

Masterarbeit

**Validierung eines Next-Generation-Sequencing Assays zum
Nachweis von *EGFR* Mutationen in zellfreier zirkulierender
Tumor-DNA**

eingereicht von

Regina Stitz, BSc.

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

(MSc)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Pathologie

des Salzkammergutklinikums Vöcklabruck

unter der Anleitung von

Assoz. Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Mag.^a Dr.ⁱⁿ rer.nat. Ellen Heitzer

Vöcklabruck, 17.06.2020

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Regina Stitz, BSc. eh

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
1.1	Inzidenz, Epidemiologie und Einteilung der Lungenkarzinome	9
1.2	Zielgerichtete Therapien beim NSCLC.....	10
1.3	Aktivierende <i>EGFR</i> Mutationen.....	11
1.4	<i>EGFR</i> -Tyrosinkinase-Inhibitoren	12
1.5	Erworbene Resistenzmutationen bei NSCLC	12
1.6	Methoden zum Nachweis von <i>EGFR</i> Mutationen aus Tumorgewebe	13
1.7	Methoden zum Nachweis von <i>EGFR</i> Mutationen aus dem Blutplasma (Liquid Biopsy)	16
1.8	Ziel der Arbeit.....	18
2.	Material und Methoden.....	18
2.1	Referenzmaterial.....	18
2.2	Validierungsprotokoll.....	19
2.3	Patienten.....	20
2.4	Blutprobengewinnung	21
2.5	Extraktion und DNA Quantifizierung.....	22
2.6	Library Preparation und Next Generation Sequenzierung.....	22
2.7	Datenanalyse	25
2.8	Referenzmethode.....	31
2.9	Statistik	32
3.	Ergebnisse	32
3.1	Validierung mit Referenzproben.....	32
3.2	Vergleichsanalyse mit Patientenproben	39
4.	Diskussion.....	43
5.	Literatur.....	48

Abkürzungen

Akt	Proteinkinase B
AO	Alternate Observations
ARMS	Amplification-Refractory Mutation System
bp	Basenpaare
cfDNA	zellfreie zirkulierende Desoxyribonukleinsäure
ctDNA	zirkulierende Tumor Desoxyribonukleinsäure
ddPCR	droplet digital Polymeraskettenreaktion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
<i>EGFR</i>	epidermales Wachstumsfaktorrezeptor Gen
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FN	falsch negativ
InDel	Insertion/Deletion
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBC	Molekulare Barcodes
miRNA	Micro RNA
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
ND MDAF	Normal Data Sets Minimal Detectable Allele Fraction
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequenzierung
NSCLC	nicht-kleinzellige Lungenkarzinome
OS	Gesamtüberleben
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFS	progressionsfreies Überleben
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
SCLC	kleinzellige Lungenkarzinome
SNV	Einzelnukleotidvariante (engl. single nucleotide variation)
T790M	Austausch der Aminosäure Threonin (T) durch Methionin im Codon 790 des <i>EGFR</i> Gens
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitoren
TP	richtig positiv
VAF	Variantenallelfrequenz

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hauptmechanismen der erworbenen Resistenz	13
Abbildung 2: ctDNA stark verdünnt	17
Abbildung 3: Validierungsläufe mit Referenzmaterial.....	20
Abbildung 4: cfDNA Molekül mit einem einzigartigen MBC gelabelt.....	23
Abbildung 5: Überblick der Archer Library Preparation	23
Abbildung 6: Aufbau eines Archer®-MBC Adapters	24
Abbildung 7: Start der Sequenzierung.....	27
Abbildung 8: Raw Reads, Unique Fragments, Unique Start Sites	27
Abbildung 9: Positionsspezifisches Rauschprofil.....	29
Abbildung 10: Darstellung MDAF und 95 MDAF	30
Abbildung 11: Der ND AF Outlier P Value	30
Abbildung 12: NGS Ergebnisse des Seraseq ctDNA Referenzmaterials	35
Abbildung 13: Der Erwartungswert lag deutlich über der ND MDAF.	35
Abbildung 14: ND MDAF und 95 MDAF der einzelnen Hotspot Mutationen.....	38
Abbildung 15: Linearer Zusammenhang zwischen DNA Input und Coverage	38
Abbildung 16: Gesamt-cfDNA Ausbeute der Plasmaproben aus 5 ml Plasma.....	40
Abbildung 17: Errechnete Allele und molekulare Coverage	40
Abbildung 18: Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen NGS- und ddPCR-Ergebnissen.....	41
Abbildung 19: Outcome von Osimertinib Patienten in der Studie Buder et al.....	47

Zusammenfassung

Lungenkrebs ist die häufigste krebsbedingte Todesursache weltweit. Die Prognose ist vorwiegend vom Stadium des Lungenkrebses bei der Erstdiagnose abhängig. Eine Früherkennung ist daher von großer Bedeutung. Nach wie vor ist eine Biopsie des Tumorgewebes für die histologische und molekularpathologische Diagnose der Goldstandard. Ca. 15% der nicht-kleinzelligen Lungenkarzinome (engl. non-small cell lung carcinoma, NSCLC) weisen eine aktivierende Mutation im epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) auf und können daher mit zielgerichteten Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKIs) therapiert werden. Nach einem initialen Ansprechen kommt es jedoch bei einem Teil der Patienten innerhalb von 1 bis 2 Jahren zu einer Therapieresistenz und einer Tumorprogression. In etwa 50% der Fälle ist eine Mutation im Codon 790 des *EGFR* Gens (T790M) Ursache für diese erworbene Resistenz. Patienten mit einer nachgewiesenen *EGFR* T790M Mutation können mit einem TKI der dritten Generation weiterbehandelt werden. Der Nachweis der T790M Mutation aus zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) aus Blutplasma stellt eine schonende, nicht-invasive Alternative zur Rebiopsie des Tumors dar und kann daher zum Therapiemonitoring von Lungenkrebspatienten verwendet werden. Aufgrund der oft sehr niedrigen Tumorfraktion in NSCLC-Patienten wird für den Nachweis der T790M Mutationen üblicherweise die hochauflösende droplet digital PCR (ddPCR) verwendet, jedoch kommen immer mehr Next Generation Sequencing (NGS) Verfahren zum Einsatz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Reveal ctDNA™ 28 Next Generation Sequencing (NGS) Assay eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität zur droplet digital PCR (ddPCR) aufweist und zum nicht-invasiven Therapiemonitoring aus ctDNA von progredienten Lungenkrebspatienten geeignet ist. Im ersten Schritt wurde der NGS Assays vollständig mit kommerziell erhältlichen Referenzmaterial validiert. Anschließend wurden im Rahmen der Routinediagnostik 28 Plasmaproben von 18 Patienten mittels NGS Assay und ddPCR analysiert und die Ergebnisse miteinander verglichen.

Durch die Validierung des Assays mit Referenzmaterial konnte bei einer Variantenallelfrequenz (VAF) von 0,5% und einem DNA Input von mindestens 22 ng eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 100% nachgewiesen werden. Die Ergebnisse stimmen mit den Angaben des Herstellers und einer weiteren

Studie der Fa. SeraCare überein. Die Vergleichsstudie der Patientenproben ergab eine Konkordanz von 91% zwischen NGS und ddPCR, wobei die ddPCR eine höhere Sensitivität bei der *EGFR* T790M Mutation und eine vergleichbare Sensitivität bei den Exon 19 Deletionen und bei der L858R Mutation aufwies.

Aus den Ergebnissen kann nun abgeleitet werden, dass bei einem Input von mindestens 22 ng zellfreier zirkulierender DNA (cfDNA) aus 5 ml Plasma eine Variantenallelfrequenz (VAF) von 0,5% (11 Kopien/5ml Plasma (2 Kopien/ml)) detektiert werden kann und daher zum Therapiemonitoring von Patienten unter TKI Therapie verwendet werden kann. Idealerweise sollte in der klinischen Routinediagnostik eine Kombination aus NGS (mit breiter Abdeckung einer Vielzahl von Genomloci) und ddPCR (mit dem gezielten hochsensitiven Nachweis spezifischer Mutationen) verwendet werden.

Abstract

Lung cancer is the leading cause of cancer-related deaths worldwide. The prognosis and course of the disease depend primarily on the stage of lung cancer at the time of initial diagnosis. Early detection is therefore of great importance. A tissue biopsy still remains the gold standard for histological and molecular pathological diagnosis. 15% of non-small cell lung carcinomas (NSCLC) harbor an activating mutation in the epidermal growth factor receptor (EGFR) and can therefore be treated with targeted tyrosine kinase inhibitors (TKIs). However, after an initial response, resistance to therapy and tumour progression occurs in a proportion of patients within 1 to 2 years. In about 50% of cases, a mutation in codon 790 of the *EGFR* gene (T790M) is the cause of this acquired resistance. Patients with a proven *EGFR* T790M mutation can be treated with a third-generation TKI. The detection of the T790M mutation from circulating tumor DNA (ctDNA) from blood plasma represents a gentle, non-invasive alternative to rebiopsy and can therefore be used for therapy monitoring of lung cancer patients. Due to the often low tumor fractions in NSCLC patients, high-resolution droplet digital PCR (ddPCR) is usually used for the detection of T790M mutations, but Next Generation Sequencing (NGS) methods are increasingly used.

The aim of this project was to investigate whether the Reveal ctDNA™ 28 NGS assay in blood plasma ("Liquid Biopsy") has a comparable sensitivity and specificity to droplet digital PCR (ddPCR) and is therefore suited for therapy monitoring of progressive lung cancer patients. In a first step the NGS assay was validated with commercially available reference material. Subsequently, 28 plasma samples from 18 patients were analysed by NGS assay and ddPCR in routine diagnostics and the results were compared.

By validating the assay with reference material, a sensitivity of 96% and a specificity of 100% could be detected at a VAF of 0.5% and a DNA input of at least 22 ng. The results are consistent with the manufacturer's specifications and a further study by SeraCare. The comparative study of the patient samples showed a concordance of 91% between NGS and ddPCR, with the ddPCR showing a higher sensitivity for the *EGFR* T790M mutation and a comparable sensitivity for the exon 19 deletions and the L858R mutation.

From these results, it can be concluded, that with a input of at least 22 ng cell-free circulating DNA (cfDNA), a variant allele frequency (VAF) of 0.5% (11 copies/5 ml plasma (2 copies/ml)) can be detected. Therefore, the Reveal ctDNA™ 28 Next Generation Sequencing (NGS) assay can be used for therapy monitoring of patients under TKI therapy. However, due to the superior sensitivity of ddPCR, a combination of NGS (with broad coverage of a large number of genomic loci) and ddPCR (with targeted highly sensitive detection of specific mutations) might be the ideal approach.

1. Einleitung

1.1 Inzidenz, Epidemiologie und Einteilung der Lungenkarzinome

Lungenkrebs ist weltweit die häufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern und Frauen. Jedes Jahr sterben etwa 1,38 Millionen Menschen an den Folgen eines Lungenkarzinoms, das entspricht 18,2% aller Krebstoten (1).

Die Inzidenz und Mortalität von Lungenkrebs ist eng mit dem Zigarettenrauchen verknüpft. Neben leicht sinkenden Inzidenz- und Mortalitätsraten in den Industrieländern weisen Schwellenländer wie Brasilien, Russland, Indien, China und Südafrika nach wie vor eine steigende Sterblichkeit aufgrund einer hohen Raucherquote, schlechteren Gesundheitsversorgung, Umweltverschmutzung und soziokulturellen Barrieren auf (2, 3). Laut Statistik Austria erkrankten im Jahr 2017 in Österreich 2.739 Männer und 1.937 Frauen an Lungenkrebs. 2.402 Männer und 1.472 Frauen starben an den Folgen eines Lungenkarzinoms (4, 5).

Entsprechend der WHO-Klassifikation nach Travis et al. (3) werden Lungentumore folgendermaßen eingeteilt:

- Epitheliale Tumore
(Adenokarzinom, Plattenepithelkarzinom, neuroendokrine Tumore, großzelliges Karzinom, adenosquamöses Karzinom, pleomorphes Karzinom, spindelzelliges Karzinom, riesenzelliges Karzinom, Karzinosarkom, pulmonales Blastom, andere und unklassifizierte Karzinome, Tumoren vom Speicheldrüsentyp, Papillome, Adenome)
- Mesenchymale Tumore
- Lymphohistiozytäre Tumore
- Tumoren ektope Ursprungs
- Metastatische Tumoren

Klinisch-therapeutisch unterscheidet man kleinzellige Lungenkarzinome (SCLC) mit hoher Zellteilungsrate und rascher Wachstumsprogredienz von NSCLC. Zu den letzteren gehören vor allem die Adeno- und Plattenepithelkarzinome (3, 4). Etwa 80 – 85% aller Lungenkarzinome sind NSCLC, wobei das Adenokarzinom der häufigste Subtyp des NSCLC ist. Therapie und Prognose sind von der

Histologie, vom Stadium, dem Genotyp, dem Geschlecht und dem Allgemeinzustand bzw. der Komorbidität abhängig. In den letzten Jahren hat die molekularpathologische Diagnostik von prädiktiven Biomarkern und dem damit verbundenen Einsatz von Immuncheckpoint- und Kinase-Inhibitoren die Prognose vieler Patienten deutlich verbessert (6).

1.2 Zielgerichtete Therapien beim NSCLC

Krebs ist grundsätzlich eine genetisch bedingte Erkrankung, die durch genetische oder epigenetische Veränderungen verursacht wird. Gleiche Tumortypen können durch unterschiedliche genetische Mutationen verursacht werden, weshalb Patienten unterschiedlich auf Therapien ansprechen können. Die sog. „personalisierte Medizin“ zielt darauf ab, die richtige Therapie für den richtigen Patienten zum richtigen Zeitpunkt zu verabreichen. Eine individualisierte, auf Grundlage des genetischen Profils des Patienten angepasste Therapie, verbessert das Therapieansprechen und reduziert Nebenwirkungen.

Die meisten Lungenkarzinome bleiben lange asymptomatisch und werden daher vorwiegend in einem späten Krankheitsstadium erstdiagnostiziert. Bis vor wenigen Jahren war die Chemotherapie die wichtigste Behandlung bei NSCLC-Patienten im Stadium III und IV. Neue platinhaltige Chemotherapeutika erbrachten eine Verbesserung der 5-Jahres-Überlebensrate von 11%. Neben starken behandlungsbedürftigen Nebenwirkungen betrug die mediane Überlebenszeit nur 8 – 10 Monate (7). Durch die Entdeckung von zielgerichteten Therapien auf Grundlage der molekularen Typisierung wurde die Überlebenszeit beim fortgeschrittenen NSCLC auf mehrere Jahre verlängert (8, 9). In den aktuellen National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines von 2020 (v3) wird für das NSCLC die Untersuchung folgender therapierelevanter Biomarker empfohlen: *EGFR*, *KRAS*, *HER2*, *ALK*, *ROS1*, *MET*, *BRAF*, *RET*, *NTRK*, *PD-L1* (10).

