



Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg

Fakultät Life Sciences

Entwicklung eines molekulargenetischen Panels zur
Detektion von Mutationen im *TP53* Gen mittels
ClearSEEK™ Biochemie

BACHELORARBEIT

zur Erlangung des akademischen Grades

Bachelor of Science (B. Sc.)

Bachelorstudienprogramm: Biotechnologie

Adna Dizdaric



Hamburg, Juni 2023

Gutachter:

Prof. Dr. Julien Bethuné (HAW Hamburg)

Dr. Caren Vollmert (Agena Bioscience GmbH)

Die Abschlussarbeit wurde betreut und erstellt im Labor der Firma Agena Bioscience GmbH

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meine Dankbarkeit und meine aufrichtige Anerkennung für all jene Personen und Institutionen zum Ausdruck bringen, die mich während meiner Bachelorzeit unterstützt haben.

Eine besondere Würdigung gilt meiner Betreuerin, Dr. Caren Vollmert, die mich mit fachlicher Expertise, ihrer Geduld, wertvollem Feedback und unermüdlicher Unterstützung begleitet hat. Ihre Anleitung und Ermutigung waren von unschätzbarem Wert und haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ihre motivierenden Worte und professionelle Begleitung an meiner Bachelorarbeit haben mich dazu inspiriert und motiviert, mein Bestes zu geben.

Ebenso möchte ich meinem Betreuer, Prof. Dr. Julien Bethuné meinen herzlichen Dank aussprechen für seine Unterstützung, seine konstruktiven Rückmeldungen und seine engagierte Betreuung.

Ein besonderer Dank gebührt auch der Firma Agena Bioscience, die mir den Zugang zum Labor sowie zu wichtigen Ressourcen, Daten und Technologien ermöglicht hat. Ich möchte mich herzlich beim Herrn Maroje Krajina, Dr. Alexander Sartori und dem gesamten Agena Bioscience Team für ihre Zusammenarbeit und Bereitschaft, ihr Wissen mit mir zu teilen, bedanken.

Des Weiteren möchte ich meinem Mann und meiner Familie meinen tiefsten Dank aussprechen. Ihr unerschütterlicher Glaube an mich, euere Unterstützung und eure bedingungslose Liebe haben mich während meiner gesamten Bachelorzeit gestärkt und ermutigt.

Diese Arbeit widme ich meiner Mutter.

Hamburg, Juni 2023

Adna Dizdagic

Abstract

Mutations are changes in the DNA code of an organism that can be caused by various factors such as radiation or chemicals. Early detection of mutations is important to identify potential health risks and enable more effective treatment. The *TP53* gene plays a crucial role in monitoring DNA integrity, and mutations in it increase the risk of cancer. Therefore, early detection of *TP53* mutations is of great importance, especially in the context of therapy and drug resistance.

In the context of this bachelor's thesis, a panel was developed and validated that contains specific markers for mutations in the *TP53* gene, which occur frequently as hotspots in cancer cases. Additionally, another marker for mutations in the *PIK3CA* gene was included in the panel. The MassARRAY® system, in conjunction with ClearSEEK™ biochemistry, was used for highly sensitive detection of somatic mutations to ensure the required sensitivity for the investigated DNA samples and the expected mutation frequencies. The development of the panel included marker list creation, assay design, iPLEX® Pro and ClearSEEK™ verification, as well as optimization.

The developed ClearSEEK™ *TP53* panel showed the targeted sensitivity required for early detection of liquid biopsy samples, with a slightly lower sensitivity for the p.R175H assay. Interestingly, some samples with low copy input, previously identified as negative, were clearly identified as positive in the raw data. This emphasizes the importance of careful evaluation of raw data to prevent false-negative results. Further validations with clinical samples and alternative reference methods are needed to further verify the reliability of the panel. These will be conducted outside the scope of this bachelor's thesis. Despite some differences, the samples used for validation showed higher yield with the CPM96 format compared to the CPM384 system. However, also the results of the CPM384 system still allow for reliable application of the panel.

The panel will also serve as a supplement to an existing ClearSEEK™ *PIK3CA* panel. Both genes are involved in the regulation of cell growth and proliferation, and mutations in both genes can lead to tumors and have combined effects.

Zusammenfassung

Mutationen sind Veränderungen im DNA-Code eines Lebewesens, die durch verschiedene Umstände wie Strahlung oder Chemikalien verursacht werden können. Eine frühzeitige Erkennung von Mutationen ist wichtig, um potenzielle Gesundheitsrisiken zu identifizieren und eine wirksamere Behandlung zu ermöglichen. Das *TP53*-Gen spielt eine entscheidende Rolle bei der Überwachung der DNA-Integrität und Mutationen darin erhöhen das Krebsrisiko. Daher ist die frühzeitige Detektion von *TP53*-Mutationen von großer Bedeutung, auch im Zusammenhang mit Therapie- und Wirkstoffresistenzen.

Im Rahmen dieser Bachelorarbeit wurde ein Panel entwickelt und validiert, das spezifische Marker für Veränderungen im *TP53*-Gen enthält, die häufiger als Hotspots bei Krebserkrankungen auftreten. Zusätzlich wurde ein weiterer Marker für Veränderungen im *PIK3CA*-Gen in das Panel aufgenommen. Für den hochsensitiven Nachweis von somatischen Mutationen wurde das MassARRAY®-System in Verbindung mit der ClearSEEK™ Biochemie verwendet, um die erforderliche Empfindlichkeit für die untersuchten DNA-Proben sowie die erwarteten Mutationsfrequenzen zu gewährleisten. Die Entwicklung des Panels umfasste die Erstellung einer Markerliste, das Assay-Design, die iPLEX® Pro- und ClearSEEK-Verifikation sowie die Optimierung.

Das entwickelte ClearSEEK™ *TP53* Panel zeigte eine geringere Sensitivität für den Assay p.R175H. Interessanterweise wurden einige Proben mit niedrigem Kopieninput, die zuvor als negativ identifiziert wurden, in den Rohdaten eindeutig als positiv erkannt. Dies betont die Bedeutung der sorgfältigen Auswertung der Rohdaten, um falsch-negativen Ergebnissen vorzubeugen. Weitere Validierungen mit klinischen Proben und alternativen Referenzmethoden sind benötigt, um die Zuverlässigkeit des Panels weiter zu überprüfen. Diese werden außerhalb des Rahmens dieser vorliegenden Bachelorarbeit durchgeführt. Mit wenigen Ausnahmen zeigten die Proben, die für die Validierung verwendet wurden, eine höhere Ausbeute mit dem CPM96 Format im Vergleich zum CPM384 System. Dennoch ermöglichen auch die Ergebnisse des CPM384 Systems eine zuverlässige Anwendung des Panels.

Das Panel wird zudem als Ergänzung zu einem bestehenden ClearSEEK™ *PIK3CA* Panel dienen. Beide Gene sind an der Regulierung von Zellwachstum und -proliferation beteiligt

und Mutationen in beiden Genen können zu Tumoren führen und kombinierte Auswirkungen haben.

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	1
ABSTRACT	2
ZUSAMMENFASSUNG	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	8
1. EINLEITUNG	9
1.1.1 MOTIVATION	9
1.2 FRAGESTELLUNG.....	10
1.3 VORGEHENSWEISE.....	11
2. TP53	13
3. METHODE	16
3.1 MASSARRAY® ANALYZER 4.....	16
3.2 BIOCHEMIE	18
3.2.1 PCR-Amplifikation	19
3.2.2 SAP-Reaktion	21
3.2.3 Single-Base-Extension Reaktion.....	22
3.3 REPORTING.....	24
3.4 TYPER-SOFTWARE.....	25
4. ENTWICKLUNG DES PANELS	26
4.1 ASSAY-DESIGN.....	26
4.2 ANPASSUNG DER PRIMER	30
4.3 iPLEX® PRO VERIFIZIERUNG	34
4.4 CLEARSEEK™ VERIFIZIERUNG.....	38
4.5 TROUBLESHOOTING.....	39
4.5.1 II iPLEX® Pro Verifizierung.....	39
4.5.2 II ClearSEEK™ Verifizierung.....	41
4.6 CLEARSEEK™ VALIDIERUNG AN KLINISCHEN PROBEN	43
5. ERGEBNISSE	45
5.1 CLEARSEEK™ VALIDIERUNG AN KLINISCHEN PROBEN	45
6. DISKUSSION	49
7. FAZIT UND AUSBLICK	51
LITERATURVERZEICHNIS	52
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	54

Abkürzungsverzeichnis

<i>TP53</i>	Gen, das für Tumor Protein 53 kodiert
p53	Tumorsuppressor Protein 53
TAD	Transaktivierende Domäne
CRD	C-terminale Regulierungsdomäne
AS	Aminosäure
FS	Frame-Shift
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
CPM	Chip Prep Module
TOF	Time of Flight
UEP	Unextended Extension Primer
MA4	MassARRAY Analyzer 4
Da	Dalton
SNP	Single Nucleotide Polymorphismus
dNTP	Deoxynucleosidtriphosphat
ddNTP	Dideoxynucleosidtriphosphat
UNG	Uracil-N-Glycosylase
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dNDP	Desoxyribonukleosid-Diphosphat
SBE	Single Base Extension
SVR	Somatic Variant Report
IQR	Interquartile Range
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
LB	Liquid Biopsy
ADS	Assay Design Suite
ddH ₂ O	Double Distilled Water
NTC	No Template Control
ASO	Allele-Specific Oligonucleotide
VAF	Variant Allele Frequency
ctDNA	Circulating Tumor DNA
IKP	Institut für klinische Pharmakologie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung der somatischen Mutationen von p53 in Tumorarten, basierend auf der letzten aktualisierten Version der TP53-Mutationsdatenbank (Juli, 2019) (5)	9
Abbildung 2: Entstehung des ClearSEEK™ TP53 Panels.....	11
Abbildung 3: Struktur des p53-Proteins.....	14
Abbildung 4: Häufigkeit der Mutationen im TP53-Gen (9).....	15
Abbildung 5: Der Typische Arbeitsablauf von der Probe bis zum Ergebnis des untersuchten Analyten. Die Dauer des Arbeitsablaufs kann je nach Chemie und Erfassungszeit sehr unterschiedlich sein (10)	16
Abbildung 6: Zusammenfassung zur Anwendung von MALDI-TOF in Verbindung mit dem MassARRAY®-System zur Detektion von SNP-Genotypen (14).....	17
Abbildung 7: Zusammenfassung der Schritte in ClearSEEK™ Biochemie (15)	19
Abbildung 8: Assay-Design-Suite-Tool von Agena Bioscience. Das Tool ist ein Online-Werkzeug und wird u.a. für multiplex Assays für die Verwendung auf dem MassARRAY®-System benutzt. Der Zugriff auf das Tool ist beschränkt auf die Mitarbeiter und Kunden von Agena Bioscience.	28
Abbildung 9: Ergebnisse des Assay-Designer-Tools. Zu sehen sind u.a. die Aufteilung in 4 Wells, PCR-Primer, Länge der Amplikons, UEP-Richtung und Sequenz.	29
Abbildung 10: Darstellung der Peak-Höhen von Extension-Primer von a) (W1) bis d) (W4) im ersten Lauf vor jeglicher Anpassung	31
Abbildung 11: Darstellung der Peak-Höhen der UEPs nach der Anpassung	33
Abbildung 12: Ansicht der Mikrotiterplatte in der TYPER-Software. Die Platte enthält 10 HapMap-Proben (jeweils 4 Wells) in grüner Farbe und 2 NTCs in roter Farbe. Die ersten beiden Spalten gehören zu Well 1, die Spalte 3 und 4 zu Well 2 usw.	35
Abbildung 13: Cluster-Plot-Ansicht der Assays mit unterschiedlicher PCR-Ausbeute	36
Abbildung 14: Spektrum des Assays, bei dem eine 100%ige Ausbeute erzielt wurde.....	36
Abbildung 15: Spektrum des Assays, bei dem keine 100%ige Ausbeute erzielt wurde.....	37
Abbildung 16: WT- und Mutationssignale in pY220C	38
Abbildung 17: Unterschied zwischen dem normalen und dem ASO-Assay.....	39
Abbildung 18: Performance des ASO Assays in einem WT-Hintergrund, in einer 50%igen VAF.....	40
Abbildung 19: Performance des ASO Assays in einem WT-Hintergrund, in einer 1%igen VAF.....	40
Abbildung 20: Darstellung der Ergebnisse der zweiten ClearSEEK™ Verifizierung.....	42
Abbildung 21: Das ASO-Assay bindet an die gBlock-Sequenz und verlängert um die Nukleotidbase C (Cytosin)	43
Abbildung 22: SVR des Panels auf dem CPM96; Baseline-Datei wurde mithilfe von negativen Proben generiert.....	47
Abbildung 23: SVR des Panels auf dem CPM96; Baseline-Datei wurde mithilfe von IQR-Methode auf der Platte generiert	47
Abbildung 24: SVR des Panels auf dem CPM384; Baseline-Datei wurde mithilfe von negativen Proben generiert	48
Abbildung 25: SVR des Panels auf dem CPM384; Baseline-Datei wurde mithilfe von IQR-Methode auf der Platte generiert	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Reaktion Reagenzien	20
Tabelle 2: PCR Thermocycling Bedingungen	20
Tabelle 3: SAP-Cocktail Reagenzien	21
Tabelle 4: iPLEX® Extension Reagenzien	22
Tabelle 5: Thermocycling Bedingungen der Extension-Reaktion	23
Tabelle 6: Massenunterschiede zwischen Basen	23
Tabelle 7: Übersicht über die 4 Wells im Panel	24
Tabelle 8: Liste der Marker im ClearSEEK™ TP53 Panel	27
Tabelle 9: Aufteilung der Assay in 4 Extension-Wells	30
Tabelle 10: Extension-Primer Anpassung in µL	32
Tabelle 11: Assay-Performance in der ersten iPLEX® Pro® Verifizierung	37
Tabelle 12: Referenzproben	44
Tabelle 13: Darstellung der Ergebnisse an beiden CPM-Systemen	45
Tabelle 14: Performance des Panels unter Anwendung alternativer Baseline-Datei	46

1. Einleitung

1.1.1 Motivation

TP53 kodiert das p53-Tumorsuppressorprotein und ist das am häufigsten mutierte Gen bei Krebs. Die Deaktivierung des p53 durch Mutationen ist häufig bei Krebs und bestätigt dessen wichtige Rolle als Tumorbremse. Es wird geschätzt, dass *TP53*-Mutationen in etwa 50% aller Krebsarten vorliegen, einschließlich Leukämie, Brustkrebs, Lungenkrebs, Magenkrebs, Leberkrebs und Bauchspeicheldrüsenkrebs (1). Gemäß der *TP53*-Mutationsdatenbank sind Mutationen in diesem Gen eine treibende Kraft bei der Tumorentstehung in verschiedenen Geweben, wie in Abbildung 1 veranschaulicht ist. Ebenfalls sind die *TP53*-Mutationen mit einer höheren Aggressivität von Krebs und einer schlechteren Überlebensprognose verbunden. (2) (3)

Das normale, Wild-Typ-p53 wirkt als starker Einflussnehmer auf Gene und kann bis zu 300 verschiedene Promotoren im Genom beeinflussen. As diesen Gründen wird das *TP53*-Gen als „Wächter des Genoms“ bezeichnet.

Es kann durch Veränderung der Muster der Genexpression zu einem Stopp des Zellzyklus oder zur Apoptose führen. *TP53* hat hauptsächlich die Aufgabe, die Integrität der DNA-Struktur der Zelle zu schützen. Darüber hinaus trägt *TP53* auch zur Entwicklung, Alterung und Unterscheidung von Zellen bei. (4)

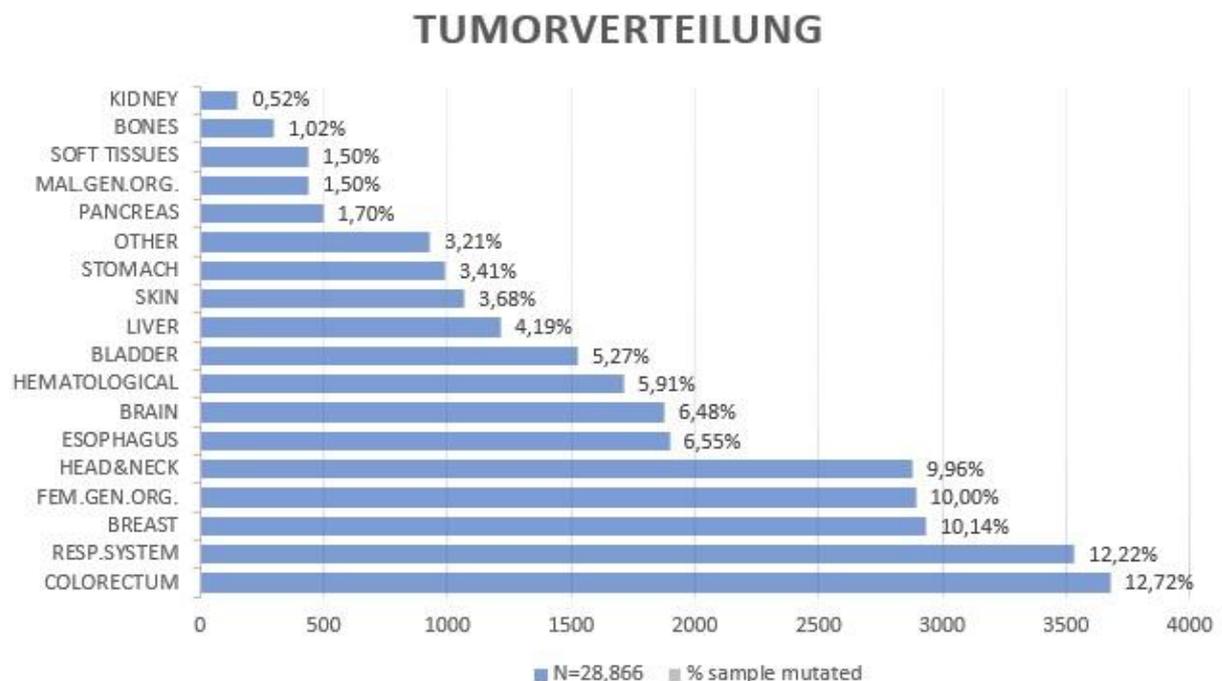


Abbildung 1: Verteilung der somatischen Mutationen von p53 in Tumorarten, basierend auf der letzten aktualisierten Version der *TP53*-Mutationsdatenbank (Juli, 2019) (5)

Die Aktivität von p53 wird reguliert und steigt bei Stress. Mutierte Formen von p53 haben Einschränkungen in der DNA-Bindung und benötigen unterschiedliche Strategien zur Aktivierung, je nachdem wie das Protein falsch gefaltet wurde.

