

Aus dem Lehrstuhl
für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. med. Christoph A. Klein

**Identifizierung und Charakterisierung von disseminierten
Tumorzellen bei Nicht-Kleinzelligem Lungenkrebs**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Mederer

2022

Aus dem Lehrstuhl
für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. med. Christoph A. Klein

**Identifizierung und Charakterisierung von disseminierten
Tumorzellen bei Nicht-Kleinzelligem Lungenkrebs**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Tobias Mederer

2022

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph A. Klein

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Stefan Hofmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17. März 2022

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	XI
1 Einleitung	13
1.1 Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom	13
1.1.1 Epidemiologie	13
1.1.2 Genetik und Therapie	13
1.1.3 Prognose	15
1.2 Tumorentstehung und Metastasierung	16
1.3 Modelle der Tumorprogression	18
1.4 Minimale Resterkrankung	19
1.5 Detektion und klinische Relevanz von DTCs	19
1.6 Zielsetzung	22
2 Materialien	24
2.1 Enzyme, Chemikalien, Reagenzien und Kits	24
2.2 Puffer, Lösungen und Medien	27
2.3 Antikörper und Microbeads	29
2.4 Oligonukleotide und Primer	30
2.5 Verbrauchsmaterialien	33
2.6 Geräte	34
2.7 Datenbanken und Software	36
3 Methoden	37
3.1 Probengewinnung	37
3.1.1 Aufarbeitung von Lymphknoten	37
3.1.2 Aufarbeitung von Knochenmark	38
3.1.3 Negative immunomagnetische Depletion von Knochenmark	39
3.1.4 Aufarbeitung von frischen Primärtumoren	39
3.1.5 Herstellung von Haftobjektträgern	40
3.1.6 Aufarbeitung von FFPE Blöcken	40
3.1.7 EpCAM-PE Suspensionsfärbung	41

3.1.8	Polymer-Alkalische Phosphatase Immunfärbung auf HOT	41
3.2	Mikromanipulation von Einzelzellen.....	42
3.2.1	Mikromanipulation von Einzelzellen in Suspension.....	42
3.2.2	Mikromanipulation von Einzelzellen von HOTs	43
3.3	Amplifikation des polyadenylierten Transkriptoms	43
3.3.1	Reamplifikation des Transkriptoms	45
3.4	Amplifikation des Genoms	46
3.4.1	Aufarbeitung des Genoms bei kombinierter Genom- und Transkriptom Amplifikation	46
3.4.2	Amplifikation des Genoms.....	46
3.4.3	Amplifikation von FFPE DNA	48
3.4.4	Reamplifikation des Genoms	48
3.5	PCR Qualitätskontrolle der Genom- und Transkriptom-Amplifikate	49
3.6	Primerdesign und -etablierung.....	49
3.6.1	Primerdesign.....	49
3.6.2	Gradienten-PCR	50
3.6.3	qRT-PCR-Testung mittels Standard- und Schmelzkurve	51
3.6.4	Restriktionsverdau des PCR Produktes.....	52
3.7	Genspezifische PCR.....	53
3.8	Gel-Elektrophorese	53
3.8.1	Manuelle Agarosegel-Elektrophorese	53
3.8.2	Automatisierte Kapillarelektrophorese mittels QIAxcel®.....	54
3.9	DNA Aufreinigung	54
3.9.1	QIAquick PCR Purification Kit	55
3.9.2	Agencourt AMPure XP beads	55
3.10	DNA Quantifikation.....	55
3.10.1	NanoDrop™ 2000c Messung.....	55
3.10.2	Qubit® Messung	56
3.10.3	Agilent 2100 Bioanalyzer Messung	56
3.10.4	KAPA Library Quantification Kit.....	56
3.11	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	57
3.12	Sanger-Sequenzierung	58
3.13	Next-Generation-Sequencing.....	58
3.13.1	Aufarbeitung des Transkriptoms für RNA-Seq	58

3.13.2	Aufarbeitung des Genoms für Ampli1™ LowPass Sequenzierung.....	60
3.13.3	NGS Pooling mittels MiSeq Sequenzierung	61
3.14	Statistische Auswertung der Daten	62
3.14.1	Statistische Tests	62
3.14.2	Hierarchische Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse.....	62
3.15	Bioinformatische Auswertung der NGS Daten.....	63
3.15.1	Auswertung der RNA-Seq Daten.....	63
3.15.2	Auswertung der LowPass Daten	63
3.15.2.1	Erstellen der kumulativen Copy-Number-Profile.....	64
3.15.2.2	Vergleichende Analyse der kumulativen Copy-Number-Profile	64
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Kollektiv an untersuchten Patienten mit Nicht-Kleinzelligem Lungenkrebs	65
4.1.1	Übersicht über das Gesamtkollektiv mit Nachweis von BerEp4 und A45-positiven Einzelzellen	66
4.1.2	Übersicht über das EpCAM-Kollektiv mit Nachweis von HEA-125-positiven Einzelzellen	66
4.1.3	Vergleich der Methoden und Marker zur Identifizierung von DTCs.....	69
4.1.4	Übersicht über die nicht-onkologischen Kontrollpatienten	71
4.2	Klinisch-pathologische Korrelationen	71
4.2.1	Korrelation von klinischen Daten mit dem Nachweis von BerEp4 bzw. A45-positiven Einzelzellen.....	71
4.2.2	Korrelation von klinischen Daten und dem Nachweis von HEA-125-positiven Einzelzellen	75
4.2.3	Direkter Vergleich der verwendeten Methoden und Marker zum Nachweis von DTCs	79
4.2.4	Korrelation des Nachweises von DTCs zu pathologisch bestimmten Parametern ..	81
4.3	Identifizierung von disseminierten Tumorzellen	83
4.3.1	Identifizierung von disseminierten Tumorzellen mittels PCR-basierter Genexpressionsanalyse.....	83
4.3.1.1	Etablierung einer Endpoint-PCR für ausgewählte Transkripte	83
4.3.1.2	Genetische Charakterisierung von EpCAM-positiven Einzelzellen aus Tumor- und Kontrollpatienten mit genspezifischen PCRs.....	86

4.3.1.3	Quantitativer EpCAM und CD45 Nachweis mittels qRT-PCR in Einzelzell-Transkriptomen	94
4.3.1.4	Korrelation der EpCAM mRNA Expression mit klinischen Daten	97
4.3.2	Identifizierung von disseminierten Tumorzellen mittels TP53 Sequenzierung ...	99
4.4	Systematische genetische Analyse mittels Genom-/Transkriptom Sequenzierung ..	101
4.4.1	LowPass Genom-Sequenzierung der isolierten Einzelzellen.....	101
4.4.1	Analyse der Genomaberrationen von Einzelzellen, Primärtumoren und Metastasen	106
4.4.1.1	Analyse der kumulativen Genomprofile der isolierten Einzelzellen.....	108
4.4.1.2	Evaluation der Zytokeratin-Färbung zum Nachweis von DTCs in Lymphknoten	111
4.4.1.3	Vergleichende Analyse der Genomaberrationen von Einzelzellen und Primärtumoren bzw. Metastasen	112
4.4.2	Analyse von Primärtumoren mit und ohne Nachweis systemischer Streuung...	117
4.4.3	Genetischen Charakterisierung der isolierten Einzelzellen mittels RNA-Seq ...	117
5	Diskussion.....	130
5.1	Nachweis und klinische Relevanz von DTCs mit BerEp4 bzw. A45-Färbung	130
5.2	Identifizierung von echten disseminierten Tumorzellen.....	135
5.3	Systematische genomische und transkriptomische Charakterisierung von DTCs....	140
5.4	Schlussfolgerung.....	146
6	Zusammenfassung	151
7	Anhang.....	153
7.1	CNV Profile von NSCLC Primärtumoren ohne DTC Nachweis.....	153
7.2	CNV Profile von NSCLC Proben mit DTC Nachweis	154
8	Literaturverzeichnis	198
9	Danksagung.....	215
10	Lebenslauf	216
11	Eidesstattliche Erklärung	218

Abkürzungsverzeichnis

-	negativ	MET	mesenchymale-epitheliale Transition
+	positiv	min	Minute
A	Adenin	MNZ	mononukleäre Zellen
ATP	Adenosintriphosphat	MOPC	Maus Eizellen-Plasmozytom
bp	Basenpaar	MRD	minimale Resterkrankung
BSA	Rinderserumalbumin	mRNA	messenger RNA
C	Cytosin	n	Anzahl
cdNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	NA	nicht verfügbar
CK	Zytokeratin	NGS	next generation sequencing
CNV	Kopienzahlvariante	NSCLC	Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom
dd	didesoxy	OPA	One-Phor-All
DEPC	Diethylpyrocarbonat	OS	Gesamtüberleben
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PAA	Polyacrylamid Carrier
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
DTC	Disseminierte Tumorzelle	PCA	Hauptkomponentenanalyse
DTT	Dithiothreitol	PCR	Polymerase Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	PE	Phycoerythrin
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	PFS	progressionsfreies Überleben
EIT	epithelial immune cell-like transition	PNA	Poly-T-Peptid-Nukleinsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition	PT	Primärtumor
EpCAM	Epitheliales Zelladhäsionsmolekül	QC	Qualitätskontrolle
EZM	extrazelluläre Matrix	qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
FCS	Fötale Kälberserum	RNA	Ribonukleinsäure
FDR	Falscherkennungsrate	rpm	Rotationen pro Minute
FITC	Fluorescein-isothiocyanat	SD	Standardabweichung
G	Guanin	SDS	Natriumlaurylsulfat
g	Beschleunigung	sec	Sekunde
gdNA	genomische Desoxyribonukleinsäure	SEM	Standardfehler des Mittelwertes
GTP	Guanosintriphosphat	T	Thymin
h	Stunde	T_A	Annealingtemperatur
H₂O	Wasser	TBE	Tris/Borat/EDTA Puffer
HD	gesunder Patient	TdT	terminale Desoxynukleotidyl Transferase
ICC	Immunzytochemie	TEMED	Tetramethylethylenediamin
ICH	Immunhistochemie	tRNA	Transfer RNA
IF	Immunfluoreszenz	U	Uracil
Kb	Kilobase	u	unit / Einheit
KM	Knochenmark	WGA	Whole Genome Amplification
M0	ohne Fernmetastasen	WTA	Whole Transcriptome Amplification
M1	mit Fernmetastasen	wt	Wildtyp
MACS	Magnet-assistierte Zellseparation	KRT	Keratin
Mb	Megabase	LK	Lymphknoten
met	Metastase	mut	mutiert

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: NSCLC Überlebensraten nach pT-Stadium	15
Abbildung 2: "The Hallmarks of Cancer"	16
Abbildung 3: Schema der Metastasierungskaskade	17
Abbildung 4: Modell der parallelen Progression	18
Abbildung 5: Schema des Studienablaufs	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Restriktionsverdau	53
Abbildung 7: Schema und Zielsetzung der Doktorarbeit.....	65
Abbildung 8: Korrelation der Färbemethoden und verwendeten Marker zur Isolierung von DTCs	70
Abbildung 9: Vergleichende Analyse der Anzahl der disseminierten Tumorzellen (DCCD).....	70
Abbildung 10: OS/PFS bei dem Nachweis von BerEp4/A45-positiven Zellen in LK/KM.....	72
Abbildung 11: OS/PFS bei negativem und positivem N-Status.....	73
Abbildung 12: OS/PFS bei pN0 Patienten und Nachweis von BerEp4-positiven Zellen im LK	73
Abbildung 13: OS/PFS bei dem Nachweis von HEA-125-positiven Zellen in LK/KM.....	76
Abbildung 14: OS/PFS bei pN0 Patienten und Nachweis von HEA-125-positiven Zellen im LK	77
Abbildung 15: Analyse des OS /PFS bei dem Nachweis von A45- oder HEA-125-positiven Zellen im KM	80
Abbildung 16: Analyse des OS/PFS bei dem Nachweis von BerEp4- oder HEA-125-positiven Zellen im LK...	81
Abbildung 17: Gradienten-PCRs und Restriktionsverdau neu etablierter Primer	85
Abbildung 18: Expression von epithelialen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem KM	86
Abbildung 19: Expression von epithelialen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem LK	87
Abbildung 20: Vergleich von EpCAM Genexpression in LK und KM.....	87
Abbildung 21: Expression von hämatopoietischen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem KM.....	88
Abbildung 22: Expression von hämatopoietischen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem LK.....	88
Abbildung 23: Expression von erythropoietischen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem KM.....	90
Abbildung 24: Expression von erythropoietischen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem LK.....	91
Abbildung 25: Expression von mesenchymalen und Tumor-assoziierten Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem KM.....	91

Abbildung 26: Expression von mesenchymalen und Tumor-assoziierten Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem LK.....	92
Abbildung 27: Hierarchische Clusteranalyse der genspezifischen Expressionsanalyse	93
Abbildung 28: Hauptkomponentenanalyse der PCR-Ergebnisse der HEA-125+ Zellen aus dem LK	94
Abbildung 29: Standardkurven der EpCAM und CD45 qRT-PCR Primer	95
Abbildung 30: Schmelzkurven der EpCAM und CD45 qRT-PCR Primer	96
Abbildung 31: Ergebnisse der EpCAM und CD45 qRT-PCR.....	96
Abbildung 32: OS bei EpCAM mRNA-positiven vs. EpCAM mRNA-negativen Zellen in KM und LK.....	98
Abbildung 33: OS bei EpCAM mRNA-positiven vs. HEA-125 oder mRNA-negativen Zellen in KM oder LK.	98
Abbildung 34: OS bei EpCAM mRNA-positiven vs. HEA-125 oder mRNA-negativen pN0 Lymphknoten.....	99
Abbildung 35: Übersicht über TP53 Sanger Sequenzierung der HEA-125+ Einzelzellen aus LK und KM.....	100
Abbildung 36: Anteil an TP53-Mutationen in dem untersuchten Kollektiv	100
Abbildung 37: Beispiel eines CNV-Profiles mit guter und schlechter Qualität	102
Abbildung 38: Anteil an aberranten Zellen in Knochenmark und Lymphknoten.....	103
Abbildung 39: Anteil an aberranten Zellen bei N0 und N+ Lymphknoten.....	103
Abbildung 40: Zusammenhang zwischen aberrantem Profil und dem DCCD	104
Abbildung 41: Anteil an aberranten Zellen an HEA-125+ und EpCAM mRNA+ und mRNA- Zellen.....	104
Abbildung 42: Heatmap aller Genomaberrationen der untersuchten Proben.....	105
Abbildung 43: Anzahl der autosomalen Genomaberrationen	106
Abbildung 44: Anteil der Aberrationen am gesamten autosomalen Genom.....	107
Abbildung 45: Korrelation von Aberrationen und DCCD im Lymphknoten	107
Abbildung 46: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten N0 LK (HEA-125) Proben	108
Abbildung 47: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten N0 LK (BerEp4) Proben	108
Abbildung 48: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten N+ LK (HEA-125) Proben.....	109
Abbildung 49: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten N+ LK (BerEp4) Proben	109
Abbildung 50: Unterschiede von CNVs bei HEA-125 und BerEp4-positiven Zellen von pN+ Patienten.....	109
Abbildung 51: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten KM (HEA-125) Proben.....	110

Abbildung 52: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten KM (A45) Proben.....	110
Abbildung 53: Unterschiede von CNVs bei HEA-125 und A45-positiven Zellen im KM	110
Abbildung 54: Unterschiede von CNVs bei HEA-125-positiven Zellen von pN0 und pN+ LK.....	111
Abbildung 55: Unterschiede von CNVs bei BerEp4-positiven Zellen von pN0 und pN+ LK.....	111
Abbildung 56: Vergleich von HEA-125, BerEp4 und A45 in Lymphknoten von 2 ausgewählten Patienten	111
Abbildung 57: Kumulative CNV-Profile von zwei Patienten mit EpCAM und A45-positiven LK Zellen	112
Abbildung 58: Anteil der gemeinsamen aberranten autosomalen Genomabschnitte von DTCs und PTs.....	113
Abbildung 59: Zwei Beispiele von gemeinsamen Aberrationen zwischen Primärtumor und DTC	114
Abbildung 60: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten PT Proben.....	114
Abbildung 61: Unterschiede von CNVs von PT und HEA-125-positiven Zellen aus dem LK.....	115
Abbildung 62: Unterschiede von CNVs von PT und BerEp4-positiven Zellen aus dem LK.....	115
Abbildung 63: Unterschiede von CNVs zwischen PT und HEA-125 und A45-positiven Zellen aus KM.....	116
Abbildung 64: Vergleich der CNVs von DTCs mit dem Primärtumor und Metastasen.....	116
Abbildung 65: Kumulative CNV-Profile von PT mit und ohne Nachweis einer systemischen Disseminierung	117
Abbildung 66: Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq Proben	118
Abbildung 67: Unterscheidung von Knochenmark und Lymphknoten Zellen anhand von RNA-Seq.....	119
Abbildung 68: DCCDs der untersuchten Proben je RNA-Seq Gruppe.....	120
Abbildung 69: Markierung der aberranten Zellen in der RNA-Seq PCA.....	121
Abbildung 70: Top 20 der hochregulierten Gene der 5 RNA-Seq Cluster	123
Abbildung 71: Top 20 der herunterregulierten Gene der 5 RNA-Seq Cluster.....	124
Abbildung 72: Analyse der Expression von früh-erythropoietischen Markern	126
Abbildung 73: OS und PFS von NSCLC Patienten anhand der 5 RNA-Seq Gruppen.....	127
Abbildung 74: EpCAM Expression in der RNA-Seq PCA.....	127
Abbildung 75: Expression von EpCAM und CD45 in den 5 RNA-Seq Gruppen	128
Abbildung 76: Korrelation zwischen Höhe der EpCAM Expression und dem DCCD	128
Abbildung 77: Expression von MKI67 in den 5 RNA-Seq Gruppen und.....	129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nachweis von CK/EpCAM positiven Mikrometastasen/DTCs in NSCLC	21
Tabelle 2: Verwendete Enzyme, Chemikalien, Reagenzien und Kits.....	24
Tabelle 3: Verwendete Antikörper und Microbeads	29
Tabelle 4: Primer für genomische DNA.....	30
Tabelle 5: Primer für cDNA.....	31
Tabelle 6: Oligonukleotide und Primer für die Amplifikation von cDNA und gDNA.....	33
Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien	33
Tabelle 8: Verwendete Geräte	34
Tabelle 9: Verwendete Datenbanken und Software	36
Tabelle 10: Zusammensetzung der WTA Mastermixe.....	44
Tabelle 11: Cyclor Programm WTA Amplifikation.....	45
Tabelle 12: Zusammensetzung WTA-Reamplifikation Mastermix	45
Tabelle 13: Cyclor Programm WTA-Reamplifikation	45
Tabelle 14: Zusammensetzung WGA Mastermixe	47
Tabelle 15: Cyclor Programm WGA PCR	47
Tabelle 16: Zusammensetzung WGA-Reamplifikation Mastermix.....	48
Tabelle 17: Cyclor Programm WGA-Reamplifikation	48
Tabelle 18: Zusammensetzung PCR-Qualitätskontrolle Mastermix.....	49
Tabelle 19: Gradienten-PCR Mastermix.....	50
Tabelle 20: Cyclor Programm Gradienten-PCR.....	51
Tabelle 21: Zusammensetzung qRT- PCR Mastermix.....	52
Tabelle 22: Cyclor Programm qRT- PCR	52
Tabelle 23: Zusammensetzung Genspezifische PCR Mastermix.....	53
Tabelle 24: Cyclor Programm Genspezifische PCR	54
Tabelle 25: Cyclor Programm KAPA Library Quantification	57
Tabelle 26: Zusammensetzung PCR Sanger Sequenzierung Mastermix	58

Tabelle 27: Zusammensetzung RNA-Seq Mastermix	59
Tabelle 28: Cyclor Programm RNA-Seq Reamplifizierung.....	60
Tabelle 29: Cyclor Programm RNA-Seq Reamplifizierung OLD	60
Tabelle 30: Beispiel einer 2x2 Kontingenztafel.....	62
Tabelle 31: Übersicht über die verwendeten Antikörper	66
Tabelle 32: Überblick über das NSCLC Gesamtkollektiv	67
Tabelle 33: Überblick über das HEA-125-Kollektiv	68
Tabelle 34: Cox-Regressions-Analyse des OS von Patienten analysierten KM (A45) und LK (BerEp4).....	74
Tabelle 35: Cox-Regressions-Analyse des PFS von Patienten analysierten KM (A45) und LK (BerEp4).....	75
Tabelle 36: Cox-Regressions-Analyse des OS von Patienten analysierten KM und LK (HEA-125)	78
Tabelle 37: Cox-Regressions-Analyse des PFS von Patienten analysierten KM und LK (HEA-125).....	78
Tabelle 38: Korrelation von pathologischem N-Status und MRD in LK (BerEp4 und HEA-125)	82
Tabelle 39: Korrelation von pathologischem N-Status und MRD in KM (A45 und HEA-125)	82
Tabelle 40: Korrelation von MRD in Knochenmark und MRD in LK.....	83
Tabelle 41: Untersuchte Gene mittels genspezifischer PCR.....	84
Tabelle 42: Verwendete Restriktionsenzyme und Inkubationsparameter	84
Tabelle 43: Einteilung der untersuchten Zellen in Gruppen anhand der EpCAM und CD45 Expression.....	89
Tabelle 44: DCCD-Werte der Quartile für die HEA-125 und BerEp4 Färbeergebnisse	103
Tabelle 45: Analyse der Genomaberrationen in EpCAM mRNA+ und mRNA- Zellen	104
Tabelle 46: Prozent der autosomalen Aberration des autosomalen Genoms von DTCs.....	113
Tabelle 47: Anteil von DTCs und HD Zellen in den 5 RNA-Seq Gruppen.....	119
Tabelle 48: Anteil an aberranten NSCLC Zellen in den 5 RNA-Seq Gruppen	121
Tabelle 49: Zuordnung der RNA-Seq Gruppen zu Zelltypen	122
Tabelle 50: Top 10 der aktivierten Pathways in den 5 RNA-Seq Clustern.....	125
Tabelle 51: Häufige CNVs in NSCLC Tumoren	143

1 Einleitung

1.1 Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Lungenkrebs ist mit 230.000 erwarteten Neuerkrankungen und 135.000 erwarteten Toten im Jahr 2020 für Männer und Frauen die tödlichste und zweithäufigste Tumorentität in den USA (Siegel, Miller, & Jemal, 2020). Das Nicht-Kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC) macht ca. 85% aller maligner Neoplasien der Lunge und des Bronchialsystems aus (J. R. Molina, Yang, Cassivi, Schild, & Adjei, 2008). Während vor 1990 noch Plattenepithelkarzinome (SCC) die Hauptvertreter der Lungentumoren unter Männern waren, stellt aktuell das Adenokarzinom (ADC) die häufigste histologische Untergruppe an NSCLC dar (Barta, Powell, & Wisnivesky, 2019; Devesa, Bray, Vizcaino, & Parkin, 2005; Lortet-Tieulent et al., 2014).

Diese Dynamik spiegelt die Entwicklung des modernen Tabakkonsums – den Hauptrisikofaktor für Lungenkrebs – wider (Kuper, Boffetta, & Adami, 2002). Die Einführung von Filterzigaretten und die veränderte Zusammensetzung moderner Zigaretten korrelieren mit der steigenden Inzidenz von Adenokarzinomen – mutmaßlich durch tiefere Inhalation und gesteigerter Exposition peripherer Lungenabschnitte mit inhalativen Karzinogenen (Gabrielson, 2006; Wynder & Muscat, 1995). Tabakkonsum erhöht das relative Risiko an Lungenkrebs zu erkranken um das 3-5 (Adenokarzinom) bis 15-fache (Plattenepithelkarzinom); wobei 46% (Frauen) bis 85% (Männer) der Erkrankungen an Lungenkrebs auf den Genuss von Tabak zurückgeführt wird (Kuper et al., 2002; Parkin, Pisani, Lopez, & Masuyer, 1994).

Eine besondere Gruppe an Lungenkarzinomen stellen Tumoren bei Nichtrauchern dar. Diese Art von Lungenkrebs macht insgesamt bis zu 25% aller NSCLC Fälle aus (Sun, Schiller, & Gazdar, 2007) und tritt mit bis zu 85% als Adenokarzinom auf (Couraud et al., 2015).

1.1.2 Genetik und Therapie

Für das NSCLC im Stadium I-II stellt die operative Resektion des kompletten Tumors in der Regel die Therapie der Wahl dar. Eine adjuvante Behandlung mit einer Platin-basierten dualen Chemotherapie ist im Stadium II-IIIa indiziert, wobei unter Abwägung der Risiken bereits im Stadium IB eine Chemotherapie und im Stadium IIIa eine zusätzliche Radiatio möglich ist (Guideline program oncology (German Cancer Society, German Cancer Aid, AWMF), 2018; Kris et al., 2017; Vansteenkiste et al., 2014). Bei fortgeschrittenen und nicht resektablen Tumoren spielen individuelle Faktoren (z.B. Ausmaß des Lymphknotenbefalls) eine große

Rolle und die Therapie muss interdisziplinär besprochen und mit einer Kombination aus Chemotherapie, Radiatio und operativer Resektion (sofern komplette Resektion möglich) erfolgen (NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group, 2008; Varela & Thomas, 2014).

Die personalisierte Medizin hat insbesondere in der Therapie von Adenokarzinomen der Lunge einen großen Stellenwert eingenommen. Nach der Markteinführung eines Tyrosinkinaseinhibitors konnte retrospektiv gezeigt werden, dass der Wirkmechanismus auf einer aktivierenden Mutation des EGFR-Gens beruht (Lynch et al., 2004; Paez, 2004). In den letzten zwei Jahrzehnten konnten durch große genetische Studien von Plattenepithel- und Adenokarzinomen der Lunge einige weitere Mutationen und Alterationen identifiziert werden, die eine zielgerichtete Therapie („*targeted therapy*“) möglich machen (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2012, 2014). Bisher finden diese *targeted therapies* fast ausschließlich Anwendung bei Adenokarzinomen, wobei auch bei Plattenepithelkarzinomen zunehmend therapierbare Ziele gefunden und diese Therapien erprobt werden (Hammerman et al., 2011; Rooney, Devarakonda, & Govindan, 2013; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2012).

Neben der konventionellen histologischen Einteilung von NSCLC hat somit – insbesondere bei fortgeschrittenen Adenokarzinomen – eine genetische Untersuchung mit der Zuordnung zu molekularen Subtypen (z.B. EGFR^{mut}, KRAS^{mut}) Einzug in die klinische Routine bekommen. (E. S. Kim et al., 2011; Lazarus & Ost, 2013). Zusätzlich zu der genetischen Testung und Entwicklung von *targeted therapies* haben sich weitere therapeutische Strategien durchgesetzt, die spezielle Eigenschaften von Tumoren adressieren. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen den VEGF-Pathway (sog. Angiogenese-Inhibitoren) eröffnete neue Therapiemöglichkeiten für fortgeschrittene Lungentumoren (Reck et al., 2009; Sandler et al., 2006, 2010). Zum anderen konnte mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle *programmed cell death protein 1* (PD-1) bzw. *programmed cell death 1 ligand 1* (PD-L1) eine Aktivierung des Immunsystems gegen den Tumor erzielt werden, das sich signifikant auf das (rezidivfreie) Überleben von NSCLC-Patienten auswirkte (Brahmer et al., 2015; Kazandjian, Suzman, et al., 2016). Diese Moleküle spielen als Korezeptoren und -liganden eine natürliche Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen und vermitteln die Abwehr von Autoimmunantworten (Carter et al., 2002; Freeman et al., 2000). In Tumoren sind diese Proteine oftmals übermäßig exprimiert, was zu einer verminderten immunologischen Reaktion auf den Tumor führt (Iwai et al., 2002; Konishi, 2004). Immun-Checkpoint-Inhibitoren haben die Therapie vieler

Tumoren, einschließlich der Therapie von NSCLC, revolutioniert und sind Inhalt vieler klinischen Studien.

1.1.3 Prognose

Lungenkrebs hat mit über 18% aller Krebs-bedingten Todesfälle im Jahr 2018 mit Abstand die höchste Mortalität unter malignen Tumoren (Bray et al., 2018). Diese schlechte Prognose lässt sich zum Teil durch die sehr hohe Rate an spät diagnostizierten Tumoren erklären. Bei ca. 40% aller Patienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein Stadium IV (Fernmetastasen) mit einer 5-Jahres Überlebensrate von nur 22% vor (Morgensztern, Ng, Gao, & Govindan, 2010; Rami-Porta et al., 2007). Darüber hinaus ist die Prognose auch bei früheren Stadien und auch nach kompletter Resektion des Tumors schlecht. Je nach initialer Tumorgöße und -ausbreitung versterben 23-59% aller Patienten innerhalb von 5 Jahren (Rami-Porta et al., 2007).

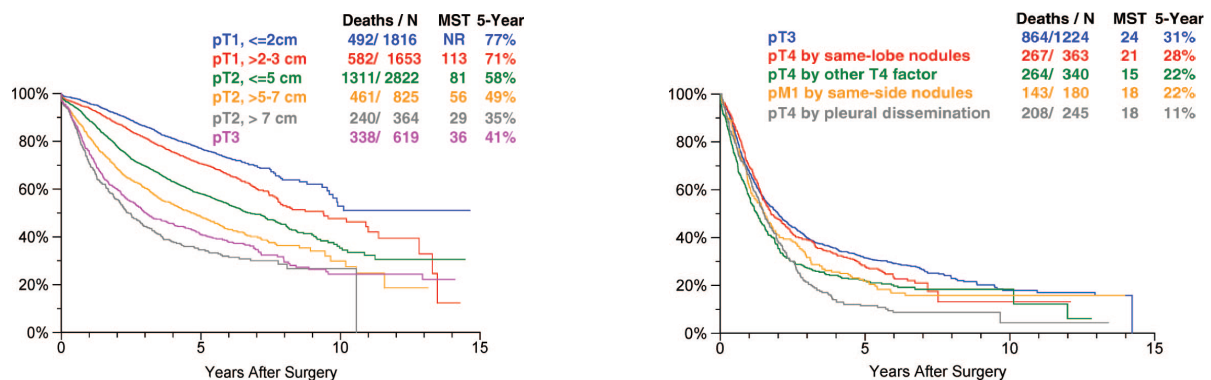


Abbildung 1: NSCLC Überlebensraten nach pT-Stadium

Die Kaplan-Meier Kurven zeigen die 5-Jahres Überlebensraten bei lokalisierten (links) und fortgeschrittenen (rechts) NSCLC nach dem pathologischen T-Stadium der TNM-Klassifikation. (Rami-Porta et al., 2007)

Die Einführung neuer pharmakologischer Therapien, insbesondere von *targeted therapies* und der Immuntherapie für das NSCLC konnte besonders das Überleben von metastasierten NSCLC bereits signifikant erhöhen (Brahmer et al., 2015; Kazandjian, Blumenthal, et al., 2016).

Für lokalisierte (potentiell kurativ therapierbare) Lungentumoren konnte die 5-Jahres Überlebensrate in den letzten 30 Jahren von 45,3% (1988) auf 58,2% (2020) angehoben werden (Lu et al., 2019). Dieser Fortschritt ist neben der medikamentösen Therapie auch auf neue operative Methoden wie Roboter- und Video-assistierte Verfahren (Cao et al., 2013; Liang et al., 2018) und verbesserte Radiotherapien (Aupérin et al., 2010) zurückzuführen.

1.2 Tumorentstehung und Metastasierung

Bösartige Tumoren entstehen aus gesundem Gewebe durch die schrittweise Aneignung von Eigenschaften, die das Überleben und ein infiltrativ-destruierendes Fortschreiten der Erkrankung möglich machen (Bertram, 2000; Greene, 1940; Rous & Beard, 1935). Hanahan und Weinberg postulierten, dass alle bösartige Tumoren fundamentale Charakteristika aufweisen (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011). Dazu gehört u.a. die Fähigkeit zur eigenen Versorgung (durch Angiogenese und proliferativen Signalen) und die Abwehr von schädigenden Einflüssen (Zelltod, Immunsystem, Wachstums-Hemmsignalen). Insbesondere die Akkumulation von genetischen Veränderungen wie z.B. Mutationen, erlaubt es Zellen, diese Eigenschaften zu erwerben. Dies führt zur unkontrollierten Vermehrung von Tumorzellen und einem invasiven Wachstum, das letztendlich in der Besiedlung anderer Organe mit Tochtergeschwülsten („Metastasen“) endet. (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011).



Abbildung 2: "The Hallmarks of Cancer"

Fundamentale Eigenschaften von malignen Tumoren nach Hanahan & Weinberg (2011)

Primärtumoren können sich durch kontinuierliches Wachstum in dem betroffenen Organ (*per continuitatem*) oder durch Infiltration von Lymph- und/oder Blutgefäßen ausbreiten. Diese lymphogene bzw. hämatogene Ausbreitung von Tumorzellen – auch Disseminierung genannt – stellt einen der ersten Schritte der sog. „Metastasierungskaskade“ dar (Pantel & Brakenhoff, 2004). Tumorzellen verändern ihre Zelleigenschaften und unterlaufen der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT), wobei dieser mesenchymale Phänotyp mit einem gesteigerten Migrationsvermögen einhergeht (Weinberg, 2014). Sofern die zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) überleben, können sie in anderen Organen wieder aus dem Gefäßsystem austreten und Mikro- bzw. Makrometastasen bilden (Fidler, 2003; Pantel & Brakenhoff, 2004;

Poste & Fidler, 1980). In dem Endorgan können disseminierte Tumorzellen (DTCs) jahrelang in einer ruhenden („*dormant*“) Phase überleben, bevor sie Metastasen ausbilden (Aguirre-Ghiso, 2007; Luzzi et al., 1998).

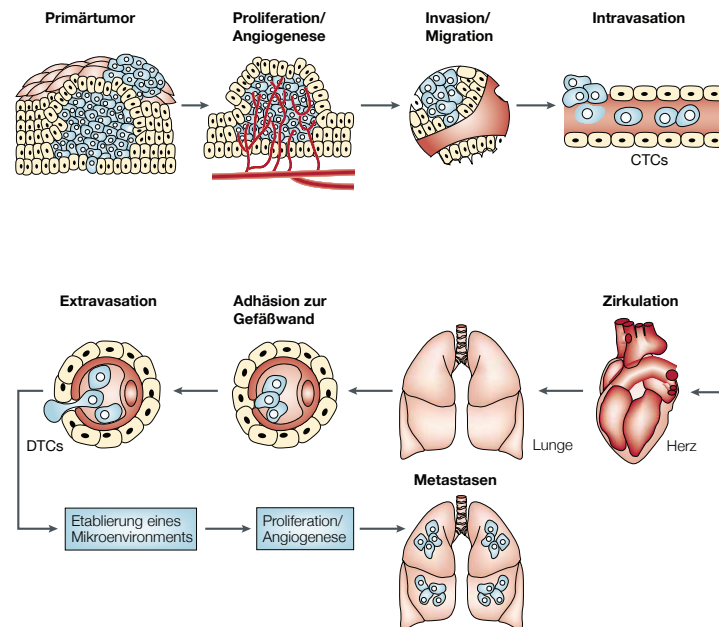


Abbildung 3: Schema der Metastasierungskaskade

Dieses Schema gibt einen Überblick über die Metastasierungskaskade. Tumorzellen migrieren zu den einwachsenden Blutgefäßen und gelangen in die systemische Zirkulation (CTCs). Im Endorgan haften sie sich an die Gefäßwand an und treten aus dem Gefäß aus (DTCs). Dort können diese Zellen erneut proliferieren und Metastasen bilden. Modifiziert nach Fidler, 2003.

Die metastatische Kolonisation von Organen ist durch die Effizienz der einzelnen Schritte der Disseminierung limitiert. In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass diese jedoch mit jedem Schritt der Kaskade abnimmt. Lediglich 0,01-0,02% von injizierten Tumorzellen können Metastasen bilden (Fidler, 1970; Luzzi et al., 1998), wobei manche Autoren von einer noch niedrigeren Rate ausgehen (Valastyan & Weinberg, 2011). Zudem konnte bereits 1889 gezeigt werden, dass die Besiedlung von Endorganen mit Metastasen nicht willkürlich geschieht und es einen gewissen Tropismus der Tumorzellen für bestimmte Organe gibt („seed and soil“ Hypothese) (Paget, 1889; Poste & Fidler, 1980).

Das Überleben von Tumorpatienten ist in den meisten Fällen nicht durch den Primärtumor, sondern durch die metastatische Erkrankung begrenzt (Gupta & Massagué, 2006; Nichols, Saunders, & Knollmann, 2012; Steeg, 2006). Welche Zellen Metastasen bilden können und welche (genetischen) Eigenschaften diese Zellen aufweisen ist bislang noch unzureichend geklärt. Therapeutische Strategien, die das Auswachsen von metastatischen Vorläuferzellen verhindern, könnten daher von sehr großer Bedeutung für die Behandlung von Tumoren sein.

1.3 Modelle der Tumorprogression

Es haben sich zwei grundlegende Modelle der Tumorprogression etabliert: Die Beobachtung, dass metastatische Tumorzellen ein höheres Potenzial besitzen, erneut Tumoren zu bilden (Fidler, 1973) bekräftigt dabei das Modell der linearen Progression. Dieses vertritt die Annahme, dass es sich bei der Disseminierung um eine lineare Kaskade handelt und (Zweit-)Metastasen aus Metastasen entstehen (Bross, Viadana, & Pickren, 1975; Fearon & Vogelstein, 1990; Weinberg, 2008).

Dahingegen konnten Untersuchungen von Tumor-Verdopplungszeiten zeigen, dass Metastasen bereits viel früher auftreten, als sie nach dem linearen Modell entstehen sollten (Collins, Loeffler, & Tivey, 1956). Zudem konnten disseminierte Tumorzellen in bereits sehr frühen Stadien der Primärtumorentwicklung nachgewiesen werden (Hüsemann et al., 2008). Das Modell der parallelen Progression geht demnach davon aus, dass sich metastatische Vorläuferzellen früh und direkt aus dem Primärtumor absiedeln und sich (genetisch) unabhängig entwickeln (Klein, 2009). Dieses Modell erklärt dementsprechend auch die erheblichen genetischen Unterschiede, die zwischen Metastasen und Primärtumoren in verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen werden können (Albanese et al., 2004; Kuukasjärvi et al., 1997).

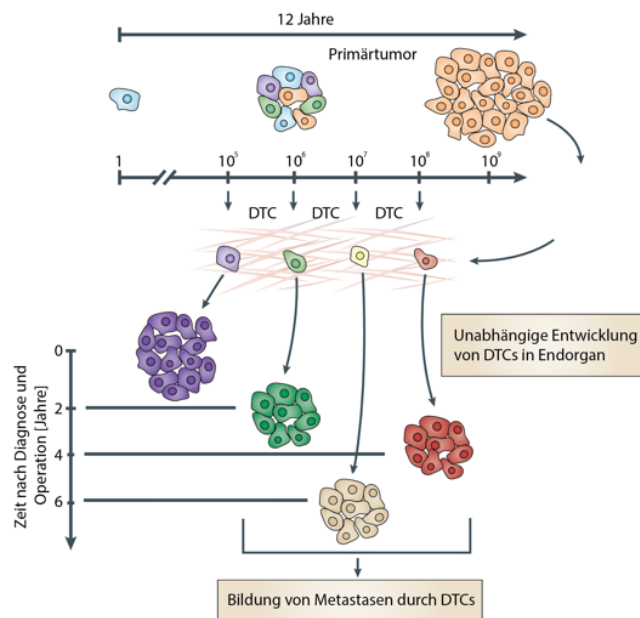


Abbildung 4: Modell der parallelen Progression

Bereits früh in der Tumorentwicklung (vor Diagnose) streuen Tumorzellen in mehreren Wellen der Disseminierung) und entwickeln sich unabhängig vom Primärtumor im Endorgan. Nach einer ruhenden Phase von bis zu mehreren Jahren können DTCs Metastasen bilden. Modifiziert nach Klein, 2009

1.4 Minimale Resterkrankung

Die minimale Resterkrankung (*minimal residual disease, MRD*) ist bei hämatologischen Erkrankungen als prognostischer Marker schon lange etabliert (van Dongen et al., 1998) und „bezeichnet eine kleine Anzahl von malignen Zellen, die während und nach scheinbar erfolgreicher Therapie, wenn der Patient in Remission ist, noch im Körper verweilen und Hauptgrund für einen möglichen Relapse (Rückfall) der Erkrankung sein können“ (Arnemann, 2019). Durch neue und hoch sensitive Methoden können neben Tumorzellen nun sogar extrazelluläre Tumorbestandteile (zirkulierende Tumor-DNA und RNA oder extrazelluläre Vesikel) in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden („*liquid biopsies*“) die man im weiteren Sinne ebenfalls zu der MRD zählen kann (Klaus Pantel & Alix-Panabières, 2019).

Der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen ist in vielen soliden Tumoren etabliert (Chemi et al., 2019; Cohen et al., 2008; Cristofanilli et al., 2004; de Bono et al., 2008; Hayes, 2006) und seit 2004 in den USA mit dem CellSearch™ System als prognostischer Test für metastatisches Brust-, Prostata- und Kolonkarzinom zugelassen. Seit 2016 wird in den USA auch die Untersuchung von zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) zur Detektion von EGFR Mutationen bei NSCLC-Patienten mit therapeutischer Konsequenz durchgeführt (Chabon et al., 2016; Kwapisz, 2017).

1.5 Detektion und klinische Relevanz von DTCs

Bei der Detektion von disseminierten Tumorzellen hat sich der (immunhistologische bzw. immunzytologische) Nachweis von Zellen mit epithelialen Markern in mesenchymalen Geweben wie Knochenmark und Lymphknoten durchgesetzt (Bernward Passlick et al., 1994; Schlimok et al., 1987). Zytokeratine sind Intermediärfilamente, die eine mechanische Stabilität in epithelialen Zellen ermöglichen und auch bei epithelialen Tumoren nachweisbar sind (Moll, Divo, & Langbein, 2008). Das *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM) wird in Gewebstammzellen und in der embryonalen Entwicklung exprimiert und vermittelt Zell-Zell-Kontakte in Epithelien (Munz, Baeuerle, & Gires, 2009). Als Tumor-assoziiertes Antigen ist es zudem vermehrt in Karzinomen und Tumorstammzellen exprimiert (Gires, Klein, & Baeuerle, 2009; Went et al., 2006).

Obwohl der Nachweis CK bzw. EpCAM-positiver Zellen in mehreren Studien ein reduziertes rezidivfreies und Gesamtüberleben der Patienten zeigen konnte (Harbeck, Untch, Pache, &

Eiermann, 1994; Köllermann et al., 2008; Riethdorf, Wikman, & Pantel, 2008), ist der Nachweis von DTCs bislang nicht in der klinischen Testung etabliert.

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass sich Primärtumoren, DTCs und Metastasen genetisch erheblich unterscheiden (Klein et al., 2002; Stoecklein & Klein, 2010). Diese Beobachtung macht die frühe Disseminierung von Tumorzellen und eine Primärtumor-unabhängige Entwicklung dieser Zellen wahrscheinlich (Modell der parallelen Progression; Klein, 2009). So zeigte eine Studie bei Brustkrebs zum Beispiel, dass der Her2-Status von DTCs aus dem Knochenmark in nur 51% mit dem Primärtumor übereinstimmte (Hartkopf et al., 2013).

Durch die Etablierung von Methoden, die die Amplifikation von Genomen und Transkriptomen einzelner Zellen erlaubten (Hartmann & Klein, 2006; Klein et al., 1999; Klein, Zohlhöfer, Petat-Dutter, & Wendler, 2003) können DTCs (und CTCs) nun auch auf genetischer Ebene untersucht werden.

Bei NSCLC gibt es bisher eine Reihe an Studien, die sich mit der klinischen Relevanz von DTCs befassen (siehe Tabelle 1). Obwohl das (rezidivfreie) Überleben in manchen Studien mit dem Nachweis von DTCs aus LK und/oder KM korrelierte, konnte dieser Effekt nicht immer gezeigt werden (Tabelle 1). Eine mögliche Erklärung hierfür ist das natürliche Vorkommen von CK und EpCAM-positiven Zellen bei gesunden Menschen, die vermutlich hämatopoietische (erythroide) Zellen mit exprimierten epithelialen Marker darstellen (Armeanu, Müller, & Klein, 2000; Choismel et al., 2004; Eisenwort et al., 2011; Lammers et al., 2002). Daher ist bei diesen Nachweismethoden Vorsicht geboten und eine weitergehende genetische Charakterisierung sinnvoll.

Tabelle 1: Nachweis von CK/EpCAM positiven Mikrometastasen/DTCs in NSCLC

Autor	Stage	Patienten	Antikörper (Klon)	Probe	Positivität	Klinische Relevanz
(Cote et al., 1995)	I-IV	47	CK (AE-1, CAM 5.2)	KM	44,68%	DFS ↓
(Ohgami et al., 1997)	I-III	39	CK (CK2)	KM	38,46%	DFS ↓
(K Pantel et al., 1996) / (Passlick et al., 1999)	I-III	139	CK (CK2)	KM	59,71%	DFS/OS ↓
(Sugio et al., 2002)	I-III	58	CK (CK2)	KM	46,55%	OS ↓
(Ruffato et al., 2009)	pN0 + M0	68	CK (MNF116)	KM	25,00%	OS/DFS ↓¹
(Nosotti et al., 2008)	I-II	152	CK18 (NA)	KM	25,00%	DFS ↔
(Brunsvig et al., 2008)	I-IV	196	EpCAM (MOC31)	KM	54,59%	OS ↔
(Hsu et al., 2000)	I-IV	96	CK (AE1/AE3, MNF116) EpCAM (BerEp4)	KM	21,88%	OS/DFS ↔
(Poncelet et al., 2001)	I-III	99	CK (AE-1, CAM 5.2)	KM	22,22%	OS/DFS ↔
(Hsu et al., 2004)	I-IV	212	CK (AE1/AE3, MNF116) EpCAM (BerEp4)	KM	31,13%	OS/DFS ↔
(Rud et al., 2013)	I-III	252	EpCAM (MOC31) CK (AE1/AE3)	KM	EpCAM: 60,32% CK: 9,92%	OS/DFS ↔
(Osaki et al., 2001)	pN0	250	CK (LK: AE1/AE3, KM:CK2)	KM+LK	KM: 31,20% LK: 30,59%	DFS ↓
(Osaki et al., 2002)	I	115	CK (LK: AE1/AE3, KM:CK2)	KM+LK	KM: 27,83% LK: 27,83%	OS LK ↓ OS KM ↔
(Yasumoto et al., 2003)	I-III	351	CK (LK: AE1/AE3, KM:CK2)	KM+LK	KM: 31,91% LK: 15,74%	OS/DFS LK ↓ OS KM ↓
(Rusch et al., 2011)	I-III	1047	CK (AE-1, CAM 5.2)	KM+LK	KM: 8,04% LK: 15,29%	OS/DFS LK ↓ OS/DFS KM ↔
(Passlick et al., 1994)	I-III	72	EpCAM (BerEp4)	LK	15,28%	DFS ↓
(Wu et al., 2001)	pN0	103	CK (AE1/AE3)	LK	20,39%	OS ↓
(Ohta et al., 2001)	I	181	CK (AE1/AE3)	LK	24,31%	OS ↓
(Roh et al., 2004)	I	35	CK (AE1/AE3)	LK	40,00%	OS ↓
(Ouyang et al., 2008)	I	78	CK (AE1/AE3)	LK	26,92%	OS ↓
(Yamashita et al., 2010)	pN0	117	CK (AE1/AE3)	LK	29,91%	OS ↓
(C. D. Gu et al., 2002)	I	49	CK (AE1/AE3)	LK	34,69%	OS ↓²
(Passlick et al., 1996) / (Kubuschok et al., 1999)	I-III	125	EpCAM (BerEp4)	LK	21,60%	OS/DFS ↓
(Rena et al., 2007)	I	87	CK (AE1/AE3)	LK	16,09%	DFS ↔
(Kawano et al., 2002)	I	49	CK (AE1/AE3) EpCAM (BerEp4)	LK	26,53%	OS ↔
(Rud et al., 2016)	I-IV	128	EpCAM (MOC31)	LK	39,84%	OS/DFS ↔

Diese Tabelle bietet eine Übersicht an Studien mit dem Nachweis CK und EpCAM-positiver Zellen aus dem Knochenmark (KM, grau), Lymphknoten (LK, blau) bzw. beiden Kompartimenten (weiß) von NSCLC mit Angabe des beobachteten Gesamtüberlebens (OS) und/oder rezidivfreien Überlebens (RFS).

¹ Reduziertes OS/DFS konnte bei Patienten mit nachweisbaren DTCs mit Aneuploidien gezeigt werden. ² Der Nachweis von CK oder p53-positiven Zellen ist mit einem reduzierten Überleben assoziiert.

1.6 Zielsetzung

Trotz bestmöglicher Therapie mit kurativer Intention von Lungentumoren in frühen Stadien verstirbt eine hohe Anzahl dieser Patienten an einem Rezidiv oder einem Fortschreiten der Tumorerkrankung. Über den prognostischen Nutzen des Nachweises disseminierter Tumorzellen mittels EpCAM und CK-Färbungen bei NSCLC Patienten gibt es noch Uneinigkeit, da einige Studien einen prognostischen Effekt zeigten, während andere Publikationen die klinische Relevanz anzweifeln lassen. Der Mangel an standardisierten Nachweis-Methoden von DTCs macht einen Vergleich der Studien und eine generelle Aussage über den prognostischen Nutzen schwierig.

In dieser Studie soll (i) die klinische Relevanz CK und EpCAM-positiver Zellen aus dem Knochenmark und Lymphknoten von NSCLC Patienten untersucht werden und (ii) echte disseminierte Tumorzellen identifiziert und (iii) genetisch analysiert bzw. charakterisiert werden. Abbildung 5 gibt einen schematischen Überblick über den Ablauf des Projektes.

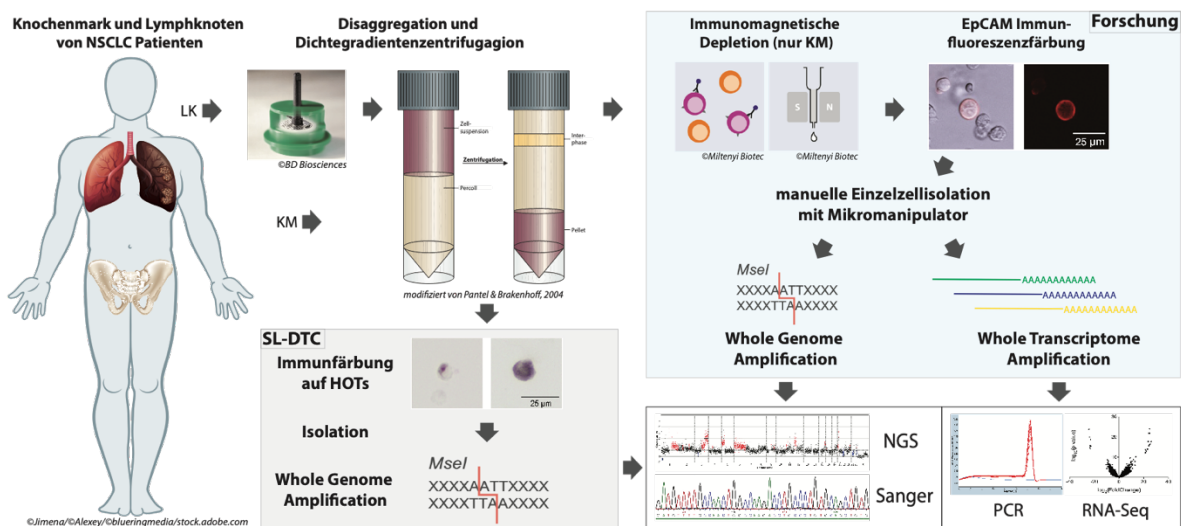


Abbildung 5: Schema des Studienablaufs

Knochenmarksaspirate und Lymphknoten werden prä- bzw. intraoperativ von NSCLC Patienten entnommen und zur weiteren Analyse eingeschickt. Es folgt die Aufarbeitung der Proben mittels Zelldisaggregation (nur LK) und Dichtegradientenzentrifugation. Im Anschluss werden CK bzw. EpCAM-positive Zellen von Haftobjektträgern isoliert. Bei einem Teil der Patienten wird zusätzlich eine EpCAM-Immunfluoreszenzfärbung in einer Lebend-Zellsuspension durchgeführt, wobei hierfür DTCs im Knochenmark mittels negativer immunmagnetischer Depletion angereichert werden. Es folgt die Isolation der positiven Einzelzellen mittels manueller Mikromanipulation und die Genom- bzw. kombinierte Genom-Transkriptom Amplifikation und weitere genetische Analysen.

Die Isolation von DTCs erfolgt sowohl mit Zytokeratin als auch mit EpCAM Antikörpern von fixierten Haftobjektträgern und aus einer Lebend-Zellsuspension. Durch die Amplifikation des Einzelzell-Genoms (A45 und BerEp4-positive Zellen) bzw. einer kombinierten Genom-

Transkriptom-Amplifikation (nur HEA-125-positive Zellen) können diese isolierten Zellen genetisch untersucht werden. Genexpressionsanalysen, der Nachweis von Mutationen und die Analyse von Kopienzahlveränderungen des Genoms erlauben die sichere Identifikation von disseminierten Tumorzellen und deren genetische Charakterisierung. Eine vergleichende Analyse von den isolierten Einzelzellen mit den Primärtumoren und im Verlauf aufgetretenen Rezidiven/Metastasen bringt Erkenntnisse über die genetische Evolution von Lungenkarzinomen und deren potentiellen Nutzen für zielgerichtete Therapien.

Anhand der zur Verfügung stehenden klinischen Follow-Up Daten kann eine Aussage über die Relevanz von DTCs als prognostischer Marker getroffen werden. Eine systematische Analyse klinischer und genetischer Daten von Subgruppen (wie z.B. CK vs. EpCAM und Haftobjektträger vs. Lebend-Zellsuspension) kann zusätzlich Auskünfte über die Sensitivität und Spezifität der einzelnen Nachweismethoden geben.

Um die Identität natürlich auftretender CK und EpCAM-positiver Zellen zu analysieren, werden neben den Tumorproben auch Knochenmarksaspirate und Lymphknoten von nicht-onkologischen Kontrollpatienten aufgearbeitet und die isolierten Zellen analysiert. Dieses Wissen und die genetischen Merkmale können zusätzlich dazu beitragen echte DTCs von gesunden Zellen zu unterscheiden.

Die systematische Analyse von DTCs als potentielle Metastasen-initiiierenden Zellen bietet die Chance, fundamentale Einblicke in die genetische Evolution von NSCLC zu gewinnen. Die Charakterisierung dieser Zellen könnte genetische Disparitäten aufdecken, die eine mögliche (adjuvante) Therapieresistenz und somit die schlechte Prognose und die hohe Rezidivrate von NSCLC nach Totalresektion und adjuvanter Therapie erklären.

2 Materialien

2.1 Enzyme, Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 2: Verwendete Enzyme, Chemikalien, Reagenzien und Kits

Bezeichnung	Firma	Artikelnummer
1 kb Plus DNA Ladder + Dye	New England Biolabs	N3200S
10x EcoRI Puffer	New England Biolabs	B7006S
5x RT Mix	Thermo Fisher Scientific	11553117
AB Serum	BioRad	805-135-MSDS
ACK Lyse Puffer	Life Technologies GmbH	A10492
Agarose	Anprotec / Biozym	AC-GN-00009, 840040
Agilent DNA 1000 Kit (300 samples)	Agilent	5067-1504
Agilent High Sensitivity DNA Kit, (110 samples)	Agilent	5067-4626
Ampli1™ LowPass Kit Illumina (Set A + Set B)	Miltenyi Silicon Biosystems	KI0040, KI0041
AMPure XP beads	Beckman Coulter	A63881, A63882
AP-Polymer anti-Maus	Zytomed Systems	ZUC077-100
Aqua ad iniectabilia	Braun	2351744
ATP Lsg. 100mM	Roche Diagnostics GmbH	11140965001
Bacto™ Peptone	Becton Dickinson	2116677
BCIP/NBT (AP-Konjugat Substrat Kit)	BioRad	170-6432
BglII (10 U/μl) 10,000 units	New England Biolabs	R1043L
Borsäure	Sigma Aldrich GmbH	31146-500g
BpuEI (5 U/μl) 500 units	New England Biolabs	R0633S
BSA	Sigma Aldrich GmbH	B8667-5ml
BSA (20 mg/ml)	Roche Diagnostics GmbH	10711454001
BSA Fraktion V	VWR International GmbH	441555J
BsmAI	New England Biolabs	R0529S
Buffer 1	Roche	11759060001
Buffer EB (250 ml)	Qiagen	19086
Collagenase	Sigma Aldrich GmbH	C9407-1G
Cutsmart Puffer	New England Biolabs	B7204S
Deparaffinization Solution	Qiagen	19093
DMEM/Ham's F12 Medium	Pan Biotech GmbH	P04-41500
DNAseI	Roche	11284932001
dNTP Set ;100 mM each A,C,G,T	GE Healthcare Europe GmbH	28-4065-51
dNTPs	VWR International GmbH	28-4065-51
DTT 0,1M	Thermo Fisher Scientific	11553117

EDTA	J.T. Baker	B-1073.1000
Ethanol absolut $\geq 99.8\%$	VWR International GmbH	20.821.330
Ethanol absolut Mol. Bio. Grade 250 ml	VWR Chemicals	437433T
Ethidium-Bromid Solution (10 mg/mL)	Sigma Aldrich GmbH	E1510
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	J.T. Baker	B-1073.1000
Expand Long Template PCR System, 3600U	Roche Diagnostics GmbH	11759060001
FastStart DNA Polymerase, dNTPack 5 U/ μ l	Roche Diagnostics GmbH	4738420001
FCS	Pan Biotech GmbH	P30-3702
Formaldehydlösung 37 %ig, gepuffert	VWR International GmbH	1.039.991.000
Formamid BioUltra, for molecular biology, $\geq 99,5\%$ (T), 250 ml	Sigma Aldrich GmbH	47671-250ML-F
Gel loading dye 6x, purple, no SDS	New England Biolabs	B7025S
GTP 100 mM	GE Healthcare Europe GmbH	28406521
Hanks Salt Solution	Biochrom	L2045
Hpy188III	New England Biolabs	R0622S
HpyCH4III	New England Biolabs	R0618S
Hyaluronidase	Sigma Aldrich GmbH	H4272-30MG
Igepal CA-360 viscous liquid, 50 ml	Sigma Aldrich GmbH	I3021-50ml
Kaliumchlorid Lösung 1M in H ₂ O für Molekularbiologie	Sigma Aldrich GmbH	60142-100ML-F
Kaliumdihydrogenphosphat zur Analyse, 1 kg	VWR International GmbH	1048731000
KAPA Library Quantification Kit	Roche Diagnostics GmbH	7960298001
Low molecular weight ladder	New England Biolabs	N3233L
Magnesium chloride solution 1M, 100 ml	Sigma Aldrich GmbH	M1028-100ml
Mineralöl, für Molekularbiologie, 500 ml	Sigma Aldrich GmbH	M5904-500ML
MiSeq Reagent Kit V2 (50 Cycles)	Illumina	MS-102-2001
MiSeq Reagent Micro Kit v2 (300-cycles)	Illumina	MS-103-1002
MiSeq Reagent Nano Kit v2 (300-cycles)	Illumina	MS-103-1001
MnII	New England Biolabs	R0163S
Mse I, rekombinant, conc., 2500U 50000U/ml	New England Biolabs	R0525M
MspI	New England Biolabs	R0106S
mTRAP™ Lysis Buffer, 100 ml	Active Motif	29011
NaOH	ITEM	
Natriumchlorid Lösung 5 M	Sigma Aldrich GmbH	71386-1L
NEBuffer 3.1	New England Biolabs	B7203S
PANScript DNA Polymerase	PAN-Seratech GmbH	ST-1100500
PEG NaCl LowPass Illumina	Miltenyi Silicon Biosystems	KI0112
Pen/Strep	Pan Biotech GmbH	P06-07100
Percoll™	GE Healthcare	17089101

Poly T gripNA™ Probe	Active Motif	29008
Protease, 20 mg	Active Motif	29012
Proteinase K, rec. PCR grade Solution	Roche Diagnostics GmbH	3115828001
QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (50)	Qiagen	56404
QIAquick PCR Purification Kit (250)	Qiagen	28106
QIAxcel DNA High Resolution Kit (1200)	Qiagen	929002
QIAxcel DNA Screening Kit (2400)	Qiagen	929004
Qubit DNA HS	Thermo Fisher Scientific	Q32851, Q32854
Qubit dsDNA BR Assay (500 assays)	Thermo Fisher Scientific	Q32850, Q32853
Roche SYBR Mastermix	Roche Diagnostics GmbH	4887352001
RPMI Medium	Pan Biotech GmbH	P04-17500
S-adenosylmethionine	New England Biolabs	B9003S
SfaNI	New England Biolabs	R0172S
Streptavidin Beads, 1,6 ml	Active Motif	29010
SuperScript® II Reverse Transcriptase, 4x 10.000 U	Thermo Fisher Scientific	11553117
T4-DNA-Ligase, konz. 500U (5U/µl)	Roche Diagnostics GmbH	10799009001
TE Puffer 1x ph 8.0 low EDTA	AppliChem	A8569,0500
Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT), Recombinant, 2500 U	Affymetrix	72033
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Roth	2367.3
Tris-Puffer pH 8,0 (1M) für Molekularbiologie, 1000 ml	AppliChem	A4577,0500
Trizma® acetate, BioUltra, ≥99.0%	Sigma Aldrich GmbH	93337-25G
tRNA from E. coli MRE 600, 100 mg	Roche Diagnostics GmbH	10109541001
TruSeq DNA CD Indexes (96 Indexes, 96 Samples)	Illumina	20015949
TruSeq DNA PCR free High Throughput Library Prep Kit (96 Samples)	Illumina	20015963
TruSeq DNA PCR free Low Throughput Library Prep Kit (24 Samples)	Illumina	20015962
TruSeq DNA Single Indexes Set A + Set B (12 Indexes, 24 Samples)	Illumina	20015960, 20015961
Trypan Blau	Sigma Aldrich GmbH	T8154-20ml
Trypsin/EDTA	Pan Biotech GmbH	P10-024100
Tsp45I	New England Biolabs	R0583S
TWEEN® 20, for molecular biology, viscous liquid, 50 ml	Sigma Aldrich GmbH	P9416-50ml
UltraPure DEPC-Treated Water, 1l	Invitrogen GmbH	750023
Water for Chromatographie 1l	VWR International GmbH	1.153.331.000

2.2 Puffer, Lösungen und Medien

10 % AB Serum in 1x PBS/2 % Pepton

5 ml AB Serum in 45 ml 1x PBS / 2 % Pepton

cDNA-Igepal Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 0,25 % Igepal)

0,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,75 ml 1 M KCl, 1 ml 0,1 M DTT, 25 µl Igepal und 7,73 ml H₂O (DEPC)

cDNA-Tween 20 Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 10 mM DTT, 0,25 % Tween 20)

0,5 ml 1 M Tris-HCl (pH 8,0), 0,75 ml 1 M KCl, 1 ml 0,1 M DTT, 50 µl Tween 20 und 7,75 H₂O (DEPC)

Basalmedium Tumorverdau

5 ml Hepes 1M, 5 ml Pen/Strep (10.000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin), 5 g BSA in 500 ml DMEM/F12

dGTP 2 mM

20 µl 100 mM dGTP, 980 µl H₂O (DEPC)

DTT 1 mM

0,1 ml 0,1 M DTT, 9,9 ml H₂O (DEPC)

dNTP 4 x 10 mM

10 µl 100 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP und 60 µl H₂O (HPLC)

EDTA 0,5 M, pH 7,4

18,61 g EDTA in 95 ml H₂O (aq. dest.), pH 7,4, ad 100 ml mit H₂O, steril filtrieren

Formamid 20%

2 ml Formamid, 8 ml H₂O (DEPC)

HCl 1M

83,3 ml 12 M HCl, 916,7 ml H₂O (aq. dest.)

HCl 10 mM, pH 2

10 ml 1 M HCl, 990 ml H₂O (aq. dest.), pH 2

Igepal 10%

1 ml Igepal CA-630 (100 %), 9 ml H₂O (DEPC)

KCl 0,075 M

5,6 g KCl in 500 ml H₂O (aq. dest.)

KH₂PO₄ 1 M, pH 7

1,36 g KH₂PO₄ in 10 ml H₂O (DEPC), pH 7, steril filtrieren

KH₂PO₄ 200 mM

0,2 ml KH₂PO₄ 1M in 0,8 ml H₂O (DEPC)

MACS Puffer (0,5 % BSA, 2 mM EDTA in 1x PBS)

2,5 g BSA (Fraktion V), 2 ml 0,5 M EDTA (pH 7,4) in 500 ml 1x PBS

MgCl₂ 40 mM

0,4 ml 1 M MgCl₂, 9,6 ml H₂O (DEPC) , pH 7, steril filtrieren

10x OPA (One-Phor-All) Puffer (100 mM Tris-acetat, 100 mM Magnesiumacetat, 500 mM Kaliumacetat)

1,18 g Tris-Acetat in 8,8 ml H₂O (HPLC), pH 7,5, 1 ml 1 M Magnesiumacetat, 200 µl 5 M Kaliumacetat, steril filtrieren

10x PBS (85 mM Na₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄, 1,5 M NaCl)

180 g NaCl, 28,66 g Na₂HPO₄, 5,34 g KH₂PO₄ in 2 l H₂O (aq. dest.)

1x PBS/2 % Pepton

2 g Pepton in 100 ml 1x PBS

Pepton 20 %

100 g Bacto™ Pepton in 500 ml 1x PBS pH 7,4, steril filtrieren

1x PBS + 0,2 % Tween 20, pH 7,4

100 ml 10x PBS, 898 ml H₂O (aq. dest.), pH 7,4, 2 ml Tween 20

10x PCR Puffer + 4 x 1 mM dNTP

Je 5 µl 100 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP und 480 µl 10x PCR-Puffer

100 % Percoll, pH 7,4

45 ml Percoll, 4,05 ml HSS mit Phenolrot; pH 7,4, steril filtrieren

65 % Percoll

32,5 ml 100 % Percoll (pH 7,4), 17,5 ml 0,9 % NaCl-Lösung

60 % Percoll

30 ml 100 % Percoll (pH 7,4), 20 ml 0,9 % NaCl-Lösung

37,5 µM Poly-T PNA-bio

15 nmol Poly-T PNA-bio in 400 µl H₂O (DEPC)

Polyacrylamid-Träger 0,25 %

1,25 ml 5% Acrylamide, 0,4 ml Tris-HCL (40mM, pH 7.0-8.0), 67 µL Natriumacetat (20mM, pH7.8), 20 µL EDTA (1mM pH 7.8-8.0), 100 µL Ammoniumpersulfat, 10µL TEMED + 8,153 ml H₂O

2 h polymerisieren lassen und anschließend 25ml 100% Ethanol hinzugeben, mischen und abzentrifugieren, Überstand abkippen und Pellet in 45ml H₂O (DEPC) lösen

Protease 20 µg/µl

8 mg Protease in 400 µl H₂O (DEPC)

Proteinase K, 10 mg/ml

46 µl Proteinase K (21,4 mg/ml), 54 µl H₂O (HPLC)

RPMI1640 + 10 % FCS + 2 mM L-Glu + 1x Pen/Strep

500 ml RPMI1640, 55 ml FCS, 5,5 ml 200 mM L-Glu, 5,5 ml 100x Pen/Strep

Tailing-Waschpuffer (50 mM KH₂PO₄, 1 mM DTT, 0,25 % Igepal)

0,5 ml 1 M KH₂PO₄ (pH 7), 100 µl 0,1 M DTT, 25 µl Igepal und 9,38 ml H₂O (DEPC)

10x TBE (0,9 M Tris, 0,9 M H₃BO₃, 20 mM EDTA)

539 g Tris, 275 g Borsäure, 37 g EDTA in 5 l H₂O (aq. dest.)

Tris 1 M

60,57 g Tris in 500 ml H₂O (aq. dest.)

tRNA 25 µg/µl

100 mg tRNA in 4 ml H₂O (DEPC)

dann weiter 1 µl tRNA in 999 µl H₂O (DEPC)

2x Trypsin/EDTA in 1x PBS

10 ml 10x Trypsin / EDTA, 40 ml 1x PBS

Tween 20 10%

1 ml Tween 20, 9 ml H₂O (HPLC)

2.3 Antikörper und Microbeads

Tabelle 3: Verwendete Antikörper und Microbeads

Antikörper	Firma	Artikelnummer
CD11b-APC, human (Klon: M1/70.15.11.5)	Miltenyi Biotec	130-091-241
CD235a (Glycophorin A) MicroBeads, human	Miltenyi Biotec	130-050-501
CD33-APC, human (Klon: AC104.3E3)	Miltenyi Biotec	130-091-731
CD326 (EpCAM)-PE, human (Klon: HEA-125)	Miltenyi Biotec	130-098-118
CD45-APC, human (Klon: 5B1)	Miltenyi Biotec	130-110-633
Anti-APC-MicroBeads	Miltenyi Biotec	130-090-855
pan-CK, human (Klon: A45-B/B3)	Micromet (AS Diagnostic)	R002A
CD326 (EpCAM), human (Klon: Ber-Ep4)	Agilent	M080401
MOPC21 Isotyp Kontrolle	Sigma Aldrich GmbH	M9269

2.4 Oligonukleotide und Primer

Tabelle 4: Primer für genomische DNA

Gen/Marker	Genlokus	Oligo	Sequenz 5' → 3'	Amplikon [bp]	T _A [°C]	Methode
BRAF_ Ex 15	7q34	5'	CTCTTCATAATGCTTGCTCTG	171	58	FFPE-QC
		3'	TCCAGACAACCTGTCAAACCTG			
CDKN2A_ Ex 3	9p21.3	5'	TGGCTCTGACCATTCTGTTC	380	58	FFPE-QC
		3'	TGGAAGCTCTCAGGGTACAA			
D5S2117*	5	5'	CCAGGTGAGAACCTAGTCAG	147*	58	WGA-QC
		3'	ACTGAGTCCTCAACCATGG			
EGFR_ Ex 18	7p11.2	5'	TTGTCCTTCCAAATGAGCTG	496	58	FFPE-QC
		3'	TGCCTTTGGTCTGTGAATTG			
EGFR_ Ex 19	7p11.2	5'	TCCTCGATGTGAGTTTCTGC	350	58	FFPE-QC
		3'	ATGCCTCCATTTCTTCATCC			
EGFR_ Ex 20	7p11.2	5'	AAACGTCCCTGTGCTAGGTC	442	58	FFPE-QC
		3'	CATGGCAAACCTCTTGCTATCC			
EGFR_ Ex 21	7p11.2	5'	CAGCGGGTTACATCTTCTTTC	418	58	FFPE-QC
		3'	AAACAATACAGCTAGTGGGAAGG			
KRAS_ Ex 1	12p12.1	5' FFPE	ATAAGGCCTGCTGAAAATGAC	91	58	WGA-QC, FFPE-QC
		5'	ATAAGGCCTGCTGAAAAT			
		3'	CTGAATTAGCTGTATCGTCAAGG			
KRT19	17q21.2	5'	GAAGATCCGCGACTGGTAC	621	58	WGA-QC
		3'	TTCATGCTCAGCTGTGACTG			
NRAS_ Ex 2	1p13.2	5'	ACACCCCCAGGATTCTTACA	174	58	FFPE-QC
		3'	TCCGCAAATGACTTGCTATT			
PIK3CA_ Ex 20	3q26.32	5'	TCTAGCTATTGCACAGCATGC	221	58	FFPE-QC
		3'	TTGTGTGGAAGATCCAATCCAT			
TP53 Ex 2/3	17p13.1	5'	GAAGCGTCTCATGCTGGATC	299	58	WGA-QC
		3'	CAGCCCAACCCTTGCTCTTA			
TP53_ Ex 5/6	17p13.1	5'	ACGCATGTTTGTCTTTGTC	507	58	FFPE-QC, Sanger Seq
		3'	ACCCCTCCTCCAGAGAC			
TP53_ Ex 7	17p13.1	5'	GAGGCTGAGGAAGGAGAATG	400	58	FFPE-QC, Sanger Seq
		3'	AGTATGGAAGAAATCGGTAAGAGG			
TP53_ Ex 8	17p13.1	5'	AGGTAGGACCTGATTCCTTACTG	245	58	FFPE-QC, Sanger Seq
		3'	AGGCATAACTGCACCCTTG			

* Dieser Primer amplifiziert einen Längenpolymorphismus auf dem humanen Chromosom 5. Es können individuelle und bei Heterozygotie intraindividuelle Unterschiede auftreten. Es können zwei Banden mit einer Länge von jeweils 108-166 bp auftreten.