Zu den zielgerichteten Therapien gehören:

- monoklonale Antikörper, welche die Ligandenbindung von extrazellulären Proteindomänen blockieren

- TKI, die als „small molecules“ intrazelluläre Kinasedomänen inhibieren
- Immun-Checkpoint-Inhibitoren, welche die Tumorabwehr durch inhibitorische Interaktionen zwischen Antigen-präsentierenden Zellen und T-Lymphozyten aktivieren (10)

1.3 Aktivierende *EGFR* Mutationen

In Europa kommen beim NSCLC Mutationen im *EGFR*-Gen (engl. epidermal growth factor receptor) mit einer Inzidenz von 15% am häufigsten vor (11). *EGFR* ist ein Transmembrantyrrosinkinase-Rezeptor und gehört zur HER- (oder ErbB-) Familie, welche vier Mitglieder umfasst (*EGFR/ErbB1*, *ErbB2*, *ErbB3*, *ErbB4*). Der Rezeptor wird durch extrazelluläre Bindung eines Liganden, wie zum Beispiel des EGF aktiviert, wodurch es über den EGF-Pathway zur Stimulierung des Zellwachstums kommt. Die Regulierung der Rezeptoraktivität erfolgt durch den Konformationszustand der intrazellulären katalytischen Domäne, welche (aktiv oder inaktiv) die Fähigkeit der Kinase bestimmt, ein Phosphat von ATP auf das Peptidsubstrat zu übertragen und die nachgeschaltete Signaltransduktion zu steuern. Die wichtigsten nachgeschalteten Signalwege, welche das Überleben und die Proliferation der Zellen fördern, gehen über folgende Signalproteine:

- Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)
- Proteinkinase B (Akt)
- Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)

Treibermutation im *EGFR*-Gen in der Region der Tyrosinkinase-Domäne (Exons 18-21) können den Zellzyklus dauerhaft aktivieren und so zu einer unkontrollierten Zellproliferation, zu einem längeren Zellüberleben und in weiterer Folge zu einer Invasion und Metastasierung führen (12).

44% aller aktivierenden *EGFR*-TK-Mutationen sind In-Frame-Deletionen im Exon 19. Diese umfassen fast immer die Aminosäurereste Leucin-747 bis Glutaminsäure-749 (Δ LR747-749). Bei den aktivierenden Punktmutationen (engl. single nucleotide variations, SNV) hat die L858R im Exon 21 mit 41% die höchste Prävalenz. Seltener findet man SNVs wie G719S, G719A, G719C und In-Frame-

Duplikationen, Insertionen bzw. eine Überexpression des EGFR aufgrund einer Genamplifikation (13).

1.4 EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren

EGFR-TKI sind sogenannte „small molecules“, die die Zellmembran passieren können und intrazellulär die EGFR-Kinasedomäne inhibieren. Patienten mit einem fortgeschrittenen *EGFR* mutierten NSCLC erhalten als Erstlinientherapie EGFR-TKI der ersten oder zweiten Generation (Erlotinib, Gefitinib, Afatinib, Dacomitinib). Die Ansprechrate liegt mit einem mittleren progressionsfreien Überleben (engl. progression-free survival, PFS) von 12 Monaten zwischen 56% und 74% (14–18). Nach einem initialen Ansprechen kommt es jedoch bei einem Großteil der Patienten innerhalb von 9 bis 13 Monaten zum Therapieversagen und einem progredienten Krankheitsverlauf. Dies ist häufig auf die Entstehung von Resistenzmutationen, insbesondere einer Punktmutation im Codon 790 (*EGFR* T790M) zurückzuführen (19). Patienten mit einer nachgewiesenen *EGFR* T790M Mutation können in weiterer Folge mit einem TKI der dritten Generation (Osimertinib) weiter behandelt werden (20). Eine frühzeitige Erkennung des Auftretens der Resistenzmutation ist daher von großem klinischem Interesse.

1.5 Erworbene Resistenzmutationen bei NSCLC

Unter Resistenzmutationen werden Mutationen verstanden, die mit einer Resistenz gegen einen EGFR-TKI einhergehen. Man unterscheidet primäre, nicht erworbene Resistenzen von sekundären, erworbenen Resistenzen. Von einer primären Resistenz sind Patienten betroffen, die von TKI-Therapiebeginn an eine fortschreitende oder gleichbleibende Erkrankung zeigen. Eine erworbene oder sekundäre Resistenz weisen jene Patienten auf, welche nach einer anfänglich guten Ansprechreaktion oder einem längeren stabilen Krankheitsverlauf eine progrediente Tumorerkrankung zeigen (19).

In einer Studie von Cortot et al. wurde in 60% der Post-TKI-Tumorproben eine *EGFR* T790M-Mutation nachgewiesen, bei 5 - 22% fand sich eine c-Met

Amplifikation und in 12% der Proben konnte eine *HER2* Amplifikation nachgewiesen werden. Bei einem weiteren Teil der Patienten wurden epitheliale Transformationen in Richtung mesenchymaler Phänotyp (EMT) oder SCLC festgestellt. Die Ursache dieser Tumorevolution ist jedoch in vielen Fällen noch unklar (19). Vermutlich sind epigenetische Mechanismen, in welchen über Micro-RNAs (miRNA) die Expression von EGFR und c-Met reguliert werden, involviert (21).

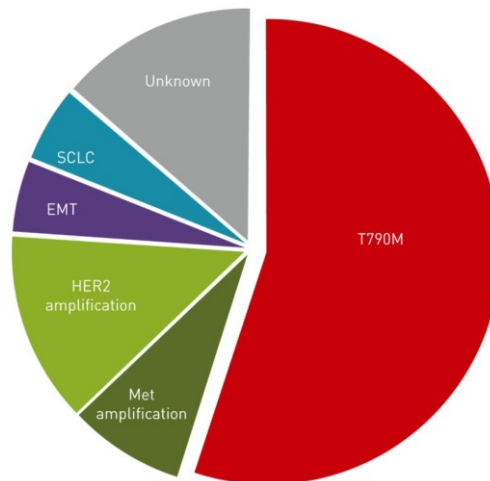


Abbildung 1: Hauptmechanismen der erworbenen Resistenz gegen EGFR-TKI bei NSCLC aus der Studie von Cortot et al. (19) SCLC: kleinzelliges Lungenkarzinom; EMT: epithelial-mesenchymaler Übergang.

In anderen Studien wird der *EGFR* T790M Anteil mit 30 - 50% beschrieben. Während der Zweitlinien-Therapie mit einem TKI der dritten Generation (Osimertinib) konnten weitere tertiäre *EGFR* Resistenzmutationen an den Codons L718 / G719, G796 / C797, L792, L798 beobachtet werden (21–24).

1.6 Methoden zum Nachweis von *EGFR* Mutationen aus Tumorgewebe

Im Anschluss an die histologische Erstdiagnose eines NSCLC wird aus der Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Gewebebiopsie (FFPE) oder aus zytologischem Material eine immunhistochemische und molekularpathologische Untersuchung auf prädiktive Marker (therapierelevante Genmutationen) durchgeführt. Vor jeder molekularpathologischen Analyse aus FFPE Gewebe wird eine Makrodissektion des Tumorareals (makroskopisches Anreicherungs-

verfahren), eine Entparaffinierung und Extraktion der Tumor-DNA durchgeführt. Anschließend kommen folgende Verfahren in der Routinediagnostik zum Einsatz:

Gezielte Untersuchung auf bekannte Hotspot-Mutationen durch **Realtime PCR** (z.B. cobas® EGFR Mutation Test v2 (Roche), Therascreen ® (Qiagen)). Zitat der Firma Roche: „Der cobas EGFR Mutation Test v2 identifiziert 42 Mutationen in Exon 18, 19, 20 und 21 des EGFR Gens und deckt damit mehr als 99% aller klinisch relevanten EGFR Mutationen ab. Auch Resistenzmutationen (z.B. T790M) können mit dem Test zuverlässig nachgewiesen werden“ (25).

Dabei wird häufig die einfache Methode des „Amplification-Refractory Mutation Systems (ARMS)“ verwendet, um Punktmutationen oder kleine Deletionen zu detektieren. ARMS basiert auf der Verwendung von sequenzspezifischen PCR-Primern, die eine Amplifikation der DNA nur ermöglicht, wenn das Ziel-Allel (mutierte Allel) in der Probe enthalten ist. Mit dem Vorhandensein oder Fehlen eines PCR-Produkts geht das Vorhandensein oder Fehlen der gesuchten Mutation einher (26).

Der Vorteil der Realtime PCR liegt in der einfachen und schnellen Durchführbarkeit und der guten Spezifität und Sensitivität ($\geq 5\%$ mutierte DNA im Hintergrund von Wildtyp DNA) des Assays bei FFPE Material (25). Der Nachteil ist jedoch, dass diese Methode nur zum Nachweis jener Mutationen verwendet werden kann, welche im Testsystem enthalten sind. Neue oder seltene Mutationen können mit dieser Methode nicht detektiert werden.

Gezielte Untersuchung von Genen durch **Sanger Sequenzierung**

Mittels Sanger Sequenzierung können Gene oder Sequenzbereiche bis zu einer Leselänge von 700 bis 800 Basenpaaren (bp) abgedeckt werden und somit auch unbekannte und seltene Mutationen gefunden werden. Der Nachteil liegt jedoch in der Sensitivität. Mit der Sanger Methode können lediglich Varianten mit einem Mutationsanteil von mehr als 15% nachgewiesen werden (27). Aus diesem Grund kommt die Sanger Sequenzierung vorwiegend in der Keimbahndiagnostik bei humangenetischen Fragestellungen und weniger in der Diagnostik von somatischen Tumoren zum Einsatz.

Gleichzeitige Untersuchung von mehreren Genen oder Genomloci durch NGS

Beim NGS (engl. Next Generation Sequencing) oder der Hochdurchsatz-Sequenzierung erfolgt eine parallele Sequenzierung von Millionen kleiner DNA-Fragmente, welche anschließend bioinformatisch zusammengesetzt und mit einem Referenzgenom verglichen werden. Dadurch ist es möglich ein gesamtes menschliches Genom innerhalb eines einzigen Tages zu sequenzieren. Im Gegensatz dazu würde man mit der zuvor erwähnten Sanger-Sequenzierungstechnologie über ein Jahrzehnt benötigen.

Es gibt eine Reihe von NGS Technologien und Plattformen auf dem Markt. Die bekanntesten und am häufigsten verwendeten Geräte für den gezielten Mutationsnachweis (engl. targeted resequencing) sind Illuminageräte (Firma Illumina) und Ion Torrent Systeme (Firma ThermoFisher Scientific). Beide verwenden unterschiedliche Amplifikations- und Sequenzieretechnologien (28).

Für alle Plattformen werden je nach Anforderung und Applikation verschiedene Verfahren zur Anreicherung relevanter Genbereiche verwendet. Man unterscheidet Amplikon-basierte Verfahren, bei welchen einzelne oder mehrere Zielregionen (einzelne Amplikons oder Amplikonpanels) mittels Primerbindung und PCR amplifiziert werden von Hybrid-Capture-basierten Methoden, bei welchen die Zielregionen durch komplementäre Bindung an Sonden angereichert und anschließend klonal amplifiziert werden. Letztere kommen bei der Sequenzierung von größeren Genpanels, ganzer Chromosomen oder der Exomsequenzierung zur Anwendung (29).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Illumina Sequencing-by-Synthesis-Methode in Kombination mit einem Amplikon-basierten Assay verwendet. Bei dieser Methode wird fragmentierte DNA über spezifische Adaptoren kovalent an einen Glasobjektträger (FlowCell) gebunden. Die Fragmentierung, Anreicherung und Ligation von Adaptoren an die Ziel-DNA-Fragmente wird als „Library Preparation“ bezeichnet und ist im Kapitel Material und Methoden genauer beschrieben. Die DNA-Fragmente auf der FlowCell werden anschließend mittels „Bridge-Amplification“ klonal amplifiziert. Dabei werden sogenannte Cluster aus identischen Molekülen erzeugt. Die Sequenzierreaktion selbst ist eine Weiterentwicklung der Sanger-Sequenzierung ohne Didesoxy-Terminatoren.

Stattdessen werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide mit "reversiblen" Terminatoren verwendet, die es ermöglichen, dass der Nukleotideinbau zyklusweise abläuft und die Fluoreszenz jedes einzelnen eingebauten Nukleotids eines Clusters detektiert werden kann. Die Terminatoren werden nach jedem Zyklus enzymatisch entfernt, womit ein neuer Zyklus beginnt. Bei einer Leselänge von üblicherweise 100 bis 250 bp, können die Fragmente „paired end“ d.h. von beiden Seiten sequenziert werden. Das erleichtert die bioinformatische Auswertung und verbessert die Sequenziergenauigkeit. (30).

1.7 Methoden zum Nachweis von *EGFR* Mutationen aus dem Blutplasma (Liquid Biopsy)

Tumore entlassen im Laufe ihrer Entstehung und Progression sowohl Zellen als auch zell-freie DNA-Fragmente in die Zirkulation, welche das gesamte Spektrum an genetischen und epigenetischen Veränderungen des Tumors repräsentieren (31). Die Analyse dieser DNA-Fragmente und Zellen wird als Liquid Biopsy bezeichnet. Bei Patienten, die sich aus unterschiedlichen Gründen keiner Gewebebiopsie unterziehen können, ist der *EGFR*-Mutationsnachweis in zirkulierender Tumor DNA (engl. circulating tumor DNA, ctDNA) aus einer Liquid Biopsy eine hervorragende nicht invasive Alternative.

Ein weiterer Vorteil ist, dass die Liquid Biopsy das gesamte Tumorgeschehen im Körper und dessen Heterogenität widerspiegelt, während eine einzelne Biopsie nur eine begrenzte Momentaufnahme eines Tumors darstellt. Limitierend ist jedoch der geringe Anteil an ctDNA im Blut, da der Großteil der cfDNA häufig nicht krebsartigen Ursprungs ist (32).

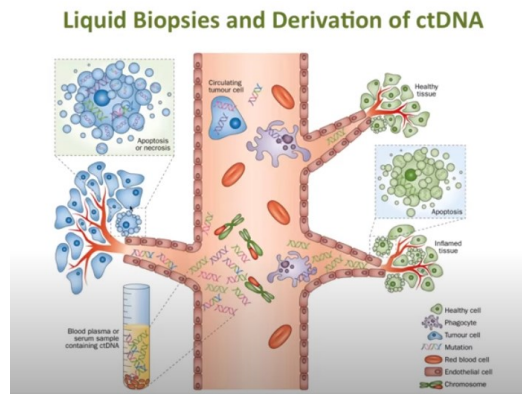


Abbildung 2: ctDNA wird durch cfDNA nicht krebsartigen Ursprungs stark verdünnt (32)

Studien haben gezeigt, dass ctDNA im Blut doppelsträngig und fragmentiert häufig mit einer Länge von ~ 100–150 bp oder 167 bp vorliegt (33, 34). Es wurden mehrere Methoden entwickelt, um die Sensitivität beim Nachweis genetischer Mutationen in ctDNA zu erhöhen. Folgende Methoden kommen in der Routinediagnostik zum Nachweis von *EGFR*-Mutationen zum Einsatz:

Gezielte Untersuchung einzelner Mutationen in ctDNA durch ddPCR

Die ddPCR ist derzeit die sensitivste und gebräuchlichste Methode zum Nachweis von *EGFR* Mutationen aus dem Blutplasma. Mithilfe einer Wasser-Öl-Emulsion wird der PCR-Ansatz auf sehr viele kleine Partitionen (Tröpfchen) verteilt. In diesen Tröpfchen findet dann eine Endpunkt-PCR basierend auf Hydrolyse Sonden mit anschließender digitaler Einzelanalyse statt. Da jedes DNA-Molekül in einem eigenen Kompartiment amplifiziert wird, kommt es zu keiner Absenkung der PCR-Effizienz durch Inhibitoren oder Wildtyp-DNA-Molekülen im Überschuss. Einer der größten Vorteile der ddPCR ist die Möglichkeit der absoluten Quantifizierung ohne Kalibration (35).

Wie bei der Realtime PCR können auch hier nur einzelne bereits bekannte Mutationen gezielt gesucht werden.