Die Möglichkeit, sowohl das normale als auch das mutierte p53 zu reaktivieren, gibt Hoffnung auf die Entwicklung von Krebsmedikamenten, die in Verbindung mit fortgeschrittenen Diagnostiken verwendet werden können. (4)

1.2 Fragestellung

Die Identifikation von Mutationen im *TP53*-Gen ist von fundamentaler Bedeutung, um die Funktionalität des p53-Proteins zu bestimmen und seine Rolle als tumorsupprimierender Faktor zu bestätigen oder zu widerlegen. Mutationen im p53 können zu Defekten in der Fähigkeit des Proteins führen, DNA zu binden und spezifische Gene zu regulieren, was zu einer Beeinträchtigung der Fähigkeit des Körpers, Krebszellen zu bekämpfen, führen kann. Daher ist die Detektion von p53-Mutationen ein unverzichtbarer Bestandteil der Diagnostik und Überwachung von Krebserkrankungen.

In diesem Zusammenhang wird die Entwicklung einer Reihe von Tests, die speziell entwickelt werden, um bestimmte Regionen des Genes zu untersuchen, in denen häufig Mutationen auftreten, von großer Bedeutung.

Die Verwendung eines Panels zur Detektion von *TP53*-Mutationen hat mehrere Vorteile, u.a. eine höhere Sensitivität, höhere Spezifität und Zeitersparnis, welche zu den schnelleren, früheren Diagnosen führen können und womöglich eine bessere Prognose für die Patienten aufstellen.

Im Rahmen der Entwicklung eines diagnostischen Tests ist es wichtig, alle wichtigen Aspekte dieses Konzepts zu betrachten. Es ist wichtig, die Anforderungen des Marktes/der Kunden mit den Möglichkeiten der verfügbaren Technologie abzugleichen und dabei den Fokus auf die kritischen Teile des Tests zu legen, in diesem Fall auf die wichtigsten oder häufigsten Mutationen, um einen grundlegenden Test zu entwickeln. So ist die Auswahl der Marker selbst, die Entwicklung von Marker-spezifischen Assays und die Auswahl der Biochemie und Technologie von Bedeutung, die optimiert und verifiziert werden müssen, um das gewünschte Panel zu ermöglichen.

Dies führt zu den Fragen: *Welche Schritte sind erforderlich zur Entwicklung eines Panels, welche Marker werden untersucht, und wie erfolgt der Weg von der Markerliste bis zum Ergebnisbericht?*

1.3 Vorgehensweise

Die Aufgaben dieser Bachelorarbeit sind Analyse, Design, Entwicklung und Optimierung eines onkologischen Panels unterstützt durch das MassARRAY®-System. Die Schritte der Entwicklung werden auf der Abbildung 2 vorgestellt.

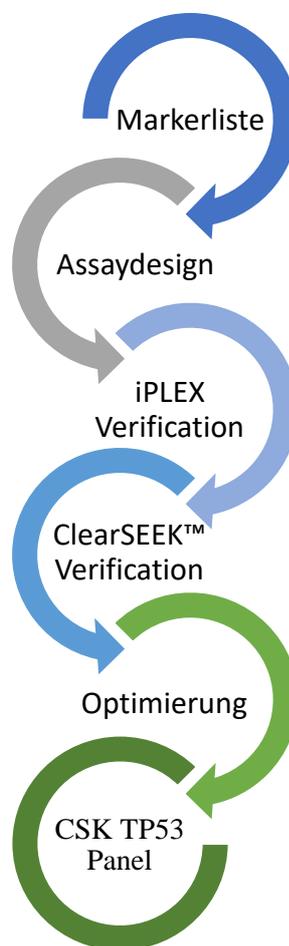


Abbildung 2: Entstehung des ClearSEEK™ TP53 Panels

Eins der Ziele ist die Optimierung dieses Panels auf das bestehende onkologische ClearSEEK™ PIK3CA Panel, um zu ermöglichen, dass die beiden Tests gleichzeitig durchgeführt werden können, wenn das vom Interesse ist. Aus diesen Gründen werden die gleiche Biochemie und die gleichen Parameter für die Messung als Startpunkt genommen. Das Design, die Versuche und die Optimierung laufen grundsätzlich zuerst unabhängig von

dem anderen Panel und erst wenn das eine Design des Panels funktioniert, werden die Anpassungen wo das nötig und möglich ist, durchgeführt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist, nach erfolgter Panel-Entwicklung und dessen technischer Verifizierung abschließend unter Einsatz klinischer Proben das Panel zu validieren.

2. TP53

Das *TP53*-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm (p-Arm) des Chromosoms 17 (17p13.1). (6) Das Wild-Type *TP53* aktiviert die Zelle, um den Zellzyklus anzuhalten, wenn DNA-Schäden entdeckt werden, und signalisiert, dass Reparatur oder Apoptose (programmierter Zelltod) ausgelöst werden sollen (7). Dies hilft, Krebs zu verhindern, indem es sicherstellt, dass schädliche Mutationen nicht weitergegeben werden. Wenn *TP53* jedoch durch Mutationen inaktiviert wird, kann es seine Funktion als Tumorsuppressor verlieren und stattdessen dazu beitragen, Krebs zu entwickeln.

Das p53-Protein ist ein multifunktionales Protein, das aus 393 Aminosäuren aufgebaut ist. Es hat eine komplexe dreidimensionale Struktur, die aus mehreren Funktionsdomänen besteht, darunter:

- i. Transaktivierende Domäne (TAD) befindet sich am N-Terminus; kann unterschiedliche Cofaktoren binden und Unterdrückung von Tumorgenese als Reaktion auf Stress wie akute DNA-Schäden steuern (AS 1-42)
- ii. Prolin-reiche Region beteiligt sich an Protein-Protein-Wechselwirkungen und an Induktion von Apoptose (AS 63-97)
- iii. DNA-Bindedomäne ermöglicht es *TP53*, an DNA zu binden und Regulierung von Genexpression zu steuern; enthält die meisten inaktivierenden Mutationen, die in verschiedenen Typen von menschlichen Krebserkrankungen identifiziert wurden (AS 102-292)
- iv. Tetramerisierungsdomäne befindet sich am C-Terminus; ermöglicht es *TP53*, sich selbst zu tetramerisieren – sodass sich vier *TP53*-Molekülen zu einem funktionellen Komplex zusammenbinden, was notwendig für die Funktion von *TP53* als Tumorsuppressor Protein ist – es wird geeignete Protein-Konformation gebildet, um an DNA für Sequenzerkennung zu binden (AS 323-356)
- v. C-terminale Regulierungsdomäne (CRD) reguliert die Funktion, Stabilität, Lokalisierung und Aktivität durch Interaktion mit anderen Proteinkomplexen. (AS 363-393) (8) (2)

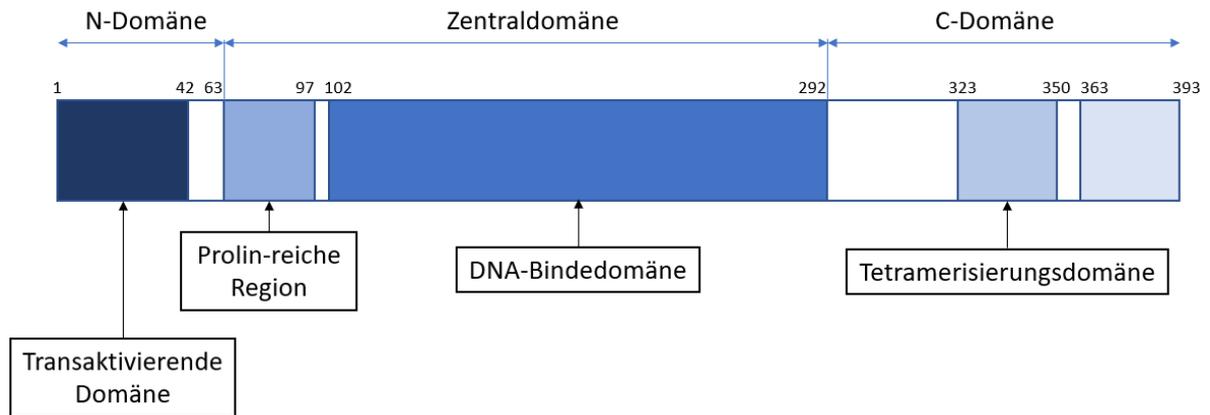


Abbildung 3: Struktur des p53-Proteins

Laut der Datenquellenseite für das *TP53*-Gen existieren verschiedene Arten von Mutationen im *TP53*-Gen, u.a.:

- *Nonsense*-Mutationen – Diese Mutationen führen zu einem frühzeitigen Stopp-Codon im Gen und resultieren in einem abgebrochenen Proteinprodukt, das normalerweise nicht funktionell ist.
- *Frameshift*-Mutationen (FS) – Diese Mutationen führen zu einer Änderung im Leserahmen des Gens und können zu einem völlig veränderten Proteinprodukt führen.
- *Missense*-Mutationen – Diese Mutationen führen zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des von dem *TP53*-Gen produzierten Proteins und können dadurch dessen Funktion beeinträchtigen.
- *Splice*-Mutationen – Diese Mutationen können zu einer Entfernung, Hinzufügung oder Veränderung von bestimmter Anzahl von Nukleotiden führen, was zur Entstehung abnormer Proteine führen kann.
- *Gross-Deletions*-Mutationen – Diese Mutationen führen zum Löschen eines großen Abschnittes des DNA-Strangs, wodurch die Genstruktur verändert werden kann. Dies kann zur Funktionsstörung des Gens führen.
- *Intronische* Mutationen – obwohl die keine direkte Auswirkung auf die Funktion des Proteins haben, können sie indirekt die Regulation des Gens beeinflussen.

Die Grafik dargestellt in Abbildung 4 macht deutlich, in welchem Ausmaß die oben aufgeführten *TP53*-Genmutationen vertreten sind. Die im Jahr 2019 aus insgesamt 28866 Proben gesammelten Daten zeigen, dass *Missense*-Mutationen am häufigsten vorkommen und 73,07 % aller Mutationen ausmachen. *Frameshift*-Mutationen kommen mit 9,07 % vor,

gefolgt von *Nonsense*-Mutationen mit 8,19 %, stillen Mutationen mit 3,59 % und Spleiß-Mutationen mit 2,50% Repräsentation.

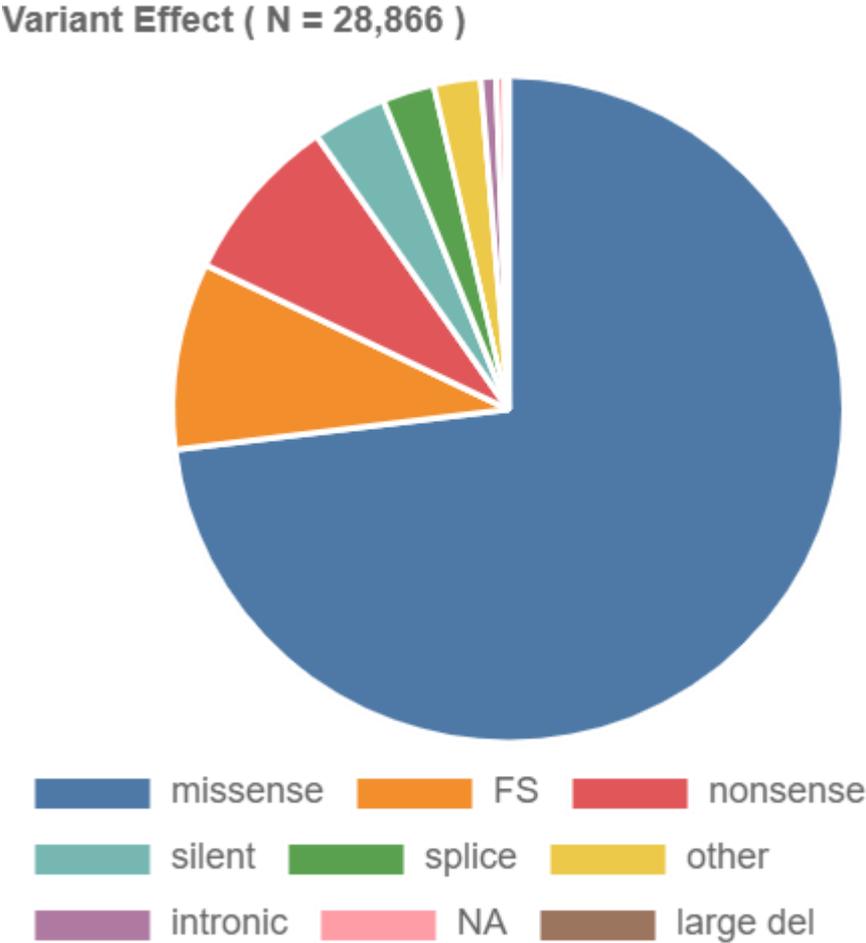


Abbildung 4: Häufigkeit der Mutationen im TP53-Gen (9)

3. Methode

Der hochsensitive Nachweis eines für eine somatische Mutation typischen Analyten erfolgt durch das MassARRAY®-System, unterstützt durch die ClearSEEK™ Biochemie. Um von der Probe zum Analyten zu kommen, sind verschiedene Reaktionen erforderlich. Dies impliziert die PCR-Amplifikation der Probe, Behandlung der unbenutzten Nukleotide mit dem SAP-Enzym und die Single-Base-Extension Reaktion. Darauf folgend werden die Analyten auf einen Chip übertragen, mit dem MassARRAY®-Analyser 4 (MA4) detektiert und die erhaltenen Daten anschließend per Software analysiert.

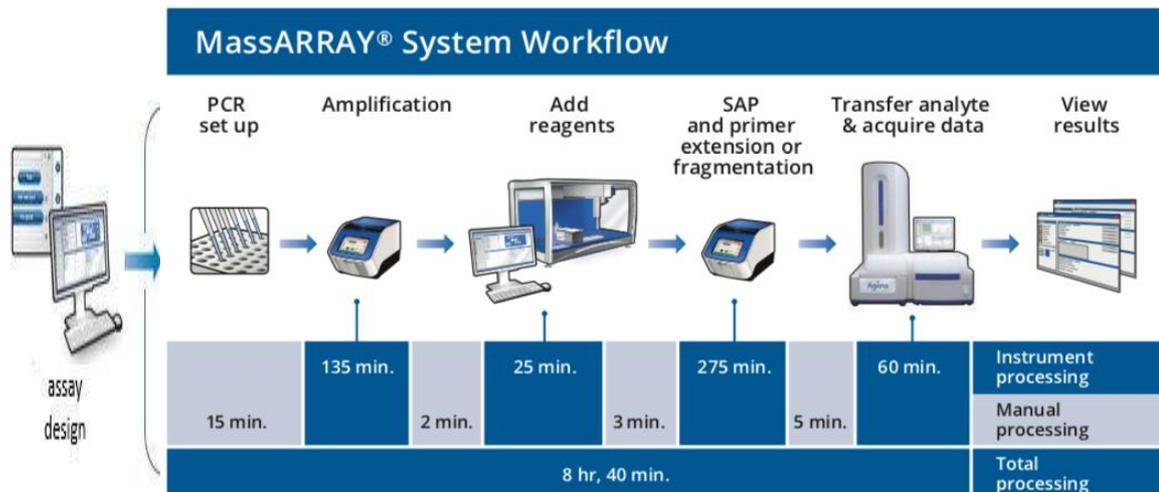


Abbildung 5: Der Typische Arbeitsablauf von der Probe bis zum Ergebnis des untersuchten Analyten. Die Dauer des Arbeitsablaufs kann je nach Chemie und Erfassungszeit sehr unterschiedlich sein (10)

3.1 MassARRAY® Analyzer 4

Zur Analyse werden die in diesem Fall mittels ClearSEEK™ Biochemie generierten Extension Produkte (Analyte) in das CPM (Chip Prep Module) transferiert. Gesteuert von der internen Robotik des Systems, werden die Analyte zuerst mit Resin, einem Ionenaustauscher Harz entsalzt und danach werden wenige Nanoliter von einer Mikrotiter-Probenplatte auf ein SpectroCHIP-Array übertragen. Die SpectroCHIPS sind erhältlich in der Größe von 96 und 384 Spots. Auf jeden dieser Spots, kann der Analyt transferiert werden und mit der inerten Kristallmatrix den Spots ein Co-Kristall bilden. (11)

Überführt vom CPM in das MALDI-TOF-Massenspektrometer, werden die Spots auf dem SpectroCHIP, die Analyt-Matrix Gemische sind, mit einem Nanosekunden-Lichtimpuls eines Stickstoff Lasers bestrahlt. (12) Durch die Bestrahlung mit UV-Wellenlänge von dem Laser, werden aus den Kristallen die "Partikelwolken" erzeugt, aus denen die ionisierten Analyten

extrahiert werden. Alle Analyten sind positiv geladen und werden in einem elektrischen Feld beschleunigt. Die fliegen unterschiedlich schnell aufgrund ihrer Masse, erreichen den Detektor und erzeugen ein Massenspektrum. Diese Flugzeit (time of flight, TOF) ist direkt proportional dem Gewicht/der Ladung des Analyten und gibt den Aufschluss, um welche Moleküle es sich handelt, bzw., um welche Base der UEP (*Unextended Extension Primer*) verlängert wurde. Mithilfe von 3-Punkt-Kalibranten bekannter Masse (5045, 8480 und 9980 Da) wird die Best-Fit-Kurve für die Stichprobendaten bestimmt und somit werden die Massen den Analyten zugeordnet. (13)

