

**Analyse zellfreier tumor-DNA im Blut von Tumorpatienten in Situationen physischer Belastung mittels einer neuen, hochsensitiven quantitativen nested real-time-PCR-Anwendung**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von Tobias Ehlert

Geboren am 30.01.1982 in Bonn

Mainz, 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 15.09.2017

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	- 1 -
1.1	Darmkrebs – Kolorektales Karzinom .....	- 1 -
1.2	Krebsgenetik .....	- 7 -
1.2.1	Das KRAS-Gen.....	- 8 -
1.3	Zellfreie DNA.....	- 10 -
1.3.1	cfDNA bei Sport .....	- 10 -
1.3.2	cfDNA bei Krankheiten .....	- 11 -
1.3.3	cfDNA bei Krebs.....	- 11 -
1.3.3.1	Allgemeine cfDNA-Konzentration als Tumormarker .....	- 12 -
1.3.3.2	DNA-Integrität als Tumormarker.....	- 13 -
1.3.3.3	ctDNA als Tumormarker.....	- 14 -
1.3.3.3.1	Methoden zur ctDNA-Detektion und -Quantifizierung .....	- 15 -
1.3.3.3.1.1	qPCR-Anwendungen .....	- 15 -
1.3.3.3.1.2	ddPCR-Anwendungen .....	- 18 -
1.3.3.3.1.3	Sequenziermethoden.....	- 19 -
1.3.3.3.1.4	Probenbehandlung.....	- 19 -
1.3.3.3.2	Prognostische Studien zur ctDNA bei Tumoren .....	- 20 -
1.3.3.3.3	Prognostische Studien zur ctDNA bei kolorektalem Karzinom.....	- 22 -
1.3.3.3.4	Machbarkeitsstudien zur ctDNA-Analyse .....	- 23 -
1.3.3.4	Epigenetische Modifikationen der cfDNA als Tumormarker .....	- 23 -
1.3.3.5	Weitere Methoden zur Tumordetektion .....	- 24 -
1.4	Studie 1.....	- 24 -
1.5	Studie 2.....	- 25 -
2	Materialien und Methoden.....	- 26 -
2.1	Bioinformatik .....	- 26 -
2.1.1	Primerdesign.....	- 26 -
2.1.1.1	Primer für die Erstellung des KRAS WT-Standards.....	- 26 -
2.1.1.2	Primer für die Site Directed Mutagenesis .....	- 26 -
2.1.1.3	Primer für Sequenzierungen .....	- 27 -
2.1.1.4	Primer für die Erstrunde der nested PCR .....	- 27 -
2.1.1.5	WT-Blocking-Primer für die Erstrunde der nested PCR.....	- 28 -
2.1.1.6	Primer für den Nachweis aller KRAS-Fragmente in der qPCR .....	- 29 -

## Inhalt

2.1.1.7	ARMS-Primer zum mutationsspezifischen Nachweis von Tumor-DNA	- 29 -
2.1.2	Design von LNA-Sonden für die qPCR	- 29 -
2.1.3	Vermeidung des Pseudogens	- 30 -
2.1.4	Auswertung von Sequenzierungen	- 31 -
2.1.5	Berechnung der Quantifikationslimits (LOQ)	- 31 -
2.2	Labormethoden	- 32 -
2.2.1	Standardmethoden	- 32 -
2.2.1.1	Zellkultur mit Krebszelllinien SW480 und HT-29	- 32 -
2.2.1.2	Gelelektrophorese	- 33 -
2.2.1.3	Isolierung von DNA-Banden aus Agarosegels	- 33 -
2.2.1.4	NanoDrop 1000	- 34 -
2.2.1.5	NanoDrop 3300	- 34 -
2.2.2	Generierung von Standards	- 35 -
2.2.2.1	PCR zur Generierung der WT- und G12V-Standards aus gDNA	- 35 -
2.2.2.2	Sequenzierung	- 36 -
2.2.2.3	Klonierung	- 36 -
2.2.2.3.1	Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren	- 36 -
2.2.2.3.2	Transformierung	- 36 -
2.2.2.4	Aufreinigung von Plasmiden	- 37 -
2.2.2.5	Schneiden von DNA mittels Restriktionsenzymen	- 37 -
2.2.2.5.1	EcoR1	- 37 -
2.2.2.5.2	Methylierungsspezifische Restriktion mit Dpn1	- 37 -
2.2.2.5.3	Gleichzeitige Restriktion genomischer DNA mit Bfa1 und Dde1	- 38 -
2.2.2.6	Site Directed Mutagenesis	- 38 -
2.2.2.7	Fragmentierung humaner DNA als Hintergrund für die qPCR	- 39 -
2.2.2.8	Ansetzen von Standardreihen für die Etablierung mutationsspezifischer Nachweismethoden	- 40 -
2.2.3	Etablierung und Durchführung der PCR- und real-time PCR-Methoden	- 41 -
2.2.3.1	Ermittlung der optimalen Temperaturen für Primer und Sonden	- 41 -
2.2.3.1.1	Vortests mit interkalierendem Farbstoff vor der Sondengenerierung	- 41 -
2.2.3.1.2	Etablierung der ARMS-Primer mit Sonde und WT-Hintergrund	- 42 -
2.2.3.2	Die real-time qPCR zum Nachweis mutierter DNA – LOD und LOQ	- 43 -
2.2.3.3	Die nested qPCR	- 45 -
2.2.3.4	Die nested qPCR mit gepoolten Erstrundenprodukten – PNB-qPCR	- 47 -



## Inhalt

2.2.3.5	Weitere Anwendungen der quantitativen real-time PCR.....	- 48 -
2.2.3.5.1	LTR5-qPCR .....	- 48 -
2.2.3.5.2	L1PA2-qPCR in Plasma.....	- 49 -
2.2.4	Bearbeitung von Blut.....	- 50 -
2.2.4.1	Gewinnung von Blutplasma.....	- 50 -
2.2.5	DNA-Aufreinigung .....	- 50 -
2.2.5.1	Isolierung von DNA aus Gewebeschnitten .....	- 50 -
2.2.5.2	Isolierung frei zirkulierender DNA aus Plasma .....	- 51 -
2.2.5.3	Isolierung hochmolekularer DNA aus Vollblut.....	- 51 -
2.2.6	DNase-1-Aktivitätsreduktionsmessung mittels spezifischem ELISA .....	- 52 -
2.3	Studie „Entwicklungen frei zirkulierender DNA bei Krebspatienten unter erschöpfender körperlicher Belastung“ .....	- 52 -
2.3.1	Rekrutierung und Zusammensetzung der Patientengruppe.....	- 52 -
2.3.2	Versuchsablauf .....	- 53 -
2.3.3	Ausbelastung auf dem Fahrradergometer .....	- 54 -
2.3.4	Abnahme und Bearbeitung der Blutproben.....	- 55 -
2.3.5	Studienparameter.....	- 55 -
2.4	Studie „Entwicklungen frei zirkulierender Tumor-DNA bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während des Resektionsprozesses“ .....	- 56 -
2.4.1	Rekrutierung der Patienten .....	- 56 -
2.4.2	Abnahme und Bearbeitung der Blutproben.....	- 57 -
2.4.3	FFPE-Schnitte.....	- 58 -
2.4.4	Studienparameter.....	- 58 -
2.5	Statistik .....	- 59 -
2.6	Primer und Sonden .....	- 60 -
2.7	Zelllinien.....	- 61 -
2.8	Materiallisten und Geräte .....	- 61 -
2.8.1	Verwendete Geräte .....	- 62 -
2.8.2	Verwendete Chemikalien .....	- 63 -
2.8.3	Verwendete Kits .....	- 65 -
2.8.4	Verwendete Medien und Puffer .....	- 65 -
2.8.5	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	- 66 -
2.8.6	Verwendete Software .....	- 67 -
3	Ergebnisse .....	- 68 -

3.1	Etablierung der verwendeten Methoden .....	- 68 -
3.1.1	Erstellung von Standards .....	- 68 -
3.1.1.1	WT-Standard.....	- 69 -
3.1.1.2	G12V-Standard .....	- 69 -
3.1.1.3	Standards aus Site directed Mutagenesis .....	- 69 -
3.1.2	Etablierung der ARMS-Primer und des WT-Std.-Primers .....	- 71 -
3.1.2.1	EvaGreen® Vortests .....	- 71 -
3.1.2.2	Vergleich EvaGreen® und LNA-Sonde .....	- 73 -
3.1.2.3	Gradienten mit LNA-Sonde .....	- 74 -
3.1.2.4	LOD- und LOQ-Reihen.....	- 83 -
3.1.3	Etablierung der nested qPCR mit Blocking-Primer .....	- 88 -
3.1.3.1	Auswahl des Blocking-Primers .....	- 88 -
3.1.3.2	Auswahl der Polymerase für die Erstrunden-PCR.....	- 91 -
3.1.3.3	Festlegung der Konzentration des Blocking-Primers .....	- 92 -
3.1.3.4	Festlegung der Zyklenzahl der Erstrunden-PCR .....	- 93 -
3.1.3.5	Einschätzung des Effekts des Blocking-Primers auf die verschiedenen Mutationen- 94 -	
3.1.3.6	LOD- und LOQ-Reihen.....	- 96 -
3.1.3.7	Nested qPCR für den WT.....	- 100 -
3.1.4	Etablierung der PNB-qPCR .....	- 101 -
3.1.5	LOQ-Reihen in der PNB-qPCR .....	- 102 -
3.1.6	Anwendung der Methoden auf isolierte DNA.....	- 107 -
3.1.6.1	FFPE-Isolate .....	- 108 -
3.1.6.2	cfDNA .....	- 109 -
3.2	Studienergebnisse „Entwicklungen frei zirkulierender DNA bei Krebspatienten unter erschöpfender körperlicher Belastung“ .....	- 111 -
3.2.1	Rekrutierung der Patienten .....	- 111 -
3.2.2	Belastungsphysiologische Parameter.....	- 112 -
3.2.2.1	Leistung und Belastungsdauer .....	- 113 -
3.2.2.2	Belastungsparameter .....	- 114 -
3.2.2.3	Entwicklungen der Belastungsparameter .....	- 117 -
3.2.3	cfDNA-Werte und Zusammenhänge mit anderen Messparametern.....	- 119 -
3.2.3.1	cfDNA-Werte allgemein.....	- 119 -
3.2.3.2	cfDNA und Belastungsparameter .....	- 124 -

## Inhalt

3.2.3.3	cfDNA und Zelltypen .....	- 128 -
3.2.3.3.1	Neutrophil-Lymphocyte-Ratio.....	- 131 -
3.2.3.4	DNase-1-Aktivitätsreduktion und cfDNA.....	- 132 -
3.2.4	ctDNA – Fallbericht .....	- 137 -
3.3	Studienergebnisse „Entwicklungen frei zirkulierender Tumor-DNA bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während des Resektionsprozesses“.....	- 139 -
3.3.1	Patienten, Studienablauf und Probengewinnung.....	- 139 -
3.3.2	Mutationsanalyse .....	- 141 -
3.3.2.1	FFPE-Proben .....	- 142 -
3.3.2.2	Plasmaproben.....	- 143 -
3.3.3	cfDNA-Messungen .....	- 146 -
3.3.3.1	Statistische Auswertung der cfDNA-Konzentrationen.....	- 148 -
3.3.3.1.1	Unterscheidung cfDNA nach Gruppierung .....	- 149 -
3.3.3.1.2	Unterscheidung cfDNA nach Verlauf.....	- 149 -
3.3.3.1.3	Unterschiede der cfDNA-Konzentrationen zwischen den Gruppierungen in verschiedenen Zeitabschnitten .....	- 150 -
3.3.3.1.4	Unterscheidung mittlerer cfDNA der Gruppen im Verlauf .....	- 152 -
3.3.3.1.5	Unterscheidung cfDNA –Korrelationen innerhalb der Zeitabschnitte.....	- 153 -
3.3.3.1.6	Unterscheidung cfDNA nach Gruppierung an Zeitpunkten .....	- 154 -
3.3.3.1.7	Unterscheidung cfDNA-Anstiege.....	- 156 -
3.3.3.2	DNA-Integrität .....	- 157 -
3.3.4	DNase-1-Aktivitätsreduktion.....	- 159 -
3.3.5	Vergleiche der verschiedenen Parameter.....	- 162 -
3.3.6	Einfluss des Mutationsstatus im Plasma im Blutbild .....	- 164 -
4	Diskussion.....	- 166 -
4.1	Allgemeines und Methodisches.....	- 166 -
4.2	Methodenetablierung.....	- 166 -
4.3	Studie 1 - Entwicklungen frei zirkulierender DNA bei Krebspatienten unter erschöpfender körperlicher Belastung.....	- 170 -
4.4	Studie 2 - Entwicklungen frei zirkulierender Tumor-DNA bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während des Resektionsprozesses.....	- 178 -
4.5	Ursprung der cfDNA.....	- 183 -
5	Zusammenfassung.....	- 191 -
6	Literatur.....	- 193 -

7 Anhang..... - 212 -  
7.1 Informationsmaterialien zu den durchgeführten Studien..... - 212 -

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1 Schema der Erstrunde der nested qPCR mit Blocking-Primer .....	- 27 -
Abbildung 2 Darstellung des Effektes eines Blocking-Primers .....	- 28 -
Abbildung 3 Primerkonstellationen G12D .....	- 30 -
Abbildung 4 Primerkonstellationen WT .....	- 31 -
Abbildung 5 Schema der PNB-qPCR .....	- 47 -
Abbildung 6 Versuchsablauf der Belastungsstudie an Tumorpatienten .....	- 54 -
Abbildung 7 Versuchsablauf der Studie an Tumorpatienten während der OP.....	- 58 -
Abbildung 8 A-clo-PCR zur Herstellung eines KRAS-Standards aus gDNA.....	- 68 -
Abbildung 9 G12V-Gelelektrophorese .....	- 69 -
Abbildung 10 Site Directed Mutagenesis zur Generierung des G12D Standards.....	- 70 -
Abbildung 11 Site Directed Mutagenesis für G12A, G12S, G12C und G12R.....	- 70 -
Abbildung 12 Site Directed Mutagenesis zur Generierung des G13D Standards.....	- 71 -
Abbildung 13 EvaGreen®-Vortests.....	- 72 -
Abbildung 14 Vergleich qPCR mit EvaGreen® und Sonde.....	- 73 -
Abbildung 15 Gradienten-qPCR G12V ohne WT-Hintergrund .....	- 74 -
Abbildung 16 Gradienten-qPCR G12R ohne WT-Hintergrund .....	- 75 -
Abbildung 17 Gradienten-qPCR G12V mit WT-Hintergrund .....	- 76 -
Abbildung 18 Gradienten-qPCR G12R mit WT-Hintergrund .....	- 77 -
Abbildung 19 qPCR mit Temperaturgradienten für G12V .....	- 78 -
Abbildung 20 qPCR mit Temperaturgradienten für G12A .....	- 79 -
Abbildung 21 qPCR mit Temperaturgradienten für G12S AIP (hiernach verworfen) .....	- 79 -
Abbildung 22 qPCR mit Temperaturgradienten für G12S ALT2.....	- 80 -
Abbildung 23 qPCR mit Temperaturgradienten für G12C AIP (hiernach verworfen) .....	- 81 -
Abbildung 24 qPCR mit Temperaturgradienten für G12C ALT3.....	- 81 -
Abbildung 25 qPCR mit Temperaturgradienten für G12R AIP .....	- 82 -
Abbildung 26 qPCR mit Temperaturgradienten für G12R AIP .....	- 82 -
Abbildung 27 qPCRs mit Temperaturgradienten für G13D AIP.....	- 83 -
Abbildung 28 qPCR LOQ-Reihe KRAS WT .....	- 84 -
Abbildung 29 qPCR Verdünnungsreihe KRAS WT .....	- 85 -
Abbildung 30 qPCR LOQ-Reihe KRAS G12D .....	- 85 -
Abbildung 31 qPCR LOQ-Reihe KRAS G12V .....	- 85 -
Abbildung 32 qPCR LOQ-Reihe KRAS G12A .....	- 86 -
Abbildung 33 qPCR LOQ-Reihe KRAS G12S .....	- 86 -
Abbildung 34 qPCR LOQ-Reihe KRAS G12C .....	- 87 -
Abbildung 35 qPCR LOQ-Reihe KRAS G12R .....	- 87 -
Abbildung 36 qPCR LOQ-Reihe KRAS G13D .....	- 87 -

## Abbildungen

Abbildung 37 Etablierung der Blocking-Primer I.....	- 89 -
Abbildung 38 Etablierung der Blocking-Primer II.....	- 89 -
Abbildung 39 Etablierung der Blocking-Primer III.....	- 90 -
Abbildung 40 Etablierung der Blocking-Primer IV .....	- 90 -
Abbildung 41 Temperaturgradient in der nested qPCR mit BO1 und verschiedenen Polymerasen .....	- 91 -
Abbildung 42 Konzentrationstest BO1, hohe Konzentrationen.....	- 92 -
Abbildung 43 Konzentrationstest BO1, niedrige Konzentrationen.....	- 93 -
Abbildung 44 Zyklentest der Erstrunden-PCR .....	- 94 -
Abbildung 45 Überprüfung der Effektstärke des Blocking-Primers bei den verschiedenen KRAS-Mutationen.....	- 95 -
Abbildung 46 Überprüfung der Effektstärken von Blocking-Primer, ARMS-Primer und der Kombination für G12D .....	- 95 -
Abbildung 47 Verdünnungsreihe nested qPCR mit G12D.....	- 96 -
Abbildung 48 LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12D.....	- 97 -
Abbildung 49 LOD-Reihe qPCR KRAS G12D .....	- 97 -
Abbildung 50 LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12V.....	- 97 -
Abbildung 51 LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12A.....	- 98 -
Abbildung 52 LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12S.....	- 98 -
Abbildung 53 LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12C.....	- 99 -
Abbildung 54 LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12R.....	- 99 -
Abbildung 55 LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G13D.....	- 100 -
Abbildung 56 Verdünnungsreihen nested qPCR WT +/- BO1.....	- 100 -
Abbildung 57 Verdünnungsreihen nested qPCR WT + BO1 .....	- 101 -
Abbildung 58 LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12R Pools.....	- 102 -
Abbildung 59 LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12D .....	- 103 -
Abbildung 60 LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12V .....	- 103 -
Abbildung 61 LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12A .....	- 104 -
Abbildung 62 LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12S .....	- 104 -
Abbildung 63 LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12C.....	- 105 -
Abbildung 64 LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12R.....	- 105 -
Abbildung 65 LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G13D .....	- 105 -
Abbildung 66 LOQ-Reihen der drei qPCR-Methoden nach Varianten sortiert.....	- 106 -
Abbildung 67 LOQ-Reihen der drei qPCR-Methoden nach Methoden sortiert .....	- 107 -
Abbildung 68 Reproduzierbarkeit der PNB-qPCR.....	- 107 -
Abbildung 69 Analyse von FFPE-Testisolaten mit drei Methoden.....	- 108 -
Abbildung 70 Verdünnungsreihen mit FFPE-Testisolaten mit drei Methoden .....	- 109 -

## Abbildungen

Abbildung 71 Verdünnungstest mit Eluat aus gespiketem Plasma.....	- 110 -
Abbildung 72 Zweiter Test zur cfDNA-Isolierung .....	- 110 -
Abbildung 73 Dritter Test zur cfDNA-Isolierung .....	- 111 -
Abbildung 74 Deskriptive Statistiken der Belastungsstudie – allgemein.....	- 112 -
Abbildung 75 Deskriptive Statistik der Belastungsstudie – Belastungsphysiologische Parameter .....	- 113 -
Abbildung 76 Vergleiche Leistung und Stufenzahl nach Gruppen .....	- 114 -
Abbildung 77 Gruppenvergleiche der maximalen Belastungsparameter.....	- 115 -
Abbildung 78 Gruppenvergleiche der Belastungsparameter prä und dynamische Werte.....	- 116 -
Abbildung 79 Maximale Herzfrequenz nach Geschlecht aufgetrennt.....	- 117 -
Abbildung 80 Entwicklungen der Belastungsparameter .....	- 118 -
Abbildung 81 Entwicklungen während der Belastung .....	- 118 -
Abbildung 82 Verbindungen der Belastungsparameter nach Zeitpunkten und Gruppen .....	- 119 -
Abbildung 83 Korrelation der Messmethoden .....	- 120 -
Abbildung 84 Deskriptive Statistik der cfDNA-Konzentrationen der Gruppen der Tumorbelastungsstudie .....	- 120 -
Abbildung 85 Korrelationen der cfDNA-Werte .....	- 121 -
Abbildung 86 cfDNA-Messungen 1 – Gruppenunterschiede.....	- 122 -
Abbildung 87 cfDNA-Messungen – Zeitpunkte .....	- 123 -
Abbildung 88 cfDNA-Dynamik .....	- 123 -
Abbildung 89 Korrelationen cfDNA-Konzentrationen und Belastungsparameter.....	- 126 -
Abbildung 90 Korrelationen cfDNA-Dynamik und Leistung.....	- 126 -
Abbildung 91 Korrelationen cfDNA-Dynamik und Herzfrequenz .....	- 127 -
Abbildung 92 Korrelationen der cfDNA-Dynamik mit VO <sub>2</sub> max und Laktat .....	- 128 -
Abbildung 93 Entwicklungen cfDNA und Zelltypen über die Zeit.....	- 129 -
Abbildung 94 Korrelationen cfDNA und Zellen in der „Belastungs-Regulation“ .....	- 130 -
Abbildung 95 Korrelationen cfDNA und Zellen im „Ruhestoffwechsel“.....	- 131 -
Abbildung 96 NLR der Tumorbelastungsstudie .....	- 132 -
Abbildung 97 DNase-AR-Verläufe .....	- 134 -
Abbildung 98 Statistiken der DNase-AR nach Gruppen und Zeitpunkt .....	- 134 -
Abbildung 99 cfDNA und DNase-AR graphisch nach Gruppen.....	- 135 -
Abbildung 100 Korrelationen der DNase-AR .....	- 136 -
Abbildung 101 Korrelationen DNase-AR post-Werte .....	- 137 -
Abbildung 102 Nachweis der KRAS G12R-Mutation in der Tumorbelastungsstudie.....	- 138 -
Abbildung 103 Quantifizierung der ctDNA .....	- 138 -
Abbildung 104 Negative Tests auf KRAS-Mutationen in der Tumorbelastungsstudie ....	- 139 -
Abbildung 105 Übersicht der Patientendaten der OP-Studie .....	- 140 -

## Abbildungen

Abbildung 106 Ergebnisse der Mutationsanalyse der FFPE-Proben.....	- 142 -
Abbildung 107 Ergebnisse der Mutationsanalyse der Plasma-Proben.....	- 144 -
Abbildung 108 Plasma-Verlaufsmessungen Patient OP13 .....	- 144 -
Abbildung 109 Plasma-Verlaufsmessungen Patient OP17 .....	- 145 -
Abbildung 110 Plasma-Verlaufsmessungen Patient OP19 .....	- 146 -
Abbildung 111 Plasma-Verlaufsmessungen Patient OP29 .....	- 146 -
Abbildung 112 Übereinstimmungen der cfDNA-Messungen in der OP-Studie .....	- 147 -
Abbildung 113 Vergleich cfDNA-Konzentrationen entsprechender venöser und arterieller Plasmaproben.....	- 148 -
Abbildung 114 Gruppenunterschiede in der cfDNA-Konzentration .....	- 149 -
Abbildung 115 Grobeinteilung des Verlaufs der cfDNA über die OP.....	- 150 -
Abbildung 116 Unterteilung der cfDNA-Werte der OP-Studie nach Gruppierung und Zeiteinteilung.....	- 151 -
Abbildung 117 Entwicklungen der individuellen cfDNA-Mittelwerte der einzelnen Gruppen, unterteilt nach den drei Patientengruppen der OP-Studie.....	- 152 -
Abbildung 118 Korrelationen der individuell gemittelten cfDNA-Konzentrationen der vier OP- Phasen.....	- 154 -
Abbildung 119 Gruppenunterschiede der cfDNA zu Einzelzeitpunkten der Operation. ...	- 155 -
Abbildung 120 Vergleiche der cfDNA-Anstiege über den Operationszeitraum im Gruppenvergleich.....	- 157 -
Abbildung 121 OP-Verlauf und DNA-Integrität.....	- 158 -
Abbildung 122 Korrelationen von kurzen, langen und allen cfDNA-Fragmenten sowie der DNA- Integrität.....	- 159 -
Abbildung 123 Verläufe und Korrelationen DNase-AR .....	- 160 -
Abbildung 124 Entwicklung der DNase-AR über den Operationsverlauf.....	- 161 -
Abbildung 125 Korrelationen DNase-AR mit cfDNA zu den Phasen des OP-Verlaufs ...	- 162 -
Abbildung 126 Individuelle Verläufe der ctDNA, cfDNA und DNase-AR .....	- 163 -
Abbildung 127 Sauerstofftransport und Plasmamutationsstatus .....	- 164 -
Abbildung 128 Entzündungsmarker und Plasmamutationsstatus .....	- 165 -
Abbildung 129 Hypothetischer Verlauf der cfDNA-Freisetzung und Anteil verschiedener Mechanismen.....	- 185 -
Abbildung 130 cfDNA-Konzentrationen im normierten Kurvenverlauf.....	- 186 -



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1 Pipettierschema A-clo-PCR (50 µl Gesamtvolumen).....	- 35 -
Tabelle 2 Pipettierschema SdM-PCR (25 µl Gesamtvolumen) .....	- 39 -
Tabelle 3 Pipettierschema SsoFast™ EvaGreen® Supermix - Vortests zur Etablierung der ARMS-Primer .....	- 41 -
Tabelle 4 Pipettierschema SsoFast™ Probes Supermix - Tests zur Etablierung der ARMS-Primer .....	- 43 -
Tabelle 5 Pipettierschema SsoFast™ Probes Supermix – LOD / LOQ-Reihen der ARMS-Primer .....	- 44 -
Tabelle 6 Pipettierschema ÄFK-Erstrunden-PCR (final, 25 µl Gesamtvolumen) .....	- 45 -
Tabelle 7 LTR5-qPCR zur Quantifizierung von gesamt-cfDNA aus Plasmaisolaten .....	- 48 -
Tabelle 8 L1PA2 qPCR zur Quantifizierung von gesamt-cfDNA .....	- 49 -
Tabelle 9 Liste der verwendeten Primer .....	- 60 -
Tabelle 10 Liste der verwendeten Sonden.....	- 60 -
Tabelle 11 Liste der Laufbedingungen der mutationsspezifischen KRAS-Primer.....	- 61 -
Tabelle 12 LOQs und LODs der mutationsspezifischen KRAS-Primer .....	- 61 -
Tabelle 13 Liste der verwendeten Zelllinien.....	- 61 -
Tabelle 14 Liste der verwendeten Geräte .....	- 62 -
Tabelle 15 Liste der verwendeten Chemikalien .....	- 63 -
Tabelle 16 Liste der verwendeten kommerziellen Kits .....	- 65 -
Tabelle 17 Liste der verwendeten Medien und Puffer .....	- 65 -
Tabelle 18 Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....	- 66 -
Tabelle 19 Liste der verwendeten Software .....	- 67 -
Tabelle 20 Korrelationen der cfDNA-Konzentrationen mit den Belastungsparametern ..	- 125 -
Tabelle 21 Korrelationen der cfDNA-Werte mit den Zelltypen.....	- 129 -
Tabelle 22 Vergleich verschiedener ctDNA-Detektionsmethoden.....	- 168 -

## **Fachwörter-, Einheiten- und Abkürzungsverzeichnis**

∅	Durchschnitt
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter (10 <sup>-6</sup> Liter)
μM	Mikromolar
A-clo	Äußerer Klonierungsprimer für die <i>KRAS</i> -Sequenz
ÄFK	Äußeres Fragment kurz (PCR-Primer)
AIP	ARMS innerer Primer
ÄP	äußerer Primer
ANOVA	Univariate Varianzanalyse
APC	Adenomatosis Polyposis Coli-Gen
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
BEAMing	Beads, Emulsion, Amplification, and Magnetics
BMI	Body Mass Index
BO	Blocking Oligonukleotid
bp	Basenpaare
BRAF	V-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
CA	Cancer Antigen
CEA	Carcinoembryonic Antigen
cfDNA	zellfreie DNA (cell free DNA)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cq	Cycle of Quantification
CRP	C-reaktives Protein
CTC	zirkulierende Tumorzelle
ctDNA	zirkulierende Tumor-DNA
ddPCR	digitale droplet-PCR
Dest	destilliert
DiffAA	Differenz Anstieg-Abfall
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
DNase-AR	DNase-Aktivitätsreduktion
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EKG	Elektrokardiogramm

## Abkürzungen

ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPIC	European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition
ERBB2	V-ERB-B2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
EVB	Erythrozytenverteilungsbreite
FBS	Fötales Kälberserum
FFPE	Formalin Fixed Paraffin Embedded, In Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
For	forward
G12D	Beispiel für eine Punktmutation, Aminosäure G (Glycin) ist in Codon 12 durch D (Asparagin) ersetzt
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O	Wasser
HER2/neu	siehe ERBB2
HCL	Salzsäure
HF	Herzfrequenz
HRAS	V-HA-RAS Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
HRM	High Resolution Melt Curve
IP	innerer Primer
K	Kopien (DNA)
KF	kurzes Fragment
KRAS	V-KI-RAS2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
<i>KRAS1P</i> -Gen	<i>KRAS</i> -Pseudogen
KRK	kolorektales Karzinom
KW-Gruppe	Studiengruppe ohne Tumor ohne <i>KRAS</i> -Mutationen im Blutplasma
lacZ	β-Galactosidase
LB	lysogeny broth
LF	langes Fragment
LNA	Locked Nucleic Acid
LOD	Limit of Detection, Detektionsgrenze der qPCR
LOQ	Limit of Quantification, Quantifikationsgrenze der qPCR
LTR	Long Terminal Repeat
M	molare Masse
MEMO	Mutant Enrichment with 3'-Modified Oligonucleotides
MET	Metabolisches Äquivalent

## Abkürzungen

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
miRNA	Mikro-RNA
mM	millimolar
mmol	Millimol
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NET	Neutrophil Extracellular Trap
ng	Nanogramm
NIH	National Institute of Health (USA)
NLR	Neutrophil-Lymphocyte-Ratio
nm	Nanometer
nM	nanomolar
NTC	No Template Control, Kontrolle ohne Edukt
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OP	Operation
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGA-Score	Plasma Genomic Abnormality Score
PIK3CA	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PM-Gruppe	Gruppe mit <i>KRAS</i> -Mutationen im Blutplasma
PNA	Peptide Nucleic Acid
PNB-qPCR	Pooled-Nested-Blocker-quantitative-Polymerasekettenreaktion
post	Wert direkt nach Belastungsende
prä	Wert vor Belastungsbeginn
QoL	Quality of Life, Lebensqualität
qPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion
$\rho$	Korrelationskoeffizient
$\rho_s$	Korrelationskoeffizient einer Spearman-Korrelation
RER	Respiratory exchange ratio, Respiratorische Austauschrate
rest	Wert 90 Minuten nach Belastungsende
rev	reverse
RFU	relative fluorescence units, Relative Fluoreszenzeinheiten
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure

## Abkürzungen

RR	relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
SdM	Site Directed Mutagenesis
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEPT9	Septin 9
SMAD4	Mothers Against Decapentaplegic
Stabw.	Standardabweichung
Std	Standard
tI bis tIV	Operationsphasen 1 bis 4
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAM	tumorassoziierter Makrophage
TAN	Tumorassoziierter Neutrophiler Granulozyt
TB	Tumorbelastungspatient
TE	Tris-EDTA
TIL	Tumorinfiltrierender Leukozyt
TMB	TMB Substrat; enthält 3,3', 5,5'- Tetramethylbenzidin
TP	Tumorpatient
TP53	Tumor Protein p53
TW-Gruppe	Studiengruppe mit Tumor ohne <i>KRAS</i> -Mutationen im Blutplasma
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
$\dot{V}O_2\text{max}$	Maximale Sauerstoffaufnahme
Vol.	Volumen
WES	Whole Exome Sequencing
WGS	Whole Genome Sequencing
WHR	Waist-to-Hip-Ratio
WT	Wildtyp (eines Gens)
$\times g$	Vielfaches der Erdrotation
ZVK	Zentraler Venenkatheter

# 1 Einleitung

## 1.1 Darmkrebs – Kolorektales Karzinom

In den westlichen Industrienationen ist Krebs ein seit längerem zunehmender Risikofaktor, auch bedingt durch die steigende Lebenserwartung der Bevölkerung. Mittlerweile ist Krebs mit etwa 220.000 krebsbedingten Sterbefällen 2012 die zweithäufigste Todesursache in Deutschland – mit steigender Tendenz (*RKI, 2015*). So stieg die Anzahl der Krebsneuerkrankungen in Deutschland zwischen 2002 und 2012 bei Frauen um 10% (auf 225.890) und bei Männern um 13% (auf 252.060) an, wobei die absoluten Sterbefälle bei Frauen um 2% (auf 101.206) und bei Männern um 10% (auf 119.717) anstiegen (*RKI, 2015*). Für 2016 rechnet das RKI mit etwa 500.000 Neuerkrankungen.

Um die Veränderungen von Umwelteinflüssen, dem Lebenswandel, sowie der medizinischen Versorgung besser erfassen zu können, wird für altersstandardisierte Statistiken gegen die steigende Lebenserwartung bereinigt. Derart altersstandardisiert ist ein Anstieg zwischen 2002 und 2012 nur noch für Neuerkrankungen bei Frauen zu verzeichnen (5%), der vor allem auf die immer noch konstant steigende Neuerkrankungsrate bei Lungenkrebs bei Frauen zurückzuführen ist. Die altersstandardisierte Neuerkrankungsrate bei Männern sank über die letzten Jahre leicht ab, die Mortalitätsraten sanken bei beiden Geschlechtern (*RKI, 2015*).

Bei der Gesamt-Inzidenz führen Brustkrebs (14,7% der Neuerkrankungen, Frauen 30,8%, Männer 0,2%), Prostatakrebs (13,3%, Männer 25,3%), Darmkrebs (13%, Frauen 12,6%, Männer 13,4%), Lungenkrebs (11%, Frauen 8%, Männer 13,7%) und Hautkrebs (4,4%, Frauen 4,6%, Männer 4,1%) die Statistik an (*RKI, 2015*). Bei der Gesamt-Mortalität liegen Lungenkrebs (20,1% der Sterbefälle, Frauen 14,6%, Männer 24,8%), Darmkrebs (11,8%, Frauen 12,1%, Männer 11,5%), Brustkrebs (8,1%, Frauen 17,5%, Männer 0,1%), Bauchspeicheldrüsenkrebs (7,3%, Frauen 8,1%, Männer 6,6%) und Prostatakrebs (5,9%, Männer 10,8%) vorne. Alle Werte stammen aus der Datenbank des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts und wurden am 31.07.2016 abgerufen. Die Unterschiede in den Reihenfolgen entstehen durch die sehr unterschiedlichen Überlebensraten der verschiedenen Tumorentitäten. So weisen Prostata-, Brust- und Hautkrebs 10-Jahres-Überlebensraten von über 80% auf, während Bauchspeicheldrüsen- und Lungenkrebs in den 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeiten unter 20% liegen (*RKI, 2015*).

Im internationalen Vergleich sind diese Werte in etwa repräsentativ für die westlichen Industrienationen. Allerdings fällt im Vergleich mit den USA auf, dass dort der Lungenkrebs prozentual sowohl in der Inzidenz, als auch bei den Sterbefällen höher liegt, während der Darmkrebs deutlich niedriger liegt (*Siegel et al., 2016*). Im Vergleich dominieren in den weniger entwickelten Regionen insbesondere Lungen, Magen- und Leberkrebs, und auch Speiseröhrenkrebs

und Cervixkarzinome sind in Inzidenz und Mortalität deutlich häufiger als in den Industrienationen (*Ferlay et al., 2015*).

Im Gegensatz hierzu ist Darmkrebs eine Erkrankung, die in den westlichen Industrienationen prozentual deutlich häufiger auftritt als in Entwicklungsländern. Darmkrebs ist international die zweithäufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen (9,2%) und die dritthäufigste Krebsneuerkrankung bei Männern (10%), in den entwickelten Regionen auf Platz 4 (12,1%) und in den weniger entwickelten Regionen auf Platz 5 (7,8%) (*Ferlay et al., 2015*).

In Deutschland ist Darmkrebs geschlechtsübergreifend nach Brustkrebs und Prostatakrebs die dritthäufigste Krebserkrankung gemessen an Neuerkrankungen (62.232, davon 28.493 Frauen und 33.739 Männer in 2012) und nach Lungenkrebs die Krebserkrankung mit den zweitmeisten Sterbefällen (25.972 in 2012), bei einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von etwa 65% (*RKI, 2015*). Somit tritt Darmkrebs in Deutschland überproportional oft auf. Da Darmkrebs im Median erst mit über 70 Jahren auftritt, ist hier der Unterschied zwischen den absoluten Werten und der altersbereinigten Statistik besonders groß. So gingen die absoluten Neuerkrankungen zwischen 2002 und 2012 bereits leicht zurück, bei ebenfalls leicht zurückgehender Mortalität, altersbereinigt sanken hingegen alle Werte deutlich um über 20% (*RKI, 2015*). Auch wenn „nur“ etwa 10% der Neuerkrankungen auf Personen unter 55 Jahren entfallen, zu welchem Zeitpunkt die Darmkrebsfrüherkennung per Koloskopie vorgesehen ist, betrifft dies in Deutschland immer noch etwa 6.000 Personen pro Jahr.

Wissenschaftlich belegte Risikofaktoren für Darmkrebs sind Übergewicht bzw. Fettleibigkeit bei Männern (*Pischon et al., 2006*), Tabakkonsum (*Leufkens et al., 2011*), verstärkter Alkoholkonsum (*Ferrari et al., 2007*), ungünstige Ernährung – hier insbesondere Gemüse- und ballaststoffarme Ernährung mit hohem Konsum an rotem Fleisch (*Bingham et al., 2003, Norat et al., 2005*), sowie eine geringe physische Aktivität (*Friedenreich et al., 2006*), deren relative Risiken sich bei akkumuliertem Auftreten der Faktoren weiter erhöhen (*Aleksandrova et al., 2014*). Hinzu kommt eine mögliche genetische Prädisposition von etwa 5-10%, die jedoch noch nicht abschließend erforscht ist (*de la Chapelle, 2004*).

Die Körperkomposition ist bei Männern und Frauen unterschiedlich signifikant als Risikofaktor für Darmkrebs. Ein europäisches Konsortium veröffentlichte 2006 eine multizentrische Studie, die EPIC-Studie (European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition), in der über 36.000 initial krebsfreie Patienten medizinisch überwacht wurden und in Bezug auf das Risiko, an Kolon- oder Rektumkrebs zu erkranken ausgewertet wurden (*Pischon et al., 2006*). Während für das Rektumkarzinom nur bei Männern nur die Waist-to-Hip-Ratio (WHR, entspricht Taille/Hüfte) ein signifikantes Risikokriterium darstellte, waren beim Kolonkarzinom Gewicht, BMI (Body Mass Index, entspricht Gewicht/Körpergröße in Metern<sup>2</sup>), Taillenumfang, Hüftumfang und WHR signifikante Risikofaktoren. Bei Frauen waren es Gewicht, Taillenumfang, WHR und die Körpergröße, wobei eine höhere Körpergröße mit einem höheren Risiko verbunden

war (Pischon et al., 2006). In den meisten Fällen waren vor allem die Extremwerte riskant, wobei das höchste relative Risiko (RR) bei Männern ein BMI von  $<29,3$  mit einem RR von 1,64 und bei den Frauen eine Körpergröße von  $>167,4$  cm mit einem RR von 1,82 war. Diese Risiken sind weit größer als das relative Risiko durch Rauchen, für das in derselben prospektiven europäischen Studie (EPIC) relative Risikowerte für Darmkrebs von maximal 1,36 berechnet wurden (Leufkens et al., 2011). Interessanterweise waren hier die Risiken für ehemalige Raucher größer als für Raucher, was sich in anderen Studien zu dem Thema so nicht wiederfand, die den Zusammenhang von Zigarettenrauch und Darmkrebs allerdings grundsätzlich bestätigten, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß (Giovannucci, 2001). Insbesondere Langzeitraucher sind laut der Studienlage gefährdet, an Darmkrebs zu erkranken (Giovannucci, 2001). Ebenfalls in der EPIC-Studie wurde das Auftreten von kolorektalen Karzinomen (KRK) im Zusammenhang mit dem Konsum alkoholischer Getränke untersucht (Ferrari et al., 2007). Es fand sich ein signifikant erhöhtes relatives Risiko von bis zu 2,6 durch Alkoholkonsum. Dieses war dosisabhängig, für Rektumkarzinome stärker als für Kolonkarzinome und stärker für Bier als für Wein- oder Spirituosenkonsum (Ferrari et al., 2007). Weiterhin wurde der Einfluss von gesteigertem Verzehr roten und verarbeiteten Fleisches und Fisches (Norat et al., 2005) und von Ballaststoffen (Bingham et al., 2003) untersucht. Während rotes und verarbeitetes Fleisch bei gesteigertem Konsum das Risiko für Darmkrebs mit RR bis zu 1,6 steigerten, sank das Risiko bei hohem Fischkonsum ab und blieb durch Konsum von Geflügel unbeeinflusst. Das höhere Risiko durch gesteigerten Konsum roten Fleisches konnte allerdings anscheinend durch gleichzeitig hohen Konsum von Fisch und/oder Ballaststoffen weitgehend ausgeglichen werden (Norat et al., 2005). Ebenso wie Fischkonsum senkte auch ein hoher Konsum von Ballaststoffen aus Früchten, Getreide und Gemüse (in dieser Reihenfolge absteigend starker Nutzen), nicht aber aus Hülsenfrüchten, das Risiko einer Darmkrebserkrankung dosisabhängig ab, wenn auch nur mit Risikorate bis zu 0,69 (Bingham et al., 2003).

Basierend auf den Daten der EPIC-Studie wurde ein möglicher Zusammenhang von körperlicher Aktivität auf das Risiko einer Darmkrebserkrankung untersucht (Friedenreich et al., 2006). Es fand sich ein intensitätsabhängiges geringeres Risiko einer Erkrankung des Kolons, aber nicht des Rektums, bei körperlich aktiveren Menschen. Der Einfluss von in der Freizeit ausgeübter Aktivität war tendenziell etwas größer als der von Aktivität im Rahmen der Arbeit oder der Hausarbeit und der Einfluss auf das rechte Kolon war größer als der auf das linke Kolon (Friedenreich et al., 2006). Allerdings konnte dieser Einfluss nicht bei Individuen mit hohem BMI ( $\geq 30$ ) und hoher Energiezufuhr festgestellt werden. Warum der Einfluss auf das rechte Kolon größer zu sein scheint als auf das linke, ist noch unklar (Friedenreich et al., 2006).

Abschließend wurden die in der EPIC-Studie untersuchten 5 Einflüsse – Körpergewicht, Tabak- bzw. Alkoholkonsum, Nahrungsgewohnheiten und körperliche Aktivität – binär in vorteilhaft (1) und schädlich (0) eingeteilt und kumulativ ausgewertet (Aleksandrova et al., 2014).



Das kumulative relative Risiko einer Darmkrebserkrankung der postulierten positiven Einflüsse war im Trend hochsignifikant niedriger für Männer und Frauen, sowohl Kolon- als auch Rektumkarzinom, mit der einzigen Ausnahme des Rektumkarzinoms bei Frauen. Den stärksten errechneten anteiligen Einfluss hatte hierbei das Körpergewicht, gefolgt von der gesunden Ernährung (*Aleksandrova et al., 2014*).

Die Auswirkungen von körperlicher Aktivität und insbesondere von Sport auf die Krebsinzidenz sowie auf die Lebensqualität und die Überlebenschancen nach einer Tumordiagnose oder -therapie wurden in zahlreichen Studien untersucht. Während noch vor einigen Jahren Tumorkranken Schonung und Ruhe empfohlen wurde, treten zunehmend die positiven Aspekte von Sport und Bewegung in den Vordergrund. So gibt es bereits offizielle Empfehlungsrichtlinien für Sport nach einer Tumordiagnose, abhängig von der jeweiligen Krebserkrankung, der Erkrankungsphase und dem körperlichen Zustand, beispielsweise nach einer Tumorektomie (*Schmitz et al., 2010*). Auch wenn Studien meist aerobe Ausdauersportprogramme verwenden, so wird auch Widerstandstraining nicht nur als unbedenklich, sondern auch als nützlich eingeordnet (*De Backer et al., 2009*). Der Einfluss von körperlicher Aktivität auf das Risiko der Krebsinzidenz wurde außer in der bereits erwähnten EPIC-Studie auch in verschiedenen anderen Studien für verschiedene Krebsentitäten untersucht. Friedenreich *et al.* teilten die Krebsentitäten 2010 basierend auf der Studienlage in drei Gruppen ein (*Friedenreich et al., 2010*):

1. Entitäten, für die ein Zusammenhang wiederholt belegt werden konnte und auf die körperliche Aktivität vermutlich präventiv wirkt. Dies sind Kolon-, Brust- und Endometriumskarzinome. So wurde beispielsweise bereits 1995 ein signifikant niedrigeres Darmkrebsrisiko bei körperlich aktiveren Menschen gezeigt (*Giovannucci et al., 1995*). Lahmann *et al.* zeigten zudem ein signifikant niedrigeres Brustkrebsrisiko bei körperlich aktiven postmenopausalen Frauen (*Lahmann et al., 2007*). Interessanterweise wurde auch ein für alle Frauen signifikant niedrigeres Risiko gezeigt, wenn die körperliche Aktivität auf die Haushaltsaktivitäten reduziert wurde. Der Einfluss körperlicher Aktivität auf Endometriumskarzinome wurde in einer Übersichtsarbeit von 2015 bestätigt, allerdings nur für übergewichtige und nicht für normalgewichtige Frauen (*Schmid et al., 2015*).

2. Entitäten, für die ein präventiver Zusammenhang möglich oder sogar wahrscheinlich ist, aber aufgrund der divergierenden oder unzureichenden Studienlage bisher nicht geklärt werden konnte. Dies traf für Lungenkrebs zu, dessen Risiko nur bei Rauchern durch körperliche Aktivität beeinflusst werden konnte, sowie für Prostata- und Eierstockkrebs (*Friedenreich et al., 2010*). Eine neuere Übersichtsarbeit beschrieb allerdings einen positiven Effekt körperlicher Aktivität auf das Lungenkrebsrisiko von akuten und ehemaligen Rauchern, ebenso wie einen fehlenden Einfluss auf Personen, die niemals geraucht haben (*Brenner et al., 2016*).

Zusätzlich wird ein moderater Einfluss von regelmäßiger körperlicher Aktivität auf Magenkrebs vermutet (*Abioye et al., 2015*).

3. Entitäten, für die (bisher) kein Einfluss von körperlicher Aktivität auf das Krebsrisiko gezeigt werden konnte (*Friedenreich et al., 2010*), was alle Entitäten einbezieht, die zuvor nicht genannt wurden. Insgesamt wurde für keine Krebsentität ein erhöhtes Risiko durch körperliche Aktivität beschrieben. Diese ist in der Krebsprävention also entweder förderlich oder ohne Effekt.

Weiterhin gibt es zahlreiche Untersuchungen, die die Auswirkungen von Sport und körperlicher Aktivität auf die Lebensqualität (Quality of Life, QoL) von Tumorpatienten und die Mortalitätsrate nach einer Krebsdiagnose beschreiben. Auch hier ist die Studienlage für Brust- und Darmkrebs am dichtesten und am weitesten fortgeschritten. Eine Umfrage an über 9.000 Krebspatienten bezüglich der körperlichen Aktivität (binär, aktiv/nicht aktiv), des Obst- und Gemüse- (binär, unter 5 oder 5 und mehr pro Tag) sowie des Zigarettenkonsums (binär, ja/nein) in Verbindung mit der Lebensqualität ergab kumulativ signifikant höhere QoL-Werte bei Befolgung der positiven Faktoren bei allen untersuchten Krebsentitäten – Brust-, Prostata-, Darm-, Blasen-, Gebärmutter- und Hautkrebs (*Blanchard et al., 2008*). Bei einer getrennten Auswertung der Einflüsse wurden für jeden der drei Faktoren positive Einflüsse auf die QoL gefunden, die körperliche Aktivität wirkte sich jedoch am stärksten aus (*Blanchard et al., 2008*). In einer weiteren umfragebasierten Studie wurden die Auswirkungen der körperlichen Aktivität speziell für Darmkrebspatienten weiter untersucht (*Peddle et al., 2008*). Patienten, die die empfohlene Richtlinie für körperliche Aktivität einhielten, wiesen signifikant höhere Werte für körperliche und funktionelle QoL sowie signifikant niedrigere Erschöpfungswerte auf, aber keine besseren Werte bei emotionaler oder sozialer Gesundheit (*Peddle et al., 2008*). Dies deutet an, dass sich körperliche Aktivität auch vor allem auf körperliche Faktoren auswirkt, aber weniger auf das geistige Wohlbefinden. Insbesondere die durch die Krebstherapie bedingte Erschöpfung, die sogenannte Fatigue, wurde mehrfach in Bezug auf Sport und Aktivität untersucht und schon frühe Studien konnten einen positiven Einfluss von Sport auf die Fatigue für Brustkrebspatientinnen belegen (*Mock et al., 2005, Schwartz et al., 2001*). Für Männer mit Prostatakrebs, die eine anti-Androgen-Therapie durchliefen, konnten zudem signifikante Verbesserungen der Fatigue und der QoL durch ein 12-wöchiges Widerstandstrainingsprogramm belegt werden (*Segal et al., 2003*). Insgesamt belegt die Studienlage somit eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität und eine niedrigere therapiebedingte Erschöpfung bei Krebspatienten. In anderen Worten: Mehr Aktivität erlaubt auch wiederum mehr Aktivität.

Neben der Lebensqualität ist die zweite wichtige Zielgröße in der Forschung zu körperlicher Aktivität und Krebs ein möglicher Einfluss der körperlichen Aktivität auf die Lebensdauer der Patienten. So gab es vor allem in der jüngeren Vergangenheit viele Studien, die sich mit der

körperlichen Aktivität im Zusammenhang mit der krebsbedingten Mortalität bei unterschiedlichen Tumorentitäten auseinandersetzen. Auch hier wurden vor allem Brust- und Darmkrebspatienten untersucht. Bereits 2006 zeigten Meyerhardt *et al.* in prospektiven Studien mit a) 832 Stufe III Darmkrebspatienten und b) 573 weiblichen Darmkrebspatienten der Stufen I bis III, dass die körperliche Aktivität, abhängig von der Zahl der MET-Stunden (MET = Metabolisches Äquivalent), sowohl das krebsfreie als auch das allgemeine Überleben verlängerte und dass die Steigerung der Aktivität die relative Sterberate senken konnte (Meyerhardt *et al.*, 2006a, Meyerhardt *et al.*, 2006b). Ebenso konnte in der sogenannten „Nurse‘ Health Study“ an fast 3.000 Krankenschwestern in den USA eine signifikante Senkung des relativen Mortalitätsrisikos durch Brustkrebs durch einen steigenden Umfang körperlicher Aktivität belegt werden, was bei hormongesteuerten Tumoren besonders ausgeprägt war (Holmes *et al.*, 2005). In einer Übersichtsarbeit wurden 2012 auch nur für diese beiden Krebsentitäten genügend Studiendaten gefunden, um eine positive Korrelation der körperlichen Aktivität mit sowohl krebspezifischer als auch der Gesamtmortalität belegen zu können (Ballard-Barbash *et al.*, 2012). Hierbei war der Effekt von körperlicher Aktivität nach Diagnose der Erkrankung zur Senkung der Mortalität größer als der Effekt körperlicher Aktivität vor der Diagnose, wobei sich diese grundsätzlich bereits auf das Erkrankungsrisiko auswirkt (s. oben). Um den Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität und dem Überleben nach Krebsdiagnose genauer auszuwerten, führten Schmid und Leitzmann eine Metaanalyse der Studiendaten bezüglich Brust- und Darmkrebs bis Juni 2013 durch (Schmid and Leitzmann, 2014). Sie errechneten eine Senkung des relativen, sowohl allgemeinen als auch krebsspezifischen, Mortalitätsrisikos durch körperliche Aktivität vor der Diagnose von etwa 25% in beiden Tumorentitäten und eine Senkung des relativen Mortalitätsrisikos durch körperliche Aktivität nach der Diagnose von etwa 30% (krebspezifisch) bzw. 50% (allgemein) für Brustkrebs und etwa 40% (allgemein und krebspezifisch) für Darmkrebs (Schmid and Leitzmann, 2014). Zusätzlich berechneten sie eine Senkung der Gesamtmortalität pro 10 MET-Stunden um 24% bei Brust- und um 28% bei Darmkrebs sowie eine allgemeine Senkung des Mortalitätsrisikos bei beiden Entitäten um etwa 40% im Falle einer Erhöhung der körperlichen Aktivität nach Krebsdiagnose (Schmid and Leitzmann, 2014). Die genauen Mechanismen des (positiven) Einflusses körperlicher Aktivität auf Krebsinzidenz sowie -prognose sind noch nicht abschließend geklärt. Da körperliche Aktivität kein isoliertes Kriterium ist, sondern systemische Auswirkungen auf den ganzen Körper hat, ist es schwierig, diesen Effekt auf einzelne Wirkmechanismen einzugrenzen. Vermutlich beruht der Effekt auf einer kumulativen Wirkung von körperlicher Aktivität auf die Körperkomposition und den Fettanteil des Körpers, der Regulierung von Sexualhormonen sowie Insulin und Glucose und der antiinflammatorischen Langzeitwirkung von Sport (McTiernan, 2008).

## 1.2 Krebsgenetik

Um die Zusammenhänge von körperlicher Aktivität und Krebs verstehen zu können, müssen die molekularen Ursachen (Krebs) und Auswirkungen (beide) verstanden werden. In den letzten Jahrzehnten wurden unzählige Studien durchgeführt, die die verschiedenen speziellen Eigenschaften von Tumoren untersucht haben, wie die Anatomie, die zelluläre Komposition von Tumoren und des Tumorumfelds, die Physiologie, Wachstumsraten, das Genom, und andere. Allein die genetischen Unterschiede zwischen und innerhalb der verschiedenen Krebsentitäten sind derart komplex, dass auch mit den rasanten Fortschritten der Sequenzieretechnologie nur langsam ein systematischer Überblick gewonnen werden kann (*Vogelstein et al., 2013*). Die genetischen Veränderungen von Tumoren gegenüber den Wirtszellen umfassen sogenannte „Driver-Mutationen“ in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, die unmittelbar mit der Tumorentstehung zusammenhängen (*Fearon and Vogelstein, 1990*), andere somatische Mutationen, somatische Variationen der Kopienzahlen (*Beroukhim et al., 2010*), Mikrosatelliteninstabilität (*Thibodeau et al., 1993*), oder auch Verluste ganzer chromosomaler Regionen (*Fearon and Vogelstein, 1990, Lengauer et al., 1997, Vogelstein et al., 1989*).

In soliden Tumoren finden sich durchschnittlich zwischen 33 und 66 somatische Mutationen mit Auswirkungen auf die Proteinsynthese. Einige mutageninduzierte Tumorentitäten weisen deutlich höhere Zahlen auf, wie durch Tabakrauch induzierter Lungenkrebs, der etwa zehnmal so viele Mutationen aufweist wie Lungenkrebs bei Nichtrauchern (*Govindan et al., 2012*), oder Melanome, die zumeist durch UV-Licht ausgelöst werden (*Vogelstein et al., 2013*). Weitere Ausnahmen sind Mutationen in Genen, deren Produkte in der Fehlerkorrektur bei der Replikation eine Rolle spielen (*Fearon, 2011*) oder auch für die Exonuklease-Funktion zuständige Bestandteile von DNA-Polymerasen (*Palles et al., 2013*). Da Mutationen zufällig auftreten, unterscheiden sich auch Tumoren der gleichen Entitäten in ihren Genotypen. In der Regel beginnt eine Zelle, in der eine einzelne Driver-Mutation vorhanden ist, schneller zu wachsen, als die Umgebungszellen, was sich durch weitere Driver-Mutationen kumulativ verstärkt (*Vogelstein et al., 2013*). Auch wenn die einzelnen Effekte der Mutationen gering zu sein scheinen – Berechnungen gehen von einer 0,4%-Beschleunigung pro Mutation aus (*Bozic et al., 2010*) – so entsteht bei einer Ansammlung dieser Gene über einen längeren Zeitraum hinweg unweigerlich ein Tumor. Eine typische Driver-Mutation ist eine Veränderung des Adenomatosis Polyposis Coli-Gens (*APC*) als Ausgangspunkt für Darmkrebs (*Powell et al., 1992*). Folge-mutationen könnten hier das *KRAS*-Gen (V-KI-RAS2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog) betreffen, wiederum gefolgt von Mutationen des *PIK3CA*- (Phosphatidylinositol 3-Kinase, Catalytic, Alpha, (*Samuels et al., 2004*)), *SMAD4*- (Mothers Against Decapentaplegic, Drosophila, Homolog Of, 4, (*Thiagalingam et al., 1996*)) oder *TP53*-Gens (Tumor Protein p53, (*Hollstein et al., 1991, Vogelstein et al., 2013*)). Weitere häufige Driver-Mutationen betreffen die Gene *BRAF* (V-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1, z.B. im Darmkrebs,

(*Davies et al., 2002*)), *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor, z.B. Lungenkrebs, (*Paez et al., 2004*)) oder *HER2/neu* bzw. *ERBB2* (V-ERB-B2 Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2, z.B. Brustkrebs, (*Slamon et al., 1989*)). *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* und *PIK3CA* sind im Zellstoffwechsel alle in die gleiche Signalkaskade eingebunden (*Bardelli and Siena, 2010*).

Zusätzlich zu den Driver-Mutationen, die das Tumorwachstum beeinflussen, gibt es noch als „Passenger“-Mutationen bezeichnete Mutationen, die sich nicht auf das Tumorwachstum auswirken und bereits lange vor der Entstehung einer Neoplasie vorhanden sein können (*Bozic et al., 2010*). Umfassende Übersichtsarbeiten zur Tumorgenetik finden sich zum Beispiel von Fearon für kolorektale Karzinome oder allgemein von Vogelstein *et al.* (*Fearon, 2011, Vogelstein et al., 2013*). Eine Analyse der molekularen Signalwege der Driver-Mutationen findet sich bei Vogelstein *et al.* (*Vogelstein and Kinzler, 2004*).

### 1.2.1 Das *KRAS*-Gen

In der vorliegenden Arbeit wird das mutierte *KRAS*-Gen in kolorektalen Karzinomen als Zielgen für die Detektion im Blut zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) verwendet. Das humane *KRAS*-Gen „V-KI-RAS2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog“ (*McKusick, 1986-2016*) wurde 1982 erstmalig von Der *et al.* beschrieben (*Der et al., 1982*). Das intakte Gen codiert ein GDP/GTP-Bindeprotein, das in der Signaltransduktion agiert (*Kranenburg, 2005*). Zwei Varianten des *KRAS*-Gens sind im humanen Genom vorhanden: Während das funktionale *KRAS2*-Gen auf Chromosom 12p12.1 liegt, befindet sich das *KRAS1P*-Gen auf Chromosom 6p12 und ist ein transkribiertes Pseudogen (*McGrath et al., 1983, Popescu et al., 1985*). Die transkribierte mRNA des *KRAS1P*-Gens ist möglicherweise in der posttranskriptionalen Regulierung des *KRAS2*-Gens involviert, indem sie mit dessen mRNA um die regulierenden microRNAs (miRNAs) konkurriert. Dies wurde in einer Studie angedeutet, in der eine positive Korrelation des Vorkommens der beiden mRNAs nachgewiesen wurde (*Poliseno et al., 2010*). Das Pseudogen kann daher als Protoonkogen bezeichnet werden.

Das *KRAS*-Gen ist für die Onkologie von besonderer Bedeutung, da es in mutierter Form als Onkogen fungieren kann (*Kranenburg, 2005*). Tumorentitäten, die oft mutierte *KRAS*-Gene aufweisen, sind Pankreas-, kolorektale, Schilddrüsen- und Lungenkarzinome (*Kranenburg, 2005*). Die häufigsten Mutationen des *KRAS2*-Gens sind Punktmutationen, genauer gesagt Basensubstitutionen, in Codon 12 im zweiten Exon. Seltener treten Punktmutationen in Codon 13 im zweiten Exon sowie in Codon 61 und 146 auf (*Vaughn et al., 2011*). Mutationen in Codon 12 oder 13 finden sich in etwa 40% der kolorektalen Karzinome (KRK), wobei die häufigsten Basensubstitutionen G12D, G12V und G13D sind (Abkürzungen benennen in der Reihenfolge die ursprüngliche Aminosäure, das Codon und die neue Aminosäure; (*Neumann et al., 2009*)).

Mutationen im *KRAS*-Gen haben eine weitere Eigenschaft, die relevant für die klinische Anwendung ist: In der Therapie von Patienten mit metastasiertem KRK, die gegen bestimmte Chemotherapeutika resistent sind, werden anti-EGFR-Antikörper eingesetzt, um die entsprechende Signalkaskade zu hemmen (*Meyerhardt and Mayer, 2005*). In mehreren Studien wurde jedoch gezeigt, dass Patienten mit einer *KRAS*-Mutation nicht von dieser Therapie profitierten und signifikant niedrigere Werte für allgemeines und krankheitsfreies Überleben aufwiesen als Patienten mit *KRAS*-WT (*Amado et al., 2008, Karapetis et al., 2008, Lievre et al., 2008, Lievre et al., 2006*). Da die betroffenen Patienten somit nicht nur unnötige Nebenwirkungen und Kosten, sondern auch einen Zeitverlust durch eine ineffektive Therapie haben, ist die anti-EGFR-Therapie bei Patienten mit *KRAS*-Mutationen nicht empfohlen. In der Folge ist eine Kategorisierung des *KRAS*-Status für die Auswahl der Therapie essentiell. Allerdings gibt es zwei Hindernisse, die in vielen Fällen auch bei einem ursprünglichen WT-Status des *KRAS*-Gens des soliden Tumors zu einer Stagnation des Therapieerfolges führen können: Erstens ist es möglich, dass zwar der resezierte oder biopsierte solide Tumor den *KRAS*-Wildtyp (WT) aufweist, eine oder mehrere Metastasen jedoch mutierte *KRAS*-Varianten tragen (*Bouchahda et al., 2010*). Zweitens können innerhalb des Tumors neue *KRAS*-Mutationen entstehen oder bereits in geringer Zahl vorhanden sein (*Morelli et al., 2015*) und diese bekommen in der Folge durch die anti-EGFR-Therapie einen zusätzlichen selektiven Vorteil, sodass sie sich schnell ausbreiten können (*Diaz et al., 2012*). Es wird in diesen Fällen also durch die Therapie eine Resistenz gegen die Therapie und eine Ausbreitung der *KRAS*-Mutation im soliden Tumor und /oder Metastasen herbeigeführt (*Misale et al., 2012*). Zusätzlich zu der möglichen Ausbreitung der Mutation wurde auch von einer Erhöhung der *KRAS*-WT-Kopienzahl berichtet (*Mohan et al., 2014*). Somit erfordert die Therapie mit anti-EGFR-Antikörpern nicht nur eine *a priori*-Genotypisierung des *KRAS*-Gens, sondern auch eine regelmäßige Kontrolle. Eine solche Veränderung des genetischen Status solider Tumoren wurde nicht nur für *KRAS*-Mutationen berichtet, sondern beispielsweise auch für ursprünglich *HER2/neu* negative Brusttumoren, die im Laufe der Therapie neue Mutationen entwickelten bzw. verbreiteten (*Gevensleben et al., 2013*).

Momentan wird die Nachsorge potentiell kurativer Behandlungen von Tumorerkrankungen mit radiologischer Bildgebung durchgeführt, was teuer ist und aufgrund der radioaktiven Dosen nicht regelmäßig durchgeführt werden kann (*Crowley et al., 2013*). Da es zudem nicht möglich ist, regelmäßig neue Biopsien in den Patienten durchzuführen, wurde erwogen, diese durch sogenannte „liquid biopsies“, also flüssige Biopsien, aus der zellfrei im Blut zirkulierenden DNA (cfDNA) zu ersetzen, wozu es bereits mehrere erfolgreiche Studienberichte gibt (*Diaz et al., 2012, Morelli et al., 2015, Murtaza et al., 2013*). Diese werden im nachfolgenden Abschnitt weiter erläutert.

### 1.3 Zellfreie DNA

Zellfrei im Blut zirkulierende DNA wurde 1948 von Mandel und Métails erstmals beschrieben, noch bevor die vollends entschlüsselte Struktur der DNA 1952 veröffentlicht wurde (*Mandel and Metais, 1948*). cfDNA findet sich in niedrigen Konzentrationen im Blut aller Menschen. Die in der cfDNA vertretenen Sequenzen entsprechen weitgehend gleichmäßig dem gesamten Genom, wobei *Alu*-Elemente leicht verstärkt aufzutreten scheinen (*Beck et al., 2009*).

Über diese geringen cfDNA-Konzentrationen hinausgehende oder anderweitig veränderte cfDNA-Konzentrationen wurden in Individuen mit verschiedenen physiologischen Zuständen außerhalb der Norm beschrieben. So wurde beispielsweise in Plasma- und Serumproben von schwangeren Frauen, die männliche Nachkommen erwarteten, über eine Detektion des Y-Chromosom nachgewiesen, dass cfDNA des Fötus im Blut der Mutter zirkulierte (*Lo et al., 1997*).

#### 1.3.1 cfDNA bei Sport

Bei anderen nicht-pathologischen physiologischen Situationen konnten stark erhöhte cfDNA-Konzentrationen gemessen werden. So steigen die cfDNA-Konzentrationen im Blut bei starker körperlicher Belastung, wie zum Beispiel einem körperlichen Belastungstest, innerhalb von Minuten stark an. Da diese Anstiege konstant zu beobachten sind und zudem belastungsabhängig sind, gibt es Untersuchungen zur Eignung der cfDNA-Konzentration oder auch des cfDNA-Anstiegs als Belastungsmarker, vergleichbar mit dem Laktatwert (*Breitbach et al., 2012*).

Erhöhte cfDNA-Konzentrationen wurden zunächst für Ausdauerbelastungen wie Halb- und Ultra-Marathonläufe (*Atamaniuk et al., 2008, Atamaniuk et al., 2004*), aber auch für intensives Widerstandstraining (*Atamaniuk et al., 2010, Fatouros et al., 2006*) und Stufenbelastungstests auf dem Laufband und dem Fahrradergometer nachgewiesen (*Beiter et al., 2011, Breitbach et al., 2014a*). Die Freisetzung von cfDNA ist jedoch nur von kurzer Dauer und vor allem auf den Belastungszustand beschränkt, so dass die cfDNA-Konzentrationen nach einer Erholungsphase von 30-120 Minuten zumeist die Ausgangswerte vor Belastung wieder erreichten. Einzige Ausnahme bildete hier der Ultra-Marathon mit einer Belastungsdauer von etwa 6 Stunden, bei dem die gemessenen cfDNA-Konzentrationen zwei Stunden nach Ende des Laufs im Schnitt immer noch deutlich über den Ausgangswerten lagen, 24 Stunden nach Belastungsende jedoch auf das Ursprungsniveau abgesunken waren (*Atamaniuk et al., 2008*). Somit kann bei körperlicher Belastung von einer schnellen und starken aber kurzen Freisetzung von cfDNA ausgegangen werden, die im Falle einer anschließenden Erholungsphase auch schnell wieder abgebaut wird.

### 1.3.2 cfDNA bei Krankheiten

Zusätzlich sind erhöhte cfDNA-Konzentrationen im Blut von Patienten mit verschiedenen Krankheiten entdeckt worden. Die zuerst beschriebene und mittlerweile auch die am besten untersuchte Krankheit, die mit erhöhten cfDNA-Konzentrationen einhergeht, war der systemische Lupus erythematodes (*Tan et al., 1966*), eine inflammatorische Autoimmunkrankheit, deren Progression auch mit steigenden cfDNA-Konzentrationen einherzugehen scheint (*Tug et al., 2014*). Später wurden hohe cfDNA-Konzentrationen auch für Traumapatienten (*Lo et al., 2000*), Patienten nach Herzinfarkt (*Chang et al., 2003*) und Schlaganfällen (*Rainer et al., 2003*) sowie Patienten mit Sepsis (*Saukkonen et al., 2008*) beschrieben.

### 1.3.3 cfDNA bei Krebs

1977 wiesen Leon und Kollegen erstmals erhöhte cfDNA-Konzentrationen bei Tumorpatienten nach (*Leon et al., 1977*). Sie brachten stark erhöhte Konzentrationen auch schon in Zusammenhang mit Metastasierung und einen deutlichen Abfall der cfDNA-Konzentrationen während einer Bestrahlungstherapie mit positiver Prognose der Wirkung der durchlaufenen Therapie (*Leon et al., 1977*). Seitdem gab es viele verschiedene Ansätze, um die im Blut zirkulierende DNA im Rahmen der Krebsdiagnostik als „Liquid Biopsy“ einzusetzen, um so auf schnellem und unkompliziertem Wege an Informationen über Tumorzustand, Resektions- und Therapieerfolg, oder mögliche Fernmetastasen zu gelangen (*Crowley et al., 2013, Schwarzenbach et al., 2011*). Die potentiellen Einsatzmöglichkeiten der cfDNA oder der ctDNA lassen sich unterteilen in diagnostische Anwendung, also die Entdeckung von Krebsgewebe im Körper, prognostische Anwendung, die die Entwicklung der Tumorkrankheit voraussagen soll, und prädiktive Anwendung, welche vor allem Informationen über den Tumor in Bezug auf zur erwartende Reaktionen auf die Therapie liefern soll (*Heitzer et al., 2015*).

