

Projektantrag: Stiftung zur Förderung der Universitätsmedizin Hamburg-Eppendorf

1. Titel

Klinischer Stellenwert von zirkulierenden Tumor-assoziierten Fibroblasten - in Relation zu zirkulierenden Tumorzellen und zirkulierender Tumor-DNA - bei Patient:innen mit duktalem Adenokarzinom des Pankreas

2. Zusammenfassung

Das duktales Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) stellt die vierthäufigste krebserkrankende Todesursache in Industrienationen dar und weist eine 5-Jahresüberlebensrate über alle Stadien von unter 10% auf. Dies ist unter anderem auf das hohe Metastasierungspotential und das geringe Ansprechen auf etablierte Systemtherapien zurückzuführen [1]. Weiterhin sind zuverlässige Biomarker zur Früherkennung sowie zur Prognoseeinschätzung oder Überwachung des Therapieansprechens derzeit noch nicht verfügbar. Dies wird durch die beim PDAC häufig problematische Gewinnung von aussagekräftigen Tumorgewebeproben zusätzlich erschwert. In den letzten Jahren sind daher „liquid biopsy“ (Flüssigbiopsie, Analyse von Körperflüssigkeiten bei soliden Tumoren)-Ansätze zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Eine Schlüsselrolle in Bezug auf Krebsprogression, Metastasierungsverhalten und Therapieresistenz wird beim PDAC dem Stroma (das die Krebszellen umgebende Gewebe) zugeschrieben. Da eine ausgeprägte Stromareaktion mit einem schlechteren Gesamtüberleben korreliert, sind Tumor-assoziierte Fibroblasten (CAFs), eine das Stroma dominierende Zellpopulation, Gegenstand neuer Studien. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Signalkaskaden identifiziert, die das komplexe Zusammenspiel zwischen CAFs und Tumorzellen vermitteln. Ein tiefgreifendes Verständnis dieser zugrundeliegenden Pathomechanismen bietet auch die Basis für die Entwicklung zukünftiger zielgerichteter Therapien [2]. Über in der Blutstrombahn zirkulierende CAFs – die sich dann mittels liquid biopsy detektieren und analysieren lassen würden – sind zum aktuellen Zeitpunkt wenig Daten verfügbar, wenngleich eine Assoziation mit einer schlechteren Prognose angenommen wird. Das Ziel unserer Studie ist es, mittels Etablierung eines liquid-biopsy-Ansatzes zirkulierende CAFs bei PDAC Patient:innen zu detektieren und nachfolgend mit zirkulierenden Tumorzellen (CTCs) und zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) zu korrelieren. Weiterhin soll der Stellenwert zirkulierender CAFs als Biomarker in der Diagnostik, Prognostik und Therapieüberwachung bei Patient:innen mit PDAC evaluiert werden.

3. Stand der Forschung

Patient:innen, die an einem PDAC leiden, profitieren derzeit noch nicht von den Errungenschaften der modernen Krebsmedizin. Mit einer medianen Überlebenszeit von 12 Monaten im metastasierten Stadium und einer 5-Jahres-Überlebensrate von insgesamt nur 6-9% über alle Stadien bleibt die Prognose betroffener Patient:innen deutlich eingeschränkt [3, 4]. Die reduzierte Prognose ist unter anderem durch das Fehlen von Frühsymptomen, effektiven Screening-Tests sowie von klinisch relevanten prognostischen und prädiktiven Biomarkern bedingt. Weitere Ursachen, wie das aggressive Metastasierungsverhalten oder die Resistenz gegenüber klassischen Chemotherapien, werden unter anderem auf das die Krebszellen umgebende Stroma zurückgeführt [5]. Das Stroma wird durch sog. cancer associated fibroblasts (CAFs) dominiert, die als Hauptproduzenten der extrazellulären Matrix gelten und eine mechanische Barriere für zytotoxische Substanzen entstehen lassen [5, 6]. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der desmoplastischen Stromareaktion, gemessen an der stromalen Akkumulation von Hyaluronsäure, mit einem schlechten Gesamtüberleben korreliert [7]. An Gewebeschnitten von Patient:innen mit PDAC wurden bereits verschiedene Subtypen von CAFs identifiziert [8]. Zusätzlich spielen CAFs eine zentrale Rolle in der Interaktion zwischen Tumor-, Immun- und anderen Bindegewebszellen [9]. Funktionelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Subtypen differentiell auf das Tumorverhalten, wie Progression oder Zellinvasion einwirken und auch *immune escape*-Mechanismen beeinflussen. Weiterhin suggerieren Forschungsarbeiten eine Korrelation der Subtypen mit der Prognose erkrankter Patient:innen [10, 11]. Unklar ist hingegen gegenwärtig noch die Bedeutung von CAFs, die in die Blutbahn gelangen und CTCs begleiten. In der Literatur mehren sich die Hinweise, dass die Präsenz dieser Zellen in der Blutbahn mit einer verschlechterten Prognose bei metastasierten Tumorpatient:innen assoziiert ist [12].