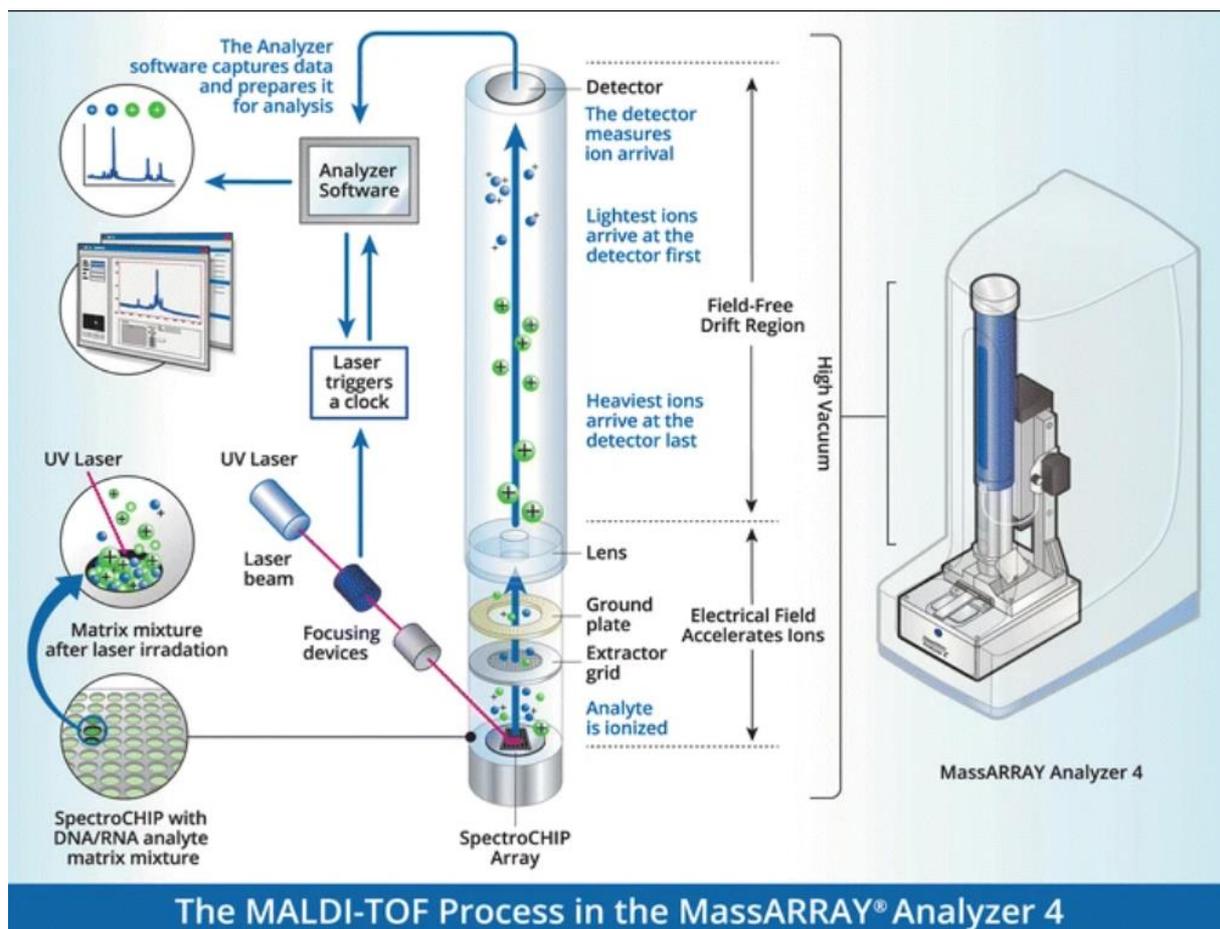


Abbildung 6: Zusammenfassung zur Anwendung von MALDI-TOF in Verbindung mit dem MassARRAY®-System zur Detektion von SNP-Genotypen (14)

Im Hintergrund laufen zusätzliche Programme, die die physische Mikrotiterplatte mit der virtuellen verbinden, und dem MA4-System die benötigten Informationen zur Analyse des SpectroCHIPS bereitstellen, sowie Programme, die den SpectroCHIP mit der Platte und mit der Analyse-Software verlinken. Zur Steuerung des Gerätes selbst, gibt es eine separate Software.

Die Typer-Software, als eine von den Teilen des MA4-Systems, dient der Datenanalyse. Die Software verfügt über Programme, mit denen die Assays oder Marker importiert werden können oder z.B. das Kreieren einer virtuellen Platte mit gewünschten Probenbenennungen und Markern erfolgt. Die Marker sind in diesem Fall die zur Detektion der Biomarker entwickelten Assays, mit denen die Proben analysiert werden sollen. Diese werden vorab in einem Assay-Design-Suite Online-Tool gestaltet.

Zusätzlich zu der Typer Software gibt es auch die spezifische Report Software, welche die Ergebnisse interpretiert und übersichtlich ausgibt.

3.2 Biochemie

Die Biochemie bezeichnet als ClearSEEK™ wurde für dieses onkologische Panel aufgrund seiner Kompatibilität und Ähnlichkeit mit dem ClearSEEK™ PIK3CA-Panel gewählt. Sie bietet die erforderliche Empfindlichkeit für die zu untersuchenden Proben (DNA-Mengen) sowie die zu erreichende Empfindlichkeit für die zu erwartenden Mutationsfrequenzen. ClearSEEK™ selbst stellt eine Weiterentwicklung auf der Basis der iPLEX® Pro¹ Biochemie dar.

Die wichtigsten Unterschiede zwischen der Standard iPLEX® Pro Biochemie und ClearSEEK™ liegen in der Nachweisgrenze und der Extension-Reaktion. Mithilfe von der ClearSEEK™ Biochemie, wird dem MassARRAY®-System ermöglicht, seltene Ereignisse nachzuweisen, und die Empfindlichkeit auf eine Allelfrequenz von $\geq 1\%$ zu erhöhen.

Nachdem das Design der Assays fertig ist, die Extension-Primer adjustiert und die Probe vorbereitet, können die Reaktionen durchgeführt werden. Es werden die Proben von Flüssigbiopsie untersucht, mit einem Input von ≥ 10 Nanogramm.

Unter ClearSEEK™ Biochemie werden drei Reaktionsschritte verstanden:

- PCR-Reaktion
- SAP-Reaktion
- Extension-Reaktion

¹ iPLEX® Pro ist eine von Firma Agena Bioscience entwickelte biochemische Plattform mit drei Grundsritten, welche eine äußerst parallele und exakte Analyse genetischer Variationen einer Vielzahl von Proben bietet; es ist eine Methode zum Nachweis genetischer Varianten mithilfe von MassARRAY.

ClearSEEK™ Method

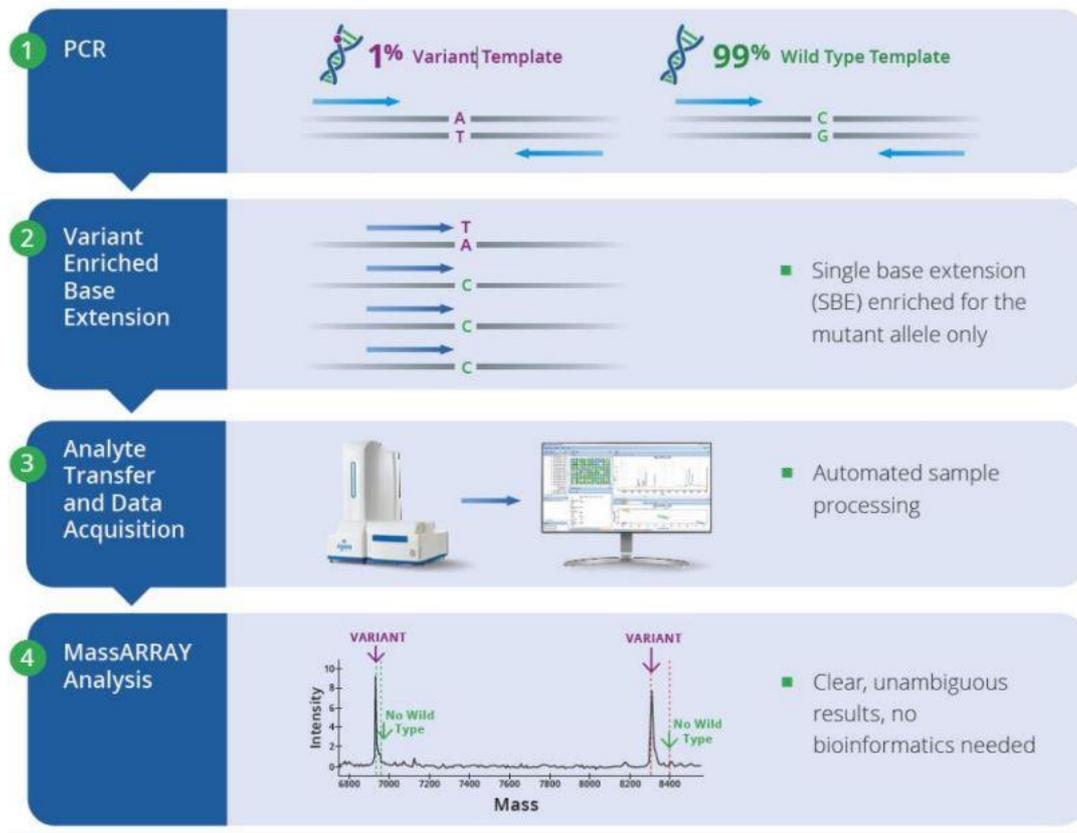


Abbildung 7: Zusammenfassung der Schritte in ClearSEEK™ Biochemie (15)

3.2.1 PCR-Amplifikation

Die erste Reaktion ist eine optimierte PCR-Amplifikation bestimmter Gen-Sequenzen bzw. Zielregionen von Interesse innerhalb der vorliegenden Gesamt-DNA eines Organismus und innerhalb eines Gens, hier TP53, bzw. eines Genabschnitts. Mithilfe von PCR werden kurze Amplikons, in diesem Panel <150 Basenpaaren lang, exponentiell vervielfältigt, theoretisch bis zu Billion-fach (den Faktor 3.5×10^{13}) mit 45 Temperaturzyklen, was ungefähr 2,5 Stunden dauert. Zur Generierung der Amplikons sind die Original-DNA sowie zwei synthetische Primer nötig, die auf den beiden Strängen der DNA die zu vervielfältigende Sequenz festlegen und begrenzen. Die PCR-Primer müssen im Vergleich zur Original-DNA im Überschuss vorliegen, um die Amplifikationswahrscheinlichkeit zu erhöhen. Für die neu synthetisierte Kopien sind die DNA-Bausteine, die dNTPs erforderlich. Das Enzym, das den Einbau von Nukleotiden nach dem Prinzip der Komplementarität mit der Ziel-DNA katalysiert, ist die thermostabile *Taq*-Polymerase. Wichtig für das Enzym ist die geeignete Umgebung, die mit der 10-fachen Pufferlösung optimiert ist, sowie die Mg^{2+} -Ionen, die die Anlagerung der Primer stabilisieren.

Neben den Standard-Reagenzien für die PCR-Reaktion wird an dieser Stelle das Uracil-DNA-Glykosidase (UNG) Enzym angesetzt, welches kontaminationsvermeidend wirkt. Die Zugabe des UNG-Enzymes ist besonders bei einer hochsensitiven und empfindlichen Biochemie wie ClearSEEK™ wichtig. Entsprechend dem Einsatz des UNG-Enzymes wird das modifizierte dNTP/dUTP-Mix mit erhöhter dUTP- statt dTTP-Konzentration eingesetzt, damit dUTP mit vergleichbarer Effizienz wie dTTP in das PCR-Fragment eingebaut werden kann. (16) Die Reagenzien und die jeweilige Menge benötigt für diese Reaktion sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: PCR-Reaktion Reagenzien

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µL)
dd-H ₂ O	7,7
10X PCR-Puffer	3
MgCl ₂	1,2
dNTP/dUTP Mix	0,15
Global PCR Primer Mix	6,0
PCR-Enzym	1,2
UNG-Enzym	0,75
DNA	10,0
PCR-Cocktail Endvolumen	20,0
PCR-Reaktion Endvolumen	30,0

Die Reaktion findet in einem Thermocycler statt unter Bedingungen, die in der Tabelle 2 erfolgen.

Tabelle 2: PCR Thermocycling Bedingungen

Temperatur in °C		Zeit	Wiederholungen
30		10 Minuten	
95		2 Minuten	
95		30 Sekunden	
56		30 Sekunden	45 Zyklen
72		1 Minute	
72		5 Minuten	
10		Halten	

Die Temperatur wird zuerst auf 30° C erhöht und 10 Minuten gehalten, um die Funktion des UNG-Enzymes zu ermöglichen. Der PCR-Prozess von 45 Zyklen beginnt mit der typischen Denaturierung der DNA-Matrix, die bei 95° erfolgt. Um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen aufzubrechen, werden die 95° für 2 Minuten gehalten. Die Primerhybridisierung oder Primer-*Annealing* findet bei 56° statt. In diesem Schritt wird auf diese Temperatur abgesenkt und für 30 Sekunden gehalten, um die spezifische Anlagerung des Primers zu erlauben. Die Elongation findet in der Gegenwart von Taq-Polymerase statt, bei 72° C. Hier werden die Nukleotide am 3'-Ende vom PCR-Primer eingebaut. Dieser Schritt wird 60 Sekunden durchgeführt, um die Primer theoretisch um ungefähr 1000 Basenpaare verlängern zu können.

Um die erfolgreiche Amplifikation einer Probe zu bestätigen, sind Amplikon-Kontrollassays enthalten. Die weisen auch in Abwesenheit eines Mutationssignals sicher nach, dass die Zielregion von Interesse amplifiziert wird. Dies dient als interne Qualitätskontrolle für die Assays. (17) Da die Amplifikate eine Hauptquelle möglicher Kontamination sind, weil sie in einer viel höheren Konzentration vorliegen als die Ziel-DNA, wird die Vorbereitung der PCR-Reaktion in einem Raum durchgeführt, der räumlich von dem Labor zur Detektion des Amplifikats getrennt ist (Prä- und Post-PCR Labor).

3.2.2 SAP-Reaktion

Nach der PCR-Reaktion erfolgt die Behandlung der Probe mit dem SAP-Enzym, welche der Dephosphorylierung der freien dNTPs/dUTPs dient, die während der PCR-Reaktion nicht genutzt wurden. Die dNTPs werden somit zu inaktiven dNDPs. Dies ist notwendig, um zu verhindern, dass freie Nukleotide während der folgenden Single-Base-Extension (SBE) Reaktion nicht interferieren und so mittels Multiple Base Extension die Reaktion stören. Die Mengenangaben der für diese Reaktion benötigten Reagenzien sind in Tabelle 3 gegeben.

Tabelle 3: SAP-Cocktail Reagenzien

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µL)
dd-H ₂ O	9,18
SAP-Puffer	1,02
SAP-Enzyme	1,8
SAP Cocktail Endvolumen	12

Die optimale Temperatur für das SAP-Enzym von 37° für 40 Minuten gehalten und anschließend wird die Temperatur auf 85° erhöht für 5 Minuten, um das Enzym zu inaktivieren. Der Thermocycler kühlt danach auf 10°.

3.2.3 Single-Base-Extension Reaktion

Zuletzt wird die Extension-Reaktion durchgeführt. Die Single-Base-Extension oder Einzelbasenverlängerung ist die Reaktion, die sequenzspezifisch ist.

Sie ist typisch für Genotypisierung von SNPs (Single Nucleotide Polymorphismus). Die SNPs sind Unterscheidungsmerkmale oder Variationen eines einzelnen Basenpaares zwischen Genomen verschiedener Personen. (18) Diese Variation wird hier genutzt, um basenspezifisch unterscheidbare Reaktionsprodukte zu bilden und diese zu detektieren. Dafür wird ein künstliches DNA-Fragment (Extension-Primer) entworfen, das an den DNA-Strang bindet und direkt vor der zu untersuchenden Base endet und sich dann zusätzlich um eine Base verlängert (SBE). Der Einsatz von ddNTPs anstelle der in der PCR verwendeten dNTPs führt dazu, dass die Reaktion nach Verlängerung dieser einen SNP-spezifischen Base abbricht, da an ein ddNTP aufgrund seiner biochemischen Struktur keine weitere Base angelagert werden kann. (19) Für die Massenspektrometrie-basierte Analyse der ClearSEEK™ Extension Reaktion werden allerdings zu den jeweiligen ddNTPs analoge massen-modifizierte Acyclonukleotide als Kettenterminatoren verwendet. Diese werden mit dem iPLEX® Pro Enzym, einer Vent-DNA-Polymerase² eingebaut.

In Tabelle 4 sind die für diese Reaktion benötigten Reagenzien mit entsprechender Menge aufgelistet.

Tabelle 4: iPLEX® Extension Reagenzien

Reagenz	Volumen pro Reaktion (µL)
dd-H ₂ O	0,62
iPLEX® Pro Puffer Plus	0,2
iPLEX® PRO Termination Mix	0,2
Extension Primer	0,94
iPLEX® Pro Enzyme	0,04
Extension-Reaktion Cocktail Endvolumen	2,0

² Vent-DNA-Polymerase ist ein hitzestabiles Enzym, isoliert aus dem thermophilen Bakterium *Thermococcus litoralis*, das in der PCR eingesetzt wird

Wie in Tabelle 5 angegeben, beginnt die Extension-Reaktion mit einer Denaturierung des Templates bei 95° für 30 Sekunden. Danach folgt in 40 Zyklen die Denaturierung bei 95° für 5 Sekunden, Primerhybridisierung von 5 Sekunden bei 52° und Extension für 5 Sekunden bei 80°. Die letzteren zwei Schritten wiederholen sich innerhalb den 40 Zyklen noch 5-mal, sodass die eigentliche Reaktion in 200 kleinen, Minizyklen stattfindet. Die endgültige Verlängerung erfolgt zum Schluss bei 72° für 3 Minuten, wonach auf 10° abgekühlt wird.