Tabelle 5: Primer für cDNA

Gen/Marker	Genlokus	Oligo	Sequenz 5' → 3'	Amplikon [bp]	T _A [°C]	Methode
ACTB	7p22.1	5'	GCGTGACATTAAGGAGAAGCTG	378	58	WTA-QC
		3'	CGCTCAGGAGGAGCAATGAT			
ALDH1A1	9q21.13	5'	TCCTGGTTATGGGCCTACAG	238	60	Genspez. PCR
		3'	CTGGCCCTGGTGGTAGAATA			
BMI1	10p12.2	5'	GCTGGTTGCCATTGACAG	148	60	Genspez. PCR
		3'	AAAAATCCCGAAAGAGCAGC			
CD11c	16p11.2	5'	GATATTGCAGAAGAAGGTGTCG	295	58	Genspez. PCR
		3'	GGTCTGTGTCCCCTTTCTG			
CD19	16p11.2	5'	CCTGTGGGCATTCTTCATC	136	62	Genspez. PCR
		3'	CACGTTCCCGTACTGTTCT			
CD33	19q13.41	5'	GGCACCAACTGACCTGT	137	62	Genspez. PCR
		3'	TCTGTTTCCCTGAGCCATC			
CD34	1q32.2	5'	AGGCCTCAGTGTCTACTGCTG	105	62	Genspez. PCR
		3'	TAGGATCCCCAGCTTTTCA			
CD44	11p13	5'	CGGACACCATGGACAAGTTT	150	58	Genspez. PCR
		3'	CCGTCCGAGAGATGCTGTAG			
CD45	1q31.3-q32.1	5'	TTAGGGACACGGCTGACTTC	106	62	Genspez. PCR, qRT-PCR
		3'	GCTTIGCCCTGTCAAAATA			
CD68	17p13.1	5'	ACATGGCGGTGGAGTACAAT	131	55	Genspez. PCR
		3'	AATGATGCTCGAGTTGCTGC			
CD71	3q29	5'	ACAACAGCCAACCTGTTTCA	154	58	Genspez. PCR
		3'	TTCTCAGCATTCCCGAAATC			
CD90	11q23.3	5'	TCAGGAAATGGCTTTTCCCA	101	62	Genspez. PCR
		3'	TCCTCAATGAGATGCCATAAGCT			
CD117	4q12	5'	CTTTAGGAAGCAGCCCCTATC	140	60	Genspez. PCR
		3'	ATCTGCATCCCAGCAAGTCT			
CD133	4p15.32	5'	ATGACAAGCCCATCACAACA	129	55	Genspez. PCR
		3'	TTGCTCCTGGATTGGAAAG			
CD207	2p13.3	5'	GGGCAGCTTGAGAAATATG	296	63	Genspez. PCR
		3'	TGTTGAATGGCGTGCATC			
CD233	17q21.31	5'	TCTCAGGAACGTGGAGCTT	172	58	Genspez. PCR
		3'	CTGCTTTTCTTGGAAAGGTG			
CD236	2q14.3	5'	GAGAAGCCCCAACAGCAC	187/130	60	Genspez. PCR
		3'	AATCACACCTGCAATGACGA			
CDH1	16q22.1	5'	CGGCCTGAAGTGACTCGTAA	152	60	Genspez. PCR
		3'	GAATCATAAGGCGGGGCTGT			
EEF1A1	6q13	5'	CTGTGTCGGGGTTGTAGCCA	290	58	WTA-QC
		3'	TGCCCCAGGACACAGAGACT			
EpCAM	2p21	5'	AAAGTTTTCGGACTGCACTT	161	55/62	Genspez. PCR, qRT-PCR
		3'	AGCCACATCAGCTATGTCCA			

EPOR	19p13.2	5'	CCAAGTTCGAGAGCAAAGC	157	58	Genspez. PCR
		3'	TCCTCGAGCTGGTAGGAGAA			
GAPDH	12p13.31	5'	CCATCTTCAGGAGCGAGAT	489	58	WTA-QC
		3'	CAGTGGGGACACGGAAGG			
HBA2	16p13.3	5'	GGCTCTGCCCAGGTAAAGG	164	60	Genspez. PCR
		3'	AGGCAGTGGCTTAGGAGCTT			
HLA-DMB	6p21.32	5'	AAGACTGCCAGCCAAT	300	63	Genspez. PCR
		3'	GGAAATGTGCCATCCTCCTG			
IVL	1q21.3	5'	AGCCTTACTGTGAGTCTGGTTG	120	58	Genspez. PCR
		3'	TTGACTGGAGGAGGAACAGTC			
KLF1	19q13.13	5'	GGATGACTTCCTCAAGTGGTG	172	60	Genspez. PCR
		3'	GTTGGTGAGGAGGAGATCCA			
KRT5	12q13.13	5'	GGAGCTCATGAACACCAAGC	103	64	Genspez. PCR
		3'	TGGTCCAACCTCTTCTCCAC			
KRT6A	12q13.13	5'	GTGAGGAGTGCAGGCTGAAT	154	64	Genspez. PCR
		3'	CCAAGACCACTGCCATAGGA			
KRT8	12q13.13	5'	GCGTACAGAGATGGAGAACGA	150	58	Genspez. PCR
		3'	AGCTCCCGGATCTCCTCTT			
KRT18	12q13.13	5'	GGAAGATGGCGAGGACTTTA	157	55	Genspez. PCR
		3'	CCTGCTTCTGCTGGCTTAAT			
KRT19	17q21.2	5'	AGCCGGACTGAAGAATTGAA	162	62	Genspez. PCR
		3'	TTCTGCCAGTGTGTCTTCCA			
NANOG	12p13.31	5'	CTAAGAGGTGGCAGAAAAACA	98/101	60	Genspez. PCR
		3'	CTGGTGGTAGGAAGAGTAAAGG			
NFE2	12q13.13	5'	CTAGAGCCATCTGGGCTTTC	191	58	Genspez. PCR
		3'	ATGGCTCACTGGAGCATTCT			
SPA17	11q24.2	5'	CTCGGAGAGAAAAGGAGTTCCAT	286	55	Genspez. PCR
		3'	CTCAGGTGGTTCTTGCTCCT			
TP53	17p13.1	5'	GCTGTGGGTTGATTCCAC	487	58	Sanger Seq
		3'	TCGCTTAGTGCTCCCTG			
TP63	3q28	5'	CCAGAGATGGCAAGTCCTG	162	55	Genspez. PCR
		3'	GTGTGTTCTGACCAAACGGG			
VIM	10p13	5'	ACTTTGCCGTTGAAGCTGCTA	472	55	Genspez. PCR
		3'	AAATCTATCTTGCGGTCCTGA			

Tabelle 6: Oligonukleotide und Primer für die Amplifikation von cDNA und gDNA

Gen/Marker	Sequenz 5' → 3'	T _A [°C]	Methode
CFL15CN8	CCCCCCCCCCCCCGTCTAGANNNNNNNN	44	WTA
CFL15CT24	CCCCCCCCCCCCCGTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV ^N *	44	WTA
CP2	TCAGAATTCATGCCCCCCCCCCCCC	65	WTA
CP2-BgII-13C	TCAGAATTCATGCCCCCGGCCCCCC	55	Reamp RNA-Seq
CP2-BpuEI	TCAGAATTCATGCCCCCCCCCCCCCGTCTTGTGAGTTTTTT	55	Reamp RNA-Seq
CP2-9C	TCAGAATTCATGCCCCCCCC	55	WTA Reamp
ddMSE11	TAACTGACAGddC	57-65	WGA
Lib1	AGTGGGATTCCTGCTGTCACT	57-65	WGA, Reamp WGA

* V steht für entweder ATP, CTP oder GTP; N für ATP, CTP, GTP oder TTP.

2.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma	Artikelnummer
Adhesive clear PCR seal	Biozym	600208
Adhesive sealing sheets	Thermo Fisher Scientific	AB0558
BIO-CERT® Filterspitzen 0,5 - 10 µl	Brand	732724
Cell Strainer 40µm Becton	Dickinson	352340
Cellstar serologische Pipette 10 ml	Greiner Bio-One	607180
Cellstar serologische Pipette 2 ml	Greiner Bio-One	710180
Cellstar serologische Pipette 25 ml	Greiner Bio-One	760180
Cellstar serologische Pipette 5 ml	Greiner Bio-One	606180
Centrifuge tube 15 ml	Greiner Bio-One	188271
Centrifuge tube 50 ml	Greiner Bio-One	227261
Combitips advanced 0.1 ml	Eppendorf	30089618
Combitips advanced 0.5 ml	Eppendorf	30089634
Combitips advanced 1 ml	Eppendorf	30089642
Diagnostika Objektträger	Th. Geyer GmbH & Co KG	9161187
Einmal-Gewebestanze mit Auswurf	Imtegra	1006-5013, 1006-5014
Erlenmeyer Kolben 250 ml	DURAN Schott	21 216 36
Erlenmeyer Kolben 500 ml	DURAN Schott	21 216 44
MACS Separation Columns LS	Miltenyi Biotec	130-042-401
MAXYMum Recovery™ PCR Tubes 0,2 ml	Axygen Scientific	11370145
Medicons	BC Biosciences	340591
microTUBE-50 AFA Fiber Screw-Cap	Covaris	PN520166

Mikro-Hämatokrit-Kapillare	Brand	749321
Nunc™ Lab-Tek™ Chamber Slides; 8 fields	Thermo Fisher Scientific	11367764
Objektträger	Carl Roth	H872.1
PCR SingleCap 8er-Soft Strips 0,2 ml, clear	Biozym	710970
PCR tube 0.2 ml, single tube	4titude Deutschland	4ti-0795
PCR tube 1.5 ml, graduated, non-sterile	Greiner Bio-One	616201
PCR tube 2 ml, graduated, non-sterile	Greiner Bio-One	623201
Protein LoBind Tube 0,5 ml	Eppendorf	22431064
Protein LoBind Tube 1,5 ml	Eppendorf	22431081
Protein LoBind Tube 2 ml	Eppendorf	22431102
Protein LoBind Tube 5 ml	Eppendorf	30108302
Reagent reservoirs 10 ml	Integra	4331
SafeSeal Surphob 1250 µl (Filter)	Biozym	VT0270
SafeSeal Surphob 20 µl (Filter)	Biozym	VT0220
SafeSeal Surphob 200 µl (Filter)	Biozym	VT0240
SafeSeal-Tips Professional 10 µl (Filter)	Biozym	770010
Skalpell	Braun	0551 8075
Spitzen, 200 µl, gelb	Biozym	VT0014
Transparent 96-well PCR plate	Biozym	710884
White, skirted 96-well qPCR plate	Biozym	712282

2.6 Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Firma
Bioanalyzer 2100	Agilent
Biomek i7	Beckman Coulter
CellTram Pumpe	Eppendorf
Centrifuge 5424	Eppendorf
Centrifuge 5424R	Eppendorf
Centrifuge 5810R	Eppendorf
Centrifuge Plate Fuge	Benchmark Scientific
Centrifuge Rotina 380R Hettich	Hettich
DMZ Universal Puller	Zeitz
DNA Engine Peltier Thermal Cycler	Bio Rad
DNA Engine Tetrad2 Peltier Thermal Cycler	Bio Rad
DynaMag™-96 Side Magnet	Thermo Fisher Scientific
Echo Liquid Handler	LabCyte

Elektrophoresekammer 40-1214	Peqlab
FastGene MagnaStand 0.2	NIPPON Genetics Europe
FastGene MagnaStand 1.5	NIPPON Genetics Europe
Genetouch Thermal Cycler	Biozym
HiSeq4000	Illumina
Hybridization oven PerfectBlot	Peqlab
Incubator Heraeus BB15	Thermo Fisher Scientific
Laminar flow bench Her Safe KS18	Thermo Fisher Scientific
LightCyler 480	Roche Diagnostics
M220X	Covaris
MACS Manual Separator	Miltenyi Biotec
Manuelle Pipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl ,200 µl, 1000 µl)	Gilson
Medimachine	BD Biosciences
Microscope Axiovert 200M	Zeiss
Microscope CX23	Olympus
Microscope IB inverted	Optech
Microscope IX81, inverted	Olympus
Mikrowelle	Micromaxx
MiSeq	Illumina
Multikanal Pipette 0,5 - 10 µl	Brand
Multipette Stream	Eppendorf
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific
Neubauer Zählkammer	Schubert & Weiss, OMNILAB
NovaSeq 6000	Illumina
Patchman NP2 micromanipulator	Eppendorf
PCR bench UVT-S-AR	Thermo Fisher Scientific
pH-meter PB-11	Sartorius
Power Supply MP-250N	Kisker Biotech
QIAxcel	Qiagen
Qubit 2/3 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific
Research Pro 8-channel pipette	Eppendorf
Roller Mixer SRT1	Stuart Scientific
Scale AVW220D	Shimadzu
Scale PLS 510-3	Kern
Thermomixer C	Eppendorf
UV Illuminator	Intas
Vortex	VELP Scientifica
Vortex/centrifuge PCV-2400	Grant-bio

2.7 Datenbanken und Software

Tabelle 9: Verwendete Datenbanken und Software

Bezeichnung	Firma
2100 Expert Software Version B.02.09SIO725 (SR1)	Agilent Technologies
Axio Vision LE	Zeiss
Bbduk	Bushnell, 2014
cellSens	Olympus
cellSens Dimension 1.9	Olympus
ComplexHeatmap version 2.2.0	Gu et al., 2016
Darkbox Gel iX Imager	Intas
Echo Software	LabCyte
factoextra version 1.0.7	https://rpkgs.datanovia.com/factoextra/index.html
FastQC v0.11.8	Andrews, 2010
Featurecounts v1.6.4	Liao et al., 2014
Genecards	https://www.genecards.org/
Human Protein Atlas	www.proteinatlas.org
LightCycler 480 Software 1.5	Roche
MultiQC v1.8	Ewels et al., 2016
NanoDrop 2000/2000c Software	Thermo Fisher Scientific
NCBI nucleotide database	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/
NCBI Primer-BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
NEBcutter v2.0	http://nc2.neb.com/NEBcutter2/
Office 365 Version 16.42	Microsoft
Prism 6	GraphPad
Progenetix	https://progenetix.org/
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
QIAxcel ScreenGel	Qiagen
R version 3.6.3	https://www.R-project.org/
R-Studio version 1.1.463	https://www.rstudio.com/
RColorBrewer version 1.1-2	https://colorbrewer2.org/
SPSS Statistics 25	IBM
STAR v 2.5.1b	Dobin et al., 2013
BioBloom Tools	Chu et al., 2014
bwa version 0.7.17	Li et al., 2009
QDNASeq	Scheinin et al., 2014

3 Methoden

3.1 Probengewinnung

Alle humanen Proben werden von den zuständigen Kooperationspartnern (Abteilung für Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg, Klinik für Thoraxchirurgie des Krankenhaus Barmherzige Brüder in Regensburg, Klinik und Poliklinik für Orthopädie der Asklepios Klinik Bad Abbach, Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg, Beatrix Cucuruz, Gefäßchirurgie) entnommen und dem Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren zugesendet. Die Aufarbeitung der Patientenproben erfolgt in dem Sonderlabor Disseminierte Tumorzellen (SL-DTC). Alle Aspekte dieses Projektes sind von dem Ethikkomitee der Universität Regensburg unter den Ethikvoten 07-079 und 18-948_1-101 genehmigt. Es erfolgt die ärztliche Aufklärung und schriftliche Einwilligung der Patienten, dass Gewebeproben entnommen und für Forschungszwecke benutzt werden dürfen.

Knochenmarksaspirate, regionäre Lymphknoten und Teile des Primärtumors werden prä- und intraoperativ bei Patienten mit dem Verdacht auf Nicht-Kleinzelliges Lungenkarzinom gewonnen und in sterilen Gefäßen bei Raumtemperatur versendet. Knochenmark wird aus dem rechten und linken Beckenkamm aspiriert und mit Heparin versetzt, um ein Gerinnen des Biopsats zu verhindern. Vollständig geronnenes Knochenmark wird nicht aufgearbeitet und verworfen. Jeweils ein nicht-fixierter Lymphknoten aus zwei Lymphknotenstationen wird von dem zuständigen Pathologen halbiert. Eine Hälfte verbleibt in der Pathologie für die routinemäßige pathologisch-histologische Untersuchung, während die andere Hälfte der Forschung zugeht. Sofern genügend Material vorhanden ist, wird auch ein Teil des Primärtumors von dem Operateur oder dem Pathologen in PBS an das SL-DTC geschickt.

Die Aufarbeitung aller humanen Proben erfolgt unter sterilen Bedingungen über das Sonderlabor DTC.

3.1.1 Aufarbeitung von Lymphknoten

Die Aufarbeitung der Lymphknoten erfolgt unmittelbar nach Eingang der Proben mittels mechanischer Zelldisaggregation (BD Medimachine System). Jede Lymphknotenhälfte wird einzeln bearbeitet. Alle Zentrifugationsschritte werden bei voller Beschleunigung und reduzierter Abbremsung bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt.

Die Probe wird in eine sterile Petrischale gegeben, mit RPMI-Medium bedeckt und mit einem Skalpell in 2-3 mm große Stücke zerkleinert. Ein Medicon (eine Einweg-Kammer mit sechs Mikroklingen) wird in die Medimachine eingesetzt und mit 1 ml Medium für 30 Sekunden eingefahren. Anschließend wird ein Gewebestück mit 0,5 – 1 ml Medium in das Medicon eingefügt und für 30-45 Sekunden disaggregiert. Dieser Schritt wird solange wiederholt, bis das gesamte Gewebe zerkleinert ist. Die Zellsuspension wird mit einer Pipette aus der Kammer des Medicons entfernt und in ein 50 ml Röhrchen überführt.

Das Gefäß wird in dem folgenden Waschschrift mit Hanks Salzlösung aufgefüllt und für 10 Minuten bei 200g zentrifugiert. Der flüssige Überstand wird bis auf 7,5 ml entfernt. Das Zellpellet wird resuspendiert und sehr langsam und vorsichtig auf 6 ml Percoll 60% in einem 15 ml Röhrchen aufgetragen. Es folgt die Isolierung der mononukleären Zellen (MNZ) mittels Dichtegradientenzentrifugation für 20 Minuten bei 1000g. Die Interphase – sichtbar als weißes Band zwischen der Percoll und der wässrigen Phase – wird vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Es folgt ein weiterer Waschschrift wie oben beschrieben; jedoch mit PBS anstatt Hanks. Der Überstand wird komplett entfernt und das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert. Anschließend werden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypan Blau vermischt und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer die MNZ und die Erythrozytenzahl bestimmt.

Bei einem Erythrozyten-Anteil von $\geq 40\%$ wird ein Lyseschrift durchgeführt. Dafür wird der Überstand nach 10 Minuten Zentrifugation bei 500g entfernt und das Pellet für 1-2 Minuten in 2 ml Lysepuffer resuspendiert. Danach wird das Röhrchen mit PBS aufgefüllt und für 10 Minuten bei 500g zentrifugiert. Anschließend erfolgt erneut die Bestimmung der Zellzahl von MNZ und Erythrozyten.

3.1.2 Aufarbeitung von Knochenmark

Die Aufarbeitung des Knochenmarks erfolgt unmittelbar nach Eingang der Probe mittels Dichtegradientenzentrifugation. Für Analysen des SL-DTC auf Haftobjektträgern wird das Knochenmark auf Percoll 60% aufgetragen, wohingegen ein Teil des Knochenmarks für eine weitere Immunzell-Depletion und EpCAM-Färbung mit Percoll 65% prozessiert wird. Alle Zentrifugationsschritte werden bei voller Beschleunigung (9) und reduzierter Abbremsung (3) bei einer Temperatur von 4°C durchgeführt.

Maximal 10 ml Knochenmark werden jeweils in ein 50 ml Röhrchen überführt und zweimalig mit Hanks Salzlösung wie oben beschrieben gewaschen. Für die Dichtegradientenzentrifugation wird das Zellpellet auf mehrere 15 ml Röhrchen aufgeteilt, sodass die Zellen von maximal 6 ml initialer Probe in einem Röhrchen verarbeitet werden. Die Zellen werden in Hanks Salzlösung resuspendiert. 9 ml Suspension werden pro Percoll Röhrchen aufgetragen. Es folgt die Zentrifugation bei 1000g für 20 Minuten. Das weitere Prozedere beinhaltet die Abnahme der Interphase, einen Waschschrift, die Zählung der Zellen und ggf. die Lyse von Erythrozyten und erfolgt analog zu der Aufarbeitung von Lymphknoten.

3.1.3 Negative immunomagnetische Depletion von Knochenmark

Durch die Kopplung von Antikörpern gegen Oberflächenmarker mit magnetischen Microbeads können hämatopoietische Zellen mit Hilfe einer magnetischen Säule depletiert und disseminierte Tumorzellen im Knochenmark angereichert werden. Pro magnetische Säule werden maximal 100 Millionen Zellen (MNZ und Erythrozyten) eingesetzt.

Nach der Zellzählung wird die Suspension bei 500g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Pro 10^6 MNZ werden 9 μ l MACS Puffer, 1 μ l CD11b-APC, 5 μ l CD33-APC und 5 μ l CD45-APC Antikörper zugegeben. Die Zellen werden resuspendiert und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. In dem folgenden Waschschrift wird das 10-fache Volumen an MACS Puffer (mindestens jedoch 5 ml) hinzugefügt und bei 500g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgekippt und pro 10^6 Erythrozyten werden 6 μ l MACS Puffer, 2 μ l Glycophorin A und 2 μ l anti-APC Microbeads hinzugefügt. Es folgt erneut eine Inkubation und ein Waschschrift wie oben beschrieben. Das Pellet wird in 1 ml MACS Puffer resuspendiert, durch ein 40 μ m Zellsieb gefiltert und mit MACS Puffer nachgespült. Die Säule wird in die Halterung eingespannt und mit 2 ml MACS Puffer gespült. Unter die Säule wird ein 50 ml Röhrchen in einem Eisbehälter platziert und 2 ml der Zellsuspension werden auf die Säule pipettiert. Es folgen drei Waschschriffe mit jeweils 3 ml MACS Puffer. Der gesammelte Durchfluss wird abzentrifugiert und in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgt in einer Neubauer Zählkammer wie oben beschrieben.

3.1.4 Aufarbeitung von frischen Primärtumoren

Die Aufarbeitung des Primärtumors erfolgt unmittelbar nach Eingang der Probe mittels enzymatischem Verdau. Das Tumorstück wird in eine Petrischale gegeben und mit 0,5 – 1 ml

Verdaumedium benetzt. Das Gewebe wird anschließend manuell mit zwei Skalpell in möglichst kleine Stücke zerteilt. Je nach Größe der Stücke und Menge an Gewebe werden 2-10 ml des Verdaumediums hinzugegeben und für 20-40 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach 10 Minuten und am Ende der Inkubationszeit wird das Gemisch mit einer Pipette mehrmals auf und ab pipettiert, um die Disaggregation zu erleichtern. Die Suspension wird dann in ein 50 ml Röhrchen überführt und die Petrischale mit 30 ml PBS nachgespült. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 300g wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 1 ml vorgewärmten (37°C) Trypsin 0,5%/EDTA 0,2% in PBS durch leichtes Schütteln resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Verdau wird durch die Zugabe von 4,5 ml Basalmedium und 500 µl FCS inaktiviert und mehrmals auf und ab pipettiert. Die Suspension wird durch einen 40 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Zellaggregate im Zellsieb wurden mit dem Stempel einer Spritze vorsichtig zerrieben. Das alte Röhrchen wird mit 4 ml PBS nachgespült und über das Zellsieb gefiltert, der anschließend mit weiteren 10 ml PBS gewaschen wird. Die Suspension wird letztlich für 5 Minuten bei 300g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in der gewünschten Menge PBS resuspendiert. Die Zellzählung erfolgt analog zu der Aufarbeitung von Lymphknoten.

3.1.5 Herstellung von Haftobjektträgern

Um Zellen auf Haftobjektträger (HOT) aufzubringen, wird die Zellsuspension auf eine Konzentration von 500.000 Zellen pro Milliliter PBS verdünnt. Pro Feld eines HOTs werden 333 µl der Suspension aufgetragen und für mindestens eine Stunde in einer geschlossenen Kammer inkubiert. In dieser Zeit sedimentieren die Zellen auf die Oberfläche des Objektträgers. Bei einer längeren Inkubation (z.B. über Nacht; maximal 17 Stunden) wurde etwas destilliertes Wasser oder PBS auf den Boden der Kammer geben, um ein Austrocknen der HOTs zu vermeiden. Nach der Sedimentation wird die Flüssigkeit auf ein Papiertuch abgekippt und die HOTs bei Raumtemperatur für mindestens acht Stunden getrocknet. Die HOTs werden mit ID und Zellzahl pro Feld gekennzeichnet und bei -20°C aufbewahrt.

3.1.6 Aufarbeitung von FFPE Blöcken

FFPE Blöcke der Primärtumoren werden von der Gemeinschaftspraxis für Pathologie und dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg zur Verfügung gestellt.

Von jedem FFPE Block wird ein 5 µm Schnitt angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt. Tumorareale werden in Kooperation mit einem Facharzt für Pathologie auf dem Objektträger markiert, um einen hohen Tumorgehalt in den Stenzen zu gewährleisten. Je nach Größe des Areales wird eine Stanze mit einem Durchmesser von 1-4 mm ausgestanzt und manuell mit zwei Skalpell in möglichst kleine Stücke zerteilt. Es wurde stets darauf geachtet, genügend Material für weitere diagnostische Untersuchungen zu erhalten. Das FFPE Gewebe wird anschließend zwischen zwei Glasobjektträgern zerdrückt und weiter zerrieben. Nach der Überführung der Stücke in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß beginnt die DNA Extraktion mit der *Deparaffinization Solution* und dem *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* nach Angaben des Herstellers.

Zusammengefasst werden die Proben mit 320 µl der *Deparaffinization Solution* – einem organischen Lösungsmittel – deparaffinisiert und anschließend enzymatisch lysiert. Nach einer kurzen Inkubation mit RNase A wird die freigesetzte DNA an die Silicamembran der Aufreinigungssäulen gebunden, gewaschen und schließlich eluiert. Das Volumen zur Eluierung der DNA hängt von der eingesetzten Menge an FFPE Gewebe ab und beträgt zwischen 20 und 50 µl. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt mittels Nanodrop (siehe Abschnitt 3.10.1 Nanodrop™ 2000c Messung).

3.1.7 EpCAM-PE Suspensionsfärbung

Sofern genügend Zellen vorhanden sind, werden 2 Millionen depletierte MNZ aus dem Knochenmark und eine Million MNZ aus jedem Lymphknoten gefärbt.

Die Zellen werden bei 500g für 5 Minuten abzentrifugiert und in 98 µl 10% AB-Serum in 2% PBS/Pepton resuspendiert. Das Serum fungiert als Blockpuffer und verhindert das unspezifische Binden des Antikörpers. Es werden 2 µl des EpCAM-PE Antikörpers (Klon: HEA-125) hinzugefügt und für 15 Minuten bei 4°C rollend inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS werden die Zellen mit einer finalen Konzentration von 10^6 MNZ/100 µl in PBS resuspendiert. Eine Isotypkontrolle wird aufgrund der normalerweise geringen Zellzahl nicht standardmäßig durchgeführt. Alle zu Beginn durchgeführten Isotyp-Färbungen waren negativ.

3.1.8 Polymer-Alkalische Phosphatase Immunfärbung auf HOT

Alle Färbungen der HOTs werden in der Regel durch Mitarbeiter des SL-DTCs durchgeführt. Es werden 2×10^6 MNZ aus dem Knochenmark bzw. jeweils 1×10^6 MNZ aus den Lymphknoten

gefärbt. Bei jeder Färbung wird eine Positivkontrolle mit gefärbt (Objektträger ($0,5 \times 10^6$ MNZ) mit einer für den gewünschten Marker positive Zelllinie). Zusätzlich werden zwei bzw. ein Objektträger für KM bzw. LK und ein Objektträger mit der Zelllinie mit dem MOPC21 Antikörper (Isotyp-Kontrolle) gefärbt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper bei den Patientenproben auszuschließen. Bei einer positiven Isotyp-Kontrolle gilt das Ergebnis der Färbung als nicht auswertbar.

Die HOTs werden für 20-30 min aufgetaut und mit 300-500 μ l 10% AB-Serum/PBS pro Feld für 20 min geblockt. Anschließend werden je Auftragsfeld 150-250 μ l der Antikörperlösung (finale Konzentration von 2 μ g/ml in 10% AB-Serum/PBS) aufgetragen und für 45 min bei RT inkubiert. Vor und nach der Inkubation mit einem anti-Maus AP-Polymer werden die HOTs drei Mal für jeweils drei Minuten in PBS gewaschen. Anschließend wird ca. 300 μ l der Entwicklerlösung (BCIP/NBT-Lösung mit 0,5% Levamisol) aufgetragen und 10 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden die HOTs für 5 min in 0,5% PFA-Lösung fixiert und letztlich erneut drei Mal gewaschen. Die Lagerung erfolgt für bis zu 7 Tage in PBS bei +4°C.

3.2 Mikromanipulation von Einzelzellen

3.2.1 Mikromanipulation von Einzelzellen in Suspension

Alle Proben werden manuell auf einem invertierten Fluoreszenzmikroskop (Zeiss und Olympus) nach EpCAM-positiven Zellen gescreent. Die Felder des 8-Kammer Objektträgers werden zunächst mit BSA beschichtet, um eine gleichmäßige Verteilung der Suspension zu erleichtern. Jeweils 30 μ l der Zellsuspension werden mit 170 μ l PBS auf ein Feld Objektträgers aufgetragen. Ein weiteres Feld wird ausschließlich mit 200 μ l PBS beladen und dient als Pick-Feld, in das einzelne Zellen transferiert werden, um nach erneuter visueller Inspektion manuell isoliert zu werden.

Mit Hilfe einer mit FBS beschichteten Glaskapillare, die an einen Patchman NP2 Mikromanipulator mit Pumpe befestigt ist, werden EpCAM- PCR Qualitätskontrolle der Genom- und Transkriptom-Amplifikate positive Zellen in die Glaskapillare eingesaugt, in das Pick-Feld übertragen und manuell mit einer Mikropipette unter visueller Kontrolle in 1 μ l PBS aufgesaugt. Die Zelle wird in ein 0,2 ml Axygen Maximum Recovery Reaktionsgefäß überführt und in 4,4 μ l Lyse-Mix (Lysepuffer mit 10 ng *E. coli* tRNA) bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert (siehe Abschnitt 3.3 Amplifikation des polyadenylierten Transkriptoms). Die tRNA soll zelleigene RNasen daran hindern, mRNA zu degradieren und

zudem das unspezifische Binden der mRNA an die Wände des Gefäßes unterbinden. Neben EpCAM-positiven Zellen werden auch mindestens zwei nicht gefärbte Zellen, ein Zellpool und eine Negativkontrolle isoliert. Für den Pool wird 1 µl der Zellsuspension, als Negativkontrolle wird 1 µl des PBS aus dem Pick-Feld (Pickkontrolle) verwendet. Die Pickkontrolle soll Kontaminationen des Puffers bzw. Verunreinigungen des Pick-Feldes (z.B. durch Zellen) ausschließen.

3.2.2 Mikromanipulation von Einzelzellen von HOTs

Die grundlegende Vorgehensweise zur Isolierung einzelner Zellen von Haftobjektträgern ist identisch mit der Isolierung von Einzelzellen aus Suspension, mit wenigen Ausnahmen.

Anstatt eines 8-Kammer Objektträgers wird der Haftobjektträger auf dem Mikroskop eingespannt. Die Isolierung der einzelnen Zellen und der Kontrollen (Pool, Pickkontrolle) werden wie oben beschrieben isoliert. Da bei HOTs lediglich die Isolierung des Genoms möglich ist, werden die Proben direkt für die Amplifikation des Genoms isoliert und vorbereitet. Dazu wird die Zelle in 1 µl PBS in den vorbereiteten PK-Mix isoliert und direkt weiterverarbeitet (siehe 4.3.2).

3.3 Amplifikation des polyadenylierten Transkriptoms

Die Amplifikation der Poly(A)-RNA von Einzelzellen erfolgt in Grundzügen nach Klein et al. (2002), Klein (2003) und Hartmann und Klein (2006). Diese Art der Transkriptom-Amplifikation (*Whole Transcriptome Amplification* = WTA) erlaubt die gleichzeitige Isolierung und nachfolgende Amplifikation der genomischen DNA der gleichen Zelle bzw. Probe, indem die polyadenylierte RNA mittels Biotin-gekoppelten Poly(T)-PNAs (*peptide nucleic acids*) und magnetischen Streptavidin-beads von der gDNA getrennt und somit die unabhängige Prozessierung ermöglicht wird.

Die Zusammensetzung der Puffer und der Mastermixe sind in Kapitel 2.2 Puffer, Lösungen und Medien und Tabelle 10 aufgeführt.

Die isolierte Zelle in Lysispuffer wird auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Proteaselösung (1 µg/µl) und 1 µl Poly(T) gripNA™ Probe (37,5 µM) versetzt und für 10 min bei 45°C lysiert. Die proteolytische Reaktion wird für 1 min bei 75°C inaktiviert und es folgt das Annealing der PNAs für 10 min bei 22°C. Es werden 4 µl der Streptavidin-konjugierten mTRAP beads

hinzugegeben und für 45 min bei Raumtemperatur unter ständigem Rollen inkubiert. Die Reaktionsgefäße werden auf einen Magneten gestellt und die Proben mit 10 µl Igepal, gefolgt von 20 µl Tween und dann erneut mit 20 µl Igepal gewaschen. Die Überstände der drei Waschschriffe enthalten die genomische DNA und werden in einem separaten 0,2 ml Gefäß mit 0,8 µl polymerisierten 0,25% Polyacrylamid (PAA) gesammelt. Die Aufarbeitung der gDNA geschieht wie in 3.4.1. beschrieben.

Die Beads werden nach dem dritten Waschschriff in 10 µl cDNA Synthese Mix I resuspendiert und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 10 µl des cDNA Synthese Mix II zugegeben und die Proben für 45 min in einem Hybridisierungssofen bei 44°C rotiert. An einem Magneten erfolgt ein Waschschriff mit 20 µl Tailing Wash Buffer. Die beads werden in 10 µl Tailing Mix resuspendiert und mit 40 µl PCR Öl bedeckt. Die cDNA wird bei 94°C für 4 min von dem RNA-Strang freigesetzt und danach sofort auf Eis gegeben. 0,8 µl Terminale Deoxynukleotidyl Tranferase (TdT) wird in die wässrige Lösung zugegeben, für 60 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 5 min bei 70°C inaktiviert. Nach Zugabe von 35 µl des PCR Mix I werden die Proben in den Cycler auf 78°C geheizt und anschließend (bei 78°C) 5,5 µl des PCR Mix II zugegeben. Es erfolgt die PCR Amplifikation der cDNA mit dem Cycler Programm in Tabelle 11. Der Erfolg der PCR wird mit einer PCR-Qualitätskontrolle bestätigt (siehe Abschnitt 3.5 PCR Qualitätskontrolle der Genom- und Transkriptom-Amplifikate).

Tabelle 10: Zusammensetzung der WTA Mastermixe

Name	Zusammensetzung
cDNA Synthese Mix I	2 µl 5x RT Puffer 1 µl DTT (0,1 M) 0,5 µl Igepal 10% 0,5 µl DEPC-Wasser 3 µl CFL15CT24BpuEI (100 µM) 3 µl CFL15CN8 (200 µM)
cDNA Synthese Mix II	2 µl 5x RT buffer 1 µl DTT (0,1 M) 0,5 µl dNTP (10 mM) 0,5 µl DEPC-Wasser 3 µl Super Script II
Tailing Mix	1 µl MgCl ₂ (40 mM) 1 µl DTT (1 mM) 1 µl dGTP (2 mM) 0,5 µl KH ₂ PO ₄ (200 mM) 6,5 µl DEPC-Wasser
PCR Mix I	4 µl Expand Long Template Buffer 1 7,5 µl Formamide 20 % 24 µl DEPC-Wasser
PCR Mix II	2,5 µl CP2 (24 µM) 1,75 µl dNTP (10 mM) 1,5 µl DNA Pol mix

Tabelle 11: Cycler Programm WTA Amplifikation

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	78°C	00:30	1
2	94°C	00:15	
3	65°C	00:30	20
4	68°C	02:00	
5	94°C	00:15	
6	65°C	00:30	20
7	68°C	02:30 + 10 sec/Zyklus	
8	68°C	07:00	1
9	4°C	∞	1

3.3.1 Reamplifikation des Transkriptoms

Um die Durchführung von mehreren Analysen der Einzelzellen zu ermöglichen, können die WTA-Proben reamplifiziert werden. Dazu wird 1 µl des originalen Amplifikates zu 49 µl des Mastermix (Tabelle 12) gegeben und amplifiziert (Tabelle 13).

Nach der WTA-Reamplifikation wird der Erfolg der PCR erneut mit einer PCR-Qualitätskontrolle bestätigt (siehe Abschnitt 3.5 PCR Qualitätskontrolle der Genom- und Transkriptom-Amplifikate).

Tabelle 12: Zusammensetzung WTA-Reamplifikation Mastermix

Reagenzien	1x Ansatz
Expand Long Template Buffer 1	5 µl
CP2_9C (24 µM)	6 µl
Formamide 20 %	7,5 µl
dNTPs (10 mM)	1,75 µl
DNA Pol mix	1,5 µl
DEPC-Wasser	27,25 µl

Tabelle 13: Cycler Programm WTA-Reamplifikation

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	95°C	01:00	1
2	94°C	00:15	
3	55°C	01:00	5
4	65°C	03:30	
5	94°C	00:15	
6	55°C	01:00	3
7	65°C	03:30 + 10 sec/Zyklus	
8	65°C	07:00	1
9	4°C	∞	1

3.4 Amplifikation des Genoms

3.4.1 Aufarbeitung des Genoms bei kombinierter Genom- und Transkriptom Amplifikation

Während der Aufarbeitung einer Probe für WTA wird der Überstand mit enthaltener gDNA mit Polyacrylamid in einem separaten Reaktionsgefäß gesammelt. Nach der Zugabe von 120 µl eiskaltem 100% Ethanol wird das Gefäß 4-5 Mal invertiert und für mindestens 24 Stunden bei -20°C aufbewahrt. Danach kann die gDNA präzipitiert und für die weitere Amplifikation aufgearbeitet werden.

Dafür wird die Probe für 45 min bei 14000 rpm in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wird bis auf 10-20 µl abgenommen und 180 µl eiskalter 70% Ethanol zugegeben. Nach 10 min in einem Thermoblock bei 19°C und 350 rpm wird die Probe für 10 min bei RT und 14000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wird insgesamt drei Mal durchgeführt wobei bei dem letzten Mal der komplette Überstand entfernt wird und das Pellet mit offenem Deckel luftgetrocknet wird. Nach der Zugabe von 3,48 µl PCR-Wasser wird die DNA für 18 h in einem Thermoblock bei 19°C und 350 rpm gelöst.

3.4.2 Amplifikation des Genoms

Bei dieser Methode der Genom-Amplifikation nach Klein et al. (1999) und Stoecklein et al. (2002) wird das Genom durch das Restriktionsenzym MseI in 150-1500 bp große Stücke geschnitten. An diese Fragmente werden Adapter ligiert, mit deren Hilfe alle Fragmente mit einem Primer amplifiziert werden können. Diese Methode entspricht größtenteils dem kommerziell erhältlichen Ampli1™ WGA Kit von Menarini Silicon Biosystems (*Whole Genome Amplification* = WGA).

Einzelzellen werden in 1 µl PBS isoliert und direkt zu dem PK Mix (Tabelle 14) in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Aufgrund der Art der Aufarbeitung wird der PK-Mix für DNA aus WTA-Überständen leicht abgewandelt. Es folgt der enzymatische Verdau von Proteinen für 10 h (15 h bei WGA aus Überständen) bei 42°C gefolgt von 10 min Inaktivierung bei 80°C.

Anschließend werden 0,2 µl One-Phor-All Puffer; 0,2 µl MseI (50.000 U/µl) und 1,6 µl PCR-Wasser zu der Probe hinzugefügt (für Überstände lediglich jeweils 0,25 µl MseI (50.000 U/µl) und PCR-Wasser). Nach 3 h Inkubation bei 37°C erfolgt die Inaktivierung für 5 min bei 65°C. Der Preannealing Mix wird in einem PCR Cycler von 65°C in Schritten von 1°C/min auf 15°C gekühlt, bei dem sich die beiden Primer Lib1 und ddMse11 zu dem doppelsträngigen Adapter

zusammenfügen. 3 µl des Preannealing-Mixes werden mit 1 µl ATP (10 mM) und 1 µl T4-Ligase (5 U/µl) zu der verdauten Probe gegeben und über Nacht bei 15°C inkubiert. Nach Zugabe des PCR Mix erfolgt die Amplifikation der MseI Fragmente (Tabelle 15).

Tabelle 14: Zusammensetzung WGA Mastermixe

Name	Zusammensetzung
PK Mix	0,2 µl One-Phor-All Puffer 0,13 µl Tween 10% 0,13 µl Igepal 10% 0,26 µl Proteinase K (10 mg/ml) 1,28 µl PCR-Wasser
PK Mix Überstand	0,5 µl One-Phor-All Puffer 0,13 µl Tween 10% 0,13 µl Igepal 10% 0,26 µl Proteinase K (10 mg/ml)
MseI Verdau	0,2 µl MseI (50.000 U/ µl) 0,2 µl One-Phor-All Puffer 1,6 µl PCR-Wasser
MseI Verdau Überstand	0,25 µl MseI (50.000 U/ µl) 0,25 µl PCR-Wasser
Preannealing Mix	0,5 µl One-Phor-All Puffer 0,5 µl Lib1 Primer (100 µM) 0,5 µl ddMse11 Primer (100 µM) 1,5 µl PCR-Wasser
PCR Mix	3 µl Expand Long Template Buffer 1 2 µl dNTPs (10 mM) 1 µl DNA Pol mix 35 µl PCR-Wasser

Tabelle 15: Cycler Programm WGA PCR

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	68°C	03:00	
2	94°C	00:40	
3	57°C	00:30	15
4	68°C	01:30 + 1 sec/Zyklus	
5	94°C	00:40	
6	57°C + 1°C/Zyklus	00:30	9
7	68°C	01:45 + 1 sec/Zyklus	
8	94°C	00:40	
9	65°C	00:30	23
10	68°C	01:53 + 1 sec/Zyklus	
11	68°C	03:40	
12	4°C	∞	

3.4.3 Amplifikation von FFPE DNA

Aus FFPE Blöcken isolierte genomische DNA kann für weitere Analysen (zum Beispiel Ampli1™ LowPass Sequenzierung) mittels WGA amplifiziert werden. Dazu wird zunächst ein Teil der isolierten DNA mit PCR-Wasser auf 6,67 ng/μl verdünnt. 3 μl dieser Verdünnung werden dann zu einem Mastermix aus 0,5 μl One-Phor-All Puffer, 0,2 μl MseI (50.000 U/μl) und 1,3 μl PCR-Wasser gegeben und für 3 h bei 37°C inkubiert. Nach einer Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 5 min erfolgt die Ligation und Amplifikation wie oben beschrieben.

3.4.4 Reamplifikation des Genoms

Analog zu der Reamplifikation der WTA Proben, können auch WGA Proben für weitere Analysen erneut amplifiziert werden. Dazu wird 1 μl der ursprünglichen WGA zu 49 μl des Mastermix gegeben (Tabelle 16) und amplifiziert (Tabelle 17).

Bei höherer Elongationstemperatur (68°C versus 65°C) werden längere DNA Fragmente suffizienter amplifiziert, weswegen in allen WGA-Reamplifikationen eine Elongationstemperatur von 68°C gewählt wurde.

Tabelle 16: Zusammensetzung WGA-Reamplifikation Mastermix

Reagenzien	1x Ansatz
Expand Long Template Buffer 1	5 μl
Lib1 (10 μM)	5 μl
BSA	1,25 μl
dNTPs (10 mM)	1,75 μl
DNA Pol mix	0,5 μl
PCR-Wasser	35,5 μl

Tabelle 17: Cycler Programm WGA-Reamplifikation

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	94°C	01:00	
2	60°C	00:30	
3	68°C	02:00	
4	94°C	00:30	
5	60°C	00:30	11
6	68°C	02:00 + 20 sec/Zyklus	
7	4°C	∞	

3.5 PCR Qualitätskontrolle der Genom- und Transkriptom-Amplifikate

Um die erfolgreiche Amplifikation des Genoms bzw. des Transkriptoms zu kontrollieren, wird eine Multiplex-PCR durchgeführt. Damit wird überprüft, ob die mRNA von drei Haushaltsgenen (GAPDH, ACTB, EEF1A1), die in jeder Zelle exprimiert sein sollten; bzw. vier Loci auf genomischer Ebene (KRAS, KRT19, D5S2117, TP53_Exon2/3) amplifiziert wurden und mittels PCR nachweisbar sind. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Kapitel 2.4 Oligonukleotide und Primer zu finden. Es wird 1 µl (WGA) bzw. 0,5 µl (WTA) des Amplifikats zu 9 µl bzw. 9,5 µl des Mastermix gegeben (Tabelle 18) und zunächst für 4 min bei 95°C denaturiert. Es folgen 32 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C für 30 sec, Annealing bei 58°C für 30 sec und Elongation bei 72°C für 90 sec. Nach einem abschließendem Elongationsschritt bei 72°C für 7 min wird die Probe bei 4°C oder -20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

Bei jeder PCR wird eine Negativkontrolle mit Wasser und eine Positivkontrolle mit einer bekannt positiven Probe durchgeführt. Eine erfolgreiche Amplifikation hat stattgefunden, wenn mindestens ein Fragment erfolgreich mittels PCR und anschließender Elektrophorese nachgewiesen wird.

Tabelle 18: Zusammensetzung PCR-Qualitätskontrolle Mastermix

Reagenzien	1x Ansatz
10x FastStart PCR Buffer (incl. 20 mM MgCl ₂)	1 µl
Primer-Mix (jeder Primer 4 µM)	1 µl
BSA	0,2 µl
dNTPs (10 mM)	0,2 µl
FastStart Taq Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
PCR-Wasser (WGA)	6,5 µl (WGA)
PCR-Wasser (WTA)	7,0 µl (WTA)

3.6 Primerdesign und -etablierung

3.6.1 Primerdesign

Die Sequenzen für mögliche Primerpaare zur Amplifikation eines bestimmten Gens / Locus wurden mit der online Software NCBI Primer-BLAST gesucht. Folgende Kriterien wurden bei der Auswahl eines Primerpaares berücksichtigt:

- Idealerweise umfassen die beiden Primer eine Exon-Exon Grenze, um die Amplifikation von kontaminierender genomischer DNA zu minimieren.

- Das Primerpaar bindet an eine Stelle des Transkripts, das möglichst weit an dem polyadenylierten 3' Ende der mRNA liegt, da die WTA aufgrund der Poly(T) Selektion eine gewisse Tendenz hat das 3' Ende bevorzugt zu amplifizieren.
- Das Produkt amplifiziert möglichst alle Transkriptvarianten.
- Es entsteht ein Amplikon mit maximal 500 bp Länge (für qRT-PCR maximal 200 bp).
- Die berechnete Schmelztemperatur (T_M) und der GC-Gehalt der beiden Primer sind einander ähnlich (optimal sind 50-60°C T_M und 40-60% GC-Gehalt).
- Die Komplementarität der Primer, die Möglichkeit der Bildung von Primer-Dimeren und die Tendenz Sekundärstrukturen (z.B. hairpins) zu bilden sollte so gering wie möglich gehalten werden.

3.6.2 Gradienten-PCR

Um die optimale Annealingtemperatur (T_A) eines neuen Primerpaares zu testen wird mit einer Referenz-DNA eine Gradienten-PCR durchgeführt. Dabei wird in dem Block des PCR Cyclers ein Temperaturgradient erzeugt. Somit können in einem Lauf verschiedene Temperaturen getestet werden. Soweit nicht anderweitig spezifiziert, wurde der Bereich zwischen 55°C und 66°C getestet. Dazu werden je 0,5 µl der Referenz-DNA zu 9,5 µl des Mastermix (Tabelle 19) gegeben und die PCR durchgeführt. (Tabelle 20) Anschließend erfolgte eine Gel-Elektrophorese mit einem 1,5% Agarose Gel. Die Temperatur der prominentesten Bande der zu erwartenden Fragmentgröße wurde als die optimale Annealingtemperatur des Primerpaares festgelegt. Sollten mehrere Banden sichtbar sein, deutet dies auf die Amplifikation von unspezifischen Begleitprodukten hin und das Primerpaar ist ungeeignet für eine Gen-spezifische PCR.

Tabelle 19: Gradienten-PCR Mastermix

Reagenzien	1x Ansatz
10x FastStart PCR Buffer (incl. 20 mM MgCl ₂)	1 µl
Primer forward (8 µM)	0,5 µl
Primer reverse (µM)	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,2 µl
BSA	0,2 µl
FastStart Taq Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
PCR-Wasser	7,0 µl

Tabelle 20: Cycler Programm Gradienten-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	94°C	02:00	
2	55-66°C	00:30	
3	72°C	02:00	
4	94°C	00:40	
5	55-66°C	00:30	11
6	72°C	00:20	
7	94°C	00:40	
8	55-66°C	00:30	28
9	72°C	00:30	
10	94°C	00:40	
11	55-66°C	00:30	
12	72°C	07:00	
13	4°C	∞	

3.6.3 qRT-PCR-Testung mittels Standard- und Schmelzkurve

Die quantitative Echtzeit (real time) PCR erlaubt den Nachweis einer bestimmten DNA-Sequenz in einer Probe und gleichzeitig die Bestimmung der absoluten bzw. relativen Konzentration dieses Fragments. Es basiert auf der Zunahme des Fluoreszenz-Signals von SYBR Green I, einem fluoreszierenden Cyanin-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Dabei entspricht die Zunahme des DNA-Gehaltes, der Zunahme des Fluoreszenz-Signals.

Primerpaare müssen aufgrund der höheren Sensitivität der qRT-PCR gegenüber einer herkömmlichen PCR für diese Methode speziell getestet werden. Hierfür wird eine sogenannte Standardkurve berechnet. Dazu wird mit einer Referenz-DNA eine 1:10 Verdünnungsreihe hergestellt (20 ng/µl bis 0,00002 ng/µl). Jeweils 2,5 µl der Verdünnungen werden mit 7,5 µl des Mastermix (Tabelle 21) gemischt und in einem Roche LightCycler® 480 amplifiziert (Tabelle 22). Als Negativkontrolle wird anstatt von Referenz-DNA Wasser verwendet. Alle Proben werden in Triplikaten gemessen.

Bei der Auswertung werden die Mittelwerte der Ct-Werte der Triplikate berechnet (bei groben Ausreißern kann einer der drei Werte ausgelassen werden) und gegen $\log_{10}(\text{Verdünnungsfaktor})$ in einem Diagramm aufgetragen. Dabei sollte sich eine lineare Kurve mit einer optimalen Steigung von 3,3 und einer Korrelation von $R^2 > 0,99$ zeigen. Die Effizienz des Primerpaares kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Effizienz (\%)} = \left(10^{\frac{1}{\text{Steigung}}} - 1 \right) \times 100$$

Eine Effizienz von 90-110% über mindestens 4 log-Stufen ist als optimal anzusehen. Zudem dürfen bei der Schmelzkurve keine unspezifischen Peaks detektierbar sein und die Ct-Werte der Negativkontrolle sollten > 30 sein.

Tabelle 21: Zusammensetzung qRT- PCR Mastermix

Reagenzien	1x Ansatz
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5 µl
Primer forward (8 µM)	0,5 µl
Primer reverse (8 µM)	0,5 µl
PCR-Wasser	1,5 µl

Tabelle 22: Cycler Programm qRT- PCR

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	95°C	05:00	
2	95°C	00:20	
3	62°C	00:15	35
4	72°C	00:15	
5	95°C	00:05	
6	50°C	01:00	
7	50-95°C (+2,2°C/sec)		
8	40°C	∞	

3.6.4 Restriktionsverdau des PCR Produktes

Um die Spezifität eines Primerpaares weiter zu prüfen, wird das PCR-Produkt mit Enzymen verdaut. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA bei bestimmten Sequenzen (z.B. nach CAGAG (N)₅ für *BsmAI*) schneiden. Mit Hilfe einer Software (NEBcutter V2.0), die alle Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen einer bestimmten DNA-Sequenz anzeigt, kann ein Enzym ausgewählt, und ein Verdau durchgeführt werden.

Dafür werden zu 15 µl des PCR-Produktes, 3 µl des Puffers, 3 µl des ausgewählten Enzyms und 9 µl Wasser gegeben. Für die Negativkontrolle wird Wasser anstatt des PCR-Produkts eingesetzt. Die verwendeten Enzyme, Puffer, Inkubationszeiten und -temperaturen können der Tabelle 42 entnommen werden. Die Gelelektrophorese erfolgt auf einem 3% Agarose-Gel.

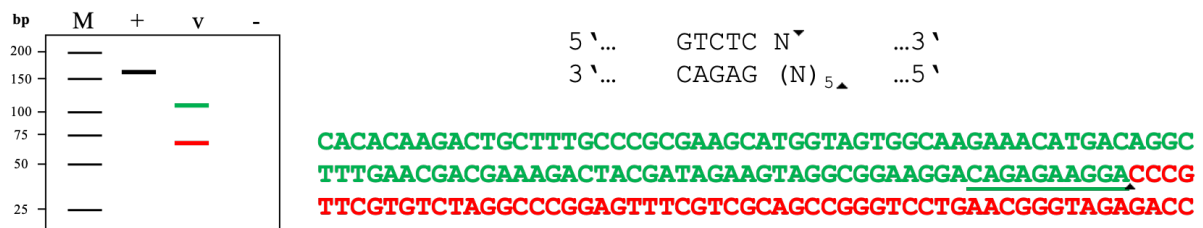


Abbildung 6: Schematische Darstellung eines Restriktionsverdaus

Gezeigt wird die Sequenz, bei der beispielhaft das Enzym *BsmAI* DNA schneidet (rechts oben) und ein Beispiel einer DNA Sequenz (162 bp), die durch *BsmAI* in zwei Fragmente gespalten wird (58 bp und 104 bp; rechts unten). Die Grafik links zeigt das schematische Bild einer Gelelektrophorese der DNA-Sequenz (+), der verdauten Sequenz (v) und einer Negativkontrolle (-) zusammen mit einem Größenmarker (M).

3.7 Genspezifische PCR

Mit einer genspezifischen PCR kann nachgewiesen werden, ob ein bestimmtes Transkript in der zu untersuchenden Probe exprimiert ist. Dafür wird die cDNA 1:20 mit Wasser verdünnt. Anschließend werden zu 2 µl der verdünnten Probe 8,1 µl Mastermix (Tabelle 23) gegeben und mittels PCR amplifiziert (Tabelle 24). Die Annealingtemperatur richtet sich nach dem verwendeten Primerpaar und ist in den Tabellen 4-5 zu finden. Bei jeder PCR sind eine Negativkontrolle mit Wasser bzw. eine Positivkontrolle mit einer Referenz-DNA durchzuführen. Anschließend erfolgt eine Gelelektrophorese mit einem 2% Agarose-Gel oder automatisiert auf dem QIAxcel® Advanced System.

Tabelle 23: Zusammensetzung Genspezifische PCR Mastermix

Reagenzien	1x Ansatz
Puffer + dNTPs	1 µl
Primer forward (8 µM)	0,5 µl
Primer reverse (8 µM)	0,5 µl
BSA	0,25 µl
PanScript DNA Polymerase	0,1 µl
PCR-Wasser	5,75 µl

3.8 Gel-Elektrophorese

3.8.1 Manuelle Agarosegel-Elektrophorese

Agarosegele werden hergestellt indem 1-3 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer gelöst werden. Dafür wird der Erlenmeyerkolben in einer Mikrowelle erhitzt, bis die Agarose komplett in dem Puffer gelöst ist und eine klare Suspension entsteht. 4,5 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) werden je 100 ml Agaroselösung hinzugefügt und durch sanftes Schütteln verteilt.

Tabelle 24: Cycler Programm Genspezifische PCR

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	94°C	02:00	
2	T _A	00:30	1
3	72°C	02:00	
4	94°C	00:15	
5	T _A	00:30	14
6	72°C	00:20	
7	94°C	00:15	
8	T _A	00:30	25
9	72°C	00:30	
10	72°C	02:00	
11	4°C	∞	

T_A = ermittelte optimale Annealingtemperatur für verwendeten Primer (Kapitel 2.4 Oligonukleotide und Primer)

Anschließend wird das Gemisch in einen Gelschlitten gegossen, Kämme eingesetzt und mit einer Pipettenspitze verbliebene Luftblasen entfernt. Die Polymerisation des Geles erfolgt bei Raumtemperatur. Zu der Probe (5-30 µl) werden 3-5 µl eines Ladepuffers gegeben und anschließend auf das Gel aufgetragen. Auf jedem Gel werden 8 µl eines passenden DNA Komigrationsstandards mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 450 mA, 160 V für 45-60 Minuten. Anschließend können die DNA Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht werden.

3.8.2 Automatisierte Kapillarelektrophorese mittels QIAxcel®

Als Alternative zur manuellen Gelelektrophorese kann eine automatisierte Kapillarelektrophorese an dem QIAxcel® Advanced System durchgeführt werden. Hierbei wird die DNA automatisiert in eine kommerziell verfügbare Gelkartusche mit 12 Glaskapillaren geladen. Ein Detektor misst das Fluoreszenzsignal während der Migration der negativ geladenen DNA Moleküle innerhalb der Kapillare und errechnet daraus ein Elektropherogramm und ein Gelbild der Probe. Die Durchführung erfolgt mit Hilfe eines DNA High Resolution bzw. eines DNA Screening Kits nach Angaben des Herstellers.

3.9 DNA Aufreinigung

Isolierte bzw. amplifizierte DNA muss für gewisse Methoden aufgereinigt werden, um verbliebene Primer und Nukleotide, aber auch Salze und Enzyme zu entfernen, da diese weitere

Analysen stören oder die Ergebnisse verfälschen können. Dies gilt insbesondere für Sequenzierungen und qRT-PCR Analysen.

3.9.1 QIAquick PCR Purification Kit

Die Aufreinigung von DNA mittels dem QIAquick PCR Purification Kit erfolgt nach Angaben des Herstellers. Die DNA wird durch Zentrifugation an eine Silicamembran einer Säule gebunden und durch Waschschriffe von Kontamination befreit. Anschließend kann die DNA in dem gewünschten Volumen eines Puffers (meist Wasser, Qiagen Buffer EB oder TE-Puffer) gelöst und eluiert werden.

3.9.2 Agencourt AMPure XP beads

Mittels paramagnetischen AMPure XP beads kann DNA manuell oder automatisiert mit Hilfe eines magnetischen Feldes aufgereinigt werden. DNA kann bei geeigneten Umständen (20% Polyethylen-Glykol und 2,5 M NaCl) an die Carboxyl-Gruppen auf der Oberfläche der beads binden und somit in einem magnetischen Feld immobilisiert werden. Durch Zugabe eines wässrigen Lösungsmittels kann die DNA letztlich wieder von den beads gelöst werden.

Durch das Verhältnis von AMPure XP beads zu Probe kann auch die Aufreinigung von Fragmenten bestimmter Größen beeinflusst werden. Prinzipiell gilt dabei, desto größer das Verhältnis von beads zu Probe, desto effizienter werden auch kleine Fragmente (insbesondere Fragmente < 200 bp) aufgereinigt,

In dieser Arbeit wird - soweit nicht anders spezifiziert - ein Verhältnis von 1,8:1 von Beads zu Probe gewählt und die Aufreinigung nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.10 DNA Quantifikation

3.10.1 NanoDrop™ 2000c Messung

Die Messung von Nukleinsäuren mit dem NanoDrop™ System erfolgt nach Angaben des Herstellers. Vor der Benutzung des Gerätes wird die Messfläche mit destilliertem Wasser gereinigt. Nach der Kalibrierung des Systems muss eine Negativprobe gemessen werden. Hier wird 1 µl des Lösemittels (z.B. Wasser, TE Puffer) oder eine mit aufgearbeitete Negativkontrolle gemessen. Anschließend werden nacheinander je 1 µl der Proben aufgetragen

und gemessen. Zwischen den Messungen wird die Messfläche mit einem trockenen und weichen Papiertuch gesäubert.

Die Qualität der Probe kann mit den Absorptionsverhältnissen 260/280 nm und 260/230 nm eingeschätzt werden. Hier werden Werte von 1,8 – 2 als gut bewertet.

3.10.2 Qubit® Messung

Die Bestimmung der DNA Konzentration mittels Qubit® erfolgt mit dem High Sensitivity (0,2-100 ng/µl) oder Broad Range (2-1000 ng/µl) Kits nach Angaben des Herstellers an einem Qubit® 2.0 oder 3.0 Fluorometer. Direkte Lichtexposition sollte während der Vorbereitung und der Messung aufgrund von möglichen Verfälschungen der Ergebnisse durch Licht vermieden werden. Zusammengefasst wird in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß bis zu 20 µl der Probe mit der Arbeitslösung zu einem Gesamtvolumen von 200 µl vermischt, kurz gevortext und mindestens zwei Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Anschließend wird auf dem Fluorometer das benutzte Kit gewählt und die Standards gemessen. Bevor die Proben eingesetzt werden ist noch das eingesetzte Volumen der Probe auszuwählen, da das Qubit® Fluorometer automatisch den Verdünnungsfaktor mit einrechnet und die Originalkonzentration der Probe berechnet.

3.10.3 Agilent 2100 Bioanalyzer Messung

Mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer kann die Qualität, Konzentration und die Fragmentlängenverteilung von Nukleinsäuren gemessen werden. Dies geschieht mittels automatisierter Chip-Elektrophorese. Verschiedene Kits weisen unterschiedliche Spezifikationen, z.B. des erfassten Größenbereichs auf (High Sensitivity DNA Kit: 50-7500 bp, DNA 1000 Kit: 25-1000 bp).

Die Durchführung erfolgt nach Angaben des Herstellers, wobei die Konzentrationsangaben bei der Bioanalyzer Analyse aufgrund von Ungenauigkeiten nicht berücksichtigt werden. Anhand des Fragmentlängenprofils kann je nach Art der Probe die Qualität und der Grad der Kontamination abgeschätzt werden.

3.10.4 KAPA Library Quantification Kit

Mit dem KAPA Library Quantification Kit für Illumina kann die Konzentration von Illumina-kompatiblen NGS-Proben mittels qRT-PCR bestimmt werden. Dazu werden Illumina Standard Primer zur Amplifikation der Libraries verwendet und anhand einer Standardkurve (bestimmt

durch Messung von sechs bekannten Konzentrationen eines 452 bp Oligonukleotids = Standard 1-6) die absolute Konzentration der Probe berechnet. Die Durchführung erfolgt größtenteils nach Angaben des Herstellers.

Für jede Probe werden zwei unabhängige Verdünnungsreihen angesetzt. LowPass Proben werden in einer Verdünnung von 1:100.000 und 1:200.000 gemessen. Für RNA-Seq Proben erfolgt die qRT-PCR mit einer 1:10.000 und einer 1:20.000 Verdünnung. Zu je 4 µl der Verdünnungen/Standards/Negativkontrolle (= Wasser) werden 4 µl Wasser und 12 µl des fertigen Mastermix (4 ml KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix + 1 ml Primer Premix) gegeben. Alle Proben werden in Triplikaten auf einem Roche LightCycler® 480 (Tabelle 25) gemessen und die absolute Konzentration berechnet. Mit der mittleren Fragmentlänge der Probe kann die Molarität ermittelt werden.

Tabelle 25: Cycler Programm KAPA Library Quantification

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	95°C	05:00	
2	95°C	00:30	
3	60°C	00:45	40
4	65-95°C (+2,2°C/sec)		

3.11 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Zum quantitativen Nachweis ausgewählter Transkripte (hier: EpCAM und CD45) erfolgt eine qRT-PCR. Dafür werden die WTA Proben reamplifiziert und mit 1,8x AMPure XP beads aufgereinigt. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt mit einem Qubit® Broad Range DNA Kit. Anschließend werden die Proben zur Normalisierung des cDNA Gehalts mit Wasser auf 1 ng/µl verdünnt. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgt analog zu Kapitel 3.6.3. Jeder Lauf enthält eine Positiv- und eine Negativkontrolle. Die Positivkontrolle dient dabei ebenfalls als Kalibrator, um Differenzen von Cp-Werten zwischen verschiedenen Läufen zu erkennen. Dazu ist es wichtig für jeden Lauf eines Experimentes das gleiche DNA-Aliquot als Positivkontrolle zu verwenden. Die Unterschiede der Cp-Werte dieses Kalibrators zeigen Proben-unabhängige, Lauf-spezifische Differenzen und müssen von den Cp-Werten der zu untersuchenden Proben abgezogen werden.

3.12 Sanger-Sequenzierung

Die Sequenzierung nach Sanger erlaubt die Identifikation der Basenabfolge von DNA-Abschnitten. Somit können Punktmutationen und kurze Insertionen bzw. Deletionen nachgewiesen werden. Für die Sanger-Sequenzierung von den Exonen 5-8 des TP53 Gens (Primersequenzen in Kapitel 2.4 Oligonukleotide und Primer) wird eine genspezifische PCR durchgeführt (Tabelle 26 + 24) und das Vorhandensein eines PCR-Produktes mit einer Gelelektrophorese bestätigt (1,5% Agarose Gel). Die Konzentration der dsDNA wird mit einem Qubit® BR Kit bestimmt und mit Wasser auf 10 ng/µl verdünnt. 15 µl dieser Verdünnung wird in eine neue Platte überführt. Zu jeder Probe werden 2 µl von einem (forward oder reverse) der dazugehörigen Primer (10 µM) gegeben und durch die Firma Eurofins Genomics sequenziert.

Tabelle 26: Zusammensetzung PCR Sanger Sequenzierung Mastermix

Reagenzien	1x Ansatz
10x FastStart PCR Buffer (incl. 20 mM MgCl ₂)	4 µl
Primer forward (8 µM)	2 µl
Primer reverse (8 µM)	2 µl
BSA	1 µl
dNTPs (10 mM)	0,8 µl
FastStart Taq Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
PCR-Wasser	33,2 µl
DNA Template	2 µl

3.13 Next-Generation-Sequencing

3.13.1 Aufarbeitung des Transkriptoms für RNA-Seq

Aufgrund einer Änderung der Sequenz des CFL15CT24 Primers im März 2012, beinhaltet dieser nun einen Abschnitt, der von dem Restriktionsenzym BpuEI erkannt wird. WTA Proben, die vor diesem Zeitpunkt bearbeitet wurden, müssen für RNA-Seq etwas anders aufgearbeitet werden (siehe Ende dieses Abschnittes).

1,5 µl der WTA wird mit 6 µl NGS-Wasser verdünnt und anschließend werden 5 µl zu 95 µl Reamp Mix (Tabelle 27) gegeben und auf fünf 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Die Reamplifizierung erfolgt in einem PCR Cycler (Tabelle 28). Der Erfolg der PCR wurde stichprobenartig mittels Multiplex-PCR (Abschnitt 3.5) kontrolliert. Die Proben werden in einem 1,5 ml Gefäß gepoolt und mit 180 µl AMPure XP beads aufgereinigt. Anschließend erfolgt die enzymatische Entfernung der CP2 Adapter. Zu den 40 µl Eluat (NGS-Wasser) gibt man 10 µl des Verdau Mix I und inkubiert die Probe für eine Stunde bei 37°C, gefolgt von 20

min bei 65°C. Anschließend werden 10 µl des Verdau Mix II zugegeben und für drei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach einer Enzym-Inaktivierung bei 65°C für 20 min erfolgt erneut eine Aufreinigung mit 1,8x AMPure XP beads. Hierbei werden die Proben in 16 µl Qiagen EB (bzw. 40 µl Qiagen EB bei Aufreinigung am Biomek i7) eluiert. Die Qualität und Konzentration der WTA wird mit dem Bioanalyzer 2100 auf einem DNA High Sensitivity Chip bzw. auf einem Qubit® Fluorometer mit einem High Sensitivity Kit evaluiert. Nur Proben ohne Hinweis auf RNA-Degradierung vor Amplifizierung werden weiterbearbeitet. Mit Hilfe der mittleren Fragmentlänge wird die optimale Dauer der Covarisierungszeit ermittelt. Die Probe wird auf 20 ng/µl verdünnt und 55 µl der Verdünnung werden mit einem Covaris M220X Instrument fragmentiert. Die korrekte mittlere Fragmentlänge nach der Fragmentation wird stichprobenartig auf einem DNA 1000 Chip (Bioanalyzer 2100) kontrolliert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt mit dem TruSeq DNA PCR free Low / High Throughput Library Prep Kit und den TruSeq DNA Single Indexes Set A+B / TruSeq DNA CD Indexes nach Angaben des Herstellers. Die Qualität und die Konzentration der fertigen Libraries werden mit einem Bioanalyzer High Sensitivity Chip und einem KAPA Library Quantification Kit für Illumina nach Angaben der Hersteller ermittelt und die Proben mit einer Konzentration von 10 nM gepoolt.

