

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**  
**Fakultät Life Sciences**  
**Department Biotechnologie**

*Optimierung und Validierung eines neuartigen Verfahrens zur  
Detektion von methylierten Brustkrebs-Biomarkern in zirkulierender  
Tumor-DNA*

**Bachelorarbeit**

Vorgelegt von

**Eike Sören Knust**



Hamburg, Bergedorf

Am 10. August 2021

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Julien Bethune (HAW Hamburg)
- 2. Gutachter:** Dr. Alexander Sartori (Agena Bioscience GmbH)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Firma Agena Bioscience GmbH, Gasstraße 18, Haus 5, 22761 Hamburg.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>2</b>
2.1 Brustkrebs .....	2
2.2 Zirkulierende Tumor-DNA .....	4
2.3 Verwendete neue Anwendungen als Grundlage der Arbeit .....	5
2.4 Ziel der Ausarbeitung.....	6
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>7</b>
3.1 PCR Primer Adjustierung.....	7
3.2 Liquid IQ Panel zur Analyse klinischer Proben .....	14
3.3 iPlex Breast Methylation Panel v1.0 zur Untersuchung von klinischen Proben .....	15
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>19</b>
4.1 PCR Primer Adjustierung und Validierung.....	19
4.2 Voranalyse mit dem Liquid IQ.....	20
4.3 Untersuchung von klinischen Proben auf Methylierungen .....	21
<b>5 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
5.1 iPlex Pro Biochemie.....	23
5.2 MassArray System .....	25
5.3 Voranalyse von cfDNA.....	27
5.4 Breast Methylation Panel v1.0 .....	28
5.4.1. Adjustierung der PCR-Primer .....	30
<b>Danksagung .....</b>	<b>32</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>34</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>37</b>

## Abkürzungsverzeichnis

cfDNA	zirkulierende-freie DNA (engl. circulating free DNA)
ctDNA	zirkulierende Tumor DNA
CPM	Chip Prep Module
CTC	Zirkulierende Tumorzellen (engl. circulating tumor cells)
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser (engl. double distilled water)
dNTP	desoxynukleotide Triphosphate
gDNA	genomische DNA
HapMap	haplotype map
MA 4	MassArray Analyzer 4
MALDI-TOF	Matrix-assistierte Laser-Desorption/Ionisierung - Time-of-Flight
N/A	Ungültig (engl. not applicable)
NTC	Negativkontrolle (Abk. von engl. no template control)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. polymerase-chain-reaction)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
SAP	Shrimp-Alkaline-Phosphatase
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UNG	Uracil-DNA-Glycosylase
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Risikofaktoren und Prävention von Brustkrebs. ....	3
Abbildung 2: Graphische Darstellung einer Blutbahn, in die durch verschiedene Prozesse cfDNA und ctDNA gelangt sind .....	5
Abbildung 3: Graphische Darstellung des Mittelwertes mit der Abweichung am Beispiel der Marker AKR1B1 und BRCA durch ein Kastengrafikdiagramm.. ....	10
Abbildung 4: Massenspektrum des 10% Methylierungsstandards bezogen auf den Biomarker SCGB3A1_v2. ....	12
Abbildung 5: Clusterplot des Methylierungsstandards SCGB3A1_v2. ....	13
Abbildung 6: Clusterplot des Methylierungsstandards BRCA1. ....	14
Abbildung 7: Boxplot des Methylierungs-Scores der beiden Kohorten. ....	16
Abbildung 8: Boxplot des Methylierungs-Scores der beiden Kohorten. ....	17
Abbildung 9: Wiedergegeben wird die totale DNA-Menge in amplifiable copies (303 amplifiable copies entsprechen 1 ng DNA) und der Methylierungs-Score der sechs klinisch relevanten Biomarker .....	18
Abbildung 10: iPlex Pro Verfahren zur Detektion verschiedener Genotypen durch ihre Massen.....	23
Abbildung 11: MassArray System. Bestehend aus dem MassArray Analyzer 4 (MA4) und dem Chip-Prep-Module (CPM).....	25
Abbildung 12: Chip-Prep-Module Deck. Zu sehen ist die 96-Well Platte, der Siliciumchip (SpectroCHIP) und der Kalibrant.....	25
Abbildung 13: MassArray System (Ellis und Ong 2017). Die Abbildung zeigt das MALDI-TOF Massenspektrometer.....	26

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bindungsrate der einzelnen Biomarker. Die Tabelle zeigt die gemessene Bindungsrate in % für jeden der Biomarker. Die Bindungsrate beschreibt dabei den Anteil an PCR Primern, die in der PCR Reaktion gebunden wurden zur Quantifizierung. Berechnet wird der Wert indirekt über den Umsatz an Extend-Primer während der single-base-Extension Reaktion (siehe Kapitel 5.1). Nach dem ersten Lauf und dem ersten Adjustment wurden einige essenzielle Marker dem Mix vom Volumen verstärkt hinzugeführt, um die Bindungsrate zu erhöhen. Insgesamt ergeben sich die Werte aus 44 Proben, aus denen der Mittelwert für einen Biomarker errechnet wurde. Zudem wird in der Tabelle ein Mittelwert berechnet, welcher die durchschnittliche Bindungsrate aller Biomarker in einem Lauf berechnet. .... 8	8
Tabelle 2: Standardabweichung der Primer gemessen über die 3. Läufe. Die Standardabweichung gibt die Streubreite der Messwerte der Bindungsrate um den Mittelwert an. Eine niedrige Streubreite bedeutet dabei eine zuverlässigere Bindung der PCR-Primer während der Reaktion. Die Abweichung wird basierend auf den 44 Messwerten jeden Biomarkers berechnet. Weiterhin wird ein Mittelwert aller Standardabweichungen eines Laufes angegeben. .... 11	11
Tabelle 3: Genutzte Reagenzien mit Volumina des iPlex Breast Methylation Panels. Die Anwendung besteht aus fünf einzelnen Reaktionen, für die die Reagenzien mit ihrem entsprechend genutzten Volumen angegeben sind. Die Probe wird entsprechend ihrer Konzentration hinzugegeben. Hochkonzentrierte Proben werden in geringerem Volumen hinzugegeben und mit ddH <sub>2</sub> O aufgefüllt. Nach dem Proteinverdau werden 5 µL des Reaktionsproduktes entnommen und in eine neue 96-Well Platte überführt. Dort folgt die Shrimp-Alkaline Phosphatase Reaktion in geringerem Volumen. .... 29	29
Tabelle 4: Platenlayout einer 96-well Platte zur Bestimmung der Bindungsrate der PCR Primer. Gemessen werden insgesamt 44 HapMap (HM) Proben sowie Methylierungsstandards (100% - 0%) mit verschiedenen Methylierungsgraden in Triplikaten. Negativkontrollen dienen als Kontaminationskontrollen. .... 31	31

## 1 Zusammenfassung

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache auf der Welt. Bei jeder dritten Frau mit Krebsdiagnose handelt es sich um Brustkrebs. Gestellt wird die Diagnose durch eine Mammographie, ein Diagnoseverfahren, welches Brustkrebs erst in einem fortgeschrittenen Stadium erkennt. Durch eine frühzeitige Detektion von Brustkrebs können sich die Überlebenschancen deutlich erhöhen.

Um Brustkrebs frühzeitig zu erkennen, wird bei der Firma Agena Bioscience eine minimal invasive, bisulfid-freie Methode entwickelt, welche die Methylierung Brustkrebs-spezifischer Biomarker in zirkulierender tumor-DNA bestimmt. Die Methode trägt den Namen iPlex Breast Methylation Panel. Die Sensitivität dieser Anwendung für die Detektion von Methylierung ist hierfür wesentlich. Um dies zu gewährleisten, wird im Rahmen dieser Arbeit eine zentrale Komponente der Methode optimiert und validiert. Weiterhin soll die Funktionalität der Anwendung an klinischen Proben gezeigt werden. Die Studien hierzu werden im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten Projekts „Liquid biopsies and IMAGING for improved cancer care“ (LIMA) durchgeführt.

Die zu optimierende Komponente ist der PCR-Primer Mix des Breast Methylation Panels. Das Ziel ist die mengenmäßige Justierung der einzelnen PCR-Primer für eine möglichst effiziente Amplifizierung aller Biomarker in einer einzigen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR). Für die Validierung an klinischen Proben wird zunächst eine Voranalyse mit dem Liquid IQ Panel der Firma Agena Bioscience durchgeführt. Hierbei werden die Proben auf ihre Qualität sowie Quantität geprüft. Als letztes erfolgt die Messung der klinischen Proben mit dem iPlex Breast Methylation Panel. Bei den klinischen Proben handelt es sich um DNA von triple-negativen Brustkrebspatientinnen und von gesunden Probanden, die vom Institut für Tumorbologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) zur Verfügung gestellt wurden.

Es wurde die erfolgreiche Justierung sowie die Validierung eines PCR Primer Mixes zum Einsatz im iPlex Breast Methylation Panel dokumentiert. Außerdem wurden weitere Optimierungsmöglichkeiten der Methode aufgezeigt. Weiterhin wurde gezeigt, dass das iPlex Breast Methylation Panel in der Lage ist, einen signifikanten Unterschied des Methylierungsgrads zwischen Proben Gesunder und Brustkrebspatientinnen zu detektieren. Dadurch wurde ein Zusammenhang zwischen hochmethylierten Biomarkern und Brustkrebs hergestellt, wodurch eine klinische Diagnose möglich wäre.

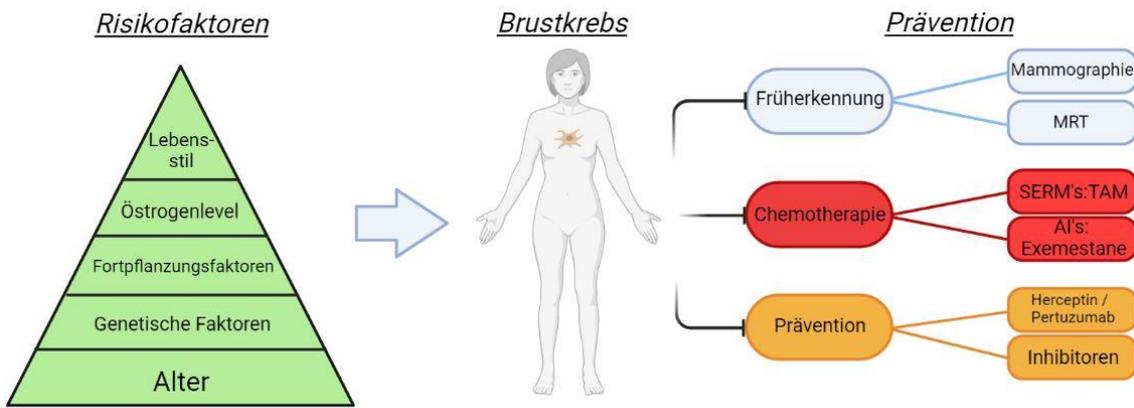
## 2 Einleitung

### 2.1 Brustkrebs

Weltweit starben im Jahr 2018 rund 9,6 Millionen Menschen an Krebs. Damit ist Krebs nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweit häufigste Todesursache und ist für jeden sechsten Todesfall weltweit verantwortlich. Krebs ist das unkontrollierte Wachstum von Zellen, deren Erbgut durch externe oder genetische Faktoren verändert worden ist. Während Männer vor allem an Lungen-, Prostata-, Darm- und Leberkrebs erkranken, betrifft Frauen vor allem Brustkrebs. Jedes Jahr werden immer mehr Krebsfälle diagnostiziert, wobei jedoch die Mortalitätsrate sinkt. Dies liegt an einer besseren Infrastruktur, sowie an immer besseren Verfahren zur frühzeitigen Erkennung von Krebs, durch die die Behandlungsmethoden angepasst werden können. (World Health Organization 2021)

Brustkrebs ist mit einem Anteil von 30% (2017) der am häufigsten auftretende Tumor bei Frauen und war für weltweit rund 570.000 Todesfälle im Jahr 2015 verantwortlich. Insgesamt erhalten pro Jahr etwa 1,5 Millionen Frauen weltweit die Diagnose Brustkrebs. Metastasenbildung in einem fortgeschrittenem Stadium in Organen wie Leber, Lunge oder Gehirn erschweren die Heilung. Wichtige Faktoren bei der Entstehung von Brustkrebs sind vor allem das Alter, der Konsum von Alkohol, die Ernährung, das Östrogenlevel und Fortpflanzungsfaktoren (Muhammad Naeem et al 2019). Zur Detektion wird die Mammographie oder seltener die Magnetresonanztomographie genutzt (s. **Abb. 1**). Brustkrebs tritt circa 100-mal häufiger bei Frauen als bei Männern auf. Zurückzuführen ist dies auf das vermehrte Vorhandensein von Brustgewebe und den höheren Anteil des Hormons Östrogen. (Sun et al. 2017)

Die Erkennung, die Behandlung und die Überlebensrate variieren weltweit stark. Während in entwickelten Ländern die Überlebensrate in den ersten fünf Jahren nach der Detektion bei 80% liegt, liegt sie in Entwicklungsländern bei 40%. Eine frühzeitige Erkennung von Brustkrebs, welche eine maßgebliche Rolle für die Behandlung und die Überlebensrate spielt, ist in Entwicklungsländern durch schlechtere Infrastruktur eingeschränkt. (Akram et al. 2017)



**Abbildung 1: Schematische Darstellung von Risikofaktoren und Prävention von Brustkrebs.** Als Risikofaktoren gelten hauptsächlich das Alter sowie genetische Faktoren, Fortpflanzungsfaktoren und das Östrogenlevel. Zur Früherkennung von Brustkrebs ist die Mammographie weit verbreitet. Die Behandlung erfolgt durch Medikamente in der Chemotherapie. Hierbei werden Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) oder Aromatasehemmer (AIs) eingesetzt. Biologische Prävention durch monoklonale Antikörper wie Herceptin werden erforscht. (Sun et al. 2017)

Je nach Größe und Typ des Tumors und wie viele Tumorzellen im Brustgewebe vorliegen wird ein Tumor in eine der fünf definierte Stadien eingeteilt. Im Stadium 0 wird von einem nicht-invasiven Stadium gesprochen, in dem krebsartige und nicht krebsartige Zellen innerhalb des Brustgewebes vorliegen. Hierbei liegt kein Indiz für eine Streuung in umliegendes Gewebe vor. Das Stadium 1 beschreibt den invasiven Brustkrebs, welcher in die zwei Unterkategorien 1A und 1B unterteilt wird. Die Kategorie 1A umfasst Tumore bis zu einer Größe von 2 cm, welche noch keine Lymphknoten befallen haben. Tumore der Kategorie 1B sind hingegen im Lymphknoten mit einer Größe von 0,2 mm vorzufinden. Ebenso wird das Stadium 2 in zwei Unterkategorien unterteilt. Während Tumore, welche kleiner als 5 cm sind und die Lymphknoten der Achselhöhle erreicht haben, in die Kategorie 2A eingeteilt werden, werden Tumore welche größer als 5 cm sind und nicht die axillären Lymphknoten erreicht haben in die Kategorie 2B eingestuft. Tumore der Kategorie 3 werden je nachdem wie viele Lymphknoten sie erreicht haben in drei Unterkategorien unterteilt. Zuletzt erreicht der Brustkrebs das Stadium 4. In diesem Stadium haben sich Metastasen in anderen Organe wie Lunge, Knochen oder Leber gebildet. (Akram et al. 2017)