Nicht-invasive liquid biopsy-Ansätze im Rahmen der molekularen Diagnostik von Tumoren haben in den vergangenen Jahren an Bedeutung gewonnen und stellen ein vielversprechendes Instrument bei der Identifikation neuer Biomarker dar. Diese Ansätze basieren überwiegend auf der Verwendung von peripheren Blutproben, die eingebunden im klinischen Alltag auch repetitiv verfügbar sind. Insbesondere beim Pankreaskarzinom wäre ein solches Vorgehen von großem Nutzen, da Tumormaterial zur molekularen Diagnostik derzeit nur durch invasive Gewebebiopsien gewonnen werden kann [13, 14]. Diese sind in Bezug auf den Primärtumor technisch kompliziert, bei metastasierten Patient:innen ist der häufig reduzierte Allgemeinzustand zusätzlich zu berücksichtigen. Die Analyse von CAFs, CTCs und zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) könnte daher künftig die Abschätzung der Tumormarklast erleichtern. *In vivo*

Untersuchungen am Mausmodell zeigten, dass bereits während der primären PDAC-Formierung CTCs detektierbar sind.

Die Tumore von PDAC-Patient:innen weisen zudem häufig spezifische genetische Veränderungen auf, die unter anderem das KRAS-Gen betreffen, welches in über 90% der Patient:innen mutiert ist [15]. Häufige Mutationen im KRAS-Gen sind G12D, G12V, G12R und Q61H [15]. Der Mutationsstatus kann anhand von Tumorgewebe, gleichzeitig aber auch mittels liquid biopsy aus einer peripheren Blutprobe zur ctDNA-Bestimmung erhoben werden [16, 17].

Das Durchführen von liquid biopsy-Verlaufsanalysen während einer Chemotherapie hat sich bereits als schneller und sensitiver hinsichtlich von Veränderungen ctDNA Mutationslast und CTCs erwiesen als Veränderungen in klassischen Bildgebungsansätzen erfassbar sind [18].

4. Vorarbeiten

Die Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf ist das führende Zentrum im norddeutschen Raum für die chirurgische Therapie von Pankreaserkrankungen. Alle Patient:innen, die chirurgisch exploriert werden, werden in einer prospektiven klinischen Datenbank erfasst. Blut sowie Tumor- und Normalgewebe werden standardmäßig nach pathologischer Untersuchung in einer hauseigenen Biobank gesammelt. Das Blut wird dabei gemäß den Standard Operating Procedures (SOPs) für die optimierte Verwendung in liquid biopsy-Ansätzen des Instituts für Tumorbiologie (ITB) verarbeitet.