Tabelle 27: Zusammensetzung RNA-Seq Mastermix

Name	Zusammensetzung
Reamp Mix	10 µl Expand Long Template Buffer 1 15 µl Formamid 20% 3,5 µl dNTPs (10 mM) 10 µl CP2-BglI-13C (24 µM) 1,5 µl DNA Pol mix 55 µl NGS-Wasser
Reamp Mix OLD	20 µl Expand Long Template Buffer 1 30 µl Formamid 20% 7,0 µl dNTPs (10 mM) 12 µl CP2-BglI-13C (24 µM) 12 µl CP2-BpuEI-13C (24 µM) 6,0 µl DNA Pol mix 103 µl NGS-Wasser
Verdau Mix I	5,0 µl 10x EcoRI Buffer (mit 80 µM SAM) 2,5 µl BpuEI (5 U/µl) 2,5 µl NGS-Wasser
Verdau Mix II	1,0 µl 10x EcoRI Buffer 2,5 µl BglI (10 U/µl) 6,5 µl NGS-Wasser

Alternativ erfolgt das Pooling der Proben mittels MiSeq Sequenzierung (Kapitel 3.13.3). Die finalen Libraries werden auf einem HiSeq 3000 bzw. NovaSeq 6000 System (2x150 bp) mit einer erwarteten Coverage von ca. 3 Millionen reads pro Probe (shallow) bzw. ca. 20 Millionen reads pro Probe (deep) und 10% PhiX spike-in sequenziert.

Für WTA Proben vor der Änderung in der CFL15CT24 Sequenz werden zwei unabhängige Verdünnung angesetzt und jeweils 5 µl mit 95 µl Reamp Mix OLD auf fünf 0,2 ml Reaktionsgefäße verteilt. Nach der Reamplifizierung (Tabelle 27 + 29) werden alle zehn Reaktionen in einem 1,5 ml Gefäß gepoolt und mit 320 µl AMPure XP beads aufgereinigt. Die weitere Bearbeitung erfolgt analog zu den neuen WTA Proben (siehe oben).

Tabelle 28: Cycler Programm RNA-Seq Reamplifizierung

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	94°C	02:00	
2	94°C	00:15	8
3	68°C	04:00	
4	68°C	07:00	
5	4°C	∞	

Tabelle 29: Cycler Programm RNA-Seq Reamplifizierung OLD

Schritt	Temperatur	Zeit (min:sec)	Zyklen
1	94°C	01:00	
2	94°C	00:15	
3	55°C	01:00	5
4	65°C	03:30	
5	94°C	00:15	
6	55°C	01:00	3
7	65°C	03:30 + 10 sec/Zyklus	
8	65°C	07:00	
9	4°C	∞	

3.13.2 Aufarbeitung des Genoms für Ampli1™ LowPass Sequenzierung

Das Ampli1™ LowPass Kit nutzt die Sequenz der Mse-Adaptoren der WGA-Produkte aus, um den DNA-Fragmenten Illumina-kompatible Barcodes für Next Generation Sequencing hinzuzufügen. Zur Bearbeitung der LowPass Proben wird die WGA zuerst reamplifiziert (Elongationstemperatur 68°C). Anschließend werden 5 µl der Reamp 1:1 mit Wasser verdünnt und mit 15 µl AMPure XP beads aufgereinigt. Die weitere Aufarbeitung entspricht dem

ursprünglichen Protokoll des Herstellers mit folgenden Abweichungen: Anstatt SPRI Select beads werden AMPure XP beads benutzt und die Anzahl der Zyklen während der Library Amplification PCR beträgt 10.

Das Pooling der Proben erfolgt anhand einem Bioanalyzer Profil und der mit einem Qubit® HS DNA Assay bestimmten DNA Konzentration wie vom Hersteller beschrieben oder alternativ mittels MiSeq Sequenzierung (Kapitel 3.13.3). Die Sequenzierung der finalen Proben erfolgt auf einem Illumina MiSeq (1x150 bp) bzw. NovaSeq 6000 (1x100 bp) Instrument mit einem Custom Primer für Read 1.

3.13.3 NGS Pooling mittels MiSeq Sequenzierung

Für die Quantifizierung der einzelnen Proben innerhalb eines Pools wird ein MiSeq Lauf durchgeführt. Für LowPass Proben wird 1 µl jeder Probe in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der resultierende Pool erneut mit 1,8x AMPure XP beads aufgereinigt. Es folgt die Bestimmung der DNA Konzentration mittels Qubit® HS DNA Assay und der mittleren Fragmentlänge mittels Bioanalyzer HS DNA Kit. Die Molarität des Pools wird mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Molarität (nM)} = \frac{\text{Konzentration (ng/}\mu\text{l)}}{660 \times \text{mittlere Fragmentlänge (bp)}} \times 10^6$$

Für RNA-Seq Libraries wird ebenfalls je 1 µl der Probe in einem neuen Gefäß gepoolt. Anschließend wird die Konzentration des Pools mit dem KAPA qPCR Kit für Illumina bestimmt.

Die Pools werden mit TE-Puffer auf 4 nM verdünnt und denaturiert. Es erfolgt die Sequenzierung des Pools mit einem MiSeq Kit v2 (RNA-Seq: 2x25 bp, 20 pM, 5% PhiX) bzw. Micro oder Nano Kit v2 (LowPass: 1x150 bp, 12 pM, kein PhiX) auf einem MiSeq Instrument nach Angaben des Herstellers. Für die Sequenzierung der LowPass Pools werden 5 µl des 60 µM Custom Primers mit 595 µl HT1 Illumina Puffer verdünnt und in die Position 18 der MiSeq Cartridge geladen.

Anhand der Anzahl der Reads pro Library wird das Verhältnis der Proben zueinander bestimmt und die Volumina für einen balancierten Pool berechnet. Es folgt das manuelle bzw. automatisierte (LabCyte Echo® 525) Pooling der berechneten Volumina. Für die LowPass Pools erfolgt abschließend eine die Konzentrationsbestimmung mit dem KAPA qPCR Kit für Illumina und der mittleren Fragmentlänge mit einem Bioanalyzer HS DNA Assay.

3.14 Statistische Auswertung der Daten

3.14.1 Statistische Tests

Alle statistischen Tests wurden mit IBM® SPSS® Statistics (Version 25), GraphPad Prism (Version 6) oder Microsoft® Excel für Mac (Version 16.42) berechnet.

Bei der Untersuchung von Häufigkeitsverteilungen zwischen zwei dichotom verteilten Variablen (Tabelle 30) wurde der Chi²-Test oder der exakte Fisher-Test (CNV-Analyse) angewendet. Im Falle von multiplen Testungen erfolgte die Korrektur der p-Werte mit der Falscherkennungsrate (FDR) nach Benjamini und Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995).

Sofern nicht anders angegeben, wurde bei metrischen Daten ein nicht-parametrischer, zweiseitiger Mann-Whitney Test durchgeführt.

Bei der Untersuchung von Überlebensdaten wurden der univariate Log-Rank Test und die multivariate Cox-Regressions-Analyse verwendet.

Bei der Auswertung von Korrelationen wurde der nicht-parametrische Korrelationskoeffizient r nach Spearman bzw. der Korrelationskoeffizient R nach Pearson benutzt. Zudem wurde bei dem Korrelations-Test nach Pearson das Bestimmtheitsmaß R^2 bestimmt, das das Verhältnis der erklärten Varianz zur Gesamtvarianz angibt.

Tabelle 30: Beispiel einer 2x2 Kontingenztafel

	B 1	B 2	Summe
A 1	a	b	a+b
A 2	c	d	c+d
Summe	a+c	b+d	n

Zwei Merkmale (A und B) mit jeweils zwei möglichen Ausprägungen (1 und 2).

3.14.2 Hierarchische Clusteranalyse und Hauptkomponentenanalyse

Die Ergebnisse der genspezifischen PCRs wurden in RStudio (version 1.1.463), R (version 3.6.3) (R Core Team, 2020) importiert. Die hierarchische Clusteranalyse erfolgte mit Hilfe des R package ComplexHeatmap (version 2.2.0) (Z. Gu, Eils, & Schlesner, 2016) und Farben von RColorBrewer (version 1.1-2). Die Hauptkomponentenanalyse wurde mit dem R package factoextra (version 1.0.7) durchgeführt.

3.15 Bioinformatische Auswertung der NGS Daten

3.15.1 Auswertung der RNA-Seq Daten

Die Qualität der Sequenzierung wurde vor und nach dem Trimmen und Filtern von Adapttern, Abschnitten mit schlechter Sequenzierqualität und Kontamination mit FastQC (version 0.11.8) (Andrews, 2010) und MultiQC (version 1.8) (Ewels, Magnusson, Lundin, & Käller, 2016) analysiert.

Verbliebene Adaptersequenzen und Basen mit schlechter Sequenzierqualität an den Enden der rohen Sequenzier-Reads wurden mit BBDuk (JGI DataScience, 2019) getrimmt. Anschließend wurden alle Reads mit einer möglichen Kontamination entfernt. Hierfür wurde mit Hilfe der BioBloom Tools (Chu et al., 2014) Filter für die Genome von Homo sapiens (hg38), Mus musculus (mm10), Escherichia coli (BL21), Mycoplasma pneumoniae (M129), Sphingobium sp. (SYK-6), Bradyrhizobium japonicum (USDA 110), Pichia pastoris (GS115), Malessia globosa (CBS 7966), Aspergillus fumigatus (Af293), und ein Set von viralen Genomen (RefSeq, 5k+ genomes) erstellt. Alle Reads, die nicht ausschließlich dem humanen Genom hg38 (GENCODE version 27, GRCh38.p10) oder zu keinem der verwendeten Genomen zugeordnet werden konnten, wurden von der weiteren Analyse entfernt. Dieser Schritt sollte falsch-positive Alignments und somit die Mapping-Qualität der Sequenzierungen erhöhen. Letztlich erfolgte das Alignment der bereinigten Sequenziererergebnisse zu dem humanen Referenzgenom hg38 mit Hilfe von STAR (version 2.5.1b) (Dobin et al., 2013). Eindeutig zugeordnete Reads wurden mit featureCounts von Subread (Y. Liao, Smyth, & Shi, 2013) als Counts pro Gen pro Probe gezählt. In der weiteren Qualitätskontrolle wurden anhand der Histogramme folgende Cut-off Werte festgelegt: Proben mit i) mindestens $10^{3.5}$ detektierten Genen bzw. ii) mindestens $10^{4.5}$ Reads werden eingeschlossen. Proben, bei denen mehr als 40% der Reads zu mitochondrialen Genen zugeordnet wurden, werden ausgeschlossen.

3.15.2 Auswertung der LowPass Daten

Die Auswertung der LowPass Sequenziererergebnisse erfolgte bis zu dem Alignment analog zu der Auswertung der RNA-Seq. Das Alignment der bereinigten Reads erfolgte mit bwa (version 0.7.17) (Li & Durbin, 2009). Die dabei entstandenen bam Dateien wurden zur Erstellung der Genomprofile mit der QDNASeq Methode prozessiert (Scheinin et al., 2014).

3.15.2.1 Erstellen der kumulativen Copy-Number-Profile

Für die Erstellung von kumulativen CNV-Häufigkeitsgrafiken wurden die bei der CNV Analyse entstandenen Informationen zu den detektierten Genomaberrationen und deren \log_2 Ratios der zu untersuchenden Proben kombiniert und mit der online verfügbaren Software *Progenetix* (www.progenetix.org, Baudis & Cleary, 2001) prozessiert. Dabei werden sowohl kumulative Häufigkeitsgrafiken als auch eine Clusteranalyse mit einem Dendrogramm der Proben erstellt.

3.15.2.2 Vergleichende Analyse der kumulativen Copy-Number-Profile

Um signifikante Unterschiede in der Häufigkeit von Genomaberrationen zwischen zwei untersuchten Gruppen zu bestimmen, wurden für alle untersuchten Genomabschnitte (*bins* mit jeweils 500 Kilobasen) die Aberrationen (balanciert, Amplifikation, Deletion) aufgetragen und mit einem exaktem Fisher-Test das Signifikanzniveau (p-Wert) bestimmt. Anschließend wurden die p-Werte mittels der Falscherkennungsrate (FDR) nach Benjamini und Hochberg für multiples Testen korrigiert (q-Wert). Genomabschnitte mit einer $FDR \leq 0,10$ wurden als signifikant gewertet.

Dabei wurden nur Aberrationen mit einer \log_2 Ratio von größer bzw. kleiner 0,15 / -0,15 als Amplifikationen und Deletionen gewertet. Abschnitte, die bei keiner der untersuchten Probe abgebildet werden konnten (meist Chromosomenenden, die aufgrund der Amplifikationsmethode nicht oder nur ungenügend amplifiziert werden) und die gonosomalen Chromosomen werden ausgeschlossen.

$$\text{exakter Fisher-Test} = \frac{(a + b)! (c + d)! (a + c)! (b + d)!}{a! b! c! d! n!}$$

$$FDR = p\text{-Wert} \times \frac{\text{Gesamtanzahl der } p\text{-Werte}}{\text{Rang des } p\text{-Wertes}}$$

4 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation und Charakterisierung von disseminierten Tumorzellen in Patienten mit Nicht-Kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) in einem frühen Stadium (M0). Dafür wurden Knochenmarksaspirate und lokoregionäre Lymphknoten auf die Anwesenheit von Zellen mit den epithelialen Molekülen *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM) und Zytokeratinen untersucht. Bei einigen Patienten war der Tumor zum Zeitpunkt der Operation bereits systemisch manifestiert im Sinne von Fernmetastasen (M1, n=15). Diese Patienten liefern wertvolle Informationen bei der Analyse der Tumorevolution und Disseminierung und wurden deshalb in die weiteren Analysen miteingeschlossen. Der Bias dieser Faktoren wird in der weiteren Auswertung mit untersucht.

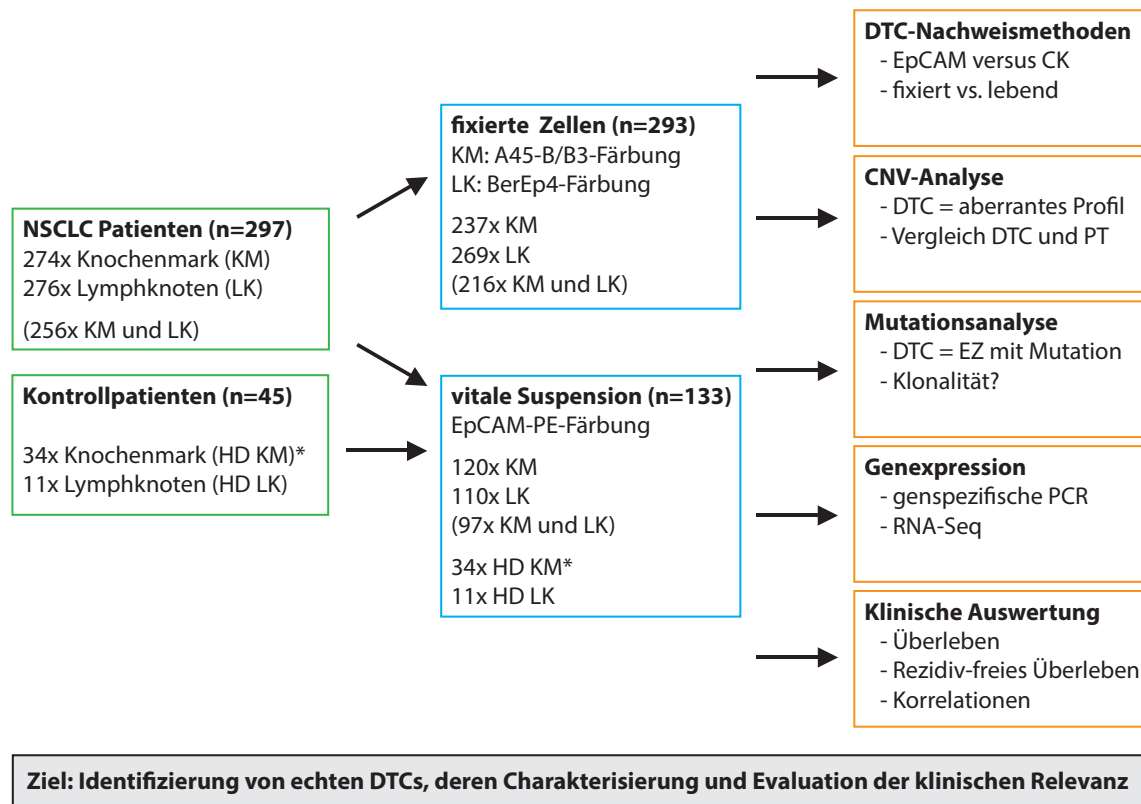


Abbildung 7: Schema und Zielsetzung der Doktorarbeit

* Die Knochenmark Kontrollpatienten stammen aus dem Brust- und Prostatakrebs Projekten und sind bereits publiziert (Haunschild, 2013. Guzvic et al., 2014. Irlbeck, 2019).

4.1 Kollektiv an untersuchten Patienten mit Nicht-Kleinzelligem Lungenkrebs

In dem Zeitraum von April 2011 bis Juli 2019 erhielt der Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren der Universität Regensburg Proben von 297 Patienten mit einer histologisch gesicherten Diagnose NSCLC. Routinemäßig wurden alle eingegangenen Proben wie oben beschrieben aufgearbeitet und auf Haftobjektträgern nach EpCAM (monoklonaler

Antikörper BerEp4, Lymphknoten) bzw. Zytokeratin (monoklonaler Antikörper A45B/B3, Knochenmark) positiven Einzelzellen gescreent. Eine Subgruppe dieses Kollektives wurde bei genügender Zellzahl zudem auf die Anwesenheit von EpCAM-positiven Zellen (monoklonaler Antikörper-Klon: HEA-125) in einer unfixierten Zellsuspension untersucht (Tabelle 31).

Tabelle 31: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Antigen	Methode	Amplifikation	Analysen
A45B/B3	CK8/18/19	IC	WGA	OS/PFS, LowPass
BerEp4	EpCAM	IC	WGA	OS/PFS, LowPass
HEA-125	EpCAM	IF	WTA/WGA	OS/PFS, LowPass, RNA-Seq, TP53-Seq, genspez. PCR

CK = Zytokeratin, EpCAM = *Epithelial Cell Adhesion Molecule*, IC = Immunzytologie, IF = Immunfluoreszenz, WGA = Whole Genome Amplification, WTA = Whole Transcriptome Amplification, OS/PFS = Gesamtüberleben/Progressions-freies Überleben

4.1.1 Übersicht über das Gesamtkollektiv mit Nachweis von BerEp4 und A45-positiven Einzelzellen

Bei insgesamt fünf Proben konnten weder Lymphknoten noch Knochenmark ausgewertet werden. Somit befinden sich 292 Patienten in dem Gesamtkollektiv zur Analyse der minimalen Resterkrankung (MRD). Tabelle 32 gibt eine Übersicht über das Kollektiv und dessen Charakteristika. Das Auftreten von MRD in Lymphknoten oder Knochenmark von den eingeschlossenen Patienten zeigte keinen signifikanten Unterschied in Hinblick auf die Tumor- bzw. Patientencharakteristika außer dem N-Status. Ein positiver Nodalstatus – also eine pathologisch gesicherte lymphogene Streuung von Tumorzellen – ist höchst signifikant mit der Detektion von MRD assoziiert.

4.1.2 Übersicht über das EpCAM-Kollektiv mit Nachweis von HEA-125-positiven Einzelzellen

Insgesamt 133 Patienten wurden zusätzlich in lebender Zellsuspension auf HEA-125-positive Zellen untersucht. In dieser Subgruppe zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge von Patienten- oder Tumorcharakteristika und dem Auftreten von MRD. Auch der N-Status war in dieser Kohorte nicht mit der Detektion von HEA-125-positiven Zellen assoziiert (Tabelle 33). Zwischen den Charakteristika des Gesamtkollektivs und der EpCAM-Subgruppe zeigen sich keine signifikanten Unterschiede (Chi²-Test, $p > 0,05$).

Tabelle 32: Überblick über das NSCLC Gesamtkollektiv

Charakteristikum		LK n=269 (100%)	LK pos n=125 (46,47%)	p-Wert	KM n=237 (100%)	KM pos n=109 (45,99%)	p-Wert
Geschlecht	männlich	188 (69,89%)	88 (46,81%)		170 (71,73%)	83 (48,82%)	
	weiblich	81 (30,11%)	37 (45,68%)	0,86	67 (28,27%)	26 (38,81%)	0,16
Alter bei Diagnose	≤ 67 Jahre	144 (53,53%)	68 (47,22%)		121 (51,05%)	55 (45,45%)	
	> 67 Jahre	125 (46,47%)	57 (45,60%)	0,79	116 (48,95%)	54 (48,95%)	0,87
Histologie	ADC	145 (53,9%)	77 (53,10%)		125 (52,74%)	54 (43,2%)	
	SCC	106 (39,41%)	41 (38,68%)	0,024	97 (40,93%)	49 (50,52%)	0,28
	NSCLC	18 (6,69%)	7 (38,89%)		15 (6,33%)	6 (40,00%)	
T-Stadium¹	T1	102 (37,92%)	40 (39,22%)		86 (36,29%)	36 (41,86%)	
	T2	98 (36,43%)	47 (47,96%)		89 (37,55%)	46 (51,69%)	
	T3	55 (20,45%)	31 (56,36%)		47 (19,83%)	18 (38,30%)	
	T4	12 (4,46%)	6 (50,00%)	0,10	13 (5,49%)	8 (61,54%)	0,64
	nicht bekannt	2 (0,74%)	1 (50,00%)		2 (0,84%)	1 (50,00%)	
N-Stadium²	N0	167 (62,08%)	60 (35,93%)		145 (61,18%)	63 (43,45%)	
	N1	55 (20,45%)	32 (58,18%)		47 (19,83%)	26 (55,32%)	
	N2	46 (17,1%)	32 (69,57%)		43 (18,14%)	19 (44,19%)	
	N3	1 (0,37%)	1 (100,00%)	< 0,001	2 (0,84%)	1 (50,00%)	0,32
M-Stadium	M0	255 (94,8%)	111 (45,88%)		224 (94,51%)	105 (46,88%)	
	M1	12 (4,46%)	8 (66,67%)	0,16	12 (5,06%)	4 (33,33%)	0,36
	nicht bekannt	2 (0,74%)	0 (0,00%)		1 (0,42%)	0 (0,00%)	
Grading³	G1	5 (1,86%)	1 (20,00%)		4 (1,69%)	1 (25,00%)	
	G2	128 (47,58%)	58 (45,31%)		110 (46,41%)	53 (48,18%)	
	G3	131 (48,70%)	65 (49,62%)		117 (49,37%)	51 (43,59%)	
	G4	1 (0,37%)	1 (100,00%)	0,36	1 (0,42%)	0 (0,00%)	0,53
	nicht bekannt	4 (1,49%)	0 (0,00%)		5 (2,11%)	4 (80,00%)	
R-Status⁴	R0	250 (92,94%)	116 (46,40%)		216 (91,14%)	99 (45,83%)	
	R1	12 (4,46%)	6 (50,00%)		9 (3,80%)	5 (55,56%)	
	R2	4 (1,49%)	1 (25,00%)	0,84	7 (2,95%)	2 (28,57%)	0,87
	nicht bekannt	3 (1,12%)	2 (66,67%)		5 (2,11%)	3 (60,00%)	

ADC = Adenokarzinom, SCC = Plattenepithelkarzinom, NSCLC = andere Nicht-Kleinzielligen Lungentumoren. LK = Lymphknoten, KM =Knochenmark. Es erfolgte eine Dichotomisierung der Charakteristika ¹ T1-2 vs. T3-4 ² N0 vs. N+ ³ G1-2 vs. G3-4 ⁴ R0 vs. R+. Alle Signifikanzniveaus wurden mit einem Chi-Quadrat-Test berechnet. Signifikante p-Werte (< 0,05) sind fett markiert.

Tabelle 33: Überblick über das HEA-125-Kollektiv

Charakteristikum		LK n=110 (100%)	LK pos n=69 (62,73%)	<i>p-Wert</i>	KM n=120 (100%)	KM pos n=63 (52,50%)	<i>p-Wert</i>
Geschlecht	männlich	71 (64,55%)	42 (59,15%)		78 (65,00%)	41 (52,56%)	
	weiblich	39 (35,45%)	27 (69,23%)	<i>0,30</i>	42 (35,00%)	22 (52,38%)	<i>0,98</i>
Alter bei Diagnose	≤ 67 Jahre	58 (52,73%)	37 (63,79%)		60 (50,00%)	31 (51,67%)	
	> 67 Jahre	52 (47,27%)	32 (61,54%)	<i>0,81</i>	60 (50,00%)	32 (53,33%)	<i>0,85</i>
Histologie	ADC	56 (50,91%)	39 (69,64%)		54 (45,00%)	29 (53,70%)	
	SCC	49 (44,55%)	27 (55,10%)	<i>0,12</i>	60 (50,00%)	30 (50,00%)	<i>0,69</i>
	NSCLC	5 (4,55%)	3 (60,00%)		6 (5,00%)	4 (66,67%)	
T-Stadium¹	T1	43 (39,09%)	26 (60,47%)		109 (35,83%)	56 (51,38%)	
	T2	41 (37,27%)	27 (65,85%)		3 (34,17%)	2 (66,67%)	
	T3	21 (19,09%)	12 (57,14%)		4 (22,50%)	3 (75,00%)	
	T4	5 (4,55%)	4 (80,00%)	<i>0,89</i>	9 (7,50%)	4 (44,44%)	<i>0,0055</i>
	nicht bekannt	0 (0,00%)	NA		0 (0,00%)	NA	
N-Stadium²	N0	66 (60,00%)	37 (56,06%)		74 (61,67%)	36 (48,65%)	
	N1	22 (20,00%)	15 (68,18%)		20 (16,67%)	13 (65,00%)	
	N2	21 (19,09%)	17 (80,95%)		24 (20,00%)	14 (58,33%)	
	N3	1 (0,91%)	0 (0,00%)	<i>0,077</i>	2 (1,67%)	0 (0,00%)	<i>0,28</i>
M-Stadium	M0	106 (96,36%)	66 (62,26%)		114 (95,00%)	58 (50,88%)	
	M1	4 (3,64%)	3 (75,00%)	<i>0,61</i>	5 (4,17%)	4 (80,00%)	<i>0,20</i>
	nicht bekannt	0 (0,00%)	NA		1 (0,83%)	1 (100,00%)	
Grading³	G1	2 (1,82%)	1 (50,00%)		2 (1,67%)	2 (100,00%)	
	G2	47 (42,73%)	32 (68,09%)		52 (43,33%)	22 (42,31%)	
	G3	60 (54,55%)	36 (60,00%)	<i>0,43</i>	62 (51,67%)	36 (58,06%)	<i>0,14</i>
	G4	0 (0,00%)	NA		0 (0,00%)	NA	
	nicht bekannt	1 (0,91%)	0 (0,00%)		4 (3,33%)	3 (75,00%)	
R-Status⁴	R0	103 (93,64%)	64 (62,14%)		109 (90,83%)	56 (51,38%)	
	R1	3 (2,73%)	3 (100,00%)		3 (2,50%)	2 (66,67%)	
	R2	2 (1,82%)	1 (50,00%)	<i>0,42</i>	4 (3,33%)	3 (75,00%)	<i>0,30</i>
	nicht bekannt	2 (1,82%)	1 (50,00%)		4 (3,33%)	2 (50,00%)	

ADC = Adenokarzinom, SCC = Plattenepithelkarzinom, NSCLC = andere Nicht-Kleinzielligen Lungentumoren. LK = Lymphknoten, KM = Knochenmark. Es erfolgte eine Dichotomisierung der Charakteristika ¹ T1-2 vs. T3-4 ² N0 vs. N+ ³ G1-2 vs. G3-4 ⁴ R0 vs. R+. Alle Signifikanzniveaus wurden mit einem Chi-Quadrat-Test berechnet. Signifikante p-Werte (< 0,05) sind fett markiert.

4.1.3 Vergleich der Methoden und Marker zur Identifizierung von DTCs

Bei einigen der NSCLC Patienten wurde neben der routinemäßigen EpCAM-Färbung für Lymphknoten (Klon: BerEp4) und Zytokeratin-Färbung für das Knochenmark (Klon: A45B/B3) auch eine EpCAM-PE (Klon: HEA-125) Immunfluoreszenz-Suspensionsfärbung durchgeführt. Dies erlaubt den direkten Vergleich von den beiden EpCAM-Antikörpern und Färbemethoden in Lymphknotenproben bzw. den Vergleich der CK und EpCAM-Färbung im Knochenmark. Eingeschränkt wird diese Vergleichbarkeit der Knochenmarkproben durch den unterschiedlichen Aufarbeitungs-Prozess:

- i. Für die HEA-125 Färbung wurden mononukleäre Zellen des Knochenmarks mit Percoll 65% (CK-Färbung mit Percoll 60%) isoliert.
- ii. Zudem erfolgte vor der HEA-125 Färbung im Knochenmark eine immunomagnetische Depletion hämatopoietischer Zellen.

Da bei den Lymphknoten Proben mit zwei verschiedenen EpCAM-Antikörpern nach disseminierten Tumorzellen gesucht wurde, werden im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Färbungen mit den EpCAM Antikörper-Klonen BerEp4 und HEA-125 (PE-konjugiert) als „BerEp4“ und „HEA-125“ bezeichnet. Die CK-Färbung wird im Weiteren „A45“ genannt.

Insgesamt 108 Lymphknoten-Proben wurden sowohl mit dem BerEp4 und dem HEA-125 Antikörper auf disseminierte Tumorzellen untersucht. Dies ermöglicht den direkten Vergleich der beiden Färbemethoden bzw. den verwendeten Antikörpern, da die Proben identisch aufgearbeitet wurden und sich lediglich in der Färbemethode und den dafür verwendeten Antikörpern unterscheiden. Um zu untersuchen, ob zwischen den Färbemethoden ein Unterschied an positiv gefärbten Zellen zu sehen ist, wurde die *disseminated tumor cell density* (DCCD) untersucht. Diese berechnet sich aus der Anzahl der positiv gefärbten Zellen pro eine Million untersuchter mononukleären Zellen.

Bei den Lymphknoten (n = 155 Lymphknoten von n = 104 Patienten) zeigte sich ein guter Zusammenhang des DCCDs mit einem Pearson r von 0,6656 ($p < 0,0001$; Abbildung 8). Im Falle der Knochenmarkproben ist der direkte Vergleich durch oben genannte Unterschiede in der Aufarbeitung und durch die Verwendung verschiedener Antikörper (Zytokeratin versus EpCAM) erschwert. Es zeigte sich bei dem Vergleich von 109 Knochenmarkproben, die jeweils mit den beiden Färbungen untersucht wurden, kein signifikanter Zusammenhang (Abbildung 8).

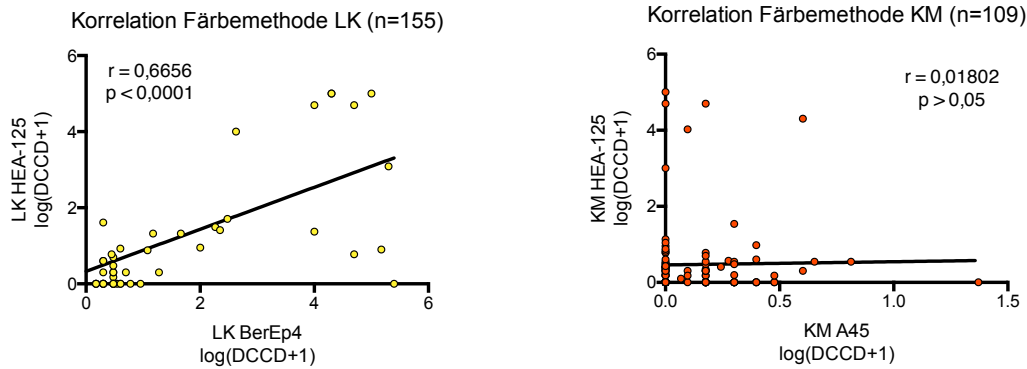


Abbildung 8: Korrelation der Färbemethoden und verwendeten Marker zur Isolierung von DTCs

Abgebildet ist die log-transformierte *disseminated tumor cell density* DCCD (= Anzahl der DTCs pro 1 Million untersuchten Zellen) für die BerEp4 und die HEA-125-Färbung in Lymphknoten und die HEA-125 und A45-Färbung im Knochenmark. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson r und das Signifikanzniveau p sind angegeben.

Bei dem Vergleich des DCCDs innerhalb eines Gewebes, zeigt sich eine hoch signifikant höhere Anzahl an HEA-125-positiven Zellen im Knochenmark gegenüber der A45-Färbung ($p = 0,0086$; Abbildung 9). Im Gegensatz dazu wies die HEA-125-Färbung im Lymphknoten eine signifikant niedrigere Anzahl an positiven Zellen auf, als die BerEp4-Färbung ($p = 0,0263$; Abbildung 9).

Da eine lymphogene Metastasierung in 37,5% aller Patienten zu sehen war, sollte auch die Anzahl der positiv gefärbten Zellen zwischen den Gewebearten (Lymphknoten versus Knochenmark) analysiert werden. (Abbildung 9). Vergleicht man die Anzahl der nachgewiesenen Zellen zwischen Lymphknoten und Knochenmark, so zeigt sich sowohl eine signifikant höhere Anzahl an BerEp4-positiv gefärbten Zellen im Lymphknoten im Vergleich zu A45-positiven Zellen im Knochenmark ($p = 0,0240$; Abbildung 9), und eine hoch signifikant höhere Anzahl an HEA-125-positiven Zellen in Lymphknoten als im Knochenmark ($p = 0,0096$; Abbildung 9).

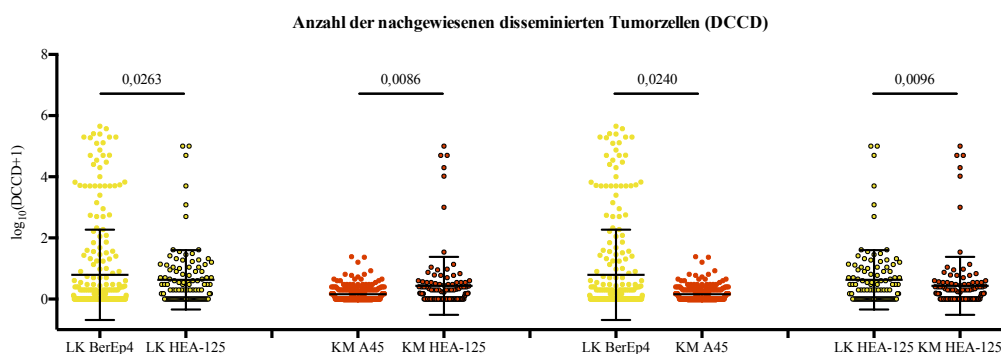


Abbildung 9: Vergleichende Analyse der Anzahl der disseminierten Tumorzellen (DCCD)

Abgebildet ist die log-transformierte DCCD der beiden Färbungen in Lymphknoten (LK) und Knochenmark (KM). Die Box-Plots zeigen den Mittelwert mit der Standardabweichung. p -Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet.

4.1.4 Übersicht über die nicht-onkologischen Kontrollpatienten

EpCAM-positive Zellen können auch im Knochenmark und in Lymphknoten von gesunden Patienten (ohne Tumorerkrankung) detektiert werden. Im Knochenmark stellen diese Zellen hauptsächlich erythropoietische Vorläuferzellen dar (Bühring et al., 1996; Guzvic et al., 2014; Lammers et al., 2002), wohingegen im Lymphknoten v.a. Langerhans-Zellen EpCAM exprimieren können (Gaiser et al., 2012; Villablanca & Mora, 2008).

Für EpCAM-positive Kontrollzellen aus dem Knochenmark konnten bereits publizierte Kollektive aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren herangezogen werden. Christoph Irlbeck detektierte HEA-125-positive Zellen in 20 der 40 analysierten weiblichen Knochenmarksaspirate (Irlbeck, 2019). Bei den männlichen Kontrollpatienten konnte in 56% der untersuchten Proben HEA-125-positive Zellen detektiert werden (Guzvic et al., 2014).

Als Lymphknoten-Kontrollen konnten aus der Gefäßchirurgie 11 Lymphknoten von gesunden Patienten analysiert werden. Fünf dieser Proben (45,5%) wiesen HEA-125-positive Einzelzellen auf. Damit besteht kein signifikanter Unterschied in der Detektionsrate von HEA-125-positiven Zellen zwischen Lymphknoten und Knochenmark bei Nicht-Tumorpatienten (Chi²-Test: p-Wert = 0,67).

4.2 Klinisch-pathologische Korrelationen

4.2.1 Korrelation von klinischen Daten mit dem Nachweis von BerEp4 bzw. A45-positiven Einzelzellen

Insgesamt konnten in 182 von 293 untersuchten Patienten BerEp4 oder A45-positive Zellen gefunden werden. Der alleinige Nachweis dieser Zellen lässt jedoch noch keine Aussage darüber zu, ob bei diesen Patienten wirklich eine minimale Resttumorkrankung vorliegt bzw. eine frühe lymphogene und/oder hämatogene Disseminierung von Tumorzellen erfolgte. Aus diesem Grund sollten die Färbeargebnisse mit klinischen Follow-Up Daten wie zum Beispiel dem Gesamtüberleben (*overall survival* = OS) und dem progressionsfreien Überleben (*progression-free survival* = PFS) korreliert werden. Frühere Studien zum Nachweis disseminierter Tumorzellen bei Patienten mit NSCLC zeigten widersprüchliche Ergebnisse zu der klinischen Relevanz dieser Zellen (Tabelle 1).

Bei einer Stratifizierung der Patienten nach DCCD = 0 (LK bzw. KM negativ) und DCCD > 0 (LK bzw. KM positiv) zeigt sich ein signifikant kürzeres OS und PFS von Patienten mit

BerEp4-positiven Zellen im LK (Log-Rank: $p = 0,0250$; $p = 0,0236$; Abbildung 10), wohingegen bei dem Nachweis von A45-positiven Zellen im KM kein sichtbarer Trend im OS oder PFS zu sehen ist (Abbildung 10).

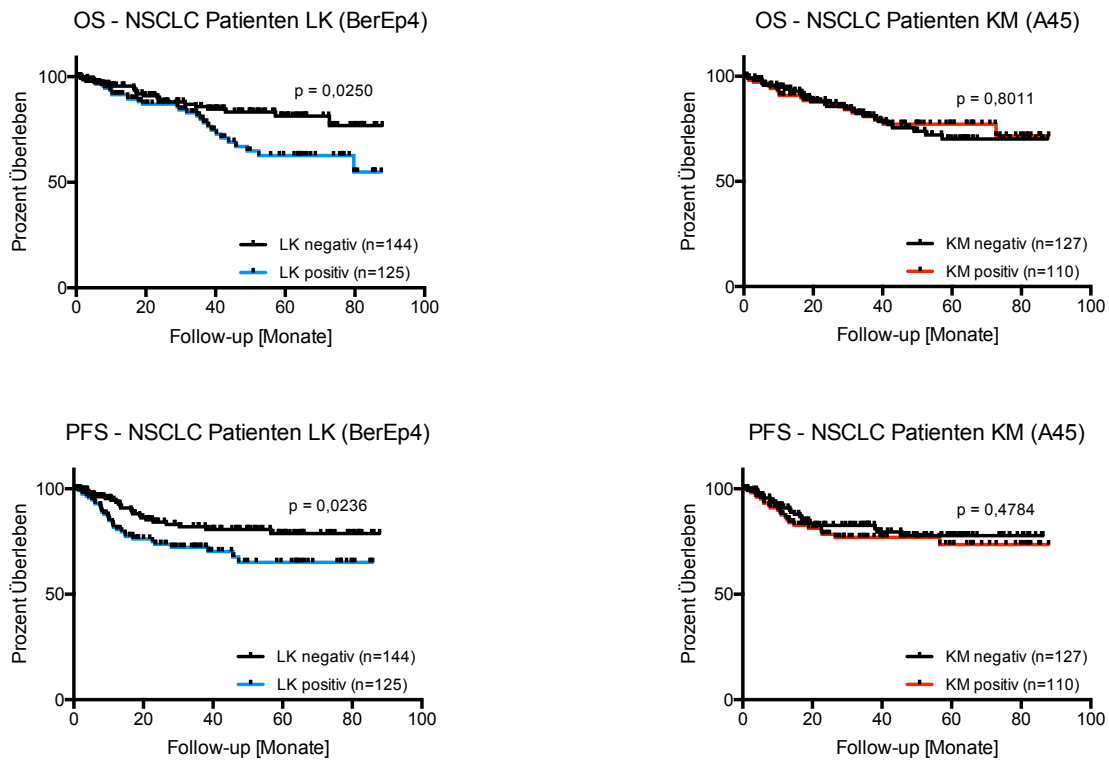


Abbildung 10: OS/PFS bei dem Nachweis von BerEp4/A45-positiven Zellen in LK/KM

Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS, obere Reihe) bzw. progressionsfreie Überleben (PFS, untere Reihe) von NSCLC Patienten mit Nachweis von MRD in Lymphknoten (LK, BerEp4, blau) und Knochenmark (KM, A45, rot). Log-Rank Test.

Einige der Patienten wiesen jedoch bereits einen positiven Nodalstatus auf (37,5% der Patienten). In diesen Patienten kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass es sich bei den isolierten Einzelzellen um Zellen aus einer manifesten lymphogenen Metastase handelt (und nicht um früh disseminierte einzelne Tumorzellen). Des Weiteren korreliert ein positiver N-Status allein bereits mit einem höchst signifikant kürzerem OS und PFS in dem untersuchten Kollektiv (Abbildung 11).

Aus diesem Grund wurden in dem nächsten Schritt alle Patienten mit einem pN0-Status analysiert. Bei den 167 Patienten ohne pathologischer Tumorausssaat in die lokoregionären Lymphknoten zeigte sich kein signifikanter Unterschied in OS oder PFS bei Patienten mit und ohne Nachweis von BerEp4-positiven Einzelzellen (Abbildung 12). Jedoch lässt sich ein nicht signifikanter Trend ($p = 0,1216$; Abbildung 12) zu einem kürzerem PFS bei Patienten mit BerEp4-positiven Zellen beobachten.

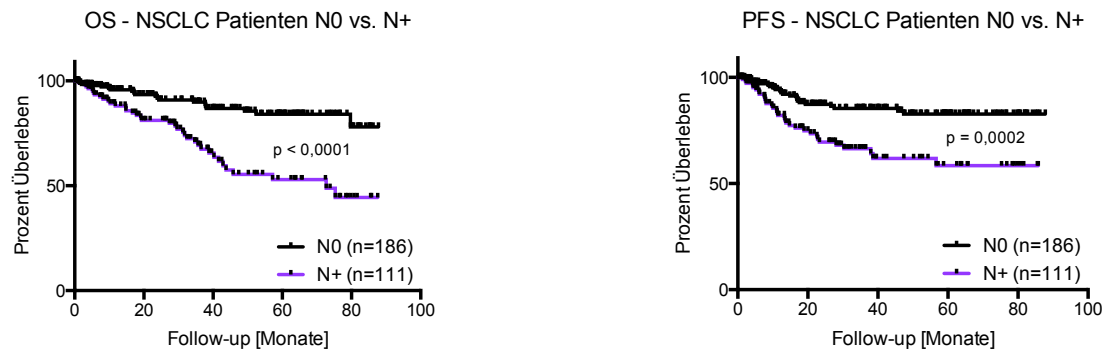


Abbildung 11: OS/PFS bei negativem und positivem N-Status

Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS, links) bzw. progressionsfreie Überleben (PFS, rechts) von NSCLC Patienten mit pathologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen (N0) bzw. mit Lymphknotenmetastasen (N+). Log-Rank Test.

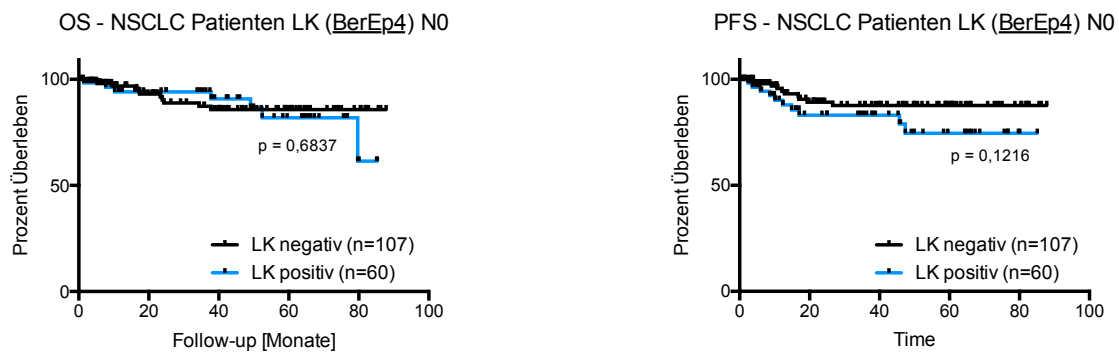


Abbildung 12: OS/PFS bei pN0 Patienten und Nachweis von BerEp4-positiven Zellen im LK

Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS, links) bzw. progressionsfreie Überleben (PFS, rechts) von NSCLC Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0) mit Nachweis von BerEp4-positiver MRD in Lymphknoten (LK, blau). Log-Rank Test.

Da mehrere Faktoren eine prognostischen Vorhersagekraft für das OS und/oder PFS von NSCLC besitzen können, wurden im Folgenden unterschiedliche Patienten- und Tumoreigenschaften auf deren Assoziation zu dem Überleben der Patienten untersucht. Dafür wurden das Alter und das Geschlecht der Patienten, die TNM-Klassifikation, der Resektionsstatus, die Histologie und das Grading des Tumors und das Vorhandensein von MRD in LK und KM untersucht. Hierfür wurden alle Patienten mit einem vollständigen Datensatz für die oben genannten Faktoren eingeschlossen (n = 210). Die individuelle, univariate Analyse dieser Faktoren im Hinblick auf das Gesamtüberleben der Patienten zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem N-Status, dem Alter, dem M-Status und dem R-Status mit dem OS (Tabelle 34). Da die untersuchten Faktoren jedoch auch untereinander zusammenhängen können und ein univariater Test hierüber keine Aussage erlaubt, wurde zusätzlich eine multivariate Cox-Regressions-Analyse durchgeführt. Hier waren lediglich der Nodalstatus [Hazard Ratio 3,620 (95% KI: 1,725 - 7,595)] und das Alter [2,001 (95% KI: 1,254 - 5,207)]

signifikant mit dem Überleben assoziiert (Tabelle 34). Dies bedeutet, dass Patienten mit einem Alter > 67 Jahren bei Erstdiagnose und Patienten mit einem positiven N-Status ein 2-fach bzw. 3,6-fach höheres Risiko haben, an dem Tumorleiden zu sterben, als jüngere Patienten oder Patienten ohne Lymphknotenmetastasen.

Tabelle 34: Cox-Regressions-Analyse des OS von Patienten analysierten KM (A45) und LK (BerEp4)

<i>n=210</i>	<i>univariate Analyse</i>	<i>multivariate Cox-Regressions-Analyse*</i>	
	<i>p-Wert</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (95%-Konfidenzintervall)</i>
N-Status	<u>0,0015</u>	<u>0,001</u>	3,620 (1,725 - 7,595)
Alter	<u>0,0134</u>	<u>0,010</u>	2,001 (1,254 - 5,207)
M-Status	<u>0,0085</u>	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
R-Status	<u>0,0436</u>	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
MRD KM	0,8737	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
MRD LK	0,2312	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Geschlecht	0,1872	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
T-Status	0,5856	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Grading	0,5707	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Histologie	0,2885	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	

Univariate (Log-Rank) und multivariate (Cox-Regression) Analyse von verschiedenen Faktoren auf das Gesamtüberleben von 210 NSCLC Patienten. Sechs Patienten wurden aufgrund von unvollständigen klinischen Daten von der Analyse ausgeschlossen. Weitere 5 Patienten waren zensierte Fälle vor dem ersten Ereignis in dem Kollektiv und wurden in der multivariaten Analyse nicht berücksichtigt. Signifikante Werte sind unterstrichen.

Führt man die gleiche Analyse im Hinblick auf das progressions-freie Überleben (PFS) durch, so zeigt sich in der univariaten Analyse ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter, dem N-Status und dem T-Status mit dem PFS, wobei in der multivariaten Cox-Regressions-Analyse – ähnlich wie bei dem OS – nur das Alter und der N-Status als statistisch signifikanter Zusammenhang bestehen bleibt mit einer Hazard Ratio von 2,484 (95% KI: 1,289 – 4,789) bzw. 2,460 (95% KI: 1,249 - 4,845) (Tabelle 35).

Tabelle 35: Cox-Regressions-Analyse des PFS von Patienten analysierten KM (A45) und LK (BerEp4)

<i>n=210</i>	<i>univariate Analyse</i>	<i>multivariate Cox-Regressions-Analyse*</i>	
	<i>p-Wert</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (95%-Konfidenzintervall)</i>
Alter	<u>0,0177</u>	<u>0,007</u>	2,484 (1,289 - 4,789)
N-Status	<u>0,0006</u>	<u>0,009</u>	2,460 (1,249 - 4,845)
T-Status	<u>0,0115</u>	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
MRD LK	0,0823	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Grading	0,2114	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
M-Status	0,2929	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
MRD KM	0,5054	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Histologie	0,7339	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Geschlecht	0,9449	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
R-Status	0,9611	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	

Univariate (Log-Rank) und multivariate (Cox-Regression) Analyse von verschiedenen Faktoren auf das progressions-freie Überleben von 210 NSCLC Patienten. Sechs Patienten wurden aufgrund von unvollständigen klinischen Daten von der Analyse ausgeschlossen. Weitere 6 Patienten waren zensierte Fälle vor dem ersten Ereignis in dem Kollektiv und wurden in der multivariaten Analyse nicht berücksichtigt. Signifikante Werte sind unterstrichen.

4.2.2 Korrelation von klinischen Daten und dem Nachweis von HEA-125-positiven Einzelzellen

Um lebende Zellen für die Analyse des Transkriptoms zu ermöglichen, wurden einige Patientenproben (Lymphknoten und Knochenmark) zusätzlich mittels dem Oberflächenmolekül EpCAM analysiert. Von den 133 Patienten, die zusätzlich in einer Zellsuspension auf HEA-125-positive Zellen untersucht wurden, konnten in 93 Patienten HEA-125-positive Zellen gefunden werden. Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse sollten anschließend anhand der klinischen Follow-up Daten evaluiert werden.

Der Nachweis von HEA-125-positiven Zellen im Lymphknoten (DCCD > 0; LK positiv) ist mit einem annähernd signifikant kürzerem OS dieser Patienten assoziiert (Log-Rank: $p = 0,0959$; Abbildung 13), wohingegen das PFS dieser Patienten signifikant kürzer ist, als bei Patienten ohne Nachweis von HEA-125-positiven Zellen (Log-Rank: $p = 0,0133$; Abbildung 13). Überraschenderweise (und gegensätzlich zu der A45-Färbung) zeigte sich bei der HEA-125-Färbung im Knochenmark eine hoch signifikante Korrelation von dem Nachweis HEA-125-positiver Zellen mit dem OS der Patienten (Log-Rank: $p = 0,0073$; Abbildung 13). Bei dem progressions-freiem Überleben der Patienten mit HEA-125-positiven Zellen im KM zeigte sich eine Trennung der Überlebenskurven von KM-negativen und KM-positiven Patienten, die sich allerdings nicht signifikant unterscheiden (Log-Rank: $p = 0,1969$; Abbildung 13).

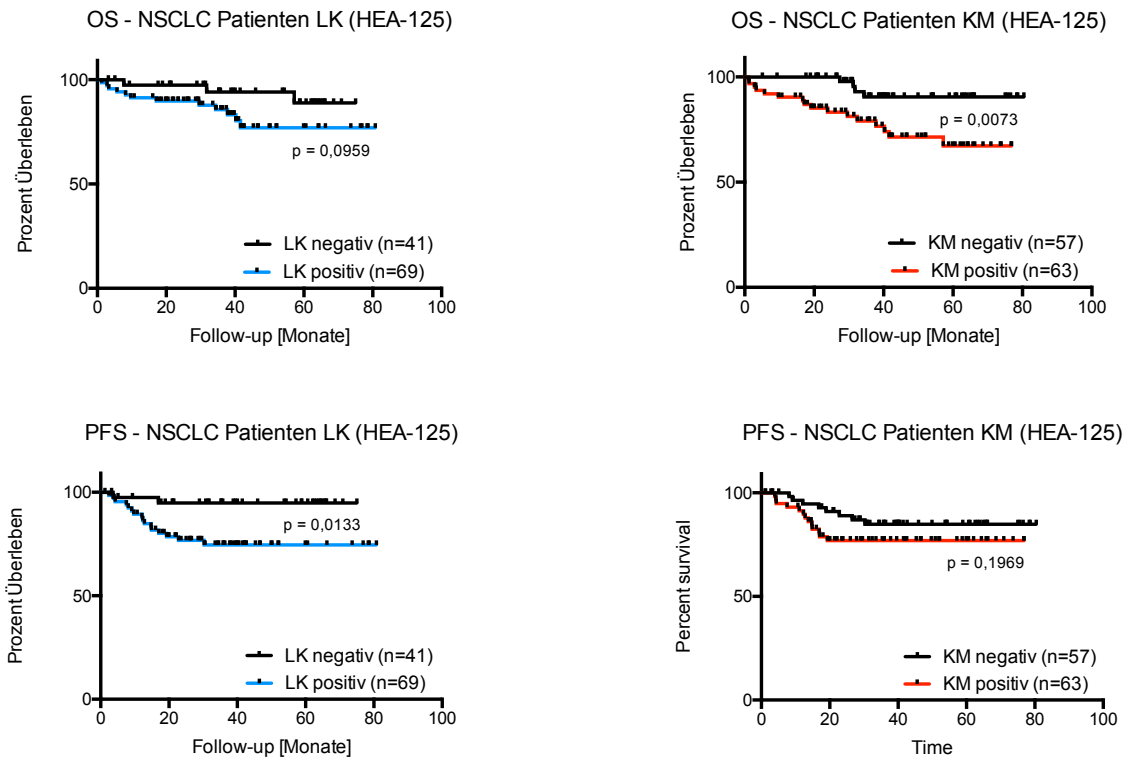


Abbildung 13: OS/PFS bei dem Nachweis von HEA-125-positiven Zellen in LK/KM

Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS, obere Reihe) bzw. progressionsfreie Überleben (PFS, untere Reihe) von NSCLC Patienten mit Nachweis von HEA-125-positiver MRD in Lymphknoten (LK, blau) und Knochenmark (KM, rot). Log-Rank Test.

Auch in diesem Kollektiv sollte letztlich die klinische Relevanz des Nachweises von einzelnen HEA-125-positiven Zellen im Lymphknoten von Patienten untersucht werden, bei denen keine lymphogene Aussaat von Tumorzellen stattgefunden hatte. Betrachtet man die 66 Patienten mit einem N0-Stadium, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben von Patienten mit und ohne Nachweis von HEA-125-positiven Zellen (Log-Rank: $p = 0,4886$; Abbildung 14). Bei dem progressions-freien Überleben dieser Patienten lässt sich – ähnlich wie bei dem Nachweis BerEp4-positiver Zellen in N0-Patienten – ein Trend zu einem kürzeren PFS bei Patienten mit HEA-125-positiven Zellen im LK beobachten, der sich allerdings nicht als signifikant darstellt (Log-Rank: $p = 0,1293$; Abbildung 14).

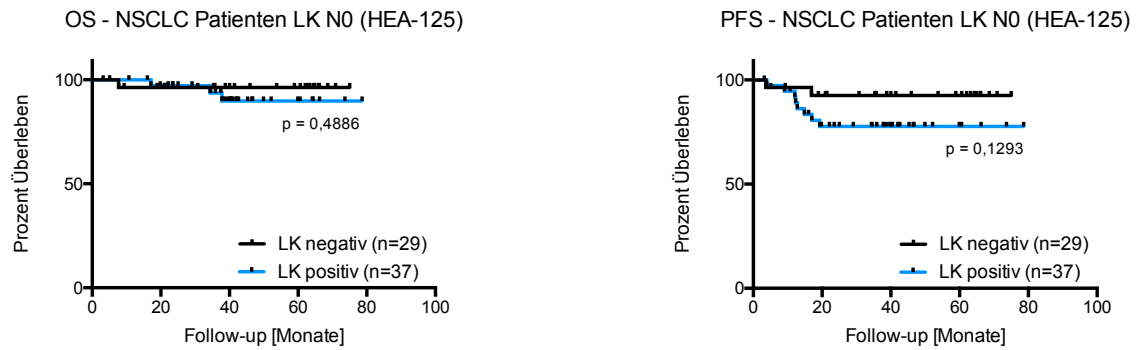


Abbildung 14: OS/PFS bei pN0 Patienten und Nachweis von HEA-125-positiven Zellen im LK

Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS, links) bzw. progressionsfreie Überleben (PFS, rechts) von NSCLC Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0) mit Nachweis von HEA-125-positiver MRD in Lymphknoten (LK, blau). Log-Rank Test.

In der weiteren Analyse von prognostischen Faktoren auf das Gesamtüberleben wurden alle Patienten, bei denen Lymphknoten und Knochenmark analysiert werden konnten, eingeschlossen (n = 97). Aufgrund von unvollständigen Daten in den untersuchten Faktoren (Alter und Geschlecht, TNM, R-Status, Grading, Histologie und MRD in LK und KM) mussten vier Patienten aus der Analyse ausgeschlossen werden.

In der univariaten Auswertung der oben genannten Faktoren zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen N-Status, M-Status und MRD in LK und KM mit dem Gesamtüberleben der Patienten (Tabelle 36). Alle dieser Faktoren außer MRD in LK waren zudem in der multivariaten Cox-Regressions-Analyse signifikant mit dem OS assoziiert. MRD in LK war mit einem $p = 0,056$ grenzwertig nicht signifikant (Tabelle 36).

Die höchste Hazard Ratio war in dieser Auswertung mit dem Nodalstatus [35,044 (95% KI: 4,132 – 297,246)] verbunden, gefolgt von dem M-Status [Hazard Ratio: 20,173 (95% KI: 0,996 – 408,449)] und dem MRD in KM [Hazard Ratio: 11,684 (95% KI: 1,060 – 128,817)]. Somit ist der Nachweis der minimalen Resterkrankung im Knochenmark in diesem Kollektiv ein prognostisch durchaus ungünstiger Faktor.

Tabelle 36: Cox-Regressions-Analyse des OS von Patienten analysierten KM und LK (HEA-125)

<i>n=93</i>	<i>univariate Analyse</i>	<i>multivariate Cox-Regressions-Analyse*</i>	
	<i>p-Wert</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (95%-Konfidenzintervall)</i>
N-Status	<u>0,0013</u>	<u>0,001</u>	35,044 (4,132 - 297,246)
MRD KM	<u>0,0049</u>	<u>0,045</u>	11,684 (1,060 - 128,817)
M-Status	<u>0,0230</u>	<u>0,050</u>	20,173 (0,996 - 408,449)
MRD LK	<u>0,0156</u>	0,056	10,420 (0,946 - 114,819)
Grading	0,0732	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Alter	0,2880	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Geschlecht	0,4914	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
R-Status	0,5551	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Histologie	0,6281	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
T-Status	0,8689	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	

Univariate (Log-Rank) und multivariate (Cox-Regression) Analyse von verschiedenen Faktoren auf das Gesamtüberleben von 93 NSCLC Patienten. Vier Patienten wurden aufgrund von unvollständigen klinischen Daten von der Analyse ausgeschlossen. Signifikante Werte sind unterstrichen.

Betrachtet man anstatt des Gesamtüberlebens nun das progressions-freie Überleben in dieser EpCAM-Subgruppe, so zeigt sich sowohl in der univariaten, als auch in der multivariaten Auswertung eine hoch signifikante bzw. signifikante Assoziation zu dem R-Status und dem MRD LK (Tabelle 37). Dabei liegt die Hazard Ratio an einem Tumorprogress zu erleiden bei einem positiven R-Status (also inkomplette Resektion des Tumors) bei 5,813 (95% KI: 1,178 – 28,691) und bei dem Nachweis von MRD in LK bei 10,119 (95%. KI: 1,195 – 85,712).

Tabelle 37: Cox-Regressions-Analyse des PFS von Patienten analysierten KM und LK (HEA-125)

<i>n=93</i>	<i>univariate Analyse</i>	<i>multivariate Cox-Regressions-Analyse*</i>	
	<i>p-Wert</i>	<i>p-Wert</i>	<i>Hazard Ratio (95%-Konfidenzintervall)</i>
R-Status	<u>0,0036</u>	<u>0,031</u>	5,813 (1,178 - 28,691)
MRD LK	<u>0,0033</u>	<u>0,034</u>	10,119 (1,195 - 85,712)
MRD KM	0,1115	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
T-Status	0,1843	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Geschlecht	0,3649	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
N-Status	0,5373	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Grading	0,5433	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
M-Status	0,6469	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Histologie	0,6957	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	
Alter	0,8286	nicht signifikant in multivariater Cox-Analyse	

Univariate (Log-Rank) und multivariate (Cox-Regression) Analyse von verschiedenen Faktoren auf das progressions-freie Überleben von 93 NSCLC Patienten. Vier Patienten wurden aufgrund von unvollständigen klinischen Daten von der Analyse ausgeschlossen. Weitere 4 Patienten waren zensierte Fälle vor dem ersten Ereignis in dem Kollektiv und wurden in der multivariaten Analyse nicht berücksichtigt. Signifikante Werte sind unterstrichen.

4.2.3 Direkter Vergleich der verwendeten Methoden und Marker zum Nachweis von DTCs

Aufgrund der parallelen Bearbeitung vieler Proben mittels A45 und HEA-125-Färbung (Knochenmark) bzw. BerEp4 und HEA-125 EpCAM-Färbung (Lymphknoten) können auch die Ergebnisse dieser Färbungen mit dem klinischen Outcome der Patienten korreliert werden. Es besteht bisher kein Konsens oder ein Standard für die Aufarbeitung der Proben oder für die Detektion von disseminierten Tumorzellen. Das Studiendesign dieser Arbeit ermöglicht den direkten Vergleich der verschiedenen Methoden und Antikörper. Aus diesem Grund sollte in dem folgenden Abschnitt auch das klinische Outcome im Hinblick auf die unterschiedlichen Marker genauer analysiert werden.

Von den 237 eingegangenen und mittels A45-Färbung analysierten Knochenmarksaspirate wurden 109 auch auf die Anwesenheit von HEA-125-positiven Zellen untersucht. In 49 der 109 Proben (44,95%) konnten A45-positive Zellen entdeckt werden, wohingegen 59 der Patienten (54,12%) HEA-125-positiv Zellen aufwiesen (Chi^2 : $p = 0,136$). Betrachtet man das OS und das PFS der A45-negativen und A45-positiven Patienten so lässt sich kein Unterschied erkennen (Log-Rank: $p = 0,4041$ bzw. $p = 0,4984$; Abbildung 15). Bei den gleichen 109 Patienten ermöglicht die Stratifizierung nach HEA-125-negativen und HEA-125-positiven Patienten dagegen eine hoch signifikante Trennung der positiven Gruppe mit konsekutiv schlechterem Gesamtüberleben. Zudem zeigt sich auch ein signifikant kürzeres PFS der HEA-125-positiven Patienten (Log-Rank: $p = 0,0088$ bzw. $p = 0,0210$; Abbildung 15).

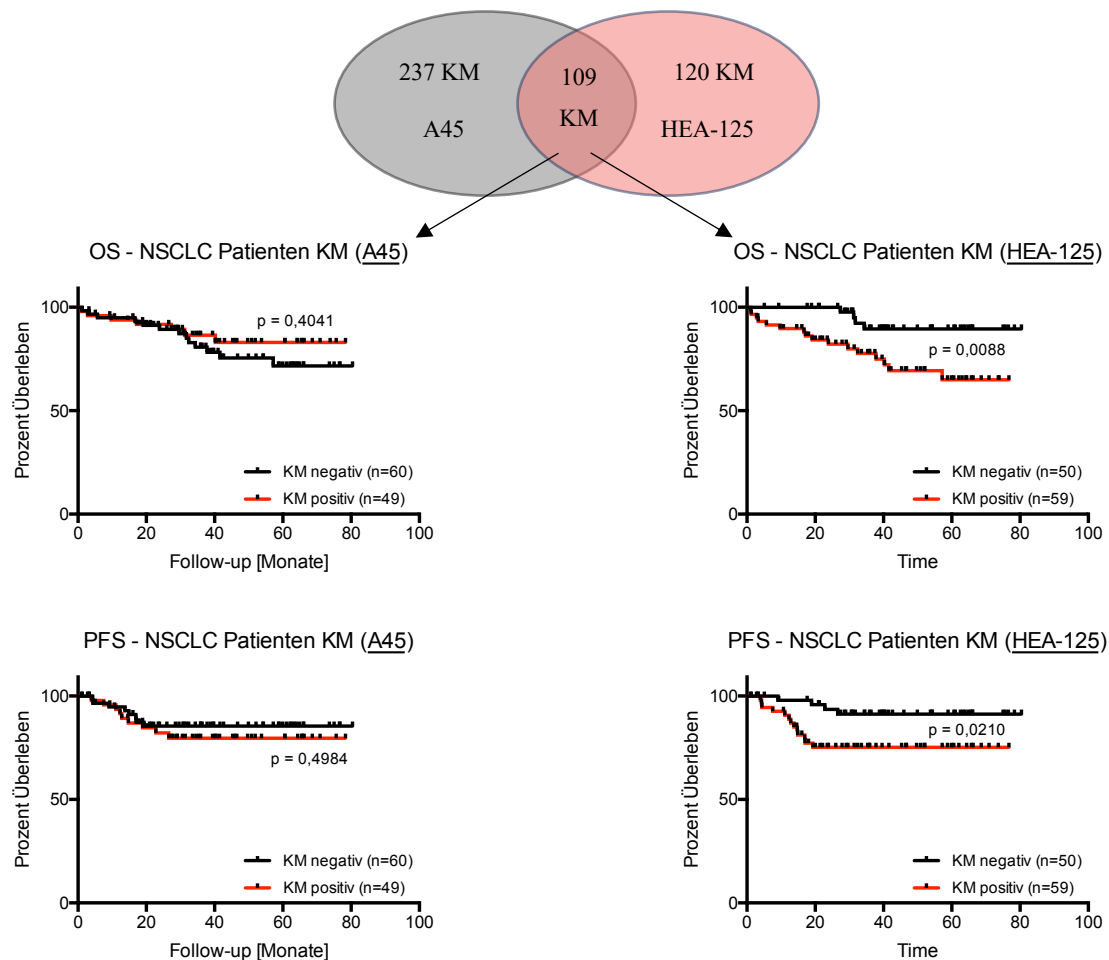


Abbildung 15: Analyse des OS /PFS bei dem Nachweis von A45- oder HEA-125-positiven Zellen im KM
Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS, obere Reihe) bzw. progressionsfreie Überleben (PFS, untere Reihe) von NSCLC Patienten mit Nachweis von A45-positiver MRD im Knochenmark (KM, rot, links) und HEA-125-positiver MRD im Knochenmark (KM, rot, rechts). Log-Rank Test.

Lymphknoten von insgesamt 269 Patienten konnten mit der BerEp4-Färbung auf einzelne positive Zellen untersucht werden, wobei bei 108 dieser Patienten eine parallele HEA-125-Färbung erfolgte. Hier zeigte sich der Anteil an positiven Proben für die HEA-125-Färbung mit 62,03% signifikant höher als die Positivitätsrate bei der BerEp4-Färbung (45,37%) (Chi^2 : $p = 0,0140$).

Während das Gesamtüberleben der Patienten mit einem Nachweis von BerEp4-positiven Zellen signifikant schlechter war als bei Patienten ohne Nachweis von positiven Zellen (Log-Rank: $p = 0,0494$; Abbildung 16), so war dieser Trend bei der HEA-125-Färbung zwar deutlich erkennbar aber erreichte mit einem $p = 0,0939$ nicht das Signifikanzniveau (Abbildung 16). Dagegen zeigte die Analyse des PFS ein gegenteiliges Ergebnis mit einer signifikanten Reduktion des progressions-freien Überlebens in der HEA-125-positiven Gruppe (Log-Rank: $p = 0,0114$), und einem nicht signifikantem Trend zu einem schlechteren PFS von BerEp4-positiven Patienten (Log-Rank: $p = 0,2849$; Abbildung 16).

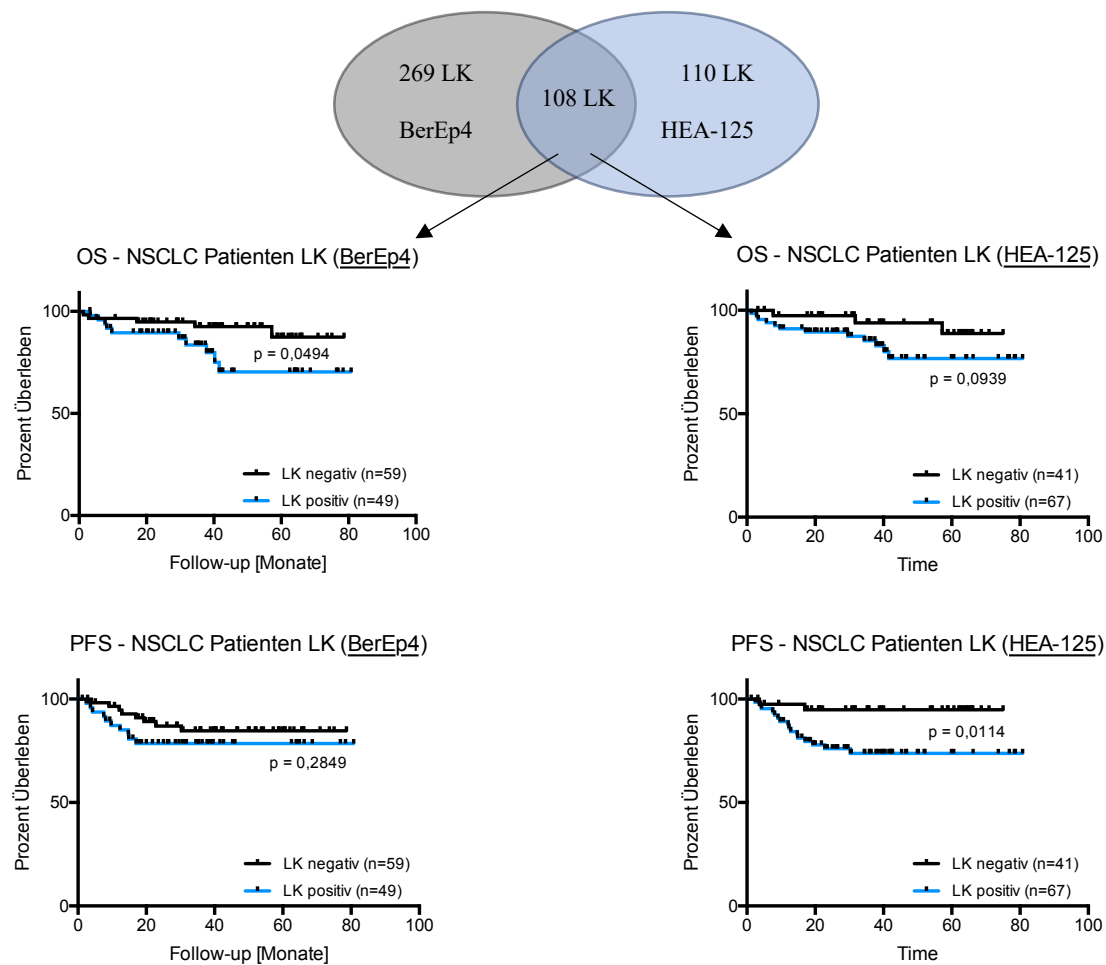


Abbildung 16: Analyse des OS/PFS bei dem Nachweis von BerEp4- oder HEA-125-positiven Zellen im LK Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS, obere Reihe) bzw. progressionsfreie Überleben (PFS, untere Reihe) von NSCLC Patienten mit Nachweis von BerEp4-positiver MRD in Lymphknoten (LK, blau, links) und HEA-125-positiver MRD in Lymphknoten (LK, blau, rechts). Log-Rank Test.

