UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Tumorbiologie

Prof. Klaus Pantel

Detektion Zirkulierender Tumorzellen mittels EGFR und HER3 in Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Heather Theresa Scharpenseel aus Köln

Hamburg 2020

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: **05.08.2021**

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christoffer Gebhardt

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher

Inhaltsverzeichnis

| 1. Zusammenfassung der Publikationsschrift | |
|--|------------|
| 1.1. Einleitung | S. 1 - 3 |
| 1.2. Material und Methoden | S. 3 – 6 |
| 1.3. Ergebnisse | S. 6 – 7 |
| 1.4. Diskussion | S. 8 - 9 |
| 2. Literaturverzeichnis | S. 10 - 12 |
| 3. Zusammenfassung | S. 13 |
| 4. Erklärung des Eigenanteiles | S. 14 |
| 5. Danksagung | S. 15 |
| 6. Lebenslauf | S. 16 |
| 7. Eidesstattliche Erklärung | S. 17 |

Anhang: Artikel in gedruckter Orginalversion

1.1. Einleitung

Die Arbeit umfasst die Etablierung einer neuen Methode zur Isolierung zirkulierender Tumorzellen (CTC) im Blut von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC). Diese können hier als Liquid Biopsy (Flüssigbiopsie) dienen, die der Feinnadelbiopsie als Alternative bzw. ergänzend dient. Zum einen ist sie als nicht-invasive Methode risikoärmer, da eine Anästhesie obsolet wird und Stichkanalmetastasen vermieden (Sawabata et al. 2000). Zum anderen spiegeln sie die große genetische Heterogenität des Karzinoms wieder, da im primären Tumorgewebe sowie den Metastasen verschiedene genetische Subtypen vorherrschen (vgl. Schmid et al. 2009). Diese Tumorheterogenität macht das NSCLC enorm interessant für Ansätze der personalisierten Medizin, welche zielgerichtete Therapien wie niedermolekulare Inhibitoren und Antikörper umfasst, die bestimmte genetische Aberrationen eines Tumors angreifen. Dieses Jahr werden in Deutschland etwa 50000 Männer und Frauen an Lungenkrebs erkranken, wovon ca. 85% in die pathologische Untergruppe des nicht-kleinzelligen Karzinoms fallen und wiederrum 80% im bereits metastasierten, also nicht-operablen. Status diagnostiziert werden (vgl. Griesinger et al. 2019). Personalisierte Ansätze, wie Tyrosinkinase-Inhibitoren gegen bestimmte Mutationen, sind neben der Chemotherapie deshalb im Fokus akademischer und industrieller Forschung. Leider entwickelt ein Großteil der Patienten durch weitere Mutationen Resistenzen gegen diese zielgerichteten Therapeutika, welche einer Umstellung bedarf. Valide Biomarker, die serielle Informationen bieten und Resistenzmutationen detektieren, ggf. bereits vor dem klinischen Progress, haben einen äußerst bedeutenden Effekt auf individuelle Therapieentscheidungen (vgl. Joosse und Pantel 2016). Die Liquid Biopsy, die den blutbasierten Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen (CTCs), Fragmenten von freier Tumor DNA (cfDNA), microRNA und Exosomen beinhaltet, könnte genau dies liefern (vgl. Levy et al 2016). Neben den Fortschritten in der translationalen Medizin, kann in der Erforschung zirkulierender Tumorzellen Wissen über wichtige Grundlagen der Tumorbiologie erlangt werden.

In der oben genannte Tumorheterogenität des NSCLC liegt auch die Herausforderung für die Detektion zirkulierender Tumorzellen dieser Krebsidentität begründet (vgl. De Bruin et al. 2014). Die Detektionsraten mittels des etablierten und meistverwendeten Detektionssystem CellSearch, welche ausschließlich den epithelialen Marker EpCam nutzt, sind weiterhin sehr gering in NSCLC, wodurch die Sensitivität des Assays stark eingeschränkt ist (vgl. Manicone et al. 2017, Hanssen et al. 2015). Der so genannte epithelial-mesenchymaler Übergang (EMT) der Krebszellen im Übergang zum Blutkreislauf führt zu einer Herunterregulierung von EpCam der einzelnen Tumorzelle im Blut (vgl.

Bednarz-Knoll et al. 2014; Gorges et al. 2012; Thiery 2002). So verfolgten wir die Hypothese, dass eine Verwendung mehrerer Oberflächenmoleküle, die spezifisch für das Tumorgewebe sind, die CTC-Isolierung verbessern könnte.

Um diese Hypothese zu untersuchen wählten wir die Oberflächenmarker der Familie der "Epidermal Growth Factor" (ERBB)-Rezeptoren. Diese Rezeptor-Tyrosinkinasen sind von großer biologischer und klinischer Bedeutung für NSCLC. Etwa 15% der kaukasischen Patienten mit Lungenkarzinom tragen eine aktivierende Mutation des EGF-Rezeptors (EGFR) (vgl. Tokumo et al. 2002), welche mit verschiedenen niedermolekularen Inhibitoren (Tyrosinkinase-Inhibitoren) behandelt werden können (vgl. Paz-Ares et al. 2010). Viele der Resistenzmechanismen gegen die Erstlinientherapie sind in ihrer genetischen Grundlage identifiziert. Es ist heute bereits möglich einige dieser Sekundärmutationen mit einer weiteren Generation der Inhibitoren zu behandeln, was eine frühe Testung auf Resistenzen voraussetzt. Eine frühe und häufige Testung macht wiederum die Liquid Biopsy möglich. Als weiteren Marker konzentrierten wir uns auf HER3, auch ERBB3 genannt, dessen Hochregulation in Tumorzellen als ein Mechanismus identifiziert wurde, die die EGFR-Resistenz antreibt (vgl. Wang et al. 2015; Yonesaka et al. 2016).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass primäres Tumorgewebe von Lungenkrebs eine Überexpression von EGFR und HER3 auf Proteinniveau aufweisen (vgl. Berghoff et al. 2015; Sharma et al. 2007). Über die Expression im metastasierenden Gewebe ist weniger bekannt (Berghoff et al. 2015; Li et al. 2016). Für eine weitere Eingrenzung der oben genannten Oberflächenmoleküle als potenzielle Marker zur CTC-Isolierung hat Dr. A. Hanssen EGFR- und HER3-Expression in primärem und metastasiertem NSCLC-Tumorgewebe untersucht (vgl. Hanssen 2016). Eine positive (mittlere oder starke) Färbung für EGFR wurde bei 52,3% der Primärtumore, 40,0% der Lymphknotenmetastasen und 62,7% der Hirnmetastasen beobachtet. Der Anteil der Tumore mit starker EGFR-Expression stieg von 18,2% bei Primärtumoren auf 29,4% bei Hirnmetastasen, was auf eine Hochregulation von EGFR im metastasierenden Gewebe hinweist. 82,7% der Primärtumore, 86,6% der Lymphknoten und 91,2% der Hirnmetastasen waren positiv auf die HER3-Expression. Die starke HER3-Expression stieg von 9,1% bei Primärtumoren auf 35,3% bei Hirnmetastasen. Die HER3-Expression in Hirnmetastasen war signifikant mit einem oligo-metastasierten Zustand der Hirnerkrankung verbunden, d.h. dem Gehirn als einzigem metastasiertem Ort (p = 0,028; n = 31). Basierend auf den eindrücklichen Ergebnissen ihrer Arbeit haben wir eine CTC-Detektionstechnik mit diesen beiden Markern entwickelt, die in "Material und Methoden" genauer erläutert wird. Des Weiteren wollten wir feststellen, dass eine direkte Kombination mit dem EpCAM-basierten System einen signifikant größeren Anteil an CTCs bei NSCLC-Patienten erfassen kann. Als dritten Schritt zeigen wir die Möglichkeit der molekularpathologischen Analyse der gefundenen CTC exemplarisch.

1.2. Material und Methoden

Ethische Erklärung

Diese Studie wurde vom institutionellen Prüfungsausschuss der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer (PV3779) genehmigt. Die Patienten wurden zwischen September 2015 und Mai 2016 eingeschrieben und es wurde die Zustimmung aller Teilnehmer eingeholt. Alle Untersuchungen wurden nach den einschlägigen Richtlinien und Vorschriften durchgeführt.