Die II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde als Teil des Universitären Cancer Center Hamburgs (UCCH) im Juli 2021 erneut von der Deutschen Krebshilfe als Onkologisches Exzellenzzentrum ausgezeichnet. Kennzeichnend ist die hohe Expertise in der systemtherapeutischen Behandlung von Patient:innen mit PDAC, die auch in der Vielzahl von aktiven klinischen Studien begründet ist. Neben der engen klinischen Zusammenarbeit kooperieren beide Kliniken innerhalb einer intensiven wissenschaftlichen Kooperation im Rahmen der Hamburg Pancreatic Study Group. Diese interdisziplinäre Arbeitsgruppe besteht zudem aus Vertretern des ITB und den Disziplinen der Humangenetik, der Anatomie, der Strahlentherapie und der I. Medizinischen Klinik (Gastroenterologie).

Gemeinsam mit weiteren großen, europäischen Zentren wurden zahlreiche Publikationen mit hohen Impact-Faktoren in den vergangenen Jahren veröffentlicht, die sich unter anderem mit liquid biopsy als auch mit den Neoplasien des Pankreas befassen [19-22].

Die Bewerberin Dr. med. Christine Nitschke ist Assistenzärztin in Weiterbildung in der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf sowie Mitglied der Hamburg Pancreatic Study Group und wird durch das Clinician Scientist Programm des Mildred-Scheel-Nachwuchszentrum gefördert. Der bisherige Forschungsschwerpunkt der Bewerberin liegt auf der Untersuchung von CTCs und ctDNA beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas, sowie auf Generierung von Tumoroiden des Pankreas mit anschließenden Medikamentenscreenings. Die Bewerberin befindet sich seit Oktober 2019 in einer Vollzeit-Laborrotation am ITB in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harriet Wikman, in einer Kooperation mit 2cureX und in der allgemeinchirurgischen Arbeitsgruppe von PD Dr. Faik G. Uzunoglu. Prof. Wikman und PD Dr. Uzunoglu haben bereits acht gemeinsame Publikationen. Der Klinikdirektor der Chirurgie, Prof. JR. Izbicki und der ITB-Direktor Prof. K. Pantel haben mehr als 70 gemeinsame Publikationen und es besteht eine enge Kooperation hinsichtlich der Bereitstellung von Blutproben und klinischer Expertise für verschiedene Projekte im Zusammenhang mit liquid biopsy.

Der Bewerber Julian Götze arbeitet als Assistenzarzt an der II. Medizinischen Klinik für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit der Interaktion zwischen Krebszellen und dem Tumormikromilieu. Er erwarb vertiefte Kenntnisse über die zellautonome Kontrolle der Unfolded Protein Response (UPR) in myeloischen Zellen durch benachbarte Tumorzellen. In seiner Doktorarbeit (derzeit im Begutachtungsprozess) untersuchte er die Übertragung des endoplasmatischen Retikulum Stresses (ER-Stress) von hepatischen Krebszellen auf Kupffer Zellen. Er beherrscht Techniken, die für die tumorbiologische Forschung und insbesondere für das beschriebene Projekt relevant sind - einschließlich der Arbeit mit primären und stabilen Zelllinien sowie Methoden wie der Durchflusszytometrie. Ab Januar 2022 wird der Bewerber – freigestellt von klinischen Verpflichtungen – im Rahmen einer Laborrotation ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Harriet Wikman tätig sein. Das ITB ist eine der weltweit führenden Einrichtungen für die Analyse von liquid biopsy und hat sensitive Methoden für die Detektion von CTCs und die Charakterisierung von Blutproben der häufigen Tumorentitäten bereits etabliert [23]. Das ITB war die führende Einrichtung einer EU-Förderung gemeinsam mit 37 akademischen und industriellen Partnern (Cancer-ID). Innerhalb dieses Konsortiums wurden standardisierte Protokolle für häufige liquid biopsy-Analysen mittels zahlreicher Ringversuche geschaffen.