Gezielte Untersuchung mehrerer bekannter Hotspot-Mutationen in ctDNA durch Realtime PCR (z.B. cobas® *EGFR* Mutation Test v2 (Roche), Therascreen ® (QIAGEN)).

Der cobas® *EGFR* Mutation Test v2 ist ein von der FDA zugelassener semiquantitativer Plasma-Genotypisierungstest. Der bereits oben beschriebene

ARMS-Test zeigte in vielen Studien bei einem Detektionslimit von 100 Kopien/ml, eine hohe Zuverlässigkeit in der Liquid Biopsy, aber eine vergleichsweise geringere Sensitivität als die ddPCR (36).

Gleichzeitige Untersuchung von mehreren Genen oder Genomloci in ctDNA durch NGS.

Eine hohe Sensitivität bei einer gleichzeitig breiten Abdeckung des Genoms und die Möglichkeit auch unbekannte Mutationen und Resistenzmechanismen im Blutplasma zu finden, wäre eine wünschenswerte Kombination. Die Untersuchung der Anwendbarkeit von NGS in ctDNA ist Teil dieser Arbeit.

1.8 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Anwendbarkeit der NGS Technologie für einen *EGFR* Mutationsnachweis aus ctDNA in der klinischen Routinediagnostik. Ziel dieses Projektes ist die Etablierung bzw. Validierung des Reveal ctDNA™ 28 NGS Assays, um reproduzierbare Ergebnisse mit maximaler Sensitivität und Spezifität zu erreichen.

2. Material und Methoden

2.1 Referenzmaterial

Für die Validierung des Assays wurde Seraseq® ctDNA Complete™ Referenzmaterial der Firma Seracare verwendet. Das Material beinhaltet sowohl menschliche DNA der Referenzzelllinie GM24385 als auch künstlich hergestellte DNA mit bekannten Hotspot Mutationen und wird in einer synthetischen Plasmamatrix mit einer DNA-Konzentration von 25 ng/ml geliefert. (37–39). Für die vorliegende Arbeit wurde Referenzmaterial mit einer Variantenallelfrequenz (VAF) von 0,1% und 0,5% verwendet. Von den insgesamt 25 enthaltenen Varianten wurden 12 Punktmutationen, 3 Deletionen und eine Insertion für die Validierung des Reveal ctDNA NGS Assays ausgewählt (siehe **Tabelle 1**).

Gene	AA Change	HGVS
<i>AKT1</i>	p.E17K	c.49G>A
<i>ALK</i>	p.G1202R	c.3604G>A
<i>ALK</i>	p.F1174L	c.3522C>A
<i>BRAF</i>	p.V600E	c.1799T>A
<i>EGFR</i>	p.T790M	c.2369C>T
<i>EGFR</i>	p.L858R	c.2573T>G
<i>KIT</i>	p.D816V	c.2447A>T
<i>KRAS</i>	p.G12C	c.34G>T
<i>KRAS</i>	p.G12D	c.35G>A
<i>KRAS</i>	p.Q61H	c.183A>C
<i>NRAS</i>	p.Q61R	c.182A>G
<i>PIK3CA</i>	p.H1047R	c.3140A>G
<i>EGFR</i>	p.L747_P753>S	c.2240_2257del18
<i>EGFR</i>	p.S752_I759 del SPKANKEI	c.2254_2277del24
<i>EGFR</i>	p.E746_A750 del ELREA	c.2235_2249del15
<i>ERBB2</i>	p.A775_G776 ins YVMA	c.2324_2325ins12

Tabelle 1: Für die Validierung ausgewählte Hotspot Mutationen.

Zur Bestimmung der Spezifität des Assays wurden Blutproben von 5 gesunden Probanden als Wildtyp-Referenzproben sequenziert und auf das Vorhandensein der in Tabelle 1 gelisteten Varianten untersucht.

2.2 Validierungsprotokoll

Basierend auf den von den Firmen ArcherDx und SeraCare bereits erhobenen Spezifikationen und Leistungsdaten des Reveal Assays wurde ein Validierungsprotokoll erstellt (38–41).

Die Validierung des Reveal Assays mit Seraseq®- und Wildtyp-Referenzproben hinsichtlich der analytischen Sensitivität bzw. Spezifität erfolgte in insgesamt 8 Sequenzierläufen unter Verwendung eines MiniSeq Mid- oder High Output Reagent Kits (300-cycles) auf einem Illumina MiniSeq. Die Proben wurden in der Regel mit anderen Routineproben (RNA und DNA-Proben aus FFPE) des molekularpathologischen Labors zusammen gepoolt und sequenziert. Die DNA Inputmenge für das Seraseq®-Referenzmaterial war aufgrund der genauen Herstellerangaben gut planbar und wurde mit 1 ml (entspricht ca. 25 ng DNA) bzw.

2 ml (ca. 50 ng DNA) Probenvolumen für die Extraktion angesetzt. Für die Wildtyp-Referenzproben wurde weniger DNA-Ausbeute erwartet. Somit wurde das eingesetzte Probenvolumen auf 5 ml erhöht. Die Referenzläufe erfolgten entsprechend folgendem Validierungsschema:

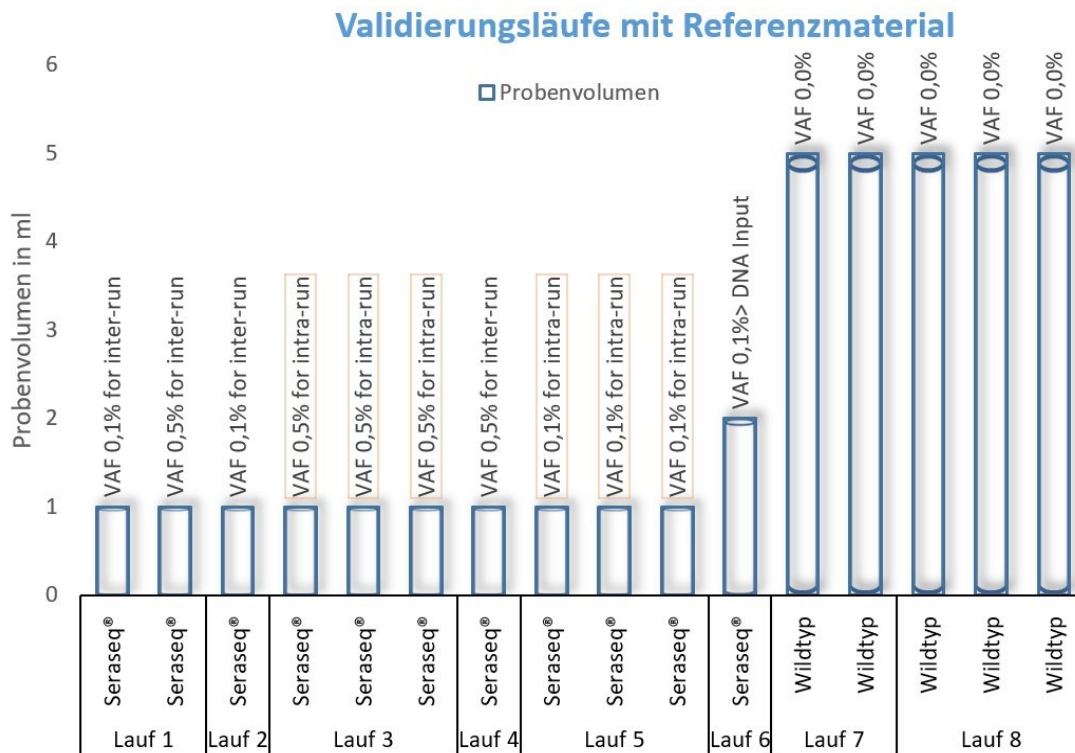


Abbildung 3: Validierungsläufe mit Referenzmaterial

2.3 Patienten

Zur Bestimmung der diagnostischen Sensitivität wurde eine Vergleichsanalyse des Reveal NGS Assays mit der ddPCR (derzeit Goldstandard) an Patientenmaterial durchgeführt. Die im Rahmen der Routinediagnostik erhobenen Ergebnisse des Reveal NGS Assays wurden mit ddPCR Ergebnissen des Instituts für Krebsforschung an der Medizinischen Universität Wien verglichen.

Das Untersuchungskollektiv beschränkte sich auf Patienten

- die in der Zeit von 1.1.2019 bis 30.04.2020 an der Lungenabteilung des Salzkammergutklinikums Vöcklabruck betreut wurden
- die an einem nachgewiesenen *EGFR* mutierten NSCLC litten
- die eine TKI Therapie erhielten

- die an der Studie „Identification of biomarkers in patients with *EGFR*-mutated NSCLC – a feasibility study“ am Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien teilnahmen
- die über die Studie aufgeklärt wurden und eine Einverständniserklärung zur Teilnahme unterzeichnet hatten
- bei welchen ein Ergebnis der ddPCR (Medizinischen Universität Wien) vorlag

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Landes Oberösterreich am 20.11.2019 genehmigt (EK Nr: 1211/2019). Unter Berücksichtigung der "ICH-Guideline for Good Clinical Practise" ist dieser EK-Beschluss bis 20.11.2020 gültig.

2.4 Blutprobengewinnung

Bei allen oben angeführten Patienten erfolgte zu den jeweiligen Kontrollterminen eine Blutabnahme von 3 x 10 ml Vollblut mittels Cell-Free DNA BCT® CE Röhrchen der Firma Streck. Das Abnahmeröhrchen enthält ein Zellkonservierungsmittel, welches die kernhaltigen Blutkörperchen stabilisiert und damit die Freisetzung von DNA aus Blutzellen verhindert. Wichtig ist eine vorschriftsmäßige Anwendung und Lagerung (max. 7 Tage bei Raumtemperatur) laut Packungsbeilage. Zwei von insgesamt drei Blutproben wurden üblicherweise noch am selben Tag im Doppel-Rotationsverfahren 1 (siehe Packungsbeilage) zentrifugiert und extrahiert. In Ausnahmefällen wurden die Vollblutproben maximal 3 Tage bei Raumtemperatur gelagert.

Das dritte Cell-Free DNA BCT Röhrchen wurde zur Bestimmung der *EGFR* T790M Mutation und der primär aktivierenden Mutation (*EGFR* L858R oder *EGFR* Exon 19 Deletion) an das Institut für Krebsforschung an der Medizinischen Universität Wien (Prof. Dr. Filipits) versendet.

2.5 Extraktion und DNA Quantifizierung

Die cfDNA Extraktion aus dem Seraseq® ctDNA Complete™ Referenzmaterial und dem Blutplasma erfolgte mit dem QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN).

Es wurde je 1 bzw. 2 ml Referenzmaterial und je 5 ml Patientenplasma in das Extraktionsprotokoll eingesetzt und gemäß Kit Handbuch bzw. mit Hilfe des Extraktionsgerätes QIAcube extrahiert. Anschließend erfolgte die DNA Quantifizierung der Eluate mit dem Qubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) am Qubit 2.0. Proben mit hoher DNA Konzentration wurden mit Nuklease-freiem Wasser auf max. 6 ng/µl verdünnt und entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

2.6 Library Preparation und Next Generation Sequenzierung

Der Archer® Reveal ctDNA™ Assay ist ein Amplikon-basiertes Deep Sequencing Verfahren zur Herstellung einer NGS Library von Zielregionen in insgesamt 28 Genen. Folgende Gene sind im Panel enthalten: *ALK, AKT1, AR, BRAF, CTNNB1, DDR2, EGFR, ERBB2, ESR1, FGFR1, HRAS, IDH1, IDH2, KIT, KRAS, MAP2K1, MAP2K2, MET, NRAS, NTRK1, NTRK3, PIK3CA, PDGFRA, RET, ROS1, SMAD4, MTOR, TP53*.

Die Library Preparation wurde entsprechend dem Archer® Reveal ctDNA™ Protocol for Illumina® durchgeführt (42).

Alle Archer®-Assays arbeiten mit der sogenannten Anchored Multiplex PCR Technologie. Bei dieser Technik werden vor der PCR zusätzlich zu den Illumina-spezifischen Indices (i5/i7) molekulare Barcodes (MBC) mit einer Länge von acht Nukleotiden an die DNA-Fragmente angehängt, wodurch jedes einzelne Molekül eindeutig gekennzeichnet wird. Durch diese Markierung kann bei der Auswertung quantitativ auf die Anzahl der Ausgangsmoleküle zurückgeschlossen werden. Der größte Vorteil dieser Methode ist jedoch die daraus mögliche Fehlerkorrektur, wie in **Abbildung 4** dargestellt.

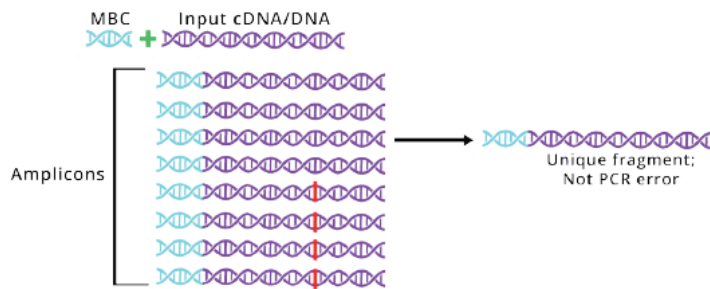


Abbildung 4: Jedes cfDNA Molekül in einer Probe wird vor der PCR mit einem einzigartigen MBC gelabelt. Nach der Sequenzierung generiert die Software eine Konsensussequenz (Unique Fragment). Entstandene PCR Fehler können so korrigiert werden (43).

Ein Überblick über die Archer Library Preparation ist in **Abbildung 5** dargestellt,

Protocol Overview

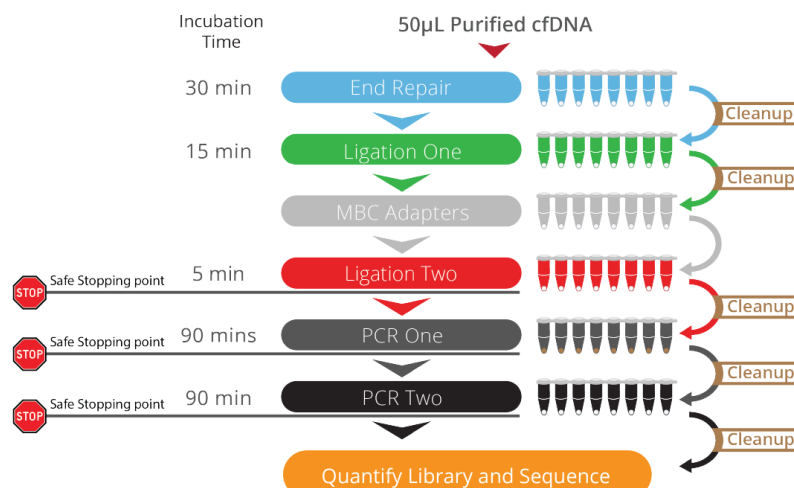


Abbildung 5: Überblick der Archer Library Preparation aus dem Archer® Reveal ctDNA™ Protocol for Illumina® (42).

- Beim End Repair und A-Tailing werden freie Überhänge der doppelsträngigen DNA-Fragmente aufgefüllt und ein Phosphor an das 5' Ende bzw. ein Adenosin an das 3' Ende angehängt. End Repair und dA-Tailing sind notwendig um die Bindung von Adaptoren zu ermöglichen.
- Die beiden Ligationsschritte dienen der Verknüpfung der DNA-Fragmente mit den Archer MBC-Adaptoren. Ein Adaptor enthält eine Universal-Primer-Bindestelle, die Indexsequenz (p5/i5) und die oben beschriebenen MBCs (Aufbau der Archer Adaptoren siehe **Abbildung 6**).
- Im ersten Amplifikationsschritt werden mit einem genspezifischen Primer 1 die gewünschten Targetregionen von insgesamt 28 Genen amplifiziert. Neben dem genspezifischen Primer 1 wird ein Universalprimer verwendet, welcher an die Universal-Primer-Bindestelle bindet (siehe Abbildung 6).

