

Positionspapier

Prof. Dr. Neumaier und Prof. Dr. Stefan Holdenrieder

Molekulare labormedizinische Diagnostik im peripheren Blut und in Körperflüssigkeiten

Die Diagnostik aus Blut und Körperflüssigkeiten ist Aufgabe der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin und umfasst Biomarker unterschiedlicher Molekülklassen, Organprovenienz sowie Prozessierungs- und Stoffwechselprodukte.

Das zirkulierende Blut hat Kontakt zu praktisch allen Organen und transportiert deren Gen- und Stoffwechselprodukte ebenso wie Moleküle der Kategorie „Tissue Leakage Marker“, welche im Zusammenhang mit Zellschädigung oder –untergang nachgewiesen werden können. Es wird angenommen, dass zu jeder gegebenen Zeit rund 500.000 verschiedene Proteine und ihre Derivate im Plasma zirkulieren. Hierbei sind die klonale Vielfältigkeit von Immunglobulinen sowie kleinmolekulare Metabolite noch nicht erfasst (Anderson 2002).

Die klassische Analytik klinisch-biochemischer Stoffwechselzusammenhänge hat sich mit der Ankunft des molekularen Zeitalters der Medizin um eine völlig neue Dimension erweitert. Die Kenntnisse um die molekularen Grundlagen als „Blaupause für die Biochemie“ sind die Grundlagen unseres rasch wachsenden Verständnisses der Zusammenhänge vieler Parameter, die seit langem mit den unterschiedlichsten in der Labormedizin vorgehaltenen Methoden analysiert werden.

Molekulargenetische Diagnostik aus der DNA zirkulierender kernhaltiger Blutzellen gehört heute zur diagnostischen Standardkompetenz in der Laboratoriumsmedizin für die Identifikation von Risikoallelen insbesondere bei multifaktoriellen Erkrankungen. Prominente Beispiele sind Thrombose- und Blutungsrisiken, pharmakogenetische Untersuchungen bei Arzneimittelnebenwirkungen oder bei Therapieresistenz, biochemisch gut fassbare Stoffwechselstörungen wie die Hämochromatose u.a. Gemeinsam ist ihnen, dass die molekulargenetischen Untersuchungsergebnisse in ausgezeichneter Weise die traditionellen Stärken in der phänotypischen Diagnostik in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin unterstützen und komplementieren können.

Gerade bei multifaktoriellen Erkrankungen mit komplexem molekularem Hintergrund ist die phänotypische Klassifizierung wegweisend. Für die Bearbeitung komplexer medizinischen Fragen muss sich das Fach daher zunehmend den Herausforderungen stellen, Verbindungen des klassischen Phänotyps mit dem zugrunde liegenden genotypischen und epigenetischen Hintergrund zu ziehen. Dabei ergeben sich gleichzeitig interdisziplinäre Dialoge zu komplementären Aufgaben der Pathologie als Gewebediagnostik sowie der Humangenetik im Zusammenhang mit erblichen Erkrankungen und genetischer Beratung.

Im Blut zirkulierende zellfreie Nukleinsäuren

Neben der genannten molekularen Diagnostik zur Erfassung genetischer Risikofaktoren ermöglichen sensitive Nachweismethoden zunehmend die Erfassung im Blut zirkulierender Tumorzellen (CTCs) sowie seit wenigen Jahren die Analyse frei im Blut zirkulierender DNA (cfDNA) oder subzellulärer Kompartimente wie z.B. Exosomen. Dies sind Nukleinsäuren enthaltende Mikropartikel, die von Zellen auch aktiv sezerniert werden können. Diese neuen Quellen für Nukleinsäurebasierte Diagnostik werden in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin in Zukunft an Bedeutung gewinnen.

Der empfindliche Nachweis von cfDNA ist seit langem bekannt. In verschiedenen Krankheitszuständen – sowie in geringem Maße auch beim Gesunden – lässt sich die Anwesenheit zell-freier zirkulierender Nukleinsäuren im Plasma und Serum (CNAPS) nachweisen (Leon 1977, Fleischhacker 2007, Holdenrieder 2009). Körperliche Anstrengung resultiert in einer deutlichen Erhöhung von cfDNA zum Beispiel bei Langstreckenläufen mit einer ausgeprägten Dynamik. So konnte gezeigt werden, dass unmittelbar nach Ende des Rennens die Konzentration der cfDNA um das rund 20-fache angestiegen war und innerhalb von 2 Stunden wiedernach der Verausgabung wieder abfiel (Atamaniuk 2004).

In den letzten zehn Jahren wurden erhöhte Konzentrationen von zell-freien Nukleinsäuren in verschiedenen Körperflüssigkeiten mit Krankheitszuständen in Verbindung gebracht. Eine Reihe von Studien untersuchte die Frage erhöhter zirkulierender Konzentrationen in der Regel bei akuten Erkrankungen oder Erkrankungszuständen. Diese eignen sich z.B. als Prädiktor für Mortalität bei Sepsis-Patienten (Rhodes 2004). Sie korrelieren statistisch signifikant mit etablierten medizinischen Scores bei Intensivpatienten mit schweren Infektionen und Organdysfunktion (Saukkonen 2007). Die Konzentrationen der cfDNA wurden auch als trennscharfer prognostischer Marker bei Myokardinfarkt und Schlaganfall identifiziert, die auch mit klinisch-chemischen Parametern korrelierten (Rainer 2003, 2006, Antonatus 2006). Auch lässt sich zirkulierende Donor-DNA im Blut von Transplantationspatienten nachweisen. Ebenso wurden erhöhte mRNA-Konzentrationen für Granzyme B und Perforin, Genprodukte zytotoxischer T-Zellen, bei Patienten mit Abstoßung von Nierentransplantaten im Urin gemessen (Li 2001). Schließlich wurden bei verschiedenen Tumorarten erhöhte DNA-Konzentrationen auch im Blut von Patienten gefunden, die nach Resektion des Tumors oder erfolgreicher systemischer Therapie im Sinne eines Verlaufsparameters wieder abfielen. Die Bedeutung zirkulierender DNA für die Unterstützung der Diagnosefindung, Prognoseabschätzung und das Therapiemonitoring von Tumorerkrankungen wurde in mehreren Übersichtsarbeiten ausführlich dargestellt (Fleischhacker und Schmidt 2007, Holdenrieder 2009, Schwarzenbach 2011, Crowley 2013). Wenngleich die Erhöhung der Konzentrationen frei zirkulierender DNA bei diversen Erkrankungsentitäten eine diagnostische Bedeutung zu haben scheint, ist ihre rein quantitative Betrachtung für den gezielten diagnostischen Einsatz limitiert.