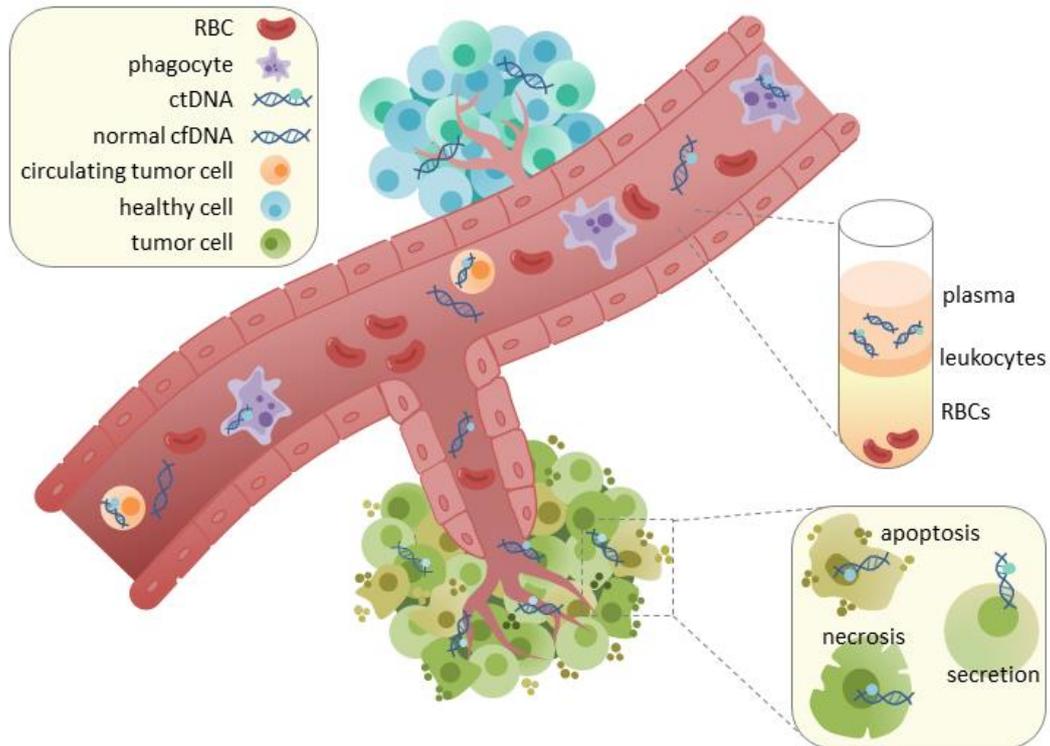
Durch frühzeitige Erkennung von Brustkrebs sinkt die Intensität der Behandlung und die Überlebensrate steigt auf bis zu 98%. Wird die Diagnose erst nach der Bildung von Metastasen, also dem Erreichen des vierten Stadium, gestellt, sinkt die Überlebensrate auf 27%. Sensitive und frühzeitige Brustkrebsdetektion ist deshalb zur Behandlung von Brustkrebs notwendig. (Radpour et al. 2011)

Wie verschiedene Studien von z.B. Radpour, R. (2011) oder Yang, X. (2001) zeigten, spielt die Epigenetik in der Entstehung von Krebs (Karzinogenese) eine wichtige Rolle. Veränderte Promotor-Methylierungsmuster von Tumorsuppressorgenen treten häufig in einem frühen Stadium während der Karzinogenese auf. Durch Zellnekrose und Apoptose gelangen signifikante Mengen an DNA in den Blutkreislauf. Das Vorhandensein sowie die quantitative Veränderung dieser zirkulierenden-zellfreien DNA wurde bei verschiedenen Krebsarten bereits nachgewiesen (Radpour et al. 2011). Der Nachweis von genetischen Veränderungen in zirkulierender-freier DNA in einer frühen Phase der Karzinogenese dient als Grundlage für die Anwendungen der Firma Agena Bioscience.

### **2.2 Zirkulierende Tumor-DNA**

DNA, welche außerhalb von Zellen in Flüssigkeiten des Körpers wie z.B. Blut oder Speichel vorkommt, wird als zirkulierende-freie DNA (cfDNA) bezeichnet (s. **Abb. 2**). Zuerst nachgewiesen wurde cfDNA in Blutplasma bereits 1948 (Campos-Carrillo et al. 2020). Bei Krebspatienten kann zirkulierende Tumor-DNA (ctDNA) einen Teil der gesamten cfDNA ausmachen. Die ctDNA beschreibt DNA-Fragmente, welche durch Zellnekrose, Apoptose oder Sekretion von Krebszellen z.B. in den Blutkreislauf gelangt sind. Von der gesamten Menge an cfDNA stammen 0,01% - 90% von ctDNA. Während bei gesunden Probanden die Gesamtmenge an cfDNA in Blutplasma bei etwa 30 ng/mL liegt, kann die cfDNA-Menge bei Krebspatienten bei bis zu 1000 ng/mL liegen. Die Länge der ctDNA-Fragmente hängt von der Art ab, wie die ctDNA in das Blut gelangt ist. cfDNA-Fragmente, welche durch Apoptose in den Blutkreislauf geraten, sind um Nukleosomen gewickelt und weisen eine Länge von circa 166 bp auf. Größere Fragmente von 320 bp bis zu 1000 bp stammen aus der Phagozytose von nekrotischen Zellen. cfDNA, welches durch aktive Sekretion die Zelle verlässt, weist eine Länge von 150 – 250 bp auf. (Elazezy und Joosse 2018)

Der Nachweis von Mutationen in ctDNA ermöglicht die frühe Detektion von Krebs. Zudem kann der Nachweis bereits erfolgen, wenn die Krebszellen noch sehr klein sind, nicht komplex und keine Metastasen gebildet haben. Eine frühzeitige Detektion kann die Behandlung beeinflussen. Da der Anteil der zirkulierenden Tumor-DNA bis hinab zu 0,01% der gesamten cfDNA betragen kann, spielt die Sensitivität des Nachweisverfahrens eine wichtige Rolle. (Elazezy und Joosse 2018)



**Abbildung 2:** Graphische Darstellung einer Blutbahn, in die durch verschiedene Prozesse cfDNA und ctDNA gelangt sind. In Grün sind Tumorzellen dargestellt, welche durch Apoptose, Nekrose oder Sekretion ctDNA (Doppelhelix-DNA mit blauem Punkt) in die Blutbahn abgeben. Weiterhin wird durch gesunde Zellen (blau) cfDNA in die Blutbahn abgegeben. Phagozyten (lila) und Rote Blutkörper (rot) sind ebenfalls schematisch dargestellt. Eine durch eine Flüssigbiopsie gewonnene Probe kann durch z.B. Zentrifugation getrennt werden. In dem Blutplasma ist dann die cfDNA und auch ctDNA vorzufinden. (Galladium 2021)

Zur Gewinnung von ctDNA aus dem Körper des Patienten wird eine Flüssigbiopsie durchgeführt (engl. *Liquid Biopsy*). Die Flüssigbiopsie beschreibt die blutbasierte Untersuchung zur Detektion von genetischen Veränderungen. Im Gegensatz zur oft angewendeten Gewebebiopsie ist die Flüssigbiopsie minimal invasiv und kann nahezu jederzeit durch eine Blutentnahme wiederholt werden. Weiterhin kann das gesamte Mutationsspektrum eines Tumors analysiert werden und ist nicht wie bei der Gewebebiopsie auf enge Bereiche begrenzt. (Banys-Paluchowski et al. 2020)

### 2.3 Verwendete neue Anwendungen als Grundlage der Arbeit

Die Ergebnisse dieser Ausarbeitung basieren auf den neuartigen Anwendungen (Panels) der Firma Agena Bioscience. Bei den Anwendungen handelt es sich um das Liquid IQ Panel und das Breast Methylation Panel.

Das Liquid IQ Panel analysiert neben der Quantität an vorhandener cfDNA auch deren Qualität. Das Liquid IQ Panel war während der Experimente für die vorliegende Arbeit noch kein offizielles kommerzielles Produkt. Insgesamt nutzt das Panel 36 Biomarker zur Untersuchung der cfDNA. Wichtige Parameter sind Kopienanzahl der DNA (*amplifiable copies*), die Bestimmung der Fragmentlängen und eine mögliche Kontamination durch z.B. gDNA von weißen Blutzellen.

Weiterhin wird das Breast Methylation Panel der Firma Agena eingesetzt. Bei dieser Anwendung handelt es sich um einen Prototyp zur Analyse von cfDNA-Proben auf Methylierung bei insgesamt 19 Brustkrebs-spezifischen Biomarkern. Die Anwendung wurde im Rahmen eines Forschungsprojektes, welches von der Europäischen Union gefördert und von der Firma Philips koordiniert wird, entwickelt.

### **2.4 Ziel der Ausarbeitung**

Brustkrebs ist für Frauen eine der am häufigsten auftretenden Krankheiten weltweit. Die Detektion von Brustkrebs in einem frühen Stadium ist notwendig, um die Überlebensrate zu steigern. Während der Karzinogenese spielen Methylierungsmuster in Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen eine wichtige Rolle. Mit Fortschreiten der Tumorgroße gelangt immer mehr zirkulierende Tumor-DNA in den Blutkreislauf durch z.B. Apoptose. Diese cfDNA kann analysiert werden, um frühzeitig Tumore zu entdecken oder die Effizienz einer Therapie zu überwachen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Optimierung und Validierung des iPlex Breast Methylation Panels v1.0. Hierbei werden die verschiedenen PCR-Primer mengenmäßig justiert, so dass ein möglichst hoher Umsatz in der Multiplex-PCR stattfindet. Dies bedeutet, dass alle Primer in einer PCR-Reaktion gemeinsam vorliegen und effizient am entsprechenden Genabschnitt binden können. Im Folgenden wird dies als Bindungsrate bezeichnet. Anschließend soll eine Probenkohorte von klinischen Proben mit diesem Panel gemessen werden. Die Probenkohorte stammt aus dem Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) und beinhaltet neben 57 Proben von gesunden Probanden, 46 Proben von triple-negativen Brustkrebspatientinnen. Beim triple-negativen Brustkrebs befinden sich weder Östrogen- noch Progesteron- sowie HER2/neu Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen. Vor der eigentlichen Methylierungsanalyse erfolgt eine quantitative und qualitative Bestimmung der cfDNA in den Proben mit dem Liquid IQ Panel.

### 3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Versuche dargestellt. Dies umfasst das Einstellen der PCR-Primer, die Vorquantifizierung mit dem Liquid IQ Panel und die Messung der klinischen Proben mit dem iPlex Breast Methylation Panel. Die mengenmäßige Adjustierung der PCR-Primer ist aufgrund der Multiplex-Reaktion schwierig. Eine hohe und ausgeglichene Bindungsrate jedes PCR-Primer während der PCR ist wichtig, ohne dass diese sich untereinander stören durch z.B. Bildung von Primer-Dimeren. Je mehr Primer während der PCR binden, desto mehr cfDNA kann amplifiziert werden. Die Sensitivität der Anwendung zur Detektion von Mutationen wird damit gesteigert. Zur Verifizierung wurden Methylierungsstandards und HapMap Proben (Wildtyp) gemessen. Weiterhin wurde eine quantitative Bestimmung der cfDNA in klinischen Blutproben aus dem Institut für Tumorphysiologie des UKE mit dem Liquid IQ Panel durchgeführt und die Proben wurden mit dem Breast Methylation Panel auf Methylierung in den relevanten Genabschnitten untersucht.

#### 3.1 PCR Primer Adjustierung

Zunächst werden die Ergebnisse des PCR-Primer Adjustments vorgestellt. Das Ziel des Adjustments ist eine möglichst hohe Bindungsrate der Primer während der PCR. Bei Vorversuchen hatten sich einige Primer als besonders aussagekräftig, bezogen auf das Methylierungsmuster bei Gesunden und Krebspatienten, erwiesen. Folgende sieben Primer wurden deshalb aufgrund ihrer größeren klinischen Relevanz bei der Optimierung vorrangig behandelt: *AKR1B1*, *BRCA1*, *GPX*, *HIST1H3C*, *SCGB3A1*, *TM6SF1* und *TMEFF2*. Weiterhin sind die Primer zur Quantifizierung (*ALB\_TotalDNA*, *APOE\_TotalDNA* und *RNaseP\_TotalDNA*) sowie die Primer zur Bewertung des enzymatischen Verdaus (*LDHA\_DigestQC* und *POP5\_DigestQC*) beim Adjustement verstärkt berücksichtigt worden. Bei den klinisch nicht relevanten Primern wurde die Konzentration vorerst angepasst.

Tabelle 1 zeigt die prozentuale Bindungsrate aller Biomarker während der Reaktion. Nach dem ersten Adjustement wurden die Konzentrationen klinisch relevanter Primer weiter erhöht, um die Bindungsrate zu steigern (s. **Anlage A**).

*Tabelle 1: Bindungsrate der einzelnen Biomarker. Die Tabelle zeigt die gemessene Bindungsrate in % für jeden der Biomarker. Die Bindungsrate beschreibt dabei den Anteil an PCR Primern, die in der PCR Reaktion gebunden wurden zur Quantifizierung. Berechnet wird der Wert indirekt über den Umsatz an Extend-Primer während der single-base-Extension Reaktion (siehe Kapitel 5.1). Nach dem ersten Lauf und dem ersten Adjustment wurden einige essenzielle Marker dem Mix vom Volumen verstärkt hinzugeführt, um die Bindungsrate zu erhöhen. Insgesamt ergeben sich die Werte aus 44 Proben, aus denen der Mittelwert für einen Biomarker errechnet wurde. Zudem wird in der Tabelle ein Mittelwert berechnet, welcher die durchschnittliche Bindungsrate aller Biomarker in einem Lauf berechnet.*

Primer	Bindungsrate 1. Lauf %	Bindungsrate 1. Adj. %	Bindungsrate 2. Adj. %
<i>AKR1B1</i>	81,1	80,6	88,6
<i>ALB_TotalDNA</i>	99,9	100	100
<i>APC</i>	53,6	47,5	54,8
<i>APOE_TotalDNA</i>	90,7	93,4	92,6
<i>ARHGEF7</i>	84,4	83,6	84,8
<i>BRCA1</i>	42,8	53,5	71,3
<i>COL6A2</i>	91,0	87,9	88,3
<i>FOXA1</i>	61,9	54,3	55,7
<i>GPX7</i>	65,3	71,9	77,0
<i>HIST1H3C</i>	89,2	92,1	98,7
<i>LDHA_DigestQC</i>	82,3	88,4	93,2
<i>MDGI-FABP3</i>	99,6	99,5	99,4
<i>POP5_DigestQC</i>	64,2	71,6	75,0
<i>RASGFR2</i>	56,2	49,2	44,5
<i>RASS1</i>	34,9	29,8	45,7
<i>RNaseP_TotalDNA</i>	85,3	90,8	96,0
<i>SCGB3A1</i>	66,3	66,7	80,6
<i>TM6SF1</i>	91,0	89,3	97,6
<i>TMEFF2</i>	75,7	79,0	83,5
Mittelwert:	74,5	75,2	80,4

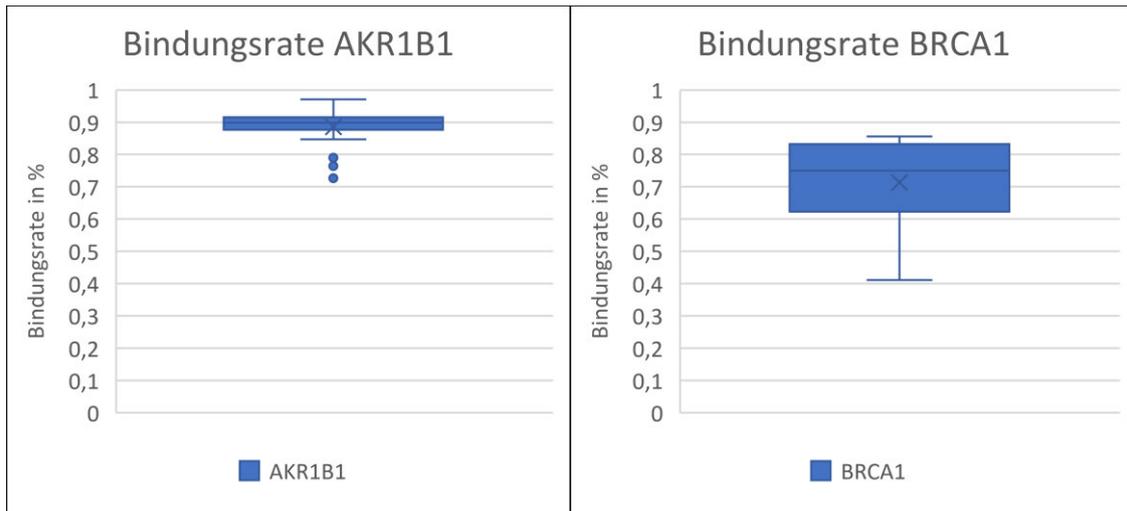
Die Tabelle zeigt, dass die Bindungsrate der wichtigsten Primer gesteigert werden konnte. Einige Primer wie *GPX*, *HIST1H3C* oder *BRCA1* weisen dabei einen kontinuierlichen Anstieg auf. Bei Primer wie *AKR1B1*, *SCGB3A1* oder *TM6SF1* veränderte sich die Bindungsrate im ersten Adjustment trotz Zugabe nicht wesentlich. Sie weisen erst nach dem zweiten Adjustment eine höhere Bindungsrate auf.