Tabelle 5: Thermocycling Bedingungen der Extension-Reaktion

Temperatur in °C	Zeit	Wiederholungen	
95	30 Sekunden		
95	5 Sekunden		
52	5 Sekunden	5 Zyklen	40 Zyklen
80	5 Sekunden		
72	3 Minuten		
10	Halten		

Der SNP-spezifische Massenunterschied (Tabelle 6) in Basen dient der Identifizierung des Reaktionsproduktes, bzw. der Unterscheidung der Mutante von dem Wild-Typ. Das MassARRAY®-System kann dementsprechend nachweisen, um welche Base der Extension-Primer verlängert wurde.

Tabelle 6: Massenunterschiede zwischen Basen

dN	Massenunterschied
A → T	-9
A → C	-24
A → G	+16
T → C	-15
T → G	+25
C → G	+40

Im Gegensatz zu der iPLEX[®] Pro Biochemie, bei der der Terminatoren-Mix alle 4 Basen, alle 4 ddNTPs enthält, wird bei der Verlängerungsreaktion in ClearSEEK[™] das Wildtyp-Nukleoid aus dem Acyclonucleotidgemisch entfernt, sodass nur die vom Wildtyp abweichenden Allele nachgewiesen werden. Bei der iPLEX[®] Pro Biochemie erfolgt die Verlängerung der UEPs sowohl auf mutante Allele als auch auf Wild-Typ Allele, während bei der ClearSEEK-Biochemie die Verlängerung der UEPs ausschließlich auf mutante Allele möglich ist. Dies erhöht die Sensitivität für die ClearSEEK-Verlängerungsreaktion.

Basierend auf der Anzahl unterschiedlicher SNPs und aufgrund der hohen Sequenzdichte der Marker im TP53-Panel ist die Aufteilung in 4 Multiplex-Reaktionen, sogenannte Wells notwendig. Die 4 Wells sind die folgenden:

Tabelle 7: Übersicht über die 4 Wells im Panel

EXT-Well	1	2	3	4
Wild-Typ Base	C	C	G	T
Termination-Mix	AGT	AGT	ACT	ACG

Die Marker wurden auf C, G und T Wild-Typ-Kanäle aufgeteilt. Aufgrund der vielen Markern, die auf das WT C verlängern, die sich gegenseitig stören, wurde der C-Kanal nochmal in 2 Kanäle (2 Wells) aufgeteilt, wie aus der Tabelle 7 zu entnehmen ist.

3.3 Reporting

Die Ergebnisse der Datenanalyse können mit einer Software, in einem vorprogrammierten Ergebnisbericht *Somatic Variant Report (SVR)* ausgegeben werden.

ClearSEEK[™] TP53 ist eines der Panels, die für statistische Berechnungen im Reporting-Schritt Baseline-Dateien benötigen, um die hohe Sensitivität und Genauigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Diese Dateien erfassen präanalytisches und Hintergrundrauschen, die in allen ClearSEEK[™]-Daten von Wildtypproben vorhanden sind, und zeigen die normale Signalverteilung für jedes Target. Die Peakintensitäten, die bei ClearSEEK[™] verwendet werden, werden auf interne Erfassungs- oder Normalisierungskontrollen normalisiert. Dies ermöglicht es, die Variantenergebnisse und ihre Bedeutung zu bestimmen. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich der beobachtete kleinere Peak statistisch von der Wildtyp-Probenverteilung unterscheidet, um als positive Variation bezeichnet zu werden, wird durch Variantenpeaks dargestellt, die als Z-Score berechnet

werden. Der Z-Score jedes Variationspeaks (Targets) wird gegen Populations- oder Grundliniensignalverteilung des Peaks berechnet.

Drei Analyse-Modalitäten der Baseline werden vom Analyseprogramm *Somatic Variant Report* unterstützt:

- Die externe Baseline-Methode: Hierbei wird Baseline-Informationen aus regulären biologischen Proben ohne Varianten genutzt.
- Die Methode der Baseline WT-Proben: Die Software verwendet Baseline-Daten von Wildtyp-Kontrollproben (negativen Proben) auf den Platten, die ausgeführt werden.
- Technik für die Populations-Baseline auf der Platte: Eine der drei Ausreißer-Eliminierungstechniken (IQR, Bottom- oder Z-Score) wird dann auf die Baseline-Daten angewendet, die aus den von der Software untersuchten Platten extrahiert wird. (20)

In ClearSEEK™ kann es dazu kommen, dass sich z.B. aus Salzen oder ungebundenen Verlängerungsprimer Addukte bilden. Die Verwendung von Baseline-Daten hilft, die Auflösung von Varianten-Peaks zu verbessern, indem sie dazu beitragen, die Auswirkungen dieser Addukt-Peaks zu erfassen und hierfür zu korrigieren. Es ist möglich, Baseline-Dateien mit kommerziell erhältlicher DNA zu erstellen, jedoch ist es empfehlenswert, für beste Ergebnisse authentische Wildtyp-Proben derselben Art und Extraktionstechnik zu verwenden.

3.4 TYPER-Software

Um Genotyp-Informationen aus MassARRAY®-Daten zu extrahieren, kann die TYPER-Analyzer Software verwendet werden. Dies ist eine Software-Suite, bestehend aus verschiedenen Modulen, die das Auswerten und Verwalten von Genotypisierungs- oder somatischen Mutationspanels ermöglicht. Für die Analyse wird der zugehörige Chip-Name ausgewählt. Dabei erscheint eine „Ampel“-Anzeige der 96- oder 384-Well-Analyseplatten, sowie eine Liste von SNPs für das ausgewählte Well. Um eine Cluster-Analyse durchzuführen, wird die Funktion „Autocluster“ verwendet. Nach Abschluss der Analyse kann man die Genotypen und die zugehörigen Proben-IDs einsehen und bei Bedarf einzelne Genotypen korrigieren.

4. Entwicklung des Panels

Die Ausgangsposition für die Entwicklung des Panels wird durch die Auswahl der relevanten Biochemie und der Liste der Marker bestimmt. Anschließend werden die Assays entworfen und es wird mit den ersten Experimenten begonnen. Der Leitfaden und die Abfolge der Schritte sind wie folgt beschrieben:

1. Assay-Design
2. Anpassung der Primer
3. iPLEX[®] Pro-Verifikation
4. ClearSEEK-Verifikation
5. ClearSEEK-Validierung an klinischen Proben

4.1 Assay-Design

Zur Identifikation und Charakterisierung von Markern³ werden Assays entwickelt. Diese sind Tests oder Methoden, die speziell auf die Detektion einer bestimmten SNP-Variante abzielen. Die Liste der Marker für das Panel wird mithilfe von Mutationen generiert, die die meisten Einträge in der *COSMIC*⁴ Datenbank haben (Tabelle 8). Die Liste mit der engsten Auswahl wurde mit Hotspot-Mutationen aus der Literatur bestätigt.

Um eine breite Palette von Proben, einschließlich Geweben und Flüssigkeiten, zu untersuchen und eine hohe Nachweisgrenze von etwa 1% zu erreichen, sollten kurze Amplikons mit einer Länge von weniger als 100 Basenpaaren oder höchstens 150 Basenpaaren erstellt werden. Diese sollten für verschiedene Probenarten wie *FFPE*-Gewebe, Feinnadelaspirate, Kernnadelbiopsien, Abstriche, Pleuralflüssigkeiten, Zytologieblöcke und Flüssigbiopsien (LB) mit einer Nachweisgrenze von annähernd 1% Allelfrequenz geeignet sein.

³ Die Marker (spezifische Abschnitte der DNA, die zur Unterscheidung zwischen Individuen oder Populationen genutzt werden) sind in diesem Fall SNPs

⁴ *COSMIC* (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) ist die Datenbank, die die Informationen über somatische Mutationen in verschiedenen Krebsarten bereitstellt.

Tabelle 8: Liste der Marker im ClearSEEK™ TP53 Panel

Gen	Variante	COSMIC Count	rs_ID	Proteinveränderung
TP53	R248Q	1368	rs11540652	c.743G>A
TP53	R248L	145	rs11540652	c.743G>T
TP53	R248W	1058	rs121912651	c.742C>T
TP53	Y220C	613	rs121912666	c.659A>G
PIK3CA	N345K*		rs121913284	g.178921553T>A
TP53	R273C	1226	rs121913343	c.817C>T
TP53	R249S	542	rs28934571	c.747G>T
TP53	R282W	972	rs28934574	c.844C>T
TP53	G245S	679	rs28934575	c.733G>A
TP53	G245C	124	rs28934575	c.733G>T
TP53	R273H	1275	rs28934576	c.818G>A
TP53	R273L	251	rs28934576	c.818G>T
TP53	R175H	2019	rs28934578	c.524G>A
TP53	R196*	497	rs397516435	c.586C>T
TP53	R213*	750	rs397516436	<u>c.637C>T</u>
TP53	R342*	440	rs730882029	c.1024C>T
TP53	C176Y	156	rs786202962	<u>c.527G>A</u>
TP53	C176F	273	rs786202962	c.527G>T

Die Entwicklung von Assays erfolgt in dem Software-Tool *Assay Design Suite* (ADS). Für das ADS-Tool wird die Liste der Ziel-SNPs unter der Verwendung der Referenz-SNP-Cluster-ID oder rs-Nummer⁵ zusammengestellt.

⁵ rs-Nummer (Reference SNP Cluster ID) ist eine eindeutige Identifikationsnummer für einen bestimmten SNP

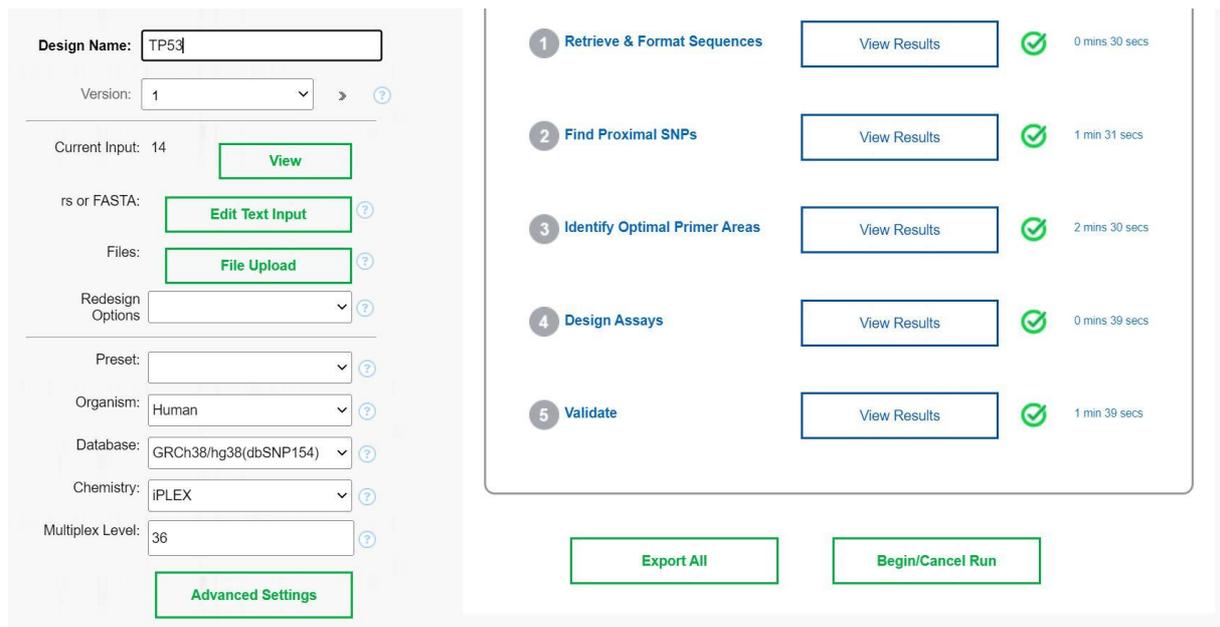


Abbildung 8: Assay-Design-Suite-Tool von Agena Bioscience. Das Tool ist ein Online-Werkzeug und wird u.a. für multiplex Assays für die Verwendung auf dem MassARRAY®-System benutzt. Der Zugriff auf das Tool ist beschränkt auf die Mitarbeiter und Kunden von Agena Bioscience.

Ein neues Projekt wird gestartet und ein beliebiger Projektname gegeben. Die ausgewählten rs-Nummern sollten unter Verwendung einer mit Komma getrennten Liste (z.B. in Microsoft Excel) zusammengestellt und über die Schaltfläche „File Upload“ hochgeladen werden (s. Abbildung 8). Alternativ können die rs-Nummern direkt in das System eingegeben werden, wenn es sich um eine kleine Liste handelt, über die Schaltfläche „Edit Text Input“. Über das Dropdown-Menü „Presets“ muss der iPLEX®-Multiplexing-Level spezifiziert werden. In diesem Fall wird das „High Multiplexing iPLEX® Preset“ gewählt. Das Feld „Multiplexing-Level“ zeigt standardmäßig die maximale Anzahl von SNPs für den ausgewählten iPLEX®-Level an. In dem Feld „Organism“ wird der entsprechende Organismus und die zu verwendende Genomdatenbank ausgewählt, um Informationen über die interessierenden SNPs wie flankierende Sequenzen und andere in der Nähe befindliche Sequenzvarianten abzurufen, die für das Design erforderlich sind. Für die Forschung am Menschen sollte das neueste verfügbare Humangenom-Software Build ausgewählt werden, es sei denn, es gibt einen besonderen Grund, SNPs an frühere Software Builds anzupassen. Sobald alle Optionen angegeben wurden, wird mit dem Klick auf die Schaltfläche „Start Run“ das Programm ausgeführt. Dies führt automatisch durch die verschiedenen Schritte des Designprozesses:

1. Abrufen und Formatieren von SNP-Sequenzen
2. Identifizierung von proximalen SNPs in den zu amplifizierenden Regionen, die eine optimale Primerbindung stören könnten

- Finden von optimalen Primer-Lokationen
- Entwurf der Assays durch Zusammenstellen von miteinander kompatiblen SNPs in Gruppen, die für Multiplex-Reaktion geeignet sind.
- Überprüfung der Assays durch Kontrolle, dass alle verschiedenen Kombinationen von Primern im Multiplex keine unerwünschten Regionen des Genoms amplifizieren.

Die Ergebnisse des Designs können mithilfe der „View Results“ Schaltfläche gesehen werden. Durch das Klicken auf „Export All“ können die erforderlichen Ausgabedateien heruntergeladen werden. Dabei sind u.a. Dateien, die für die Bestellung von Primer genutzt werden und Dateien, die für die Durchführung der Assays auf dem MassARRAY®-System benötigt werden. Die Datei „Assay Group“ beinhaltet die Informationen zur Anzahl der entworfenen Multiplex-Assays (als „Wells“ bezeichnet und mit W1, W2, W3 usw. gekennzeichnet) sowie die Informationen zu PCR- und UEP-Primern, erwarteten Amplikons und Massen der Extension-Produkte für verschiedene Allele. Die Dateien können heruntergeladen und z.B. mit Microsoft Excel gezeigt werden (Abbildung 9). Aufgrund der Dichte des TP53-Panelinhalts sind zumeist mehrere SNPs in einem PCR Amplikon zu finden. (13)