4.2.4 Korrelation des Nachweises von DTCs zu pathologisch bestimmten Parametern

Lokoregionäre Lymphknoten werden bei jedem NSCLC Patienten routinemäßig histopathologisch untersucht, wobei dieses N-Stadium von N0 (ohne Nachweis lymphogener Metastasen) bis N3 eingeteilt wird (je nach Anzahl und Lokalisation der infiltrierten Lymphknoten). In dieser Studie wurden zudem von meist zwei Lymphknoten der Patienten eine Hälfte mittels der BerEp4 und/oder der HEA-125-Färbung auf einzelne Tumorzellen untersucht. Im Folgenden soll die Korrelation der Färbeargebnisse (MRD LK) mit dem histopathologischen Staging untersucht werden. Dafür wurde der N-Status in pN0 und pN1-3/pN+ dichotomisiert.

Bei den 269 mittels BerEp4-Färbung untersuchten Patienten zeigte sich mit 63,7% aller untersuchten pN+ Patienten ein höchst signifikant höherer Anteil an LK MRD in Patienten mit Lymphknotenbefall, wohingegen 64,7% der pN0 Patienten ebenfalls negativ für BerEp4-positive Zellen waren (Chi²: p < 0,001; Tabelle 38).

Bei den 110 Patienten, die mit der HEA-125-Färbung untersucht wurden, konnten in 72,7% aller pN+ Patienten HEA-125-positive Zellen detektiert werden. Hier zeigte sich jedoch in mehr als der Hälfte der untersuchten pN0 Patienten ebenfalls HEA-125-positive Zellen, weshalb der Unterschied sich grenzwertig nicht signifikant zeigte (Chi²: p = 0,0545) (Tabelle 38).

Tabelle 38: Korrelation von pathologischem N-Status und MRD in LK (BerEp4 und HEA-125)

	<i>BerEp4 (n=269)</i>			<i>HEA-125 (n=110)</i>		
	pN0	pN+	p-Wert	pN0	pN+	p-Wert
LK MRD-	108 (64,7%)	37 (36,3%)		30 (45,5%)	12 (27,3%)	
LK MRD+	59 (35,3%)	65 (63,7%)	< 0,0001	36 (54,5%)	32 (72,7%)	0,0545

Gezeigt werden die Anteile an Patienten mit dem Nachweis von MRD im Lymphknoten (LK MRD-) bzw. mit dem Nachweis von MRD (LK MRD+) bei der Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen (pN0) bzw. Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (pN+). Prozentangaben bezogen auf Gesamtanzahl der untersuchten Patienten. Chi-Quadrat Test.

Untersucht man zudem den Zusammenhang zwischen Nachweis an A45 bzw. HEA-125-positiven Zellen im Knochenmark (KM MRD) mit dem Nodalstatus der Patienten, kann kein signifikanter Unterschied zwischen pN0 und pN+ Patienten detektiert werden (Tabelle 39).

Tabelle 39: Korrelation von pathologischem N-Status und MRD in KM (A45 und HEA-125)

	<i>A45 (n=237)</i>			<i>HEA-125 (n=120)</i>		
	pN0	pN+	p-Wert	pN0	pN+	p-Wert
KM MRD-	82 (56,6%)	45 (48,9%)		38 (51,4%)	19 (41,3%)	
KM MRD+	63 (43,4%)	47 (51,1%)	0,250	36 (48,7%)	27 (58,7%)	0,284

Gezeigt werden die Anteile an Patienten mit dem Nachweis von MRD im Knochenmark (KM MRD-) bzw. mit dem Nachweis von MRD (KM MRD+) bei der Abwesenheit von Lymphknotenmetastasen (pN0) bzw. Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (pN+). Prozentangaben bezogen auf Gesamtanzahl der untersuchten Patienten. Chi-Quadrat Test.

Überraschenderweise lässt sich beobachten, dass bei der HEA-125-Färbung MRD in LK und im KM höchst signifikant korrelieren (Chi²: p < 0,001). So zeigen 70% aller Patienten mit negativer HEA-125-Färbung im Lymphknoten ebenfalls ein negatives Ergebnis im Knochenmark und 66,7% aller LK-positiver Patienten auch ein positives Ergebnis im Knochenmark. Diese Korrelation konnte zwischen der BerEp4 und der A45 Färbung nicht beobachtet werden (Chi²: p = 0,151; Tabelle 40).

Tabelle 40: Korrelation von MRD in Knochenmark und MRD in LK

	<i>KM (A45) / LK (BerEp4) (n=216)</i>			<i>KM (HEA-125) / LK (HEA-125) (n=97)</i>		
	LK MRD-	LK MRD+	p-Wert	LK MRD-	LK MRD+	p-Wert
KM MRD-	67 (58,8%)	50 (29,0%)		28 (70,0%)	19 (33,3%)	
KM MRD+	47 (41,2%)	52 (51,0%)	0,151	12 (30,0%)	38 (66,7%)	<0,001

Gezeigt werden die Anteile an Patienten mit dem Nachweis von MRD im Knochenmark (KM MRD-) bzw. mit dem Nachweis von MRD (KM MRD+) bei der Abwesenheit von MRD im Lymphknoten (LK MRD-) bzw. Nachweis von MRD (LK MRD+). Linke Spalte zeigt die Ergebnisse der A45 und BerEp4-Färbung, wohingegen rechts die Ergebnisse der HEA-125-Färbung aufgelistet sind. Prozentangaben bezogen auf Gesamtanzahl der untersuchten Patienten. Chi-Quadrat Test.

4.3 Identifizierung von disseminierten Tumorzellen

Da auch in Kontrollpatienten ohne Tumorerkrankung EpCAM bzw. Zytokeratin-positiv Einzelzellen nachweisbar sind, lässt der alleinige Nachweis solcher Zellen keine zweifelsfreie Aussage zu, ob es sich in Tumorpatienten dabei um „echte“ disseminierte Tumorzellen handelt. Im Folgenden werden daher verschiedene Herangehensweisen untersucht, die maligne Abstammung dieser Zellen zu bestätigen. Zudem soll die genetische Analyse der Einzelzellen Aufschlüsse über die Evolution der Tumoren geben und die Identität solcher Zellen in tumorfreien Patienten untersuchen.

4.3.1 Identifizierung von disseminierten Tumorzellen mittels PCR-basierter Genexpressionsanalyse

Die Analyse der Einzelzell-Transkriptome von EpCAM-positiven Zellen isoliert aus Knochenmark und Lymphknoten von NSCLC und tumorfreien Patienten erlaubt die Charakterisierung dieser Gruppen mittels Expressionsanalyse von verschiedenen hämatopoietischen, epithelialen, mesenchymalen oder tumor-assoziierten Genen. Es wurde untersucht, ob eine Unterscheidung von Kontrollzellen und putativen DTCs anhand des Nachweises ausgewählter Transkripte möglich ist. Um mögliche histologisch-bedingte Unterschiede zu vermeiden, wurden für die PCR-basierte Genanalyse lediglich EpCAM-positiv Zellen von den Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Lunge untersucht.

4.3.1.1 Etablierung einer Endpoint-PCR für ausgewählte Transkripte

Einige Primerpaare für die zu untersuchenden Gene (siehe Tabelle 41) sind für den Gennachweis bei Einzelzellen bereits getestet und etabliert (Guzvic et al., 2014). Die übrigen

Primerpaare (entsprechende Gene sind in Tabelle 41 unterstrichen) wurden wie oben beschrieben getestet (Kapitel 3.6 Primerdesign und -etablierung). Die verwendeten Restriktionsenzyme und Verdau-Bedingungen sind in Tabelle 42 aufgeführt.

Tabelle 41: Untersuchte Gene mittels genspezifischer PCR

Kategorie	Untersuchte Gene
Hämatopoietisch	CD11c, CD19, CD33, CD34, CD44, CD45, <u>CD68</u> , CD71, <u>CD90</u> , CD117, CD207, CD233, CD236, EPOR, HBA2, HLA-DMB, KLF1, NFE2
Mesenchymal	<u>ALDH1A1</u> , <u>VIM</u>
Epithelial	<u>CDH1</u> , EpCAM, KRT5, KRT6a, KRT8, KRT18, KRT19
Tumor-assoziiert	CD133, <u>IVL</u> , <u>NANOG</u> , <u>SPA17</u> , <u>TP63</u> , <u>BMI1</u>

Aufgrund der vielfältigen Funktionen mancher Gene kann die Zuordnung zu mehr als nur einer der genannten Gruppen gerechtfertigt sein. Für die unterstrichenen Gene wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Primer etabliert.

Tabelle 42: Verwendete Restriktionsenzyme und Inkubationsparameter

Gen	Enzym	Fragmente	Puffer	Inkubation	Inaktivierung
ALDH1A1	SfaNI	166 + 71 bp	NEB3.1	1h 37°C	20 min 65°C
BMI1	Hpy188III	102 + 46 bp	CutSmart	1h 37°C	20 min 65°C
CD68	HpyCH4III	88 + 43 bp	CutSmart	1h 37°C	20 min 65°C
CD90	MspI	65 + 36 bp	CutSmart	1h 37°C	20 min 65°C
CDH1	MspI	101 + 51 bp	CutSmart	1h 37°C	-
IVL	Tsp45I	61 + 59 bp	CutSmart	1h 65°C	-
NANOG	MnII	65 + 36/33 bp	CutSmart	1h 37°C	20 min 65°C
SPA17	MspI	149 + 137 bp	CutSmart	1h 37°C	-
TP63	BsmAI	104 + 58 bp	CutSmart	1h 55°C	-
VIM	SfaNI	341 + 131 bp	NEB3.1	1h 37°C	20 min 65°C

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Gradienten-PCR und des Restriktionsverdaus der neu etablierten Primer. Bei allen untersuchten Genen konnte eine einzelne Bande mit der erwarteten Amplikon-Länge detektiert werden. In allen Fällen wurde das PCR-Produkt durch den Verdau mit dem jeweiligen Restriktionsenzym in die erwarteten DNA-Fragmente mit den entsprechenden Größen verdaut. Die parallel durchgeführten Negativkontrollen zeigten keine Amplifikation von kontaminierender DNA. Die Primerpaare können somit zuverlässig und auf Einzelzell-Ebene das zu untersuchende Gen nachweisen.

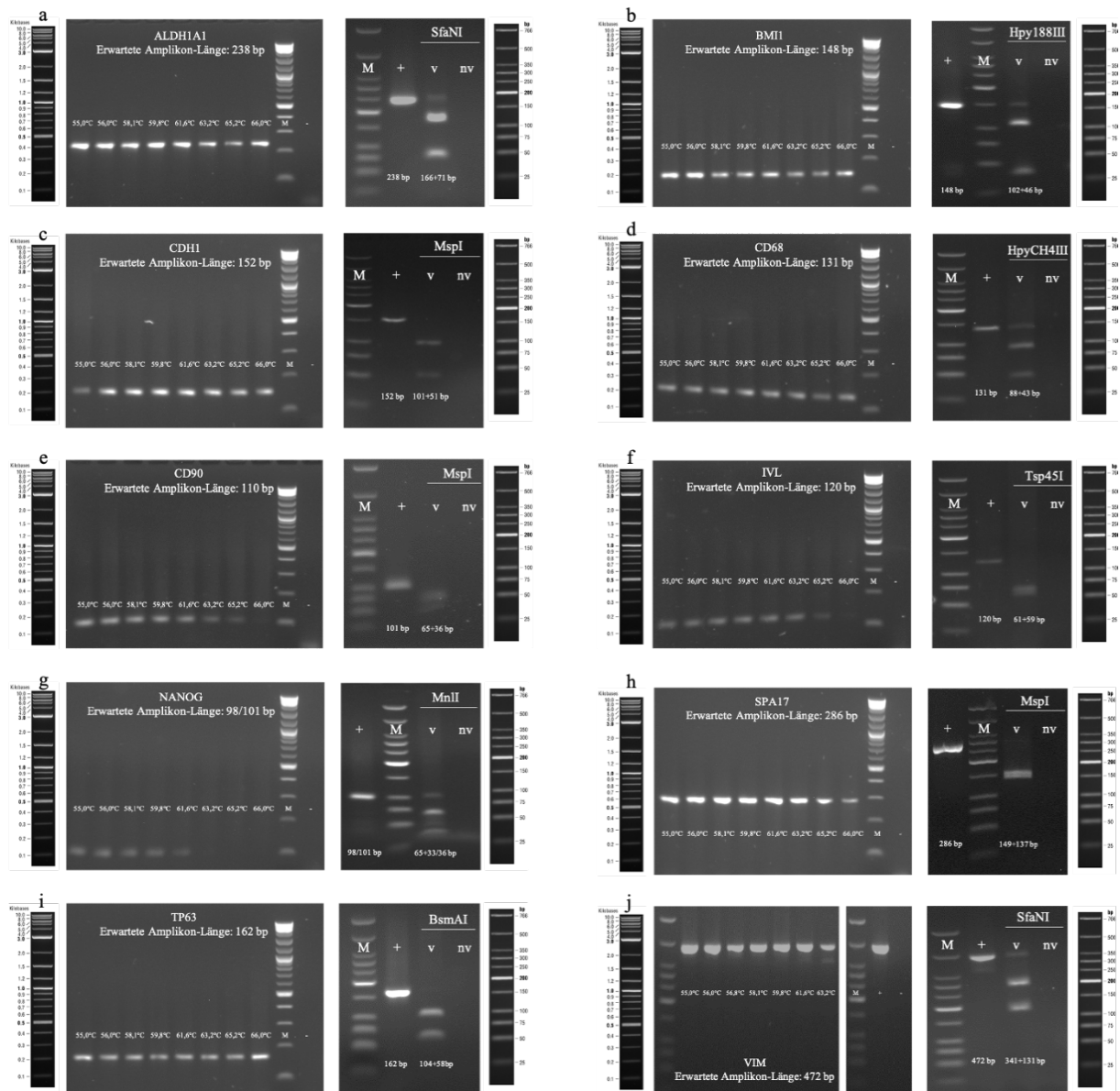


Abbildung 17: Gradienten-PCRs und Restriktionsverdau neu etablierter Primer

Agarose-Gelbilder der Gradienten-PCRs (links) und Restriktionsverdau (rechts) für die neu etablierten Primerpaare a) ALDH1A1, b) BMI1, c) CDH1, d) CD68, e) CD90, f) IVL, g) NANOG, h) SPA17, i) TP63, j) VIM. Jeweils links der Gradienten-PCR und rechts des Restriktionsverdaus zeigen Größenmarker die Größe (bp) der abgebildeten Banden. M = Größenmarker; v = verdaut; nv = nicht verdaut.

4.3.1.2 Genetische Charakterisierung von EpCAM-positiven Einzelzellen aus Tumor- und Kontrollpatienten mit genspezifischen PCRs

Nach der Etablierung der gewünschten Primerpaare sollten nun alle WTA Produkte von Plattenepithelkarzinomen der Lunge und der Kontrollpatienten (*healthy donor* = HD) untersucht werden. Dabei sollte geklärt werden, ob gesunde von malignen Zellen anhand der Genexpression unterschieden werden können. Es wurden für alle Zellen mit mindestens einer Bande in der WTA-QC alle Marker der Tabelle 41 untersucht. Insgesamt konnten 157 Zellen mit genspezifischen Endpunkt-PCRs untersucht werden (HD: n=38, M0: n=94, M1: n=25).

Zuerst wurden die epithelialen Marker *EpCAM*, *CDH1* und die Zytokeratine *KRT5*, *KRT6*, *KRT8*, *KRT18* und *KRT19* untersucht. Sowohl in den Zellen aus Lymphknoten als auch aus dem Knochenmark ließen sich nur wenige Zellen mit Expression von *KRT5* (n=1/157) oder *KRT19* (n=4/157) finden, während *KRT6* in keiner der untersuchten Zellen nachgewiesen werden konnte.

In dem Vergleich der Häufigkeit der Expression der epithelialen Marker wurden in den EpCAM-gefärbten Zellen aus dem Knochenmark (Abbildung 18) keine signifikanten Unterschiede zwischen HD, M0 und M1 Zellen beobachtet (Chi²-Test > 0,05). Passend zu der positiven Färbung konnte bei über 80% der untersuchten Zellen aus dem Knochenmark das EpCAM Transkript nachgewiesen werden.

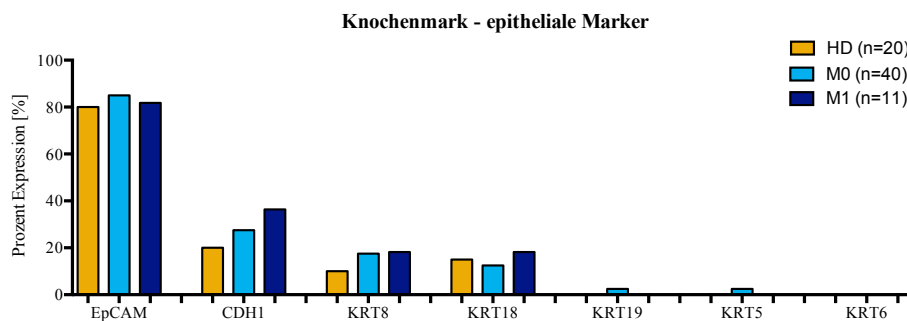


Abbildung 18: Expression von epithelialen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem KM

Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD), Patienten ohne Fernmetastasen (M0) und mit Fernmetastasen (M1) mit positivem Nachweis des untersuchten Gen-Transkripts. Chi-Quadrat Test.

Bei der Analyse der Genexpression epithelialer Gene in den Zellen aus Lymphknoten (Abbildung 19) zeigte sich, dass Zellen von M1-Patienten höchst signifikant häufiger *EpCAM* (Chi²; $p < 0,001$) und *KRT18* (Chi²; $p < 0,001$) und signifikant häufiger *CDH1* (Chi²; $p = 0,030$) exprimieren als Zellen von Kontrollpatienten. Dies ließ sich zum Teil auch bei Zellen von M0-Patienten zeigen, die signifikant häufiger *KRT18* exprimieren (Chi²; $p = 0,028$).

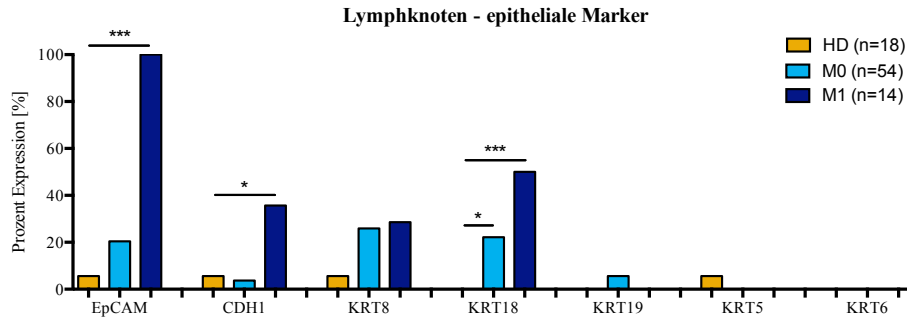


Abbildung 19: Expression von epithelialen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem LK

Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD), Patienten ohne Fernmetastasen (M0) und mit Fernmetastasen (M1) mit positivem Nachweis des untersuchten Gen-Transkripts. Chi-Quadrat Test.

Überraschenderweise zeigte sich in Lymphknoten-Zellen trotz immunchemisch positivem Nachweis von Oberflächen-EpCAM Protein ein niedriger Anteil von Zellen mit nachweisbarem EpCAM-Transkript in den HD und M0 Gruppen mit jeweils 5,6% und 20,4%. Dies ist ein höchst signifikanter Unterschied (χ^2 ; $p < 0,001$) im Vergleich zu HD und M0 Zellen aus dem Knochenmark (Abbildung 20).

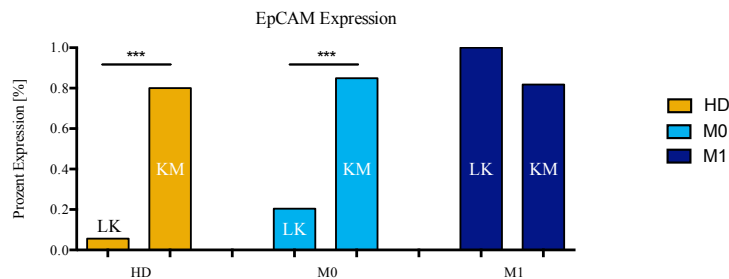


Abbildung 20: Vergleich von EpCAM Genexpression in LK und KM

Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD), Patienten ohne Fernmetastasen (M0) und mit Fernmetastasen (M1) mit positivem Nachweis des EpCAM Transkripts in Zellen aus dem Lymphknoten (LK) und Knochenmark (KM). Chi-Quadrat Test.

Da auch bei gesunden Patienten EpCAM-positive Zellen zu finden sind und diese nativen Zellen meist hämatopoietischer Herkunft zu sein scheinen, wurden die Zellen zudem auf eine Reihe von hämatopoietischen Markern (*CD45*, *CD19*, *CD33*, *CD34*, *CD44*, *CD68*, *CD90*, *CD71*, *CD117*, *CD11c*, *CD207*, *HLA-DMB*) untersucht.

Typische Marker für Langerhans-Zellen (*CD11c*, *CD207*, *HLA-DMB*) waren in allen untersuchten Knochenmark- und den meisten Lymphknoten-Zellen negativ. Des Weiteren konnte *CD33* ($n = 6/157$) und *CD90* ($n = 3/157$) in nur wenigen Zellen nachgewiesen werden.

Insgesamt waren die Zellen aus dem Knochenmark nur selten positiv für *CD45*, das von den meisten differenzierten hämatopoietischen Zellen exprimiert wird (Holmes, 2006) (5,0% der

HD Zellen, 22,5% der M0 und 0% der M1 Zellen). Zwischen den Zellgruppen aus dem Knochenmark zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der Expression von den oben genannten hämatopoietischen Markern (Abbildung 21).

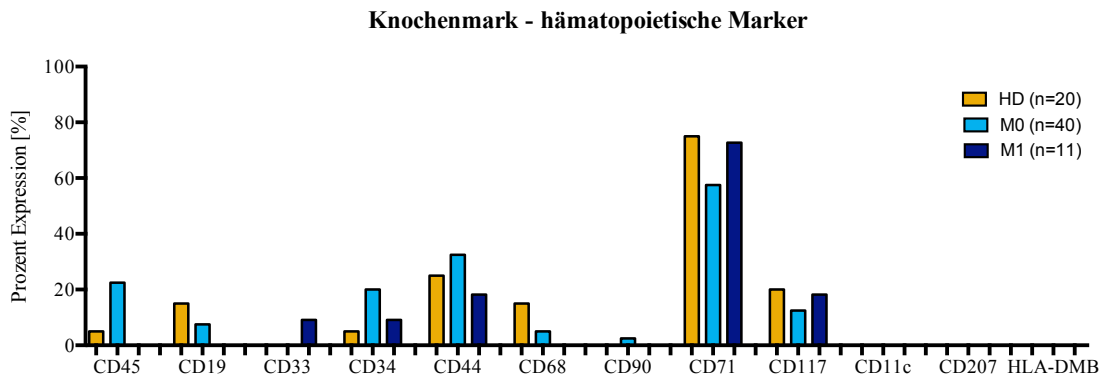


Abbildung 21: Expression von hämatopoietischen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem KM
 Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD), Patienten ohne Fernmetastasen (M0) und mit Fernmetastasen (M1) mit positivem Nachweis des untersuchten Gen-Transkripts. Chi-Quadrat Test.

Bei der Untersuchung der hämatopoietischen Marker in den EpCAM-positiven Zellen aus den Lymphknoten zeigte sich in 22,2% der HD, 66,7% der M0 und 50% der M1-Zellen eine nachweisbare Expression von *CD45* (Abbildung 22). In den Gruppen der M0 und M1 Zellen war dies ein höchst bzw. hoch signifikant höherer Anteil an *CD45*-positiven Zellen (χ^2 ; $p < 0,001$ bzw. $p = 0,006$) im Vergleich zu den EpCAM-Zellen aus dem Knochenmark. Zudem wurde das *CD44*-Antigen, das in vielen Zellen (z.B. T-Zellen, aber auch in Epithelien oder Krebsstammzellen) exprimiert wird, signifikant bis hoch signifikant häufiger in Lymphknoten im Vergleich zu Knochenmark Zellen nachgewiesen (χ^2 ; $p = 0,022$ für HD; $p = 0,002$ für M0 und $p = 0,021$ für M1).

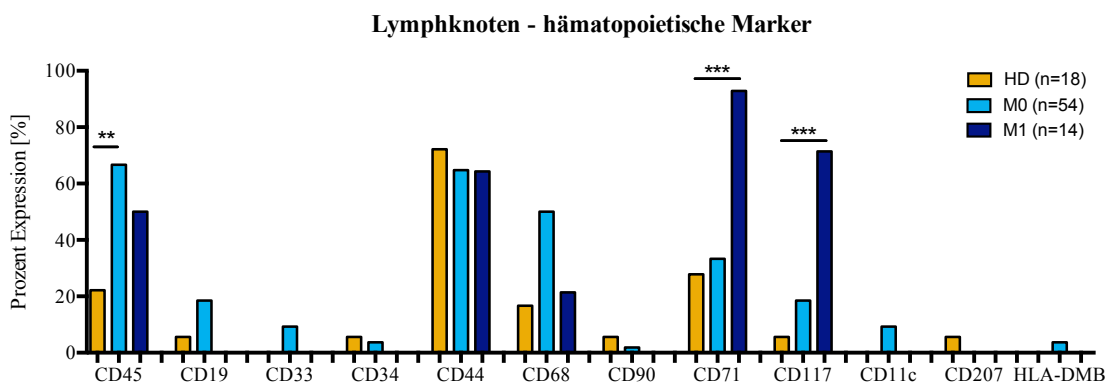


Abbildung 22: Expression von hämatopoietischen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem LK
 Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD), Patienten ohne Fernmetastasen (M0) und mit Fernmetastasen (M1) mit positivem Nachweis des untersuchten Gen-Transkripts. Chi-Quadrat Test.

Bei der Einteilung der Zellen in vier Subgruppen anhand der EpCAM und CD45-Expression konnte ein deutlicher Unterschied in der Verteilung der Zellen in die Expressions-Gruppen zwischen Lymphknoten und Knochenmark beobachtet werden (Tabelle 43). So waren im Knochenmark die Mehrheit aller HD, M0 und M1 Zellen in der EpCAM+/CD45- Gruppe, wohingegen im Lymphknoten der Großteil der Zellen in die Gruppen EpCAM-/CD45- (HD), EpCAM-/CD45+ (M0) bzw. zu gleichen Teilen in EpCAM+/CD45- und EpCAM+/CD45+ (M1) fielen.

Tabelle 43: Einteilung der untersuchten Zellen in Gruppen anhand der EpCAM und CD45 Expression

Gruppe	Lymphknoten			Knochenmark		
	HD	M0	M1	HD	M0	M1
EpCAM+/CD45-	0 (0%)	4 (7,4%)	7 (50%)	16 (80%)	25 (62,5%)	9 (81,8%)
EpCAM+/CD45+	1 (5,6%)	7 (13%)	7 (50%)	0 (0%)	9 (22,5%)	0 (0%)
EpCAM-/CD45+	3 (16,7%)	29 (53,7%)	0 (0%)	1 (5%)	0 (0%)	0 (0%)
EpCAM-/CD45-	14 (77,8%)	14 (25,9%)	0 (0%)	3 (15%)	6 (15%)	2 (18,2%)

Die untersuchten Zellen wurden anhand der Expression von EpCAM und CD45 in der PCR in vier Gruppen eingeteilt. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen in der jeweiligen Gruppe und der Anteil an der jeweiligen Zellklasse in Prozent. EpCAM-positive Zellgruppen sind fetter Schrift hervorgehoben.

Auch innerhalb der EpCAM-positiven Zellen aus dem Lymphknoten zeigte sich ein hoch signifikant höherer Anteil an CD45-Expression (Chi^2 ; $p = 0,001$) in M0 im Vergleich zu HD Zellen (Abbildung 22). Des Weiteren konnte eine höchst signifikant höhere Anzahl an CD117 und CD71-positiven Zellen (Chi^2 ; $p < 0,001$) in M1 Zellen und eine signifikant höhere Anzahl an CD68-positiven Zellen in M0 Zellen im Vergleich zu HD Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 22). CD68 wird in mehreren Blutzellen (Makrophagen, Monozyten), aber auch in Endothel- und Tumorzellen exprimiert (Chistiakov, Killingsworth, Myasoedova, Orekhov, & Bobryshev, 2017). Die Tyrosinkinase KIT (CD117) wird insbesondere in hämatopoietischen Stammzellen exprimiert (Lennartsson, Jelacic, Linnekin, & Shivakrupa, 2005) und der Transferrin Rezeptor (CD71) findet sich vor allem in Endothel- und erythroiden Vorläuferzellen (Marsee, Pinkus, & Yu, 2010).

Da insbesondere erythroide Vorläuferzellen als natürliches Reservoir an nicht-malignen EpCAM-positiven Zellen vorbeschrieben sind (Bühring et al., 1996; Guzvic et al., 2014; Lammers et al., 2002) und sowohl im Lymphknoten ($n = 36/86$), als auch im Knochenmark ($n = 47/71$) eine Vielzahl der Zellen positiv für den u.a. erythroiden Marker CD71 waren, sollten im folgenden Schritt weitere erythroide Marker in dem Kollektiv untersucht werden.

Untersucht wurde die Expression von *HBA2*, *EPOR*, *KLF1*, *NFE2*, *CD233* und *CD236* (Abbildung 23 und 24). Während *EPOR* und *KLF1* nur sporadisch nachzuweisen war (5,7% und 4,5% aller Zellen), zeigten sich im Knochenmark fast alle Zellen positiv für Hämoglobin A2 (HD: 80%, M0: 87,5%, M1: 100%). Zusätzlich konnte in 57,7% der Zellen aus dem Knochenmark *CD233* (SLC4A1, Bande 3, Anionen-Austauscher 1; Zellmembran-Protein von Erythrozyten und Nephronen) detektiert werden. Hierbei zeigte sich jedoch eine signifikant niedrigere Anzahl von positiven Zellen in M1 als in HD Zellen (χ^2 ; $p = 0,022$). Bei den übrigen Markern konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen HD und M0 / M1 Zellen gesehen werden.

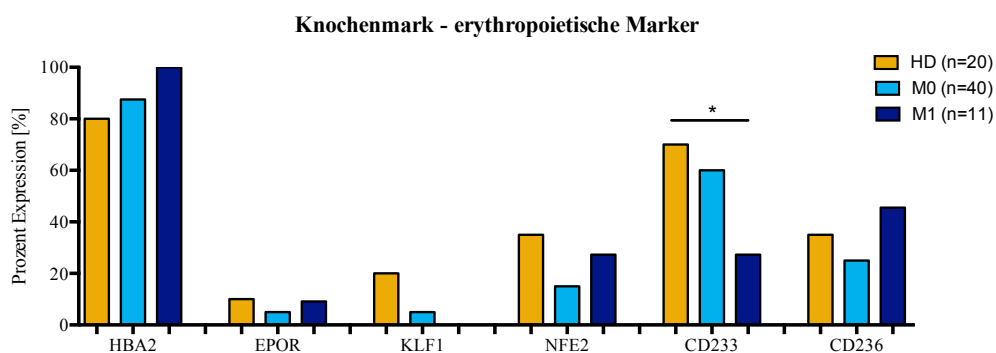


Abbildung 23: Expression von erythropoietischen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem KM
 Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD), Patienten ohne Fernmetastasen (M0) und mit Fernmetastasen (M1) mit positivem Nachweis des untersuchten Gen-Transkripts. Chi-Quadrat Test.

In EpCAM-positiv gefärbten Zellen aus Lymphknoten war *HBA2* ebenfalls das am häufigsten exprimierte Gen in der Gruppe der untersuchten erythroiden Marker (Abbildung 24). Allerdings zeigte sich - im Gegensatz zu den Knochenmark Zellen - eine signifikant niedrigere Anzahl an *HBA2*-positiven Zellen in M0 Zellen (χ^2 ; $p = 0,017$). Der Anteil an *NFE2*-positiven Zellen (Nuclear Factor, Erythroid 2; Differenzierung und Reifung erythrozytärer Zellen und von Megakaryozyten) (Gasiorek & Blank, 2015) war bei M0 signifikant (χ^2 ; $p = 0,05$) und bei M1 Zellen hoch signifikant (χ^2 ; $p = 0,001$) größer als bei HD Zellen. Zudem wurde *CD236* (Glycophorin C; Membranprotein von Erythrozyten) signifikant höher in M1 Zellen als in HD Zellen exprimiert (χ^2 ; $p < 0,001$).

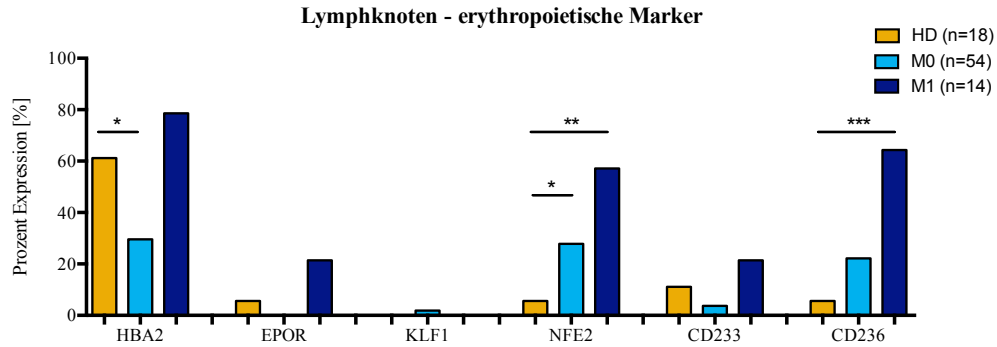


Abbildung 24: Expression von erythropoietischen Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem LK
 Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD), Patienten ohne Fernmetastasen (M0) und mit Fernmetastasen (M1) mit positivem Nachweis des untersuchten Gen-Transkripts. Chi-Quadrat Test.

Um einen malignen Ursprung der Zellen weiter zu untersuchen, wurden im Folgenden noch mesenchymale und Tumor-assoziierte Marker analysiert. Dazu gehören der mesenchymale Marker Vimentin (*VIM*), die Tumor-Stammzell-assoziierten Gene *ALDH1A1* und *CD133*, *BMI1* als Marker für die epitheliale-mesenchymale Transition und die Plattenepithelkarzinom-assoziierten Gene *TP63*, *SPA17* und Involucrin (*IVL*) (Abbildung 25 und 26).

Während im Knochenmark kein signifikanter Unterschied zwischen der Häufigkeit der *ALDH1A1*-Expression festgestellt werden konnte, zeigten M0 Zellen aus Lymphknoten einen höchst signifikant höheren Anteil an Zellen mit Nachweis von *ALDH1A1* (Chi^2 : $p < 0,001$).

Im Knochenmark zeigte sich zudem eine hoch signifikant höhere Anzahl an *VIM*-positiven Zellen in M0 und M1 Zellen (Chi^2 : $p = 0,049$; $p = 0,009$). Dagegen waren unter den M1 Zellen im Lymphknoten hoch signifikant weniger *VIM*-positive Zellen nachweisbar (Chi^2 : $p = 0,001$). Bei den Tumor-assoziierten bzw. Plattenepithelkarzinom-assoziierten Genen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen HD und M0 oder M1 Zellen.

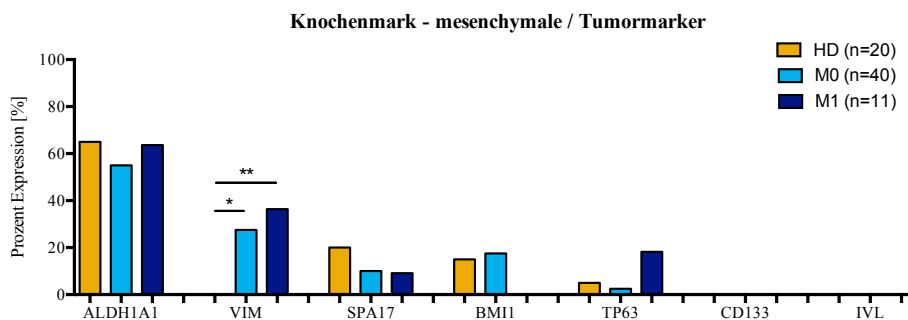


Abbildung 25: Expression von mesenchymalen und Tumor-assoziierten Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem KM
 Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD), Patienten ohne Fernmetastasen (M0) und mit Fernmetastasen (M1) mit positivem Nachweis des untersuchten Gen-Transkripts. Chi-Quadrat Test.

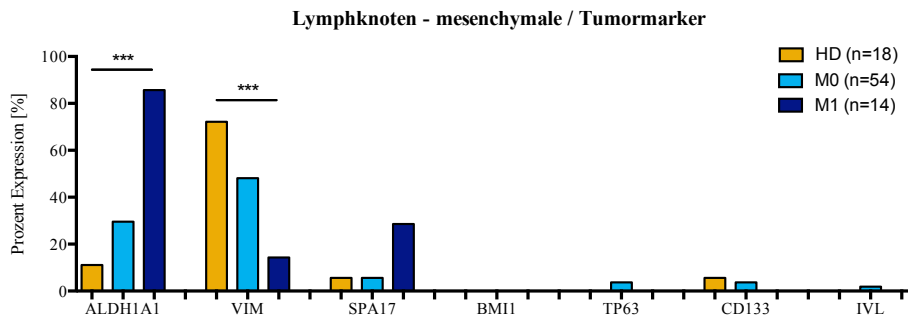


Abbildung 26: Expression von mesenchymalen und Tumor-assoziierten Transkripten in HEA-125+ Zellen aus dem LK

Aufgetragen ist der prozentuale Anteil der Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD), Patienten ohne Fernmetastasen (M0) und mit Fernmetastasen (M1) mit positivem Nachweis des untersuchten Gen-Transkripts. Chi-Quadrat Test.

Insgesamt zeigte sich ein sehr heterogenes Bild der Genexpression in den verschiedenen Zellgruppen und den verschiedenen Geweben. Während es deutliche Unterschiede in dem Anteil an Zellen mit EpCAM und CD45 Expression zwischen Lymphknoten und Knochenmark gab, waren die übrigen Marker meist nicht aussagekräftig oder spiegelten gegensätzliche Trends wider.

Um letztlich zu untersuchen, ob die Herkunft der Zellen aus Kontroll- bzw. Tumorpatient anhand der PCR-basierten Genexpression möglich ist, wurden die Ergebnisse aller untersuchten Gene mit einer hierarchischen Clusteranalyse untersucht. Die Heatmaps und Dendrogramme sind in Abbildung 27 abgebildet.

In den HEA-125-positiven Zellen aus dem Lymphknoten zeigte sich hierbei eine mäßige Separierung der M1 Zellen von den M0 und HD Zellen. Zudem war zu beobachten, dass M0 Zellen meist in kleinen Gruppen von mehreren Zellen zusammen clustern und die Kontrollzellen verstreut zwischen den M0 Zellen liegen. Bei den Zellen aus dem Knochenmark hingegen zeigte sich erneut ein sehr heterogenes Bild ohne sichtbaren Trend von Zell-Clustern. Hier waren sowohl M1, als auch die HD Zellen ohne erkennbarem Muster zwischen den M0 Zellen verteilt.

Da insbesondere die M1 Zellen in den Lymphknoten anhand der Genexpression von den übrigen Zellen einigermaßen zu unterscheiden waren, wurden die PCR-Ergebnisse der Zellen aus den Lymphknoten in einer Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analyse* = PCA) untersucht (Abbildung 28). Die PCA beinhaltet die Vereinfachung von multidimensionalen Datensätzen und versucht somit die Variablen - unter Erhaltung der höchst möglichen Varianz der Variablen - zu reduzieren.

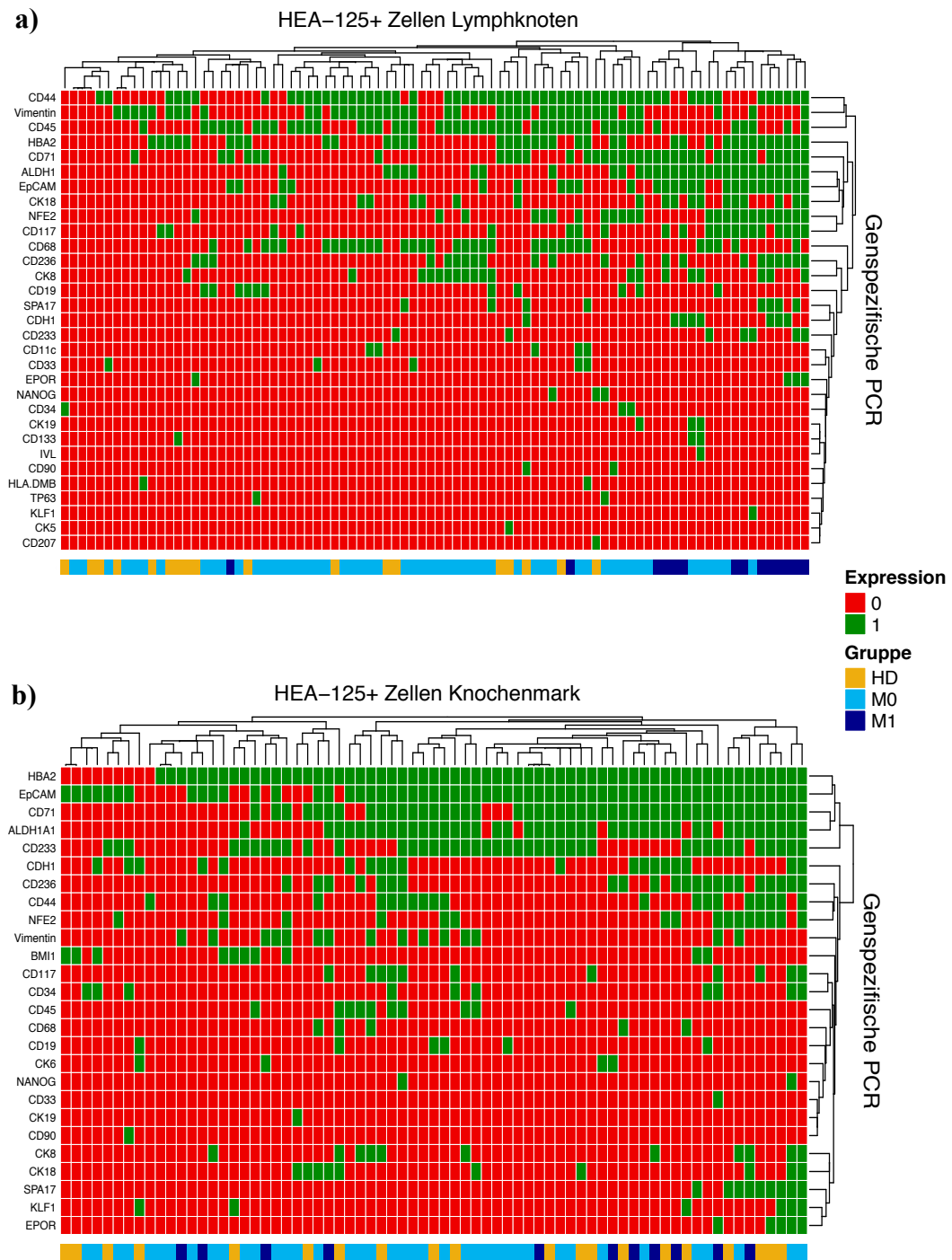


Abbildung 27: Hierarchische Clusteranalyse der genspezifischen Expressionsanalyse

Gezeigt sind die Heatmaps der Genexpression (rot = nicht exprimiert, grün = exprimiert) der HEA-125-positiven Zellen aus a) Lymphknoten und b) Knochenmark. Jeweils unterhalb der Heatmaps zeigt eine Farbcodierung die Herkunft der untersuchten Zelle aus gesunden Kontrollpatienten (HD, gelb), NSCLC Patienten ohne Metastasen (M0, hellblau) oder mit Metastasen (M1, dunkelblau). Marker, bei denen alle Zellen negativ waren, wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

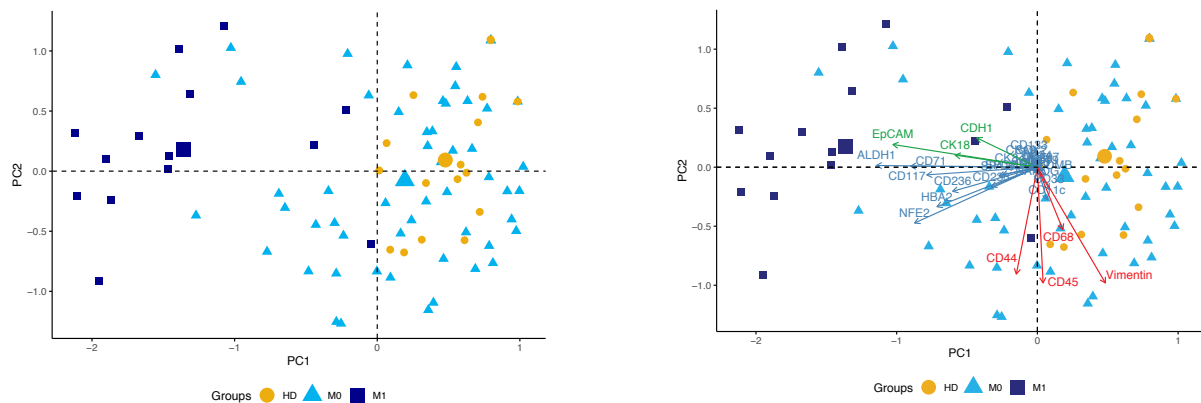


Abbildung 28: Hauptkomponentenanalyse der PCR-Ergebnisse der HEA-125+ Zellen aus dem LK
 Gezeigt ist das Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse in einer Punktwolke (links) und zusätzlich als Ladungsdiagramm (rechts). Zellen von gesunden Kontrollpatienten (HD) sind gelb markiert, Zellen von NSCLC ohne (M0) bzw. mit (M1) Metastasen jeweils hellblau und dunkelblau. Epitheliale Marker sind grün markiert, erythroide Marker blau und hämatopoietische/mesenchymale Marker rot.

In der Darstellung als Punktwolke erkennt man ähnlich wie bei der Heatmap der Lymphknoten-Zellen eine Separierung der M1 Zellen, wohingegen HD und M0 Zellen nicht zu unterscheiden sind (Abbildung 28). In der rechten Abbildung ist zusätzlich zu der Punktwolke (entspricht den einzelnen Zellen) das Ladungsdiagramm eingezeichnet, das die Koeffizienten der einzelnen Variablen anzeigt (Pfeile) und somit die Größe des Effektes der einzelnen Variablen (untersuchte Gene) auf die Komponenten (PC1 oder PC2) grafisch darstellt.

Hier ist zu beobachten, dass insbesondere epitheliale (*EpCAM*, *CK18*, *CDH1*) und erythroide (*HBA2*, *NFE2*, *CD236*, *CD71*) Marker einen maßgeblichen Einfluss auf PC1 (x-Achse) und mesenchymale/hämatopoietische Marker wie *CD45*, *CD68*, *VIM* und *CD44* auf PC2 (y-Achse) haben. Somit scheinen epitheliale und erythroide Marker den größten Stellenwert in der Unterscheidung von M1 Zellen im Lymphknoten einzunehmen.

4.3.1.3 Quantitativer EpCAM und CD45 Nachweis mittels qRT-PCR in Einzelzell-Transkriptomen

Der epitheliale Marker EpCAM und der hämatopoietische Marker CD45 scheinen in Zellen aus Lymphknoten und Knochenmark ein durchaus distinktes Verteilungsmuster aufzuweisen (Tabelle 43). Außerdem zeigt die Hauptkomponentenanalyse der LK Zellen von Plattenepithelkarzinomen einen maßgeblichen Einfluss von epithelialen und hämatopoietischen Markern auf die Separierung zwischen M1 und HD/M0 Zellen (Abbildung 28). Zudem werden den zirkulierenden oder disseminierten Tumorzellen solider Tumoren oftmals der Phänotyp CK+/CD45- bzw. EpCAM+/CD45- zugeschrieben, wie zum Beispiel auch bei dem FDA-zugelassenen System CellSearch™ System zur Detektion von zirkulierenden Tumorzellen (CTC).

Aus diesem Grund sollte im Folgenden eine quantitative Analyse der Expression dieser beiden Marker in den Einzelzell-Transkriptomen durchgeführt und auch bei anderen histologischen NSCLC-Entitäten untersucht werden. Für den quantitativen Nachweis des EpCAM und CD45-Transkripts wurden somit DTCs aller NSCLC Subtypen eingeschlossen. Da der Nachweis der EpCAM-mRNA auf eine aktive Transkription des EpCAM Gens hindeutet, werden im Folgenden HEA-125+/EpCAM mRNA+ Zellen als „aktivierte EpCAM-positive Zellen“ bezeichnet.

Um diese quantitative Analyse der EpCAM bzw. CD45-Expression auf Einzelzell-Ebene zu ermöglichen, mussten zunächst die vorhandenen Primer auf ihre qRT-PCR-Tauglichkeit getestet werden [siehe hierzu Kapitel 3.11 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)].

In der Auswertung der Standardkurve zeigte sich für das EpCAM Primerpaar eine Korrelation von $R^2 = 0,9985$ und eine Effizienz von 95,02% über 4 log-Stufen. Für das CD45 Primerpaar betrug die Effizienz 92,43% und die Korrelation $R^2 = 0,9921$ über 5 log-Stufen (Abbildung 29). Des Weiteren zeigte die Schmelzkurve des qRT-PCR-Laufes keine zusätzlichen Peaks, die auf eine unspezifische Amplifikation anderer cDNA Fragmente hinweisen würden (Abbildung 30). Somit waren die beiden Primerpaare gut für die quantitative Expressionsanalyse mittels qRT-PCR geeignet.

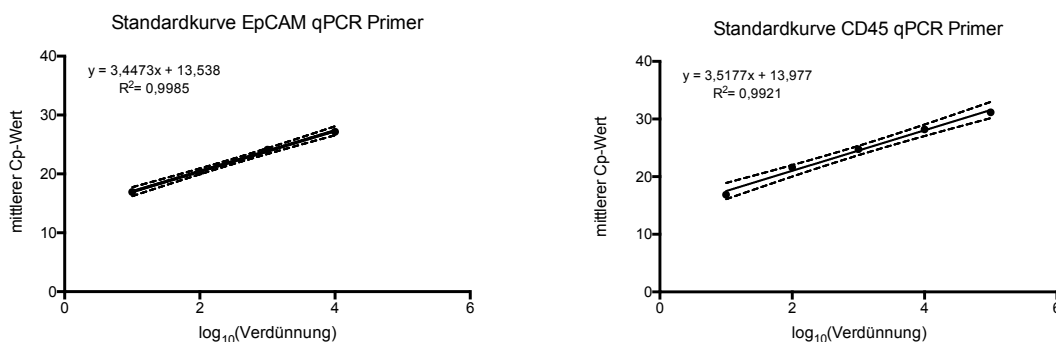


Abbildung 29: Standardkurven der EpCAM und CD45 qRT-PCR Primer

Dargestellt ist die Veränderung der errechneten Cp-Werte über mehrere \log_{10} -Stufen Verdünnungen zur Berechnung der Effizienz der EpCAM (links) und CD45 (rechts) Primer für die qRT-PCR. Angegeben ist die Funktion der interpolierten linearen Standardkurve und das Bestimmtheitsmaß R^2 nach Pearson.

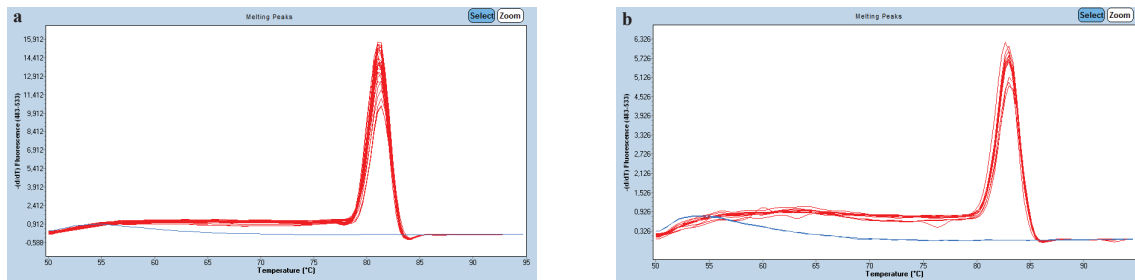


Abbildung 30: Schmelzkurven der EpCAM und CD45 qRT-PCR Primer

Gezeigt sind die Schmelzkurven der a) EpCAM, b) CD45 Amplifikate. Rote Linien zeigen Proben mit Amplifikation des Genfragments, blaue Linien zeigen die Negativkontrollen.

Insgesamt konnten 453 isolierte Zellen aus dem Knochenmark ($n = 153$ NSCLC und $n = 15$ HD) und Lymphknoten ($n = 259$ NSCLC und $n = 26$ HD) untersucht werden. Dabei wurde die Expression der Marker anhand der berechneten Ct-Werte eingeteilt:

- i. fehlende (neg) Expression bei $Ct \geq 32$
- ii. niedrige (low) Expression bei $26 < Ct < 32$
- iii. hohe (high) Expression bei $Ct \leq 26$.

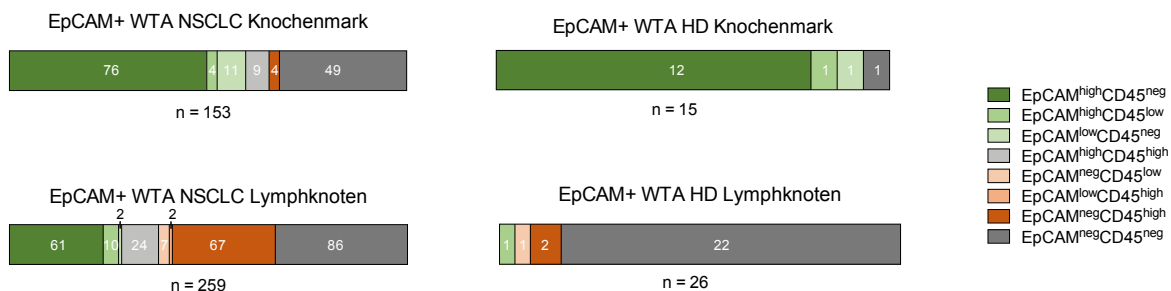


Abbildung 31: Ergebnisse der EpCAM und CD45 qRT-PCR

Die untersuchten Zellen wurden anhand der jeweiligen Expression von EpCAM und CD45 in Gruppen unterteilt. Angegeben ist die Anzahl der Zellen der jeweiligen Phänotyp-Gruppe, wobei grün ein Überwiegen der EpCAM Expression und orange ein Überwiegen der CD45 Expression angibt. Bei ähnlich hohen Expressionswerten der beiden Marker ist die Gruppe grau markiert.

Abbildung 31 zeigt einen Überblick über die Phänotypen der untersuchten Zellen basierend auf den Expressionslevels (negativ, niedrige und hohe Expression) von EpCAM und CD45 in der jeweiligen Gruppe. Ähnlich wie bei der Genexpressionsanalyse mittels Endpunkt-PCR zeigt sich ein höchst signifikanter Unterschied in der Verteilung von EpCAM und CD45 Expression zwischen Knochenmark und Lymphknoten. Während ca. zwei Drittel (91/153) der EpCAM-positiven Zellen aus dem KM von NSCLC Patienten und fast alle untersuchten Zellen aus dem KM von Kontrollpatienten (14/15) EpCAM exprimieren („aktivierte EpCAM-positiv Zellen), beträgt der Anteil der aktivierten EpCAM-positiven Zellen im LK nur ca. 28% (73/259) (Chi^2 : $p < 0,001$) in NSCLC Patienten bzw. 4% (1/26) (Chi^2 : $p < 0,001$) in HD Patienten.

Umgekehrt zeigen nur vier der 153 Zellen aus dem Knochenmark von Tumorpatienten eine aktive Transkription von CD45 (2,6%), wohingegen dieser Anteil in dem Lymphknoten bei 29% (76/259) (Chi^2 : $p < 0,001$) liegt. Auffallend ist zudem, dass in dem Großteil der Kontrollzellen aus dem Lymphknoten weder EpCAM noch CD45 nachgewiesen werden konnte; dieser Anteil ist höchst signifikant mehr als in den anderen Zellgruppen (Chi^2 : $p < 0,001$).

4.3.1.4 Korrelation der EpCAM mRNA Expression mit klinischen Daten

Die Genexpressionsanalysen zeigten, dass vor allem im Lymphknoten die Mehrzahl der Zellen trotz positiver EpCAM-Färbung das EpCAM-Transkript nicht exprimieren. Nun stellte sich die Frage, ob dies ein möglicher Marker zur Unterscheidung von echten disseminierten Tumorzellen und natürlich vorkommenden / falsch EpCAM-positiven Zellen darstellt. Hierfür wurden erneut die klinischen Follow-Daten ausgewertet. Es sollte untersucht werden, ob bei einer Stratifizierung der Patienten anhand der aktivierten EpCAM-positiven Zellen anstatt der immunzytologischen Färbung ein Unterschied in dem Gesamtüberleben beobachtet werden kann.

In dem ersten Schritt wurden alle Patienten mit einem Nachweis von HEA-125-positiv gefärbten Zellen in Lymphknoten oder im Knochenmark und einer erfolgreichen Amplifikation des Einzelzell-Transkriptoms (als Voraussetzung zur Genexpressionsanalyse) eingeschlossen ($n = 56$ für KM, $n = 63$ für LK). Die Patienten wurden anschließend anhand der qRT-PCR Daten für die EpCAM-Expression in die beiden Gruppen EpCAM+/PCR- und EpCAM+/PCR+ eingeteilt.

Hierbei zeigte sich eine deutliche Trennung der Überlebenskurven mit einem hoch signifikant niedrigerem Gesamtüberleben in der HEA-125+/mRNA+ Gruppe im Lymphknoten ($p = 0,0011$; Abbildung 32). Der Trend war ebenfalls im Knochenmark zu sehen, allerdings mit $p = 0,1235$ nicht signifikant (Abbildung 32). Zudem konnte beobachtet werden, dass in der HEA-125-positiven und mRNA-negativen Vergleichsgruppe (HEA-125+/mRNA-) sowohl im Knochenmark ($n = 10$) als auch im Lymphknoten ($n = 34$) nur jeweils ein tumorbedingtes Sterbeereignis auftrat (Abbildung 32).

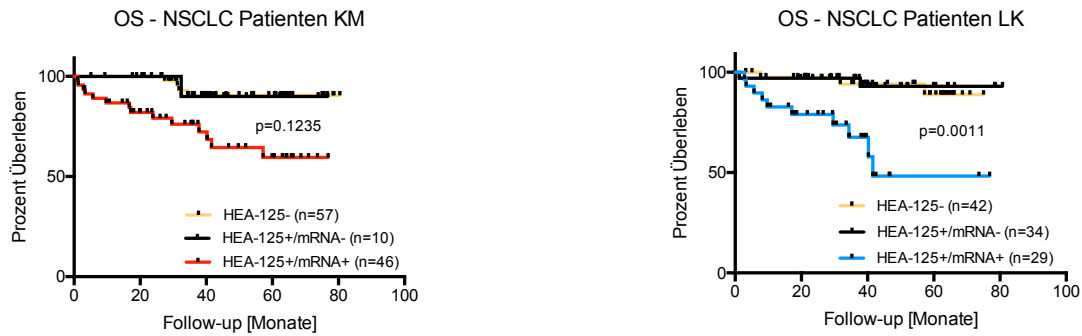


Abbildung 32: OS bei EpCAM mRNA-positiven vs. EpCAM mRNA-negativen Zellen in KM und LK
Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS) von NSCLC Patienten mit (mRNA+) und ohne Nachweis des EpCAM Transkriptes (mRNA-) bei HEA-125-positiver MRD in Knochenmark (KM, rot, links) bzw. HEA-125-positiver MRD in Lymphknoten (LK, blau, rechts). Gezeigt ist der p-Wert des Log-Rank Test zwischen den HEA-125+/mRNA- und der HEA-125+/mRNA+ Gruppen. Zum Vergleich ist zusätzlich jeweils das OS der HEA-125- Gruppe in Gelb gezeigt.

Da die Überlebenskurve der Patienten ohne Nachweis HEA-125-positiver Zellen (HEA-125-) nahezu identisch zu der Kurve der Patienten mit HEA-125-positiven Zellen, jedoch ohne EpCAM mRNA Nachweis ist (HEA-125+/mRNA-), wurden im nächsten Schritt diese Patienten ohne Nachweis von aktivierten EpCAM-positiven Zellen den negativ gefärbten Patienten gleichgestellt. Es ergeben sich somit die beiden Gruppen HEA-125+/-/mRNA- und HEA-125+/mRNA+ (aktivierte EpCAM-positive Zellen). Dabei zeigte sich sowohl im Knochenmark als auch im Lymphknoten ein höchst signifikant reduziertes Gesamtüberleben der Gruppen mit Nachweis von aktivierten EpCAM-positiven Zellen (Abbildung 33).

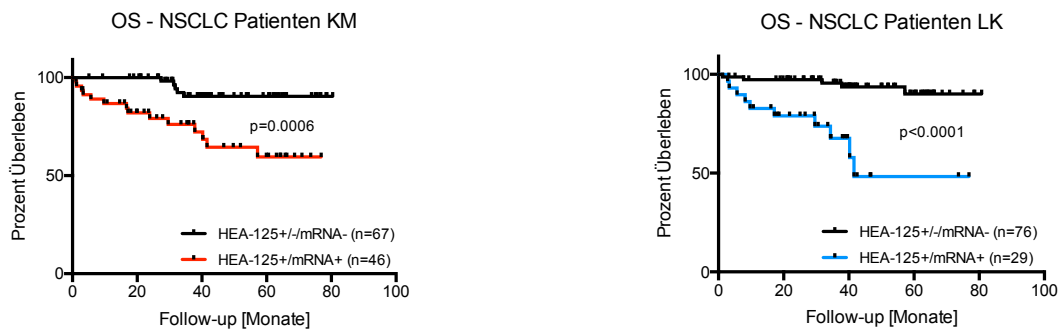


Abbildung 33: OS bei EpCAM mRNA-positiven vs. HEA-125 oder mRNA-negativen Zellen in KM oder LK
Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS) von NSCLC Patienten mit Nachweis des EpCAM Transkriptes (mRNA+) bei HEA-125-positiver MRD und HEA-125 oder mRNA-negativen Patienten im Knochenmark (KM, rot, links) bzw. in Lymphknoten (LK, blau, rechts). Log-Rank Test.

Betrachtet man abschließend nur die pN0 Patienten und gruppiert sie anhand dem Nachweis von HEA-125-positiven Zellen mit negativer bzw. positiver EpCAM PCR (Nachweis von nicht-aktivierten vs. aktivierten EpCAM-positiven Zellen) im Lymphknoten zeigt sich trotz niedriger Patientenzahl von n = 34 ein deutlicher Trend (p= 0,0943; Abbildung 34) zu einem reduzierten OS bei Patienten mit dem Nachweis von aktivierten EpCAM-positiven Zellen,

welcher sich bei Einschluss der HEA-125-negativen Patienten als signifikant erwies ($p = 0,0497$; Abbildung 34).

Somit zeigt die Stratifizierung der Patienten anhand der EpCAM Genexpression - im starken Gegensatz zu der HEA-125-Positivität im Rahmen der Immunfärbung - auch bei Patienten mit histopathologisch tumorfreien Lymphknoten (pN0) einen signifikanten Unterschied in dem Gesamtüberleben.

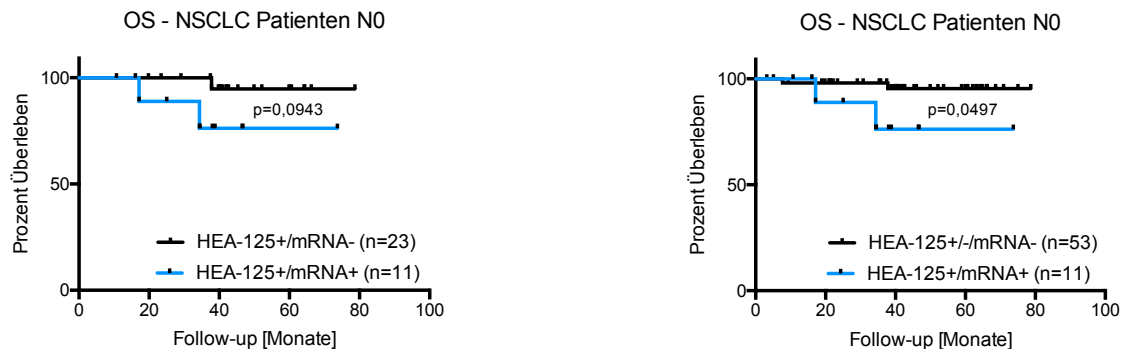


Abbildung 34: OS bei EpCAM mRNA-positiven vs. HEA-125 oder mRNA-negativen pN0 Lymphknoten
Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS) von NSCLC Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (N0) mit (mRNA+) und ohne (mRNA-) Nachweis des EpCAM-Transkriptes bei HEA-125-positiver MRD (links) bzw. mit Nachweis des EpCAM-Transkriptes (mRNA+) bei HEA-125-positiver MRD und HEA-125 oder mRNA-negativen Patienten (rechts) in Lymphknoten (LK, blau). Log-Rank Test

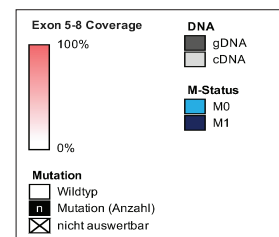
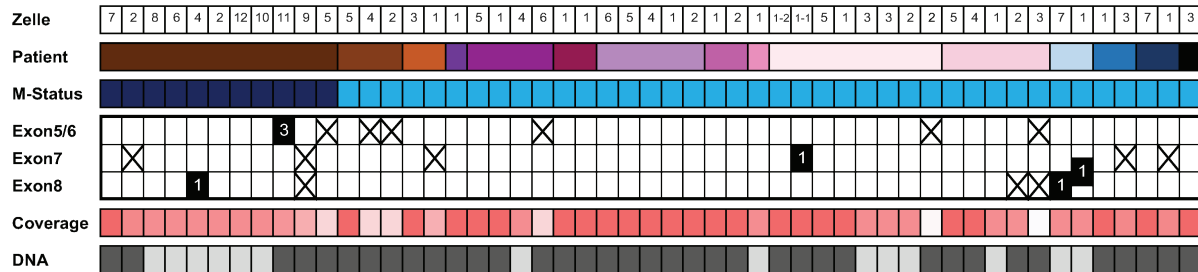
4.3.2 Identifizierung von disseminierten Tumorzellen mittels TP53 Sequenzierung

Mutationen in dem Tumorsuppressor-Gen TP53 gehören zu den häufigsten genetischen Veränderungen in malignen Tumoren (Olivier, Hollstein, & Hainaut, 2010). Laut dem *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer* (COSMIC) weisen bis zu 66% aller NSCLC eine Mutation dieses Gens auf. Zudem ist beschrieben, dass TP53-Veränderungen frühe und klonale Ereignisse in der Entstehung von Lungentumoren darstellen (Jamal-Hanjani et al., 2017).

Bei klonalen Mutationen von TP53 in Lungentumoren könnte die Sequenzierung dieses Gens somit auch den malignen Ursprung von früh disseminierten Tumorzellen eindeutig bestätigen. Da der Großteil aller in Lungentumor beschriebenen TP53-Mutationen in den Exons 5-8 auftreten (Olivier et al., 2010), wurden lediglich diese 4 Exons untersucht. In der Masterarbeit von Sabine Bleicher wurden bereits einige DTCs von Adenokarzinomen der Lunge untersucht. Dort konnte in lediglich 1/18 EpCAM-positiven Zellen aus dem Lymphknoten (und 0/22 EpCAM-positiven Zellen aus dem Knochenmark) eine TP53-Mutation entdeckt werden (Bleicher, 2016). Daraufhin wurden in der folgenden Analyse lediglich die Zellen von Plattenepithelkarzinomen - der zweiten großen histologischen Gruppe der NSCLC Tumoren -

auf TP53-Mutationen untersucht. Abbildung 35 zeigt eine Übersicht über die sequenzierten Zellen und deren Charakteristika. Insgesamt konnte bei 7 von 92 untersuchten Zellen eine Punktmutation bzw. eine Insertion / Deletion in den Exons 5-8 des TP53-Gens entdeckt werden.

a) Lymphknoten



b) Knochenmark

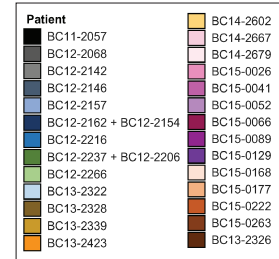
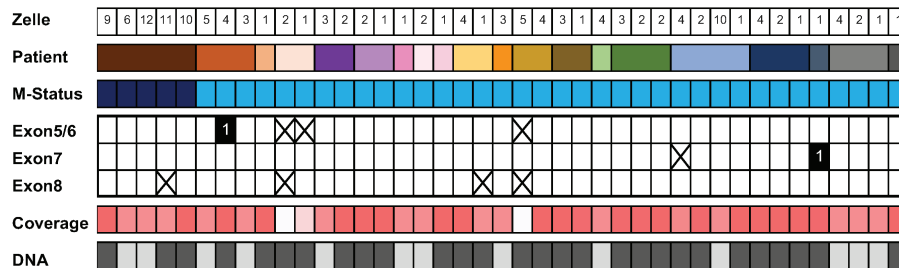


Abbildung 35: Übersicht über TP53 Sanger Sequenzierung der HEA-125+ Einzelzellen aus LK und KM

Im Lymphknoten zeigte die Sanger Sequenzierung in 9,8% aller untersuchten Zellen und bei 20% der untersuchten Patienten eine TP53-Mutation. Dahingegen waren es im Knochenmark lediglich 4,88% der untersuchten Zellen bzw. 10% aller Patienten (Abbildung 36). Dieser Unterschied zwischen Mutationen in Lymphknoten- und Knochenmarkzellen ($\chi^2: p = 0,376$) bzw. Patienten mit Mutationen in Lymphknoten oder Knochenmark ($\chi^2: p = 0,403$) war allerdings nicht signifikant.