Bei den klinisch nicht relevanten Primern wie *FOXAI* oder *RASGFR2* sinkt die Bindungsrate über den Verlauf des Adjustments. Auffällig hierbei ist ein geringer Anstieg der Bindungsrate im zweiten Adjustment bei den Markern *FOXAI* und *APC*, obwohl keine vermehrte Zugabe stattgefunden hat.

Der Primer *ALB\_TotalDNA* zur Bestimmung der DNA-Menge weist eine Bindungsrate von 100% auf. Am schwächsten bindet der Primer *RASSF1* mit einer Bindungsrate von 45,7%. Der Mittelwert aller Primer bezogen auf ihre Bindungsrate steigt im Verlauf des Adjustments kontinuierlich an. Der Mittelwert aller Primer erreicht so im Mix einen Wert von über 80%. Dies bedeutet, dass 80% der vorhandenen Primer während der PCR Reaktion genutzt werden.

Zudem wurden auch Kastendiagramme herangezogen, um die Verteilung der Bindungsraten zu bewerten. Exemplarisch wird in Abbildung 3 für die beiden Biomarker *AKR1B1* und *BRCA1* die Streuung der Messwerte gezeigt. Weitere Kastengrafiken sind dem Anhang (Anlage B) zu entnehmen. Die Abbildung zeigt die statistische Verteilung der Messwerte je eines Primerpaars. Insgesamt basiert das Verteilungsdiagramm auf 44 Messwerten für jeden Biomarker. Die Bindungsraten und die daraus resultierenden Kastengrafiken stammen von der dritten Messung (2. Adjustment).

Eine Kastengrafik, oder auch Boxplot genannt, gibt mehrere wichtige statistische Werte wieder. Zunächst gibt sie den Mittelwert aus allen Werten in Form eines Kreuzes wieder. Weiterhin werden das erste und dritte Quartil (blaue Box) angegeben. In diesem Intervall der Box liegen 50% der Messwerte vor. Der Median teilt diese Box durch eine waagerechte Linie. Außerdem werden der Minimal- und Maximalwert angezeigt. Hierbei handelt es sich um den niedrigsten bzw. höchsten Messwerte der Messreihe. Zusätzlich werden Ausreißer in Form von Punkten dargestellt.



**Abbildung 3:** Graphische Darstellung des Mittelwertes mit der Abweichung am Beispiel der Marker *AKR1B1* und *BRCA1* durch ein Kastengrafikdiagramm. Aufgetragen werden alle Bindungsraten der Biomarker in %. Hierbei wird in der Grafik selbst der Mittelwert (blaues X), der Median (blaue horizontale Linie), das erste und dritte Quartil (untere bzw. obere Kante des blauen Kastens) sowie der Minimal- bzw. Maximalwert angezeigt. Zudem werden Ausreißer als Punkte dargestellt (siehe *AKR1B1*).

Die durchschnittliche Bindungsrate des Biomarkers *AKR1B1* liegt knapp unter 90%. Der Median, also der Zentralwert, des Markers liegt bei knapp über 90%. Das erste und dritte Quartil liegen sehr nahe beieinander. Der Minimalwert liegt bei 85%. Der Maximalwert liegt bei knapp 97%. Insgesamt weist die Messung drei Ausreißer auf, welche alle im Intervall von 70% - 80% vorliegen.

Der Marker *BRCA1* weist einen Mittelwert von 71% auf. Der Median erreicht eine leicht höhere Bindungsrate als der Mittelwert. Das erste und dritte Quartil liegen deutlich weiter auseinander. Der Minimalwert liegt bei nur knapp über 40%. Der Maximalwert erreicht eine Bindungsrate von über 85%. Es sind keine Ausreißer vorzufinden.

Zuletzt wird die Bindungsrate der PCR Primer über die Standardabweichung bewertet (**Tab. 2**). Die Standardabweichung gibt die Streuung der Messwerte um den Mittelwert an.

*Tabelle 2: Standardabweichung der Primer gemessen über die 3. Läufe. Die Standardabweichung gibt die Streubreite der Messwerte der Bindungsrate um den Mittelwert an. Eine niedrige Streubreite bedeutet dabei eine zuverlässigere Bindung der PCR-Primer während der Reaktion. Die Abweichung wird basierend auf den 44 Messwerten jeden Biomarkers berechnet. Weiterhin wird ein Mittelwert aller Standardabweichungen eines Laufes angegeben.*

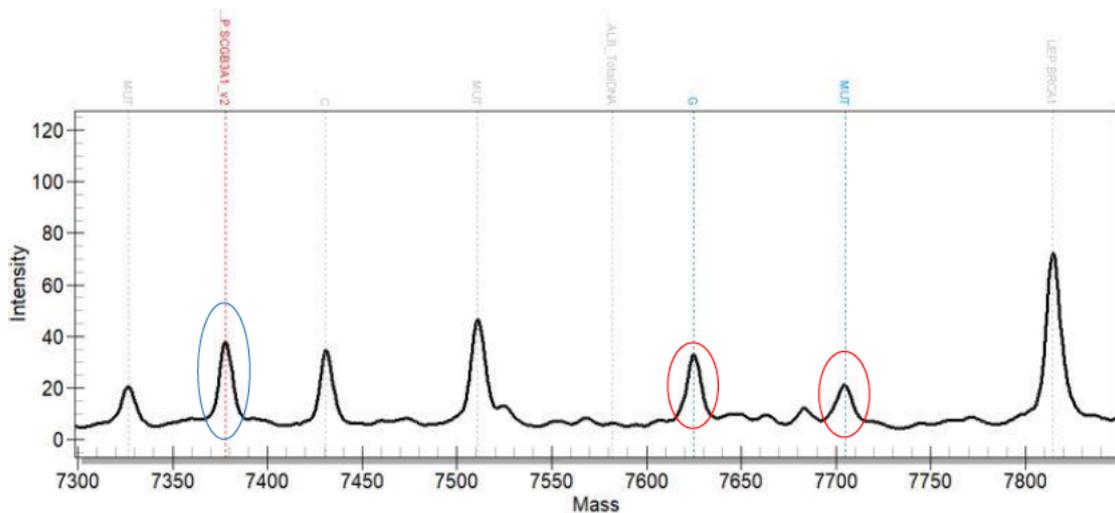
Primer	Standard-abweichung 1. Lauf	Standard-abweichung 1. Adj.	Standard-abweichung 2. Adj.
<i>AKR1B1</i>	0,180	0,162	0,050
<i>ALB_TotalDNA</i>	0,003	0,000	0,000
<i>APC</i>	0,110	0,134	0,066
<i>APOE_TotalDNA</i>	0,022	0,023	0,038
<i>ARHGEF7</i>	0,145	0,112	0,073
<i>BRCA1</i>	0,175	0,191	0,130
<i>COL6A2</i>	0,061	0,101	0,080
<i>FOXA1</i>	0,155	0,209	0,119
<i>GPX7</i>	0,073	0,071	0,065
<i>HIST1H3C</i>	0,249	0,202	0,056
<i>LDHA_DigestQC</i>	0,163	0,099	0,028
<i>MDGI-FABP3</i>	0,003	0,004	0,006
<i>POP5_DigestQC</i>	0,133	0,155	0,071
<i>RASGFR2</i>	0,139	0,197	0,142
<i>RASS1</i>	0,186	0,203	0,172
<i>RNaseP_TotalDNA</i>	0,080	0,056	0,023
<i>SCGB3A1</i>	0,119	0,158	0,072
<i>TM6SF1</i>	0,158	0,189	0,027
<i>TMEFF2</i>	0,076	0,068	0,034
Mittelwert:	0,117	0,123	0,065

Die Standardabweichung sinkt im Verlauf des Adjustment bei allen klinisch relevanten Primern. Im Durchschnitt halbiert sich die Standardabweichung von der ersten Messung bis zum 2. Adjustment. Das erste Adjustment weist ähnliche Werte auf wie die erste Messung. Eine starke Verbesserung ist beim 2. Adjustment zu beobachten.

Nicht essenzielle Primer weisen vermehrt einen Anstieg der Standardabweichung vom ersten Lauf zum ersten Adjustment auf. Beim zweiten Adjustment sinken die Werte teils stark.

Die Messung der Methylierungsstandards mit absteigendem Methylierungsgrad dient zur Kalibrierung der Software zur Berechnung der Methylierung. Hierzu befindet sich für jeden Marker ein Kompetitor (Q-Mix) in der Reaktion. Der Kompetitor ist ein synthetischer DNA-Abschnitt, der sich von der Sequenz der Ziel-DNA in der Probe um eine Base unterscheidet. Durch diesen Basenunterschied ist ein Massenunterschied gewährleistet, damit eine separate Detektion möglich ist. Der Kompetitor ist mit einer bekannten Konzentration von 0,3 ng (100 *amplifiable copies*) enthalten. Als Ergebnis liegen nach der Reaktion zwei Produkte mit unterschiedlicher Masse vor. Der Kompetitor als Mutationssignal und das Mehtylierungssignal als Ziel-DNA.

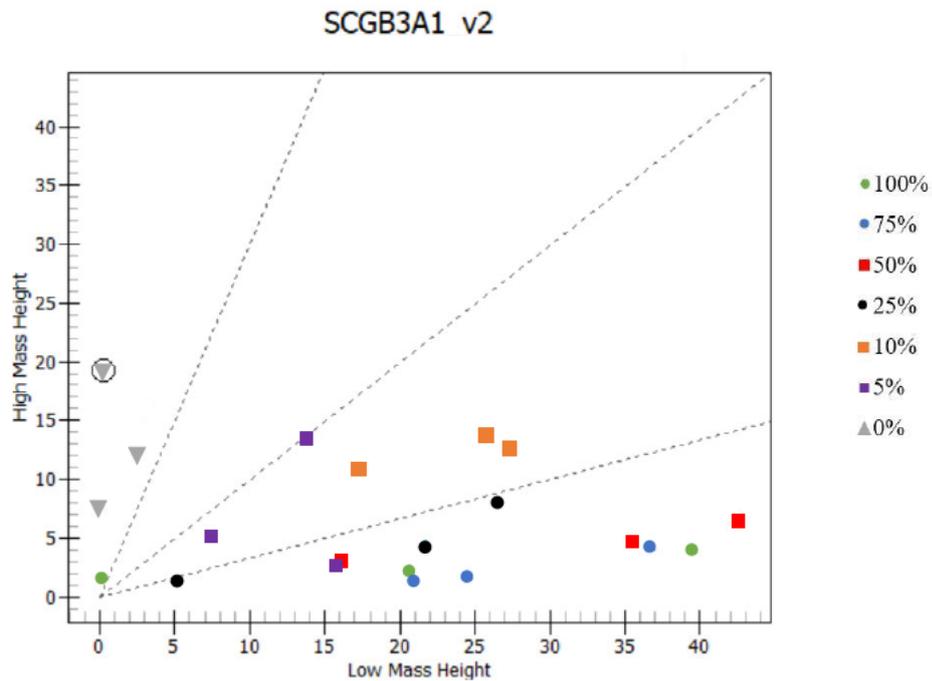
Beispielhaft wird dies an dem Biomarker *SCGB3A1\_v2* in Abbildung 4 gezeigt.



**Abbildung 4:** Massenspektrum des 10% Methylierungsstandards bezogen auf den Biomarker *SCGB3A1\_v2*. Aufgetragen ist die Peakintensität gegen die Masse in Da. Zu erkennen sind zwei Peaks (rote Kreise) bei einer Masse von etwa 7625 Da und 7705 Da, sowie ein großer Peak (blauer Kreis) bei einer Masse von etwa 7380 Da. Bei diesem Peak handelt es sich um den hinzugegebene Extend Primer, welcher in der Reaktion nicht in Produkt umgesetzt wurde. Anteile des Primers, welche bei der single-base Extension umgesetzt und um eine Base verlängert wurden, erkennt man als Mehtylierungssignal (roter Kreis bei einer Masse von 7525 Da) bzw. Mutationsspeak (roter Kreis bei einer Masse von 7705 Da).

Der 10% Methylierungsstandard zeigt sehr deutlich neben dem vorhandenen Methylierungssignal den Mutationspeak des Kompetitors. Bei einem DNA-Input von 5 ng ist zu erwarten, dass bei dem 10% Methylierungsstandard nach dem DNA Verdau noch 0,5 ng methylierte DNA vorliegen. Der Mutationspeak, welcher durch 0,3 ng des Kompetitors zustande kommt, müsste deshalb von der Signalhöhe leicht unterhalb der Höhe des Methylierungssignals liegen. Dies ist bei dem Biomarker in Abbildung 4 deutlich zu erkennen.

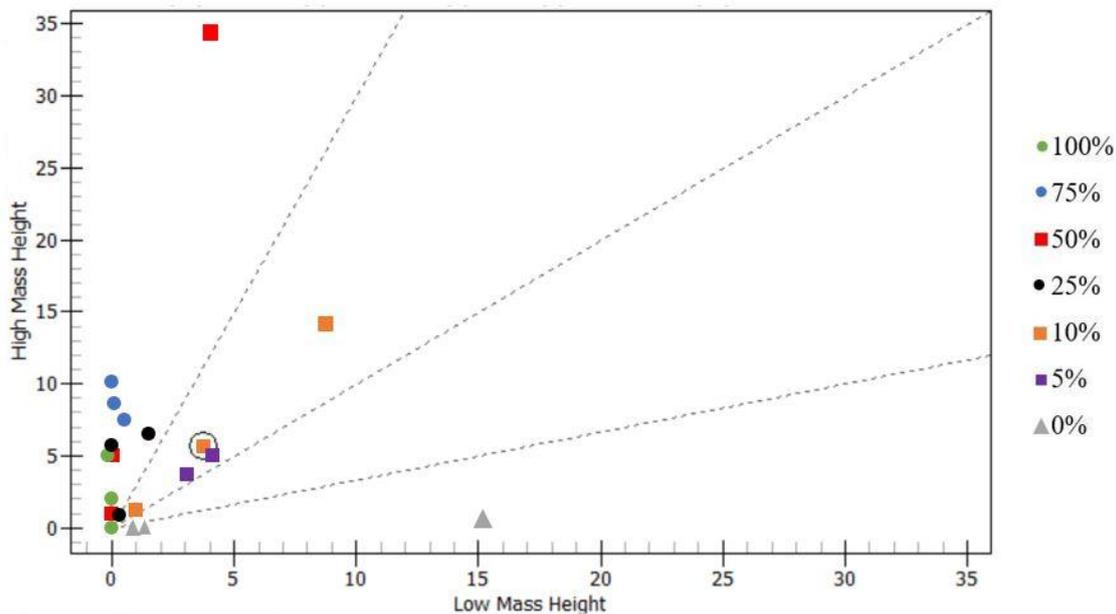
Zur Analyse aller Methylierungsstandards werden die Peaks des Kompetitors bzw. Methylierung in einem Clusterplot (Abb. 5) dargestellt.



**Abbildung 5:** Clusterplot des Methylierungsstandards SCGB3A1\_v2. Aufgetragen wurden die Methylierungsstandards von 100%-0%. Auf der Y-Achse ist die Peakhöhe der schwereren eingebauten Base, was der Mutationsbase entspricht, aufgetragen. Auf der X-Achse ist die leichtere eingebaute Base (hier Guanin) aufgetragen. Farblich markiert sind die Methylierungsstandards je nach Methylierungsgrad der Probe. Von allen Standards wurden 5 ng in die Reaktion eingebracht.