WELL	TERM	SNP_ID	2nd-PCR	1st-PCR	AMP_LEN	UP_CONF	MP_CONF	PdGC	PWARN	UEP_DIR	UEP_SEQ	UEP_SEQ	EXT1_CAL	EXT1_MA	EXT1_SEQ	EXT2_CAL	EXT2_MA	EXT2_SEQ	EXT3_CAL	EXT3_MA	EXT3_SEQ	EXT4_CAL	EXT4_MA	EXT4_SEQ	
W1	IPEX	TP53_c74	ACGTTGG	ACGTTGG	119	92	74,7	50	60	F	4931,2	CATGGGCG	C	5178,4	CATGGGCG	T	5258,3	CATGGGCGG	CATGA	ACT					
W1	IPEX	TP53_c81	ACGTTGG	ACGTTGG	130	56,9	74,7	50,2	52,9	dh	R	5206,4	CAGGACA	G	5453,6	CAGGACA	T	5477,6	CAGGACA	A	5533,5	CAGGACAGG	CACAAAC		
W1	IPEX	TP53_c58	ACGTTGG	ACGTTGG	151	63,3	74,7	52,1	55	F	5923,9	CCCTCTC	C	6171	CCCTCTC	A	6195,4	CCCTCTC	G	6211,1	CCCTCTC	T			
W1	IPEX	TP53_c81	ACGTTGG	ACGTTGG	130	56,9	74,7	56,2	57,1	Dh	F	6551,3	GGACGGAC	C	6798,4	GGACGGAC	T	6878,4	GGACGGAC	AGCTT	GAGGTGT				
W1	IPEX	TP53_c74	ACGTTGG	ACGTTGG	119	92	74,7	55,5	54,5	D5	R	6966,5	TGTGTGATG	C	7213,7	TGTGTGAT	T	7237,7	TGTGTGAT	C	7253,7	TGTGTGAT	GTTGAG		
W1	IPEX	AmpCont	ACGTTGG	ACGTTGG	123	74,1	96,2	50,5	32	F	7695	TGATTTG	C	7893,2	TGATTTG	A	7966,2	TGATTTG	G	7982,2	TGATTTG	G	7982,2	TGATTTG	G
W1	IPEX	TP53_c63	ACGTTGG	ACGTTGG	151	63,3	74,7	50,6	32	F	7695	TGATTTG	C	7893,2	TGATTTG	A	7966,2	TGATTTG	G	7982,2	TGATTTG	G	7982,2	TGATTTG	G
W1	IPEX	TP53_c52	ACGTTGG	ACGTTGG	100	45	74,7	67,4	69,2	G	R	8093,2	CTGAGCA	A	8340,4	CTGAGCA	A	8420,3	CTGAGCAG	CGCTCAT	GGGGG	CAGT			
W2	IPEX	TP53_c73	ACGTTGG	ACGTTGG	119	92	88,8	50,3	66,7	d	R	4519,9	GCCTCCG	G	4767,1	GCCTCCG	T	4791,1	GCCTCCG	A	4847	GCCTCCG	T	GCCT	
W2	IPEX	AmpCont	ACGTTGG	ACGTTGG	100	45	93,7	51,4	58,8		R	5035,3	CCTCACAF	A	5362,4	CCTCACAC	CTCCG	TCAT							
W2	IPEX	TP53_c84	ACGTTGG	ACGTTGG	130	56,9	88,8	50,9	64,7	H	F	5211,4	CCTGTCTC	C	5458,6	CCTGTCTC	T	5538,5	CCTGTCTC	GGAGAG	A				
W2	IPEX	TP53_c10	ACGTTGG	ACGTTGG	105	94,4	88,8	52,8	52,6	h	F	5834,8	TGAGGCG	C	6082	TGAGGCG	C	6161,9	TGAGGCG	CTTGAGAT	TTCT				
W2	IPEX	AmpCont	ACGTTGG	ACGTTGG	151	63,3	93,7	52,1	55	F	5923,9	CCCTCTC	G	6211,1	CCCTCTC	AGCAT	TTATCCG								
W3	IPEX	TP53_c52	ACGTTGG	ACGTTGG	100	45	82,6	51,2	60	sh	F	4664	AGGTTG	TA	4935,2	AGGTTG	T	4951,2	AGGTTG	T	4991,1	AGGTTG	GAGCG	CCT	
W3	IPEX	TP53_c74	ACGTTGG	ACGTTGG	119	92	82,6	54,4	64,7	D	F	5220,4	CATGGGC	A	5491,6	CATGGGC	G	5507,6	CATGGGC	T	5547,5	CATGGGC	GGATGAA	C	
W3	IPEX	AmpCont	ACGTTGG	ACGTTGG	130	56,9	63,9	54,1	55,6	h	F	5592,6	TGAGGTG	C	5839,8	TGAGGTG	CGT	TTTGCC							
W3	IPEX	AmpCont	ACGTTGG	ACGTTGG	119	92	92	51,1	39,1	F	6991,6	ACAAC	TAT	T	7318,7	ACAAC	CAT	GTGTA	ACAGT	CTCT					
W4	IPEX	AmpCont	ACGTTGG	ACGTTGG	105	94,4	94,4	50,7	52,9	R	5121,3	AGGCGT	G	5368,5	AGGCGT	CATT	CAGCT	C							
W4	IPEX	TP53_c65	ACGTTGG	ACGTTGG	151	63,3	96	53,5	66,7	D	R	5469,6	AGACCTG	C	5740,8	AGACCTG	C	5756,8	AGACCTG	AGGCG	CGT	CACG			
W4	IPEX	PIK3CA_c1	ACGTTGG	ACGTTGG	123	74,1	96	50,4	42,1	F	5802,8	TTTGTG	CA	6074	TTTGTG	CA	T	6129,9	TTTGTG	CAAC	CTG	GAAT			
Norm_Ctr	IPEX	Norm_ctr	Norm_ctr	Norm_ctr	154	98,6	98,6	0	52,9	F	4695,2	Norm_ctr	Na	4717,2	Sodium	K	4733,2	Potassium	Mn	4750,2	Manganese	Matrix			
Norm_Ctr	IPEX	Norm_ctr	Norm_ctr	Norm_ctr	154	98,6	98,6	0	52,9	F	3990	Norm_ctr	Na	4999,4	Norm_ctr	1									
Norm_Ctr	IPEX	Norm_ctr	Norm_ctr	Norm_ctr	154	98,6	98,6	0	52,9	F	9317,2	Norm_ctr	Na	9339,2	Sodium	K	9355,2	Potassium	Mn	9372,2	Manganese	Matrix			
Norm_Ctr	IPEX	Norm_ctr	Norm_ctr	Norm_ctr	154	98,6	98,6	0	52,9	F	3980	Norm_ctr	Na	9621,4	Norm_ctr	4									
Norm_Ctr	IPEX	Norm_ctr	Norm_ctr	Norm_ctr	154	98,6	98,6	0	52,9	F	3975	Norm_ctr	Na	7135,8	Norm_ctr	5									

Abbildung 9: Ergebnisse des Assay-Designer-Tools. Zu sehen sind u.a. die Aufteilung in 4 Wells, PCR-Primer, Länge der Amplikons, UEP-Richtung und Sequenz.

Die Assays in der ClearSEEK™ Biochemie werden anhand ihres Wildtyp-Allels gruppiert und zusammengefasst. Die Software soll für jedes Amplikon eine Amplikon-Kontrolle entwerfen, um sicherzustellen, dass nur die Variante von Interesse amplifiziert wird, ohne dass das Wildtyp-Allel dabei ist, und es soll eine Amplikon-Kontrolle pro Extension-Well gegeben werden. Die Normalisierungskontrollen (Normalization Controls) sollen mit ClearSEEK-Assays in jedem Multiplex entworfen werden, um eine halbquantitative Schätzung der Häufigkeit der Varianten zu ermöglichen.

Die generierte Datei mit Assay-Gruppen wird in das Assay-Editor-Programm in das TYPHER-Softwarepaket des Massenspektrometers hochgeladen. Danach werden die Assays und die Platte(n) in der MassARRAY®-Datenbank eingerichtet, und diese Informationen werden mit dem Massenspektrometer verbunden. Die Aufteilung der Assays erfolgte in vier Extension-Well, die detailliert in Tabelle 9 dargestellt sind.

Tabelle 9: Aufteilung der Assay in 4 Extension-Well

Well / WT-Chanel	1, WT C	2, WT C	3, WT G	4, WT T
Assay	TP53_c742CtoTf_pR248W TP53_c818GtoATr_pR273HL TP53_c586CtoTGAF_pR196* TP53_c817CtoTf_pR273C TP53_c747GtoTCr_pR249S AmpControl_PIK3CA TP53_c637CtoTGAF_pR213* TP53_c524GtoAr_pR175H	TP53_c733GtoTAr_pG245CS AmpControl_TP53_1 TP53_c844CtoTf_pR282W TP53_c1024CtoTf_pR342* AmpControl_TP53_2	TP53_c527GtoTAf_pC176FY TP53_c743GtoTAf_pR248LQ AmpControl_TP53_4 AmpControl_TP53_3	AmpControl_TP53_5 TP53_c659AtoGr_pY220C_ASO PIK3CA_c1035ToAf_pN345K

4.2 Anpassung der Primer

Für eine exakte Analyse der Marker und Daten ist es notwendig, die Extension-Primer anzupassen oder zu adjustieren, da die Intensität des Peaks und die Masse in einem umgekehrten Verhältnis stehen. Oligonukleotide mit unterschiedlicher Länge haben unterschiedliche Desorptionseigenschaften in MALDI-TOF MassARRAY®-System. Längere Oligonukleotiden erzeugen tendenziell schwächere Signale als kürzere Oligonukleotide. Dies kann dazu führen, dass einige Analyt-Peaks verloren gehen, oder Signal-Rausch-Verhältnisse verschoben werden, was zu Genotypisierungsfehlern führen könnte. Erwünscht sind Extension-Peaks gleicher Intensität, die durch die Adjustierung der UEP-Konzentrationen erreicht werden.

Die PCR-Primer werden ebenfalls anhand der Ausbeute der Signale in der Extension-Reaktion bewertet und entsprechend angepasst, um eine optimale PCR-Effizienz zu erreichen. Idealerweise ist die Ausbeute der PCR-Primer (Umsetzung des UEP in Analytsignale) annähernd 100%, als ausreichend akzeptiert wird sie, wenn die über 80% liegt.

In dem vorliegenden Versuch wurde das Prüfen der Peak-Höhen der Extension-Primer getrennt vor der iPLEX® Pro Verifizierung durchgeführt. Dabei wurde jedes Well separat bewertet und die Peak-Höhen in jedem Well verglichen. Die Ergebnisse der ersten Testung vor der Anpassung sind in Abbildung 10 dargestellt.

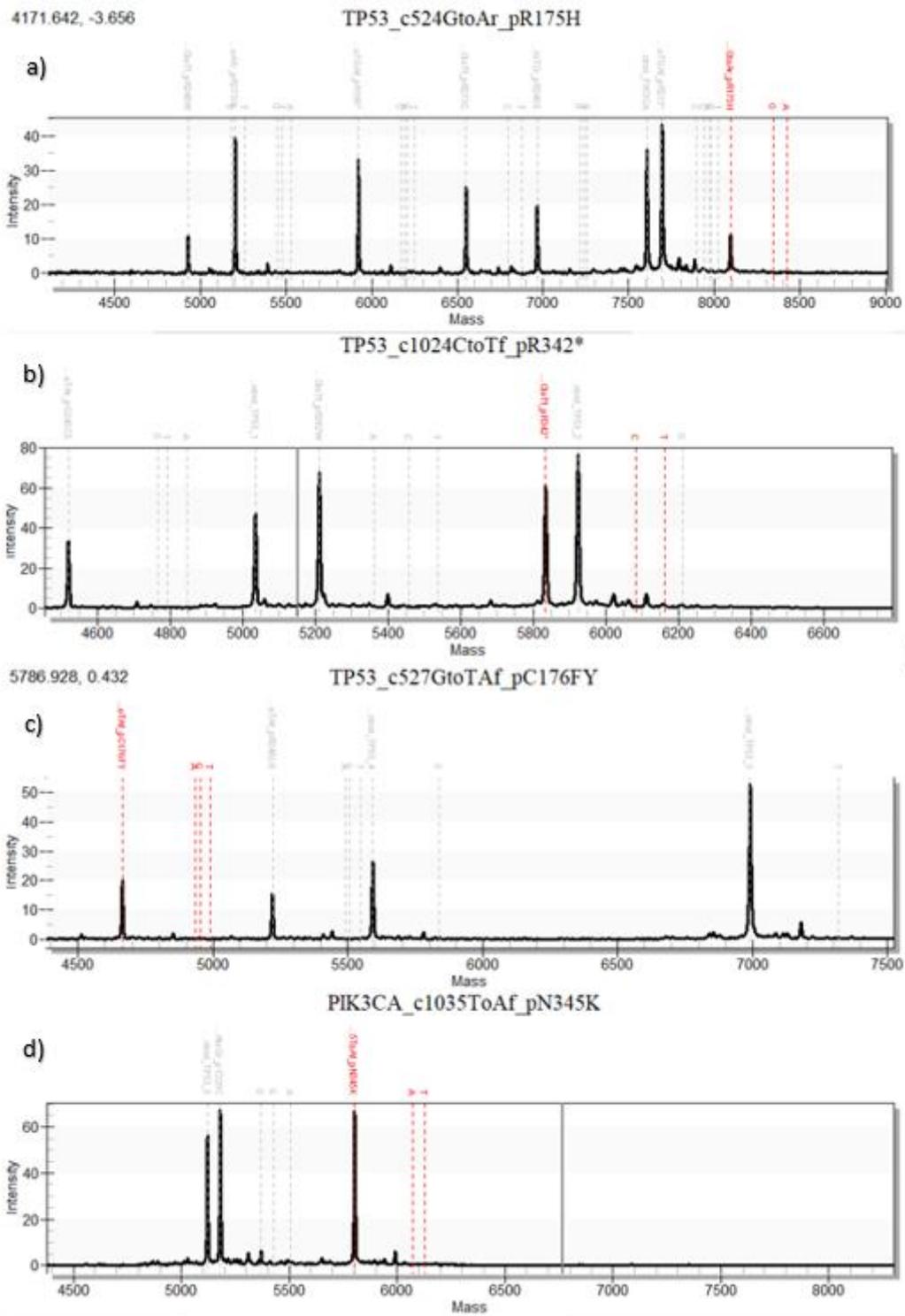


Abbildung 10: Darstellung der Peak-Höhen von Extension-Primer von a) (W1) bis d) (W4) im ersten Lauf vor jeglicher Anpassung

Gemäß Abbildung 10 sind die Höhen der Peaks unterschiedlich und sollten angepasst werden. Im Vergleich zu den anderen Wells sieht Well 4 (Abb. 10d) mit seinen drei UEP-Peaks zufriedenstellend aus. Allerdings waren die Signale etwas niedriger und es wurden alle Primer zugegeben. Die detaillierte Anpassung in quantitativer Hinsicht wurde in Tabelle 10

dargestellt. Die Anpassung erfolgte durch Zugabe der UEPs mit niedrigeren Peaks. Dabei wurden die Volumina im Vergleich zum größten Peak im Well prozentual berechnet und der vorhandenen Menge dazugegeben. Der erste ursprüngliche UEP-Mix wurde mit einer Vorlage von Agena Bioscience berechnet und in ddH₂O vorbereitet. Die Ausgangsmenge betrug 1 mL pro Well/Extension-Primer-Mix.

Tabelle 10: Extension-Primer Anpassung in μL

Assay	Ausgangsmenge in μL	1. Anpassung in μL	2. Anpassung in μL	3. Anpassung in μL	SUMME in μL
TP53_c742CtoTf_pR248W	4	10	4	5,4	23,4
TP53_c818GtoATr_pR273HL	4,6		2,3	1,4	8,3
TP53_c586CtoTGAF_pR196*	6,3		3,8	4	14,1
TP53_c817CtoTf_pR273C	8,3	3,3	3,7	6,9	22,2
TP53_c747GtoTCr_pR249S	10,1	10,1		9,1	29,3
AmpControl_PIK3CA	13,4	34,8			48,2
TP53_c637CtoTGAF_pR213*	14,4		5	5,8	25,2
TP53_c524GtoAr_pR175H	17,5		9,6	29,8	56,9
ddH ₂ O	921,4				
TP53_c733GtoTAr_pG245CS	3,7	3,7			7,4
AmpControl_TP53_1	4,9	2,7			7,6
TP53_c844CtoTf_pR282W	5,9				5,9
TP53_c1024CtoTf_pR342*	8,2				8,2
AmpControl_TP53_2	9,5				9,5
ddH ₂ O	967,8				
TP53_c527GtoTAf_pC176FY	3,8	4,5			8,3
TP53_c743GtoTAf_pR248LQ	5,1	10,3			15,4
AmpControl_TP53_4	6,5	6,5			13
AmpControl_TP53_3	11,6				11,6
ddH ₂ O	972,9				
AmpControl_TP53_5	4,2	4,2			8,4
TP53_c659AtoGr_pY220C_AS O	4,8	5,3			10,1
PIK3CA_c1035ToAf_pN345K	6,6	6,6			13,2
ddH ₂ O	984,4				

Nach jeder Zugabe wurde neu gemessen und bei Bedarf entsprechend angepasst. Nach vier Durchläufen und Anpassungen hatten die Extension-Peaks eine ähnliche Höhe und wurden als zufriedenstellend betrachtet. Die Summe aller Zugaben kann bei der Herstellung einer neuen Menge des Mixes hilfreich sein. Die Höhe der Peaks nach der letzten Anpassung sind in Abbildung 11 dargestellt.

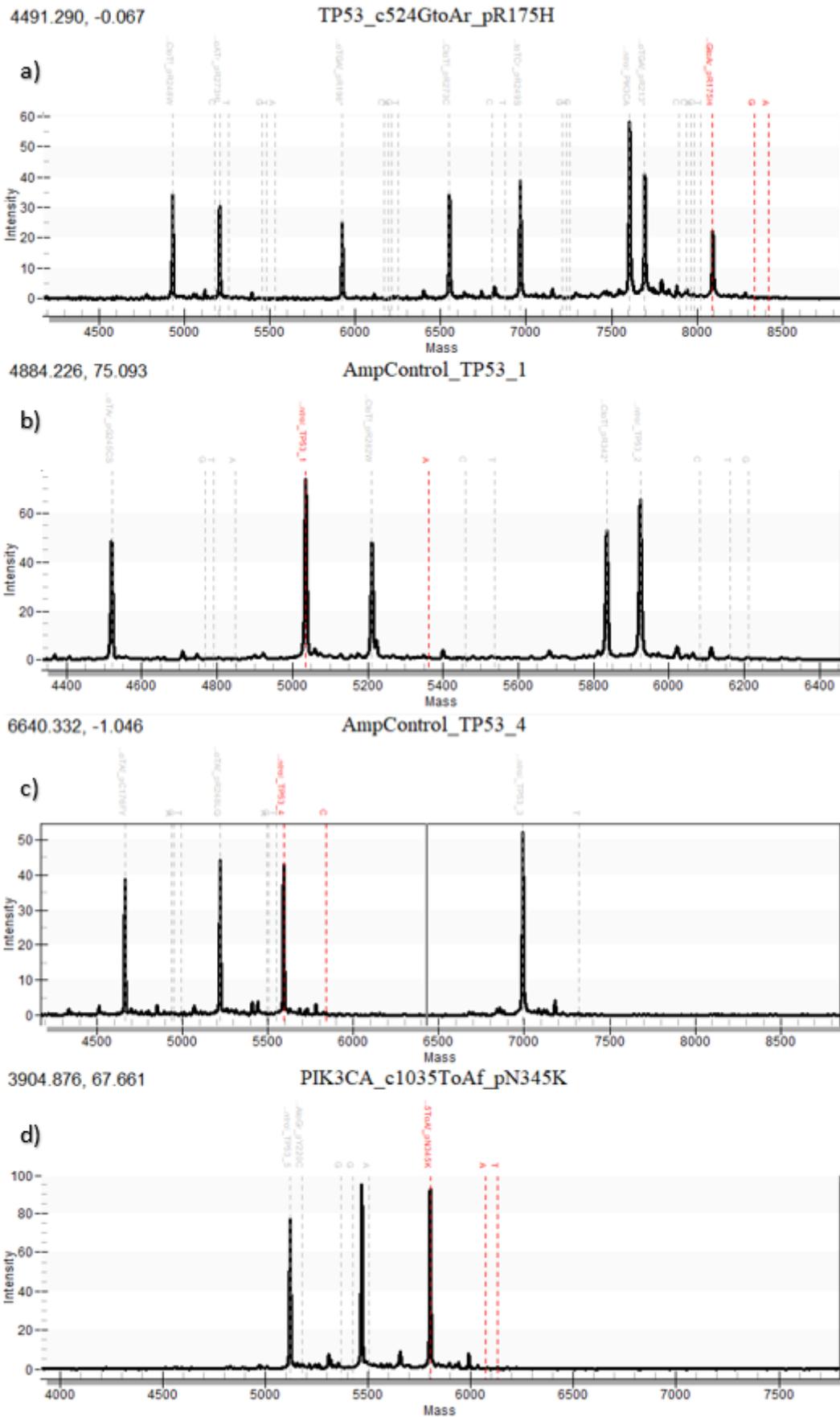


Abbildung 11: Darstellung der Peak-Höhen der UEPs nach der Anpassung

Basierend auf Abbildung 11 ist zu erkennen, dass Intensitäten der niedrigeren Peaks verstärkt und die Peaks insgesamt höher sind. In Wells 3 und 4 sind vergleichbar hohe UEP-Peaks zu beobachten, während in den Wells 1 und 2 jeweils ein UEP-Peak höher als die anderen Signale ist, jedoch ohne dabei zu viele Störungen zu verursachen. Nach dieser Anpassung wurden die Extension-Mixe als zufriedenstellend betrachtet und für weitere Versuche verwendet.