Dadurch entstehen zufällige Sequenzstartpunkte und Fragmente mit unterschiedlichen Längen, was die Komplexität der Library erhöht.

- Der zweite Amplifikationsschritt ist eine „nested PCR“ mit einem genspezifischen Primer 2. Im Zuge dieser PCR wird der zweite Index (p7/i7) angefügt.

Molecular Barcode (MBC) adapters

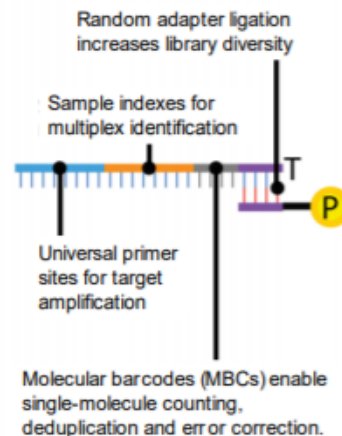


Abbildung 6: Aufbau eines Archer®-MBC Adapters (44)

- Die Libraries wurden gemäß Protokoll mit AMPure XP Beads aufgereinigt, mit einem Qubit 2.0 Fluorometer quantifiziert und auf 4 ng/µl verdünnt.
- Die normalisierten Proben wurden anschließend gepoolt und laut MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (1000000002697) (45) verdünnt und denaturiert.
- 500 µl des denaturierten und verdünnten Library-Pools wurden in eine Mid Output oder High Output Reagent Cartridge geladen und am MiniSeq sequenziert. Der Hersteller empfiehlt für Reveal ctDNA Proben eine Sequenziertiefe von mindestens 5 Millionen Reads. Mit einer Mid Output Cartridge können maximal 8 Millionen Reads, mit einer High Output Cartridge maximal 25 Millionen Reads sequenziert werden.
- Die Sequenzierung der Proben erfolgte nach Anlegen des Laufes im Local Run Manager und Zuordnung der Indices zu den entsprechenden Proben unter dem „Generate FASTQ“ Workflow am Illumina MiniSeq.
- Zu beachten war, dass bei der Sequenzierung von Archer Produkten stets eine PhiX Kontrolle oder eine Library eines anderen Herstellers mit einem Anteil von mindestens 20% mitgeführt werden musste.

Begründung:

Alle Libraries der Fa. Archer weisen durch die Universal-Primer Stelle am Anfang eine Reihe homologer Sequenzen auf. Aufgrund dieser verringerten Diversität beim Sequenzierstart kommt es zu Problemen bei der Clustergenerierung in den ersten 25 Sequenzierzyklen, insbesondere beim Sequenziergerät Illumina MiniSeq. Der MiniSeq verwendet die 2-Kanal „sequencing by synthesis“ Technologie. Diese Methode erfordert nur 2 Bilder pro Sequenzierzyklus (anstatt 4 Bilder wie z.B. beim MiSeq), wodurch sich die Sequenzierungs- und Datenverarbeitungszeiten verkürzen. Beim Base Calling erfolgt die digitale Zuweisung der Basen zu den jeweiligen Signalen. Cluster, die in roten oder grünen Bildern zu sehen sind, werden als C- bzw. T-Basen interpretiert. Sowohl in roten als auch in grünen Bildern beobachtete Cluster sind als A-Basen (als gelbe Cluster) gekennzeichnet, während nicht markierte Cluster als G-Basen gekennzeichnet sind. Haben beispielsweise alle Fragmente an der gleichen Stelle eine G-Base, wird auf der gesamten Flusszelle kein Signal detektiert. Das Gerät kann die G-Basen keinen Clustern zuordnen. Passiert das am Anfang mehrmals hintereinander, sodass auf der gesamten Flusszelle die gleiche Bildfarbe detektiert wird, können die einzelnen Cluster nicht voneinander unterschieden werden.

- Alle Referenz- und Patientenproben wurden am MiniSeq „paired-end“, d.h. von beiden Seiten, sequenziert.

2.7 Datenanalyse

Nach der Sequenzierreaktion und dem Base Calling erfolgte das Demultiplexing der simultan sequenzierten Proben direkt am MiniSeq. In diesem Schritt wurden die Indices den einzelnen Proben zugeordnet und FASTQ Files erstellt (Generate FASTQ Workflow). Für jede Probe waren aufgrund der paired-end Sequenzierung zwei FASTQ Files verfügbar.

Beurteilung der Laufqualität

Für die Beurteilung der allgemeinen NGS-Laufqualität galten folgende Richt- bzw. Zielwerte:

Clusterdichte: Bereich zwischen 170 – 220 K/mm²

Clusters Passing Filter (CPF): > 85%

Q30 Score: > 80%

Sekundär- und Tertiäranalyse

Die Sekundär- und einzelne Schritte der Tertiäranalyse erfolgte mit dem von der Firma ArcherDX bereitgestellten Analyseprogramm Archer Analysis 6.2.1, welche lokal auf einem Server in einer virtuellen Umgebung (VMware Fusion®) installiert wurde. Die Analyse beinhaltet das Adapter Trimming, Deduplication, Qualitätskontrolle, Alignment und Mutation Calling sowie eine Tertiäranalyse mit Ensembl Variant Effect Predictor und ClinVar. Die Software ermöglicht prinzipiell den Nachweis von Strukturvarianten (exon skipping, internal tandem duplication und anderen strukturellen Aberrationen), Einzelnukleotidvarianten (SNV), Kopienzahlveränderungen und Insertionen/Deletionen (InDel) bis zu einer Länge von 30 bp. In dieser Arbeit wurde der Reveal ctDNA™ Assay lediglich auf SNVs und InDels getestet. Als Referenzgenom wurde das Genome Reference Consortium GRCh37 (**hg19**) verwendet.

- Adapter Trimming:

Die bioinformatische Entfernung der Adaptersequenzen ist nur an den 3' Enden und nicht an den 5' Enden der Fragmente notwendig, da die DNA Sequenzierung von Read 1 und Read 2 immer an der ersten Base des DNA Inserts beginnt (siehe **Abbildung 7**) und die Adaptoren am 5' Ende nicht mitsequenziert werden. Da die Sequenzierung in der Regel über die Länge des DNA-Inserts hinausläuft, wird die Adaptersequenz am 3'-Ende mitsequenziert und muss bei der Datenanalyse entfernt werden.

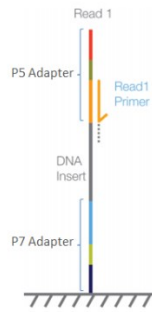


Abbildung 7: Die Sequenzierung von Read 1 und Read 2 beginnt an der ersten Base des DNA-Inserts (46).

- Deduplication:

Bei der Deduplication werden mithilfe der MBC die Raw Reads zu Unique Fragments zusammengeführt (siehe **Abbildung 8**)

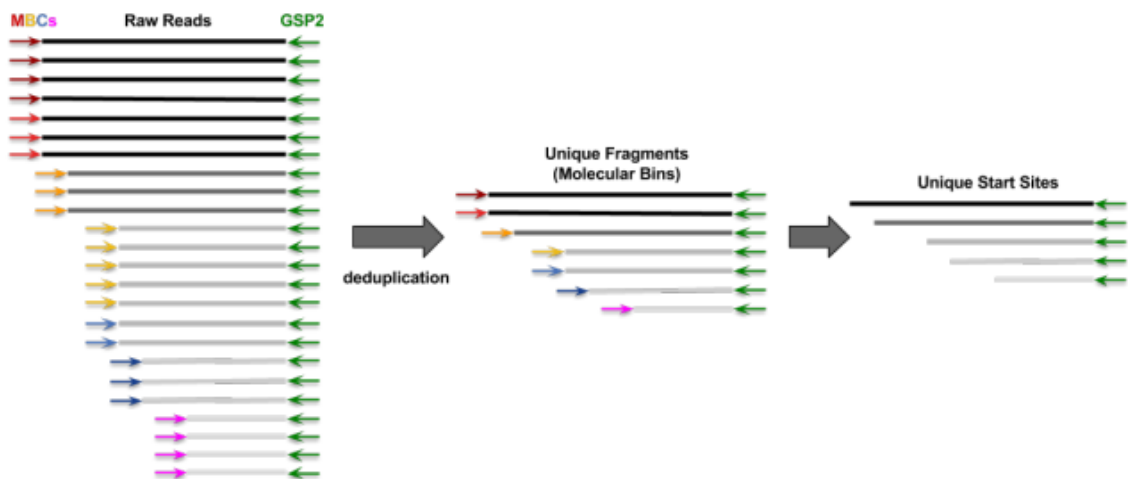


Abbildung 8: (Übernommen aus Archer® Analysis 6.0 User Manual (47)) **Raw Reads** sind die Reads, welche bei der Sequenzierung generiert wurden. **Unique Fragments (Molecular Bins)** stellen die Originalfragmente aus einer Probe dar, d. h. vor den PCR-Schritten. Bei der Deduplication werden alle Fragmente mit gleichem MBC zu einer Konsensussequenz zusammengefasst und Fehler korrigiert. **Unique Start Sites** entstehen durch das Zusammenführen aller gleich langen Fragmente der Unique Fragments zu einem Konsensusfragment. Unique Fragments in Kombination mit Unique Start Sites geben Auskunft über die Probenkomplexität und Qualität der Probe.

Filtereinstellungen und Qualitätskontrollparameter:

Für die vorliegende Arbeit wurden die Standardeinstellungen der Archer Analysis 6.2.1 Software übernommen (siehe Archer® Analysis 6.0 User Manual, General Analysis Settings). Auf wenige wichtige Einstellungen und Parameter wird nachfolgend eingegangen.

Generelle Datenanalyseeinstellungen:

- MIN_AVERAGE_UNIQUE_DNA_AND_AMBIG_START_SITES_PER_GSP
2

Dieser Parameter gibt die durchschnittliche Anzahl der Unique Start Sites für jeden genspezifischen Primer 2 an. Der Wert muss > 50 betragen um ein Analyseergebnis für die entsprechende Probe zu erhalten (Pass/Fail Kriterium). Niedrige Werte (<50) deuten auf eine schlechte DNA-Qualität hin.

Einstellungen für das Detektieren der Varianten („variant calling“)

- MIN_BASEQUAL_FOR_VARIANT_CALL

Es wurden nur Varianten detektiert, welche einen PHRED-Scaled Quality Score von > 20 aufwiesen.

- TARGETED MUTATION FILE

Die Datenanalyse wurde mithilfe des Targeted Mutation File „Archer_Comprehensive_Targets-v1.3.vcf“ spezifiziert. Dieses File, im Variant Call Format (vcf), beinhaltet 4910 bekannte Varianten. Bei Verwendung eines Target Mutation File werden alle Varianten aus dem File in der Ergebnisliste angezeigt, unabhängig davon, ob das alternative Allel gefunden wird oder nicht. Für jede gelistete Position können somit verschiedene Sequenzdaten wie, Quality, Coverage und das Detektionslimit abgelesen werden. Die Einstellung „include Non-Targeted Variants“ wurde auf „Off“ gestellt. Damit wurden alle Varianten, welche nicht in diesem File enthalten waren, herausgefiltert. Diese Vorfilterung verringert das Hintergrundrauschen bei sehr niedrigen Allelfrequenzen und erhöht damit die Performance des Assays. Der Nachteil ist allerdings, dass nur in diesem File gelistete Varianten detektiert werden können. Da in der Liquid Biopsy in der Regel aber nach bekannten aktivierenden Mutationen oder nach Resistenzmutationen gesucht wird, ist die diagnostische Sensitivität ausreichend.

- NORMAL DATA SET

Neben der Verwendung von MBC bedient sich Archer in der Software eines weiteren sehr effizienten Hilfsmittels, um bei niedrigen Allelfrequenzen sogenannte Hintergrundsignale (Artefakte aus PCR und Sequenzierreaktion, Cytosin

Desaminierungen) von echten Mutationen zu unterscheiden. Während der Analyse wird jede einzelne Variante mit einem vordefinierten „Normal Data Set“ aus Wildtypsequenzen abgeglichen und das Hintergrundrauschen ermittelt. Für die Erstellung des „Normal Data Sets“ wurde Blutplasma von 5 gesunden Labormitarbeitern in 5 separaten Sequenzierläufen sequenziert und als „Normal Data Set“ im Archer Analysis 6.2.1 Programm definiert.

Messwerte und Funktionen in der Archer Ergebnisliste:

- NORMAL DATA SETS MINIMAL DETECTABLE ALLELE FRACTION (ND MDAF, ND 95MDAF)

Mithilfe des oben beschriebenen „Normal Data Sets“ erstellt das Archer Programm für jede potentielle Variante ein positionsspezifisches Rauschprofil (position-specific noise profil). Wie in **Abbildung 9** dargestellt, wird anstatt eines statischen Schwellenwertes zur Trennung der Hintergrundsignale von richtig detektierten Varianten, ein Grenzwert für jede einzelne Variante ausgegeben, welcher als MDAF bezeichnet wird.

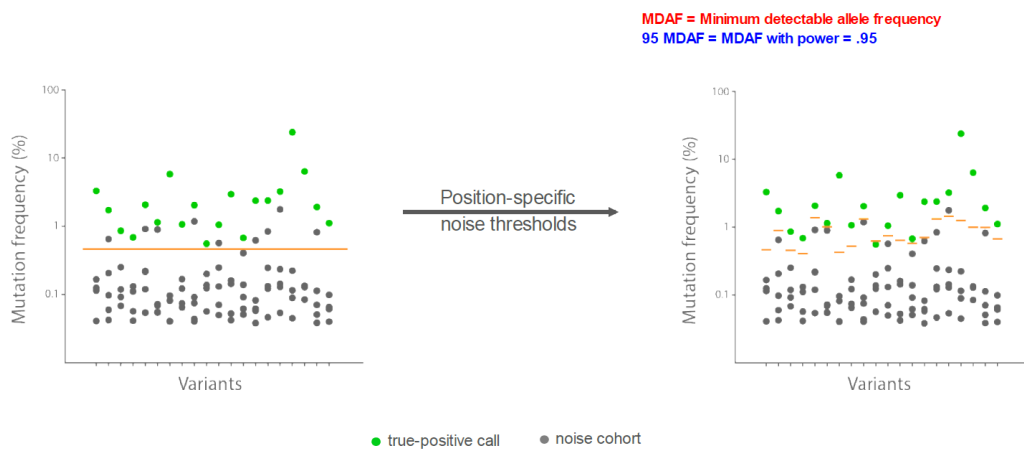


Abbildung 9: Positionsspezifisches Rauschprofil, Grafik übernommen aus den „Technical Note“ der Fa. Archer (44)

Die ND MDAF ist jene Allelfrequenz, welche eine Variante aufweisen muss, um sich vom Hintergrundrauschen des Normal Data Sets abzuheben und die ausreicht, um die Variante in 50% der Fälle detektieren zu können (siehe **Abbildung 10**). Die MDAF ist eine Funktion des Hintergrundes und der molekularen Coverage. Je höher der DNA Input umso höher die Coverage und umso niedriger die MDAF. Dieser Zusammenhang wird im Kapitel Ergebnisse

weiter dargestellt. Die 95 MDAF ist die MDAF mit einer statistischen Power von 95%.