Dem beantragten Projekt zu Grunde liegend sind insbesondere die am ITB gesammelten Erfahrungen der Bewerberin Dr. Nitschke mit der Methodik von liquid biopsy bei PDAC. Diese umfassen die Kollektion der liquid biopsy aus peripherem und zentralem Blut, die optimale Aufarbeitung und Lagerung des Blutes mittels Isolation und Detektion von CTCs sowie die Isolation und Analyse von ctDNA aus Plasma. Bisherige, noch nicht publizierte Ergebnisse der Bewerberin Dr. Nitschke

sind ein entwickeltes Färbeprotokoll zur Detektion von CTCs (siehe Abbildung 1), mittels Parsortix™ detektierte CTCs (siehe Abbildung 2) sowie aus Plasma isolierte ctDNA. Dabei zeigt sich eine perioperative CTC-Detektionsrate von 43.9% in PDAC Patient:innen (CTCs/7,5ml Blut: Mittelwert: 2,78; Median: 1,5; [1-11]. In der Follow-Up (FUP) Analyse waren CTCs bei 54% aller Patient:innen nachweisbar und ein Nachweis zum 9-Monatszeitpunkt nach Operation war signifikant mit einem Tumorrezidiv assoziiert ($p=0,043$). KRAS Mutationen waren bei 80% der Patienten nachweisbar, und KRAS Mutationen in ctDNA ließen sich präoperativ bei 37,5% aller Patient:innen detektieren – mit einer medianen mutanten Allelfraktion von 0,15% [0,06-22,76%]. Der präoperative Nachweis von ctDNA zeigte einen signifikanten Einfluss kürzeres Rezidiv-freies Überleben nach Operation ($p=0,044$).

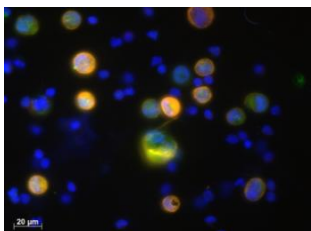


Abb. 1

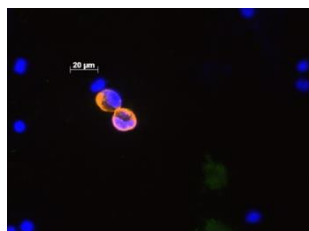


Abb. 2

Abbildung 1: Pankreastumorzellen (orange) im etablierten Färbeprotokoll

Abbildung 2: Mittels Parsortix™ aus portalvenösem Blut detektierte CTCs bei einem Patienten mit inoperablem T4 Pankreaskarzinom

5. Projektziele mit Forschungshypothese

Die zentrale Hypothese ist, dass - in Analogie zu den in der Literatur bereits charakterisierten Subpopulationen von CAFs in Gewebeproben von Pankreaskarzinomen - auch in der Blutbahn betroffener Patient:innen distinkte Subpopulationen von zirkulierenden CAFs detektierbar sind [10]. Diese Populationen der CAFs anhand ausgewählter Oberflächenmarker zu charakterisieren und ggf. in Subpopulation zu unterteilen, wird daher eine zentrale Aufgabe des vorliegenden Etablierungs-Vorhabens sein. Ein weiteres Ziel ist es, den Stellenwert von zirkulierenden CAFs als prognostisches Instrument und als prädiktive Marker zu untersuchen. Daher werden zirkulierende CAFs zusammen mit CTCs und ctDNA in einer Kohorte von $n=50$ PDAC Patient:innen in frühen und metastasierten Stadien bei Diagnosestellung sowie zu festgesetzten Zeitpunkten im weiteren Krankheitsverlauf isoliert und sowohl mit dem Krankheitsstadium als auch dem Überleben korreliert. Zudem dient die bisherige PDAC Kohorte von $n=77$ ebenfalls als Vergleichskohorte hinsichtlich CTCs und ctDNA. Ziel der Studie ist eine Etablierung der zirkulierenden CAF-Detektion in PDAC Patient:innen und die Untersuchung der Vorteile der verschiedenen liquid biopsy -Ansätze, um sie zu optimieren und zukünftig als diagnostische, prognostische und überwachende Biomarker bei PDAC klinisch einsetzen zu können.