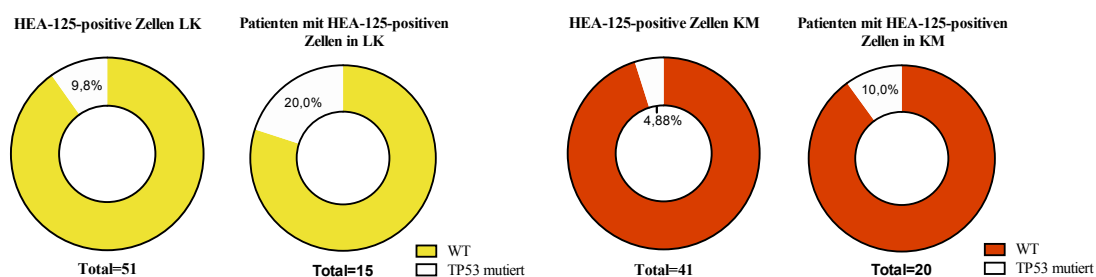


Abbildung 36: Anteil an TP53-Mutationen in dem untersuchten Kollektiv

Tortendiagramme zeigen den Anteil an TP53-mutierten Zellen (jeweils links) bzw. Patienten (jeweils rechts) in den untersuchten Zellen aus Lymphknoten (LK, gelb) und Knochenmark (KM, rot).

4.4 Systematische genetische Analyse mittels Genom-/Transkriptom Sequenzierung

Die klinischen Follow-Up Daten zeigen einen deutlichen Überlebensvorteil bei NSCLC-Patienten ohne Nachweis von EpCAM-positiven Zellen in Lymphknoten oder Knochenmark. Jedoch zeigte die Analyse von KM und LK von Kontrollpatienten ebenfalls eine hohe Nachweisrate von EpCAM-positiven Zellen. Eine weitergehende Analyse dieser Zellen mittels genspezifischer Endpunkt-PCR, quantitativem Nachweis von EpCAM und CD45 und Sanger-Sequenzierung des am häufigsten mutierten Gen TP53 zeigte keine zuverlässige Methode zum eindeutigen Nachweis von echten disseminierten Tumorzellen.

Aus diesem Grund sollte in den weiteren Untersuchungen eine systematische Analyse der Einzelzellen mittels Genom- und Transkriptom-Sequenzierung erfolgen. Als ein Charakteristikum von Krebserkrankungen gilt die Akquirierung von Mutationen und einer Genominstabilität (Hanahan & Weinberg, 2011). Somit sollten Tumorzellen - und folglich auch disseminierte Tumorzellen - solche Mutationen und Genomaberrationen tragen und der maligne Ursprung der Zellen durch diese Alterationen nachgewiesen werden können.

4.4.1 LowPass Genom-Sequenzierung der isolierten Einzelzellen

Insgesamt wurden 381 der isolierten BerEp4/HEA-125 und A45-positiven Zellen von 62 NSCLC Patienten in die shallow Genom-Sequenzierung eingeschlossen (siehe auch Kapitel 3.13.2 Aufarbeitung des Genoms für Ampli1™ LowPass Sequenzierung; Kapitel 3.13.3 NGS Pooling mittels MiSeq Sequenzierung, Kapitel 3.15.2 Auswertung der LowPass Daten). Die Qualitätskontrolle der CNV-Profile erfolgte anhand der beobachteten Standardabweichung σ_{Δ^*} . Eine $\sigma_{\Delta^*} < 0,3$ wurde als gute Qualität und eine $\sigma_{\Delta^*} > 0,5$ als ungenügende Qualität gewertet (Abbildung 37). Alle Proben mit einer σ_{Δ^*} zwischen 0,3 und 0,5 wurden manuell inspiziert und ein- oder ausgeschlossen. Die manuell eingeschlossenen Profile mit einem $\sigma_{\Delta^*} > 0,3$ weisen eine moderate Qualität auf. Die Profile aller untersuchten Proben und die Beurteilung der Qualität sind im Anhang aufgeführt.

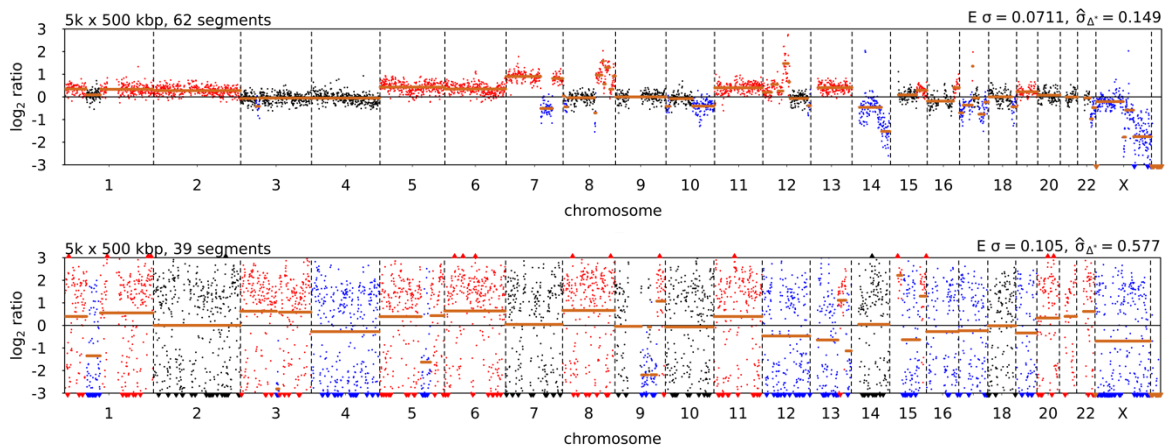


Abbildung 37: Beispiel eines CNV-Profiles mit guter und schlechter Qualität

Es konnten 316 der sequenzierten EpCAM ($n = 31$ KM HEA-125, $n = 108$ LK HEA-125, $n = 132$ LK BerEp4) und A45-positiven Zellen ($n = 45$) für die weitergehenden Analysen von Genomaberrationen (*copy number variation* = CNV) eingeschlossen werden. Als Teil der bioinformatischen Analyse wird das humane Genom in *bins* von 500 Kilobasen unterteilt. Es wurde festgelegt, dass eine Aberration von mindestens 25 konsekutiven *bins* vorliegen muss, um die Probe als aberrant zu werten. Die beiden gonosomalen Chromosomen X und Y wurden aufgrund von meist schlechterer Qualität und Coverage und den unterschiedlichen Geschlechtern der Patienten ausgeschlossen. Bei den untersuchten Zellen von Kontrollpatienten war in 33% der Proben (4/12) die Sequenzierung und bei weiteren 33% die Qualität der CNV Profile ungenügend zur weiteren Analyse. Aufgrund der niedrigen Anzahl an verbleibenden CNV Profilen von Kontrollpatienten konnten diese in den folgenden (statistischen) Auswertungen nicht berücksichtigt werden.

Abbildung 38 zeigt den Anteil der Zellen mit Aberrationen in den autosomalen Chromosomen an der Gesamtheit der untersuchten Zellen mit einem CNV-Profil von ausreichender Qualität. Dabei zeigt sich, dass knapp über 50% der HEA-125 und A45-positiven Zellen im Knochenmark Genomaberrationen aufweisen, wohingegen die Zellen aus dem Lymphknoten in knapp 60% bzw. über 90% der Fälle mindestens eine Aberration aufweisen. Der Anteil von aberranten BerEp4-positiven Zellen war höchst signifikant höher als der Anteil von aberranten Zellen in dem HEA-125-positiven Kollektiv ($\text{Chi}^2: p < 0,001$; Abbildung 38).

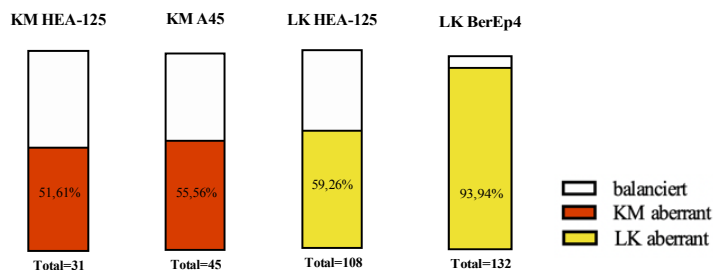


Abbildung 38: Anteil an aberranten Zellen in Knochenmark und Lymphknoten

Angezeigt werden die prozentualen Anteile der aberranten Zellen an der Gesamtheit der analysierten Zellen der verschiedenen Gruppen in Knochenmark (KM, rot) und Lymphknoten (LK, gelb).

Vergleicht man den Anteil der aberranten Zellen aus pN0 und pN+ Patienten, so sieht man sowohl in HEA-125, als auch bei BerEp4-positiven Zellen einen signifikant höheren Anteil an aberranten Zellen in pN+ Patienten (χ^2 : $p < 0,001$ bzw. $p = 0,0262$; Abbildung 39). Hier ist zu berücksichtigen, dass der pN-Status der Patienten anhand aller (pathologisch) untersuchten Lymphknoten bestimmt wird und nicht immer den Status der in dieser Arbeit untersuchten Lymphknotenhälften entspricht.

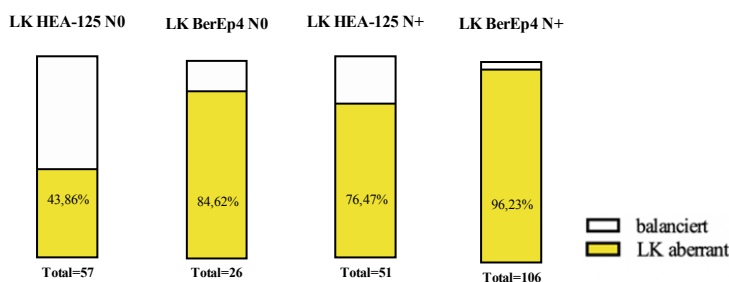


Abbildung 39: Anteil an aberranten Zellen bei N0 und N+ Lymphknoten

Angezeigt werden die prozentualen Anteile der aberranten Zellen an der Gesamtheit der analysierten Zellen im Lymphknoten (LK, gelb) von Patienten ohne (N0) und mit (N+) Lymphknotenmetastasen.

Da der Anteil der aberranten Zellen mit dem pathologischen N-Status zusammenhängen scheint, sollte im nächsten Schritt auch der Zusammenhang mit dem DCCD untersucht werden. Der DCCD ist spezifisch für den untersuchten Lymphknoten und beschreibt die Menge an EpCAM-positiven Zellen (putativen Tumorzellen) je einer Millionen Lymphknotenzellen. Hierfür wurden die Quartile der beobachteten DCCDs der Lymphknoten errechnet (Tabelle 44).

Tabelle 44: DCCD-Werte der Quartile für die HEA-125 und BerEp4 Färbeergebnisse

Perzentile	25. Perzentile	50. Perzentile	75. Perzentile
HEA-125	4	14	10.000
BerEp4	11	423	50.000

Abbildung 40 zeigt den Anteil der aberranten Zellen der jeweiligen Quartile für beide Färbungen im Lymphknoten. Es ist dabei zu beobachten, dass mit steigendem DCCD der Lymphknoten auch der Anteil der aberranten Zellen steigt.

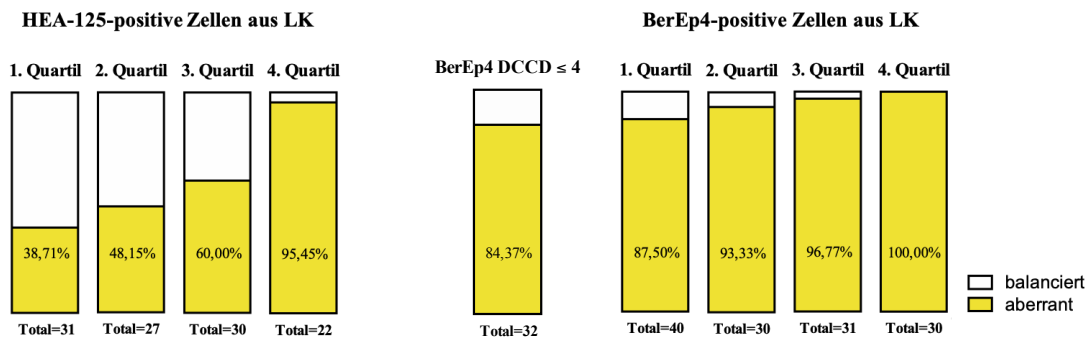


Abbildung 40: Zusammenhang zwischen aberrantem Profil und dem DCCD

Gezeigt ist der Anteil an aberranten EpCAM-positiven Zellen aus dem Lymphknoten (LK) an der Gesamtzahl der untersuchten Zellen mit akzeptablen CNV-Profilen der jeweiligen Quartile (berechnet anhand der Lymphknoten-spezifischen DCCDs) für HEA-125-positive (links) und BerEp4-positive Zellen (rechts). Zusätzlich ist bei für die BerEp4 Färbung der Anteil an aberranten Zellen bei einem Cut-off von DCCD=4 (entspricht der 25. Perzentile bei der HEA-125 Färbung) gezeigt (mittig).

Die EpCAM mRNA Expression v.a. in HD und M0 Lymphknoten höchst signifikant weniger häufig war als im Knochenmark (Abbildung 20+31) und zudem ein signifikanter Überlebensnachteil für Patienten mit aktivierten EpCAM-positiven Zellen (mRNA+) im Lymphknoten oder Knochenmark bestand (Abbildung 32-34), sollte anhand der Genomprofile evaluiert werden, ob der Anteil an aberranten Zellen in der mRNA+ Gruppe höher ist, als in der mRNA- Gruppe. Hierbei zeigte sich im Lymphknoten bei aktivierten EpCAM-positiven Zellen ein signifikant höherer Anteil an aberranten Zellen (χ^2 : $p < 0,001$; Tabelle 45), wohingegen dies bei Knochenmark-Zellen nicht zu beobachten war (Abbildung 41).

Tabelle 45: Analyse der Genomaberrationen in EpCAM mRNA+ und mRNA- Zellen

	<i>KM (HEA-125) (n=31)</i>			<i>LK (HEA-125) (n=108)</i>		
	aberrant	balanciert	p-Wert	aberrant	balanciert	p-Wert
EpCAM mRNA+	13 (41,9%)	10 (32,2%)		39 (36,1%)	11 (10,2%)	
EpCAM mRNA-	3 (9,7%)	5 (16,1%)	0,424	25 (23,1%)	33 (30,6%)	≤ 0,001

Gezeigt werden die Anteile an Knochenmark (KM, links) und Lymphknoten (LK, rechts) Zellen mit positivem (mRNA+) oder negativem (mRNA-) Nachweis des EpCAM-Transkriptes und dem Status des Genomprofils (aberrant oder balanciert). Prozentangaben bezogen jeweils auf die Gesamtanzahl der untersuchten Zellen. Chi-Quadrat Test.

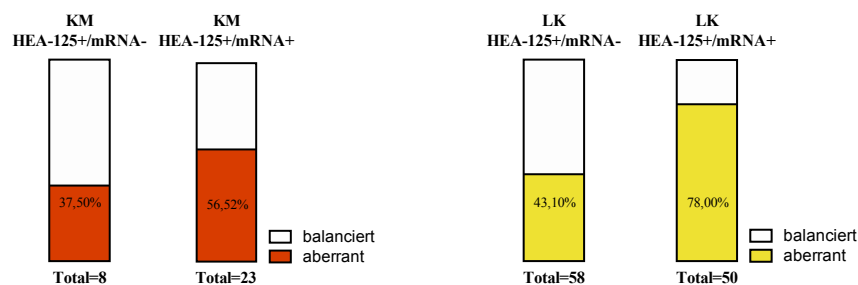


Abbildung 41: Anteil an aberranten Zellen an HEA-125+ und EpCAM mRNA+ und mRNA- Zellen

Angezeigt werden die prozentualen Anteile der aberranten Zellen an der Gesamtheit der analysierten Zellen der EpCAM-Transkript-negativen (mRNA-) und positiven (mRNA+) Gruppen in Knochenmark (KM, rot) und Lymphknoten (LK, gelb).

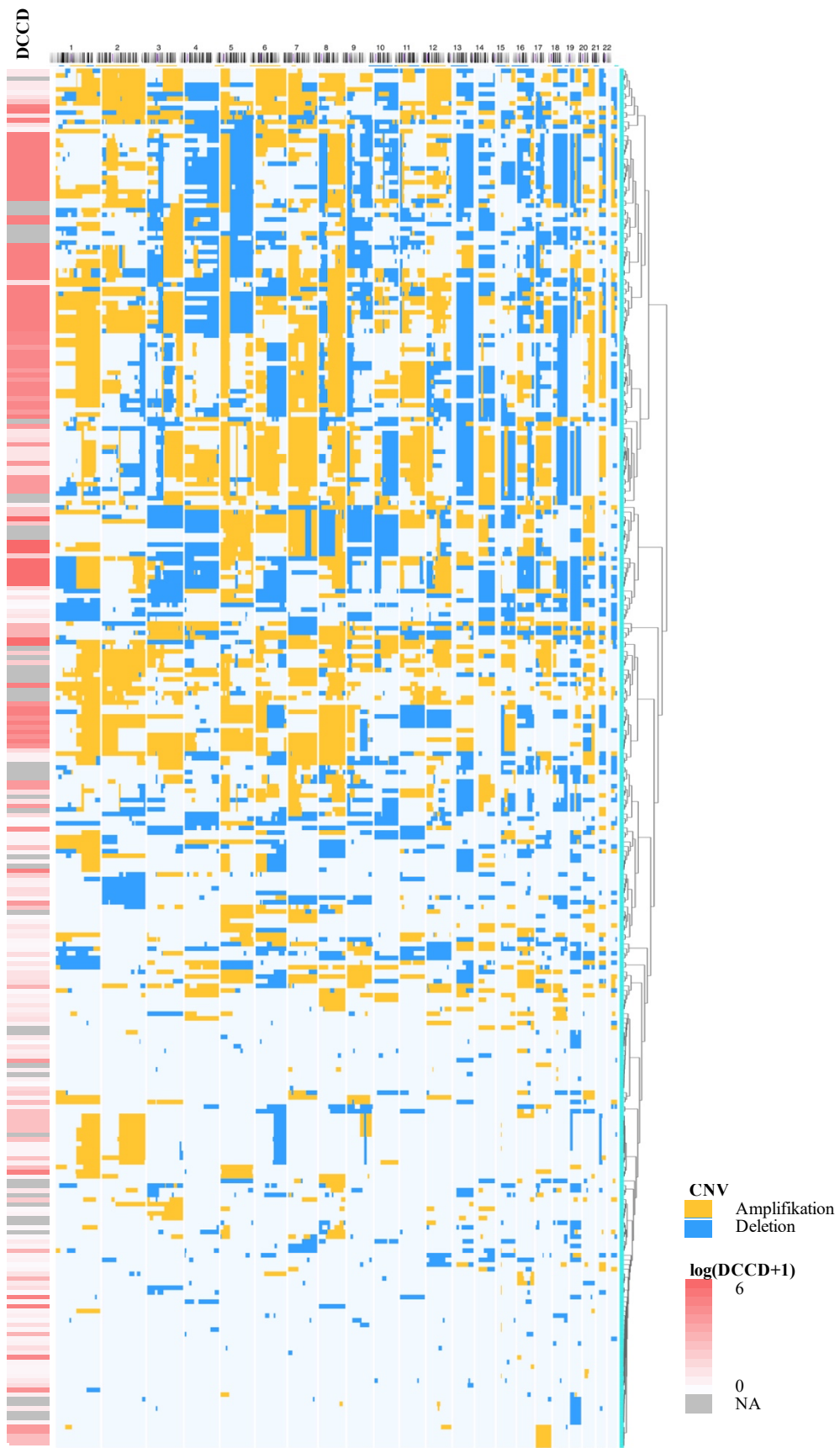


Abbildung 42: Heatmap aller Genomaberrationen der untersuchten Proben

Alle untersuchten Proben mit autosomalen Aberrationen wurden mit der online verfügbaren Software von progenetix.com (Baudis & Cleary, 2001) einer hierarchischen Clusteranalyse unterzogen.

4.4.1 Analyse der Genomaberrationen von Einzelzellen, Primärtumoren und Metastasen

Um genomische Unterschiede zwischen den putativen disseminierten Tumorzellen und dem Primärtumor zu untersuchen wurde DNA von verfügbaren Primärtumoren und Metastasen isoliert und ebenfalls für die Genom-Sequenzierung aufgearbeitet (siehe Kapitel 3.1.6 Aufarbeitung von FFPE Blöcken und Kapitel 3.4.3 Amplifikation von FFPE DNA). Clustert man alle HEA-125, BerEp4 und A45-positiven Zellen zusammen mit den Primärtumoren ($n = 42$) und Metastasen ($n = 6$), so zeigt sich der Trend, dass Zellen von Proben mit einer höheren *disseminated tumor cell density* (DCCD), aberrantere CNV Profile aufweisen (Abbildung 42).

Da bei pN+ Zellen nicht nur eine höhere Rate an aberranten Zellen beobachtet wurde (Abbildung 39), sondern diese auch einen hohen Anteil an Genomalterationen aufzuweisen scheinen (Abbildung 42), sollte nun auch die Anzahl und der Anteil der Alterationen an dem gesamten autosomalen Genom untersucht werden. Dabei zeigten sich zwischen A45 und HEA-125-positiven Zellen im Knochenmark kein signifikanter Unterschied (Abbildung 43+44).

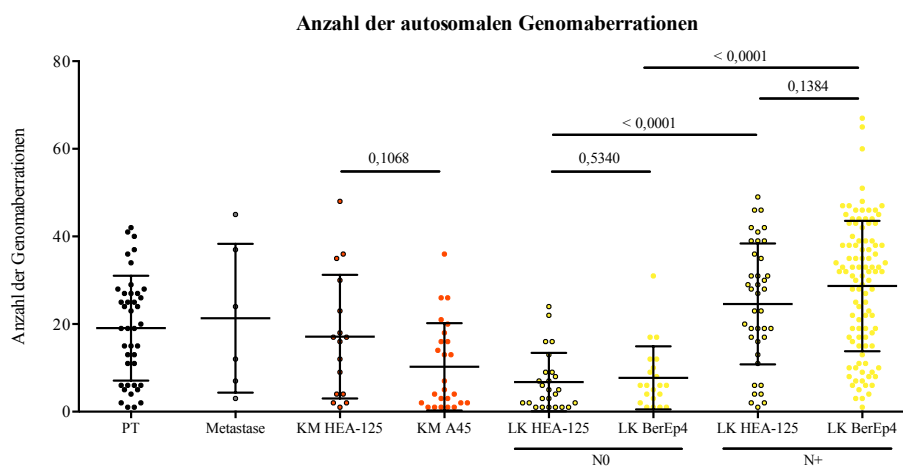


Abbildung 43: Anzahl der autosomalen Genomaberrationen

Abgebildet ist die Anzahl der numerischen Genomaberrationen in den untersuchten Gruppen. Zellen aus dem Lymphknoten (LK) bzw. Knochenmark (KM) sind in gelb bzw. rot dargestellt. HEA-125-positive Zellen sind zudem mit einer schwarzen Umrandung versehen. Die Box-Plots zeigen den Mittelwert mit der Standardabweichung. p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet.

Des Weiteren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen BerEp4 und HEA-125-positiven Zellen von pN0 bzw. pN+ Patienten (Abbildung 43) mit der Ausnahme des prozentualen Anteils an autosomalen Aberrationen bei pN0 Patienten (Abbildung 44). Dort zeigte sich ein signifikant höherer Prozentsatz an Genomaberrationen in BerEp4-positiven Zellen als in HEA-125-positiven Zellen ($p = 0,0458$; Abbildung 44).

Wie erwartet war bei pN+ Zellen sowohl die Anzahl der CNVs als auch der Anteil an Aberrationen an dem Genom höchst signifikant höher als bei den pN0 Zellen ($p < 0,0001$; Abbildung 43+44).

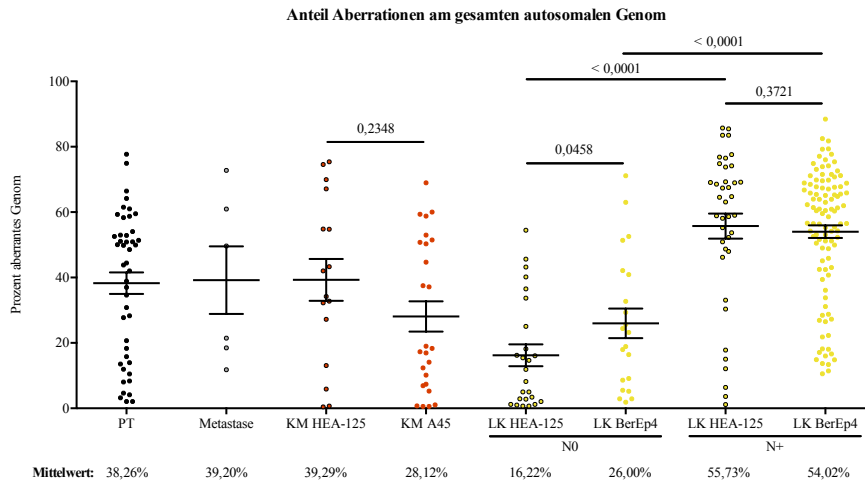


Abbildung 44: Anteil der Aberrationen am gesamten autosomalen Genom

Abgebildet ist Anteil der numerischen Genomaberrationen am gesamten autosomalen Genom der untersuchten Gruppen. Zellen aus dem Lymphknoten (LK) bzw. Knochenmark (KM) sind in gelb bzw. rot dargestellt. HEA-125-positive Zellen sind zudem mit einer schwarzen Umrandung versehen. Die Box-Plots zeigen den Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes. p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet.

Da der DCCD der einzelnen Proben mit dem Anteil an Aberrationen der isolierten Einzelzellen korrelierte (Abbildung 42), sollte neben dem N-Status auch der Zusammenhang des Lymphknoten-spezifischen DCCDs mit der Anzahl und dem Ausmaß der Aberrationen (Prozent aberrantes Genom) der Zellen aus dem Lymphknoten untersucht werden. Hierbei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen steigendem DCCD und zunehmender Anzahl an CNVs bzw. Anteil an autosomalen Aberrationen des Einzelzell-Genoms (Abbildung 45).

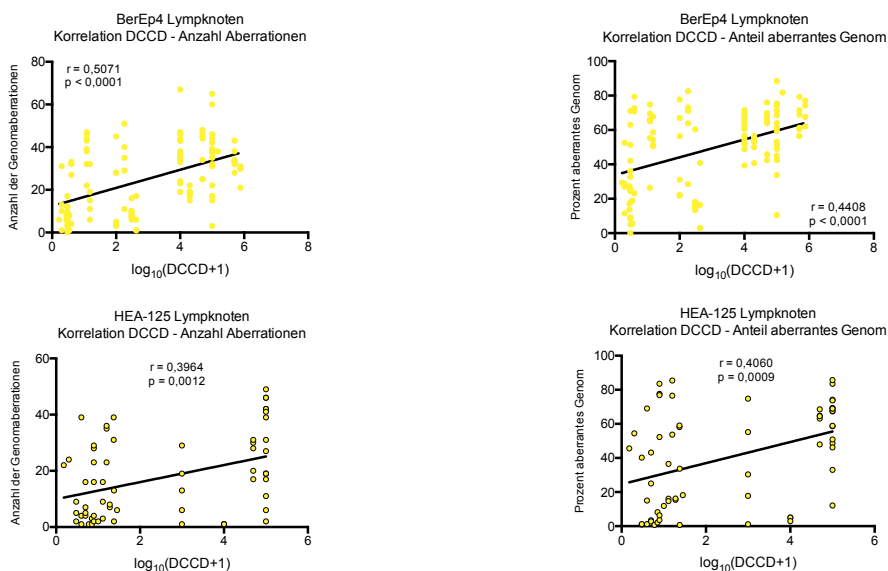


Abbildung 45: Korrelation von Aberrationen und DCCD im Lymphknoten

Die Abbildung zeigt die Korrelation der log-transformierten *disseminated cancer cell density* (DCCD) mit der Anzahl an detektierten Aberrationen (links) bzw. mit dem Anteil der Aberrationen am autosomalen Genom (rechts) für die BerEp4 Färbung (gelb, obere Reihe) und die HEA-125 Färbung im Lymphknoten (gelb mit schwarzem Rand, untere Reihe). Angegeben ist der Korrelationskoeffizient Pearson r und Signifikanzniveau p.

4.4.1.1 Analyse der kumulativen Genomprofile der isolierten Einzelzellen

Sowohl die Analyse der Genomprofile, als auch die transkriptomische Untersuchung der Einzelzellen brachten klare Assoziationen zu dem Überleben der Patienten. Der zusätzliche Vergleich mit den verfügbaren Primärtumoren und Metastasen zeigte, dass die Mehrheit dieser Zellen weniger als 50% der Aberrationen des Primärtumors aufwies und somit zwar Ähnlichkeiten, aber dennoch erhebliche Unterschiede mit bzw. zu dem initialen Tumor vorliegen. Um die genetischen Unterschiede zwischen den isolierten EpCAM-positiven Zellen und zudem zwischen den einzelnen Zellgruppen zu untersuchen, wurden kumulative CNV-Profile der verschiedenen Zellgruppen (BerEp4 und HEA-125-positiv Zellen für jeweils N0 und N+ Patienten, HEA-125 und A45-positiv Zellen im Knochenmark, A45-positiv Zellen im LK, Primärtumoren) mit Progenetix [www.progenetix.org (Baudis & Cleary, 2001)] erstellt. Die dabei entstandenen Häufigkeitsdiagramme zeigen die Anzahl der jeweiligen Genomaberrationen in der untersuchten Gruppe an Proben.

Abbildungen 46 und 47 zeigen die Häufigkeitsdiagramme der CNVs von HEA-125 und BerEp4-positiven Zellen aus dem Lymphknoten von pN0 NSCLC Patienten. Es konnten in beiden Gruppen nur wenige wiederkehrende Aberrationen festgestellt werden. Die vergleichende Analyse der CNVs ergab keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit der einzelnen Alterationen zwischen den beiden Gruppen (q-Wert > 0,10).

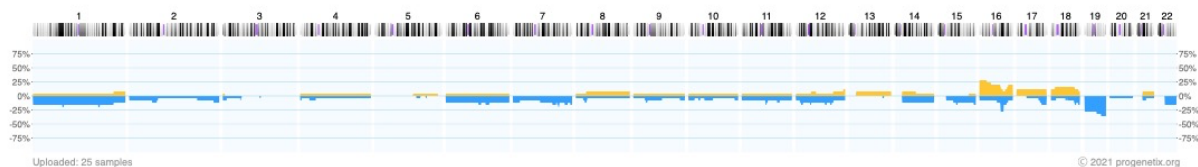


Abbildung 46: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten N0 LK (HEA-125) Proben

Die Grafik zeigt die Häufigkeiten (%) von *copy number variations* (CNV) für die Chromosomen 1 bis 22 in dem untersuchten Probenkollektiv. Amplifikationen sind in Gelb dargestellt, während Deletionen blau markiert sind.

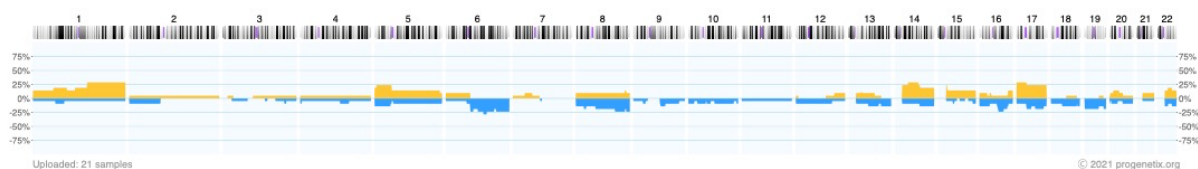


Abbildung 47: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten N0 LK (BerEp4) Proben

Die Grafik zeigt die Häufigkeiten (%) von *copy number variations* (CNV) für die Chromosomen 1 bis 22 in dem untersuchten Probenkollektiv. Amplifikationen sind in Gelb dargestellt, während Deletionen blau markiert sind.

Im Vergleich zu den Zellen aus pN0 Lymphknoten wiesen die Zellen von pN+ Lymphknoten einen deutlich höheren Anteil an CNVs auf. Die kumulativen Profile der HEA-125 und BerEp4-positiven Zellen zeigen fast identische Profile und Häufigkeiten der Alterationen (Abbildung

48+49). Lediglich drei kleine Amplifikationen in Chromosom 1 von jeweils 500 - 1500 Kilobasen waren signifikant häufiger in HEA-125-positiven Zellen von pN+ Lymphknoten nachweisbar (q -Wert $< 0,1$). Die signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen wurden ähnlich den kumulativen CNV-Profilen grafisch dargestellt (Abbildung 50), jedoch gibt die y-Achse die Signifikanz [Deletion: $-1+(10*q\text{-Wert})$, Amplifikation: $1-(10*q\text{-Wert})$] an. Je höher die Amplitude des Profils, desto kleiner (signifikanter) ist der dazugehörige q -Wert.

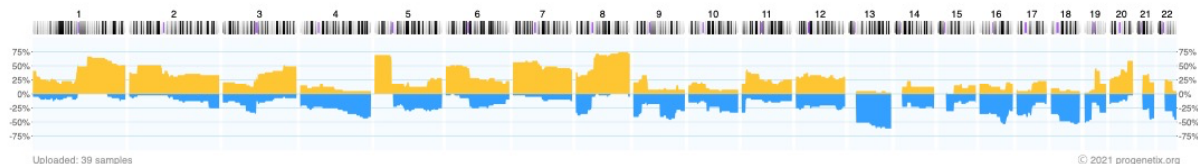


Abbildung 48: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten N+ LK (HEA-125) Proben

Die Grafik zeigt die Häufigkeiten (%) von *copy number variations* (CNV) für die Chromosomen 1 bis 22 in dem untersuchten Probenkollektiv. Amplifikationen sind in Gelb dargestellt, während Deletionen blau markiert sind.

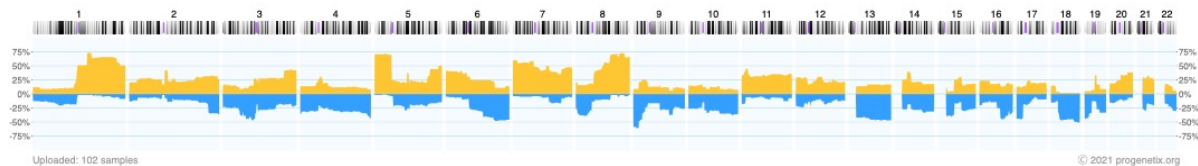


Abbildung 49: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten N+ LK (BerEp4) Proben

Die Grafik zeigt die Häufigkeiten (%) von *copy number variations* (CNV) für die Chromosomen 1 bis 22 in dem untersuchten Probenkollektiv. Amplifikationen sind in Gelb dargestellt, während Deletionen blau markiert sind.

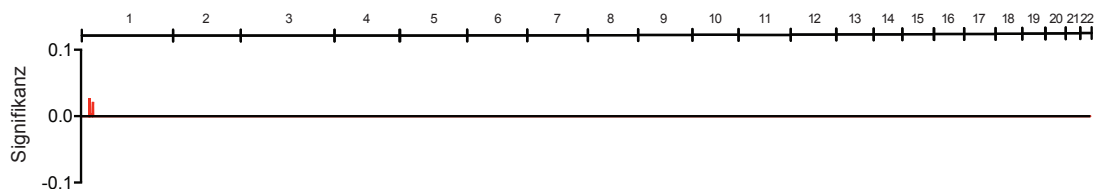


Abbildung 50: Unterschiede von CNVs bei HEA-125 und BerEp4-positiven Zellen von pN+ Patienten

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mit einem exakten Fisher-Test und der Falscherkennungsrate zur Korrektur bei multiplen Testungen berechnet ($q < 0,10$) und grafisch aufgetragen. Amplifikationen sind in rot und Deletionen in blau dargestellt.

Die untersuchten HEA-125 und A45-positiven Einzelzellen aus dem Knochenmark zeigten ähnlich den pN0 Zellen eine geringe Last an CNVs (Abbildung 51+52), wobei HEA-125-positiv Zellen tendenziell häufiger gemeinsame Aberrationen aufwiesen (z.B. Deletion in Chromosom 19 bei bis zu 75% der Proben) (Abbildung 51). Signifikante Unterschiede zeigten sich für kleine Deletionen auf Chromosom 12, 15 und 19, die signifikant häufiger in HEA-125 als in A45-positiven Zellen auftraten (Abbildung 53).

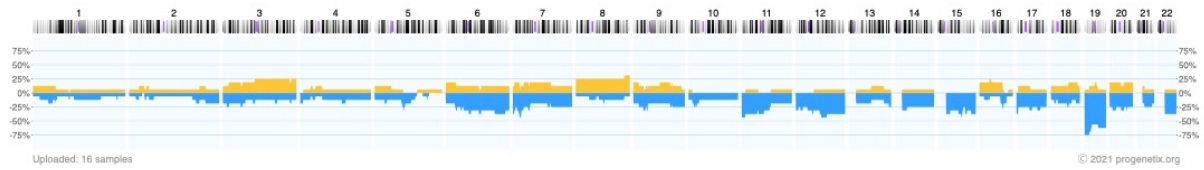


Abbildung 51: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten KM (HEA-125) Proben

Die Grafik zeigt die Häufigkeiten (%) von *copy number variations* (CNV) für die Chromosomen 1 bis 22 in dem untersuchten Probenkollektiv. Amplifikationen sind in Gelb dargestellt, während Deletionen blau markiert sind.

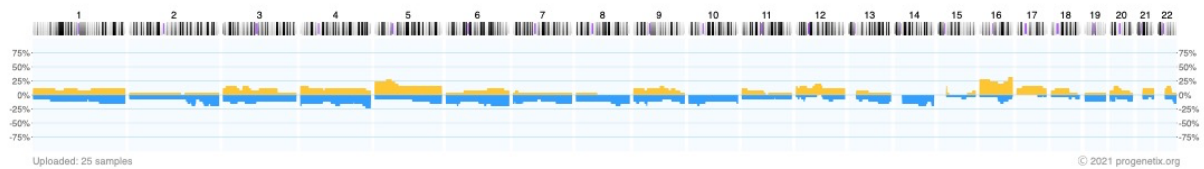


Abbildung 52: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten KM (A45) Proben

Die Grafik zeigt die Häufigkeiten (%) von *copy number variations* (CNV) für die Chromosomen 1 bis 22 in dem untersuchten Probenkollektiv. Amplifikationen sind in Gelb dargestellt, während Deletionen blau markiert sind.

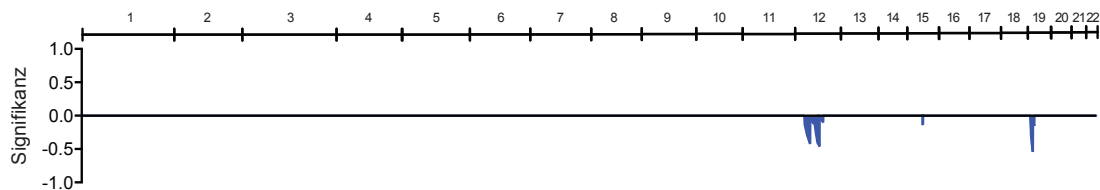


Abbildung 53: Unterschiede von CNVs bei HEA-125 und A45-positiven Zellen im KM

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mit einem exakten Fisher-Test und der Falscherkennungsrate zur Korrektur bei multiplen Testungen berechnet ($q < 0,10$) und grafisch aufgetragen. Amplifikationen sind in rot und Deletionen in blau dargestellt.

Vergleicht man die HEA-125 bzw. BerEp4-positiven Zellen aus dem Lymphknoten nach dem pathologischen N-Status (pN0 versus pN+), so zeigen sich sowohl bei HEA-125 (Abbildung 54), als auch bei BerEp4-positiven Zellen (Abbildung 55) signifikante Unterschiede der Alterationen in großen Anteilen des Genoms. Dies bestätigt die oben beschriebenen Ergebnisse, in der Zellen von pN+ Patienten höchst signifikant mehr Aberrationen und höhere Anteile an aberrantem Genom aufweisen, als Zellen von pN0 Patienten (Abbildung 43+44).

Auffällig ist, dass vor allem Amplifikationen signifikant häufiger in den pN+ Lymphknoten Zellen aufzufinden sind im Vergleich zu pN0 Zellen. Dies ist dadurch zu erklären, dass Zellen aus pN0 Lymphknoten überwiegend Deletionen (und weniger Amplifikationen) aufweisen (Abbildung 46+47).

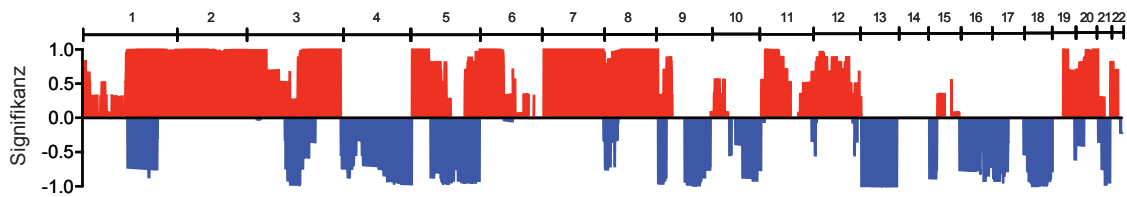


Abbildung 54: Unterschiede von CNVs bei HEA-125-positiven Zellen von pN0 und pN+ LK

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mit einem exakten Fisher-Test und der Falscherkennungsrate zur Korrektur bei multiplen Testungen berechnet ($q < 0,10$) und grafisch aufgetragen. Amplifikationen sind in rot und Deletionen in blau dargestellt.

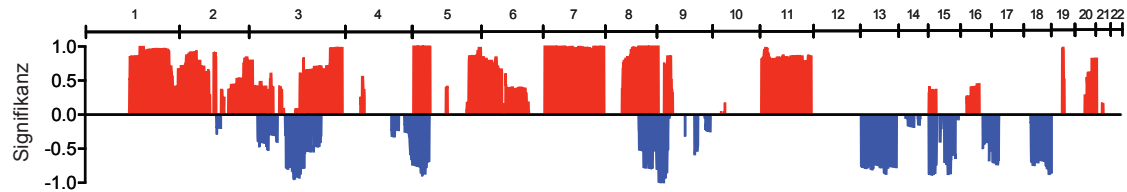


Abbildung 55: Unterschiede von CNVs bei BerEp4-positiven Zellen von pN0 und pN+ LK

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mit einem exakten Fisher-Test und der Falscherkennungsrate zur Korrektur bei multiplen Testungen berechnet ($q < 0,10$) und grafisch aufgetragen. Amplifikationen sind in rot und Deletionen in blau dargestellt.

4.4.1.2 Evaluation der Zytokeratin-Färbung zum Nachweis von DTCs in Lymphknoten

In einem Pilotprojekt (maßgeblich durchgeführt von Julia Greindl-Junghans) konnten von zwei Patienten mit hoher Anzahl an nachgewiesenen BerEp4-positiven Zellen (hoher DCCD) asservierte Haftobjektträger für eine vergleichende A45-Färbung im Lymphknoten aufgearbeitet werden. In dieser Studie werden DTCs aus Lymphknoten ausschließlich mit EpCAM-Antikörpern nachgewiesen, da zum Beispiel Retikulumzellen in (nicht-malignen) Lymphknoten Zytokeratin-positiv sein können (Doglioni et al., 1990). Anhand dieser beiden Patienten sollte zusätzlich die Zytokeratin (A45)-Färbung zum Nachweis von DTCs in Lymphknoten untersucht werden. Dabei zeigten sich ähnlich hohe Anteile an aberranten Zellen zwischen der HEA-125 (9/11), BerEp4 (10/10) und A45-Färbung (20/21) (Abbildung 56).

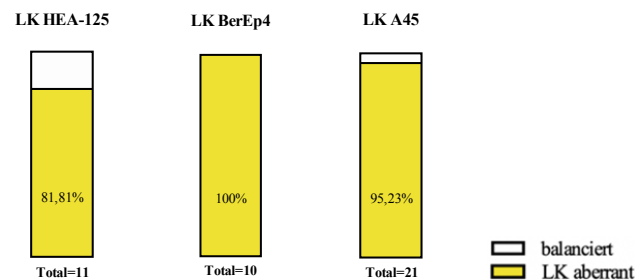


Abbildung 56: Vergleich von HEA-125, BerEp4 und A45 in Lymphknoten von 2 ausgewählten Patienten
Angezeigt werden die prozentualen Anteile der aberranten Zellen an der Gesamtheit der analysierten HEA-125, BerEp4 und A45-positiven Zellen aus Lymphknoten (LK) von zwei NSCLC Patienten.

Die kumulativen Genomprofile der EpCAM-positiven (n = 19) und A45-positiven Zellen (n = 20) (Abbildung 57) waren nahezu identisch und es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden.

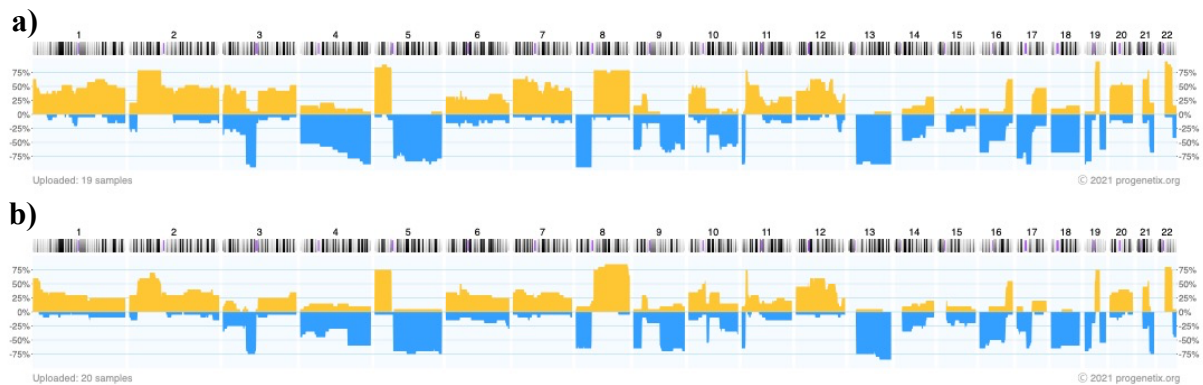


Abbildung 57: Kumulative CNV-Profile von zwei Patienten mit EpCAM und A45-positiven LK Zellen
Abbildungen zeigen die kumulativen CNV-Profile von a) EpCAM (HEA-125 + BerEp4) und b) A45-positiven Zellen aus den Lymphknoten von zwei NSCLC Patienten.

4.4.1.3 Vergleichende Analyse der Genomaberrationen von Einzelzellen und Primärtumoren bzw. Metastasen

Da auch bei einigen der untersuchten Patienten (42 Tumorareale von n = 34 Patienten) der Primärtumor zur Genomanalyse zur Verfügung stand, sollte in der weiteren Auswertung der CNV-Profile die (genomische) Ähnlichkeit der CK bzw. EpCAM-positiven Zellen mit dem initialen Tumor untersucht werden. Hierfür wurden in den Einzelzellen lediglich jene Genomabschnitte analysiert, die in dem Primärtumor als aberrant klassifiziert wurden. Abbildung 58 zeigt, wie viel Prozent des aberranten autosomalen Genoms des Primärtumors ebenfalls in den einzelnen Zellen aberrant waren.

Während Zellen aus pN0 Lymphknoten im Durchschnitt nur 13 bzw. 21 % des aberranten PT-Genoms aufwiesen ($p = 0,7358$; Abbildung 58), so war dieser Anteil in Zellen aus pN+ Zellen mit 41% und 61% hoch bzw. höchst signifikant höher ($p = 0,0066$ bzw. $p < 0,0001$; Abbildung 58). A45 bzw. HEA-125-positive Zellen aus dem Knochenmark wiesen jeweils 22% und 17% der PT-Aberrationen auf ($p = 0,8796$; Abbildung 58).

Überraschenderweise war der Anteil an gemeinsamen Aberrationen auch in Metastasen (n = 4) nur bei einem Mittelwert von 54% mit einer breiten Reichweite (Minimum: 15,20%; Maximum: 100,00%; Abbildung 58).

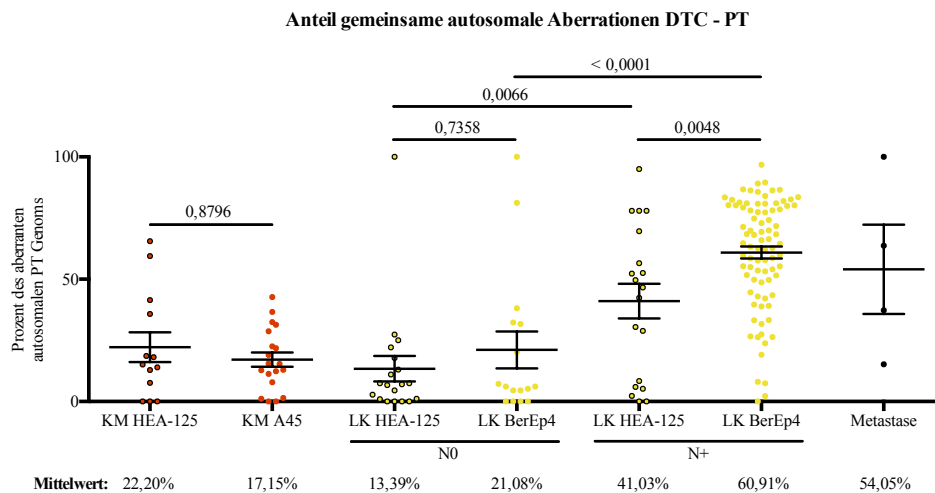


Abbildung 58: Anteil der gemeinsamen aberranten autosomalen Genomabschnitte von DTCs und PTs

Abgebildet sind die gemeinsamen Anteile des aberranten Genoms der Proben mit dem dazugehörigen Primärtumor. Zellen aus dem Lymphknoten (LK) bzw. Knochenmark (KM) sind in gelb bzw. rot dargestellt. HEA-125-positive Zellen sind zudem mit einer schwarzen Umrandung versehen. Die Box-Plots zeigen den Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes. p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-Test berechnet.

Anschließend wurden die Einzelzellen anhand des Anteils an gemeinsamen Genomaberrationen (Tabelle 46) in Gruppen von i) keine gemeinsamen Aberrationen, ii) bis zu 50% gemeinsames aberrantes Genom und iii) mehr als 50% gemeinsame Aberrationen mit dem Primärtumor in drei Gruppen eingeteilt. Abbildung 59 zeigt beispielhaft das CNV-Profil einer DTC mit mehr als 50% bzw. weniger als 50% gemeinsamen autosomalen Aberrationen und das Profil des jeweiligen Primärtumors.

Insgesamt zeigt sich, dass sich die Mehrheit aller Zellen in der Gruppe „zwischen 0% und 50% gemeinsamen aberranten Genom“ befindet. Nur bei Zellen von Patienten mit lymphogener Metastasierung (N+) zeigte sich ein überwiegender Anteil an Zellen mit > 50% gemeinsamen autosomalen Aberrationen mit dem Primärtumor. Dieser Unterschied für HEA-125 und BerEp4-positive Zellen aus pN+ Lymphknoten war im Vergleich zu den N0 Patienten signifikant bzw. höchst signifikant (Chi2-Test: $p = 0,044$ bzw. $p = 0,0013$; Tabelle 46).

Tabelle 46: Prozent der autosomalen Aberration des autosomalen Genoms von DTCs

Gruppe	Gemeinsame autosomale Aberrationen mit PT		
	0%	zwischen 0% und 50%	50% oder mehr
KM HEA-125	3/13 (23,1%)	8/13 (61,5%)	2/13 (15,4%)
KM A45	2/19 (10,5%)	17/19 (89,5%)	0/19 (0%)
LK HEA-125 N0	4/22 (18,1%)	15/22 (68,2%)	3/22 (13,6%)
LK BerEp4 N0	4/19 (21,1%)	10/19 (52,6%)	5/19 (26,3%)
LK HEA-125 N+	2/16 (12,5%)	7/16 (43,8%)	7/16 (43,8%)
LK BerEp4 N+	1/82 (1,2%)	20/82 (24,4%)	61/82 (74,4%)

KM: Knochenmark, LK: Lymphknoten.

Um genetische bzw. genomische Charakteristika von frühen disseminierten Tumorzellen genauer zu analysieren, sollten die Genomprofile von vorhandenen Primärtumoren (n=42 von 34 NSCLC Patienten) mit den isolierten Einzelzellen verglichen werden. Abbildung 60 zeigt das kumulative CNV-Profil der Primärtumor-Areale.

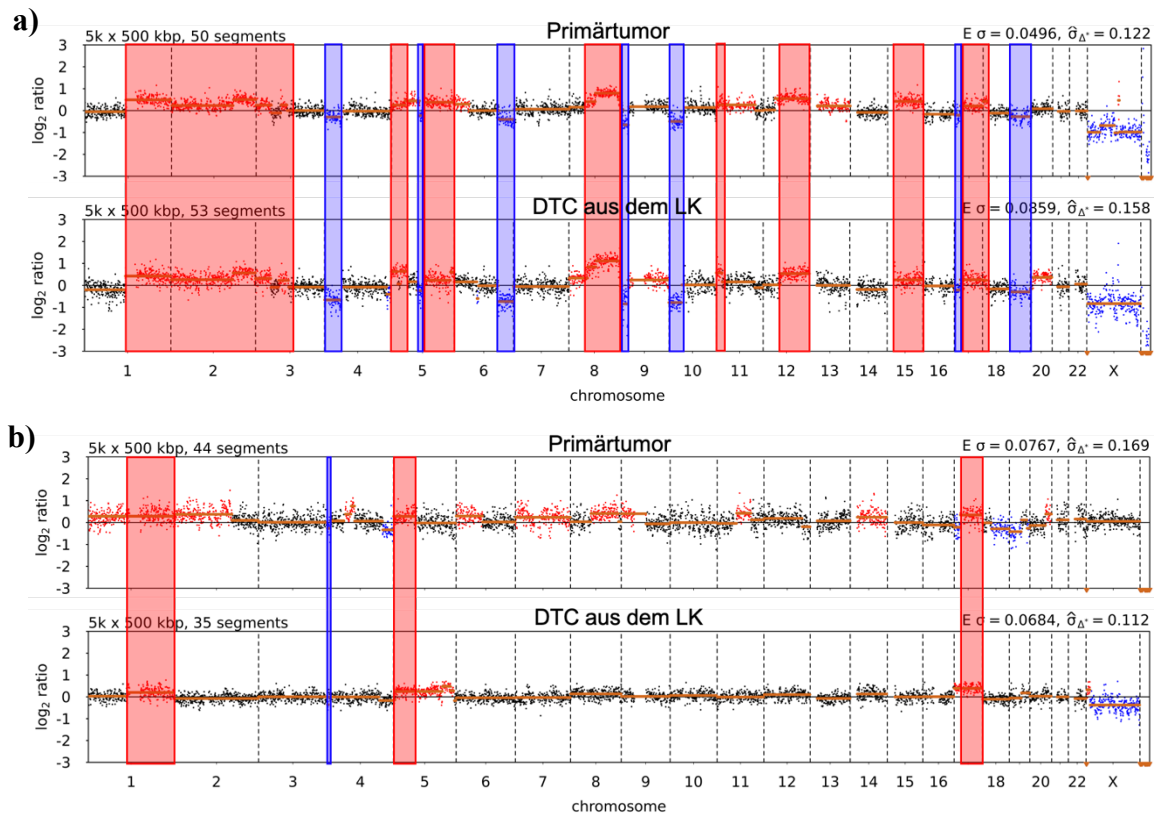


Abbildung 59: Zwei Beispiele von gemeinsamen Aberrationen zwischen Primärtumor und DTC
Gezeigt sind beispielhaft die CNV-Profile von Primärtumor (jeweils oben) und einer DTC aus dem Lymphknoten (LK; jeweils unten) mit a) hohem an gemeinsamen autosomalen Aberrationen (> 50% der Primärtumor-Aberrationen) und b) niedrigem Anteil (< 50%). Amplifikationen sind in rot markiert, Deletionen in blau.

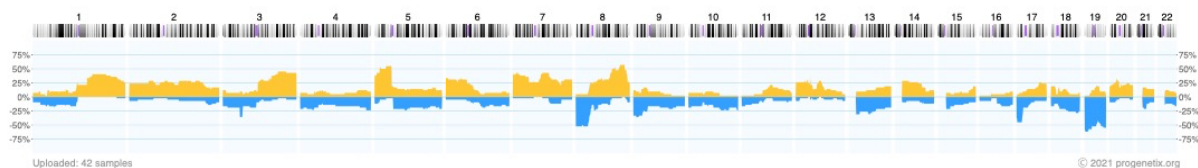


Abbildung 60: Kumulatives CNV-Profil der untersuchten PT Proben
Die Grafik zeigt die Häufigkeiten (%) von copy number variations (CNV) für die Chromosomen 1 bis 22 in dem untersuchten Probenkollektiv. Amplifikationen sind in Gelb dargestellt, während Deletionen blau markiert sind.

Vergleicht man das kombinierte Genomprofil der Primärtumoren mit den Zellen aus dem Lymphknoten, so zeigen sich sowohl für HEA-125, als auch für die BerEp4-positiven Zellen ähnliche Unterschiede (Abbildung 61+62). Insgesamt zeigen sich in den Einzelzellen aus pN+ Lymphknoten Genom-weit signifikant häufiger Amplifikationen als in den untersuchten Primärtumoren (Abbildung 61+62).

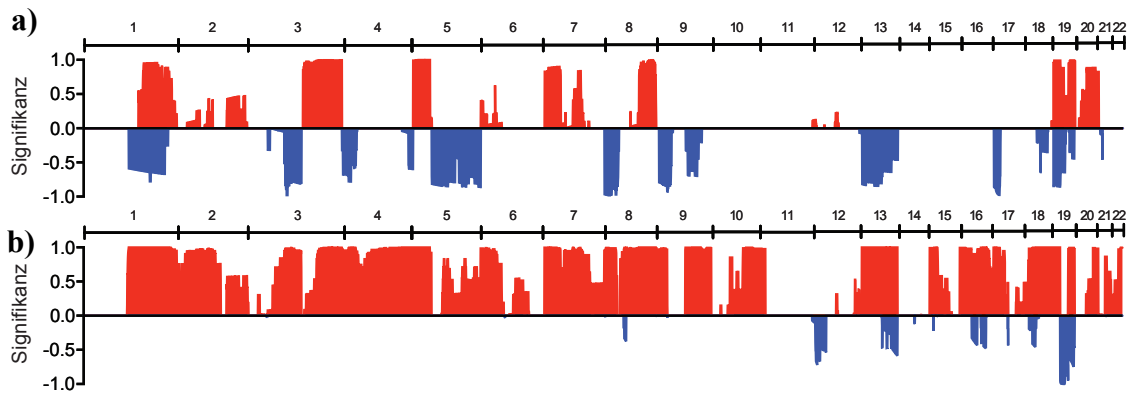


Abbildung 61: Unterschiede von CNVs von PT und HEA-125-positiven Zellen aus dem LK

Signifikante Unterschiede zwischen dem Primärtumor und HEA-125-positiven Zellen aus dem Lymphknoten von a) N0 und b) N+ Patienten wurden mit einem exakten Fisher-Test und der Falscherkennungsrate zur Korrektur bei multiplen Testungen berechnet ($q < 0,10$) und grafisch aufgetragen. Amplifikationen sind in rot und Deletionen in blau dargestellt.

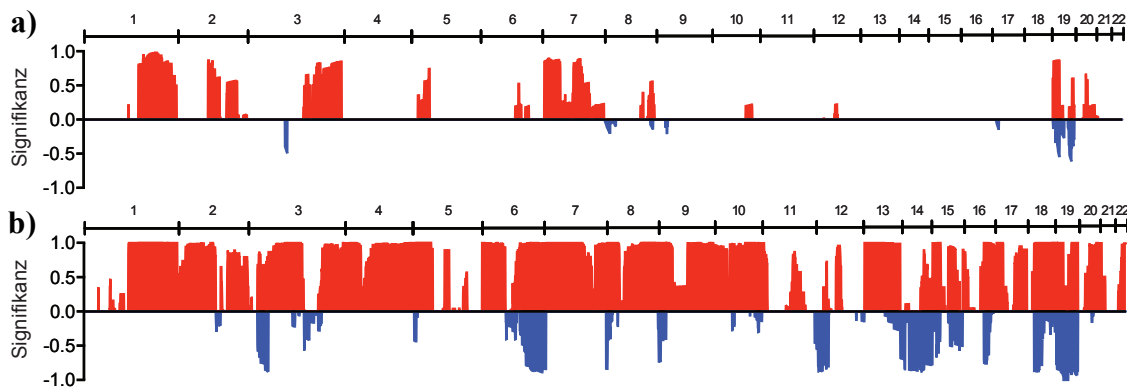


Abbildung 62: Unterschiede von CNVs von PT und BerEp4-positiven Zellen aus dem LK

Signifikante Unterschiede zwischen dem Primärtumor und BerEp4-positiven Zellen aus dem Lymphknoten von a) N0 und b) N+ Patienten wurden mit einem exakten Fisher-Test und der Falscherkennungsrate zur Korrektur bei multiplen Testungen berechnet ($q < 0,10$) und grafisch aufgetragen. Amplifikationen sind in rot und Deletionen in blau dargestellt.

A45-positive Zellen aus dem Knochenmark weisen in dem kumulativen CNV-Profil weniger häufig wiederkehrende Aberrationen auf als HEA-125-positive Zellen (Abbildung 51+52). Vermutlich aus diesem Grund lassen sich auch mehr signifikante Unterschiede zwischen Primärtumoren und A45-positiven Zellen im Knochenmark finden, als bei HEA-125-positiven Zellen. Dort zeigen sich nur wenige Deletionen (Chromosom 7, 8, 12, 14, 20) und eine Amplifikation auf Chromosom 1 mit signifikant unterschiedlicher Anzahl (Abbildung 63).

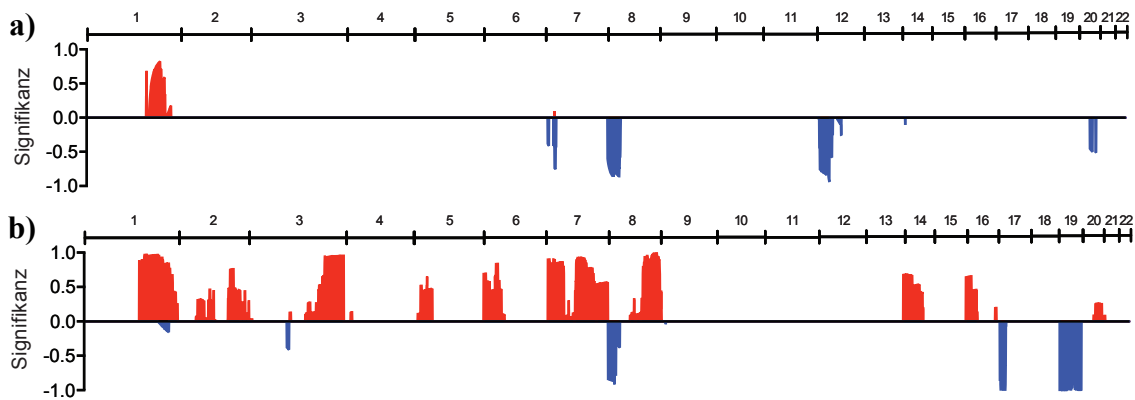


Abbildung 63: Unterschiede von CNVs zwischen PT und HEA-125 und A45-positiven Zellen aus KM

Signifikante Unterschiede zwischen dem Primärtumor und a) HEA-125 oder b) A45-positiven Zellen aus dem Knochenmark wurden mit einem exakten Fisher-Test und der Falscherkennungsrate zur Korrektur bei multiplen Testungen berechnet ($q < 0,10$) und grafisch aufgetragen. Amplifikationen sind in rot und Deletionen in blau dargestellt.

Bei vier Patienten konnte sowohl der Primärtumor als auch eine metastatische Läsion sequenziert werden. Vergleicht man die Anteile des aberranten Genoms des Primärtumors bzw. der Metastasen, die ebenfalls in den DTCs nachgewiesen werden konnten, so zeigt sich in drei der vier Patienten, dass die DTCs tendenziell mehr Gemeinsamkeiten mit der Metastase aufweisen als mit dem Primärtumor (Abbildung 64). Zum Beispiel bei Patient #4 zeigt sich, dass die isolierten Einzelzellen über 30% des aberranten Genoms der Metastasen aufweisen, wohingegen nur 0-11% des aberranten Genoms des Primärtumors in den DTCs gefunden wurde. Bei dem einzigen Patienten, bei dem dieser Trend nicht zu beobachten war (Patient #1), wiesen die DTCs insgesamt sehr hohe Gemeinsamkeiten mit dem PT und der Metastase auf (80-100%; Abbildung 64).

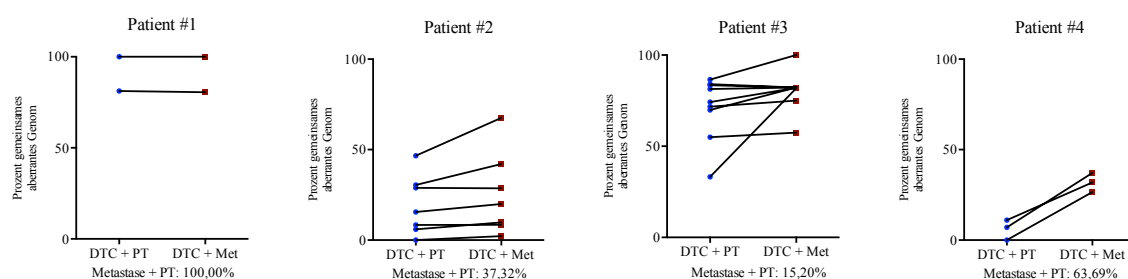


Abbildung 64: Vergleich der CNVs von DTCs mit dem Primärtumor und Metastasen

Diagramme zeigen den Anteil an gemeinsamen Aberrationen zwischen DTCs und dem jeweiligen Primärtumor (PT, blau) und Metastase (Met, braun) von vier Patienten. Jeweils unter dem Graphen ist der Anteil gemeinsamer autosomaler Aberrationen zwischen Primärtumor und Metastase angegeben.

4.4.2 Analyse von Primärtumoren mit und ohne Nachweis systemischer Streuung

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass anhand von genomischen Charakteristika wie zum Beispiel der Verlust von 4q21.23-22.1, eine prognostische Aussage in Bezug auf eine frühe hämatogene Disseminierung bei NSCLC Patienten und folglich einem reduzierten OS und PFS möglich ist (Uzunoglu et al., 2014).

In diesem Kollektiv sollten nun die Genomprofile der Primärtumoren mit Nachweis von HEA-125/BerEp4/A45-positiven Zellen (Abbildung 65a) mit denjenigen Tumoren verglichen werden, bei denen weder HEA-125/BerEp4 noch A45-positive Zellen nachgewiesen werden konnten (Abbildung 65b). Diese Patienten war allesamt pN0 und M0 (n=10).

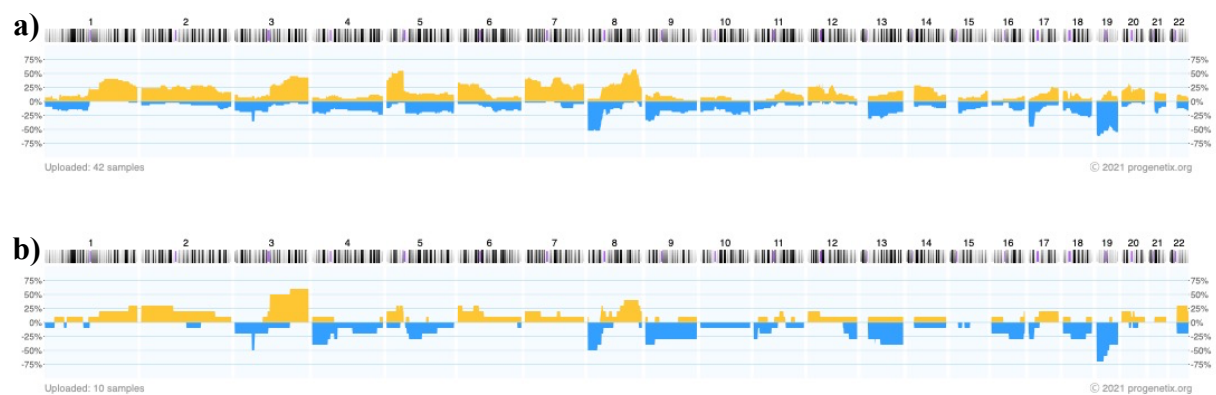


Abbildung 65: Kumulative CNV-Profil von PT mit und ohne Nachweis einer systemischen Disseminierung
Abbildungen zeigen die kumulativen CNV-Profile der Tumoreareale aus Primärtumoren a) mit Nachweis von MRD und b) ohne Nachweis von MRD im Knochenmark oder Lymphknoten.

Bei dem Vergleich von Amplifikationen oder Deletionen des Tumorgenoms zwischen Primärtumoren mit nachweisbarer Streuung von Tumorzellen (MRD-positiv) und ohne Zeichen von Tumorzell-Disseminierung (Lymphknoten und Knochenmark negativ für EpCAM oder Zytokeratin-positive Zellen) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (q-Wert > 0,1).

4.4.3 Genetischen Charakterisierung der isolierten Einzelzellen mittels RNA-Seq

Nachdem der Nachweis von HEA-125/BerEp4-positiven Zellen sowohl aus dem Lymphknoten, als auch aus dem Knochenmark mit einer signifikanten Reduktion des Überlebens der Patienten einhergeht (Abbildung 10+13) und in 51% bis zu 93% der Fälle ein aberrantes CNV-Profil aufweisen (Abbildung 38), sollten diese Zellen nun weitergehend (genetisch) charakterisiert werden. Die Untersuchung einzelner Gene auf mRNA Ebene (z.B. EpCAM) zeigte bereits eine gute Assoziation zu den klinischen Überlebensdaten (Abbildung 32-34). Aus diesem Grund sollte das Genexpressionsprofil der Zellen weitergehend evaluiert

werden. Dazu wurden die amplifizierten Einzelzell-Transkriptome für *next generation sequencing* (NGS) aufgearbeitet.

Insgesamt 436 der isolierten HEA-125-positiven Zellen von NSCLC und HD Patienten zeigten eine ausreichende Qualität der WTA (mindestens eine von drei Banden in der WTA-QC, siehe Kapitel 3.5 PCR Qualitätskontrolle der Genom- und Transkriptom-Amplifikate). Davon konnten 242 (55,5%) Zellen erfolgreich für RNA-Seq aufgearbeitet und sequenziert werden (siehe Kapitel 3.13.1 Aufarbeitung des Transkriptoms für RNA-Seq). Nach einer strikten Qualitätskontrolle und Ausschluss von Outliern verblieben 225 (51,6%) der Zellen für weitere Analysen (siehe Kapitel 3.15.1 Auswertung der RNA-Seq Daten).

Eine Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq Ergebnisse zeigte anhand der Genexpression eine deutliche Trennung der untersuchten Zellen in 5 Gruppen mit einem distinkten Expressionsprofil (Abbildung 66).