Patienten

Wie in Scharpenseel et al (2019) beschrieben wurde für die Detektion zirkulierender Tumorzellen Blut aus einer Kohorte von 45 Patienten im fortgeschrittenen Stadium (Stadium III oder IV) bei der Erstdiagnose oder im Progress der Erkrankung entnommen. Die Patienten wurden von der Abteilung für Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplantation mit der Abteilung Pneumologie, der Abteilung für Neurochirurgie oder der Abteilung für Strahlentherapie, die alle Teil des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE, Deutschland) sind, in die Studie eingeschrieben. 15 Patienten wurden vor der Resektion von Hirnmetastasen rekrutiert. Von der gesamten Kohorte wurden 41 Patienten mit Adenokarzinom (AC) diagnostiziert, drei mit Plattenepithelkarzinom und einer mit großzelligem Karzinom. Sechs der AC-

| | | atterneeting | |
|------------|---------------------------|-----------------|------|
| | | n | % |
| Histologie | AC | 41 | 91,1 |
| | SCC | 3 | 6,7 |
| | Andere | 1 | 2,2 |
| Geschlecht | weiblich | 20 | 44,4 |
| | männlich | 25 | 55,6 |
| Alter | Durchschnitt (Bereich) | 63 (41 - 85) | |
| UICC | | | |
| Stadium | III | 5 | 11,1 |
| | IV | 40 | 88,9 |
| Metastasen | Oligo | 14 | 31,1 |
| | Multipel | 27 | 60,0 |
| | M0 | 4 | 8,89 |
| Mutations | | | |
| Status | EGFR mut | 7 | 15,6 |
| | Wildtyp | 30 | 66,7 |
| | n.a. | 8 | 17,8 |

Tabelle 1. Klinische Merkmale der Patientenkohorte

Patienten erhielten eine Anti-EGFR-Therapie. Genauere Angaben zu den Patienten sind in *Tabelle 1* dargestellt. Darüber hinaus wurden 18 gesunde Spenderproben aus der Abteilung für Transfusionsmedizin (UKE) getestet. Für die HER3/EGFR CTC-Anreicherung wurden 7,5 ml Blut in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) entnommen. Die

Blutproben wurden bei Raumtemperatur gelagert. Das EDTA-Blut wurde innerhalb von sechs Stunden verarbeitet.

Etablierung des HER3/EGFR-basierten CTC-Anreicherungsverfahrens

Zunächst wurde die Spezifität verschiedener Biotin-markierter EGFR- und HER3-Antikörper, benötigt für die Durchführung einer magnetischen Zellseparation, durch Immunfluoreszenzfärbung auf zytozentrifugierten Tumorzellen aus der Zellkultur im Gemisch mit gesundem Spender-Blut geprüft. Es wurden entweder Zellen der EGFRpositiven Zelllinie MDA-MB-468 oder der HER3-positiven Zelllinie SKBR3 verwendet. Für die EGFR-basierte CTC-Anreicherung wurden drei verschiedene biotinylierte monoklonale Antikörper getestet, darunter der Klon 14C8 (Acris Antibodies, Herford, Deutschland), der Klon B1D8 und der Klon Hu1 (beide von Novus Biologicals, Littleton, Colorado). Für HER3 wurden zwei verschiedene Antikörper getestet: der biotinylierte humane Anti-HER3-Antikörper (Klon REA508; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) und der biotinylierte humane Anti-HER-3-Antikörper (Klon 1B4C3; BioLegend, San Diego, Kalifornien). Aufgrund der Intensität und Spezifität (bewiesen durch die Negativität von Leukozyten) der Färbung wurden zunächst beide HER3-Antikörperklone sowie der EGFR-Antikörperklon B1D8 von Novus Biologicals (NBP2-34553B) ausgewählt (vgl. Scharpenseel et al. 2019).

Experimente für die Etablierung eines CTC-Protokolls mittels magnetischer Beads (Magnetic Cell Seperation – MACS) wurden durchgeführt, indem Tumorzellen aus der Zellkultur in Blutproben von gesunden Spendern überführt wurden. Es wurden insgesamt 50 Zellen, entweder der SKBR3 Zelllinie (für die HER3-Isolierung) oder der MDA-MB-468-Zellen (für die EGFR-Isolierung), manuell in 4 ml Blut transfundiert. Hiernach konnte für den HER3-Antikörperklon REA509 eine Wiederfindungsrate der 50 Tumorzellen von 67% (Bereich 58-82%; n = 3) erreicht werden, verglichen mit 44% (Bereich 34-52%) bei Verwendung des HER3-Antikörperklons 1B4C3. Um das Protokoll für die EGFR-basierte Anreicherung (Klon B1D8) zu optimieren, wurden zwei Konzentrationen (1:10 und 1:15 Verdünnungen) für die Antikörperinkubation (30 min bei RT) miteinander verglichen. Hier zeigte die höhere Konzentration höhere Rückgewinnungsraten von 64% (Bereich 38-82%; n = 3) im Vergleich zu 34% (Bereich 26-41%; n = 3). Nach Anwendungen des Protokolls an 30 Patientenproben wurde jeweils eine Kontrolle durchgeführt, wobei für den HER3-Antikörperklon REA509 Wiederfindungsraten der von 29 der 50 Tumorzellen (58%, n=1) erreicht wurde und für den EGFR-Antikörperklon B1D8 33 der 50 Tumorzellen aus dem gesunden Blut zurückgewonnen wurden (66%, n=1).

CTC-Isolierung durch magnetische Zelltrennung

Wie in Scharpenseel et al. (2019) beschrieben, führten wir die Zellseparation anhand untenstehenden Protokolls durch. Dies orientiert sich an den Angaben des Herstellers (Miltenyi, Köln, Germany) und Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe (vgl. Hanssen 2016). Die PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell)-Zellfraktion des Patientenblutes (7,5 ml Blut) wurde mit den Leukosep-Tuben (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) angereichert. PBMCs wurden in zweigeteilt und entweder bei 4 °C für 10 Minuten (HER3-Antikörper; Miltenyi) mit einer Verdünnung von 1:11 in 100 µl Zellsuspension oder für eine Stunde bei Raumtemperatur (EGFR-Antikörper; 1:10 Verdünnung; Novus Biologicals-Antikörper in 100 µl Zellsuspension) inkubiert. Im Anschluss wurden die PBMCs mit MACS Running Buffer gewaschen, gefolgt von einer 15-minütigen Inkubation mit 10 µl Streptavidin-beschichteten Beads (beide Miltenyi) pro 1 x 10⁷ Zellen für den HER3 und 20 µl für 30 min für EGFR. Eine unspezifische Bindung von Magnetpartikeln wurde mit dem Trennpuffer weggewaschen und die Zellsuspension auf eine magnetische Säule (Miltenyi) aufgebracht. Nach dreimaligem Waschen mit 500 µl Trennpuffer wurden die magnetisch markierten Zellen schließlich auf zwei Glasträger gespült, zentrifugiert und über Nacht getrocknet. Die Objektträger wurden innerhalb von 3 Tagen immunfluoreszierend gefärbt. Die Zellen wurden 10 Minuten lang mit 4% PFA fixiert, mit PBS gewaschen und in 10% AB-Serum blockiert. Der Antikörpercocktail wurde 45 Minuten lang bei Raumtemperatur appliziert. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit dem Pan-Keratin-Antikörper (AE1AE3 eFluor570; 1:80; eBioScience, San Diego, Kalifornien) als CTC und CD45 (CD45-Alexa647; 1:150; Biolegend) als Leukozytenmarker. Hierzu wurde DAPI als Kernfarbstoff eingesetzt (1:500; Sigma).

Statistische Auswertung

Assoziationen zwischen CTC-Status und klinischen Merkmalen wurden durch Chi-Square, zweiseitigen Fisher's exact test und Kaplan-Meier-Analyse gemäß dem Logrank-Test mittels SPPS getestet. Die Korrelation von Cell Search und MACS-System wurde mittels Cohen-Kappa bewertet. P-Werte unter 0.05 gelten als signifikant.

Mutationsnachweis

Für den gezielten Nachweis von somatischen Mutationen in CTCs wurden diese mit einem Mikromanipulator isoliert und mittels Picoplex[™] WGA Single Cell Whole Genome Amplification Kit (Rubicon Genomics, Ann Arbor, Michigan) oder dem Amplil Kit (Silicon Biosystems) amplifiziert. Für diese sowie entsprechendes Gewebe haben wir die iPLEX HS-Technologie in Verbindung mit dem MALDI-TOF-basierten MassARRAY-System

(Agena Bioscience, San Diego, Kalifornien) eingesetzt. Hier wurde das Lungenpanel verwendet, das 70 Mutationen in fünf Onkogenen (BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS und PIK3CA) abdeckt, die an der Progression der Erkrankung und dem Therapieerfolg beteiligt sind. Ein mit der iPLEX HS-Chemie erzeugtes Mutationssignal kann vom MassARRAY-System bei ca. 1% VAF23 zuverlässig nachgewiesen werden.

1.3. Ergebnisse

CTC-Detektion durch magnetische Zelltrennung

Um jene CTCs zu isolieren, die diese therapeutisch relevanten Proteine exprimieren, wurde basierend auf diesen Ergebnissen die zuvor beschriebene magnetische CTC-



Abbildung 2: Detektionsraten der Methoden

Anreicherungstechnik (Magnetic Cell Seperation - MACS) mit biotinylierten Antikörpern etabliert.

Blutproben von 45 metastasierten NSCLC-Patienten und 18 gesunden Spendern (HD) wurden mit dieser MACS-basierten Technik analysiert. Die EGFR/HER3-basierte Methode war für alle Proben der gesunden Studienteilnehmer negativ. Bei 37,8% der (Karzinom-)Patienten konnten CTCs unter

Verwendung von entweder HER3- oder EGFR-Antikörpern isoliert werden (Mittelwert: 3 CTCs; Bereich: 1-21 CTCs). In einem Patienten wurden 10 große CTC-Cluster und 21 einzelne CTCs beobachtet (beispielhaft in Abb. 3).

Darüber hinaus war die EGFR/HER3-Technik bei 44% (n = 24) der Patienten mit Hirnmetastasen positiv.