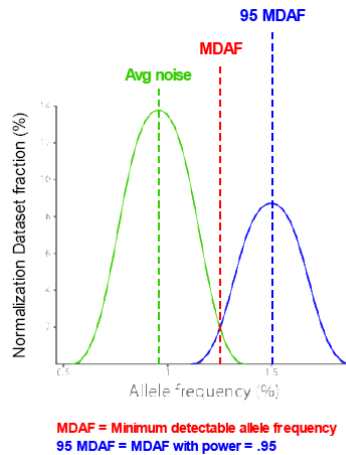


Abbildung 10: Darstellung MDAF und 95 MDAF, entnommen aus den „Technical Notes“ der Fa. Archer (44)

Für die Validierung dieses Assays wurde der ND MDAF als Entscheidungsgrenze (positiv/negativ Aussage) verwendet. Der 95 MDAF Wert stellt das Detektionslimit (LOD95) dar und wird in der Praxis bei unsicheren Varianten auch als Entscheidungswert verwendet.

- NORMAL DATA SETS ALLELE FRACTION OUTLIER P-VALUE (ND AF OUTLIER P VALUE)

Der ND AF Outlier P Value ist ein weiterer Parameter zur Beurteilung der Varianten. Ein niedriger P Value ($< 0,01$) besagt, dass sich die beobachtete VAF einer bestimmten Variante deutlich vom Hintergrundsignal abhebt. Hingegen weist ein hoher P Value ($> 0,1$) darauf hin, dass die VAF der detektierten Variante sehr nahe am Hintergrundsignal liegt.

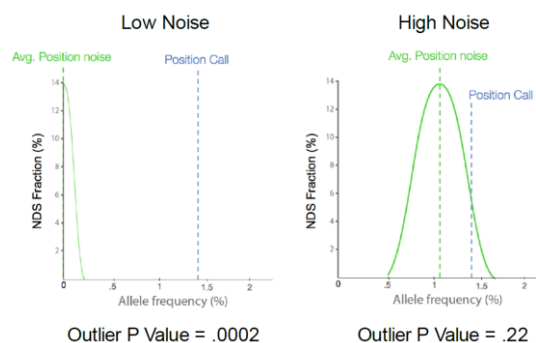


Abbildung 11: Grafik übernommen aus dem „Technical Notes“ der Fa. Archer (44). Die Variante mit einen P Value von 0,22 liegt mit 1,4% AF am Randbereich des Hintergrundsignals.

- ALTERNATE OBSERVATIONS (AO)

Der AO Wert zeigt die Anzahl der alternativen Allele an.

Filtereinstellungen in der Archer Ergebnisliste:

Die Ergebnisse wurden gefiltert nach:

- Populationsallelfrequenz GnomAD (>0.05)
- Consequence (like coding_sequence_variant, feature_elongation, feature_truncation, frameshift_variant, incomplete_terminal_codon_variant, inframe_deletion, inframe_insertion, missense_variant, protein_altering_variant, splice_acceptor_variant, splice_donor_variant, splice_region_variant, start_lost, stop_gained, stop_lost, transcript_ablation, transcript_amplification)
- AO (≥ 1.0)
- ND MDAF ($\leq AF$)

Die verbleibenden Varianten wurden hinsichtlich klinischer Signifikanz und 95 MDAF individuell befundet.

2.8 Referenzmethode

Als Referenzmethode wurde die ddPCR verwendet, welche im Rahmen der Studie „Identification of biomarkers in patients with EGFR-mutated NSCLC – a feasibility study“ am Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien unter der Leitung von Prof. Dr. Martin Filipits durchgeführt wurde. Die Blutabnahme erfolgte an der Lungenabteilung im SK Vöcklabruck mit einem Cell-Free DNA BCT® CE Röhrchen der Firma Streck. Anschließend wurde das Blut vom pathologischen Institut nach Wien versendet. Die Extraktion der zellfreien zirkulierenden DNA aus 2 ml Plasma erfolgte mit dem QIAmp Circulating Nucleic Acid Kit (Fa. Qiagen) entsprechend dem Kit Protokoll. Die Primer und Sonden wurden von Life Technologies (Carlsbad, CA, USA) hergestellt. Die Analyse der ddPCR Rohdaten erfolgte mit der QuantaSoft Analysis Software der Firma Bio-Rad (36, 48).

2.9 Statistik

Die Leistungsmerkmale des Assays wurden anhand der NGS Ergebnisse des Referenzmaterials mittels deskriptiver Statistik in Excel bestimmt. Zur Überprüfung der Übereinstimmung der Ergebnisse des Reveal ctDNA™ 28 Assays mit den Ergebnissen der ddPCR aus Patientenmaterial wurden Konkordanzanalysen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Validierung mit Referenzproben

Für die analytische Validierung des Assays wurden primär zwei SereSeq® ctDNA Referenzstandards der Fa. SeraCare (0,5% und 0,1% VAF) auf insgesamt 10 Proben aliquotiert und mit einem durchschnittlichen DNA Input von 22 ng in 6 separaten Sequenzierläufen sequenziert. Um den Einfluss der DNA-Menge auf die Sensitivität darzustellen wurde in einem 7. Sequenzierlauf der ctDNA Standard mit 0,1% AF und einer DNA-Menge von 57 ng sequenziert. Insgesamt wurden 11 SereSeq Referenzproben sequenziert und bei jeder Probe 16 Varianten (siehe Tabelle 1) (=gesamt 176 Varianten) ausgewertet. Für die Berechnung der analytischen Spezifität wurden 5 gesunde Kontrollproben mit einem DNA-Gehalt von 11 ng, 21 ng, 37 ng, 47 ng und 89 ng sequenziert und je 16 Varianten (=gesamt 80 Varianten) ausgewertet. Als Entscheidungswert (positiv/negativ Aussage) wurden der ND MDAF Wert, wie im Kapitel Datenanalyse beschrieben, verwendet.

Die **analytische Sensitivität** (Positiv Percentage Agreement, PPA) wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{TP}{(TP+FN)} * 100$$

Als "True positive" (TP) wurden jene Varianten bewertet, welche über der ND MDAF lagen. Nicht gefundene Mutationen (Wildtyp) oder Mutationen, die unter der ND MDAF lagen, wurden als „False negative“ (FN) interpretiert.

Ohne Berücksichtigung der ND MDAF als Entscheidungsgrenze konnten 96% (169/176) der Varianten aller Referenzproben detektiert werden. Jedoch befanden sich nur 76% (136/176) der Mutationen über der ND MDAF.

Die **Sensitivität** des Assays ist in **Tabelle 2** dargestellt. Referenzproben mit einem Erwartungswert von 0,5% VAF und einem durchschnittlichen DNA-Gehalt von 21 ng zeigten eine Sensitivität von **96%** (77/80). Bei Referenzproben mit 0,1% VAF und ähnlichem DNA-Gehalt konnten nur **54%** (37/43) der Varianten nachgewiesen werden. Bei Erhöhung des DNA Inputs auf 57 ng lagen 88% (14/16) der Varianten über der ND MDAF. Mit Ausnahme der *EGFR* Resistenzmutation T790M zeigten sich zwischen Punktmutationen und Insertionen/Deletionen nur wenig Unterschiede.

Die ***EGFR* T790M** Mutation erreichte im Referenzstandard mit 0,5% VAF eine Sensitivität von **80%** (4/5). Bei Proben mit einem Erwartungswert von 0,1% VAF konnte die T790M Mutation jedoch nur in **17%** (1/6) nachgewiesen werden. Die Variante wurde zwar in allen 6 Referenzproben zu 100% detektiert, lag aber in 5 von 6 Proben (83%) unterhalb der ND MDAF. Die ND MDAF ist, wie im Kapitel Datenanalyse beschrieben, abhängig vom Hintergrundrauschen und der Coverage. Da die DNA auch bei gesunden Kontrollproben (im „Normal Data Set“) an der Position *EGFR* c.2369 häufig eine C>T Substitution (p.T790M) zeigte, lag der ND MDAF an dieser Position entsprechend höher (siehe **Tabelle 2** und **Abbildung 12**).

Der Assay zeigte bei ***EGFR* Exon 19 Deletionen** in Referenzproben mit einem Erwartungswert von 0,5% VAF eine Sensitivität von **93%** (14/15). Bei einem Erwartungswert von 0,1% konnten lediglich **60%** (9/15) der Varianten nachgewiesen werden. Bei Erhöhung des DNA Inputs auf 57 ng lagen die Exon 19 Deletionen des 0,1%igen Standards zu **100%** (3/3) über der ND MDAF.

	DNA Input ng Ø	Seraseq® ctDNA Reference VAF	Mutationen Gesamt	TP	FN	Sensitivität
Alle 16 Hotspot Mutationen	22 ng	0,5%	80	77	3	96%
		0,1%	80	43	37	54%
	57 ng	0,1%	16	14	2	88%
Punktmutationen	22 ng	0,5%	60	58	2	97%
		0,1%	60	32	28	53%
	57 ng	0,1%	12	11	1	92%
Insertionen/Deletionen	22 ng	0,5%	20	19	1	95%
		0,1%	20	11	9	55%
	57 ng	0,1%	4	3	1	75%
EGFR T790M	22 ng	0,5%	5	4	1	80%
		0,1%	5	1	4	20%
	57 ng	0,1%	1	0	1	0%
EGFR L858R	22 ng	0,5%	5	5	0	100%
		0,1%	5	3	2	60%
	57 ng	0,1%	1	1	0	100%
EGFR Exon19Deletionen	22 ng	0,5%	15	14	1	93%
		0,1%	15	9	6	60%
	57 ng	0,1%	3	3	0	100%

Tabelle 2: Anzahl der richtig positiven und falsch negativen Ergebnisse aller Referenzproben

Die Abhängigkeit der Sensitivität des Assays von der Coverage und dem DNA Input ist in **Abbildung 12 und 13** dargestellt. Werte die unterhalb der ND MDAF lagen, galten als nicht nachweisbar und wurden als falsch negativ bewertet. Bei einem Erwartungswert von 0,1% VAF lagen bei einem DNA Input von 57 ng 12% (2/16) der detektierten VAF unterhalb der ND MDAF. Wurde nur 22,7 ng DNA in den Assay eingesetzt, befanden sich 31% (5/16) unterhalb der ND MDAF. Bei einem Erwartungswert von 0,5% VAF reichten 24,7 ng DNA um alle Varianten detektieren zu können, d.h. es lag keine Variante unterhalb der ND MDAF.

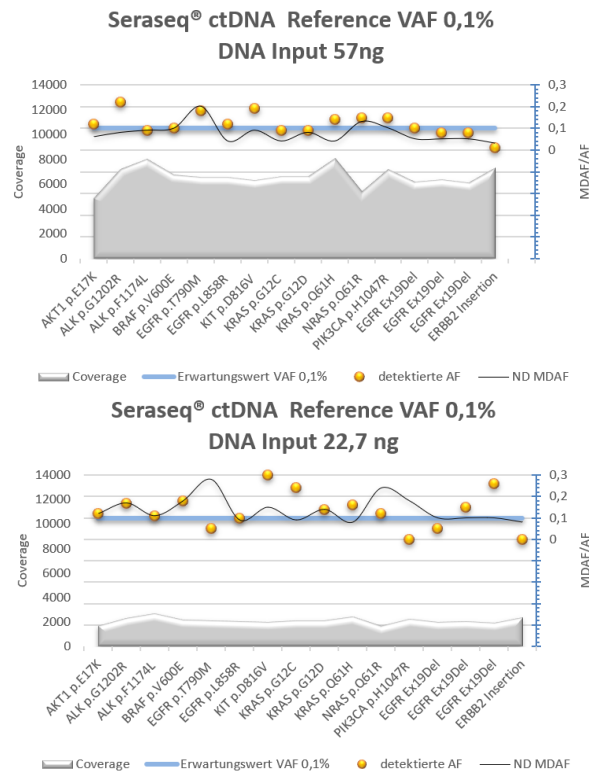


Abbildung 12: NGS Ergebnisse des Seraseq ctDNA Referenzmaterials mit 0,1% VAF und 57 ng bzw. 22,7 ng DNA Input. Je höher die Coverage umso niedriger die ND MDAF. Die Varianten EGFR p.T790M und NRAS p.G12C zeigten aufgrund hoher Hintergrundsignale im Normal Data Set eine erhöhte ND MDAF.

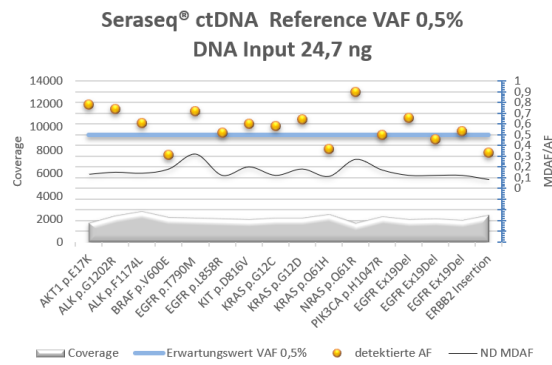


Abbildung 13: Der Erwartungswert von 0,5% VAF und die detektierten VAF des Standards lagen deutlich über der ND MDAF.

Für die Beurteilung der **analytischen Spezifität** (Negative Percentage Agreement, NPA) wurden ebenfalls die im Standard enthaltenen und oben genannten 16 Hotspot Mutationen (siehe Tabelle 1) des Referenzstandards in 5 gesunden Kontrollproben (gesamt 80 Varianten) analysiert und wie folgt berechnet:

$$\frac{TN}{(TN+FP)} * 100.$$

Bei 35% (28/80) in Betracht gezogenen Hotspot Regionen konnten zwar mutierte Allele detektiert werden, allerdings lag die VAF bei allen Varianten unterhalb der ND MDAF. Die Spezifität des Assays beträgt daher **100%**.

Der **positive Vorhersagewert** (Positive Predictive Value, PPV) gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit eine detektierte Variante wirklich in der Probe vorhanden ist. Der PPV wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{TP}{(TP+FP)} * 100 :$$

Da es zu keinen falsch positiven Ergebnissen kam, beträgt der PPV für alle Hotspot Varianten **100%**.

Die **Richtigkeit** des Assays wird aus der Gesamtheit der richtigen Ergebnisse aller Referenzproben (Standard und Kontrollen) mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{(TP+TN)}{(TP+FN+FP+TN)} * 100$$

Aufgrund der schlechten Performance des Assays beim Referenzstandard VAF 0,1% liegt die Richtigkeit des Assays nur bei **84%**.

Die **Wiederholbarkeit** des Tests wurde mittels Intra-Lauf-Triplikaten von je 3 gleichen Seraseq ctDNA Referenzstandards mit 0,1% und 0,5% VAF getestet. Die Extraktion, Librarypreparation und Sequenzierung der Standards erfolgte jeweils in einem Workflow und in einem Sequenzierlauf. Die absolute Standardabweichung des Intra-Lauf-Triplikates des **0,1%**igen Standards beträgt 0,08%. Der Mittelwert aus insgesamt 48 detektierten Varianten liegt gering über dem Erwartungswert und ist 0,12%. Daraus ergibt sich eine relative Standardabweichung (Variationskoeffizient) von **68%**. Beim Standard mit **0,5% VAF** fällt die absolute Standardabweichung aufgrund des höheren Sollwertes mit 0,25% höher aus. Der Mittelwert liegt ebenfalls gering über dem Erwartungswert bei 0,53% und der Variationskoeffizient beträgt **47%**.

Die **Reproduzierbarkeit** wurde mit je 2 gleichen Seraseq ctDNA Referenzstandards mit 0,1% und 0,5% VAF zu unterschiedlichen Zeiten und in unterschiedlichen Sequenzierläufen (Inter-Lauf) getestet. Die absoluten Standardabweichungen liegen bei 0,11% und 0,28% und sind wie erwartet höher als bei den Intra-Lauf Ergebnissen. Die Mittelwerte verbleiben nahezu unverändert

auf 0,12% und 0,51%. Der Variationskoeffizient der beiden Standard-Duplikate des 0,1%igen Standards beträgt **89%** und der des 0,5%igen Standards **54%**.