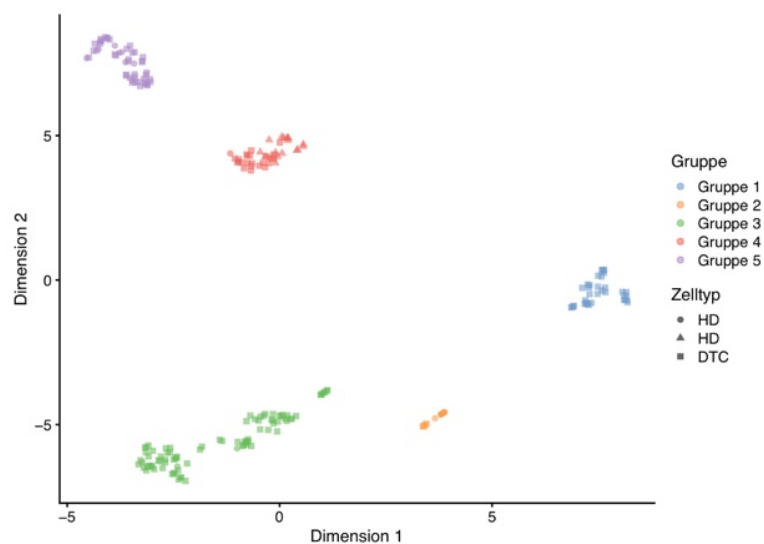


Abbildung 66: Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq Proben

Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq Daten zeigt fünf distinkte Gruppen. HD: Zelle aus gesundem Kontrollpatient, DTC: Zelle aus NSCLC Patient.

Während Gruppen 1-3 zu 100% aus Zellen aus dem Lymphknoten bestehen, clusterten in den beiden Gruppen 4 und 5 prädominant Knochenmarkszellen mit jeweils 95,34% und 69,38% (Abbildung 67).

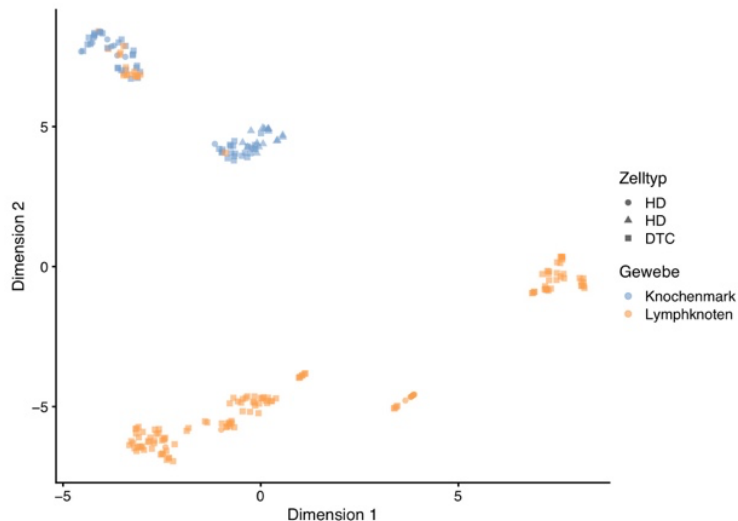


Abbildung 67: Unterscheidung von Knochenmark und Lymphknoten Zellen anhand von RNA-Seq

Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq Daten mit Hervorhebung des Ursprungs aus Lymphknoten (orange) und Knochenmark (blau). HD: Zelle aus gesundem Kontrollpatient, DTC: Zelle aus NSCLC Patient.

Bei der genaueren Analyse der Zellarten in den 5 RNA-Seq Gruppen zeigte sich, dass 35 der 36 Zellen in Gruppe 1 aus Patienten mit lymphogener Streuung (N+) isoliert wurden und nur 1 Zelle von einem N0 Patienten stammte, wohingegen die Mehrheit der Zellen aus Gruppe 3 (59/86) von N0 Patienten stammen. Die Kontrollzellen aus Lymphknoten von Nicht-Tumorpatienten machten den Großteil (8/12) der Gruppe 2 aus (Tabelle 47).

Bei Gruppe 4 handelte es sich präferentiell um Knochenmarkszellen mit einem Großteil aller HD Zellen aus dem Knochenmark (18/25). Gruppe 5 zeigte die größte Heterogenität mit einigen Knochenmark Kontrollzellen (7/49), und HEA-125-positiven Zellen aus sowohl KM (27/49) und LK (15/49) (Tabelle 47). Auffällig in Gruppe 5 ist, dass 18 der 29 eingeschlossenen M1 Zellen - unabhängig von der Herkunft aus LK oder KM - in dieser Gruppe clusterten.

Tabelle 47: Anteil von DTCs und HD Zellen in den 5 RNA-Seq Gruppen

<i>Gruppe</i>	<i>LK NSCLC</i>	<i>KM NSCLC</i>	<i>LK HD</i>	<i>KM HD</i>
Gruppe 1	36/36 (100%)	0/36 (0%)	0/36 (0%)	0/36 (0%)
Gruppe 2	4/12 (33,3%)	0/12 (0%)	8/12 (66,7%)	0/12 (0%)
Gruppe 3	84/86 (97,7%)	0/86 (0%)	2/86 (2,3%)	0/86 (0%)
Gruppe 4	1/42 (2,4%)	23/42 (54,8%)	0/42 (0%)	18/42 (42,9%)
Gruppe 5	15/49 (30,6%)	27/49 (55,1%)	0/49 (0%)	7/49 (14,3%)

Übersicht über die Verteilung der Zellen aus Lymphknoten (LK) und Knochenmark (KM) aus NSCLC und Kontrollpatienten (HD) in den einzelnen RNA-Seq Gruppen. In Klammern ist der prozentuale Anteil an der Gesamtzahl der jeweiligen Gruppe angegeben. Die prädominante Zellgruppe der einzelnen Gruppe darstellt ist jeweils hervorgehoben.

Der pathologische N-Status gibt Rückschlüsse auf das Ausmaß der lymphogenen Streuung in den untersuchten Patienten, jedoch müssen die in dieser Arbeit untersuchten Lymphknoten-Hälften nicht zwangsläufig befallen sein. Bei einem tumorösen Befall der untersuchten Proben sollte auch der DCCD (also die Höhe der nachgewiesenen EpCAM/CK-positiven Zellen pro 1 Million untersuchter Zellen) entsprechend des Ausmaßes des Befalls erhöht sein. Trägt man von den Zellen der 5 RNA-Seq Gruppen die jeweils dazugehörigen DCCD-Werte auf, so zeigt sich insbesondere in den Gruppen 1 und 5 ein hoher durchschnittlicher DCCD, wobei sich in beiden Gruppen auch Zellen von Proben mit relativ niedrigen DCCDs befinden (Abbildung 68). Dagegen zeigen die Gruppen 2, 3 und 4 einen niedrigen durchschnittlichen DCCD mit wenigen Ausnahmen in den Gruppen 3 und 4 (Abbildung 68).

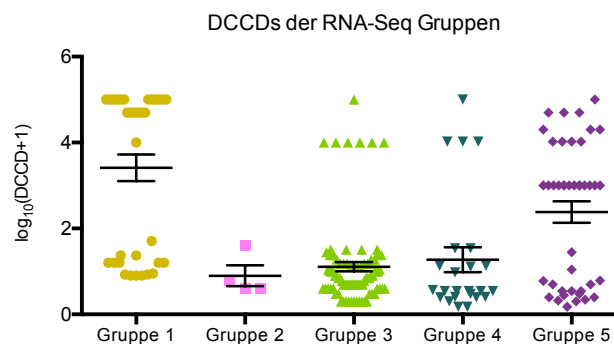


Abbildung 68: DCCDs der untersuchten Proben je RNA-Seq Gruppe

Die Abbildung zeigt für die Zellen aus den NSCLC-Patienten der verschiedenen RNA-Seq Gruppen die dazugehörigen DCCDs der untersuchten Probe. Gezeigt ist der Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes.

Da 4 der 5 RNA-Seq Gruppen einen hämatopoietischen Phänotyp aufweisen und somit der maligne Ursprung weiterhin unsicher ist, sollten die Daten der Genomsequenzierung eingeschlossen werden. Bei 140 der insgesamt 225 Zellen (62,22%) konnte neben dem Einzelzell-Transkriptom auch das Genom erfolgreich amplifiziert und sequenziert werden. Die Ergebnisse der CNV-Analysen zeigten, dass 100% der sequenzierten Zellen der Gruppe 1 ein aberrantes Genom aufweisen, wohingegen keine der Zellen mit einem CNV-Profil der Gruppe 2 (n = 3) Aberrationen zeigten. Bei den übrigen RNA-Seq Gruppen war der Anteil der Zellen mit Genomalterationen zwischen 50-53% (Gruppe 4 und 5) und 39% (Gruppe 3) (Tabelle 48, Abbildung 69).

Tabelle 48: Anteil an aberranten NSCLC Zellen in den 5 RNA-Seq Gruppen

<i>Gruppe</i>	<i>CNV aberrant</i>
Gruppe 1	28/28 (100,00%)
Gruppe 2	0/3 (0,00%)
Gruppe 3	25/64 (39,06%)
Gruppe 4	8/15 (53,30%)
Gruppe 5	13/26 (50,00%)

Übersicht über den prozentualen Anteil der aberranten NSCLC Zellen an allen NSCLC Zellen mit akzeptablem CNV-Profil in den einzelnen RNA-Seq Gruppen.

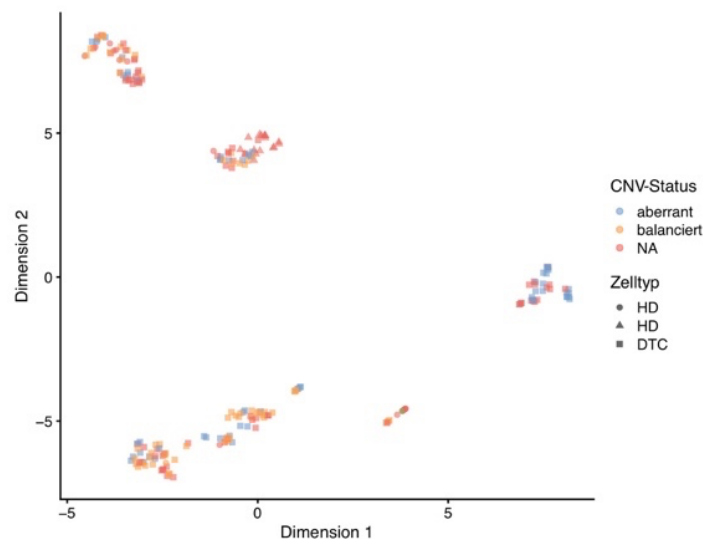


Abbildung 69: Markierung der aberranten Zellen in der RNA-Seq PCA

Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq Daten mit Hervorhebung des CNV-Status der Zellen: aberrant (blau), balanciert (orange), nicht verfügbar (NA, rot). HD: Zelle aus gesundem Kontrollpatient, DTC: Zelle aus NSCLC Patient.

Da in den RNA-Seq Gruppen 3-5 nicht nur HEA-125-positive Zellen aus NSCLC Patienten, sondern auch HD Zellen vorhanden waren und der Anteil an aberranten Zellen zwischen 39% und 53% lag, ist dort von einer gemischten Population von echten DTCs und falsch-positiven Zellen auszugehen. Dagegen ist bei Gruppe 1 und 2 aufgrund der Charakteristika der Zellen und der CNV-Profile von reinen DTC und HD Gruppen auszugehen.

Um die Zellen in den RNA-Seq Gruppen weitergehend zu analysieren, sollte anhand der Genexpression und den aktivierten Pathways in den Gruppen die mutmaßliche Identität der Zellgruppen bestimmt werden. Die dazu verwendeten erhöht und vermindert exprimierte Gene und die am stärksten aktivierten Pathways der einzelnen Gruppen sind in den Abbildungen 70 und 71 und der Tabelle 50 ersichtlich.

In der Gruppe 2, die zum Großteil aus (nicht-aberranten) HD Zellen besteht, zeigt sich ein Expressionsmuster passend zu Monozyten bzw. myeloiden Zellen mit aktiven Prozessen der Antigen-Präsentation und (Auto-)Immunreaktivität (Tabelle 49).

Das Expressionsprofil der Gruppe 3 mit 97,7% HEA-125-positiven Zellen aus NSCLC Lymphknoten korrelierte am stärksten mit Zellen der adaptiven Immunität (T- und B-Zellen) wobei Aktivierungsprozesse eben dieser Zellen in der Pathway-Analyse dieser Gruppe deutlich im Vordergrund standen (Tabelle 49)

Gruppe 4 mit der höchsten Anzahl an KM HEA-125-positiven Zellen zeigt ein Expressionsprofil von Plasmazellen, während sich immunologische Prozesse wie Phagozytose und die Aktivierung und Regulierung des Immunsystems hoch aktiv zeigten (Tabelle 49).

Die stärkste Korrelation mit der Genexpression von Gruppe 5 zeigten Erythroblasten bzw. frühe erythroide Zellen mit einer erhöhten Aktivität der Zellteilung (Tabelle 49).

Tabelle 49: Zuordnung der RNA-Seq Gruppen zu Zelltypen

Gruppe	Knochenmark-Atlas	Gewebe-Atlas	Pathway-Analyse
Gruppe 1	NA*	bronchiale Epithelzellen	Zelladhäsion, EZM-Interaktion, Zellzyklus
Gruppe 2	NA*	Monozyten / Myeloide Zellen	Antigen-Präsentation, (Auto-) Immunreaktionen
Gruppe 3	NA*	B-Zellen / T-Zellen	T-Zell und B-Zellaktivierung
Gruppe 4	Plasmazellen	NA°	Phagozytose, Immunaktivierung und -regulierung
Gruppe 5	Erythroblasten	frühe erythroide Zellen	Zellteilung

* Da der verwendete Atlas die Genexpression für Zellreihen des Knochenmarkes beschreibt und in Gruppen 1-3 ausschließlich Zellen aus dem Lymphknoten clustern, kann hier keine valide Aussage getroffen werden. ° Einige der Gene, die Gruppe 4 vermehrt bzw. vermindert exprimieren, waren in der Datenbank nicht aufgelistet, weshalb keine valide Aussage zu dem Zelltyp erfolgen konnte.

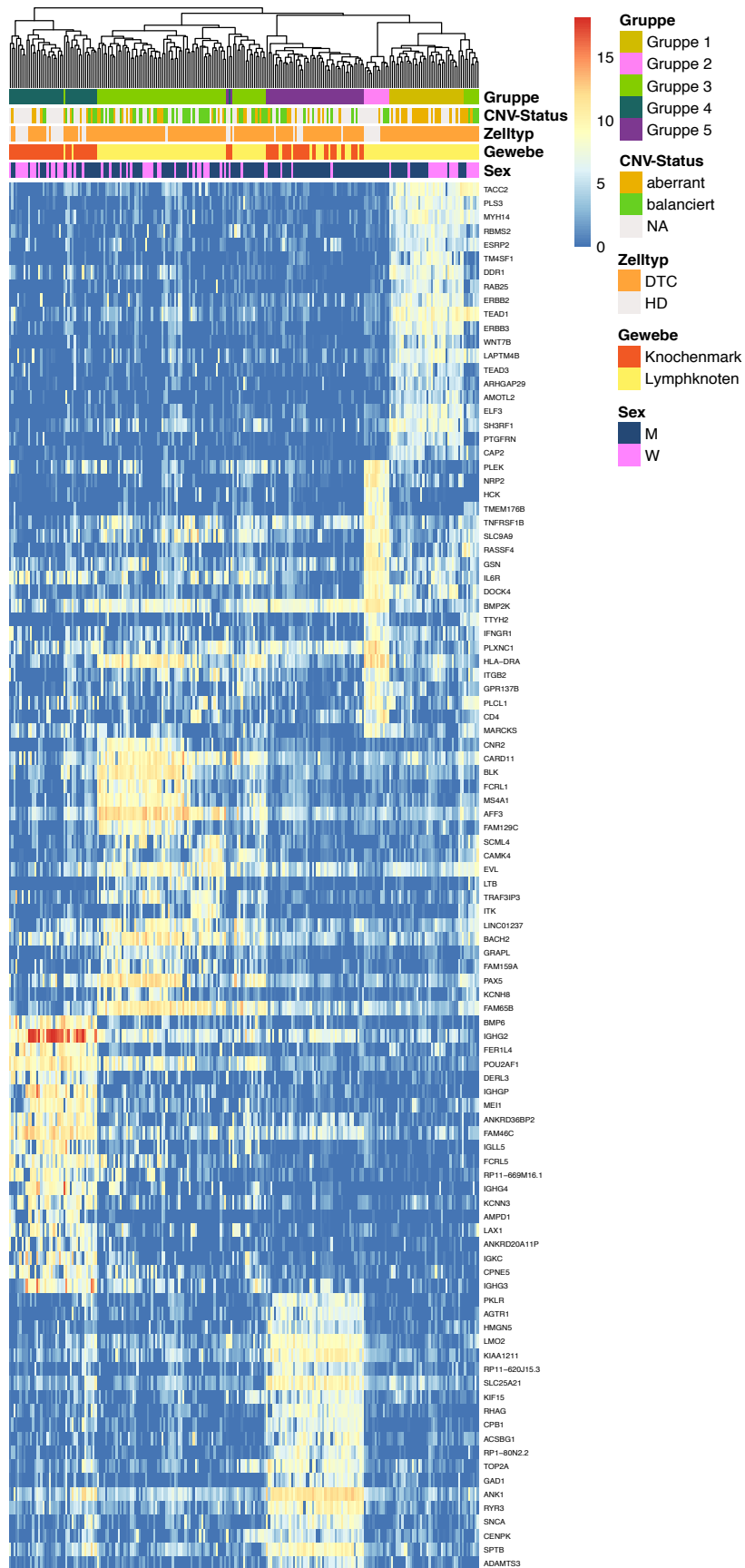


Abbildung 70: Top 20 der hochregulierten Gene der 5 RNA-Seq Cluster

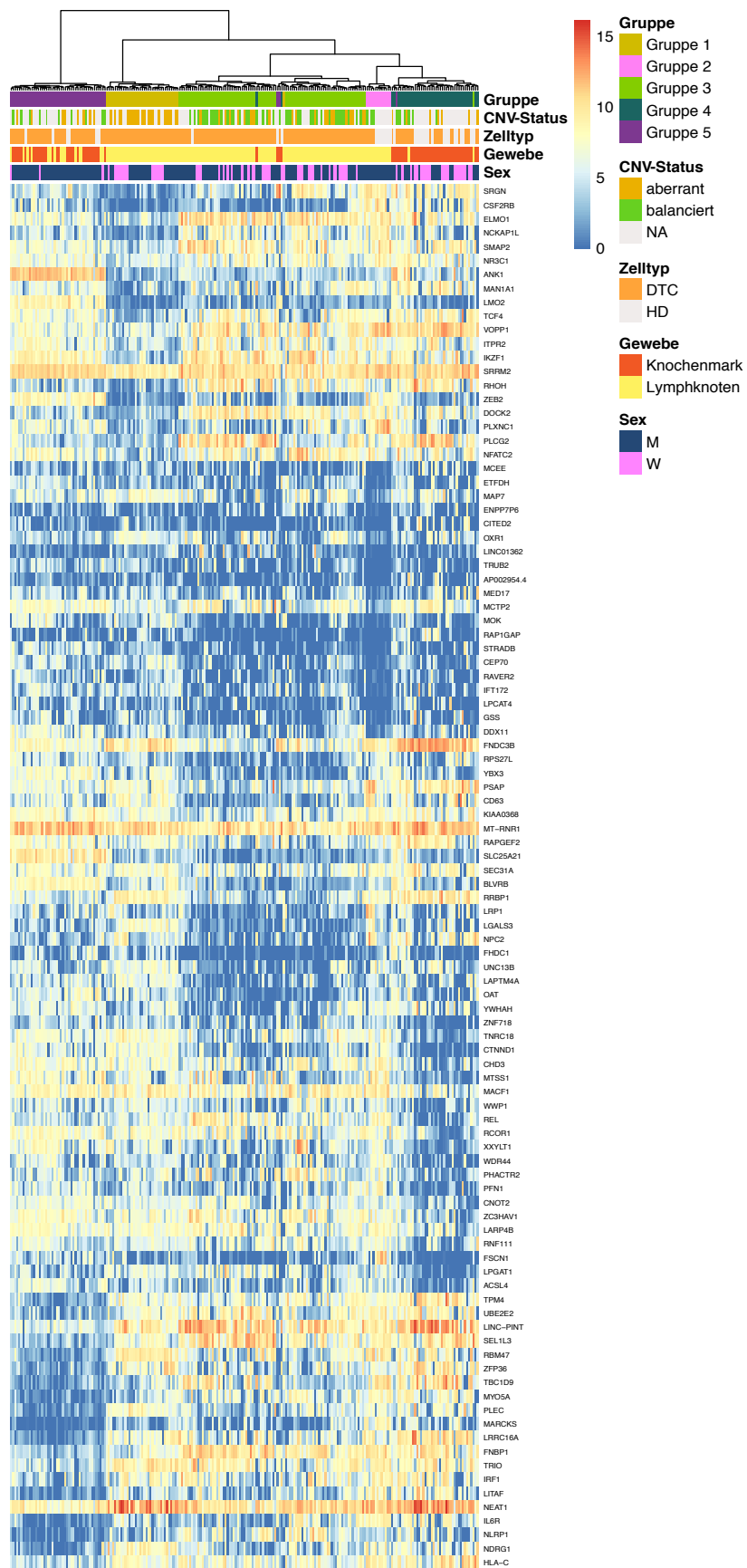


Abbildung 71: Top 20 der herunterregulierten Gene der 5 RNA-Seq Cluster

Tabelle 50: Top 10 der aktivierten Pathways in den 5 RNA-Seq Clustern

Gruppe	Anzahl Pathways	Datenbank	Name	korrigierter p-Wert
1	144	GO Molecular Function 2018	cadherin binding (GO:0045296)	2,16E-07
		KEGG 2019 Human	Tight junction	1,52E-06
		WikiPathways 2019 Human	Focal Adhesion WP306	8,44E-06
		NCI-Nature 2016	a6b1 and a6b4 Integrin signaling Homo sapiens	9,97E-06
		NCI-Nature 2016	Alpha6 beta4 integrin-ligand interactions Homo sapiens	2,52E-05
		KEGG 2019 Human	Focal adhesion	5,90E-05
		Reactome 2016	Extracellular matrix organization Homo sapiens R-HSA-1474244	1,33E-04
		NCI-Nature_2016	Stabilization and expansion of the E-cadherin adherens junction Homo sapiens	1,49E-04
		Reactome_2016	Non-integrin membrane-ECM interactions Homo sapiens R-HSA-3000171	1,96E-04
2	92	WikiPathways 2019 Human	Primary Focal Segmental Glomerulosclerosis FSGS WP2572	2,43E-04
		KEGG 2019 Human	Th17 cell differentiation	1,90E-05
		Reactome_2016	Phosphorylation of CD3 and TCR zeta chains Homo sapiens R-HSA-202427	2,08E-05
		WikiPathways 2019 Human	TYROBP Causal Network WP3945	2,33E-05
		GO Cellular Component 2018	MHC class II protein complex (GO:0042613)	4,71E-05
		GO Cellular Component 2018	MHC protein complex (GO:0042611)	7,13E-05
		KEGG 2019 Human	Hematopoietic cell lineage	8,21E-05
		KEGG 2019 Human	Th1 and Th2 cell differentiation	9,00E-05
		KEGG 2019 Human	Viral myocarditis	1,13E-04
3	17	KEGG 2019 Human	Toxoplasmosis	1,21E-04
		KEGG 2019 Human	Inflammatory bowel disease (IBD)	1,22E-04
		WikiPathways 2019 Human	T-Cell antigen Receptor (TCR) Signaling Pathway WP69	6,55E-04
		NCI-Nature 2016	Class I PI3K signaling events Homo sapiens	7,03E-04
		NCI-Nature 2016	TCR signaling in naive CD4+ T cells Homo sapiens	1,12E-03
		GO Molecular Function 2018	non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity (GO:0004715)	2,47E-03
		GO Biological Process 2018	B cell activation (GO:0042113)	2,49E-03
		GO Biological Process 2018	T cell activation (GO:0042110)	3,16E-03
		GO Biological Process 2018	protein autophosphorylation (GO:0046777)	3,27E-03
4	45	GO Biological Process 2018	peptidyl-tyrosine autophosphorylation (GO:0038083)	3,30E-03
		GO Biological Process 2018	antigen receptor-mediated signaling pathway (GO:0050851)	1,77E-02
		GO Biological Process 2018	T cell receptor signaling pathway (GO:0050852)	1,85E-02
		GO Biological Process 2018	regulation of B cell activation (GO:0050864)	5,08E-06
		GO Molecular Function 2018	immunoglobulin receptor binding (GO:0034987)	1,13E-05
		GO_Biological_Process_2018	humoral immune response mediated by circulating immunoglobulin (GO:0002455)	1,13E-05
		GO Biological Process 2018	complement activation, classical pathway (GO:0006958)	1,33E-05
		GO Biological Process 2018	positive regulation of B cell activation (GO:0050871)	1,54E-05
		GO Biological Process 2018	phagocytosis, engulfment (GO:0006911)	3,60E-05
5	578	GO Biological Process 2018	regulation of complement activation (GO:0030449)	3,99E-05
		GO Biological Process 2018	positive regulation of lymphocyte activation (GO:0051251)	4,11E-05
		GO Biological Process 2018	regulation of protein activation cascade (GO:2000257)	4,15E-05
		GO Biological Process 2018	regulation of immune effector process (GO:0002697)	4,53E-05
		Reactome 2016	Cell Cycle Homo sapiens R-HSA-1640170	8,07E-57
		Reactome 2016	Cell Cycle, Mitotic Homo sapiens R-HSA-69278	1,49E-55
		WikiPathways 2019 Human	Retinoblastoma Gene in Cancer WP2446	9,27E-41
		KEGG 2019 Human	Cell cycle	1,20E-27
		WikiPathways 2019 Human	Cell Cycle WP179	5,65E-26
5	578	Reactome 2016	Mitotic Prometaphase Homo sapiens R-HSA-68877	2,88E-25
		Reactome 2016	Mitotic G1-G1/S phases Homo sapiens R-HSA-453279	1,19E-24
		Reactome_2016	Resolution of Sister Chromatid Cohesion Homo sapiens R-HSA-2500257	4,17E-23
		GO Biological Process 2018	DNA metabolic process (GO:0006259)	1,34E-21
		GO Biological Process 2018	G1/S transition of mitotic cell cycle (GO:0000082)	3,02E-21

Die Tabelle zeigt die Top 10 der aktivierten Gen-Pathways pro RNA-Seq Gruppe (sortiert nach korrigiertem p-Wert). Anzahl Pathways entspricht der Gesamtzahl der signifikant (korrigierter p-Wert < 0,10) aktivierten Pathways der jeweiligen Gruppe.

Besonders auffällig war die Korrelation der Genexpression von Gruppe 5 mit erythroiden Vorläuferzellen (Tabelle 49, Abbildung 72), da diese hämatopoietische Zellreihe mehrfach als mögliches natives Reservoir an EpCAM-positiven Zellen beschrieben ist (Armeanu et al., 2000; Choemsel et al., 2004; Eisenwort et al., 2011; Lammers et al., 2002). Es folgte die gezielte Analyse von typischen Markern von 3 Gruppen erythroider Vorläuferzellen (frühe erythroide Vorläuferzellen = Early-ERP, erythroide Vorläuferzellen = ERP und Erythroblasten) (Hay, Ferchen, Chetal, Grimes, & Salomonis, 2018). Hier zeigte sich eine deutlich höhere Expression von Erythroblasten-assoziierten Genen in der RNA-Seq der Gruppe 5 (Abbildung 72).

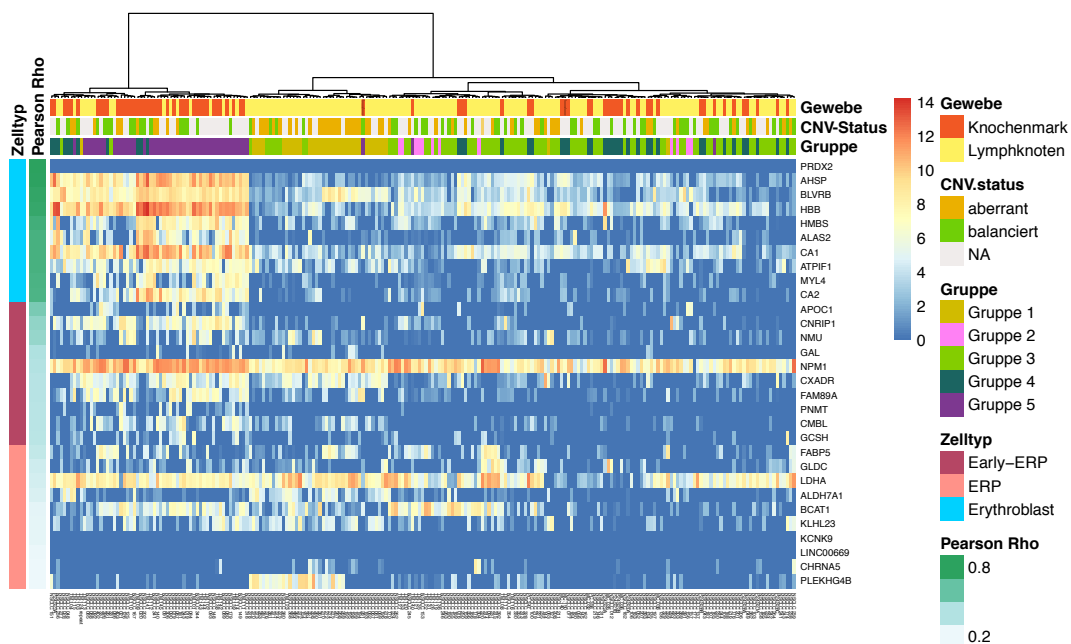


Abbildung 72: Analyse der Expression von früh-erythropoietischen Markern

Typische Marker von frühen erythroiden Vorläuferzellen (early-ERP, dunkelrot), erythroiden Vorläuferzellen (ERP, hellrot) und Erythroblasten (hellblau) wurden in dem NSCLC Kollektiv untersucht.

Überraschend war jedoch - trotz deutlicher transkriptomischer Ähnlichkeit mit Erythroblasten - die hohe Anzahl an M1-Zellen in der RNA-Seq Gruppe 5 (18/49), die relativ hohe Anzahl an aberranten Zellen (8/21) und der Fakt, dass 15 der 49 Zellen dieser Gruppe nicht aus dem Knochenmark, sondern aus dem Lymphknoten stammen.

Da mit Ausnahme der Gruppe 2 in allen Gruppen aberrante Zellen vorhanden waren sollte das Überleben dieser Patienten untersucht werden. Passend zu den CNV-Status wurde bei den beiden NSCLC Patienten deren Zellen zusammen mit HD Zellen in der RNA-Seq Gruppe 2 clustern kein Todesereignis beobachtet, wohingegen 5 der 9 Patienten mit Zellen in der RNA-Seq Gruppe 1 (zu 100% aberrant) innerhalb von 3 Jahren verstarben (Abbildung 73). Bei den Patienten mit Zellen in den RNA-Seq Gruppen 3-5 zeigte sich ein reduziertes OS mit einer

ähnlichen Überlebenswahrscheinlichkeit der Gruppen 3 und 4 und einer stärker reduzierten OS der Gruppe 5. Das PFS dieser Gruppen war in ähnlichem Ausmaße reduziert (Abbildung 73).

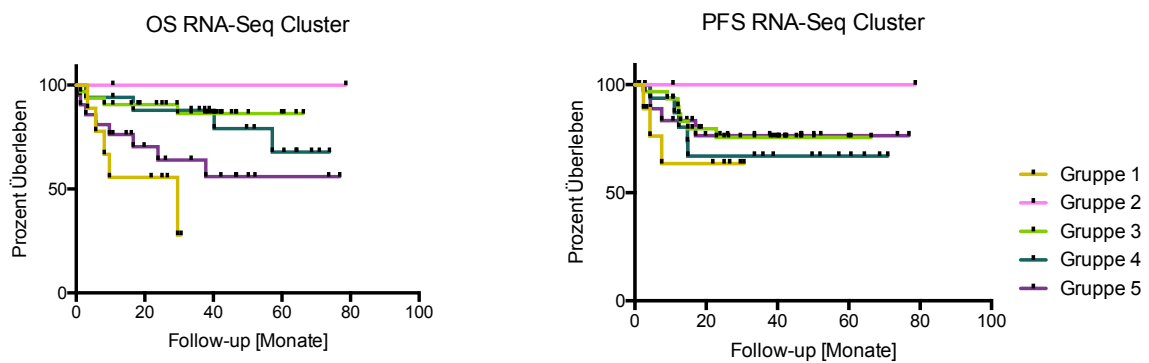


Abbildung 73: OS und PFS von NSCLC Patienten anhand der 5 RNA-Seq Gruppen

Kaplan-Meier Kurven zeigen das Gesamtüberleben (OS, links) und progressionsfreie Überleben (PFS, rechts) der Patienten mit Zellen in den einzelnen RNA-Seq Gruppen.

Überraschenderweise weist Gruppe 5 der RNA-Seq Cluster somit trotz dem transkriptomischen Phänotyp von Erythroblasten ein deutlich vermindertes Gesamtüberleben auf (Abbildung 73). Interessanterweise weisen die Zellen der Gruppe 5 relativ hohe Expressionswerte von EpCAM auf (Abbildung 74), das in dieser Arbeit bereits mit einem niedrigeren Gesamtüberleben assoziiert wurde (Abbildung 32-34).

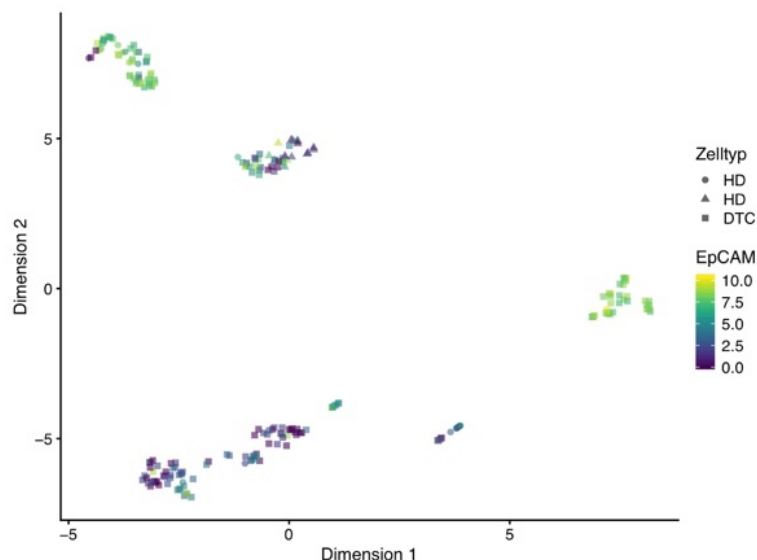


Abbildung 74: EpCAM Expression in der RNA-Seq PCA

Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq Daten mit Hervorhebung der EpCAM-Expressionslevels. Hohe Level der Expression sind mit Gelb markiert, wohingegen eine mittlere und niedrige Expression durch grüne und violette Symbole gekennzeichnet sind. HD: Zelle aus gesundem Kontrollpatient, DTC: Zelle aus NSCLC Patient.

Vergleicht man die Expressionslevels von EpCAM und CD45 der 5 RNA-Seq Gruppen, so kann beobachtet werden, dass die Gruppe 1 mit einem Expressionsprofil von bronchialen Zellen und dem schlechtesten OS und PFS der RNA-Seq Gruppen eine hohe EpCAM und eine niedrige

CD45 Expression aufweisen (Abbildung 75). Des Weiteren zeigt Gruppe 5 ähnlich hohe Werte an EpCAM- bzw. niedrige Werte an CD45-Expression in der RNA-Seq, als Gruppe 1 (Abbildung 75). Im Gegensatz dazu exprimieren die Gruppen 2 und 3 höhere Levels an CD45 als EpCAM und Gruppe 4 zeigt niedrigere Levels von beiden Genen (Abbildung 75).

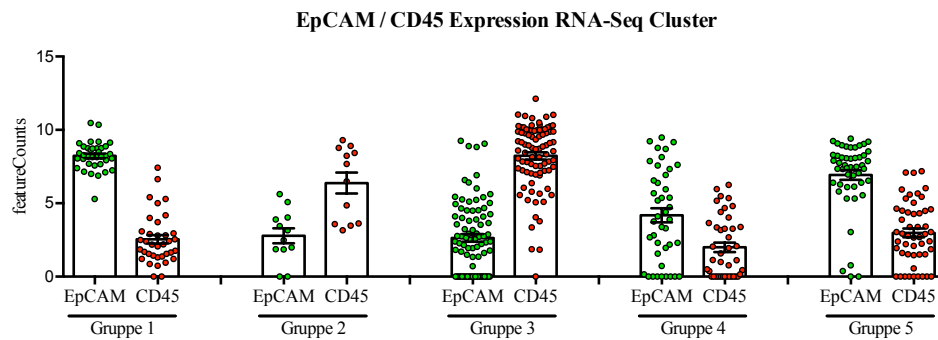


Abbildung 75: Expression von EpCAM und CD45 in den 5 RNA-Seq Gruppen

Abgebildet sind die Expressionslevels der RNA-Seq Ergebnisse von EpCAM (grün) und CD45 (rot) der fünf Gruppen.

Die beiden Gruppen 1 und 5 exprimieren somit höhere Levels an EpCAM-Transkript (Abbildung 75) und weisen zudem höhere durchschnittliche DCCD-Werte auf (Abbildung 68). Um den Zusammenhang dieser Parameter (und die mögliche Rolle von EpCAM mRNA als Aktivierungsmarker in DTCs) zu testen, sollte im Folgenden die Assoziation zwischen der Höhe der EpCAM-Expression der Zellen und dem jeweiligen DCCD der Probe untersucht werden. Abbildung 76 zeigt die Korrelation des DCCDs (hier logarithmisch transformiert) und der Höhe der EpCAM bzw. CD45-Expression der Zellen ($n = 190$). Es zeigt sich ein moderater Zusammenhang von EpCAM ($r = 0,4585$; $p < 0,0001$) und CD45 ($r = -0,4089$; $p < 0,0001$) mit dem DCCD, wobei eine höhere EpCAM-Expression mit einem höheren DCCD und höhere CD45-Expression mit einem niedrigeren DCCD assoziiert ist.

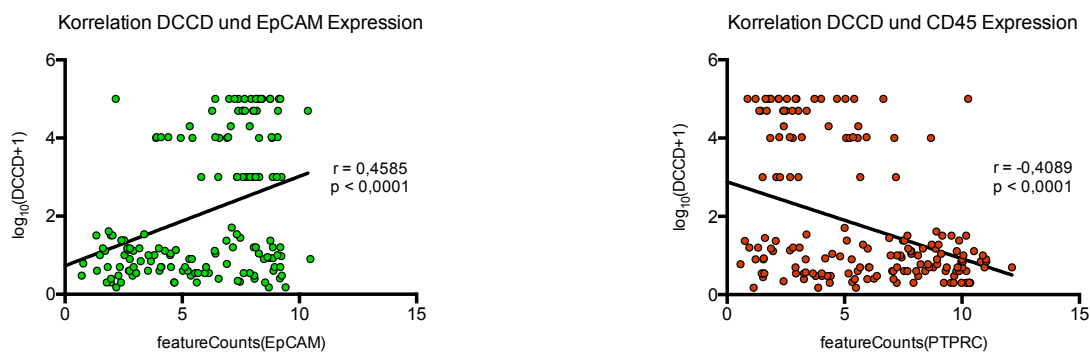


Abbildung 76: Korrelation zwischen Höhe der EpCAM Expression und dem DCCD

Gezeigt ist die Korrelation der EpCAM (links, grün) und CD45 (rechts, rot) Expression der RNA-Seq mit dem DCCD der jeweiligen Probe. Angegeben ist der Korrelationskoeffizient Pearson r und das Signifikanzniveau p .

Die Höhe des EpCAM-Transkripts korreliert positiv mit einem erhöhten DCCD (Abbildung 76). Um weiterhin zu untersuchen, ob diese EpCAM-positiven Zellen verstärkt proliferieren und somit den erhöhten DCCD verursachen, wurde der Proliferationsmarker MKI67 untersucht. Vor Allem Gruppe 5 zeigte sowohl in der Pathway-Analyse (Tabelle 49+50), als auch bei der Analyse der RNA-Seq Daten mit hohe Expressionslevels von MKI67 einen proliferativen Phänotyp auf (Abbildung 77). Bei den übrigen Gruppen der RNA-Seq zeigen sich ähnlich (niedrige) Levels von MKI67-Expression (Abbildung 77).

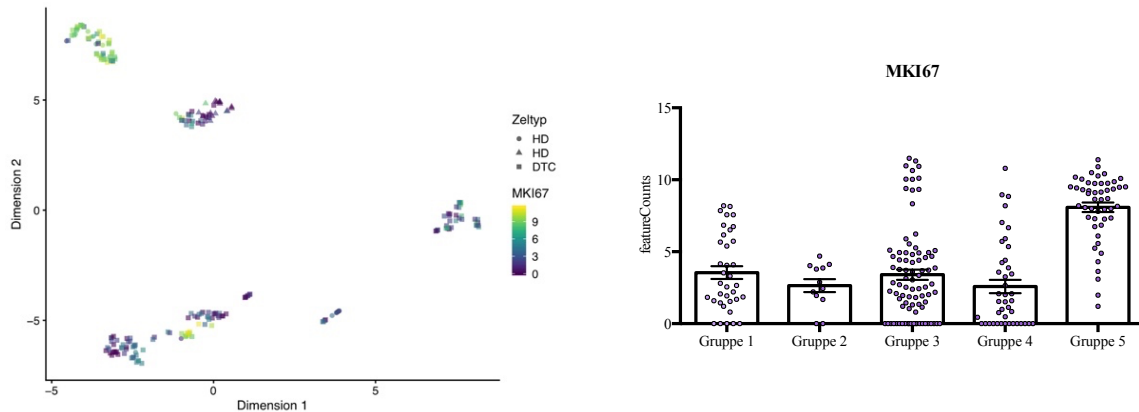


Abbildung 77: Expression von MKI67 in den 5 RNA-Seq Gruppen und Hauptkomponentenanalyse der RNA-Seq Daten mit Hervorhebung der MKI67-Expressionslevels (links). HD: Zelle aus gesundem Kontrollpatient, DTC: Zelle aus NSCLC Patient. Zudem sind die MKI67-Expressionslevels der einzelnen Gruppen rechts dargestellt.

5 Diskussion

Das 5-Jahres Überleben von NSCLC Patienten ist auch bei fehlenden Fernmetastasen (M0) mit 90% (Stadium IA1) bis 13% (Stadium IIIC) stark eingeschränkt (Goldstraw et al., 2016). In bis zu 77,7% der Fälle wird das Versterben von Lungenkrebs Patienten mit einer metastatischen Aussaat in Verbindung gebracht (Dillekås, Rogers, & Straume, 2019). Dieses Paradoxon könnte durch die frühe lymphogene und/oder hämatogene Aussaat von einzelnen Tumorzellen erklärt werden, wobei diese Zellen ein Reservoir an möglichen Metastasen-initiiierenden Zellen darstellen (Klein, 2009).

In dieser Arbeit wurden EpCAM und CK-positive Zellen aus dem Knochenmark und Lymphknoten von knapp 300 Patienten untersucht und nach der Amplifikation des Einzelzellgenoms (und Transkriptoms) weitergehend genetisch analysiert und charakterisiert. Der alleinige Nachweis von EpCAM-positiven Zellen im Lymphknoten oder dem Knochenmark in diesen NSCLC Patienten korrelierte signifikant mit einem reduzierten Überleben. Dieser prognostische Effekt konnte mit dem zusätzlichen Nachweis des EpCAM-Transkriptes mittels PCR noch verbessert werden. Allerdings können auch bei Kontrollpatienten ohne Tumorerkrankung EpCAM-positive Zellen nachgewiesen werden.

Nähere Untersuchungen der Zellen mittels genspezifischer PCR oder TP53-Mutationsanalyse erlaubten keine eindeutige Identifizierung bzw. Trennung von putativen Tumorzellen von Kontrollzellen. Letztlich wurden DTCs durch ein aberrantes Genomprofil klassifiziert und die RNA-Seq der isolierten Zellen erlaubte die Einteilung in fünf distinkte Gruppen. Diese Unterteilung anhand der Genexpression erlaubt die Unterscheidung zwischen Zellen aus Lymphknoten und Knochenmark und bis zu einem gewissen Maße auch zwischen DTCs und Kontrollzellen.

5.1 Nachweis und klinische Relevanz von DTCs mit BerEp4 bzw. A45-Färbung

Die Identifizierung von disseminierten Tumorzellen bei NSCLC Patienten erfolgt meist mit einem Antikörper gegen epitheliale Zytokeratine oder - wenn auch seltener in der Literatur - gegen das *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (EpCAM) (Tabelle 1). In dieser Arbeit wurde das Knochenmark der NSCLC Patienten auf A45-positive Zellen und die Lymphknoten auf BerEp4-positive Zellen untersucht. Insbesondere bei dem Nachweis von Zytokeratinen müssen die Zellen aufgrund der intrazellulären Lokalisation dieser Proteine fixiert und permeabilisiert werden. Um eine kombinierte Genom- und Transkriptom-Amplifikation zu ermöglichen - die

mit neuen Methoden auch bei Einzelzellen durchgeführt werden kann (Klein et al., 2002) - bedarf es dem Nachweis mittels eines Oberflächenmoleküls auf den Zellen, um lebende Zellen zu isolieren. Dafür wurden einige Proben der Patienten mit dem EpCAM-Antikörper HEA-125 in einer lebenden Zellsuspension untersucht.

Insgesamt wurden Proben (Knochenmark und/oder Lymphknoten) von 293 Patienten mit einem histologisch gesicherten NSCLC untersucht. Dabei konnten in 125/269 (46,47%) bzw. 109/237 (45,99%) der Patienten mindestens eine BerEp4 (Lymphknoten) bzw. A45-positive Zelle (Knochenmark) nachgewiesen werden, wohingegen bei dem Nachweis von DTCs mit der HEA-125 Suspensionsfärbung in Lymphknoten von 69/110 Patienten (62,73%) und in Knochenmark-Proben von 63/120 (52,50%) Patienten mindestens eine positiv gefärbte Zelle gefunden wurde. Diese Positivitätsraten liegen über den in der Literatur vorbeschriebenen Detektionsraten von durchschnittlich 25,67% (15,28% - 40,00%) in Lymphknoten bzw. 34,21% (9,92% - 60,32%) in Knochenmark (Tabelle 1). Dieser Unterschied könnte unter anderem durch die großen Unterschiede in der Aufarbeitung der Proben und den verwendeten Antikörperklonen erklärt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper A45-B/B3 (CK) und HEA-125 (EpCAM) wurden in keiner der bereits publizierten Studien zum Nachweis von DTCs in NSCLC Patienten verwendet (Tabelle 1).

Klinische Relevanz von nachgewiesenen CK und EpCAM-positiven Zellen

Die klinische Relevanz von nachgewiesenen CK oder EpCAM-positiven Zellen muss durchaus kritisch hinterfragt werden. Teils konnte der Nachweis von disseminierten Tumorzellen in relativ großen Kollektiven von mehreren Hundert Patienten mit einem signifikant verkürzten Gesamtüberleben oder progressionsfreien Überleben assoziiert werden, wohingegen andere Studien diese Assoziation zum Überleben der Patienten nicht nachweisen konnten (Tabelle 1). Allerdings zeigen diese Studien eine starke Heterogenität im Hinblick auf Einschlusskriterien der Patienten, untersuchten Variablen (OS, PFS), Isolierung der Zellen, Färbemethoden und verwendeten Antikörper (multiple verschiedene Klone von EpCAM und CK-Antikörpern). Dies erschwert einen Vergleich der Ergebnisse und somit eine valide Aussage zu der klinischen Relevanz von DTCs.

In dem Kollektiv dieser Arbeit konnte jedoch nachgewiesen werden, dass der Nachweis von einzelnen BerEp4-positiven Zellen im Lymphknoten signifikant mit einem niedrigeren OS ($p = 0,0239$) und einem niedrigeren PFS ($p = 0,0220$) korreliert. Der Nachweis von A45-positiven Zellen im Knochenmark zeigte keinerlei Effekt auf das Überleben der Patienten.

Interessanterweise war das OS der Patienten mit HEA-125-positiven Zellen im Knochenmark dahingegen deutlich reduziert ($p = 0,0073$). Auch der Nachweis von HEA-125-positiven Zellen im Lymphknoten zeigte einen Trend zu einem reduzierten OS ($p = 0,0890$) und einer signifikanten Reduktion des PFS der untersuchten Patienten ($p = 0,0109$).

Dieser prognostische Effekt im Lymphknoten scheint jedoch vor allem durch den pathologischen N-Status bedingt zu sein, da dieser allein eine höchst signifikante Reduktion des OS und des PFS ($p < 0,001$) verursacht und der Überlebensunterschied bei dem Nachweis einzelner positiver Zellen isoliert bei pN0 Patienten nicht mehr signifikant war ($p > 0,05$).

In der multivariaten Analyse des Gesamtkollektivs ($n=210$; Nachweis von BerEp4 und A45-positiven Zellen in LK bzw. KM) zeigt sich die minimale Resterkrankung weder im Lymphknoten noch im Knochenmark als signifikant, wohingegen der N-Status und das Alter der Patienten einen signifikanten Einfluss auf das OS und PFS haben. Dieses Ergebnis ist mit der Literatur vereinbar, da der Einfluss des N-Status und das Ausmaß der lymphogenen Streuung bereits mehrfach als prognostischer Marker vorbeschrieben ist (Fukui, Mori, Yokoi, & Mitsudomi, 2006; Marra et al., 2011) und mit steigendem Alter auch die Anzahl der Komorbiditäten steigt und der Allgemeinzustand der Patienten (und damit verbunden die Durchführbarkeit von adjuvanten Therapien) sinkt. Diese Faktoren spiegeln sich in dem Überleben von Krebspatienten wider (Palma et al., 2010; Wedding, Röhrig, Klippstein, Pientka, & Höffken, 2007). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Arbeit von Singh et al., in der zelluläre Veränderungen des Knochenmarks im Alter und damit einhergehende angiokrine Veränderungen im Sekretom inhibierend auf *dormancy* und - im Sinne einer erhöhten Proliferation - aktivierend auf schlafende DTCs wirkt (Singh et al., 2019). Dies erklärt einen möglichen altersabhängigen Einfluss auf die Inzidenz von Knochenmetastasen und bietet eine zusätzliche Erklärung für den hohen prognostischen Einflusses des Alters für das Überleben der Patienten in dieser Arbeit.

Untersucht man den Nachweis von HEA-125-positiven Zellen in LK oder KM in der multivariaten Analyse ($n=93$ NSCLC Patienten), so zeigt sich neben dem N-Status auch der Nachweis von HEA-125-positiven Zellen im KM und der M-Status als signifikante Einflussfaktoren auf das Überleben der Patienten, wobei auch der Nachweis von einzelnen, positiv gefärbten Zellen im LK einen annähernd signifikanten Einfluss zeigt. Überraschend zeigt sich, dass der Nachweis von MRD im KM mit einer Hazard Ratio von 11,684 (95% KI: 1,060 - 128,817) neben dem pathologischen Nodalstatus und dem M-Status durchaus prognostisch für das Gesamtüberleben der Patienten ist. Des Weiteren zeigt sich eine annähernd

signifikante Relevanz des Nachweises von MRD im LK mit einer Hazard Ratio von 10,420 (95% KI: 0,946 – 114,819). Somit könnte der Nachweis von MRD in KM (und LK) einen aussagekräftigen prognostischen Marker darstellen. Hierbei ist jedoch nicht zu vergessen, dass der M-Status - also eine systemische Manifestation des Tumorleidens zum Zeitpunkt der Probenentnahme - in der multivariaten Analyse einen signifikanten Einfluss auf das Überleben hat und somit die systemische Streuung des Tumorleidens eine mögliche Verzerrung in der Auswertung der MRD in KM und/oder LK darstellt.

Für den Unterschied des prognostischen Effektes bei dem direkten Vergleich der HEA-125 und BerEp4-Färbung - vor allem in der multivariaten Analyse - ergibt sich kein offensichtlicher Grund. Beide Klone sind als sehr spezifische EpCAM-Antikörper beschrieben bzw. getestet und binden an die extrazelluläre EGF-like Domäne /Thyreoglobulin-Domäne des Proteins (Takao, Nagai, & Torii, 2013). Die genauen Epitope der Antikörper-Bindungen sind jedoch in der Literatur nicht beschrieben und zudem gibt es das EpCAM-verwandte Protein TROP-2, das eine zu 49,8% identische Aminosäuren-Sequenz aufweist. Diese Ähnlichkeit steigt - nur auf die Thyreoglobulin-Domäne bezogen - sogar auf 60,0%. (BLAST). Weiterhin handelt es sich bei dieser Domäne um eine evolutionär hoch konservierte Proteindomäne, die auch in anderen Proteinen (z.B. in der Familie der *Insulin-like growth factor binding proteins*) vorzufinden sind (Bauerle & Gires, 2007; F. Molina, Bouanani, Pau, & Granier, 1996). Somit ist nicht zu hundert Prozent auszuschließen, dass durch unspezifische Bindung eines Antikörpers an analoge Epitope in verwandten Proteinen falsch-positive Zellen oder disseminierte Tumorzellen mit TROP-2-Expression (Arafat et al., 2017; Goldenberg, Stein, & Sharkey, 2018; Schneck et al., 2015) isoliert werden. Interessanterweise wurde 1990 bei der erstmaligen Charakterisierung des BerEp4-Antikörpers sowohl der BerEp4, als auch der HEA-125 Antikörper-Klon (zum Vergleich) untersucht. Hier zeigten sich auf Proteinebene im Western Blot zwei Banden, die Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von ca. 34 kDa und 39 kDa entsprechen (Latza, Niedobitek, Schwarting, Nekarda, & Stein, 1990). Hier kann der Nachweis zweier verschiedener EpCAM Isoformen bzw. unterschiedlich modifizierter EpCAM Proteinen (mit folglich verschiedenem Molekulargewicht) nicht ausgeschlossen werden. Jedoch ist es auffällig, dass das Molekulargewicht der beiden verwandten Proteine EpCAM und TROP-2 ca. 35 kDa und 40 kDa beträgt. Eine weitere Charakterisierung der detektierten Antigene dieser Antikörper ist meines Wissens bisher nicht geschehen, weshalb die Detektion des homologen TROP-2 Proteins denkbar wäre.

Diese Arbeit zeigt mit einem mittleren klinischen Follow-Up von 34,64 Monaten (0,17 - 87,83 Monaten) große Ähnlichkeit zu den bereits veröffentlichten Studien, die ein durchschnittliches Follow-Up von ca. 38 Monaten aufweisen. Eine Langzeit-Follow-Up Analyse des Überlebens von 72,021 Patienten mit Stadium I-III NSCLC aus den Niederlanden zeigte, dass die tumorbedingte Sterblichkeit nach den ersten drei Jahren von ca. 80-85% auf 60-75% abfiel. Auch danach zeigte sich ein weiterer proportionaler Abfall der tumorbedingten Sterblichkeit, wobei diese bis zum Endpunkt bei über 30% blieb (Janssen-Heijnen, van Erning, De Ruyscher, Coebergh, & Groen, 2015). Auch wenn das Langzeit-Outcome bei Patienten mit möglicherweise schlafenden DTCs sehr interessant wäre, so kann aufgrund der oben genannten Daten auch argumentiert werden, dass ein Follow-Up von drei Jahren für eine Aussage bezüglich des prognostischen Wertes als ausreichend anzusehen ist.

Native EpCAM-positive Zellen in Kontrollpatienten

Ein Schwachpunkt aller bisherigen Arbeiten ist die alleinige Analyse von CK oder EpCAM-positiven Zellen in Krebspatienten, da auch in gesunden Patienten zu einem gewissen Maße EpCAM-positive (Bühring et al., 1996; Choemmel et al., 2004; Gaiser et al., 2012; Guzvic et al., 2014; Haunschild, 2013; Irlbeck, 2019; Lammers et al., 2002; Villablanca & Mora, 2008) und CK-positive Zellen (Braun et al., 2000, 2005; Domagala, Bedner, Chosia, Weber, & Osborn, 1992; Krag et al., 2009) nachweisbar sind. Bei gesunden Kontrollpatienten konnten HEA-125-positive Zellen in 50% bzw. 56% der Knochenmarksaspirate von Frauen bzw. Männern entdeckt werden (Guzvic et al., 2014; Irlbeck, 2019), wobei in 45,5% der untersuchten Lymphknoten von gefäßchirurgischen Patienten ohne Tumorerkrankung HEA-125-positive Zellen nachweisbar waren. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Tumorpatienten bzw. zwischen Lymphknoten und Knochenmark. Die Identität solcher Zellen ist nicht vollends geklärt, wobei vermutlich hämatopoietische Zellen des Knochenmarks und insbesondere erythroide Vorläuferzellen EpCAM-Expression aufweisen können (Choemmel et al., 2004; Lammers et al., 2002). Zudem ist in der Literatur beschrieben, dass Langerhans-Zellen im Lymphknoten möglicherweise EpCAM exprimieren (Gaiser et al., 2012; Villablanca & Mora, 2008). Diese natürlich vorkommenden EpCAM-positiven Zellen könnten - als falsch-positive disseminierte Tumorzellen - eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen und widersprüchlichen Ergebnisse bei der Analyse von DTCs erklären (Tabelle 1).

Eine genetische Analyse bzw. Charakterisierung dieser putativen disseminierten Tumorzellen in NSCLC Patienten könnte die Unterscheidung von DTCs und nativen EpCAM-positiven

Zellen und die Bestimmung deren Identität ermöglichen. Meines Wissens gibt es bisher noch keine Arbeit, in der die isolierten DTCs eingehend genetisch charakterisiert wurden. Dieses Kollektiv bietet daher die Chance einzigartige Einblicke in die Genetik von DTCs und der Tumorevolution von frühen NSCLC zu bekommen.

5.2 Identifizierung von echten disseminierten Tumorzellen

Da auch in Nicht-Tumor Patienten EpCAM-positive Zellen in Lymphknoten und Knochenmark gefunden werden können, stellt sich die Frage nach der Identität dieser Zellen und mit welchen Mitteln / Methoden eine Unterscheidung zu echten disseminierten Tumorzellen möglich ist. Ebenfalls stellt sich die Frage, ob durch native EpCAM-positive Zellen der prognostische Effekt von DTCs in NSCLC Patienten - der zumindest in dieser Arbeit als signifikant zu werten ist - zu einem gewissen Grad verschleiert wird, oder ob dieser Effekt sogar möglicherweise durch nicht-maligne (native) EpCAM-positive Zellen verursacht wird. Frühere Arbeiten aus dem Lehrstuhl für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren konnten bereits zeigen, dass EpCAM-positive Zellen aus dem Knochenmark von Mammakarzinom- und Prostatakarzinom-Patienten aberrante Genome aufweisen und zudem auch CD45 exprimieren können (Guzvic et al., 2014; Haunschild, 2013; Irlbeck, 2019). Bei aberranten Zellen ist hierbei eher von Zellen malignen Ursprungs auszugehen, als von natürlich vorkommenden EpCAM-positiven Zellen. Eine weitere genetische Untersuchung dieser Patienten ist demnach essentiell zur validen Klassifizierung von DTCs, wobei in dieser Arbeit neben genspezifischen Analysen das erste Mal eine systematische genetische Analyse von putativen DTCs in NSCLC Patienten erfolgte.

Identifizierung von DTCs mittels Genexpressionsanalyse

Bei der Isolation von möglichen DTCs aus dem Knochenmark und Lymphknoten mittels der HEA-125 Färbung handelt es sich um vitale Zellen, die in der folgenden Aufarbeitung einer kombinierten Genom- und Transkriptom-Amplifikation unterzogen werden können (Klein et al., 2003). Da sich die Genexpressionsprofile von malignen Karzinomzellen epithelialen Ursprungs theoretisch deutlich von hämatopoietischen Zellen bzw. anderen nativen / nicht-malignen Zellen unterscheiden sollten, wurde initial untersucht, ob durch die gezielte Untersuchung einzelner Transkripte eine Unterscheidung der Zellen aus Karzinom- und Kontrollpatienten möglich ist.

Dabei wurden neben dem epithelialen Marker EpCAM auch die Zytokeratine 5, 6, 8, 18 und 19 und das epitheliale Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin (CDH1) untersucht. Im Knochenmark

zeigt sich passend zu einem positiven EpCAM-Nachweis mittels Immunfluoreszenz ein hoher Anteil an EpCAM-Transkript positiven Zellen sowohl in Kontroll- als auch in NSCLC Patienten mit einer Nachweisrate von über 80%. Andere epitheliale Transkripte waren in nur 10%-36% der Zellen und ohne signifikante Unterschiede nachweisbar und sind daher von geringem Nutzen zur Charakterisierung der isolierten Zellen. Im Vergleich dazu waren Kontrollzellen aus dem Lymphknoten für alle epithelialen Marker weitestgehend negativ. Die Lymphknoten Zellen von M1 Patienten exprimieren dagegen zu 100% EpCAM (Chi^2 : $p < 0,001$). Auch die Nachweisrate von CK18 und CDH1 war in diesen Zellen signifikant höher (Chi^2 : $p < 0,001$; $p = 0,030$). In M0 Zellen zeigte sich dieser Unterschied lediglich bei CK18 (Chi^2 : $p = 0,028$). Somit zeigt sich im Lymphknoten eine klare Differenzierung von M1 und HD Zellen anhand der Expression von epithelialen Markern - insbesondere EpCAM (Guzvic et al., 2014). Jedoch konnte dieser Unterschied nicht für Zellen aus M0 Patienten beobachtet werden, was den Nutzen dieser Untersuchung stark einschränkt. Überraschend ist die niedrige Rate an EpCAM-Transkript Nachweis in Zellen von HD und M0 Zellen, obwohl das Oberflächenprotein mittels Immunfluoreszenz-Färbung nachweisbar war. Eine unspezifische Färbung dieser Zellen ist aufgrund der offensichtlich hohen Spezifität in der Färbung von Knochenmark jedoch unwahrscheinlich. Es ist wahrscheinlicher, dass in den Zellen aus dem Lymphknoten eine größere Differenz der mRNA und Protein-Expression von EpCAM besteht. In Prostata-Karzinomen konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die EpCAM mRNA in malignen Geweben (im Vergleich zu normalem Stroma) nur 2,5-fach erhöht war, wohingegen das Protein eine fast 17-fach höhere Expression zeigte (Massoner et al., 2014) Zudem wird die Stabilität und somit auch die Halbwertszeit des Proteins auf der Oberfläche maßgeblich durch die Glykosylierung dreier Aminosäuren des extrazellulären Anteils bestimmt (Imrich, Hachmeister, & Gires, 2012). Es wäre daher denkbar, dass sich Lymphknoten-Zellen in einem anderen Stadium der EMT oder des Zellzyklus befinden und somit EpCAM nicht mehr aktiv transkribieren, der Nachweis mittels Immunfluoreszenz jedoch aufgrund einer längeren Halbwertszeit noch möglich ist (Massoner et al., 2014)

Um den Ursprung der Zellen weitergehend zu analysieren wurden eine Reihe an hämatopoietischen Markern untersucht. Darunter war der Pan-Leukozytenmarker CD45 und verschiedene Marker für spezifische hämatopoietische Zellreihen / Immunzellreihen (CD19: B-Zellreihe; CD33: myeloide Zellreihe; CD34 und CD117: hämatopoietische Stammzellen; CD68: Makrophagen; CD11c, CD207 und HLA-DMB für Langerhans-Zellen; CD71: Endothelzellen und erythroide Vorläuferzellen, aber auch auf Epithelzellen). Im Knochenmark

zeigten die isolierten Zellen ähnlich wie bei den epithelialen Markern keine signifikanten Unterschiede, während der überwiegende Teil der Zellen negativ für das CD45-Transkript (95% der HD, 77,5% der M0 und 100% der M1-Zellen) und andere hämatopoietische Marker war. Im Lymphknoten zeigte sich im Vergleich zu Knochenmark eine signifikant höhere Anzahl CD45-positiven Zellen. Dabei wiesen M1-Zellen - die ebenfalls signifikant häufiger epitheliale Marker exprimieren als HD Zellen exprimieren - auch eine signifikant höhere Rate an CD117 und CD71-Expression auf. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass erythroide Vorläuferzellen als natives Reservoir an EpCAM-positiven Zellen vorbeschrieben ist (Bühring et al., 1996; Guzvic et al., 2014; Lammers et al., 2002), ist die hohe Expressionsrate von CD71 in Knochenmark und Lymphknoten Zellen suspekt und könnte theoretisch auf einen hohen Anteil dieser nativen EpCAM-positiven Zellen hinweisen. Jedoch scheinen diese Zellen neben EpCAM auch häufig andere epitheliale Marker (CDH1, CK8 und CK18) zu exprimieren, was einen epithelialen Ursprung dieser Zellen ebenso denkbar macht.

Um eine mögliche erythroide Identität der Zellen weitergehend zu untersuchen wurden ebenfalls die Gene Hämoglobin alpha 2 (HBA2), Erythropoietinrezeptor (EPOR), Krüppel-like Faktor 1 (KLF1), Nuclear Factor, Erythroid 2 (NFE2), Anionen-Austauscher 1 (CD233) und Glycophorin C (CD236), die allesamt auf erythroiden Zellen exprimiert werden, untersucht. Hierbei zeigte sich ein ubiquitär hoher Anteil an Zellen mit Expression von erythroiden Markern. Dieses Phänomen konnte bereits in DTCs aus dem Knochenmark von Prostata-CA Patienten gesehen werden, wobei der Anteil an HBA2 mRNA-positiven Zellen in diesem Kollektiv - und vor allem auch im Lymphknoten - sogar noch höher war, als der Anteil an EpCAM mRNA-positiven Zellen in Prostata-CA Patienten (Guzvic et al., 2014). In den Vorarbeiten von Lammers et al. und Bühring et al. wurden die EpCAM bzw. E-Cadherin positiven erythroiden Vorläuferzellen auch auf die Koexpression anderer erythroider Marker untersucht. Hierbei zeigte sich in beiden Studien eine hohe Rate (90-100%) an Koexpression von CD71 und (70%) CD117, wohingegen nur ein kleiner Anteil (5%) CD34 exprimierte (Bühring et al., 1996; Lammers et al., 2002). Überraschenderweise weisen diese Daten sehr hohe Korrelationen zu dem in dieser Arbeit untersuchtem Kollektiv auf. Hier zeigen sich sowohl in Lymphknoten als auch in Knochenmark-Zellen hohe Raten an CD71-Expression und teilweise (v.a. M1 Zellen im Lymphknoten) CD117-Expression, wohingegen CD34 nur spärlich nachweisbar war. Trotz der großen Übereinstimmung mit dem beschriebenen Phänotyp dieser erythroiden Zellen scheint die Identität vor allem in Lymphknoten-Zellen weiterhin fraglich, da dort nur zu geringen Raten CD45 exprimiert wird, der Nachweis von EpCAM oder

CDH1 nur in M1 Zellen zu höheren Anteilen möglich war und im Lymphknoten in der Regel keine erythroiden Vorläuferzellen zu finden sein sollten.

Um den vermuteten malignen Ursprung der Zellen zu evaluieren wurden im Folgenden Tumor-assoziierte Gene und Marker der epithelial-mesenchymalen Transition, die oftmals als Voraussetzung zur Migration und Disseminierung von Tumorzellen angesehen wird (Banyard & Bielenberg, 2015) untersucht. Neben Vimentin (mesenchymal) , ALDH1A1 und BMI1 (Stammzell-Marker) und CD133 (Tumorstammzell-Marker) wurden die Tumor-assoziierten Gene SPA17, TP63 und Involucrin (IVL) untersucht (De Jong, Buchli, & Robbins, 2002; Kaufmann, Fietze, Mengs, & Dietel, 2001; Zamay et al., 2017). Hierbei zeigte sich eine ubiquitär hohe Expression von ALDH1A1 (im Lymphknoten vor allem in M0 und M1 Zellen) und eine gegensätzliche Expression von Vimentin in Knochenmark (M1 > M0 > HD) und Lymphknoten (HD > M0 > M1). Die übrigen Marker waren nur sporadisch nachweisbar und zeigten somit keinen Nutzen zur Charakterisierung der Zellen. Insgesamt waren diese Marker wenig aufschlussreich, wobei die häufigere Expression von Vimentin gut mit dem höheren Anteil an CD45-positiven (möglicherweise mesenchymalen) Zellen im Lymphknoten vereinbar ist. Alternativ könnte es sich bei der Ko-Expression von mesenchymalen und epithelialen Markern wie zum Beispiel Vimentin und EpCAM um verschiedene Stadien der epithelial-mesenchymalen bzw. der mesenchymal-epithelialen Transition handeln. Es wird postuliert, dass für die Disseminierung der Tumorzellen die Akquise eines eher mesenchymalen / migratorischen Phänotyps erforderlich ist und letztlich zur Kolonialisierung des Endorgans der umgekehrte Prozess stattfinden muss (Banyard & Bielenberg, 2015).

Zusammenfassend scheint in Anbetracht der Heterogenität der HEA-125-positiven Zellen die Analyse einzelner Gene (33 von insgesamt ca. 23,000 bekannten Genen im menschlichen Genom) keine genauere Einteilung und Charakterisierung der isolierten Zellen zu erlauben.

Analyse der EpCAM und CD45 Expression und deren klinische Relevanz

Der epitheliale Marker EpCAM und der hämatopoietische Marker CD45 nehmen einen großen Stellenwert in dem Nachweis von zirkulierenden und disseminierten Tumorzellen bei Karzinompatienten ein (Veridex, 2013; Tabelle 1). Zudem weisen diese Marker überraschend ausgeprägte Unterschiede zwischen Lymphknoten und Knochenmark Zellen auf. Insgesamt zeigen sich in dem hier untersuchten Kollektiv ähnliche Raten an CD45-positiven Zellen aus dem Knochenmark (22,5%) als in DTC-Kollektiven aus Mamma- und Prostatakarzinom

Patienten (jeweils ca. 13% und 19%) (Guzvic et al., 2014; Haunschild, 2013), wobei es für DTCs aus dem Lymphknoten meines Wissens keine vergleichbaren Analysen gibt.