In 39 parallelen Proben wurden in unserem Institut durch die AG Riethdorf CellSearch-Analysen durchgeführt und die Ergebnisse von der zwei Wissenschaftlern (SR und HW) ausgewertet. Bei 33,4% der Patienten wurden ≥1 CTCs/7,5 ml Blut und bei 22,0% ≥3 CTCs nachgewiesen. 12,8% der Patienten mit Hirnmetastasen hatten ≥1 CTC/ 7,5 ml Blut. Es konnte keine signifikante Korrelation der CTC-Positivität mit der Methode oder dem EGFR-Mutationsstatus festgestellt werden. Die Kombination beider CTC-Detektionsmethoden (≥1 CTC) ergab CTCs bei 66,7% der NSCLC-Patienten. Interessanterweise wurden bei nur vier Patienten CTCs anhand beider Methoden nachgewiesen (signifikante negative Korrelation mit Cohens kappa = -0,280).

Mutationsnachweis in CTCs

Im dritten Schritt der Studie galt es zu beweisen, dass der Ursprung der von uns identifizierten zirkulierenden Zellen tatsächlich malignes Tumorgewebe ist. Hierzu wurden wie in Scharpenseel et al (2019) beschrieben die zirkulierenden Zellen und das entsprechende primäre Tumorgewebe des Patienten, bei welchem zahlreiche zirkulierende Zellen und Cluster isoliert wurden (Abbildung 3, Patient 3), auf molekularer Ebene untersucht. Drei einzelne CTCs und ein Cluster sowie das primäre Tumorgewebe zeigte eine heterozygote Mutation für KRAS G12S. Die gleiche Mutation konnte im CTC-Cluster und in einem der CTCs nachgewiesen werden, während zwei CTCs eine niedrige Amplifikationsrate hatten und keine Mutationen nachgewiesen werden konnten. Die oben genannten Ergebnisse belegen, dass diese neue Methode weitere genomische Analysen von CTCs ermöglicht



Abbildung 3: Repräsentative Bilder (DAPI+/CD45-/CK+) einer einzelnen zirkulierenden Tumorzelle (Pat 1), einer Doublette (Pat 2) und eines Tumorzellclusters (Pat 3), die über eine Magnetzellseparation in NSCLC-Patienten isoliert wurden.

1.4. Diskussion

Zuverlässige blutbasierte Biomarker auf Basis zirkulierender Tumorzellen für die gezielte Behandlung von NSCLC-Patienten sind von großem Nutzen für die Therapieüberwachung und prognostische Bewertung. Während die Untersuchung von frei zirkulierende Tumor-DNA als Liquid Biopsy bereits in der Klinik im Rahmen der Indikationsstellung der EGFR-Tyrosinkinase-Inhibition bzw. der Therapieumstellung bei Resistenzentwicklung Anwendung findet, verbleiben Detektionsraten zirkulierender Tumorzellen und damit deren Aussagekraft zu gering (vgl. Remon et al. 2017). Der perfekte CTC-Marker würde ausschließlich Tumorzellen vor dem großen hämatopoetischen Hintergrund isolieren und sich an die Veränderung des biologischen Phänotyps der Krebszelle anpassen (Alix-Panabieres, C. und Pantel, K. 2014). Leider existiert dieser perfekte Tumormarker nicht, doch durch die Kombination von EpCAM-basierten Methoden mit EGFR- und HER3basierter Anreicherung konnten wir CTCs bei einem großen Teil der NSCLC-Patienten nachweisen. Durch die negative Korrelation der beiden verwendeten Methoden, zeigen wir außerdem erneut die große Heterogenität von zirkulierenden Tumorzellen im Blut von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom. Jedoch verblieb auch hier die Gesamtzahl isolierter Zellen klein. Daher sollte gleichzeitig neben tumorspezifischen Markern ein Ansatz verfolgt werden, der auf physikalischen Eigenschaften basiert, um die Positivitätsraten sowie die Anzahl gefundener Zellen zu erhöhen (vgl. Kuske et al. 2016).

Es bleibt unklar, welche genetische und biologische Variation die Prognose und die bestmögliche Behandlung eines Patienten bestimmt. Der Vorgang der Metastasierung, welche meist entscheidend für die Prognose ist, ist nicht vollständig verstanden, aber verschiedene CTC-Subpopulationen könnten metastatische Stellen haben, die in ihrem genetischen Profil vorprogrammiert sind (vgl. Massague und Obenauf 2016). Unsere Ergebnisse in der Kohorte der Patienten mit cerebraler Metastasierung stimmen mit unseren Daten aus der Gewebefärbung überein und unterstützt unsere These der spezifischen Beteiligung der Mitglieder der ERBB-Familie an der Bildung von Hirnmetastasen. Hier kann die *Liquid biopsy* also neben der Vermittlung von translationalem Wissen auch die Grundlagenforschung über klinische Studien erweitern. Sogar der Einsatz CTC-abgeleitete Xenografts ist möglich (vgl. Morrow et al 2016).

Die Studie zeigt, dass die von uns isolierten CTCs für eine molekulare Charakterisierung durchaus geeignet sind und die Beschreibung von falsch-positiven Epithelzellen, die beispielweise durch die Injektion während der Blutabnahme in den Blutkreislauf gelangen, ausschließt. Genetische Analysen können wichtige Informationen in der Biologie der Zirkulierenden Tumorzellen sowie der Metastasierung im Allgemeinen liefern und sind somit für die Krebstherapie relevant. Unsere Methode beinhaltet zusätzlich die Möglichkeit der Detektion von Tumorzellverbänden (Cluster). Bei einem Patienten der Kohorte wurden zahlreichen dieser Cluster und einzelnen CTCs beschrieben, die mit der EGFR/HER3basierten Anreicherung erkannt wurden. Cluster können ein bis zu 50-fach erhöhtes höheres metastatisches Potential besitzen und von pathophysiologischer Bedeutung für die Tumorausbreitung sind (vgl. Aceto et al. 2014; Gkountela et al. 2019). Leider bleibt auch die Gesamtzahl der Cluster, die isoliert werden können, zu gering, um folgereiche Aussagen über das Tumormikromilieu und potenzielle Metastasierungswege im Spezifischen zu machen.

Der Weg der CTC-Forschung beim NSCLC scheint noch weit, doch sobald die Tumorheterogenität besser verstanden ist und automatisierte Verfahren in multizentrischen Studien standardisiert, wird die *Liquid Biopsy* einen immer größeren Einfluss in der personalisierten Therapie nehmen.

2. Literaturverzeichnis

- Aceto,N., Bardia, A., Miyamoto, DT, Donaldson, MC, Wittner, BS, Spencer, JA, Yu, M., Pely, A., Engstrom, A., Zhu, H., Brannigan, BW, Kapur, R., Stott, SL, Shioda, T., Ramaswamy, S, Ting, DT, Lin, CP, Toner, M., Haber, DA, Maheswaran, S. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. Cell 158, 1110–1122 (2014)
- Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. Challenges in circulating tumour cell research. Nature reviews. Cancer 14, 623–631 (2014).
- Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. Cancer metastasis reviews 31, 673–687 (2012).
- Berghoff, AS, Magerle, M., Ilhan-Mutlu, A., Dinhof, C., Widhalm, G., Dieckman, K., Marosi, C., Wöhrer, A., Hackl, M., Zöchbauer-Müller, S., Preusser, M., Birner, P.. Frequent overexpression of ErbB–receptor family members in brain metastases of non-small cell lung cancer patients. APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 121, 1144–1152 (2013).
- Cooper, W. A., Lam, D. C., O'Toole, S. A. & Minna, J. D. Molecular biology of lung cancer. Journal of thoracic disease 5(Suppl 5), S479–490 (2013).
- De Bruin, EC, McGranahan, N., Mitter, R., Salm, M., Wedge, DC, Yates, L., Jamal-Hanjani, M., Shafi, S., Murugaesu, N., Rowan, AJ, Grönroos, E., Muhammad, MA, Horswell, S., Gerlinger, M., Varela, I., Jones, D., Marshall, J., Voet, T., Van Loo, P., Rassl, DM, Rintoul, RC, Janes, SM, Lee, SM, Forster, M., Ahmad, T., Lawrence, D., Falzon, M., Capitanio, A., Harkins, TT, Lee, CC, Tom, W., Teefe, E., Chen, SC, Begum, S., Rabinowitz, A., Phillimore, B., Spencer-Dene, B., Stamp, G., Szallasi, Z., Matthews, N., Stewart, A., Campbell, P., Swanton, C. Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. Science (New York, N.Y.) 346, 251–256 (2014).
- Gkountela, S., Castro-Giner, F., Szczerba, BM, Vetter, M., Landin, J., Scherrer, R., Krol, I., Scheidmann, MC, Beisel, C., Stirnimann, CU, Kurzeder, C., Heinzelmann-Schwarz, V., Rochlitz, C., Weber, WP, Aceto, N. Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. Cell 176, 98–112 (2019).
- Gorges, TM, Tinhofer, I., Drosch, M., Röse, L., Zollner, TM, Krahn, T., von Ahsen, O. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. BMC cancer 12, 178 (2012).
- Griesinger, F., Eberhardt, W., Früh, M., Gautschi, O., Hilbe, W. Hoffmann, H., Huber, RM, Loges, S., Pirker, R., Pöttgen, C., Pritzkuleit, R., Reck, M., Reinmuth, N., Sebastian, M., Ukena, D., Waller, C., Wolf, J., Wolf, M., Wörmann, B. (2019) Lungenkarzinom, nicht-kleinzellig (NSCLC) URL: https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/lungenkarzinom-nichtkleinzellig-nsclc/@@guideline/html/index.html [Stand: 09.12.2019, 11.15 Uhr].
- Hanssen, A. (2016) Detection and characterization of circulating tumor cells in non-small cell lung cancer. Biol. Dissertation. Universität Hamburg
- Hanssen, A., Loges, S., Pantel, K. & Wikman, H. Detection of Circulating Tumor Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. Frontiers in oncology 5, 207 (2015).
- Ignatiadis, M., Lee, M. & Jeffrey, S. S. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 21, 4786–4800 (2015).