Einer von drei Replikaten des Methylierungsstandards mit einem Methylierungsgrad von 100% ist ausgefallen. Die Abnahme des Methylierungssignals ist für die Standards von 100% und 75% nicht eindeutig. Dies kann an der eingebrachten DNA-Menge von 5 ng liegen, welche bei den hohen Methylierungsgraden die Reaktion, welche für eine deutlich geringe DNA-Menge ausgelegt ist, überlädt. Erst ab einem Methylierungsgrad von 50% tritt eine Linearität auf. Hierbei ist die Abnahme des Methylierungssignals bis zu einem Methylierungsgrad von 0% zu be-

obachten. Weiterhin steigt die Signalhöhe des Kompetitors stetig an. In dem 0%-Methylierungsstandard ist nur der Kompetitor zu erkennen. Die Signalhöhe des Kompetitors, welcher mit einer 100 Kopien eine bekannte Konzentration besitzt, entspricht in der Theorie bei einem DNA-Input von 5 ng einer Signalhöhe zwischen dem 5% und 10% Methylierungsstandard. Bei einem DNA-Input von 5 ng ( $\approx 1500$  *amplifiable copies*) liegen bei dem 5%-Methylierungsstandard 75 und bei dem 10%-Methylierungsstandard 150 *amplifiable copies* vor. Die Analyse aller Clusterplots ergab, dass bei dem Biomarker *BRCA1* der Kompetitor nicht funktionierte (s. **Abb. 6**). Hier zeigte sich kein Mutationspeak bei zwei von drei 0%-Methylierungsstandards. Eine neue Justierung des Kompetitors ist für die Funktionalität des Biomarker wichtig und wurde deshalb außerhalb dieser Arbeit vorgenommen.



**Abbildung 6:** Clusterplot des Methylierungsstandards *BRCA1*. Aufgetragen wurden die Methylierungsstandards von 100%-0%. Aufgetragen ist der Signalhöhe des Methylierungssignals auf der Y-Achse gegen die Peakhöhe des Mutationssignals, welches vom Kompetitor stammt.

### 3.2 Liquid IQ Panel zur Analyse klinischer Proben

Die Probenentnahme erfolgte am Institut für Tumorbologie des UKE. Hierbei wurden jeweils 7,5 mL Blut in EDTA-Blutabnahmeröhrchen entnommen. Aus dem Blutplasma wurde die cfDNA mithilfe magnetischer *beads*-Technologie isoliert (Invitex). Die Rohdaten des zur Analyse genutzten Liquid IQ Panels sind im Anhang zu finden (Anlage C & Anlage D). In Anlage C sind die Ergebnisse der gesunden Kohorte abgebildet. In Anlage D die Ergebnisse der tripel-negativen Brustkrebspatientinnen.

Bei der gesunden Kohorte sind bei fast allen Proben 20 oder 21 Genabschnitte der Anwendung detektiert worden, was auf eine hohe Qualität der Analyse hinweist (maximal 21). Die Konzentration, welche sich aus der *amplifiable copies*-Zahl berechnet (303 *amplifiable copies* entsprechen 1 ng DNA), liegt bei den Proben zwischen 0,10 ng/ $\mu$ L und 0,57 ng/ $\mu$ L. Der Durchschnitt liegt bei einer Konzentration von 0,24 ng/ $\mu$ L. Die Kontamination durch genomische DNA weißer Blutkörper (WBC) liegt bei 21 der 57 Proben bei 0%. Weiterhin zeigen 24 Proben eine maximale Kontamination von 25%. Insgesamt 11 Proben weisen eine Kontamination von über 25% auf, vier Proben zu 100%. Bei einer Kontaminierung einer Probe von über 50% wird die Probe verworfen und nicht gemessen. 54 Proben stammen von weiblichen Probanden, eine Probe von einem männlichem Patient und zwei Proben konnten keinem Geschlecht zugeordnet werden. Die Probe 23 wurde bei der Messung nicht detektiert, weshalb keine Daten vorliegen.

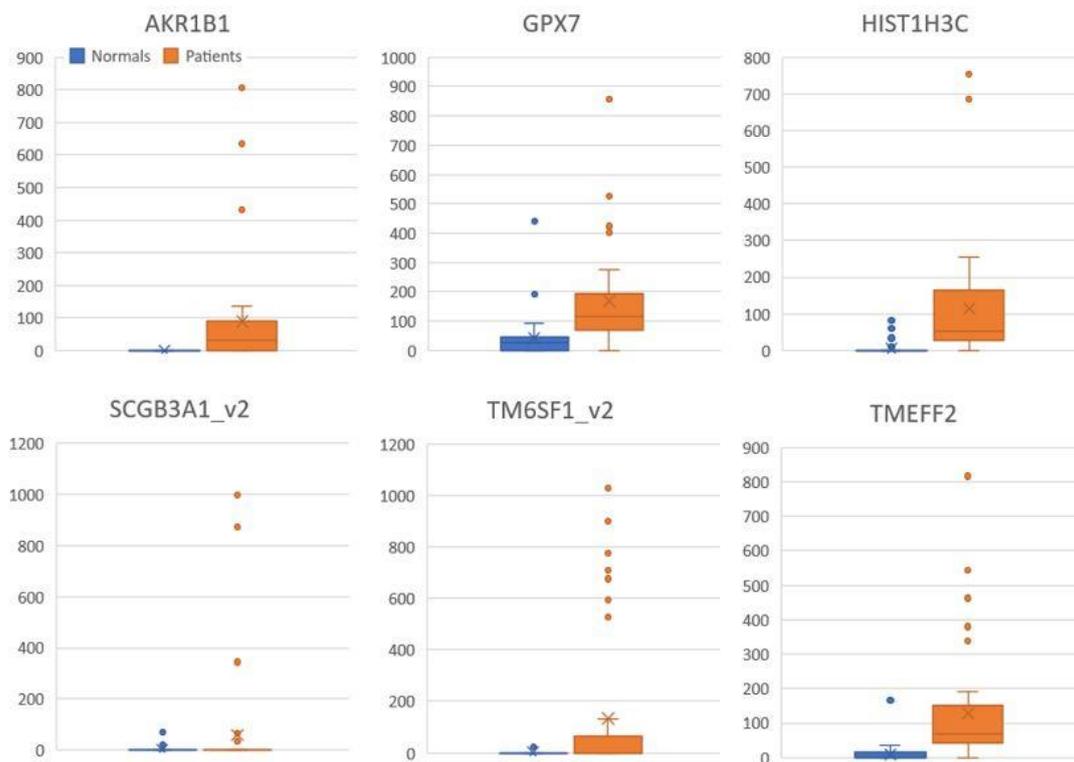
Die zweite Kohorte der Brustkrebspatientinnen (Anlage D) weist eine im Schnitt niedrigere Wiederfindungsrate der Genabschnitte auf. In den meisten Proben werden 16 bzw. 17 der 21 Genabschnitte der Anwendung detektiert. In einigen Proben sind nur 11 Genabschnitte wiederzufinden. Die Konzentration beträgt minimal 0,18 ng/ $\mu$ L, maximal 3,38 ng/ $\mu$ L und im Schnitt 0,67 ng/ $\mu$ L. Die WBC-Kontamination liegt bei fast allen Proben unter 25%, mit Ausnahme der Proben 10 und 24. Maximal liegt die Kontamination bei 37% bei Probe 10. Bei 47 von 48 Proben wurde durch die Voranalyse das weibliche Geschlecht der Probanden bestätigt. Nur bei Probe 37 war das Ergebnis nicht eindeutig.

Ein Vergleich der beiden Kohorten zeigt, dass die Konzentration im Schnitt in der triple-negativen Kohorte deutlich höher liegt als die Konzentration der gesunden Kohorte. Weiterhin ist die Kontamination durch gDNA geringer. Proben wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen, wenn sie bei der Messung gar keine Ergebnisse zeigten, zu stark mit gDNA kontaminiert waren oder insgesamt eine zu geringe DNA-Konzentration aufwiesen. Es wurden 10 Proben der gesunden Kohorte und vier Proben der triple-negativen Kohorte von der Analyse mit dem iPlex Breast Methylation Panel ausgeschlossen.

#### **3.3 iPlex Breast Methylation Panel v1.0 zur Untersuchung von klinischen Proben**

Ausgewertet wurden die Ergebnisse in Form von Boxplots (**Abb. 7**). Aufgetragen wurde dabei der Methylierungs-Score eines Markers getrennt für beide Kohorten (Gesunde und triple-negativer Brustkrebs). Der Methylierungs-Score wird dabei über die Höhe der Peaks berechnet und gibt an, wie stark die Probe methyliert ist. Damit das Ergebnis unter allen Proben ver-

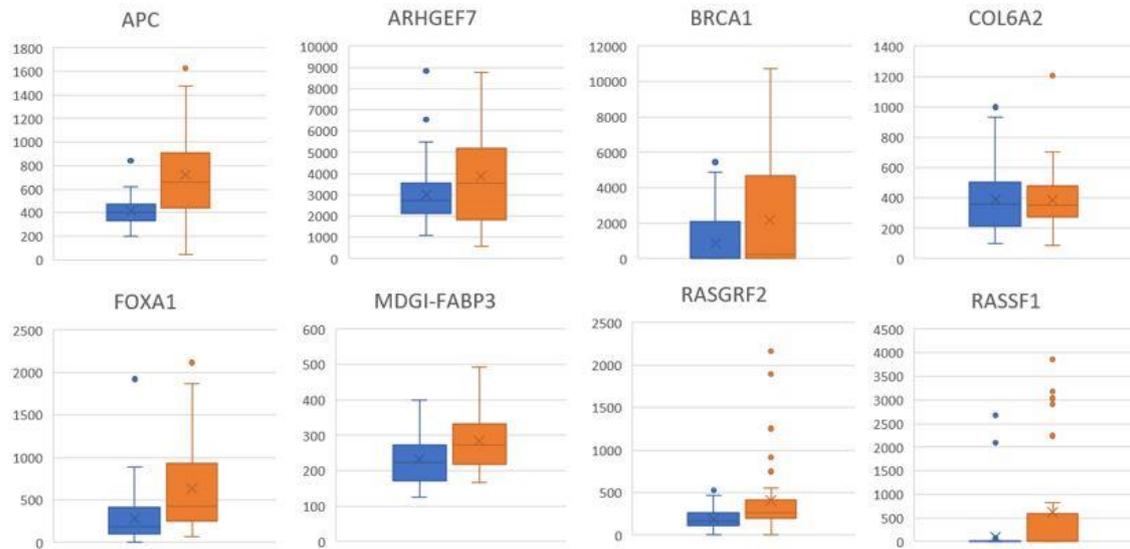
gleichbar ist, wird der Methylierungs-Score über den Kompetitor (Q-Mix) auf eine DNA-Menge von 10 ng normalisiert.



**Abbildung 7: Boxplot des Methylierungs-Scores der beiden Kohorten. Insgesamt wurde der Methylierungs-Score von 47 gesunden Probanden (normal, blau) gegen 42 triple-negative Patienten (Patient, orange) aufgetragen. Betrachtet werden sechs Marker, bei denen der Unterschied des Methylierungsscore zu erkennen ist und als signifikant angesehen werden kann.**

Die Abbildung zeigt sechs Marker der Anwendung, bei denen ein signifikanter Unterschied zwischen dem Methylierungsscore der gesunden Proben und der Brustkrebspatienten besteht. Zu erkennen ist, dass der Methylierungsscore bei den gesunden Proben im Durchschnitt nahe Null liegt. Bei dem Marker GPX beträgt der Methylierungsscore der gesunden Proben nahe 50. Bei den seltenen Ausreißern der gesunden Kohorte handelt es sich um Proben mit geringer DNA-Konzentration. Durch die Normalisierung der DNA-Menge auf 10 ng über den Kompetitor wird der Methylierungs-Score, durch das Multiplizieren des Messfehlers, stark verfälscht. Der Unterscheid im Methylierungs-Score wird vor allem bei den Biomarkern *GPX*, *HIST1H3C* und *TMEFF2* deutlich, hier beträgt der Methylierungsscore der triple-negativen Kohorte im Durchschnitt über 100. Bei den Biomarkern *AKR1B1*, *SCGB3A1* und *TM6SF1\_v2* liegt trotz einer leichten Überschneidung des Boxplots im unteren Bereich ein signifikanter Unterschied im Methylierungs-Score vor. Bei den Ausreißern handelt es sich um Proben mit teils 10-fach höherer Methylierung gemessen am Mittelwert (z.B. *TM6SF1\_v2*).

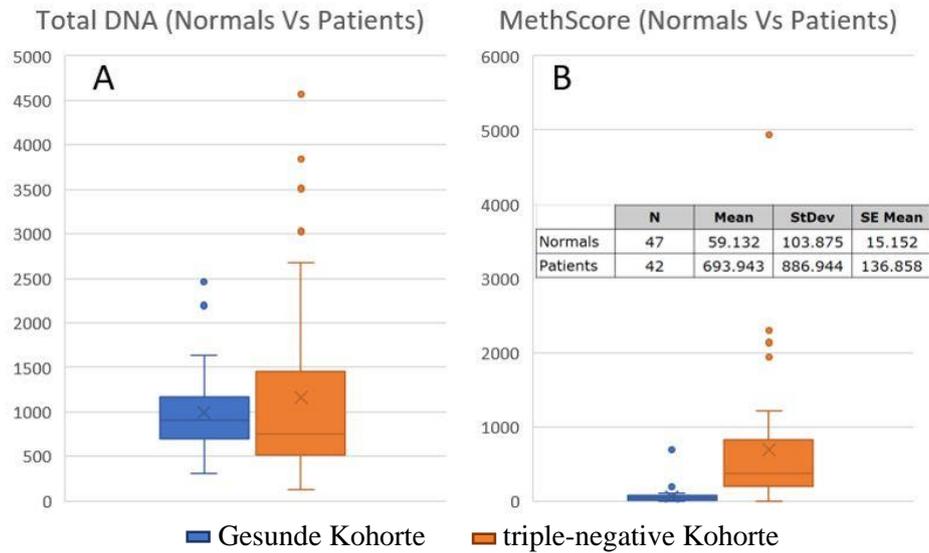
Die Ergebnisse der restlichen acht Marker sind in **Abb. 8** dargestellt.



**Abbildung 8:** Boxplot des Methylierungsscores der beiden Kohorten. Insgesamt wurde der Methylierungsscore von 47 gesunden Proben (normal, blau) gegen 42 triple-negative Patienten (Patient, orange) aufgetragen. Betrachtet werden acht Marker, bei denen kein signifikanter Unterschied zwischen den Methylierungsscores von Proben Gesunder zu triple-negative Patientinnen besteht.

Die Methylierungsscores dieser acht Biomarker lassen sich nicht signifikant unterscheiden, da keine klare Trennung der Boxplots vorliegt. Bei allen Biomarkern, bis auf *COL6A2*, ist zu erkennen, dass der mittlere Methylierungsscore niedriger ist bei der gesunden Kohorte. Weiterhin ist zu erkennen, dass der Methylierungsscore aller Biomarker deutlich höher liegt als bei der ersten Abbildung, in der sich die Kohorten signifikant unterscheiden. Der Biomarker *APC* zeigt eine leichte Überschneidung der Boxplots auf. Der Minimumwert der triple-negativen Kohorte liegt unter dem Minimumwert der gesunden Kohorte. *ARHGEF7* weist mit einem mittlerem Methylierungsscore von über 3000, sowohl bei der gesunden als auch bei der triple-negativen Kohorte, die höchsten Werte auf. Auch bei diesem Biomarker liegt das Intervall der gesunden Kohorte innerhalb des Intervalls der triple-negativen Kohorte. Die Marker *FOXA1*, *MDGI-FABP3*, *BRCA1* und *RASGRF2* weisen alle denselben Zusammenhang auf. Die Kohorten überschneiden sich deutlich in Bezug auf den Methylierungsscore. Im Intervall der gesunden Kohorte, bezüglich des Methylierungsscores, liegt die triple-negative Kohorte des Biomarkers *COL6A2*. Damit ist kein Unterschied zwischen Gesunden und triple-negativen Probanden zu erkennen. Beim Marker *RASSF1* ist eine Trennung der Kohorten zu erkennen. Die Proben der gesunden Kohorte sind nahezu nicht methyliert, während die Proben der zweiten Kohorte im Durchschnitt 500 Methylierungen enthalten.