Guo et al. untersuchte 2014 bei dem hepatozellulärem Karzinom einen verbesserten CTC-Detektions-Assay, der auf der Charakterisierung der CTCs mittels der EpCAM mRNA basierte. Bei dem direkten Vergleich mit der FDA-zugelassenen Plattform CellSearch zeigte sich eine Konkordanz von 76,7% und ein signifikant kürzeres Überleben von Patienten mit CTCs, die die EpCAM mRNA exprimierten (Guo et al., 2014). Analog dazu konnte auch in diesem Kollektiv ein hoher prognostischer Effekt von HEA-125-positiven und EpCAM mRNA-positiven Zellen in NSCLC Patienten beobachtet werden. Hierbei zeigte sich eine schärfere Trennung der Überlebenskurven, als bei der alleinigen Stratifizierung anhand des EpCAM-Nachweises mittels der Immunfluoreszenz-Färbung. Zudem konnte anhand der isolierten Zellen und dem Nachweis der EpCAM mRNA Expression in diesen Zellen selbst in Lymphknoten ohne pathologischer Tumorausssaat (pN0) ein signifikanter Überlebensunterschied gezeigt werden. Womöglich ist die aktive Transkription der EpCAM mRNA und folglich auch deren Nachweisbarkeit ein Marker für aktivierte DTCs, die eine bessere Prognoseeinschätzung erlauben. Demnach ist auch eine gesteigerte Expression von EpCAM mit einem stärker proliferativen und prognostisch ungünstigeren Tumorwachstum verbunden (Chaves-Pérez et al., 2013; Keller, Werner, & Pantel, 2019).

Identifikation von DTCs mittels TP53-Mutationsanalyse

In der großen britischen Studie zur Erforschung der Tumorevolution von Lungentumoren TRACERx wurden multiple Tumoreareale von 100 NSCLC Patienten sequenziert und unter anderem die zeitliche Evolution von Mutationen und Genomaberrationen untersucht. Hierbei zeigten sich Mutation in dem Tumorsuppressorgen TP53 als frühe Ereignisse in der Tumorentwicklung von NSCLC und meistens als klonale Mutationen (Jamal-Hanjani et al., 2017). Zudem ist TP53 eines der häufigsten mutierten Gene in Karzinomen (bis zu 66% aller NSCLC) und wurde in Patienten mit Lungentumoren mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht (Mogi & Kuwano, 2011; Tate et al., 2019).

Aufgrund der häufigen Mutationsraten und der vorbeschriebenen Klonalität der TP53 Mutationen (die somit alle malignen Zellen aufweisen sollten) ist theoretisch anzunehmen, dass auch in disseminierten Tumorzellen Alterationen in dem TP53-Gen nachzuweisen sind. In der Sanger Sequenzierung der Exone 5-8 zeigten sich allerdings nur wenige Mutationen (9,8% der Lymphknoten-Zellen und 4,88% der Knochenmark-Zellen). Zudem konnten TP53-Mutationen

nur in 20% (LK) bzw. 10% (KM) der Patienten nachgewiesen werden. Die somit nachgewiesenen Mutationsraten sind um einiges niedriger als in der Literatur beschrieben (Jamal-Hanjani et al., 2017; Mogi & Kuwano, 2011; Tate et al., 2019). Bereits 1999 konnte von Offner et al. gezeigt werden, dass immortalisierte Zelllinien von mikrometastatischen Zellen aus dem Knochenmark von NSCLC Patienten keine TP53-Mutation aufweisen und die Alteration dieses Gens somit nicht notwendig ist für die hämatogene Disseminierung (Offner et al., 1999). Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass die hier verwendete Immortalisierung mit dem Simian-Virus 40 (SV40) großem T Antigen TP53 inhibiert (Sheppard, Corneillie, Espiritu, Gatti, & Liu, 1999) und somit einen Einfluss auf den Nachweis von Mutationen in diesem Gen haben könnte.

Des Weiteren zeigte die Analyse von Primärtumoren und DTCs von 15 NSCLC Patienten, dass in neun der Patienten keine TP53 Mutation in den Knochenmarks-DTCs vorliegt. Interessanterweise waren zwei dieser Tumoren nachgewiesenermaßen TP53-mutant (Blankenstein, 2013; Klein et al., 2002).

Zusammenfassend ist somit anzunehmen, dass die Disseminierung von DTCs zeitlich vor der Akquirierung von TP53-Mutationen in dem Primärtumor erfolgt. Da TP53-Mutationen allerdings häufig eine Klonalität in den Tumoren aufweisen und zu frühen und treibenden Mutationen in der Tumorevolution zählen, scheint die Disseminierung von DTCs ein äußerst frühes Phänomen in der Entwicklung von NSCLC darzustellen.

5.3 Systematische genomische und transkriptomische Charakterisierung von DTCs

Da die gezielte Genexpressions-Analyse mittels PCR oder die Sanger-Sequenzierung des TP53-Gens keine eindeutige Klassifizierung der isolierten Einzelzellen ermöglicht, mussten die Zellen systematisch genetisch analysiert werden. Die Amplifikation des Einzelzell-Genoms (Klein et al., 1999) bzw. die kombinierte Genom- und Transkriptom-Amplifikation der Zellen (Klein et al., 2003) erlaubt sowohl die Untersuchung des Genoms (z.B. Genomaberrationen mittels LowPass Genom-Sequenzierung) und die Analyse der globalen Genexpression mittels RNA-Seq. Dabei wurden Zellen mit aberranten Genomen als echte DTCs klassifiziert.

LowPass Genom-Sequenzierung

Die LowPass-Sequenzierung der Einzelzell-Genome erlaubt die Untersuchung von numerischen Genomaberrationen, wobei Punktmutationen und strukturelle Aberrationen (Translokationen, Fusionen etc.) bei dieser Analyse unentdeckt bleiben.

Bei HEA-125 bzw. A45-positiven Zellen aus dem Knochenmark können - unabhängig von der Färbung – in knapp über 50% der Zellen Aberrationen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sind bereits publizierten Daten in anderen Tumorentitäten sehr ähnlich. Dort konnten in 38% der untersuchten HEA-125-positiven Prostata-CA DTCs (Guzvic et al., 2014) bzw. in 65,5% und 53,8% von EpCAM-positiven DTCs aus Mamma-CA Patienten (Haunschild, 2013; Irlbeck, 2019) Genomaberrationen nachgewiesen werden. Durchaus verwunderlich ist jedoch der sogar leicht höhere Anteil an aberranten Zellen in der Gruppe der A45-positiven Knochenmark-Zellen bei NSCLC Patienten (55,6%), da der Nachweis dieser Zellen keinerlei Auswirkungen auf das Überleben der Patienten zeigt. Dagegen zeigt der Nachweis von HEA-125-positiven Zellen aus dem Knochenmark eine signifikante Reduktion des Überlebens der NSCLC Patienten und mit 51,6% einen ähnlichen Anteil an aberranten Zellen. Möglicherweise handelt es sich bei den Zytokeratin (A45)-positiven und den EpCAM (HEA-125)-positiven Zellen um verschiedene Subgruppen an disseminierten Tumorzellen, wobei die HEA-125-positiven Zellen aufgrund von einem proliferativen, aktivierten oder aggressiveren Phänotyp das Überleben innerhalb des Follow-Up Zeitraums von knapp drei Jahren signifikant beeinflussen. (Chaves-Pérez et al., 2013; Keller et al., 2019). Interessanterweise waren in Knochenmark-Proben von Mamma-CA Patienten, die mittels EpCAM/CK-Doppelfärbung untersucht wurden, alle CK+ Zellen ebenfalls EpCAM+. Dagegen wiesen 8% der untersuchten Proben EpCAM+/CK- Zellen auf (Haunschild, 2013). Dieser Anteil an Zytokeratin-negativen und EpCAM-positiven Zellen könnte zumindest zum Teil den unterschiedlichen prognostischen Effekt der beiden Färbungen auf das Überleben verursachen. Möglicherweise befinden sich auch die DTCs, die mittels der Zytokeratin-Färbung im Knochenmark nachgewiesen werden – im Gegensatz zu den EpCAM-positiven Zellen in einem (genetisch) unreiferen und/oder schlafenden (*dormant*) Zustand und verursachen innerhalb der (durchschnittlich) drei Jahre Follow-Up (noch) keine Metastasen und folglich reduziertem Überleben. Eine weitere mögliche Ursache für diesen unterschiedlichen Effekt könnte in den Genomaberrationen der beiden Zellgruppen liegen. Dort zeigen sich vor allem bei HEA-125-positiven Zellen wiederkehrende Genomaberrationen (zum Beispiel eine Deletion auf Chromosom 19 in bis zu 75% der untersuchten Zellen), wohingegen A45-positiven Zellen ein

sehr heterogenes Bild an CNV-Profilen aufweisen. Einschränkend muss erwähnt werden, dass der prognostische Effekt von CK-positiven Zellen in anderen Studien auch innerhalb von wenigen Jahren Follow-Up gezeigt werden konnte (Tabelle 1).

Im Lymphknoten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Anteilen an aberranten Zellen von HEA-125 und BerEp4-positiven Zellen (Chi^2 : $p < 0,001$), wobei sich dieser Unterschied sowohl bei pN0 Lymphknoten als auch bei pN+ Lymphknoten zu beobachten war (Chi^2 : $p < 0,001$). Da im Laufe der Tumorevolution häufig eine chromosomale Instabilität mit folgender Diversifikation der genomischen Aberration auftritt (Gerstung et al., 2020), ist es nicht verwunderlich, dass bei Patienten mit pathologisch gesicherten Lymphknotenmetastasen (pN+) auch mehr Aberrationen auftreten. Des Weiteren ist bei der Cluster-Analyse anhand der Genomaberrationen der einzelnen Proben eine Korrelation des N-Status und dem Ausmaß der Disseminierung (DCCD) mit stärker aberranten Genomprofilen zu beobachten.

Die genauen Epitope der Antikörper-Bindungsstellen sind in der Literatur nicht näher beschrieben, weswegen der höhere Anteil an aberranten Zellen bei der BerEp4-Färbung möglicherweise durch Unterschiede der Antikörper-Spezifitäten oder -Bindungsstellen hervorgerufen werden könnte. Hierbei wäre es möglich, dass die BerEp4-Färbung spezifischer an EpCAM bindet und somit einen höheren Anteil an echten DTCs (hier als aberrante Zellen definiert) detektiert. Da die Expression von EpCAM vor allem in proliferativen Stadien der Tumorprogression erhöht ist und weniger bei der frühen Invasion/Migration zu beobachten ist (Driemel et al., 2014) könnte man jedoch auch argumentieren, dass die BerEp4-Färbung präferenziell DTCs in proliferativen Stadien mit höherer EpCAM Expression detektiert und die HEA-125-Färbung auch Zellen in der schlafenden (*dormant*) Phase mit geringerer EpCAM-Expression nachweisen kann. Für diese Hypothese spricht auch die Beobachtung, dass EpCAM mRNA-positive Zellen im Lymphknoten zu einem signifikant höheren Anteil Genomaberrationen aufweisen als mRNA-negative Zellen. Eine Akkumulation von CNVs ist mit späteren Stadien der Tumorevolution verbunden, wohingegen in den frühen Phasen eher Mutationen in treibenden (Onko-)Genen beschrieben sind (Gerstung et al., 2020).

Vergleicht man die Genomprofile der aberranten HEA-125 und BerEp4-positiven Lymphknoten-Zellen aus pN0 bzw. pN+ Lymphknoten, so zeigen sich zwischen den Gruppen bis auf eine kleine Amplifikation auf Chromosom 1 bei pN+ Zellen keine signifikanten Unterschiede. Somit scheint der maßgebliche Unterschied bei den beiden Antikörpern im Anteil der aberranten Zellen, jedoch nicht bei den Aberrationen selbst, zu liegen.

Vergleich mit dem Primärtumor

Tabelle 51 zeigt die häufigsten beschriebenen Genomaberrationen von NSCLC Primärtumoren (Jamal-Hanjani et al., 2017; Lukeis, Irving, Garson, & Hasthorpe, 1990; Pikor, Ramnarine, Lam, & Lam, 2013; Testa et al., 1994; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2012, 2014). Diese typischen Aberrationen in NSCLC Tumoren zeigen sich auch zum Großteil in den in dieser Arbeit untersuchten Primärtumoren. Darüber hinaus zeigen auch Zellen aus pN+ Lymphknoten einige dieser typischen CNVs auf, wohingegen Zellen aus pN0 Lymphknoten und aus dem Knochenmark insgesamt weniger Aberrationen und auch nur sehr wenige der typischen Aberrationen aus Tabelle 51 aufweisen.

Tabelle 51: Häufige CNVs in NSCLC Tumoren

<i>Deletionen</i>	<i>Amplifikationen</i>
3p	1q
4p	3q
5q	5p
8p	7
9	8q
10q	20q
13q	
17p	
19p	
21p	

Übersicht über die in der Literatur am häufigsten beschriebenen Genomaberrationen in NSCLC Primärtumoren.

Der maligne Ursprung der EpCAM-positiven Zellen aus Lymphknoten von Patienten mit pN+ Status scheint somit durchaus wahrscheinlich, wobei dies für Zellen aus pN0 Lymphknoten und dem Knochenmark nicht offensichtlich ist. Einerseits wäre es denkbar, dass es sich bei diesen Zellen nicht um disseminierte Tumorzellen eines Bronchial-Karzinoms handelt, sondern um native EpCAM-positive Zellen, die auch bei gesunden Patienten gefunden werden können. Das aberrante Genom und die klinische Assoziation mit einem kürzeren Überleben legen jedoch nahe, dass es sich dabei um echte DTCs handelt, die lediglich (wesentlich) unterschiedliche bzw. weniger genomische Aberrationen aufweisen. Dies bekräftigt die Hypothese der parallelen Evolution von DTCs (Klein, 2009; Klein et al., 1999). Bei der Charakterisierung von Melanom-DTCs konnte bereits gezeigt werden, dass disseminierte Tumorzellen ein zeitlich sehr frühes Ereignis in der Tumorentwicklung darstellen und die notwendigen (onkogenen) Alterationen zur Kolonialisierung anderer Organe außerhalb der Primärtumors erworben

werden (genetische Reifung der DTCs) (Werner-Klein et al., 2018). Vereinbar mit diesem Modell sind auch die Anteile der gemeinsamen Aberrationen zwischen DTCs und Primärtumor in diesem Kollektiv. Lediglich 13-22% des aberranten Genoms des Primärtumors konnte in den DTCs (pN0 Lymphknoten und Knochenmark) detektiert werden, wobei dieser Anteil bei Zellen aus pN+ Lymphknoten auf bis zu 61% ansteigt. Bei einer kontinuierlichen Disseminierung von Tumorzellen / linearen Tumorprogression (Bross et al., 1975; Fearon & Vogelstein, 1990; Weinberg, 2008) würde man (insbesondere im Knochenmark und in pN0 Lymphknoten) eine stärkere Korrelation bzw. Konkordanz der Genomprofile zwischen DTCs und PT erwarten.

Besonders interessant ist zudem auch, dass bei den metastatischen Läsionen, die bei vier der Patienten mit untersucht werden konnten, zum Teil große Unterschiede in den CNV-Profilen beobachten lassen. Durchschnittlich waren nur 54% des aberranten Primärtumor-Genoms in den Metastasen nachweisbar. Während bei einer Metastase 100% der Primärtumor-Aberrationen festgestellt werden konnten, zeigten die anderen Läsionen lediglich zu 15,2%, 37,3% und 63,7% die Aberrationen des Primärtumors. Diese großen (genomischen/genetischen) Unterschiede von initialen und metastatischen Läsionen konnten bereits mehrfach für NSCLC Tumoren gezeigt werden (E. Y. Kim et al., 2016; L. Liao et al., 2018; Saber et al., 2016). Einhergehend mit der Hypothese der parallelen Progression und der genetischen Reifung von DTCs fernab der Primärtumors, scheinen die isolierten DTCs (als potentielle Metastasen-initiiierende Zellen) tendenziell mehr Gemeinsamkeiten mit den metastatischen Läsionen, als mit dem Primärtumor aufzuweisen.

Zusammenfassend konnte die Analyse der Genomprofile der Einzelzellen zeigen, dass ein Großteil der Zellen Aberrationen aufweisen und somit der maligne Ursprung als wahrscheinlich angesehen werden kann. Innerhalb der DTCs zeigen sich jedoch Subgruppen mit wenigen Alterationen (pN0 Lymphknoten und Knochenmark) und deutliche Unterschiede zwischen pN0 und pN+ Lymphknoten-Zellen bzw. EpCAM mRNA-negativen und positiven LK-Zellen im Hinblick auf den Anteil der aberranten Zellen. Bei den Aberrationen selbst zeigen sich jedoch keine bzw. nur sehr wenige signifikante Unterschiede zwischen A45/HEA-125 (KM) oder BerEp4/HEA-125-positiven Zellen (LK).

RNA-Seq Analyse

Wenn Tumorzellen disseminieren bestimmt unter anderem auch die neue Umgebung das Schicksal dieser Zellen. Dabei zählt das Knochenmark zum Beispiel zu einem restriktiven Umfeld, in dem die Tumorzellen in eine schlafende Phase (*dormancy*) versetzt werden und für

längere Zeit ruhen, bis sie möglicherweise Jahre später wieder aktiviert werden können (Maria Soledad Sosa, Bragado, Debnath, & Aguirre-Ghiso, 2013). Dabei einhergehend sind gravierende Veränderungen der Signalwege und der transkribierten Gene. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie BHLHB3, NR2F1 oder TP53 und aktivierte Stress-Signalwege (niedriges Verhältnis von ERK/p38) führen zu einem Zellarrest in der G₀-G₁ Phase und liefern die notwendigen Überlebenssignale in der schlafenden Phase (María Soledad Sosa, Bragado, & Aguirre-Ghiso, 2014; Maria Soledad Sosa et al., 2013). Die Analyse von DTCs aus Pleuraergüssen von Lungen-Adenokarzinom Patienten mittels Einzelzell-RNA-Seq zeigte des Weiteren vier distinkte Subgruppen, wobei die Pathway-Analyse folgende Phänotypen identifizierte: Immunantwort, Proliferation, Zelladhäsion und Apoptose (Dong, Wang, & Shi, 2020).

Die in dieser Arbeit untersuchten putativen DTCs sollten demnach auch auf transkriptomischer Ebene untersucht werden. Die über 200 sequenzierten Zellen konnten in fünf distinkte Gruppen eingeordnet werden. Ähnlich wie bei Dong et al. waren in den fünf Gruppen Signalwege der i) Zelladhäsion, ii) der Antigen-Präsentation / Immunantwort, iii) der Aktivierung von T- und B-Zellen, iv) der Immunaktivierung bzw. -regulierung und v) der Zellteilung aktiviert (Dong et al., 2020). Die anhand der Expressionsmuster bestimmten mutmaßlichen Zellidentitäten waren jedoch zum Großteil Zellreihen des hämatopoietischen Systems. Lediglich Gruppe 1 wies mit einem Phänotyp von bronchialen Epithelzellen einen vermeintlichen Ursprung aus NSCLC Tumoren auf.

Im Jahr 2009 wurde von Peter Gout et al. bei Prostata-CA Zellen eine Expression von typischen Immunmarkern beobachtet. Sie postulierten - analog zu der EMT - eine *epithelial immune cell-like transition* (EIT), bei der Tumorzellen durch Transdifferenzierung Immunmarker exprimieren und somit aktiv einen Immun-suppressiven Phänotyp induzieren können (Choi, Gout, Collins, & Wang, 2012; Gout et al., 2009). In Anbetracht der teilweise erheblichen Anteile an aberranten Zellen in den Gruppen 3-5 mit einem Phänotyp von B-/T-Zellen, Plasmazellen und erythroiden Vorläuferzellen bietet die Hypothese der EIT eine mögliche Erklärung dieser immunologischen Expressionsmuster von teils aberranten Zellen.

Besonders deutlich ist in diesem Kollektiv die Trennung von den EpCAM-positiven Kontrollzellen aus dem Lymphknoten zu sehen, wobei sich 80% dieser Zellen in Gruppe 2 befinden und die beiden NSCLC Patienten, die ebenfalls Zellen mit diesem Phänotyp aufweisen (ohne Aberrationen) in dem gesamten Follow-Up Zeitraum nicht verstarben. Diese Daten deuten darauf hin, dass es sich hierbei um myeloide Zellen mit einer aktivierten (Auto-)

Immunreaktivität handelt und diese Zellen ein mögliches Reservoir an nativen EpCAM-positiven Zellen darstellt. Dahingegen clustern die Kontrollzellen aus dem Knochenmark in den beiden Gruppen 4 und 5; zusammen mit aberranten Zellen von NSCLC Patienten. Hier scheint die alleinige Analyse des Transkriptom keine eindeutige Unterscheidung zu erlauben.

Während die Patienten mit EpCAM-positiven Zellen und einem transkriptomischen Phänotyp von bronchialen Epithelzellen am schnellsten versterben, weisen die Gruppen 3-5 mit einer mutmaßlichen hämatopoietischen Identität ebenfalls ein deutlich eingeschränktes OS und PFS auf. Hier ist durchaus zu erwägen, dass es sich trotz immunologischem Phänotyp um echte DTCs handelt. Auffallend ist vor allem, dass gerade die erythroide Zellgruppe das zweitschlechteste OS aufweisen. Die Betrachtung der EpCAM Expressions-Levels in den beiden Gruppen 1 und 5 zeigen ähnlich hohe bzw. niedrige Werte für EpCAM und CD45 und weisen somit eine hohe Korrelation auf. Hier bestätigt sich erneut, dass der Nachweis der EpCAM mRNA mit einem eingeschränktem Überleben der Patienten einhergeht (Chaves-Pérez et al., 2013; Keller et al., 2019). Gruppe 5 ist zudem die einzige Gruppe mit einer hohen Expression des Proliferationsmarkers MKI67. Dies ist einerseits mit hämatopoietischen Vorläuferzellen vereinbar, da diese ein hohes Zellteilungspotential haben, andererseits ist im Hinblick auf den Anteil der aberranten Zellen (38%) und dem hohen Anteil von M1 Zellen in dieser Gruppe (aus Knochenmark und Lymphknoten) ein (re-)aktiviertes Stadium von vormals schlafenden DTCs durchaus denkbar.

5.4 Schlussfolgerung

Der Nachweis von minimaler Resterkrankung (Nachweis von EpCAM oder CK-positiven Einzelzellen) in Lymphknoten und Knochenmark bei knapp 300 NSCLC Patienten in dieser Studie konnte eine signifikante Korrelation mit einem reduzierten Überleben der Patienten zeigen. Dieser Effekt war bei der zusätzlichen genetischen Charakterisierung mittels genspezifischer PCR zum Nachweis des EpCAM-Transkriptes zudem deutlich ausgeprägter und konnte sogar in pathologisch tumorfreien Lymphknoten einen signifikanten Überlebensunterschied zeigen. Da jedoch auch bei Nicht-Tumor Patienten zu ähnlichen Anteilen EpCAM-positive Zellen nachgewiesen werden konnten, sollte die weitergehende Untersuchung der Zellen mittels genspezifischer PCRs für ausgewählte Transkripte oder die TP53-Mutationsanalyse die Identität bzw. den malignen Ursprung dieser Zellen analysieren. Hierbei zeigte sich kein offensichtlicher Nutzen der verwendeten Marker in der Unterscheidung der Zelltypen.

Die Genom-weite Analyse von numerischen Chromosomenaberrationen zeigte einen relativ hohen Anteil an aberranten Zellen (52-94%), was prinzipiell gut zu den beobachteten klinischen Assoziationen passt. Eine Transkriptom-weite Expressionsanalyse mittels RNA-Seq der Einzelzellen zeigte überraschenderweise einen prädominanten Immunzell-Phänotyp der DTCs, was intuitiv im Widerspruch zu den aberranten Genomprofilen und den klinischen Daten steht. Für diese Diskordanz und Heterogenität der transkriptomischen Phänotypen sind mehrere Gründe denkbar:

- 1) Es könnte angenommen werden, dass es sich bei den Zellpopulationen um verschiedene Zellarten von (nativen) EpCAM+ Zellen handelt und es sich nur bei einem Bruchteil der isolierten Zellen um echte DTCs handelt. Es ist vorbeschrieben, dass Langerhans-Zellen in Lymphknoten und erythroide Vorläuferzellen EpCAM (oder das verwandte TROP-2) exprimieren können (Choemmel et al., 2004; Eisenwort et al., 2011; Gaiser et al., 2012; Guzvic et al., 2014; Lammers et al., 2002; Villablanca & Mora, 2008). Geht man bei dem erythroiden Phänotyp mancher Zellen von echten hämatopoietischen Vorläuferzellen aus, die EpCAM exprimieren, so könnte das Vorhandensein dieser Zellen auch im Lymphknoten durch eine extramedulläre Hämatopoiese erklärt werden. Dies ist bei Karzinom-Patienten gelegentlich beschrieben. Allerdings zeigte eine retrospektive Review-Arbeit in einem Zeitraum von 37 Jahren nur 42 publizierte Fälle, wobei diese extramedullären hämatopoietischen Zellen keine epithelialen Marker exprimierten (Badr, Roberts, & Shaaban, 2019; Bao et al., 2018). Somit scheint es sich hierbei um ein seltenes Phänomen zu handeln, das die Beobachtungen dieser Studie nicht gänzlich erklären kann.
- 2) In Mamma-CA Patienten haben Cluster von zirkulierenden Tumorzellen ein 23-50-fach höheres metastatisches Potential als einzelne CTCs (Aceto et al., 2014). Insbesondere bei der Ko-Expression von epithelialen und hämatopoietischen Markern könnte der Verdacht von heterotypen Zellclustern (Tumorzellen und Immunzellen) aufkommen. Das Vorhandensein von solchen Clustern mit DTCs und Immunzellen ist in diesem Kollektiv nicht zu 100% auszuschließen, jedoch wurden die positiv gefärbten Zellen während der Mikromanipulation multipel visuell inspiziert, um sicherzustellen, dass es sich um eine einzelne Zelle ohne Kontamination (z.B. durch andere Zellen) handelt.
- 3) Die unterschiedlichen Expressionsprofile der Zellgruppen könnten zudem dadurch erklärt werden, dass DTC-intrinsische Faktoren, wie zum Beispiel die Genexpression, den Ort der Disseminierung determinieren. Dieser Expressions-abhängige Organ-

Tropismus konnte bei CTCs, die vorwiegend Hirnmetastasen bildeten bereits gezeigt werden (Klotz et al., 2020; Zhang et al., 2013). In dieser Studie wäre somit ein B-Zell oder T-Zell Phänotyp mit der Streuung in Lymphknoten und ein Plasmazell-Phänotyp mit der hämatogenen Disseminierung assoziiert, wobei die Expression eines erythroiden Profils einen Tropismus in beide Organe bedeuten könnte.

- 4) Des Weiteren ist es auch möglich, dass sich die DTCs dem neuen *microenvironment* adaptieren und sich durch eine phänotypische Plastizität dieser metastatischen Nische anpassen bzw. durch das Immunsystem oder der metastatischen Nische selbst bestimmte Programme und somit verschiedene DTC-Phänotypen induziert werden (Goddard, Bozic, Riddell, & Ghajar, 2018; María Soledad Sosa et al., 2014; Wikman, Vessella, & Pantel, 2008). Die Hypothese der *epithelial immune cell-like transition* bietet ebenfalls eine mögliche Erklärung für die häufige Expression von typischen Immunmarkern und könnte den Zellen einen Vorteil im Sinne der aktiven Immunevasion bringen (Choi et al., 2012; Gout et al., 2009)
- 5) Besonders kontrovers wäre es zudem noch denkbar, dass es sich bei den Zellen mit Ko-Expression von epithelialen und hämatopoietischen Markern um Zellfusionen zwischen Tumorzellen und Immunzellen handelt. Bereits 1911 wurde von Otto Aichel diese Hypothese der Zellfusionierung von Tumorzellen und Blutzellen zur Migration und Immunevasion aufgestellt (Aichel, 1911). Diese Hypothese lässt sich in humanen Patienten nur schwierig belegen. Besonders überzeugend sind dabei jedoch Studien, in denen bei Karzinompatienten mit einer vorangegangenen sex-mismatch Knochenmarkstransplantation in den Tumorzellen auch das anders-geschlechtliche Genom (des Stammzell-Spenders) entdeckt werden konnte (z.B. Nachweis eines Y-Chromosoms in knapp 5% der CK-positiven Tumorzellen eines Pankreas-CA einer Frau) (Gast et al., 2018). Tumorzellfusionen sind mit einer Reihe von Immunzellen (am häufigsten mit Makrophagen, jedoch auch mit B-Zellen, dendritischen Zellen, Endothelzellen u.a.) beschrieben (Review von Jiang, Yan, Xu, & Shang, 2019). In NSCLC Patienten zeigen die experimentellen Daten einen signifikanten Zusammenhang des OS/PFS der Patienten mit Tumorzellfusionen und zudem ein erhöhtes metastatisches Potenzial und eine Plastizität im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition und der *stemness* (Review von (Manjunath et al., 2020). Zumindest bei einem Teil der Zellen in dem Kollektiv dieser Studie zeigen sich jedoch stark ausgeprägte Genomaberrationen. Bei der Fusion der Tumorzelle mit einer normalen Immunzelle (mit nicht-aberrantem Genom) würde man daher solche starken CNVs nicht unbedingt erwarten.

Diese Arbeit liefert neue und einzigartige Einblicke in die Genetik der frühen Disseminierung bei NSCLC Patienten. Die untersuchten EpCAM-positiven Zellen sind klar mit einem niedrigeren Gesamtüberleben und progressionsfreien Überleben assoziiert, wobei nicht gänzlich auszuschließen ist, dass es sich bei den EpCAM-positiven Zellen um ein Epiphänomen in den NSCLC Patienten handelt und bisher unbekannte (aber vermutlich abhängige) Faktoren diesen Effekt verursachen. Da diese Zellen jedoch relativ häufig Genomaberrationen aufweisen, scheint der maligne Ursprung durchaus wahrscheinlich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben Hinweise darauf, dass es sich bei den isolierten EpCAM-positiven Zellen um echte DTCs handelt, die sich unabhängig vom Primärtumor in der metastatischen Nische entwickeln bzw. dort zu kompetenten Metastasen-initiiierenden Zellen reifen. Es kann postuliert werden, dass es sich bei EpCAM mRNA-negativen und mRNA-positiven Zellen aus pN0 Lymphknoten um unterschiedliche Stadien der DTC-Aktivierung handelt, wobei das EpCAM-Transkript als möglicher Aktivierungsmarker von DTCs genutzt werden könnte. Da die Genomprofile von pN+ Zellen dem Primärtumor ähnlicher sind (41-61% gemeinsames aberrantes Genom) ist schwer zu sagen, ob es sich hierbei um einen genetisch reifen Zustand von früh disseminierten DTCs handelt, die aufgrund von NSCLC-typischen (möglicherweise notwendigen) onkogenen Veränderungen eine konvergente Evolution mit dem Primärtumor zeigen, oder ob in den späten Phasen des Tumorwachstums eine kontinuierliche Tumorausbreitung (*per continuitatem*) in die lokoregionären Lymphknoten erfolgte und somit das Genomprofil des Primärtumors widerspiegelt.

Analog könnten Zytokeratin-positive Zellen im Knochenmark aufgrund ähnlich häufiger, jedoch stärker heterogener Aberrationen als bei EpCAM-positiven Zellen eine frühere Phase der genetischen DTC-Maturierung darstellen. Dies könnte auch den Unterschied in den klinischen Korrelationen bei CK und EpCAM-positiven Zellen im Knochenmark erklären, indem CK-positive Zellen sich noch in einer genetisch unreifen Phase befinden und erst bei der Akkumulation von wiederkehrenden - vermutlich notwendigen - Aberrationen (z.B. Deletion auf Chromosom 19) genetisch reif und klinisch relevant werden.

Jedoch sind weiterhin viele Fragen - unter anderem die Identität der EpCAM-positiven Zellen in Nicht-Tumorpatienten - unbeantwortet. Auch die Heterogenität der Genexpression und der prädominante Phänotyp von Immunzellen stellen weiterhin die Identität dieser Zellen als früh disseminierte Tumorzellen (zum Teil) in Frage. Weitergehende Analysen sind notwendig, um die maligne Herkunft zu belegen. Hierbei könnte die Genom- bzw. Transkriptom-weite Mutationsanalyse der Zellen erwogen werden. Da der Tabakkonsum einer der größten

(kausalen) Risikofaktoren für die Entstehung von Lungentumoren darstellt, sollte in den malignen DTCs auch ein passendes Mutationsmuster (*smoking signature*) zu finden sein. Die kombinierte Analyse mit den Primärtumoren und den Metastasen (z.B. mittels Whole-Exome-Sequencing) könnte zudem die Evolution dieser Tumoren genauer beschreiben.

6 Zusammenfassung

Trotz bestmöglicher Therapie von NSCLC in frühen Stadien versterben viele der Patienten an der metastatischen Aussaat - auch nach kurativer Resektion des Tumors und adjuvanter Therapie. Das Modell der parallelen Progression und der frühen Tumorzell-Disseminierung bietet eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen, wobei bereits sehr früh Tumorzellen in distante Organe streuen (DTCs) und dort in einer schlafenden Phase (und somit resistent gegenüber einer Chemotherapie, die meist in die Zellteilung eingreift) überleben. Diese Zellen stellen somit ein Reservoir an möglichen Metastasen-initiiierenden Zellen dar.

Das Ziel dieser Studie war die Untersuchung der minimalen Resterkrankung (MRD) in Lymphknoten und Knochenmark von NSCLC Patienten mittels epithelialer Immunfärbung (*Epithelial Cell Adhesion Molecule* / EpCAM und Zytokeratinen / CK) in mesenchymalen Organen. Da der Nachweis dieser Zellen in NSCLC zu widersprüchlichen Ergebnissen in Bezug auf die klinische Relevanz / das Überleben der Patienten zeigte, sollte anhand eines mehrjährigen Follow-Up dieser Patienten die Assoziation zu klinischen Merkmalen untersucht werden. Des Weiteren sollten, da auch bei gesunden Patienten EpCAM-positive Zellen detektiert werden können, durch weitergehende genetische Analyse echte disseminierte Tumorzellen identifiziert und charakterisiert werden.

In dieser Arbeit wurden EpCAM und CK-positive Zellen - als putative DTCs - aus dem Knochenmark und lokoregionären Lymphknoten in NSCLC Patienten untersucht. Bereits der Nachweis mindestens einer EpCAM-positiven Zelle im Lymphknoten oder dem Knochenmark zeigte ein signifikant reduziertes Überleben. Dieser Effekt konnte mit einer genspezifischen EpCAM-PCR zum Nachweis des Transkriptes noch verbessert werden, wobei hier selbst in Patienten ohne Lymphknotenmetastasen (pN0) ein prognostischer Nutzen sichtbar war.

Die gezielte Analyse weiterer ausgewählter Gene erlaubte jedoch keine eindeutige Trennung von EpCAM-positiven Zellen aus NSCLC oder gesunden Kontrollpatienten. Auch die Sequenzierung des am häufigsten mutierten Gen in NSCLC Tumoren - TP53 - war aufgrund der niedrigen Detektionsraten nicht zur routine-mäßigen Identifizierung von echten DTCs geeignet und zeigte weiterhin, dass die Disseminierung dieser Zellen vermutlich zu sehr frühen Stadien der Tumorentwicklung erfolgt.

Letztlich wurden die Genome der DTCs sequenziert und der maligne Ursprung durch ein aberrantes Genomprofil klassifiziert. Die Daten deuten darauf hin, dass es unterschiedliche Subpopulationen von DTCs gibt, die womöglich verschiedene Stadien der genetischen Reifung

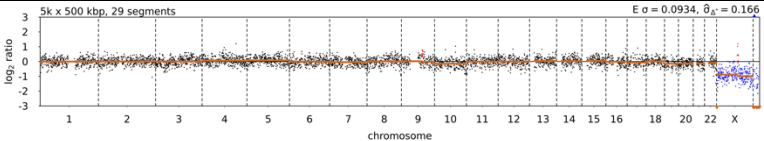
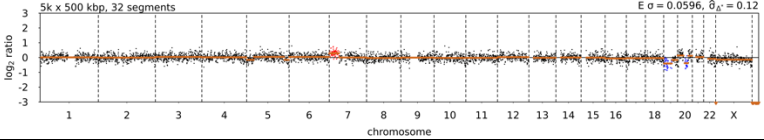
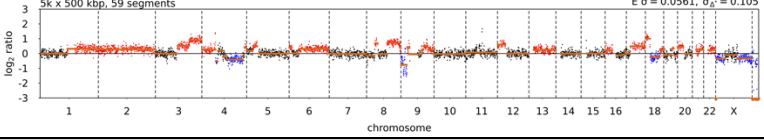
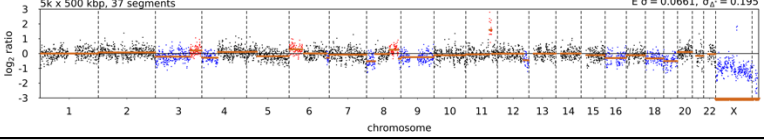
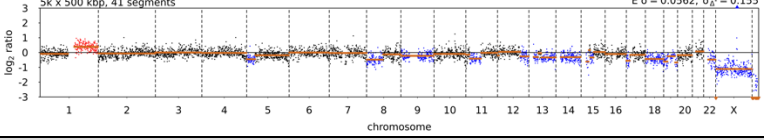
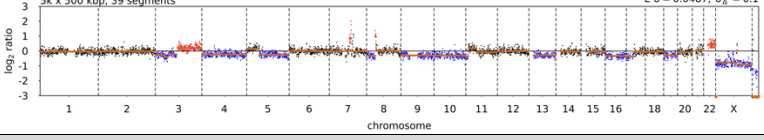
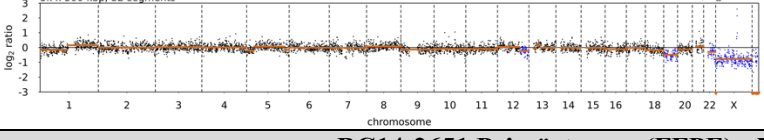
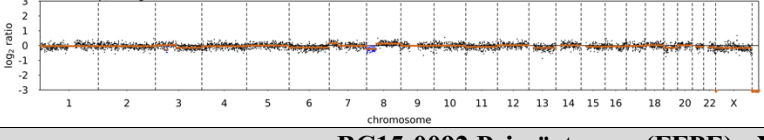
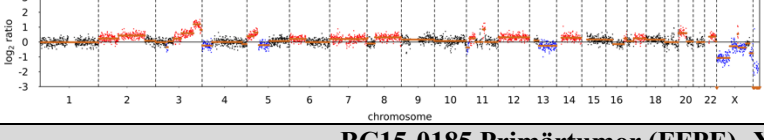
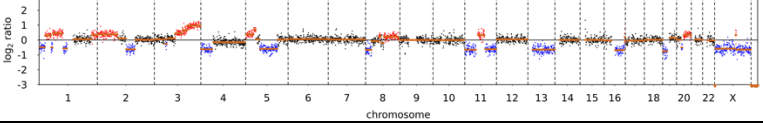
von DTCs darstellen. So könnte die aktive Transkription von EpCAM ein Aktivierungsmarker für DTCs in genetisch reifen bzw. reiferen Stadien darstellen, da diese Zellen häufiger Aberrationen aufweisen und mit einem signifikant schlechteren Überleben korrelieren.

Die Analyse der Genexpression dieser Zellen mittels RNA-Seq erlaubte die Einteilung in fünf distinkte Gruppen. Hier konnte ein durchaus hohes Ausmaß an Plastizität der Genexpression beobachtet werden, da vier der fünf Gruppen einen hämatopoietischen Phänotyp aufweisen. In allen Gruppen, die aberrante Zellen beinhalten (4/5) konnte zudem ein Effekt auf das Überleben der Patienten beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern erste Einblicke in die Genetik der frühen Disseminierung bei NSCLC Patienten, wobei einige essentielle Fragen wie zum Beispiel die Identität v.a. der Knochenmark-Kontrollzellen weiterhin offenbleiben. Eine weitergehende Analyse dieser Zellen eröffnet möglicherweise neue Behandlungsstrategien und könnte wertvolle Informationen zu der Metastasierung von NSCLC Tumoren liefern.

7. Anhang

7.1 CNV Profile von NSCLC Primärtumoren ohne DTC Nachweis

BC12-2130 Primärtumor (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,166
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC12-2270 Primärtumor (FFPE) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,12
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2290 Primärtumor (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,105
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2348 Primärtumor (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,195
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2450 Primärtumor (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,155
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2535 Primärtumor (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,1
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2571 Primärtumor (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,13
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2651 Primärtumor (FFPE) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,0952
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0092 Primärtumor (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,116
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0185 Primärtumor (FFPE) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,112
			Qualität	gut
			Status	aberrant

BC15-0293 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,103
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0507 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,082
	Qualität	gut
	Status	balanciert

Gezeigt sind die CNV Profile der Primärtumoren, bei denen keine DTCs gefunden werden konnten (links), mitsamt der beobachteten Standardabweichung $\sigma\Delta^*$ der QDNaseq-Analyse, der Einteilung der Profilqualität (siehe 4.4.1 LowPass Genom-Sequenzierung der isolierten Einzelzellen) und dem CNV-Status (rechts). FFPE entspricht Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe. Für jede Probe ist das Geschlecht des Patienten als Satz der Gonosomen (XY = Mann; XX = Frau) angegeben.

7.2 CNV Profile von NSCLC Proben mit DTC Nachweis

BC11-2057 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,0948
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC11-2057 LK TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,15
	Qualität	gut
	Status	balanciert

BC11-2058 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,107
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC11-2058 Primärtumor Stanze 2 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,115
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC11-2058 Primärtumor Stanze 3 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC11-2058 LK2 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,129
	Qualität	gut
	Status	balanciert

BC12-2068 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,142
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2068 KM TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,138
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC12-2068 KM TZ1 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC12-2083 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,12
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2083 KM TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,237
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2083 LK1 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,125
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2083 LK1 TZ2 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,128
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2083 LK1 TZ3 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2083 LK1 TZ4 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,137
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2083 LK1 TZ5 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,22
	Qualität	gut
	Status	aberrant

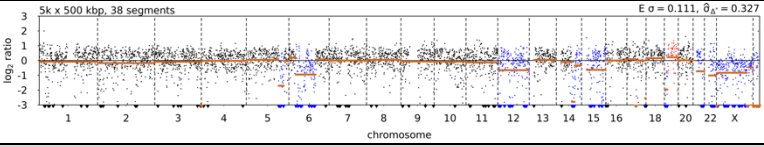
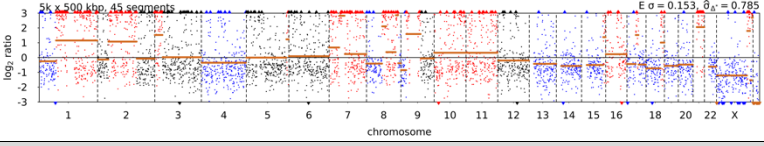
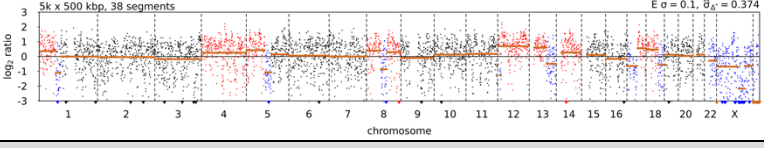
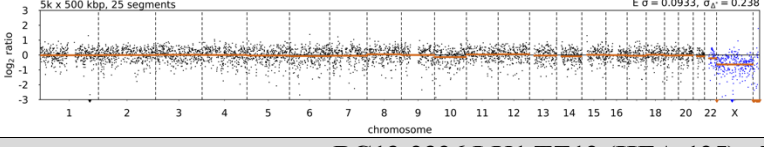
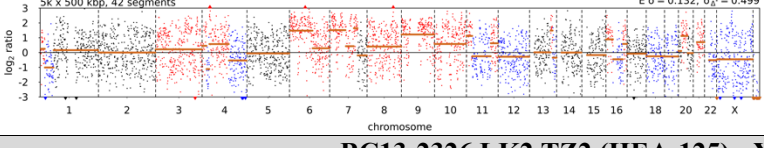
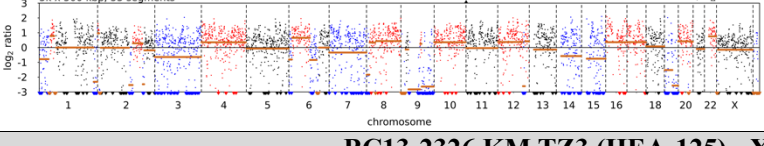
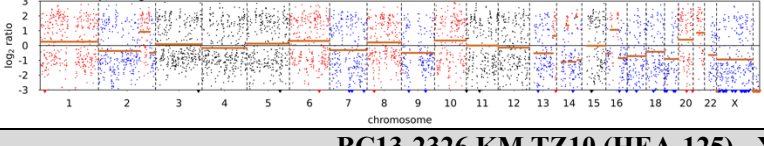
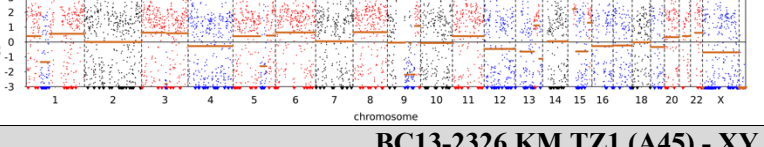
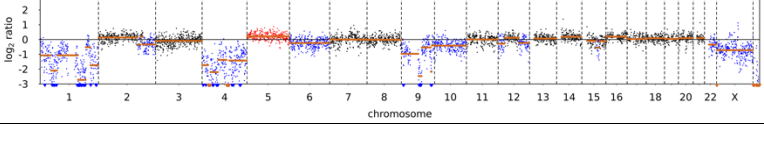
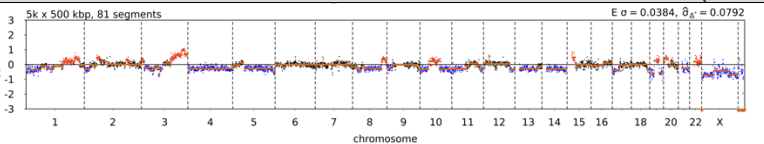
BC12-2120 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,145
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 Primärtumor Stanze 2 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,104
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 Primärtumor Stanze 3 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,12
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 LK Metastase (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,116
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 LK1 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,162
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 LK1 TZ2 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,149
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 LK1 TZ3 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,204
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 LK1 TZ4 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,136
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 LK1 TZ5 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,157
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 LK2 TZ2 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,117
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC12-2120 LK2 TZ3 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,149
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 LK2 TZ4 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,158
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 LK2 TZ5 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,129
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2120 KM TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,163
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC12-2142 Primärtumor (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,101
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2142 KM TZ4 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,131
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC12-2146 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,108
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2146 LK2 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,117
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2146 KM TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,178
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC12-2146 KM TZ1 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,196
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC12-2157 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,134
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2157 KM TZ10 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,371
	Qualität	schlecht
	Status	NA
BC12-2162 / BC12-2154 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,103
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2154 KM TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,276
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2234 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,186
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2234 KM TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,175
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2237 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,106
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2237 KM TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,196
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC12-2237 KM TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,281
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2237 KM TZ2 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,128
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC12-2266 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,105
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2266 LK1 TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,382
	Qualität	moderat
	Status	aberrant
BC12-2266 LK2 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,124
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC12-2266 KM TZ1 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,147
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2322 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,0877
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2322 Primärtumor Stanze 2 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,101
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2322 LK1 TZ1 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2322 LK1 TZ2 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,137
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2322 LK1 TZ3 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,137
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2322 LK1 TZ2A (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,482
	Qualität	schlecht
	Status	NA

BC13-2322 LK2 TZ1 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,353
	Qualität	moderat
	Status	aberrant
BC13-2322 LK2 TZ2 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,243
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2322 LK2 TZ9 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,165
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2326 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,0894
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2326 Primärtumor Stanze 2 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,0903
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2326 Metastase Stanze 1 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,0825
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2326 Metastase Stanze 2 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,105
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2326 LK1 TZ4 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,588
	Qualität	schlecht
	Status	NA
BC13-2326 LK1 TZ5 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,417
	Qualität	schlecht
	Status	NA
BC13-2326 LK1 TZ6 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,195
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC13-2326 LK1 TZ7 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,327
			Qualität	moderat
			Status	aberrant
BC13-2326 LK1 TZ8 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,785
			Qualität	schlecht
			Status	NA
BC13-2326 LK1 TZ9 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,374
			Qualität	moderat
			Status	aberrant
BC13-2326 LK1 TZ11 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,238
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2326 LK1 TZ12 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,499
			Qualität	moderat
			Status	aberrant
BC13-2326 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,385
			Qualität	moderat
			Status	aberrant
BC13-2326 KM TZ3 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,592
			Qualität	schlecht
			Status	NA
BC13-2326 KM TZ10 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,577
			Qualität	schlecht
			Status	NA
BC13-2326 KM TZ1 (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,187
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2328 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,0792
			Qualität	gut
			Status	aberrant

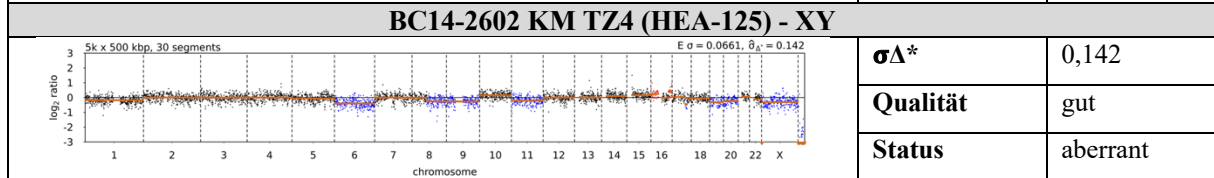
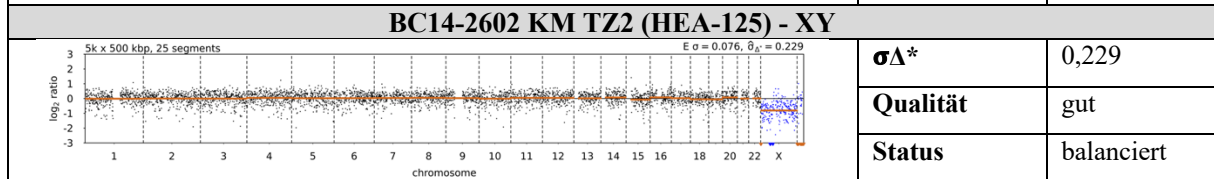
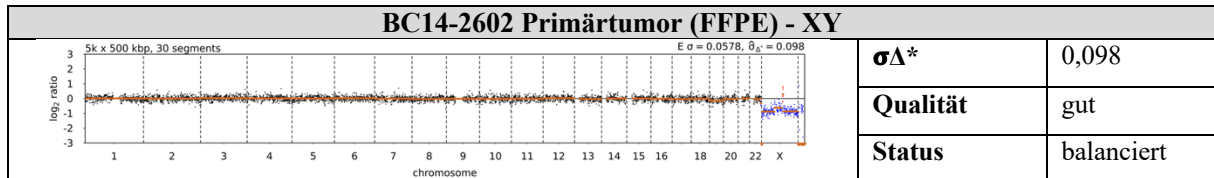
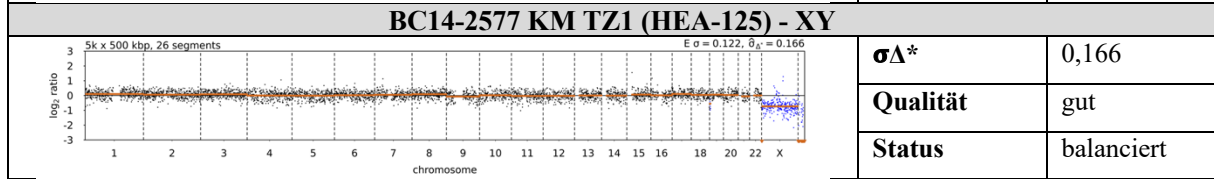
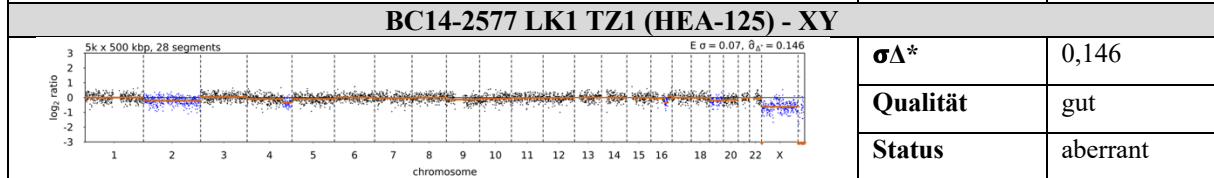
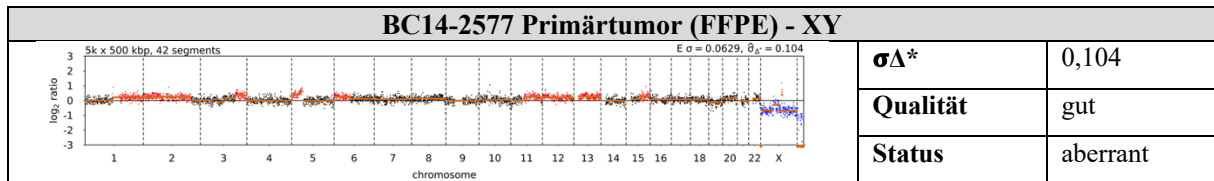
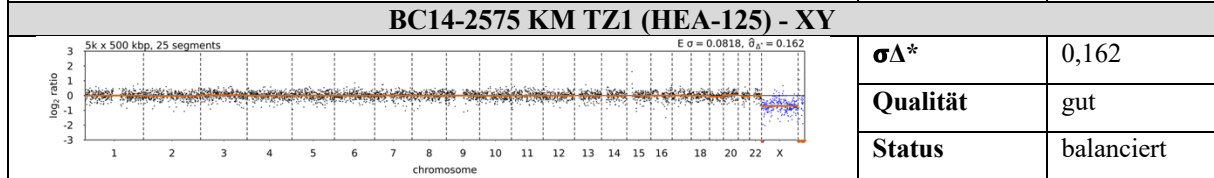
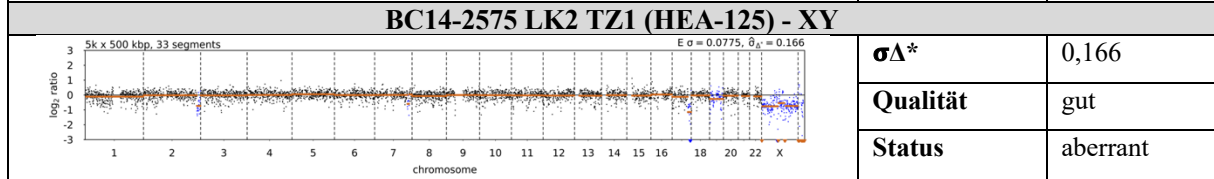
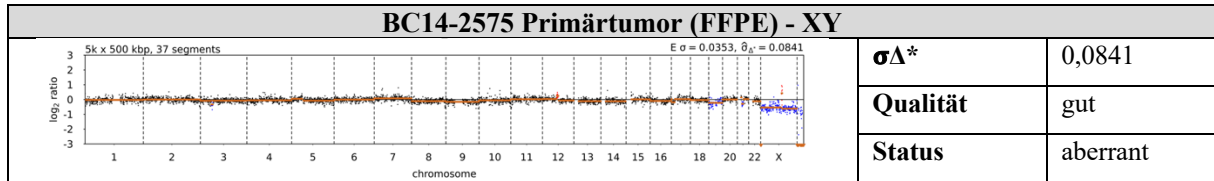
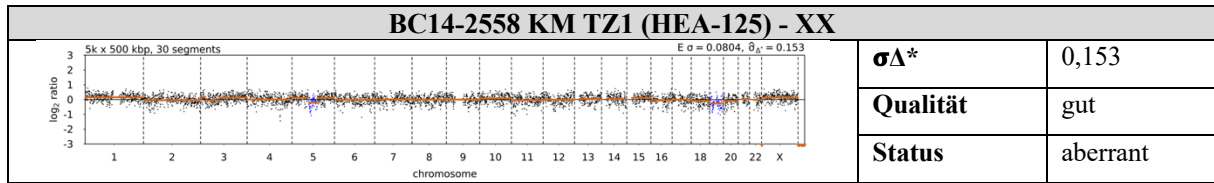
BC13-2328 Primärtumor Stanze 2 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,0865
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2328 LK2 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,155
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2328 KM TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,205
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2328 KM TZ1 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,128
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2328 KM TZ2 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,113
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2328 KM TZ3 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,106
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2328 KM TZ4 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,119
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2328 KM TZ2 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,113
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2328 KM TZ3 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,144
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2335 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,119
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC13-2335 Primärtumor Stanze 2 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,11
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2335 Metastase Stanze 1 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,134
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2335 Metastase Stanze 2 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,148
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2335 LK1 TZ1 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,114
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2335 LK1 TZ2 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,132
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2335 LK1 TZ4 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,13
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2335 LK2 TZ1 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,219
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2335 LK2 TZ3 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,222
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2335 LK2 TZ6 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,203
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2335 KM TZ2 (A45) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,155
	Qualität	gut
	Status	balanciert

BC13-2339 Primärtumor (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,106
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2339 KM TZ2 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,629
	Qualität	schlecht
	Status	NA
BC13-2339 KM TZ5 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,715
	Qualität	schlecht
	Status	NA
BC13-2378 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,0985
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2378 Primärtumor Stanze 2 (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,11
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2378 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,171
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2378 LK TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,132
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2378 LK TZ2 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,138
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2378 LK TZ3 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,139
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2378 KM TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,301
	Qualität	moderat
	Status	aberrant

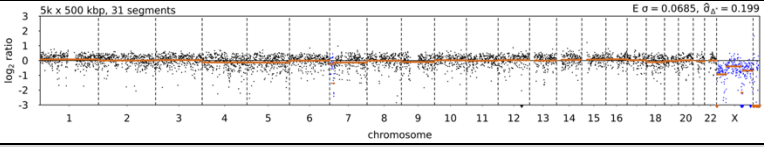
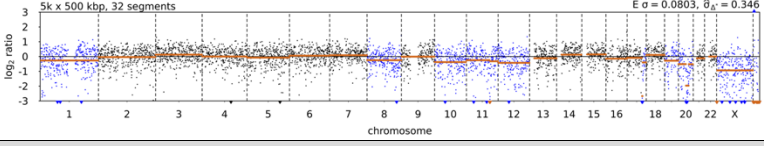
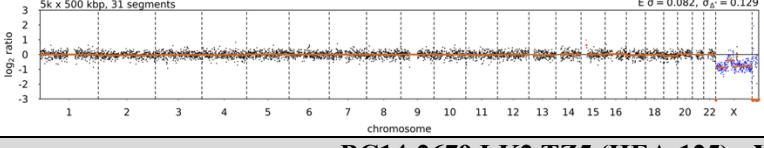
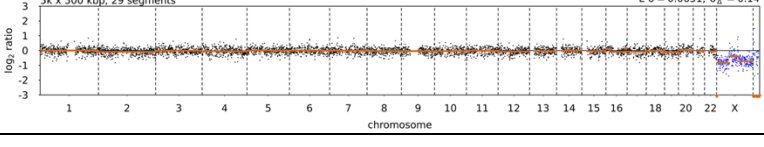
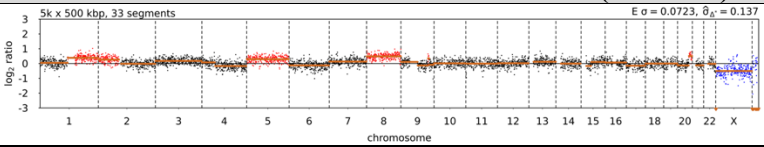
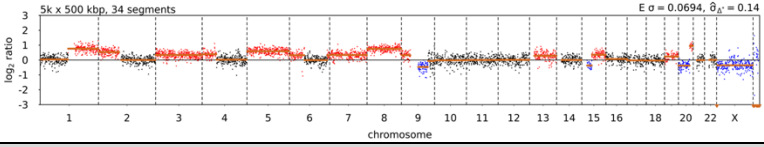
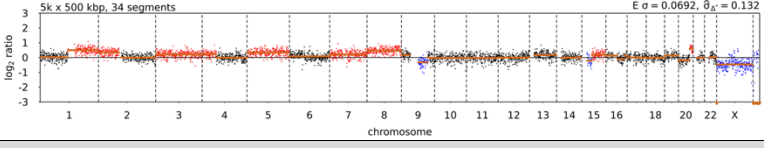
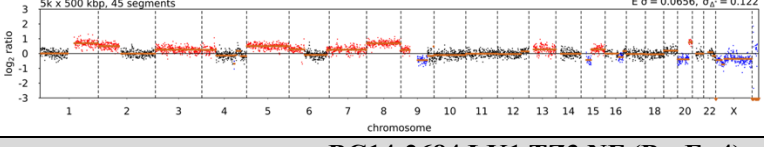
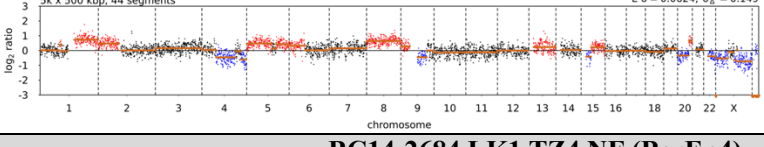
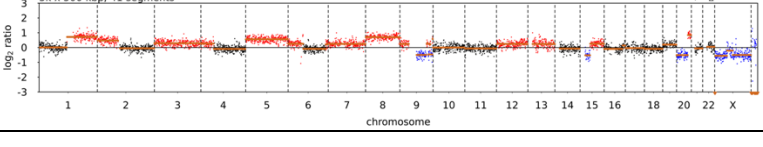
BC13-2378 KM TZ3 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,331
			Qualität	moderat
			Status	aberrant
BC13-2381 Primärtumor (FFPE) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,106
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2381 KM TZ5 (HEA-125) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,269
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2381 KM TZ6 (HEA-125) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,267
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2423 Primärtumor (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,162
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2423 LK1 TZ1 NF (BerEp4) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,145
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2423 LK1 TZ3 NF (BerEp4) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,149
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2423 LK1 TZ4 NF (BerEp4) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,14
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2423 LK2 TZ1 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,249
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC13-2423 KM TZ3 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,279
			Qualität	gut
			Status	aberrant

BC13-2453 LK2 TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,149
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC BC13-2453 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,148
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2453 LK2 TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,14
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2522 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,105
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2522 LK1 TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,158
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2522 LK1 TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,128
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC13-2522 LK1 TZ5 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,14
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC13-2522 LK2 TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,102
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2558 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,104
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2558 Primärtumor Stanze 2 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,125
	Qualität	gut
	Status	aberrant



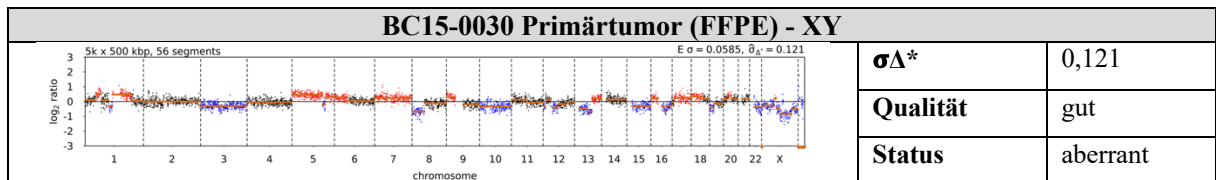
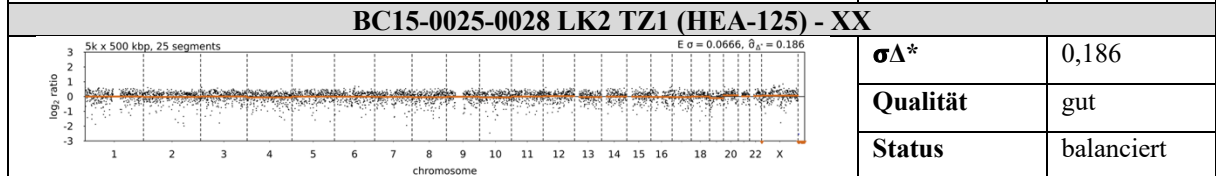
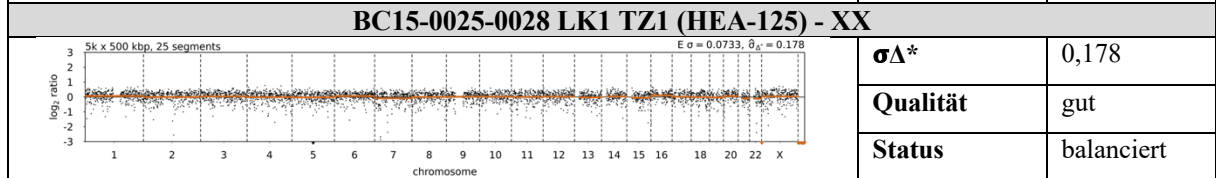
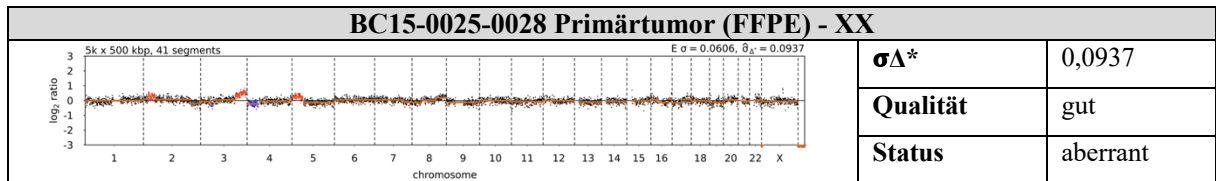
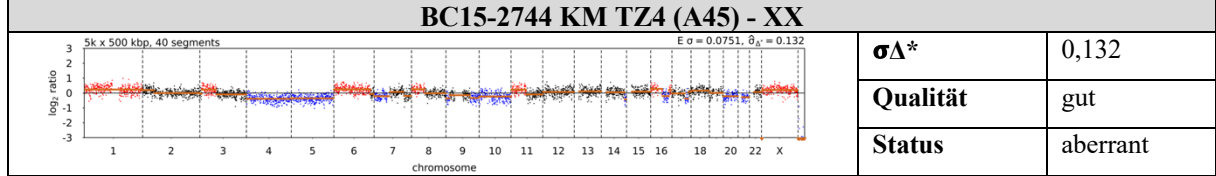
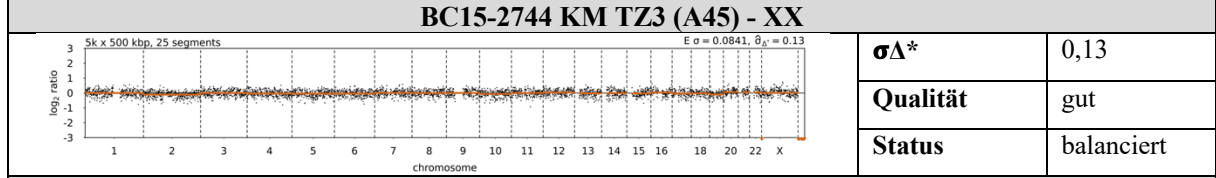
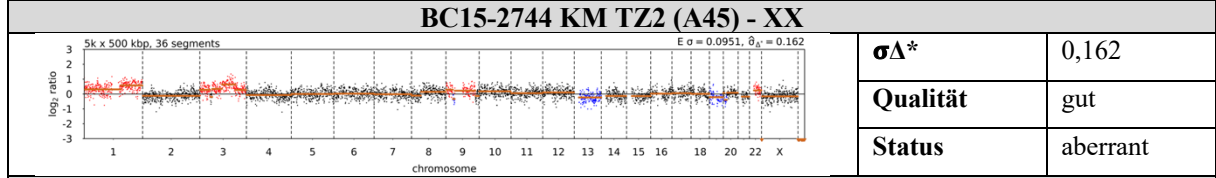
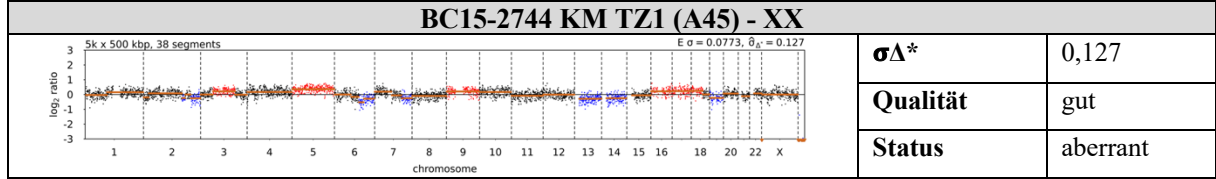
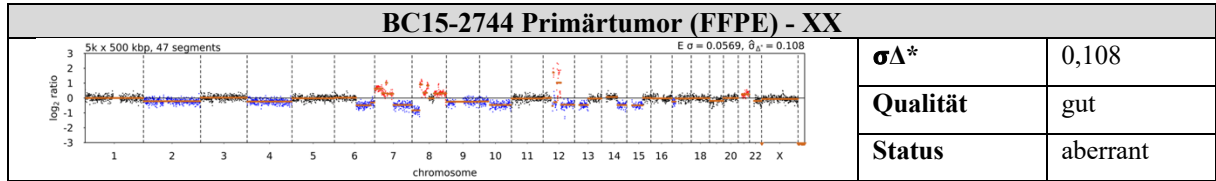
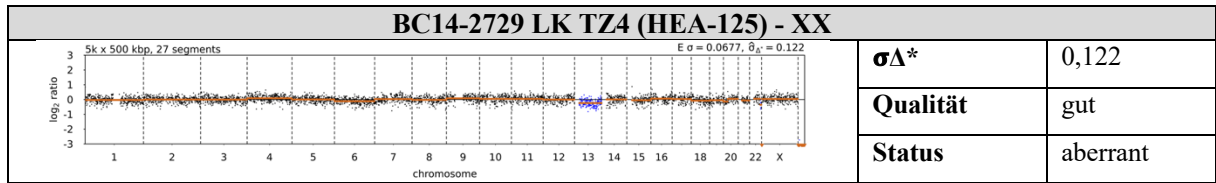
BC14-2602 KM TZ1 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,139
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2605 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,0556
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2605 Primärtumor Stanze 2 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,0827
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2605 LK2 TZ1 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,109
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2605 LK2 TZ3 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,114
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2605 LK2 TZ4 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,127
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2605 KM TZ1 (A45) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,0883
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2605 KM TZ2 (A45) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,0849
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2605 KM TZ3 (A45) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,11
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2667 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,119
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC14-2667 LK1 TZ1 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,17
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC14-2667 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,208
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC14-2667 LK2 TZ3 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,236
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC14-2667 LK2 TZ4 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,148
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC14-2667 LK2 TZ5 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,563
			Qualität	schlecht
			Status	NA
BC14-2667 KM TZ1 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,148
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC14-2667 KM TZ1 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,123
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC14-2679 Primärtumor (FFPE) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,102
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2679 LK1 TZ2 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,188
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2679 LK1 TZ3 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,135
			Qualität	gut
			Status	balanciert

BC14-2679 LK2 TZ1 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,199
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2679 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,3461
			Qualität	moderat
			Status	aberrant
BC14-2679 LK2 TZ3 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,129
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC14-2679 LK2 TZ5 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,14
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC14-2684 LK1 TZ3 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,137
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2684 LK1 TZ4 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,14
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2684 LK1 TZ5 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,132
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2684 LK1 TZ1 NF (BerEp4) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,122
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2684 LK1 TZ3 NF (BerEp4) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,149
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC14-2684 LK1 TZ4 NF (BerEp4) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,118
			Qualität	gut
			Status	aberrant