- Ilie, M., Hofman, V., Long, E., Bordone, O., Selva, E., Washetine, K., Marquette, CH, Hofman, P. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? Annals of translational medicine 2, 107 (2014).
- Joosse, S. A., Gorges, T. M. & Pantel, K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. EMBO molecular medicine 7, 1–11 (2014).
- Joosse, S. A. & Pantel, K. Genetic traits for hematogeneous tumor cell dissemination in cancer patients. Cancer metastasis reviews 35, 41-48, doi:10.1007/s10555-016-9611-7 (2016).
- Kuske, A., Gorges, TM, Tennstedt, P., Tiebel, AK, Pompe, R., Preißer, F., Prues, S., Mazel, M., Markou, A., Lianidou, E., Peine, S., Alix-Panabières, C., Riethdorf, S., Beyer, B., Schlomm, T., Pantel, K... Improved detection of circulating tumor cells in non-metastatic high-risk prostate cancer patients. Scientific reports 6, 39736 (2016).Manicone, M., Poggiana, C., Facchinetti, A. & Zamarchi, R. Critical issues in the clinical application of liquid biopsy in non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease* 9, S1346–s1358 (2017).
- Levy, B., Hu, ZI, Cordova, KN, Close, S., Lee, K., Becker, D. Clinical Utility of Liquid Diagnostic Platforms in Non-Small Cell Lung Cancer. The oncologist 21, 1121-1130, doi:10.1634/theoncologist.2016-0082 (2016).
- Li, H., Cao, J., Zhang, X., Song, X., Wang, W., Jia, S., Li, Z., Jia, H., Cao, X., Zhou, W., Lian, J., Han, S., Yang, W., Xi, Y., Lian, S., Jing, H. Correlation between status of epidermal growth factor receptor mutation and distant metastases of lung adenocarcinoma upon initial diagnosis based on 1063 patients in China. Clinical & experimental metastasis (2016).
- Manicone, M., Poggiana, C., Facchinetti, A. & Zamarchi, R. Critical issues in the clinical application of liquid biopsy in non-small cell lung cancer. Journal of thoracic disease 9, S1346–s1358 (2017).
- Massague, J. & Obenauf, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. Nature 529, 298-306 (2016).
- Morrow, CJ, Trapani, F., Metcalf, RL, Bertolini, G., Hodgkinson, CL, Khandelwal, G., Kelly, P., Galvin, M., Carter, L., Simpson, KL, Williamson, S., Wirth, C., Simms, N., Frankliln, L., Frese, KK, Rothwell, DG, Nonaka, D., Miller, CJ, Brady, G., Blackhall, FH, Dive, C.. Tumourigenic non-small-cell lung cancer mesenchymal circulating tumour cells: a clinical case study. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, doi:10.1093/annonc/mdw122 (2016).
- Paz-Ares, L., Soulières, D., Melezínek, I., Moecks, J., Keil, L., Mok, T., Rosell, R., Klughammer, B.. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. Journal of cellular and molecular medicine 14, 51–69 (2010).
- Remon, J., Caramella, C., Jovelet, C., Lacroix, L., Lawson, A., Smalley, S., Howarth, K., Gale, D., Green, E., Plagnol, V., Rosenfeld, N., Planchard, D., Bluthgen, MV, Gazzah, A., Pannet, C., Nicotra, C., Auclin, E., Soria, JC, Besse, B. Osimertinib benefit in EGFR-mutant NSCLC patients with T790M-mutation detected by circulating tumour DNA. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO. 28(4):784-790 (2017).
- Ross, K., Pailler, E., Faugeroux, V., Taylor, M., Oulhen, M., Auger, N., Planchard, D., Soria, JC, Lindsay, CR, Besse, B., Vielh, P., Farace, F. The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer. Expert review of molecular diagnostics 15, 1605–1629 (2015).

- Sawabata, N., Ohta, M. & Maeda, H. Fine-needle aspiration cytologic technique for lung cancer has a high potential of malignant cell spread through the tract. Chest 118, 936-939 (2000).
- Scharpenseel,H., Hanssen, A., Loges, S., Mohme, M., Bernreuther, C., Peine, S., Lamszus, K., Goy, Y., Petersen, C., Westphal, M., Glatzel, M., Riethdorf, S., Pantel, K., Wikman, H. EGFR and HER3 expression in circulating tumor cells and tumor tissue from non-small cell lung cancer patients. Scientific Reports. 9(1):7406 (2019).
- Schmid, K., Oehl, N., Wrba, F., Pirker, R., Pirker, C., Filipits, M. EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 15, 4554-4560 (2009).
- Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nature reviews. Cancer 7, 169–181 (2007).
- Tadimety, A., Syed, A., Nie, Y., Long, CR, Kready, KM, Zhang JX. Liquid biopsy on chip: a paradigm shift towards the understanding of cancer metastasis. Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro 9(1):22-49 (2016).
- Thiery, JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nature reviews. Cancer 2, 442–454 (2002).
- Tokumo, M., Toyooka, S., Kiura, K., Shigematsu, H., Tomii, K., Aoe, M., Ichimura, K., Tsuda, T., Yano, M., Tsukuda, K., Tabata, M., Ueoka, H., Tanimoto, M., Date, H., Gazdar, AF, Shimizu, N.. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 11, 1167–1173 (2005).
- Torre, L. A., Siegel, R. L. & Jemal, A. Lung Cancer Statistics. Advances in experimental medicine and biology 893, 1–19 (2016).
- Wang, D. D., Ma, L., Wong, M. P., Lee, V. H. & Yan, H. Contribution of EGFR and ErbB-3 Heterodimerization to the EGFR Mutation-Induced Gefitinib- and Erlotinib-Resistance in Non-Small-Cell Lung Carcinoma Treatments. PloS one 10, e0128360 (2015).
- Yonesaka, K., Hirotani, K., Kawakami, H., Takeda, M., Kaneda, H., Sakai, K., Okamoto, I., Nishio, K., Jänne, PA, Nakagawa, K. Anti-HER3 monoclonal antibody patritumab sensitizes refractory non-small cell lung cancer to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib. Oncogene 35, 878–886 (2016).

3. Zusammenfassung (Deutsch/Englisch)

Die Arbeit umfasst die Etablierung einer neuen Methode zur Isolierung zirkulierender Tumorzellen (CTC) im Blut von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC). Diese dienen zum einen als Liquid Biopsy (Flüssigbiopsien) und können zum anderen in weiterer Forschung Aufschluss über die Tumorbiologie geben. Da die Detektionsraten mittels des etablierten CellSearch-Systems, welche den epithelialen Marker EpCam nutzt, sehr gering verbleiben, folgerten wir den positiven Nutzen mehrerer Oberflächenmarker. Die Expression auf Proteinniveau von EGFR und HER3 (ERBB-NSCLC-Gewebe mittels Immunhistochemie auf von Primärtumoren, Familie) Lymphknotenmetastasen und Hirnmetastasen zeigten signifikante Positivitätsraten in vorangegangen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe. Somit schloss sich eine Untersuchung von 45 Blutproben einer Kohorte von NSCLC-Patienten mittels Magnetischer Zellseparation unter dem Nutzen der genannten Marker im parallelen Vergleich zum CellSearch-Assay an. Die EGFR/HER3-Methode detektierte CTCs in 37.8% der Patienten, während eine Kombination mit der EpCam-basierten Methode einen signifikant höheren Anteil von 66.7% aufweist. Dies unterstreicht unsere These und liegt in der Tumorheterogenität des NSCLC begründet. Um den malignen Ursprung der Zellen zu beweisen, sowie den klinischen Nutzen unserer Methode, wurde als letzten Schritt Tumorgewebe exemplarisch erfolgreich primäres und CTCs eines Patienten molekularpathologisch untersucht.

The work includes the establishment of a new method for the isolation of circulating tumor cells (CTC) in the blood of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC). These cells serve as liquid biopsy and can also be used for further research in tumor biology. Since the detection rates using the established CellSearch system, which uses the epithelial marker EpCam, remain very low, we concluded the positive benefit of several surface markers. The expression at protein level of EGFR and HER3 (ERBB family) by immunohistochemistry on NSCLC tissues of primary tumors, lymph node metastases and brain metastases showed significant positivity rates in previous studies of our group. This was therfore followed by a study of 45 blood samples from a cohort of NSCLC patients by magnetic cell separation using the aforementioned markers in parallel to the CellSearch assay. The EGFR/HER3 method detected CTCs in 37.8% of the patients, whereas a combination with the EpCambased method showed a significantly higher proportion of 66.7%. This underlines our hypothesis and is based on the tumor heterogeneity of NSCLC. In order to prove the malignant origin of the cells as well as the clinical benefit of our method, the second step was the successful molecular analysis of primary tumor tissue and CTCs of one patient.