6. Arbeitsprogramm

Patient:innenkollektiv

Als Studienkohorte dienen $n=50$ neu diagnostizierte PDAC Patient:innen aller Stadien. Der Einschluss der Patient:innen soll mit möglicher Genehmigung des Antrags ab Januar 2022 beginnen, eine Interimsanalyse soll nach 20 Patient:innen durchgeführt werden. 7,5ml EDTA-Blut-Proben zur Bestimmung und Analyse von zirkulierenden CAFs, CTCs und ctDNA werden den Patient:innen bei Diagnosestellung sowie drei-monatlich im FUP im Rahmen von peripheren Routine-Blutentnahmen entnommen. Bei dem Teilkollektiv der Patient:innen in einem metastasierten Stadium werden die Blutproben zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, alle drei Monate unter laufender Chemotherapie und bei Progress gesammelt.

Zielgrößen

Die Hauptzielgröße ist die Etablierung und die Erfassung der Detektion von zirkulierenden CAFs bei PDAC Patient:innen. Die Ergebnisse werden in Korrelation zur CTC und ctDNA Detektion sowie zu klinischen Verlaufsparemtern evaluiert. Zur statistischen Auswertung werden der Chi-Quadrat-Test, t-test und Kaplan-Meier-Kurven genutzt. Das Signifikanzniveau ist 5%.

Durchführung

Die Datenkollektion wird über die existierende, chirurgische Datenbank für Patient:innen mit Pankreasresektionen prospektiv im Einklang mit der Datenschutz-Grundverordnung (DSGVO) innerhalb einer professionellen Datenbanklösung (Ninox) durchgeführt. Die Datenbank umfasst klinisch-pathologische Eigenschaften (z.B. Alter, Geschlecht, pathologisches Ergebnis), operative Details (z.B. Dauer der Operation, Art der Operation, Blutverlust) und *Follow-Up*-Ergebnisse aller Patienten, die einer kurativen oder diagnostischen Operation zugeführt wurden. Metastasierte Patienten ohne Operation werden gesondert durch die Onkologie erfasst. Die Daten- sowie Biobank und die angestrebte Blutentnahme von peripherem Blut sind bereits durch die Ethikkommission Hamburg genehmigt (PV3548).

Zirkulierende CAFs & CTCs

Für die Detektion der zirkulierenden CAFs und CTCs nutzen wir in dieser Studie eine Antigen-unabhängige Detektionsmethode. Hierfür verwenden wir das Parsortix™ Zell-Separations-System. Dieses Gerät reichert durch Größen- und Deformierbarkeitsselektion lebensfähige Zellen an, welche für molekulare und funktionelle Analysen verwendet werden können [24]. Nach dem Aufbringen auf Objektträger werden diese mittels Biomarker gefärbt und detektierbare, epitheliale Zellen unter dem Mikroskop gepickt. Anschließend können die 20 gesammelten Zell-Proben, die am besten detektierbar waren, mittels Einzelzellanalyse zur Isolation von DNA und *Whole Genome Amplification* (WGA) amplifiziert werden [25]. *Low pass next-generation Genome Sequencing* (NGS) dient der Überprüfung des malignen Ursprungs der Zelle mittels *copy number analysis* [26].

ctDNA

Blutproben von PDAC Patient:innen werden zum Diagnosezeitpunkt, während des FUP (7,5ml EDTA-Röhrchen) bzw. unter laufender Chemotherapie und bei Progress gesammelt. Mithilfe eines bereits etablierten „double-spin“ Protokolls wird das Blutplasma isoliert. Zellfreie (cf)DNA wird durch das QIAmp Systems isoliert und daraufhin mit dem Qubit Systems (Thermo Fisher Scientific) quantifiziert [27]. Die DNA-Qualität wird mithilfe des TapeStation-Systems (agilent) überprüft [28]. Anschließend wird eine emulsionsbasierte digital droplet PCR (ddPCR), die zur Erkennung der KRAS-Hotspot Mutationen geeignet ist, mithilfe des BioRad ddPCR Cyclers durchgeführt [29].