Die **Nachweisgrenze** (Limit of Detection, LOD) ist abhängig vom DNA-Gehalt in der Probe und dem Hintergrundrauschen und wird bioinformatisch für jede Variante im Analyseprogramm Archer Analyse 6.2.1 berechnet und in der Ergebnistabelle als ND MDAF und 95 MDAF ausgegeben (Details siehe Material und Methoden). In der nachfolgenden Tabelle werden die Nachweisgrenzen der 16 Hotspot Mutationen am Beispiel zweier Seraseq Referenzproben mit 22 ng und 57 ng DNA dargestellt.

Seraseq® ctDNA Reference Standard VAF 0,1%						
			DNA Input 22 ng		DNA Input 57 ng	
Gene	AA Change	HGVS	LOD (95 MDAF)	LOD (MDAF)	LOD (95 MDAF)	LOD (MDAF)
AKT1	p.E17K	c.49G>A	0,42	0,12	0,16	0,06
ALK	p.G1202R	c.3604G>A	0,43	0,17	0,17	0,08
ALK	p.F1174L	c.3522C>A	0,30	0,11	0,13	0,09
BRAF	p.V600E	c.1799T>A	0,45	0,18	0,20	0,10
EGFR	p.T790M	c.2369C>T	0,56	0,28	0,32	0,20
EGFR	p.L858R	c.2573T>G	0,34	0,10	0,12	0,04
KIT	p.D816V	c.2447A>T	0,40	0,15	0,19	0,09
KRAS	p.G12C	c.34G>T	0,33	0,09	0,12	0,04
KRAS	p.G12D	c.35G>A	0,38	0,14	0,17	0,08
KRAS	p.Q61H	c.183A>C	0,28	0,08	0,09	0,04
NRAS	p.Q61R	c.182A>G	0,59	0,24	0,26	0,13
PIK3CA	p.H1047R	c.3140A>G	0,44	0,18	0,20	0,10
EGFR*	p.L747_P753>S	c.2240_2257del18	0,36	0,10	0,13	0,05
EGFR*	p.S752_I759 del SPKANKEI	c.2254_2277del24	0,35	0,10	0,13	0,05
EGFR*	p.E746_A750 del ELREA	c.2235_2249del15	0,36	0,10	0,13	0,05
ERBB2*	p.A775_G776 ins YVMA	c.2324_2325ins12	0,30	0,08	0,09	0,03

Tabelle 3.: Detektionslimit der einzelnen Hotspot Mutationen bei 22 ng und 57 ng DNA Input

*Für die in Tabelle 3 angeführten Insertionen und Deletionen wurden gesonderte Nachweisgrenzen verwendet. Diese Varianten galten aufgrund der spezifischen Länge, Art und Bekanntheit ab einer Detektion von **drei** alternativen Allelen als

nachgewiesen. Bei Vorhandensein eines Vorbefundes aus FFPE Material mit der exakt gleichen Variante wurde die Deletion oder Insertion bereits bei **einem einzigen** gefundenen Allel als „nachgewiesen“ beurteilt.

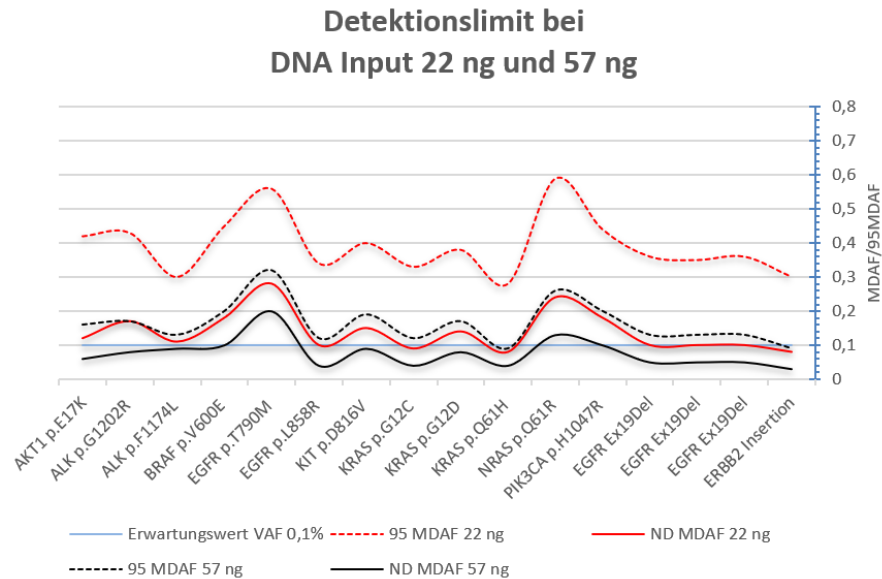


Abbildung 14: ND MDAF und 95 MDAF der einzelnen Hotspot Mutationen im Vergleich.

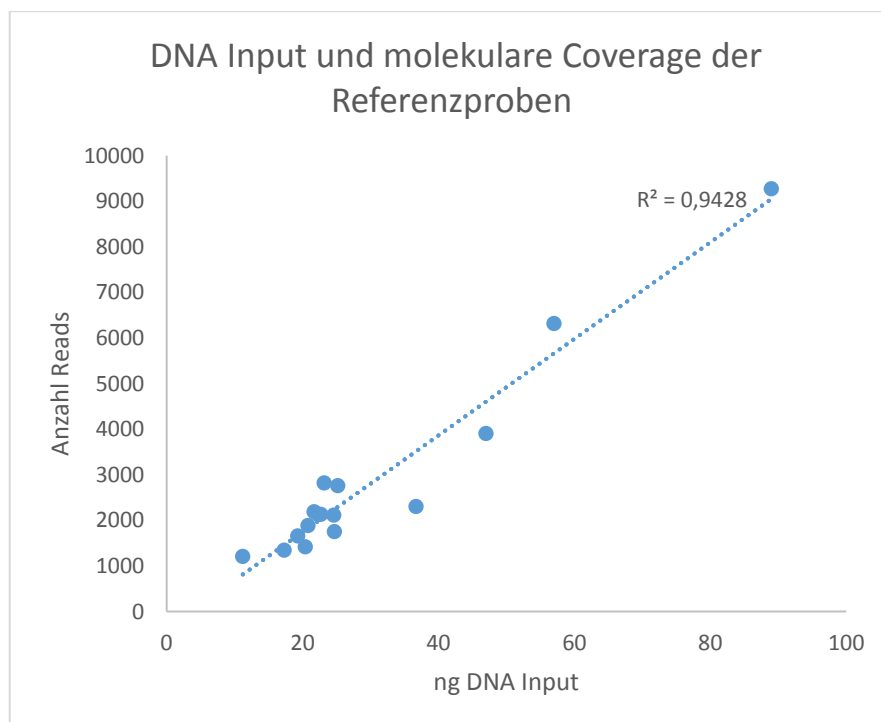


Abbildung 15: Linearer Zusammenhang zwischen DNA Input und molekularer Coverage.

Wie in **Abbildung 15** ersichtlich besteht zwischen der eingesetzten DNA und der molekularen Coverage (durchschnittlichen Anzahl der Reads) ein linearer Zusammenhang von 94,28% (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9428$). Der Hersteller empfiehlt für den Assay mindestens 5 Millionen Reads pro Probe. Bei Einhaltung dieser Herstellerempfehlung erhält man bei 22 ng DNA Input im Bereich der 16 getesteten Hotspot Mutationen eine durchschnittliche molekulare Coverage von 2128 Reads. Es ist daher eine **Mindestabdeckung** von 2128 Reads pro Variante notwendig, um mit einer 96%igen Wahrscheinlichkeit eine VAF von 0,5% nachweisen zu können. Da die molekulare Coverage in etwa die Anzahl der DNA-Fragmente in der Originalprobe widerspiegelt, gelingt es mit diesem Sequenzierassay im Durchschnitt bei einem Hintergrund von 2117 Wildtypfragmenten in 96% der Fälle rund 11 alternative Allele zu detektieren.

3.2 Vergleichsanalyse mit Patientenproben

Für die Vergleichsanalyse mit der ddPCR als Goldstandard wurden insgesamt 28 Plasmaproben von 15 Patienten mit dem ctReveal NGS Assay sequenziert und anschließend mittels ddPCR auf die *EGFR* Variante T790M und je nach Primärbefund der Gewebeprobe entweder auf das Vorhandensein der *EGFR* L858R Variante oder der *EGFR* Exon 19 Deletion getestet.

Die Sensitivität des Assays ist stark von der Menge der eingesetzten cfDNA abhängig (49). Die mittlere Plasma-cfDNA-Konzentration der Vergleichsproben betrug 13,9 ng/ml Plasma (Bereich 2,8 ng – 36,2 ng cfDNA). Die mittlere Menge an cfDNA pro Sequenzierreaktion (DNA Input) betrug 69,4 ng (Bereich 14,0 – 181 ng cfDNA), das entspricht in etwa 10515 Genomäquivalenten (Bereich 2121 – 27424 GE) und 21030 Allelen, wenn man von einem Genomgewicht von 6,6 pg pro Zelle ausgeht. Bei fast der Hälfte (43%) der Proben konnte weniger als 50 ng cfDNA extrahiert werden (siehe **Abbildung 16**).

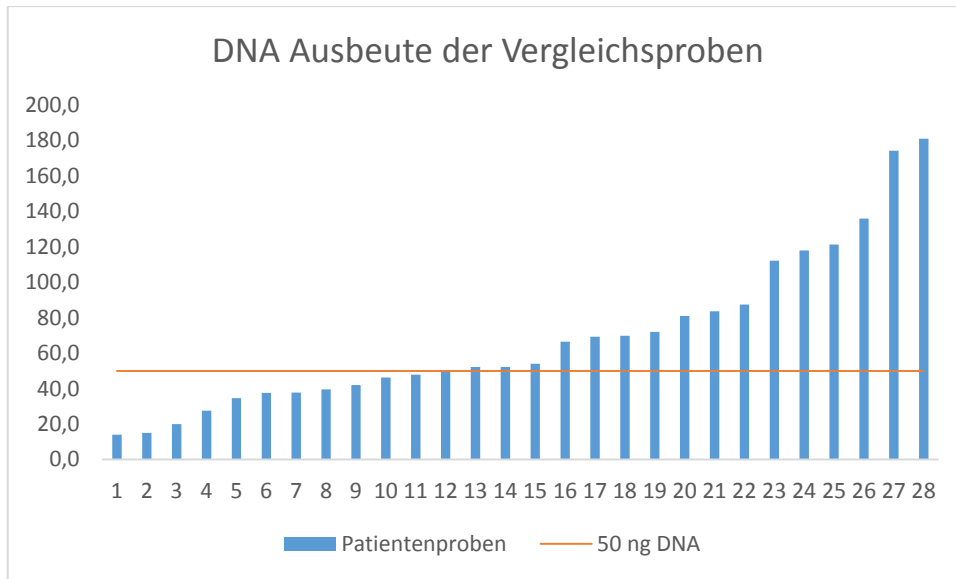


Abbildung 16: Gesamt-cfDNA Ausbeute der Plasmaproben aus 5 ml Plasma.

Ein Vergleich der errechneten Allele mit der tatsächlich sequenzierten molekularen Coverage an der Position *EGFR* c.2369C>T (T790M) ist in **Abbildung 17** dargestellt. Etwa ein Viertel der extrahierten cfDNA Moleküle konnte an dieser Position sequenziert werden.

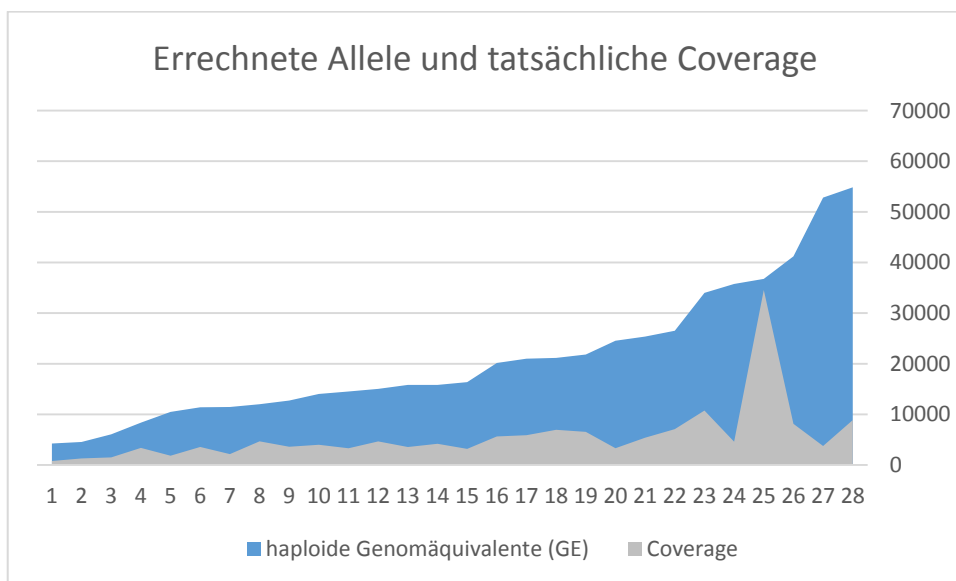


Abbildung 17: Errechnete Allele und molekulare Coverage der 28 Proben an der Position *EGFR* c.2369C>T

Die insgesamt 56 verglichenen *EGFR* Mutationsergebnisse aus NGS und ddPCR zeigten einen linearen Zusammenhang von 99,43% ($R^2 = 0,9943$). Die Korrelation ist in **Abbildung 18** dargestellt. Ein Extremwert von 28312 Kopien /ml in der ddPCR und 67,42% VAF beim Nachweis mit NGS wurde aufgrund der Verzerrung der graphischen Darstellung aus der Analyse entfernt.