BC14-2684 LK1 TZ5 NF (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,124
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2684 LK2 TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,125
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2684 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,117
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2684 LK2 TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,142
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2684 LK2 TZ4 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,146
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2684 LK2 TZ5 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,145
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2684 LK2 TZ4 NF (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,114
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2684 LK2 TZ5 NF (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,115
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2689 Primärtumor Stanze 1 (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,106
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2689 LK2 TZ1 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,127
	Qualität	gut
	Status	balanciert

BC14-2689 LK2 TZ1 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,146
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2689 KM TZ1 (A45) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,102
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2725 Primärtumor (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,117
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2725 Metastase (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,0942
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2725 LK1 TZ1 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2725 LK1 TZ2 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,113
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2725 KM TZ1 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,119
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2729 Primärtumor (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,122
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC14-2729 LK TZ1 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,141
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC14-2729 LK TZ2 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,185
	Qualität	gut
	Status	aberrant



BC15-0030 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,192	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0030 LK2 TZ3 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,168	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0030 LK2 TZ4 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,152	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0030 KM TZ1 (A45) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,124	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
BC15-0041 Primärtumor (FFPE) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,102	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0041 LK1 TZ2 (HEA-125) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,227	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0041 LK2 TZ1 (HEA-125) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,161	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
BC15-0052 LK1 TZ2 (HEA-125) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,145	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
BC15-0052 LK1 TZ5 (HEA-125) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,188	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0052 KM TZ1 (A45) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,117	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	

BC15-0052 KM TZ3 (A45) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,144	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0052 KM TZ4 (A45) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,141	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0052 KM TZ5 (A45) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,13	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0052 KM TZ6 (A45) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,122	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
BC15-0052 KM TZ7 (A45) - XX			
	$\sigma\Delta^*$	0,125	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0066 Primärtumor (FFPE) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,112	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0066 LK2 TZ1 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,163	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
PT BC15-0089 Primärtumor (Kryo) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,0988	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
BC15-0089 LK2 TZ1 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,199	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0089 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,157	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	

BC15-0089 LK2 TZ4 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,19
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC15-0089 LK2 TZ5 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,166
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0089 LK2 TZ6 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,244
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0096 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,0965
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC15-0096 LK1 TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,174
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC15-0096 LK1 TZ4 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,141
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0096 LK1 TZ5 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,151
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0096 LK1 TZ6 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,123
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0096 LK1 TZ7 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,161
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0096 LK1 TZ8 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,128
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC15-0129 Primärtumor (FFPE) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,112	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0129 LK1 TZ1 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,128	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
BC15-0129 LK1 TZ1 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,151	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0129 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,191	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0129 LK2 TZ5 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,221	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0129 LK2 TZ6 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,221	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
BC15-0129 KM TZ3 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,224	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC15-0222 LK2 TZ1 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,192	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
BC15-0222 LK2 TZ3 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,143	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	
BC15-0222 KM TZ4 (HEA-125) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,207	
	Qualität	gut	
	Status	balanciert	

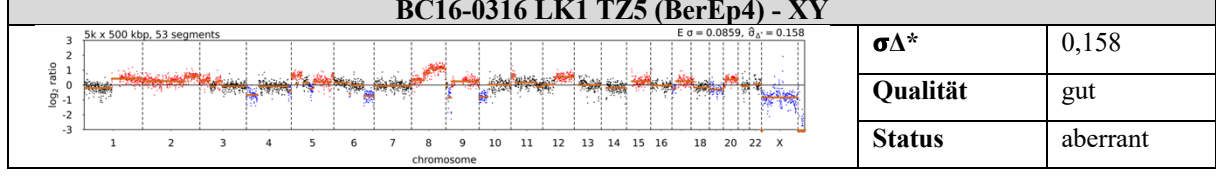
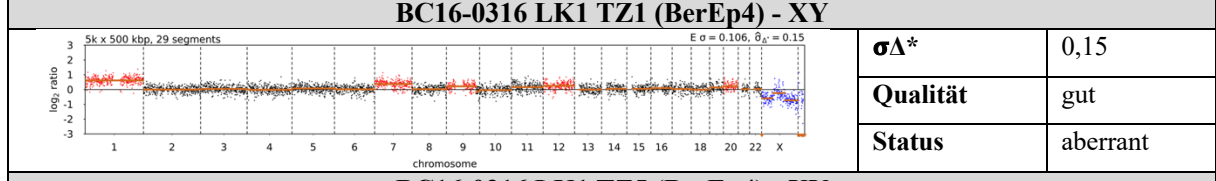
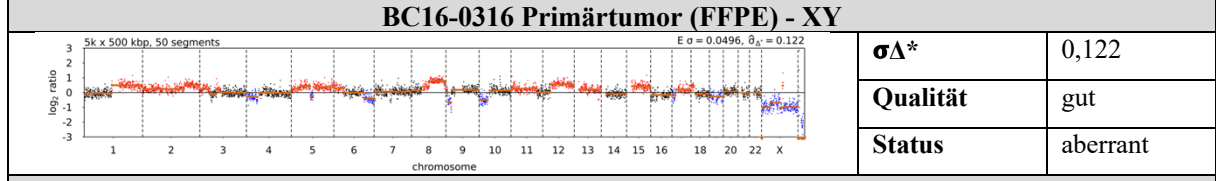
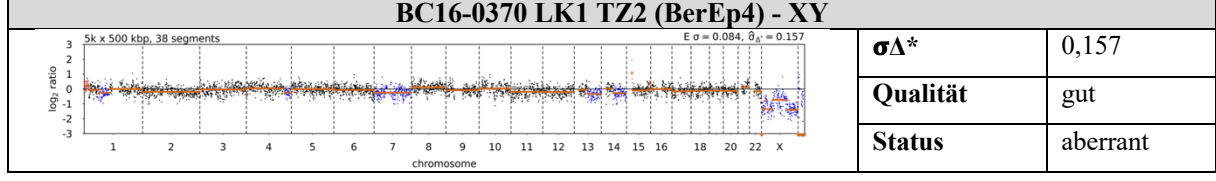
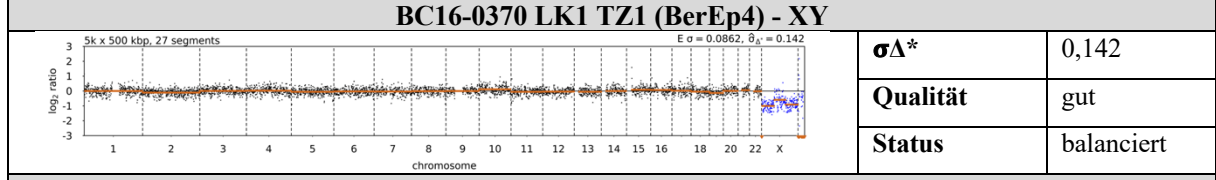
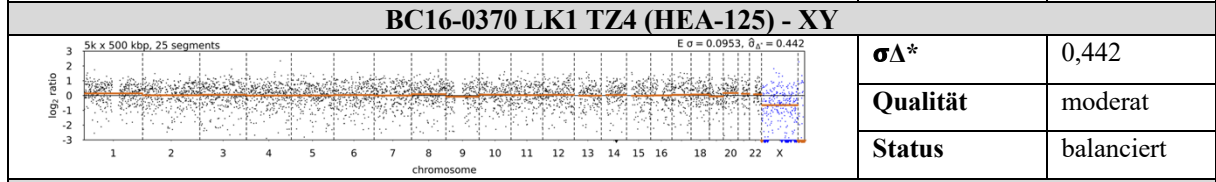
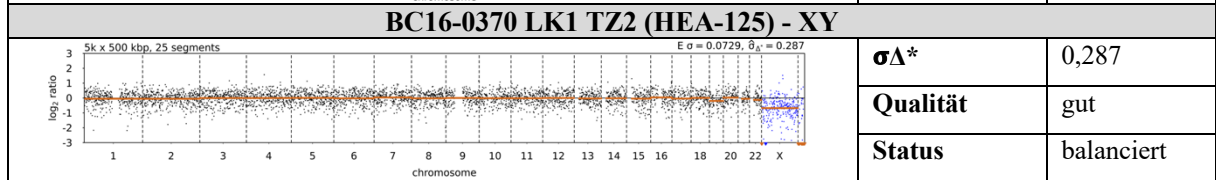
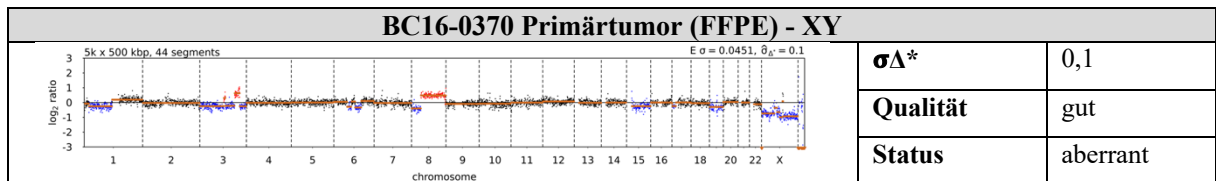
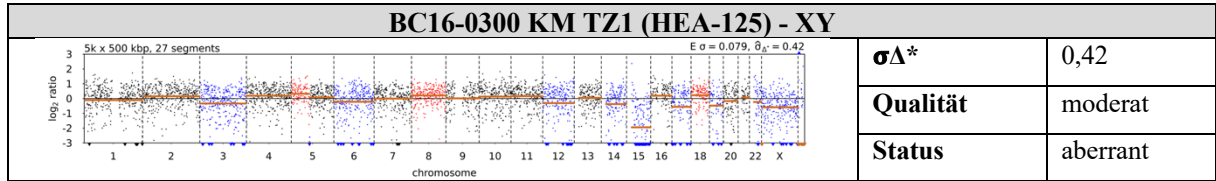
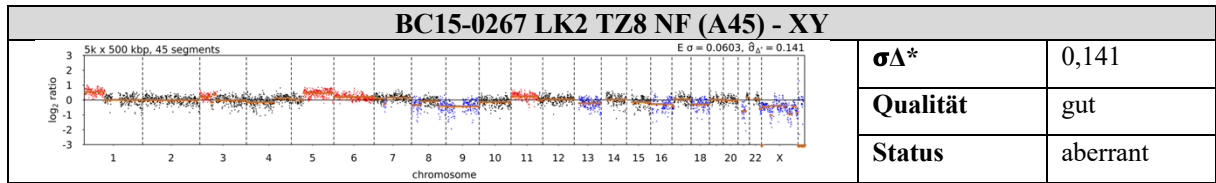
BC15-0222 KM TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,128
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC15-0222 KM TZ5 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,166
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC15-0263 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,117
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0263 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,251
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC15-0263 KM TZ1 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,13
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC15-0263 KM TZ2 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,142
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0263 KM TZ3 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,129
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC15-0263 KM TZ4 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,17
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0263 KM TZ5 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,146
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0263 KM TZ6 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,121
	Qualität	gut
	Status	balanciert

BC15-0263 KM TZ7 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0263 KM TZ8 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,134
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0263 KM TZ9 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,135
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0263 KM TZ10 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,143
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,208
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ4 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,166
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ5 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,187
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ6 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,188
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ7 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,161
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC15-0267 LK1 TZ8 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,164
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ9 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,163
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ10 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,234
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,135
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ2 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,224
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ3 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,318
	Qualität	moderat
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ5 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,127
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ6 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,158
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ7 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,128
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ8 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,134
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC15-0267 LK1 TZ9 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,168
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ2 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,125
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ3 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,15
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ4 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,153
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ5 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,138
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ6 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,175
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ7 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,205
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ8 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,132
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ9 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,129
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ10 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,149
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC15-0267 LK1 TZ11 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,147
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ12 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,191
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ13 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,16
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0267 LK1 T14 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,14
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ16 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,139
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0267 LK1 TZ17 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,127
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0267 LK2 TZ1 (BerEp4) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,121
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0267 LK2 TZ3 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,151
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC15-0267 LK2 TZ5 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,122
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC15-0267 LK2 TZ6 NF (A45) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,112
			Qualität	gut
			Status	aberrant



BC16-0316 LK1 TZ6 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,165
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0316 LK1 TZ7 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,138
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0316 LK1 TZ8 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,189
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0316 LK1 TZ9 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,163
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0316 LK1 TZ10 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0316 LK2 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,156
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0316 LK2 TZ2 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,184
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0316 LK2 TZ5 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,142
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0316 LK2 TZ6 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,171
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0316 LK2 TZ7 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,224
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC16-0316 LK2 TZ8 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,161
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC16-0316 LK2 TZ9 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,17
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC16-0316 LK2 TZ10 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,183
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC16-0316 KM TZ1 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,19
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC16-0316 KM TZ4 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,187
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC16-0316 KM TZ5 (HEA-125) - XY			$\sigma\Delta^*$	0,252
			Qualität	gut
			Status	balanciert
BC16-0373 Primärtumor (FFPE) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,068
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ1 (HEA-125) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,163
			Qualität	gut
			Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ5 (HEA-125) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,346
			Qualität	moderat
			Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ6 (HEA-125) - XX			$\sigma\Delta^*$	0,155
			Qualität	gut
			Status	aberrant

BC16-0373 LK1 TZ1 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,149
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ2 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,114
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ3 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,11
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ4 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,113
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ5 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,558
	Qualität	schlecht
	Status	NA
BC16-0373 LK1 TZ6 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,113
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ7 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,116
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ8 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,109
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK1 TZ9 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,137
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK2 TZ5 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,205
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC16-0373 LK2 TZ9 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,246
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK2 TZ2 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,107
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK2 TZ3 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,124
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK2 TZ4 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK2 TZ5 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,102
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0373 LK2 TZ6 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,115
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK2 TZ8 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,115
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0373 LK2 TZ10 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,11
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0417 Primärtumor (FFPE) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,169
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0417 LK1 TZ2 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,111
	Qualität	gut
	Status	balanciert

BC16-0417 LK1 TZ3 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,211
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0417 LK1 TZ4 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,331
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0417 LK1 TZ6 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,136
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0417 LK1 TZ8 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,453
	Qualität	moderat
	Status	aberrant
BC16-0417 LK1 TZ11 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,133
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0417 LK1 TZ12 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,125
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0417 LK1 TZ1 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,166
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0417 LK1 TZ2 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,147
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0417 LK1 TZ3 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,123
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0417 LK1 TZ4 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,112
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC16-0417 LK1 TZ5 (BerEp4) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,174
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0417 LK2 TZ5 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,297
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0417 LK2 TZ7 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,308
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0417 LK2 TZ8 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,257
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0417 LK2 TZ9 (HEA-125) - XX		
	$\sigma\Delta^*$	0,32
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0455 KM TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,166
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0455 KM TZ8 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,295
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0455 KM TZ9 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,141
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0455 KM TZ1 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,138
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0455 KM TZ3 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,135
	Qualität	gut
	Status	balanciert

BC16-0455 KM TZ4 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,141
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0455 KM TZ6 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,142
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0479 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,125
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 LK1 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,139
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 LK1 TZ2 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,159
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 LK1 TZ3 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,148
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC BC16-0479 LK1 TZ4 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,151
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 LK1 TZ5 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,131
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 LK1 TZ6 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,14
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 LK1 TZ7 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,221
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC16-0479 LK1 TZ8 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,143
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 LK2 TZ1 NF (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,147
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 LK2 TZ2 NF (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,124
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 LK2 TZ3 NF (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,119
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0479 KM TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,121
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0479 KM TZ2 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,151
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0483 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,0986
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0483 LK1 TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,138
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0483 LK1 TZ5 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,136
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0483 LK1 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,137
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC16-0483 LK1 TZ2 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,118	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC16-0483 LK1 TZ3 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,166	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC16-0483 LK1 TZ4 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,109	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC16-0483 LK1 TZ5 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,13	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC16-0483 LK1 TZ6 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,114	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC16-0483 LK1 TZ7 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,122	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC16-0483 LK1 TZ8 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,118	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC16-0483 LK1 TZ9 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,119	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC16-0483 LK1 TZ10 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,129	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	
BC16-0483 LK2 TZ1 (BerEp4) - XY			
	$\sigma\Delta^*$	0,135	
	Qualität	gut	
	Status	aberrant	

BC16-0483 LK2 TZ2 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,111
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0483 LK2 TZ3 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,113
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0483 LK2 TZ4 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,119
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0483 LK2 TZ5 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,101
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0483 LK2 TZ7 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,119
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0483 LK2 TZ8 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,108
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0483 LK2 TZ9 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,106
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 Primärtumor (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,101
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 LK1 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,132
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 LK1 TZ2 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,116
	Qualität	gut
	Status	aberrant

BC16-0588 LK1 TZ3 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,131
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 LK1 TZ4 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,139
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 LK1 TZ6 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,117
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 LK1 TZ7 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,119
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 LK1 TZ8 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 LK1 TZ9 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,134
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 LK1 TZ10 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,125
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0588 LK2 TZ7 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,202
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0588 LK2 TZ8 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,193
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0592 LK1 TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,128
	Qualität	gut
	Status	balanciert

BC16-0592 LK1 TZ1 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,112
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0592 LK1 TZ5 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,126
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0592 LK2 TZ1 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,623
	Qualität	schlecht
	Status	NA
BC16-0592 LK2 TZ2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,153
	Qualität	gut
	Status	balanciert
BC16-0592 LK2 TZ10 NF (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,149
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC16-0592 KM TZ1 (A45) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,114
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC17-0072 Metastase (FFPE) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,109
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC17-0072 LK1 TZ3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,225
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC17-0072 LK1 TZ4 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,182
	Qualität	gut
	Status	aberrant
BC17-0072 LK1 TZ5 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,504
	Qualität	moderat
	Status	aberrant

BC17-0072 LK1 TZ7 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,407
	Qualität	moderat
	Status	aberrant
BC17-0072 LK1 TZ9 (BerEp4) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,384
	Qualität	moderat
	Status	aberrant
N12-2221 LKB Z2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,457
	Qualität	schlecht
	Status	NA
N12-2221 LKB Z3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,435
	Qualität	schlecht
	Status	NA
N12-2221 LKB Z6 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,335
	Qualität	moderat
	Status	aberrant
N12-2221 LKB Z8 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,779
	Qualität	schlecht
	Status	NA
N12-2221 LKB Z9 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,233
	Qualität	gut
	Status	balanciert
N12-2224 LK Z6 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,332
	Qualität	schlecht
	Status	NA
N16-0434 LK Z2 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,245
	Qualität	gut
	Status	aberrant
N16-0434 LK Z3 (HEA-125) - XY		
	$\sigma\Delta^*$	0,405
	Qualität	moderat
	Status	aberrant

Gezeigt sind die CNV Profile der untersuchten NSCLC Proben (links), mitsamt der beobachteten Standardabweichung $\sigma\Delta^*$ der QDNaseq-Analyse, der Einteilung der Profilqualität (siehe 4.4.1 LowPass Genom-Sequenzierung der isolierten Einzelzellen) und dem CNV-Status (rechts). Die Probenart bzw. der verwendete Antikörper der jeweiligen Proben ist in Klammern angegeben FFPE entspricht Formalin-fixiertes Paraffin-eingebettetes Gewebe. Für jede Probe ist das Geschlecht des Patienten als Satz der Gonosomen (XY = Mann; XX = Frau) angegeben.

8 Literaturverzeichnis

- Aceto, N., Bardia, A., Miyamoto, D. T., Donaldson, M. C., Wittner, B. S., Spencer, J. A., ... Maheswaran, S. (2014). Circulating Tumor Cell Clusters Are Oligoclonal Precursors of Breast Cancer Metastasis. *Cell*, 158(5), 1110–1122. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>
- Aguirre-Ghiso, J. A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer*, 7(11), 834–846. <https://doi.org/10.1038/nrc2256>
- Aichel, O. (1911). *Über Zellverschmelzung mit qualitativ abnormer Chromosomenverteilung als Ursache der Geschwulstbildung* (Heft XIII). Wilhelm Roux (Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig).
- Albanese, I., Scibetta, A. G., Migliavacca, M., Russo, A., Bazan, V., Tomasino, R. M., ... La Farina, M. (2004). Heterogeneity within and between primary colorectal carcinomas and matched metastases as revealed by analysis of Ki-ras and p53 mutations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 325(3), 784–791. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.10.111>
- Andrews, S. (2010). A quality control tool for high throughput sequence data. *Babraham Bioinformatics*, <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/>. Retrieved from <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Arafat, W., Stahlfeld, C., Sperger, J. M., Heninger, E., Gopalakrishnan, D., Barata, P. C., ... Grivas, P. (2017). Intra-patient heterogeneity in urothelial cancer (UC) circulating tumor cells (CTC) and PDL1 expression to identify biomarkers of response and new therapeutic targets: A pilot study. *Journal of Clinical Oncology*, 35(15_suppl), 4537–4537. https://doi.org/10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.4537
- Armeanu, S., Müller, C. A., & Klein, G. (2000). Involvement of E-cadherin in the development of erythroid cells. *Hematology*, 5(4), 307–316. <https://doi.org/10.1080/10245332.2000.11746524>
- Arnemann, J. (2019). Minimal Residual Disease (pp. 1661–1661). https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3527
- Aupérin, A., Le Péchoux, C., Rolland, E., Curran, W. J., Furuse, K., Fournel, P., ... Pignon, J.-P. (2010). Meta-Analysis of Concomitant Versus Sequential Radiochemotherapy in Locally Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(13), 2181–2190. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.26.2543>
- Badr, N. M., Roberts, C., & Shaaban, A. M. (2019). Extramedullary Haematopoiesis in Axillary Lymph Nodes of Breast Carcinoma Patients Receiving Neoadjuvant Chemotherapy: A Potential Diagnostic Pitfall. *Pathobiology*, 86(2–3), 167–172. <https://doi.org/10.1159/000493752>
- Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2007). EpCAM (CD326) finding its role in cancer. *British Journal of Cancer*, 96(3), 417–423. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603494>
- Banyard, J., & Bielenberg, D. R. (2015). The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connective Tissue Research*, 56(5), 403–413. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1060970>
- Bao, Y., Liu, Z., Guo, M., Li, B., Sun, X., & Wang, L. (2018). Extramedullary hematopoiesis secondary to malignant solid tumors: a case report and literature review. *Cancer Management and Research*, Volume 10, 1461–1470. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S161746>

- Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P. (2019). Global Epidemiology of Lung Cancer. *Annals of Global Health*, 85(1), 1–16. <https://doi.org/10.5334/aogh.2419>
- Baudis, M., & Cleary, M. L. (2001). Progenetix.net: an online repository for molecular cytogenetic aberration data. *Bioinformatics*, 17(12), 1228–1229. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.12.1228>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling The False Discovery Rate - A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society B*, 57(1), 289–300. <https://doi.org/10.2307/2346101>
- Bertram, J. S. (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 21(6), 167–223. [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(00\)00007-8](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8)
- Blankenstein, T. (2013). Mutationsanalyse von TP53, KRAS und PIK3CA bei einzelnen disseminierten Tumorzellen aus dem Knochenmark von Karzinompatienten.
- Bleicher, S. (2016). *Unterscheidung von EpCAM+ Zellen aus Knochenmark und Lymphknoten von NSCLC Patienten und Nicht-Tumorpatienten*. Universität Regensburg.
- Brahmer, J., Reckamp, K. L., Baas, P., Crinò, L., Eberhardt, W. E. E., Poddubskaya, E., ... Spigel, D. R. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 373(2), 123–135. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504627>
- Braun, S., Pantel, K., Müller, P., Janni, W., Hepp, F., Kentenich, C. R. M., ... Schlimok, G. (2000). Cytokeratin-Positive Cells in the Bone Marrow and Survival of Patients with Stage I, II, or III Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 342(8), 525–533. <https://doi.org/10.1056/NEJM200002243420801>
- Braun, S., Vogl, F. D., Naume, B., Janni, W., Osborne, M. P., Coombes, R. C., ... Pantel, K. (2005). A Pooled Analysis of Bone Marrow Micrometastasis in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 353(8), 793–802. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050434>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bross, I. D. J., Viadana, E., & Pickren, J. (1975). Do generalized metastases occur directly from the primary? *Journal of Chronic Diseases*, 28(3), 149–159. [https://doi.org/10.1016/0021-9681\(75\)90003-X](https://doi.org/10.1016/0021-9681(75)90003-X)
- Brunsvig, P. F., Flatmark, K., Aamdal, S., Hoifødt, H., Le, H., Jakobsen, E., ... Fodstad, Ø. (2008). Bone marrow micrometastases in advanced stage non-small cell lung carcinoma patients. *Lung Cancer*. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.12.018>
- Bühring, H. J., Müller, T., Herbst, R., Cole, S., Rappold, I., Schuller, W., ... Schmidt, H. (1996). The adhesion molecule E-cadherin and a surface antigen recognized by the antibody 9C4 are selectively expressed on erythroid cells of defined maturational stages. *Leukemia*, 10(1), 106–116. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8558914>
- Cao, C., Zhu, Z.-H., Yan, T. D., Wang, Q., Jiang, G., Liu, L., ... He, J. (2013). Video-assisted thoracic surgery versus open thoracotomy for non-small-cell lung cancer: a propensity score analysis based on a multi-

- institutional registry. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 44(5), 849–854. <https://doi.org/10.1093/ejcts/ezt406>
- Carter, L. L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C. R., ... Carreno, B. M. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4+ and CD8+ T cells and is overcome by IL-2. *European Journal of Immunology*, 32(3), 634. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200203\)32:3<634::AID-IMMU634>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200203)32:3<634::AID-IMMU634>3.0.CO;2-9)
- Chabon, J. J., Simmons, A. D., Lovejoy, A. F., Esfahani, M. S., Newman, A. M., Haringsma, H. J., ... Diehn, M. (2016). Circulating tumour DNA profiling reveals heterogeneity of EGFR inhibitor resistance mechanisms in lung cancer patients. *Nature Communications*, 7(1), 11815. <https://doi.org/10.1038/ncomms11815>
- Chaves-Pérez, A., Mack, B., Maetzel, D., Kremling, H., Eggert, C., Harréus, U., & Gires, O. (2013). EpCAM regulates cell cycle progression via control of cyclin D1 expression. *Oncogene*, 32(5), 641–650. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.75>
- Chemi, F., Rothwell, D. G., McGranahan, N., Gulati, S., Abbosh, C., Pearce, S. P., ... Dive, C. (2019). Pulmonary venous circulating tumor cell dissemination before tumor resection and disease relapse. *Nature Medicine*, 25(10), 1534–1539. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0593-1>
- Chistiakov, D. A., Killingsworth, M. C., Myasoedova, V. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). CD68/macrosialin: not just a histochemical marker. *Laboratory Investigation*, 97(1), 4–13. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.116>
- Choemmel, V., Pierga, J.-Y., Nos, C., Vincent-Salomon, A., Sigal-Zafrani, B., Thierry, J.-P., & Blin, N. (2004). Enrichment methods to detect bone marrow micrometastases in breast carcinoma patients: clinical relevance. *Breast Cancer Research*, 6(5), R556. <https://doi.org/10.1186/bcr898>
- Choi, S. Y. C., Gout, P. W., Collins, C. C., & Wang, Y. (2012). Epithelial immune cell-like transition (EIT): A proposed transdifferentiation process underlying immune-suppressive activity of epithelial cancers. *Differentiation*, 83(5), 293–298. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2012.02.005>
- Chu, J., Sadeghi, S., Raymond, A., Jackman, S. D., Nip, K. M., Mar, R., ... Birol, I. (2014). BioBloom tools: fast, accurate and memory-efficient host species sequence screening using bloom filters. *Bioinformatics*, 30(23), 3402–3404. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu558>
- Cohen, S. J., Punt, C. J. A., Iannotti, N., Saidman, B. H., Sabbath, K. D., Gabrail, N. Y., ... Meropol, N. J. (2008). Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(19), 3213–3221. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.8923>
- Collins, V. P., Loeffler, R. K., & Tivey, H. (1956). Observations on growth rates of human tumors. *The American Journal of Roentgenology, Radium Therapy, and Nuclear Medicine*, 76(5), 988–1000. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9098\(199708\)65:4<284::AID-JSO11>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9098(199708)65:4<284::AID-JSO11>3.0.CO;2-2)
- Core, T. R. (2020). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>

- Cote, R. J., Beattie, E. J., Chaiwun, B., Shi, S. R., Harvey, J., Chen, S. C., ... Taylor, C. R. (1995). Detection of occult bone marrow micrometastases in patients with operable lung carcinoma. *Annals of Surgery*, 222(4), 415–425. <https://doi.org/10.1097/00000658-199522240-00001>
- Couraud, S., Souquet, P. J., Paris, C., Dô, P., Doubre, H., Pichon, E., ... Zaleman, G. (2015). BioCAST/IFCT-1002: Epidemiological and molecular features of lung cancer in never-smokers. *European Respiratory Journal*, 45(5), 1403–1414. <https://doi.org/10.1183/09031936.00097214>
- Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., ... Hayes, D. F. (2004). Circulating Tumor Cells, Disease Progression, and Survival in Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 351(8), 781–791. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040766>
- de Bono, J. S., Scher, H. I., Montgomery, R. B., Parker, C., Miller, M. C., Tissing, H., ... Raghavan, D. (2008). Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 14(19), 6302–6309. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0872>
- De Jong, A., Buchli, R., & Robbins, D. (2002). Characterization of sperm protein 17 in human somatic and neoplastic tissue. *Cancer Letters*, 186(2), 201–209. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(02\)00350-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(02)00350-6)
- Devesa, S. S., Bray, F., Vizcaino, A. P., & Parkin, D. M. (2005). International lung cancer trends by histologic type: Male:Female differences diminishing and adenocarcinoma rates rising. *International Journal of Cancer*, 117(2), 294–299. <https://doi.org/10.1002/ijc.21183>
- Dillekås, H., Rogers, M. S., & Straume, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, 8(12), 5574–5576. <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dogliani, C., Dell’Orto, P., Zanetti, G., Iuzzolino, P., Coggi, G., & Viale, G. (1990). Cytokeratin-immunoreactive cells of human lymph nodes and spleen in normal and pathological conditions. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, 416(6), 479–490. <https://doi.org/10.1007/BF01600298>
- Domagala, W., Bedner, E., Chosia, M., Weber, K., & Osborn, M. (1992). Keratin-positive reticulum cells in fine needle aspirates and touch imprints of hyperplastic lymph nodes: A possible pitfall in the immunocytochemical diagnosis of metastatic carcinoma. *Acta Cytologica*, 36(2), 241–245.
- Dong, Y., Wang, Z., & Shi, Q. (2020). Liquid Biopsy Based Single-Cell Transcriptome Profiling Characterizes Heterogeneity of Disseminated Tumor Cells from Lung Adenocarcinoma. *PROTEOMICS*, 20(13), 1900224. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900224>
- Driemel, C., Kremling, H., Schumacher, S., Will, D., Wolters, J., Lindenlauf, N., ... Gires, O. (2014). Context-dependent adaption of EpCAM expression in early systemic esophageal cancer. *Oncogene*, 33(41), 4904–4915. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.441>
- Eisenwort, G., Jurkin, J., Yasmin, N., Bauer, T., Gesslbauer, B., & Strobl, H. (2011). Identification of TROP2 (TACSTD2), an EpCAM-like molecule, as a specific marker for TGF- β 1-dependent human epidermal

- langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(10), 2049–2057. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.164>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-I](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I)
- Fidler, I. J. (1970). Metastasis: Quantitative Analysis of Distribution and Fate of Tumor Emboli Labeled With 125I-5-Iodo-2'-deoxyuridine. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 45(4), 773–782. <https://doi.org/10.1093/jnci/45.4.773>
- Fidler, I. J. (1973). Selection of Successive Tumour Lines for Metastasis. *Nature New Biology*, 242(118), 148–149. <https://doi.org/10.1038/newbio242148a0>
- Fidler, I. J. (2003). The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nature Reviews Cancer*, 3(6), 453–458. <https://doi.org/10.1038/nrc1098>
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., ... Honjo, T. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7), 1027–1034. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>
- Fukui, T., Mori, S., Yokoi, K., & Mitsudomi, T. (2006). Significance of the Number of Positive Lymph Nodes in Resected Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 1(2), 120–125. [https://doi.org/10.1016/S1556-0864\(15\)31526-4](https://doi.org/10.1016/S1556-0864(15)31526-4)
- Gabrielson, E. (2006). Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology (Carlton, Vic.)*, 11(5), 533–538. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2006.00909.x>
- Gaiser, M. R., Lammermann, T., Feng, X., Igyarto, B. Z., Kaplan, D. H., Tessarollo, L., ... Udey, M. C. (2012). Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(15), E889–E897. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117674109>
- Gasiorek, J. J., & Blank, V. (2015). Regulation and function of the NFE2 transcription factor in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(12), 2323–2335. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1866-6>
- Gast, C. E., Silk, A. D., Zarour, L., Riegler, L., Burkhart, J. G., Gustafson, K. T., ... Wong, M. H. (2018). Cell fusion potentiates tumor heterogeneity and reveals circulating hybrid cells that correlate with stage and survival. *Science Advances*, 4(9), eaat7828. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aat7828>
- Gerstung, M., Jolly, C., Leshchiner, I., Dentre, S. C., Gonzalez, S., Rosebrock, D., ... Van Loo, P. (2020). The evolutionary history of 2,658 cancers. *Nature*, 578(7793), 122–128. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1907-7>

- Gires, O., Klein, C. a., & Baeuerle, P. a. (2009). On the abundance of EpCAM on cancer stem cells. *Nature Reviews. Cancer*, 9(2), 143; author reply 143. <https://doi.org/10.1038/nrc2499-c1>
- Goddard, E. T., Bozic, I., Riddell, S. R., & Ghajar, C. M. (2018). Dormant tumour cells, their niches and the influence of immunity. *Nature Cell Biology*, 20(11), 1240–1249. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0214-0>
- Goldenberg, D. M., Stein, R., & Sharkey, R. M. (2018). The emergence of trophoblast cell-surface antigen 2 (TROP-2) as a novel cancer target. *Oncotarget*, 9(48), 28989–29006. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25615>
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E. E., ... Yokoi, K. (2016). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 11(1), 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.09.009>
- Gout, P., Watahiki, A., Wang, Y., Lin, D., Xue, H., & Wang, Y. Z. (2009). Abstract #4183: Proposed epithelial-immune cell transition (EIT) of cancer cells may be critical for survival of prostate cancers via evasion of immune surveillance. *Cancer Research*, 69(9 Supplement), 4183 LP – 4183. Retrieved from http://cancerres.aacrjournals.org/content/69/9_Supplement/4183.abstract
- Greene, H. S. N. (1940). Familial Mammary Tumors In The Rabbit. *Journal of Experimental Medicine*, 71(3), 305–324. <https://doi.org/10.1084/jem.71.3.305>
- Gu, C. D., Osaki, T., Oyama, T., Inoue, M., Kodate, M., Dobashi, K., ... Yasumoto, K. (2002). Detection of micrometastatic tumor cells in pn0 lymph nodes of patients with completely resected nonsmall cell lung cancer: Impact on recurrence and survival. *Annals of Surgery*, 235(1), 133–139. <https://doi.org/10.1097/0000658-200201000-00017>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 32(18), 2847–2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Guideline program oncology (German Cancer Society, German Cancer Aid, AWMF), S. (2018). Interdisciplinary S3-guideline: prevention, diagnostics, therapy and aftercare of lung cancer. *Guideline Program Oncology, long vers.*(AWMF reg no. 020/007OL), 1–417. Retrieved from https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-007OL_1_S3_Lungenkarzinom_2018-03.pdf
- Guo, W., Yang, X.-R., Sun, Y.-F., Shen, M.-N., Ma, X.-L., Wu, J., ... Fan, J. (2014). Clinical Significance of EpCAM mRNA-Positive Circulating Tumor Cells in Hepatocellular Carcinoma by an Optimized Negative Enrichment and qRT-PCR-Based Platform. *Clinical Cancer Research*, 20(18), 4794–4805. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0251>
- Gupta, G. P., & Massagué, J. (2006). Cancer Metastasis: Building a Framework. *Cell*, 127(4), 679–695. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>
- Guzvic, M., Braun, B., Ganzer, R., Burger, M., Nerlich, M., Winkler, S., ... Klein, C. A. (2014). Combined genome and transcriptome analysis of single disseminated cancer cells from bone marrow of prostate cancer patients reveals unexpected transcriptomes. *Cancer Research*, 74(24), 7383–7394. <https://doi.org/10.1158/0008->

- Hammerman, P. S., Sos, M. L., Ramos, A. H., Xu, C., Dutt, A., Zhou, W., ... Meyerson, M. (2011). Mutations in the DDR2 Kinase Gene Identify a Novel Therapeutic Target in Squamous Cell Lung Cancer. *Cancer Discovery*, 1(1), 78–89. <https://doi.org/10.1158/2159-8274.CD-11-0005>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100(1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harbeck, N., Untch, M., Pache, L., & Eiermann, W. (1994). Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *British Journal of Cancer*, 69(3), 566–571. <https://doi.org/10.1038/bjc.1994.103>
- Hartkopf, A. D., Banys, M., Meier-Stiegen, F., Hahn, M., Röhm, C., Hoffmann, J., ... Fehm, T. (2013). The HER2 status of disseminated tumor cells in the bone marrow of early breast cancer patients is independent from primary tumor and predicts higher risk of relapse. *Breast Cancer Research and Treatment*, 138(2), 509–517. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2470-9>
- Hartmann, C. H., & Klein, C. A. (2006). Gene expression profiling of single cells on large-scale oligonucleotide arrays. *Nucleic Acids Research*, 34(21). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl740>
- Haunschild, G. (2013). *Nachweis und molekulare Charakterisierung EpCAM-positiver Zellen im Knochenmark von Mammakarzinom-Patientinnen*.
- Hay, S. B., Ferchen, K., Chetal, K., Grimes, H. L., & Salomonis, N. (2018). The Human Cell Atlas bone marrow single-cell interactive web portal. *Experimental Hematology*, 68, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2018.09.004>
- Hayes, D. F. (2006). Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival. *Clinical Cancer Research*, 12(14), 4218–4224. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2821>
- Holmes, N. (2006). CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology*, 117(2), 145–155. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2005.02265.x>
- Hsu, C. P., Chen, C. Y., Kwang, P. C., Miao, J., Hsia, J. Y., & Shai, S. E. (2000). Bone-marrow microinvolvement in non-small cell lung cancer is not a reliable indicator of tumour recurrence and prognosis. *European Journal of Surgical Oncology*, 26(7), 691–695. <https://doi.org/10.1053/ejso.2000.0982>
- Hsu, Chung Ping, Shai, S. E., Hsia, J. Y., & Chen, C. Y. (2004). Clinical Significance of Bone Marrow Microinvolvement in Nonsmall Cell Lung Carcinoma: A Long-Term Follow-Up Report. *Cancer*, 100(4), 794–800. <https://doi.org/10.1002/cncr.20027>
- Hüsemann, Y., Geigl, J. B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., ... Klein, C. A. (2008). Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell*, 13(1), 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.003>

- Imrich, S., Hachmeister, M., & Gires, O. (2012). EpCAM and its potential role in tumor-initiating cells. *Cell Adhesion & Migration*, 6(1), 30–38. <https://doi.org/10.4161/cam.18953>
- Irlbeck, C. (2019). *Molecular characterization of disseminated cancer cells isolated from patients with luminal B type breast cancer*.
- Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T., & Minato, N. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(19), 12293–12297. <https://doi.org/10.1073/pnas.192461099>
- Jamal-Hanjani, M., Wilson, G. A., McGranahan, N., Birkbak, N. J., Watkins, T. B. K., Veeriah, S., ... Swanton, C. (2017). Tracking the Evolution of Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 376(22), 2109–2121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1616288>
- Janssen-Heijnen, M. L. G., van Erning, F. N., De Ruyscher, D. K., Coebergh, J. W. W., & Groen, H. J. M. (2015). Variation in causes of death in patients with non-small cell lung cancer according to stage and time since diagnosis. *Annals of Oncology*, 26(5), 902–907. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv061>
- JGI DataScience. (2019). BBtools software suite. <https://Jgi.Doe.Gov/Data-and-Tools/Bb-Tools>.
- Jiang, E., Yan, T., Xu, Z., & Shang, Z. (2019). Tumor Microenvironment and Cell Fusion. *BioMed Research International*, 2019, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2019/5013592>
- Kaufmann, O., Fietze, E., Mengers, J., & Dietel, M. (2001). Value of p63 and Cytokeratin 5/6 as Immunohistochemical Markers for the Differential Diagnosis of Poorly Differentiated and Undifferentiated Carcinomas. *American Journal of Clinical Pathology*, 116(6), 823–830. <https://doi.org/10.1309/21TW-2NDG-JRK4-PFJX>
- Kawano, R., Hata, E., Ikeda, S., & Sakaguchi, H. (2002). Micrometastasis to lymph nodes in stage I left lung cancer patients. *Annals of Thoracic Surgery*, 73(5), 1558–1562. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(02\)03398-2](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(02)03398-2)
- Kazandjian, D., Blumenthal, G. M., Yuan, W., He, K., Keegan, P., & Pazdur, R. (2016). FDA Approval of Gefitinib for the Treatment of Patients with Metastatic EGFR Mutation–Positive Non–Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research*, 22(6), 1307–1312. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2266>
- Kazandjian, D., Suzman, D. L., Blumenthal, G., Mushti, S., He, K., Libeg, M., ... Pazdur, R. (2016). FDA Approval Summary: Nivolumab for the Treatment of Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer With Progression On or After Platinum-Based Chemotherapy. *The Oncologist*, 21(5), 634–642. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0507>
- Keller, L., Werner, S., & Pantel, K. (2019). Biology and clinical relevance of EpCAM. *Cell Stress*, 3(6), 165–180. <https://doi.org/10.15698/cst2019.06.188>
- Kim, E. S., Herbst, R. S., Wistuba, I. I., Lee, J. J., Blumenschein, G. R., Tsao, A., ... Hong, W. K. (2011). The BATTLE Trial: Personalizing Therapy for Lung Cancer. *Cancer Discovery*, 1(1), 44–53. <https://doi.org/10.1158/2159-8274.CD-10-0010>
- Kim, E. Y., Cho, E. N., Park, H. S., Kim, A., Hong, J. Y., Lim, S., ... Chang, Y. S. (2016). Genetic heterogeneity

- of actionable genes between primary and metastatic tumor in lung adenocarcinoma. *BMC Cancer*, *16*(1), 27. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2049-z>
- Klein, C. A. (2009). Parallel progression of primary tumours and metastases. *Nature Reviews Cancer*, *9*(4), 302–312. <https://doi.org/10.1038/nrc2627>
- Klein, C. A., Blankenstein, T. J. F., Schmidt-Kittler, O., Petronio, M., Polzer, B., Stoecklein, N. H., & Riethmüller, G. (2002). Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. *Lancet*, *360*(9334), 683–689. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09838-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09838-0)
- Klein, C. A., Schmidt-Kittler, O., Schardt, J. A., Pantel, K., Speicher, M. R., & Riethmüller, G. (1999). Comparative genomic hybridization, loss of heterozygosity, and DNA sequence analysis of single cells. *Genetics*, *96*(April), 4494–4499. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4494>
- Klein, C. A., Zohlhöfer, D., Petat-Dutter, K., & Wendler, N. (2003). Gene Expression Analysis of a Single or Few Cells. *Current Protocols in Molecular Biology*, *61*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb25b08s61>
- Klotz, R., Thomas, A., Teng, T., Han, S. M., Iriondo, O., Li, L., ... Yu, M. (2020). Circulating Tumor Cells Exhibit Metastatic Tropism and Reveal Brain Metastasis Drivers. *Cancer Discovery*, *10*(1), 86–103. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0384>
- Köllermann, J., Weikert, S., Schostak, M., Kempkensteffen, C., Kleinschmidt, K., Rau, T., & Pantel, K. (2008). Prognostic Significance of Disseminated Tumor Cells in the Bone Marrow of Prostate Cancer Patients Treated With Neoadjuvant Hormone Treatment. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(30), 4928–4933. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.0441>
- Konishi, J. (2004). B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression. *Clinical Cancer Research*, *10*(15), 5094–5100. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0428>
- Krag, D. N., Kusminsky, R., Manna, E., Weaver, D., Harlow, S. P., Covelli, M., ... Amarante, P. (2009). Cytokeratin-positive Cells in the Bone Marrow of Breast Cancer Patients and Noncancer Donors. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, *17*(5), 403–408. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31819f4d6b>
- Kris, M. G., Gaspar, L. E., Chaft, J. E., Kennedy, E. B., Azzoli, C. G., Ellis, P. M., ... Weyant, M. (2017). Adjuvant Systemic Therapy and Adjuvant Radiation Therapy for Stage I to IIIA Completely Resected Non-Small-Cell Lung Cancers: American Society of Clinical Oncology/Cancer Care Ontario Clinical Practice Guideline Update. *Journal of Clinical Oncology*, *35*(25), 2960–2974. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.72.4401>
- Kubuschok, B., Passlick, B., Izbicki, J. R., Thetter, O., & Pantel, K. (1999). Disseminated tumor cells in lymph nodes as a determinant for survival in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Pneumologie*, *53*(5).
- Kuper, H., Boffetta, P., & Adami, H.-O. (2002). Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *Journal of Internal Medicine*, *252*(3), 206–224. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.2002.01022.x>
- Kuukasjärvi, T., Karhu, R., Tanner, M., Kähkönen, M., Schäffer, A., Nupponen, N., ... Isola, J. (1997). Genetic

- heterogeneity and clonal evolution underlying development of asynchronous metastasis in human breast cancer. *Cancer Research*, 57(8), 1597–1604. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108466>
- Kwapisz, D. (2017). The first liquid biopsy test approved. Is it a new era of mutation testing for non-small cell lung cancer? *Annals of Translational Medicine*, 5(3), 46–46. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.01.32>
- Lammers, R., Giesert, C., Grünebach, F., Marxer, A., Vogel, W., & Bühring, H. J. (2002). Monoclonal antibody 9C4 recognizes epithelial cellular adhesion molecule, a cell surface antigen expressed in early steps of erythropoiesis. *Experimental Hematology*, 30(6), 537–545. [https://doi.org/10.1016/S0301-472X\(02\)00798-1](https://doi.org/10.1016/S0301-472X(02)00798-1)
- Latza, U., Niedobitek, G., Schwarting, R., Nekarda, H., & Stein, H. (1990). Ber-EP4: new monoclonal antibody which distinguishes epithelia from mesothelial. *Journal of Clinical Pathology*, 43(3), 213–219. <https://doi.org/10.1136/jcp.43.3.213>
- Lazarus, D. R., & Ost, D. E. (2013). How and when to use genetic markers for nonsmall cell lung cancer. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 19(4), 1. <https://doi.org/10.1097/MCP.0b013e328362075c>
- Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., & Shivakrupa, R. (2005). Normal and Oncogenic Forms of the Receptor Tyrosine Kinase Kit. *Stem Cells*, 23(1), 16–43. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0117>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(14), 1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Liang, H., Liang, W., Zhao, L., Chen, D., Zhang, J., Zhang, Y., ... He, J. (2018). Robotic Versus Video-assisted Lobectomy/Segmentectomy for Lung Cancer. *Annals of Surgery*, 268(2), 254–259. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002346>
- Liao, L., Ji, X., Ge, M., Zhan, Q., Huang, R., Liang, X., & Zhou, X. (2018). Characterization of genetic alterations in brain metastases from non-small cell lung cancer. *FEBS Open Bio*, 8(9), 1544–1552. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12501>
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2013). The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research*, 41(10), e108–e108. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt214>
- Lortet-Tieulent, J., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Rutherford, M., Weiderpass, E., & Bray, F. (2014). International trends in lung cancer incidence by histological subtype: Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer*, 84(1), 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.01.009>
- Lu, T., Yang, X., Huang, Y., Zhao, M., Li, M., Ma, K., ... Wang, Q. (2019). Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades. *Cancer Management and Research, Volume 11*, 943–953. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S187317>
- Lukeis, R., Irving, L., Garson, M., & Hasthorpe, S. (1990). Cytogenetics of non-small cell lung cancer: Analysis of consistent non-random abnormalities. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2(2), 116–124. <https://doi.org/10.1002/gcc.2870020207>
- Luzzi, K. J., MacDonald, I. C., Schmidt, E. E., Kerkvliet, N., Morris, V. L., Chambers, A. F., & Groom, A. C.

- (1998). Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. *The American Journal of Pathology*, 153(3), 865–873. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65628-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65628-3)
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., ... Haber, D. A. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. *New England Journal of Medicine*, 350(21), 2129–2139. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040938>
- Manjunath, Y., Porciani, D., Mitchem, J. B., Suvilesh, K. N., Avella, D. M., Kimchi, E. T., ... Kaifi, J. T. (2020). Tumor-Cell-Macrophage Fusion Cells as Liquid Biomarkers and Tumor Enhancers in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1872. <https://doi.org/10.3390/ijms21051872>
- Marra, A., Richardsen, G., Wagner, W., Müller-Tidow, C., Koch, O. M., & Hillejan, L. (2011). Prognostic factors of resected node-positive lung cancer: location, extent of nodal metastases, and multimodal treatment. *Thoracic Surgical Science*, 8, Doc01. <https://doi.org/10.3205/tss000021>
- Marsee, D. K., Pinkus, G. S., & Yu, H. (2010). CD71 (Transferrin Receptor). *American Journal of Clinical Pathology*, 134(3), 429–435. <https://doi.org/10.1309/AJCPCRK3MOAOJ6AT>
- Massoner, P., Thomm, T., Mack, B., Untergasser, G., Martowicz, A., Bobowski, K., ... Pühr, M. (2014). EpCAM is overexpressed in local and metastatic prostate cancer, suppressed by chemotherapy and modulated by MET-associated miRNA-200c/205. *British Journal of Cancer*, 111(5), 955–964. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.366>
- Mogi, A., & Kuwano, H. (2011). TP53 Mutations in Nonsmall Cell Lung Cancer. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2011, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2011/583929>
- Molina, F., Bouanani, M., Pau, B., & Granier, C. (1996). Characterization of the Type-1 Repeat from Thyroglobulin, a Cysteine-Rich Module Found in Proteins from Different Families. *European Journal of Biochemistry*, 240(1), 125–133. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.0125h.x>
- Molina, J. R., Yang, P., Cassivi, S. D., Schild, S. E., & Adjei, A. A. (2008). Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(5), 584–594. <https://doi.org/10.4065/83.5.584>
- Moll, R., Divo, M., & Langbein, L. (2008). The human keratins: biology and pathology. *Histochemistry and Cell Biology*, 129(6), 705–733. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0435-6>
- Morgensztern, D., Ng, S. H., Gao, F., & Govindan, R. (2010). Trends in Stage Distribution for Patients with Non-small Cell Lung Cancer: A National Cancer Database Survey. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(1), 29–33. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181c5920c>
- Munz, M., Baeuerle, P. A., & Gires, O. (2009). The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Research*, 69(14), 5627–5629. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0654>
- Nichols, L., Saunders, R., & Knollmann, F. D. (2012). Causes of Death of Patients With Lung Cancer. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 136(12), 1552–1557. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0521-OA>
- Nosotti, M., Tosi, D., Palleschi, A., Rosso, L., Mendogni, P., & Santambrogio, L. (2008). Immunocytochemical

- detection of occult tumor cells in the bone marrow: Prognostic impact on early stages of lung cancer. *European Surgical Research*, 41(3), 267–271. <https://doi.org/10.1159/000141961>
- NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group. (2008). Chemotherapy in Addition to Supportive Care Improves Survival in Advanced Non–Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Individual Patient Data From 16 Randomized Controlled Trials. *Journal of Clinical Oncology*, 26(28), 4617–4625. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.7162>
- Offner, S., Schmaus, W., Witter, K., Baretton, G. B., Schlimok, G., Passlick, B., ... Pantel, K. (1999). p53 gene mutations are not required for early dissemination of cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(12), 6942–6946. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.12.6942>
- Ohgami, A., Mitsudomi, T., Sugio, K., Tsuda, T., Oyama, T., Nishida, K., ... Yasumoto, K. (1997). Micrometastatic tumor cells in the bone marrow of patients with non- small cell lung cancer. *Annals of Thoracic Surgery*, 64(2), 363–367. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(97\)00543-2](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(97)00543-2)
- Ohta, Y., Oda, M., Wu, J., Tsunozuka, Y., Hiroshi, M., Nonomura, A., & Watanabe, G. (2001). Can tumor size be a guide for limited surgical intervention in patients with peripheral non-small cell lung cancer? Assessment from the point of view of nodal micrometastasis. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 122(5), 900–906. <https://doi.org/10.1067/mtc.2001.117626>
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(1), a001008. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001008>
- Osaki, T., Oyama, T., Gu, C. D., Yamashita, T., So, T., Takenoyama, M., ... Yasumoto, K. (2002). Prognostic impact of micrometastatic tumor cells in the lymph nodes and bone marrow of patients with completely resected stage I non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 20(13), 2930–2936. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.11.011>
- Osaki, T., Oyama, T., Inoue, M., Gu, C. D., Kodate, M., Aikawa, M., ... Yasumoto, K. (2001). Molecular biological markers and micrometastasis in resected non-small-cell lung cancer. Prognostic implications. *The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery: Official Publication of the Japanese Association for Thoracic Surgery = Nihon Kyōbu Geka Gakkai Zasshi*, 49(9), 545–551. <https://doi.org/10.1007/BF02913530>
- Ouyang, W. W., Lu, B., Fu, H. Y., He, C., Long, Y. G., & Wang, P. (2008). Detection of regional lymph node micrometastasis and its impact on long-term survival of non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Ai Zheng = Aizheng = Chinese Journal of Cancer*, 27(7), 756–760.
- Paez, J. G. (2004). EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science*, 304(5676), 1497–1500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>
- Paget, S. (1889). The Distribution Of Secondary Growths Ii Cancer Of The Breast. *The Lancet*, 133(3421), 571–573. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)49915-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)49915-0)
- Palma, D. A., Tyldesley, S., Sheehan, F., Mohamed, I. G., Smith, S., Wai, E., ... Senan, S. (2010). Stage I Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) in Patients Aged 75 Years and Older: Does Age Determine Survival After

- Radical Treatment? *Journal of Thoracic Oncology*, 5(6), 818–824.
<https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181d6e052>
- Pantel, K., Izbicki, J., Passlick, B., Angstwurm, M., Häussinger, K., Thetter, O., & Riethmüller, G. (1996). Frequency and prognostic significance of isolated tumour cells in bone marrow of patients with non-small-cell lung cancer without overt metastases. *Lancet*, 347, 649–653.
- Pantel, Klaus, & Alix-Panabières, C. (2019). Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 16(7), 409–424. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0187-3>
- Pantel, Klaus, & Brakenhoff, R. H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer*, 4(6), 448–456. <https://doi.org/10.1038/nrc1370>
- Parkin, D. M., Pisani, P., Lopez, A. D., & Masuyer, E. (1994). At least one in seven cases of cancer is caused by smoking. Global estimates for 1985. *International Journal of Cancer*, 59(4), 494–504. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910590411>
- Passlick, B., Kubuschok, B., Izbicki, J. R., Thetter, O., & Pantel, K. (1999). [Isolated tumor cells in bone marrow predicts reduced survival in lymph node-negative non-small-cell lung cancer]. *Pneumologie*, 54(8), 355–360. <https://doi.org/10.1055/s-2000-6953>
- Passlick, Bernward, Izbicki, J. R., Kubuschok, B., Nathrath, W., Thetter, O., Pichlmeier, U., ... Pantel, K. (1994). Immunohistochemical assessment of individual tumor cells in lymph nodes of patients with non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 12(9), 1827–1832. <https://doi.org/10.1200/JCO.1994.12.9.1827>
- Passlick, Bernward, Izbicki, J. R., Kubushok, B., Thetter, O., & Pantel, K. (1996). Detection of disseminated lung cancer cells in lymph nodes: Impact on staging and prognosis. *Annali Italiani Di Chirurgia*, 70(6), 839–840.
- Pikor, L. A., Ramnarine, V. R., Lam, S., & Lam, W. L. (2013). Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer*, 82(2), 179–189. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.07.025>
- Poncelet, A. J., Weynand, B., Ferdin, F., Robert, A. R., & Noirhomme, P. H. (2001). Bone marrow micrometastasis might not be a short-term predictor of survival in early stages non-small cell lung carcinoma. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 20(3), 481–488. [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(01\)00830-2](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(01)00830-2)
- Poste, G., & Fidler, I. J. (1980). The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature*, 283(5743), 139–146. <https://doi.org/10.1038/283139a0>
- Rami-Porta, R., Ball, D., Crowley, J., Giroux, D. J., Jett, J., Travis, W. D., ... Goldstraw, P. (2007). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for the Revision of the T Descriptors in the Forthcoming (Seventh) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 2(7), 593–602. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31807a2f81>
- Reck, M., von Pawel, J., Zatloukal, P., Ramlau, R., Gorbounova, V., Hirsh, V., ... Manegold, C. (2009). Phase III Trial of Cisplatin Plus Gemcitabine With Either Placebo or Bevacizumab As First-Line Therapy for Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer: AVAiL. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8), 1227–1234. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.5466>

- Rena, O., Carsana, L., Cristina, S., Papalia, E., Massera, F., Errico, L., ... Casadio, C. (2007). Lymph node isolated tumor cells and micrometastases in pathological stage I non-small cell lung cancer: prognostic significance. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 32(6), 863–867. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2007.09.014>
- Riethdorf, S., Wikman, H., & Pantel, K. (2008). Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *International Journal of Cancer*, 123(9), 1991–2006. <https://doi.org/10.1002/ijc.23825>
- Roh, M. S., Lee, J. I., Choi, P. J., & Hong, Y. S. (2004). Relationship between micropapillary component and micrometastasis in the regional lymph nodes of patients with stage I lung adenocarcinoma. *Histopathology*, 45(6), 580–586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2004.01953.x>
- Rooney, M., Devarakonda, S., & Govindan, R. (2013). Genomics of Squamous Cell Lung Cancer. *The Oncologist*, 18(6), 707–716. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2013-0063>
- Rous, P., & Beard, J. W. (1935). The Progression To Carcinoma Of Virus-Induced Rabbit Papillomas. *Journal of Experimental Medicine*, 62(4), 523–548. <https://doi.org/10.1084/jem.62.4.523>
- Rud, A K, Borgen, E., Mælandsmo, G. M., Flatmark, K., Le, H., Josefsen, D., ... Boye, K. (2013). Clinical significance of disseminated tumour cells in non-small cell lung cancer. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.450>
- Rud, Ane Kongsgaard, Boye, K., Fodstad, Ø., Juell, S., Jørgensen, L. H., Solberg, S., ... Mælandsmo, G. M. (2016). Detection of disseminated tumor cells in lymph nodes from patients with early stage non-small cell lung cancer. *Diagnostic Pathology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13000-016-0504-4>
- Ruffato, A., Mattioli, S., Pileri, S., Daddi, N., D'Ovidio, F., Pilotti, V., & Tazzari, P. (2009). Do bone marrow isolated tumor cells influence long-term survival of non-small cell lung cancer? *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 35(3), 463–468. <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2008.11.017>
- Rusch, V. W., Hawes, D., Decker, P. A., Martin, S. E., Abati, A., Landreneau, R. J., ... Cote, R. J. (2011). Occult metastases in lymph nodes predict survival in resectable non-small-cell lung cancer: Report of the ACOSOG Z0040 trial. *Journal of Clinical Oncology*, 29(32), 4313–4319. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.35.2500>
- Saber, A., Hiltermann, T. J. N., Kok, K., Terpstra, M. M., de Lange, K., Timens, W., ... van den Berg, A. (2016). Mutation patterns in small cell and non-small cell lung cancer patients suggest a different level of heterogeneity between primary and metastatic tumors. *Carcinogenesis*, 38(2), bgw128. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw128>
- Sandler, A., Gray, R., Perry, M. C., Brahmer, J., Schiller, J. H., Dowlati, A., ... Johnson, D. H. (2006). Paclitaxel–Carboplatin Alone or with Bevacizumab for Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 355(24), 2542–2550. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa061884>
- Sandler, A., Yi, J., Dahlberg, S., Kolb, M. M., Wang, L., Hambleton, J., ... Johnson, D. H. (2010). Treatment Outcomes by Tumor Histology in Eastern Cooperative Group Study E4599 of Bevacizumab with Paclitaxel/Carboplatin for Advanced Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 5(9), 1416–1423. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181da36f4>
- Scheinin, I., Sie, D., Bengtsson, H., van de Wiel, M. A., Olshen, A. B., van Thuijl, H. F., ... Ylstra, B. (2014).

- DNA copy number analysis of fresh and formalin-fixed specimens by shallow whole-genome sequencing with identification and exclusion of problematic regions in the genome assembly. *Genome Research*, 24(12), 2022–2032. <https://doi.org/10.1101/gr.175141.114>
- Schlimok, G., Funke, I., Holzmann, B., Göttlinger, G., Schmidt, G., Häuser, H., ... Riethmüller, G. (1987). Micrometastatic cancer cells in bone marrow: in vitro detection with anti-cytokeratin and in vivo labeling with anti-17-1A monoclonal antibodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8672–8676. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8672>
- Schneck, H., Gierke, B., Uppenkamp, F., Behrens, B., Niederacher, D., Stoecklein, N. H., ... Neubauer, H. (2015). EpCAM-Independent Enrichment of Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer. *PLOS ONE*, 10(12), e0144535. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144535>
- Sheppard, H. M., Corneillie, S. I., Espiritu, C., Gatti, A., & Liu, X. (1999). New Insights into the Mechanism of Inhibition of p53 by Simian Virus 40 Large T Antigen. *Molecular and Cellular Biology*, 19(4), 2746–2753. <https://doi.org/10.1128/MCB.19.4.2746>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Singh, A., Veeriah, V., Xi, P., Labella, R., Chen, J., Romeo, S. G., ... Kusumbe, A. P. (2019). Angiocrine signals regulate quiescence and therapy resistance in bone metastasis. *JCI Insight*, 4(13). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.125679>
- Sosa, María Soledad, Bragado, P., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2014). Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 611–622. <https://doi.org/10.1038/nrc3793>
- Sosa, Maria Soledad, Bragado, P., Debnath, J., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2013). Regulation of Tumor Cell Dormancy by Tissue Microenvironments and Autophagy (pp. 73–89). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1445-2_5
- Steeg, P. S. (2006). Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nature Medicine*, 12(8), 895–904. <https://doi.org/10.1038/nm1469>
- Stoecklein, N. H., & Klein, C. A. (2010). Genetic disparity between primary tumours, disseminated tumour cells, and manifest metastasis. *International Journal of Cancer*, 126(3), 589–598. <https://doi.org/10.1002/ijc.24916>
- Sugio, K., Kase, S., Sakada, T., Yamazaki, K., Yamaguchi, M., Ondo, K., & Yano, T. (2002). Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and β -catenin: Risk assessment by immunohistochemistry. *Surgery*, 131(1 SUPPL.), 226–231. <https://doi.org/10.1067/msy.2002.119793>
- Sun, S., Schiller, J. H., & Gazdar, A. F. (2007). Lung cancer in never smokers - A different disease. *Nature Reviews Cancer*, 7(10), 778–790. <https://doi.org/10.1038/nrc2190>
- Takao, M., Nagai, Y., & Torii, T. (2013). Cysteine-Poor Region-Specific EpCAM Monoclonal Antibody Recognizing Native Tumor Cells with High Sensitivity. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and*

Immunotherapy, 32(2), 73–80. <https://doi.org/10.1089/mab.2012.0082>

- Tate, J. G., Bamford, S., Jubb, H. C., Sondka, Z., Beare, D. M., Bindal, N., ... Forbes, S. A. (2019). COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D941–D947. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1015>
- Testa, J. R., Siegfried, J. M., Liu, Z., Hunt, J. D., Feder, M. M., Litwin, S., ... Keller, S. M. (1994). Cytogenetic analysis of 63 non-small cell lung carcinomas: Recurrent chromosome alterations amid frequent and widespread genomic upheaval. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 11(3), 178–194. <https://doi.org/10.1002/gcc.2870110307>
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489(7417), 519–525. <https://doi.org/10.1038/nature11404>
- The Cancer Genome Atlas Research Network. (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 511(7511), 543–550. <https://doi.org/10.1038/nature13385>
- Uzunoglu, F. G., Dethlefsen, E., Hanssen, A., Wrage, M., Deutsch, L., Harms-Effenberger, K., ... Wikman, H. (2014). Loss of 4q21.23-22.1 is a prognostic marker for disease free and overall survival in non-small cell lung cancer. *PLoS ONE*, 9(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113315>
- Valastyan, S., & Weinberg, R. A. (2011). Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*, 147(2), 275–292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.024>
- van Dongen, J. J., Seriu, T., Panzer-Grümayer, E. R., Biondi, A., Pongers-Willems, M. J., Corral, L., ... Bartram, C. R. (1998). Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *The Lancet*, 352(9142), 1731–1738. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04058-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04058-6)
- Vansteenkiste, J., Crinò, L., Doooms, C., Douillard, J. Y., Faivre-Finn, C., Lim, E., ... Westeel, V. (2014). 2nd ESMO Consensus Conference on Lung Cancer: early-stage non-small-cell lung cancer consensus on diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 25(8), 1462–1474. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu089>
- Varela, G., & Thomas, P. A. (2014). Surgical management of advanced non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*, 6 Suppl 2(SUPPL.2), S217-23. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2014.04.34>
- Veridex. (2013). The CellSearch® System. Retrieved November 18, 2020, from <https://www.cellsearchctc.com>
- Villablanca, E. J., & Mora, J. R. (2008). A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *European Journal of Immunology*, 38(11), 2975–2980. <https://doi.org/10.1002/eji.200838919>
- Wedding, U., Röhrig, B., Klippstein, A., Pientka, L., & Höffken, K. (2007). Age, severe comorbidity and functional impairment independently contribute to poor survival in cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 133(12), 945–950. <https://doi.org/10.1007/s00432-007-0233-x>
- Weinberg, R. A. (2008). Mechanisms of malignant progression. *Carcinogenesis*, 29(6), 1092–1095. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn104>
- Weinberg, R. A. (2014). *The Biology of the Cancer*. Garland Science (Vol. XXXIII). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

- Went, P., Vasei, M., Bubendorf, L., Terracciano, L., Tornillo, L., Riede, U., ... Baeuerle, P. A. (2006). Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *British Journal of Cancer*, *94*(1), 128–135. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602924>
- Werner-Klein, M., Scheitler, S., Hoffmann, M., Hodak, I., Dietz, K., Lehnert, P., ... Klein, C. A. (2018). Genetic alterations driving metastatic colony formation are acquired outside of the primary tumour in melanoma. *Nature Communications*, *9*(1), 595. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02674-y>
- Wikman, H., Vessella, R., & Pantel, K. (2008). Cancer micrometastasis and tumour dormancy. *APMIS*, *116*(7–8), 754–770. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2008.01033.x>
- Wu, J., Ohta, Y., Minato, H., Tsunozuka, Y., Oda, M., Watanabe, Y., & Watanabe, G. (2001). Nodal occult metastasis in patients with peripheral lung adenocarcinoma of 2.0 cm or less in diameter. Invited commentary. *Annals of Thoracic Surgery*, *71*(6), 1777–1778. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(01\)02623-6](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(01)02623-6)
- Wynder, E. L., & Muscat, J. E. (1995). The changing epidemiology of smoking and lung cancer histology. *Environmental Health Perspectives*, *103*(SUPPL. 8), 143–148. <https://doi.org/10.2307/3432301>
- Yamashita, T., Uramoto, H., Onitsuka, T., Ono, K., Baba, T., So, T., ... Yasumoto, K. (2010). Association between lymphangiogenesis-/micrometastasis- and adhesion-related molecules in resected stage I NSCLC. *Lung Cancer*, *70*(3), 320–328. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.02.013>
- Yasumoto, K., Osaki, T., Watanabe, Y., Kato, H., & Yoshimura, T. (2003). Prognostic value of cytokeratin-positive cells in the bone marrow and lymph nodes of patients with resected nonsmall cell lung cancer: A multicenter prospective study. *Annals of Thoracic Surgery*, *76*(1), 194–201. [https://doi.org/10.1016/S0003-4975\(03\)00130-9](https://doi.org/10.1016/S0003-4975(03)00130-9)
- Zamay, T. N., Zamay, G. S., Kolovskaya, O. S., Zukov, R. A., Petrova, M. M., Gargaun, A., ... Kichkailo, A. S. (2017). Current and Prospective Protein Biomarkers of Lung Cancer. *Cancers*, *9*(11). <https://doi.org/10.3390/cancers9110155>
- Zhang, L., Ridgway, L. D., Wetzel, M. D., Ngo, J., Yin, W., Kumar, D., ... Marchetti, D. (2013). The Identification and Characterization of Breast Cancer CTCs Competent for Brain Metastasis. *Science Translational Medicine*, *5*(180), 180ra48-180ra48. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005109>

9 Danksagung

Krebsforschung ist für mich eine sehr persönliche Angelegenheit und ich möchte mich an dieser Stelle bei allen herzlichst bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben und diejenigen würdigen, die in mir die Leidenschaft und den Ehrgeiz zur Forschung – insbesondere der onkologischen Forschung geweckt haben.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Christoph Klein bedanken. Mit dem Überlassen des Themas dieser Arbeit hat er mir nicht nur Vertrauen in meine wissenschaftlichen Fähigkeiten, sondern auch Vertrauen in den Umgang mit diesem wertvollen und einzigartigen Probenkollektiv entgegengebracht. Mit einer hervorragenden fachlichen Betreuung und seinem persönlichen Mentorat konnte ich als Forscher wachsen und lernte selbständig und effizient wissenschaftlichen Fragen nachzugehen.

Besonderen Dank gilt auch allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren und des ITEM-R der Fraunhofer Gesellschaft, die mich und das Gelingen dieser Arbeit in großem Maße unterstützt haben. Großer Dank an Miodrag Guzvic, Julia Greindl-Junghans, Courtney König, Christian Mulas, Sandra Huber, Severin Gütter und Bernhard Polzer für die fachlichen Diskussionen und Ratschlägen, die Unterstützung bei der Forschungsarbeit und den aufmunternden Worten in schwierigen Zeiten. Des Weiteren großer Dank an Christoph Irlbeck, Zbigniew Czyz, Giancarlo Feliciello, Sarah Hücker und Stefan Kirsch für die Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der Sequenzierarbeiten. Zuletzt auch ein herzliches Dankeschön an alle Technischen Assistenten der Labore, die für das Gelingen eines jeden Vorhabens essentiell wichtig sind. In vielen Fällen habe ich nicht nur Kollegen, sondern Freunde gefunden.

Ich danke den Kooperationspartnern und insbesondere allen Patientinnen und Patienten, die in der ohnehin schwierigen Situation mit einer Krebserkrankung, die Forschung unterstützen und diese Arbeit überhaupt erst möglich machten.

Zuletzt auch ein Dankeschön an meine Familie, insbesondere an meine Mutter Margit, an meine erweiterte Familie in den USA und an meine Freunde, die mich immer unterstützen und auch in den schwierigsten Zeiten bedingungslos an meiner Seite stehen. Danke an Gerhard und Marian für eure Liebe und die Motivation, die euer Schicksal in mir entfachte.

10 Lebenslauf

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

.....

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)