4.3 iPLEX® Pro Verifizierung

Mithilfe von der Standardbiochemie iPLEX® Pro werden alle Assays auf ihre Funktionalität geprüft. Dabei wird die PCR-Effizienz sowie die SBE-Ausbeute für Wildtyp-Signale getestet, und es werden die Primer-Interaktionen sowie unerwartete Peaks oder Verlängerungen in Proben oder NTCs⁶ geprüft. In der PCR-Reaktion des iPLEX® Pro werden Wildtyp-dNTPs verwendet, wodurch Wildtyp-Signale in negativen Proben (Proben ohne Varianten) erwartet werden. Oft werden hierfür die HapMap⁷-DNA-Proben als negative Kontrollen benutzt. Im Falle unerwarteter Ergebnisse wird eine Fehlerdiagnose und -behebung durchgeführt.

Die iPLEX® Pro Verifizierung umfasste die Testung von 10 HapMap-DNA-Proben mit einer Konzentration von 2 ng/μL und jeweils 2 NTCs pro Well auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Eine „globale“ PCR mit einem Endvolumen von 30μL wurde durchgeführt. Nach der SAP-Reaktion wurde das PCR+SAP-Produkt auf 4 Wells aufgeteilt und der entsprechende Extension Mastermix für jedes Well vorbereitet. Die Mikrotiterplatte wurde in der TYPER-Software wie auf der Abbildung 12 dargestellt.

⁶ NTC (No Template Control) = Negativkontrolle; anstelle von DNA wird Wasser gegeben, der Rest des Mastermixes bleibt gleich

⁷ Das HapMap-Projekt ist ein Projekt der Humangenomforschung, das die genetischen Variationen des menschlichen Genoms kreiert und analysiert; es ist eine Datenbank, die die genetischen Variationen von Menschen aus verschiedenen ethnischen Gruppen enthält. Die DNA-Proben sind kommerziell erhältlich unter bestimmten Bedingungen. (21)

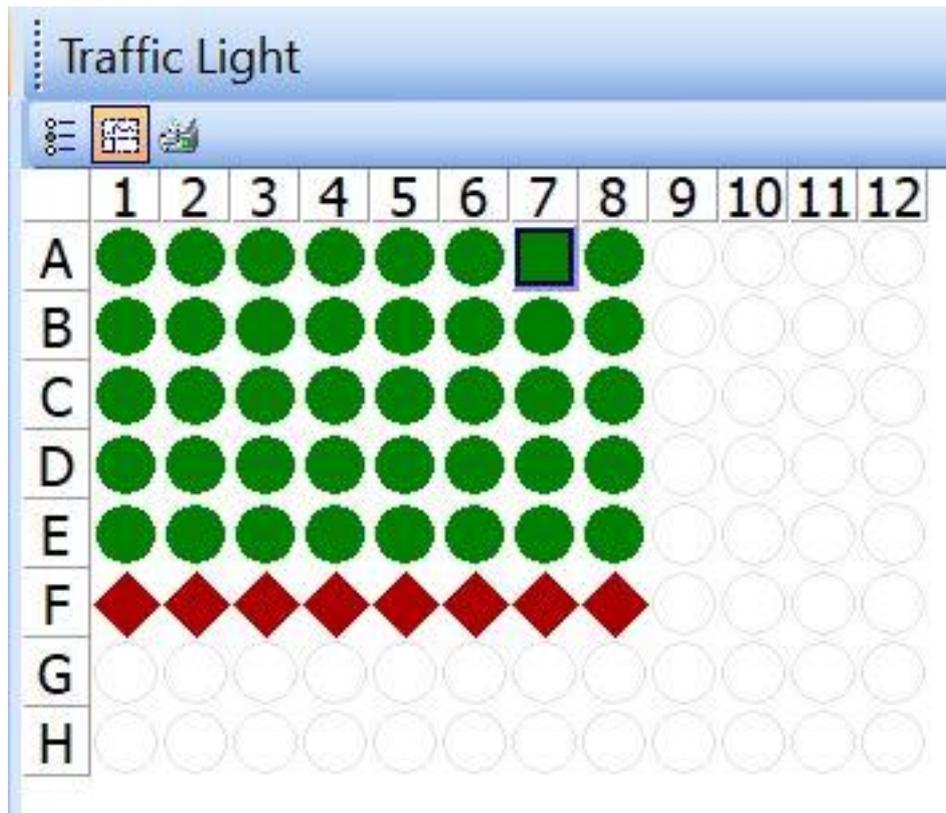


Abbildung 12: Ansicht der Mikrotiterplatte in der TYPER-Software. Die Platte enthält 10 HapMap-Proben (jeweils 4 Wells) in grüner Farbe und 2 NTCs in roter Farbe. Die ersten beiden Spalten gehören zu Well 1, die Spalte 3 und 4 zu Well 2 usw.

In diesem Ansatz waren die WT-dNTPs enthalten und daher wurden in HapMap-Proben WT-Signale erwartet. Diese wurden benutzt, um damit die Funktionalität der Assays und die PCR-Primer-Ausbeute in Gegenwart von DNA zu überprüfen und ggf. die PCR Primerkonzentration anzupassen. Es wurden keine Signale in den NTCs erwartet und daher wurden diese verwendet, um ggf. falsch-negative Extensionprodukte zu detektieren. In den NTCs werden die UEPs nicht in Signalpeaks umgesetzt, daher konnten sie verglichen werden. Abbildung 13 zeigt einen Vergleich der Assays in einem Cluster-Plot mit unterschiedlicher Ausbeute. Links ist der Assay TP53_c.637CtoTGAf_pR213* mit 10 von 10 erwarteten WT-C Signalen und einer Ausbeute von etwa 75%. Rechts ist der Assay TP53_c659AtoGr_pY220C mit 10 von 10 erwarteten WT-A Signalen und einer Ausbeute von etwa 100% zu sehen.

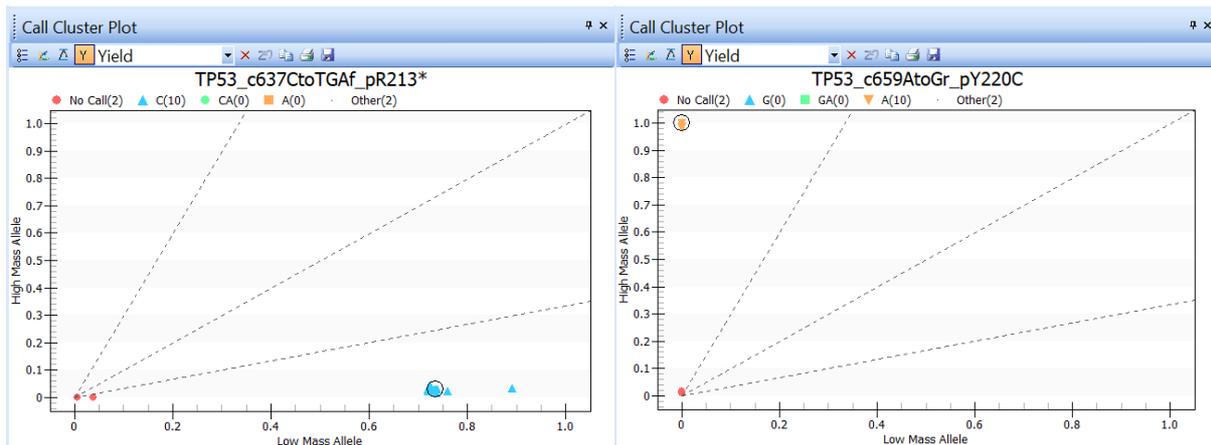


Abbildung 13: Cluster-Plot-Ansicht der Assays mit unterschiedlicher PCR-Ausbeute

In der Abbildung 14 und 15 sind die MassARRAY®-Spektren dargestellt, welche UEP-Peaks (erste rote gestrichelte Linie), Analyten-Peaks (zweite rote gestrichelte Linie) und WT-Peaks (blaue gestrichelte Linie) aufweisen. Peaks mit grau hinterlegten Linien gehören zu anderen Assays im selben Multiplex-Spektrum.

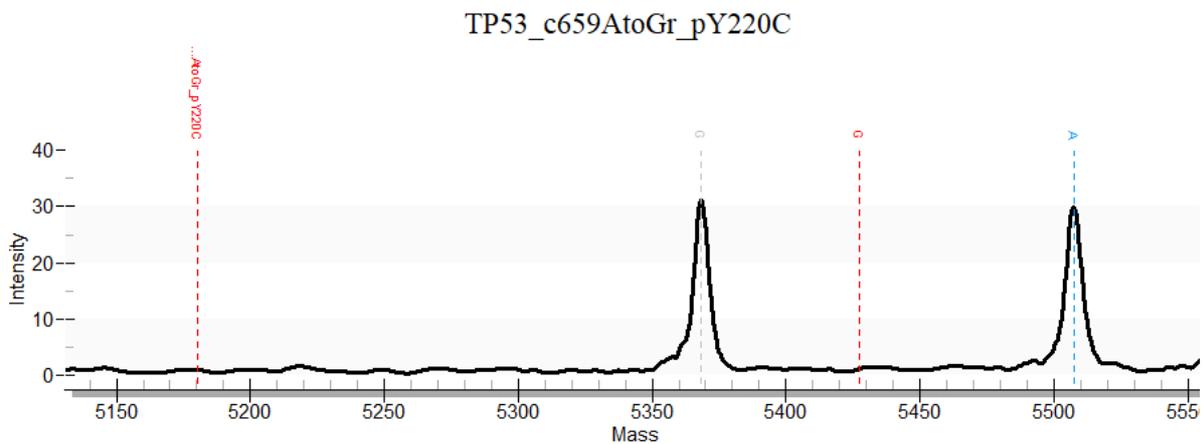


Abbildung 14: Spektrum des Assays, bei dem eine 100%ige Ausbeute erzielt wurde

7709.165, -3.976

TP53_c637CtoTGAf_pR213*

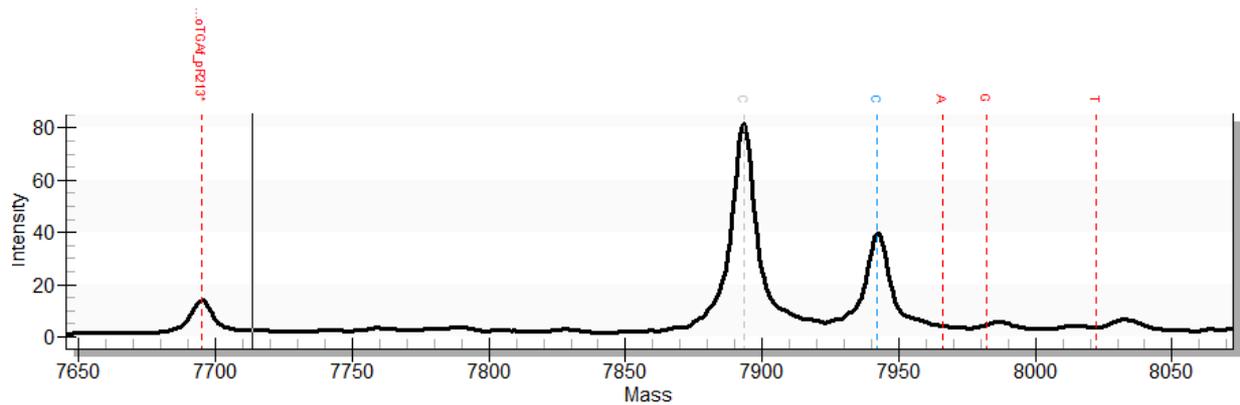


Abbildung 15: Spektrum des Assays, bei dem keine 100%ige Ausbeute erzielt wurde

Im Folgenden sind die Ergebnisse bzw. die Performance aller Assays in der nachstehenden Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Assay-Performance in der ersten iPLEX® Pro® Verifizierung

Probe	HapMap-DNA
Assay	Ausbeute
AmpControl_PIK3CA	100%
AmpControl_TP53_1	100%
AmpControl_TP53_2	100%
AmpControl_TP53_3	100%
AmpControl_TP53_4	100%
AmpControl_TP53_5	100%
PIK3CA_c1035ToAf_pN345K	100%
TP53_c1024CtoTf_pR342*	100%
TP53_c524GtoAr_pR175H	80-100%
TP53_c527GtoTAf_pC176FY G>A	95%
TP53_c527GtoTAf_pC176FY G>T	95-100%
TP53_c586CtoTGAf_pR196* C>T	95%
TP53_c586CtoTGAf_pR196* C>G	95%
TP53_c586CtoTGAf_pR196* C>A	95%
TP53_c637CtoTGAf_pR213* C>T	70-90%
TP53_c637CtoTGAf_pR213* C>G	70-90%
TP53_c637CtoTGAf_pR213* C>A	70-90%
TP53_c659AtoGr_pY220C	100%
TP53_c733GtoTAr_pG245CS	100%
TP53_c733GtoTAr_pG245CS	100%
TP53_c742CtoTf_pR248W	90-100%
TP53_c743GtoTAf_pR248LQ	90%
TP53_c743GtoTAf_pR248LQ G>A	90%
TP53_c747GtoTCr_pR249S	90-95%
TP53_c817CtoTf_pR273C	95-100%
TP53_c818GtoATr_pR273HL	95-100%
TP53_c844CtoTf_pR282W	100%
Capture_control_1	100%
Capture_control_2	100%
Capture_control_3	100%
Capture_control_4	100%
Capture_control_5	100%

Die Performance bzw. Ausbeute aller Assays war zufriedenstellend und bedurfte in diesem Schritt keiner Anpassung. Eine Ausbeute von etwa 70% bei einigen Assays wurde akzeptiert, und diese Assays wurden in weiteren Schritten besonders beobachtet.

4.4 ClearSEEK™ Verifizierung

Wenn alle Assays die erforderlichen Kriterien im iPLEX® Pro-Modus erfüllt haben, werden sie unter den Bedingungen der ClearSEEK™-Biochemie getestet, um potenzielle Bindungen der Primer an falschen DNA-Abschnitten zu prüfen. Da der PCR-Mastermix in der ClearSEEK™-Biochemie keine Wildtyp-dNTPs verwendet, werden weder WT- noch Mutationssignale erwartet.

Die ClearSEEK™ Verifizierung wurde analog zu der iPLEX® Pro Verifizierung durchgeführt, wobei der Ansatz und die Prozessschritte identisch waren, mit Ausnahme der Extension-Reaktion, die an die ClearSEEK™-Biochemie angepasst wurde. In diesem Ansatz wurden keine WT-ddNTPs verwendet, weshalb in den HapMap-Proben weder WT- noch Mutationssignale zu erwarten waren. Es wurden keine Signale in den NTCs erwartet.

Während der Analyse dieser Daten wurde festgestellt, dass der Assay TP53_c659AtoGr_pY220C ein Mutationssignal mit einer hohen Ausbeute (80%) aufweist.

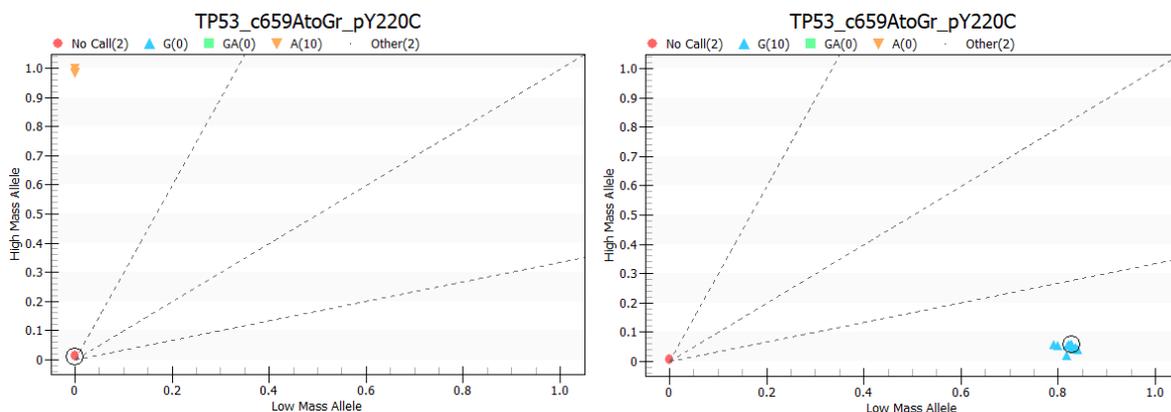


Abbildung 16: WT- und Mutationssignale in pY220C

Die vorliegende Abbildung 16 illustriert die Performance des Assays TP53_c659AtoGr_pY220C in einem Cluster-Plot unter Verwendung von beiden Biochemien. Auf der linken Seite sind die Wildtyp-„Calls“ oder -Signale in 10 von 10 Proben zu sehen, wie es für die iPLEX® Pro Biochemie erwartet wurde. Auf der rechten Seite hingegen sind die unerwünschten Mutationssignale in 10 von 10 Proben zu erkennen, die während des ClearSEEK™-Biochemiemodus aufgetreten sind.

Aufgrund dieses Problems wurde eine Fehlerdiagnose durchgeführt. Zuerst wurde mittels online frei verfügbarer Software-Tools eine Untersuchung bezüglich des Heterodimer-/Homodimer-Potentials der Extension-Primer durchgeführt und es konnte keine signifikante Ausprägung festgestellt werden.

Es stellte sich heraus, dass dieser Assay aufgrund von falschem Priming ein falsches Signal lieferte. Um dieses Problem ohne ein Re-Design zu lösen, kann der UEP-Primer in einen ASO-Assay (Allele-spezifisches Oligonukleotid) umgewandelt werden, bei dem die Mutationsvariante in die 3'-Base integriert wird und der ASO-Assay auf die nächste Base verlängert.