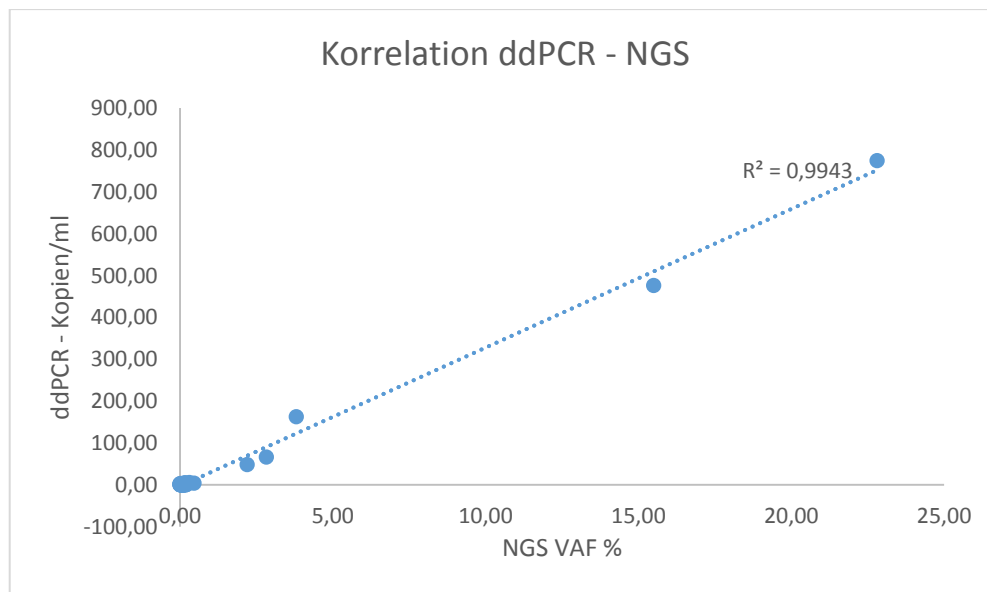


Abbildung 18: Darstellung des linearen Zusammenhangs zwischen NGS- und ddPCR-Ergebnissen

Weiters wurde die **Konkordanzrate** mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{(a+d)}{(a+b+c+d)} * 100$$

Konkordanzrate			
		ddPCR	
		positiv	negativ
NGS	positiv	a	b
	negativ	c	d

Konkordanzrate ddPCR - NGS							
	Messungen gesamt	a	d	c	b	Konkordanzrate	
EGFR T790M	28	3	19	2	0	92%	
EGFR L858R	10	4	6	0	0	100%	
EGFR Ex19Del	18	5	11	1	2	84%	
Gesamt	56	12	36	3	2	91%	

Bei 5 von 28 Plasmaproben konnte die **EGFR T790M** Mutation in der ddPCR nachgewiesen werden. 2 dieser 5 Plasmaproben zeigten im ctReveal NGS Assay ein negatives Ergebnis. Es konnten zwar in beiden Proben alternative Allele (T790M) sequenziert werden, die VAF lag jedoch unterhalb des ND MDAF und konnte daher vom Hintergrundrauschen nicht unterschieden werden. Die ddPCR lag in beiden Fällen mit 3 Kopien/ml knapp über dem Cut-Off Wert von > 1 Kopie/ml (36).

Bei der **EGFR L858R** Mutation konnte eine 100%ige Übereinstimmung erzielt werden. Insgesamt wurden 11 Proben auf diese Mutation getestet, wobei bei 5 Patienten die L858R Mutation mit beiden Methoden nachweisbar war.

EGFR Exon 19 Deletionen wurden insgesamt in 8 von 18 Proben nachgewiesen. Bei 3 Proben gab es keine Übereinstimmung. In einer Probe konnte mit dem NGS Assay kein deletiertes Allel sequenziert werden, wohingegen in der ddPCR 2,3 Kopien/ml nachgewiesen wurden (Cut-Off Wert > 2 Kopien/ml). Umgekehrt wurden in 2 weiteren Proben mittels NGS je eine spezifische Exon 19 Deletion (c.2236_2250delGAATTAAGAGAAGCA; c.2235_2249delGGAATTAAGAGAAGC) sequenziert, welche in der ddPCR nicht gefunden wurden. Da exakt die gleichen Deletionen auch im Tumorgewebe des Patienten gefunden wurden, konnte ein falsch positives Ergebnis durch NGS ausgeschlossen werden. Alle 3 Proben befanden sich mit beiden Methoden knapp über oder unter der Nachweisgrenze (36).

4. Diskussion

Die meisten NSCLC Patienten, die mit TKI-Inhibitoren der ersten oder zweiten Generation behandelt werden, entwickeln nach etwa 9 bis 13 Monaten aufgrund verschiedener Resistenzmechanismen einen progredienten Krankheitsverlauf (9, 50). Die häufigste Resistenzmutation (etwa 50-60%) ist die *EGFR* T790M Mutation, darüber hinaus werden andere Ursachen wie *c-MET*- und *ERBB2* Amplifikationen, seltene *EGFR* Resistenzmutationen oder EMT gefunden (19).

Das Auftreten einer erworbenen Resistenz bei diesen Patienten kann durch Monitoring der ctDNA frühzeitig erkannt werden. Üblicherweise wird zum Nachweis der T790M Mutation die Methode der ddPCR verwendet. Um jedoch auch andere, weniger häufigere Resistenzmutationen zu erfassen, sind komplexere Nachweisverfahren wie das NGS erforderlich. In der vorliegenden Arbeit wurden die Leistungsmerkmale des ctReveal NGS Assays erhoben und überprüft, ob der Assay eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität zur ddPCR aufweist und zum Therapiemonitoring von progredienten Lungenkrebspatienten geeignet ist.

Neben der PCR- und Sequenziergenauigkeit eines Assays stellt die Menge an eingesetzter DNA eines der wichtigsten Kriterien für einen erfolgreichen Mutationsnachweis in cfDNA dar. Die Validierung des Assays wurde daher basierend auf den im Internet verfügbaren Publikationen der Firma ArcherDx (40, 41) und der Firma SeraCare (38, 39) mit unterschiedlichen cfDNA Mengen und ctDNA Konzentrationen geplant. Entsprechend der offiziellen Homepage des Herstellers ist ein zuverlässiger Nachweis von Varianten mit einer VAF von 1% bei einem DNA Input von 10 ng möglich. In der Studie von Lee et al. wurde mit diesem Assay eine 100%ige Sensitivität bei einer VAF von 1% und einem DNA Input von **10 ng** bestätigt. Bei Erhöhung des DNA Inputs auf **50 ng** konnten **71,9%** der Varianten mit VAF von 0,1% detektiert werden (41). Die Firma SeraCare testete ihr eigenes ctDNA Complete™ Referenzmaterial mit dem ctReveal DNA Assay und erreichte ebenfalls eine 100%ige Sensitivität bei einer VAF von 0,5% und einem DNA Input von **50 ng** (39).

Die Ergebnisse der Firma SeraCare konnten in der vorliegenden Untersuchung nahezu bestätigt werden. Bei einem DNA Input von 57 ng und einer VAF von 0,1% erreichte der Assay eine Sensitivität von **88%** (vs. SeraCare 71,9%). Hingegen konnten im Grenzbereich von 22 ng DNA Input und VAF von 0,1% nur mehr **54%** der Varianten detektiert werden. Bei einer VAF von 0,5% und gleichem DNA Input lag die Sensitivität bei **96%**.

Mit Ausnahme der *EGFR* T790M und der Exon 19 Deletionen konnten alle Varianten zu $\geq 95\%$ nachgewiesen werden. Die T790M Mutation wurde nur in 80% der 0,5%igen Referenzproben spezifisch gefunden. In 20% der Fälle lag die sequenzierte VAF unter der MDAF. Das bedeutet, dass bei 20% der Proben die gefundenen T790M Allele nicht vom Hintergrundsignal unterschieden werden konnten. Das Hintergrundrauschen war an der DNA-Position *EGFR* c.2369C>T auffallend höher als an den anderen 15 Hotspot Mutationen. Eine ähnliche Beobachtung machte die Forschungsgruppe Belchis et. al an der Johns-Hopkins-Universität. Sie sequenzierten 16 nicht neoplastische FFPE Proben und detektierten an der Position c.2369C>T ein Hintergrundrauschen von 1,3% VAF. Bei weiteren 179 Proben mit bekannten aktivierenden KRAS Mutationen wurde dieses C>T Artefakt mit einer VAF von 0,37% bis 0,77% gefunden (51). Das Hintergrundsignal in dieser Studie war an dieser Position ebenfalls auffallend höher als an anderen Hotspot Mutationen, ähnlich wie in der vorliegenden Untersuchung. Sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* scheint diese DNA-Position für eine Desaminierung anfällig zu sein. Obwohl die DNA einer FFPE Probe aufgrund der Formalinfixierung meist eine schlechtere Qualität aufweist und daher mit der cfDNA nicht gleich zu setzen ist, ist auch die cfDNA im Blut bei einer Halbwertszeit von 15 Minuten bis wenigen Stunden einer Degradation und damit verbundenen Desaminierung ausgesetzt (34). Da jedoch die ddPCR bei den Vergleichsproben in der vorliegenden Untersuchung sehr wenig unspezifische Reaktionen an dieser Position zeigte, wird wahrscheinlich die Technik der Library Präparation und das NGS die ausschlaggebende Rolle in der Entstehung dieses Artefaktes spielen.

Anders verhielt es sich bei den *EGFR* Exon 19 Deletionen. Die bekannten und meist in etwa 15 bis 18 bp langen Inframe-Deletionen zeigten in dieser Arbeit eine äußerst hohe Spezifität. Es trat praktisch kein einziges unspezifisches Hintergrundsignal bei den Wildtyp-Referenzproben auf. Die Sensitivität betrug

beim Referenzmaterial 93%, d.h. 14 von 15 Deletionen konnten nachgewiesen werden. In der Vergleichsanalyse zeigte NGS bei den Exon 19 Deletionen eine vergleichbare Sensitivität zur ddPCR. Bei 2 Proben konnten mittels NGS spezifisch Deletionen gefunden werden, welche in der ddPCR nicht nachweisbar waren. Die beiden unterschiedlichen Exon 19 Deletionen (c.2236_2250, c.2235_2249) wurden zuvor im FFPE Gewebe des jeweiligen Patienten nachgewiesen. Ein falsch positives Ergebnis konnte daher ausgeschlossen werden. Umgekehrt wurde in einem Fall eine Exon 19 Deletion in der ddPCR nachgewiesen, welche mit NGS nicht gefunden wurde. Bei allen 3 Proben befand sich die Anzahl der gefundenen Kopien knapp über oder unterhalb der Nachweisgrenze (zw. 1 und 4 Kopien).

In einer Arbeit von Vollbrecht et al. (2018) wurde die Performance des Oncomine Lung cfDNA Assay (OLcfDNA) am Ion S5XL System (Thermo Fisher Scientific) getestet. Dieser Assay enthält ebenfalls molekulare Barcodes zur Fehlerkorrektur und ist daher mit dem Reveal Assay von Archer vergleichbar. Der Hersteller (Thermo Fisher Scientific) empfiehlt mindestens 20 ng DNA Input und eine molekulare Coverage von mindestens 2500 Reads um ein Detektionslimit (LoD) von 0,1% zu erreichen. In dieser Studie erreichte der OLcfDNA Assay bei einer VAF von 0,1% eine Sensitivität von **87,5%**. Aus der Publikation konnte jedoch nicht entnommen werden, wieviel DNA der Referenzproben eingesetzt wurde. Bei einem Input von 50 ng DNA würde der Assay eine vergleichbare Sensitivität zu dem Reveal Assay von Archer (88%) aufweisen (52).

Die Validierungsergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Sensitivität und Spezifität des Assays mit den Angaben des Herstellers übereinstimmen und mit anderen NGS Assays vergleichbar sind. Weiters wurde mittels Intra- und Inter-Läufen die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit des gesamten NGS-Workflows gemessen und mithilfe eines Variationskoeffizienten bewertet. Bei Erwartungswerten von VAF 0,1% und 0,5% lagen alle relativen Abweichungen zwischen 47% und 89%. In Anbetracht der niedrigen Absolutwerte sind diese Werte valide.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Assay vorwiegend im Grenzbereich mit einem DNA Input von 22 ng und einem Erwartungswert von VAF 0,1% validiert.

Da auch im Patientenplasma häufig mit einem geringen DNA-Gehalt zu rechnen ist und Varianten im niedrigen Bereich (VAF 0,1%) detektiert werden möchten, entsprechen diese Bedingungen dem klinischen Laboralltag. Bei fast der Hälfte (43%) der getesteten Patientenproben konnte weniger als 50 ng (10 ng DNA/ml Plasma) extrahiert werden. Die Forschungsgruppe Zhang et al. aus China beschäftigte sich mit dem Einfluss der cfDNA Menge auf den Mutationsnachweis und erhielt in ihrer Untersuchungskohorte von 215 Patienten eine mittlere cfDNA Konzentration von 11,09 ng/ml (49). In der vorliegenden Studie betrug die mittlere cfDNA-Konzentration der Plasmaproben 13,9 ng/ml Plasma (Bereich 2,8 ng – 36,2 ng cfDNA). Trotz der geringen Fallzahl von 28 Proben ist das ein vergleichbarer Wert zur Arbeit von Zhang et al. Weiters konnte Zhang et al. einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen drei cfDNA Input Gruppen (≥ 5 ng cfDNA Input pro Reaktion; 2-5 ng cfDNA pro Reaktion; < 2 ng cfDNA-Eingabe pro Reaktion) hinsichtlich ihrer *EGFR*-Mutationsnachweisbarkeit feststellen, wobei der Mutationsnachweis aus Gewebe als Referenz diente. Die Gruppe mit ≥ 5 ng DNA Input zeigt eine Sensitivität von 82,6%, wohingegen die Gruppe mit < 2 ng DNA Input lediglich eine Sensitivität von 46,7% aufweisen konnte (49).

Die in diesem Assay verwendeten molekularen Barcodes dienen in erster Linie der Fehlerkorrektur und damit der Erhöhung der Sensitivität des Assays. Zusätzlich kann aber durch diese Markierung auf die Menge der Ausgangsmoleküle (molekulare Coverage) in der Probe zurückgeschlossen werden kann. Der mittlere DNA Input der Vergleichsproben betrug 69,4 ng cfDNA das entspricht in etwa 21030 Allele, wenn man von einem Genomgewicht von 6,6 pg pro Zelle ausgeht. Beim Vergleich der errechneten Allele mit der tatsächlichen molekularen Coverage an der Position *EGFR* c.2369C>T (T790M) konnte gezeigt werden, dass nur etwa ein Viertel (27%) der extrahierten DNA Moleküle (5611 Reads) an dieser Position wiedergefunden wurden. Eine schwedische Forschungsgruppe untersuchte die Qualität und Quantität der cfDNA unter anderem mit qPCR und Sequenzierung und fand 37% der Ausgangsmoleküle nach der Sequenzierung wieder, wobei der größte Verlust auf die stark fragmentiert vorliegende cfDNA zurückzuführen war. (53)

Leider gibt es derzeit noch wenig Anhaltspunkte oder Richtlinien über die Leistungsanforderungen eines Assays zum T790M Nachweis aus ctDNA. Buder

et al. verglichen den Outcome von Osimertinib Patienten (TKI der dritten Generation) mit der Höhe der Kopienzahl der T790M Mutation in ctDNA zu Therapiebeginn. In der folgenden Kaplan-Meier Kurve ist das progressionsfreie Überleben (PFS) und das Gesamtüberleben (OS) bei T790M > 10 Kopien/ml und < 10 Kopien/ml dargestellt (36).

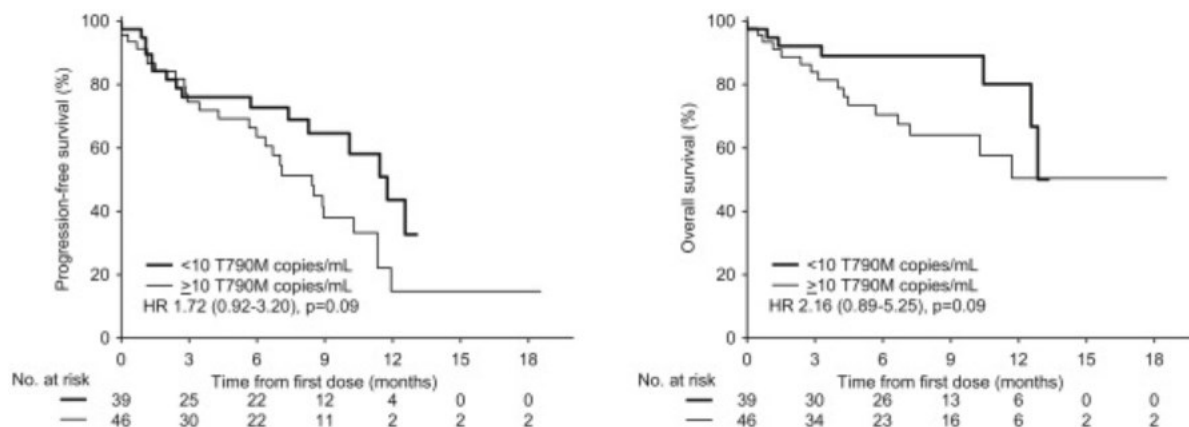


Abbildung 19: In der Studie Buder et al. zeigten Patienten mit niedriger Kopienzahl im Plasma ein höheres PFS und OS als Patienten mit höherer T790M Kopienzahl (36).