7. Beantragte Mittel: Sach-, Personal- und Investitionsmittel

Sachmittelkosten	In Euro
Parsortix-Kassetten (á 75 Euro) 5x pro Patient:in (n=250)	25.000
Antikörper ImmunoFluoreszenz-Färbung	5.000
Einzelzellanalyse der 20 am besten detektierbaren Proben: Ampli1 WGA Kit (1400Euro), Ampli1™ LowPass Kit (1900 Euro), Qualitätskontrolle (700 Euro) und Hotspotmutationen (insgesamt 2000Euro)	4.000
ddPCR-TM Supermix	4.500
ddPCR-Mutation KRAS Screening Assay für die vier Hotspotmutationen (2x á 2.250Euro)	4.500
ES-Blastozysten-Injektions-Kapillare á 20Euro (n=50)	1.000
Plastikwaren	1.000
Gesamt	45.000
Personalkosten	In Euro
Studentische Hilfskraft auf 400€ Basis für 12 Monate	4.800
Gesamt	4.800
Gesamtkosten des beantragten Projektes	49.800

Die weiteren Personalkosten werden durch die Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie sowie durch die II. medizinische Klinik (Onkologie) gedeckt. Investitionsmittel werden nicht beantragt. Die Infrastruktur für die erfolgreiche Durchführung des Projektes ist bereits am ITB und im allgemeinchirurgischen Forschungslabor vorhanden.

8. Voraussichtliche Dauer

Der Förderzeitraum für das Projekt wird ab Januar 2022 für insgesamt zwei Jahre angesetzt.