Erkrankungsspezifische Veränderungen

Mit zunehmendem pathobiochemischem Verständnis um Krankheitszusammenhänge hat sich in den letzten Jahren der Blick hin zu Erkrankungsspezifischen molekularen Veränderungen erweitert. Methodische Fortschritte machen diese gerade bei Tumorerkrankungen zunehmend auch in Blut und Körperflüssigkeiten analysierbar. Von steigendem Interesse sind genetische Veränderungen von Einzelmutationen über den Verlust oder Zugewinn von Genabschnitten (z.B. bei Verlust der Heterozygotität (LOH) oder Mikrosatelliteninstabilität (MSI)) bis hin zu numerischen Chromosomenaberrationen. Hinzu kommen prinzipiell reversible Veränderungen auf epigenetischer Ebene (z.B. Veränderung des DNA-Methylierungsmusters an Promotorregionen oder diverse Histon-Modifikationen), die eine große Rolle in der Regulation der Transkription spielen. Ebenfalls regulierend auf der Ebene der Transkription sind nicht-kodierende RNA-Marker wie z.B. die 19-24 Basenpaare kurzen microRNAs oder die längeren long-non-coding RNAs (lncRNA). Schließlich sind Genexpressions-Profile (mRNA) in verschiedenen Blutzellen und Kompartimenten aufschlussreich für die Entwicklung von Erkrankungszuständen (Fleischhacker und Schmidt 2007, Schwarzenbach 2011, 2015, Crowley 2013, Gezer 2014, Holdenrieder 2014). Diese neuen diagnostischen Ansatzpunkte befinden sich derzeit zum Teil noch im Forschungs- bzw. Validierungsstadium. Wir können jedoch davon ausgehen, dass sie langfristig die bislang häufig Proteinbasierte Analysestrategie in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin ergänzen und bereichern werden.

Mit den rasanten Fortschritten in den Techniken der massiven parallelen DNA-Sequenzierung (next generation sequencing; NGS) ist seit kurzem eine in die Tiefe gehende Charakterisierung von cfDNA bis hinunter in die Einzelbase möglich geworden. Wesentliche Anwendungen liegen dabei einerseits auf den Gebieten der Humangenetik, wenn es z.B. um die Charakterisierung fetaler DNA im mütterlichen Kreislauf geht. Zum anderen wird blutbasierte Charakterisierung molekularer Defekte bei malignen Erkrankungen die molekularpathologische Analyse des Tumors ergänzen. Beide Anwendungen sind hinsichtlich der analytischen Herausforderungen sehr verwandt, handelt es sich doch um Genomäquivalente, die sich vom Genom des „Wirtes“ unterscheiden lassen und in Abhängigkeit von Stadium bzw. der Schwangerschaftswoche in steigenden Konzentrationen im Blut nachweisbar werden. Wesentliche Impulse wurden auch hier von der Gruppe um Dennis Lo gesetzt (Lo 1997, Poon 2000, Chiu 2011, Tsui 2011). Inzwischen ist gezeigt, dass sich das gesamte fetale Genom aus dem Blut der Schwangeren sequenzieren lässt (Kitzman 2012). Erkenntnisse dieser Art werden z.B. für die Beratungsmöglichkeiten durch die Humangenetik absehbar erhebliche Bedeutung erlangen und sich für die gesamte Medizin zur Herausforderung entwickeln.

Die Labordiagnostik maligner Erkrankungen ist eine zentrale und umfangreiche Aufgabe der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin in der Krankenversorgung, liegt doch die Zahl der Todesfälle durch Tumorerkrankungen in unserer Gesellschaft in der Mortalitätsstatistik an zweiter Stelle hinter den Herz-Kreislauferkrankungen. Im Kontext mit Tumorerkrankungen treten zirkulierende Nukleinsäuren aus im Wesentlichen zwei Quellen auf: 1) zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA), die aus Tumornekrose, -apoptose oder Sekretion der malignen Zelle stammt oder 2) zirkulierender Tumorzellen (CTC), die sich im Rahmen einer Mikrometastasierung in der Zirkulation befinden bzw. deren Nukleinsäuren (Fleischhacker 2007, Schwarzenbach 2011).

Die Untersuchung tumor-assoziiertes mRNA-Expression mittels rtPCR im Blut wurde mit Beginn der 1990er Jahre in unterschiedlichen Tumoren untersucht (Smith 1991, Gerhard 1994). Eine unspezifische, teils induzierbare Hintergrundexpression der tumorassoziierten Marker-Expression durch normale kernhaltige Zellen des Blutes oder Knochenmarks erschwerten jedoch die Spezifitätsbeurteilung und damit die robuste Anwendung in der Diagnostik (Neumaier 1995). Demgegenüber erlauben neue analytische Verfahren heute die exakte Aufklärung somatischer einzelner molekularer Defekte oder ganzer Tumorsignaturen aus der Plasma-cfDNA sowie aus CTCs (Speicher 2014, Lianidou 2015).

Die rasch zunehmenden Kenntnisse in der Pathobiochemie des malignen Wachstums, die Identifikation tumorassoziiertes bzw. -spezifischer molekularer Defekte und sog. „druggable Targets“ sowie die Entwicklung Pathway-spezifischer Medikamente wird diese neue Labordiagnostik wichtige Informationen für Verlaufsbeurteilungen und Therapieentscheidungen beitragen. Waren die klassischen Serum-Tumormarker, mit denen sich die Laboratoriumsmedizin an der Diagnostik maligner Erkrankungen beteiligt hatte, in frühen Tumorstadien häufig durch niedrige Sensitivitäten und Spezifitäten gehandicapped, so lässt sich für die künftig verfügbaren Verfahren der molekularen CNAPS-Diagnostik aufgrund der erheblichen Steigerungen von Spezifität und Sensitivität am ehesten der Begriff „Tumormarker reloaded“ verwenden.

Vier wesentliche diagnostische Anwendungen der Analyse zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) lassen sich für eine moderne Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin zunächst definieren: 1) Charakterisierung einzelner oder komplexer genetischer und epigenetischer Veränderungen im Sinne von Mutations- oder Expressionsprofilen zur Therapiestratifizierung, 2) Verlaufskontrolle molekularer Veränderungen unter Therapie zum Monitoring der Therapiewirksamkeit, 3) Detektion und Charakterisierung molekularer Resistenz unter Therapie, 4) hochsensitiver Nachweis tumorbasierter Nukleinsäuren zur Detektion minimaler Resterkrankung bzw. eines noch präklinischen Progresses.