4. Erklärung des Eigenanteils

| Scharpenseel, | Etablierung des Protokolls, Durchführung der magnetischen | | | | |
|-----------------|---|--|--|--|--|
| Heather | Zellseparation an Patientenproben, Auswertung der Daten, | | | | |
| | Anfertigung Manuskript *geteilte Erstautorschaft | | | | |
| Hanssen, | Expressionsanalysen, Etablierung des Protokolls, Auswertung der | | | | |
| Annkathrin | Daten, Anfertigung Manuskript *geteilte Erstautorschaft | | | | |
| Loges, Sonja | Bereitstellung Patientenproben aus der Klinik für Hämatologie und | | | | |
| | Onkologie mit Abteilung Pneumologie, Universitätsklinikum Hamburg | | | | |
| | Eppendorf | | | | |
| Mohme, Malte | Bereitstellung Patientenproben aus der Klinik für Neurochirurgie, | | | | |
| | Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf | | | | |
| Bernreuther, | Bereitstellung histopathologischer Schnitte zur | | | | |
| Christian | immunhistochemischen Untersuchung | | | | |
| Peine, Sven | Bereitstellung gesundes Spenderblutes aus dem Institut für | | | | |
| | Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf | | | | |
| Lamszus, Katrin | Beratung, Bereitstellung Patientenproben aus der Klinik für | | | | |
| | Neurochirurgie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf | | | | |
| Goy, Yvonne | Bereitstellung Patientenproben aus dem Institut für Strahlentherapie, | | | | |
| | Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf | | | | |
| Petersen, | Bereitstellung Patientenproben aus dem Institut für Strahlentherapie, | | | | |
| Cordula | Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf | | | | |
| Westphal, | Bereitstellung Patientenproben aus der Klinik für Neurochirurgie, | | | | |
| Manfred | Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf | | | | |
| Glatzel, Markus | Bereitstellung histopathologischer Schnitte zur | | | | |
| | immunhistochemischen Untersuchung | | | | |
| Riethdorf, | AG Riethdorf Durchführung und Auswertung paralleler CellSearch- | | | | |
| Sabine | Analysen | | | | |
| Pantel, Klaus | Beratung, finanzielle Organisation | | | | |
| Wikman, Harriet | Durchführung und Auswertung der molekularen Analyse, | | | | |
| | Kommunikation, Betreuung, finanzielle Organisation | | | | |

5. Danksagung

Ich bin sehr dankbar für die technische Unterstützung von Cornelia Coith und Antje Andreas. Hier außerdem im Besonderen Jolanthe Kropidlowski, die auch viel mentale Unterstützung geleistet hat. Meiner Doktormutter Harriet Wikman danke ich für ihre große Expertise, ihre guten Ideen und ihre Präsenz während der gesamten Jahre. Tausend Dank an Annkathrin Hanssen für die tolle Zusammenarbeit und das Mentoring. Dem gesamten Institut für Tumorbiologie danke für die Einführung in die wissenschaftliche Welt.

Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich bei der Initiative für innovative Arzneimittel im Rahmen der Finanzhilfevereinbarung Nr. 115749, dessen Mittel sich aus dem finanziellen Beitrag des Siebten Rahmenprogramms der Europäischen Union (FP7/2007-2013-9) zusammensetzen.

6. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: H. Manuell

SCIENTIFIC REPORTS

Received: 31 October 2018 Accepted: 27 April 2019 Published online: 15 May 2019

OPEN EGFR and HER3 expression in circulating tumor cells and tumor tissue from non-small cell lung cancer patients

Heather Scharpenseel¹, Annkathrin Hanssen¹, Sonja Loges², Malte Mohme³, Christian Bernreuther⁴, Sven Peine⁵, Katrin Lamszus³, Yvonne Goy⁶, Cordula Petersen⁶, Manfred Westphal³, Markus Glatzel ⁶, Sabine Riethdorf¹, Klaus Pantel¹ & Harriet Wikman ⁶

Although clinically relevant, the detection rates of EpCAM positive CTCs in non-small cell lung cancer (NSCLC) are surprisingly low. To find new clinically informative markers for CTC detection in NSCLC, the expression of EGFR and HER3 was first analyzed in NSCLC tissue (n = 148). A positive EGFR and HER3 staining was observed in 52.3% and 82.7% of the primary tumors, and in 62.7% and 91.2% of brain metastases, respectively. Only 3.0% of the brain metastases samples were negative for both HER3 and EGFR proteins, indicating that the majority of metastases express these ERBB proteins, which were therefore chosen for CTC enrichment using magnetic cell-separation. Enrichment based on either EGFR or HER3 detected CTCs in 37.8% of the patients, while the combination of EGFR/HER3 enrichment with the EpCAM-based CellSearch technique detected a significantly higher number of 66.7% CTC-positive patients (Cohen's kappa = -0.280) which underlines the existence of different CTC subpopulations in NSCLC. The malignant origin of keratin-positive/CD45-negative CTC clusters and single CTCs detected after EGFR/HER3 based enrichment was documented by the detection of NSCLC-associated mutations. In conclusion, EGFR and HER3 expression in metastasized NSCLC patients have considerable value for CTC isolation plus multiple markers can provide a novel liquid biopsy approach.

The field of precision medicine is evolving rapidly. For non-small cell lung cancer (NSCLC), which is the most common cause of cancer-related death world wide¹, personalized strategies using targeted therapies are already of great benefit for a subset of patients harboring specific somatic aberrations. However, the occurrence of secondary mutations that drive resistance to targeted therapies, poses a big challenge in clinical oncology². In addition to the prognostic power of circulating tumor cell (CTC) analysis, CTCs could also serve as a valuable real-time tool for monitoring therapy and disease recurrence in cancer patients^{3,4}. Due to the non-invasiveness of the procedure, CTC analysis allows serial monitoring of patients and can provide information e.g. on the mutation burden from different metastatic sites⁵ or the occurrence of resistance mutations⁶. CTC detection is still challenging, especially for NSCLC patients, and numerous different CTC detection systems have been proposed⁷⁻⁹. With the most commonly used EpCAM based CTC detection systems the CTC detection rate in NSCLC patients is surprisingly low, especially when considering the aggressiveness of the disease¹⁰. The reported low CTC numbers might be caused by an epithelial-mesenchymal transition (EMT) of the cancer cells reaching the blood stream, which could entail downregulation of the epithelial marker EpCAM¹¹⁻¹³. Furthermore, the pronounced tumor heterogeneity, a characteristic of NSCLC tumor tissue, creates an additional big challenge in liquid biopsy research^{3,14}. Making use of multiple surface molecules as antigens that are specific for the tumor tissue could improve CTC isolation¹⁵.

¹Department of Tumour Biology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ²Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with section Pneumology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ³Department of Neurosurgery, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁴Department of Neuropathology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁵Institute for Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. ⁶Department of Radiotherapy, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany. Heather Scharpenseel and Annkathrin Hanssen contributed equally. Correspondence and requests for materials should be addressed to H.W. (email: h.wikman@uke.de)

| | | n | % |
|------------------|---------------|------------|------|
| Histology | AC | 41 | 91.1 |
| | SCC | 3 | 6.7 |
| | other | 1 | 2.2 |
| Gender | Female | 20 | 44.4 |
| | Male | 25 | 55.6 |
| Age | Mean (range) | 63 (41-85) | |
| UICC stage | III | 5 | 11.1 |
| | IV | 40 | 88.9 |
| Metastatic state | Oligo-met. | 14 | 31.1 |
| | Multiple met. | 27 | 60.0 |
| | M0 | 4 | 8.89 |
| Mutation status | EGFR mut. | 7 | 15.6 |
| | Wild type | 30 | 66.7 |
| | n.a. | 8 | 17.8 |

Table 1. Clinical characteristics of NSCLC patients from the MACS cohort. n.a.: data not available.

The Epidermal Growth Factor Receptor (ERBB)-family of receptor tyrosine kinases is of great biological and clinical importance in NSCLC. In tumor cells the ERBB proteins regulate proliferation, differentiation and apoptosis¹⁶. Approximately 10–15% of Caucasian lung adenocarcinoma patients and up to 40% of patients of Asian origin carry an activating mutation of the EGF-receptor (EGFR)¹⁷. These patients can efficiently be treated with different small molecule inhibitors (tyrosine kinase inhibitors) targeting EGFR¹⁸. However, most patients will eventually develop resistance against these therapies. Upregulation of HER3 expression has been found to be one of the mechanisms that drive EGFR resistance^{19,20}.

Here, we first screened the EGFR and HER3 expression in primary and metastatic NSCLC tumor tissue. Based on the results, we developed a CTC detection technique using these two markers and show that in combination with EpCAM we could capture a larger fraction of CTCs in NSCLC patients.

Materials & Methods

Ethical statement. The institutional review board of the ethical commission of the Hamburger Ärztekammer (PV3779) approved this study. Patients were enrolled between September 2015 and May 2016 and informed consent was obtained from all participants. All research was performed in accordance with relevant guidelines and regulations.