Durch den nicht vorhandenen signifikanten Unterschied werden die acht Marker nicht in folgender Analyse des gesamten Methylierungs-Scores berücksichtigt. Abbildung 9 zeigt die gesamte DNA-Menge für die beiden Kohorten, welche über die drei Marker zur Quantifizierung bestimmt wurde, und den durchschnittlichen Methylierungs-Score der sechs klinisch relevanten Biomarker, bei denen ein signifikanter Unterschied im Methylierungs-Score vorliegt.



**Abbildung 9:** Wiedergegeben wird die totale DNA-Menge in amplifiable copies (303 amplifiable copies entsprechen 1 ng DNA) und der Methylierungs-Score der sechs klinisch relevanten Biomarker. Um die Ergebnisse des Methylierungsgrades vergleichbar zu machen, wird der DNA-Input jeder Probe auf.

Zu erkennen ist, dass die DNA-Menge der triple-negativen Kohorte einen höheren Durchschnittswert aufweist und stärker variiert. Beim Methylierungs-Score ist eine deutliche Differenz zu erkennen. Während der Methylierungs-Score der gesunden Kohorte im Schnitt rund 59 beträgt, weisen die Proben der triple-negativen Kohorte im Schnitt eine Methylierung von 694 auf.

## 4 Diskussion

### 4.1 PCR Primer Adjustierung und Validierung

Für eine effiziente Amplifizierung zirkulierender Tumor-DNA ist eine hohe Bindungsrate der PCR-Primer essenziell. Durch Nebenwirkungen, wie Adsorption oder das Bilden von Dimeren, stellt die mengenmäßige Justierung der einzelnen PCR-Primer in einem Multiplex eine besonders schwierige Aufgabe dar. Die Ergebnisse zeigen, dass kontinuierlich die Bindungsrate der PCR-Primer gesteigert werden konnte. Hierbei wurden bei Vorversuchen mehrere klinisch signifikante Primer festgestellt, auf die der Fokus bei der Optimierung lag. Weiterhin konnte die Streuweite der Messwerte reduziert werden, wodurch die Verlässlichkeit einzelner Primer verbessert wurde. Der optimierte PCR-Primer Mix kann zur Amplifizierung von zirkulierender Tumor-DNA in der iPlex Breast Methylation Anwendung genutzt werden.

Zur Kalibrierung des Systems wurden Methylierungsstandards gemessen. Hierfür wird ein Kompetitor in bekannter Konzentration genutzt, der während der PCR in die Reaktion eingebracht wird. Bei fast allen Markern konnte ein Zusammenhang zwischen Signalintensität und Methylierungsgrad der Probe hergestellt werden. Bei dem Marker *BRCA1* wurde festgestellt, dass der Kompetitor nicht korrekt funktionierte. Der Kompetitor der Anwendung war vor der Optimierung des Primer-Mixes an die Anwendung angepasst worden. Während der Versuche wurde die Bindungsrate des *BRCA1*-Assays stark verbessert, wodurch nun der Kompetitor ebenfalls angepasst werden muss. Erste Versuch hierzu wurden außerhalb dieser Arbeit bereits durchgeführt.

Als nächsten Schritt zur Optimierung des Panels sollten auch die bisher nicht signifikanten Primer adjustiert werden. Hierbei spielt vor allem *BRCA1*, aufgrund seiner klinischen Relevanz bei Brustkrebs, eine wichtige Rolle. Erste Versuche hierzu zeigten, dass das Optimieren aller PCR-Primer zeitgleich zu einem Kipppunkt führten, an dem die Bindungsrate einzelner Primer stark sinkt. Durch das mehrfache hinzugeben weiterer Primer-Mengen, steigt die Konzentration. Ein Problem dabei ist, dass bei steigender Konzentration das Bilden von Primer-Dimeren und die Adsorption an der Gefäßwand wahrscheinlicher werden.

## 4.2 Voranalyse mit dem Liquid IQ

Vor der Messung klinischer Proben des UKEs mit dem iPlex Breast Methylation Panel, erfolgte eine Voranalyse der Proben mit dem Liquid IQ Panel. Wichtige Parameter, die dabei erfasst werden sollten, waren die DNA-Konzentration, eine mögliche Kontamination durch gDNA von weißen Blutkörpern und der Fragmentierungsgrad der Proben.

Bis auf eine Probe konnten alle Proben erfolgreich mit der Anwendung analysiert werden. Es ist ein klarer Unterschied in der Konzentration der beiden Kohorten zu erkennen. Während die Konzentration der gesunden Kohorte im Schnitt 0,24 ng und maximal 0,57 ng betrug, wurde in der triple-negativen Kohorte im Schnitt 0,67 ng cfDNA detektiert. Dies bestätigt den Anstieg an cfDNA im Blut bei Patienten mit Brustkrebs (s. Elazezy und Joosse 2018). Bis auf eine Probe, welche männlich war, und vier Proben bei der die Analysen nicht eindeutig waren, waren alle Proben weiblichen Ursprungs. Durch mehr Brustgewebe und das Hormon Östrogen tritt Brustkrebs deutlich häufiger bei Frauen auf (Sun et al. 2017). Eine Kontamination durch weiße Blutkörper (Leukozyten) ist durch die Aufreinigungsmethode und deren Geschwindigkeit beeinflusst. Wie in Abbildung 2 (Galladium 2021) dargestellt, befinden sich die Leukozyten in der Grenzschicht zwischen Blutplasma, in welcher die cfDNA/ctDNA vorliegt und dem restlichen Bestandteil des Blutes. Eine falsch durchgeführte Zentrifugation bei der Aufreinigung, könnte zu einem Vermischen der beiden Schichten, und damit zum Vermischen der gDNA und der cfDNA, führen. Weiterhin spielt die Geschwindigkeit der Aufreinigung eine Rolle. Kontaminationen entstehen dann vor allem, wenn EDTA-Blut nicht schnell prozessiert wird und die weißen Blutkörper in Lyse gehen.

Die Voranalyse von cfDNA-Proben ist ein wichtiger Schritt vor der Untersuchung der Proben auf Methylierungen oder andere Parameter wie somatische Mutationen. Bei einer Flüssigbiopsie sind das Volumen und die Konzentration der aufgereinigten cfDNA üblicherweise der limitierende Faktor. Das benötigte Volumen für eine Analyse mit dem Liquid IQ Panel von nur 1,5 µL ist daher optimal, um cfDNA-Proben qualitativ und quantitativ zu untersuchen und dennoch den Großteil der Probe für die anschließende Hauptanalyse verfügbar zu haben. Insgesamt wurden mit der Anwendung 14 cfDNA-Proben detektiert, bei denen durch verschiedene Faktoren keine weitere Analyse sinnvoll ist.

### 4.3 Untersuchung von klinischen Proben auf Methylierungen

In frühen Stadien der Brustkrebskrankung weisen wenige Biomarker einen hohen Methylierungsgrad auf. Durch einen minimal invasiven Eingriff ist es möglich, zirkulierende tumor-DNA, welche die methylierten DNA-Fragmente enthält, zu isolieren und zu untersuchen. Die Detektion dieser Methylierungen erfolgte durch das iPlex Breast Methylation Panel.

Insgesamt lagen 14 Brustkrebs-spezifische Biomarker vor, welche in der Literatur einen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad und einer Krebserkrankung aufwiesen. In diesen Biomarkern liegt die cfDNA bei Brustkrebspatientinnen verstärkt methyliert vor (Radpour et al. 2011; Fackler et al. 2014; Nunes et al. 2018). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen insgesamt sechs Biomarker, bei denen ein signifikanter Unterschied im Methylierungsgrad zwischen Gesunden und Brustkrebspatienten messbar ist. Bei den Markern handelt es sich um *AKR1B1*, *GPX7*, *HIST1H3C*, *SCGB3A1\_v2*, *TM6SF1\_v2* und *TMEFF2*. Der Methylierungsgrad dieser sechs Biomarker liegt im Schnitt rund 12-mal höher bei den Brustkrebspatientinnen. Acht weitere Biomarker wiesen keinen signifikanten Unterschied im Methylierungsgrad auf. Biomarker wie *APC*, *FOXA1*, *FASGFR2* und *RASSF1* weisen nur einen kleinen Überschneidungsbereich zwischen gesunder Kohorte und der Kohorte von Brustkrebspatienten auf. Bei vier Biomarkern (*ARHGEF7*, *BRCA1*, *COL6A2*, *MDGI-FABG3*) wurde nachgewiesen, dass der durchschnittliche Methylierungsgrad höher ist bei der Kohorte der Brustkrebspatienten. Aus den Ergebnissen konnte aber kein klinisch relevanter Nutzen abgeleitet werden, da die Methylierungsgrade der beiden Kohorten sich zu stark überschneiden.

Für die sechs Marker, welche bei der Optimierung des PCR-Primer-Mixes bevorzugt wurden, ist der Unterschied der Methylierung zwischen den Kohorten signifikant (s. **Abb. 6**). Eine weitere Optimierung der Biomarker, welche nur einen geringen Überschneidungsbereich der beiden Kohorten aufweisen, könnte weitere klinisch relevante Ergebnisse liefern. Vor allem der Biomarker *BRCA1*, welchem eine große klinische Relevanz zuzuordnen ist, kann durch weitere Justierung zur Auswertung von klinischen Proben genutzt werden. Erste Ergebnisse des Komparator-Adjustments weisen darauf hin, dass der Marker in der Zukunft ebenfalls verwendet werden kann.

Ein Zusammenhang zwischen einer Brustkrebskrankung und dem Methylierungsgrad von Biomarkern wurde nachgewiesen. Diese minimal invasive Methode könnte in Zukunft zur frühzeitigen Erkennung und der Überwachung der Therapie von Brustkrebspatienten eingesetzt

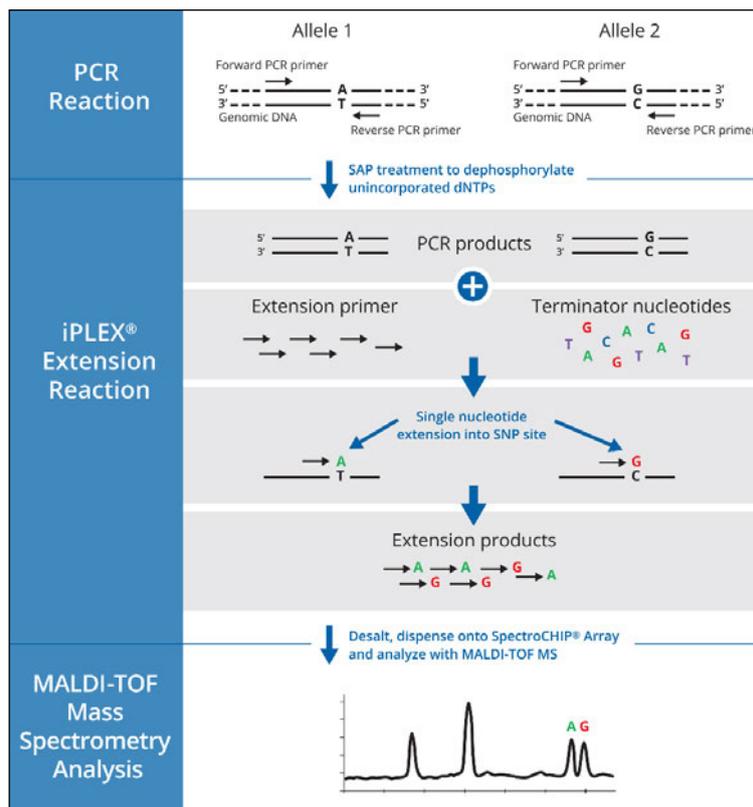
werden. Die Methode arbeitet weiterhin Bisulfit-frei, was einen sehr geringen DNA-Einsatz in die Reaktion ermöglicht. Der erfolgreiche Nachweis von Methylierungen in zirkulierender Tumor-DNA und die sensitive Detektion dieser bietet außerdem Ansatzmöglichkeiten weiterer Anwendungen zur frühzeitigen Erkennung anderer Krebsarten.

## 5 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die Eigenschaften und der Ablauf der iPLEX Pro Biochemie, auf der die meisten Anwendungen der Firma Agena Bioscience basieren, erläutert. Weiterhin wird auf das zur Messung genutzte Massenspektrometer und auf die beiden genutzten Anwendungen genauer eingegangen. Bei den Anwendungen handelt es sich um das Liquid IQ Panel zur Voranalyse von cfDNA und das Breast Methylation Panel zur Detektion auf Brustkrebs-Biomarker.

### 5.1 iPLEX Pro Biochemie

Die iPLEX Pro Biochemie beschreibt das Verfahren zur Detektion von verschiedenen Genotypen in einer DNA-Probe. Am Ende des Verfahrens können die unterschiedlichen Genotypen aufgrund der Massenunterschiede der betreffenden Nukleotide nachgewiesen werden. Die beiden verwendeten Panel (Liquid IQ & Breast Methylation Panel) der Firma Agena basieren auf dieser Chemie.



**Abbildung 10:** iPLEX Pro Verfahren zur Detektion verschiedener Genotypen durch ihre Massen. Die Chemie umfasst die Amplifikation der genomischen DNA durch eine PCR gefolgt von einem Verdauungsschritt durch Shrimp-Alkaline-Phosphatase. In der Extension Reaktion wird das Amplifikationsprodukt um eine Base verlängert. Je nachdem welcher Genotyp vorliegt, variiert die Masse der Extension-Produktes.

Das Verfahren (**Abb. 10**) enthält zwei wesentliche Schritte: Die PCR-Reaktion und die anschließende *single-base-Extension* (iPlex Extension Reaktion). Zwischen diesen Schritten erfolgt ein Verdauungsschritt mit *Shrimp-Alkaline-Phosphatase* (SAP). Abschließend findet die Messung und Analyse mit dem MALDI-TOF Massenspektrometer statt.

Durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wird die vorhandene DNA (z.B. genomische DNA oder cfDNA) in der Probe doppelsträngig amplifiziert. Hierbei werden nur Genabschnitte amplifiziert, welche zur Detektion des Genotyps von Bedeutung sind. Amplifiziert werden alle Alleltypen des entsprechenden Genabschnittes der genomischen DNA. Nach der PCR werden vorhandene dNTPs durch Shrimp-Alkaline-Phosphatase dephosphoryliert. Notwendig ist dieser Schritt, da die in der PCR nicht genutzten Nukleotide zu Interferenzen während der Extension-Reaktion führen würde.

In der *single-base-extension* Reaktion wird durch Zugabe von allelspezifischen Primern und modifizierten Nukleotiden (ddNTPs) die amplifizierte genomische DNA verlängert. Dabei lagert sich der Extension Primer bis eine Base vor der Mutationsstelle an die genomische DNA an. An der Mutationsstelle wird die entsprechende Base durch die modifizierten Nukleotide eingebaut. Modifizierte Nukleotide sind am 3'-Ende desoxyliert, sodass kein weiteres Nukleotid angehängt werden kann. Die Nukleotide werden dann auch als Stopp-Nukleotide oder Terminatoren bezeichnet. Entsprechend dem codierenden Strang werden unterschiedliche Stopp-Nukleotide an der Mutationsstelle eingebaut. Die Masse des Reaktionsproduktes variiert je nach eingebauten Stopp-Nukleotid.

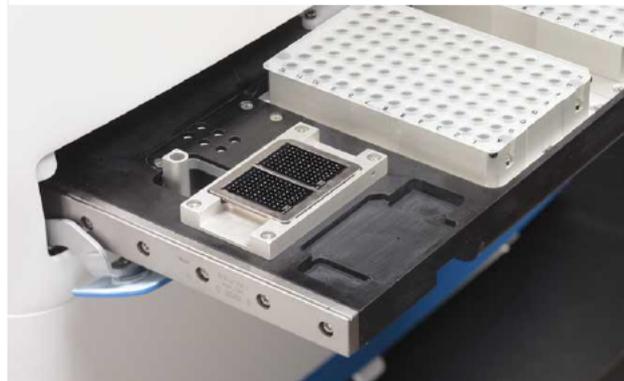
Vor der Messung wird die Probe im Chip-Prep-Module automatisch entsalzt und auf den Chip transferiert. Das Massenspektrometer detektiert die verschiedenen Allele anhand ihrer unterschiedlichen Massen und stellt diese in einem Massenspektrum dar. Über die Höhe des Peaks und einen Kompetitor (Q-Mix), welcher in bekannter Kopienzahl vorhanden ist, wird der Alleltyp quantifiziert. Zusätzlich wird durch einen 3-Punkt-Kalibrant, welcher drei Peaks in bekannter Masse besitzt, die Lage der Peaks im Spektrum korrigiert.