„Liquid Profiling“

Zunächst in verschiedenen Zusammenhängen geprägt, steht der Begriff „Liquid Biopsy“ in der einschlägigen Literatur derzeit für die Untersuchung von cfDNA oder CTCs in Zusammenhang mit der Charakterisierung von Tumoreigenschaften (Lianidou 2010, Diaz 2014). In unseren Augen wird diese Begrifflichkeit der diagnostischen Bedeutung der Biopsie nicht gerecht. Während die Gewebebiopsie dem Pathologen wichtige Aufschlüsse über komplexe Zusammenhänge geben kann – zu den Klassifikationskriterien zählen Tumornekrose, Hypoxiezeichen, Vaskularisierung und Gefäßstatus des Tumorbetts, Stromareaktion des Normalgewebes, Infiltration des Tumors durch Zellen des innatens und kognaten Immunsystems sowie schließlich wichtige phänotypische Differenzierungsmerkmale der Tumorzellen und ihrer Heterogenität – gibt die sog. „Liquid Biopsy“ ausschließlich über molekulare Eigenschaften des Tumors selber Auskunft. Andererseits wird der Nachweis von Tumoreigenschaften im Blut oder Körperflüssigkeiten – zunächst auf Proteinebene als „Tumormarker“ sowie zellulärer Phänotypisierung leukämischer Zellen und nun zunehmend auf molekularer Basis – seit vielen Jahren von der Labormedizin diagnostisch angewandt. Die Unterscheidung von Tumor- und Normalgewebe bzw. die Charakterisierung des prognostisch relevanten Profils einer Tumorerkrankung lassen sich schließlich auf allen Ebenen diagnostisch verfügbarer Biomoleküle vornehmen. Eine multiparametrische Bewertung von Tumoreigenschaften wird am ehesten durch den Begriff „Liquid Profiling“ erfasst. Dies dient auch der Klärung, dass die Untersuchungen nicht in biotisch entnommenem Gewebe, sondern in Blut oder Körperflüssigkeiten durchgeführt werden, und es um die diagnostisch oder therapeutisch relevante Erfassung eines Krankheitsdefinierenden Markerprofils geht.

„Liquid Profiling“ ist somit in der Klinischen Chemie und Laboratoriumsmedizin verankert und erfährt durch die diagnostische Nutzung von cfDNA und CTCs eine begrüßenswerte Renaissance und Erweiterung.

Companion-Diagnostik zur Therapiestratifizierung bei Tumorerkrankungen

Besondere Bedeutung hat die molekulardiagnostische Charakterisierung von Tumorerkrankungen dadurch erlangt, dass neue biologische Therapien (sog. „Targeted Therapies“) gezielt auf Komponenten von Wachstums-Signalwegen einwirken, die bei Tumorzellen z.B. durch spezifische Mutationen dereguliert sind. Durch extrazellulär wirkende Antikörper oder intrazelluläre ansetzende „small molecules“ werden dauerhaft angeschaltete Komponenten blockiert und das Tumorstadium gehemmt. Allerdings sind die Therapien nur wirksam, wenn die spezifischen molekularen Veränderungen vorliegen, so dass der Nachweis der sog. „Treibermutationen“ im Tumorgewebe Voraussetzung für die Therapiegabe ist (Crowley 2013, Duffy 2013). Dabei geht es oft eher um die Frage, welcher Patient nicht behandelt werden soll, als welcher Patient von der Behandlung mit einem der sog. Biologics profitiert.

Beispiele für den Einsatz dieser Companion-Diagnostik sind der Nachweis von aktivierenden Mutationen (L858R oder Exon-19 Deletion) des epithelial growth factor receptor (EGFR) als Bedingung für die Gabe der EGFR-inhibierenden Tyrosinkinase Inhibitoren Gefitinib und Erlotinib beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC), der Nachweis der aktivierenden BRAF-Mutation V600E für die Gabe der BRAF-Inhibitoren Vemurafenib und Dabrafenib beim malignen Melanom sowie das Nicht-Vorhandensein der Downstream-Mutationen KRAS und NRAS als Voraussetzung für die Gabe der EGFR-Antikörper Cetuximab und Panitumumab beim kolorektalen Karzinom (Crowley 2013, Duffy 2013, Bokemeyer 2015).

Wenngleich der Einsatz der Companion-Diagnostik die Ansprechraten bei den hierfür qualifizierten Patientengruppen erhöht hat, besteht weiterer Verbesserungsbedarf. So sprechen beim NSCLC nur 70% der Patienten in der Erstlinien- und 50% in der Zweitlinientherapie auf Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI) an (Ciardiello 2008, Petrelli 2012). Hinzu kommen zahlreiche Rezidive und sekundäre Progressionen, die z.T. auf zusätzliche Resistenzmutationen wie die EGFR T790M Mutation oder das – wiederum durch Crizotinib therapierbare – ALK-EML-Fusionsgen hervorgerufen werden (Ciardiello 2008, Crowley 2013).

Eine Ursache für das Nicht-Ansprechen trotz des Vorliegens qualifizierender Mutationen ist die oft anzutreffende molekulare Heterogenität innerhalb eines Tumors, zwischen Primärtumor und Metastasen sowie die zeitliche und räumliche Plastizität der Tumore (Gerlinger 2012). Im Blut findet sich die Summe der molekularen Marker aus verschiedenen Tumormanifestationen; zudem können durch die geringe Invasivität der seriell durchführbaren, blutbasierten Diagnostik die molekularen Veränderungen über die Zeit verfolgt werden und für das Therapiemonitoring, die frühzeitige Rezidivdiagnostik und molekulare Charakterisierung der Resistenzen verwendet werden (Diaz 2014). Schließlich kann Liquid Profiling auch dann durchgeführt werden, wenn die biopsische Gewinnung eines geeigneten Gewebematerials nicht möglich ist sowie um potentielle Biopsie-assoziierte Komplikationen zu vermeiden (Overman 2013).