Patients. Tissue microarrays (TMA) with 55 surgical tissue specimens from histologically proven NSCLC primary tumors, 17 matched lymph node metastases and 76 non-matched lung cancer brain metastases were used for immunohistochemistry (IHC) staining of EGFR and HER3 proteins. For each patient, tissue was analyzed in duplicates with a core size of 1.0 mm. The primary tumor TMA has been described in detail before²¹. 40.0% of the samples were adenocarcinomas, 38.2% squamous cell carcinoma, and 21.8% of other subtypes. 58.2% were males and 41.8% females. 31.5% were diagnosed with stage I disease, 29.6 with stage II and 38.9 stage III. 98% of patients were current or ex-smokers and only one patient was a non-smoker (5 patients had unknown smoking status). In the brain metastases TMA (non-matched to the primary tumors), 75.4% of the samples were adenocarcinomas, 13.8% squamous cell carcinoma, and 10.8% other or unclear subtype. The average age of brain metastases diagnosis was 60.3 years (range: 32–78) and 56.6% were males and 43.4% females.

Blood was drawn from a cohort of 45 advanced stage (Stage III or IV) NSCLC patients at first diagnoses or at disease progression for CTC isolation. Patients were enrolled from the Department of Oncology, Hematology and Bone Marrow Transplantation with section Pneumology, the Department of Neurosurgery or from the Department of Radiation Therapy, all part of the University Medical Center Hamburg-Eppendorf (UKE, Germany). Fifteen patients were recruited prior to resection of brain metastases. Of the total cohort, 41 patients were diagnosed with adenocarcinoma (AC), three with squamous cell carcinoma and one with large-cell carcinoma. Six of the AC patients received anti-EGFR therapy. Patient characteristics are shown in Table 1. In addition, 18 healthy donor samples were enrolled from the Department for Transfusion Medicine (UKE). For HER3/ EGFR CTC enrichment, 7.5 ml of blood were collected in EDTA tubes (Sarstedt, Nuernbrecht, Germany) whereas CellSave tubes (Janssen Diagnostics, Raritan, New Jersey) were used for CellSearch CTC analyses. Blood samples were stored at room temperature. The EDTA blood was processed within 6 hours and the CellSave blood within 24 h.

Immunohistochemistry staining of lung primary tumor and brain metastases tissue for EGFR and HER3 protein expression. TMA slides were first baked for 1 hour at 60 °C, followed by a de-paraffinization in xylol and a decreasing ethanol series for rehydration purpose. Tissue was treated with either proteinase K (DAKO/Agilent; Santa Clara, California; EGFR) or boiled in 1 mM EDTA (HER3) for antigen unmasking. Peroxidase blocking solution or 5% goat serum in 1xTBST were used for EGFR (1:20; DAKO) or HER3 (1:250; Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts) immunostainings, respectively and both incubated overnight at 4 °C. For visualization, DAKO Envision Kit or Signal Stain Boost (Cell Signaling Technology)

was used. The tissue was counterstained with hemalaun solution for 2 seconds and dehydrated with an increasing ethanol series and a final xylol incubation step. Specimens were covered with Eukitt (ORSAtec, Bobingen, Germany) and a cover glass.

Staining of TMAs was analyzed blinded by two independent scientists (AH and HW). Both signal intensity and signal distribution were multiplied to a final value and grouped according to the final value into negative (0–0.5), intermediate (0.6–2) and strong (\geq 2) staining. Disconcordant evaluations were analyzed for a second time.

Establishment of the HER3/EGFR based CTC enrichment method. First, the specificity of different biotinylated EGFR and HER3 antibodies was tested by immunofluorescence staining on cyto-centrifuged MDA-MB-468 (EGFR) or SKBR3 (HER3) cells mixed with healthy donor PBMCs. For EGFR based CTC enrichment, three different biotinylated monoclonal antibodies were tested, including clone 14C8 (Acris Antibodies, Herford, Germany), clone B1D8 and clone Hu1 (both from Novus Biologicals, Littleton, Colorado). For HER3 we tested two different antibodies; the biotinylated human anti-HER3 antibody (clone REA508; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and the biotinylated human anti-HER-3 antibody (clone 184C3; BioLegend, San Diego, California). Cells were fixed with 4% PFA, washed with PBS and permeabilized by 0.1% Tween 20 in PBS. After another washing step the samples were blocked in 5% goat serum in PBS and incubated with the antibodies EGFR (1:50) or HER3 (1:25) for one hour at room temperature (RT). The secondary streptavidin conjugated antibody, *life technologies* (Carlsbad, California), was incubated for 45 min at RT and washed away with PBS. Cells were additionally stained for CD45 (CD45–647, 1:150; Biolegend) and DAPI (1:500; Sigma, St. Louis, Misssouri) for one hour at RT. Based on the intensity and specificity (negative leucocyte staining) of the staining we chose both the tested HER3 antibodies and the EGFR antibody clone B1D8 from Novus Biologicals (NBP2-34553B) for the establishment of a bead enrichment CTC protocol (Supplementary Information 1).

Experiments on recovery rates (Supplementary Information 2) were performed by spiking tumor cells into blood samples from healthy donors (received from the department of transfusion medicine). 50 cells of either the HER3 positive SKBR3 (for HER3 isolation) or 50 EGFR-positive MDA-MB-468 cells (for EGFR isolation) were manually spiked into 4 ml blood. For the HER3-enrichment, two different protocols were tested. The biotinylated HER3-antibody, clone REA508, was incubated at 4 °C for 10 min with PBMCs followed by 15 min incubation with the streptavidin coated magnetic beads. Second, the HER3-antibody clone 1B4C3 was incubated at room temperature for 30 min followed by 60 min magnetic bead incubation. A recovery rate of 67% (range 58-82%; n = 3) was obtained for the HER3-antibody clone REA509 compared to 44% (range 34–52%) when using the HER3-antibody clone 1B4C3. To optimize the protocol for the EGFR- based enrichment (clone B1D8), we compared two concentrations (1:10 and 1:15 dilutions) for the antibody incubation (30 min at RT). Here, the higher concentration showed higher recovery rates; of 64% (range 38-82%; n = 3) compared to 34% (range 26-41%; n = 3). To allow larger studies with multiple sites involved in patient recruitment, ensuring that newly identified CTC isolation techniques are efficient also in blood preservative tubes is of high importance. Therefore, we analyzed spiked blood samples in CellSave tubes (Janssen Diagnostics). Overnight incubation of the samples in CellSave tubes showed a significant reduction on the CTC recovery rates for the EGFR antibody (clone B1D8) with a mean recovery rate of 36% (Supplementary Information 2 C), whereas the HER3 enrichment was not influenced by the blood collection tube. Given that this was a single center study, we therefore collected all patient samples in EDTA tubes.

CTC Isolation via magnetic cell separation. The PBMC cellular fraction (7.5 ml blood) was enriched using the Leucosep tubes (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). PBMCs were divided into two parts and incubated either at 4 °C for 10 minutes (HER3 antibody; Miltenyi) with a dilution of 1:11 in 100 µl cell suspension or for one hour at room temperature (EGFR antibody; 1:10 dilution; Novus Biologicals antibody in 100 μ l cell suspension). When working with more than 1 \times 10⁷ cells, twice the volume of all indicated volumes were used. The PBMCs were then washed with MACS running buffer followed by 15 min incubation with $10\,\mu$ l streptavidin-coated beads (both Miltenyi) per 1×10^7 cells for the HER3 and $20\,\mu$ l for 30 min for EGFR. Unspecific binding of magnetic particles was washed away with the separation buffer and the cell suspension was applied on a MS Column (Miltenyi). After washing three times with 500 µl separation buffer the magnetically labeled cells were finally flushed onto two glass slides, centrifuged and dried overnight. Slides were immunofluorescent stained within 3 days. Cells were fixed with 4% PFA for 10 min, washed with PBS and blocked in 10% AB serum. The antibody cocktail was applied for 45 min at RT. Immunofluorescence staining was performed using pan-Keratin antibody (AE1AE3 eFluor570; 1:80; eBioScience, San Diego, California) as CTC and CD45 (CD45-Alexa647; 1:150; Biolegend) as leukocyte marker. DAPI was applied as nuclear dye (1:500; Sigma). 12 samples were also stained for cMET protein expression (clone: C1D2, Cell Signaling, 1:3000, overnight at 4°C; secondary antibody: anti-rabbit-alexa 488 (eBioScience, 1:1000, 60 min at RT).

CellSearch analysis. In parallel, 41 patient samples were analyzed by the CellSearch system (Silicon Biosystems, Bologna, Italy)²². The CellSearch System is a semi-automated EpCAM-based CTC enrichment technique. It enriches tumor cells of epithelial origin (EpCAM+) and allows enumeration of CTCs (CD45- and keratins 8, 18, and 19+) in whole blood.