## 5.2 MassArray System

Das verwendete MassArray System besteht aus zwei Komponenten (**Abb. 11**). Dem MassArray Analyzer 4 (MA4) Massenspektrometer (MALDI-TOF MS) und dem Chip-Prep Module (CPM). Im CPM findet die automatisierte Probenvorbereitung und der Transfer zum MA4 statt. Hierbei werden die fertig prozessierten Proben, die sich in 96-Well-Mikrotiterplatten befinden, mit Harz (*resin*) behandelt, welches Salze in der Probe bindet. Ungebundene Salze lagern sich ansonsten an den Analyten an und verändern die Masse. Dies beeinflusst die Auswertung. Das Harz sinkt aufgrund der höheren Dichte auf den Boden des *Wells*. Nach dem Entsalzen werden im CPM wenige Nanoliter der Probe auf einen Siliciumchip (SpectroCHIP) transferiert. Zusätzlich zu den Proben werden wenige Nanoliter des Kalibranten auf den Chip transferiert. Zur Messung der Analyten wird der Chip in das Massenspektrometer eingeschleust. Im MALDI-TOF MS erfolgt die Messung der Proben. Das Messprinzip wird folgend genauer erläutert (**Abb. 13**).



**Abbildung 11: MassArray System. Bestehend aus dem MassArray Analyzer 4 (MA4) und dem Chip-Prep-Module (CPM).**



**Abbildung 12: Chip-Prep-Module Deck. Zu sehen ist die 96-Well Platte, der Siliciumchip (SpectroCHIP) und der Kalibrant.**

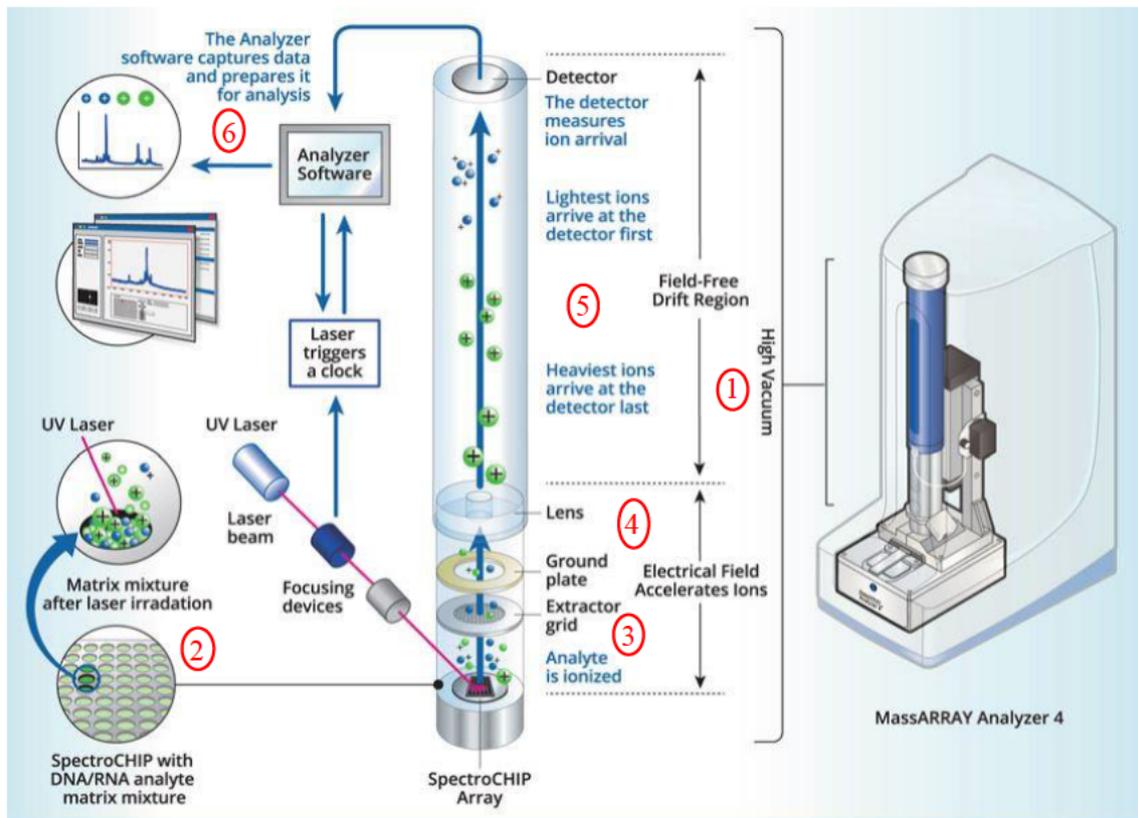


Abbildung 13: MassARRAY System (Ellis und Ong 2017). Die Abbildung zeigt das MALDI-TOF Massenspektrometer. Der Laser desorbiert die Matrix und den Analyten, welche sich auf dem SpectroCHIP befinden, sodass diese kokristallisieren. Durch den Übergang von einem Proton von der Matrix auf den Analyten erhält dieser eine positive Ladung. Durch ein angelegtes Spannungsfeld zwischen dem Chip und einem Gitter (Extractor grid) wird der Analyt beschleunigt und trifft nach einer Trennungsstrecke auf einen Detektor. Die vom Detektor gemessenen Signale werden von der Analyzer Software ausgewertet und als Spektren dargestellt.

Die Funktionsweise des Massenspektrometers beruht auf dem Prinzip des MALDI-TOF MS (matrix-assistierte Laser Desorption/Ionisierung – Time of Flight Massenspektrometrie). Die Messung erfolgt folgendermaßen.

1. Im Massenspektrometer herrscht ein Vakuum. Auf dem SpectroChip ist die Matrix mit dem Analyten kristallisiert.
2. Ein UV-Laser feuert nacheinander auf die Positionen auf dem Chip, auf der sich die Matrix zusammen mit der Probe befinden. Die Moleküle des Analyten werden durch die Desorption ionisiert. Durch den Transfer eines Protons von der Matrix auf die Moleküle des Analyten werden alle Moleküle mit einer positiven Ladung von +1 geladen. Es entsteht eine positiv geladene Gaswolke über der Chipoberfläche.
3. Der Chip und das Gitter (*Extractor grid*), welches wenige Zentimeter über dem Chip angebracht ist, weisen beide eine Spannung von 20 kV auf. Durch einen Spannungsab-

fall von -3 kV auf 17 kV am Gitter, wird der geladene Analyt in Richtung des Gitters beschleunigt. Hierbei werden Analyten mit geringerer Masse schneller beschleunigt als Analyten mit höherer Masse.

4. Direkt nach dem Gitter folgt eine Erdung (*ground plate*), durch die die Spannung auf 0 kV gesetzt wird. Die positiv geladenen Moleküle geraten in ein Feld-freie Drift Region (*field free drift region*), in der sie nicht mehr beschleunigt werden.
5. Mit ihrer erlangten Geschwindigkeit werden sie über die Wegstrecke bis zum Detektor getrennt. Gelenkt werden sie dabei durch eine Linse (*lens*).
6. Beim Auftreffen des Analyten auf den Detektor werden digitale Signale erzeugt, welche durch die Software als Massenspektren dargestellt werden. Aufgetragen wird die Masse in Dalton gegen die Signalintensitäten. Die Masse verhält sich proportional zur Flugdauer. Durch die Breite des Spektrums von 4000 Da bis 9000 Da können mehrere Analyten gleichzeitig gemessen werden. (Crescence 2020)

### 5.3 Voranalyse von cfDNA

Vor der eigentlichen Analyse wird die cfDNA aus der Flüssigbiopsie hinsichtlich verschiedener Parameter mit dem Liquid IQ Panel der Firma Agena Bioscience untersucht. Wichtige Parameter sind dabei die Länge der Fragmente, die Konzentration und der Anteil möglicher gDNA-Kontamination.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt dabei über die Anzahl an amplifizierten Kopien der DNA (*amplifiable copies*), wobei 303 *amplifiable copies* einer cfDNA-Menge von 1 ng entsprechen (Crescence). Neben der Messung der Quantität wird mit der Anwendung ebenfalls die cfDNA auf ihre Qualität untersucht. cfDNA-Fragmente weisen eine Länge von 120-220 bp auf (Alcaide et al. 2020). Längere DNA-Fragmente werden ebenfalls durch das Panel detektiert, wodurch Kontamination durch z.B. DNA von weißen Blutkörpern angezeigt wird. Das Panel benötigt zur Messung mit 1,5  $\mu\text{L}$  nur ein kleines Probenvolumen, um möglichst viel der üblicherweise geringen Menge an cfDNA in die eigentliche Analyse (iPlex Breast Methylation) einsetzen zu können. (Lamy et al. 2020)

Wichtig ist die Konzentrationsbestimmung für das iPlex Breast Methylation Panel. Damit die Anwendung optimal funktioniert, wird eine DNA-Menge von etwa 10 ng empfohlen. Ist die DNA-Konzentration zu niedrig, verliert das Panel an Sensitivität. Wird zu viel cfDNA in die

Reaktion eingebracht, ist die PCR überladen und der Quantifizierungsbereich der Kalibratoren wird überschritten.

Der Ablauf folgt der iPlex Pro Chemie wie in Kapitel 5.1 beschrieben. Nach der PCR-Reaktion und der SAP-Reaktion folgt die single-base-extension Reaktion. Anschließend wird die Probe mit dem MassArray System gemessen.

### 5.4 Breast Methylation Panel v1.0

Das iPlex Breast Methylation Panel ist eine neuartige Anwendung zur Erkennung von methylierten Brustkrebs-Biomarkern. Entwickelt wurde die Anwendung im Rahmen des Forschungsprojektes „Liquid biopsies and IMAGING for improved cancer care“ (LIMA) in Zusammenarbeit mit der europäischen Union. Das Ziel dieses Projektes ist die Entwicklung und Validierung eines Verfahrens, welches die Flüssigbiopsie nutzt, um dynamische Tumore effizient zu charakterisieren. (Agena Bioscience 2021)

Das Breast Methylation Panel basiert auf dem Prinzip iPlex Pro Biochemie mit der Abwandlung, dass vor der PCR-Reaktion unmethylierte DNA mithilfe von Restriktionsenzymen zerschnitten wird. Durch diesen Schritt wird gewährleistet, dass nur methylierte DNA amplifiziert wird. Weiterhin folgt nach der PCR ein Verdauschritt von allen Enzymen in der Probe durch Protease.

Ausgewählt wurden die Marker nach ihren Eigenschaften im Methylierungsgrad. Die Marker weisen bei gesunden Patienten einen niedrigen Methylierungsgrad auf, der sich bei Patienten mit Brustkrebs stark erhöht. Bei den Markern handelt es sich um *AKR1B1*, *ARHGEF7*, *COL6A2*, *GPX7*, *HIST1H3C*, *RASGRF2*, *RASSF1*, *TM6SF1* und *TMEFF2*. (Fackler et al. 2014) Neben den neun Markern wurden weiterhin *APC*, *FOXA1* und *SCGB3A1* (Nunes et al. 2018), *BRCA1* (Radpour et al. 2011) und *MDG1-FAB3* (Cassinotti et al. 2012) zu dem Panel hinzugefügt, welche ebenfalls geringe Methylierung in Proben gesunder Probanden aufweisen und hochmethyliert in Proben von Brustkrebspatienten sind. Insgesamt umfasst das Panel 14 verschiedene Brustkrebs-Biomarker. Weiterhin sind drei Marker zur Quantifizierung der DNA-Menge vorhanden (*ALB*, *APOE* und *RNaseP*) und zwei Marker (*LDHA* und *POP5*), durch die der Erfolg des Verdauschrittes (*Digestion*) kontrolliert wird.

Optimalerweise wird in die PCR Reaktion der Anwendung eine cfDNA-Menge von 10 ng eingebracht, um die Sensitivität der Anwendung zu optimieren. Mit sinkender cfDNA-Menge verliert die Anwendung an Sensitivität.

*Tabelle 3: Genutzte Reagenzien mit Volumina des iPlex Breast Methylation Panels. Die Anwendung besteht aus fünf einzelnen Reaktionen, für die die Reagenzien mit ihrem entsprechend genutzten Volumen angegeben sind. Die Probe wird entsprechend ihrer Konzentration hinzugegeben. Hochkonzentrierte Proben werden in geringerem Volumen hinzugegeben und mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Nach dem Proteinverdau werden 5 µL des Reaktionsproduktes entnommen und in eine neue 96-Well Platte überführt. Dort folgt die Shrimp-Alkaline Phosphatase Reaktion in geringerem Volumen.*

Reaktion	Benutzte Reagenzien	Volumen per Reaktion in µL
DNA Digestion	• Digestion Puffer	3,20
	• Digestion Enzym	9,44
	• Probe	22,36
Polymerase-Chain Reaktion	• ddH <sub>2</sub> O	4,30
	• 10x PCR Puffer	6,00
	• MgCl <sub>2</sub>	4,80
	• dNTP's	1,50
	• PCR Enzym	2,40
	• PCR Primer Mix	5,00
	• Q-Mix	1,00
Protein Digestion	• ddH <sub>2</sub> O	3,70
	• Protease	1,30
Shrimp-Alkaline Phosphatase	• ddH <sub>2</sub> O	1,53
	• SAP Puffer	0,17
	• SAP Enzym	0,30
single-base Extension	• ddH <sub>2</sub> O	0,619
	• iPlex Puffer Plus	0,20
	• iPlex Termination Mix	0,20
	• iPlex Pro Enzym	0,041
	• Extend Primer	0,94

#### 5.4.1. Adjustierung der PCR-Primer

Zur Optimierung der Anwendung werden die PCR Primer des iPlex Breast Methylation Panels adjustiert. Die PCR-Primer werden in der Polymerase-Ketten-Reaktion gebraucht, um die Amplifizierung der cfDNA zu starten. Hierbei binden sie an die cfDNA und geben einen Startpunkt für die DNA-Polymerase, welcher weitere Nukleotide verknüpft. Sie zu justieren bedeutet, dass sie eine möglichst hohe Bindungsrate erreichen. Je mehr Primer während einer PCR binden, desto effizienter kann die Amplifizierung ablaufen. Bindet ein Primer nur selten, wird der entsprechende Genabschnitt geringer amplifiziert, wodurch dieser in der Messung nicht sensitiv erfasst werden kann. Vor allem bezogen auf tumor-DNA, welche sehr gering konzentriert ist, ist eine hohe Bindungsrate des PCR-Primers wichtig, damit die Anwendung möglichst sensitiv ist.

Ausgelegt wurde der neue PCR-Primer Mix auf ein Gesamtvolumen von 25 mL in einer Konzentration von 0,2  $\mu\text{mol}$ . Gelöst wurden die PCR Primer in ddH<sub>2</sub>O. Von den Primern ( $c = 500 \mu\text{mol}$ ) wurde immer gleichermaßen vom *forward*-Primer als auch vom *reverse*-Primer hinzugegeben. Weiterhin wurde Lachssperma-DNA im Überschuss ( $c = 1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ) hinzugefügt, um das Bilden von Primer-Dimeren zu verhindern. Validiert wurde der neue PCR Primer Mix mit HapMap Proben und Methylierungsstandards. Bei Methylierungsstandards sind definierte Prozentanteile der DNA methyliert.

Folgender Versuchsansatz wurde zur Optimierung und Validierung des PCR-Primer Mixes vorgenommen. Gemessen wurden insgesamt 44 HapMap (HM) Proben sowie vier Negativkontrollen (NTC). Bei HapMap Proben handelt es sich um unterschiedliche genomische DNA, die als Wildtyp dienen. Eingesetzt wurden jeweils 10 ng DNA. Hierdurch wird die Effizienz der PCR für jeden Marker an die DNA getestet. Weiterhin werden Methylierungsstandards von 100% bis 0% gemessen. Bei allen Methylierungsstandards werden 5 ng in die Reaktion eingebracht.