Hochdurchsatztechnologien in der molekularen Diagnostik

Erst mit Entwicklung hochparallel amplifizierender Technologien wurde die ultrasensitive Detektion von tumorspezifischen Nukleinsäuren möglich, die heute eine Auflösung von einem aus mehr als 10.000 DNA-Molekülen erreicht (Diaz 2014). Die am weitesten verbreiteten Verfahren stellen digitale oder klonale Amplifikationsmethoden dar, die mittels Emulsions-PCR oder Clusterbildung hochspezifisch einzelne DNA-Moleküle so stark vermehren, dass sie mittels FACS-, massenspektrometrische Analyse oder hochparallele Sequenzierung ausgelesen werden können (Diehl 2006, Chen 2013, Forshew 2012, Taly 2013). Zahlreiche aktuelle klinische Studien basieren auf der sog. BEAMing-Methode (Beads, Emulsion, Amplification and Magnetics), die eine Digital Droplet-Emulsions-PCR mit einer durchflußzytometrischen Detektion kombiniert (Diehl 2006, 2008). Daneben spielen klassische Next Generation Sequencing-Ansätze eine wichtige Rolle (z.B. Illumina, Ion Torrent etc.), bei denen einzelne oder multiple Genabschnitte direkt sequenziert werden. Hierbei ist die Tiefe der Analyse, d.h. die Abdeckungshäufigkeit einzelner Genabschnitte (Coverage), für die Zuverlässigkeit der Erfassung einzelner DNA-Moleküle von Bedeutung. Aufgrund der mitunter geringen DNA-Menge im Blut und des geringen Anteils von Tumor-DNA (z.T. weniger als 0,1%) ist auf ein genügend großes Ausgangsvolumen von mehreren Millilitern Plasma zu achten, um darin ein Tumor-DNA-Molekül mit hoher statistischer Wahrscheinlichkeit zu finden. Immerhin wurde in einer umfassenden Studie mit 640 Patienten mit diversen Tumorerkrankungen gezeigt, dass tumorspezifische Mutationen auf cfDNA in 82% der Patienten mit fortgeschrittenen Tumoren (ohne Hirntumore) und in 55% mit lokalisierten Tumorstadien vorhanden waren. Bedeutsam ist, dass cfDNA im Plasma der überwiegenden Zahl von Tumorpatienten nachgewiesen werden, die für eine Companion-Diagnostik in Frage kommen (Bettegowda 2014).

NGS hat inzwischen breiten Einzug in die Humangenetik, Pathologie, Mikrobiologie und eben in die Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin gefunden. Bereits 2011 wurde Jonathan Rothberg für seine Pionierleistung auf dem Gebiet der NGS mit dem Preis für biochemische Analytik der DGKL ausgezeichnet.

Auch beim Nachweis zirkulierender Tumorzellen (CTC) müssen die seltenen Zellen aus großen Blutvolumina (0 bis einige Hundert Zellen in 7,5 ml) angereichert werden: Beim bislang einzigen von der FDA approbierten Verfahren, der CellSearch-Methode, werden epitheliale Tumorzellen anhand des Oberflächenmarkers EpCAM isoliert. Allerdings werden hierbei Tumorzellen, die bereits die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) vollzogen haben oder dieses Merkmal initial gar nicht besaßen, nicht erkannt (Pantel 2010). Eine noch stärkere Anreicherung wird mit einem EPCAM-beschichteten Draht erzielt, der intravenös eingebracht und in 30 min von etwa 2-3 Litern Blut umspült wird (Sauceno-Zeni 2012).

Einzelne Tumorzellen schließlich können nach verschiedenen Merkmalen z.B. durch die DepArray-Technologie isoliert und für weitere Einzelzell-Analysen aufbereitet werden (Fabbri 2012). CTCs finden sich v.a. im Blut von Patienten mit einer metastasierten Tumorerkrankung und sind mit einer ungünstigen Prognose beim Mamma-, Kolon- und Prostatakarzinom assoziiert (Alix-Panabières 2012). CTCs wurden in 21 von 37 Patienten mit Kolonkarzinom nachgewiesen, wobei die Treibermutationen APC, KRAS und PIK3CA in Tumor, Metastasen und CTCs in wenigen Indexpatienten gefunden wurde (Heitzer 2013). Von 27 Patienten mit CTCs bei metastasiertem Lungenkarzinom wurden EGFR-Mutationen in 11 von 12 Fällen in den CTCs identifiziert (Maheswaran 2008). Bei einem Vergleich der KRAS-Mutationen CTCs, cfDNA und Gewebe von 82 Patienten mit Lungenkarzinom schnitten die CTCs jedoch deutlich schlechter ab als cfDNA mit einer diagnostischen Sensitivität von nur 52% (bei 88% Spezifität) im Vergleich zu einer Sensitivität von 96% (bei 95% Spezifität) für cfDNA (Freidin 2015). Auch Bettgowda et al berichteten eine deutlich geringere Häufigkeit von tumorspezifischen Rearrangements in CTCs als in cfDNA (Bettgowda 2014).

Klinische Studien zu Liquid Profiling bei Tumorerkrankungen

Liquid Profiling kann dann sinnvoll zur **Therapiestratifizierung** eingesetzt werden, wenn keine Biopsie möglich ist oder die Gewebeprobe keine aussagekräftigen Schlüsse zulässt. Allerdings wird als Voraussetzung für die in Frage kommenden Technologien eine hohe Konkordanz der Ergebnisse in cfDNA und dem Tumorgewebe gefordert. Diese hohe Übereinstimmung wurde für das BEAMing-Verfahren in mehreren Studien nachgewiesen: Higgins et al wiesen in 34 retrospektiven und 51 prospektiven cfDNA Proben eine 100%ige Konkordanz mit den FFPE-Gewebeproben nach, wenn in beiden Materialien BEAMing durchgeführt wurde (Higgins 2012). Bettgowda et al verglich KRAS Mutationen in cfDNA und Tumorgewebe von 206 Patienten mit metastasiertem, kolorektalem Karzinom. Dabei wurde eine Sensitivität von 87% bei einer Spezifität von 99% ermittelt (Bettgowda 2014). Janku et al untersuchten 21 Mutationen im BRAF, EGFR, KRAS und PIK3CA-Gen in Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen mittels BEAMing im Vergleich zur Standard-Gewebediagnostik. Hierbei wurden Übereinstimmungsraten von 91% für BRAF, 99% für EGFR, 83% für KRAS und 91% für PIK3CA Mutationen erzielt. Hohe cfDNA Mutationsraten waren zudem mit einer ungünstigen Prognose assoziiert (Janku 2015). Tabernero et al untersuchten mittels BEAMing retrospektiv Plasmaproben von 503 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom, die im Rahmen der CORRECT-Studie den Multityrosin-kinase-Inhibitor Regorafenib oder Plazebo erhalten hatten. Hierbei fanden sie Mutationen von KRAS in 69%, von PIK3CA in 17% und von BRAF in 3% in cfDNA. Dies war deutlich mehr als im archivierten Gewebe (59%, 12% und 1%) mit derselben Methode gemessen worden war. cfDNA KRAS-Mutationen waren prognostisch ungünstige Faktoren für das Gesamt- und Progressionsfreie Überleben (Tabernero 2015). Diese Studien weisen eine hohe Konkordanz tumorspezifischer Mutationen in Plasma cfDNA und Tumorgewebe aus; darüber hinaus zeigen sie, dass auch diskrepante Befunde bedeutsam sind, insbesondere wenn cfDNA mit dem Therapieansprechen oder der Prognose assoziiert ist. Weitere Studien werden adressieren, inwiefern die cfDNA-Diagnostik das Therapieansprechen besser antizipieren kann, was angesichts der verbesserungswürdigen Ansprechraten bei einigen TKIs durchaus realistisch erscheint.