Auf methodischer Ebene gibt es ebenfalls mehrere Herangehensweisen an die Analyse der cfDNA, die im Weiteren anhand von Studienbeispielen noch detaillierter erläutert werden, hier aber bereits im kurzen Überblick zusammengefasst sind: 1. Die einfache Quantifizierung der gesamt-cfDNA. Dies kann erste Hinweise auf Erkrankungen liefern, ist aber weder Krankheits- noch Tumor-, und schon gar nicht Tumorentitätsspezifisch. Zudem ist die Ausprägung stark schwankend – manche Patienten haben sehr stark erhöhte cfDNA-Konzentrationen, manche Patienten haben cfDNA-Konzentrationen, die nicht höher sind als diejenige gesunder Menschen. Fehlende Spezifität macht die reine cfDNA-Quantifizierung also für die Tumordiagnostik ungeeignet. Prädiktiv und prognostisch ist die cfDNA eventuell besser geeignet. Der große Vorteil der cfDNA-Quantifizierung ist die Einfachheit der Methodik und die Möglichkeit mit einem Minimum an Probenvolumen auszukommen, so dass nicht einmal eine venöse, sondern nur eine kapilläre Blutabnahme erforderlich ist (*Breitbach et al., 2014a*). 2. Die DNA-Integrität



der cfDNA, also das Verhältnis langer cfDNA-Fragmente zu kurzen cfDNA-Fragmenten. Erhöhte DNA-Integrität der cfDNA wurde bei verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (*Schwarzenbach et al., 2011*). Dennoch kann die erhöhte Integrität als diagnostischer Marker aufgrund der hohen Streuung voraussichtlich keine Verwendung finden. Als prognostischer Marker ist sie aber möglicherweise geeignet (*Umetani et al., 2006a*). 3. Detektion, Quantifizierung und Analyse der zirkulierenden Tumor-DNA (ctDNA). Mit verschiedenen hochsensitiven Techniken ist es mittlerweile möglich, die im Blut zirkulierende, aus dem Tumor stammende, ctDNA anhand von Sequenzunterschieden zur DNA aus gesunden Zellen spezifisch zu detektieren und zu quantifizieren. Die ctDNA bietet die meisten Vorteile, insbesondere durch das Alleinstellungsmerkmal gegenüber den anderen Herangehensweisen, dass sie nur im Falle einer tatsächlichen Tumorerkrankung im Blut zu finden sein kann. 4. Epigenetische Analysen der cfDNA. Dies ist die einzige cfDNA-Analyse, die bereits in der klinischen Diagnostik zugelassen ist.

### 1.3.3.1 Allgemeine cfDNA-Konzentration als Tumormarker

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die cfDNA im Blut von Tumorpatienten im Durchschnitt deutlich höher ist als bei gesunden Individuen. Gal *et al.* beschrieben erhöhte cfDNA-Konzentrationen im Serum von Brustkrebspatientinnen, unabhängig von der Metastasierung und dem Krankheitsverlauf (*Gal et al., 2004*). Auch für Darmkrebspatienten und, wenn auch weniger ausgeprägt, für Patienten mit Polypen des Kolons wurden in einer Studie von Danese *et al.* erhöhte cfDNA-Konzentrationen gemessen (*Danese et al., 2010*). Holdenrieder *et al.* unterschieden in einer Studie an Lungenkrebspatienten nur zwischen Patienten, die von Chemotherapie profitierten (Responder) oder nicht profitierten (non-Responder) und detektierten bei Respondern zu allen Phasen der Therapie durchschnittlich signifikant niedrigere cfDNA-Konzentrationen, welche hier in Form zirkulierender Nukleosomen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt und angegeben wurden (*Holdenrieder et al., 2004*). Somit konnten sie der cfDNA einen gewissen prädiktiven Wert nachweisen. Dennoch war hier, wie bei allen Studien zur Diagnostik von Tumorerkrankungen durch gesamt-cfDNA, eine derart breite Streuung der Messwerte gegeben, dass zwar im Nachhinein eine statistische Aussage getroffen werden konnte, aber aufgrund der gewonnenen Daten keine Grenzwerte für Responder oder non-Responder bestimmt werden können. Daher ist eine klinische Anwendung voraussichtlich nicht möglich.

Bei einer Einteilung der gemessenen cfDNA-Konzentrationen in hohe und niedrige Werte, zumeist über oder unter dem Median oder Mittelwert, konnte für verschiedene Tumorentitäten den höheren Werten eine niedrigere allgemeine und auch krankheitsfreie Überlebenszeit zugeordnet werden, also eine prognostische Aussage getroffen werden. Dies war der Fall für Patientinnen mit Ovarialkarzinomen (Grenze Median 5150 Allele/ml Plasma, (*Steffensen et al., 2014*)) und kolorektalen Karzinomen (Grenze 1000 ng/ml Blut, gemessen im Serum,

(Schwarzenbach *et al.*, 2008)). Li *et al.* konnten hingegen in einer prospektiven Evaluation der prognostischen Aussage von cfDNA bei Lungenkrebs mit 103 Patienten keine prognostische Aussagekraft der cfDNA detektieren (Li *et al.*, 2016). In einer weiteren Studie an Patienten mit KRK wurde der Zusammenhang von cfDNA-Konzentrationen mit der Lebenserwartung bestätigt (Grenze Mittelwert der Kontrollgruppe + zwei Standardabweichungen), die Patienten mit hohen cfDNA-Konzentrationen wiesen ein kürzeres Überleben auf (Spindler *et al.*, 2014). Zusätzlich wurde in dieser Studie noch in Zusammenhang mit einer *KRAS*-Genotypisierung aus dem Plasma gezeigt, dass die einzige Gruppe, die sich signifikant positiv im Überleben von den anderen unterschied, die Gruppe der Patienten mit niedrigen cfDNA-Konzentrationen und ohne *KRAS*-Mutationen im Plasma war (Spindler *et al.*, 2014). Eine 2016 veröffentlichte Metaanalyse hat die Studien zum Einfluss der cfDNA-Konzentrationen bei KRK berechnet und ergab ein erhöhtes Risiko für Patienten mit hohen cfDNA Konzentrationen von 2,78 für rückfallfreies Überleben und 3,03 für Gesamtüberleben (Basnet *et al.*, 2016). Somit zeigen die Ergebnisse der bisher veröffentlichten Studien zumindest für einige Tumorentitäten einen möglichen prognostischen Wert der cfDNA für das Patientenüberleben. Ob sich diese statistische Relevanz der hohen cfDNA-Konzentrationen für die Patientenprognose in eine Anwendung in der Therapie verwenden lässt, bleibt abzuwarten.

### 1.3.3.2 DNA-Integrität als Tumormarker

Die cfDNA-Integrität ist in verhältnismäßig wenigen Studien bisher untersucht worden. Sie errechnet sich aus dem Quotienten der langen cfDNA-Fragmente geteilt durch die kurzen cfDNA-Fragmente. Da die kurzen Abschnitte in den langen Fragmenten ebenfalls vorhanden sind, sind diese in der Konzentration kurzer Fragmente miteingeschlossen.

Wang *et al.* beschrieben 2003 eine erhöhte cfDNA-Integrität bei Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren (Wang *et al.*, 2003). Umetani *et al.* konnten im Durchschnitt statistisch tumorstufenabhängig erhöhte cfDNA-Integritätswerte für Brustkrebspatientinnen bestätigen, wenn auch mit hohen Überschneidungen der Gruppen (Umetani *et al.*, 2006a). Im Gegensatz hierzu fanden Madhavan *et al.* in einer Studie an Patientinnen mit primärem oder metastatischem Brustkrebs zwar erhöhte cfDNA-Konzentrationen in Korrelation mit einer schlechten Prognose, dies aber gepaart mit einer niedrigeren cfDNA-Integrität (Madhavan *et al.*, 2014), während in einer weiteren Studie an Brustkrebs- sowie einer Studie an Lungenkrebspatienten keine signifikanten Unterschiede in der cfDNA-Integrität zwischen den einzelnen Tumorgruppen (Lehner *et al.*, 2013) oder den Tumorpatienten und der Kontrollgruppe gefunden wurden (Schmidt *et al.*, 2008). Auch wenn einzelne Studienergebnisse vielversprechend aussehen, scheint die cfDNA-Integrität aufgrund der variierenden Befunde nicht für die Tumordiagnostik geeignet zu sein.

In einem Xenograft-Modell, bei dem menschliche Tumoren in Mäusen induziert worden waren, wurde beschrieben, dass die den Tumoren entstammende zirkulierende DNA kürzer war als

die mauseigene cfDNA, was eher für eine niedrigere DNA-Integrität bei Tumorpatienten spricht (Mouliere et al., 2011). Allerdings lässt sich dieses Modell nicht zu 100% auf den Fall einer körpereigenen Neoplasie übertragen, zumal auch in den Xenograft-Modellen ein Großteil der cfDNA aus dem Tumor stammt (Thierry et al., 2010), was aber auch lediglich mit der Größenrelation des Tumors zur Körpermasse im Mausmodell zusammenhängen könnte. Dies ist in den meisten Fällen für humane Tumoren anders beschrieben, in denen die ctDNA meist nur eine geringe Fraktion ausmacht. Jiang et al. analysierten die cfDNA von Patienten mit Lebertumoren mittels genomweiter massiv-paralleler DNA-Sequenzierung und fanden heraus, dass die Anteile kurzer cfDNA-Fragmente (<150 DNA-Basenpaaren (bp)) mit der ctDNA-Konzentration korrelierten, cfDNA-Fragmente mononukleosomaler Länge (150-180 bp) unabhängig von der ctDNA-Konzentration waren und lange Fragmente (>180 bp) negativ mit der ctDNA-Konzentration korrelierten (Jiang et al., 2015). Patienten mit viel ctDNA im Blut wiesen also verstärkt kurze Fragmente auf. Eine weitere Studie, die in Patienten mit Melanom oder Lungenkrebs die Fragmentlängen von ctDNA mit *BRAF*-Mutationen mit den entsprechenden WT-Fragmenten verglich, kam ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die ctDNA-Fragmente mit etwa 130-140 bp kürzer waren als die restliche cfDNA mit etwa 165 bp (Underhill et al., 2016). Dies weist auf einen Zusammenhang der Fragmentlänge mit der freien Tumor-DNA hin und bestätigt die Ergebnisse der Xenograft-Studie, zeigt aber ebenfalls die Überlegenheit der ctDNA-Analyse gegenüber der Messung der cfDNA-Integrität in Spezifität und Aussagekraft.

### 1.3.3.3 ctDNA als Tumormarker

Die dritte Möglichkeit der cfDNA-Analyse in der Tumordiagnostik ist die direkte Untersuchung derjenigen cfDNA-Fragmente, die dem Tumor entstammen, die sogenannte ctDNA (Anker et al., 1997). Für diese Analysen gibt es eine Vielzahl verschiedener Herangehensweisen und Methoden und mehr wissenschaftliche Veröffentlichungen als für die anderen Analyse-Ansätze. Die Vorteile der direkten ctDNA-Analyse sind offensichtlich: Es wird DNA detektiert, die nur aus einem Tumor stammen kann, da tumorspezifische Sequenzeigenschaften als Marker gewählt werden. Im Falle einer Detektion von ctDNA-Fragmenten ist die Diagnose also sehr wahrscheinlich positiv, wobei eine Negativ-Diagnose schwieriger zu treffen ist. Dies impliziert aber gleichzeitig eine der Schwierigkeiten bei der diagnostischen Verwendung der ctDNA – die ctDNA muss gefunden werden. Diese tritt jedoch in sehr niedrigen Konzentrationen von teilweise nur 0,01% der gesamten cfDNA auf (Diehl et al., 2005). Die cfDNA wiederum kann in geringen Konzentrationen von etwa 10 ng/ml bei gesunden Individuen, aber auch bei Tumorpatienten, vorkommen. Insbesondere bei Patienten mit frühen Tumorstadien kann es zudem sein, dass (noch) keine Tumor-DNA im Plasma vorhanden ist. Außerdem entstammt die ctDNA körpereigenen Zellen, ist also genetisch in fast allen Punkten zunächst mit der restlichen cfDNA identisch. Es ist daher notwendig, die jeweiligen genetischen Unterschiede zwi-

schen ctDNA und cfDNA zu kennen und in der Folge zu entdecken. Die genetischen Unterschiede werden in der Anwendung zumeist durch Analysen von Gewebeproben aus soliden Tumoren gefunden (*Dawson et al., 2013*), für eine Erstdiagnose der Erkrankung ist dies aber nicht möglich. Daher wird für eine tatsächliche diagnostische Anwendung ein Kenntnis der möglichen Eigenschaften von ctDNA benötigt, die alle hochsensitiv getestet werden müssen. Hierfür ist eine umfangreiche Vorarbeit zur Erforschung der möglichen relevanten Mutationen notwendig. Eine Sammlung der krebsspezifischen Genetik wird online als „Cancer Genome Atlas“ vom US-amerikanischen National Institute of Health zur Verfügung gestellt (*NIH*).

### 1.3.3.3.1 Methoden zur ctDNA-Detektion und -Quantifizierung

In den Jahren seit der ursprünglichen Entdeckung zellfreier DNA in Tumorpatienten wurden zahlreiche stetige Verbesserungen bestehender Methoden sowie neue Methoden zur Detektion und Quantifizierung von gesamt-cfDNA und ctDNA entwickelt. Während in Gewebeproben aus Tumoren hohe DNA-Konzentrationen vorliegen, in denen auch die Anteile der Tumorzellen groß genug sind, um Mutationen mit herkömmlichen Gentests wie dem Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus zu detektieren (*Schimanski et al., 1999*), werden für die Plasmaanalyse eigens entwickelte, hochsensitive Methoden benötigt. Diese Anforderung entsteht aus den kombinierten Hindernissen, dass ctDNA in der cfDNA nur eine geringe Fraktion ausmacht, diese wiederum im Blutplasma in niedrigen Konzentrationen vorliegt und dieses wiederum teilweise nur in niedrigen Volumina zur Verfügung steht.

Im Folgenden sollen einige relevante Anwendungen zur ctDNA-Detektion, -Quantifizierung und -Analyse vorgestellt werden, mit den Schwerpunkten auf Varianten der quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR), digitalen Droplet-PCR (ddPCR) und DNA-Sequenzierung. Für die einzelnen Methoden werden jeweils kurz die spezifischen Möglichkeiten sowie Vor- und Nachteile geschildert.

#### 1.3.3.3.1.1 qPCR-Anwendungen

Die qPCR ist bereits eine Weiterentwicklung der Polymerase-Kettenreaktion, die in jedem Amplifikationszyklus die im Reaktionsgemisch vorhandene DNA mittels Fluoreszenzmarkern, wie zum Beispiel dem DNA-interkalierenden SYBR-Green, quantifiziert. Aufgrund sequenzspezifischer Bindeprimer, an die die jeweils verwendete DNA-Polymerase für die Vervielfältigung bindet, wird nur eine bestimmte Sequenz aus der DNA amplifiziert. Für die Mutationsdetektion sind diese Bindeprimer für bestimmte Mutationen spezifisch, zum Beispiel bestimmte Basensubstitutionen, und binden die WT-Variante nicht oder nur in geringerem Ausmaß. Alternativ können alle Varianten der Sequenzen amplifiziert werden aber nur die Fragmente mit entsprechenden Mutationen durch mutationsspezifische Sonden sichtbar gemacht werden, die dann bei der Abtrennung von der spezifisch gebundenen Sequenz das Fluoreszenzsignal für die Quantifizierung aussenden. Durch Verwendung spezieller DNA-Polymerasen können

unterschiedlich hohe Grade an Genauigkeit, Schnelligkeit und Vervielfältigung schwieriger und schlechterhaltener DNA-Vorlagen erreicht werden. Zusätzlich kann auch eine Anpassung der physikalischen Bedingungen, wie Temperatur und Dauer der PCR-Zyklen, oder der anderen in der PCR verwendeten Reagenzien hier einen Einfluss haben. Durch derartige Veränderungen war es unter anderem Breitbach *et al.* möglich, eine qPCR zu entwickeln, die direkt mit verdünntem Blutplasma als Ausgangsmaterial arbeitet, anstatt, wie sonst üblich, mit isolierter DNA (Breitbach *et al.*, 2014b, Umetani *et al.*, 2006c).

Wie bereits erwähnt, ist eine Ansatzmöglichkeit zur spezifischen Detektion mutierter Sequenzen, PCR-Bindeprimer zu verwenden, die spezifisch für bestimmte Mutationen sind. Dies wird grundsätzlich dadurch ermöglicht, dass die Mutation im Falle einer Punktmutation oder Insertion in der Primersequenz vorkommt, im Falle einer Deletion der Primer die Enden der Deletion direkt nacheinander beinhaltet. Für Punktmutationen ist der Primer umso spezifischer, je weiter die Mutation am 3'-Ende liegt, im Optimalfall ist es die letzte Base des Primers (Newton *et al.*, 1989). Sogenannte ARMS-Primer (Amplification Refractory Mutation System) bauen zusätzlich am 3'-Ende kurz vor der Mutation noch eine nicht in der Vorlage vorhandene Basensubstitution ein, die die Zielsequenz verändert (Newton *et al.*, 1989). Dies verringert zwar auch die ursprüngliche Bindeaffinität des ARMS-Primers zur mutierten Sequenz, aber nicht so sehr wie die zusätzliche Verringerung der ohnehin niedrigen Affinität zur WT-Sequenz, die nun zwei Basenunterschiede zur Primersequenz aufweist. qPCR-Ansätze mit ARMS-Primern wurden bereits erfolgreich für die Detektion und auch die Quantifizierung von ctDNA verwendet (Lang *et al.*, 2011, Spindler *et al.*, 2012).

Eine zusätzliche Verbesserung der Spezifität bei der Detektion kann durch den Einsatz von Nukleotiden mit artifiziell veränderten Strukturen erreicht werden, die eine verbesserte Bindeaffinität zu den entsprechenden komplementären Basen haben. Dies sind Locked Nucleic Acids (LNAs) und Peptide Nucleic Acids (PNAs) (Koshkin *et al.*, 1998). Primer, in denen Basen am 3'-Ende durch LNA-Basen ersetzt worden waren, zeigten in Studien deutlich höhere Spezifitäten in der Bindung an komplementäre Stränge als Primer ohne LNAs (Latorra *et al.*, 2003). PNAs besitzen zusätzlich die Eigenschaft, dass sie sich nicht mehr von den einmal gebundenen Strängen lösen. Somit können sie als sogenannte PNA-clamps eingesetzt werden (Clamp = Zwinde, Schelle), die irreversibel an WT-Fragmente binden und diese blockieren (Nagai *et al.*, 2005). Anschließend können mutierte Fragmente in einer PCR angereichert werden, da diese nicht blockiert werden. Ein selektiver Nachweis der Mutation kann anschließend durch spezifische Primer oder auch spezifische Sonden erbracht werden, oder das Produkt kann als Ausgangsmaterial für Sequenzierungen dienen (Yeo *et al.*, 2013). Diese modifizierten artifiziellen Nukleotide sind eine effiziente Ergänzung zu PCR- und qPCR-Anwendungen, haben

aber hohe Anschaffungskosten, insbesondere PNAs, sind komplizierter zu entwickeln als herkömmliche Bindeprimer oder Sonden und werden nur von wenigen Firmen kommerziell angeboten.

Anders als mit LNAs und PNAs ist eine Anreicherung der mutierten Fraktion mittels WT-DNA-Primern mit anderweitig modifizierten 3'-Enden, zum Beispiel in Form von C6-Aminen, kostengünstig (Lee *et al.*, 2011). Diese können ebenfalls die Verlängerung der Primer verhindern und so die Amplifikation des WT blockieren. Allerdings erfordern sie eine genaue Etablierung der Anlagerungstemperatur in der PCR, da diese WT-Blocking-Primer weniger Spezifität zum WT aufweisen als PNA-Clamps. Somit ist die Differenz in der Affinität zwischen Mutation und WT geringer und nur bei genau abgestimmten Anlagerungstemperaturen optimal (Lee *et al.*, 2011).

In High Resolution Melt Curve (HRM) Analysen wird die Detektion der mutierten DNA-Fragmente nicht während der Amplifikation vorgenommen, sondern durch eine anschließende Schmelzkurve, die die Strukturunterschiede durch veränderte Schmelztemperaturen detektiert (Hu *et al.*, 2012). Diese Methode eignet sich allerdings nicht gut für Punktmutationen, vor allem für Basensubstitutionen, und zeigt auch eine schlechtere Sensitivität als die anderen vorgestellten Methoden, da sie mutierte Fragmente nicht unter 1% erkennen kann (Hu *et al.*, 2012). Die qPCR erreicht eine sehr hohe Sensitivität, bis hin zu einer einzigen mutierten Kopie, was mittels entsprechender Anpassungen auch durch eine entsprechende Spezifität gewährleistet werden kann. Die qPCR ist außerdem kostengünstig und die benötigten Apparaturen sind in den meisten molekularbiologischen Laboren vorhanden. Ein Nachteil der qPCR ist die Bandbreite an Informationen, die aus einer Probe bzw. einer Reaktion gewonnen werden kann. Die qPCR zielt in der Regel auf nur eine Zielsequenz ab und benötigt für eine verlässliche statistische Auswertung der Ergebnisse dreifach-Ansätze von jeder Probe. Ersteres lässt sich teilweise durch die Verwendung eines sogenannten Multiplex-Ansatzes verbessern, in dem mehrere Zielsequenzen amplifiziert werden, wie für die ddPCR unten beschrieben (Taly *et al.*, 2013). Letzteres Problem kann durch einen nested-Ansatz gelöst werden, bei der in einer vorgeschalteten Erstrunden-PCR die Proben-DNA voramplifiziert wird, das Produkt anschließend verdünnt und in die eigentliche qPCR-Detektionsanwendung eingesetzt, so dass das Ausgangsvolumen erhöht wird (Bartley *et al.*, 2010). Dies bewirkt allerdings wiederum Ungenauigkeiten bei der Quantifizierung und zusätzliche Arbeitsschritte.

Um die erste PCR in einem nested-Ansatz effektiver zu gestalten, können hier Modifikationen vorgenommen werden, wie sie teilweise in der Präamplifikation vor der DNA-Sequenzierung verwendet werden. Ein Beispiel hierfür ist die sogenannte COLD-PCR, die durch sehr niedrige Schmelztemperaturen die Doppelstrangtrennung von Fehlbindungen, beispielsweise einer mutierten mit einer WT-Sequenz, im Schmelzschritt begünstigt, während die Bindungen zweier gleicher Fragmente nicht getrennt werden (Li *et al.*, 2008). Diese PCR hat den Vorteil, dass

sie alle Fragmentvariationen begünstigt, die in niedrigen Konzentrationen vorliegen, aber gleichzeitig den Nachteil, dass eine gezielte Aufkonzentrierung spezieller Sequenzen nicht möglich ist und dass die Aufkonzentrierung bis maximal auf die gleiche Konzentration wie die des WT kommen kann. In einer weiterentwickelten Version, der *ice*-COLD-PCR, gelang es How Kit *et al.* mittels dieser Präamplifikationsmethode eine Sensitivität von 0,1% mutierter *KRAS*-Fragmente in der Detektion zu erreichen (How Kit *et al.*, 2013). Eine weitere Möglichkeit, die Spezifität der nested-PCR zu steigern, ist der Einsatz von WT-Blocking-Primern in der Erstrunden-PCR, wie in dieser Arbeit vorgestellt (siehe Methodenteil).

Andersen *et al.* zeigten, dass die Verwendung von qPCR-Amplikons von 85 bp zur Detektion von ctDNA-Fragmenten geeigneter ist, als die Verwendung von Fragmenten von 120 bp Länge (Andersen *et al.*, 2015). Dies passt zu den Erkenntnissen anderer Veröffentlichungen, dass ctDNA oft aus sehr kurzen Fragmenten besteht (Mouliere *et al.*, 2011, Underhill *et al.*, 2016) und sollte bei der Generierung von PCR-Primern bedacht werden.

### 1.3.3.3.1.2 ddPCR-Anwendungen

Die digitale droplet PCR ist eine Abwandlung und Weiterentwicklung der herkömmlichen PCR und qPCR mit Ansätzen einer nested-PCR (Hudecova, 2015). Sie ist eine Endpunkt-PCR, was bedeutet, dass nicht die Entwicklung der Amplifikation während der PCR überprüft wird, sondern nur die Endkonzentration bestimmt wird. Sie basiert auf dem Prinzip, dass ein PCR-Reaktionsgemisch generiert wird, teilweise nach einer Präamplifikation, und diese mit Hilfe einer speziellen Apparatur und einer öligen Emulsion in tausende bis Millionen von einzelnen Ansätzen zerteilt wird. Diese Vielzahl von Einzel-PCRs durchläuft dann reguläre PCR-Zyklen und wird am Ende im Hinblick auf eine stattgefundene Amplifikation binär ausgewertet. Ein Programm berechnet anschließend aus der binären Information in Kombination mit der Zahl der PCR-Ansätze eine absolute Konzentration der vorher in der Probe befindlichen Fragmente. Aufgrund der Vielzahl an einzelnen PCRs erreichen diese Methoden eine sehr hohe Sensitivität, sind aber möglicherweise anfälliger für falsch positive Ergebnisse als qPCR-Ansätze. Ein Vorreiter dieser Technologie war das bereits 2003 entwickelte BEAMing (Beads, Emulsion, Amplification, and Magnetics, (Diehl *et al.*, 2006, Dressman *et al.*, 2003)), das mutierte Fraktionen unter 0,01% quantifizieren kann. Taly *et al.* stellten 2013 eine Multiplex-ddPCR vor, die die Detektion der sieben häufigsten *KRAS*-Mutationen in den Codons 12 und 13 und den WT in zwei Ansätzen quantifizieren kann (Taly *et al.*, 2013). Diese Methode ist hochsensitiv und kann ebenfalls Fraktionen bis zu 0,01% quantifizieren, allerdings mit einer Untergrenze von etwa 10 Kopien, aufgrund falsch positiver Ergebnisse in Höhe von 3-7 Kopien – je nach Mutation (Taly *et al.*, 2013). In vielen neueren Studien werden ddPCR-Anwendungen für die Analyse serieller Blutproben verwendet (Dawson *et al.*, 2013, Gray *et al.*, 2015, Olsson *et al.*, 2015, Pereira *et al.*, 2015, Sato *et al.*, 2016, Wang *et al.*, 2014).

#### 1.3.3.3.1.3 Sequenziermethoden

Durch die fortschreitende technologische Entwicklung ist die Sequenzierung nicht mehr so teuer wie noch vor wenigen Jahren und bietet mittlerweile eine bedingt erschwingliche Alternative bei der Analyse von cfDNA. Auch wenn die neuen Next-Generation Sequencing-Methoden immer noch teurer sind als andere Methoden und zumeist auch arbeits- und zeitaufwendiger, insbesondere in der Datenauswertung, sind sie durch zahlreiche Vorteile aber sehr attraktiv. Diese Vorteile sind erstens die gleichzeitige Analyse einer hohen Bandbreite an DNA-Sequenzen. Je nach Ansatz können mehrere einzelne Zielsequenzen in hoher Wiederholungszahl analysiert werden, das gesamte Genom im Whole Genome Sequencing (WGS), oder Zwischenschritte, wie zum Beispiel der gesamte proteincodierende Bereich im Whole Exome Sequencing (WES). Zweitens werden in der Sequenzierung die Basenabfolgen der sequenzierten Abschnitte vollständig offengelegt, so dass mögliche Veränderungen ohne deren vorherige Kenntnis entdeckt werden können. Mit anderen Methoden müsste jede mögliche Mutation und Veränderung separat gesucht werden.

Anwendung finden das WES und WGS mit einer meist zweistelligen Sequenzabdeckung vor allem in der initialen Detektion und Identifikation von tumorspezifischen Mutationen aus Tumorgewebe (*Dawson et al., 2013, Leary et al., 2010, Leary et al., 2012, Xia et al., 2015*). Alternativ wurden ausgewählte Sequenzen in den bekannten, häufig mutierenden Genen, in der Regel mit Driver Mutationen, sequenziert (*Forshew et al., 2012, Narayan et al., 2012, Newman et al., 2014, Sato et al., 2016*), was deutlich kostengünstiger ist, als WGS oder WES (*Newman et al., 2014*).

Durch hohe Sequenzabdeckung von mehreren tausend Reads, sogenanntes Deep-Sequencing, können geringste Fraktionen von ctDNA-Fragmenten bis zu 0,02% der cfDNA hochsensitiv im Plasma/Serum detektiert werden (*Forshew et al., 2012, Narayan et al., 2012, Newman et al., 2014*). Dies gelingt bei entsprechender Abdeckung auch genomweit (*Heitzer et al., 2013, Schutz et al., 2015*). Die hohe Sequenzabdeckung ist nötig, um die Wahrscheinlichkeit falsch positiver oder falsch negativer Ergebnisse zu verringern.

Ein Nachteil der Sequenziermethoden ist meistens ein höherer Bedarf und Anspruch an Einsatzprobenmaterial als bei einigen anderen Methoden (*Crowley et al., 2013*), welcher aber in den meisten Studien problemlos zu decken ist.

#### 1.3.3.3.1.4 Probenbehandlung

Die Ergebnisse der verschiedenen Methoden können immer nur so gut sein, wie ihr Ausgangsmaterial zulässt. Daher wurde in vielen Studien untersucht, wie Probenmaterial optimal zu präparieren ist, um die nachfolgenden Anwendungen optimal einsetzen zu können. Dies fängt an bei der richtigen Wahl des Probenmaterials: Serum weist höhere Konzentrationen an



cfDNA auf als Plasma (*Lee et al., 2001*), was entgegen ursprünglicher Vermutungen wahrscheinlich nicht auf zerstörte Zellen, sondern auf andere Mechanismen zurückzuführen ist (*Umetani et al., 2006b*), beinhaltet beim Vergleich von Proben gleicher Blutspender niedrigere Fraktionen an ctDNA (*Vallee et al., 2013*). Vermutlich, weil im Serum die körpereigene cfDNA höher ist. Daher scheint Plasma besser für die ctDNA-Detektion geeignet zu sein (*Vallee et al., 2013*).

Auch die Wahl und Durchführung der geeigneten DNA-Extraktionsmethode sind wichtig (*Bronkhorst et al., 2015*), ebenso wie ein oder mehrere zugegebene DNA-Standards, die Sicherheit in Bezug auf mögliche Verluste während der Extraktion liefern können (*Devonshire et al., 2014*). Zusätzlich muss darauf geachtet werden, wie, wo und wie lange die Blutproben und die Plasmaproben gelagert werden, um Degradierung des Probenmaterials zu vermeiden.

Ebenfalls kann bereits die Gewinnung des Plasmas aus der Blutprobe das Endergebnis verfälschen, da zum Beispiel zu hohe Zentrifugationsgeschwindigkeiten Blutzellen schädigen und so das Plasma mit genomischer DNA (gDNA) kontaminieren können (*Bronkhorst et al., 2015*, *Sherwood et al., 2016*).

### 1.3.3.3.2 Prognostische Studien zur ctDNA bei Tumoren

ctDNA wurde in Untersuchungen im Zusammenhang mit beinahe allen Tumorentitäten gefunden. Im Folgenden werden zunächst einige Studien der jüngeren Vergangenheit vorgestellt, die die prädiktive und prognostische Eignung von ctDNA bei Tumorpatienten mit anderen Tumorentitäten als Darmkrebs untersucht haben.

In einer methodisch wegweisenden Studie untersuchten Dawson *et al.* 52 Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs während der Therapie und verglichen den prognostischen Wert von radiologischer Bildgebung, ctDNA, zirkulierender Tumorzellen (CTCs) und CA 15-3 (Cancer-Antigen 15-3), einem Protein, das als klinischer prognostischer Marker bei Brustkrebs verwendet wird (*Dawson et al., 2013*). Um die ctDNA detektieren zu können, wurde DNA aus Tumor- und gesunden Gewebeproben sequenziert und verglichen, bei 9 Patientinnen die gesamte DNA und bei 25 nur die Sequenzen der Gene *PIK3CA* und *TP53*. Bei insgesamt 25 Patientinnen wurden Mutationen eines der beiden Gene detektiert, bei allen 9 Patientinnen, die mit WGS (Whole Genome Sequencing) untersucht worden waren, fanden sich weitere Mutationen oder tumorspezifische Sequenzvarianten. Auch andere Studien zeigen, dass mit umfassendem WGS bei nahezu 100% aller Patienten die genetischen Veränderungen der Tumoren detektiert werden können (*Leary et al., 2012*, *Newman et al., 2014*). Insgesamt stellten Dawson *et al.* bei 30 Patientinnen Mutationen in den Gewebeproben fest, von diesen wurde bei 29 ctDNA im Plasma detektiert (*Dawson et al., 2013*). Anschließend an die initiale Mutationsanalyse wurden 97 serielle Blutproben von 19 Patientinnen über den Therapieverlauf hinweg mittels mutationsspezifischer digitaler PCR und 44 Plasmaproben der restlichen 11 Patientinnen mittels Tagged-Amplicon Deep-Sequencing quantitativ analysiert, allerdings „nur“ mit

einer Sensitivität von 0,1% (ddPCR) bzw. 0,14% (Sequenzierung). Als Ergebnis konnte mittels der ctDNA-Konzentrationen eine klare prognostische Aussage in Bezug auf absolutes Überleben getroffen werden, mit den geringsten Überlebenschancen bei den Patientinnen mit sehr hohen ctDNA-Konzentrationen (>75%). Die prognostische Aussagekraft der ctDNA-Konzentrationen überstieg die von CTCs und CA 15-3 deutlich. Zusätzlich korrelierten steigende ctDNA-Konzentrationen in den meisten Fällen mit einer Verschlechterung des Zustands, also einem Fortschreiten der Krebserkrankung (*Dawson et al., 2013*).

In einer weiteren Studie wurde die prognostische Aussagekraft der ctDNA auch für primäre Brusttumoren bestätigt (*Olsson et al., 2015*). In einem retrospektiven Versuchsansatz wurde in seriellen Proben von 20 Patientinnen mit kurativer Tumoresektion durch Anstiege und Wieder-Anstiege der ctDNA eine Krankheitswiederkehr prognostiziert, und dies im Durchschnitt 11 Monate vor dem klinisch diagnostizierten Rückfall mit einer Genauigkeit von über 90% (*Olsson et al., 2015*). In einer Studie von *Pereira et al.* an Patientinnen mit verschiedenen gynäkologischen Tumoren wurden ebenfalls Rückfälle durch ctDNA-Quantifizierung frühzeitig erkannt (*Pereira et al., 2015*). Zusätzlich waren Konzentrationen unter der Detektionsgrenze in allen Fällen mit einer guten Prognose korreliert (*Pereira et al., 2015*).

Für Prostatumoren wurde ebenfalls ein prognostischer Wert der ctDNA bestätigt, mittels eines eigens erstellten Plasma Genomic Abnormality Scores (PGA-Score), der auf der Basis der relevantesten tumorspezifischen Kopienzahlvariationen berechnet wurde (*Xia et al., 2015*). *Xia et al.* beobachteten zudem, dass sich das Mutationsprofil im Laufe der, und eventuell bedingt durch die, Therapie der Prostatumoren (Androgendprivationstherapie oder Chemotherapie) individuell teilweise stark veränderte (*Xia et al., 2015*). Eine prognostische Aussage konnte auch für Patienten mit Lebertumoren (*Liao et al., 2016*), diffusem großzelligem B-Zell-Lymphom (*Roschewski et al., 2015*), Magentumoren (*Hamakawa et al., 2015*), Melanomen (*Gray et al., 2015, Sanmamed et al., 2015*) und Lungenkrebs (*Nygaard et al., 2013, Wang et al., 2014*) getroffen werden.

*Kinugasa et al.* und *Hadano et al.* wiesen in Patienten mit gemischten (*Kinugasa*) und mit resezierbarem (*Hadano*) Pankreaskrebs eine prognostische Aussage *KRAS*-mutierten ctDNA-Konzentrationen in Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben nach, welche mit digitaler PCR bestimmt wurden (*Hadano et al., 2016, Kinugasa et al., 2015*). Sie mussten allerdings die Detektion auf die drei häufigsten *KRAS*-Mutationen limitieren, da die Methode mehr Probenvolumen benötigte, als ihnen zur Verfügung stand. Somit konnte eine genaue Klassifizierung der „WT“-DNA nicht vorgenommen werden, so dass möglicherweise Patienten mit *KRAS*-mutierter ctDNA im Blut fälschlich als WT klassifiziert wurden (*Hadano et al., 2016, Kinugasa et al., 2015*). In solchen Fällen limitierter Probenvolumina ist die Auswahl einer Methode mit niedrigen Einsatzvolumina für eine optimale Genauigkeit der Ergebnisse notwendig.

Im Falle bekannter Zusammenhänge von Mutationen mit bestimmten Therapieformen, wie zum Beispiel bei *KRAS*-Mutationen und anti-EGFR-Therapie, hatte die ctDNA auch eine prädiktive Aussagekraft, die oft mit der prognostischen einherging (Nygaard *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2014).

#### 1.3.3.3 Prognostische Studien zur ctDNA bei kolorektalem Karzinom

Bereits 2002 demonstrierten Lecomte *et al.* in einer Studie mit KRK-Patienten mit gemischten Tumor-Einstufungen deutlich bessere 2-Jahres Prognosen von Patienten ohne detektierte Mutationen im Plasma als bei Patienten mit entweder *KRAS*-Mutationen oder hypermethylierten *p16*-Promotoren im Plasma und dies sowohl für Gesamtüberleben in allen Patienten, als auch für krankheitsfreies Überleben innerhalb der Patienten mit Tumoren der Stufen I bis III (Lecomte *et al.*, 2002). Diehl *et al.* konnten einen klaren prognostischen Wert des Vorkommens von ctDNA im Plasma von KRK-Patienten in Bezug auf das krankheitsfreie Überleben nachweisen (Diehl *et al.*, 2008). Die ctDNA wurde über Mutationen der Gene *APC*, *KRAS*, *TP53* und *PIK3CA* mittels der hochsensitiven BEAMing-Methode (Dressman *et al.*, 2003) detektiert und quantifiziert. Die prognostische Relevanz der ctDNA-Detektion war hier der Messung des Tumormarkers CEA (Carcinoembryonic Antigen) überlegen, keine Patienten ohne detektierbare ctDNA hatte einen Rückfall innerhalb der ersten 600 Tage nach Operation im Vergleich zu allen Patienten mit ctDNA im Plasma (Diehl *et al.*, 2008). Auch in weiteren Studien konnten sowohl in Patienten mit metastasiertem KRK (El Messaoudi *et al.*, 2016), als auch in KRK-Patienten mit früheren Tumorstufen (Tie *et al.*, 2016) prognostische Aussagen für allgemeines und krankheitsfreies Überleben getroffen werden. Für Patienten mit Stufe II KRK war die ctDNA-Analyse der klinischen Einschätzung in der prognostischen Einteilung in hoch- und niedrig-Risiko-Patienten deutlich überlegen (Tie *et al.*, 2016).

Einen weiteren Meilenstein erreichten mehrere Veröffentlichungen, die personalisierte Kombinationen an Tumor-Markern in Patienten mit KRK etablierten, um so ein Maximum an Sensitivität in der Detektion von ctDNA zu erreichen (Newman *et al.*, 2014, Reinert *et al.*, 2016, Tie *et al.*, 2015). Durch die Verwendung mehrerer bekannter häufiger Mutationen oder Strukturvarianten konnten Sensitivitäten in der ctDNA-Detektion bis über 90% der Patienten erreicht werden (Tie *et al.*, 2015) und Rückfälle beinahe jedes Mal vorausgesagt werden (Reinert *et al.*, 2016). Zudem zeigten Newman *et al.* in ihrer Studie, in der eine Sequenzieranwendung verwendet wurde, die eine breite Abdeckung möglicher Mutationen und Strukturvariationen bei einer Sensitivität von bis zu 0,02% ctDNA-Fraktion in der cfDNA im Plasma vorwies, dass die ctDNA-Konzentration bei Tumoren ab Stufe II signifikant mit der Tumormasse korrelierte (Newman *et al.*, 2014).

Diese Studien belegen auch für Darmkrebs eine beachtliche prognostische Aussagekraft der ctDNA, die in der hochsensitiven Detektion von Tumorresten und vorab unbemerkten Metastasen zu liegen scheint (Tie *et al.*, 2016), wie zum Beispiel die ctDNA auch bei der Detektion

von Resten von Brustkrebs im Ruhezustand effektiv sein kann (*Shaw et al., 2012, Uhr and Pantel, 2011*). Zudem ist die Heterogenität von soliden Tumoren ein Problem bei der Klassifizierung von Tumoren durch einzelne Biopsien, während die ctDNA die gesamte DNA-Vielfalt des Tumors und möglicher Metastasen widerspiegelt (*Gerlinger et al., 2012, Gray et al., 2015*). Möglicherweise noch wichtiger als die reine Prognostik, ist die Möglichkeit, über prädiktive Vorhersagen von Wirkzusammenhängen spezieller genetischer Muster mit Therapiekombinationen. Die ctDNA-Analyse vor Beginn eines Therapiezyklus sowie regelmäßige Folgeanalysen während der Therapie und in der Nachsorge können eine flexible Therapie und einen maximalen Nutzen für den Patienten ermöglichen.

#### 1.3.3.3.4 Machbarkeitsstudien zur ctDNA-Analyse

Nachdem die diagnostische, prädiktive und prognostische Aussagekraft der ctDNA in der Theorie belegt waren, wurden großangelegte Studien gestartet, um den klinischen Nutzen der ctDNA-Analyse anhand der bestehenden Richtlinien für Tumormarker (*Eisenhauer et al., 2009*) zu evaluieren (*Simon and Roychowdhury, 2013*).

In einer ersten prospektiven Studie an 106 Patienten mit metastasiertem KRK verglichen *Thierry et al.* die Ergebnisse der Plasmaanalyse auf *KRAS*- und *BRAF*-Mutationen mittels qPCR mit denen der entsprechenden Gewebeproben aus soliden Tumoren (*Thierry et al., 2014*). Die ctDNA-Detektion für *KRAS* erreichte eine Spezifität von 98% und eine Sensitivität von 92%, die für *BRAF* jeweils 100%. Diese Studie zeigt eine gute Effektivität der ctDNA-Detektion und eine Relevanz der ctDNA-Analyse für das Monitoring oder die Erkennung von tumoralem Restgewebe, kann jedoch aufgrund der Studienpersonen mit vermutlich überdurchschnittlich hohen ctDNA-Konzentrationen keine Aussage über die Früherkennung treffen.

Zusammengefasst kann die ctDNA-Analyse und -Überwachung auf lange Sicht eine genauere Prognose, eine verbesserte Früherkennung von Rückfällen und Fernmetastasierung, eine bessere Genotypisierung des Tumors und eine individuellere Therapie ermöglichen, muss jedoch in weiteren klinischen Studien bestätigt werden.

#### 1.3.3.4 Epigenetische Modifikationen der cfDNA als Tumormarker

Ein zusätzlicher Weg, Informationen zur Tumordetektion aus dem Blut zu gewinnen, ist die Analyse der cfDNA auf epigenetische Modifikationen. Epigenetische Modifikationen sind Veränderungen der DNA-Sekundär-Struktur, ohne dass hierdurch die Basenabfolge verändert wird. Beispiele hierfür sind die DNA-Methylierung, beinahe ausschließlich von Cytosin, und Histonmodifikationen. Sie haben Konsequenzen für die Zugänglichkeit der DNA für die Transkription und beeinflussen somit direkt die Genexpression, regulieren aber auch andere Prozesse. Epigenetische Modifikationen sind prinzipiell reversibel und werden zu großen Teilen vor der Geburt in der Zelldifferenzierung gebraucht (*Reik et al., 2001*), werden aber auch in der frühkindlichen Entwicklung (*Weaver et al., 2004*) oder im späteren Leben durch äußere

Einflüsse angelegt (*Fraga et al., 2005*). Auch Sport hat beispielsweise einen Einfluss auf die Epigenetik (*Ehlert et al., 2013*).

Veränderte epigenetische Profile in soliden Tumoren, insbesondere des Methylierungsprofils, wurden bereits früh beschrieben (*Feinberg and Vogelstein, 1983*). Tumorgene sind, je nach Genomregion, hyper- oder hypomethyliert (*Irizarry et al., 2009*) und unterschiedliche Krebsentitäten weisen jeweils spezielle epigenetische Profile auf (*Lao and Grady, 2011*). Epigenetische Modifikationen in Tumoren können sich, ähnlich wie Mutationen, auf die Therapieresonanz auswirken und erfordern daher ebenfalls eine Analyse im Zusammenspiel mit der Behandlung (*Ebert et al., 2012, Heyn and Esteller, 2012*).

Auch die ctDNA weist die epigenetischen Veränderungen der genomischen Tumor-DNA auf und kann daher als solche identifiziert werden, entweder über Methylierungsanalysen einzelner Gene (*Lofton-Day et al., 2008*) oder über genomweite Methylierungsprofile (*Liggett et al., 2010, Wen et al., 2015*). Der Nachweis von Fragmenten mit methylierten *SEPT9*-Sequenzen wurde bereits in größeren Studien getestet (*Church et al., 2014*) und ist für die klinische Diagnose von Darmkrebs zugelassen, auch wenn die Ergebnisse nicht frei von Beeinflussung durch Komorbiditäten sind (*Orntoft et al., 2015*). Ob dieser Nachweis der ctDNA über epigenetische Modifikationen den erhofften Erfolg in der klinischen Anwendung bringen kann, bleibt aufgrund der Abhängigkeit dieser Methode von der herkömmlichen Diagnostik, wie der Koloskopie, umstritten (*Parikh and Prasad, 2016*).

### 1.3.3.5 Weitere Methoden zur Tumordetektion

Eine Vielzahl weiterer Methoden zur Detektion und Analyse von Tumoren sind bekannt, wie zum Beispiel die Analyse von frei zirkulierender microRNA im Blut (*Huang et al., 2010, Mitchell et al., 2008*), die Quantifizierung zirkulierender Tumorzellen im Blut (*Alix-Panabieres et al., 2012, Cohen et al., 2008*), die Detektion und Quantifizierung von Tumor-DNA in Stuhlproben (*Iannone et al., 2016, Sidransky et al., 1992*), oder auch die Erkennung einer Tumorerkrankung durch Hunde (*Sonoda et al., 2011*). Auf diese Methoden wird hier mangels Relevanz für die in dieser Arbeit durchgeführten Studien nicht näher eingegangen.

## 1.4 Studie 1

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden für die vorliegende Arbeit zwei Studien durchgeführt, die erste Erkenntnisse im Bereich der ctDNA- und cfDNA-Dynamik in Tumorpatienten in außerordentlichen Belastungssituationen liefern sollten. Über die Dynamik von cfDNA und ctDNA über größere Zeitabschnitte hinweg ist viel bekannt, zum Beispiel vor und nach einer Chemotherapie, vor und nach einer Tumoresektion oder während mehrerer Monate der Nachsorge. Die Forschung an gesunden Individuen unter körperlicher Belastung hat jedoch gezeigt, dass unter Umständen innerhalb sehr kurzer Zeit starke Schwankungen innerhalb der cfDNA-

Konzentration auftreten können, deren Ursache und Herkunft bisher nicht ausreichend geklärt ist (*Helmig et al., 2015*). Über die Kurzzeitentwicklung von ctDNA ist in solchen geringen Zeiträumen nichts bekannt. Auch über die Wirkung von körperlichen Belastungssituationen auf die mögliche Freisetzung von ctDNA ist bisher nichts bekannt. Falls aktive Mechanismen die cfDNA-Freisetzung unter körperlicher Belastung regulieren, wird durch diese Regulierung auch der Tumor zu verstärkter DNA-Freisetzung stimuliert?

Zur Untersuchung dieser Frage wurde eine Studie entwickelt, in der Tumorpatienten einer individuell angepassten körperlichen Ausbelastung auf dem Fahrradergometer unter Standardbedingungen unterzogen wurden. Blutproben wurden vor und nach der Belastung sowie nach einer Erholungsphase entnommen, das Plasma wurde isoliert und cfDNA und, im Falle von *KRAS*-Mutationen, ctDNA quantifiziert. Die *KRAS*-mutierte ctDNA wurde mittels einer eigens entwickelten, hochsensitiven und hochspezifischen nested qPCR-Anwendung namens PNB-qPCR (Pooled-Nested-Blocker-qPCR) detektiert und quantifiziert, deren Besonderheit die gute Ausnutzung geringer Probenvolumina ist.

### 1.5 Studie 2

In einer zweiten Studie wurde die Entwicklung von cfDNA und insbesondere von ctDNA während Tumorresektionen untersucht. Hier ist die Entwicklung in größeren Zeitrahmen, über mehrere Tage oder Wochen hinweg, untersucht worden, aber nicht die detaillierten Zeitabschnitte während des chirurgischen Eingriffs. Die Hypothese betreffend der cfDNA war ein kontinuierlicher Anstieg während der Operation, die spezifische Entwicklung der ctDNA in diesem Zeitrahmen war unklar. Auch hier wären Freisetzungsmechanismen durch den Eingriff möglich, die auf cfDNA und ctDNA gleichermaßen wirken.

In beiden Studien wurde zusätzlich die DNase-1-Aktivitätsreduktion gemessen, um die Regulierung der cfDNA direkt in Zusammenhang mit der cfDNA-Entwicklung setzen zu können und, vor allem in der zweiten Studie, mögliche Einflüsse einer Medikamentierung besser einschätzen zu können.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Bioinformatik**

#### **2.1.1 Primerdesign**

Alle Primer wurden mit dem online frei verfügbaren Programm Primer 3 (Koressaar T, 2007, Untergasser A, 2012) erstellt. Alle qPCR-Primer wurden nach Möglichkeit so generiert, dass sie potentiell bei der gleichen Annealing-Temperatur verwendet werden konnten. Die Annahme hierfür orientierte sich an der vom Programm angegebenen Schmelztemperatur der Primer. Es wurden, soweit nachfolgend nicht anders angegeben, die Grundeinstellungen des Programmes gewählt. Die humane „mispriming library“ wurde gewählt, um Fehlbindungen an anderen Stellen des Genoms zu vermeiden. Da ausschließlich DNA-Primer generiert wurden, sind keine der Primer exonüberlappend. Alle Primer und Oligonukleotide (außer LNA-Sonden, siehe unten) wurden von der Firma eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

##### 2.1.1.1 Primer für die Erstellung des KRAS WT-Standards

Die Primer für die Amplifizierung des *KRAS*-Fragments zur Einklonierung in Vektoren sollten die Zielsequenz der Mutationshotspots weitläufig umfassen, um auch für Versuche mit nested-Verfahren und DNA-Integritäts-Untersuchungen mit verschiedenen Längenvarianten der Amplifikate verwendet werden zu können. Die Oligonukleotide, die Primer 3 als am besten geeignete Primer für den Bereich von 60 °C vorschlug, wurden verwendet. Es wurden keine Strukturanpassungen der Basenfolgen vorgenommen.

##### 2.1.1.2 Primer für die Site Directed Mutagenesis

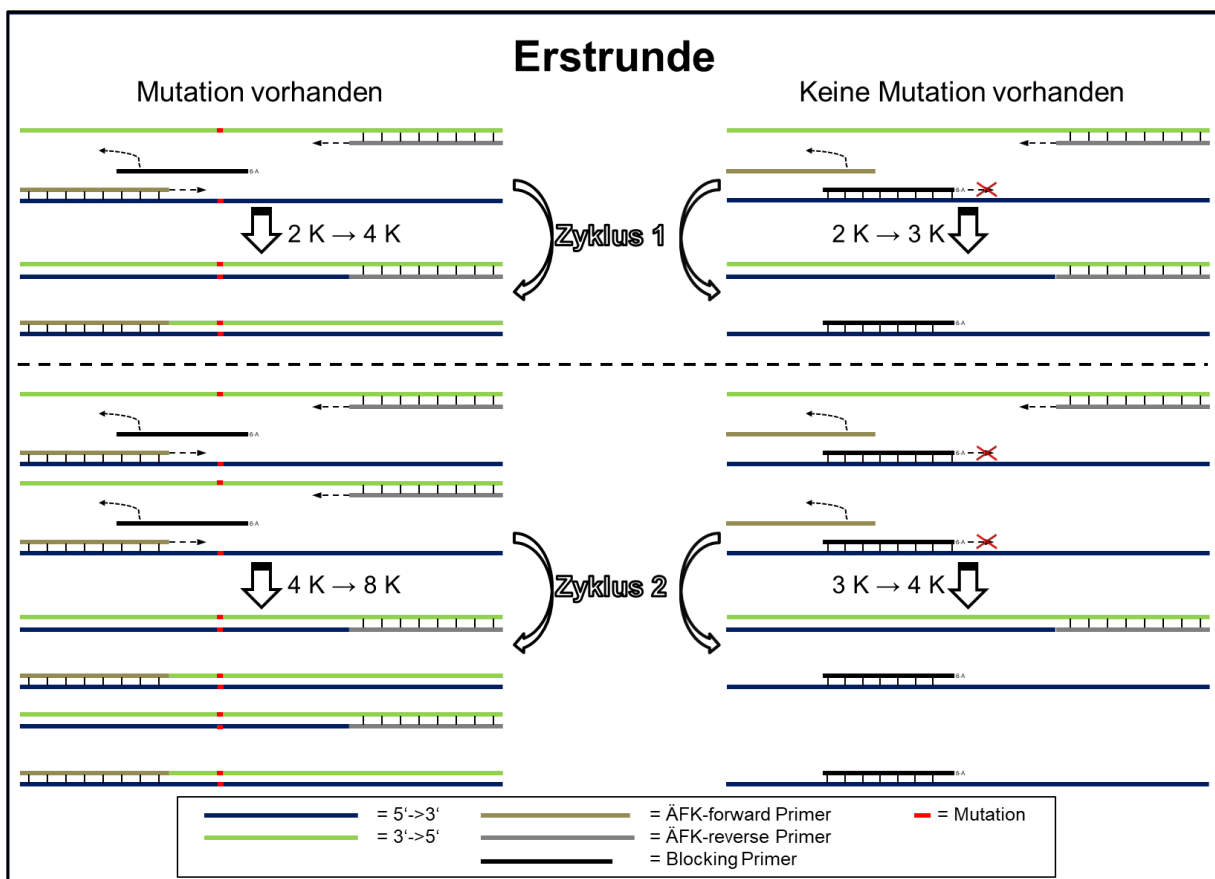
Die Primer für die Site Directed Mutagenesis (SdM) dienten dem Einbau von Mutationen in die Basenfolge der *KRAS*-Sequenz in den Plasmiden des WT-Standards. Das 5'-Ende des sense-Primers lag in der natürlichen Basenfolge direkt 3' des antisense-Primers, sodass in der PCR die gesamte *KRAS*-Standard-Sequenz und zusätzlich die gesamte Plasmidsequenz amplifiziert wurde. Alle SdM-Primer waren jeweils 5'-phosphoryliert, um eine anschließende Ligation der Enden zu ermöglichen. Es wurde ein antisense-Primer generiert und sechs sense-Primer, die jeweils eine der sieben häufigsten *KRAS*-Mutationen beinhalteten. Die G12V-Mutation, die in Codon 12 die Basenfolge GGT durch GTT ersetzt, war ausgeschlossen, da diese Sequenz aus der Zelllinie SW480 gewonnen werden sollte. Die Namen der Forward-Primer setzen sich zusammen aus dem Zweck („SdM“), der Codonnummer („12“ oder „13“), der Sequenz des mutierten Codons, und „for“ für „forward“, beispielsweise „SdM 12 AGT for“.

### 2.1.1.3 Primer für Sequenzierungen

Ein Primer wurde nur für Kontroll-Sequenzierungen von PCR-Produkten verwendet („AIP rev LF“). Dieser Primer codierte für den sense-Strang und lag 284 bp 3' von Codon 13 des zweiten Exons und war ursprünglich als möglicher Primer für Integritätsversuche gestaltet worden.

### 2.1.1.4 Primer für die Erstrunde der nested PCR

Als äußere Primer der nested PCR wurden möglichst lange Oligonukleotide generiert, welche teilweise mit den inneren Primern überlappen, jedoch außerhalb der Mutationshotspots liegen. Die Gesamtlänge des Amplikons mit Primerbindestellen beträgt 110 bp, die Sequenz zwischen den beiden äußeren Primern ist jedoch nur 41 bp lang. Sie weisen eine hohe Anlagerungstemperatur auf und decken eine hohe Bandbreite an möglichen Fragmentlängen des Templates ab. Die Primer sind betitelt „KRAS ÄP for“ und „KRAS ÄP rev KF“, wobei „ÄP“ für „äußerer Primer“ steht und „KF“ für „kurzes Fragment“.



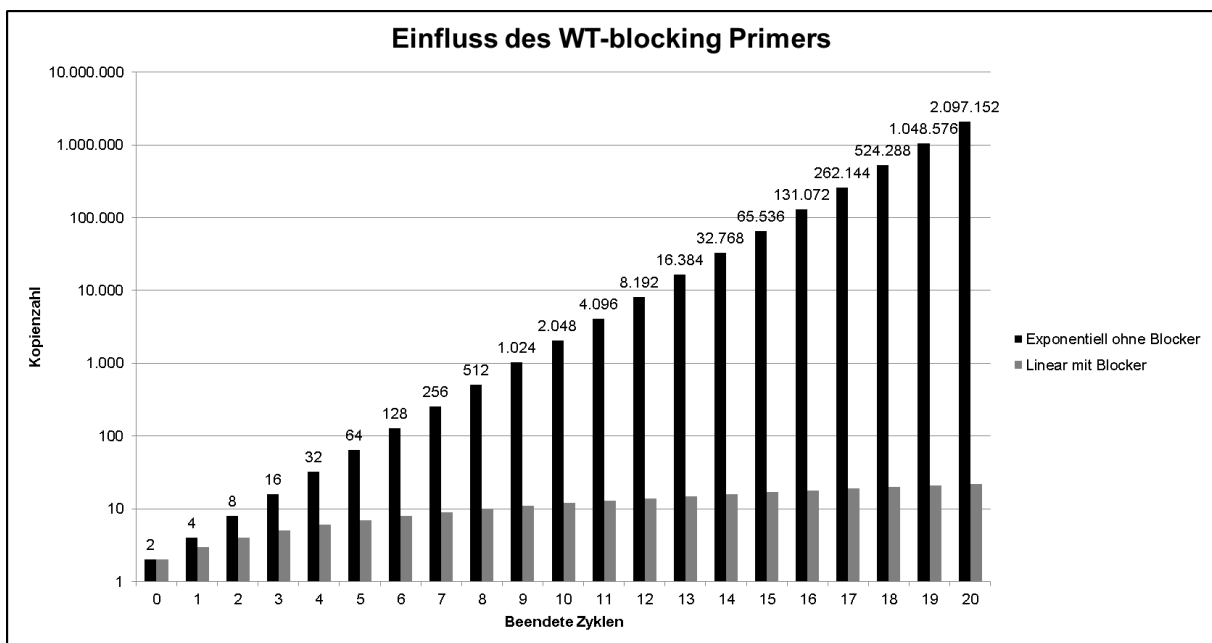
**Abbildung 1** Schema der Erstrunde der nested qPCR mit Blocking-Primer

Auf der linken Seite der Graphik ist eine Erstrunden-PCR mit mutierten DNA-Fragmenten als Vorlage zu sehen, auf der rechten eine PCR mit WT-Fragmenten. Im Falle einer vorhandenen Mutation bindet der Forward-Primer spezifisch an den Reverse-Strang und die Kopienzahl verdoppelt sich. Im Falle des Wildtyps bindet der Blocking-Primer spezifischer als der Forward-Primer und der Reverse-Strang wird nicht verdoppelt, nur der Forward-Strang. Da keine weiteren Reverse-Stränge gebildet werden, dienen auch immer nur dieselben Stränge als Vorlage für neue Forward-Stränge. Somit kommt keine effiziente Amplifikation zustande. K steht hier für die Kopienzahlen der Einzelstränge, Abbildung 2 stellt die Entwicklung der beiden PCRs in Zahlen gegenüber.



2.1.1.5 WT-Blocking-Primer für die Erstrunde der nested PCR

Der WT-Blocking-Primer, der in der Erstrunden-PCR der nested qPCR Anwendung fand, wurde nach einem Prinzip generiert, das von Lee *et al.* 2011 als „MEMO-PCR“ (Mutant Enrichment with 3'-Modified Oligonucleotides) beschrieben wurde (Lee *et al.*, 2011). Hierbei wird ein Oligonukleotid generiert, das sowohl mit dem Forward-Primer, als auch mit dem Mutationshotspot am 3'-Ende überlappt, jedoch die WT-Sequenz trägt. Die Anlagerungstemperatur muss so liegen, dass der Blocking-Primer im Falle des Wildtyps eine deutlich höhere Affinität zur Template-DNA aufweist als der konkurrierende Forward-Primer, im Falle einer Mutation am Hotspot jedoch eine deutlich niedrigere. Gleichzeitig muss er eine deutlich geringere Affinität zur Zielsequenz haben als der Forward-Primer, falls eine Mutation vorliegt. Da das 3'-Ende des Blocking-Primers mit einer Modifikation versehen ist, in diesem Fall mit einer C6-Amino-Gruppe, kann die Sequenz von der DNA-Polymerase nicht verlängert werden und es findet keine Amplifikation der Sequenz statt. Die Entwicklungen in der PCR sind für eine WT- und eine mutierte Vorlagensequenz schematisch in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 2** Darstellung des Effektes eines Blocking-Primers

In einer hypothetischen PCR mit einer Effizienz von 2 und einer Ausgangskonzentration von einer Kopie ist die Wirkweise des Blocking-Primers verdeutlicht. Jeden Zyklus verdoppelt sich in der PCR ohne Blocking-Primer die DNA-Konzentration – ein exponentielles Wachstum. In der PCR mit Blocking-Primer wird jeweils nur der Forward-Strang neu gebildet, so dass immer nur eine zusätzliche detektierbare Kopie dazu kommt, falls mit der Forward-Sonde gemessen wird (lineares Wachstum). Wird hingegen mit der Reverse-Sonde gemessen oder mittels interkalierendem Farbstoff, so stagniert die Konzentration vollends. Ein lineares Wachstum in der PCR bleibt unter der Detektionsgrenze.

#### 2.1.1.6 Primer für den Nachweis aller KRAS-Fragmente in der qPCR

Für die Amplifikation aller KRAS-Fragmente einer Probe in der qPCR bzw. nested-qPCR-Zweitrunde wurde ein sense-Primer generiert, der in seiner Anlagerungstemperatur möglichst den mutationsspezifischen Primern gleichen soll, um in den selben qPCR-Läufen einsetzbar zu sein. Somit lassen sich Verzerrungen durch ungleiche qPCR-Konditionen minimieren. Die Primersequenz endet kurz vor dem Mutationshotspot, so dass alle Fragmente amplifiziert werden, unabhängig von einer Mutation. Der Primer heißt KRAS-Std-Primer.

#### 2.1.1.7 ARMS-Primer zum mutationsspezifischen Nachweis von Tumor-DNA

Die Primer zum Nachweis mutierter DNA im Blut müssen hochspezifisch sein, da mutierte Fragmente nur in sehr kleinen Prozentsätzen vorkommen, teilweise im Bereich unter 0,1%. Diese Spezifität lässt sich mit dem Amplification Refractory Mutation System (ARMS) erreichen (Newton et al., 1989). ARMS Primer enden mit der mutierten Base, da die Wahrscheinlichkeit einer Anlagerung und Verlängerung des Primers mit einem Mismatch am 3'-Ende stark reduziert ist. Zusätzlich wird noch eine Mismatch-Base 2-4 Basen vor dem 3'-Ende eingebaut (Abbildung 3). Dies reduziert zwar die Affinität zur mutierten Sequenz ebenfalls, die zur WT-Sequenz aber noch überverhältnismäßig mehr.

Es wurden Primer erstellt für die Mutationen G12D, G12V, G12A, G12S, G12C, G12R und G13D in KRAS Exon 2. Alle erstellten ARMS Primer sind Forward-Primer. Die Primer wurden folgendermaßen betitelt: „AIP“ für „ARMS innerer Primer“, nach dem Codon und nach der mutierten Basensequenz des Triplets. Zum Beispiel ist „AIP 12 GAT“ der Primer für die G12D-Mutation in Codon 12, bei der GGT durch GAT ersetzt ist. Für 3 Mutationen wurden in einer zweiten Design-Runde alternative Forward-Primer erstellt, da die ersten Primer in Tests nicht effektiv oder nicht spezifisch genug waren („AIP 12 GTT for2“, „AIP AGT ALT2“ und „AIP TGT ALT3“). Um den Aufwand zu reduzieren wurde für alle Mutationen zusammen ein gemeinsamer Reverse-Primer generiert („AIP rev KF“). Für „AIP AGT ALT2“ und „AIP TGT ALT3“ wurde später ein neuer Reverse-Primer generiert, um für diese Primer eine bessere Effizienz zu gewährleisten („AIP AGT rev1“). Die Kombination der Forward- und Reverse-Primer wurde so gewählt, dass die Zielsequenzen so kurz wie möglich waren, ihre Längen reichten von 59 bis 69 bp inklusive der Primer.

#### 2.1.2 **Design von LNA-Sonden für die qPCR**

Da die Abstände zwischen den Forward- und den Reverse-Primern in der KRAS qPCR nur 14-18 bp betragen, wurden in die Sonden zur Detektion der amplifizierten Fragmente „Locked Nucleic Acids“ (LNAs) eingebaut. Diese modifizierten RNA-Nukleotide (Koshkin et al., 1998, Obika et al., 1997) weisen eine deutlich höhere Bindeaffinität auf als reguläre DNA- oder RNA-Nukleotide und können, im Gegensatz zu beispielsweise Peptide Nucleic Acids (PNAs)

(Egholm et al., 1993, Nielsen et al., 1991), mit DNA-Molekülen im Wechsel synthetisiert werden und werden somit auch von Nukleasen abgebaut. Somit ist es möglich, kurze Oligonukleotide mit hohen Anlagerungstemperaturen zum Nachweis von DNA-Sequenzen zu erstellen. Für die KRAS qPCR wurden 2 verschiedene LNA-Sonden generiert, welche auf den beiden unterschiedlichen DNA-Strängen liegen. Zur Generierung der Sonden wurde das frei verfügbare Online-Tool „LNA™ probe designer“ der Firma Exiqon verwendet (Exiqon). Die Sonden wurden nach dem Zielstrang benannt, „WT-forward“ für die Sonde, die an den sense-Strang bindet und „WT-reverse“ für den antisense-Strang. Die Benennung ist also abweichend von den Primern, die danach benannt wurden, welche Stränge aus ihnen gebildet werden. Beide Sonden sind 15 Nukleotide lang, davon je 5 LNA-Basen. Die „WT-reverse“-Sonde wurde speziell für die G12D-Mutation entwickelt, da die „WT-Forward“-Sonde mit der Sequenz des Primers sowie mit der Mutation über 3 Basen, inklusive einer LNA-Base, überlappt (was bei Tests zu starken Verzerrungen in den Amplifikationskurven führte (s. 3.1.2.3 + Abb. 27)). Alle LNA-Sonden wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

KRAS G12D-Mutation:	
5' ggcctgctgaaaatgactgaatataaaacttggtagttggagctg	Atggcgttaggcaagagtgcocttgacgataacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatga 3'
5' GGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGIGG 3'	AFK-Forward-Primer
Blocking-Primer	5' ATAACTTGGTGTAGTTGGAGCTGGTGGCG [3'-6Amin] 3'
G12D-AIP-Primer	5' AAACITGGGTAGTTGGAGCAGA 3'
WT-Reverse-Sonde	5' GCGTAGGCAAGAGTG 3'
WT-Forward	3' aCcgcaTCcgTTctc 5'
WT-Reverse-Primer	3' GGAACIGCTATGTCGATTAAGTCT 5'
AFK-Reverse-Primer	3' GTCGATTAAGTCTTAGTAAAAACACCTGCTTATACT 5'
3' ccggacgacttttactgacttatatttgaacacatcaacctcgaccaccgcatcogttctcaggaactgctatgtcgattaagtcttagtaaaacacctgcttatact 5'	
Legende: Sense-Strang: <u>Hotspot-Codons</u> ; ARMS-Primer: <u>Mismatch-Base</u> , <u>mutierte Base</u> ; LNA-Sonden: LNA-Basen	

**Abbildung 3** Primerkonstellationen G12D

Die Konstellation von Blocking-Primer, der äußeren Primer, der ARMS-Primer und der LNA-Sonden der KRAS nested qPCR im Falle der Mutation G12D.

### 2.1.3 Vermeidung des Pseudogens

Auf dem humanen Chromosom 6 (6p12-p11) befindet sich eine prozessierte Sequenz, die der KRAS-Sequenz auf Chromosom 12 sehr ähnelt und als Pseudogen bezeichnet wird (McGrath et al., 1983). Dieses Pseudogen ist wahrscheinlich in die miRNA-vermittelte Regulierung von KRAS eingebunden (Poliseno et al., 2010). Um zu verhindern, dass das Pseudogen durch die qPCR- oder nested Primer amplifiziert wird, mussten die Primersequenzen mit der Sequenz des Pseudogens abgeglichen werden.

```

Pseudogen:
5' gAcctgctgaaaatgactgaatataaaacttgCggtagttggagctggtggcgtaAgcaaAagtgTcttgaagatacagctaattcagaatcattttgtggacCaatatga 3'
KRAS WT:
5' ggccctgctgaaaatgactgaatataaaacttggttagttggagctggtggcgtaggcaagagtgcccttgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatga 3'
5' GGCCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGG 3'
Blocking-Primer 5' ATAAACTTGTGGTAGTGGAGCTGGTGGCG[3'-6Amin] 3'
WT-Std-Primer 5' GAATATAAACTTGTGGTAGTGGAGC 3'
WT-Reverse-Sonde 5' GCGTAGGCAAGAGTG 3'
WT-Forward-Sonde 3' aCcgcaTCogTTctc 5'
WT-Reverse-Primer 3' GGAAC TGTGCGATTAAAGTCT 5'
AFK-Reverse-Primer 3' GTCGATTAAAGTCTTAGTAAAACACCTGCTTACT 5'
3' ccggacgacttttactgacttatatttgaacacccatcaacctcgaccaccgcatccggttctcacggaactgctatgctgattaagtcttagtaaaaacacctgcttatact 5'

Legende: Pseudogen: FEHLPAARUNGEN ZUR KRAS-SEQUENZ; Sense-Strang: Hotspot-Codons; LNA-Sonden: LNA-Basen
    
```

**Abbildung 4** Primerkonstellationen WT

Die Konstellation von Blocking-Primer, äußeren Primern, den inneren Primern und den LNA-Sonden der KRAS-nested-qPCR im Falle des Wildtyps

Der äußere Forward-Primer weist an zwei Positionen Fehlpaarungen mit dem Pseudogen auf, an der zweiten Base des 5'-Endes und an der dritten Base des 3'-Endes. Hiermit liegt die Affinität deutlich unter der zur Zielsequenz. Zusätzlich stimmt die Sequenz des Blocking-Primers nur an einer Base nicht mit dem Pseudogen überein, diese liegt relativ zentral, 20 Basen vom 3'-Ende entfernt. Somit ist die Affinität des Blocking-Primers für das Pseudogen größer als die des Forward-Primers. Da der Blocking-Primer in deutlichem Überschuss vorhanden ist, kann er so zusätzlich zu der Amplifikation von WT- Sequenzen auch die potentielle Anlagerung und Amplifikation des Forward-Primers an das Pseudogen inhibieren.

Hinzu kommt, dass das Pseudogen an zwei von 15 Basen von den LNA-Sonden abweicht, eine davon eine hochaffine LNA-Base. Somit wird der Nachweis von KRAS selbst im Falle einer Amplifikation des Pseudogens nicht verzerrt, da die Sonden die Sequenz nur schwach binden.

### 2.1.4 Auswertung von Sequenzierungen

Alle DNA-Sequenzierungen wurden extern von der Firma StarSEQ (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Die Ergebnisdateien im Dateityp „.ab1“ wurden mit dem Sequence-Alignment-Programm BioEdit 7 (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA) überprüft und die Basenfolge wurde mit dem Programm ClustalW2 ((EMBL-EBI); Seite nicht mehr aktiv) mit der gewünschten DNA-Sequenz verglichen.