WGA and quality control. Whole genome amplification (WGA) of single cell CK-positive/CD45-negative CTCs was performed with either the PicoplexTM WGA Single Cell Whole Genome Amplification Kit (Rubicon Genomics, Ann Arbor, Michigan) or the AmpliI Kit (Silicon Biosystems). Single cells were isolated by micromanipulation. 2μ l of Cell lysis buffer (Silicon Biosystems) was added on the cells and the lysate was stored at -80 °C until further usage. WGA was performed according to the manufacturer's instructions, and DNA products were

A)

Primary lung tumors n=51



B)

Primary lung tumors n=51



Brain metastases n=68



Figure 1. Protein expression and frequency distribution in primary and metastatic lung cancer tissue. EGFR protein immunohistochemistry (**A**) and HER3 protein immunohistochemistry (**B**) was performed on tissue microarray from primary NSCLC tumors and brain metastases. Representative strong (left), intermediate (center) and negative (right) staining are shown in 200x magnification (Zeiss Axiovision).

stored at -80 °C until downstream molecular analysis. The DNA concentration after the WGA was measured by the QubitTM fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Pinneberg, Germany). The quality of the WGA product was assessed by the Ampli1TM QC Kit (Silicon Biosystems). Cells with good quality (three or four PCR bands) were used for the next-generation sequencing (NGS) analyses.

Statistical analysis. Associations between protein expression (TMA) or CTC status and clinical characteristics were tested by chi-square, two-sided Fisher's exact test and Kaplan-Meier analysis in line with the logrank test, respectively. The correlation of the Cell Search and the MACS system were assessed using the Cohen's kappa. P-values below 0.05 were considered significant.



Figure 2. EGFR (**A**) and HER3 (**B**) expression distribution in primary lung, lymph node and brain metastatic tissue and association between HER3 protein expression in primary and clinicopathological parameters (**C**). HER3 is more frequently expressed in brain metastasis of oligo-brain metastatic patients (p = 0.028) compared to patients with other metastatic sites. HER3 expression in primary NSCLC tumors is significantly associated with a decreased time to metastatic progression (p = 0.006; log-rank test) (**D**) and decreased relapse-free survival time (p = 0.013; log-rank test) (**E**).

Mutation detection. For the targeted detection of somatic mutations in CTCs and tissue we used the iPLEX HS technology in conjunction with the MALDI-TOF based MassARRAY System (Agena Bioscience, San Diego, California). Here we used the Lung Panel covering 70 mutations in five key oncogenes (BRAF, EGFR, ERBB2, KRAS and PIK3CA) implicated in disease progression and therapy response. A mutation signal produced using iPLEX HS chemistry can be reliably detected by the MassARRAY System at about 1% VAF²³.

Results and Discussion

The prognostic value of CTC detection with the CellSearch System has already been demonstrated in many previous studies¹⁰. However, for NSCLC patients in the majority of cases CTCs are undetectable with EpCam based methods, suggesting that the sensitivity of the assay for this purpose might be too low. In this study, we analyzed whether detection sensitivity could be increased by using other surface markers for CTC capture. Our assumption was supported by previous results where we analyzed EpCAM expression in primary and metastatic NSCLC tissues²¹. Furthermore, others and we have previously shown that important tumor markers from the ERRB-family can be specifically upregulated in CTCs and metastatic tissue compared to the primary tumor^{24,25}. Therefore, we first screened the expression level of the clinically important target proteins *EGFR* and *HER3* in primary and metastatic tissue from NSCLC patients.

HER3 and EGFR protein expression. Several studies have shown that approximately 60% of lung cancer primary tumor tissue display overexpression of *EGFR* at protein level^{26–28}. In addition, *HER3* is often expressed in lung tumor tissue^{28,29}, whereas less is known about expression in metastatic tissue. Analyzing our TMA, we classified EGFR and HER3 protein expression as either negative, intermediate or strong. Evaluable results were obtained from 44 primary tumors, 15 matched lymph node metastases and 51 non-matched brain metastases. Representative staining are shown in Fig. 1A. Evaluable results for HER3 were obtained from 44 primary tumors, 15 lymph node metastases, and 68 brain metastases samples (Fig. 1B). A positive (intermediate or strong) staining for EGFR was observed in 52.3% of primary tumors, 40.0% of the lymph node metastases, and in 62.7% of brain metastases (Fig. 2A). The proportion of tumors with strong EGFR expression increased from 18.2% in primary tumors to 29.4% in brain metastases, indicating an upregulation of EGFR in metastatic tissue. Whether the higher expression levels in the brain metastases are caused by a *de novo* expression cannot be assessed as non-matched samples were analyzed. No association between EGFR expression in primary tumors and clinical status was found (data not shown). In brain metastases, a significant inverse correlation between the size of the patients' primary

A)



Figure 3. CTC positivity rates in NSCLC patients (n = 45). (**A**) Significantly higher detection rates when combining the methods in comparison to either single use CellSearch (p = 0.0023) or magnetic cell separation with EGFR/HER3 (p = 0.0109). (**B**) CTC enumeration detected by CellSearch and MACS.



Figure 4. Representative images of two Circulating Tumor Cell cluster (DAPI⁺/CD45⁻/CK⁺) isolated via magnetic cell separation with HER3-protein antibody in one NSCLC patient. Heterogeneous MET expression was found within the cluster as well as CD45-positive leukocytes.

tumors and EGFR expression was found (p = 0.009). EGFR was also linked with a more frequently detection in the brain metastases of squamous cell carcinomas (p = 0.001). 82.7% of primary tumors, 86.6% of lymph nodes and 91.2% of brain metastases were positive for HER3 expression (Fig. 2B). Strong HER3 expression increased from 9.1% in primary tumors to 35.3% in brain metastases. HER3 expression in brain metastases was significantly associated with an oligo-metastatic brain disease state, i.e. brain as the single metastatic site (p=0.028; n=31) (Fig. 2C). Survival analyses revealed a significant association of HER3 expression in primary lung tumors with a shorter time to metastatic progression (p = 0.006; n = 36) (Fig. 2D) and a shorter time of relapse-free survival (p = 0.013; n = 36) (Fig. 2E). No further associations between HER3 protein expression and clinical patient characteristics or outcome were found (data not shown). When both EGFR and HER3 staining results were combined, only three brain metastases samples (3.0%) were negative for both HER3 and EGFR proteins, indicating that the large majority of metastases express ERBB proteins. In contrast, we previously showed that 20.9% of brain metastases were negative for EpCAM expression, thus supporting our approach to include additional surface markers for CTC isolation in NSCLC²¹. Moreover, we previously showed that elevated amounts of HER3 mRNA transcripts could be detected in the blood of metastatic NSCLC patients²¹. Based on these results, the here described magnetic CTC enrichment technique was established using biotinylated antibodies to isolate CTCs that express these therapeutically relevant proteins.



Figure 5. Molecular analysis of primary lung tumor tissue (PT), corresponding circulating tumor cell cluster and three single CTCs. MassARRAY system (iPLEx Lung) shows heterozygous mutation for KRAS G12S in PT. (A) Same mutation is seen in the CTC cluster (B) and in one single CTC (C), whereas two single CTCs (D,E) show no mutation for KRAS.

CTC Detection by magnetic cell separation. For detection of different CTCs subpopulations, a two-step detection and identification protocol was established. In the first step, the CTCs were enriched out of the vast amount of PBMCs via a positive selection based on HER3 and/or EGFR protein expression. This was followed by a second step of immunofluorescence staining (pan-keratin and CD45) of the enriched cell fraction. A sample was defined as CTC positive if at least one CTC (keratin positive/CD45 negative) was detected. Blood samples from 45 metastatic NSCLC patients and 18 healthy donors (HD) were analyzed with this MACS based technique. The EGFR/HER3-based method was negative for all HD samples and positive in 37.8% of the patients (mean: 3 CTCs; range: 1–21 CTCs) (Fig. 3). In one patient 10 large CTC clusters and 21 single CTCs could be observed (Fig. 4). Furthermore, the EGFR/HER3-technique was positive in 44% (n = 24) of patients suffering from brain metastases, which is in line with our data obtained from tissue staining thus supporting the specific involvement of ERBB pathway members in brain metastasis formation. Noteworthy, we have recently shown that patients with brain metastases are less often CTC positive when analyzed by the CellSearch method³⁰. This new method shows a higher suitability when analyzing patients with brain metastases.

In addition to HER3 overexpression, also MET amplification is a known mechanism of acquired resistance against EGFR tyrosine kinase inhibitors³¹. We therefore analyzed MET expression of keratin positive CTCs in twelve patients. In five of these patients keratin positive CTCs were detected. In three patients the detected keratin-positive CTCs (1-2 CTCs) were negative for MET whereas in the fourth patient the one CTC was positive for both MET and keratins. The fifth positive case with many single CTCs and clusters had a heterogeneous MET expression in both single CTCs, as well as in the clusters (Fig. 4), indicating that MET can be neither used for CTC isolation nor as identification marker of CTC.

In 39 parallel samples CellSearch analyses were performed. In 33.4% of the patients ≥ 1 CTCs/ 7.5 ml blood was detected and in 22.0% ≥ 3 CTCs were detected. 12.8% of the patients with brain metastases had ≥ 1 CTC/ 7.5 ml blood. There was no significant correlation in CTC positivity with either method or EGFR mutation status. Combining both CTC detection methods (≥ 1 CTC) revealed CTCs in 66.7% of NSCLC patients. Interestingly, in only four patients CTCs were detected by both methods (significant negative correlation by Cohen's kappa = -0.280), underlining the vast heterogeneity of CTCs in NSCLC. Further research is needed to specifically characterize these subpopulations in order to draw a conclusion on their role in the disease and their clinical

impact on the disease and treatment course. In one AC patient with numerous clusters and single CTCs detected by EGFR/HER3 based enrichment method only two CTCs were found when analyzed with the CellSearch system. Clusters have been described to possess an up to 50-fold increased higher metastatic potential^{32,33} and are of pathophysiological relevance for tumor spread³⁴. It remains unclear which genetic and biological variation determines a patients' prognosis and the best possible treatment. The number of single CTCs and clusters isolated remain small though and further research is needed to characterize NSCLC subpopulations.