**Tabelle 4: Platenlayout einer 96-well Platte zur Bestimmung der Bindungsrate der PCR-Primer. Gemessen werden insgesamt 44 HapMap (HM) Proben sowie Methylierungsstandards (100% - 0%) mit verschiedenen Methylierungsgraden in Triplikaten. Negativkontrollen dienen als Kontaminationskontrollen.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HM	HM	HM	HM	HM	HM				100%	100%	100%
B	HM	HM	HM	HM	HM	HM				75%	75%	75%
C	HM	HM	HM	HM	HM	HM				50%	50%	50%
D	HM	HM	HM	HM	HM	HM				25%	25%	25%
E	HM	HM	HM	HM	HM	HM				10%	10%	10%
F	HM	HM	HM	HM	HM	HM				5%	5%	5%
G	HM	HM	HM	HM	HM	HM				0%	0%	0%
H	NTC	HM	NTC	NTC	HM	NTC				NTC	NTC	NTC

Nach der Messung wurde die Bindungsrate der einzelnen Marker ausgewertet. Angestrebt wird eine Bindungsrate von über 80%, wobei jedoch jeder Marker durch verschiedene Einflüsse beeinflusst wird. Eine zu hohe Konzentration eines Primers kann zur Bildung von Dimeren oder zu Adsorption an der Gefäßwand führen. Zudem sind einige Marker für das Gesamtergebnis aussagekräftiger als andere, sodass diese in der Adjustierung stärker berücksichtigt werden.

## Danksagung

Ein großes Dank geht an meinen Betreuer Alexander Sartori, welcher mich während der ganzen Zeit der Bachelorarbeit und des Hauptpraktikums unterstützt hat und mir großes Vertrauen entgegengebracht hat. Dank ihm kam diese Bachelorarbeit, zu diesem sehr interessanten Thema erst zustande. Weiterhin will ich mich bei Maroje Krajina und Maria Medina Mesa bedanken für ihre Unterstützung im Labor, bei der Auswertung und bei meinen vielen Fragen. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei der Firma Agena Bioscience bedanken für die Möglichkeit für fast ein Jahr Teil des Teams sein zu dürfen und die Möglichkeit zu erhalten mich weiterzuentwickeln und auszuprobieren.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Julien Béthune, welcher sich meiner Bachelorarbeit angenommen hat trotz den schwierigen Voraussetzungen durch die Pandemie. Ich wünsche Ihnen sehr viel Erfolg in ihrer Zeit als Professor an der HAW.

Ein weiterer Dank geht an meine Familie, meine Freundin und meine Freunde, ohne die dieses Studium nicht möglich gewesen wären. Ich danke für jeden Ratschlag und jede Unterstützung in den letzten vier Jahren dieses Studiums.

---

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit ohne fremde Hilfe selbstständig verfasst und nur die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Ferner sind die verwendeten Tabellen, Grafiken, Bilder und andere Materialien richtig zitiert, oder selbstständig erstellt worden. Wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Werken entnommene Stellen sind unter Angabe der Quellen gemäß wissenschaftlicher Zitierregeln kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form in keiner Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

---

Ort, Datum

---

(Knust, Eike Sören)

---

## **Literaturverzeichnis**

Agena Bioscience (2021): Agena Bioscience's Liquid Biopsy Technology Awarded Horizon 2020 Grant by European Union. Online verfügbar unter

<http://www.agenabio.com/company/press-release/agenas-liquid-biopsy-technology-awarded-eus-horizon-2020-research-grant/>, zuletzt aktualisiert am 20.07.2021, zuletzt geprüft am 20.07.2021.

Akram, Muhammad; Iqbal, Mehwish; Daniyal, Muhammad; Khan, Asmat Ullah (2017): Awareness and current knowledge of breast cancer. In: *Biological Research* 50 (1), S. 33. DOI: 10.1186/s40659-017-0140-9.

Alcaide, Miguel; Cheung, Matthew; Hillman, Jack; Rassekh, S. Rod; Deyell, Rebecca J.; Batist, Gerald et al. (2020): Evaluating the quantity, quality and size distribution of cell-free DNA by multiplex droplet digital PCR. In: *Sci Rep* 10 (1), S. 12564. DOI: 10.1038/s41598-020-69432-x.

Banys-Paluchowski, Maggie; Krawczyk, Natalia; Fehm, Tanja (2020): Liquid Biopsy in Breast Cancer. In: *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 80 (11), S. 1093–1104. DOI: 10.1055/a-1124-7225.

Campos-Carrillo, Andrea; Weitzel, Jeffrey N.; Sahoo, Prativa; Rockne, Russell; Mokhnatkin, Janet V.; Murtaza, Muhammed et al. (2020): Circulating tumor DNA as an early cancer detection tool. In: *Pharmacology & therapeutics* 207, S. 107458. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.107458.

Cassinotti, Elisa; Melson, Joshua; Liggett, Thomas; Melnikov, Anatoliy; Yi, Qilong; Replogle, Charles et al. (2012): DNA methylation patterns in blood of patients with colorectal cancer and adenomatous colorectal polyps. In: *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer* 131 (5), S. 1153–1157. DOI: 10.1002/ijc.26484.

Crescence, Maryam: Ultrasensitive Detection of Lung Cancer Mutation Pattern Favoring Minimal Invasive Liquid Biopsy - An Experimental Approach. Ultrasensitive Detection of Lung Cancer Mutation Pattern Favoring Minimal Invasive Liquid Biopsy - An Experimental Approach. Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg. Online verfügbar unter <https://reposit.haw-hamburg.de/handle/20.500.12738/9302>.

Elazezy, Maha; Joosse, Simon A. (2018): Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. In: *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16, S. 370–378. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.10.002.

---

Ellis, Justine A.; Ong, Benjamin (2017): The MassARRAY® System for Targeted SNP Genotyping. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1492, S. 77–94. DOI: 10.1007/978-1-4939-6442-0\_5.

Fackler, Mary Jo; Lopez Bujanda, Zoila; Umbrecht, Christopher; Teo, Wei Wen; Cho, Soon-weng; Zhang, Zhe et al. (2014): Novel methylated biomarkers and a robust assay to detect circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. In: *Cancer research* 74 (8), S. 2160–2170. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3392.

Galladium (2021): Breast cancer: P53 deletion promotes cancer cell metastasis. In: *Galladium*, 23.01.2021. Online verfügbar unter <https://medicaltrend.org/2021/01/22/breast-cancer-p53-deletion-promotes-cancer-cell-metastasis/>, zuletzt geprüft am 23.07.2021.

Lamy, Pierre-Jean; van der Leest, Paul; Lozano, Nicolas; Becht, Catherine; Duboeuf, Frédérique; Groen, Harry J. M. et al. (2020): Mass Spectrometry as a Highly Sensitive Method for Specific Circulating Tumor DNA Analysis in NSCLC: A Comparison Study. In: *Cancers* 12 (10). DOI: 10.3390/cancers12103002.

Muhammad Naeem et al (2019): Risk factors, genetic mutations and prevention of breast cancer 2019. Online verfügbar unter [https://www.researchgate.net/profile/Muhammad-Hayat-14/publication/335992813\\_Risk\\_factors\\_genetic\\_mutations\\_and\\_prevention\\_of\\_breast\\_cancer/links/5e4e2c64a6fdccd965b40000/Risk-factors-genetic-mutations-and-prevention-of-breast-cancer.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Muhammad-Hayat-14/publication/335992813_Risk_factors_genetic_mutations_and_prevention_of_breast_cancer/links/5e4e2c64a6fdccd965b40000/Risk-factors-genetic-mutations-and-prevention-of-breast-cancer.pdf), zuletzt geprüft am 17.04.2021.

Nunes, Sandra P.; Moreira-Barbosa, Catarina; Salta, Sofia; Palma de Sousa, Susana; Pousa, Inês; Oliveira, Júlio et al. (2018): Cell-Free DNA Methylation of Selected Genes Allows for Early Detection of the Major Cancers in Women. In: *Cancers* 10 (10), S. 357. DOI: 10.3390/cancers10100357.

Radpour, Ramin; Barekati, Zeinab; Kohler, Corina; Lv, Qing; Bürki, Nicole; Diesch, Claude et al. (2011): Hypermethylation of tumor suppressor genes involved in critical regulatory pathways for developing a blood-based test in breast cancer. In: *PLoS ONE* 6 (1), e16080. DOI: 10.1371/journal.pone.0016080.

Sun, Yi-Sheng; Zhao, Zhao; Yang, Zhang-Nv; Xu, Fang; Lu, Hang-Jing; Zhu, Zhi-Yong et al. (2017): Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. In: *International Journal of Biological Sciences* 13 (11), S. 1387–1397. DOI: 10.7150/ijbs.21635.

---

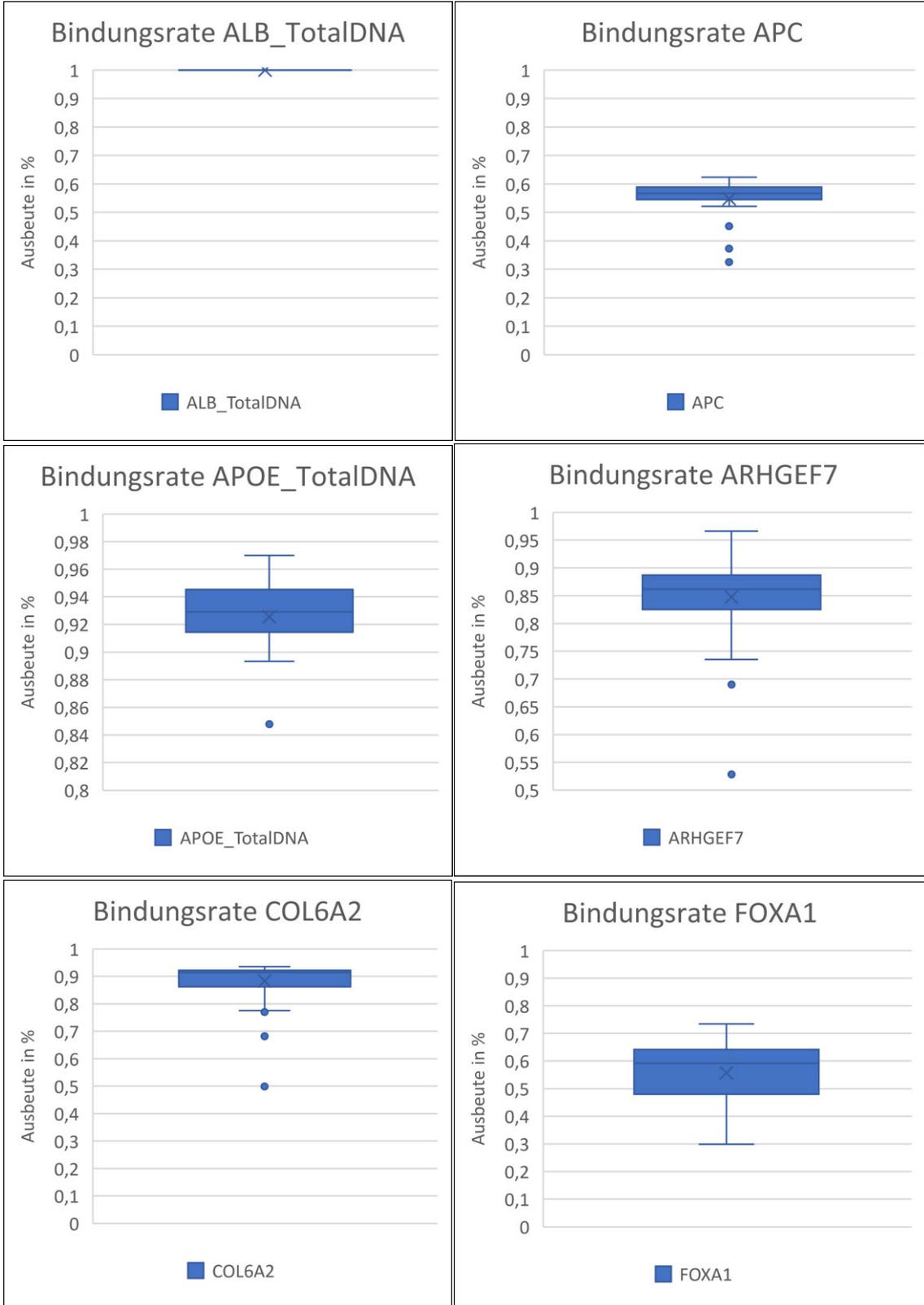
World Health Organization (2021): World Health Organization. Online verfügbar unter [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1), zuletzt aktualisiert am 20.07.2021, zuletzt geprüft am 20.07.2021.

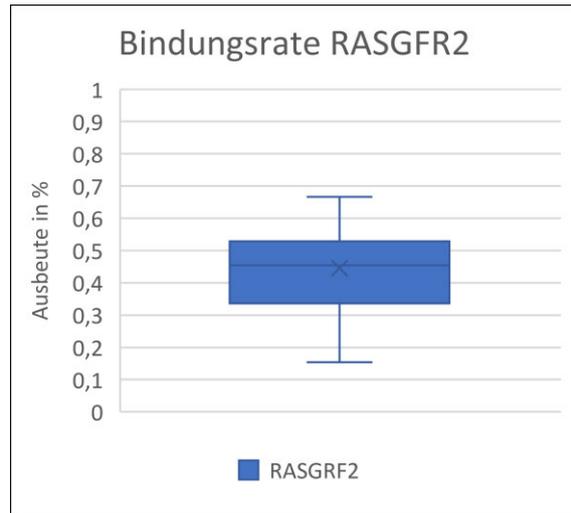
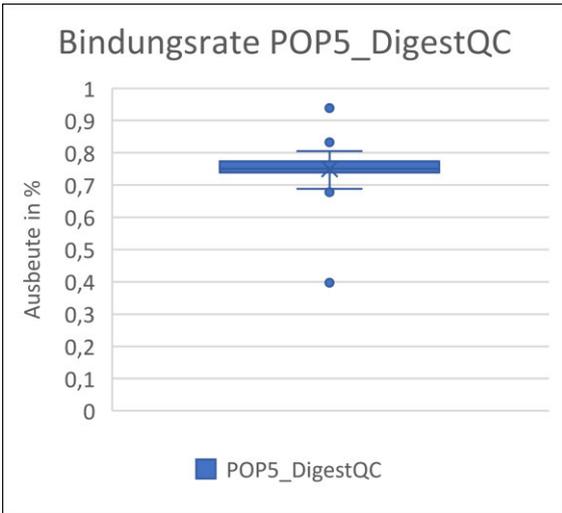
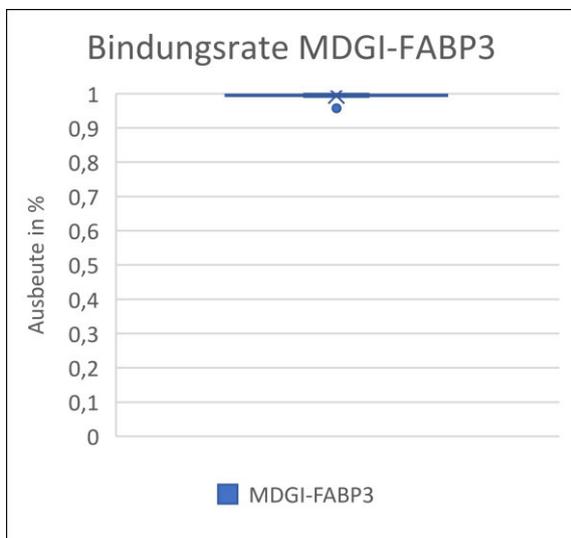
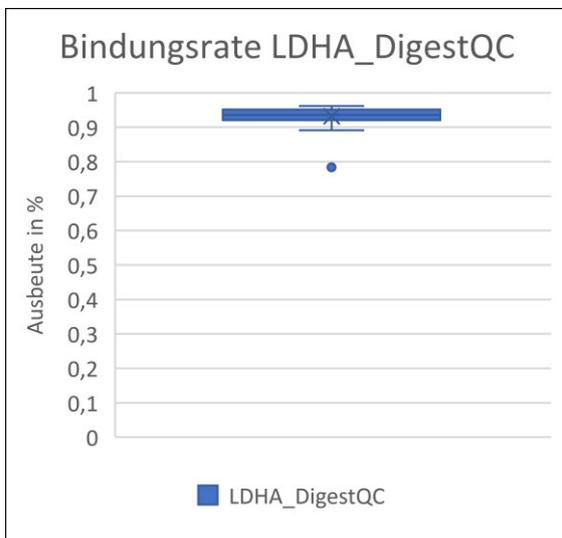
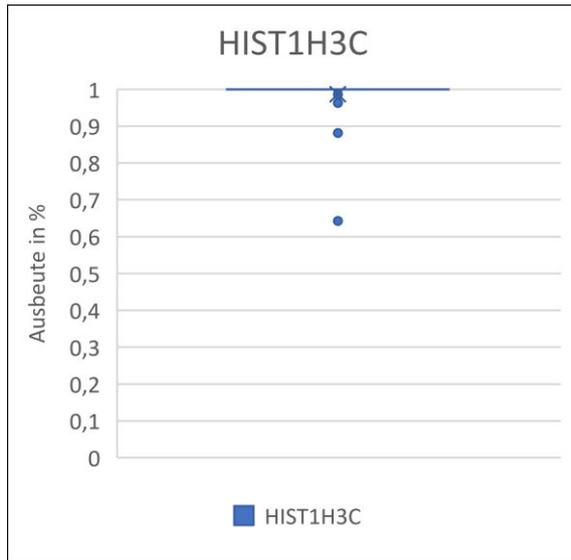
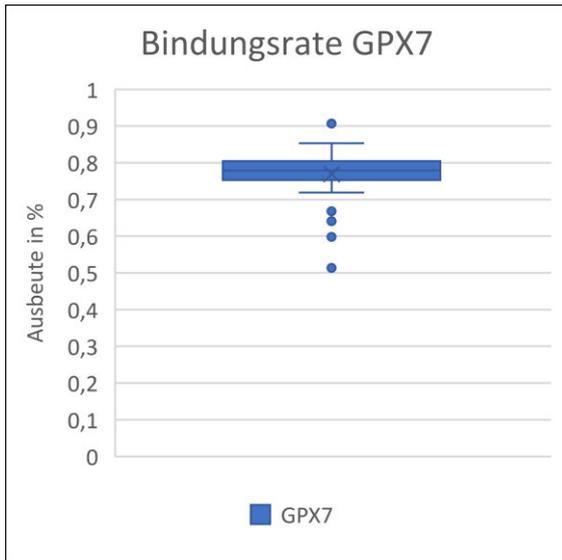
# Anhang