### 2.1.5 Berechnung der Quantifikationslimits (LOQ)

Die Anzahl von Kopien der Zielsequenz in der quantitativen PCR, bis zu der verlässliche Quantifikationsergebnisse möglich sind, wird „Limit of Quantification“ (LOQ) genannt. Dieses muss für jede qPCR-Anwendung separat ermittelt werden, da die Effektivität der Quantifizierung von den verschiedenen Primern, Sonden und Reagenzien stark beeinflusst wird.

Zur Ermittlung der LOQs wurden Verdünnungsreihen aus abnehmenden Konzentrationen von Fragmenten der jeweiligen Zielsequenz angesetzt, wie in Abschnitt [2.2.2.8](#) beschrieben, und

in Heptetts in die qPCR eingesetzt. Alle Ansätze mussten denselben qPCR-Lauf unter identischen Bedingungen durchlaufen und anschließend gemeinsam ausgewertet werden.

Alle qPCR-Reihen wurden mit Microsoft Excel ausgewertet. Die Ergebnisse der Messungen wurden hierfür in eine Tabelle übertragen, mit einer Spalte pro Verdünnungsschritt. Die Mittelwerte der C<sub>q</sub>-Werte der einzelnen Verdünnungsschritte wurden in ein Punktdiagramm übertragen, mit den pipettierten Konzentrationen der Standards auf der logarithmierten X-Achse und den C<sub>q</sub>-Werten auf der Y-Achse. Für die Mittelwerte der Verdünnungsschritte wurde eine logarithmische Trendlinie erstellt und die Formel dieser Trendlinie durch Excel berechnet. Anhand der Umkehrfunktion der Trendlinie wurden für die einzelnen gemessenen C<sub>q</sub>-Werte der Verdünnungsstufen die zugehörigen Konzentrationen berechnet. Die Absolutwerte der Abweichungen dieser berechneten Konzentrationen vom Sollwert der jeweiligen Verdünnungsstufe wurde gemittelt. Falls diese mittlere Abweichung mehr als 20% vom Sollwert der Verdünnungsstufe betrug, so wurden diese und alle folgenden Verdünnungsstufen aus der LOQ-Reihe ausgeschlossen. Eine solche Abweichung konnte durch eine Abweichung aller Werte in die gleiche Richtung vom Sollwert entstehen, oder aber durch eine hohe Standardabweichung. Das LOQ bildete somit die unterste Verdünnungsstufe der Reihe, die nicht um mehr als 20% vom Sollwert abwich.

Die Berechnungen wurden für die nested-qPCR genauso durchgeführt. Hier sind für die Verdünnungsreihen immer die in die Erstrunde eingesetzten Konzentrationen angegeben. Die Konzentrationen im Template der Zweitrunde können aus den Ergebnissen anhand der entsprechenden qPCR-Standardreihen berechnet werden.

## **2.2 Labormethoden**

### **2.2.1 Standardmethoden**

#### **2.2.1.1 Zellkultur mit Krebszelllinien SW480 und HT-29**

Die adhäsiven Zelllinien SW480 und HT-29 wurden bei CLS Cell Line Service (Eppelheim, Deutschland) bezogen. Beide wurden nach Angaben des Vertreibers in einer 1:1 Mischung von DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) und Ham's F12, versetzt mit 1/10 Volumen (Vol.) FBS Gold (Fötale Kälberserum) sowie je 1/20 Vol. L-Glutamin und Penicillin/ Streptomycin (alles PAA, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), in Zellkulturflaschen von 175 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) im Brutschrank (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Ein Teilen (Splitten) der Zellen erfolgte durch Abnahme des Mediums mit einer sterilen Glaspipette, Waschen mit 1x PBS (phosphate buffered saline; Life Technologies GmbH, Darmstadt), kurze Inkubation mit Trypsin (PAA, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), sowie 5 Min. Inkubation nach Abnahme des Trypsins im

Brutschrank zum Ablösen der Zellen von der Kulturflasche, gefolgt von der Aufnahme der Zellen in neuem Medium in neuen Kulturflaschen.

Je  $10^6$  Zellen der ersten Passagen wurden in je 1 ml einer Mischung aus 10% DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 10% FBS Gold und 80% DMEM/Ham's F12 (1:1) eingefroren. Das schonende Einfrieren erfolgte in zwei Schritten, erst bei  $-80\text{ °C}$  in einem mit Ethanol gefüllten Mr. Frosty™ Gefrierbehälter (Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland), dann in flüssigem Stickstoff.

Die Zahl der lebenden Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld-Superior, Lauda Königshofen, Deutschland) unter einem Lichtmikroskop (Hund, Wetzlar, Deutschland) in Trypanblau (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt.

### 2.2.1.2 Gelelektrophorese

Alle Gelelektrophoreseläufe wurden in einer horizontalen Gelkammer (Bio-Rad, München, Deutschland) durchgeführt. Es wurden Agarosekonzentrationen zwischen 0,5% und 2% von Agarose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in TAE-Puffer (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) verwendet und die vom Hersteller empfohlene Konzentration Ethidiumbromidlösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) als interkalierendem UV-Farbstoff verwendet. Die verwendeten Spannungen lagen zwischen 70 und 90 V, je nach Dichte des Gels und gewünschter Auflösung. Als Ladepuffer wurde ein Gel Loading Dye Blue (6x) verwendet (New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland), der Laufpuffer war TBE-Puffer (1x). Als Marker zur Analyse der Bandenlängen dienten je nach gesuchter Fragmentlänge der DNA die DNA-Leitern „puc19“ und „1 kB“ (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland).

Die Auswertung von Agarosegels erfolgte mit einem Gel Doc™ XR+-System und der zugehörigen Herstellersoftware (Bio-Rad, München, Deutschland). Agarosegele wurden zur rein qualitativen Auswertung der PCR genutzt.

### 2.2.1.3 Isolierung von DNA-Banden aus Agarosegels

Bei beabsichtigter Isolierung der DNA aus DNA-Gelen wurde zunächst bestätigt, ob DNA-Banden korrekter Länge auf dem Gel vorhanden waren. Bei positivem Ergebnis wurde das Agarose-Gel bei geöffneter Schublade des Gel Doc™ XR+-Systems dem UV-Licht ausgesetzt, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell vollständig ausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) überführt.

Für die DNA-Isolierung wurden zwei verschiedene Kits verwendet, entweder das „NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) oder das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem jeweiligen Herstellerprotokoll. Zwischen den Ergebnissen der beiden Kits ließen sich keine Unterschiede erkennen. Isolierte DNA wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei  $-20\text{ °C}$  zwischengelagert.

#### 2.2.1.4 NanoDrop 1000

Die Verwendung des Spektrophotometers NanoDrop 1000 (PeqLab, VWR, Erlangen, Deutschland) zur Quantifizierung von DNA in Lösung geschah immer nach den Herstellervorgaben. Zunächst wurde im Menu das Feld „Nucleic Acids“ gewählt und nachfolgend die Einstellung für DNA. Das Gerät wurde erst mit 2 µl H<sub>2</sub>O reinst initialisiert und danach mit dem Puffer, in dem auch die zu messenden Proben gelöst waren, auf den Hintergrund eingestellt („Blank“). Anschließend konnten die Proben in einem Volumen von 1,5 µl nacheinander gemessen werden. Zwischen allen Schritten wurden Arm und Sockel des NanoDrop 1000 mit einem fusselreien Reinigungstuch gesäubert (Kimberly-Clark, Koblenz, Deutschland), um nachfolgende Messungen nicht zu verfälschen. Aus der angegebenen Masse der DNA konnte mithilfe eines Kopienzahlrechners (*Thermo-Fisher-Scientific*) die in der Lösung enthaltene Kopienzahl errechnet werden, wenn die Zusammensetzung der DNA bekannt war (artifizielle Fragmente, genomische DNA, PCR-Produkt, Plasmide, etc.).

#### 2.2.1.5 NanoDrop 3300

Die Bedienung des NanoDrop 3300 unterscheidet sich von der des NanoDrop 1000. Da es sich um ein Fluorospektrometer handelt, müssen die Proben vor der Messung in festem Verhältnis mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen® (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) vermischt werden und inkubieren.

Im Vorfeld der ersten Messung wurde eine Standard-Verdünnungsreihe aus λ-Phagen-DNA erstellt (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Die Ausgangskonzentration war vom Hersteller angegeben und wurde mit dem NanoDrop 1000 bestätigt. Anhand der Standardreihe konnten den gemessenen RFU-Werten (Intensitäten) DNA-Konzentrationen zugeordnet werden. Diese Standardreihe musste für jede folgende Messung zunächst neu ins Bedienmenu geladen werden.

Für die Messung von Proben musste zunächst das Gerät mit dem in den Proben befindlichen Puffer kalibriert werden – eine sogenannte „blank“-Messung. Im Anschluss wurde die erste Probe 1:1 mit dem lichtgeschützt aufbewahrten PicoGreen-Farbstoff (direkt vorher auf 1x Konzentration in TE-Puffer verdünnte Stocklösung) vermischt und 4 Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Probe so schnell wie möglich fünfmal hintereinander auf dem NanoDrop 3300 gemessen. Um den Betriebsablauf zu beschleunigen, konnte die nachfolgende Probe gegen Ende der Inkubationszeit angesetzt werden und bereits während der Messung der vorherigen Probe inkubieren. Zwischen verschiedenen Proben erfolgte ein erneutes Kalibrieren (Blank) des Gerätes, um Verfälschungen im Messvorgang zu vermeiden.

## 2.2.2 Generierung von Standards

Für alle Etablierungen der einzelnen PCRs und qPCRs sowie zur Verwendung als Positivkontrollen mussten dauerhaft verfügbare, homogene, gleichbleibende Standards hergestellt werden. Als erster Standard wurde die humane *KRAS*-Sequenz, welche die Mutationshotspots umschließt, in Plasmidvektoren eingefügt und in chemisch kompetente *E. coli* Bakterien inkubiert. Geeignete homogene Bakteriensuspensionen wurden in einem Gemisch aus 70% Bakteriensuspension und 30% Glycerin in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 2.2.2.1 PCR zur Generierung der WT- und G12V-Standards aus gDNA

Als optimale Annealing-Temperatur für das Primerpaar, das die *KRAS*-Wildtyp-Zielsequenz amplifiziert („A-clo“-Primer), wurde per Gradienten-PCR und folgender Gelelektrophorese 56-60 °C ermittelt. Die Zielsequenz inklusive der Primer hat eine Länge von 895 Basenpaaren (bp). Nachfolgend wurde die *KRAS*-Zielsequenz per PCR vervielfältigt (Abb. 7a). Als DNA-Template für die Gewinnung des WT-Standards diente restriktionsverdaute hochmolekulare genomische DNA, die aus dem Vollblut eines Spenders in der Sportmedizin Mainz isoliert worden war (Methoden siehe [2.2.5.3](#) und [2.2.2.5.3](#)). Als DNA-Template für den G12V-Standard diente DNA, die aus Zellen der Tumorzelllinie SW480, die diese Mutation homozygot trägt, mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert worden war.

**Tabelle 1** Pipettierschema A-clo-PCR (50 µl Gesamtvolumen)

Reagenz	Volumen (ges. 50 µl)	Endkonzentration
5x HotStar HiFidelity PCR Puffer (incl. dNTPs)	10 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1 µl	0,5 mM
HotStar HiFidelity DNA Polymerase (2,5 U/µl)	1 µl	0,05 U/µl
H <sub>2</sub> O reinst	31 µl	
Primer-Mix (Forward-/ Reverse-Primer je 3,75 µM)	6 µl	450 nM
Template (gDNA, ≥ 50 ng/µl)	1 µl	variabel

Alle PCRs wurden auf einem Eppendorf Mastercycler ep Gradient S durchgeführt.

### Protokoll

	300 Sek.	95 °C	Aktivierung
35 Zyklen	60 Sek.	94 °C	Denaturierung
	60 Sek.	57 °C	Anlagerung (Annealing)
	60 Sek.	72 °C	Elongation
	600 Sek.	72 °C	finale Elongation
	∞	4 °C	Kühlung



Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels einer Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert. Passende Banden wurden ausgeschnitten und entweder bei -20 °C eingefroren oder die DNA sofort isoliert (s. 2.2.1.3).

### 2.2.2.2 Sequenzierung

Jede neue Vorlagensequenz für eine Klonierung wurde vor dem Einsatz per Sequenzierung auf die Vollständigkeit und Korrektheit der DNA-Sequenz überprüft, um fehlerhafte Sequenzen und somit Folgefehler in der Standardgenerierung ausschließen zu können. Alle Sequenzierungen wurden extern bei der Firma StarSEQ (Mainz, Deutschland) durchgeführt. Als Primer für die Sequenzierung dienten im Fall von Plasmiden vektorinterne Standardprimer (M13), für PCR-Produkte wurden eigene Primer innerhalb der Zielsequenz eingesetzt, entweder die A-clo-Primer oder der „AIP rev LF“-Primer, der 330 bp downstream des WT-Std. forward-Primers an den antisense-Strang bindet. Die Auswertung von Sequenzierungen ist unter Punkt 2.1.4 beschrieben.

### 2.2.2.3 Klonierung

DNA-Fragmente wurden in Plasmidvektoren eingefügt und dann in chemisch kompetente E. coli Bakterien inkloniert und mit diesen vervielfältigt. Dies geschah größtenteils mit dem „TA Cloning Kit“ der Firma Invitrogen (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) nach Herstellerangaben und ist im Folgenden kurz beschrieben.

#### 2.2.2.3.1 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Zur Ligation wurden etwa 10 ng doppelsträngige PCR-Fragmente mit 50 ng des pCR<sup>®</sup>2.1-Vektors unter Anwesenheit von 4 Weiss Units T4 DNA Ligase sowie des zugehörigen Puffers für mindestens 4 Std. bei maximal 14 °C in einem Thermocycler (MJ Mini Gradient Thermal Cycler, Bio-Rad, München, Deutschland) inkubiert. Für ein Gelingen der Ligation war es essentiell, dass die DNA-Fragmente durch die Polymerase in der PCR mit „Sticky Ends“, also einem zusätzlichen Adenin am 3'-Ende, versehen wurden, da die Vektoren an den 3'-Enden jeweils einen Thymin-Überhang aufweisen. Die Ligationsstelle des Vektors liegt in einem *lacZα*-Gen direkt zwischen zwei EcoRI-Schnittstellen. Zudem beinhaltet der Vektor Gene zur Antibiotikaresistenz sowie M13 Primerbindestellen zur Sequenzierung.

#### 2.2.2.3.2 Transformierung

Im Anschluss wurden die ligierten Vektoren in chemisch kompetente E. coli Bakterien inkloniert, welche im Vorfeld in der Sportmedizin Mainz hergestellt worden waren. Für die Einklonierung wurden 1-2 µl des Ligationsansatzes in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml Bakteriensuspension verteilt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock in einem Heizblock bei 42 °C mit einer Dauer von 30-120 Sek. und daraufhin ein erneutes Inkubieren von 5 Min. auf Eis. Nun wurden wahlweise 250 µl SOC-Medium (Kit, Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham,

MA, USA) oder LB-Medium ohne Ampicillin (selbst hergestellt, siehe Tabelle 17) zugegeben und das Reaktionsgefäß 1 Std. bei 37 °C und 225 U/min. inkubiert. 10-200 µl dieser Suspension wurden auf mit Agar (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), LB-Medium mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 100 µg/ml Ampicillin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) beschichteten Platten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert (Mini Incubator, Labnet International, Edison, NJ, USA).

Weißer Kolonien, die sich auf den Platten bildeten, hatten den Vektor mit eingefügtem DNA-Fragment integriert, blaue Kolonien den Leervektor mit aktivem lacZα-Gen und Bakterien ohne den Vektor waren aufgrund fehlender Antibiotikaresistenz nicht lebensfähig und bildeten keine Kolonien.

### 2.2.2.4 Aufreinigung von Plasmiden

Weißer Kolonien wurden in ca. 2-5 ml LB-Medium mit Ampicillin übertragen und über Nacht im Inkubationsschüttler (Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland) bei niedriger Rotation bei 37 °C inkubiert.

Zur qualitativen Überprüfung per PCR und Gelelektrophorese konnte eine schnelle Plasmid-isolierung durchgeführt werden, deren Produkte aufgrund mangelnder Reinheit jedoch nicht für eine Sequenzierung infrage kamen. Hierfür wurden 5 ml Bakterienkultur in einer Zentrifuge bei 6000 x g pelletiert und in 300 µl TENS-Puffer (Zusammensetzung siehe Materialliste) resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 Min. auf Eis inkubiert, mit 150 µl 3 M Natriumacetat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, erneut zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß auf 0,9 ml reines, bei -20 °C vorgekühltes Ethanol überführt. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde das entstandene Plasmidpellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, und mit 50 µl RNase-haltigem Wasser (10 µg/ml) resuspendiert. Zur Gewinnung einer reineren Plasmidfraktion wurde das „Qiagen Plasmid Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### 2.2.2.5 Schneiden von DNA mittels Restriktionsenzymen

#### 2.2.2.5.1 EcoR1

Die pCR<sup>®</sup>2.1-Plasmide wurden mittels EcoR1 linearisiert. 17 µl der Plasmidsuspension wurden mit 1 µl bzw. 20 Units EcoR1 und 2 µl des zugehörigen CutSmart- oder NEB4-Puffers (NEB, Frankfurt, Deutschland) für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Die Hitzeinaktivierung des Enzyms erfolgte im Anschluss für 20 Min. bei 65 °C.

#### 2.2.2.5.2 Methylierungsspezifische Restriktion mit Dpn1

Das Restriktionsenzym Dpn1 verdaut ausschließlich methylierte DNA. Somit konnte nach der Site Directed Mutagenesis ([2.2.2.6](#)) die nichtmethylierte Produkt-DNA von der methylierten Template-DNA aus den Bakterien „gereinigt“ werden, da letztere verdaut wurde. Es wurden

jeweils 26 µl PCR-Produkt mit 1 µl Dpn1 und 3 µl des zugehörigen CutSmart- oder NEB4-Puffers (NEB, Frankfurt, Deutschland) für 1 Std. bei 37 °C verdaut. Das Enzym wurde im Anschluss bei 80 °C für 20 Min. inaktiviert.

### 2.2.2.5.3 Gleichzeitige Restriktion genomischer DNA mit Bfa1 und Dde1

Um hochmolekulare DNA, die nach Abschnitt 2.2.5.3 isoliert worden war, für PCR-Versuche geeigneter zu machen, wurde diese mit einer Kombination von den zwei Restriktionsenzymen Bfa1 und Dde1 in kleinere Fragmente zerschnitten (siehe auch Abschnitt 2.2.2.7). Bfa1 schneidet 56-mal im *KRAS*-Gen, immer in der Sequenz „GANTC“ zwischen T und C; Dde1 schneidet 114-mal im *KRAS*-Gen in der Sequenz „GATC“ zwischen T und C. Beide Enzyme schneiden jedoch nicht in der *KRAS*-Sequenz, in der die Mutations-Hotspots liegen, und jeweils nur einmal am Ende der einklonierten *KRAS*-Sequenz. Somit wurden die verwendeten PCR-Methoden nicht beeinflusst. Der Verdau genomischer humaner DNA wurde mit je 5 µl Bfa1 und Dde1, 100 µl NEB4-Puffer (alles NEB, Frankfurt, Deutschland), 90 µl TE-Puffer (Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) und 800 µl gDNA in TE-Puffer (250 ng/µl) für mindestens 16 Std. bei 37 °C durchgeführt, mit abschließender Hitzeinaktivierung der Enzyme bei 80 °C für 20 Min. Die entstehende, geschnittene DNA wurde auf eine Konzentration von 200 ng/µl verdünnt und bei -20 °C eingefroren.

Die Kombination der Restriktionsenzyme wurde von ████████ übernommen.

### 2.2.2.6 Site Directed Mutagenesis

Für die Etablierung und Verwendung mutationsspezifischer qPCR-Methoden war es notwendig, konstant verfügbare, reine, homozygote Standards mit den entsprechenden Sequenzen der Mutationen zu generieren. Diese wurden mittels Site Directed Mutagenesis (SdM) erstellt. Dies ist eine Methode, eine oder mehrere beliebige Teile einer DNA-Sequenz durch gewünschte andere Sequenzabschnitte zu ersetzen und diese Wunschsequenz zu vervielfältigen. Hierfür wurde die Plasmidsequenz per PCR mit speziellen Primern, die eine gewünschte Mutation in die Sequenz einführen (siehe 2.1.1.2), vervielfältigt. Diese Methode wurde für die Punktmutationen G12D, G12A, G12S, G12C, G12R und G13D durchgeführt.

Die gesamte Plasmidsequenz wurde der Länge nach amplifiziert, als Template dienten die ungeschnittenen Plasmidstandards für die WT-Sequenz. Es wurde die Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase (NEB, Frankfurt, Deutschland) verwendet, die a) eine sehr geringe Fehlerhäufigkeit aufweist, und b) stumpfe 3'-Enden („blunt ends“) ohne Adenin-Überhang produziert. Letzteres war wichtig, da die Primer an der Zielsequenz beginnen und mit A-Überhang an dieser Stelle eine zusätzliche Base eingefügt worden wäre.

**Tabelle 2** Pipettierschema SdM-PCR (25 µl Gesamtvolumen)

Reagenz	Volumen (ges. 25 µl)	Endkonzentration
5x Phusion® HF Buffer (incl. 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,5 µl	0,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	200 µM
Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase (2 U/µl)	0,25 µl	0,02 U/µl
H <sub>2</sub> O reinst	(11,75 - vol. Template) µl	
Primer-Mix (Forward-/ Reverse-Primer je 1,8 µM)	7 µl	500 nM
Template (Plasmide)	5 ng	0,2 ng/µl

Alle PCRs wurden auf einem Eppendorf Mastercycler ep Gradient S durchgeführt.

### Protokoll

	30 Sek.	98 °C	Aktivierung
	10 Sek.	98 °C	Denaturierung
35 Zyklen	30 Sek.	70 °C	Anlagerung (Annealing)
	150 Sek.	72 °C	Elongation
	600 Sek.	72 °C	finale Elongation
	∞	4 °C	Kühlung

Die Anlagerungstemperatur ist bei dieser Polymerase höher als bei anderen Polymerasen und kann mit einem speziellen Programm auf der Internetseite des Herstellers berechnet werden (*NEB*). Die Eignung der verwendeten Anlagerungstemperatur war im Vorfeld mittels einer Gradienten-PCR bestätigt worden. Die gewählte Elongationsdauer war höher angesetzt, als vom Hersteller vorgeschlagen, um die vollständige Amplifikation sicherzustellen.

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss mit Dpn1 verdaut (siehe [2.2.2.5.2](#)) und mit einer T4 DNA Ligase (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) ligiert, wie in [2.2.2.3.1](#) für die WT-Plasmidvektoren beschrieben. Alle PCR-Ergebnisse wurden nach EcoR1-Restriktionsverdau per Gelelektrophorese und unverdaut per Sequenzierung überprüft.

### 2.2.2.7 Fragmentierung humaner DNA als Hintergrund für die qPCR

Als WT-Hintergrund für die Standardreihen mutierter DNA-Fragmente wurde entweder hochmolekulare, restriktionsverdaute genomische DNA (siehe [2.2.2.5.3](#) und [2.2.5.3](#)) oder ein Standard aus WT-Fragmenten, der mittels der „A-clo-PCR“ generiert worden war, eingesetzt. Die gDNA wurde bei den anfänglichen Versuchen zur Etablierung der qPCRs eingesetzt. Für den verwendeten gDNA-Standard wurde DNA mehrerer Spender nach der Isolierung gepoolt. Die

WT-Fragmente wurden für die späteren Etablierungen der nested qPCRs verwendet, da dieser Standard schneller zu gewinnen, homogener und besser verfügbar war. Die Ergebnisse waren vergleichbar (Abb. 28+29).

### 2.2.2.8 Ansetzen von Standardreihen für die Etablierung mutationsspezifischer Nachweismethoden

Fast alle Standardreihen für die Etablierung der qPCRs und der nested qPCRs waren gleich aufgebaut. Die Reihen starteten mit 12.800 Kopien des jeweiligen (mutationstragenden) Zielfragments und wurden in 1:2-Verdünnungsschritten mit TE-Puffer (Ambion®, Life Technologies, Darmstadt) angesetzt (Rechnung für die qPCR-Standardreihen jeweils in Kopien pro 3,2 µl, da dies das Einsatzvolumen in die qPCR war). Alle Standardreihen aus mutierten Fragmenten wurden mit einem konstanten Hintergrund von 30.000 Kopien des WT-Fragments oder mit 100 ng genomischer DNA, was etwa 29.000 Kopien des humanen Genoms entspricht, angesetzt. Da dieser Hintergrund zusätzlich noch die Standards vor Degradierung schützen sollte, wurde er direkt beim Ansetzen der Standardreihe zugegeben.

Bei allen Pipettierschritten wurde gleich verfahren. Zuerst wurde der TE-Puffer vorgelegt. Dann wurde das benötigte Volumen der vorherigen Konzentration des Standards zugegeben, das Reaktionsgefäß auf dem Vortexer gemischt, kurz abzentrifugiert und mindestens 30 Sek. stehen gelassen. Dann erst folgte der nächste Verdünnungsschritt. Es wurden parallel eine Standardreihe mit und eine ohne WT-DNA angesetzt. Diejenige mit WT-DNA diente für die Etablierungen oder Positivkontrollen als Template, aus den Proben ohne WT-DNA wurden die Proben mit WT-Hintergrund angesetzt.

Die Ausgangskonzentration des Basisstandards wurde mit dem NanoDrop 3300 genau bestimmt und in mehreren Schritten auf eine Konzentration von  $10^5$  Kopien (K)/3,2 µl verdünnt. Parallel wurde eine WT-Fragment-Konzentration ( $10^6$  K/3,2 µl) oder eine Konzentration von 200 ng/µl gDNA her- bzw. bereitgestellt. Von diesem Schritt aus wurden 25,6 µl des Zielfragments mit 174 µl TE-Puffer für eine Konzentration von 12.800 K/3,2 µl als Ausgangspunkt für die nächste Verdünnungsstufe vermischt. Zusätzlich wurden in einem separaten Reaktionsgefäß 12,8 µl mit 85 µl TE-Puffer und später 3 µl WT-Standard oder mit 37,2 µl TE-Puffer und später 50 µl gDNA-Standard für ein Gesamtvolumen von 100 µl vermischt. Aus jedem Verdünnungsschritt ohne WT-DNA mit einem Volumen von je 200 µl wurden 100 µl mit 100 µl TE-Puffer für die nächste Ausgangsverdünnung und 50 µl mit entweder 47 µl TE-Puffer und 3 µl WT-Fragmenten oder mit 50 µl gDNA für den jeweiligen Standard vermischt. Abhängig vom Templatevolumen in der nested qPCR (meist nur 1 µl) wurde die Konzentration der jeweiligen Stocklösungen angepasst.

## 2.2.3 Etablierung und Durchführung der PCR- und real-time PCR-Methoden

### 2.2.3.1 Ermittlung der optimalen Temperaturen für Primer und Sonden

#### 2.2.3.1.1 Vortests mit interkalierendem Farbstoff vor der Sondengenerierung

Die Ermittlung der optimalen Anlagerungstemperatur für die Primer wurde zunächst in Vorversuchen eingegrenzt, die zusätzlich einen Richtwert für die Anlagerungstemperatur der zu erstellenden Sonde liefern sollten. Es wurden für jedes mutationsspezifische ARMS-Primer-Paar qPCRs angesetzt, die einen Temperaturgradienten für die Anlagerungstemperatur im Protokoll vorsahen. Als Templates dienten Standards des Wildtyps sowie aller Mutationen in gleicher Konzentration. Somit konnte neben der Spezifität gegenüber dem WT auch die Spezifität gegenüber den anderen Mutationen getestet werden. Es wurde der SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet, der den interkalierenden Farbstoff EvaGreen® enthält, zu dem nur noch Primer und Templates zugegeben wurden.

**Tabelle 3** Pipettierschema SsoFast™ EvaGreen® Supermix - Vortests zur Etablierung der ARMS-Primer

Reagenz	Volumen/Well (ges. 10 µl)	Endkonzentration
SsoFast™ EvaGreen® Supermix (2x)	5 µl	1x
Primer-Mix (Forward-/ Reverse-Primer je 4 µM)	1 µl	400 nM
Template (20.000 K/µl)	4 µl	8.000 K/µl

Alle Ansätze wurden in Triplets angesetzt. Alle qPCRs wurden auf einem Bio-Rad CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System durchgeführt und mit dem Bio-Rad CFX-Manager, Version, 3.1 ausgewertet (Bio-Rad, München, Deutschland).

#### Protokoll

	120 Sek.	98 °C	Aktivierung
40 Zyklen	5 Sek.	98 °C	Denaturierung
	10 Sek.	Gradient	Anlagerung (Annealing)
	10 Sek.	72 °C	Elongation
	60 Sek.	95 °C	Denaturierung
	60 Sek.	60 °C	Anlagerung

Schmelzkurvenanalyse mit 0,5 °C Inkrement für je 5 Sek. von 65 °C bis 95 °C

Eine geeignete Anlagerungstemperatur sollte einen größtmöglichen Abstand zwischen den Cq-Werten („Cycle of Quantification“, dies ist der Zyklus, bei dem die amplifizierte Kurve den

vom Programm aus den Amplifikationsraten und den relativen Fluoreszenzwerten (RFU) berechneten Threshold übersteigt) der spezifischen Anlagerung der Primer an die Zieltemplates und denen der unspezifischen Amplifikationen der anderen Templates, insbesondere des Wildtyps, aufweisen. Gleichzeitig sollte der Cq-Wert der spezifischen Amplifikation nicht so hoch werden, um die Quantifizierung geringer Template-Konzentrationen zu ermöglichen. Außerdem sollten die gewählten Anlagerungstemperaturen der verschiedenen Primerpaare möglichst nah beieinander liegen, im Optimalfall identisch sein, um gemeinsame qPCR-Läufe zu ermöglichen.

Die Gradienten wurden so gewählt, dass der erste Gradient ein etwas größeres Temperaturspektrum abdeckte und in folgenden Läufen die Spanne um die günstigsten Ergebnisse herum eingegrenzt wurde. Primer, die keine gute Spezifität zeigten, wurden ersetzt.

#### 2.2.3.1.2 Etablierung der ARMS-Primer mit Sonde und WT-Hintergrund

Im zweiten Schritt wurden die ARMS-Primer in Kombination mit der Sonde auf Spezifität und Effizienz getestet, insbesondere in Anwesenheit von WT-DNA. Die Sonden „WT-forward“ und „WT-reverse“ wurden in Kombination mit Verdünnungsreihen getestet, um die Effizienz und Spezifität der Sonden zu bestätigen. WT-reverse wurde im Anschluss nur für die G13D-Mutation verwendet, da bei dieser Sonde die Überlappung mit dem Primer die PCR nicht beeinflusst, da sie an den anderen Strang bindet (siehe Abb. 3 und Abb. 27 bzw. [3.1.2.3](#)).

Für eine definitive Festlegung der Primer auf eine Verwendungstemperatur wurden Verdünnungsreihen mit den jeweiligen Fragmenten mit Mutation in den Konzentrationen  $10^5$ ,  $10^3$  und 40 Kopien/qPCR mit und ohne WT-Hintergrund erstellt, sowie  $10^5$  K WT-Fragmente und 200 ng gDNA pro qPCR (entspricht 58.000 K). Wiederum wurden Gradienten in der Anlagerungstemperatur eingesetzt, um die beste Temperatur zu ermitteln. Hierfür wurde der SsoFast™ Probes Supermix (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Das Protokoll wurde auf ein Zwei-Schritt-Protokoll umgestellt, der Anlagerungsschritt und der Elongationsschritt wurden also zusammengelegt.

Eine Temperatur wurde als praktikabel gewählt, wenn a) die Standardabweichungen der Pipettierschritte gering waren, insbesondere für 40 K + gDNA, b) die Ergebnisse der drei Verdünnungsschritte auf einer Geraden lagen, also die Effizienz der qPCR hoch war, und c) der falsch positive Cq-Wert für die reinen WT-DNA-Ansätze möglichst hoch war. Schlechte Ergebnisse für a) ließen auf eine schlechte Sensitivität des ARMS-Primers schließen, schlechte Ergebnisse für b) und c) auf eine schlechte Spezifität.

**Tabelle 4** Pipettierschema SsoFast™ Probes Supermix - Tests zur Etablierung der ARMS-Primer

Reagenz	Volumen/Well (ges. 8 µl)	Volumen/Triplett (+ 5% Überschuss)	Endkonzentration
SsoFast™ Probes Supermix (2x)	4 µl	12,60 µl	1x
Primer-Mix (Forward-/ Reverse-Primer je 5 µM)	0,64 µl	2,02 µl	400 nM
Sonde (10 µM)	0,16 µl	0,50 µl	200 nM
Template (Verdünnungsreihe 10 <sup>5</sup> -40 K)	3,2 µl	10,08 µl	variabel

Alle Ansätze wurden in Triplets angesetzt. Alle qPCRs wurden auf einem Bio-Rad CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System durchgeführt und mit dem Bio-Rad CFX-Manager, Version 3.1, ausgewertet (Bio-Rad, München, Deutschland).

#### Protokoll

	120 Sek.	95 °C	Aktivierung
	5 Sek.	95 °C	Denaturierung
50 Zyklen	30-40 Sek.	Gradient	Anlagerung (Annealing) und Elongation
	300 Sek.	72 °C	finale Elongation

Im Anschluss wurden weitere, detailliertere Gradienten für die Anlagerungstemperatur abgeschlossen. Es wurden die Verdünnungsschritte 12.800 K, 3.200 K, 400 K, 100 K und 12,5 K und 0 K /qPCR angesetzt, alle mit 100 ng gDNA im Hintergrund. Hierbei sollte ein möglichst linearer Kurvenverlauf bei gleichzeitig niedrigen falsch positiven WT-Cq-Werten erzielt werden, was eine effiziente LOQ-Reihe (Limit of Quantification) nahelegt.

Waren die Ergebnisse nicht aussichtsreich, so wurden alternative Primerpaare erstellt. Für alle Varianten wurden Temperaturen für spätere LOQ-Reihen gewählt.

#### 2.2.3.2 Die real-time qPCR zum Nachweis mutierter DNA – LOD und LOQ

Für die Erstellung von LOD- und LOQ-Reihen wurden vorab jedes Mal neue Standardreihen angesetzt (siehe 2.2.2.8), um die Gefahr der Degeneration der DNA in den Standards zu minimieren. Als Templates wurden die generierten Fragmente mit der jeweiligen KRAS-Mutation in Konzentrationen von 12.800 K in 1:2-Verdünnungsschritten bis zu 1,56 K, jeweils mit 100 ng gDNA, und eine Negativkontrolle mit nur 100 ng gDNA sowie eine Negativkontrolle mit Wasser eingesetzt. Alle Verdünnungsschritte wurden in Heptetts angesetzt und pipettiert, um eine statistisch ausreichende Absicherung für die Genauigkeit der Methode zu bekommen (Beiter et al., 2011).



**Tabelle 5** Pipettierschema SsoFast™ Probes Supermix – LOD / LOQ-Reihen der ARMS-Primer

Reagenz	Volumen/Well (ges. 8 µl)	Volumen/Heptett (+ 5% Überschuss)	Endkonzentration
SsoFast™ Probes Supermix (2x)	4 µl	29,40 µl	1x
Primer-Mix (Forward-/ Reverse-Primer je 5 µM)	0,64 µl	4,70 µl	400 nM
Sonde (10 µM)	0,16 µl	1,18 µl	200 nM
Template (Verdünnungsreihe 10 <sup>5</sup> -40 K)	3,2 µl	23,52 µl	variabel

Alle Ansätze wurden in Heptetts angesetzt. Alle qPCRs wurden auf einem Bio-Rad CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detektion System durchgeführt und mit dem Bio-Rad CFX-Manager, Version 3.1, ausgewertet (Bio-Rad, München, Deutschland).

#### Protokoll

	120 Sek.	95 °C	Aktivierung
	5 Sek.	95 °C	Denaturierung
50 Zyklen	30-40 Sek.	Variabel	Anlagerung (Annealing) und Elongation
	300 Sek.	72 °C	finale Elongation

Das LOQ definierte sich als die niedrigste DNA-Konzentration pro qPCR, bei der die Verdünnungsreihe mit einer Genauigkeit von >80% quantifiziert werden konnte, also die durchschnittliche Abweichung der gemessenen Werte vom, zuvor aus der Verdünnungsreihe errechneten, Sollwert unter 20% lag. Alle gemessenen Kavitäten bis zu dem jeweils potentiellen LOQ-Wert wurden miteinbezogen. Für eine Nichterfüllung der LOQ-Kriterien konnten sowohl eine hohe Standardabweichung der unterschiedlichen Messwerte einer Konzentration, als auch eine Gesamtabweichung der Messwerte oder aber eine zu hohe gDNA-Negativkontrolle verantwortlich sein. Während der letzte Punkt durch eine zu geringe Spezifität der Primer hervorgerufen wird, lassen die hohen Abweichungen auf ein Erreichen der Grenze der Bindeeigenschaften der Primer schließen, die Affinität der Primer ist somit wahrscheinlich zu gering. Das LOD definierte sich hier entweder als die Konzentration, die als letzte noch zu einer Wahrscheinlichkeit von  $\geq 80\%$  detektiert werden konnte, oder als letzte bestimmte Konzentration vor der falsch positiven gDNA-Negativkontrolle, die einen Abstand von einem Zyklus zwischen allen gemessenen Werten und allen gemessenen falsch positiven Werten aufwies.

Bei den qPCR-Durchläufen zur Messung von Proben wurde stets eine Positivkontrolle mit einer bekannten Konzentration des zu amplifizierenden Fragments mitamplifiziert, um den Threshold in der Auswertung an dieser auszurichten. Hierbei wurde der Threshold so gelegt,

dass bei der Auswertung für die Positivkontrolle der Cq-Wert erreicht wurde, der in der Auswertung mithilfe der zuvor erstellten LOQ-Reihe die enthaltene DNA-Konzentration ergab.

### 2.2.3.3 Die nested qPCR

Für die nested qPCR wurde eine Erstrunden-PCR mit den ÄFK-Primern (siehe [2.1.1.4](#)) und einem Blocking-Primer (siehe [2.1.1.5](#)) etabliert. Während die PCR-Primer die Hotspot-Region aus Exon 2 des *KRAS*-Gens unabhängig von möglichen Mutationen amplifizierten, war der Zweck des Blocking-Primers, den *KRAS*-WT mit höherer Affinität zu binden, als der reguläre PCR-Forward-Primer, mutierte Sequenzen hingegen mit geringerer Affinität als dieser. In der Folge wurden mutierte Fragmente bevorzugt amplifiziert und in der Erstrunden-PCR stark angereichert. Um diese Wirkung sicherzustellen, war der Blocking-Primer im Überschuss vorhanden. Im Etablierungsverlauf wurden mehrere mögliche Blocking-Primer entworfen und getestet, wobei wiederum Temperaturgradienten verwendet wurden, um die jeweils optimale Anlagerungstemperatur zu finden. Diese war essentiell, da die genaue Abstimmung der Temperatur auf die beiden Primer für die Effizienz der Anreicherung mutierter Fragmente und somit für die Qualität der Erstrunden-PCR ausschlaggebend war.

Nach einem anschließenden Verdünnungsschritt wurde das amplifizierte Erstrundenprodukt als Template in die oben beschriebene qPCR mit mutationsspezifischen ARMS-Primern eingesetzt. Die Zusammenstellung und Konzentrationen der Reagenzien und der Verdünnungslösung sowie die Zyklenzahl wurden im Hinblick auf maximale Anreicherung mutierter Fragmente eingestellt. Da die Anlagerungstemperatur in der Erstrunden-PCR sehr hoch angesetzt war und eine schnelle DNA-Polymerase verwendet wurde, konnte zusätzlich Zeit gespart werden, indem in den Zyklen auf den Elongationsschritt verzichtet wurde.

**Tabelle 6** Pipettierschema ÄFK-Erstrunden-PCR (final, 25 µl Gesamtvolumen)

Reagenz	Volumen (ges. 25 µl)	Endkonzentration
5x Phusion® HF Buffer (incl. 7,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,5 µl	0,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,5 µl	200 µM
Blocking-Primer (10 µM)	2,5 µl	1 µM
Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase (2 U/µl 1:20 verdünnt)	0,5 µl	0,002 U/µl
H <sub>2</sub> O reinst	(14 - vol. Template) µl	
ÄFK-Primer-Mix (Forward-/ Reverse-Primer je 5 µM)	2 µl	400 nM
Template (Plasmide)	1-14 µl	variabel

Alle PCRs wurden auf einem Eppendorf Mastercycler ep Gradient S durchgeführt.

Protokoll

	30 Sek.	98 °C	Aktivierung
	10 Sek.	98 °C	Denaturierung
20-25 Zyklen	30 Sek.	Gradient	Anlagerung (Annealing) und Elongation
	600 Sek.	72 °C	finale Elongation
	∞	4 °C	Kühlung

Anschließend wurde das PCR-Produkt verdünnt und in die (fertig etablierte) qPCR eingesetzt (siehe [2.2.3.2](#)).

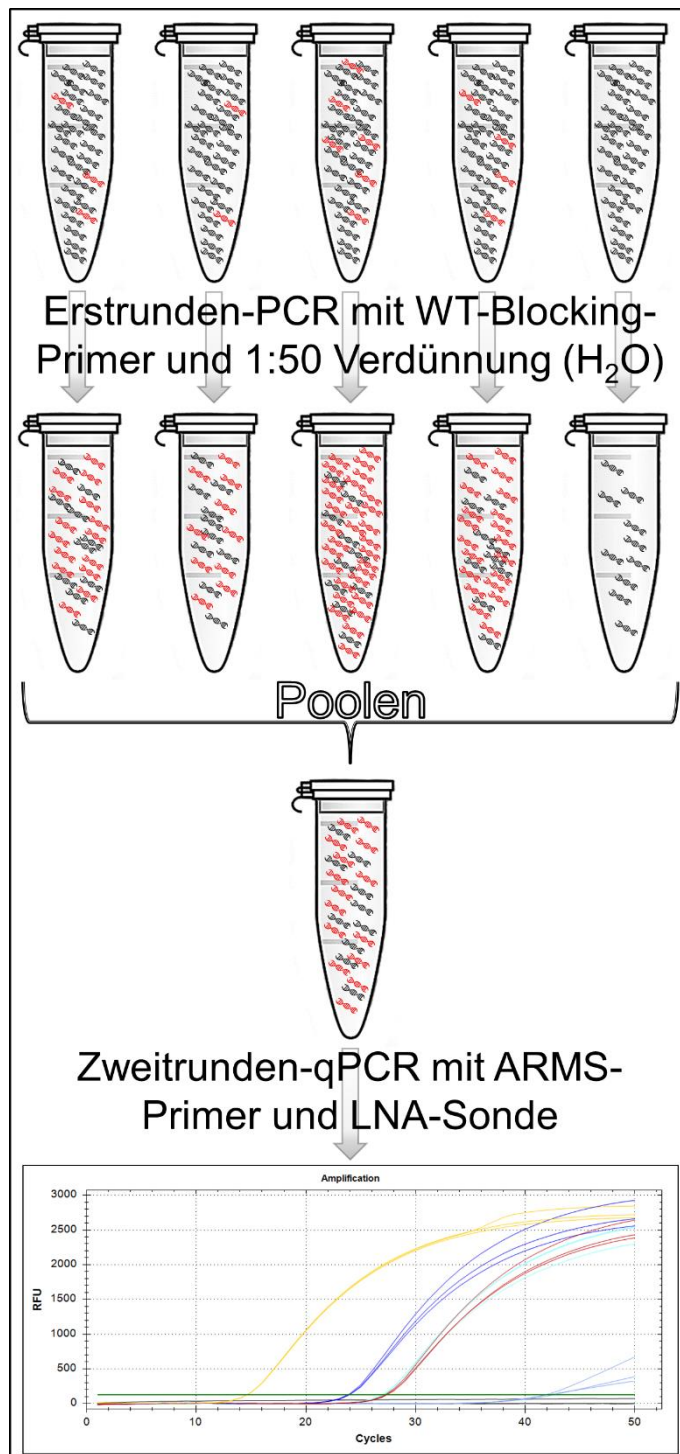
Die final etablierte Zyklenzahl betrug 20, die finale Anlagerungstemperatur 69 °C und die Produkte wurden 1:50 (2 µl + 98 µl) in sterilem H<sub>2</sub>O reinst verdünnt.

Es wurden LOQ-Reihen für alle Mutationen nach folgendem Schema durchgeführt. Zuerst wurden Standardreihen angesetzt, wie für die qPCR-Etablierung beschrieben (siehe [2.2.2.8](#)). Diese wurden über Nacht eingefroren und am nächsten Tag schonend auf Eis aufgetaut. Ein Mastermix mit dem Reaktionsgemisch wurde für alle Proben angesetzt, auf 0,6 ml Reaktionsgefäße verteilt, das Template hinzugefügt und beides gründlich gemischt. Jeder Ansatz wurde auf drei Einzelansätze à 25 µl aufgeteilt, die in die Erstrunden-PCR eingesetzt wurden. Jedes PCR-Produkt wurde separat verdünnt und in Triplets in die mutationsspezifische qPCR übertragen. Somit ergaben sich pro Verdünnungsstufe neun qPCR-Ergebnisse, die als ein Ansatz ausgewertet wurden. Die LOQ-Kriterien waren identisch mit den in Abschnitt [2.2.3.2](#) beschriebenen. Als Template-Konzentrationen für die Auswertung dienten die ursprünglich in die Erstrunde eingesetzten Konzentrationen der mutierten Fragmente.

Eine Standardreihe mit gDNA bzw. WT-Fragmenten mittels der nested qPCR mit Blocking-Primer wurde versucht zu etablieren. Obwohl sich eine Standardgerade bis herunter zur Konzentration von 25 K innerhalb der LOQ-Kriterien durchführen ließ, wurde im Folgenden auf die Messung der gesamt-KRAS-DNA mittels nested qPCR mit Blocking-Primer in der Anwendung verzichtet. Die Gründe hierfür waren erstens eine mögliche Ungenauigkeit durch die massive Inhibierung der WT-Amplifikation, zweitens eine geringere Sensitivität gegenüber der bereits etablierten regulären qPCR, und drittens eine extreme Verfälschung der Ergebnisse in den Fällen, in denen mutierte Fragmente im Template enthalten waren. Aufgrund letztgenannter Verfälschung ließ sich diese Methode nicht zur allgemeinen Bestimmung der gesamt-KRAS-DNA verwenden.

### 2.2.3.4 Die nested qPCR mit gepoolten Erstrundenprodukten – PNB-qPCR

Diese Erweiterung der beschriebenen nested qPCR ist methodisch mit dieser identisch, weist jedoch einen Unterschied in der Anzahl und Behandlung der PCR-Produkte auf, wie schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Ein großer Ansatz für die PCR-Erstrunde wurde auf mehrere einzelne Ansätze à 25 µl unterteilt, welche alle die Erstrunde im selben Lauf durchliefen. In Vorversuchen wurden fünf parallele Ansätze als optimal ermittelt (siehe 3.1.4). Gleiche Teile der fünf amplifizierten Produkte aus dem gleichen Template wurden nach Ende der PCR vermischt (gepoolt) und anschließend 1:50 in H<sub>2</sub>O verdünnt.



**Abbildung 5** Schema der PNB-qPCR

Die PNB-qPCR ist hier in einem vereinfachten Schema dargestellt. In den fünf Reaktionsgefäßen in der ersten Reihe befinden sich fünf Aliquotierungen des zu untersuchenden Templates. Die roten DNA-Stränge repräsentieren Fragmente mit Mutationen des *KRAS*-Gens, also ctDNA, die schwarzen DNA-Stränge repräsentieren die WT-Fragmente. Die prozentualen Anteile der ctDNA in den fünf Gefäßen sind unterschiedlich hoch (hier übertrieben dargestellt). In der Erstrunden-PCR wird durch die Verwendung eines WT-Blockers die Amplifikation der WT-Fragmente gehemmt, wohingegen die Fragmente mit Mutation ungehemmt vervielfältigt werden. Nach der qPCR sind folglich die ctDNA-Fragmente angereichert und liegen in sehr viel höheren, aber auch jetzt noch sehr unterschiedlicheren Konzentrationen vor. Durch das Poolen der PCR-Produkte wird die Varianz beseitigt. Der Schritt der Verdünnung der PCR-Produkte kann vor oder nach dem Poolen der Produkte durchgeführt werden. In die Zweitunden-qPCR wird so anschließend ein Template eingesetzt, das dem Mittelwert der fünf PCR-Produkte entspricht. Durch die Verwendung von mutationsspezifischen ARMS-Primern werden die Fragmente, die die Mutation tragen, in der Amplifikation der qPCR wiederum stark begünstigt, wodurch Templates mit Mutationen von reinen WT-Templates klar abgegrenzt werden können, welche so gut wie gar nicht amplifiziert werden. Durch die vorherige Verwendung von Standardreihen und eine Positivkontrolle in der PNB-qPCR kann die rechnerische Mittlere Konzentration der fünf Templates der Erstrunde ermittelt werden.

Diese Anpassung der nested qPCR sollte zu einer Minimierung der Abweichungen durch die erste Runde führen und so die Quantifizierbarkeit niedrig konzentrierter Templates deutlich verbessern, sowie zu einer hohen Variabilität im eingesetzten Volumen des Templates (5 x 1-14 µl = 5-66 µl). Auch in der nested und in der gepoolten nested qPCR wurden Positivkontrollen verwendet, wie für die qPCR beschrieben. Bei großen Ansätzen mussten aufgrund der beschränkten Kapazität des PCR-Cyclers zwei Erstrunden-Durchgänge durchlaufen werden, jeweils mit einer separaten Positivkontrolle zur Anpassung der zwei Durchgänge aneinander.

### 2.2.3.5 Weitere Anwendungen der quantitativen real-time PCR

#### 2.2.3.5.1 LTR5-qPCR

Diese PCR wurde fertig etabliert von Frau Dr. Susanne Helmig übernommen (*Helmig et al., 2015*). Die PCR-Primer amplifizieren einen 70 bp langen Abschnitt des repetitiven *LTR5*-Retrotransposons, der 195-mal im haploiden humanen Genom vorkommt, wodurch auch geringe Konzentrationen an DNA in der qPCR zuverlässig quantifiziert werden können. Für die *LTR5*-qPCR wurde ein hausgemachter Mastermix verwendet, basierend auf dem interkalierenden DNA-Farbstoff SYBR-Green (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und der HotStarTaq *Plus* DNA Polymerase (Qiagen, München, Deutschland). Pro Kavität wurden 1,6 µl isolierten DNA-Templates eingesetzt. Die Reagenzien wurden zu einem Mastermix vermischt, wie in Tabelle 7 angegeben, und dann mit Primern und Template für die Triplets zusammenpipettiert.

**Tabelle 7** *LTR5*-qPCR zur Quantifizierung von gesamt-cfDNA aus Plasmaisolaten

Reagenz	Volumen (5 µl/Well)	Endkonzentration
PCR-Puffer (10x)	0,5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,1 µl	0,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,1 µl	200 µM
HotStarTaq <i>Plus</i> DNA Polymerase (5 U/µl)	0,025 µl	0,025 U/µl
SYBR-Green (10x)	0,07 µl	0,14x
FITC (1 µM)	0,0125 µl	2,5 nM
H <sub>2</sub> O	1,73 µl	
LTR5-Primer-Mix (Forward-/ Reverse-Primer je 1,875 µM)	0,82 µl	320 nM
Template	1,64 µl	variabel

Alle Ansätze wurden in Triplets angesetzt. Alle qPCRs wurden auf einem Bio-Rad CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System durchgeführt und mit dem Bio-Rad CFX-Manager, Version 3.1, ausgewertet (Bio-Rad, München, Deutschland).

Protokoll

	300 Sek.	95 °C	Aktivierung
40 Zyklen	15 Sek.	94 °C	Denaturierung
	30 Sek.	61 °C	Anlagerung
	30 Sek.	80 °C	Elongation
	60 Sek.	94 °C	Denaturierung
	60 Sek.	80 °C	Elongation

Schmelzkurvenanalyse mit 0,5 °C Inkrement für je 10 Sek. von 72 °C bis 95 °C

2.2.3.5.2 L1PA2-qPCR in Plasma

Die Methode dieser qPCR wurde fertig etabliert von Frau Dr. Sarah Breitbach übernommen (*Breitbach et al., 2014b*). Die qPCR-Primer amplifizieren einen 90 bp langen Abschnitt des repetitiven L1PA2-Retrotransposons, der 3345-mal im haploiden humanen Genom vorkommt. Zusätzlich konnte mit einem alternativen Reverse-Primer ein 222 bp langes Fragment amplifiziert werden, das 3134-mal im humanen Genom vertreten ist. Dies dient der Bestimmung der Längenfragmentierung der cfDNA, wodurch unter anderem auf die Herkunft und den Freisetzungsprozess der cfDNA geschlossen werden kann. Durch die hohe Anzahl an Wiederholungen im Genom werden nur minimale Mengen an DNA benötigt, um sicher quantifizieren zu können.

**Tabelle 8** L1PA2 qPCR zur Quantifizierung von gesamt-cfDNA

Reagenz	Volumen (5 µl/Well)	Endkonzentration
TEGO-Puffer (2x)	2,5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,1 µl	0,5 mM
Velocity Polymerase (2 U/µl)	0,1 µl	0,04 U/µl
SYBR-Green (10x)	0,07 µl	0,14x
FITC (1 µM)	0,005 µl	1 nM
H <sub>2</sub> O	1,13 µl	
L1PA2-Primer-Mix (Forward-/ Reverse-Primer je 3,75 µM)	0,4 µl	300 nM
Template	0,7 µl	variabel

Alle Ansätze wurden in Triplets angesetzt. Alle qPCRs wurden auf einem Bio-Rad CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System durchgeführt und mit dem Bio-Rad CFX-Manager, Version 3.1, ausgewertet (Bio-Rad, München, Deutschland).

### Protokoll

	120 Sek.	98 °C	Aktivierung
	10 Sek.	94 °C	Denaturierung
35 Zyklen	40 Sek.	64 °C	Anlagerung
	10 Sek.	75 °C	Elongation

Schmelzkurvenanalyse mit 0,5 °C Inkrement für je 10 Sek. von 70 °C bis 95 °C

Die Besonderheit dieser qPCR-Anwendung ist, dass nicht isolierte DNA, sondern verdünntes Plasma als Template verwendet wird. Hierdurch wird ein Verlust von DNA bei der Aufreinigung verhindert. Das Plasma wurde vor der Verwendung in der qPCR 1:40 in H<sub>2</sub>O verdünnt (je 2 µl Plasma + 78 µl H<sub>2</sub>O).

## **2.2.4 Bearbeitung von Blut**

### 2.2.4.1 Gewinnung von Blutplasma

Blutplasma wurde durch zweifache Zentrifugation aus Vollblut gewonnen. Zunächst wurde venöses oder arterielles Vollblut in mit EDTA versetzten Abnahmeröhrchen (S-Monovette® 2,7 oder 7.5 ml K3E, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen und entweder direkt zentrifugiert oder kühl gelagert und spätestens eine Stunde nach Entnahme zentrifugiert. Der erste Zentrifugationsschritt lief für 10 Min. bei 1.600 x g bei 4 °C. Anschließend wurde der klare, zellfreie Überstand abgenommen und in ein neues Reagenzgefäß überführt. Der zweite Zentrifugationsschritt lief für 5 Min. bei 16.000 x g, ebenfalls bei 4 °C. Dieser Schritt diente der Entfernung von Zellrückständen wie Zellkernen und Mitochondrien aus dem Plasma. Der Überstand wurde wiederum abgenommen und in einem neuen Reaktionsgefäß entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C oder bei -80 °C zur späteren Verwendung eingelagert.

## **2.2.5 DNA-Aufreinigung**

### 2.2.5.1 Isolierung von DNA aus Gewebeschnitten

Im Rahmen der intraoperativen Tumorstudie (Abschnitt 2.4) wurde den Patienten der Studie entnommenes, pathologisches Gewebe vom Institut für Pathologie der Universitätsmedizin Mainz bereitgestellt. In Formalin fixierte, in Paraffin eingebettete (Formalin Fixed Paraffin Embedded, FFPE) Gewebeschnitte wurden am Institut für Pathologie angefertigt und die Struktur von einem Pathologen validiert.

Die FFPE-Schnitte wurden mit Roti®-Histol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) deparaffiniert und die zelluläre genomische DNA mit dem QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden,

Deutschland) isoliert. Für die Deparaffinierung wurde mit einem in Roti<sup>®</sup>-Histol angefeuchteten Skalpell der Zielbereich des FFPE-Schnitts vom Objektträger gekratzt und in ein Reaktionsgefäß mit 1,5 ml Roti<sup>®</sup>-Histol überführt, auf dem Vortexer gemischt und für 2 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA des Pellets wurde nach den Herstellerangaben des QIAamp DNA FFPE Tissue Kits aufgereinigt.

Die Konzentration der eluierten DNA wurde mit dem NanoDrop 1000 bestimmt und anschließend in einem (wenn < 30 ng/µl) oder zwei (wenn ≥ 30 ng/µl) Schritten in H<sub>2</sub>O auf 1 ng/µl verdünnt. Die Verdünnung hatte sich als notwendig erwiesen, da höhere Konzentrationen in Vorversuchen zu Inhibierungen geführt hatten, insbesondere in der Erstrunde der nested qPCR, und somit Verzerrungen in den qPCR-Messungen (siehe [3.1.6.1](#) und Abb. 69).

### 2.2.5.2 Isolierung frei zirkulierender DNA aus Plasma

Frei zirkulierende DNA wurde aus Plasma mit dem QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qia-gen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Es wurde das Herstellerprotokoll verwendet, allerdings mit zwei Veränderungen. Erstens wurde auf die Zugabe von Carrier-RNA verzichtet. Zweitens wurde die DNA mit H<sub>2</sub>O eluiert anstatt mit dem mitgelieferten AVE-Elutions-Puffer, da Vorversuche ergeben hatten, dass bei Verwendung des Puffers die PCR stark inhibiert wurde (siehe [3.1.6.2](#)). Eingesetzt wurden bis zu 2 ml Plasma, eluiert wurde immer in 50 µl H<sub>2</sub>O. Somit ergab sich eine maximal 40-fache Aufkonzentrierung.

### 2.2.5.3 Isolierung hochmolekularer DNA aus Vollblut

Die Isolierung hochmolekularer DNA aus Vollblut wurde in einer von Dr. Dirk Moser veränderten Methode nach Miller (*Miller et al., 1988*) durchgeführt. Die Methode ist hier mit Volumina angegeben, die auf 10 ml EDTA-Vollblut abgestimmt sind. Für die Isolierung aus geringeren Blutvolumina wurden die verwendeten Volumina der jeweiligen Reagenzien entsprechend angepasst. Es wurde stets frisches EDTA-Vollblut verwendet, das nicht länger als 30 Min. vor Beginn der Isolierung entnommen worden war.

Zuerst wurden 10 ml EDTA-Vollblut mit 30 ml auf 4 °C gekühltem Lysepuffer vermischt, 15 Min. auf Eis inkubiert, erneut gemischt und 15 Min. bei 400 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet kurz auf Filterpapier abtropfen gelassen. Anschließend wurden 10 ml Kernlysepuffer zugegeben und im Anschluss 660 µl 10%iges SDS (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) sowie 500 µl Proteinase (20 g/ml, Qiagen, Hilden, Deutschland). Nach jedem Schritt wurde gemischt und im Anschluss bei 37 °C über Nacht bis zu sieben Tage inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte die Zugabe von 3,4 ml gesättigter 6M-NaCl-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), gefolgt von kräftigem Schütteln. Das Gemisch wurde für 20 Min. bei 3000 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Zentrifugationsschritt noch einmal wiederholt. Im Anschluss wurden vorsichtig 7,5 ml Isopropanol untergemischt, woraufhin die DNA in ganzen Strängen ausfiel. Diese



konnte nun mit sterilen Haken aus den Gefäßen „gefischt“ und nach kurzem Trocknen in TE-Puffer gelöst werden. Die DNA wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert.

### **2.2.6 DNase-1-Aktivitätsreduktionsmessung mittels spezifischem ELISA**

Zur Messung der DNase-1-Aktivitätsreduktion (DNase-AR) wurde ein kommerzieller ELISA-Assay (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) von der Firma Orgentec (Mainz, Deutschland) verwendet. Die Durchführung des Assays richtete sich vollständig und ohne Änderungen nach den Angaben des Herstellers. Die Plasmaproben wurden vor Beginn 1:11 in im Kit enthaltenem Probenpuffer verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden je 100 µl in die Kavitäten der im Assay enthaltenen Mikrotiterplatte pipettiert und für 60 Min. bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Kavitäten entleert und drei Mal mit je 300 µl des Waschpuffers gewaschen. Dann wurden 100 µl Enzymkonjugatlösung in die Kavitäten pipettiert, für 15 Min. bei RT inkubiert und wiederum drei Mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt von 15 Min. bei RT mit je 100 µl TMB Substratlösung, drei weitere Waschschrte, und fünf Minuten Inkubation bei RT mit Stopplösung. Diese wurde in den Kavitäten belassen, die innerhalb der nachfolgenden 30 Min. gemessen werden konnten. Die Messung der optischen Dichte erfolgte in einem iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad, München, Deutschland) bei 450 nm. Die Messung wurde in diesem Zeitraum zwei Mal wiederholt, um die Messwerte zu bestätigen.

Die Auswertung der gemessenen Ergebnisse und die Umrechnung der optischen Dichten in Aktivitätsreduktionswerte übernahm freundlicherweise die Firma Orgentec.

## **2.3 Studie „Entwicklungen frei zirkulierender DNA bei Krebspatienten unter erschöpfender körperlicher Belastung“**

Das Ziel der Studie war die Untersuchung der Entwicklung tumorspezifischer und allgemeiner frei zirkulierender DNA im Blut von Tumorpatienten unter körperlicher Belastung. Die Studie wurde von der Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz bewilligt.

Die Studie wurde finanziell von der „Dr. Gerhard und Martha Röttger-Stiftung für humanmedizinische Forschungsprojekte“ unterstützt.

### **2.3.1 Rekrutierung und Zusammensetzung der Patientengruppe**

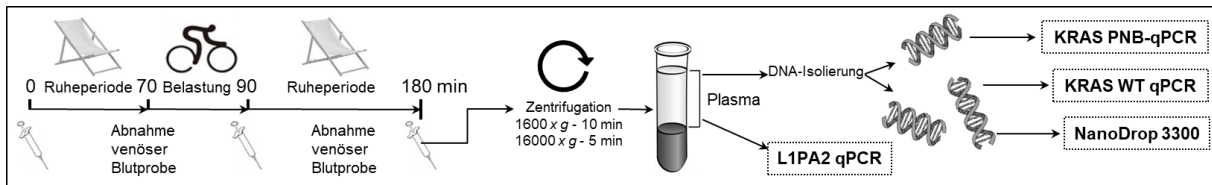
Die Patienten wurden von Mitarbeitern der Sportmedizin Mainz rekrutiert. Dies geschah über Flyer, Poster und Aushänge sowie im Rahmen von Informationsveranstaltungen, Patientensprechstunden an der Universitätsmedizin Mainz und dem Katholischen Klinikum Mainz, aus

Tumorsportgruppen und per Empfehlung von kooperierenden Ärzten. Alle Patienten wurden im Vorfeld persönlich mündlich von Mitarbeitern der Sportmedizin Mainz aufgeklärt und unterschrieben eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie. Die Kontrollprobanden wurden im Rahmen der regulären sportmedizinischen Sprechstunde an der Sportmedizin Mainz rekrutiert.

Die Patienten wurden nach den folgenden Einschlusskriterien rekrutiert. Es musste eine Krebserkrankung vorliegen, bevorzugt eine des Kolons oder des Rektums, und mindestens ein Teil der Tumormasse oder Metastasen musste noch im Körper vorhanden sein. Zudem musste die physische Belastbarkeit für eine Ausbelastung auf dem Fahrradergometer möglich sein, ohne das Patientenwohl zu gefährden. Die Kontrollgruppe, bestehend aus Probanden ohne aktuelle oder vorhergegangene Tumorerkrankung, sollte an die Tumorguppe nach Alter angeglichen werden. Ausschlusskriterien waren allgemein Komorbiditäten oder Suchterkrankungen, die die Belastbarkeit oder die frei zirkulierende DNA beeinflussen könnten, eine generell schlechte körperliche Verfassung, eine fehlende oder ungültige Einwilligung, Chemotherapie 48 Std. vor dem Test oder Bestrahlung 7 Tage vor dem Test sowie die Einnahme gerinnungshemmender Medikamente.

### **2.3.2 Versuchsablauf**

Der Versuchsablauf war streng reguliert, um die Vergleichbarkeit der Messungen zu gewährleisten. Bis auf einen Test (TP6) wurden alle Belastungstests an der Sportmedizin Mainz durchgeführt. Der Test an TP6 wurde am Marienhospital in Darmstadt ohne Verwendung einer Spirometrie durchgeführt. Die Teilnehmer sollten im Vorfeld des Versuchs (einige Stunden) keinen körperlichen Belastungen ausgesetzt gewesen sein, um die Ruhewerte nicht zu verfälschen. Die erste Blutabnahme erfolgte direkt nach der Aufklärung und dem schriftlichen Einverständnis der Teilnehmer. Darauf folgte eine sportmedizinische Untersuchung durch eine/n Mediziner/in, um die Tauglichkeit für eine Ausbelastung zu bestätigen, deren Ergebnisse allerdings nicht in die Auswertungen aufgenommen wurden. Diese umfasste eine umfassende Anamnese, einen Lungenfunktionstest, ein Ruhe-EKG (Elektrokardiogramm), eine Blutdruckmessung und eine Bioimpedanzanalyse. Voruntersuchung und Fahrradbelastung sowie ein anschließendes Beratungsgespräch waren für alle Teilnehmer der Studie kostenfrei. Aufgrund der Dauer, die die Blutaufreinigung in Anspruch nahm (siehe [2.3.4](#)), mussten ca. 90 Min. zwischen den Blutabnahmen liegen. Somit startete die Fahrradbelastung etwa 70 Min. nach der ersten Blutabnahme, damit die Proben der zweiten Abnahme direkt bearbeitet werden konnten und keine längeren Lagerungszeiten der Blutproben entstanden. Nach der zweiten Abnahme lag eine Ruhephase von 90 Min., dann erfolgte die dritte und letzte Abnahme. In der Ruhephase konnten die Patienten duschen, sollten sich allerdings keinen körperlich anstrengenden Tätigkeiten aussetzen.



**Abbildung 6** Versuchsablauf der Belastungsstudie an Tumorpatienten

Den Patienten wurde nach Ankunft in der Abteilung Sportmedizin der Universität Mainz ein Aufklärungs- und ein Anamnesebogen überreicht. Bei Einverständnis und Eignung der Patienten und Kontrollprobanden wurde die erste Blutabnahme durchgeführt, bei der Blut für die Plasmaisolierung und, bei den Tumorpatienten, für ein Blutbild abgenommen wurde (Zeitpunkt 0), in der Abbildung graphisch durch die Spritze symbolisiert. Nachfolgend wurden sportmedizinische Standarduntersuchungen durchgeführt, die jedoch die Teilnehmer körperlich nicht belasteten, um die Eignung der Teilnehmer für die Studie zu bestätigen. 70 Minuten nach der ersten Blutabnahme wurde der Belastungstest gestartet (Zeitpunkt 70), der laut Studienprotokoll im Optimalfall 20 Minuten dauern sollte, so dass zwischen der ersten und der zweiten Abnahme 90 Minuten liegen sollten. Direkt nach Ende des Belastungstests wurde die zweite Blutprobe durchgeführt (Zeitpunkt 90). Nach einer 90-minütigen Erholungsphase wurde die dritte Blutabnahme durchgeführt (Zeitpunkt 180). Mit jeder Blutprobe wurde genau gleich verfahren: Zunächst wurde im ersten Zentrifugationsschritt das Plasma von der Zellfraktion getrennt, dann wurden im zweiten, höhertourigen Zentrifugationsschritt im Plasma verbliebene Zellreste entfernt. Das zweifach zentrifugierte Plasma wurde teilweise verdünnt in die L1PA2-qPCR eingesetzt, teilweise wurde die cfDNA für folgende Analyseschritte isoliert. Diese isolierte DNA wurde mit der KRAS PNB-qPCR, der KRAS-Std-qPCR und dem NanoDrop 3300 analysiert und quantifiziert.

### 2.3.3 Ausbelastung auf dem Fahrradergometer

Die Ausbelastung der Teilnehmer fand auf einem Fahrradergometer ergoselect 200 (ergoline, Bitz, Deutschland) bei individuell angepasstem Belastungsprotokoll statt. Die individuelle Anpassung war notwendig, da der angestrebte Zustand der körperlichen Ausbelastung war, die nach mehreren Stufen aber nicht mehr als 20 Min. eintreten sollte. Es wurde immer ein Stufenprotokoll mit einer Stufendauer von drei Min. mit anschließender Erhöhung des Widerstands zur nächsten Stufe verwendet. Der Ausgangswiderstand und der zusätzliche Widerstand pro neuer Stufe waren variabel und richteten sich nach den körperlichen Voraussetzungen der Teilnehmer. Ein häufig verwendetes Protokoll verwendete beispielsweise einen Ausgangswiderstand und eine Steigerung von je 25 Watt. Das Testende wurde durch die Teilnehmer bestimmt – wenn diese das Gefühl hatten, den Test nicht weiterführen zu können – oder durch den Testleiter bei Auftreten klinisch bedenklicher Vorkommnisse. Der Abbruch konnte nach oder während der einzelnen Stufen erfolgen.

Bei jedem Test wurde ein Belastungs-EKG durchgeführt und mit der Auswertungssoftware AMEDTEC ECGpro® (AMEDTEC Medizintechnik, Aue, Deutschland) überwacht und am Ende jeder Stufe wurde der Blutdruck gemessen, um im Falle von auftretenden Unregelmäßigkeiten den Belastungstest abbrechen zu können. Zusätzlich wurde eine Spirometrie mit einer Atemmaske durchgeführt, um die individuelle Ausbelastung mittels der Atemäquivalente nachverfolgen zu können. Die Auswertung der Messung der Atemäquivalente wurde mit der Software Blue Cherry durchgeführt (Geratherm® Respiratory GmbH, Bad Kissingen, Deutschland). Zum

Ende jeder Stufe mussten die Teilnehmer die gefühlte Belastung über die BORG-Skala einordnen. Diese Skala bildet die Anstrengung von 6 bis 20 ab, betitelt mit den Einschätzungen „sehr, sehr leicht“ (6) bis „sehr, sehr schwer“ (20), wobei eine Stufe, während der der Test abgebrochen wurde, automatisch mit 20 bewertet wurde (*Borg, 1970*). Als weitere Messgröße für die körperliche Ausbelastung wurde nach jeder Stufe Blut aus dem Ohrläppchen entnommen um die Laktatentwicklung zu messen. Hierfür wurde das Ohr leicht mit einer Blutlanzette (Pro Medico Plan GmbH, Mainz, Deutschland) angestochen und das austretende Blut wurde mit einer natriumheparinisierten Kapillare mit einem Fassungsvermögen von 20 µl (EKF Diagnostics, Magdeburg, Deutschland) aufgenommen. Diese Kapillare wurde anschließend in einer Salzlösung genormten Volumens (EKF Diagnostics, Magdeburg) aufgenommen und in einem Biosen 5140 Laktatmessgerät gemessen (EKF Diagnostics, Magdeburg, Deutschland). Die Auswertung wurde mit der Software winlactat (mesics GmbH, Münster, Deutschland) durchgeführt.