Im Verlauf einer Tumorthherapie korreliert die Menge der im Blut zirkulierenden mutierten DNA mit der Tumormasse, wie Diehl et al am Beispiel der APC, TP53 und KRAS-Mutationen bei Patienten mit kolorektalem Karzinom zeigen konnten (Diehl 2008). Nach vollständiger chirurgischer Tumorentfernung fielen die Werte mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Stunden bis auf weniger als 1% des Ausgangswerts nach 24 Stunden ab, während sie bei Vorliegen eines Resttumors auf höheren Wertlagen persistierten. cfDNA wies eine stärker Dynamik auf und hatte einen höheren prädiktiven Wert für die Erkennung eines Tumorrezidivs als der etablierte Tumormarker CEA (Diehl 2008). Ähnlich überzeugende Ergebnisse wurden für PIK3CA und TP53 beschrieben, die in cfDNA von 97% (29 von 30) der Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom nachgewiesen wurden, während die Sensitivitäten für CTCs und CA 15-3 nur bei 87% und 78% lagen. Auch war die Korrelation mit der Tumorlast und die akkurate Erkennung eines Rezidivs für die ctDNA mit 89% deutlich besser als für CTC (37%) oder CA 15-3 (50%). In 53% der progredienten Patientinnen zeigte ctDNA als erster Marker und mit einer durchschnittlichen Lead Time von 5 Monaten bis zum bildgebenden Nachweis die unzureichende Therapiewirkung an (Dawson 2013). Eine Reihe weiterer Studien liegen zum Monitoring von EGFR-Mutationen bei Patienten mit NSCLC vor. Auch hier korrelieren die relative ctDNA-Veränderungen mit dem Therapieansprechen. Abhängig von der Sensitivität der verwendeten Methoden werden unterschiedliche Raten für Markeranstiege bei Progression und die Detektion von Resistenzmutationen genannt (Bai 2012, Nakamura 2011, Sakai 2013, Yam 2012). Diese Studien zeigen, dass cfDNA-Marker bei bekanntem Mutationsstatus sich sehr gut als „individueller Tumormarker“ für das Monitoring des Krankheitsverlaufs während und nach einer Therapie eignen.

Die **sensitive Detektion sekundär nachweisbarer Resistenzmutationen** wurde von Misale et al beschrieben. In 6 von 10 Patienten mit kolorektalem Karzinom und Resistenz gegenüber Cetuximab und Panitumumab wurden neue KRAS-Mutationen bis zu 4 Monate vor einem CEA-Anstieg und 9 Monate vor der radiologischen Rezidivdiagnostik gefunden. Während die Tumorzellen eine Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren aufwiesen, waren sie sensitiv für eine Kombination von EGFR- und MEK-Inhibitoren, was eine frühe und individuelle Therapieanpassung ermöglichte (Misale 2013). Auch Diaz et al berichteten über neue KRAS Mutationen in 9 von 24 mit Panitumumab behandelten Patienten, die ursprünglich einen KRAS-Wildtyp hatten und 5-6 Monate nach Behandlungsbeginn eine Therapieresistenz entwickelten. Anhand von mathematischen Modellen konnten sie zeigen, dass die expandierten Subklone bereits vor Beginn der Therapie vorhanden waren (Diaz 2014). Bettgowda et al. fanden in 23 von 24 (96%) Patienten mit EGFR-resistentem kolorektalem Karzinom neue Mutationen von KRAS, NRAS und anderen Genen im MAP-Kinase-Signalweg (Bettgowda 2014). Diese Befunde korrelieren mit Daten aus dem Tumorgewebe, in dem bis zu 27% der in Exon 2 unmutierten KRAS-Gene genetische Varianten in anderen Abschnitten dieses Gens oder in NRAS aufwiesen (Schwartzberg 2014; Heinemann 2014). Nach einer auf der Basis von 9 RCT mit EGFR-Antikörpern durchgeführten Metaanalyse von Sorich MJ et al., (Ann Oncol 2015) liegt die Prävalenz bei durchschnittlich 20%. Murtaza et al. verfolgten die genomischen Veränderungen in 6 Tumorpatienten durch hochparalleles Exomsequencing und identifizierten neue Resistenzbedingende und aktivierende Mutationen wie EGFR T790M, PIK3CA und RB1 (Murtaza 2013).

Eine Charakterisierung von KRAS und EGFR Resistenzgenen im Plasma von 62 Patienten mit metastasiertem kolorektalem Karzinom mit erworbener Anti-EGFR-Resistenz brachte 5 neue EGFR- und 27 neue KRAS-Mutationen insbesondere in den Codons 61 und 146. In den entsprechenden (als KRAS-Wildtyp eingestuft) prätherapeutischen Gewebeproben waren diese Mutationen in 35% der Patienten in geringer Allelfrequenz bereits vorhanden und korrelierten mit einer ungünstigen Prognose (Morelli 2015). Siravegna et al berichten von verschiedenen erworbenen Resistenz-Mutationen (u.a. KRAS, NRAS, MET, ERBB2, FLT3, EGFR und MAP2K1) in cfDNA während einer EGFR-inhibierenden Therapie. Bei Therapieunterbrechung sanken die mutierten KRAS-Spiegel wieder ab, so dass eine erneute Anti-EGFR-Therapie möglich war (Siravegna 2015). In einer gerade publizierten Studie zeigten Garcia-Murillas et al schließlich an 55 Patientinnen mit einem lokalisierten Mammakarzinom nach erfolgreicher neoadjuvanter Chemotherapie und kurativer Resektion, dass einmalige wie serielle ctDNA Bestimmungen akkurat das Auftreten eines Rezidiv vorhersagten – mit einer medianen Vorlaufzeit von 7,9 Monaten vor der klinisch festgestellten Manifestation. Durch „targeted sequencing“ wiesen sie zahlreiche neue Mutationen in Plasma-ctDNA zum Zeitpunkt der minimalen Residualerkrankung nach, welche stärker mit dem genetischen Status des später detektierten Rezidivs korrelierten als die genetischen Veränderungen des Primärtumors (Garcia-Murillas 2015). Diese Studien zeigen, dass neue Resistenzgene in cfDNA sehr sensitiv detektiert und charakterisiert werden können. Klinisch nutzbar kann dieses Wissen allerdings erst gemacht werden, wenn auch entsprechende „Targeted Therapies“ zur Verfügung stehen.