Demnach zeigten Patienten, bei welchen frühzeitig eine T790M Mutation (< 10 Kopien/ml) nachgewiesen werden konnte, einen besseren Outcome als Patienten mit einer höheren T790M Kopienzahl (36). Ob dies aufgrund der frühzeitigen Erkennung der Tumorprogression oder aufgrund eines besseren Ansprechens auf Osimertinib zurückzuführen ist, lässt sich jedoch nicht erkennen. Weitere Studien diesbezüglich werden daher empfohlen (36).

Wie oben beschrieben können mit dem ctReveal NGS Assay bei einer Mindestabdeckung von 2128 Reads in **80% der Fälle** 0,5% mutierte T790M Allele nachgewiesen werden. Das entspricht einem Detektionslimit von 11 Kopien/5ml Plasma oder 2 Kopien/ml Plasma. Zum Vergleich erreicht der von der FDA zugelassene cobas® EGFR Mutation Test v2 laut Hersteller ein Detektionslimit von 100 Kopien/ml (54). Die ddPCR ist die sensitivste Methode zum Nachweis von Mutationen aus cfDNA. Zhu et al. berichtete über eine Nachweisgrenze der ddPCR von 0,04% (1:2500). Demnach kann mit ddPCR ein einziges T790M Allel bei einem Hintergrund von 2500 Wildtyp-Allelen zuverlässig nachgewiesen werden (55).

Zusammenfassend kann durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden, dass der ctReveal NGS Assay zum Therapiemonitoring von NSCLC unter TKI Therapie verwendet werden kann. Der NGS Assay zeigte im Vergleich mit der ddPCR zwar eine etwas geringere Sensitivität bei der T790M Mutation aber eine vergleichbare Sensitivität bei den Exon 19 Deletionen und der L858R Mutation. Zudem bietet NGS den Vorteil, dass gleichzeitig auch andere ursächliche Mutationen oder Resistenzmutationen gefunden werden können. Daher kann der Assay auch bei der initialen Suche nach *EGFR* Mutationen und anderen prädiktiven Markern eingesetzt werden, wenn kein oder zu wenig Gewebematerial nach der Erstdiagnose vorhanden ist.

In der klinischen Routine würde der Einsatz beider Methoden, NGS und ddPCR den größten Vorteil bringen. Einerseits bietet die ddPCR eine hohe Sensitivität, wenn gezielt nach bestimmten Mutationen gesucht wird, andererseits könnten mit NGS weitere Resistenzmechanismen gefunden werden.

5. Literatur

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2):69–90. doi: 10.3322/caac.20107.
2. Barta JA, Powell CA, Wisnivesky JP. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann Glob Health* 2019; 85(1). doi: 10.5334/aogh.2419.
3. Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, Yatabe Y, Austin JHM, Beasley MB et al. The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *J Thorac Oncol* 2015; 10(9):1243–60. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.
4. Onkologie L. S3-Leitlinie Lungenkarzinom [Stand: 03.07.2020]. Verfügbar unter: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-007OL_I_S3_Lungenkarzinom_2018-03.pdf.
5. Luftröhre, Bronchien, Lunge; 2020 [Stand: 07.03.2020]. Verfügbar unter: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/menschen_und_gesellschaft/gesundheit/krebserkrankungen/luftroehre_bronchien_lunge/index.html.
6. Dong J, Li B, Lin D, Zhou Q, Huang D. Advances in Targeted Therapy and Immunotherapy for Non-small Cell Lung Cancer Based on Accurate Molecular Typing. *Front Pharmacol* 2019; 10:230. doi: 10.3389/fphar.2019.00230.

7. Nagasaka M, Gadgeel SM. Role of chemotherapy and targeted therapy in early-stage non-small cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 2018; 18(1):63–70. doi: 10.1080/14737140.2018.1409624.
8. Peters S, Camidge DR, Shaw AT, Gadgeel S, Ahn JS, Kim D-W et al. Alectinib versus Crizotinib in Untreated ALK-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 377(9):829–38. doi: 10.1056/NEJMoa1704795.
9. Mok TS, Wu Y-L, Ahn M-J, Garassino MC, Kim HR, Ramalingam SS et al. Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376(7):629–40. doi: 10.1056/NEJMoa1612674.
10. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology; 2020 [Stand: 03.08.2020]. Verfügbar unter:
https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#site.
11. Midha A, Dearden S, McCormack R. EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res* 2015; 5(9):2892–911.
12. Kumar A, Petri ET, Halmos B, Boggon TJ. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26(10):1742–51. doi: 10.1200/JCO.2007.12.1178.
13. Gazdar AF. Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 2009; 28 Suppl 1:S24–31. doi: 10.1038/onc.2009.198.
14. Fukuoka M, Wu Y-L, Thongprasert S, Sunpaweravong P, Leong S-S, Sriuranpong V et al. Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III, randomized, open-label, first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung cancer in Asia (IPASS). *J Clin Oncol* 2011; 29(21):2866–74. doi: 10.1200/JCO.2010.33.4235.
15. Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Tan EH, Hirsh V, Thongprasert S et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2005; 353(2):123–32. doi: 10.1056/NEJMoa050753.
16. Thatcher N, Chang A, Parikh P, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, Pawel J von et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *The Lancet* 2005; 366(9496):1527–37. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67625-8.
17. Mok TS, Wu Y-L, Thongprasert S, Yang C-H, Chu D-T, Saijo N et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 2009; 361(10):947–57. doi: 10.1056/NEJMoa0810699.
18. Pirker R. What is the best strategy for targeting EGF receptors in non-small-cell lung cancer? *Future Oncol* 2015; 11(1):153–67. doi: 10.2217/fon.14.178.
19. Cortot AB, Jänne PA. Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *Eur Respir Rev* 2014; 23(133):356–66. doi: 10.1183/09059180.00004614.

20. Planchard D, Popat S, Kerr K, Novello S, Smit EF, Faivre-Finn C et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2018; 29(Suppl 4):iv192-iv237. doi: 10.1093/annonc/mdy275.
21. Ahsan A. Mechanisms of Resistance to EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors and Therapeutic Approaches: An Update. *Adv Exp Med Biol* 2016; 893:137–53. doi: 10.1007/978-3-319-24223-1_7.
22. Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(3):169–81. doi: 10.1038/nrc2088.
23. Santoni-Rugiu E, Melchior LC, Urbanska EM, Jakobsen JN, Stricker K de, Grauslund M et al. Intrinsic resistance to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitors in EGFR-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer: Differences and Similarities with Acquired Resistance. *Cancers (Basel)* 2019; 11(7). doi: 10.3390/cancers11070923.
24. Tan C-S, Gilligan D, Pacey S. Treatment approaches for EGFR-inhibitor-resistant patients with non-small-cell lung cancer. *The Lancet Oncology* 2015; 16(9):e447-e459. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00246-6.
25. Roche Diagnostics Deutschland GmbH. cobas® EGFR Mutation Test v2 - Diagnostics: Lorenz IT-Dienstleistungen Ltd. & Co. KG; 2020 [Stand: 06.11.2020]. Verfügbar unter: <https://www.roche.de/diagnostics/tests-parameter/molekulare-diagnostik/cobas-egfr-mutation-test.html#Tests-Parameter>.
26. Little S. Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations. *Curr Protoc Hum Genet* 2001; Chapter 9:Unit 9.8. doi: 10.1002/0471142905.hg0908s07.
27. Gao J, Wu H, Shi X, Huo Z, Zhang J, Liang Z. Comparison of Next-Generation Sequencing, Quantitative PCR, and Sanger Sequencing for Mutation Profiling of EGFR, KRAS, PIK3CA and BRAF in Clinical Lung Tumors. *Clin Lab* 2016; 62(4):689–96. doi: 10.7754/clin.lab.2015.150837.
28. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:251364. doi: 10.1155/2012/251364.
29. Samorodnitsky E, Jewell BM, Hagopian R, Miya J, Wing MR, Lyon E et al. Evaluation of Hybridization Capture Versus Amplicon-Based Methods for Whole-Exome Sequencing. *Hum Mutat* 2015; 36(9):903–14. doi: 10.1002/humu.22825.
30. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 2018; 122(1):e59. doi: 10.1002/cpmb.59.
31. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet* 2019; 20(2):71–88. doi: 10.1038/s41576-018-0071-5.

32. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol* 2013; 10(8):472–84. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.110.
33. Chen Y-L, Lin C-C, Yang S-C, Chen W-L, Chen J-R, Hou Y-H et al. Five Technologies for Detecting the EGFR T790M Mutation in the Circulating Cell-Free DNA of Patients With Non-small Cell Lung Cancer: A Comparison. *Front Oncol* 2019; 9:631. doi: 10.3389/fonc.2019.00631.
34. Sen S, Datto M, Rapisardo S. Emerging Concepts in Liquid Biopsy. *Advances in Molecular Pathology* 2018; 1(1):183–91. doi: 10.1016/j.yamp.2018.07.009.
35. Gürtler P, Gerdes L. Digitale Polymerasekettenreaktion (dPCR). *Biospektrum* 2014; 20(6):632–5. doi: 10.1007/s12268-014-0498-y.
36. Buder A, Hochmair MJ, Schwab S, Bundalo T, Schenk P, Errhalt P et al. Cell-Free Plasma DNA-Guided Treatment With Osimertinib in Patients With Advanced EGFR-Mutated NSCLC. *J Thorac Oncol* 2018; 13(6):821–30. doi: 10.1016/j.jtho.2018.02.014.
37. ps-seracare-seraseq-ctdna-complete-fnl-web [Stand: 11.10.2019]. Verfügbar unter: <https://d-markbio.com/image/catalog/SeraCare/ps-seracare-seraseq-ctdna-complete-fnl-web.pdf>.
38. pr-0710-0673-seraseq-ctdna-complete-rm-af0.1-10346909 [Stand: 11.10.2019]. Verfügbar unter: <https://www.seracare.com/globalassets/seracare-resources/pr-0710-0673-seraseq-ctdna-complete-rm-af0.1-10346909.pdf>.
39. pr-0710-0672-seraseq-ctdna-complete-rm-af0.5-10346908 [Stand: 11.10.2019]. Verfügbar unter: <https://www.seracare.com/globalassets/seracare-resources/pr-0710-0672-seraseq-ctdna-complete-rm-af0.5-10346908.pdf>.
40. Liquid Biopsy Tests | ArcherDX; 2020 [Stand: 05.03.2020]. Verfügbar unter: <https://archerdx.com/liquidplex/>.
41. Lee J, Manoj N, Haimes J, Mishkin S, Griffin L, Elmore S et al. Anchored Multiplex PCR Enables Sensitive and Specific Detection of Variants in Circulating Tumor DNA by Next-Generation Sequencing. *Cancer Genetics* 2017; 214-215:47. doi: 10.1016/j.cancergen.2017.04.049.
42. Nathan V. LA090.A Archer® Reveal ctDNA™ Protocol for Illumina® [Stand: 01.11.2019]. Verfügbar unter: <https://cdn2.hubspot.net/hubfs/4445440/Protocols/LA090.A%20Protocol,%20Archer%20Reveal%20ctDNA%20Kit%20for%20Illumina.pdf>.
43. Archer-molecular-barcode-Tech-Note-APM028A.pdf
 __hstc=251652889.4a46df1df4428f5df3fe57b46281b16b.1569953042264.1572632587229.1572638706546.8&__hssc=251652889.1 [Stand: 01.11.2019]. Verfügbar unter: https://cdn2.hubspot.net/hubfs/4445440/Tech%20notes/Archer-molecular-barcode-Tech-Note-APM028A.pdf?__hstc=251652889.4a46df1df4428f5df3fe57b46281b16b.1569953042264.1572632587229.1572638706546.8&__hssc=251652889.1.1572638706546.

44. 95% MDAF noise modeling [Stand: 01.11.2019]. Verfügbar unter:
https://news.archerdx.com/hubfs/Tech%20notes/Technote:%2095%20MDAF%20noise%20modeling,%20APM059.A.pdf?__hstc=251652889.4a46df1df4428f5df3fe57b46281b16b.1569953042264.1572638706546.1572642820098.9&__hssc=251652889.1.1572642820098.
45. Illumina. MiniSeq System Denature and Dilute Libraries Guide (1000000002697) [Stand: 01.12.2019]. Verfügbar unter:
https://emea.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/miniseq/miniseq-denature-dilute-guide-1000000002697-07.pdf.
46. Adapter trimming: Why are adapter sequences trimmed from only the 3' ends of reads? [Stand: 07.12.2019]. Verfügbar unter:
<https://emea.support.illumina.com/bulletins/2016/04/adapter-trimming-why-are-adapter-sequences-trimmed-from-only-the--ends-of-reads.html?langsel=/at/>.
47. Microsoft Word -
 CS001.C_Archer_Analysis_6.0_User_Manual_KV_DRAFT(HP2).docx.
48. Buder A, Setinek U, Hochmair MJ, Schwab S, Kirchbacher K, Keck A et al. EGFR Mutations in Cell-free Plasma DNA from Patients with Advanced Lung Adenocarcinoma: Improved Detection by Droplet Digital PCR. *Target Oncol* 2019; 14(2):197–203 [Stand: 11.10.2019]. Verfügbar unter:
<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs11523-019-00623-x.pdf>.
49. Zhang Y, Xu Y, Zhong W, Zhao J, Chen M, Zhang L et al. Total DNA input is a crucial determinant of the sensitivity of plasma cell-free DNA EGFR mutation detection using droplet digital PCR. *Oncotarget* 2017; 8(4):5861–73. doi: 10.18632/oncotarget.14390.
50. Yu HA, Arcila ME, Rekhtman N, Sima CS, Zakowski MF, Pao W et al. Analysis of tumor specimens at the time of acquired resistance to EGFR-TKI therapy in 155 patients with EGFR-mutant lung cancers. *Clin Cancer Res* 2013; 19(8):2240–7. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
51. Belchis DA, Tseng L-H, Gniadek T, Haley L, Lokhandwala P, Illei P et al. Heterogeneity of resistance mutations detectable by nextgeneration sequencing in TKI-treated lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016; 7(29):45237–48. doi: 10.18632/oncotarget.9931.
52. Vollbrecht C, Lehmann A, Lenze D, Hummel M. Validation and comparison of two NGS assays for the detection of EGFR T790M resistance mutation in liquid biopsies of NSCLC patients. *Oncotarget* 2018; 9(26):18529–39. doi: 10.18632/oncotarget.24908.
53. Johansson G, Andersson D, Filges S, Li J, Muth A, Godfrey TE et al. Considerations and quality controls when analyzing cell-free tumor DNA. *Biomol Detect Quantif* 2019; 17:100078. doi: 10.1016/j.bdq.2018.12.003.
54. Setinek U. Analyse der zellfreien zirkulierenden Tumor DNA bei Patienten mit EGFR – mutiertem, nicht kleinzelligem Lungenkarzinom unter Tyrosinkinaseinhibitor Therapie [Masterarbeit]; 2017.

55. Zhu G, Ye X, Dong Z, Lu YC, Sun Y, Liu Y et al. Highly Sensitive Droplet Digital PCR Method for Detection of EGFR-Activating Mutations in Plasma Cell-Free DNA from Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Mol Diagn* 2015; 17(3):265–72. doi: 10.1016/j.jmoldx.2015.01.004.