### **2.3.4 Abnahme und Bearbeitung der Blutproben**

Die drei Blutabnahmen von je 20 ml, betitelt „vor Belastung (prä)“, „nach Belastung (post)“ und „Ruhe (rest)“, wurden in EDTA-beschichteten S-Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) aufgenommen. Alle weiteren Schritte wurden im molekularbiologischen Labor durchgeführt.

Die eine Hälfte der Blutproben wurde für die Gewinnung von Blutplasma nach Abschnitt 2.2.4.1 verwendet, die andere Hälfte wurde für die getrennte Isolierung verschiedener Zelltypen verwendet. Es wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs), Granulozyten, Thrombozyten und Erythrozyten isoliert, wobei für PBMCs und Granulozyten auch die Zellzahl bestimmt wurde, und bei -80 °C gelagert. Da diese Zellen für diese Arbeit nicht weiterverwendet wurden, wird die detaillierte Aufreinigung hier nicht beschrieben. Die Dauer der Aufreinigung von etwa 90 Min. war jedoch maßgeblich für die Planung des Versuchsaufbaus mitverantwortlich und soll daher hier erwähnt sein. Zusätzlich wurde zu allen drei Zeitpunkten Blut in einer EDTA-Monovette für ein großes Blutbild abgenommen, welches extern angefertigt wurde (Amedes MVZ für Labordiagnostik und Mikrobiologie Rhein-Main GmbH, Raunheim, Deutschland).

### **2.3.5 Studienparameter**

Für alle Teilnehmer der Studie wurde die gesamt-cfDNA aller venösen Plasmaproben mit der L1PA2-qPCR bestimmt. Die DNA aus den Nachbelastungsproben wurde isoliert und mit dem NanoDrop 3300, mit der *KRAS*-Std-qPCR sowie der *KRAS*-Std-nested-qPCR mit und ohne Blocking-Primer gemessen. Zusätzlich wurden die isolierten Plasmaproben mit der Pooled Nested qPCR mit Blocking-Primer (PNB-qPCR) auf mutierte DNA-Fragmente getestet. Im

Fälle positiver ctDNA-Bestimmungen wurden die drei Blutproben des jeweiligen Patienten erneut aufgereinigt und mit der PNB-qPCR sowie der *KRAS*-Std-qPCR gemessen. Für alle Plasmaproben wurde die DNase-1-Aktivitätsreduktion gemessen. Die Blutbilder der Patienten wurden zur Auswertung hinzugezogen, um potentielle Verbindungen der Blutparameter mit den cfDNA-Werten feststellen zu können. Des Weiteren wurden die belastungsphysiologischen Parameter mit in die Auswertung einbezogen, da zuvor bereits in anderen Studien Zusammenhänge zwischen den cfDNA-Werten unter körperlicher Belastung und konventionellen Belastungsparametern nachgewiesen worden waren (*Breitbach et al., 2014a, Tug et al., 2016*).

## **2.4 Studie „Entwicklungen frei zirkulierender Tumor-DNA bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während des Resektionsprozesses“**

Diese Studie untersuchte die Entwicklung von cfDNA und ctDNA über den Prozess einer Resektion pathologischen Gewebes hinweg bei Tumorpatienten und Patienten mit vergleichbaren Operationen aber ohne Krebserkrankungen. Des Weiteren sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede von cfDNA und ctDNA unter den gleichen Einflüssen festgestellt werden. Diese Entwicklungen sollten zusätzlich zur DNase-1 Aktivität in Bezug gesetzt werden. Dafür wurden Tumor- und Kontrollpatienten vor der OP, während des OP-Verlaufs und in der unmittelbaren Regenerationsphase nach der OP regelmäßig Blutproben entnommen und mit verschiedenen qPCR-Methoden sowie dem DNase-1-AR-ELISA analysiert. Zusätzlich wurde der Tumormutationsstatus der Patienten in den soliden Tumoren mittels PNB-qPCR an genomischer DNA aus Gewebeproben untersucht.

Die Studie wurde von der Ethikkommission des Landes Rheinland-Pfalz bewilligt.

### **2.4.1 Rekrutierung der Patienten**

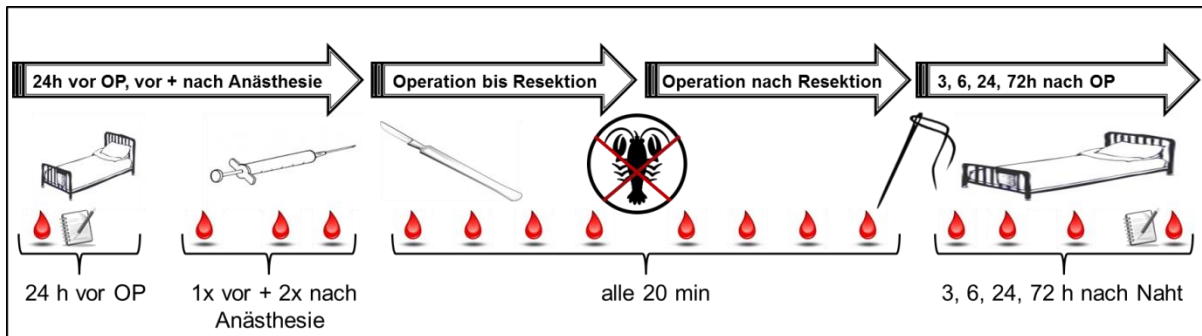
Die Patienten für diese Studie wurden in der Universitätsmedizin Mainz von Mitarbeitern der Anästhesie und der Chirurgie, sowie von Frau cand. Med. Vanessa Neef rekrutiert. Es galten strikte Ein- und Ausschlusskriterien sowie Vorgaben für die Gruppengrößen. Abweichungen entstanden durch ungenaue oder im Nachhinein als fehlerhaft erkannte Einstufungen der Patienten in Bezug auf den Tumorstatus oder eine Veränderung der Operationsmethode aufgrund akut auftretender Vorkommnisse, wobei hier zwischen minimal invasiver Operationsmethode und invasiver Operation (OP) unterschieden wurde. Es wurden Patienten mit Tumoren des Kolons oder des Rektums in die Studie aufgenommen, die in den folgenden Tagen eine kurative Operation zur Tumorresektion durchlaufen sollten. Alle Patienten mussten nach der Aufklärung über den Studienablauf schriftlich der Teilnahme an der Studie zustimmen. Ausschlusskriterien waren ein Alter unter 20 oder über 80 Jahren, mangelnde Einwilligungsfähig-

keit sowie schwere Komorbiditäten, die entweder gegen zusätzliche Blutabnahmen gesprochen hätten oder aber die Studienergebnisse hätten verfälschen können. Die Patienten der Kontrollgruppe, bei denen vergleichbare Operationen des Kolons oder Rektums geplant waren, wurden so weit wie möglich nach Alter, Geschlecht und OP-Methode an die Testgruppe angepasst. Die Rekrutierung geschah in der Regel am Tag vor der OP.

### **2.4.2 Abnahme und Bearbeitung der Blutproben**

Es wurden zu verschiedenen Zeitpunkten an vier verschiedenen Tagen Blutproben entnommen. Alle Blutabnahmen wurden von Personal der Universitätsmedizin Mainz oder von Frau cand. Med. Vanessa Neef durchgeführt. Die erste Blutprobe wurde einen Tag vor der OP entnommen. Zu diesem Zeitpunkt wurden 7,5 ml venöses Blut für eine Plasmaaufreinigung und 2 ml für ein großes Blutbild entnommen. Am Tag der Operation wurden venöse Blutproben von je 2 ml vor der Anästhesie und nach der Anästhesie aus dem Arm entnommen. Nach dem Einsetzen eines Zentralen Venenkatheters (ZVK) wurden die folgenden venösen Blutproben aus diesem entnommen. Die erste direkt nach Legen des ZVK, dann bei längerer Verweildauer im Anästhesieraum noch eine weitere vor Beginn der OP, eine Probe direkt nach Hautschnitt und dann alle 20 Min. während der OP bis zur Resektion. Eine Probe wurde immer direkt nach der Resektion genommen, dann wieder alle 20 Min. bis zum Ende der OP. Parallel zu den venösen Proben wurden im OP-Verlauf auch arterielle Blutproben von je 2 ml entnommen. Anschließend wurden 3, 6, 24 und 72 Std. nach Ende der OP wieder venöse Proben aus dem Arm entnommen. Bei der postoperativen Probe nach 72 Std. wurden, wie bei der Probe am Tag vor der OP, 7,5 ml und zusätzlich Blut für ein großes Blutbild entnommen.

Alle Blutproben wurden in EDTA-beschichteten S-Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und spätestens 60 Min. nach Abnahme weiterverarbeitet. Bei allen Proben wurden das Blutplasma, wie in Abschnitt [2.2.4.1](#) beschrieben, gewonnen, im Anschluss gekühlt auf Eis gelagert und spätestens sechs Stunden nach Aufreinigung bei -20 °C eingefroren. Bei der Lagerung auf Eis wurde darauf geachtet, direkten Kontakt der Probe mit dem Eis zu vermeiden. Die Plasmaproben wurden anschließend gefroren in die Sportmedizin Mainz überführt und dort bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für die erste Zentrifugation wurde eine Universal 320 R Kühlzentrifuge für Reaktionsgefäße bis zu 50 ml verwendet (Hettich Tuttlingen, Deutschland), für die zweite Zentrifugation eine Kühlzentrifuge der Firma Thermo (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).



**Abbildung 7** Versuchsablauf der Studie an Tumorpatienten während der OP

Die Patienten wurden am Tag vor der Operation rekrutiert und bekamen sofort einen Aufklärungsbogen sowie einen Anamnesebogen. Nach der Einwilligung und der Feststellung der Eignung des Patienten durch einen Mitarbeiter der Studie wurde die erste Blutprobe abgenommen. Die nächste Blutprobe wurde am Tag der Operation vor der Anästhesie und nach Verabreichung des Anästhetikums, graphisch symbolisiert durch die Spritze, abgenommen. Es folgten Abnahmen nach Legung des ZVK sowie mögliche Abnahmen während der Vorbereitung der Patienten für die Operation. Ab dem Hautschnitt, graphisch symbolisiert durch das Skalpell, wurden die Proben alle 20 Minuten bis zur Resektion des pathologischen Gewebes abgenommen. Eine Abnahme erfolgte direkt nach der Resektion, graphisch symbolisiert durch den durchkreuzten Krebs. Anschließend erfolgten die Blutabnahmen wieder alle 20 Minuten. Nach Ende der Operation zum Zeitpunkt der Wundnaht, graphisch symbolisiert durch die Nähnadel, wurde die letzte Probe des Operationsverlaufs abgenommen. Anschließend wurden 3, 6, 24 und 72 Stunden nach Operationsende wieder Blutproben abgenommen. Zusätzlich wurden parallel zur ersten und der letzten Probe Fragebögen zur Befindlichkeit ausgefüllt, graphisch symbolisiert durch den Notizblock, die hier aber nicht in die Auswertung eingeschlossen wurden. Alle abgenommenen Blutproben wurden anschließend und parallel zur Operation in einem Labor weiterverarbeitet. Das gewonnene Blutplasma wurde bei -80 °C gelagert.

### 2.4.3 FFPE-Schnitte

Um den Mutationsstatus der cfDNA im Plasma mit dem des soliden Tumors vergleichen zu können, wurden von den Patienten Gewebeschnitte von der pathologischen Abteilung der Universitätsmedizin Mainz angefordert. Es handelte sich um Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeschnitte, je ein HE-gefärbter Schnitt und zwei ungefärbte für die DNA-Isolierung pro Patient. Von vier Patienten lagen keine verwendbaren Schnitte vor. Alle Schnitte waren im Vorfeld von einem Pathologen begutachtet und bestätigt worden.

Aus den FFPE-Schnitten (zuerst je ein Schnitt pro Patient) wurde die DNA wie in Abschnitt [2.2.5.1](#) beschrieben aufgereinigt. Die Konzentrationen der DNA wurden mit dem NanoDrop 1000 (PeqLab, VWR, Erlangen, Deutschland) bestimmt.

### 2.4.4 Studienparameter

Für die Isolate der FFPE-Schnitten wurden PNB-qPCRs mit allen Primerpaaren durchgeführt, um mögliche Mutationen der soliden Tumoren zu entdecken. Die gesamt-cfDNA im Plasma aller abgenommenen venösen und arteriellen Blutproben wurde per L1PA2-qPCR mit den 90 bp-Fragment-Primern gemessen. Alle L1PA2-Messungen im Rahmen dieser Studie wurden von Frau [REDACTED] durchgeführt. Zusätzlich wurden exemplarisch ausgewählte Verlaufsproben einiger Patienten (bis TP16) mit den 222 bp-Fragment-Primern der L1PA2-qPCR

gemessen. Diese Messungen wurden von [REDACTED] durchgeführt. Als Quotient aus den Konzentrationen der langen cfDNA-Fragmente geteilt durch die Konzentrationen aller cfDNA-Fragmente (Messungen für kurze Fragmente messen auch die langen Fragmente) errechnete sich die DNA-Integrität.

Die DNA aus allen Proben vom Tag vor der OP wurde aus bis zu 2 ml Plasma isoliert. Des Weiteren wurde aus mehreren Plasmaproben aus den gesamten OP-Verläufen der Patienten mit *KRAS*-Mutationen in den soliden Tumoren die DNA isoliert. Die cfDNA aus allen Isolaten wurde mit der *LTR5*-qPCR und mit der *KRAS*-Std-qPCR quantifiziert. Außerdem wurden die Isolate aller prä-OP-Proben in der PNB-qPCR mit allen Primerpaaren gemessen, um einerseits in den FFPE-Proben detektierte Mutationen zu bestätigen und andererseits andere oder unentdeckte Mutationen zu finden. Für einen Patienten, der in der prä-OP-Plasmaprobe mutierte Fragmente aufgewiesen hatte, aber nicht zuvor im FFPE-Material, wurde noch DNA aus Plasmaproben aus dem OP-Verlauf isoliert. Für alle Isolate aus dem OP-Verlauf wurde die ctDNA der jeweilig zuvor detektierten Mutation mit den entsprechenden Primerpaaren in der PNB-qPCR quantifiziert.

Für alle Plasmaproben aus dem OP-Verlauf der Patienten mit *KRAS*-Mutationen, die mit der *KRAS*-Std- und der *LTR5*-qPCR gemessen worden waren, wurde die DNase-1-Aktivitätsreduktion mit dem ELISA-Kit bestimmt.

### 2.5 Statistik

Die Berechnungen der LOQ-Reihen wurden mit Microsoft Excel durchgeführt. Die Daten der Studien wurden mit SPSS Version 22 und 23 ausgewertet. Die Berechnung der gemittelten Daten der drei verschiedenen Gruppen zu vier Zeitpunkten über den Operationsverlauf wurden, wie angegeben, mit JMP Version 8 (SAS, Cary, NC, USA) durchgeführt und mit SPSS Version 22 und 23 (IBM, Armonk, NY, USA) verifiziert. Alle Werte wurden in SPSS auf Normalverteilung hin getestet. Stetige Variablen wurden logarithmiert, die arteriellen und venösen cfDNA-Konzentrationen der Studie 2 wurden nach einer von Templeton beschriebenen Methode in zwei Schritten normalisiert (Templeton, 2011).

Alle Korrelationen normalverteilter Daten wurden nach Pearson durchgeführt, nicht-normalverteilte nach Spearman. Varianzanalysen wurden, sofern nicht anders angegeben, mittels ANOVA-Varianzanalysen mit SPSS durchgeführt. Die Post-Hoc-Analysen der ANOVA-Analysen wurden nach Bonferroni durchgeführt.

P-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant bewertet, P-Werte < 0,01 als hochsignifikant. P-Werte zwischen 0,05 und 0,01 wurden mit einem Asterisk (\*) gekennzeichnet, P-Werte zwischen 0,01 und 0,001 mit \*\* und P-Werte unter 0,001 mit \*\*\*.



## 2.6 Primer und Sonden

**Tabelle 9** Liste der verwendeten Primer

#	Primer	Richtung	Sequenz (5' – 3')	Länge (bp)	# rev. Primer
1	Äußerer primer for	sense	GGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGG	34	2
2	Äußerer primer rev	antisense	TCATATTCGTCCACAAAATGATTCTGAATTAGCTG	35	
3	KRAS Std	sense	GAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGC	26	4
4	Innerer reverse 1	antisense	TCTGAATTAGCTGTATCGTCAAGG	24	
5	Innerer reverse 2	antisense	ATTAGCTGTATCGTCAAGGC	20	
6	G12D AIP	sense	AAACTTGTGGTAGTTGGAGCAGA	23	4
7	G12V AIP	sense	AAACTTGTGGTAGTTGGAGGTGT	23	4
8	G12A AIP	sense	ACTTGTGGTAGTTGGAGCAGC	21	4
9	G12S AIP	sense	ATAAACTTGTGGTAGTTGGAGATA	24	5
10	G12C AIP	sense	AAACTTGTGGTAGTTGGAGATT	22	5
11	G12R AIP	sense	AATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGGTC	27	4
12	G13D AIP	sense	TGTGGTAGTTGGAGCTGGAGA	21	4
13	Sequencing primer	antisense	TCCAATCAAATGCACAGAGA	21	
14	A-clo for	sense	CTTAAGCGTCGATGGAGGAG	20	15
15	A-clo rev	antisense	CAACAAAGCAAAGGTAAAGTTGG	23	
16	SDM rev	antisense	PHO-AAGTTTATATTCAGTCATTTTCAGCAGGC	29	
17	SDM G12D	sense	PHO-GTGGTAGTTGGAGCTGATGGCGTA	24	16
18	SDM G12A	sense	GTGGTAGTTGGAGCTGCTGGCGTA	24	16
19	SDM G12S	sense	GTGGTAGTTGGAGCTAGTGGCGTA	24	16
20	SDM G12C	sense	GTGGTAGTTGGAGCTTGTGGCGTA	24	16
21	SDM G12R	sense	GTGGTAGTTGGAGCTCGTGGCGTA	24	16
22	SDM G13D	sense	GTGGTAGTTGGAGCTGGTGACGTA	24	16
23	WT blocking primer	sense	ATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCG-NH3	30	-
24	L1PA2 for	sense	TGCCGCAATAAACATACGTG	20	25, 26
25	L1PA2 rev 90 bp	antisense	GACCCAGCCATCCATTAC	19	24
26	L1PA2 rev 222 bp	antisense	AACAACAGGTGCTGGAGAGG	20	24
27	LTR5 for	sense	ACCGAGACATTCCATTGCC	19	28
28	LTR5 rev	antisense	GCCTCTTGCAGTTGAGACAAG	21	

**Tabelle 10** Liste der verwendeten Sonden

Sonde	Richtung	Sequenz	Länge (bp)	Primer #
KRAS WT LNA for (WTfor)	sense	[6FAM]CTC[+T][+T]GC[+C][+T]ACGC[+C]A[BHQ1]	15	3, 6-11
KRAS WT LNA rev (WTrev)	antisense	[6FAM]GCGTA[+G]GC[+A][+A]G[+A]G[+T]G[BHQ1]	15	12

**Tabelle 11** Liste der Laufbedingungen der mutationsspezifischen *KRAS*-Primer

Forward Primer	Reverse Primer	Sonde	Annealing Temperatur	Annealing Zeit
G12D AIP	Innerer reverse 1	WTfor	67 °C	30 Sek.
G12V AIP	Innerer reverse 1	WTfor	67 °C	30 Sek.
G12A AIP	Innerer reverse 1	WTfor	65 °C	40 Sek.
G12S AIP	Innerer reverse 2	WTfor	65 °C	30 Sek.
G12C AIP	Innerer reverse 2	WTfor	65 °C	40 Sek.
G12R AIP	Innerer reverse 1	WTfor	65 °C	40 Sek.
G13D AIP	Innerer reverse 1	WTrev	65 °C	30 Sek.

**Tabelle 12** LOQs und LODs der mutationsspezifischen *KRAS*-Primer

LOQ (Kopien)	qPCR	nested qPCR	PNB-qPCR	LOD (Kopien)	qPCR	nested qPCR	PNB-qPCR
G12D AIP	12,5	12,5	3,13	G12D AIP	12,5	1	0,4
G12V AIP	50	50	12,5	G12V AIP	30	1	0,4
G12A AIP	12,5	25	3,13	G12A AIP	2,5	1	0,4
G12S AIP	50	50	6,25	G12S AIP	45	3,7	1
G12C AIP	6,25	25	3,13	G12C AIP	4,2	3	0,4
G12R AIP	25	25	12,5	G12R AIP	1,7	1	0,8
G13D AIP	6,25	25	12,5	G13D AIP	4,3	1	0,8
Mittelwert	23,2	30,4	7,6	Mittelwert	14,31	1,67	0,60
Median	12,5	25	6,25	Median	4,3	1	0,4

## 2.7 Zelllinien

**Tabelle 13** Liste der verwendeten Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Verkäufer	<i>KRAS</i> Mutation	Bestelldatum
HT29	Humane Adenokarzinomzellen d. Colons	CLS Cell Line Service, Eppelheim, Deutschl.	Keine	08.11.2011
SW480	Humane Adenokarzinomzellen d. Colons	CLS Cell Line Service, Eppelheim, Deutschl.	G12V	08.11.2011

## 2.8 Materiallisten und Geräte

Hier sind alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien, Kits, Puffer, Medien, Verbrauchsmittel und Software aufgelistet. Die meisten der genannten Materialien finden sich an entsprechender Stelle im Text des Methodenteils wieder.

## 2.8.1 Verwendete Geräte

**Tabelle 14** Liste der verwendeten Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Vertrieb</b>
Autoklav Systec VX 150	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wetzlar
Brutschrank New Brunswick Galaxy 170 R	Eppendorf AG, Hamburg
Eismaschine Scotsman Flockeneisbereiter, AF-80	MS Laborgeräte GmbH, Wiesloch
Elektrophoresekammer Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elektrophoresekammer Netzteil PowerPac Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fahrradergometer ergoselect 200	ergoline GmbH, Bitz
Geldokumentation Gel Doc XR	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock AccuBlock Digital Dry Bath	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA
Heizblock Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Heizblock HLC MHR 13	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
iMark™ Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubationshaube TH15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Inkubator Mini Incubator	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA
Inversmikroskop Wilovert Standard HF 20	Hund GmbH, Wetzlar
Kolbenhubpipetten 2,5/10/100/1.000 µl Eppendorf Research®/Eppendorf Research® plus/Eppendorf Reference®	Eppendorf AG, Hamburg
Laktatmessgerät Biosen 5140	EKF Diagnostics, Magdeburg
Magnetrührer MSH basic	Yellow line, ika werke GmbH + Co. KG, Staufen
Magnetrührer Magnetic Stirrer R1000	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Mini-Tischzentrifuge Sprout	G. Kisker GbR, Steinfurt
Mini-Tischzentrifuge Spectrafuge Mini Laboratory Centrifuge	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA
Mini-Tischzentrifuge Rotilabo®-Mini-Zentrifuge	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Multistep-Pipette Eppendorf Multipipette® stream	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop 3300	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Neubauer Zellzählkammer	Marienfeld-Superior, Lauda Königshofen
PCR-Arbeitsbank UV Sterilizing PCR Workstation	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

Pipettierhilfe Eppendorf Easypet®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet® pro	BRAND GmbH + Co KG, Wertheim
Spülmaschine Miele Reinigungs- und Desinfektionsautomat, G 7883	Miele & Cie. KG, Friedberg
Thermocycler MJ Mini Gradient Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermocycler Mastercycler EP Gradient S	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vakuumpumpe AP 04 Membran	HLC Biotech, Bovenden
Vakuumsystem QIAvac 24 Plus vacuum system	Qiagen GmbH, Hilden
Vortexer RS-VA 10	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Vortexer Vortex Mixer Labnet	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA
Vortexer Vortex-Genie® 2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Waage Kern EMB 220-1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Wasserbad WNB 29	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Zentrifuge Hettich Universal 320 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zentrifuge Centrifuge 5424R, Rotoren FA-45-6-30, A-4-81, A-2-DWP	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5810R, Rotor FA-45-24-11	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.8.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 15 Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/Vertrieb
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
CutSmart Puffer (10x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® min. 99,8%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA Away®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA-Leiter 100bp	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA-Leiter 1kb	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNA-Marker pUC 19/Mspl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
dNTPs	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe

Materialien und Methoden

ExpressLink T4 DNA Ligase	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
ExpressLink T4 DNA Ligase Buffer (5x)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Gel Loading Dye Blue (6x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Glukose/Laktat Hämolyselösung	Biosen, EKF Diagnostics, Magdeburg
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
HotStarTaq Plus Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden
HotStarTaq Plus Puffer (10x)	Qiagen GmbH, Hilden
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Lambda-Phagen-DNA	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Qiagen GmbH, Hilden
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
NEBuffer 4 (10x)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
pCR2.1 Vector	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAA, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
PicoGreen®	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Proteinase K	Qiagen GmbH, Hilden
Restriktionsenzyme Bfal, Ddel, Dpnl, EcoRI HF	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SsoFast™ EvaGreen Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SsoFast™ Probes Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SYBR® Green I	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tego PCR-Puffer (2x)	Bioline GmbH, Luckenwalde

TOPO® Vektor	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
TRIS Hydrochlorid (Tris-HCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
VELOCITY DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde
Wasser (H <sub>2</sub> O)	Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt

### 2.8.3 Verwendete Kits

**Tabelle 16** Liste der verwendeten kommerziellen Kits

Kit	Hersteller
DNase Activity ELISA	Orgentec, Mainz
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up“ Kit	Macherey-Nagel, Düren
QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAamp FFPE Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
TA Cloning® Kit (with pCR®2.1 vector) ohne Zellen	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt

### 2.8.4 Verwendete Medien und Puffer

**Tabelle 17** Liste der verwendeten Medien und Puffer

Medium/Puffer	Zusammensetzung oder Hersteller
DMEM	PAA, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Ham's F12	PAA, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
FBS Gold	PAA, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
LB-Medium (lysogeny broth)	5 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 2,5 g Natriumchlorid, ad. 500 ml Aqua dest
PBS (phosphate buffered saline)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
TE-Puffer	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
TAE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
TENS-Puffer	10mM Tris-HCL, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0, 0,1 N NaOH, 0,5 % SDS
Trypsin	PAA, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland

## 2.8.5 Verwendete Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 18** Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Blutlanzetten	Pro Medico Plan GmbH, Mainz
Butterfly zur Blutentnahme: Safety-Multifly®-Set (Nadel: 0,8 x 19 mm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Desinfektionsspray Kodan® Tinktur	Pro Medico Plan GmbH, Mainz
Dispenser-Spitzen Combitips Advanced®	VWR International GmbH, Darmstadt
Falcon Tubes 15/50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Filterspitzen 10, 100, 1.000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glasware (Flaschen, Messbecher)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Kapillarhalter	EKF Diagnostics, Magdeburg
Kimtech Science precision wipes Reinigungstücher	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz /Rheinhafen
Klebeetiketten	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Klebefolie für qPCR-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kunststoff-Kapillare 20 µl, Natriumheparinisiert	EKF Diagnostics, Magdeburg
Low retention Eppis 0,6/1,5 ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Low retention Spitzen 10/100/1.000 µl	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern
Monovetten zur Blutentnahme: S-Monovette® 7,5ml EDTA K3 / 2,7 ml EDTA K3	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mundschutz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nitril-Einmalhandschuhe	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern
Parafilm	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen 10/100/1.000 µl	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Plastikware (Messbecher, Messzylinder)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
qPCR Platten, weiß (96-Well, 384-Well)	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern
Reaktionsgefäße 0,2/0,5/1,5/2,0 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Glasvollpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tupfer Pur-Zellin®	Pro Medico Plan GmbH, Mainz
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen 175cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

## 2.8.6 Verwendete Software

**Tabelle 19** Liste der verwendeten Software

Software	Hersteller/ Anbieter
AMEDTEC ECGpro®	AMEDTEC Medizintechnik Aue GmbH, Aue
BioEdit Sequence Alignment Editor 7	Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA
Bio-Rad CFX Manager 3.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Blue Cherry	Geratherm® Respiratory GmbH, Bad Kissingen
DNA copy number calculation	<a href="http://www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber/">http://www.thermoscientificbio.com/webtools/copynumber/</a> , Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
EndNote X5	Thomson Reuters, Philadelphia, PA, USA
JMP 8	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
LNA™ probe designer	Exiqon, Qiagen, Hilden
Microsoft Office 2007, 2010	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
NanoDrop 1000 3.8.1	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NanoDrop 3300 2.8.0	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> , National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD, USA
Primer3	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/</a>
Quantity One® 1-D Analysis Software 4.6.9	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Reverse complement	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a> (Stothard 2000)
SPSS Statistics 22 + 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen
UCSC Genome Bioinformatics	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a> (Kent et al. 2002)
winlactat	mesics GmbH, Münster



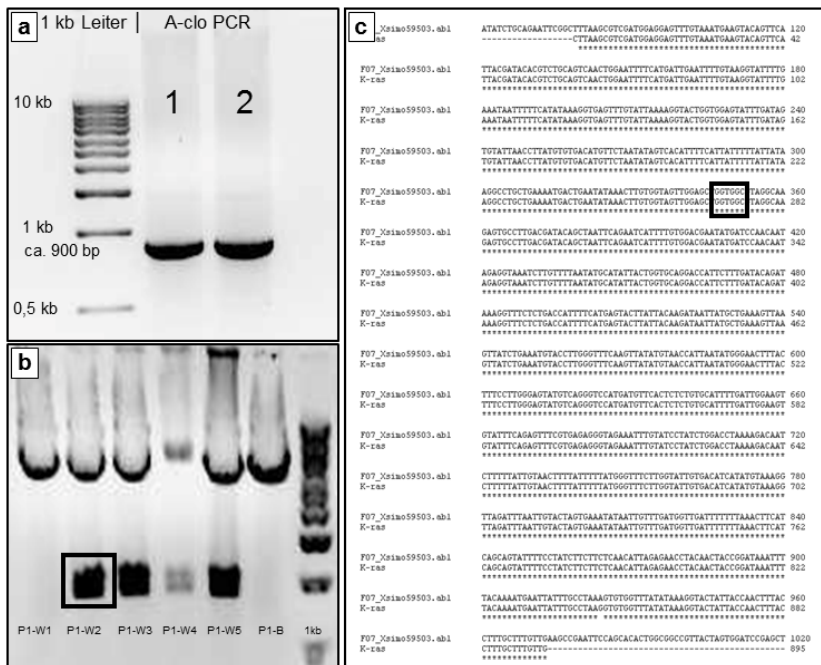
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung der verwendeten Methoden

Ein Teilziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung, Etablierung und Anwendung einer neuen Methode, um in geringen Volumina von Blutplasma zirkulierende, mutierte Tumor-DNA (ctDNA) detektieren und quantitative Aussagen über deren Konzentrationen treffen zu können. Der erste Abschnitt behandelt die Ergebnisse der Konstruktion und Etablierung der verwendeten Methode.

##### 3.1.1 Erstellung von Standards

Für die Etablierung der Methoden zum Nachweis der sieben häufigsten Punktmutationen in *KRAS* Exon 2 war es zunächst notwendig, die zu detektierenden Mutationen in homozygoter Form in einem dauerhaft verfügbaren DNA-Standard vorliegen zu haben. Vor Beginn der Etablierung wurden in mehreren Schritten mittels PCR- und Klonierungstechniken der *KRAS*-WT und die verschiedenen Punktmutationen in einer Sequenz von ca. 900 bp als Bestandteil von Plasmiden in *E. coli* Bakterien eingeführt und gelagert. Die verwendeten Methoden sind in Abschnitt 2.2.2 beschrieben.



**Abbildung 8** A-clo-PCR zur Herstellung eines *KRAS*-Standards aus gDNA

8a: Agarose-Gelelektrophorese mit zwei A-clo-PCR-Produkten. Die gewünschte Fragmentlänge von 911 bp (davon entfallen 16 bp auf die *Eco*RI-Schnittstelle) stimmt mit der bestimmten Bandenlänge überein. 8b: Agarose-Gelelektrophorese mit aus fünf weißen Bakterienkolonien (P1-W1-5) mittels Qiagen Plasmid Mini Kit isolierter DNA sowie zur Kontrolle DNA aus einer blauen Kolonie (P1-B). Die Banden lassen auf eine Fragmentlänge von ca. 900 bp schließen, wobei auch noch eine längere Bande vorhanden ist. 8c: Im Alignment mit der *KRAS*-Originalsequenz wurde die richtige Basenfolge mittels

Sanger-Sequenzierung bestätigt. Der Mutationshotspot ist durch das schwarze Rechteck markiert. Die erste der zwei abweichenden Basen, ganz am Beginn der Sequenz (Base 1 der „K-ras“-Sequenz), konnte bei Kontrolle des Chromatogramms des Sequenz-Alignments als abweichend bestätigt werden. Die zweite abweichende Base, am Ende der Sequenz (Base 846 der „K-ras“-Sequenz), war nicht eindeutig, was auf eine Heterogenität der Sequenz bezüglich dieser Base hindeutet.

Die Farben der Abbildungen 8a und 8b wurden mit Photoshop CS5 invertiert.

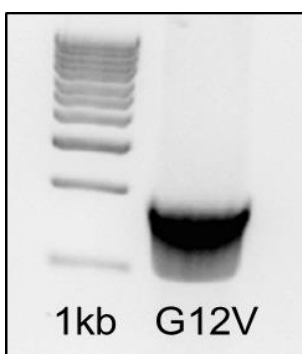
Der erste Schritt, um einen dauerhaft verfügbaren Standard zu erstellen, war die Generierung eines, für die Einklonierung in Bakterien geeigneten, DNA-Fragments aus dem *KRAS*-Gen mittels Endpunkt-PCR. Diese PCR inklusive des fertig etablierten Protokolls ist in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben.

### 3.1.1.1 WT-Standard

Zuerst wurde aus humaner genomischer DNA eines gesunden Spenders per A-clo-PCR ein Fragment amplifiziert, per Agarose-Gelelektrophorese überprüft und isoliert. In Abbildung 8a ist die Agarose-Gelelektrophorese mit zwei A-clo-PCR-Produkten des WT-Fragments gezeigt. Das isolierte Fragment wurde in einen Vektor ligiert und in kompetente *E. coli*-Bakterien ein-kloniert. Aus Plasmiden aus mehreren erzeugten Kolonien konnte DNA in der richtigen Bandenlänge isoliert werden (Abbildung 8b). Die Sequenz wurde anschließend in aus dem Isolat gewonnener DNA per Sanger-Sequenzierung bestätigt, um Fehlpaarungen und kurze Sequenzveränderungen auszuschließen. Die Sequenz konnte, für die Kernsequenz vollständig mit der *KRAS*-Sequenz übereinstimmend, bestätigt werden. Ein Alignment ist in Abbildung 8c gezeigt.

### 3.1.1.2 G12V-Standard

Der G12V-Standard wurde aus Zellen der SW480 Tumorzelllinie per A-clo-PCR gewonnen. Alle weiteren Schritte entsprachen denen für den WT-Standard. Wie in Abbildung 9 gezeigt, konnte per PCR eine Bande in der entsprechenden Länge generiert werden. Für den Standard wurde nur die DNA aus der direkten Bande aus dem Gel isoliert und nicht der dunkle Bereich unter der Bande, der auf geringer konzentrierte, kürzere Nebenprodukte hindeutet.



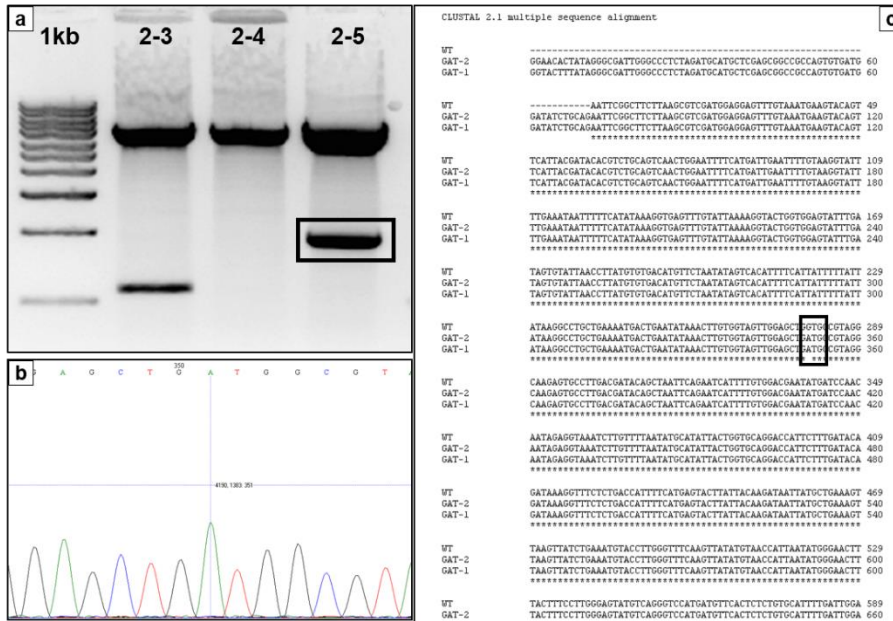
**Abbildung 9** G12V-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese mit einem A-clo-PCR-Produkt des G12V-Fragments aus SW480 Tumorzellen. Die Bandenlänge liegt bei ca. 900 bp, die gewünschte Fragmentlänge bei 895 bp. Unterhalb der schwarzen Bande liegt ein grauer Bereich, der sich deutlich vom Hintergrund abhebt. Dieser lässt kürzere Nebenprodukte vermuten und wurde in der nachfolgenden DNA-Aufreinigung nicht isoliert. Die Farben der Abbildung wurden mit Photoshop CS5 invertiert.

### 3.1.1.3 Standards aus Site directed Mutagenesis

Basierend auf dem WT-Standard als Template wurden für sechs der sieben häufigsten Punktmutationen im Mutationshotspot in *KRAS* Exon 2 – alle außer für die G12V-Mutation –

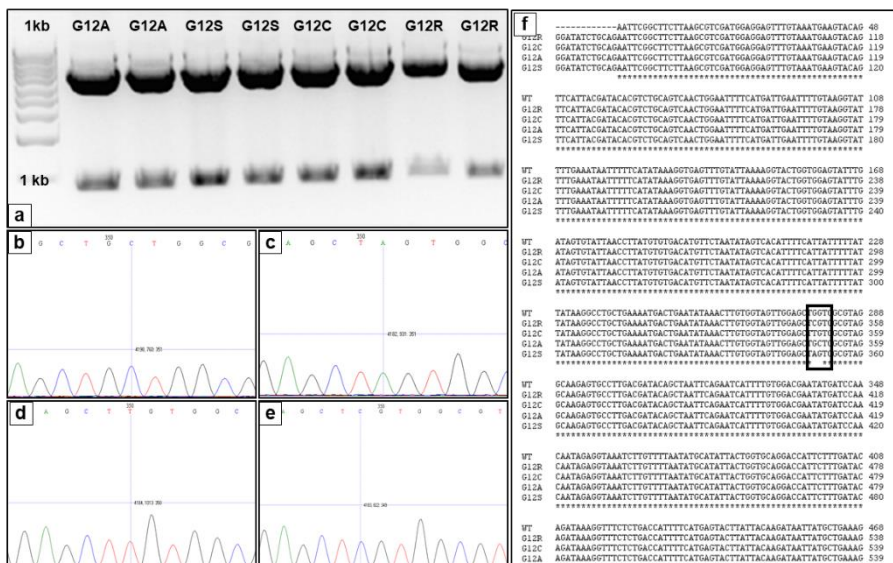
Standards per Site-Directed-Mutagenesis-PCR generiert, wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben. Die folgenden Abbildungen 10 bis 12 zeigen jeweils eine Gelelektrophorese sowie die Sequenzierergebnisse der korrekten Sequenzen mit künstlich eingefügter Mutation. Begonnen wurde mit der G12D-Mutation, um die Methode sowie die Primer zu etablieren, wie in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10** Site Directed Mutagenesis zur Generierung des G12D Standards

10a zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese mit drei SdM-PCR-Produkten, von denen nur eines die richtige Bandenlänge aufweist (Probe 2-5). Die Präsenz der Mutation in diesem Produkt wurde per Sequenzierung bestätigt. 10b: Die ausgetauschte Base – Adenin statt Guanin – ist mit dem Fadenkreuz markiert und erkennbar homozygot vorhanden. 10c bietet eine Übersicht über die gesamte Sequenz, die bis auf die eingeführte Mutation deckungsgleich mit der WT-Sequenz ist. Das Triplett, welches die Mutation enthält, ist durch das schwarze Rechteck gekennzeichnet. Die Farben der Abbildung 10a wurden mit Photoshop CS5 invertiert.

Die gesamte Sequenz, die bis auf die eingeführte Mutation deckungsgleich mit der WT-Sequenz ist. Das Triplett, welches die Mutation enthält, ist durch das schwarze Rechteck gekennzeichnet. Die Farben der Abbildung 10a wurden mit Photoshop CS5 invertiert.



**Abbildung 11** Site Directed Mutagenesis für G12A, G12S, G12C und G12R

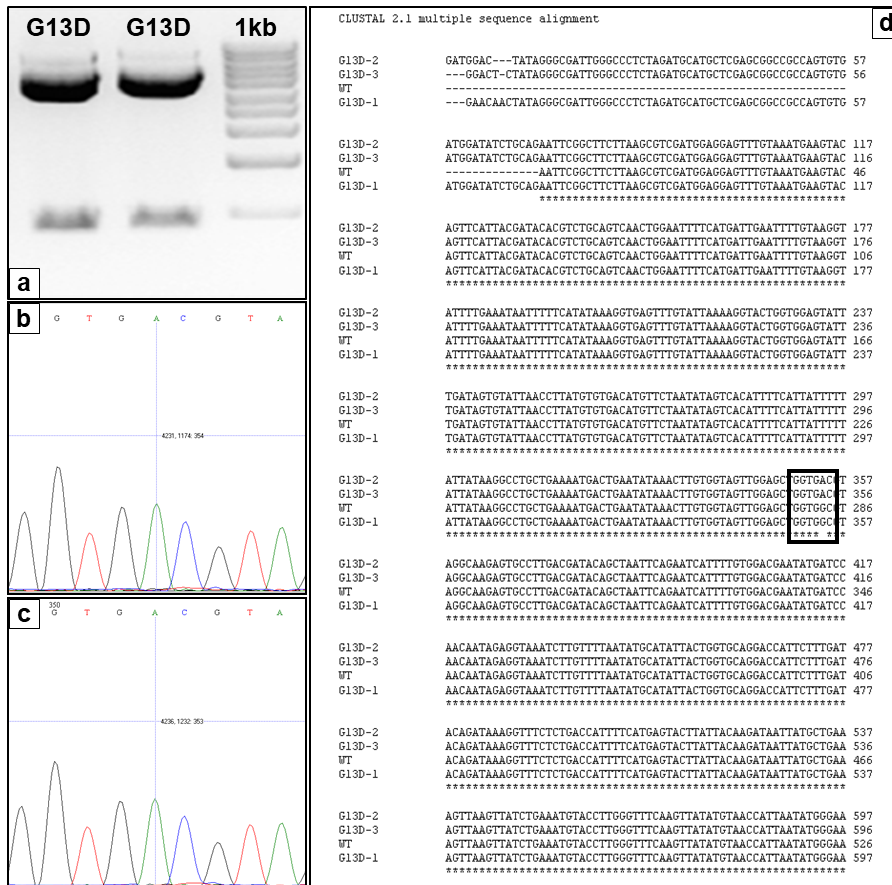
11a zeigt eine Agarose-Gelelektrophorese mit zwei SdM-PCR-Produkten pro gewünschter Mutation. Alle Banden weisen in etwa die richtige Länge auf, sind aber von unterschiedlicher Intensität. Die jeweils stärker ausgeprägte Bande wurde isoliert und sequenziert. Die Sequenzierungen bestätigten die erfolgreichen Mutagenesen.

11b-e: Die ausgetauschten Basen sind jeweils mit dem Fadenkreuz markiert und stets erkennbar homozygot vorhanden. 11f zeigt Alignments der gesamten Sequenzen, die bis auf die eingeführten Mutationen (schwarzes Rechteck) deckungsgleich mit der WT-Sequenz sind. Die Farben der Abbildung 11a wurden mit Photoshop CS5 invertiert.

## Ergebnisse

Die nachfolgenden Mutationen wurden anschließend parallel hergestellt, wobei G12A, G12S, G12C und G12R auf Anhieb erfolgreich generiert werden konnten, wie in Abbildung 11 gebündelt dargestellt ist.

Zuletzt wurde mit G13D die einzige Mutation in Codon 13 generiert (Abb. 12).



**Abbildung 12** Site Directed Mutagenesis zur Generierung des G13D Standards

12a: Agarose-Gelelektrophorese mit zwei SdM-PCR-Produkten. Beide weisen die richtige Bandenlänge auf. 12b und 12c: Die Präsenz der Mutation wurde per Sequenzierung bestätigt. Die ausgetauschte Base – Adenin statt Guanin – ist mit dem Fadenkreuz markiert und erkennbar homozygot vorhanden. 12d: Alignment über die gesamte Sequenz mit beiden Sequenzen sowie einer zuvor generierten SdM-Sequenz, bei der die Mutagenese nicht erfolgreich war. Die beiden oberen Sequenzen, G13D-2 und G13D-3, weisen die Mutation auf, G13D-1 nicht (schwarzes Rechteck). Ansonsten sind alle Sequenzen de-

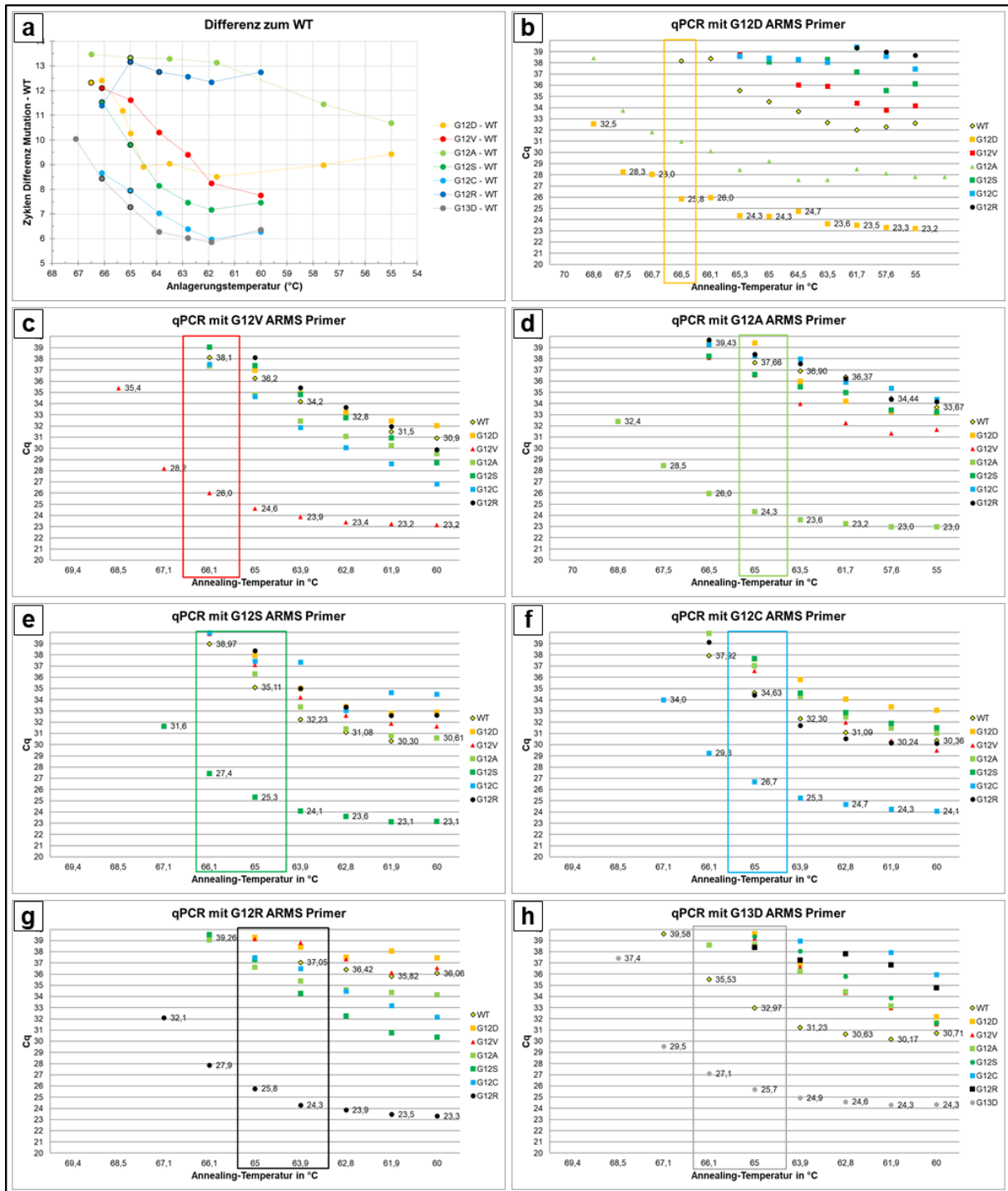
ckungsgleich. Die Farben der Abbildung 12a wurden mit Photoshop CS5 invertiert.

### 3.1.2 Etablierung der ARMS-Primer und des WT-Std.-Primers

#### 3.1.2.1 EvaGreen® Vortests

Als erste Tests zur Etablierung der mutationsspezifischen ARMS-Primer wurden qPCRs mit Temperaturgradienten bei der Anlagerungstemperatur durchgeführt. Sie dienen der ungefähren Ermittlung der Anlagerungstemperaturen, bei denen die Primer ihre höchste Spezifität bei gleichzeitig akzeptabler qPCR-Effizienz aufweisen. Der in Abbildung 13b abgebildete Gradient für die G12D-Mutation setzt sich aus den Ergebnissen von zwei Einzelgradienten-qPCRs zusammen, die an aufeinanderfolgenden Tagen mit identischen Templates durchgeführt wurden. Aufgrund der zwei qPCR-Durchläufe und dem erneuten Auftreten sind die Amplifikationskurven teilweise nicht kontinuierlich, in ihrer Aussage aber kompatibel.

## Ergebnisse



**Abbildung 13** EvaGreen®-Vortests

Die Temperaturgradienten der qPCRs der EvaGreen®-Vortests aller sieben ARMS-Primer für die Punktmutationen in KRAS Exon 2. In 13a sind für alle Primer die Differenzen der spezifischen Amplifikationen des jeweiligen mutationstragenden Fragments und der unspezifischen Amplifikation des WT-Fragments dargestellt. Die Temperaturschritte, die als am effektivsten bewertet wurden, sind schwarz umrandet. Sie liegen zwischen 63,9 °C für G12R und 66,5 °C für G12D. 13b-h zeigen die Cq-Werte der sieben mutationsspezifischen Primerpaare für alle Templates. In den qPCRs mit den Primern für Mutationen in Codon 12 wurde die G13D-Mutation als Template ausgeschlossen, da diese Primer keinen Unterschied zwischen dieser Mutation und dem WT machen können.

Basierend auf diesen Tests konnten anschließend diese Temperaturen als Richtwert für die optimalen Anlagerungstemperaturen der zu generierenden LNA-Sonden verwendet werden.

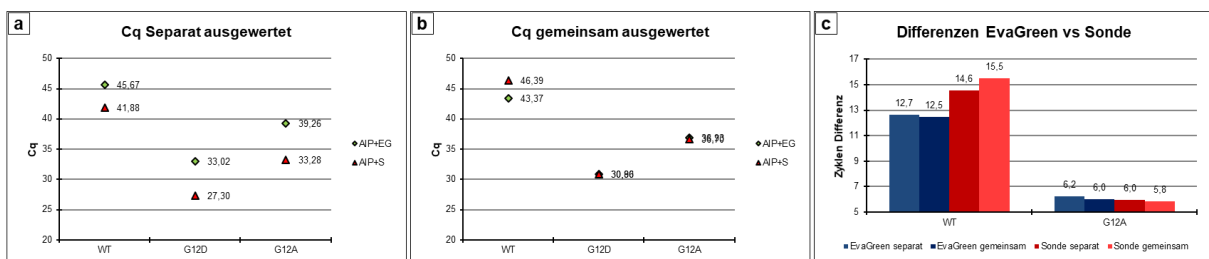


Primer, deren Spezifität gegenüber dem WT oder den anderen Mutationen nicht ausreichte, wurden verändert und ersetzt.

Zur Signaldetektion beinhalteten die qPCRs den interkalierende Farbstoff EvaGreen®, wie in Abschnitt 2.2.3.1.1 beschrieben. Für jede Mutation wurde eine präferierte Temperatur mit möglichst niedrigem Cq für die spezifische Detektion und möglichst hohen Cqs für die unspezifischen Detektionen bestimmt. Wie in Abbildung 13 dargestellt, lagen diese zwischen ca. 66,5 °C und ca. 63,5 °C. Teilweise wurden Temperaturen trotz der hohen Spezifität gegenüber Mismatches verworfen, wenn der Cq der passenden Templates in der qPCR zu hoch lag (z.B. G12A in Abb. 13d, G12R in Abb. 13g). Die die hier verwendeten Primer für G12S und G12C, wurden im späteren Verlauf der Etablierungen noch ersetzt.

### 3.1.2.2 Vergleich EvaGreen® und LNA-Sonde

Auf der Basis der Ergebnisse der EvaGreen®-Gradienten-qPCRs wurden Sonden für die spezifische Detektion von *KRAS* Exon 2 erstellt, die je 5 LNA-Basen enthielten, um eine hohe Spezifität trotz geringer Basenzahl von 15 zu ermöglichen (siehe 2.1.2). Das Ziel der Sonden war, die Spezifität für das gewünschte Produkt weiter zu erhöhen. Dies sollte sich in einer geringeren unspezifischen Amplifikation niederschlagen. In Versuchen, die identische spezifische und unspezifische Templates für eine Eva-Green®- und eine sondenbasierte Detektion verwendeten, zeigte sich tatsächlich, dass die sondenbasierte Detektion von unspezifischem WT-Produkt geringer war, als mit dem EvaGreen®-Ansatz, wie in Abbildung 14 gezeigt ist. Zusätzlich zeigte sich, dass die Cq-Werte der sondenbasierten qPCR unter denen der qPCR mit EvaGreen® lagen, wenn die qPCRs separat voneinander ausgewertet wurden. Dies spricht für eine höhere Sensitivität dieser Methode.



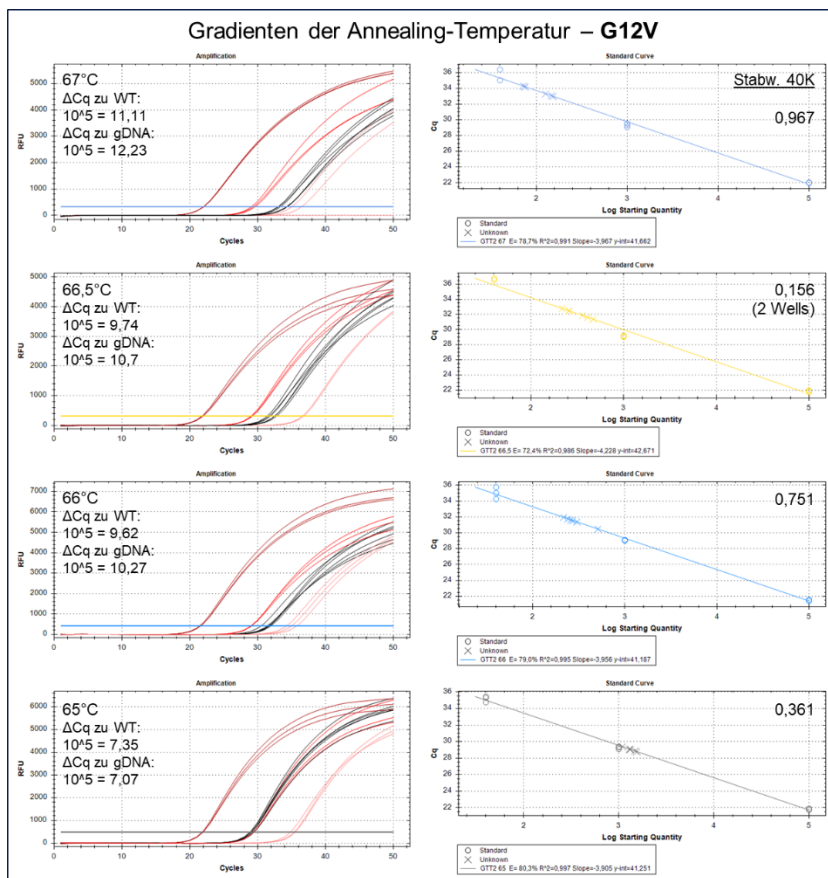
**Abbildung 14** Vergleich qPCR mit EvaGreen® und Sonde

Es wurden mehrere qPCRs mit dem G12D-ARMS-Primer mit identischem Template durchgeführt, einmal mit einem EvaGreen®-basierten und einmal mit einem sondenbasierten Ansatz. Das Template waren WT-, G12A- (beides unspezifisch) oder G12D-Fragmente. 14a und 14b zeigen die gleichen qPCR-Läufe, einmal mit separat angepasstem Threshold (a) und einmal mit gemeinsam angepasstem Threshold (b). In beiden Fällen ist die sondenbasierte qPCR resistenter gegenüber Fehlamplifikationen der WT-Fragmente, im Falle der separaten Auswertung zeigt sich zusätzlich eine höhere Sensitivität für die spezifische Zielsequenz. 14c: Die Differenzen zwischen den Cqs der spezifischen und den zwei unspezifischen qPCRs getrennt nach EvaGreen® bzw. sondenbasierter qPCR und separat bzw. gemeinsamer Auswertung. Deutlich zeigt sich die höhere Spezifität gegenüber dem WT in den sondenbasierten Ansätzen.

### 3.1.2.3 Gradienten mit LNA-Sonde

Im Anschluss an die Vortests mit Primern und Sonde folgten weitere Gradienten-qPCRs in zwei Schritten unter Verwendung der LNA-Sonden.

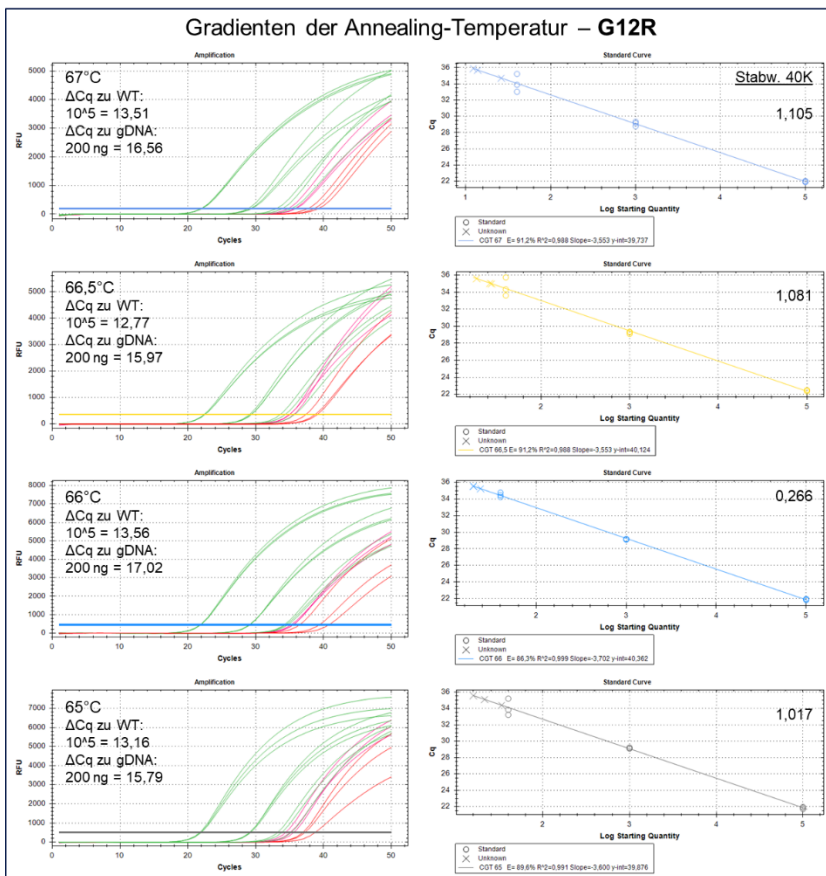
Zunächst wurde die Linearität der qPCRs bei verschiedenen Anlagerungstemperaturen in Verdünnungsreihen mit und ohne WT-Hintergrund in Temperaturgradienten getestet, da die Methode nicht nur eine hochsensitive Detektion, sondern auch eine reliable Quantifikation niedrigster Konzentrationen von Tumor-DNA ermöglichen soll. Die Gradienten liefen mit zwei verschiedenen Template-Ansätzen gleichzeitig: einer Verdünnungsreihe, bestehend aus den Fragmenten mit der jeweiligen Mutation, und einer Verdünnungsreihe, die zusätzlich noch einen Hintergrund aus gDNA (200 ng pro qPCR final) beinhaltet. Jede Verdünnungsreihe bestand zunächst aus drei Konzentrationen des mutationstragenden Fragments –  $10^5$  Kopien,  $10^3$  Kopien und 40 Kopien. Die Spezifität bei den jeweiligen Anlagerungstemperaturen wurde durch einen separaten Ansatz mit nur 200 ng gDNA und einen Ansatz mit nur  $10^5$  Kopien des WT-Fragments als Negativkontrollen getestet. Die Anlagerungsdauer pro qPCR-Zyklus lag zunächst für alle Gradienten bei 40 Sek. pro Zyklus.



**Abbildung 15** Gradienten-qPCR G12V ohne WT-Hintergrund  
Als Ausgangstemperatur aus den Vorversuchen wurde 65 °C gewählt. Es wurden vier Anlage-temperaturen getestet: 65 °C, 66 °C, 66,5 °C und 67 °C, jeweils bei 40 Sek. Anlagerungszeit. Angegeben sind die jeweilige Annealing-Temperatur, die Differenz zwischen spezifischem Fragment und WT bzw. gDNA in Zyklen und die errechnete Standardabweichung des 40 Kopien-Verdünnungsschrittes (rechts). Die Spezifität des Primers steigt mit der Anlagerungstemperatur sichtbar an, von 7,35 Zyklen Differenz bei 65 °C auf 11,11 Zyklen Differenz bei 67 °C zum WT bzw. von 7,07 Zyklen auf 12,23 Zyklen Differenz zur gDNA. Die Standardabweichungen bei 40 Kopien waren nicht linear von der Temperatur abhängig, tendenziell jedoch niedriger bei niedrigeren Temperaturen. Die Standardabweichung bei 66,5 °C kann nicht

mit einbezogen werden, da hier nur zwei Wells ausgewertet werden konnten. Die Spezifität ist hier ausschlaggebend, musste jedoch nachfolgend noch auf anderem Wege verbessert werden.

In den Abbildungen 15 bis 18 sind Ergebnisse dieser Gradienten mit den Primern für die G12V und G12R-Mutationen exemplarisch für alle Mutationen dargestellt. Die Graphik zu den Auswertungen der G12V-Gradienten ohne gDNA (Abb. 15) zeigt, dass die Spezifität des Primers, definiert als der Abstand zwischen spezifischer und unspezifischer Amplifikation, temperaturabhängig deutlich ansteigt. So beträgt die Differenz zwischen  $10^5$  Kopien G12V und  $10^5$  Kopien WT bei 65 °C nur 7,35 Zyklen, bei 67 °C hingegen 11,11 Zyklen. Die Differenz zur gDNA ist jeweils etwas größer. Dies zeigt, dass die Anlagerungstemperatur der Primer eine entscheidende Rolle für die Spezifität der ARMS-Primer-basierten qPCR spielt. Andere Primerpaare, wie der G12R-Primer, sind bei denselben Temperaturgradienten in ihrer Spezifität bereits konstant hoch, hier zwischen 12,77 und 13,56 Zyklen Differenz zum WT. Die Spezifität zeigt sich auch in den Gradienten mit gDNA-Hintergrund deutlich in der Linearität der Verdünnungsreihen. Bei einer geringen Spezifität der Primer wird der gDNA-Hintergrund zu gewissen Teilen mitamplifiziert, was sich in den Cq-Werten der niedrigeren Konzentrationen mutierter Fragmente mit gDNA-Hintergrund stark auswirkt. Als Folge sind die Cq-Werte dieser niedrigen Konzentrationen zu niedrig, die berechnete Kopienzahl zu hoch und die qPCR-Effizienz liegt falsch zu hoch, oft deutlich über 100%. Dies ist z.B. bei der 65 °C Verdünnungsreihe des G12V-Primers in Abbildung 17 zu beobachten.

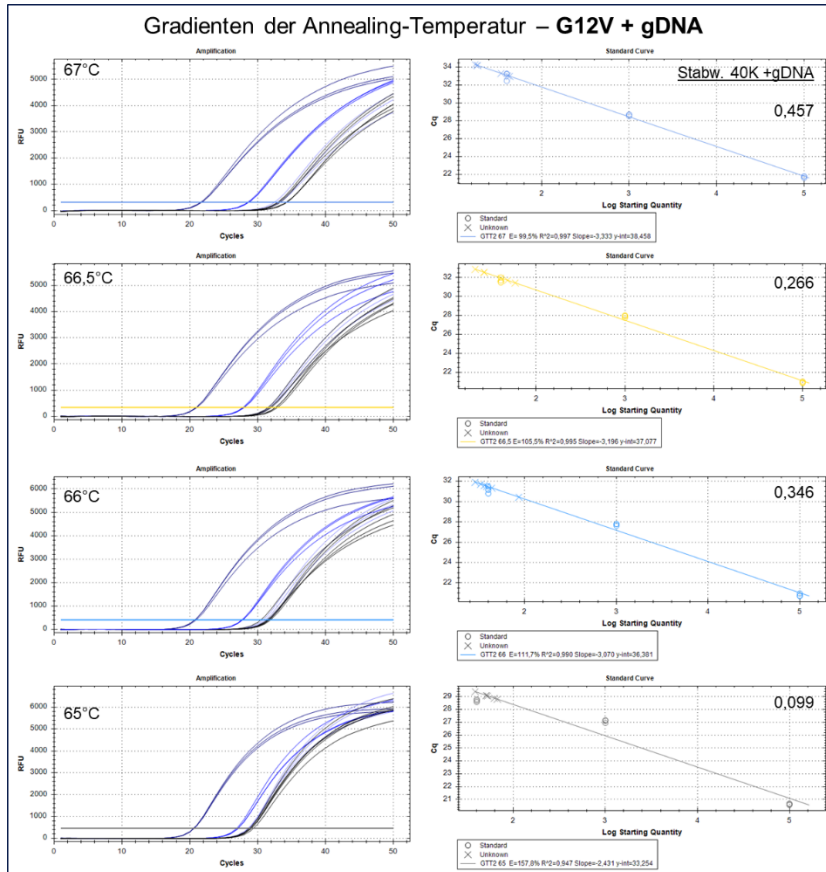


**Abbildung 16** Gradienten-qPCR G12R ohne WT-Hintergrund Als Ausgangstemperatur aus den Vorversuchen wurde 65 °C gewählt. Es wurden vier Anlagerungstemperaturen getestet: 65 °C, 66 °C, 66,5 °C und 67 °C, jeweils bei 40 Sek. Anlagerungszeit. Angegeben sind die jeweilige Annealing-Temperatur, die Differenz zwischen spezifischem Fragment und WT bzw. gDNA in Zyklen und die errechnete Standardabweichung des 40 Kopien-Verdünnungsschrittes (rechts). Die Spezifität des Primers steigt mit der Anlagerungstemperatur nicht linear an. Sie schwankt von 12,77 Zyklen bei 66,5 °C bis 13,56 Zyklen Differenz bei 66 °C zum WT bzw. von 15,79 Zyklen bei 65 °C bis 17,02 Zyklen Differenz bei 66 °C zur gDNA. Die Standardabweichungen bei 40 Kopien waren nicht linear von der Temperatur abhängig und mit Ausnahme von 66 °C sehr hoch. Da diese jedoch mit 0,255 in einem akzeptablen Rahmen lag, waren die hohen Abweichungen möglicherweise durch Ungenauigkeiten im Arbeitsablauf bedingt. Die Standardabweichung ist für weitere Tests ausschlaggebend.



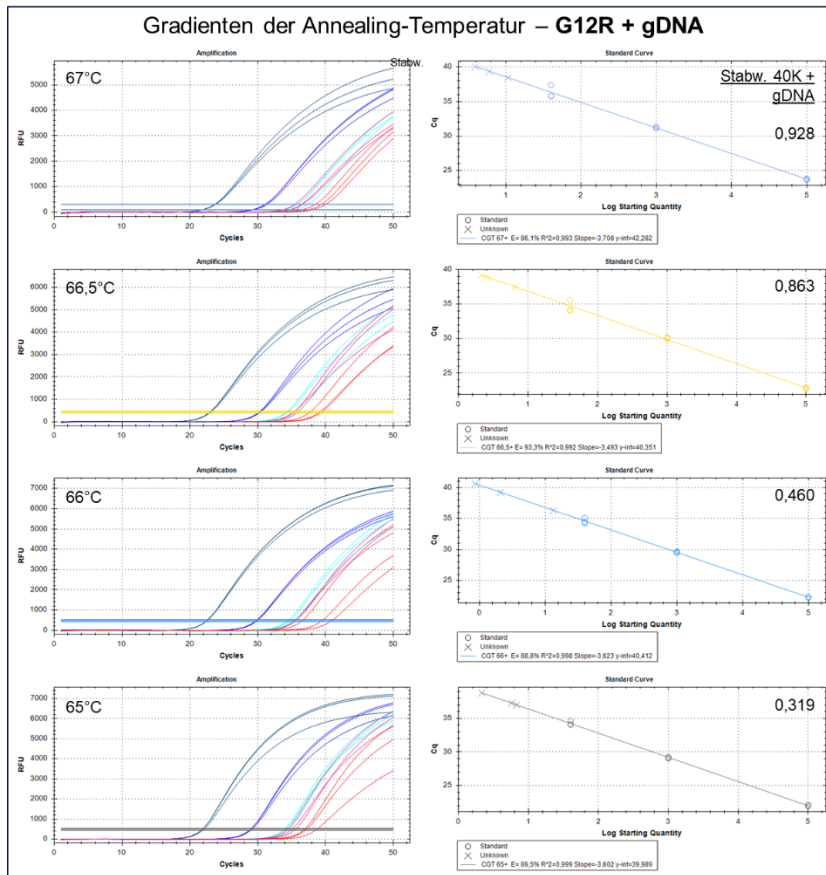
## Ergebnisse

Das Ziel der Gradienten ohne WT-Hintergrund war eine hohe Differenz der Cq-Werte zu den WT-Ansätzen. Das Ziel der Gradienten mit WT-Hintergrund war eine hohe Linearität der Verdünnungsreihe und eine geringe Standardabweichung der niedrigen Konzentrationen. Letzteres ist für die 65 °C-Ansätze des G12R-Primers in den Abbildungen 16 und 18 zu sehen.