Präanalytische und analytische Qualitätssicherung molekularer Analysen

Für ein effizientes Liquid Profiling sind eine Reihe von Voraussetzungen zu erfüllen, die im klinischen Labor im Allgemeinen als gegeben betrachtet werden können. Diese beziehen sich auf die verfügbare Infrastruktur zur Bewältigung großer Probenmengen. Aufgrund der zu erwartenden Häufigkeiten von Untersuchungen (vgl. die Häufigkeiten von (phänotypischen) Tumormarker-Bestimmungen im Serum in der Vergangenheit) sind effiziente Workflows sicherzustellen, um kurze Responsezeiten nicht zu gefährden.

Standardisierte präanalytische Verfahren, die in klinischen Laboratorien im Rahmen interner und externer Qualitätssicherung verpflichtend sind, lassen sich für cfDNA-Untersuchungen nutzen. Präanalytische Schritte wie die Aufbereitung des Probenmaterials sind strikt einzuhalten. Auch wenn die ctDNA-Konzentrationen z.B. nach Tumorexstirpation mit einer Halbwertszeit von etwa 2 Stunden abfallen, sind die Blutspiegel im chronischen Status einer Tumorerkrankung relativ stabil. Bei und nach der Blutentnahme empfiehlt es sich, die gängigen präanalytischen Protokolle einzuhalten, die ein zügige Weiterverarbeitung und eine doppelte Zentrifugation vorsehen, um zellfreies Material zu erhalten (El Messaoudi 2013). Alternativ werden inzwischen Röhrchen mit speziellen Zellmembranstabilisierenden Agenzien angeboten, bei denen – auch bei verzögerter Zentrifugation – keine zusätzliche DNA freigesetzt wird (Wong 2013). Die Langzeitlagerung des zellfreien Plasmas sollte bei mindestens -80°C erfolgen.

Effektive Eingangskontrollen zur Prüfung des Untersuchungsmaterials sind erforderlich. Die Qualitätssicherung des im Labor empfangenen Materials ist von erheblicher Bedeutung, um z.B. falsch negative Befunde zu verhindern. Auf die Bedeutung des Abbaus von Nukleinsäuren im Probenmaterial und ihre Auswirkung auf das Untersuchungsergebnis sowie die Notwendigkeit der Standardisierung haben externe Ringversuche hingewiesen (Ahmad Nejad-2015). Innerhalb des Labors sind Kenntnisse über Einflussfaktoren erforderlich, die im Rahmen der Stabilisierung von Probenmaterial zu artifiziellen Ergebnissen führen können. Diese Faktoren besitzen für die Untersuchungen im Blut nicht den gleichen Stellenwert wie in der Gewebediagnostik, zeigen aber grundsätzlich die überragende Bedeutung der Präanalytik nicht nur für quantitative, sondern auch für qualitative Ergebnisse i.e. Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Punktmutationen.

So haben Do und Dobrovic (Do 2012, 2015) untersucht, wie Deaminierung von Cytosin zu Uracil im Rahmen von Formalinfixierung zustande kommt und zu einer hohen Frequenz artifizierlicher C>T Transitionen führen kann. Die Autoren zeigten weiterhin, wie durch Einsatz der Uracil-N-Glycosylase die Frequenz fehlerhafter DNA-Sequenzen deutlich reduziert werden kann. Unklar ist, wieviele C>T Mutationen in der Literatur durch diesen in-vitro Artefakt verursacht sind. Komplementäre Gruppen von Transitionen A>G und T>C (Typ1) sowie G>A und C>T (Typ 2) sind im Rahmen von DNA-Degradation und Prozessierung *postmortem* seit längerem bekannt (Gilbert 2003). Sie konnten kürzlich auch als Quelle von Sequenzartefakten in unterschiedlichen NGS-Sequenzierungstechnologien auf NGS-Analysen identifiziert werden (Chen 2014; Sequin-Orlando 2013).

Diese Aspekte weisen klar auf die erhebliche Bedeutung qualitätssichernder Massnahmen gerade in der molekularen Diagnostik hin. Die Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin hat hierzu seit 1998 umfangreiche externe Ringversuchsprogramme entwickelt, welche medizinischen Laboratorien durch regelmäßige Ringversuchsangebote zu Genotypisierung, zu Qualitätssicherung von DNA-Isolation sowie zur technischen und medizinischen Qualitätssicherung von DNA-Sequenzierungen die Möglichkeit der Überprüfung bieten. Diese vom Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB) international angebotenen Programme (www.rfb.bio) sind von jeher mit dem Ziel einer verbesserten in-vitro Diagnostik interdisziplinär ausgerichtet (Ahmad-Nejad 2015; Lianidou 2014).

Die neuen Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung labormedizinischer Untersuchungen regeln in Kapitel B5 der „qualitativen laboratoriumsmedizinischen Untersuchungen“ die molekulargenetischen und zytogenetischen Analysen auch für komplexe molekulare Untersuchungsmethoden im Konsens aus dem interdisziplinären Dialog zwischen Klinischer Chemie und Humangenetik. Im Rahmen der Abfassung von B5 der RiLiBÄK sichert die erfolgreiche Kooperation der Ringversuchsorganisationen RfB und des humangenetischen Netzwerks „European Molecular Quality Network“ (EMQN) in Manchester seither die Qualität moderner präanalytischer und analytischer Methoden im Rahmen einer modernen molekularen Diagnostik aus dem Blutplasma und Körperflüssigkeiten für die medizinischen Laboratorien. Die entsprechenden seit 1989 angebotenen Ringversuchsprogramme (www.rfb.bio) umfassen inzwischen DNA-Isolation, Genotypisierungs-Programme zu Risikoallelen, Tumormutationen und Pharmakogenetik in der Onkologie sowie DNA-Sequenzierung nach Sanger und NGS (EMQN). Ende 2015 wird in einem ersten Pilotingversuch erstmals eine Qualitätssicherung zu spezifischen Aspekten der Plasma-DNA Diagnostik angeboten werden.