Mutation detection in CTCs. In order to prove the tumorigenic origin of CTCs detected by our new approach, we analyzed CTCs and the corresponding primary tumor tissue from the patient where numerous CTCs and clusters were isolated (Fig. 5). The success of the WGA was proven by a multiplex PCR. Based on the WGA results three single CTCs and one cluster as well as the primary tumor tissue was analyzed for 70 hot spot mutations in five genes using the MassARRAY system²³. The primary tumor tissue showed a heterozygous mutation for KRAS G12S. The same mutation could be detected in the CTC cluster and in one of the CTCs, whereas two CTCs had a low amplification yield and no mutations could be detected. The results above prove that this new method allows further genomic analyzes of CTCs and precludes description of false-positive epithelial cells.

Conclusion

In conclusion, this study demonstrates the large heterogeneity of NSCLC CTCs and thus the benefit of the use of multiple markers for both CTC enrichment and detection. By combining EpCAM enrichment with EGFR and HER3 based enrichment, CTCs can be detected in a large proportion of patients, including brain metastatic patients who were previously found to have only very few EpCAM positive CTCs²¹. We further show that the isolated CTC are suitable for downstream molecular characterization, which may provide important information in CTC biology relevant to cancer therapy. However, for the feasibility of implementation multi-centered studies further tests on using blood collection tubes with preservatives must be accomplished.

Data Availability

The datasets generated and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Torre, L. A., Siegel, R. L. & Jemal, A. Lung Cancer Statistics. Advances in experimental medicine and biology 893, 1–19, https://doi. org/10.1007/978-3-319-24223-1_1 (2016).
- Chen, Z., Fillmore, C. M., Hammerman, P. S., Kim, C. F. & Wong, K. K. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nature reviews. Cancer* 14, 535–546, https://doi.org/10.1038/nrc3775 (2014).
- Ignatiadis, M., Lee, M. & Jeffrey, S. S. Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA: Challenges and Opportunities on the Path to Clinical Utility. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 21, 4786–4800, https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-14-1190 (2015).
- Joosse, S. A., Gorges, T. M. & Pantel, K. Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells. EMBO molecular medicine 7, 1–11, https://doi.org/10.15252/emmm.201303698 (2014).
- 5. Tadimety, A. et al. Liquid biopsy on chip: a paradigm shift towards the understanding of cancer metastasis. Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro, https://doi.org/10.1039/c6ib00202a (2016).
- Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. Cancer discovery 6, 479–491, https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-15-1483 (2016).
- Ross, K. et al. The potential diagnostic power of circulating tumor cell analysis for non-small-cell lung cancer. Expert review of molecular diagnostics 15, 1605–1629, https://doi.org/10.1586/14737159.2015.1111139 (2015).
- Ilie, M. et al. Current challenges for detection of circulating tumor cells and cell-free circulating nucleic acids, and their characterization in non-small cell lung carcinoma patients. What is the best blood substrate for personalized medicine? Annals of translational medicine 2, 107, https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2014.08.11 (2014).
- 9. Manicone, M., Poggiana, C., Facchinetti, A. & Zamarchi, R. Critical issues in the clinical application of liquid biopsy in non-small cell lung cancer. *Journal of thoracic disease* **9**, S1346–s1358, https://doi.org/10.21037/jtd.2017.07.28 (2017).
- Hanssen, A., Loges, S., Pantel, K. & Wikman, H. Detection of Circulating Tumor Cells in Non-Small Cell Lung Cancer. Frontiers in oncology 5, 207, https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00207 (2015).
- Bednarz-Knoll, N., Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. Plasticity of disseminating cancer cells in patients with epithelial malignancies. Cancer metastasis reviews 31, 673–687, https://doi.org/10.1007/s10555-012-9370-z (2012).
- Thiery, J. P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews. Cancer* 2, 442–454, https://doi.org/10.1038/ nrc822 (2002).
- Gorges, T. M. et al. Circulating tumour cells escape from EpCAM-based detection due to epithelial-to-mesenchymal transition. BMC cancer 12, 178, https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-178 (2012).
- de Bruin, E. C. *et al.* Spatial and temporal diversity in genomic instability processes defines lung cancer evolution. *Science (New York, N.Y.)* 346, 251–256, https://doi.org/10.1126/science.1253462 (2014).
- Alix-Panabieres, C. & Pantel, K. Challenges in circulating tumour cell research. Nature reviews. Cancer 14, 623–631, https://doi. org/10.1038/nrc3820 (2014).
- Cooper, W. A., Lam, D. C., O'Toole, S. A. & Minna, J. D. Molecular biology of lung cancer. *Journal of thoracic disease* 5(Suppl 5), S479–490, https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.08.03 (2013).
- Tokumo, M. et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 11, 1167–1173 (2005).
- Paz-Ares, L. et al. Clinical outcomes in non-small-cell lung cancer patients with EGFR mutations: pooled analysis. Journal of cellular and molecular medicine 14, 51–69, https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00991.x (2010).
- Yonesaka, K. et al. Anti-HER3 monoclonal antibody patritumab sensitizes refractory non-small cell lung cancer to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib. Oncogene 35, 878–886, https://doi.org/10.1038/onc.2015.142 (2016).
- Wang, D. D., Ma, L., Wong, M. P., Lee, V. H. & Yan, H. Contribution of EGFR and ErbB-3 Heterodimerization to the EGFR Mutation-Induced Gefitinib- and Erlotinib-Resistance in Non-Small-Cell Lung Carcinoma Treatments. *PloS one* 10, e0128360, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128360 (2015).
- Hanssen, A. et al. Characterization of different CTC subpopulations in non-small cell lung cancer. Scientific reports 6, 28010, https:// doi.org/10.1038/srep28010 (2016).

- Riethdorf, S. et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood of patients with metastatic breast cancer: a validation study of the CellSearch system. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 13, 920–928, https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-06-1695 (2007).
- Sutton, B. C. et al. Assessment of common somatic mutations of EGFR, KRAS, BRAF, NRAS in pulmonary non-small cell carcinoma using iPLEX(R) HS, a new highly sensitive assay for the MassARRAY(R) System. PloS one 12, e0183715, https://doi.org/10.1371/ journal.pone.0183715 (2017).
- Sun, M. et al. HER family receptor abnormalities in lung cancer brain metastases and corresponding primary tumors. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research 15, 4829–4837, https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2921 (2009).
- Hohensee, I. et al. Frequent genetic alterations in EGFR- and HER2-driven pathways in breast cancer brain metastases. The American journal of pathology 183, 83–95, https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.03.023 (2013).
- Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J. & Haber, D. A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature reviews. Cancer* 7, 169–181, https://doi.org/10.1038/nrc2088 (2007).
- Chang, H. C. et al. Impact of epidermal growth factor receptor gene expression level on clinical outcomes in epidermal growth factor receptor mutant lung adenocarcinoma patients taking first-line epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors. Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine 39, https://doi.org/10.1177/1010428317695939 (2017).
- Berghoff, A. S. et al. Frequent overexpression of ErbB-receptor family members in brain metastases of non-small cell lung cancer patients. APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 121, 1144–1152, https://doi.org/10.1111/ apm.12063 (2013).
- Li, H. et al. Correlation between status of epidermal growth factor receptor mutation and distant metastases of lung adenocarcinoma upon initial diagnosis based on 1063 patients in China. Clinical & experimental metastasis, https://doi.org/10.1007/s10585-016-9822-x (2016).
- Hanssen, A. et al. Frequency of Circulating Tumor Cells (CTC) in Patients with Brain Metastases: Implications as a Risk Assessment Marker in Oligo-Metastatic Disease. Cancers (Basel) 12, https://doi.org/10.3390/cancers10120527 (2018).
- Engelman, J. A. et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science (New York, N.Y.) 316, 1039–1043, https://doi.org/10.1126/science.1141478 (2007).
- Aceto, N. et al. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. Cell 158, 1110–1122, https:// doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013 (2014).
- Liu, X. et al. Homophilic CD44 Interactions Mediate Tumor Cell Aggregation and Polyclonal Metastasis in Patient-Derived Breast Cancer Models. Cancer Discov. 9, 96–113, https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0065 (2019).
- Gkountela, S. et al. Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. Cell 176, 98–112, https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.046 (2019).

Acknowledgements

We are grateful for the technical assistance of Jolanthe Kropidlowski, Cornelia Coith and Antje Andreas (UKE). The research leading to these results has received support from the Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking under grant agreement no. 115749, resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013-9).

Author Contributions

Experiments were planned by H.W., A.H., H.S. and K.P. and performed by H.S., A.H. and S.R. Clinical samples were provided by S.L., M.M., Y.G., M.J., C.B., S.P., K.L., C.P., M.W. and M.G., H.S., A.H. and H.W. wrote the article. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-019-43678-6.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2019