**Abbildung 17** Gradienten-qPCR G12V mit WT-Hintergrund. Angegeben sind die jeweilige Anneling-Temperatur und die errechnete Standardabweichung des 40 Kopien-Verdünnungsschrittes. Anlagerungszeit war 40 Sek. Diese Verdünnungsreihen wurden gleichzeitig mit denen aus Abbildung 15 durchgeführt. Nur bei 67 °C ist die Verdünnungsreihe linear, bei den niedrigeren Anlagerungstemperaturen ist die Kurve krumm, die Effizienz ist falsch zu hoch. Die Linearität ist somit die ausschlaggebende Effektgröße für weitere Tests.

## Ergebnisse



**Abbildung 18** Gradienten-qPCR G12R mit WT-Hintergrund  
 Angegeben sind die jeweilige Anneling-Temperatur und die errechnete Standardabweichung des 40 Kopien-Verdünnungsschrittes. Anlagerungszeit war 40 Sek. Alle Verdünnungsreihen sind linear, was die hohe Spezifität bestätigt, die in der Verdünnungsreihe ohne WT-Hintergrund festgestellt wurde (Abb. 15). Somit ist hier die qPCR-Effizienz entscheidend, die sich in der Kurvensteigung und in den Standardabweichungen abbildet. Da letztere Temperaturabhängig anstiegen, kann die Temperatur von 65 °C diesbezüglich als die günstigste angesehen werden.

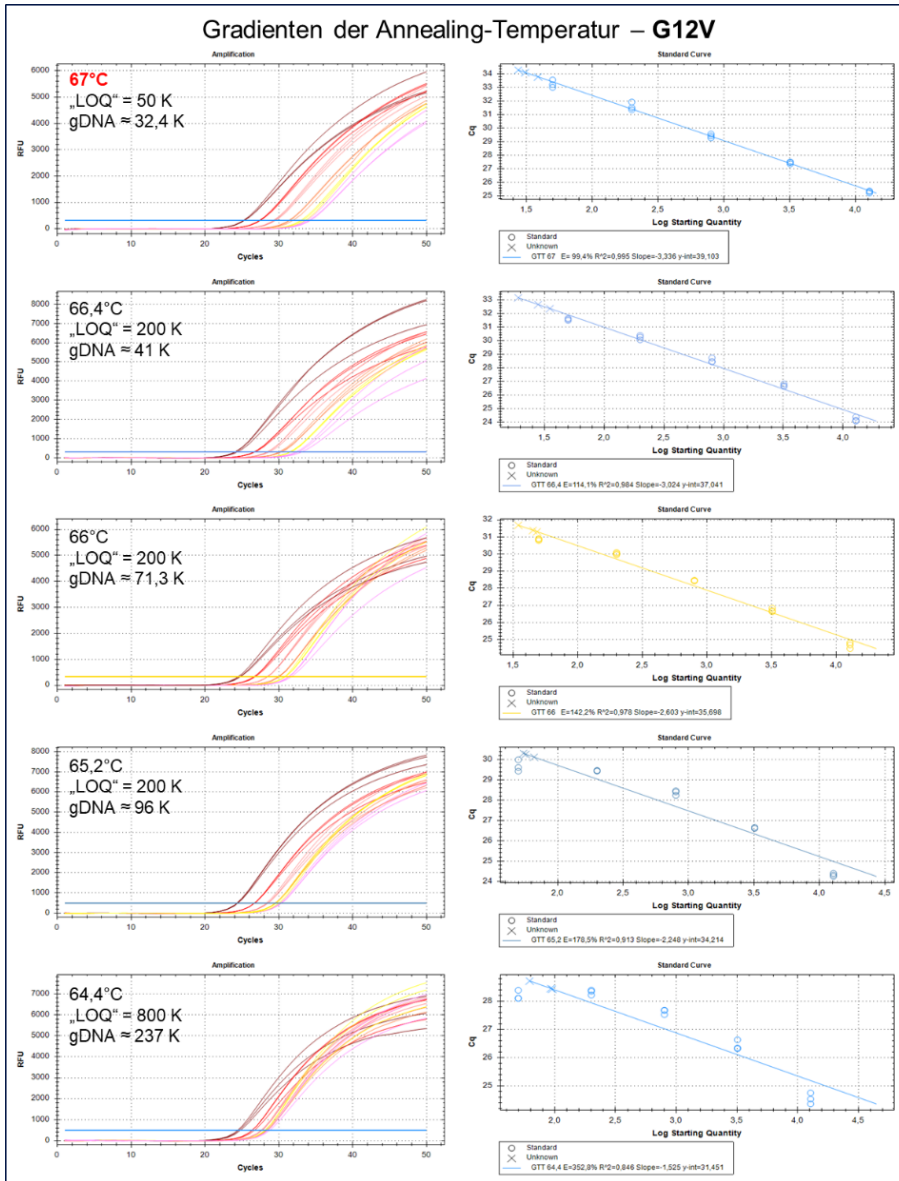
Anschließend wurden weitere qPCRs mit Temperaturgradienten in der Anneling-Temperatur durchgeführt, diesmal nur mit Ansätzen mit WT-Hintergrund von 100 ng gDNA pro qPCR und mit fünf Verdünnungsstufen – 12800, 3200, 800, 200 und 50 Kopien Standard pro qPCR, teilweise zusätzlich noch 12,5 Kopien, sowie ein Ansatz mit nur 100 ng gDNA. Diese Gradienten sollten die günstigsten Temperaturen für LOQ-Reihen festlegen, die basierend auf den Ergebnissen dieser Versuche geplant wurden. Aufgrund der Auswertung dieser Gradienten-qPCRs auf ihre Linearität hin, analog zu LOQ-Reihen, konnten potentielle Grenzen für die Quantifikation festgelegt werden.

Aus den Werten der Standards der Verdünnungsreihen wurden Standardreihen berechnet. Wichtig die berechnete Kopienzahl einer Verdünnungsstufe um mehr als 20% von der sich aus der berechneten Formel ergebenden Soll-Kopienzahl ab, so wurde diese Verdünnungsstufe ausgeschlossen und die nächst größere Kopienzahl als potentielles LOQ festgelegt. Im Gegensatz zu LOQ-Reihen wurden hier allerdings die einzelnen Verdünnungsstufen nur in Triplets angesetzt und es wurden auch weniger Verdünnungsschritte verwendet.

Für das falsch positive Signal der gDNA-Probe wurde anhand der Standards eine Kopienzahl berechnet und bei der Gesamtauswertung berücksichtigt. Da diese Gradienten pro Verdünnungsstufe nur Triplets beinhalteten, konnte von einem tendenziell besseren Ergebnis als bei einer LOQ-Reihe mit Heptetts und mehr Verdünnungsschritten ausgegangen werden. Die Ergebnisse dieser Gradienten sind in den Abbildungen 19-27 dargestellt. Die bestgeeigneten

## Ergebnisse

Temperaturen lagen bei 67 ° (G12D (hier nicht gezeigt, da in mehreren verschiedenen Vorversuchen ermittelt) und G12V), 65,5 ° (G13D) und 65 ° (G12A, G12S, G12C, G12R).

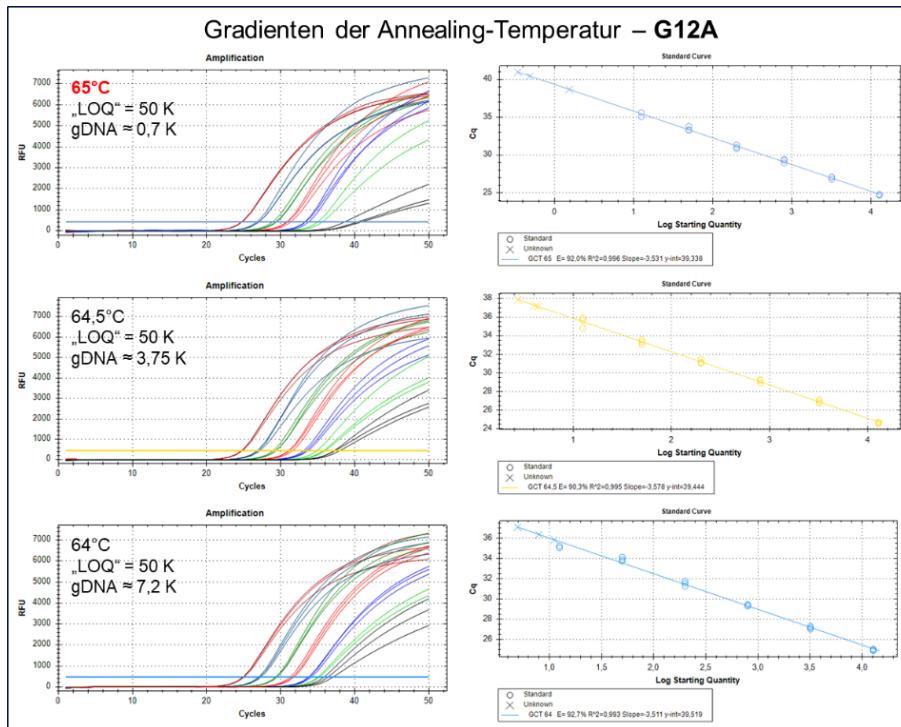


**Abbildung 19** qPCR mit Temperaturgradienten für G12V

Verdünnungsstufen von 12.800 bis 50 Kopien pro qPCR mit 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 64,4 °C-67 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit.

Die Gradienten zeigen, wie schon die vorherigen Gradienten in Abb. 15 und 17, dass dieser Primer in seiner Spezifität stark temperaturabhängig ist. Alle Verdünnungsreihen unter 67 °C sind als Ganzes falsch zu effizient berechnet, mit der Folge eines potenziellen LOQs von 200 Kopien oder mehr. Zusätzlich dazu sind die falsch positiven Signale des gDNA-Ansatzes sehr hoch (auch noch bei 67 °C). Somit kommt nur die höchste Temperatur für eine Quantifizierung in Betracht (in Rot gehalten).

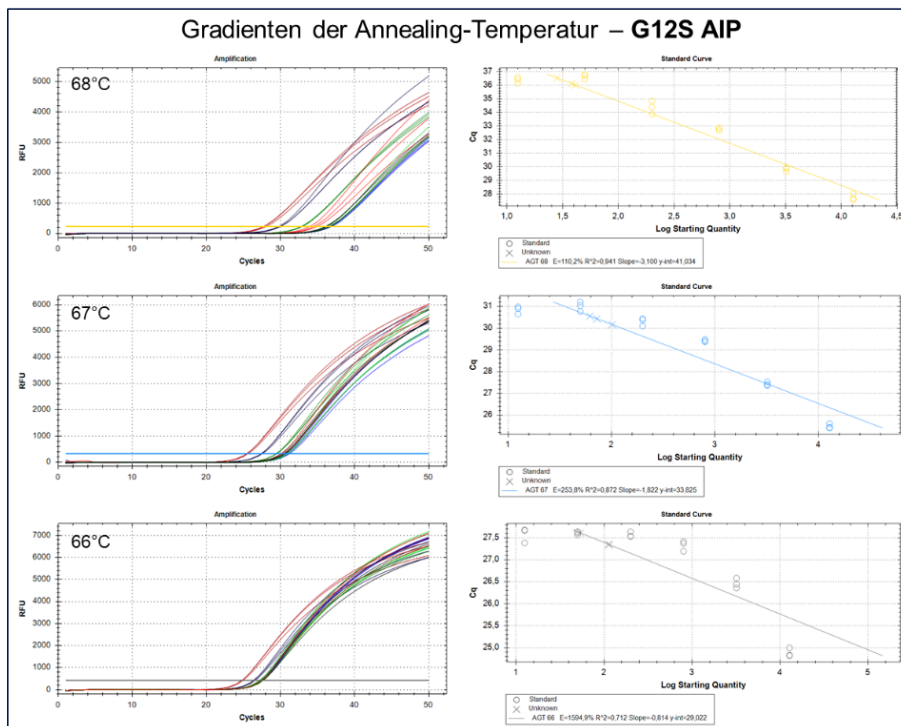
## Ergebnisse



bestgeeignete. Der potentielle LOQ liegt bei 50 Kopien, die 12,5 Kopien fallen nur knapp aus der Berechnung heraus (Abweichung von 20,4%).

**Abbildung 20** qPCR mit Temperaturgradienten für G12A

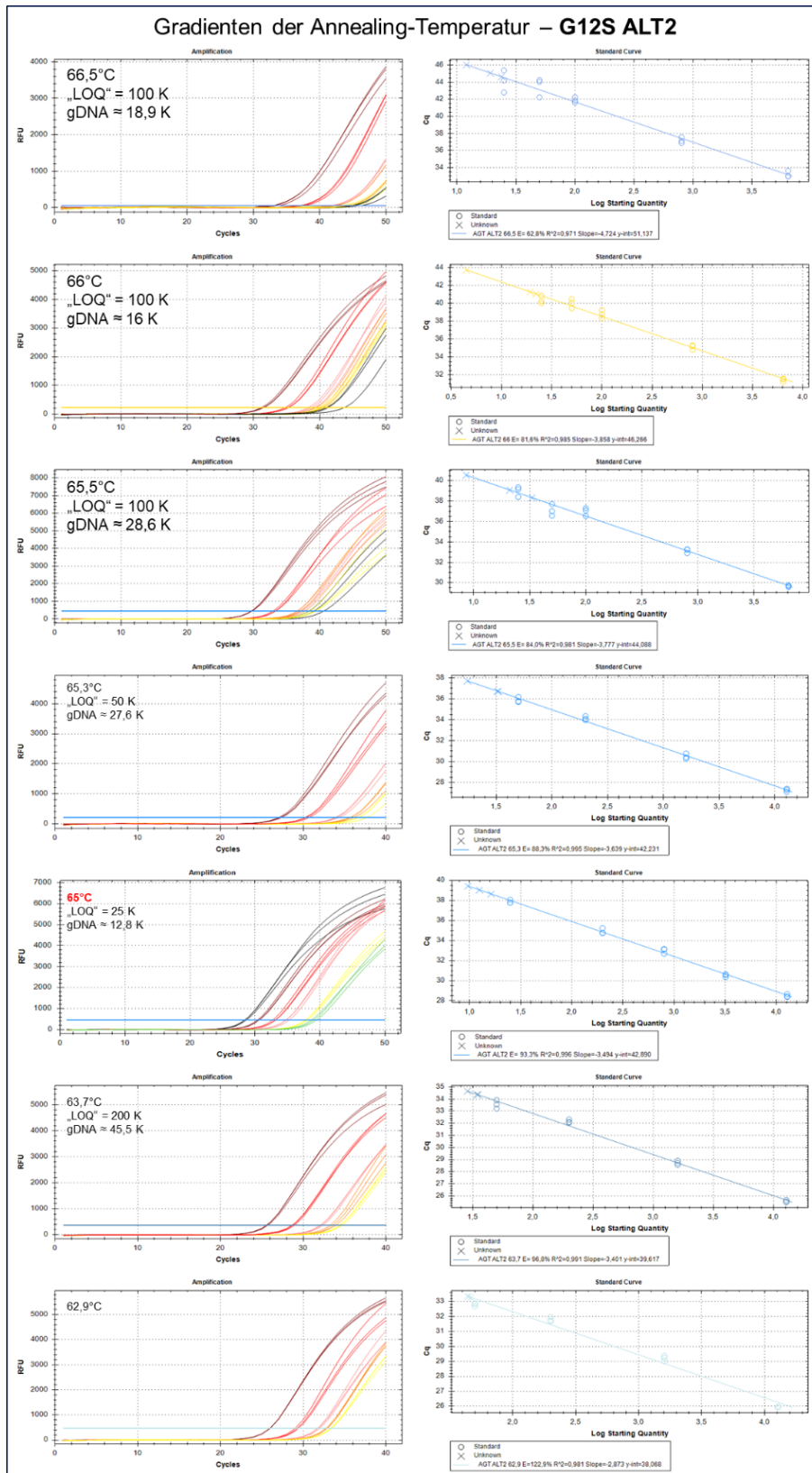
Verdünnungsstufen von 12.800 bis 12,5 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 64 °C-65 °C, 40 Sek. Anlagerungszeit. Die Kurve bei 64 °C zeigt noch eine zu geringe Spezifität, da der Cq der Probe mit 12,5 Kopien Template deutlich nach unten von der Kurve abweicht. Ab 64,5 °C ist die Kurve linear, bei 65 °C ist der falsch positive Wert für die gDNA jedoch viel geringer, 0,7 statt 3,75 errechnete Kopien. Somit ist diese Temperatur die



**Abbildung 21** qPCR mit Temperaturgradienten für G12S AIP (hiernach verworfen)

Verdünnungsstufen von 12.800 bis 12,5 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 66 °C-68 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit. Die Verdünnungsreihen zeigen alle keine Linearität. Die Effizienz bei der höchsten Temperatur beträgt immer noch 110%. Der spezifische Primer G12S AIP wurde daraufhin verworfen.

## Ergebnisse



**Abbildung 22** qPCR mit Temperaturgradienten für G12S ALT2

Zusammengesetzt aus 3 qPCR-Läufen: 1) Verdünnungsstufen von 12.800, 1.600, 200, 50 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 65,3 °C, 63,7 °C und 62,9 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit.

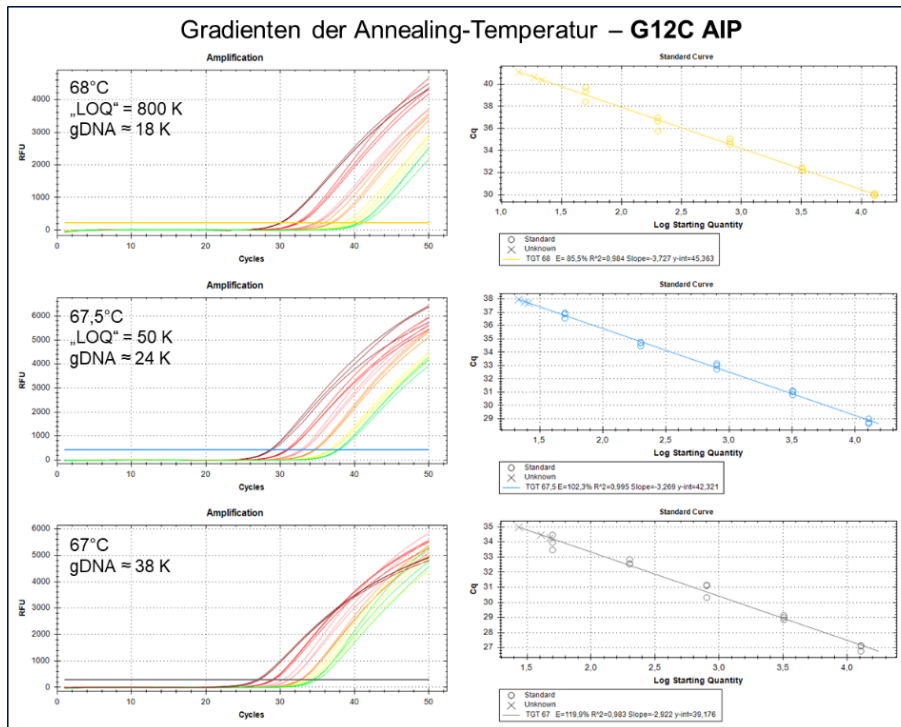
2) Verdünnungsstufen von 6.400, 800, 100, 50, 25 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 66,5 °C, 66 °C und 65,5 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit.

3) Verdünnungsstufen von 12.800, 3.200, 800, 200, 25 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperatur von 65 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit.

Da es sich um drei separate qPCR-Durchgänge handelt, können die Werte nicht absolut verglichen werden, die Ergebnisse sind jedoch eindeutig. Die niedrigsten Temperaturen zeigen eine zu hohe Effizienz, hohe falsch positive Signale der gDNA-Ansätze und krumme Kurven. Die hohen Temperaturen zeigen zu hohe Standardabweichungen. Die besten Ergebnisse konnten um 65 °C herum erzielt werden.



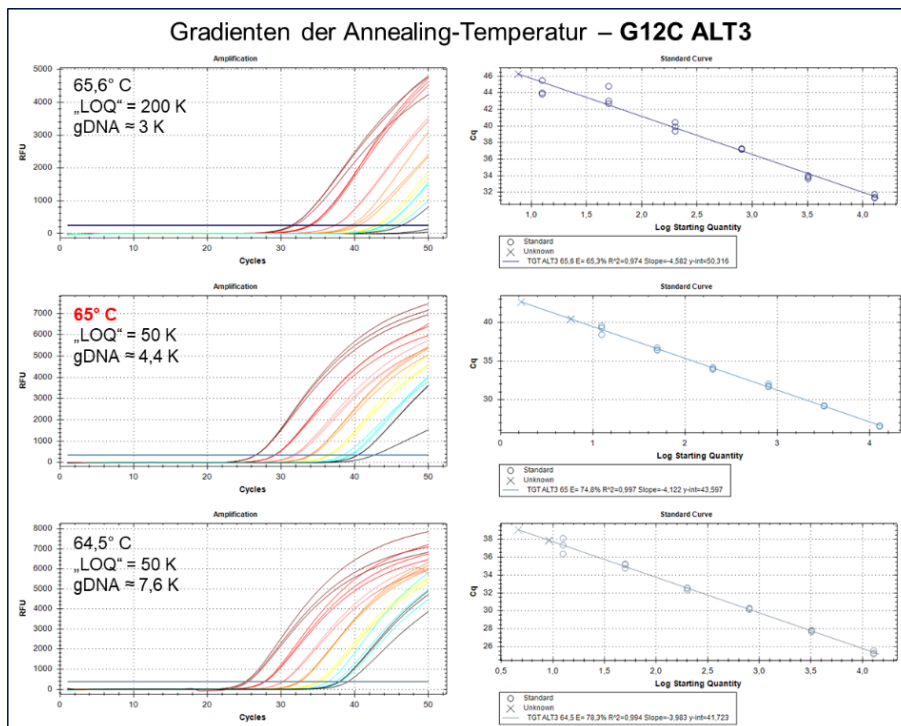
## Ergebnisse



**Abbildung 23** qPCR mit Temperaturgradienten für G12C AIP (hiernach verworfen)

Verdünnungsstufen von 12.800 bis 50 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 67 °C-68 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit.

Die Effizienzen der unteren Temperaturen sind falsch zu hoch, bei der höchsten Temperatur sind die Standardabweichungen zu hoch. Bei allen Anlagerungstemperaturen ist das falsch positive Signal der gDNA-Probe hoch. Daher wurde der G12C AIP Primer verworfen.



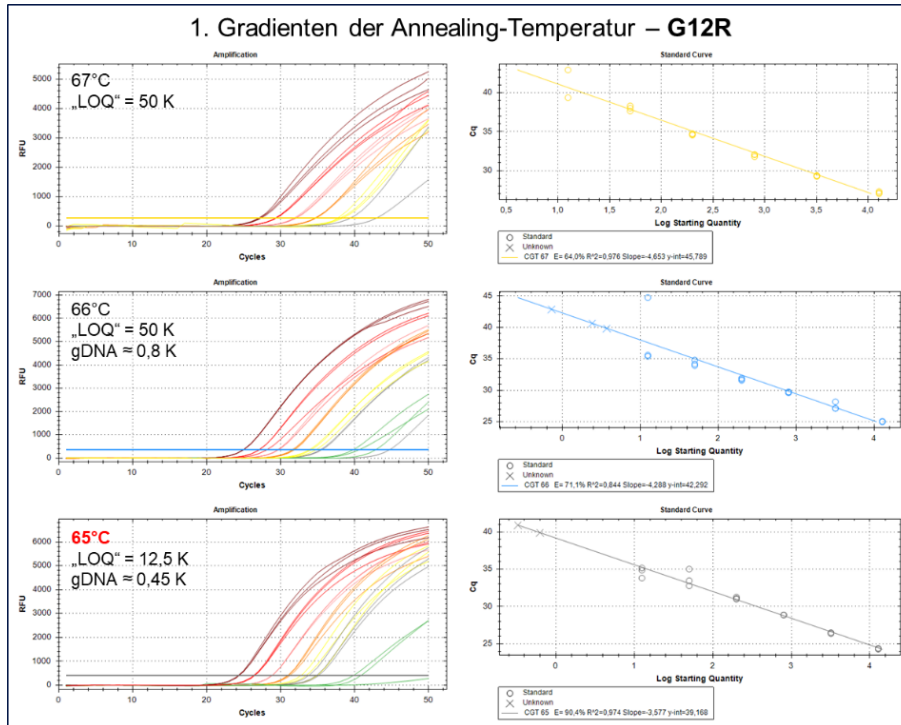
**Abbildung 24** qPCR mit Temperaturgradienten für G12C ALT3

Verdünnungsstufen von 12.800 bis 12,5 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 64,5 °C-65,6 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit.

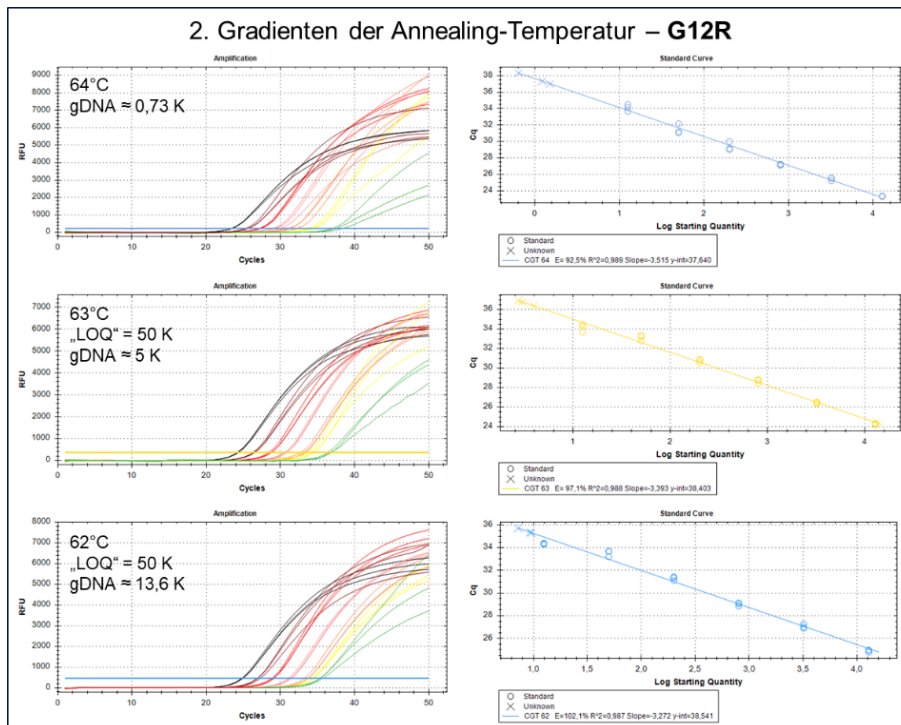
Die Linearität aller Verdünnungsreihen ist akzeptabel. Die Standardabweichungen bei der höchsten Temperatur sind zu hoch, der potenzielle LOQ liegt nur bei 200 Kopien. Daher ist die errechnete Kopienzahl der falsch positiven Detektion der gDNA-Probe ausschlaggebend. Somit ist

65 °C für weitere Tests am aussichtsreichsten.

## Ergebnisse



Standardabweichungen diesen Primer disqualifizieren, musste in der LOQ-Reihe getestet werden.



gelassenen Abweichung von 20% des Sollwerts. Daher bleibt die Anlagerungstemperatur von 65 °C aus Gradient 1 vermutlich am geeignetsten (Abb. 25).

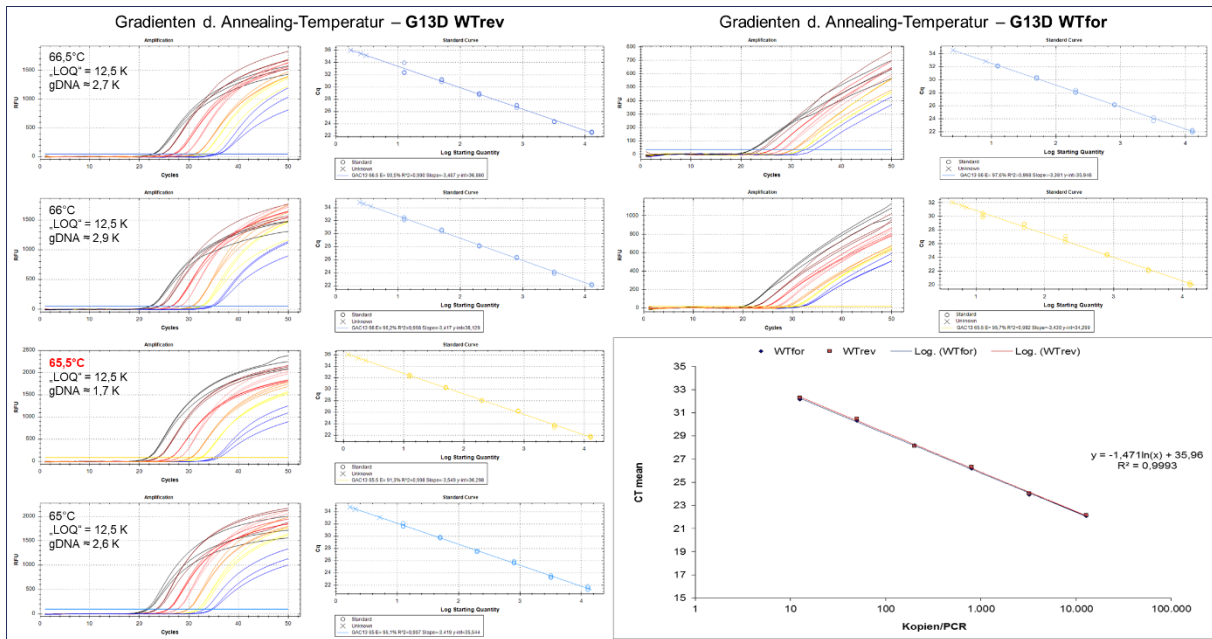
**Abbildung 25** qPCR mit Temperaturgradienten für G12R AIP

Verdünnungsstufen von 12.800 bis 12,5 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 65 °C-67 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit. Linearität und Spezifität sind für alle Temperaturen gut. Die Standardabweichungen sind problematisch, jedoch nicht direkt temperaturabhängig, sondern möglicherweise durch Pipettierfehler bedingt. Die günstigste Temperatur ist 65 °C, auch unter Berücksichtigung des zweiten Gradienten (Abbildung 26). Ob die Standardabweichungen diesen Primer disqualifizieren, musste in der LOQ-Reihe getestet werden.

**Abbildung 26** qPCR mit Temperaturgradienten für G12R AIP

Verdünnungsstufen von 12.800 bis 12,5 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 62 °C-64 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit. Unterhalb von 64 °C sinkt die Spezifität deutlich ab, sichtbar durch steigende falsch positive Signale der gDNA-Proben und falsch zu hoch berechnete qPCR-Effizienzen der Verdünnungsreihen. 64 °C ist linear, aber durch hohe Standardabweichungen unterhalb von 800 Kopien nicht mehr im Rahmen der maximal zugelassenen Abweichung von 20% des Sollwerts. Daher bleibt die Anlagerungstemperatur von 65 °C aus Gradient 1 vermutlich am geeignetsten (Abb. 25).

## Ergebnisse



**Abbildung 27** qPCRs mit Temperaturgradienten für G13D AIP

1) Gradienten mit Reverse-Sonde (links): Verdünnungsstufen von 12.800 bis 12,5 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 65 °C-66,5 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit.

2) Gradienten mit Forward-Sonde (rechts): Verdünnungsstufen von 12.800 bis 12,5 Kopien pro qPCR mit je 100 ng gDNA Hintergrund pro Well. Anlagerungstemperaturen von 65,5 °C-66 °C, 30 Sek. Anlagerungszeit. Rechts unten sind die beiden Verdünnungsreihen bei 66 °C übereinandergelegt.

Durch die Überschneidung der Forward-Sonde mit dem spezifischen Forward-Primer ist die qPCR mit dieser Sonde etwas gehemmt. Dies schlägt sich in den Amplifikationskurven nieder – sie sind sehr flach, wie hier zu erkennen ist. Durch die Verwendung der Reverse-Sonde ließ sich diese Hemmung umgehen. Die Verdünnungsreihen mit beiden Sonden sind jedoch deckungsgleich, wie die Graphik mit den beiden Kurven bei 66 °C belegt. Da das falsch positive Signal der gDNA-Probe unter Verwendung der Reverse-Sonde niedriger war und somit die Spezifität höher, wurde diese im Weiteren verwendet.

Die Effizienzen aller qPCRs sind gut, die Standardabweichungen sind nur in den 12,5 Kopien-Ansätzen bei 66,5 °C mit WTrev-Sonde und bei 65,5 °C hoch. Die Sensitivität gegenüber falsch positiven Signalen durch die gDNA ist akzeptabel. Nachfolgend wurde 65,5 °C mit WTrev-Sonde als günstigste Konstellation erachtet.

### 3.1.2.4 LOD- und LOQ-Reihen

Um die Grenzen der Quantifikation der einzelnen Primerkonstellationen zu definieren, wurden, wie in Abschnitt [2.2.3.2](#) beschrieben, Verdünnungsreihen in Heptetts pipettiert. Als Anlagerungstemperaturen und -zeiten dienen zunächst die geeignetsten ermittelten Werte aus den vorherigen Gradienten. Die Auswertung ist in Abschnitt [2.1.5](#) erläutert.

Für den Fall, dass die Ergebnisse stark von den Erwartungen abwichen, konnten nachfolgend Parameter angepasst werden, die als kausal für die Probleme erachtet wurden. Bei hohen Standardabweichungen aber guter Spezifität gegenüber dem WT konnte beispielsweise die Anlagerungszeit verlängert werden. Bei hohen Standardabweichungen aber mittelmäßiger Spezifität wurde die Anlagerungstemperatur gesenkt. Bei guten Standardabweichungen aber schlechter Spezifität wurde entweder die Anlagerungstemperatur erhöht oder die Anlagerungszeit verkürzt (letzteres war hier in keinem Fall erfolgreich). Wenn schlechte Ergebnisse vermutlich auf Ungenauigkeiten im Arbeitsablauf zurückzuführen waren, wurde die Reihe unter

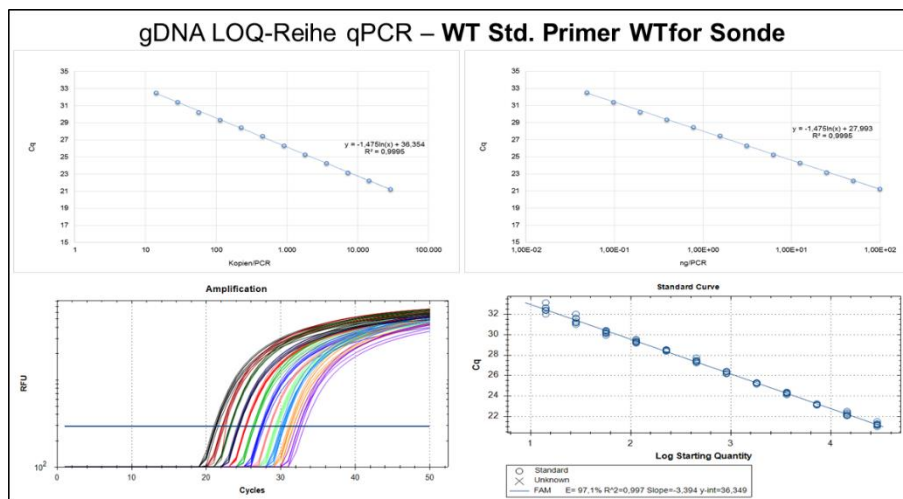


## Ergebnisse

den gleichen Konditionen wiederholt. Anzeichen hierfür waren beispielsweise hohe Abweichungen einzelner Wells oder abweichende Werte für Schritte in der Mitte der Verdünnungsreihe. Falls diese Anpassungen erfolglos blieben, musste der Primer ersetzt werden.

LOQ-Reihen wurden für die mutationsspezifischen qPCRs mittels der artifiziellen mutations-tragenden Fragmente sowie für den mutationsunspezifischen *KRAS*-Std-Primer (*KRAS*-Standard) mit gDNA-Template durchgeführt. Teilweise liegen die angegebenen Kopienzahlen außerhalb der ganzen Zahlen und sind rechnerische Kopienzahlen, die sich aus den Verdünnungen ergeben.

Die LOD-Werte wurden in der Regel durch die falsch positiven Werte der 100 ng gDNA-Probe statt durch eine Bestimmung der generellen Detektionsgrenze bestimmt. Die Definition war, dass das LOD einen Zyklus unterhalb des niedrigsten gemessenen C<sub>q</sub>-Wertes für 100 ng gDNA lag. Diese Definition für eine in-vivo-Detektion ist sehr konservativ, da erstens 100 ng pro qPCR bei einer cfDNA-Messung fast nie erreicht werden – ein solcher Wert entspräche bei dieser qPCR und einer vorherigen 40-fachen Aufkonzentrierung bei der cfDNA-Isolierung einer ursprünglichen cfDNA-Konzentration im Plasma von über 780 ng/ml. Zweitens wurde hier ein ganzer Zyklus unterhalb von der niedrigsten von sieben Messungen als Abstand festgelegt. Der durchschnittliche C<sub>q</sub> der falsch positiven gDNA-Werte lag in der Regel viel höher. Diese vorsichtige Regelung diente dem spezifischen Ausschluss möglicher falsch positiver Ergebnisse.

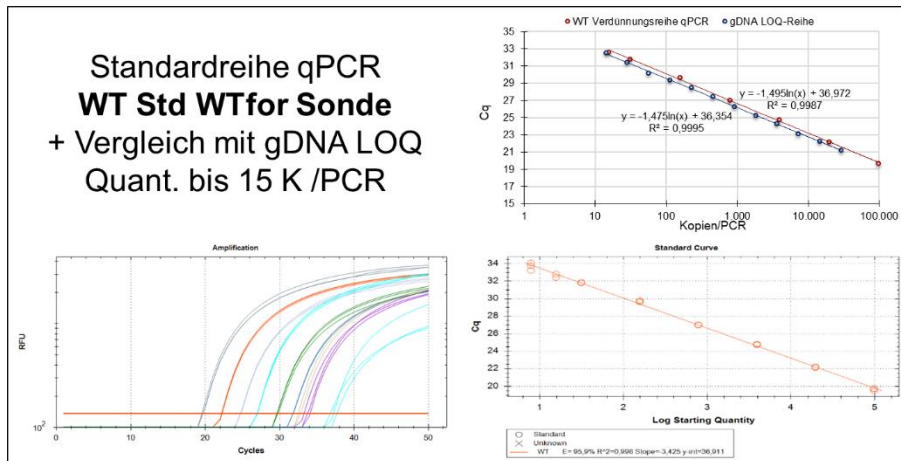


**Abbildung 28** qPCR LOQ-Reihe *KRAS* WT LOQ-Reihe mit dem WT-Std-Primer und der WTfor-Sonde bei 67 °C Anlagerungstemperatur und 30 Sek. Anlagerungszeit. Es wurde gDNA-Template in Konzentrationen von 100-0,05 ng pro Well in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, dies entspricht 29000 bis 14,16 errechneten WT-Kopien. Alle Verdünnungsschritte wurden in Heptetts pipet-

tiert.

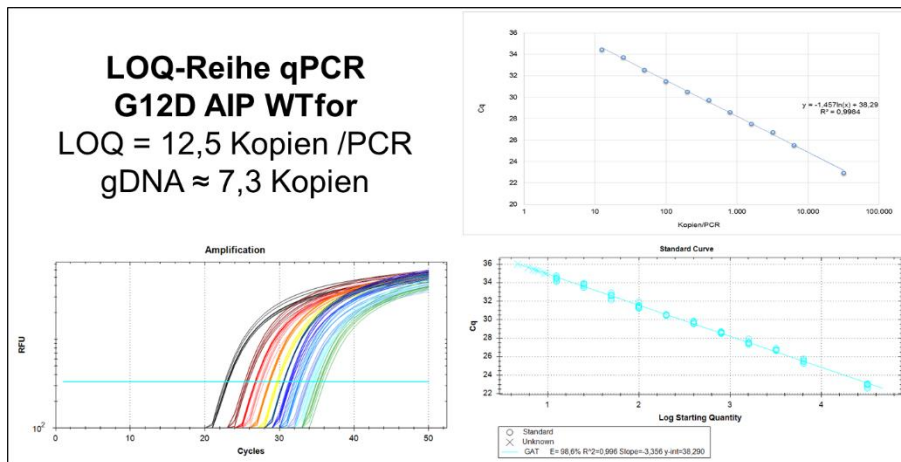
Alle gemittelten Abweichungen der Verdünnungsschritte lagen bei der Auswertung innerhalb von 20% des Sollwertes, somit betrug das ermittelte LOQ 0,05 ng bzw. 14,2 Kopien WT pro qPCR.

## Ergebnisse



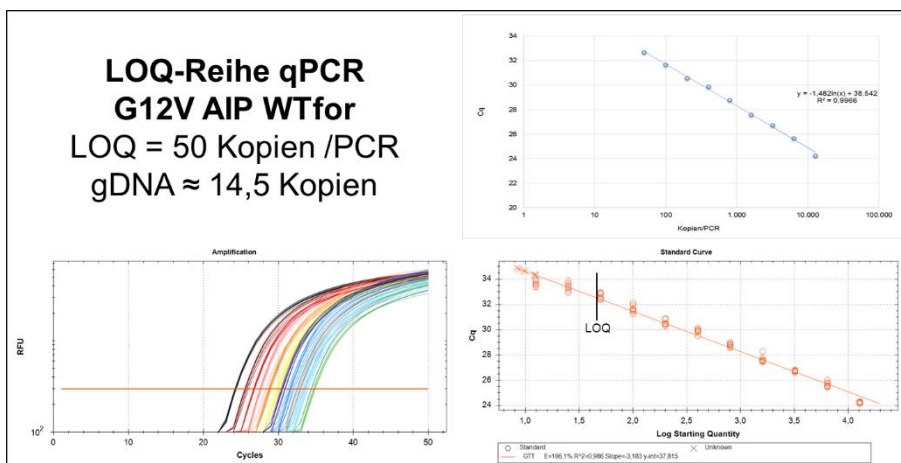
**Abbildung 29** qPCR Verdünnungsreihe *KRAS* WT Verdünnungsreihe mit dem WT-Std-Primer und der WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden künstliche WT-Fragmente als Template in Konzentrationen von 97656-15,6 Kopien pro Well eingesetzt. Alle Verdünnungsschritte wurden in Triplets pipettiert. Die Graphik oben rechts

zeigt die Standardreihe und die gDNA-LOQ-Reihe aus Abbildung 28 im direkten Vergleich. Die Kurven liegen parallel und sind nur leicht um einen halben Zyklus auf der Y-Achse verschoben. Diese Verdünnungsreihe wurde zeitlich deutlich später angesetzt, als die LOQ-Reihen der qPCR, unterstreicht aber, dass WT-Fragmente und gDNA in der qPCR gleichwertige Templates darstellen.



**Abbildung 30** qPCR LOQ-Reihe *KRAS* G12D LOQ-Reihe mit dem G12D AIP-Primer und der WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12D-Mutation in Konzentrationen von 32000 Kopien und 6400-12,5 Kopien pro Well in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 100 ng

gDNA, sowie ein Ansatz mit nur 100 ng gDNA. Alle Verdünnungsschritte wurden in Heptetts pipettiert. Das LOQ für G12D AIP WTfor liegt bei 12,5 Kopien pro qPCR, das falsch positive Signal für 100 ng gDNA bei ca. 7,3 Kopien. Das LOQ dieser qPCR entspricht auch dem LOD, das durch das falsch positive Signal bedingt wird.

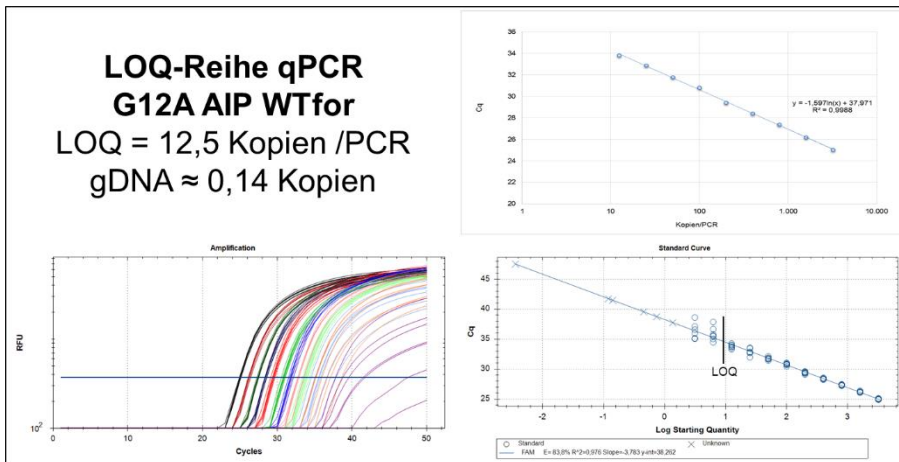


**Abbildung 31** qPCR LOQ-Reihe *KRAS* G12V LOQ-Reihe mit dem G12V AIP2-Primer und der WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12V-Mutation in Konzentrationen von 12800-12,5 Kopien pro Well in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 100 ng gDNA, sowie ein Ansatz

mit nur 100 ng gDNA. Alle Verdünnungsschritte wurden in Heptetts pipettiert.

## Ergebnisse

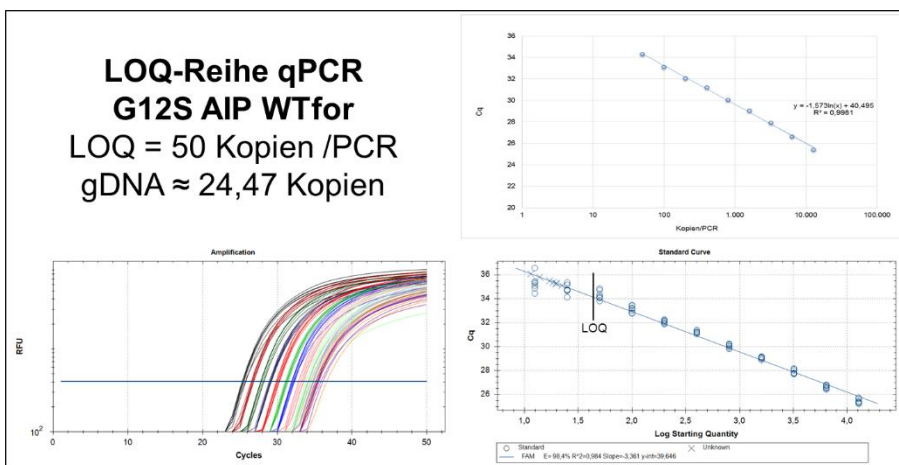
Das LOQ für G12V AIP WTfor liegt bei 50 Kopien pro qPCR, das falsch positive Signal für 100 ng gDNA bei ca. 14,5 Kopien. Somit bedingt das LOQ auch das LOD dieser qPCR, welches hier auf einen Cq von 33,5 festgelegt wurde (einen Zyklus unterhalb dem niedrigsten falsch positiven Signal), was einer Kopienzahl von 30 entspricht.



**Abbildung 32** qPCR LOQ-Reihe KRAS G12A LOQ-Reihe mit dem G12A AIP-Primer und der WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungs-temperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12A-Mutation in Konzentrationen von 3200-3 Kopien pro Well in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 100 ng gDNA, sowie ein Ansatz

mit nur 100 ng gDNA. Alle Verdünnungsschritte wurden in Heptetts pipettiert.

Das LOQ für G12A AIP WTfor liegt bei 12,5 Kopien pro qPCR. Das LOD dieser qPCR wird durch das falsch positive Signal bedingt. Als LOD wurde ein Cq von 36,5 festgelegt (einen Zyklus unterhalb dem niedrigsten falsch positiven Signal), was einer Kopienzahl von 2,5 entspricht. Das durchschnittliche falsch positive Signal für 100 ng gDNA lag jedoch deutlich höher, bei einem Cq von 41, was einer Kopienzahl von 0,14 entspräche.

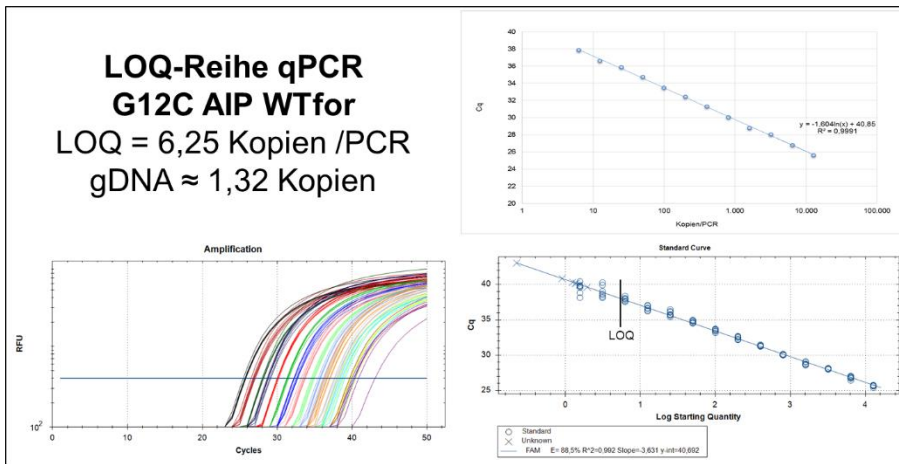


**Abbildung 33** qPCR LOQ-Reihe KRAS G12S LOQ-Reihe mit dem G12S AIP-Primer und der WTfor-Sonde bei 64,5 °C und 30 Sek. Anlagerungs-temperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12S-Mutation in Konzentrationen von 12800-12,5 Kopien pro Well in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 100 ng gDNA, sowie ein Ansatz

mit nur 100 ng gDNA. Alle Verdünnungsschritte wurden in Heptetts pipettiert.

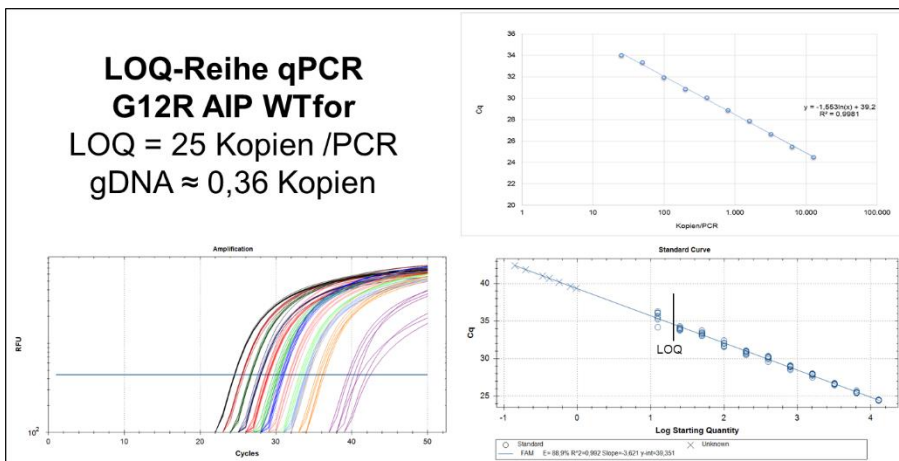
Das LOQ für G12S AIP WTfor liegt bei 50 Kopien pro qPCR. Das LOD dieser qPCR wird durch das falsch positive Signal bedingt. Als LOD wurde ein Cq von 35,5 festgelegt (einen Zyklus unterhalb dem niedrigsten falsch positiven Signal für 100 ng gDNA), was einer Kopienzahl von 45 entspricht. Dieser Primer war bereits der Beste aus vier getesteten Alternativen.

## Ergebnisse



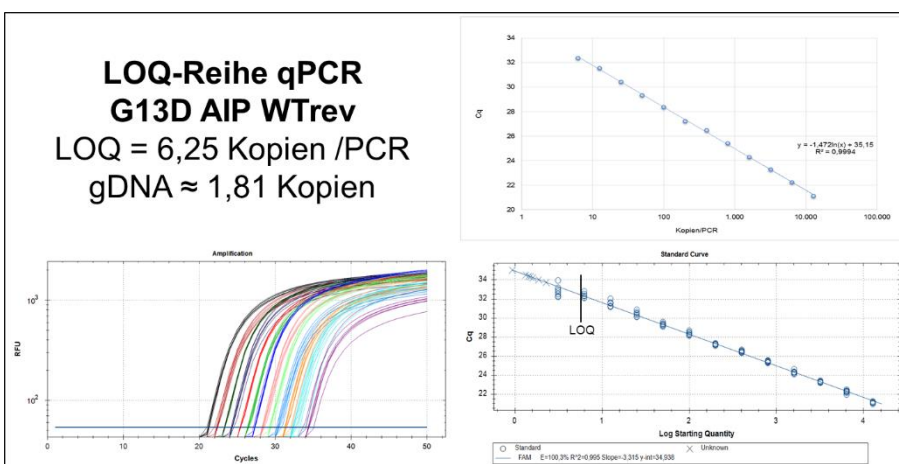
**Abbildung 34** qPCR LOQ-Reihe KRAS G12C LOQ-Reihe mit dem G12C AIP-Primer und der WTfor-Sonde bei 65 °C und 40 Sek. Anlagerungs-temperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12C-Mutation in Konzentrationen von 12800-1,56 Kopien pro Well in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 100 ng gDNA, sowie ein Ansatz

mit nur 100 ng gDNA. Alle Verdünnungsschritte wurden in Heptetts pipettiert. Das LOQ für G12C AIP WTfor liegt bei 6,25 Kopien pro qPCR. Das LOD dieser qPCR wird durch das falsch positive Signal für 100 ng gDNA bedingt. Als LOD wurde ein Cq von 38,5 festgelegt (einen Zyklus unterhalb dem niedrigsten falsch positiven Signal), was einer Kopienzahl von 4,2 entspricht. Dieser Primer wurde in einer zweiten Etablierungsrunde entworfen, da der ursprünglich entworfene nicht spezifisch gewesen war.



**Abbildung 35** qPCR LOQ-Reihe KRAS G12R LOQ-Reihe mit dem G12R AIP-Primer und der WTfor-Sonde bei 66 °C und 40 Sek. Anlagerungs-temperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12R-Mutation in Konzentrationen von 12800-12,5 Kopien pro Well in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 100 ng gDNA, sowie ein Ansatz

mit nur 100 ng gDNA. Alle Verdünnungsschritte wurden in Heptetts pipettiert. Das LOQ liegt bei 25 Kopien pro qPCR. Das LOD dieser qPCR wird durch das falsch positive Signal für 100 ng gDNA bedingt. Als LOD wurde ein Cq von 38,4 festgelegt (einen Zyklus unterhalb dem niedrigsten falsch positiven Signal), was einer Kopienzahl von 1,67 entspricht.



**Abbildung 36** qPCR LOQ-Reihe KRAS G13D LOQ-Reihe mit dem G13D AIP-Primer und der WTrev-Sonde bei 65,5 °C und 30 Sek. Anlagerungs-temperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G13D-Mutation in Konzentrationen von 12800-3,13 Kopien pro Well in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 100 ng

## Ergebnisse

gDNA, sowie ein Ansatz mit nur 100 ng gDNA. Alle Verdünnungsschritte wurden in Heptetts pipettiert. Das LOQ für G13D AIP WTrev liegt bei 6,25 Kopien pro qPCR. Das LOD dieser qPCR wird durch das falsch positive Signal für 100 ng gDNA bedingt. Als LOD wurde ein C<sub>q</sub> von 33 festgelegt (etwa einen Zyklus unterhalb dem niedrigsten falsch positiven Signal), was einer Kopienzahl von 4,3 entspricht.

Die Primerkonstellationen, die finalen qPCR-Bedingungen sowie LODs und LOQs sind in den Tabellen 9, 11 und 12 in Abschnitt 2.6 aufgelistet. Die ermittelten LOQs reichten von 50 Kopien für G12V und G12 S über 25 Kopien (G12R) und 12,5 Kopien (G12D, G12A) bis hin zu 6,25 Kopien für G12C und G13D (Mittelwert: 23,2 K, Median: 12,5 K). Das LOQ für den WT Std Primer lag bei 14,2 Kopien bzw. 0,05 ng gDNA. Die LODs lagen zwischen 45 und 1,7 Kopien (G12D: 12,5 K, G12V: 30 K, G12A: 2,5 K, G12S: 45 K, G12C: 4,2 K, G12R: 1,7 K, G13D: 4,3 K, Mittelwert: 14,3 K, Median: 4,3 K). Bei einigen Mutationen wurden mehrere Primerkombinationen und Konstellationen getestet und die beste ausgewählt.

Durch verschiedene Ergänzungen hätten diese Werte möglicherweise noch verbessert werden können, wie zum Beispiel durch den Einsatz von WT-Blockern in der qPCR oder den Einbau von hochspezifischen modifizierten Nukleotiden an den mutierten Basen in den Arms-Primern. Da die qPCR jedoch nur Teil der Gesamtmethode sein sollte, wurde auf diese Zusätze verzichtet.

### 3.1.3 Etablierung der nested qPCR mit Blocking-Primer

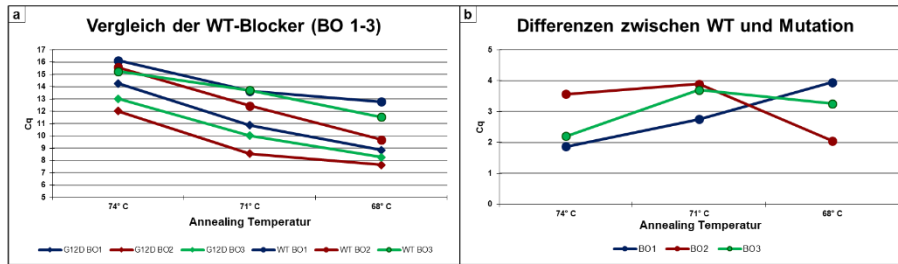
#### 3.1.3.1 Auswahl des Blocking-Primers

Im zweiten Hauptschritt der Etablierung wurde die Erstrunden-PCR zur Aufkonzentrierung mutierter *KRAS*-Fragmente getestet und optimiert. Zunächst war entscheidend, einen Blocking-Primer zu etablieren, der effizient *KRAS*-WT binden und somit blockieren und gleichzeitig die Amplifikation der mutierten Fragmente möglichst wenig beeinflussen sollte. Dies war in hohem Grade abhängig von der Anlagerungstemperatur der PCR, da der Blocking-Primer aus Kostengründen ohne LNA-Basen oder PNA-Basen auskommen sollte. Die Affinität des Blocking-Primers zum WT musste somit die zu den mutierten Basen bei weitem übertreffen.

Die Etablierung startete mit drei verschiedenen Blocking-Primern, genannt BO1, BO2, BO3 für „Blocking-Oligonukleotid“ 1-3, welche mit dem Forward-Primer konkurrieren, durch eine 3'-Modifikation jedoch von der Polymerase in der PCR nicht verlängert werden können. Diese wurden in einer Endrunden-PCR, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben, eingesetzt – zunächst mit Temperaturgradienten im Anlagerungsschritt. Die Produkte wurden verdünnt und in die fertig etablierte qPCR eingesetzt. Auf der Basis erster grobmaschiger Gradienten folgten detailliertere, darauf aufbauende Folgegradienten. Die ersten Versuche wurden nicht mit der letztendlich verwendeten Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase (s. Abschnitt 2.2.3.3) durchgeführt, sondern mit HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dies ist in den Ergebnisbeschreibungen jeweils angegeben.



## Ergebnisse

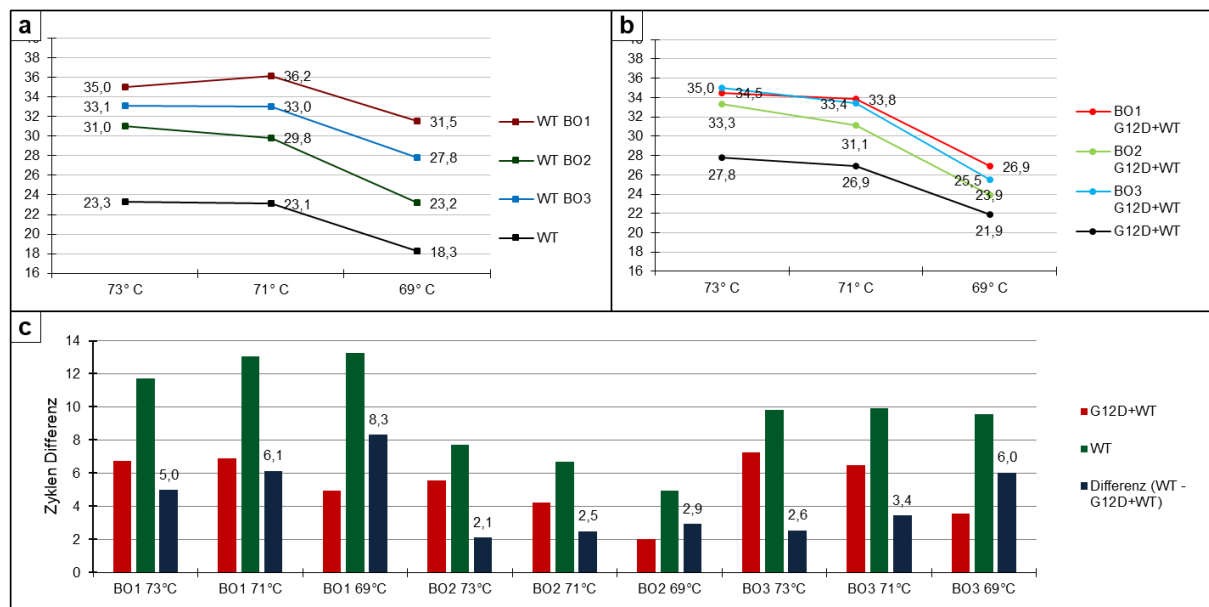


**Abbildung 37** Etablierung der Blocking-Primer I

Es wurden drei verschiedene Blocking-Primer getestet: BO1, BO2, BO3. Die Erstrunden-PCR wurde mit drei verschiedenen Anlagerungstemperaturen – 74 °C, 71 °C und

68 °C – in einem Gradienten durchgeführt. Verwendet wurde die HotStarTaq Plus DNA Polymerase. Die Zweitrunde wurde mit dem WT Std Primer und der WTfor-Sonde durchgeführt. Templates waren 62500 Kopien – entweder G12D oder WT. a) zeigt die absoluten Cq-Werte, b) die Differenzen der WT- und der G12D-Werte bei identischen Temperaturen.

Die effizientesten Bedingungen zeigten BO1 bei 68 °C und BO2 und BO3 bei 71 °C mit jeweils ca. 4 Zyklen Differenz. Die absoluten Cq-Werte der G12D-Messung bei diesen Temperaturen lagen nah beieinander (8,5-10).



**Abbildung 38** Etablierung der Blocking-Primer II

Es wurden drei verschiedene Blocking-Primer getestet: BO1, BO2, BO3. Die Erstrunden-PCR wurde mit drei verschiedenen Anlagerungstemperaturen – 73 °C, 71 °C und 69 °C – in einem Gradienten durchgeführt. Verwendet wurde die HotStarTaq Plus DNA Polymerase. Die Zweitrunde wurde mit dem WT Std Primer für die WT-Ansätze und dem G12D-AIP für die G12D+WT-Ansätze und der WTfor-Sonde durchgeführt. Templates waren entweder je 62500 Kopien G12D+WT oder nur WT. G12D+WT wurde verwendet, um eine Beeinflussung der G12D-Amplifikation durch die WT-DNA zu untersuchen. a) zeigt die absoluten Cq-Werte der WT-Ansätze, b) die absoluten Cq-Werte der G12D+WT-Ansätze, c) die Differenzen der WT- und der G12D+WT-Werte der jeweiligen Temperaturen sowie die Differenz aus diesen zwei Differenzen, welche in etwa der Aufkonzentrierung entsprechen sollte.

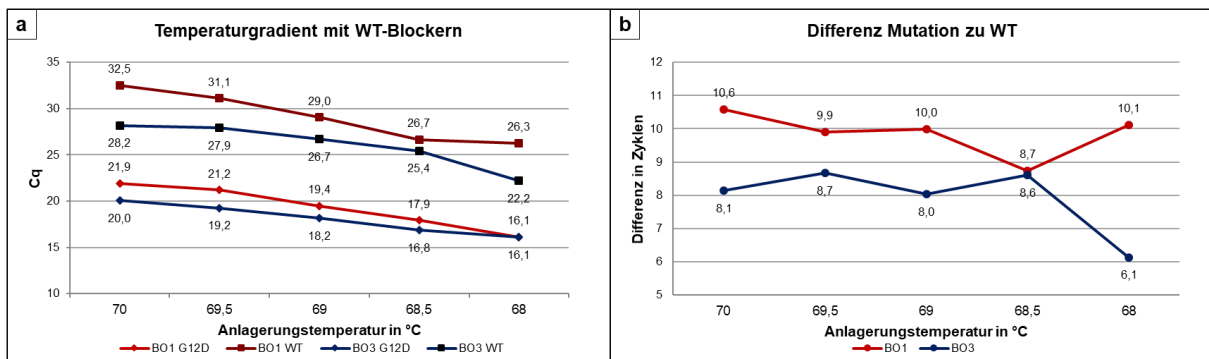
Die effizientesten Bedingungen zeigte BO1 bei 69 °C mit einer hypothetischen Aufkonzentrierung von 8,3 Zyklen. Für BO3 lag die beste Temperatur ebenfalls bei 69 °C mit einer hypothetischen Aufkonzentrierung von 6 Zyklen. Da die Inhibierung der G12D-Probe hier geringer war, wurde dieses BO ebenfalls weiter getestet. BO2 wurde hingegen aufgrund der niedrigen Inhibierung des WT verworfen.

In den ersten Versuchen wurden alle drei designten Blocking-Primer parallel getestet. BO2 wurde anschließend verworfen, da die WT-Inhibierung deutlich schwächer war, als bei den beiden anderen Blockern (Abb. 38). BO1 und BO3 wurden in weiteren Gradienten mit kleine-

## Ergebnisse

ren Temperaturabständen getestet. BO1 wurde als Blocking-Primer für die nested qPCR ausgewählt, da die hypothetische Aufkonzentrierung, berechnet aus der Differenz der Inhibierung des WT's und der Inhibierung der Mutation, hier deutlich stärker war (Abb. 39).

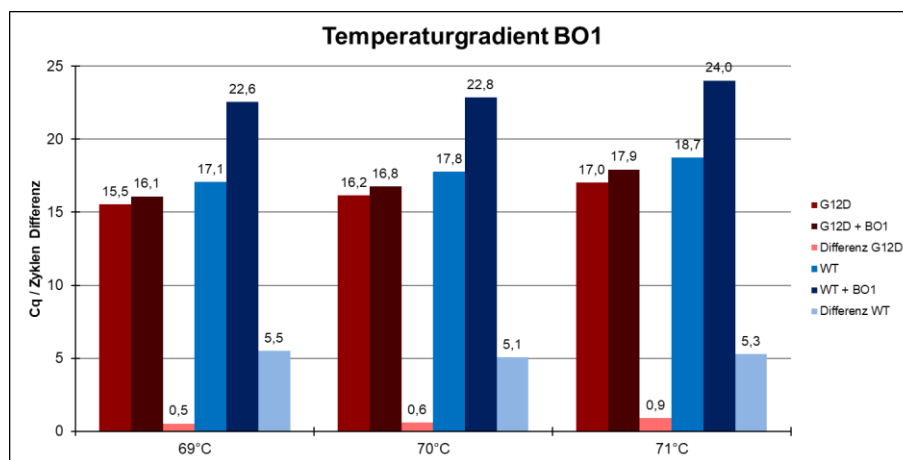
Die finale Festlegung der Anlagerungstemperatur auf 69 °C, in Abbildung 40 dargestellt, wurde erst nach der Optimierung weiterer essentieller Einflussfaktoren, wie der verwendeten Polymerase, der Konzentration des Blocking-Primers, oder der der Zyklenzahl der Erstrunden-PCR, vorgenommen. Bei den Abbildungen ist zu beachten, dass in der Zweirunde in der Regel keine mutationsspezifischen Primer eingesetzt wurden, um den Einfluss des Blocking-Primers isoliert erkennen zu können.



**Abbildung 39** Etablierung der Blocking-Primer III

Es wurden zwei verschiedene Blocking-Primer getestet: BO1 und BO3. Die Erstrunden-PCR wurde mit fünf verschiedenen Anlagerungstemperaturen – 70 °C, 69,5 °C, 69 °C, 68,5 °C, 68 °C – in einem Gradienten durchgeführt. Verwendet wurde die HotStarTaq Plus DNA Polymerase. Die Zweirunde wurde mit dem WT Std Primer und der WTfor-Sonde durchgeführt. Templates waren entweder je 62500 Kopien G12D oder WT. a) zeigt die absoluten Cq-Werte, b) die Differenzen der WT- und der G12D-Werte der jeweiligen Temperaturen.

Nachfolgend wurde BO3 verworfen, da die Differenzen konstant geringer waren, als die von BO1. Die Anlagerungstemperatur wurde erst später final festgelegt.