Zusammenfassung

Die neuen technischen Möglichkeiten der molekularen Diagnostik erlauben die gezielte Aufklärung zirkulierender Nukleinsäuren im peripheren Blut und die Beantwortung diagnostischer Fragen für eine Reihe von Krankheitsentitäten, hier insbesondere bei malignen Erkrankungen. Ross und Cronin haben 2011 einen Paradigmenwechsel in der onkologischen Diagnostik skizziert und auf die sich entwickelnde Bedeutung der im Plasma durchführbaren cfDNA-Diagnostik hingewiesen (Ross 2011). Dies wird die Entwicklung diagnostischer Strategien in verschiedenen Feldern der Laboratoriumsmedizin vorantreiben.

Aus der Perspektive einer molekularen Pathologie haben Dahl et al. kürzlich die Plasmadiagnostik molekularer Tumordefekte vor dem Hintergrund der gewebebasierten Verfahren kritisch beleuchtet (Dahl 2015). Unstrittig ist die maßgebende Bedeutung einer Identifikation relevanter molekularer Defekte aus dem Tumorgewebe für therapeutische Entscheidungen. Es ist aufgrund der sich mehrenden Erkenntnis inzwischen dennoch absehbar, dass sich die Plasma-Diagnostik bei Tumorkranken mit der fortschreitenden Entwicklung der Methodik zu einer komplementären Strategie für das gewebebasierte Tumor-Profilung – insbesondere im Hinblick auf das Monitoring des Therapieansprechens und des weiteren Krankheitsverlaufs entwickeln wird.

Die Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin besitzt durch ihre herausragende Expertise und Leistungsfähigkeit in der phäno- und genotypisierenden biomolekularen Analytik sowie ihren einzigartigen Track-Record in der umfassenden Qualitätssicherung von Laboruntersuchungen die notwendigen Voraussetzungen zu einer effizienten Implementation in der medizinisch-diagnostischen Krankenversorgung. Hierbei ist ein interdisziplinärer Dialog wünschenswert, um die Potenziale dieses neuen Diagnostikfeldes für die therapeutische Medizin und damit den Patienten zu mobilisieren.

Literatur

1. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 2002; 1: 845-67.
2. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res* 1977; 37: 646-50.
3. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer – a survey. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 181-232.

4. Holdenrieder S, Stieber P. Clinical use of circulating nucleosomes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009; 46: 1-24.
5. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H et al. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem* 2004; 50: 1668-70.
6. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H et al. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Crit Care* 2006; 10: R60.
7. Saukkonen K, Lakkisto P, Varpula M, et al. Association of cell-free plasma DNA with hospital mortality and organ dysfunction in intensive care unit patients. *Intensive Care Med.* 2007; 33: 1624-7.
8. Rainer TH, Wong LK, Lam W et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem* 2003; 49: 562-9.
9. Rainer TH, Lam NY, Man CY et al. Plasma beta-globin DNA as a prognostic marker in chest pain patients. *Clin Chim Acta* 2006; 368: 110-3.
10. Antonatos D, Patsilinos S, Spanodimos S, et al. Cell-free DNA levels as a prognostic marker in acute myocardial infarction. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1075: 278-81.
11. Li B, Hartono C, Ding R, et al. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med.* 2001; 344: 947-54.
12. Schwarzenbach H, Hoon DS, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 426-37.
13. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F et al. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10: 472-84.
14. Gezer U, Holdenrieder S. Posttranslational histone modifications in circulating nucleosomes in patients with colorectal cancer. *In Vivo* 2014; 28: 287-92.
15. Holdenrieder S. Circulating nucleic acids in therapy monitoring. In P.B. Gahan (ed.), *Circulating Nucleic Acids in Early Diagnosis, Prognosis and Treatment Monitoring, Advances in Predictive, Preventive and Personalised Medicine 5*, Springer, 2014: 309-348.
16. Schwarzenbach H. The clinical relevance of circulating, exosomal miRNAs as biomarkers for cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015; 15: 1159-69.
17. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997; 350: 485-7.
18. Poon LL, Leung TN, Lau TK, Lo YM. Prenatal detection of fetal Down's syndrome from maternal plasma. *Lancet.* 2000; 356: 1819-20.
19. Chiu RW, Akolekar R, Zheng YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study. *BMJ.* 2011; 342: c7401.
20. Tsui NB, Kadir RA, Chan KC, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. *Blood.* 2011; 117: 3684-91.

21. Kitzman JO, Snyder MW, Ventura M, et al. Noninvasive whole-genome sequencing of a human fetus. *Sci Transl Med.* 2012; 4: 137ra76.
22. Smith B, Selby P, Southgate J, et al. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *Lancet.* 1991; 338: 1227-9.
23. Gerhard M, Juhl H, Kalthoff H, et al. Specific detection of carcinoembryonic antigen-expressing tumor cells in bone marrow aspirates by polymerase chain reaction. *J Clin Oncol.* 1994; 12: 725-9.
24. Neumaier M, Gerhard M, Wagener C. Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissuespecific genes. *Gene.* 1995; 159: 43-7.
25. Speicher MR, Pantel K. Tumor signatures in the blood. *Nat Biotechnol.* 2014; 32: 441-3.
26. Lianidou ES. Molecular characterization of circulating tumor cells: Holy Grail for personalize cancer treatment? *Clin Chem.* 2014; 60: 1249-51.
27. Lianidou ES, Mavroudis D, Sotiropoulou G, et al. What's new on circulating tumor cells? A meeting report. *Breast Cancer Res.* 2010; 12: 307.
28. Diaz LA Jr, Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014; 32: 579-86.
29. Duffy MJ, Crown J. Companion biomarkers: paving the pathway to personalized treatment for cancer. *Clin Chem* 2013; 59: 1447-56.
30. Bokemeyer C, Köhne CH, Ciardiello F, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2015; 51: 1243-52.
31. Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008; 358: 1160-74.
32. Petrelli F, Borgonovo K, Cabiddu M et al. Efficacy of EGFR tyrosine kinase inhibitors in patients with EGFR-mutated non-small-cell lung cancer: a meta-analysis of 13 randomized trials. *Clin Lung Cancer* 2012; 13: 107-14.
33. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med* 2012; 366: 883-92.
34. Overman MJ, Modak J, Kopetz S, et al. Use of research biopsies in clinical trials: are risks and benefits adequately discussed? *J Clin Oncol.* 2013; 31: 17-22.
35. Diehl F, Li M, He Y, Kinzler KW et al. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nat Methods* 2006; 3: 551-9
36. Chen WW, Balaj L, Liao LM et al. BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013; 2: e109.
37. Chen WW, Balaj L, Liao LM et al. BEAMing and Droplet Digital PCR Analysis of Mutant IDH1 mRNA in Glioma Patient Serum and Cerebrospinal Fluid Extracellular Vesicles. *Mol Ther Nucleic Acids* 2013; 2: e109.