WELL	TERM	SNP_ID	UEP_DIR	UEP_SEQ	EXT1_CALL	EXT1_SEQ	EXT2_CALL	EXT2_SEQ
W4	WTT	TP53_c659AtoGr_pY220C	R	AGACCTCAGGCGGCTCA	G	AGACCTCAGGCGGCTCAC	A	AGACCTCAGGCGGCTCAT
W4	WTT	TP53_c659AtoGr_pY220C_v2_ASO	R	AGACCTCAGGCGGCTCAC	G	AGACCTCAGGCGGCTCACA	A	AGACCTCAGGCGGCTCACG

Abbildung 17: Unterschied zwischen dem normalen und dem ASO-Assay

Die vorliegenden Ergebnisse dargestellt in der Abbildung 17 zeigen Unterschiede zwischen dem ursprünglichen und dem ASO-Assay bei der Analyse der TP53_c659AtoGr_pY220C Mutation. Der ursprüngliche Assay im ersten Panel-Design wurde durch den neuen ASO-Assay ersetzt. Da der neue Assay eine andere Oligonukleotid-Sequenz verwendet, musste der Extension-Mix für Well 4 neu hergestellt werden. Der hergestellte Mix wurde auf seine Extension-Peak-Höhen geprüft und es konnte festgestellt werden, dass er zufriedenstellende Ergebnisse liefert und nicht angepasst werden soll. Aufgrund dieser positiven Ergebnisse konnte das Experiment fortgesetzt werden, und es war möglich, die weitere Entwicklung des Panels voranzutreiben.

4.5 Troubleshooting

4.5.1. II iPLEX® Pro Verifizierung

Zur Überprüfung der Funktionalität des ASO-Assays wurde notwendig, eine neue iPLEX® Pro Verifizierung, die gBlocks⁸ als Proben einschließt, durchzuführen. Es wurden zwei separate Durchläufe durchgeführt.

- In dem ersten Durchlauf wurden gBlock-Proben mit einer Konzentration von etwa 600 Kopien in einem Verhältnis von 1:1 mit einem Wildtyp-Hintergrund (HapMap-Proben) bei gleicher Konzentration kombiniert. Es wurden insgesamt 10 solcher Mischproben und 2 NTCs getestet.

⁸ gBlocks = Gene Fragments, doppelsträngige DNA-Fragmente mit einer Länge von bis 3000 Basenpaaren, die für die erschwingliche und einfache Konstruktion oder Modifikation von Genen konzipiert wurde. (22)

- Im zweiten Durchlauf wurde nur der Wildtyp, einmal mit einer Gesamteingabe von 600 getestet. Es wurden insgesamt 10 HapMap-Proben und 2 NTCs getestet.

Das Ziel dieser experimentellen Verfahren besteht darin, ein umfassendes Verständnis für die Spezifität und die Amplifikationseffizienz des Assays zu erlangen. Um sicherzustellen, dass das Assay korrekt funktioniert, wurden Tests mit verschiedenen Varianten-Allel-Frequenzen⁹ (VAF) durchgeführt. Zunächst wurde eine VAF von 50% verwendet, um sicherzustellen, dass die angemessene Menge an Extension-Produkten im iPLEX[®] Pro-Modus beobachtet wird. Anschließend wurde eine VAF von 1% verwendet, um die Sensitivität des Assays für die ClearSEEK[™]-Biochemie zu testen.

Es wird erwartet, dass in dem ASO-Assay mit gBlocks Wildtyp-Signale des künstlich eingefügten SNPs zu sehen sind, da die Mutation nicht natürlich vorkommt. Es wird jedoch nicht erwartet, dass das Mutationssignal in den Proben sichtbar ist.

Bei NTCs mit gBlocks wird erwartet, dass ASO-Assay- und Extension-Signale von Assays zu sehen sind, deren Extension-Primer auch auf die gBlocks des ASO-Assays binden.

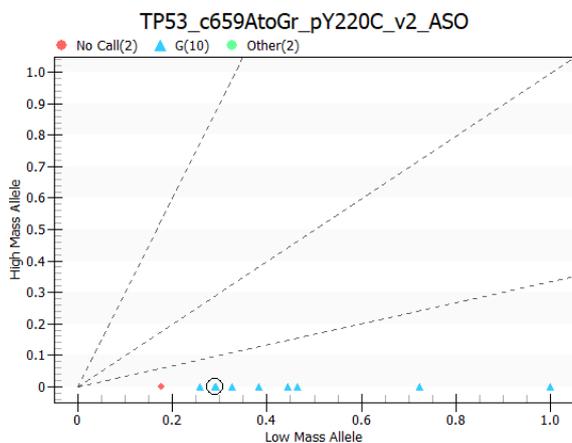


Abbildung 18: Performance des ASO Assays in einem WT-Hintergrund, in einer 50%igen VAF

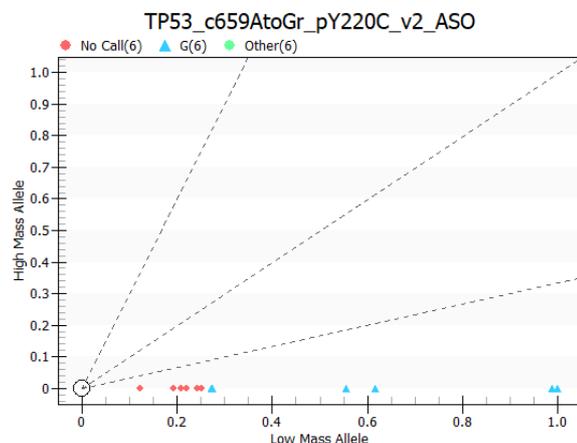


Abbildung 19: Performance des ASO Assays in einem WT-Hintergrund, in einer 1%igen VAF

Die Abbildungen 18 und 19 zeigen, dass die Leistung des ASO-Assays bei einer 50%igen VAF besser ist, was erwartet wurde. Bei einer 1%igen VAF ist der Assay weniger sensitiv. Die Ausbeute variiert jedoch stark und liegt im Bereich von 30 bis 100 bei den positiven

⁹ VAF beschreibt den Anteil von Varianten-Allelen im Verhältnis zu Wildtyp-Allelen in einer bestimmten Probe.
(23)

Proben, was jedoch für die Performance von ASO-Assays typisch ist. Wichtig ist, dass der ASO-Assay auch bei einer 1%igen VAF nachweisbar ist.

Die Leistungsfähigkeit des ASO-Assays blieb unverändert, wenn er ausschließlich an Wildtyp-Proben getestet wurde, unabhängig von der Konzentration.

4.5.2 II ClearSEEK™-Verifizierung

Die Überprüfung des ASO-Assays wurde auch unter CSK-Biochemiebedingungen durchgeführt. Hierbei wurden die gleichen Proben wie bei der II iPLEX® Pro Verifizierung verwendet. Bei den Mischproben aus gBlocks und HapMaps wurden keine Signale erwartet, außer bei den nicht-ASO-Assays, bei denen der Extension-Primer auch an die ASO-Assay-gBlocks bindet. Die ASO-Assays in gBlocks mit und ohne HapMaps zeigten lediglich WT-Signale für künstlich eingefügte SNPs, während das Mutationssignal, das nicht tatsächlich existiert, nicht nachgewiesen werden konnte.

Es wurde erwartet, dass die NTCs ohne gBlocks keine Signale zeigen würden, da sie nur als Kontrollen verwendet wurden, um sicherzustellen, dass keine unspezifischen Amplifikationen oder Verunreinigungen in den Reaktionen vorhanden waren. Im Gegensatz dazu wurden bei den NTCs mit gBlocks ASO-Assays und Extension-Signale beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Extension-Primer auch auf die gBlocks der ASO-Assays binden und Allele verlängern können, die nicht dem jeweiligen WT-Kanal entsprechen.

Experiment	II CSK Verifizierung	
	1% AF gBlock:HAPMAP	HAPMAP
Proben	Ausbeute	Ausbeute
AmpControl_PIK3CA	100%	100%
AmpControl_TP53_1	100%	100%
AmpControl_TP53_2	100%	100%
AmpControl_TP53_3	100%	100%
AmpControl_TP53_4	100%	100%
AmpControl_TP53_5	100%	100%
PIK3CA_c1035ToAf_pN345K	<10%	<10%
TP53_c1024CtoTf_pR342*	<10%	<10%
TP53_c524GtoAr_pR175H	<10%	<10%
TP53_c527GtoTAf_pC176FY G>A	<10%	<10%
TP53_c527GtoTAf_pC176FY G>T	<10%	<10%
TP53_c586CtoTGAf_pR196* C>T	<10%	<10%
TP53_c586CtoTGAf_pR196* C>G	<10%	<10%
TP53_c586CtoTGAf_pR196* C>A	<10%	<10%
TP53_c637CtoTGAf_pR213* C>T	<10%	<10%
TP53_c637CtoTGAf_pR213* C>G	<10%	<10%
TP53_c637CtoTGAf_pR213* C>A	<10%	<10%
TP53_c659AtoGr_pY220C_v2_AS0	95%	<10%
TP53_c733GtoTAr_pG245CS	<10%	<10%
TP53_c733GtoTAr_pG245CS	<10%	<10%
TP53_c742CtoTf_pR248W	<10%	<10%
TP53_c743GtoTAf_pR248LQ	<10%	<10%
TP53_c743GtoTAf_pR248LQ G>A	<10%	<10%
TP53_c747GtoTCr_pR249S	<10%	<10%
TP53_c817CtoTf_pR273C	<10%	<10%
TP53_c818GtoATr_pR273HL	<10%	<10%
TP53_c844CtoTf_pR282W	<10%	<10%
Capture_control_1		
Capture_control_2		
Capture_control_3		
Capture_control_4		
Capture_control_5		

Abbildung 20: Darstellung der Ergebnisse der zweiten ClearSEEK™ Verifizierung

Wie aus der Abbildung 20 ersichtlich ist, lagen die Ergebnisse aller Assays im erwarteten Bereich. Das Signal, das der ASO-Assay zeigt, wurde in der NTC-Probe mit gBlock beobachtet. Dieses ist in der Abbildung 21 dargestellt.

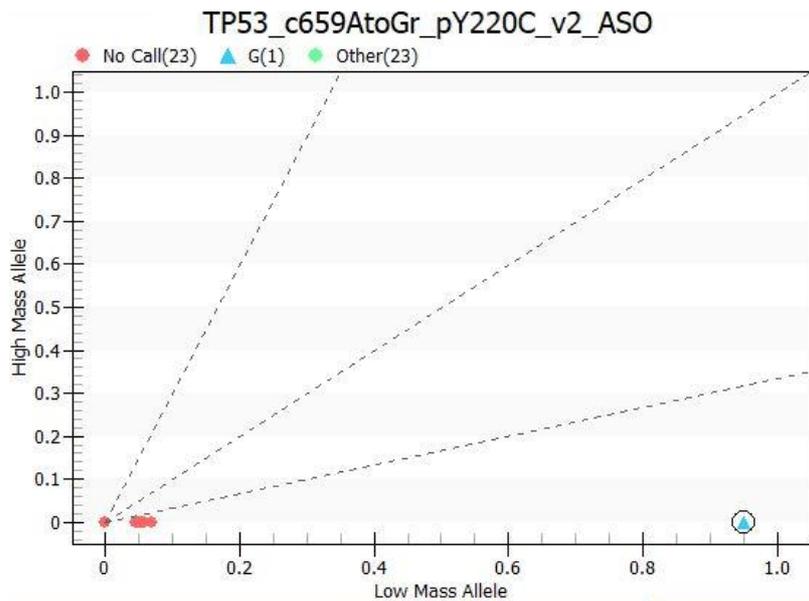


Abbildung 21: Das ASO-Assay bindet an die gBlock-Sequenz und verlängert um die Nukleotidbase C (Cytosin)

4.6 ClearSEEK™ Validierung an klinischen Proben

Die Validierung der Assays an klinischen Proben erfolgt, wenn sie eine erfolgreiche Performance im iPLEX®- und ClearSEEK™-Modus an HapMap-Proben gezeigt haben.

Dieser Test ist von großer Bedeutung, da er die Leistung und Zuverlässigkeit eines Panels zeigen sollte. Hierbei wird eine ausreichende Anzahl klinischer Proben untersucht, um die Sensitivität (Fähigkeit, positive Ergebnisse genau zu erkennen) und Spezifität (Fähigkeit, negative Ergebnisse korrekt auszuschließen) des Panels zu bewerten. Durch die Validierung eines Panels an klinischen Proben, kann sichergestellt werden, dass das Panel vertrauenswürdige Ergebnisse für den Forschungsbereich oder z.B. für die Patientendiagnose oder -überwachung liefern kann. Bevor ein diagnostisches Verfahren in der klinischen Praxis eingesetzt wird, ist es wichtig, seine Qualität und Zuverlässigkeit zu bestätigen.

Die Performance der Assays wird anhand von bekannten positiven und negativen Proben in der Kohorte sowie NTCs bewertet. Als Referenzproben wurden in dieser Untersuchung solche verwendet, die im *Cluster Plot* (Rohdaten) deutlich abweichen oder eine Gruppe bilden, die auch optisch von negativen Proben getrennt werden kann. Zudem wurden Proben eingeschlossen, die vorab mittels ddPCR (extern am IKP ausgewertet) als offensichtlich positiv oder negativ gemessen wurden. Als zusätzliche Positivkontrolle wurde ein SeraCare Seraseq® Mutation Mix v2 verwendet, der die Mutationen p.R175H, p.R273H und p.R248Q

enthält und als positive Kontrollen bei einer Varianten-Allelfrequenz (VAF) von 1% und 2% eingesetzt wurde. Eine Liste der Referenzproben ist in der Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Referenzproben

Positive Referenzproben	Negative Referenzproben
SeraCare Seraseq® p.R175H 2% VAF	3
SeraCare Seraseq® p.R175H 1% VAF	13
SeraCare Seraseq® p.R273H 2% VAF	53
SeraCare Seraseq® p.R273H 1% VAF	326
SeraCare Seraseq® p.R248Q 2% VAF	418
SeraCare Seraseq® p.R248Q 1% VAF	434
Probe 52 positiv für p.R273H	442
Probe 567 positiv für p.R273C	445
Probe 1492 positiv für PIK3CA:p.N345K	457
Probe 886 positiv für PIK3CA:p.N345K	479
Probe 527 positiv für p.R213*	594
Probe 431 positiv für p.R342	742
Probe 579 positiv für p.R175	1029
	454
	664

Die negativen Referenzproben können zusätzlich für die Erstellung der Baseline-Datei verwendet werden, für die Methode mit Wildtyp-Kontrollproben auf den Platten, da sie aus derselben Kohorte stammen.

5. Ergebnisse

5.1 ClearSEEK™ Validierung an klinischen Proben

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden klinische Proben zur Validierung der ClearSEEK™-Biochemie verwendet. Insgesamt wurden 84 Proben vom *Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für klinische Pharmakologie (IKP), Stuttgart* eingesetzt, mit einer Konzentration von 2 ng. Diese wurden bereits vorbereitet und im flüssigen Zustand geliefert. Sowohl das 96- als auch das 384-Format des CPM wurden verwendet, um die Sensitivität der beiden Systeme für diese Biochemie und dieses Panel zu prüfen.

Um die Testergebnisse zu generieren, wurde die Somatic Variant Report (SVR) Software genutzt. Zur Erstellung der Baseline-Datei wurden 15 Proben aus der Kohorte verwendet, die als negativ (Wildtyp) erwartet wurden.

In der vorliegenden Tabelle 13 sind die Ergebnisse dargestellt, mit den für dieses Gerät, die Biochemie und das Panel optimierten Einstellungen des Reports.

Tabelle 13: Darstellung der Ergebnisse an beiden CPM-Systemen

	CPM96	CPM384
Einstellungen für SVR	Baseline Method: WT Type:SNR Minimum Peak Intensity: 5 Z-Score: 4	Baseline Method: WT Type:AREA Minimum Peak Intensity: 5 Z-Score: 3
SeraCare Seraseq® p.R175H 2% VAF	gefunden 1/2	gefunden
SeraCare Seraseq® p.R175H 1% VAF	nicht gefunden	gefunden 1/2
SeraCare Seraseq® p.R273H 2% VAF	gefunden	gefunden
SeraCare Seraseq® p.R273H 1% VAF	gefunden	gefunden
SeraCare Seraseq® p.R248Q 2% VAF	gefunden	gefunden
SeraCare Seraseq® p.R248Q 1% VAF	gefunden	gefunden
Probe 52 positiv für p.R273H	gefunden	gefunden
Probe 567 positiv für p.R273C	gefunden	gefunden
Probe 1492 positiv für PIK3CA:p.N345K	gefunden	gefunden
Probe 886 positiv für PIK3CA:p.N345K	gefunden	gefunden
Probe 527 positiv für p.R213*	gefunden	gefunden
Probe 431 positiv für p.R342	gefunden	nicht gefunden
Probe 579 positiv für p.R175	nicht gefunden	gefunden

Darüber hinaus wurde die Performance des Panels anhand alternativer Einstellungen bewertet, die verwendet werden können, wenn keine Informationen über die negativen Proben vorliegen. Einer der drei Ansätze zur Ausreißer-Eliminierungstechniken, die IQR-Methode,

wurde auf die Baseline-Datei angewendet, die aus den von der Software untersuchten Platten extrahiert wird. Die Ergebnisse dieses Tests sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Performance des Panels unter Anwendung alternativer Baseline-Datei

	CPM96	CPM384
Einstellungen für SVR	Baseline Method: ON PLATE, IQR Type:SNR Minimum Peak Intensity: 5 Z-Score: 4	Baseline Method: ON PLATE, IQR Type:AREA Minimum Peak Intensity: 5 Z-Score: 3
SeraCare Seraseq® p.R175H 2% VAF	gefunden 1/2	gefunden
SeraCare Seraseq® p.R175H 1% VAF	nicht gefunden	gefunden 1/2
SeraCare Seraseq® p.R273H 2% VAF	gefunden	gefunden
SeraCare Seraseq® p.R273H 1%VAF	gefunden	gefunden
SeraCare Seraseq® p.R248Q 2%VAF	gefunden	gefunden
SeraCare Seraseq® p.R248Q 1% VAF	gefunden	gefunden
Probe 52 positiv für p.R273H	gefunden	gefunden
Probe 567 positiv für p.R273C	gefunden	gefunden
Probe 1492 positiv für PIK3CA:p.N345K	gefunden	gefunden
Probe 886 positiv für PIK3CA:p.N345K	gefunden	gefunden
Probe 527 positiv für p.R213*	gefunden	gefunden
Probe 431 positiv für p.R342	gefunden	nicht gefunden
Probe 579 positiv für p.R175	nicht gefunden	gefunden

Neben diesen Referenzproben zeigten die Ergebnisse beider Tests kleine Abweichungen bei der Erkennung anderer Varianten. Beispielsweise ergab das Panel auf dem CPM96 System mit der WT-Baseline Methode 22 Varianten, während es mit der IQR-Methode 23 Varianten erkannte. In ähnlicher Weise erkannte das CPM384 System mit der WT-Baseline Methode 19 Varianten, während es mit der IQR-Methode 24 Varianten von insgesamt 96 analysierten Proben entdeckte (84 klinischen Proben, 4 SeraCare-Replikaten, 8 HapMaps).