**Abbildung 40** Etablierung der Blocking-Primer IV

Es wurden drei verschiedenen Anlagerungstemperaturen – 71 °C, 70 °C, 69 °C – in einem Gradienten mit und ohne Blocking-Primer BO1 getestet. Verwendet wurde die Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase. Die Zweirunde wurde mit dem WT Std Primer und der WTfor-Sonde durchgeführt. Templates waren

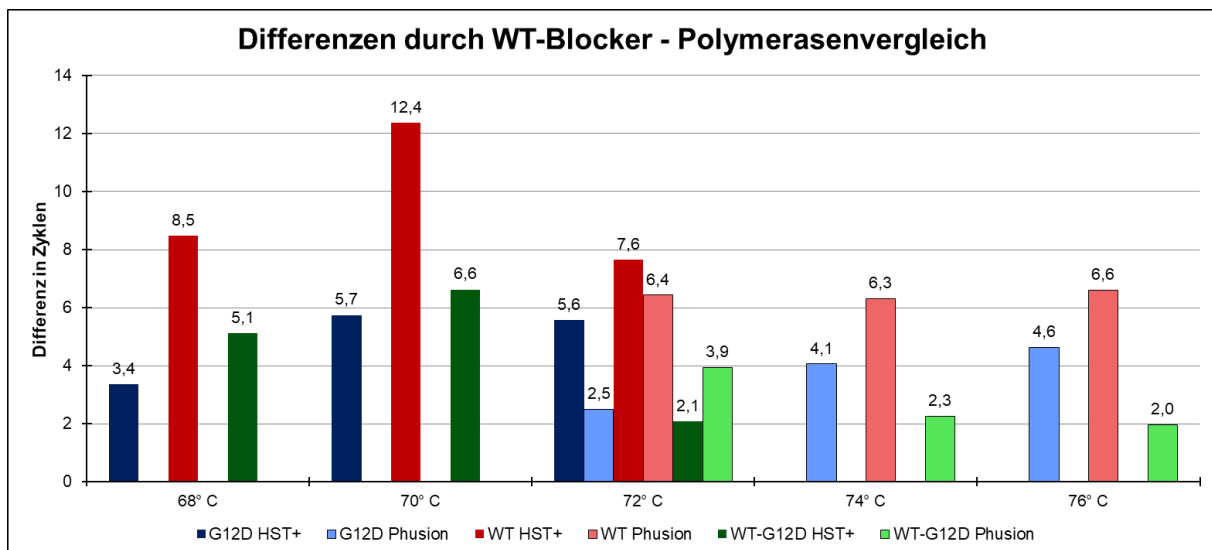
entweder je 10000 Kopien G12D oder WT. Gezeigt sind die absoluten Cq-Werte mit und ohne BO1 sowie die Differenz der WT- und die der G12D-Werte der jeweiligen Temperaturen.

Dieser Test wurde zeitlich erst nach der Auswahl von Konzentration, Zyklenzahl und Polymerase durchgeführt (Folgeabschnitte). 69 °C wurde als Anlagerungstemperatur für die Erstrunden-PCR festgelegt, da hier die Inhibierung der Mutation am geringsten und die des WT's am größten war.

### 3.1.3.2 Auswahl der Polymerase für die Erstrunden-PCR

In den ersten Tests zur Etablierung der nested qPCR wurde die HotStarTaq Plus DNA Polymerase verwendet. Um Fehlamplifikationen zu vermeiden und das PCR-Protokoll zu beschleunigen, wurde zur Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase gewechselt, einer high-fidelity-Polymerase mit geringerer Fehleranfälligkeit und sehr hoher Geschwindigkeit.

Die Effizienz dieser Polymerase in Kombination mit dem WT-Blocking-Primer wurde in einem ersten Gradienten (Abb. 41) bestätigt. Die ersten Anlagerungs-Temperaturen wurden deutlich höher gewählt, als bei der HotStarTaq Plus, wie vom Hersteller empfohlen. In späteren Versuchen stellte sich jedoch heraus, dass die optimale Einsatztemperatur der Blocking-Primers unabhängig von der Polymerase bei 69 °C liegt.



**Abbildung 41** Temperaturgradient in der nested qPCR mit BO1 und verschiedenen Polymerasen

Es wurden die HotStarTaq Plus (HST+, dunkel) und die Phusion® Hot Start Flex (Phusion®, hell) DNA Polymerasen getestet. Die Erstrunden wurden separat mit unterschiedlichen Protokollen durchgeführt. Für die Phusion® Polymerase wurde hier noch ein 3-Schritt Protokoll mit insgesamt einer Minute Anlagerungs- und Verlängerungszeit verwendet.

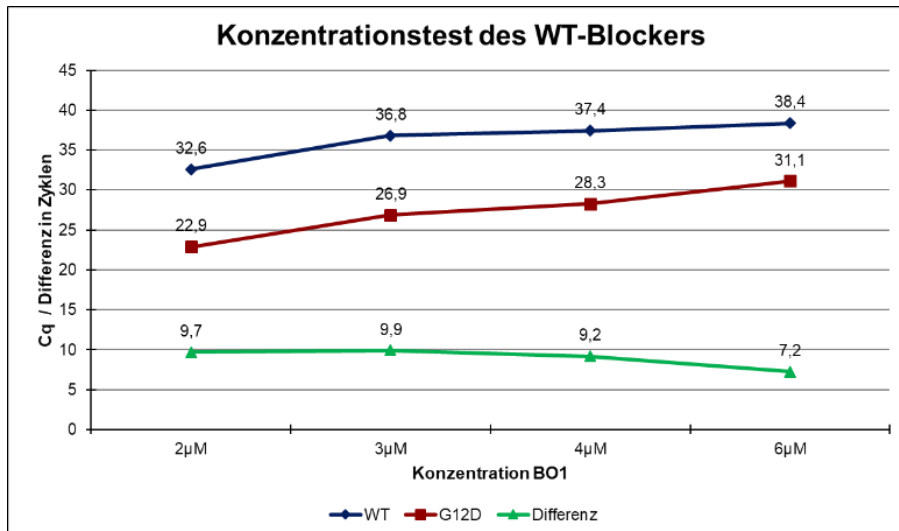
Die HST+ zeigte eine höhere WT-Inhibierung, aber auch eine höhere Inhibierung der mutierten Fragmente. Im direkten Vergleich lag die Differenz in den Ansätzen mit der Phusion®-Polymerase über denen der HST+.

Die geringe Inhibierung der WT-Amplifikation in den Ansätzen mit Phusion® Hot Start Flex in Abbildung 41 ist, außer durch die nicht optimale Temperatur, möglicherweise durch ein ungeeignetes Protokoll zu erklären. Dieses beinhaltete eine 30 Sek. lange Anlagerungszeit und zusätzlich eine 30 Sek. lange Verlängerungszeit. Aufgrund der hohen Leistung und Geschwindigkeit der Polymerase war jedoch erstere zu lang gewählt, während ein Verlängerungsschritt gar nicht notwendig ist, insbesondere da die Anlagerungstemperaturen ohnehin im Bereich von 70 °C lagen. Spätere Anpassungen des Protokolls in Folgeversuchen konnten die Inhibierung wesentlich steigern.



### 3.1.3.3 Festlegung der Konzentration des Blocking-Primers

Die Konzentration des Blocking-Primers hat einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz des Blockvorganges. Zu wenig Blocking-Primer führt zu einer zu geringen Inhibierung des WT, zu viel führt zu einer zu starken unspezifischen Inhibierung der mutierten Fragmente. Ersteres hat eine suboptimale Aufkonzentrierung der gesuchten mutierten Fragmente zur Folge, letzteres eine verringerte Sensitivität der PCR-Methode.



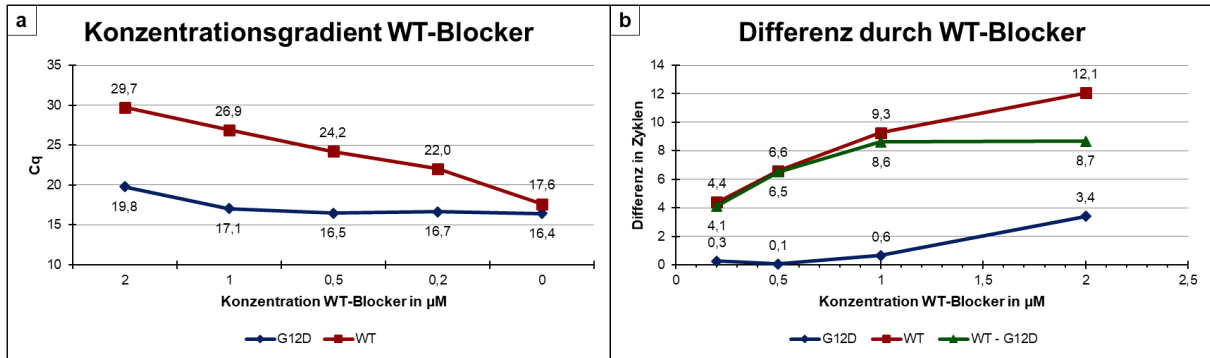
**Abbildung 42** Konzentrationstest BO1, hohe Konzentrationen

In die Erstrunden-PCR wurden Konzentrationen des Blocking-Primers von 2, 3, 4, oder 6 µM final eingesetzt. Templates waren 62500 Kopien WT oder G12D pro PCR. Die Zweitrunden-qPCR wurde mit WT-Std-Primer und WTfor-Sonde durchgeführt.

Die Differenz zwischen der WT-Probe und der G12D-Probe wurde für

jede BO-Konzentration berechnet (grün). Höhere Konzentrationen steigerten die Inhibierung von WT- und G12D-Amplifikation gleichermaßen, so dass die Differenz der beiden Inhibierungen nicht weiter anstieg, lediglich die PCR-Bedingungen wurden durch höhere Cqs ungünstiger. Somit war eine höhere finale Konzentration des Blocking-Primers nicht sinnvoll.

Die optimale Konzentration wurde in zwei Konzentrationstests bestimmt. Abbildung 42 zeigt, dass die Differenz zwischen der Amplifikation von WT- und G12D-Fragmenten ab einer Konzentration des Blocking-Primers von 2 µM final nicht weiter ansteigt, da die Cq-Werte parallel anstiegen und bei 6 µM sogar die Differenz abfiel. In einem Folgeversuch wurden niedrigere Konzentrationen getestet. Abbildung 43 zeigt, dass die Differenz bis 1 µM klar ansteigt und anschließend stagniert. Da bei gleicher Spezifität, also gleicher Differenz, immer die höhere Sensitivität, also der niedrigere Cq der spezifischen Detektion, zu bevorzugen ist, wurde 1 µM als optimale Konzentration des Blocking-Primers festgelegt.



**Abbildung 43** Konzentrationstest BO1, niedrige Konzentrationen

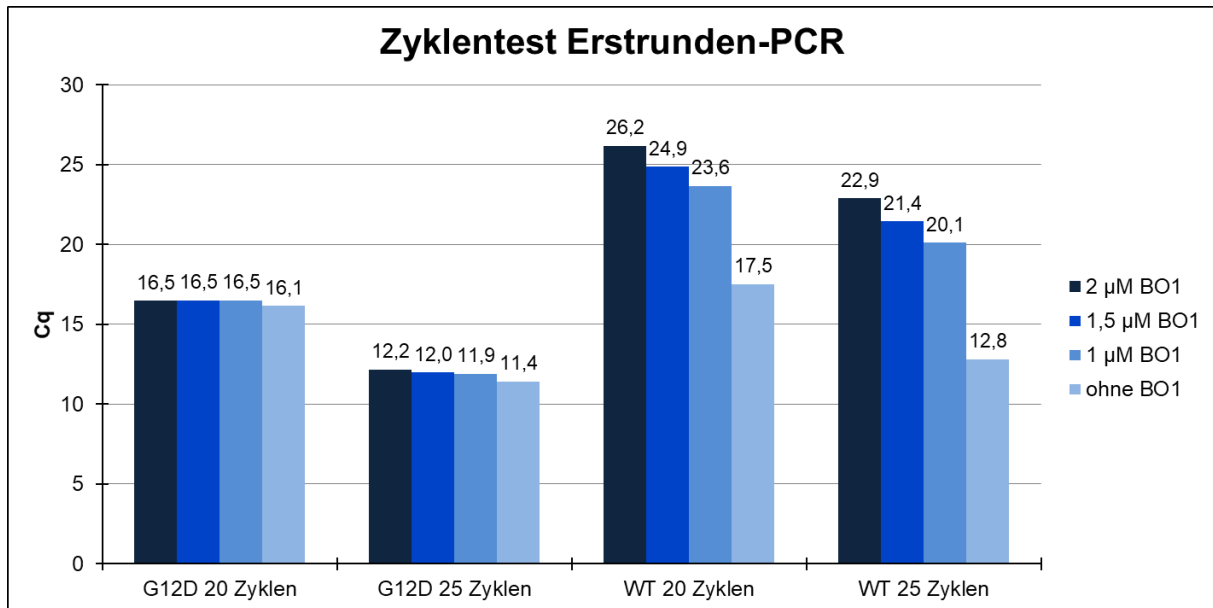
In die Erstrunden-PCR wurden Blocking-Primer-Konzentrationen von 0, 0,2, 0,5, 1, oder 2  $\mu\text{M}$  final eingesetzt. Templates waren 30000 Kopien WT oder G12D pro PCR. Die Zweitrunden-qPCR wurde mit WT-Std-Primer und WTfor-Sonde durchgeführt. a) zeigt die C<sub>q</sub>-Werte, b) die Differenzen durch Zugabe von BO1.

Die Inhibierung des WT's war klar konzentrationsabhängig, jedoch nicht linear, sondern einer Sättigungskurve folgend. Die G12D-Amplifikation wurde durch die niedrigeren Konzentrationen (<1  $\mu\text{M}$ ) nicht relevant inhibiert, bei 1  $\mu\text{M}$  nur schwach und bei 2  $\mu\text{M}$  deutlich stärker. Der Anstieg der Inhibierung von 1 zu 2  $\mu\text{M}$  verlief bei den mutierten Fragmenten und dem WT parallel, sodass die Differenz nicht weiter anstieg. Daher wurde nachfolgend zugunsten der besseren PCR-Effizienz 1  $\mu\text{M}$  BO1 als finale Konzentration eingesetzt.

### 3.1.3.4 Festlegung der Zyklenzahl der Erstrunden-PCR

Für eine effektive nested PCR sollte das Ende der Erstrunden-PCR im exponentiellen Teil der Amplifikationskurve liegen (*Haff, 1994*). Dies ist bei ausreichenden Primer- und Polymerasenkonzentrationen sowohl für 20 als auch für 25 Zyklen gegeben. Beides wurde gegeneinander getestet, um eine eventuelle Verbesserung der Aufkonzentrierung der mutierten Fragmente durch eine Erhöhung der Zyklenzahl zu überprüfen.

Tatsächlich war die Inhibierung des WT im Verhältnis zu den mutierten Fragmenten um etwa einen Zyklus effektiver, wenn 25 Zyklen durchlaufen wurden (Abbildung 44). Die Nachteile von 25 Zyklen wären jedoch erstens eine höhere Fehleranfälligkeit durch mehr Zyklen gewesen; zweitens wäre durch die stärkere Amplifikation eine stärkere Verdünnung zwischen den beiden PCRs notwendig geworden, was wiederum eine potentielle Fehlerquelle dargestellt hätte, da ansonsten die C<sub>q</sub>s hoher Kopienzahlen unterhalb des quantifizierbaren Bereichs gelegen hätten. Aus diesen Gründen wurde die Zyklenzahl von 20 beibehalten.



**Abbildung 44** Zyklentest der Erstrunden-PCR

Es wurden 20 und 25 Zyklen Erstrunden-PCR verglichen. Hierfür wurden alle Ansätze doppelt angesetzt und die Hälfte wurde nach 20 Zyklen aus dem PCR-Cycler herausgenommen und auf Eis gelagert. Die andere Hälfte verblieb im Cycler für weitere 5 Zyklen. Die nested qPCR wurde mit drei verschiedenen Konzentrationen BO1 sowie ohne durchgeführt. Template waren 10000 Kopien G12D oder WT.

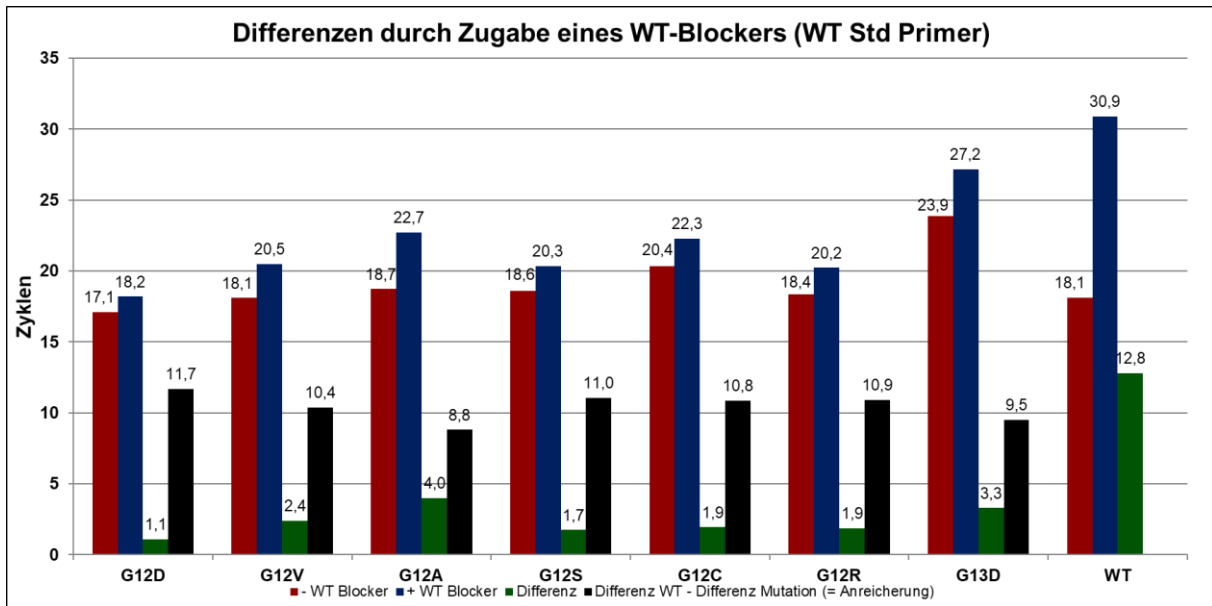
Die Differenz der Inhibierung des WTs und der der G12D-Fragmente war nach 25 Zyklen im Durchschnitt etwa einen Zyklus höher als nach 20 Zyklen (z.B. für 1 µM BO1:  $((WT\ 25\ BO1 - WT\ 25) - (G12D\ 25\ BO1 - G12D\ 25)) - ((WT\ 20\ BO1 - WT\ 20) - (G12D\ 20\ BO1 - G12D\ 20)) = ((20,1-12,8) - (11,9-11,4)) - ((23,6-17,5) - (16,5-16,1)) = 1,1$  Zyklen Differenz).

### 3.1.3.5 Einschätzung des Effekts des Blocking-Primers auf die verschiedenen Mutationen

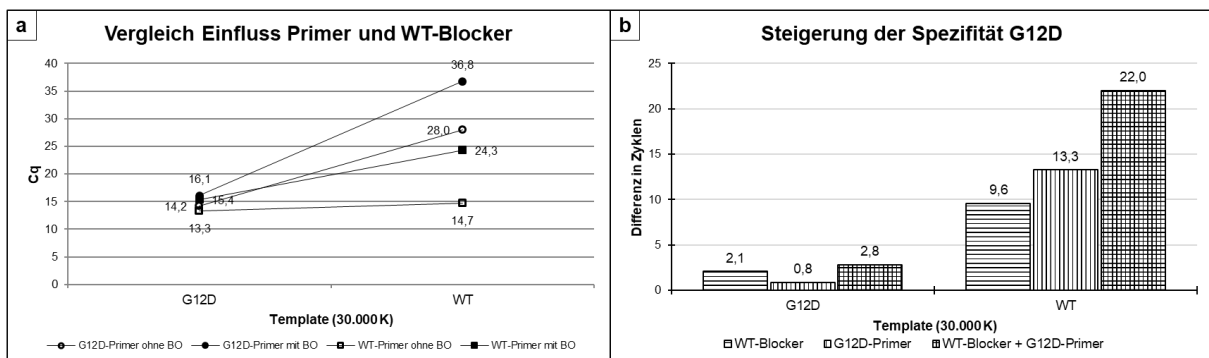
Ein Schlüsselversuch für die vorgestellte Methode war die Überprüfung des Effekts des Blocking-Primers auf alle Mutationen. Hierfür wurden Fragmente jeder Mutation sowie des WTs separat mit und ohne Blocking-Primer in die nested qPCR eingesetzt und die hypothetische Aufkonzentrierung wurde aus den Differenzen errechnet, wobei in der Zweitrunde der WT-Std Primer verwendet wurde. Die rechnerische Aufkonzentrierung lag im Mittelwert bei 10,4 und im Median bei 10,8 Zyklen (8,8-11,7; Abb. 45). Bei einer Effizienz der nested qPCR von z.B. 1,9 entspräche dies einer Aufkonzentrierung von 284-fach ( $1,9^{8,8}$ ) bis 1826-fach ( $1,9^{11,7}$ ), durchschnittlich 793-fach ( $1,9^{10,4}$ ).

Um die einzelnen Einflussgrößen noch detaillierter einstufen zu können, wurden anschließend alle möglichen Konstellationen in einer nested qPCR gegeneinander getestet (Abb. 46). So wurden für WT- und G12D-Template Erstrunden-PCRs mit und ohne Blocking-Primer durchgeführt. Die Produkte wurden anschließend in eine qPCR einmal mit WT-Std. Primer und einmal mit G12D-Primer eingesetzt. Die Ergebnisse belegten, dass die Erstrunden-PCR mit Blocking-Primer die Spezifität der mutationsspezifischen ARMS-Primer zusätzlich deutlich erhöht.

## Ergebnisse



**Abbildung 45** Überprüfung der Effektstärke des Blocking-Primers bei den verschiedenen *KRAS*-Mutationen. Es wurden alle Mutationen und der WT separat mit (schwarz) und ohne (rot) Blocking-Primer in einer nested qPCR getestet. Es wurden je 1000 Kopien Template pro PCR-Erstrunde eingesetzt (Phusion-Polymerase, 20 Zyklen, 1  $\mu$ M BO1). Die Zweitrunde wurde mit dem WT-Std Primer und der WTfor-Sonde durchgeführt. Gezeigt sind die Cqs, die Differenzen der beiden Messungen (grün) sowie die Differenz dieser Differenzen und der Differenz des WTs (blau), was der hypothetischen Aufkonzentrierung in PCR-Zyklen entspricht. Die hypothetische Aufkonzentrierung reicht von 8,8 Zyklen für G12A (12,8-4,0) bis 11,7 Zyklen für G12D (12,8-1,1).



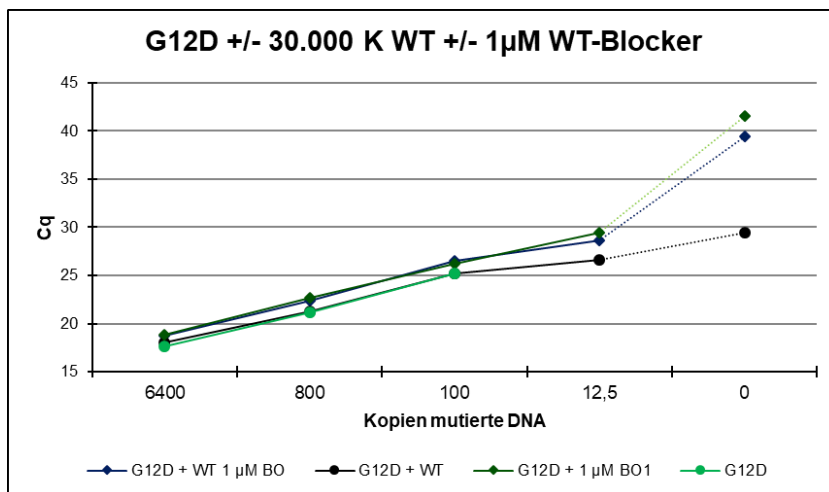
**Abbildung 46** Überprüfung der Effektstärken von Blocking-Primer, ARMS-Primer und der Kombination für G12D. Es wurden je 30000 Kopien der Templates G12D und WT in der nested qPCR jeweils mit WT Std- und G12D ARMS-Primer mit und ohne 1  $\mu$ M BO1 getestet. Abbildung a) zeigt die Cq-Werte nach Template aufgetrennt, Abbildung b) zeigt die Differenzen in der Amplifikation mit den Einflussfaktoren im Verhältnis zur nested qPCR mit WT Std Primer ohne BO1.

Der separate Einfluss des Blocking-Primers auf den WT beträgt 9,6 Zyklen, der separate Einfluss des ARMS-Primers 13,3 Zyklen und der kombinierte Einfluss 22 Zyklen. Somit ist der kombinierte Einfluss hier nur unwesentlich geringer als die Summe der Einzeleinflüsse.

Für den Einsatz der nested qPCR zur absoluten Quantifizierung ist essentiell, dass die beobachteten Aufkonzentrierungen auch bei direkter Anwesenheit hoher Konzentrationen des WTs bei nur wenigen mutierten Fragmenten ebenso effektiv wirken, wie in den Vorversuchen. In Standardreihen wurden daher Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen mutierter Frag-

mente mit und ohne WT-Hintergrund verglichen. Es zeigte sich, dass auch hohe Konzentrationen WT-Hintergrund die Detektion geringer Konzentrationen mutierter DNA nicht nennenswert beeinflussten. Wie in Abbildung 47 zu sehen ist, waren die Verdünnungsreihen annähernd linear und die Werte mit WT-Hintergrund wichen nur minimal von denen ohne WT-Hintergrund ab. Da durch die Erstrunden-PCR die Fragmente aufkonzentriert werden, liegen die C<sub>q</sub>-Werte gleicher Ausgangskonzentrationen niedriger als bei der qPCR (z.B. lag der C<sub>q</sub> von 100 Kopien hier bei 26,5 und in der qPCR für G12D bei 31,5). Somit läuft die qPCR weniger in den technisch bedingten Grenzbereichen der methodischen Anwendbarkeit. Dies zeigte sich unter anderem in den Standardabweichungen, welche keinen limitierenden Faktor mehr für die Quantifizierung darstellten.

Die NTC mit WT Hintergrund und mit BO1 lag weit unter dem Y-Achsen Abschnitt der zugehörigen Verdünnungsreihe und somit weit unter dem berechneten Wert einer Kopie des mutierten Fragments. Dies belegt eine hohe mögliche Sensitivität der nested qPCR, da falsch positive Signale nun nicht mehr limitierend wirken sollten.



**Abbildung 47** Verdünnungsreihe nested qPCR mit G12D

Es wurden qPCR-Verdünnungsreihen in vier Konstellationen durchgeführt. 1. Nur mit G12D-Fragmenten, ohne BO1 in der Erstrunde; 2. Nur mit G12D-Fragmenten, mit BO1 in der Erstrunde; 3. Mit G12D-Fragmenten und WT-Hintergrund von 30000 Kopien, ohne BO1 in der Erstrunde; 4. Mit G12D-Fragmenten und WT-Hintergrund von 30000 Kopien, mit BO1 in der Erstrunde. Je Reihe wurden Konzentrationen von 6400, 800, 100 und 12,5

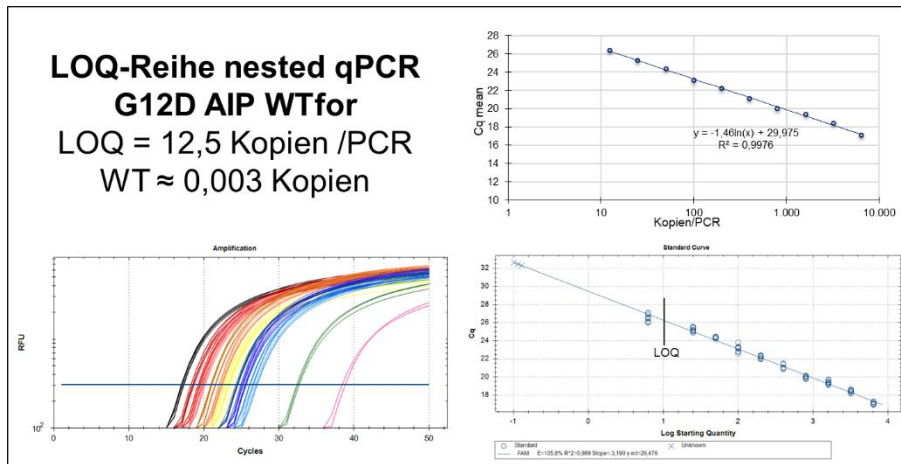
sowie 0 Kopien des mutierten Fragments pro qPCR getestet.

In der niedrigsten Konzentration zeigt sich ein Abknicken der Kurve mit WT-Hintergrund und ohne BO1, die NTC dieser Reihe ist auch deutlich niedriger als die anderen.

### 3.1.3.6 LOD- und LOQ-Reihen

Für die fertig etablierte nested qPCR wurde erneut für jede Mutation das LOQ bestimmt, wie in Abschnitt 2.2.3.3 beschrieben. Die LOQs lagen bei 12,5 Kopien (G12D), 25 Kopien (G12A, G12C, G12R, G13D) und 50 Kopien (G12V, G12S), im Durchschnitt bei 30 Kopien (Median 25 Kopien). Diese Werte waren höher als für die qPCR, bei welcher die LOQs im Mittelwert bei 23 Kopien (Median 12,5 Kopien) gelegen hatten. Der vermutliche Grund hierfür waren die Abweichungen zwischen den Erstrundenprodukten – die zusätzliche Erstrunden-PCR bringt somit eine zusätzliche Fehlerquelle in die Methode.

## Ergebnisse

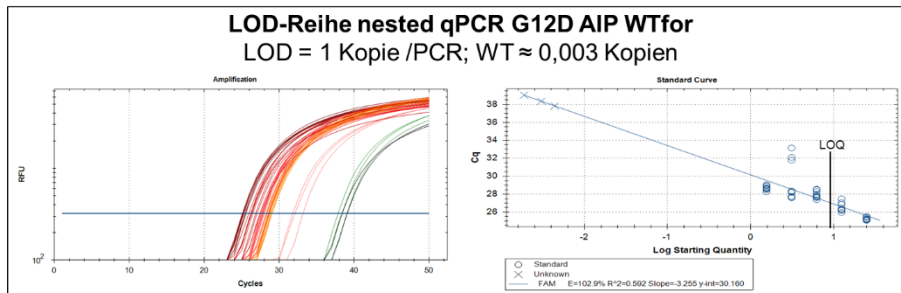


**Abbildung 48** LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12D

LOQ-Reihe, 1. Runde mit 1 µM BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12D AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12D-Mutation in Konzentrationen von 6400-6,25 Kopien pro

Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

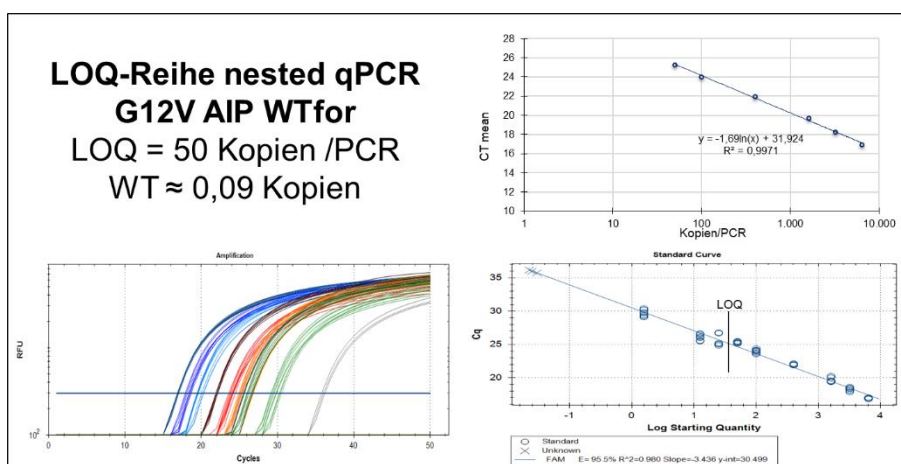
Das LOQ für G12D AIP WTfor in der nested qPCR liegt bei 12,5 Kopien. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD.



**Abbildung 49** LOD-Reihe qPCR KRAS G12D

1. Runde mit 1 µM BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12D AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden

Fragmente mit der G12D-Mutation in Konzentrationen von 25-1,56 Kopien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA. Alle Proben konnten detektiert werden. Das heißt, das LOD liegt unterhalb von 1,56 Kopien. Somit kann die Methode sicher einzelne Kopien detektieren.



**Abbildung 50** LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12V

LOQ-Reihe, 1. Runde mit 1 µM BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12V AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12V-Mutation in Konzentrationen von 6400-1600, 400, 100-

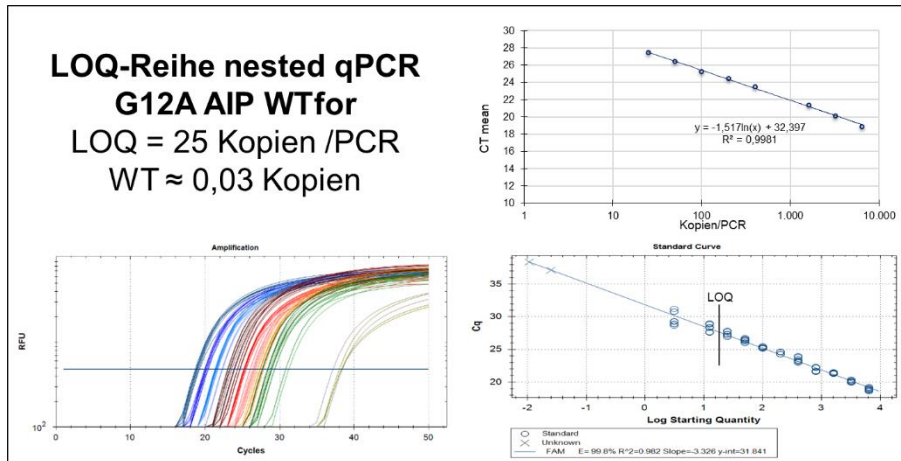
1,56 Kopien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12V AIP WTfor in der nested qPCR liegt bei 50 Kopien. Limitierend waren die hohen Abweichungen zwischen den Erstrunden-Ansätzen. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD.



## Ergebnisse

Die LODs waren hingegen in allen Fällen deutlich verbessert und zumeist nicht mehr durch die falsch positiven Ergebnisse der WT-Proben bedingt, da die Spezifität in der nested qPCR viel höher lag als in der qPCR. Die LOD-Werte wurden zwischen einer Kopie (G12D, G12V, G12A, G12R, G13D) und ca. 3,7 Kopien (G12S, 3 Kopien für G12C) festgesetzt. Die falsch positiven Signale lagen im Durchschnitt bei 0,5 Kopien (Median 0,06 Kopien), im Gegensatz zu 14,3 Kopien (Mittelwert) und 4,3 Kopien (Median) bei der qPCR.

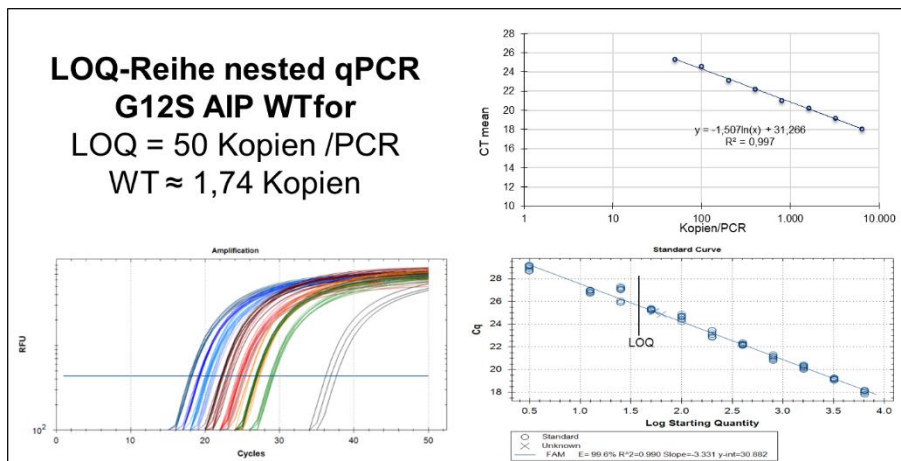


**Abbildung 51** LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12A

LOQ-Reihe, 1. Runde mit 1  $\mu$ M BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12A AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 65 °C und 40 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12A-Mutation in Konzentrationen von 6400-12,5 und 3,13

Kopien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12A AIP WTfor in der nested qPCR liegt bei 25 Kopien. Limitierend waren die hohen Abweichungen zwischen den Erstrunden-Ansätzen. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD.



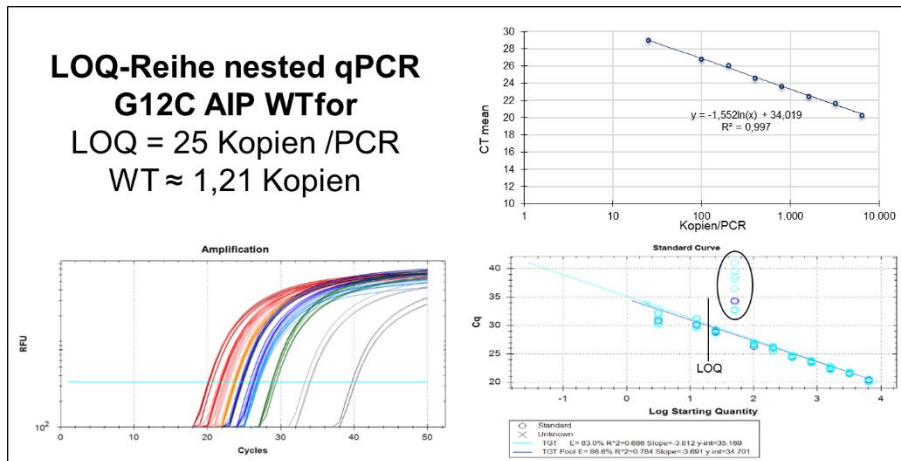
**Abbildung 52** LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12S

LOQ-Reihe, 1. Runde mit 1  $\mu$ M BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12S AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 64,5 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12S-Mutation in Konzentrationen von 6400-12,5 und 3,13

Kopien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12S AIP WTfor in der nested qPCR liegt bei 50 Kopien. Limitierend waren die hohen Abweichungen zwischen den Erstrunden-Ansätzen. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen das LOD, welches auf einen Cq von 29,3 festgesetzt wurde, 1 Zyklus unterhalb des untersten falsch positiven WT-Signals. Dies entspricht ca. 3,7 Kopien.

## Ergebnisse

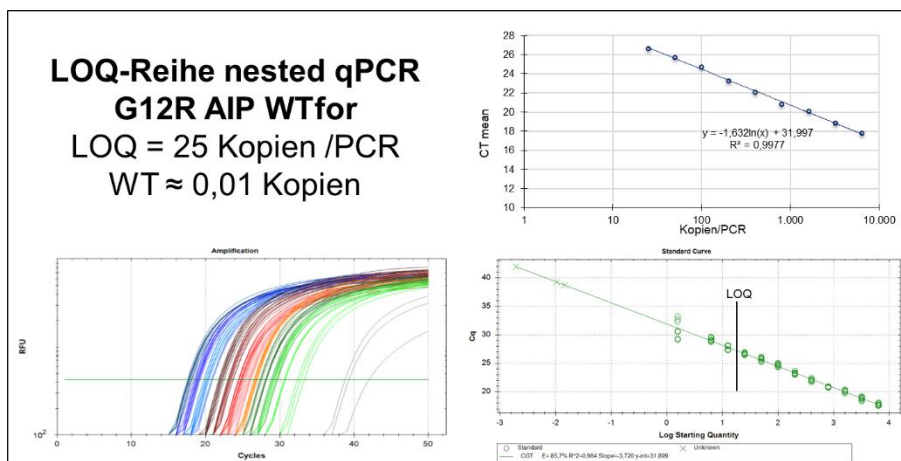


**Abbildung 53** LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12C

LOQ-Reihe, 1. Runde mit 1  $\mu$ M BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12C AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 65 °C und 40 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12C-Mutation in Konzentrationen von 6400-12,5 und 3,13

Kopien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12C AIP WTfor in der nested qPCR liegt bei 25 Kopien. Limitierend waren die hohen Abweichungen zwischen den Erstrunden-Ansätzen. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen das LOD, welches auf einen Cq von 32,3 festgesetzt wurde, 1 Zyklus unterhalb des untersten falsch positiven WT-Signals. Dies entspricht ca. 3 Kopien. Die Cq-Werte für 50 Kopien fallen vollständig aus der Reihe heraus. Da jedoch die Werte vor- und nachher linear liegen und auch die Werte für 3,13 Kopien klar im LOD-Bereich liegen, wurde davon ausgegangen, dass ein Pipettierfehler beim Ansetzen des Standards verursachend für diese Abweichung verantwortlich war.



**Abbildung 54** LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12R

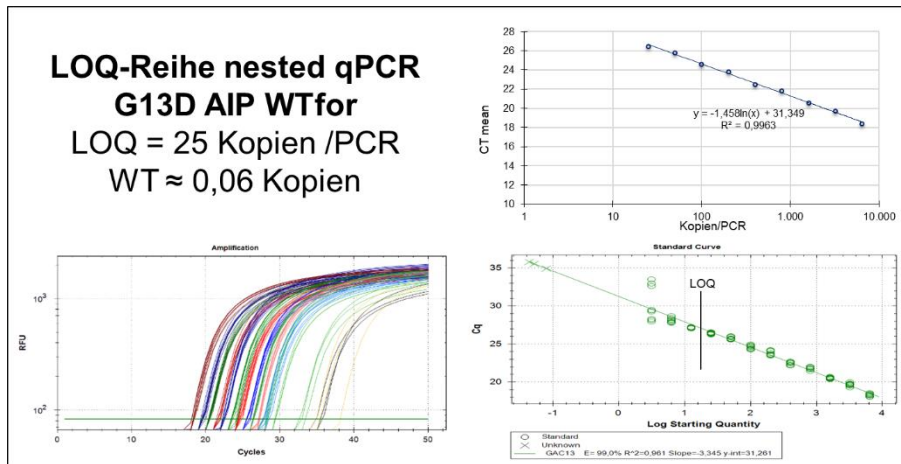
LOQ-Reihe, 1. Runde mit 1  $\mu$ M BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12R AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 66 °C und 40 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12R-Mutation in Konzentrationen von 6400-6,25 und 1,56

Kopien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12R AIP WTfor in der nested qPCR liegt bei 25 Kopien. Limitierend waren die hohen Abweichungen zwischen den Erstrunden-Ansätzen. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD, welches auf 1 Kopie festgelegt wurde.



## Ergebnisse



**Abbildung 55** LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G13D

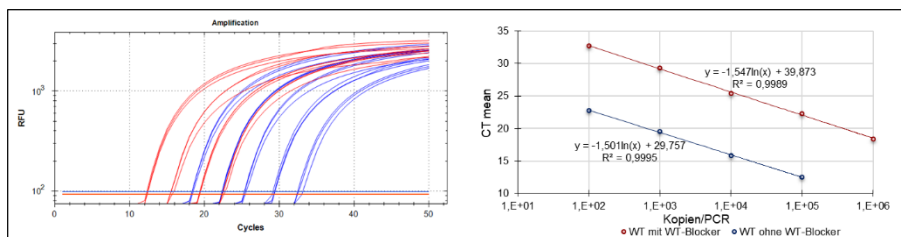
LOQ-Reihe, 1. Runde mit 1 µM BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G13D AIP-Primer und WTrev-Sonde bei 65,5 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G13D-Mutation in Konzentrationen von 6400-3,13 Kopien pro

Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G13D AIP WTrev in der nested qPCR liegt bei 25 Kopien. Limitierend war die Abweichung der Cq-Werte bei 12,5 Kopien nach unten. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD, welches auf 1 Kopie festgelegt wurde.

### 3.1.3.7 Nested qPCR für den WT

Es wurde getestet, ob die nested qPCR mit Blocking-Primer auch für den WT in einer Verdünnungsreihe lineare Ergebnisse produzieren würde. Dies würde belegen, dass WT-Fragmente nicht konzentrationsabhängig geblockt werden, sondern immer zu einem festen Prozentsatz. Somit wäre eine Quantifizierung von gesamt-cfDNA mittels der nested qPCR möglich, allerdings nur für Proben ohne mutierte Fragmente.

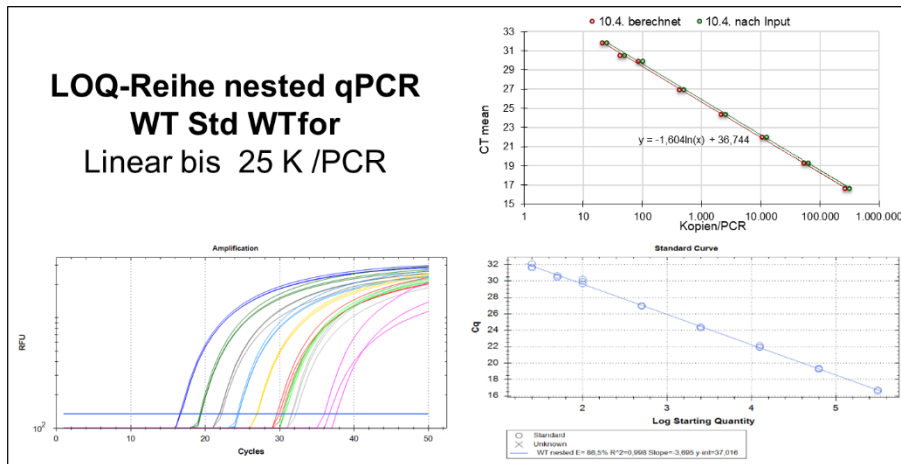


**Abbildung 56** Verdünnungsreihe nested qPCR WT +/- BO1

1. Runde je mit und ohne 1 µM BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit WT Std-Primer

und WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden WT-Fragmente in Konzentrationen von 10<sup>6</sup>-10<sup>1</sup> Kopien pro Erstrundenansatz in 1:10 Verdünnungsschritten eingesetzt.

Die Verdünnungsreihe mit BO1 (rot) war linear von 10<sup>6</sup>-10<sup>2</sup> Kopien, die Verdünnungsreihe ohne BO1 (blau) war linear von 10<sup>5</sup>-10<sup>2</sup> Kopien.



**Abbildung 57** Verdünnungsreihen nested qPCR WT + BO1

1. Runde je mit 1  $\mu\text{M}$  BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit WT Std-Primer und WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden WT-Fragmente in Konzentrationen von 312500-100, 50, 25 Kopien pro Erstrundenan-

satz in 1:5 Verdünnungsschritten eingesetzt.

Die Verdünnungsreihe mit war linear über alle Verdünnungsschritte. In der Graphik oben rechts wurde die Verdünnungsreihe einmal anhand der vorher berechneten Inputkonzentrationen auf die X-Achse aufgetragen und einmal wurden die Konzentrationen zum Vergleich anhand einer mitangesetzten WT-Reihe ohne Erstrunde (Abb. 29) an die WT-LOQ-Reihe (Abb. 28) angeglichen. Beide Berechnungen stimmen überein.

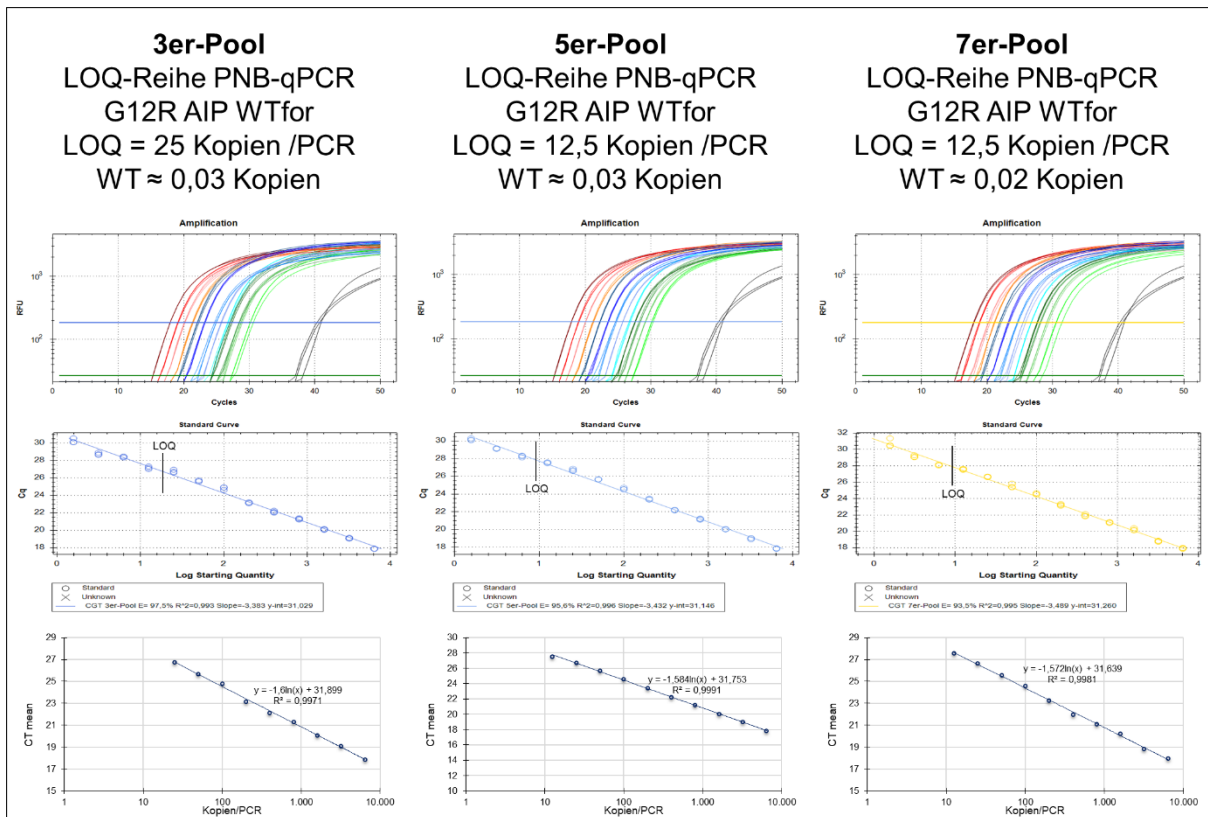
### 3.1.4 Etablierung der PNB-qPCR

Die Detektion mutierter *KRAS*-Fragmente mittels der nested qPCR ist hochsensitiv und hochspezifisch. Allerdings ist die Quantifizierung aufgrund der Schwankungen in der Erstrunde nicht effektiv genug, um im niedrigen zweistelligen oder im einstelligen Bereich erfolgreich zu sein. Um die LOQs zu verbessern, wurde eine zusätzliche Anpassung der nested qPCR vorgenommen. Mehrere Erstrundenläufe mit identischem Template wurden parallel durchgeführt und die PCR-Produkte anschließend gepoolt, also vermischt. Diese Pools wurden daraufhin verdünnt und in die Zweirunde eingesetzt. So wurden die Abweichungen der Erstrunden-PCRs gemittelt und dieser Mittelwert quantifiziert.

Zunächst musste die richtige Poolgröße ermittelt werden, da zu wenige PCR-Läufe im Pool die Schwankungen nicht ausreichend beseitigen würden, zu viele jedoch Arbeitsaufwand und Kosten unnötig in die Höhe trieben. Die Abbildung 58 zeigt die drei LOQ-Reihen, die aus Pools von drei, fünf und sieben Erstrunden-PCR-Produkten entstanden sind. Die Messwerte des Dreier-Pools schwanken noch sichtbar, ab fünf gepoolten PCR-Produkten ist die Varianz deutlich reduziert und eine verbesserte Quantifizierung möglich. Eine Pool-Größe von sieben konnte die Quantifizierung nicht weiter verbessern. Folglich wurde die Poolgröße von fünf PCR-Erstrunden für die weitere Etablierung der Methode verwendet.

Generell sind die Schwankungen und Abweichungen der Konzentrationen jenseits des LOQs bei den Verdünnungsreihen mit Pools geringer als bei den anderen Methoden, so dass oft einzelne oder mehrere Cqs unterer Konzentrationen noch im LOQ-Bereich liegen, die Reihe aber vorher unterbrochen wurde. Dies unterstreicht die hohe Sicherheit der Methode und die geringe Fehleranfälligkeit – Abweichungen können immer nur gering ausfallen, da Mittelwerte

mehrerer Erstrunden-Produkte gemessen werden. Diese Methode wurde Pooled-Nested-Blocker-qPCR (PNB-qPCR) genannt.



**Abbildung 58** LOQ-Reihe nested qPCR KRAS G12R Pools

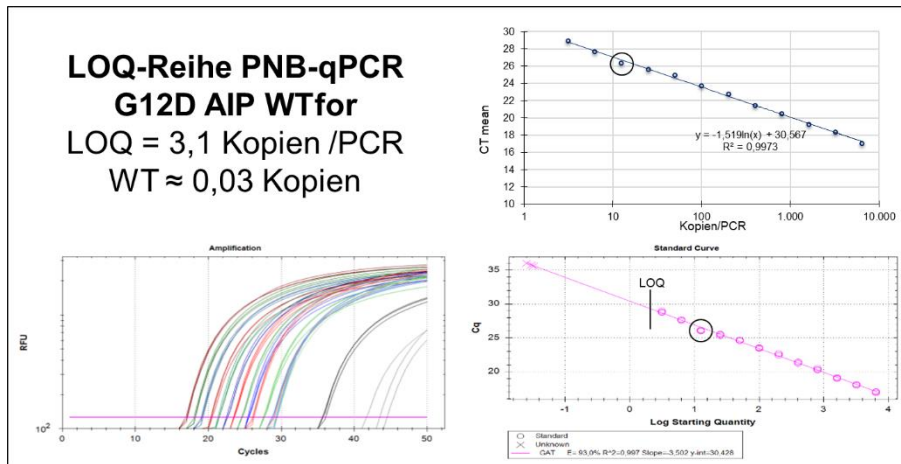
LOQ-Reihe, 1. Runde mit 1  $\mu$ M BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, 3, 5 oder 7 Erstrunden pro Template gepoolt, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12R AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 66 °C und 40 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12R-Mutation in Konzentrationen von 6400-0,78 Kopien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12R AIP WTfor in der nested qPCR mit 3er-Pools liegt bei 25 Kopien, die der 5er- und 7er-Pools liegen jeweils bei 12,5 Kopien. Bei den 3er-Pools limitieren Schwankungen der Cqs der niedrigeren Messkonzentrationen die Messeffizienz. Die Werte der 5er- und der 7er-Pools liegen deutlich konstanter auf der Trendlinie als bei den 3er-Pools, Schwankungen treten kaum noch auf. Limitierend sind hier die Abweichungen der Cqs der niedrigeren Messkonzentrationen nach unten (Werte falsch etwas zu hoch). Die unteren Konzentrationen liegen zwar außerhalb des Bereichs der absoluten Quantifizierung, weichen jedoch nur leicht ab und folgen generell der Linie der Verdünnungsreihe. Bei den 7er-Pools ist keine Verbesserung gegenüber den 5er-Pools erkennbar.

### 3.1.5 LOQ-Reihen in der PNB-qPCR

Basierend auf der Verbesserung der Quantifikationseffizienz durch die Einführung der Erstrundenpools wurden neue LOQ-Reihen durchgeführt. Alle LOQs konnten gegenüber der nested qPCR verbessert werden. Die LOQs reichten von 12,5 Kopien (G12V, G12R, G13D) über 6,25 Kopien (G12S) bis herunter zu 3,13 Kopien (G12D, G12A, G12C), mit einem Mittelwert von 7,6 Kopien und einem Median von 6,25 Kopien (Abbildungen 59-67). Durch das Poolen der Erstrundenprodukte konnten rechnerische LOD-Werte unter einer einzelnen Kopie pro Ansatz erreicht werden.

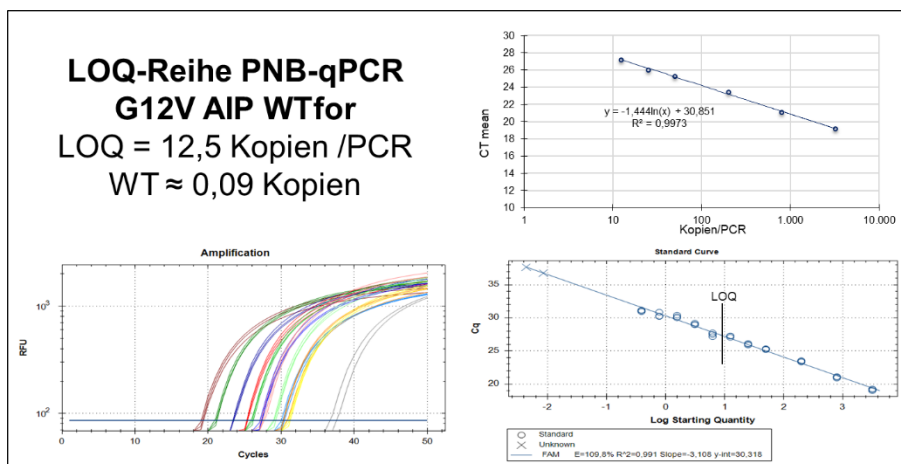
## Ergebnisse



**Abbildung 59** LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12D LOQ-Reihe, 1. Runde in 5er-Pools, mit 1  $\mu$ M BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12D AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12D-Mutation in Konzentrationen von 6400-0,4 Kopien pro Erstrundenansatz

in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12D AIP WTfor in der PNB-qPCR liegt bei 3,13 Kopien. Der Wert für 12,5 Kopien wich leicht nach unten ab, was in einer zweiten LOQ-Reihe mit denselben Templates genauso wieder abgebildet werden konnte. Daher wurde von einer Ungenauigkeit beim Ansetzen der Standardreihe ausgegangen. Die Werte für 6,25 und 3,13 Kopien weichen nur um 4% bzw. 9% vom Sollwert ab. Das LOD wurde auf 0,4 Kopien festgelegt. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD.

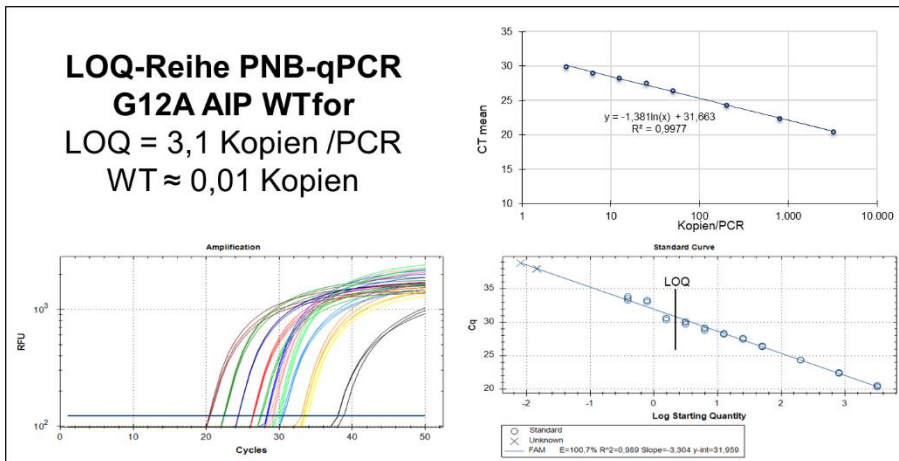


**Abbildung 60** LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12V LOQ-Reihe, 1. Runde in 5er-Pools, mit 1  $\mu$ M BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12V AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12V-Mutation in Konzentrationen von 3200, 800, 200, und 50-0,4 Kopien pro Erstrundenansatz

in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12V AIP WTfor in der PNB-qPCR liegt bei 12,5 Kopien. Nach dem abweichenden 6,25-Kopien-Wert liegen die Werte für 3,13 und 1,56 Kopien allerdings im Sollbereich. Dennoch wurde der LOQ auf 12,5 Kopien festgelegt, da keine zweite Messung zur Bestätigung dieser Abweichung durchgeführt wurde. Das LOD wurde auf 0,4 Kopien festgelegt. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD. Diese LOQ-Bestimmung wurde von Frau Alexandra Brahmer durchgeführt.

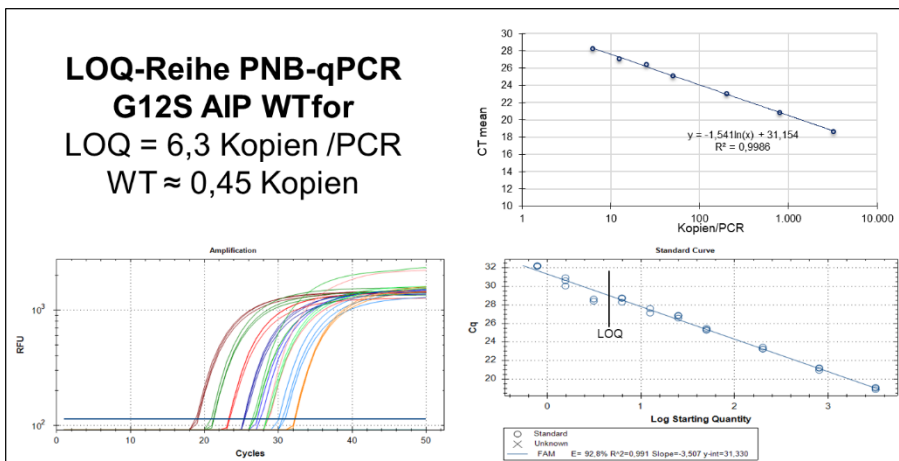
## Ergebnisse



**Abbildung 61** LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12A LOQ-Reihe, 1. Runde in 5er-Pools, mit 1  $\mu\text{M}$  BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12A AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 65 °C und 40 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12A-Mutation in Konzentrationen von 3200, 800, 200, und 50-0,4 Ko-

pien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12A AIP WTfor in der PNB-qPCR liegt bei 3,13 Kopien. Das LOD wurde auf 0,4 Kopien festgelegt. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD. Diese LOQ-Bestimmung wurde von Frau Alexandra Brahmer durchgeführt.



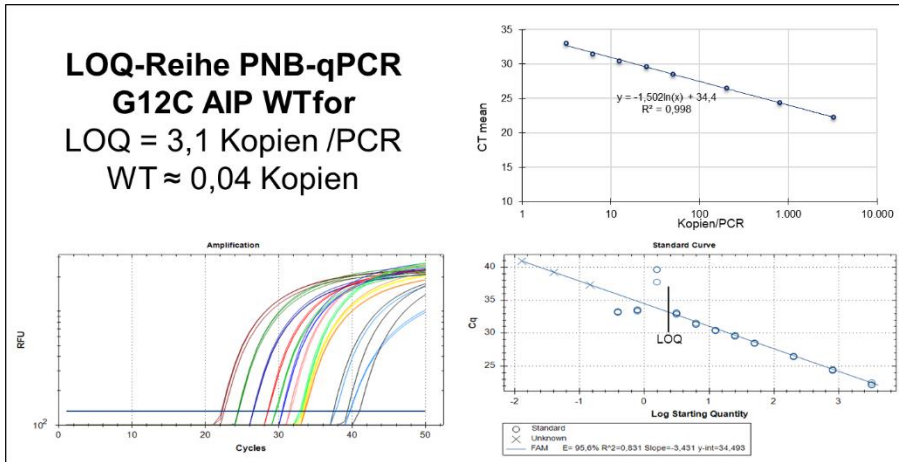
**Abbildung 62** LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12S LOQ-Reihe, 1. Runde in 5er-Pools, mit 1  $\mu\text{M}$  BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlagerung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12S AIP-Primer und WTfor-Sonde bei 65 °C und 30 Sek. Anlagerungstemperatur bzw. -zeit. Es wurden Fragmente mit der G12S-Mutation in Konzentrationen von 3200, 800, 200, und 50-0,8 Ko-

pien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12S AIP WTfor in der PNB-qPCR liegt bei 6,25 Kopien. Das LOD wurde auf 1 Kopie festgelegt. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen das LOD, welches auf 1 Zyklus unterhalb des untersten gemessenen Wertes für die WT-Probe festgelegt wurde. Diese LOQ-Bestimmung wurde von Frau Alexandra Brahmer durchgeführt.



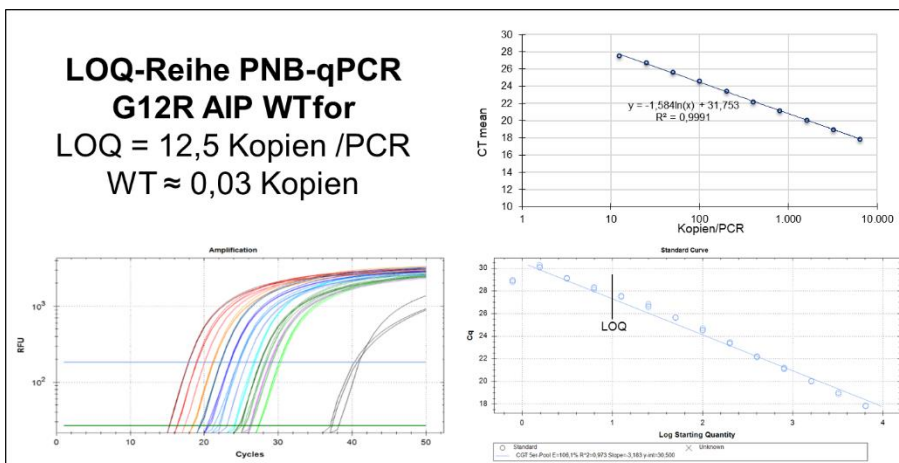
## Ergebnisse



**Abbildung 63** LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12C LOQ-Reihe, 1. Runde in 5er-Pools, mit 1  $\mu\text{M}$  BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlage- rung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12C AIP-Primer und WTfor- Sonde bei 65 °C und 40 Sek. Anlagerungstempe- ratur bzw. -zeit. Es wur- den Fragmente mit der G12C-Mutation in Kon- zentrationen von 3200, 800, 200, und 50-0,4 Ko-

prien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

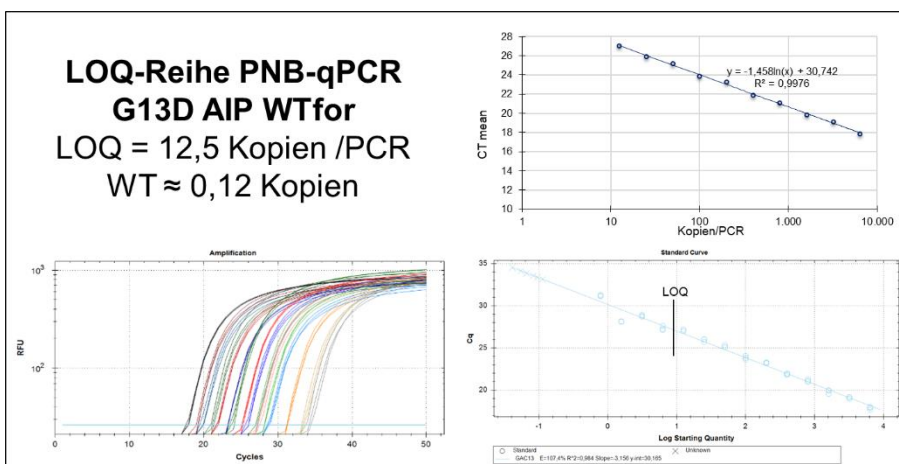
Das LOQ für G12C AIP WTfor in der PNB-qPCR liegt bei 3,13 Kopien. Das LOD wurde auf 0,4 Kopien festgelegt. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD. Diese LOQ-Bestimmung wurde von Frau Alexandra Brahmer durchgeführt.



**Abbildung 64** LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G12R LOQ-Reihe, 1. Runde in 5er-Pools, mit 1  $\mu\text{M}$  BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlage- rung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G12C AIP-Primer und WTfor- Sonde bei 66 °C und 40 Sek. Anlagerungstempe- ratur bzw. -zeit. Es wur- den Fragmente mit der G12R-Mutation in Kon- zentrationen von 6400-0,8 Kopien pro Erstrundenans-

atz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

Das LOQ für G12R AIP WTfor in der PNB-qPCR liegt bei 12,5 Kopien. Das LOD wurde auf 0,8 Kopien festgelegt. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD.

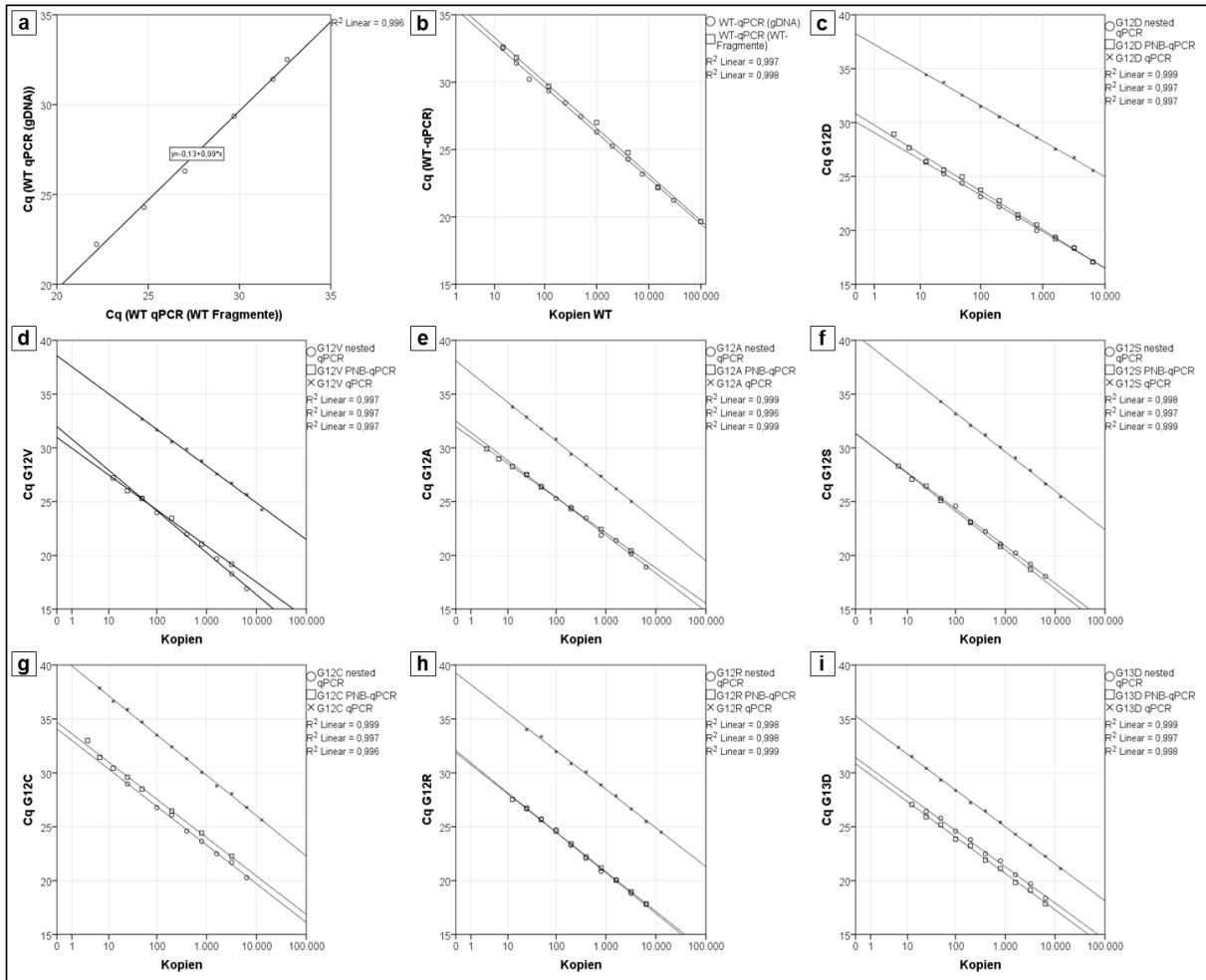


**Abbildung 65** LOQ-Reihe PNB-qPCR KRAS G13D LOQ-Reihe, 1. Runde in 5er-Pools, mit 1  $\mu\text{M}$  BO1, 20 Zyklen 69 °C Anlage- rung, Verdünnung 1:50 in H<sub>2</sub>O, 2. Runde mit G13D AIP-Primer und WTrev- Sonde bei 65,5 °C und 30 Sek. Anlagerungstempe- ratur bzw. -zeit. Es wur- den Fragmente mit der G13D-Mutation in Kon- zentrationen von 6400-0,8

## Ergebnisse

Kopien pro Erstrundenansatz in 1:2 Verdünnungsschritten eingesetzt, alle mit einem Hintergrund von 30000 Kopien WT-DNA, und ein Ansatz mit nur 30000 Kopien WT-DNA.