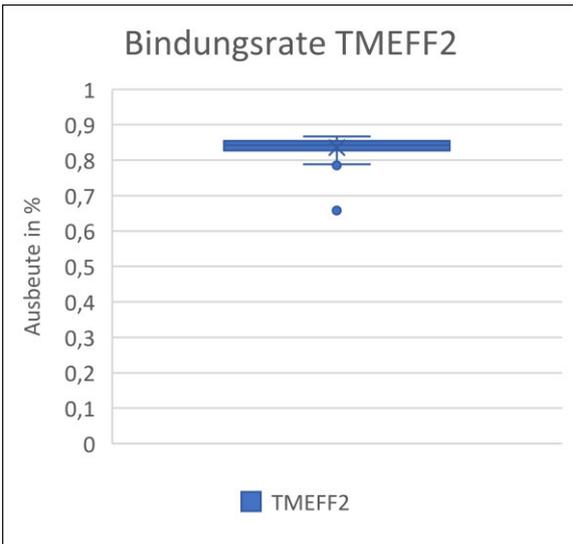
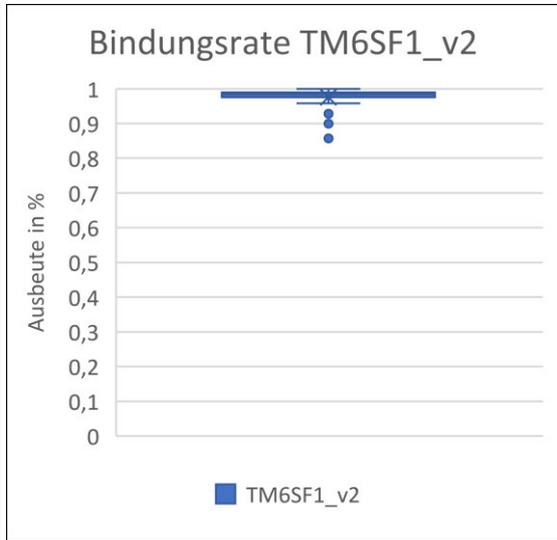
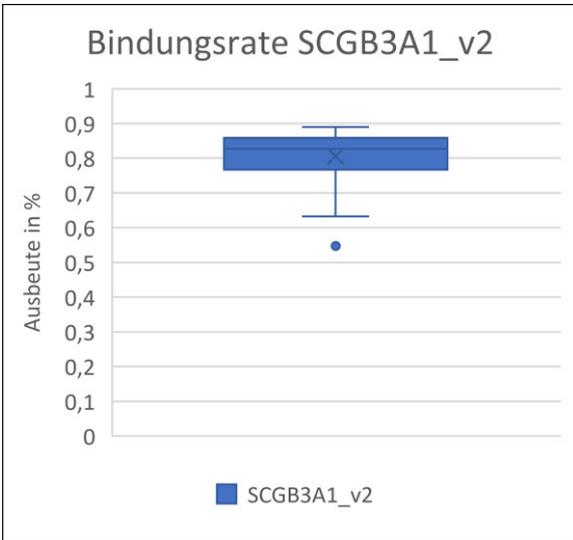
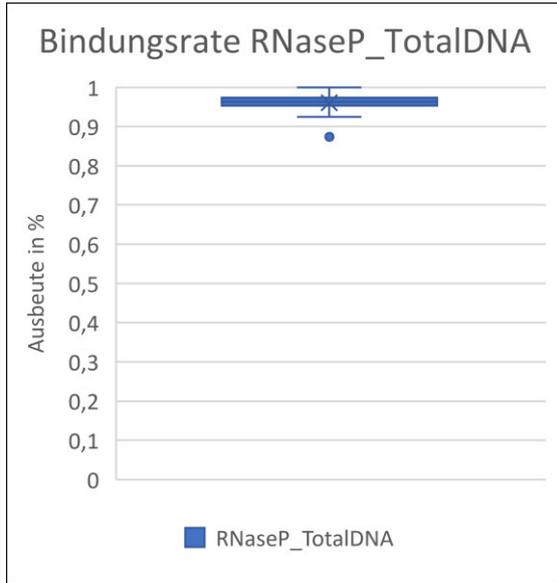
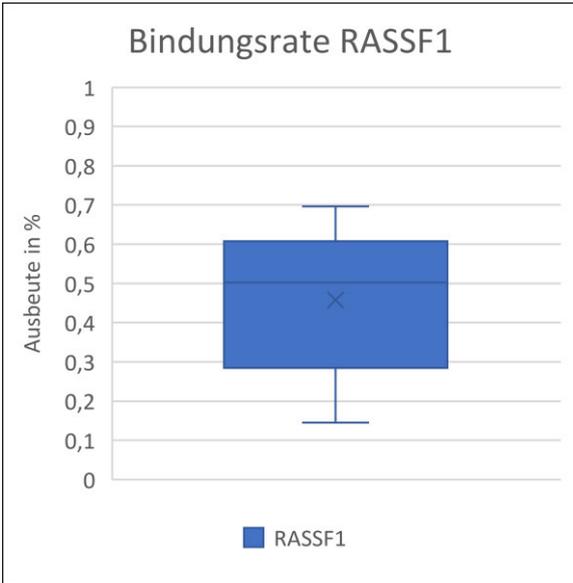
## Anlage A:

Well Number	Table 1	Stock Conc. (µM)	Volume (µl)	Multiplier	Plate Well	Adjustment 1	Adjustment 1 Addition 1	Adjustment 2	Adjustment 2 Addition 2	Adjustment 3	Adjustment 3 Addition 3	Adjustment 4	Adjustment 4 Addition 4	Adjustment 5	Adjustment 5 Addition 5	Total (µl)
MDG1-FABP3-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A01												100.0
COL6A2-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A02		0.5	50.0									150.0
ARRGF7-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A03		0.5	50.0									150.0
TM68F1_v2-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A05		1.0	100.0	0.20	40.0							240.0
HIST1H3C-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A06		0.0	0.0	0.20	20.0							120.0
APOE_TotalDNA-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A07		0.0	0.0	0.25	25.0							125.0
GFY1-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A08		0.0	0.0	0.40	40.0							140.0
APC-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A09												100.0
TM6FF2-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A10		0.0	0.0	0.30	30.0							130.0
FOXA1-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A11												100.0
RASGEF2-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 A12												100.0
AKR1B1-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B01		1.0	100.0	0.20	40.0							140.0
POP5_DigestQC-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B02		1.0	100.0	0.40	80.0							280.0
SCGB3A1_v2-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B03		1.0	100.0	0.40	80.0							280.0
ALB_TotalDNA-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B04		0.0	0.0	0.20	20.0							120.0
ENaseP_TotalDNA-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B05		0.0	0.0	0.50	50.0							150.0
RASSF1-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B06		0.0	0.0	0.25	25.0							125.0
LDHA_DigestQC-P1	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B07		0.5	50.0									150.0
LDHA_DigestQC-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B08		0.0	0.0	0.30	30.0							130.0
MDG1-FABP3-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B09												100.0
COL6A2-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B10		0.5	50.0									150.0
ARRGF7-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 B11		0.5	50.0									150.0
TM68F1_v2-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C01		1.0	100.0	0.20	40.0							240.0
HIST1H3C-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C02		0.0	0.0	0.20	20.0							120.0
APOE_TotalDNA-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C03		0.0	0.0	0.25	25.0							125.0
GFY1-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C04		0.0	0.0	0.40	40.0							140.0
APC-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C05												100.0
TM6FF2-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C06		0.0	0.0	0.30	30.0							130.0
FOXA1-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C07												100.0
RASGEF2-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C08												100.0
AKR1B1-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C09		1.0	100.0	0.20	40.0							240.0
POP5_DigestQC-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C10		1.0	100.0	0.40	80.0							280.0
SCGB3A1_v2-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C11		1.0	100.0	0.40	80.0							280.0
ALB_TotalDNA-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 C12		0.0	0.0	0.20	20.0							120.0
BRC11-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 D01		0.0	0.0	0.50	50.0							150.0
ENaseP_TotalDNA-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 D02		0.0	0.0	0.25	25.0							125.0
RASSF1-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 D03		0.5	50.0									150.0
LDHA_DigestQC-P2	20190507_LIMA_Breast_Meth_v2	50	100.0	1.0 D04		0.0	0.0	0.30	30.0							130.0

Anlage B:







Anlage C:

Sample	SNP Calls	Amplifiable Copies	WBC Contamination	Long DNA Template	Gender	Konz.
1	21	88	0%	Detected	F	0,29
2	21	95	0%	Detected	F	0,31
3	21	51	100%	Detected	F	0,17
4	20	48	0%	Detected	F	0,16
5	20	47	2%	Detected/Not Detected	F	0,16
6	20	34	3%	Detected	F	0,11
7	21	101	32%	Detected	F	0,33
8	20	55	2%	Detected	F	0,18
9	20	49	4%	Detected/Not Detected	F	0,16
10	20	106	0%	Detected	F	0,35
11	20	33	0%	Detected	F	0,11
12	20	31	0%	Detected	F	0,10
13	20	65	2%	Detected	F	0,21
14	21	83	1%	Detected/Not Detected	N/A	0,27
15	20	121	0%	Detected	F	0,40
16	21	73	0%	Detected	F	0,24
17	20	40	0%	Detected/Not Detected	F	0,13
18	21	78	0%	Detected	F	0,26
19	20	68	79%	Detected	F	0,22
20	21	143	0%	Detected	F	0,47
21	21	58	2%	Detected	M	0,19
22	19	35	3%	Detected	F	0,12
23	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
24	21	80	0%	Detected/Not Detected	F	0,26
25	21	107	0%	Detected	F	0,35
26	20	40	3%	Detected/Not Detected	F	0,13
27	21	81	1%	Detected/Not Detected	F	0,27
28	20	55	13%	Detected	F	0,18
29	20	70	1%	Detected	F	0,23
30	20	36	36%	Detected	F	0,12
31	19	37	5%	Detected	F	0,12
32	20	76	3%	Detected	F	0,25
33	20	86	76%	Detected	F	0,28
34	21	34	100%	Detected	F	0,11
35	19	48	0%	Detected/Not Detected	F	0,16
36	21	70	13%	Detected	F	0,23
37	20	96	0%	Detected	F	0,32
38	20	62	100%	Detected	F	0,20
39	21	61	62%	Detected	F	0,20
40	21	53	100%	Detected	F	0,17
41	19	50	0%	Detected	F	0,17
42	20	147	0%	Detected	F	0,49
43	20	78	1%	Detected	F	0,26
44	20	50	16%	Detected	F	0,17
45	21	68	13%	Detected	F	0,22
46	20	75	0%	Detected	F	0,25
47	21	67	24%	Detected	F	0,22
48	21	172	10%	Detected	F	0,57
49	20	48	17%	Detected	N/A	0,16
50	20	92	1%	Detected	F	0,30
51	21	108	0%	Detected	F	0,36
52	21	59	0%	Detected	F	0,19
53	21	77	0%	Detected	F	0,25
54	20	82	1%	Detected	F	0,27
55	21	70	69%	Detected	F	0,23
56	20	88	15%	Detected	F	0,29
57	21	139	28%	Detected	F	0,46

Anlage D:

Sample	SNP Calls	Amplifiable Copies	WBC Contamination	Long DNA Template	Gender	Konz.
1	16	137	0%	Not Detected	F	0,45
2	14	94	0%	Detected/Not Detected	F	0,31
3	15	294	13%	Detected	F	0,97
4	16	58	0%	Detected/Not Detected	F	0,19
6	20	149	5%	Detected/Not Detected	F	0,49
7	19	75	1%	Detected	F	0,25
8	16	106	5%	Detected/Not Detected	F	0,35
9	14	292	0%	Detected/Not Detected	F	0,96
10	13	185	37%	Not Detected	F	0,61
11	18	221	0%	Detected/Not Detected	F	0,73
12	17	162	0%	Detected/Not Detected	F	0,53
13	17	121	2%	Detected/Not Detected	F	0,40
14	18	275	28%	Detected	F	0,91
15	16	62	8%	Detected/Not Detected	F	0,20
16	16	87	24%	Detected	F	0,29
17	16	129	1%	Detected/Not Detected	F	0,43
19	19	138	14%	Detected/Not Detected	F	0,46
20	17	88	0%	Detected/Not Detected	F	0,29
21	13	119	0%	Detected	F	0,39
22	17	142	0%	Detected/Not Detected	F	0,47
23	18	161	11%	Detected	F	0,53
24	14	317	1%	Not Detected	F	1,05
25	12	119	0%	Detected/Not Detected	F	0,39
26	18	303	0%	Detected/Not Detected	F	1,00
27	16	93	0%	Detected	F	0,31
28	19	104	0%	Detected	F	0,34
29	20	349	1%	Detected/Not Detected	F	1,15
30	14	231	3%	Detected/Not Detected	F	0,76
31	16	118	0%	Detected/Not Detected	F	0,39
32	17	447	0%	Not Detected	F	1,48
33	21	972	0%	Not Detected	F	3,21
34	11	706	0%	Not Detected	F	2,33
35	19	62	0%	Detected	F	0,20
36	17	54	0%	Detected/Not Detected	F	0,18
37	18	57	0%	Detected	N/A	0,19
38	15	159	0%	Detected	F	0,52
39	17	130	0%	Detected/Not Detected	F	0,43
40	16	79	3%	Detected/Not Detected	F	0,26
41	17	102	0%	Detected/Not Detected	F	0,34
42	16	73	4%	Detected	F	0,24
43	17	133	0%	Detected	F	0,44
44	17	107	0%	Detected	F	0,35
45	19	170	0%	Detected	F	0,56
46	19	1023	0%	Detected/Not Detected	F	3,38
47	20	227	1%	Detected	F	0,75
48	19	125	0%	Detected/Not Detected	F	0,41