38. Taly V, Pekin D, Benhaim L et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRas mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem* 2013; 59: 1722-31.
39. Diehl F, Schmidt K, Choti MA et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 2008; 14: 985-90.
40. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, et al. Detection of circulating tumor DNA in early and late-stage human malignancies. *SciTransl Med*. 2014; 6: 224ra24.
41. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med*. 2010; 16: 398-406.
42. Saucedo-Zeni N1, Mewes S, Niestroj R, et al. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int J Oncol*. 2012; 41: 1241-50.
43. Fabbri F, Carloni S, Zoli W, et al. Detection and recovery of circulating colon cancer cells using a dielectrophoresis-based device: KRAS mutation status in pure CTCs. *Cancer Lett*. 2013; 335: 225-31.
44. Alix-Panabières C, Schwarzenbach H, Pantel K. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annu Rev Med*. 2012; 63: 199-215.
45. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer* 2013; 133: 346-56.
46. Maheswaran S, Sequist LV, Nagrath S et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells. *N Engl J Med* 2008; 359: 366-77.
47. Freidin MB, Freydina DV, Leung M, et al. Circulating Tumor DNA Outperforms Circulating Tumor Cells for KRAS Mutation Detection in Thoracic Malignancies. *Clin Chem*. 2015 Aug 13. pii: clinchem.2015.242453.
48. Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 3462-9.
49. Janku F, Angenendt P, Tsimberidou AM, et al. Actionable mutations in plasma cellfree DNA in patients with advanced cancers referred for experimental targeted therapies. *Oncotarget*. 2015; 6: 12809-21.
50. Tabernero J, Lenz HJ, Siena S, et al. Analysis of circulating DNA and protein biomarkers to predict the clinical activity of regorafenib and assess prognosis in patients with metastatic colorectal cancer: a retrospective, exploratory analysis of the CORRECT trial. *Lancet Oncol*. 2015; 16: 937-48.
51. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 1199-1209.
52. Bai H, Wang Z, Chen K et al. Influence of chemotherapy on EGFR mutation status among patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2012; 30:3077-83.
53. Nakamura T, Sueoka-Aragane N, Iwanaga K et al. A noninvasive system for monitoring resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors with plasma DNA. *J Thorac Oncol* 2011; 6: 1639-48.

54. Sakai K, Horiike A, Irwin DL et al. Detection of epidermal growth factor receptor T790M mutation in plasma DNA from patients refractory to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Sci* 2013; 104: 1198-204.
55. Yam I, Lam DC, Chan K et al. EGFR array: uses in the detection of plasma EGFR mutations in non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 1131-40
56. Misale S, Yaeger R, Hobor S et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* 2012; 486: 532-6.
57. Diaz LA Jr, Williams RT, Wu J et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature* 2012; 486: 537-40.
58. Schwartzberg LS, Rivera F, Karthaus M, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wildtype KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2014; 32: 2240-7.
59. Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014; 15: 1065-75.
60. Sorich MJ, Wiese MD, Rowland A, et al. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann Oncol.* 2015; 26: 13-21.
61. Murtaza M, Dawson SJ, Tsui DW et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature* 2013; 497:108-12.
62. Morelli MP, Overman MJ, Dasari A, et al. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Ann Oncol.* 2015; 26: 731-6.
63. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, et al. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med.* 2015; 21: 795-801.
64. Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. *Sci Transl Med.* 2015; 7: 302ra133.
65. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta.* 2013; 424: 222-30.
66. Wong D, Moturi S, Angkachatchai V, et al. Optimizing blood collection, transport and storage conditions for cell free DNA increases access to prenatal testing. *Clin Biochem.* 2013; 46: 1099-104.
67. Ahmad-Nejad P, Duda A, Sucker A, et al. Assessing quality and functionality of DNA isolated from FFPE tissues through external quality assessment in tissue banks. *Clin Chem Lab Med.* 2015 Jun 6. (ahead of print)

68. Do H, Dobrovic A. Dramatic reduction of sequence artefacts from DNA isolated from formalin-fixed cancer biopsies by treatment with uracil-DNA glycosylase. *Oncotarget*. 2012; 3: 546-58.
69. Do H, Dobrovic A. Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem*. 2015; 61: 64-71.
70. Gilbert MT, Hansen AJ, Willerslev E, et al. Characterization of genetic miscoding lesions caused by postmortem damage. *Am J Hum Genet*. 2003; 72: 48-61.
71. Chen G, Mosier S, Gocke CD, et al. Cytosine deamination is a major cause of baseline noise in next-generation sequencing. *Mol Diagn Ther*. 2014; 18: 587-93.
72. Seguin-Orlando A, Schubert M, Clary J, et al. Ligation bias in illumina next-generation DNA libraries: implications for sequencing ancient genomes. *PLoS One*. 2013; 8: e78575.
73. Lianidou E, Ahmad-Nejad P, Ferreira-Gonzalez A, et al. Advancing the education in molecular diagnostics: the IFCC-Initiative "Clinical Molecular Biology Curriculum" (C-CMBC); a ten-year experience. *Clin Chim Acta*. 2014; 436: 5-8.
74. Ross JS, Cronin M. Whole cancer genome sequencing by next-generation methods. *Am J Clin Pathol*. 2011; 136: 527-39.
75. Dahl E, Jung A, Fassunke J, et al. Chancen und Risiken der blut-basierten molekularpathologischen Analytik zirkulierender Tumorzellen (CTC) und zellfreier DNA (cfDNA) in der personalisierten Krebstherapie. Eine Stellungnahme des Arbeitskreises „Liquid Biopsy“ der AG Molekularpathologie in der Deutschen Gesellschaft für Pathologie (DGP). *Pathologe*. 2015; 36: 92-7.