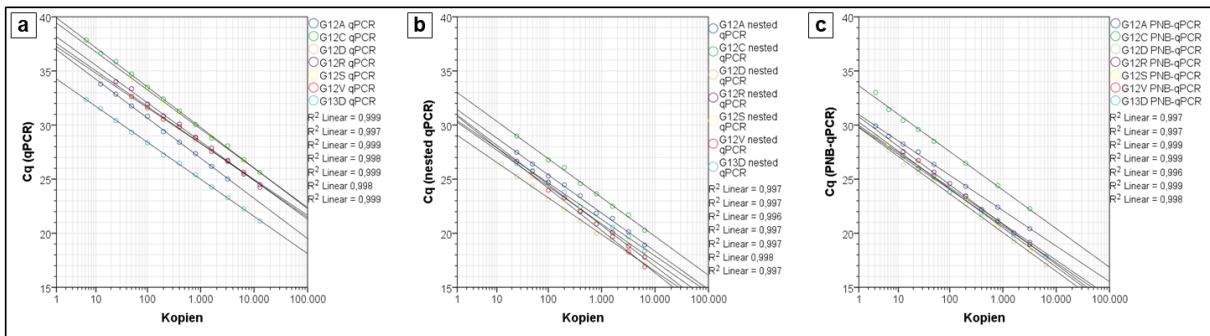
Das LOQ für G13D AIP WTrev in der PNB-qPCR liegt bei 12,5 Kopien. Auch hier lagen die Cq-Werte niedrigerer Konzentrationen im Sollbereich (3,13 und 0,78 Kopien), aufgrund von Abweichungen der Zwischenkonzentrationen wurde das LOQ aber auf 12,5 festgelegt. Das LOD wurde auf 0,8 Kopien festgelegt. Die falsch positiven Signale der WT-Probe bedingen nicht das LOD.



**Abbildung 66** LOQ-Reihen der drei qPCR-Methoden nach Varianten sortiert

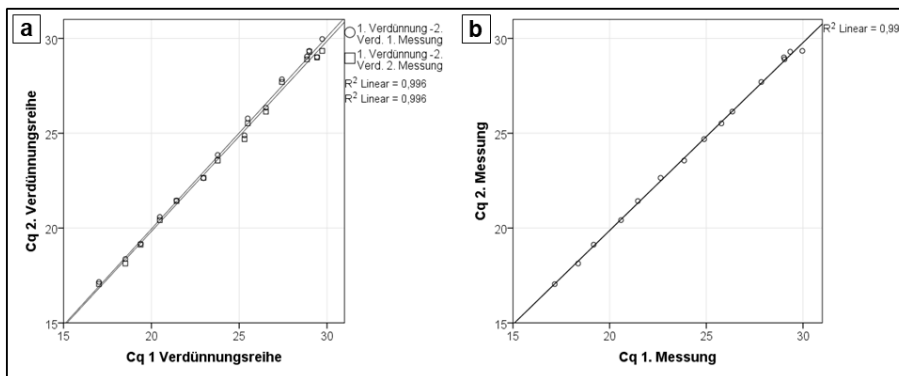
a) Zeigt die WT-LOQ-Reihe der qPCR, die mit gDNA-Fragmenten angefertigt wurde (auch Abb. 28) gegen eine WT-Verdünnungsreihe aufgetragen, die mit künstlichen WT-Fragmenten angefertigt wurde (auch Abb. 29). Beide Reihen haben eine sehr hohe Übereinstimmung. In Abbildung b sind beide WT-qPCR-Reihen gemeinsam über die Kopienzahl aufgetragen. Auch dies unterstreicht die hohe Übereinstimmung. In den Abbildungen c-i sind die LOQ-Reihen nach den Punktmutationen aufgetrennt dargestellt, jeweils mit allen drei Methoden – qPCR, nested qPCR, PNB-qPCR. Während die PNB-qPCR der nested-qPCR vor allem in der Sensitivität überlegen ist, zeigen beide nested-Applikationen deutlich niedrigere Cq-Werte als die qPCR.

## Ergebnisse



**Abbildung 67** LOQ-Reihen der drei qPCR-Methoden nach Methoden sortiert

Ergebnisse aller LOQ-Reihen der a) qPCR, b) nested qPCR und c) PNB-qPCR. Die verschiedenen Primerpaare weichen in ihrer Effizienz voneinander ab, z.B. weist die Amplifikation von G12C immer die höchsten Cqs auf, die LOQ-Reihen verlaufen jedoch alle parallel zueinander. Die LOQ-Reihen mit höheren Cqs sind nicht weniger spezifisch oder sensitiv als die anderen Reihen. Die Abstände sind in den nested-qPCR-Methoden (b+c) geringer als in der qPCR.



**Abbildung 68** Reproduzierbarkeit der PNB-qPCR Die beiden Abbildungen zeigen die Ergebnisse wiederholter Messungen von LOQ-Reihen aus Fragmenten mit der G12D-Mutation. Abbildung a zeigt die Messungen einer ersten Verdünnungsreihe auf der X-Achse gegen zwei Messungen mit den Fragmenten einer zweiten Standardreihe auf der Y-Achse aufgetragen, die aus erneuten Verdünnungen der Pools gleicher Erstrundenprodukte erstellt wurden. Diese sind untereinander noch einmal in Abbildung b verglichen. Alle Vergleiche zeigen beinahe identische Übereinstimmungen, was auf eine gute Reproduzierbarkeit schließen lässt.

sungen mit den Fragmenten einer zweiten Standardreihe auf der Y-Achse aufgetragen, die aus erneuten Verdünnungen der Pools gleicher Erstrundenprodukte erstellt wurden. Diese sind untereinander noch einmal in Abbildung b verglichen. Alle Vergleiche zeigen beinahe identische Übereinstimmungen, was auf eine gute Reproduzierbarkeit schließen lässt.

### 3.1.6 Anwendung der Methoden auf isolierte DNA

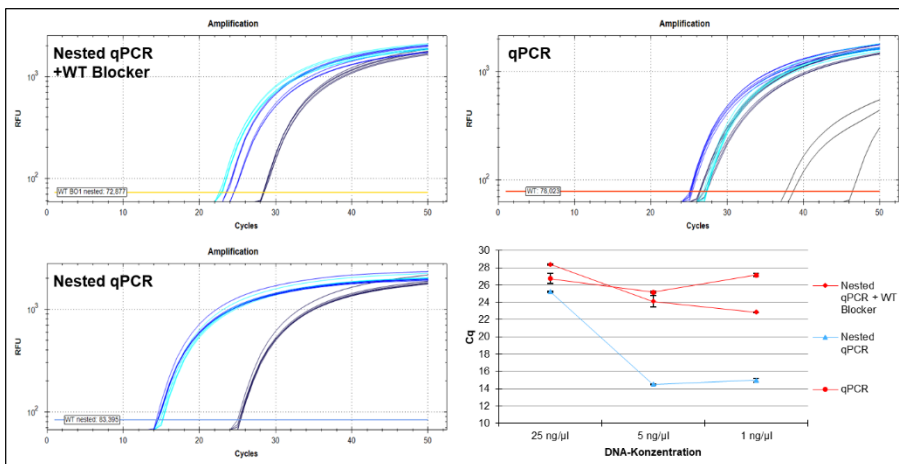
In allen vorherigen Versuchen zur Methodenetablierung wurde artifizielle DNA aus PCR-Vervielfältigungen verwendet. Um sicherzustellen, dass die etablierten Methoden Probenmaterial aus den nachfolgenden Studien erfolgreich analysieren konnten, wurden vorab Testdurchgänge gemacht. So konnten eventuelle Anpassungen an den Isolations-, Verdünnungs- oder Analyseverfahren vorgenommen werden, ohne wichtiges Probenmaterial zu verlieren.

In der Auswertung der Studien wurde Probenmaterial aus zwei Quellen verwendet. Aus Formalin-fixierten in Paraffin eingebetteten (FFPE-) soliden Tumoren wurde genomische DNA isoliert (s. Abschnitt [2.2.5.1](#)) und aus Blutproben wurde Blutplasma gewonnen, aus welchem wiederum frei zirkulierende DNA isoliert wurde (s. [2.2.4.1](#) und [2.2.5.2](#)).



### 3.1.6.1 FFPE-Isolate

DNA aus FFPE-Schnitten ist infolge der Konservierung fragmentiert, wodurch die Qualität der DNA niedrig sein kann. Zusätzlich sind die Proben eventuell teilweise chemisch verunreinigt, was die PCR-Effizienz einschränken kann, bis hin zur totalen Inhibierung der Amplifikation. Da die FFPE-Proben lediglich qualitativ auf die Anwesenheit von Mutationen ausgewertet werden sollten, musste die Genauigkeit der absoluten Quantifizierung nicht geprüft werden. Eine Quantifizierung könnte bei diesem Probenmaterial keine Aussage über den Tumor treffen, da die Beschädigung der DNA durch die FFPE-Konservierung nicht bestimmt werden konnte.

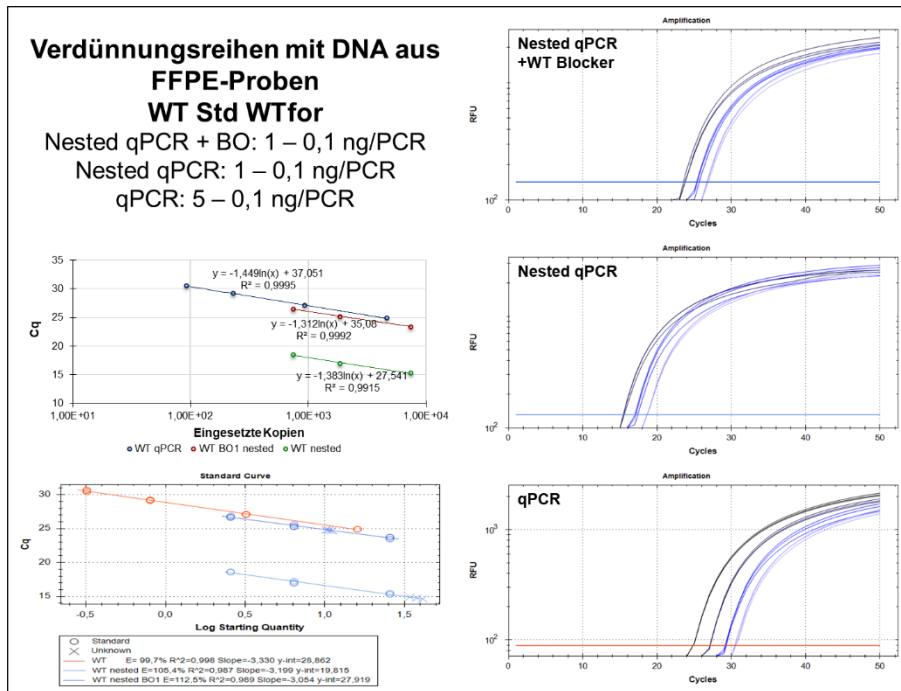


**Abbildung 69** Analyse von FFPE-Testisolaten mit drei Methoden  
FFPE-Testmaterial wurde nach Protokoll isoliert. Das Eluat wurde in zwei Konzentrationen unverdünnt (25 und 5 ng pro PCR) und in einer Konzentration in H<sub>2</sub>O vorverdünnt (1 ng pro PCR) als Template eingesetzt. Diese Templates wurden in PCR-Erstrunden mit und ohne Blocking-Primer

sowie ohne Erstrunde direkt in die qPCR eingesetzt. Die Erstrunde wurde nach Protokoll 2.2.3.3 durchgeführt, mit und ohne 1 µM BO1, die Produkte 1:50 in H<sub>2</sub>O verdünnt, qPCR mit WT Std WTfor bei 67 °C und 30 Sek. Anlage-rung. Alle 25 ng-Ansätze wurden stark inhibiert, sodass die Cq-Werte der 5 ng-Proben und auch die 1 ng-Proben absolut niedriger lagen. Für die nested qPCR mit BO1 lag die 1 ng-Probe sogar niedriger als die 5 ng-Probe. Dies zeugt von einer starken Inhibierung durch das Eluat, welche in der nested qPCR mit BO1 am stärksten und in der qPCR ohne Erstrunde am geringsten ist.

Eine mögliche Inhibierung durch das FFPE-Eluat wurde für die qPCR und die nested qPCR mit und ohne Blocking-Primer getestet, um direkt mögliche Inhibierungsgründe aufdecken zu können. In Abbildung 69 ist zu erkennen, dass alle drei PCR-Methoden tatsächlich durch hochkonzentrierte FFPE-Eluat inhibiert werden, durch niedrigere Konzentrationen aber weniger. Daher wurden Konzentrationsreihen angesetzt, die die Qualität der Inhibierung definieren sollten. Es zeigte sich, dass die zwei verwendeten nested qPCR-Methoden ab einer Konzentration von ≤1 ng DNA pro PCR linear amplifizieren, die qPCR ohne Erstrunde sogar bereits ab 5 ng pro qPCR (Abb. 70). Daher wurde in den Analysen von FFPE-Eluaten maximal eine Konzentration von 1 ng pro PCR eingesetzt.

## Ergebnisse



**Abbildung 70** Verdünnungsreihen mit FFPE-Testisolaten mit drei Methoden  
 FFPE-Testmaterial wurde nach Protokoll isoliert. Das Eluat wurde in Konzentrationsreihen von 5, 1, 0,25 und 0,1 ng pro PCR (in H<sub>2</sub>O verdünnt) als Template eingesetzt. Diese Templates wurden in PCR-Erstrunden mit und ohne Blocking-Primer sowie ohne Erstrunde direkt in die qPCR eingesetzt. Die Erstrunde wurde nach Protokoll [2.2.3.3](#) durchgeführt, mit und ohne 1 µM BO1, die Produkte 1:50 in H<sub>2</sub>O verdünnt, qPCR mit WT Std

WTfor bei 67 °C und 30 Sek. Anlagerung.

Die Inhibierung war in den niedrigeren Konzentrationen deutlich geringer. Die Verdünnungsreihen waren für die nested qPCR mit und ohne BO1 je von 1-0,1 ng pro PCR linear, für die qPCR von 5-0,1 ng pro qPCR.

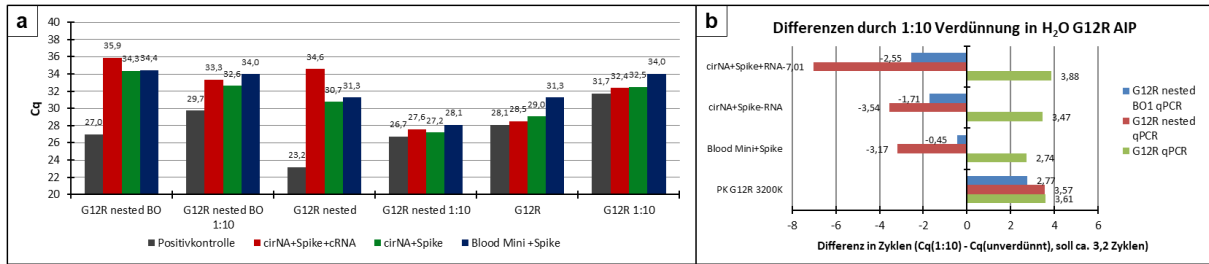
### 3.1.6.2 cfDNA

Der Hauptteil der Proben, die mit den etablierten Methoden analysiert werden sollten, waren Plasmaproben. Hier war auch eine absolute Quantifizierung der cfDNA und der ctDNA notwendig, so dass die verwendeten Eluate die Analyse nicht inhibieren oder anderweitig verfälschen durften.

Erste Tests zeigten jedoch genau dies: eine deutliche Inhibierung der PNB-qPCR durch unverdünntes Eluat, welches in Aufreinigungen aus Plasma mit dem QIAamp® Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll isoliert worden war. Abbildung 71 zeigt, dass eine 1:10 Verdünnung in H<sub>2</sub>O von Eluaten aus Plasma, das mit Ziel-DNA versetzt worden war, die Cq-Werte in den nested qPCR-Methoden absolut senkt, während die Cq-Werte in der qPCR ebenso wie die einer Vergleichskontrolle nach einer Verdünnung wie erwartet ansteigen.

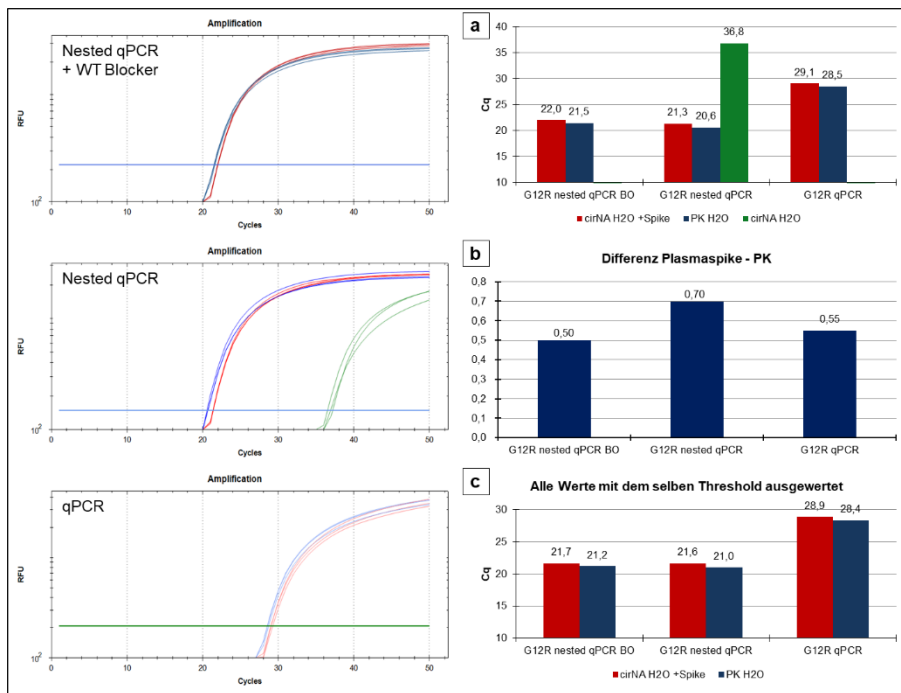
In weiteren Versuchen kristallisierte sich der zur Elution verwendete Puffer des Kits als Inhibierungsursache heraus. Wie die Abbildungen 72 und 73 verdeutlichen, wurden Proben, die mit mutierten Fragmenten versetzt und in H<sub>2</sub>O eluiert worden waren, in der nested qPCR nicht mehr inhibiert. Die anschließend gemessenen Konzentrationen entsprachen den in Positivkontrollen gemessenen Vergleichswerten. In der Folge wurde daher bei der Isolierung von cfDNA aus Plasma mit H<sub>2</sub>O eluiert, um reliable Ergebnisse zu erzielen.

## Ergebnisse



**Abbildung 71** Verdünnungstest mit Eluaten aus gespiketem Plasma

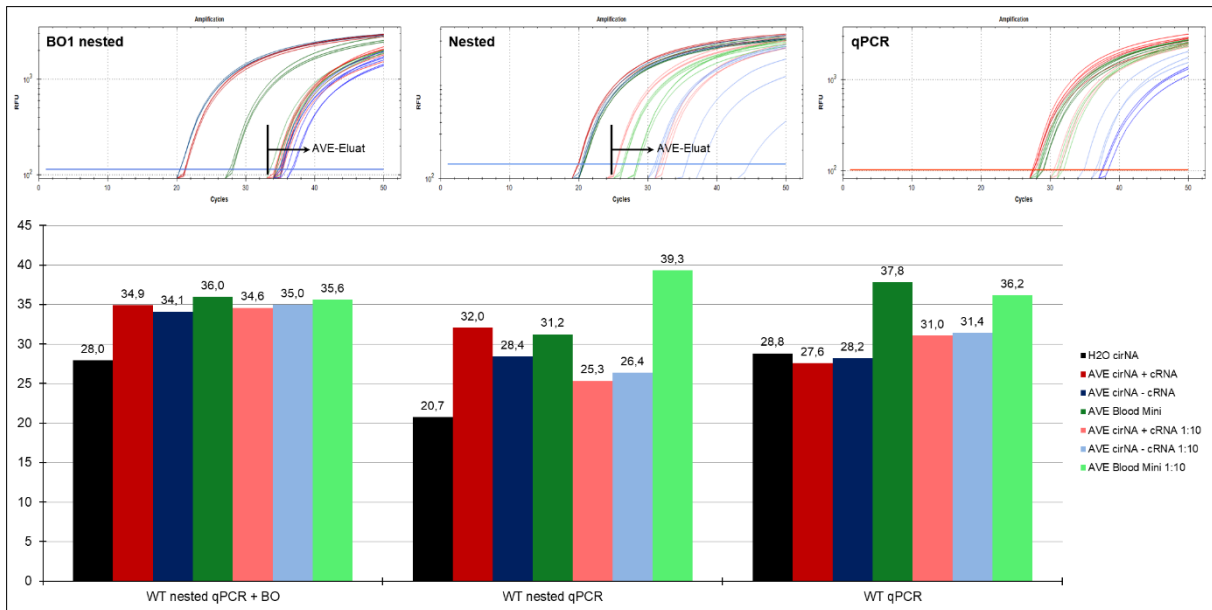
Blutplasma war vor einer DNA-Isolierung mit G12R-DNA versetzt worden, so dass nach der Isolierung eine Konzentration von 1000 Kopien / $\mu$ l Eluat vorhanden war. Es war mit dem QIAamp® Circulating Nucleic Acid (cirNA) Kit mit und ohne Carrier-RNA und mit dem Blood Mini Kit (beide Qiagen) aufgereinigt worden. Die Elution war mit den zugehörigen Puffern durchgeführt worden. Hiervon wurden je 3,2  $\mu$ l in die nested qPCR mit und ohne BO1 sowie direkt in die qPCR eingesetzt. Zum Vergleich wurden die Eluate auch 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt eingesetzt. Die qPCRs wurden mit G12R AIP WTfor nach Protokoll durchgeführt. a) zeigt die Cq-Werte, b) zeigt die Differenzen durch die Verdünnung in Zyklen. Alle Cq-Werte sinken in den nested-Anwendungen durch die 1:10-Verdünnung, obwohl sie rechnerisch um ca. 3,2 Zyklen ansteigen sollten. Die Anstiege sind in der qPCR zu sehen, was belegt, dass die Konzentrationen tatsächlich um 90% abnehmen. Mit Carrier-RNA scheint die Inhibierung noch stärker zu sein. Die Erträge mit dem parallel getesteten Blood Mini Kit sind deutlich geringer als mit dem CirNA-Kit.



**Abbildung 72** Zweiter Test zur cfDNA-Isolierung Plasma war mit G12R-DNA versetzt worden, so dass nach der Isolierung eine Konzentration von 1000 Kopien / $\mu$ l Eluat vorhanden war. Es war mit dem QIAamp® Circulating Nucleic Acid (cirNA) Kit ohne Carrier-RNA aufgereinigt und in H<sub>2</sub>O eluiert worden. Hiervon wurden je 3,2  $\mu$ l in die nested qPCR mit und ohne BO1 sowie direkt in die qPCR eingesetzt. Zum Vergleich diente eine Positivkontrolle (PK) von G12R-DNA gleicher Konzentration in H<sub>2</sub>O. Die qPCRs wurden mit G12R AIP WTfor nach

Protokoll durchgeführt. a) zeigt die Cq-Werte, b) die jeweiligen Differenzen zur PK in Zyklen, c) noch mal die Cq-Werte der Vergleiche, aber alle identisch ausgewertet. Die Elution mit H<sub>2</sub>O scheint die Inhibierung zu verhindern, verbliebene Differenzen zur PK sind durch den Isolierungsvorgang zu erklären. Der Versuch zeigt auch noch einmal, dass die Ergebnisse mit und ohne BO1 in der Erstrunde für mutierte Fragmente kaum einen Unterschied machen, der Blocking-Primer inhibiert die Amplifikation mutierter Fragmente nicht.

## Ergebnisse



**Abbildung 73** Dritter Test zur cfDNA-Isolierung

Es wurden in einem erneuten Versuchsdurchlauf Templates der beiden vorherigen Tests direkt verglichen, allerdings mit dem WT Std Primer und nur Templates ohne Zugabe von G12R-Fragmenten. Die Templates wurden zu je 3,2 µl in die nested qPCR mit und ohne BO1 sowie direkt in die qPCR eingesetzt. qPCRs mit WT Std WTfor nach Protokoll. Die vorherigen Ergebnisse bestätigen sich, die Cqs in H<sub>2</sub>O eluierte Probe liegen deutlich niedriger als die der im Puffer eluierten Proben. Ebenso bestätigt sich das Sinken der Cq-Werte nach einer 1:10-Verdünnung. Da es sich um eine WT-qPCR handelt, sind die Cq-Werte der nested qPCR ohne BO1 niedriger.

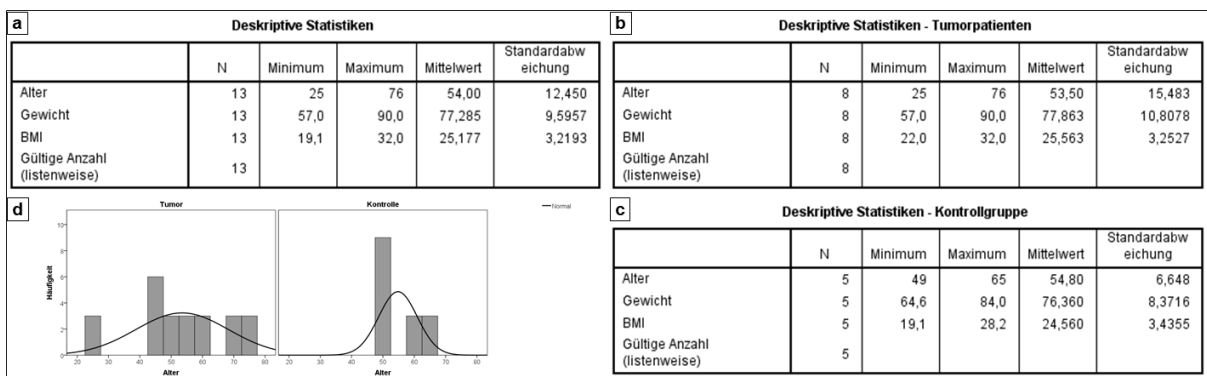
### 3.2 Studienergebnisse „Entwicklungen frei zirkulierender DNA bei Krebspatienten unter erschöpfender körperlicher Belastung“

#### 3.2.1 Rekrutierung der Patienten

Für die Studie konnten acht Patienten mit einer Tumorerkrankung sowie fünf Kontrollprobanden ohne bekannte Tumorerkrankung rekrutiert werden. Da die Tumorpatienten Träger eines soliden Tumors sein sollten und gleichzeitig körperlich noch in der Lage, einen Belastungstest durchzuführen, war die potentielle Zielgruppe für die Rekrutierung klein. Erschwert wurde die Rekrutierung zusätzlich durch eine geringe Bereitschaft des Kollektivs zur Teilnahme an der Studie. Die beabsichtigte Teilnehmerzahl für die Studie konnte nicht erreicht werden, da der gesetzte Zeitrahmen überschritten wurde.

Drei Patienten mit Tumorerkrankung wurden rekrutiert, konnten aber aufgrund der Versuchsumstände nicht in die Studiauswertung aufgenommen werden. Hiervon hatte ein Patient zu hohe Blutdruckwerte vor Beginn der körperlichen Belastung, was einen Belastungstest ausschloss, und zwei Patienten konnte im Anschluss an die Belastung kein Blut entnommen werden. Zusätzlich konnte einem Patienten die Probe 90 Min. nach Ende der Belastung nicht abgenommen werden, da der Blutfluss gehemmt war.

Die Tumorgruppe war sehr heterogen in Bezug auf die Tumorentität. Es waren 4 Patienten mit Kolonkarzinom, einer davon postoperativ mit Metastasen, sowie zwei Patienten mit Ösophaguskarzinomen, ein Patient mit Magenkarzinom und ein Patient mit Mamma- sowie Schilddrüsenkarzinomen. Drei Patienten hatten detektierte Metastasen. Die Tumorgruppe bestand aus drei weiblichen und fünf männlichen Teilnehmern, die Kontrollgruppe aus fünf männlichen Probanden. Die deskriptive Statistik in Abbildung 74 zeigt, dass die Mittelwerte der beiden Gruppen gut aneinander angeglichen sind, wobei die Streuung in der Tumorgruppe für alle Werte größer ist.



**Abbildung 74** Deskriptive Statistiken der Belastungsstudie – allgemein

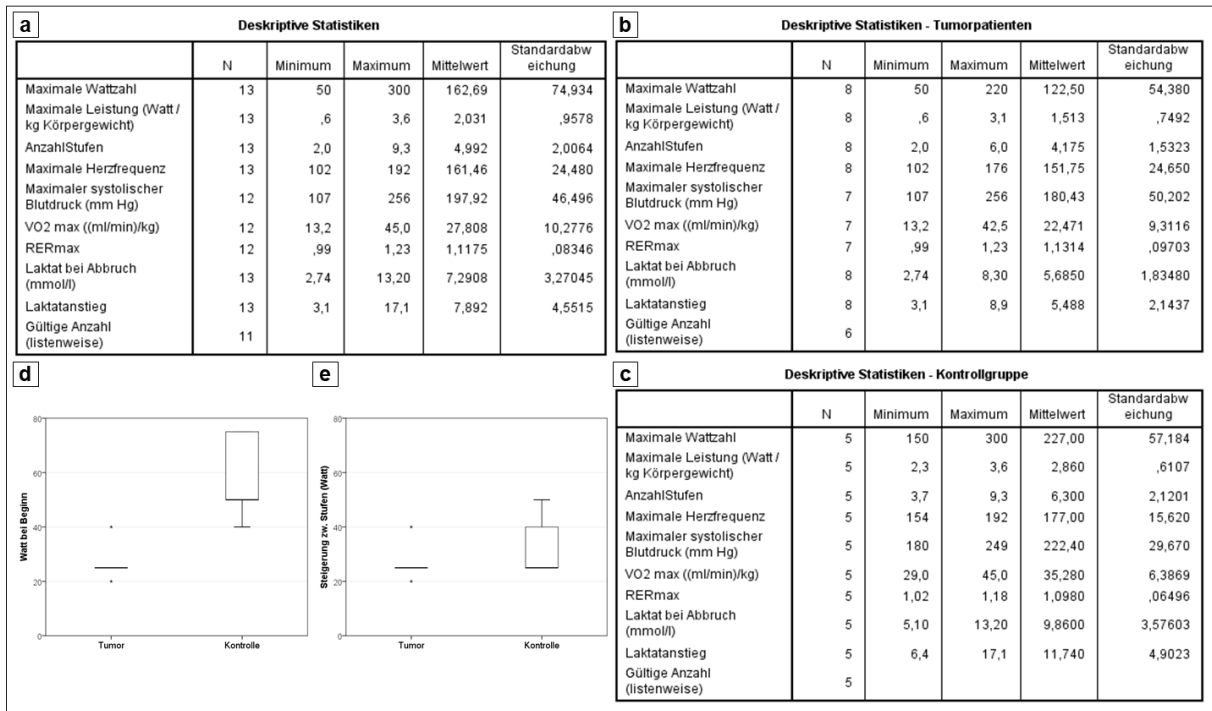
Die Mittelwerte der Untergruppen unterscheiden sich kaum. Die Standardabweichungen innerhalb der Tumorgruppe sind jedoch deutlich größer, in Abbildung d) repräsentativ für das Alter veranschaulicht. Der einzige Wert, der sich sichtbar aber nicht statistisch relevant unterscheidet, ist der BMI.

### 3.2.2 Belastungsphysiologische Parameter

Alle in die Auswertung aufgenommenen Patienten absolvierten den Belastungstest bis zur subjektiven körperlichen Ausbelastung. Der durchschnittliche BORG-Wert bei Abbruch betrug 18,3 für die Gesamtgruppe, 18,1 für die Tumorgruppe und 18,6 für die Kontrollgruppe. Abbildung 75 gibt einen Überblick über die gemessenen Belastungsparameter.

Die belastungsphysiologischen Parameter waren keine Zielmessgröße der Studie, aber dennoch wichtige mögliche Anhaltspunkte für die Entwicklung der cfDNA und der ctDNA unter körperlicher Ausbelastung. Belastungsphysiologischen Parameter, wie die maximale Leistung, die Herzfrequenz, der Blutdruck, die Sauerstoffaufnahme ( $\dot{V}O_2$ ), der respiratorische Quotient (RQ, hier RER für Respiratory Exchange Ratio), der Laktatwert bei Abbruch der Belastung, oder der Laktatanstieg während der Belastung, wurden im Rahmen der Belastung auf dem Fahrradergometer durch das Testsystem routinemäßig und standardisiert erhoben (Abschnitt 2.3.3). Da sie einen Überblick über die physiologische Entwicklung in den Gruppen unter Belastung liefern, werden sie hier zuerst besprochen.

## Ergebnisse



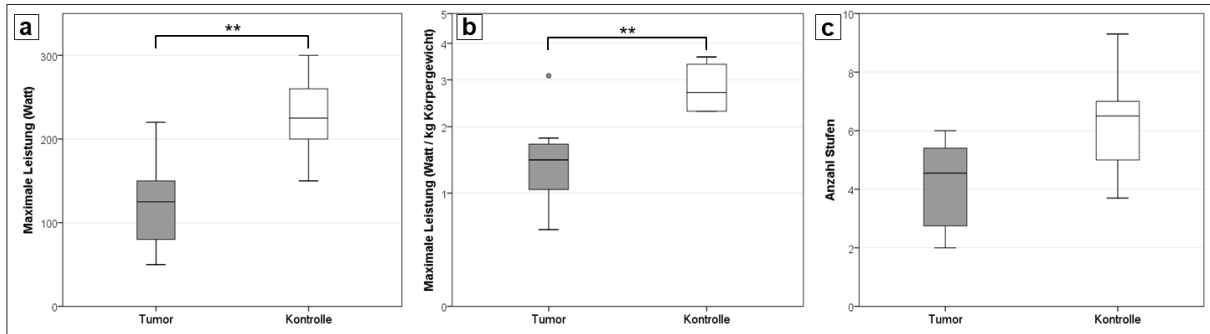
**Abbildung 75** Deskriptive Statistik der Belastungsstudie – Belastungsphysiologische Parameter

Die deskriptive Statistik der Belastungsparameter, aufgeteilt nach a) Gesamtgruppe, b) nur Tumorpatienten und c) nur Kontrollpatienten. Die Kontrollgruppe liegt bei allen Parametern deutlich über der Tumorgruppe, mit Ausnahme des RER max. Abbildungen d) und e) zeigen, dass für die Kontrollgruppe außerdem anspruchsvollere Protokolle gewählt worden waren. Die individuelle Belastung bei Abbruch, bestimmt anhand der Borg-Skala, unterscheidet sich zwischen den Gruppen kaum ( $\bar{x}$  18,1 Tumorgruppe und 18,6 Kontrollgruppe).

### 3.2.2.1 Leistung und Belastungsdauer

Die Kontrollpatienten erreichten im Durchschnitt eine signifikant höhere maximale Leistung in Watt, sowohl absolut als auch im Verhältnis zum Körpergewicht (Abb. 75+76), was eine höhere Leistungsfähigkeit belegt. Sie fuhren außerdem tendenziell mehr Teststufen als die Tumorgruppe, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Die Belastungszeit, die aus der Stufenzahl resultiert, für alle Studienteilnehmer möglichst gleich zu halten war ein Ziel der Wahl unterschiedlicher Testprotokolle, und wurde weitgehend erreicht. Die Stufenzahl der weiblichen Tumorpatienten, isoliert betrachtet, war hingegen signifikant niedriger als die der Kontrollgruppe (im Durchschnitt 2,5 zu 6,3,  $P = 0,015$ ), aber nicht als die der männlichen Tumorpatienten (im Durchschnitt 5,2,  $P = 0,089$ , beides ANOVA). Für die weibliche Teilgruppe waren die Protokolle daher möglicherweise zu schwer gewählt.

## Ergebnisse



**Abbildung 76** Vergleiche Leistung und Stufenzahl nach Gruppen

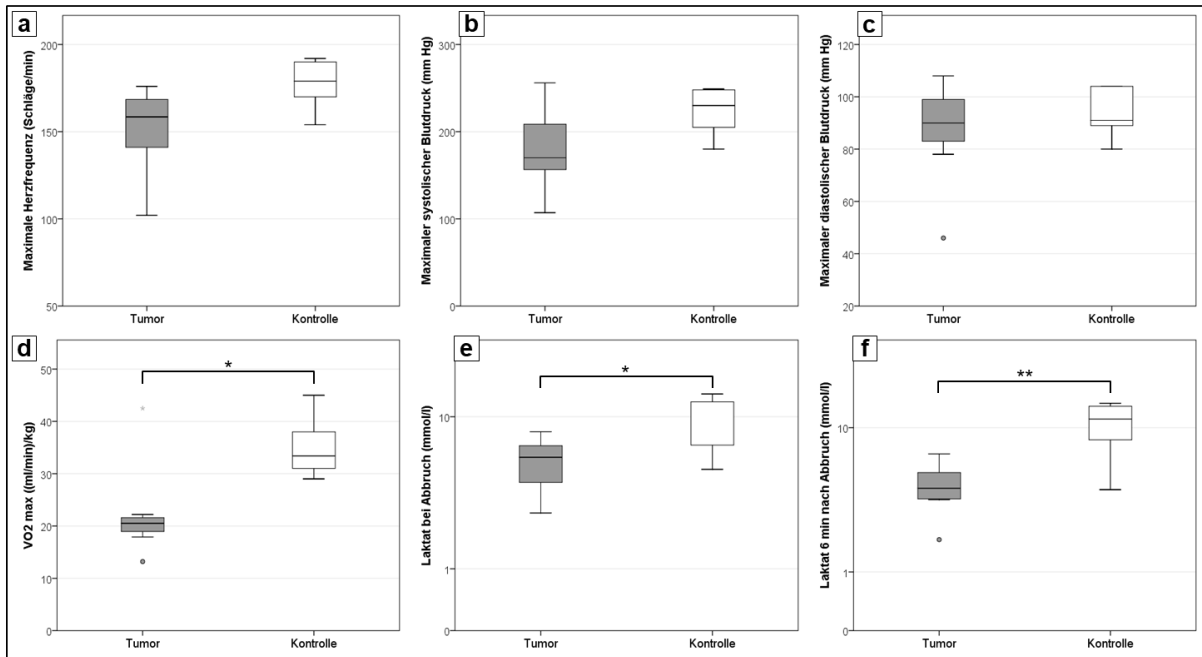
Sowohl die maximale Leistung (a,  $\bar{x}$  123 W (Stabw. 54,4 W) in der Tumorgruppe zu 227 W (57,2 W) in der Kontrollgruppe;  $P = 0,007$ ), als auch die an das Körpergewicht angepasste Leistung (b,  $\bar{x}$  1,51 (0,75) W/kg in der Tumorgruppe zu 2,86 (0,61) W/kg in der Kontrollgruppe;  $P = 0,006$ ) waren in der Tumorgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Die Anzahl absolvierter Teststufen hingegen war nicht signifikant unterschiedlich (c,  $\bar{x}$  4,2 (1,5) in der Tumorgruppe zu 6,3 (2,1) Stufen in der Kontrollgruppe).

### 3.2.2.2 Belastungsparameter

Die Werte der Kontrollgruppe lagen in allen physiologischen Belastungsparametern über denen der Tumorgruppe, außer dem maximalen RER (Abbildung 75). Dieser trifft jedoch keine Aussage über Leistung oder Leistungsfähigkeit, sondern lediglich über die momentane individuelle Belastung sowie den momentanen Stoffwechsel. Die Ruhewerte vor Belastung unterschieden sich zwischen den Gruppen nur in der Herzfrequenz, hier lag die Tumorgruppe signifikant über der Kontrollgruppe ( $P = 0,011$ ; Tumor: MW 92,1 (Stabw. 12,2) Schläge/Min.; Kontrolle: MW 72,6 (Stabw. 9,1) Schläge/Min., ANOVA, Abb. 78).

Die Belastungswerte für die  $\dot{V}O_2\max$  ( $P = 0,024$ ; Tumor: MW 22,5 (Stabw. 9,3) (ml  $O_2$ /min)/kg; Kontrolle: MW 35,3 (Stabw. 6,4) (ml  $O_2$ /min)/kg) und Laktat direkt nach Belastungsende ( $P = 0,017$ ; Tumor: MW 5,69 (Stabw. 1,83) mmol/l; Kontrolle: MW 9,86 (Stabw. 3,58) mmol/l) waren signifikant unterschiedlich, die für Laktat 6 Min. nach Abbruch ( $P = 0,006$ ; Tumor: MW 4,55 (Stabw. 1,67) mmol/l; Kontrolle: MW 10,17 (Stabw. 3,86) mmol/l) sogar hochsignifikant unterschiedlich zwischen den zwei Gruppen (ANOVA, Abb. 77). Maximale Herzfrequenz und maximaler Blutdruck waren zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich, allerdings lag die maximale Herzfrequenz der weiblichen Teilnehmer signifikant unter den männlichen Tumorpatienten und den Kontrollpatienten (Tumorgruppe weibl. ( $\bar{x}$  128, Stabw. 25,1) vs. Tumorgruppe männl. ( $\bar{x}$  166, Stabw. 8,5):  $P = 0,025$ , und vs. Kontrolle männl. ( $\bar{x}$  177, Stabw. 15,6):  $P = 0,005$ , ANOVA mit Post-Hoc-Test nach Bonferroni, Abb. 79). Bei allen anderen Belastungsparametern, wie der  $\dot{V}O_2\max$  (gesamt:  $\rho = 0,61$ ,  $P = 0,035$ , ANOVA) oder den Laktatwerten (nicht signifikant), unterschieden sich die weibliche und die männliche Tumorgruppe weniger deutlich und lagen dichter beieinander als zur Kontrollgruppe.

## Ergebnisse



**Abbildung 77** Gruppenvergleiche der maximalen Belastungsparameter

Die maximalen belastungsphysiologischen Parameter im Vergleich zwischen der Tumor- und der Kontrollgruppe. Die Werte der Kontrollgruppe waren signifikant höher für  $\dot{V}O_2\text{max}$  (d,  $\bar{x}$  22,5 in der Tumorgruppe zu 35,3 in der Kontrollgruppe;  $P = 0,024$ ) und die Laktatwerte direkt nach Abbruch (e,  $\bar{x}$  5,69 in der Tumorgruppe zu 9,86 in der Kontrollgruppe;  $P = 0,017$ ) und 6 Min. nach Abbruch der Belastung (f,  $\bar{x}$  4,55 in der Tumorgruppe zu 10,17 in der Kontrollgruppe;  $P = 0,006$ ). Nicht signifikant verschieden waren die maximale Herzfrequenz (a) und der maximale systolische (b) sowie diastolische (c) Blutdruck, die sich nur in der Tendenz zwischen den Gruppen unterschieden. Alle Tests waren ANOVAs.

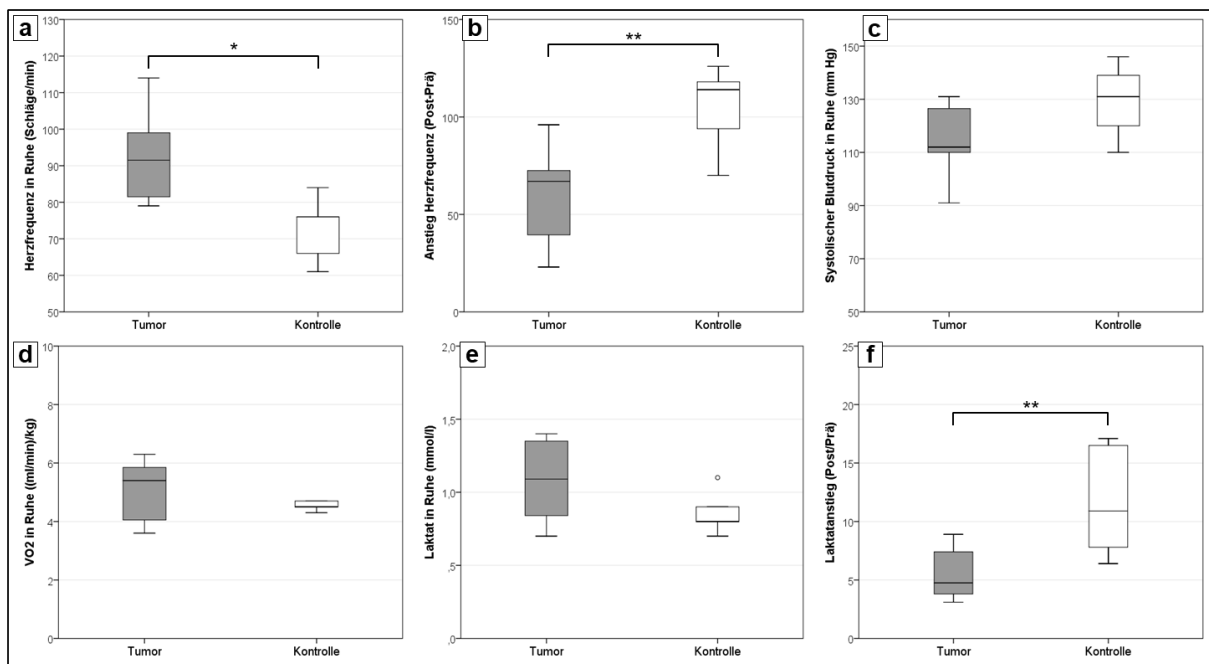
Für die Herzfrequenz und Laktat wurden dynamische Werte als zusätzliche Parameter der körperlichen Belastung gebildet. Für die Herzfrequenz wurde die Zunahme als Differenz aus dem post-Wert minus den prä-Wert errechnet, für Laktat der Anstieg, ein Quotient aus dem post-Wert geteilt durch den prä-Wert. Diese dynamischen Werte waren ebenfalls beide in der Tumorgruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Zunahme Herzfrequenz:  $P = 0,006$ ; Tumor: MW 59,6 (Stabw. 23,9) Schläge/Min.; Kontrolle: MW 104,4 (Stabw. 22,6) Schläge/Min.; Anstieg Laktat:  $P = 0,008$ ; Tumor: MW 5,49 (Stabw. 2,14); Kontrolle: MW 11,74 (Stabw. 4,9), ANOVA, Abb. 78). Die Zunahme der Herzfrequenz unterschied sich auch nach Geschlechtern aufgetrennt mehr zwischen Tumor- und Kontrollgruppe, als zwischen Männern und Frauen. Insgesamt zeigten somit fast alle physiologischen Belastungsparameter signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen: die dynamische Zunahme der Herzfrequenz, die  $\dot{V}O_2\text{max}$ , die absoluten Laktatwerte sowie der dynamische Laktatanstieg.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob diese Werte direkt mit der Leistung der Teilnehmer im Belastungstest zusammenhing. Die absolute und die gewichtsabhängige maximal erreichte Leistung korrelierten stark mit der maximalen Herzfrequenz ( $\rho = 0,814$  absolut und  $0,798$  gewichtsabhängig,  $P = 0,001$  für  $n = 13$ ), der  $\dot{V}O_2\text{max}$  (höchste erreichte Sauerstoffaufnahme)



## Ergebnisse

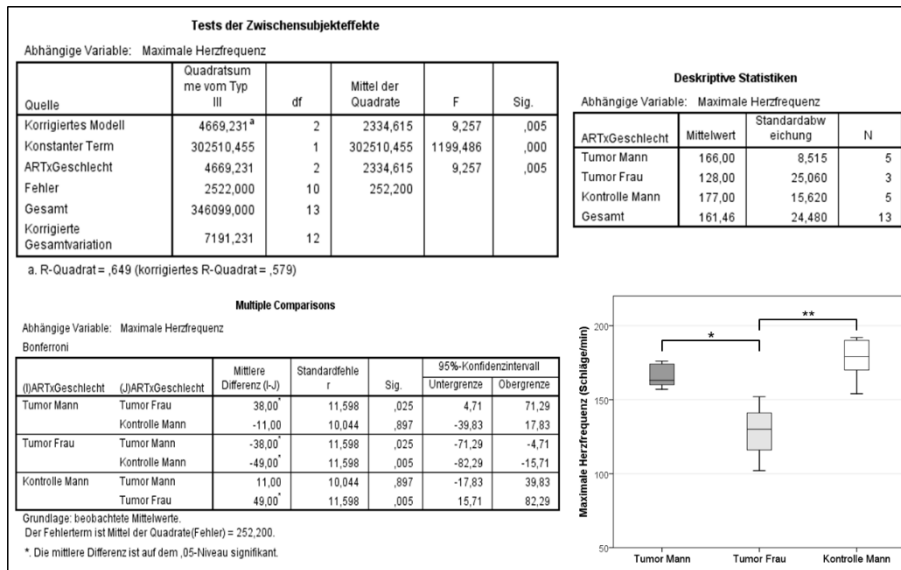
( $\rho = 0,9$  absolut und  $0,969$  gewichtsabhängig,  $P < 0,001$  für  $n = 12$ ), den Laktatwerten bei Belastungsabbruch ( $\rho = 0,678$ ,  $P = 0,011$  absolut und  $\rho = 0,656$ ,  $P = 0,015$  gewichtsabhängig für  $n = 13$ ) und 6 Min. nach Abbruch ( $\rho = 0,739$ ,  $P = 0,006$  absolut und  $\rho = 0,696$ ,  $P = 0,012$  gewichtsabhängig für  $n = 12$ ) sowie dem Laktatanstieg ( $\rho = 0,613$ ,  $P = 0,026$  absolut und  $\rho = 0,645$ ,  $P = 0,017$  gewichtsabhängig für  $n = 13$ , Pearson-Korrelationen). Die absolvierte Stufenzahl hingegen korrelierte nur signifikant mit der maximalen Herzfrequenz ( $\rho = 0,711$ ,  $P = 0,006$  für  $n = 13$ ) und schwächer mit der  $\dot{V}O_2\max$  ( $\rho = 0,61$ ,  $P = 0,035$  für  $n = 12$ , beide Pearson-Korrelationen). Allerdings korrelierte die Zahl der gefahrenen Stufen ebenfalls positiv mit der Wattlast bei Start der Belastung ( $\rho = 0,714$ ,  $P = 0,006$  für  $n = 13$ , Pearson-Korrelation). Das bedeutet, dass Teilnehmer mit einem anspruchsvolleren Testprotokoll zusätzlich auch mehr Stufen fuhren. Da die Korrelationen der physiologischen Belastungsparameter mit der maximalen Leistung stärker sind als die mit der Stufenzahl, ist ein verzerrender Einfluss der gewählten Belastungsprotokolle auf die Messergebnisse unwahrscheinlich.



**Abbildung 78** Gruppenvergleiche der Belastungsparameter prä und dynamische Werte

Von den Ruhewerten vor der Belastung unterschieden sich die Gruppen nur in der Herzfrequenz in Ruhe signifikant (a,  $\bar{x}$  92,1 Schläge/Min. in der Tumor- zu 72,6 Schläge/Min. in der Kontrollgruppe;  $P = 0,011$ ). Bei beiden errechneten dynamischen Parametern – der Zunahme der Herzfrequenz und dem Anstieg des Laktatwerts – lagen die Werte der Tumorgruppe hochsignifikant unter denen der Kontrollgruppe (b: Anstieg Herzfrequenz:  $\bar{x}$  59,6 Schläge/Min. in der Tumor- zu 104,4 Schläge/Min. in der Kontrollgruppe;  $P = 0,006$ ; f: Laktatanstieg:  $\bar{x}$  5,5 mmol/l in der Tumor- zu 11,7 mmol/l in der Kontrollgruppe;  $P = 0,008$ ). Alle Tests waren ANOVAs.

## Ergebnisse



**Abbildung 79** Maximale Herzfrequenz nach Geschlecht aufgetrennt

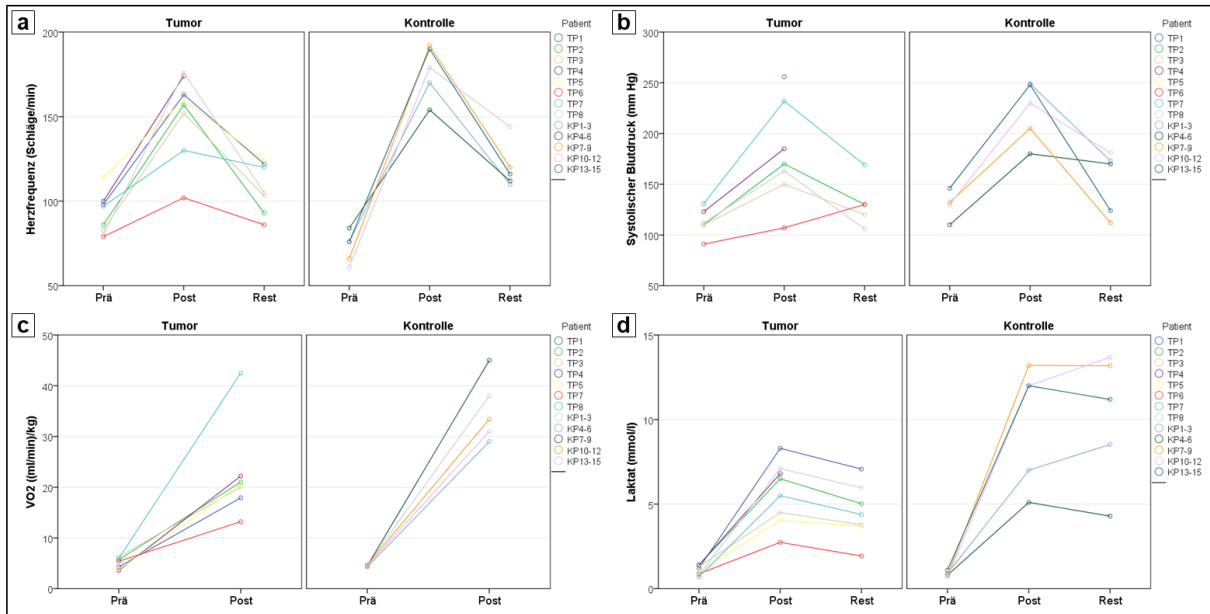
Die maximale Herzfrequenz unterschied sich zwischen der Gruppe der weiblichen und der der männlichen Tumorpatienten signifikant, zwischen den weiblichen Tumorpatienten und den Kontrollprobanden sogar hochsignifikant (Werte s. Abb.). Die männlichen Tumorpatienten und die Kontrollgruppe unterschieden sich nicht signifikant. Somit ist bei diesem Parameter hier das Geschlecht entscheidender als der Tumorstatus.

### 3.2.2.3 Entwicklungen der Belastungsparameter

Die Entwicklungen der physiologischen Belastungsparameter verliefen über den Zeitraum der Messungen hinweg, mit wenigen Ausnahmen, zwischen den Gruppen gleich, wie in den Abbildungen 80 bis 82 dargestellt ist. Die Werte stiegen während der Belastung wie erwartet an und sanken in den ersten sechs Minuten nach Ende der Belastung bereits wieder teilweise (Herzfrequenz, Laktat) bis vollständig (Blutdruck) ab (Abb. 80). Eine Ausnahme bildete der Laktatwert in der Kontrollgruppe, der im Durchschnitt leicht weiter anstieg (Abb. 80d).

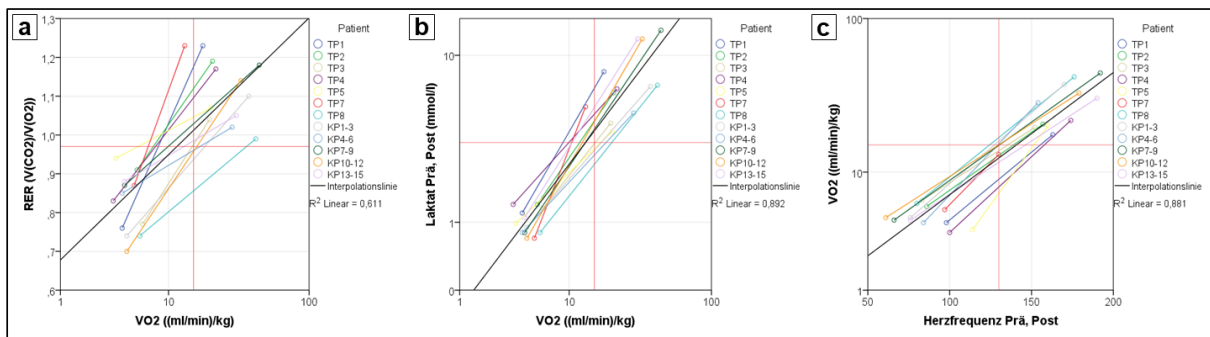
Die Gleichmäßigkeit der Entwicklungen über den Zeitraum der Belastung ist in Abbildung 81 verdeutlicht. Die Parameter weisen in vergleichbarem Maße Anstiege auf, wenn sie miteinander in Verbindung gesetzt werden. Hierbei ist kein systematischer Unterschied zwischen den einzelnen Teilnehmern zu erkennen.

# Ergebnisse



**Abbildung 80** Entwicklungen der Belastungsparameter

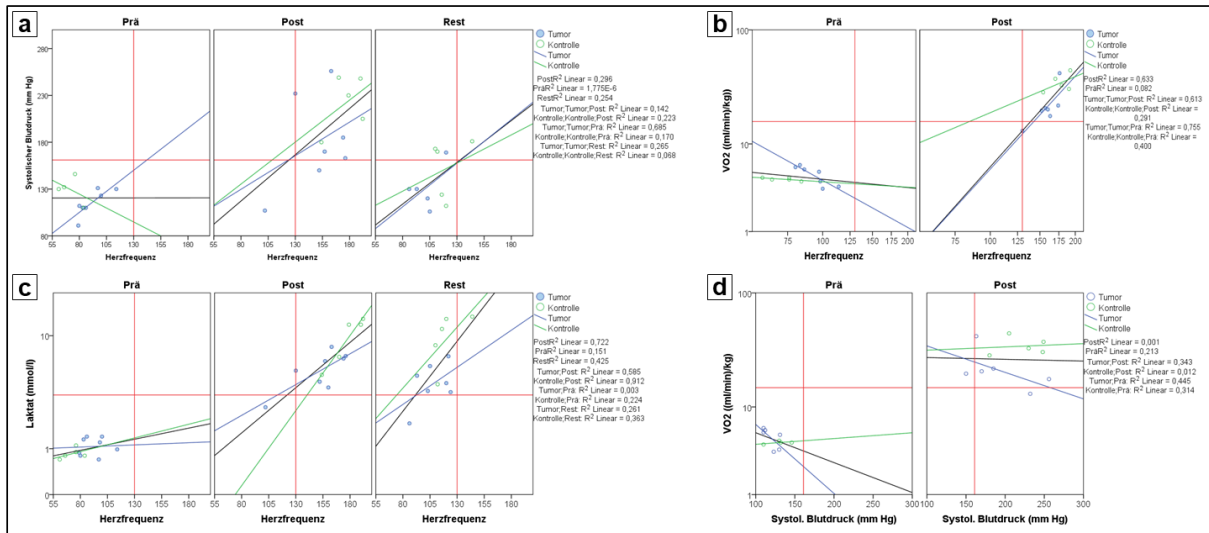
Die Entwicklungen der wichtigsten belastungsphysiologischen Parameter im Vergleich zwischen Tumor- und Kontrollgruppe zeigen gleiche Tendenzen bei unterschiedlichen Ausprägungen. So zeigt die Kontrollgruppe in fast allen Fällen stärkere dynamische Anstiege, mit der Ausnahme des systolischen Blutdrucks und von TP8 bei der  $\dot{V}O_2$ . Das Wiederabsinken der Herzfrequenz und des Laktats sind hingegen bei der Tumorgruppe stärker ausgeprägt. Der „rest“-Wert bezieht hier sich auf eine Messung 6 Min. nach Belastungsabbruch und darf nicht mit dem 90 Min.-Wert, der unten für cfDNA-Konzentrationen angegeben wird, verwechselt werden.



**Abbildung 81** Entwicklungen während der Belastung

Die Werte vor und nach Belastung wurden für je zwei Belastungsparameter gegeneinander aufgetragen. Es zeigt sich eine gleichmäßige Entwicklung über die Teilnehmergruppen hinweg.

Wenn die Parameter hingegen nach den einzelnen Zeitpunkten und nach Gruppen getrennt gegeneinander aufgetragen werden, so zeigen sich teilweise unterschiedliche Entwicklungen (Abb. 82). So zeigt sich bei gemeinsamer Betrachtung von Herzfrequenz und  $\dot{V}O_2$  in Abbildung 82b, dass in der Tumorgruppe die Werte vor Belastung negativ miteinander korrelieren, nach Belastung jedoch positiv. Diese Entwicklung zeigte sich in der Kontrollgruppe nur Ansatzweise. Dies könnte auf den verschlechterten gesundheitlichen Grundzustand der Tumorgruppe sowie auf eine reduzierte Leistungsfähigkeit zurückzuführen sein bzw. diesen unabhängig von der Tumordiagnose belegen.



**Abbildung 82** Verbindungen der Belastungsparameter nach Zeitpunkten und Gruppen  
 a) Die Herzfrequenz gegen den systolischen Blutdruck aufgetragen zeigt ähnliche Entwicklungen beider Parameter. Beide steigen von prä nach post an und sinken nach rest wieder ab. Gruppenunterschiede sind keine zu erkennen.  
 b) Die  $\dot{V}O_2$  und die Herzfrequenz gegeneinander aufgetragen steigen ebenfalls beide an. Die Werte der Tumorgruppe korrelieren prä negativ und post positiv. c) Die Herzfrequenz und Laktat gegeneinander aufgetragen steigen beide von prä zu post an, der Laktatwert sinkt jedoch zu rest hin nur schwach oder nicht ab. Post korrelieren sowohl die Gesamtgruppe, als auch beide Untergruppen positiv. d) Die  $\dot{V}O_2$  gegen den systolischen Blutdruck aufgetragen zeigt einen gleichartigen Anstieg unabhängig von der Gruppe. Keine Werte korrelieren.

### 3.2.3 cfDNA-Werte und Zusammenhänge mit anderen Messparametern

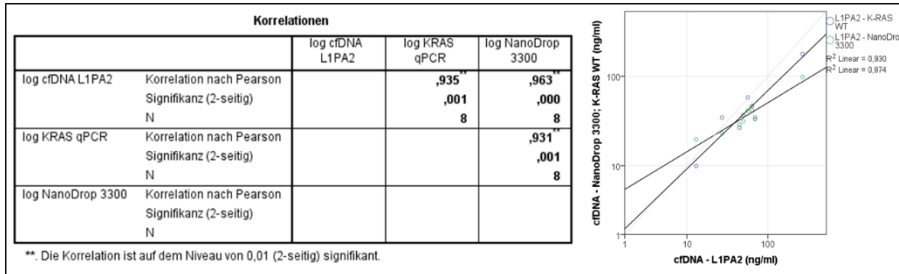
#### 3.2.3.1 cfDNA-Werte allgemein

Die cfDNA-Konzentrationen wurden aus dem venösen Blutplasma aller Patienten für alle drei Zeitpunkte mit der L1PA2-qPCR bestimmt, wie in Abschnitt 2.2.3.5.2 beschrieben. Alle durchgeführten Messungen lagen im LOQ-Bereich (Abb. 84a). Vergleichsmessungen wurden an isolierter cfDNA mittels dem NanoDrop 3300 (Abschnitt 2.2.1.5) sowie der mutationsunspezifischen KRAS-qPCR (Abschnitt 2.2.3.2 und Abb. 28) durchgeführt. Diese Messungen bestätigten die Ergebnisse (Abb. 83). So wurde einerseits die Messmethode kontrolliert und andererseits überprüft, dass die cfDNA-Aufreinigung keine Verzerrungen zwischen den Proben verursacht hatte.

Die cfDNA-Konzentrationen der Gesamtgruppe lagen in Ruhe vor Belastung („prä“) im Durchschnitt bei 32,96 ng/ml (7,52-120,45 ng/ml), nach der Ausbelastung bei 73,12 ng/ml (13,17-260,21 ng/ml) und nach anschließender 90-minütiger Erholung bei 31,45 ng/ml (9,28-126,89 ng/ml) (Abb. 84). Die cfDNA-Konzentrationen aller Patienten waren direkt nach Ende der körperlichen Ausbelastung („post“) angestiegen und nach einer 90-minütigen Ruhephase („rest“) wieder abgesunken (Abb. 86 a+b). Die prä-Konzentrationen korrelierten mit den post- Konzentrationen ( $p = 0,724$ ,  $P < 0,005$  für  $n = 13$ ) und den rest- Konzentrationen ( $p = 0,914$ ,

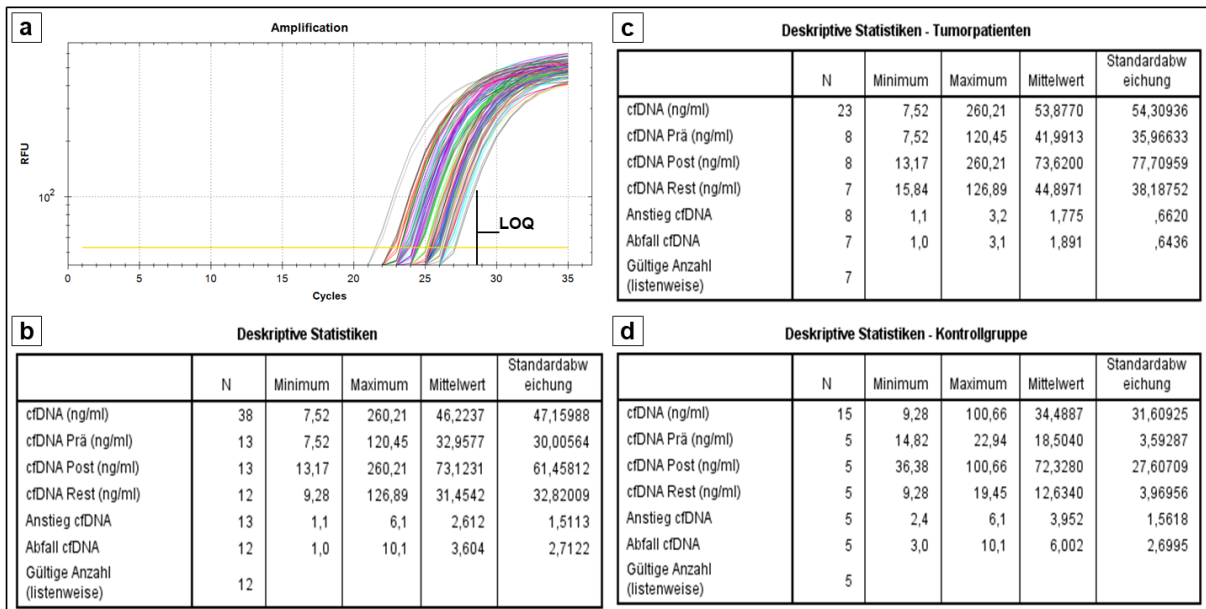
## Ergebnisse

$P < 0,001$  für  $n = 12$ ), post und rest untereinander aber nicht (Pearson-Korrelationen, Abbildung 85). Dies deutet Unterschiede in den zwei Phasen – der Belastungs- und der Regenerationsphase – an.



**Abbildung 83** Korrelation der Messmethoden  
Die Korrelationen der L1PA2-qPCR, der KRAS-qPCR und der NanoDrop 3300-Messungen in der Datenauswertung (links) und im Punktdiagramm, mit der L1PA2-qPCR auf

der X-Achse und den beiden anderen Messungen auf der Y-Achse (rechts). Die Korrelationen zwischen den Messungen gleicher Proben mit den verschiedenen Messmethoden waren trotz der geringen Fallzahl hochsignifikant. Durch die Plasmaisolierung waren die Werte der Messverfahren mit isolierter cfDNA etwas niedriger, die Isolierung verfälschte die Messungen aber nicht.



**Abbildung 84** Deskriptive Statistik der cfDNA-Konzentrationen der Gruppen der Tumorbelastungsstudie  
Abbildung a zeigt die Messkurven der L1PA2-Messung der Plasmaproben der Tumorbelastungsstudie. Alle Messungen lagen über dem LOQ. Abbildungen b-d zeigen die deskriptive Statistik der cfDNA-Konzentrationen zu den drei Messzeitpunkten sowie den cfDNA-Anstieg und -Abfall für die Gesamtgruppe (b) und separat für Tumor- (c) und Kontrollgruppe (d).

Die Streuung der cfDNA-Konzentrationen und auch der cfDNA-Anstiege während der Belastung in der Tumorgruppe war zu allen Zeitpunkten deutlich größer als die Streuung in der Kontrollgruppe (Abb. 84, 86a+b). Die cfDNA-Konzentrationen prä und post unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Abb. 86c-e, g+h), die rest-Konzentrationen der Tumorgruppe lagen hingegen signifikant über denen der Kontrollgruppe (prä:  $P = 0,203$ , Tumor MW 41,99 ng/ml (7,52-120,45 ng/ml), Kontrolle MW 18,5 ng/ml (14,82-22,94 ng/ml); post:

## Ergebnisse

P = 0,552, Tumor MW 73,62 ng/ml (13,17-260,21 ng/ml), Kontrolle MW 72,32 ng/ml (36,38-100,66 ng/ml); rest: P = 0,01, Tumor MW 44,9 ng/ml (15,84-126,89 ng/ml), Kontrolle MW 12,63 ng/ml (9,28-19,45 ng/ml); ANOVAs, Abb. 86).