Obwohl keine der 15 negativen Proben, die in Tabelle 12 aufgeführt sind, im SVR mit der IQR-Baselinemethode des CPM96-Systems erschienen, wurden mit CPM384-System der Proben (53, 445 und 457) erfasst. Allerdings erfolgte die Erfassung mit einer sehr niedrigen Ausbeute und Z-Score, die an der Grenze liegen.

Die Ergebnisse in Form von Reports (SVR) sind in den jeweiligen Abbildungen 22, 23, 24 und 25 dargestellt.

Change Zscore (Default Value : 3)

4

Export CSV

Report Summary:	Analysis Parameters:
Date of Report: Sun Jun 11 12:32:24 2023	Intensity Type: SNR
SVR Report Version: v1.0	Intensity Threshold: 5
Chemistry: ClearSEEK	Baseline Method: External
Panel Software Version: TP53 v1.0	
Total Samples : 96	
QC Passed : 94	
QC Failed: 2	
Samples with Variants: 22	
Samples without Variants: 74	

Panel Content

PIK3CA:p.N345K c.1035T>A (2)	TP53:p.C176F c.527G>T (0)	TP53:p.C176Y c.527G>A (2)
TP53:p.G245C c.733G>T (0)	TP53:p.G245S c.733G>A (3)	TP53:p.R175H c.524G>A (1)
TP53:p.R196 c.586C>A (0)	TP53:p.R196 c.586C>G (0)	TP53:p.R196 c.586C>T (0)
TP53:p.R213 c.637C>A (0)	TP53:p.R213 c.637C>G (0)	TP53:p.R213 c.637C>T (2)
TP53:p.R248L c.743G>T (0)	TP53:p.R248Q c.743G>A (6)	TP53:p.R248W c.742C>T (2)
TP53:p.R249S c.747G>C (0)	TP53:p.R249S c.747G>T (0)	TP53:p.R273C c.817C>T (1)
TP53:p.R273H c.818G>A (10)	TP53:p.R273L c.818G>T (0)	TP53:p.R282W c.844C>T (1)
TP53:p.R342 c.1024C>T (1)	TP53:p.Y220C c.659A>G (0)	

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Abbildung 22: SVR des Panels auf dem CPM96; Baseline-Datei wurde mithilfe von negativen Proben generiert

Change Zscore (Default Value : 3)

4

Export CSV

Report Summary:	Analysis Parameters:
Date of Report: Sun Jun 11 12:43:53 2023	Intensity Type: SNR
SVR Report Version: v1.0	Intensity Threshold: 5
Chemistry: ClearSEEK	Baseline Method: Onplate - IQR
Panel Software Version: TP53 v1.0	
Total Samples : 96	
QC Passed : 94	
QC Failed: 2	
Samples with Variants: 23	
Samples without Variants: 73	

Panel Content

PIK3CA:p.N345K c.1035T>A (2)	TP53:p.C176F c.527G>T (0)	TP53:p.C176Y c.527G>A (4)
TP53:p.G245C c.733G>T (0)	TP53:p.G245S c.733G>A (3)	TP53:p.R175H c.524G>A (1)
TP53:p.R196 c.586C>A (0)	TP53:p.R196 c.586C>G (0)	TP53:p.R196 c.586C>T (0)
TP53:p.R213 c.637C>A (0)	TP53:p.R213 c.637C>G (0)	TP53:p.R213 c.637C>T (2)
TP53:p.R248L c.743G>T (0)	TP53:p.R248Q c.743G>A (7)	TP53:p.R248W c.742C>T (0)
TP53:p.R249S c.747G>C (0)	TP53:p.R249S c.747G>T (0)	TP53:p.R273C c.817C>T (1)
TP53:p.R273H c.818G>A (11)	TP53:p.R273L c.818G>T (0)	TP53:p.R282W c.844C>T (1)
TP53:p.R342 c.1024C>T (1)	TP53:p.Y220C c.659A>G (0)	

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Abbildung 23: SVR des Panels auf dem CPM96; Baseline-Datei wurde mithilfe von IQR-Methode auf der Platte generiert

Change Zscore (Default Value : 4)

Export CSV

Report Summary:	Analysis Parameters:
Date of Report: Sun Jun 11 11:29:53 2023	Intensity Type: Area
SVR Report Version: v1.0	Intensity Threshold: 5
Chemistry: ClearSEEK	Baseline Method: External
Panel Software Version: TP53 v1.0	
Total Samples : 96	
QC Passed : 94	
QC Failed: 2	
Samples with Variants: 19	
Samples without Variants: 77	

Panel Content

PIK3CA:p.N345K c.1035T>A (1)	TP53:p.C176F c.527G>T (0)	TP53:p.C176Y c.527G>A (2)
TP53:p.G245C c.733G>T (0)	TP53:p.G245S c.733G>A (1)	TP53:p.R175H c.524G>A (3)
TP53:p.R196 c.586C>A (0)	TP53:p.R196 c.586C>G (0)	TP53:p.R196 c.586C>T (1)
TP53:p.R213 c.637C>A (0)	TP53:p.R213 c.637C>G (9)	TP53:p.R213 c.637C>T (1)
TP53:p.R248L c.743G>T (0)	TP53:p.R248Q c.743G>A (3)	TP53:p.R248W c.742C>T (0)
TP53:p.R249S c.747G>C (0)	TP53:p.R249S c.747G>T (0)	TP53:p.R273C c.817C>T (1)
TP53:p.R273H c.818G>A (1)	TP53:p.R273L c.818G>T (0)	TP53:p.R282W c.844C>T (0)
TP53:p.R342 c.1024C>T (1)	TP53:p.Y220C c.659A>G (0)	

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Abbildung 24: SVR des Panels auf dem CPM384; Baseline-Datei wurde mithilfe von negativen Proben generiert

Change Zscore (Default Value : 4)

Export CSV

Report Summary:	Analysis Parameters:
Date of Report: Sun Jun 11 11:46:31 2023	Intensity Type: Area
SVR Report Version: v1.0	Intensity Threshold: 5
Chemistry: ClearSEEK	Baseline Method: Onplate - IQR
Panel Software Version: TP53 v1.0	
Total Samples : 96	
QC Passed : 94	
QC Failed: 2	
Samples with Variants: 31	
Samples without Variants: 65	

Panel Content

PIK3CA:p.N345K c.1035T>A (2)	TP53:p.C176F c.527G>T (0)	TP53:p.C176Y c.527G>A (2)
TP53:p.G245C c.733G>T (0)	TP53:p.G245S c.733G>A (1)	TP53:p.R175H c.524G>A (4)
TP53:p.R196 c.586C>A (0)	TP53:p.R196 c.586C>G (0)	TP53:p.R196 c.586C>T (2)
TP53:p.R213 c.637C>A (0)	TP53:p.R213 c.637C>G (1)	TP53:p.R213 c.637C>T (2)
TP53:p.R248L c.743G>T (1)	TP53:p.R248Q c.743G>A (14)	TP53:p.R248W c.742C>T (2)
TP53:p.R249S c.747G>C (0)	TP53:p.R249S c.747G>T (0)	TP53:p.R273C c.817C>T (1)
TP53:p.R273H c.818G>A (7)	TP53:p.R273L c.818G>T (0)	TP53:p.R282W c.844C>T (0)
TP53:p.R342 c.1024C>T (2)	TP53:p.Y220C c.659A>G (0)	

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

Abbildung 25: SVR des Panels auf dem CPM384; Baseline-Datei wurde mithilfe von IQR-Methode auf der Platte generiert

6. Diskussion

Die vorliegende Bachelorarbeit konzentrierte sich auf die Entwicklung und Validierung des ClearSEEK™ TP53 Panels. Dabei wurden die erforderlichen Schritte zur Panel-Entwicklung, einschließlich der Auswahl der zu untersuchenden Marker und der Optimierung des Panels, beleuchtet. Das übergeordnete Ziel bestand darin, die Fähigkeit des ClearSEEK™-Panels zur zuverlässigen Identifizierung von Mutationen in klinischen Proben zu validieren. Die Ergebnisse zeigen, dass das ClearSEEK™ TP53 Panel für beide CPM-Formate geeignet ist und durch Feinabstimmung des Baseline-Files verbesserte Ergebnisse erzielt werden können.

Es wurde festgestellt, dass das Panel eine geringere Sensitivität für den Assay p.R175H aufweist. Dies wird in den Tabellen 13 und 14 deutlich. Einige Proben, die mit ddPCR vorab als negativ identifiziert wurden, zeigten jedoch in den Rohdaten (Cluster Plot) eindeutig positive Ergebnisse, wie beispielsweise die Proben 1514, 961 und 433 (niedriger Kopieninput). Dies unterstreicht die Bedeutung der Auswertung der Rohdaten selbst als Zusatz zu dem analytischen Report und verdeutlicht, dass nicht nur die Konzentration der Probe, sondern auch die spezifischen Eigenschaften des Assays und des Panels berücksichtigt werden müssen. Darüber hinaus wird eine weitere Untersuchung der klinischen Proben im Rahmen der fortsetzenden Panel-Validierung empfohlen. Dies umfasst sowohl erneute Überprüfung mit dem beschriebenen Panel als auch die Nutzung alternativer Referenzmethoden.

Darüber hinaus wiesen einige Assays, wie p.R196, einen relativ hohen und variablen Hintergrund auf. Die Proben 567 und 52 wurden sowohl im Clusterplot als auch in den Reports als positiv für den Assay R273C bzw. R273H identifiziert, ebenso wie die Proben 886 und 1492 für den Pik3ca Assay (p.N345K). Es ist erfreulich festzustellen, dass das Panel mit allen Kompatibilitäten des bestehenden PIK3CA Panels funktioniert. Dies ermöglicht, wie gewünscht, in Zukunft beide Panels, das hier neu entwickelte TP53 und das bestehende PIK3CA Panel, parallel unter identischen Laborprozessbedingungen anzuwenden.

Hinsichtlich der Software Reports zeigt sich, dass das ClearSEEK™ TP53 Panel geringfügige Abweichungen von den standardisierten Einstellungen für das ClearSEEK™ PIK3CA Panel erfordert (SNR, Intensität 5, Z-Score 3). Für CPM96 zeigten sich sauberere Ergebnisse mit weniger Hintergrundrauschen, wenn mit einem Z-Score von 4 ausgewertet wird, während für CPM384 die Verwendung der AREA-Methode anstelle von SNR bessere Ergebnisse erzielte.

Die Auswahl der Baseline-Methode ist gerätespezifisch. Idealerweise sollte die Baseline auf dem jeweilig zur molekularen Mutationsdetektion verwendeten Gerät generiert werden, unter Verwendung von Proben mit bekanntem Charakter (positiv oder negativ) und isoliert auf die gleiche Weise wie die zu messenden Proben.

Insgesamt zeigen die zur Validierung verwendeten Proben eine etwas höhere Ausbeute bei CPM96 im Vergleich zum CPM384-System. Nichtsdestotrotz ist festzustellen, dass das CPM384-System trotz einiger Unterschiede vergleichbar gute Ergebnisse erzielen kann.

7. Fazit und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Entwicklung und Validierung des ClearSEEK™ TP53-Panels erfolgreich abgeschlossen wurde. Basierend auf den ersten Ergebnissen und der Validierung an 84 klinischen Proben hat sich das Panel als geeignet erwiesen. Zur Erreichung dieses Ziels wurden im Rahmen der vorliegenden Bachelorarbeit wesentliche Schritte wie die Erstellung einer Markerliste, das Assay-Design, die iPLEX® Pro-Verifikation, die ClearSEEK-Verifikation und die Panel-Optimierung erfolgreich durchgeführt.

Das ClearSEEK™ TP53-Panel zeigt vielversprechende Ergebnisse bei der Erkennung von Mutationen in klinischen Proben, insbesondere bei den häufiger auftretenden Hotspot-Veränderungen. Die Anwendung des Panels hat das Potenzial, frühzeitig TP53-Mutationen zu identifizieren und somit mögliche Gesundheitsrisiken aufzudecken.

Es sind jedoch weitere Untersuchungen mit einer größeren Anzahl klinischer Proben und unter Verwendung alternativer Referenzmethoden erforderlich, um die Genauigkeit des Panels weiter zu überprüfen. Es ist wichtig, die Empfindlichkeit und Genauigkeit des Panels in verschiedenen klinischen Kontexten zu bewerten.

Die erfolgreiche Entwicklung und Validierung des ClearSEEK™ TP53-Panels legt den Grundstein für weitere Forschungsarbeiten und Anwendungen im Bereich der präzisen Medizin und individualisierten Therapien. Das Panel stellt ein wertvolles Werkzeug dar, um TP53-Mutationen zu identifizieren, die das Krebsrisiko erhöhen, und somit die Auswahl geeigneter Behandlungsstrategien zu unterstützen. Es eröffnet Möglichkeiten für eine verbesserte Patientenversorgung und eine personalisierte Behandlung bei Krebserkrankungen.

Literaturverzeichnis

1. Harris, Curtis C. NCBI. [Online] [Zitat vom: 01. 09 2022.]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1469608/pdf/envhper00346-0025.pdf>.
2. Muniandy, Nisha Thevandaren and Priyadarshini Nair. *TP53 BREAST CANCER*. Shah Alam : Department of Health and Life Science, Management and Science University.
3. Lahin, Amlani. clinmedjournals. [Online] [Zitat vom: 30. 01 2023.]
<https://clinmedjournals.org/articles/ijccr/international-journal-of-cancer-and-clinical-research-ijccr-6-122.php?jid=ijccr>.
4. *Relevance of p53 protein and its mutations for novel strategies in cancer therapy*. P., Müller. 2004.
5. Cancer, International Agency for Research on. [Online] [Zitat vom: 31. 01 2023.]
<https://www.mark53.com/for-physicians/tp53-wachter-des-genoms/>.
6. NCBI. [Online] [Zitat vom: 01. 04 2023.]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7655923/#:~:text=The%20human%20TP53%20locus%2C%20located,%2C%20autophagy%2C%20and%20metabolism%20regulation..>
7. Walensi, Dr. med. Mikolaj. Flexikon. [Online] 29. 01 2023.
<https://flexikon.doccheck.com/de/P53>.
8. *Tumor suppresspr p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic taretng*. Liz J. Hernandez Borrero, Wafik S. El-Deiry. Providence, USA : Warren Alpert Medical School, Brown University, 2021.
9. The TP53 Database. [Online] [Zitat vom: 06.. Juni 2023.] https://tp53.isb-cgc.org/get_distribution?action=get_mutation_dist&query_dataset=Somatic.
10. Explorea. [Online] [Zitat vom: 06. 06 2023.] <https://www.explorea.cz/massarray-system>.
11. agenabio.com. [Online] [Zitat vom: 06. 06 2023.] <https://www.agenabio.com/wp-content/uploads/2015/05/Agena-Bioscience-MassARRAY-SystemBrochure-SYS000306.pdf>.
12. Agena Bioscience, Inc. *MassARRAY System*. 2022.
13. Ellis, J.A., Ong, B. *The MassARRAY® System for Targeted SNP Genotyping*. 2017.
14. Springer. [Online] [Zitat vom: 06. 06 2023.]
https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-4939-6442-0_5.
15. Agena Bioscience. [Online] [Zitat vom: 20. 06 2023.]
<https://www.agenabio.com/resources/articles/understanding-different-massarray-chemistries/>.

16. SpringerLink. [Online] [Zitat vom: 06. 06 2023.]
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-48986-4_3628.
17. Bioscience, Agena. *ClearSEEK™ PIK3CA Panel User Guide*. 2022.
18. eurofinsgenomics.eu. [Online] [Zitat vom: 06. 06 2023.]
<https://eurofinsgenomics.eu/de/genotypisierung-genexpression/genotypisierung-services/snp-genotypisierung/>.
19. Di Giusto D, King GC. ncbi.nlm.gov. *Single base extension (SBE) with proofreading polymerases and phosphorothioate primers: improved fidelity in single-substrate assays*. *Nucleic Acids Res*. [Online] 1. Feb 2003. [Zitat vom: 06. 06 2023.]
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC149219/>.
20. Agena Bioscience, Inc. Baseline File Creation Guide. *USG-CUS-135 R02*. 2022.
21. NHGRI. [Online] [Zitat vom: 28. 02 2023.]
<https://www.genome.gov/10001688/international-hapmap-project>.
22. IDT. [Online] [Zitat vom: 04. 03 2023.] <https://eu.idtdna.com/pages/products/genes-and-gene-fragments/double-stranded-dna-fragments/gblocks-gene-fragments>.
23. biomedcentral.com. [Online] [Zitat vom: 04. 03 2023.]
[https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-019-0664-4#:~:text=The%20variant%20allele%20frequency%20\(VAF,approximately%2050%25%20or%20100%25..](https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-019-0664-4#:~:text=The%20variant%20allele%20frequency%20(VAF,approximately%2050%25%20or%20100%25..)

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

21.06.2023

.....
(Datum)

.....
(Unterschrift)