9. Literaturverzeichnis

1. Huang L, Holtzinger A, Jagan I et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell– and patient-derived tumor organoids. *Nature Medicine* 2015; 21: 1364-1371. doi:10.1038/nm.3973
2. Wu F, Yang J, Liu J et al. Signaling pathways in cancer-associated fibroblasts and targeted therapy for cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2021; 6: 218. doi:10.1038/s41392-021-00641-0
3. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE et al. *Cancer Statistics, 2021*. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2021; 71: 7-33. doi:https://doi.org/10.3322/caac.21654
4. Conroy T, Desseigne F, Ychou M et al. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* 2011; 364: 1817-1825. doi:10.1056/NEJMoa1011923
5. Hosein AN, Brekken RA, Maitra A. Pancreatic cancer stroma: an update on therapeutic targeting strategies. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 2020; 17: 487-505. doi:10.1038/s41575-020-0300-1
6. Zhang Y, Crawford HC, Magliano MPd. Epithelial-Stromal Interactions in Pancreatic Cancer. 2019; 81: 211-233. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114515
7. Tahkola K, Ahtiainen M, Mecklin J-P et al. Stromal hyaluronan accumulation is associated with low immune response and poor prognosis in pancreatic cancer. *Sci Rep* 2021; 11: 12216. doi:10.1038/s41598-021-91796-x
8. Nielsen MFB, Mortensen MB, Detlefsen S. Typing of pancreatic cancer-associated fibroblasts identifies different subpopulations. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 4663-4678. doi:10.3748/wjg.v24.i41.4663
9. Sahai E, Astsaturou I, Cukierman E et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts. *Nature Reviews Cancer* 2020; 20: 174-186. doi:10.1038/s41568-019-0238-1
10. Norton J, Foster D, Chinta M et al. Pancreatic Cancer Associated Fibroblasts (CAF): Under-Explored Target for Pancreatic Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* 2020; 12: 1347. doi:10.3390/cancers12051347
11. Öhlund D, Handy-Santana A, Biffi G et al. Distinct populations of inflammatory fibroblasts and myofibroblasts in pancreatic cancer. *Journal of Experimental Medicine* 2017; 214: 579-596. doi:10.1084/jem.20162024
12. Ortiz-Otero N, Marshall JR, Lash B et al. Chemotherapy-induced release of circulating-tumor cells into the bloodstream in collective migration units with cancer-associated fibroblasts in metastatic cancer patients. *BMC Cancer* 2020; 20: 873. doi:10.1186/s12885-020-07376-1
13. Lee J-S, Rhee T-M, Pietrasz D et al. Circulating tumor DNA as a prognostic indicator in resectable pancreatic ductal adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports* 2019; 9: 16971. doi:10.1038/s41598-019-53271-6
14. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease – latest advances and implications for cure. *Nat Rev Clin Oncol* 2019; 16: 409-424. doi:10.1038/s41571-019-0187-3
15. Waddell N, Pajic M, Patch A-M et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature* 2015; 518: 495-501. doi:10.1038/nature14169
16. Groot VP, Mosier S, Javed AA et al. Circulating Tumor DNA as a Clinical Test in Resected Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 2019; 25: 4973. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0197
17. Ollar RA, Cooperman AM, Wayne ME et al. A Colorimetric Method for Detection of K-ras Codon 12 Point Mutations in DNA Extracted from Tissue and Peripheral Blood in Pancreatic Disorders. *Biochemical Genetics* 2010; 48: 577-589. doi:10.1007/s10528-010-9340-5
18. Lee B, Lipton L, Cohen J et al. Circulating tumor DNA as a potential marker of adjuvant chemotherapy benefit following surgery for localized pancreatic cancer. *Annals of Oncology* 2019; 30: 1472-1478. doi:https://doi.org/10.1093/annonc/mdz200
19. Pantel K, Alix-Panabières C. Liquid biopsy and minimal residual disease — latest advances and implications for cure. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2019; 16: 409-424. doi:10.1038/s41571-019-0187-3
20. Alix-Panabières C, Pantel K. Challenges in circulating tumour cell research. *Nature Reviews Cancer* 2014; 14: 623. doi:10.1038/nrc3820
21. Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends in Molecular Medicine* 2010; 16: 398-406. doi:https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.07.001
22. Effenberger KE, Schroeder C, Hanssen A et al. Improved Risk Stratification by Circulating Tumor Cell Counts in Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* 2018; 24: 2844. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0120
23. Lampignano R, Neumann MHD, Weber S et al. Multicenter Evaluation of Circulating Cell-Free DNA Extraction and Downstream Analyses for the Development of Standardized (Pre)analytical Work Flows. *Clinical Chemistry* 2019. doi:10.1373/clinchem.2019.306837: clinchem.2019.306837. doi:10.1373/clinchem.2019.306837
24. Pagliassotti MJ. Endoplasmic Reticulum Stress in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. 2012; 32: 17-33. doi:10.1146/annurev-nutr-071811-150644
25. Riebensahm C, Joosse SA, Mohme M et al. Clonality of circulating tumor cells in breast cancer brain metastasis patients. *Breast Cancer Research* 2019; 21: 101. doi:10.1186/s13058-019-1184-2
26. Berger L-A, Janning M, Velthaus J-L et al. Identification of a High-Level MET Amplification in CTCs and ctDNA of an ALK-Positive NSCLC Patient Developing Evasive Resistance to Crizotinib. *Journal of Thoracic Oncology* 2018; 13: e243-e246. doi:https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.08.2025
27. van Ziel AM, Wolzak K, Nölle A et al. No evidence for cell-to-cell transmission of the unfolded protein response in cell culture. 2020; 152: 208-220. doi:10.1111/jnc.14856
28. Li P, He K, Li J et al. The role of Kupffer cells in hepatic diseases. *Molecular Immunology* 2017; 85: 222-229. doi:https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.018
29. Demuth C, Spindler K-LG, Johansen JS et al. Measuring KRAS Mutations in Circulating Tumor DNA by Droplet Digital PCR and Next-Generation Sequencing. *Transl Oncol* 2018; 11: 1220-1224. doi:10.1016/j.tranon.2018.07.013