		Korrelationen						
		log cfDNA Prä (ng/ml)	log cfDNA Post (ng/ml)	log cfDNA Rest (ng/ml)	log Anstieg cfDNA	log Abfall cfDNA	log Differenz Anstieg - Abfall	Differenz Prä - Rest (ng/ml)
log cfDNA Prä (ng/ml)	Korrelation nach Pearson		<b>,724**</b>	<b>,914**</b>	-,382	-,529	-,498	-,023
	Signifikanz (2-seitig)		<b>,005</b>	<b>,000</b>	,198	,077	,100	,943
	N		<b>13</b>	<b>12</b>	13	12	12	12
log cfDNA Post (ng/ml)	Korrelation nach Pearson			,515	,361	,253	-,095	-,138
	Signifikanz (2-seitig)			,086	,225	,427	,769	,669
	N			12	13	12	12	12
log cfDNA Rest (ng/ml)	Korrelation nach Pearson				-,531	-,698*	-,660*	-,383
	Signifikanz (2-seitig)				,076	<b>,012</b>	<b>,019</b>	,219
	N				12	<b>12</b>	<b>12</b>	12
log Anstieg cfDNA	Korrelation nach Pearson					<b>,889**</b>	,485	-,118
	Signifikanz (2-seitig)					<b>,000</b>	,110	,716
	N					<b>12</b>	12	12
log Abfall cfDNA	Korrelation nach Pearson						<b>,666</b>	,316
	Signifikanz (2-seitig)						<b>,018</b>	,317
	N						<b>12</b>	12
log Differenz Anstieg - Abfall	Korrelation nach Pearson							,349
	Signifikanz (2-seitig)							,266
	N							12
Differenz Prä - Rest (ng/ml)	Korrelation nach Pearson							
	Signifikanz (2-seitig)							
	N							

\*\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.  
\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

### Abbildung 85 Korrelationen der cfDNA-Werte

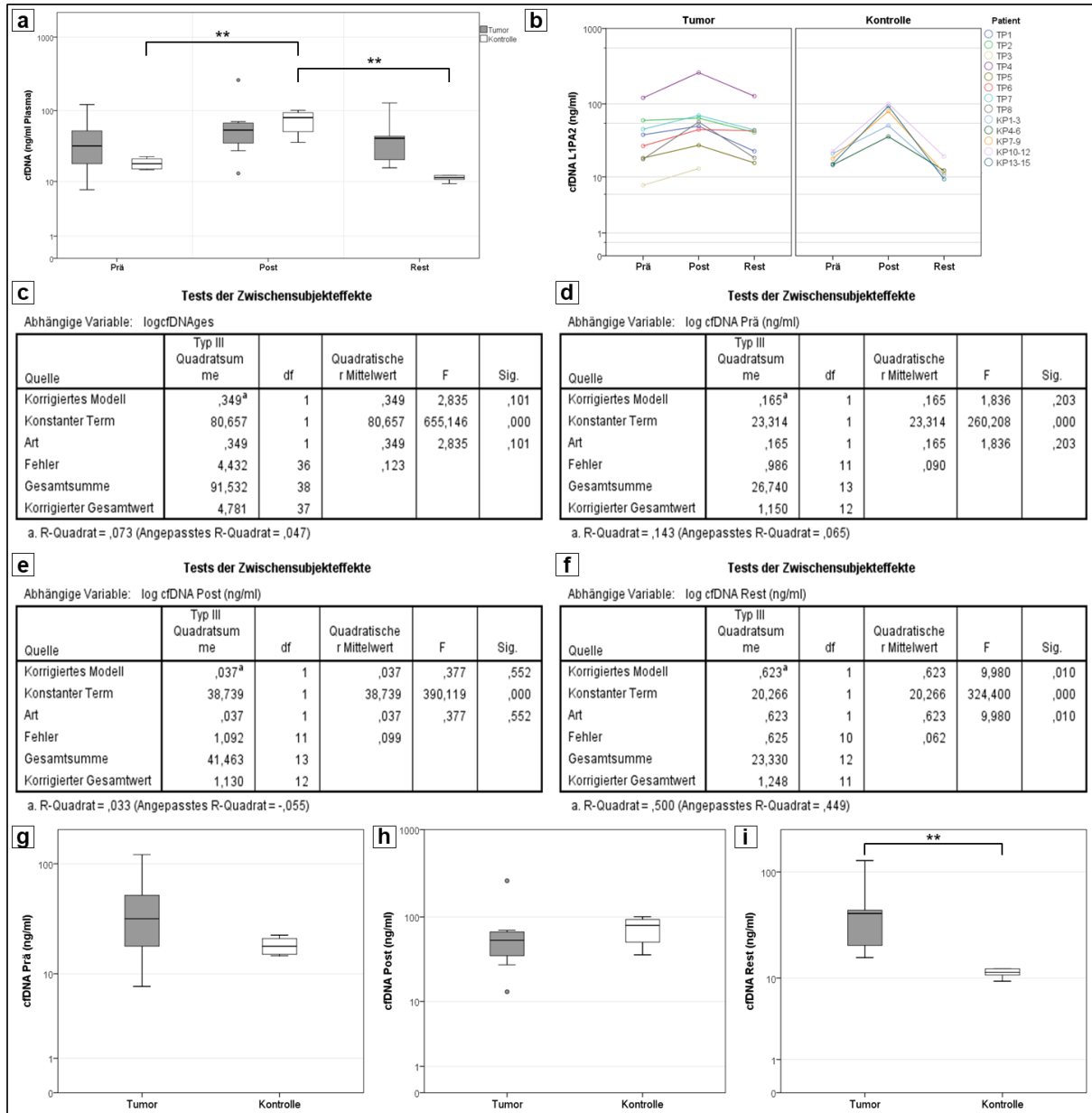
Zweiseitige Korrelation nach Pearson mit den cfDNA-Werten der Tumorbelastungsstudie. Die prä-Konzentrationen korrelieren mit den post- und den rest-Konzentrationen. Die rest-Konzentrationen korrelieren negativ mit dem cfDNA-Abfall und der Differenz aus Anstieg und Abfall. Der Abfall korreliert zusätzlich mit dem Anstieg und der Differenz aus Anstieg und Abfall.

Während prä die cfDNA-Konzentrationen der Tumorpatienten also tendenziell über denen der Kontrollprobanden lagen (Abb. 86g), stiegen deren Konzentrationen während der körperlichen Belastung stärker an, auf durchschnittlich gleich hohe Werte (Abb. 86h), und sanken anschließend wieder auf deutlich niedrigere Konzentrationen ab (Abb. 86i). Die cfDNA-Konzentrationen der Tumorgruppe zeigten also eine geringere Dynamik. Abbildung 87 unterstreicht die unterschiedliche Dynamik. Sie belegt, dass sich die cfDNA-Konzentrationen über die Zeit nur für die Gesamt- und Kontrollgruppe signifikant veränderten, für die Tumorgruppe aber nicht (Werte in Abb. 87), obwohl auch diese sichtbar anstiegen und abfielen (Abb. 86a+b).

Dies wird veranschaulicht durch einen Vergleich der dynamischen Veränderungen der cfDNA-Konzentrationen zwischen prä und post („Anstieg“ als X-faches der prä-Konzentration, post-Konzentration/prä-Konzentration), zwischen post und rest („Abfall“ als X-faches der rest-Konzentration, post-Konzentration/rest-Konzentration) sowie der Differenzen zwischen diesen beiden Werten („DiffAA“, Differenz Anstieg-Abfall). Anstieg und Abfall der Tumorgruppe lagen signifikant unter denen der Kontrollgruppe (Anstieg: P = 0,003, Tumor MW 1,78-fach (Stabw. 0,66), Kontrolle MW 3,95-fach (Stabw. 1,56); Abfall: P = 0,001, Tumor MW 1,89-fach (Stabw. 0,64), Kontrolle MW 6-fach (Stabw. 2,7); ANOVAs, Abb. 88).

## Ergebnisse

Dies zeigt, dass die Dynamik in der Tumorgruppe geringer ist, insbesondere in der Regenerationsphase. Die Veränderung der Regenerationsphase in der Tumorgruppe entspricht in etwa der in der Belastungsphase, während in der Kontrollgruppe die cfDNA-Konzentrationen während der Regenerationsphase deutlich unter den Ausgangswert absinken. Als Folge ist der DiffAA-Wert signifikant unterschiedlich – bei der Tumorgruppe in etwa 0 und bei der Kontrollgruppe negativ ( $P = 0,012$ , Tumor MW -0,11 (Stabw. 0,49), Kontrolle MW -2,05 (Stabw. 1,42), ANOVA, Abb. 88e-f).



**Abbildung 86** cfDNA-Messungen 1 – Gruppenunterschiede

a) Zeigt die Gruppiereten cfDNA-Konzentrationen getrennt nach Tumor- und Kontrollgruppe und nach den drei Messzeitpunkten im Boxplot. Die höhere Streuung der Werte der Tumorgruppe wird deutlich. b) Zeigt diese Werte nach den individuellen Entwicklungen der einzelnen Patienten aufgeschlüsselt. c-f) Die cfDNA-Konzentrationen der Tumorgruppe unterscheiden sich nur beim rest-Wert signifikant von denen der Kontrollgruppe. Zu diesem Zeitpunkt liegen sie höher, im Durchschnitt 44,9 ng/ml bei der Tumorgruppe gegen 12,6 ng/ml bei der Kontrollgruppe. Diese Werte sind graphisch in g-i im Boxplot dargestellt.

# Ergebnisse

Tests der Zwischensubjekteffekte						Multiple Comparisons						Deskriptive Statistiken				
Abhängige Variable: log cDNA (ng/ml)						Abhängige Variable: log cDNA (ng/ml)						Abhängige Variable: log cDNA (ng/ml)				
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	(i)Zeitpunkt	(j)Zeitpunkt	Mittlere Differenz (i-j)	Standardfehler	Sig.	95%-Konfidenzintervall	Zeitpunkt	Mittelwert	Standardabweichung	N	
Korrigiertes Modell	1,253 <sup>a</sup>	2	,627	6,215	,005	Prä	Post	-,3684	,12453	,020	-,6715	-,0453	Prä	1,4030	,30958	13
Konstanter Term	86,174	1	86,174	854,898	,000	Rest	Rest	,0465	,12710	1,000	-,2731	,3661	Post	1,7614	,30683	13
Zeitpunkt	1,253	2	,627	6,215	,005	Post	Prä	,3584	,12453	,020	,0453	,6715	Rest	1,3565	,33686	12
Fehler	3,528	35	,101			Rest	Post	-,4049 <sup>*</sup>	,12710	,009	-,7245	-,0853	Gesamt	1,5109	,35947	38
Gesamt	91,532	38				Prä	Rest	-,3684	,12453	,020	-,6715	-,0453				
Korrigierte Gesamtvariation	4,781	37				Post	Prä	-,3584	,12453	,020	-,0453	,6715				
						Post	Rest	-,4049 <sup>*</sup>	,12710	,009	-,7245	-,0853				

a. R-Quadrat = ,262 (korrigiertes R-Quadrat = ,220)

Grundlage: beobachtete Mittelwerte  
Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = ,101.  
\* Die mittlere Differenz ist auf dem .05-Niveau signifikant.

Tests der Zwischensubjekteffekte - Tumorpatienten						Multiple Comparisons - Tumorpatienten						Deskriptive Statistiken - Tumorpatienten				
Abhängige Variable: log cDNA (ng/ml)						Abhängige Variable: log cDNA (ng/ml)						Abhängige Variable: log cDNA (ng/ml)				
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	(i)Zeitpunkt	(j)Zeitpunkt	Mittlere Differenz (i-j)	Standardfehler	Sig.	95%-Konfidenzintervall	Zeitpunkt	Mittelwert	Standardabweichung	N	
Korrigiertes Modell	,222 <sup>a</sup>	2	,111	,896	,424	Prä	Post	-,2270	,17581	,634	-,6864	,2323	Prä	1,4919	,36976	8
Konstanter Term	57,676	1	57,676	466,482	,000	Rest	Rest	-,0572	,18198	1,000	-,5327	,4182	Post	1,7190	,36845	8
Zeitpunkt	,222	2	,111	,896	,424	Post	Prä	,2270	,17581	,634	-,2323	,6864	Rest	1,5492	,30700	7
Fehler	2,473	20	,124			Rest	Post	-,1698	,18198	1,000	-,3056	,6453	Gesamt	1,5883	,34996	23
Gesamt	60,719	23				Prä	Rest	-,0572	,18198	1,000	-,4182	,5327				
Korrigierte Gesamtvariation	2,694	22				Post	Prä	-,1698	,18198	1,000	-,3056	,6453				

a. R-Quadrat = ,082 (korrigiertes R-Quadrat = ,010)

Grundlage: beobachtete Mittelwerte  
Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = ,124.  
\* Die mittlere Differenz ist auf dem .05-Niveau signifikant.

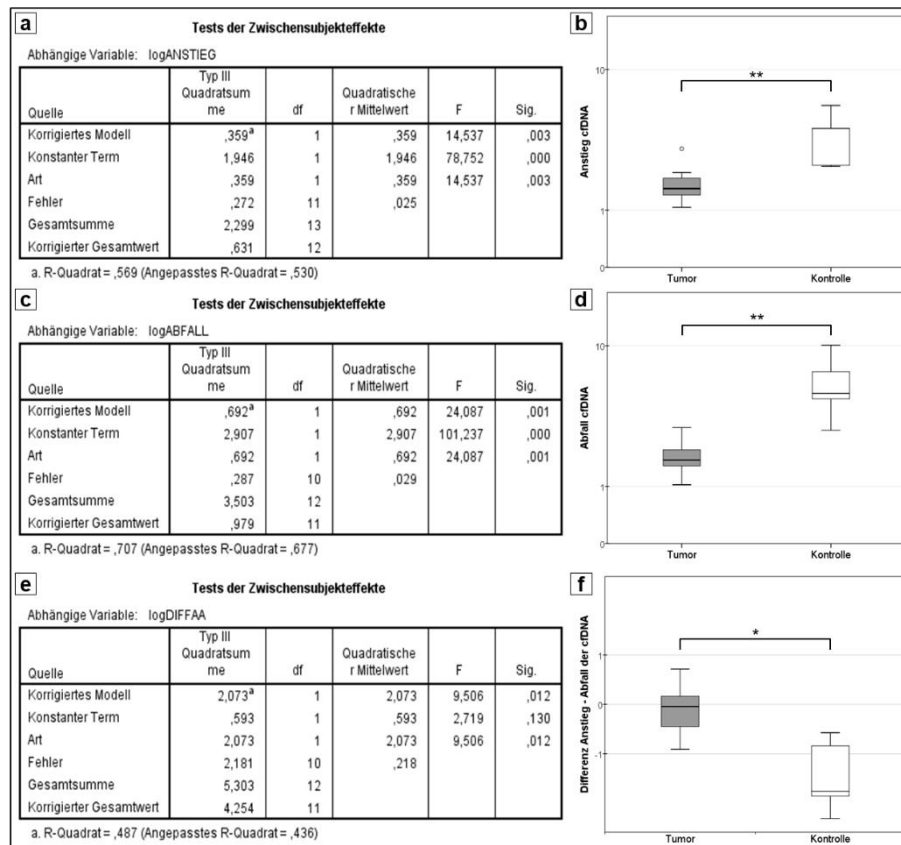
Tests der Zwischensubjekteffekte - Kontrollpatienten						Multiple Comparisons - Kontrollpatienten						Deskriptive Statistiken - Kontrollpatienten				
Abhängige Variable: log cDNA (ng/ml)						Abhängige Variable: log cDNA (ng/ml)						Abhängige Variable: log cDNA (ng/ml)				
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	(i)Zeitpunkt	(j)Zeitpunkt	Mittlere Differenz (i-j)	Standardfehler	Sig.	95%-Konfidenzintervall	Zeitpunkt	Mittelwert	Standardabweichung	N	
Korrigiertes Modell	1,508 <sup>a</sup>	2	,754	39,373	,000	Prä	Post	-,5696	,08752	,000	-,8118	-,3253	Prä	1,2607	,08443	5
Konstanter Term	29,076	1	29,076	1518,473	,000	Rest	Rest	-,1739	,08752	,211	-,6694	,4171	Post	1,8293	,18843	5
Zeitpunkt	1,508	2	,754	39,373	,000	Post	Prä	,5696	,08752	,000	,3253	,8118	Rest	1,0868	,12169	5
Fehler	,230	12	,019			Rest	Post	-,7424 <sup>*</sup>	,08752	,000	-,9857	-,4992	Gesamt	1,3923	,35230	15
Gesamt	30,813	15				Prä	Rest	-,1739	,08752	,211	-,4171	,6694				
Korrigierte Gesamtvariation	1,738	14				Post	Rest	-,7424 <sup>*</sup>	,08752	,000	-,9857	-,4992				

a. R-Quadrat = ,868 (korrigiertes R-Quadrat = ,846)

P = 0,000005  
\* Die mittlere Differenz ist auf dem .05-Niveau signifikant.

**Abbildung 87** cfDNA-Messungen – Zeitpunkte

Dargestellt sind univariate Varianzanalysen (ANOVAs) der cfDNA-Konzentrationen gegen die gemessenen Zeitpunkte (prä, post und rest) und die zugehörige deskriptive Statistik. Die Werte von Gesamtgruppe und Kontrollgruppe variieren signifikant über die Zeitpunkte. Die Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni zeigt, dass sich jeweils prä und rest von post unterscheiden, aber nicht prä von rest. Für die Tumorguppe variieren die Werte nicht signifikant. Die Kontrollgruppe zeigt die höchsten Varianzen und die geringsten Standardabweichungen.



**Abbildung 88** cfDNA-Dynamik

Die Entwicklungen der cfDNA-Konzentrationen werden hier in drei Kategorien dargestellt. a+b) Der Anstieg der cfDNA während des Belastungstests, also Quotient post/prä. Die Werte der Kontrollgruppe liegen hochsignifikant über denen der Tumorguppe ( $\emptyset$  3,95-fach zu 1,77-fach). c+d) Der Abfall der cfDNA-Konzentrationen während der 90-minütigen Ruhephase, also Quotient post/rest. Die Werte der Kontrollgruppe liegen wieder hochsignifikant über denen der Tumorguppe ( $\emptyset$  6-fach zu 1,89-fach). e+f) Die Differenz zwischen Anstieg und Abfall, (Anstieg-Abfall). Der Wert der Tumorguppe liegt signifikant über dem der Kontrollgruppe ( $\emptyset$  -0,11 zu -2,05).



Im Vergleich von Anstieg und Abfall innerhalb der Testgruppen ist der cfDNA-Abfall signifikant höher als der Anstieg, sowohl in der Gesamtgruppe ( $P = 0,046$ , Anstieg 2,684 (Stabw. 1,56), Abfall 3,604 (Stabw. 2,71)), als auch vor allem in der Kontrollgruppe ( $P = 0,016$ , Anstieg 3,952 (Stabw. 1,56), Abfall 6,002 (Stabw. 2,7)), nicht aber in der Tumorgruppe ( $P = 0,576$ , Anstieg 1,779 (Stabw. 0,72), Abfall 1,891 (Stabw. 0,64), abhängige t-Tests mit verbundenen Stichproben).

### 3.2.3.2 cfDNA und Belastungsparameter

Zusätzlich zu den Untersuchungen der cfDNA-Konzentrationen auf gruppen- und zeitpunkt-spezifische Varianz wurden die cfDNA-Werte in Bezug auf Zusammenhänge mit den belastungsphysiologischen Parametern ausgewertet. Da die cfDNA während der körperlichen Belastung bei allen Teilnehmern anstieg, korrelierte sie in ihrer Entwicklung prä-post signifikant mit der Herzfrequenz ( $\rho = 0,6$ ;  $P = 0,001$  für  $n = 26$ ), dem systolischen Blutdruck ( $\rho = 0,53$ ;  $P = 0,01$  für  $n = 23$ ), der  $\dot{V}O_2$  ( $\rho = 0,486$ ;  $P = 0,016$ , für  $n = 24$  alle Pearson-Korrelationen) und mit dem Laktatwert ( $\rho_s = 0,665$ ;  $P < 0,001$  für  $n = 26$ , Spearman-Korrelation, da die Laktatwerte nicht normalverteilt sind).

Die zu den Einzelzeitpunkten gemessenen cfDNA-Werte korrelierten kaum mit den Belastungsparametern (Tabelle 20). Eine Ausnahme bildet hier der post-Wert, der signifikant mit den Laktatkonzentrationen nach Abbruch ( $\rho_s = 0,691$ ,  $P_s = 0,009$  für  $n = 13$ , Abb. 89 c) und 6 Min. nach Abbruch ( $\rho_s = 0,811$ ,  $P_s = 0,001$  für  $n = 12$ , beide Korrelationen aufgrund hoher Abweichungen innerhalb der cfDNA-post-Werte nach Spearman) korrelierte, in beiden Fällen auch separat innerhalb der Kontrollgruppe ausgewertet (je  $\rho = 0,94$ ,  $P = 0,016$  für  $n = 5$ ). Die post-Werte korrelierten außerdem über die Gesamtgruppe leicht mit der maximalen Herzfrequenz ( $\rho_s = 0,637$ ,  $P_s = 0,019$  für  $n = 13$ ).

Außerdem korrelierten die cfDNA-rest-Werte negativ mit der maximal erreichten Leistung, sowohl der absoluten ( $\rho_s = -0,723$ ,  $P_s = 0,008$  für  $n = 12$ ), als auch dem Quotienten mit dem Körpergewicht ( $\rho_s = -0,76$ ,  $P_s = 0,004$  für  $n = 12$ , Abb. 89 a+b), was vor allem darauf zurückzuführen ist, dass die Tumorpatienten gleichzeitig niedrigere Leistungen erzielten und, aufgrund der geringeren Dynamik in den cfDNA-Konzentrationen nach Belastung, höhere rest-Werte aufwiesen. Innerhalb der Untergruppen gab es keinen Zusammenhang zwischen cfDNA und Leistung.

Deutlich stärker waren die Zusammenhänge zwischen den Belastungsparametern und den dynamischen cfDNA-Entwicklungen – dem Anstieg der cfDNA-Konzentrationen über die Belastungsdauer und ihrem anschließenden Abfall während der Ruhephase (Tab. 20). Insbesondere der Abfall der cfDNA korrelierte für die Gesamtgruppe hochsignifikant mit allen Belastungsparametern (Tab. 20). Somit stiegen die cfDNA-Konzentrationen bei denjenigen Testteil-

## Ergebnisse

nehmern stärker an und fielen stärker wieder ab, die höhere Leistungen und eine höhere physiologische Belastung erreicht hatten. Mit Ausnahme der  $\dot{V}O_2\text{max}$ , bei der die beiden Korrelationen gleich stark waren, war bei allen Belastungsparametern der Zusammenhang mit dem cfDNA-Abfall stärker als mit dem cfDNA-Anstieg.

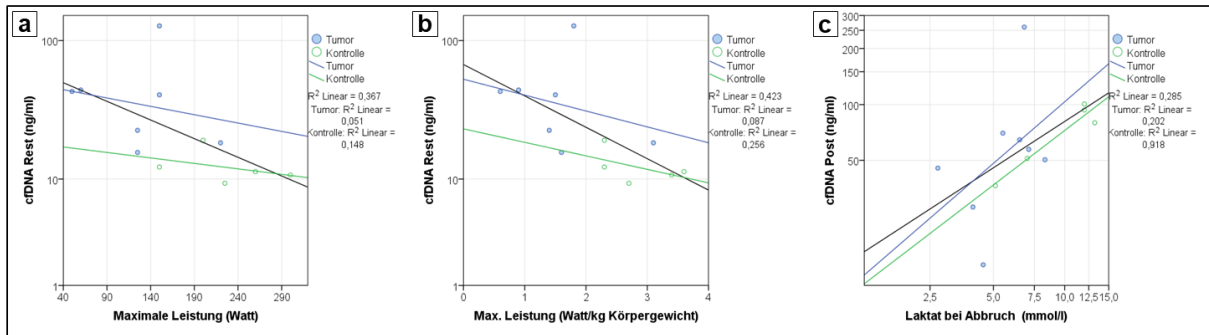
**Tabelle 20** Korrelationen der cfDNA-Konzentrationen mit den Belastungsparametern

Parameter	Zeitpunkt	Gesamt (n = 13, rest = 12)		Tumor (n = 8, rest = 7)		Kontrolle (n = 5)	
		Spearman	Pearson	Spearman	Pearson	Spearman	Pearson
Leistung (Watt)	Rest	<b>-0,723 / 0,008</b>	-0,612 / 0,035				
	Anstieg	<b>0,694 / 0,008</b>	0,664 / 0,013				
	Abfall	<b>0,847 / 0,001</b>	<b>0,835 / 0,001</b>		0,858 / 0,013		
Leistung (Watt/kg)	Rest	<b>-0,760 / 0,004</b>	-0,656 / 0,021				
	Anstieg	<b>0,748 / 0,003</b>	<b>0,723 / 0,005</b>				
	Abfall	<b>0,858 / 0,0004</b>	<b>0,836 / 0,001</b>		<b>0,898 / 0,006</b>		
max. Herzfrequenz (Schläge/ Min.)	Post	0,637 / 0,019					
	Anstieg	<b>0,698 / 0,008</b>	0,649 / 0,016				
	Abfall	<b>0,867 / 0,0003</b>	<b>0,817 / 0,001</b>	<b>0,929 / 0,003</b>	<b>0,878 / 0,009</b>	0,900 / 0,037	0,935 / 0,02
$\dot{V}O_2\text{max}$ (ml/min)/kg	Anstieg	<b>0,783 / 0,003</b>	<b>0,744 / 0,006</b>		0,784 / 0,037		
	Abfall	<b>0,782 / 0,004</b>	<b>0,740 / 0,009</b>		0,852 / 0,031		
Laktat bei Abbruch mmol/l	Post	<b>0,691 / 0,009</b>					0,942 / 0,016
	Anstieg	0,600 / 0,03	<b>0,757 / 0,003</b>				0,892 / 0,042
	Abfall	<b>0,834 / 0,001</b>	<b>0,869 / 0,0003</b>	0,821 / 0,023	0,770 / 0,043		
Laktat 6 min post mmol/l	Post	<b>0,811 / 0,001</b>	0,668 / 0,018			0,900 / 0,037	0,944 / 0,016
	Anstieg	0,580 / 0,048	<b>0,776 / 0,003</b>				
	Abfall	<b>0,836 / 0,001</b>	<b>0,878 / 0,0003</b>		0,821 / 0,045		
Laktatanstieg	Post	0,665 / 0,013				0,900 / 0,037	
	Anstieg	<b>0,692 / 0,009</b>	<b>0,775 / 0,002</b>				
	Abfall	<b>0,832 / 0,001</b>	<b>0,783 / 0,003</b>				

Bei  $\dot{V}O_2\text{max}$  je 1n weniger; Hochsignifikante Korrelationen sind **fett** gedruckt

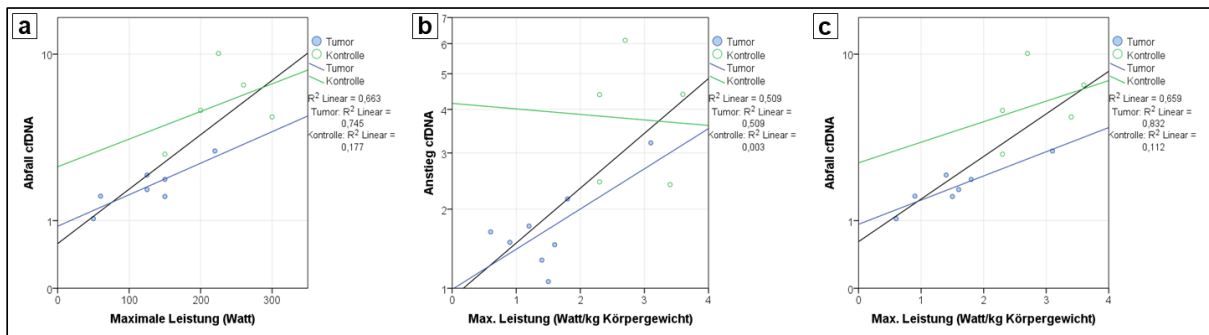
Wichtig ist hierbei, dass diese Korrelationen nicht durch die Unterschiede zwischen der Tumor- und der Kontrollgruppe zustande kommen, obwohl die beiden Gruppen sich so deutlich im cfDNA-Abbau während der Regenerationsphase unterscheiden. Im Gegenteil ist die Korrelation zwischen dem cfDNA-Abfall und den Belastungsparametern auch innerhalb der Tumorgruppe zu finden. Auch fällt bei den separaten Korrelationen auf, dass die Belastungsparameter innerhalb der Tumorgruppe stets mit dem cfDNA-Abfall, aber nur einmal mit dem cfDNA-Anstieg korrelierten ( $\dot{V}O_2\text{max}$ ). Innerhalb der Kontrollgruppe korrelierten hingegen eher die Absolutwerte, vor allem mit dem Laktat (Tab. 9). Daher kann aus diesen Zusammenhängen geschlossen werden, dass entweder ein verminderter oder gar gestörter cfDNA-Abbau in der Regenerationsphase mit ebenfalls verminderter körperlicher Leistungsfähigkeit einhergeht, oder aber in diesen Teilnehmern der Belastungsreiz nicht ausreichend war, um eine Steigerung des cfDNA-Abbaus zu bewirken. Letzteres ist unwahrscheinlich, da der Abbruch der Belastung immer an der individuellen Ausbelastung erfolgte, was unter anderem über den Borg-Wert belegt wurde.

## Ergebnisse



**Abbildung 89** Korrelationen cfDNA-Konzentrationen und Belastungsparameter

a+b) Die Korrelationen der cfDNA-rest- Konzentrationen und der maximal erreichten Leistung waren für die Gesamtgruppe negativ, vermutlich da die rest-Konzentrationen bei der Kontrollgruppe niedriger waren und diese ebenfalls im Durchschnitt eine höhere Leistung erzielte. c) Die cfDNA-post-Konzentration korrelierte mit dem Laktatwert bei Abbruch insbesondere bei der Kontrollgruppe.



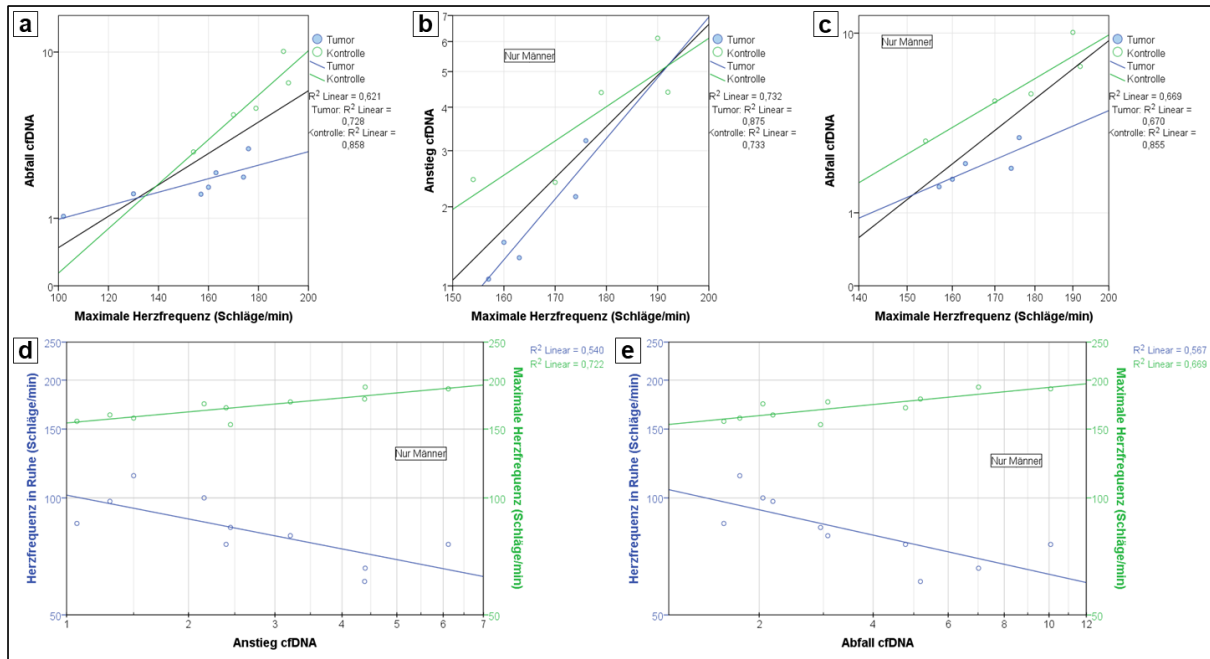
**Abbildung 90** Korrelationen cfDNA-Dynamik und Leistung

Gezeigt sind die Korrelationen a) der absoluten maximalen Leistung mit dem cfDNA-Abfall und der maximalen Leistung pro kg mit b) dem cfDNA-Anstieg und c) dem cfDNA-Abfall. Die dynamischen Veränderungen der cfDNA-Konzentrationen korrelierten jeweils mit der Gesamtgruppe und, insbesondere beim Abfall, mit der Tumorgruppe, nicht jedoch mit der Kontrollgruppe, bei der keine Zusammenhänge erkennbar sind.

Die deutlichsten Korrelationen mit dem cfDNA-Abfall finden sich bei der maximalen Herzfrequenz (Abb. 91a, Tab. 9) und dem Laktatwert bei Abbruch (Abb. 92d, Tab. 9). In beiden Fällen korrelierten hier auch die Untergruppen sichtbar (Abb. 91 und 92, Tab. 9), wenn auch die Kontrollgruppe beim Laktat nicht signifikant (möglicherweise aufgrund der geringen Fallzahl). Die Herzfrequenz könnte durch die Beschleunigung des Bluttransports einen direkten Einfluss auf den Abbau der cfDNA haben, während der Laktatwert ein Indikator für einen generell stark erhöhten Stoffwechsel ist. Die Herzfrequenz korrelierte allerdings unterschiedlich mit den cfDNA-Konzentrationen in Abhängigkeit von der Belastungssituation. Teilnehmer, die eine hohe Herzfrequenz in Ruhe aufwiesen, also zum prä- oder rest-Zeitpunkt, hatten gleichzeitig niedrige cfDNA-Konzentrationen, was einen erhöhten Abbau von cfDNA im Ruhezustand nahelegt. Teilnehmer mit hoher belastungsinduzierter Herzfrequenz wiesen auch hohe cfDNA-Konzentrationen auf, zeigten dann wiederum aber auch einen höheren cfDNA-Abfall in der Regenerationsphase. Hierbei ist vermutlich die verstärkte Freisetzung von cfDNA parallel zur

## Ergebnisse

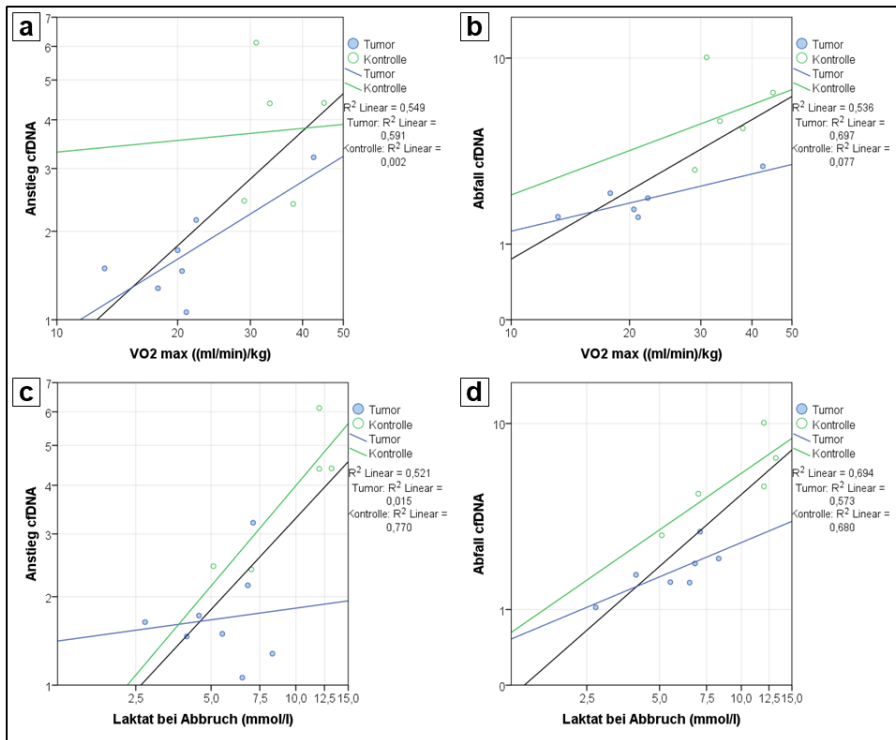
oder bedingt durch die starke körperliche Belastung die Ursache der hohen cfDNA-Konzentrationen zum post-Zeitpunkt. Relevant für die Zusammenhänge sind daher vermutlich einmal die Freisetzung und einmal die Abbaurrate, abhängig vom momentanen physiologischen Zustand der Probanden. Dies ist in Abbildung 91d+e für die Untergruppe der männlichen Teilnehmer veranschaulicht.



**Abbildung 91** Korrelationen cfDNA-Dynamik und Herzfrequenz

a) Die maximale Herzfrequenz korreliert insgesamt am stärksten von allen Belastungsparametern mit dem cfDNA-Abfall, auch innerhalb der Untergruppen. b) Wenn nur die Männer betrachtet werden, korreliert der Anstieg ebenfalls sehr stark mit der maximalen Herzfrequenz. c) Auch beim cfDNA-Abfall werden die Korrelationen für die Gesamtgruppe noch stärker, wenn nur die Männer betrachtet werden. Die Tumorgruppe separat korreliert schwächer. d+e) Sowohl für den cfDNA-Anstieg als auch für den -Abfall korrelieren die Herzfrequenz-Werte in Ruhe negativ und die maximale Herzfrequenz positiv mit den dynamischen cfDNA-Parametern.

## Ergebnisse



**Abbildung 92** Korrelationen der cfDNA-Dynamik mit  $\dot{V}O_2\text{max}$  und Laktat a+b) Die  $\dot{V}O_2\text{max}$  korreliert für die Gesamtgruppe etwa gleich gut mit Anstieg (a) und Abfall (b). Die Tumorgruppe separat korreliert ebenfalls, die Kontrolle nicht. c+d) Der Laktatwert bei Abbruch korreliert für die Gesamtgruppe besser mit dem cfDNA-Abfall (d) als mit dem cfDNA-Anstieg (c). Für die Kontrollgruppe separat ist es andersherum. Für die Tumorgruppe separat korreliert nur der cfDNA-Abfall.

### 3.2.3.3 cfDNA und Zelltypen

Für die Tumorpatienten wurden für jeden Messzeitpunkt aus zusätzlich abgenommenen Blutproben Blutbilder erstellt. Die Zellzahlen und Entwicklungen der einzelnen Zelltypen wurden mit den cfDNA-Konzentrationen verglichen. Es wurden über die gesamten Messwerte signifikante positive Korrelationen für cfDNA mit den Konzentrationen an Leukozyten, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten festgestellt sowie eine negative Korrelation mit dem Prozentsatz der Monozyten, was auf gleiche bzw. gegenläufige Entwicklungen in Belastungsprozess schließen lässt (Abb. 93, auch Werte).

Zu Einzelzeitpunkten korrelierten die cfDNA-prä-Konzentrationen mit den Lymphozyten nach Belastung sowie unter Ausschluss von Tumorpatient 4 (TP4) auch mit Monozyten nach Belastung sowie negativ mit allen Messwerten der basophilen Granulozyten (alle Werte in Tabelle 21, Abb. 94 a+b). Der Ausschluss von TP4 geschah aufgrund außergewöhnlich hoher cfDNA-Werte, die sich nicht in anderen Messwerten, wie den Zellfraktionen, widerspiegeln. Die cfDNA-post-Konzentrationen korrelierten ebenfalls mit Lymphozyten und Monozyten nach Belastung (ohne TP4, Abb. 94 a+b). Die cfDNA-rest-Werte korrelierten mit den neutrophilen Granulozyten prä und post sowie negativ mit den prozentualen Anteilen der Monozyten an den Gesamtzellen (Abb. 95 c+d). Der cfDNA-Anstieg korrelierte positiv mit den prozentualen Anteilen der Lymphozyten (Abb. 94 c+d) und negativ mit den Konzentrationen der basophilen Granulozyten (Abb. 95 e). Der cfDNA-Abfall korrelierte negativ mit allen Thrombozytenkonzentrationen, mit den neutrophilen Granulozyten rest, den Monozytenkonzentrationen prä und rest und allen prozentualen Anteilen der Monozyten (alle Abb. 95 f-h) sowie positiv mit dem

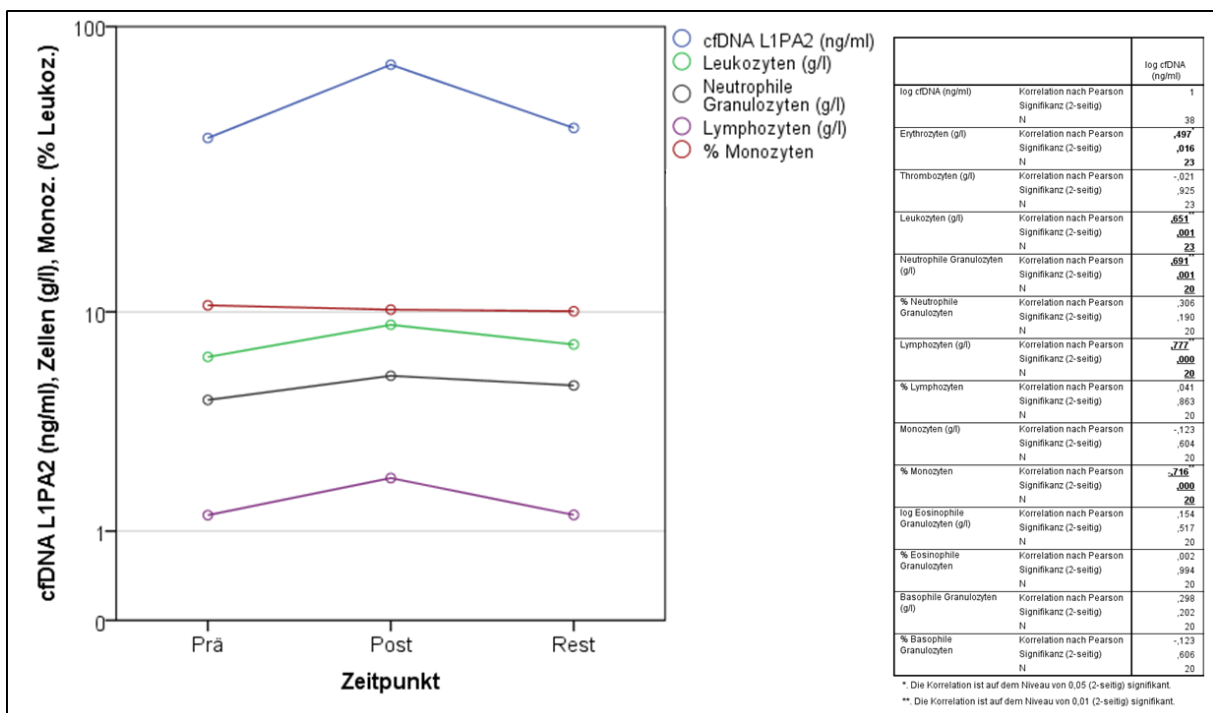
## Ergebnisse

Anstieg und dem Abfall der Lymphozyten (Abb. 94 e+f). Alle relevanten signifikanten Korrelationen der Einzelwerte und der dynamischen Parameter mit den Messwerten der Zelltypen finden sich mit Korrelationskoeffizient und P-Wert in Tabelle 21.

**Tabelle 21** Korrelationen der cfDNA-Werte mit den Zelltypen

cfDNA Prä	cfDNA Post	cfDNA Rest	cfDNA Anstieg	cfDNA Abfall I	cfDNA Abfall II
Lymphozyten Post $\rho = 0,803$ P = 0,03 (n = 7)	Lymphozyten Post $\rho = 0,921$ P = 0,003 (n = 7)	Neutroph. Gran. Prä $\rho = 0,824$ P = 0,044 (n = 6)	% Lymphozyten Prä <sup>°</sup> $\rho = 0,909^{\circ}$ P = 0,012 <sup>°</sup> (n = 6)	Thrombozyten Prä $\rho = -0,876$ P = 0,01 (n = 7)	Monozyten Prä <sup>^</sup> $\rho = -0,936^{\wedge}$ P = 0,019 <sup>^</sup> (n = 5)
Basoph. Gran. Prä <sup>^</sup> $\rho = 0,910^{\wedge}$ P = 0,012 <sup>^</sup> (n = 6)	Monozyten Post <sup>^</sup> $\rho = 0,833^{\wedge}$ P = 0,04 <sup>^</sup> (n = 6)	Neutroph. Gran. Post $\rho = 0,885$ P = 0,019 (n = 6)	% Lymphozyten Post <sup>°</sup> $\rho = 0,932^{\circ}$ P = 0,007 <sup>°</sup> (n = 6)	Thrombozyten Post $\rho = -0,845$ P = 0,017 (n = 7)	Monozyten Rest <sup>^</sup> $\rho = -0,900^{\wedge}$ P = 0,037 <sup>^</sup> (n = 5)
Basoph. Gran. Post <sup>^</sup> $\rho = 0,911^{\wedge}$ P = 0,012 <sup>^</sup> (n = 6)		% Monozyten Prä $\rho = -0,848$ P = 0,033 (n = 6)	% Lymphozyten Rest <sup>°</sup> $\rho = 0,993^{\circ}$ P = 0,001 <sup>°</sup> (n = 6)	Thrombozyten Rest $\rho = -0,886$ P = 0,008 (n = 7)	% Monozyten Prä <sup>^</sup> $\rho = 0,919^{\wedge}$ P = 0,027 <sup>^</sup> (n = 5)
		% Monozyten Post $\rho = -0,915$ P = 0,011 (n = 6)	Basoph. Gran. Prä $\rho = -0,783$ P = 0,037 (n = 7)	Neutroph. Gran. Rest $\rho = -0,812$ P = 0,05 (n = 7)	% Monoz. Post <sup>^</sup> $\rho = 0,964^{\wedge}$ P = 0,008 <sup>^</sup> (n = 5)
		% Monozyten Rest $\rho = -0,866$ P = 0,026 (n = 6)	Basoph. Gran. Post $\rho = -0,856$ P = 0,014 (n = 7)	Lymphozyten Anstieg $\rho = 0,912$ P = 0,011 (n = 6)	% Monoz. Rest <sup>^</sup> $\rho = 0,97^{\wedge}$ P = 0,006 <sup>^</sup> (n = 5)
			Basoph. Gran. Rest $\rho = -0,941$ P = 0,005 (n = 6)	Lymphozyten Abfall $\rho = 0,94$ P = 0,005 (n = 6)	

<sup>°</sup> = ohne TP1; <sup>^</sup> = ohne TP4; alles Pearson-Korrelationen

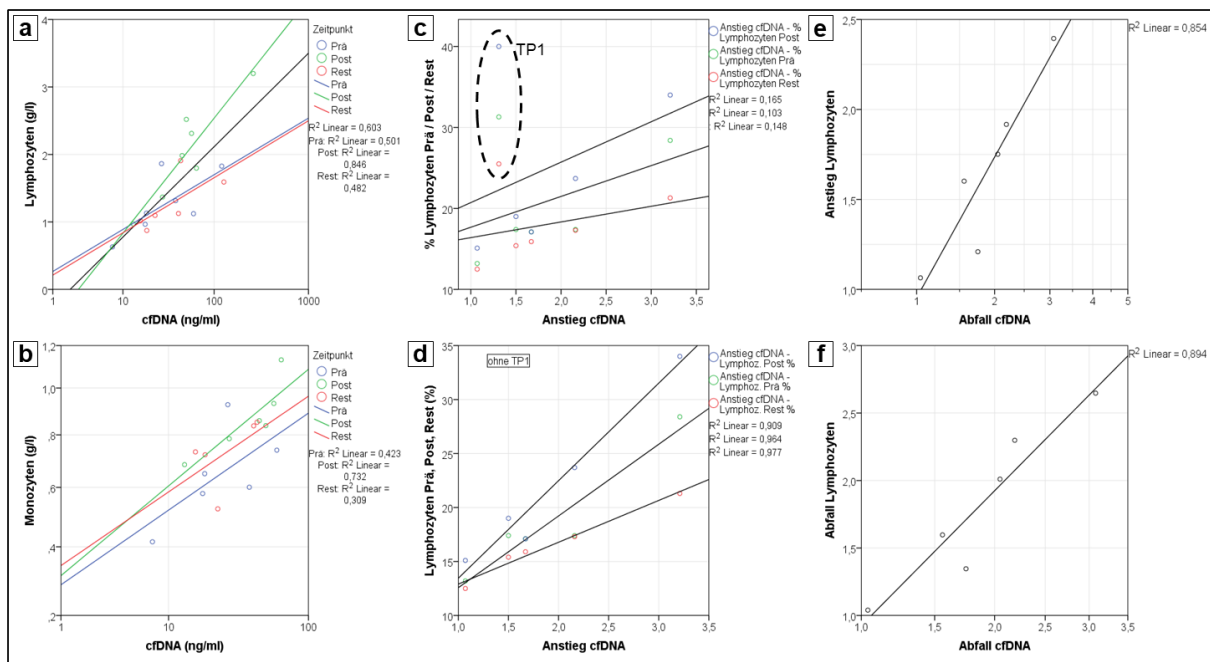


**Abbildung 93** Entwicklungen cfDNA und Zelltypen über die Zeit

Vier Zelltypen korrelierten signifikant mit der Entwicklung der cfDNA über die drei Messzeitpunkte hinweg. Die Leukozyten und ihre Untergruppen der neutrophile Granulozyten und Lymphozyten korrelierten hochsignifikant positiv, während die prozentualen Anteile der Monozyten an den Gesamtleukozyten negativ mit den cfDNA-Konzentrationen korrelierten. Die Graphik zeigt deutlich, dass die Lymphozyten belastungsabhängig stark variieren, die anderen Zelltypen hingegen weniger.

## Ergebnisse

Aus diesen diversen Korrelationen lässt sich eine grobe Gruppierung ableiten, wenn die cfDNA-Werte und Konzentrationen, die durch die körperliche Belastung gesteuert sind, von denjenigen differenziert werden, die durch Ruhewerte oder -phasen definiert sind. Die Korrelationen der „Belastungsregulation“ sind in Abbildung 94 festgehalten und betreffen in erster Linie die cfDNA-post-Konzentrationen und den cfDNA-Anstieg, sowie den Abfall bei positiver Korrelation. Diese cfDNA-Werte stehen vor allem mit den Lymphozyten in Zusammenhang sowie in einer Korrelation mit den Monozyten, während die cfDNA-Parameter des „Ruhestoffwechsels“, die in Abbildung 95 gezeigt sind, vor allem mit basophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Thrombozyten und Monozyten korrelieren.

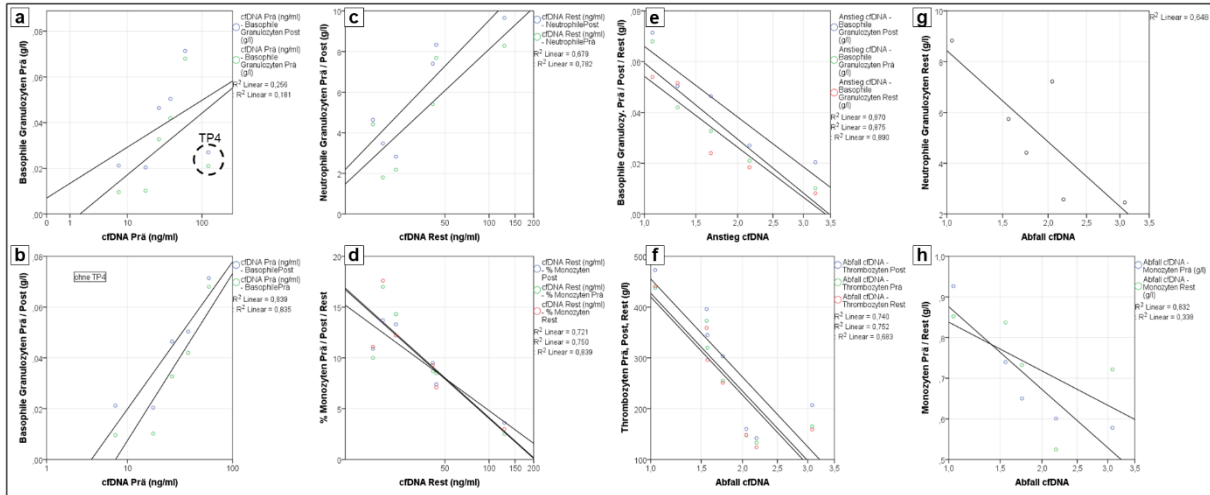


**Abbildung 94** Korrelationen cfDNA und Zellen in der „Belastungs-Regulation“

a) Positive Korrelation der cfDNA-Konzentrationen zu den drei Zeitpunkten mit den Lymphozytenkonzentrationen. Insbesondere die post-Werte korrelieren stark. b) Positive Korrelation der cfDNA-Konzentrationen zu den drei Zeitpunkten mit den Monozytenkonzentrationen. Die post-Werte korrelieren deutlich. c+d) Korrelationen der prozentualen Lymphozytenkonzentrationen mit dem cfDNA-Anstieg, in c) mit allen Individuen, in d) ohne TP1, dessen Lymphozytenwerte alle deutlich nach oben abweichen. Ohne TP1 korrelieren alle Werte stark. e+f) Deutliche positive Korrelationen des Lymphozytenanstiegs und -abfalls mit dem cfDNA-Abfall.

Die Lymphozytenkonzentrationen stiegen im Verlauf der Belastung stark an und fielen während der anschließenden Ruhephase wieder ab (Abb. 93). Die post-Werte der Lymphozyten korrelierten hochsignifikant mit den cfDNA-post-Konzentrationen, die prozentualen Lymphozytenkonzentrationen korrelierten signifikant mit dem Anstieg und die dynamischen Lymphozytenwerte korrelierten positiv mit dem Abfall der cfDNA (Tab. 10). Bei den Korrelationen des „Ruhestoffwechsels“ war auffällig, dass hohe Granulozytenkonzentrationen mit hohen Ruhewerten einhergingen und folglich negativ mit dem cfDNA-Abfall oder dem cfDNA-Anstieg korrelierten.

Bei den dynamischen cfDNA-Parametern war es teilweise wichtig zu unterscheiden, ob die Werte negativ aufgrund von Ruhe- oder positiv aufgrund von Belastungskonzentrationen korrelierten. So korrelierten die basophilen Granulozyten beispielsweise negativ mit dem cfDNA-Anstieg, da sie mit den prä-Werten positiv korrelierten.



**Abbildung 95** Korrelationen cfDNA und Zellen im „Ruhestoffwechsel“

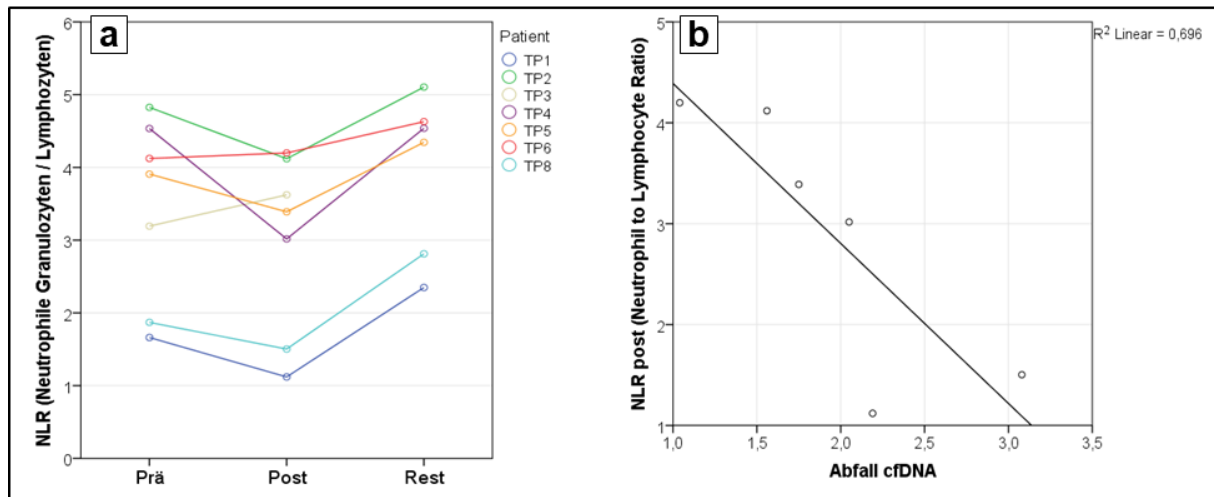
a+b) Korrelationen der cfDNA-prä-Konzentrationen mit den prä- und post-Konzentrationen der basophilen Granulozyten. Bei Ausschluss von TP4 (b) korrelieren die Werte deutlich. c) Korrelationen der cfDNA-rest-Konzentrationen mit den prä- und post-Konzentrationen der neutrophilen Granulozyten. Deutliche Korrelationen, insbesondere der post-Werte. d) Korrelationen der cfDNA-rest-Konzentrationen mit den prozentualen Anteilen Monozyten. Deutliche negative Korrelation, anteilig wenige Monozyten gehen mit hohen cfDNA-rest-Konzentrationen einher. e) Starke negative Korrelation aller basophilen Granulozytenkonzentrationen mit dem cfDNA-Anstieg. Da hohe prä-Werte der cfDNA niedrige Anstiege bedeuten können, bestätigt dies die Aussage von Abbildung b. f) Negative Korrelation aller Thrombozytenkonzentrationen mit dem cfDNA-Abfall. g) Negative Korrelation der rest-Konzentrationen der neutrophilen Granulozyten mit dem cfDNA-Abfall. h) Negative Korrelationen der rest- und vor allem der prä- Konzentrationen der Monozyten mit dem cfDNA-Abfall. Beide Korrelationen sind nach Pearson signifikant (Tabelle 21).

### 3.2.3.3.1 Neutrophil-Lymphocyte-Ratio

Zusätzlich wurde für alle Patienten zu jedem Zeitpunkt die Neutrophil-Lymphocyte-Ratio (NLR) errechnet, ein Entzündungsmarker, der aus dem Quotienten aus der Konzentration neutrophiler Granulozyten geteilt durch die Konzentration der Lymphozyten errechnet wird (Walsh et al., 2005) (Abbildung 96). Die NLR fiel bei den meisten Patienten während der Belastung ab und stieg bei allen Patienten während der Erholungsphase an. Die rest-Werte lagen signifikant über den prä- und den post-Werten (prä (MW 3,49) vs. rest (MW 3,96):  $P = 0,016$  und post (MW 2,89) vs. rest  $P = 0,001$ , 2-seitiger t-Test gepaarter Stichproben). Die post-Werte korrelierten zudem negativ mit dem cfDNA-Abfall – Patienten mit höheren NLR-Werten, also einem ungünstigen Entzündungswert, zeigten einen signifikant niedrigeren cfDNA-Abfall in der Erholungsphase ( $\rho = -0,834$ ,  $P = 0,039$  für  $n = 6$ ). Außerdem korrelierte die NLR über den gesamten Verlauf signifikant mit der DNase-AR, die im nächsten Abschnitt beschrieben wird ( $\rho = 0,621$ ,  $P = 0,003$  für  $n = 20$ ).



Unter Ausschluss von Patient TP1, dessen Lymphozytenwerte stark abwichen, korrelierte die NLR nach Belastung auch signifikant negativ mit der maximalen Leistung (Watt absolut:  $\rho = -0,828$ ,  $P = 0,042$ ; Watt pro kg Körpergewicht:  $\rho = -0,939$ ,  $P = 0,005$  für je  $n = 6$ ), der  $\dot{V}O_2\max$  ( $\rho = -0,929$ ,  $P = 0,023$  für  $n = 5$ ) und dem Laktatanstieg ( $\rho = -0,924$ ,  $P = 0,008$  für  $n = 6$ ), was einen Zusammenhang der NLR mit der Leistungsfähigkeit belegt.



**Abbildung 96** NLR der Tumorbelastungsstudie

Bei allen Tumorpatienten außer TP7 wurde für jeden der drei Zeitpunkte die NLR (Neutrophil-Lymphocyte-Ratio) berechnet. a) zeigt die Veränderungen der NLR über die Belastung hinweg. Bei den meisten Patienten fiel die NLR über die Belastung ab und stieg anschließend wieder bis über den Ausgangswert an. b) Die NLR (Y) gegen den Abfall der cfDNA von post nach rest (X) aufgetragen. Die Werte korrelieren negativ miteinander.

### 3.2.3.4 DNase-1-Aktivitätsreduktion und cfDNA

Im Blutplasma aller abgenommenen Blutproben wurde die DNase-1-Aktivitätsreduktion (DNase-AR) mittels kommerziellem ELISA-Test bestimmt, wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben. Die DNase-AR veränderte sich abhängig vom Belastungszustand – sie fiel während der Belastung signifikant ab ( $P = 0,006$ ) und stieg während der Erholungsphase wieder signifikant an ( $P = 0,001$ , Abb. 97, Werte in Abb. 98). Bei separater Analyse der Tumor- und der Kontrollgruppe blieb die Signifikanz über den Gesamtzeitraum betrachtet erhalten, allerdings unterschieden sich die Werte zu den einzelnen Zeitpunkten in einer Post-Hoc-Analyse nur noch in der Kontrollgruppe signifikant voneinander, nicht aber in der Tumorgruppe (Abb. 98, ANOVA, Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni). Letzteres ergibt sich unter anderem aus der hohen Streuung der Werte der Tumorgruppe zu allen Zeitpunkten sowie der atypischen Entwicklung der DNase-AR-Werte von TP1, bei dem die DNase-AR von prä nach post deutlich anstieg (Abb. 97, Abb. 99a).

In Abbildung 99 a und b sind die Entwicklungen der DNase-AR-Werte zusammen mit denen der cfDNA-Konzentration für die einzelnen Individuen gezeigt. Bis auf 2 Tumorpatienten (TP1

+ TP7), zeigten alle Teilnehmer gegenläufige Entwicklungen der beiden Parameter. Ein Vergleich der individuellen Korrelationen der DNase-AR-Werte mit den cfDNA-Konzentrationen in Abbildung 99c zeigt in der Tumorgruppe stark abweichende Muster in den Zusammenhängen von cfDNA und DNase-AR bei einzelnen Patienten (TP1, TP2, TP7), wohingegen die Teilnehmer der Kontrollgruppe sehr ähnliche Verläufe aufweisen. Diese Abweichungen resultierten vor allem aus nur sehr geringen belastungsabhängigen Veränderungen entweder der cfDNA-Konzentration oder der DNase-AR einzelner Patienten in der Tumorgruppe von prä nach post. Daher korrelierten die DNase-AR-Werte innerhalb der Tumorgruppe nicht mit den cfDNA-Konzentrationen. Die Abweichungen ließen sich nicht mit der maximalen Leistung oder den gemessenen Belastungsparametern erklären.

Korrelationsanalysen bestätigten dies: DNase-AR und cfDNA korrelierten zwar hochsignifikant negativ innerhalb der Kontrollgruppe für den Gesamtzeitraum ( $\rho = -0,838$ ,  $P < 0,001$ ,  $n = 15$ ) und den Belastungszeitraum prä-post ( $\rho = -0,871$ ,  $P = 0,001$ ,  $n = 10$ ), für die Tumor- und die Gesamtgruppe jedoch gar nicht (Abb. 100). Die DNase-AR-Werte scheinen also während der Belastung in der Tumorgruppe in einigen Fällen anderweitig stärker oder anders beeinflusst zu sein als (durch) die cfDNA, so dass die Aussagekraft im Zusammenhang mit der cfDNA, vermutlich eingeschränkt ist. Ein direktes Zusammenspiel cfDNA-Konzentration mit DNase-AR ist hier nicht zu finden.

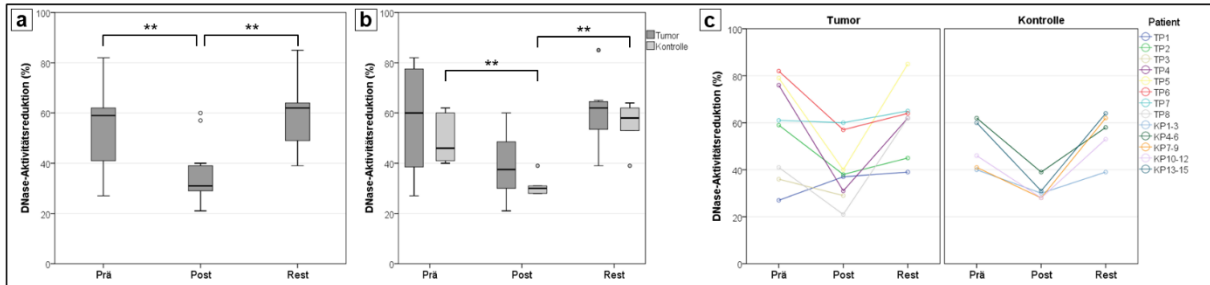
Wird hingegen die Erholungsphase separat betrachtet, spielte die DNase-AR anscheinend eine entscheidende Rolle für die cfDNA-Kinetik, da der Abfall der cfDNA-Konzentrationen von post nach rest in der Gesamtgruppe und stärker noch in der Tumorgruppe signifikant mit den post-DNase-AR-Werten korrelierte (Gesamt:  $\rho = -0,682$ ,  $P = 0,015$ ,  $n = 12$ ; Tumor:  $\rho = -0,849$ ,  $P = 0,016$ ,  $n = 7$ ; Abb. 101). In der Kontrollgruppe korrelierten tendenziell eher die prä- und post-Werte der beiden Parameter untereinander (prä:  $\rho = -0,819$ ,  $P = 0,09$ ; post  $\rho = -0,807$ ,  $P = 0,099$ ). Die bereits beschriebenen starken Varianzen im Abfall der cfDNA in der Erholungsphase zwischen den Studiengruppen (Abschnitt [3.2.3.1](#)) sind somit möglicherweise ein direktes Resultat aus den sehr unterschiedlichen DNase-AR-Werten direkt nach Belastung.

Da die DNase-AR-Werte post zudem sowohl in der Gesamt- als auch in der Tumorgruppe hochsignifikant mit der maximalen Leistung, der maximalen Herzfrequenz und der  $\dot{V}O_2\text{max}$  korrelierten, könnte ein Zusammenhang bei den Tumorpatienten zwischen der Leistungsfähigkeit und der DNase-AR direkt nach Belastung zu bestehen (Abb. 101 a+b, auch Werte). Wiederum fanden sich diese Korrelationen nicht bei der Kontrollgruppe. Die Nachbelastungswerte waren somit nur für die Tumorgruppe von möglicher belastungsphysiologischer Aussagekraft.

Über alle Messzeitpunkte hinweg und auch nur über die Entwicklung der Belastungsdauer (prä-post) korrelierte die DNase-AR signifikant mit den Belastungsparametern – mit der Herzfrequenz, dem systolischen und dem diastolischen Blutdruck, der  $\dot{V}O_2$  und dem Laktatwert

# Ergebnisse

(Abb. 100 a+b), die Entwicklungen der Werte stimmen also überein. Interessanterweise korrelierte der Abfall der DNase-AR zwischen prä und post mit keinem der Belastungsparameter (nicht gezeigt). Die Entwicklung der DNase-AR während der Belastung hat demnach vermutlich keine belastungsphysiologische Aussage, sondern nur der Belastungswert.



**Abbildung 97** DNase-AR-Verläufe

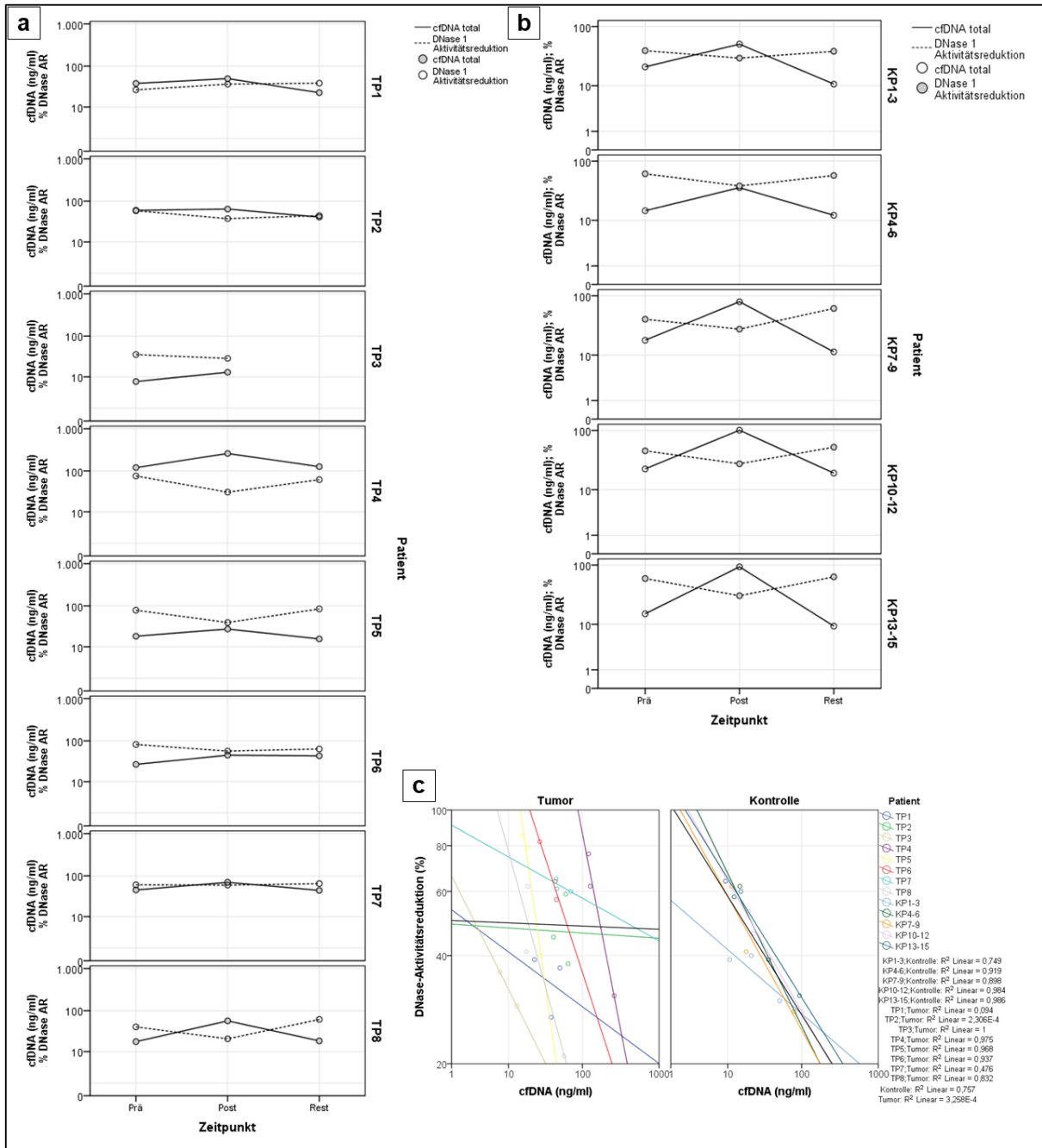
Die DNase-AR-Verläufe der Tumor- und der Kontrollgruppe, a) für das gesamte Kollektiv, b) nach Gruppen unterschieden und c) nach Individuen aufgetrennt. In beiden Gruppen fielen die Reduktionswerte im Laufe der Belastung ab, die DNase-1-Aktivität stieg also an. Bis auf einen Tumorpatienten (TP1) traf dies auf alle Individuen zu. Wie auch bei der cfDNA ist die Streuung bei der Tumorgruppe größer als bei der Kontrollgruppe, wodurch sich die DNase-AR-Werte der Kontrollgruppe signifikant zwischen post und den Ruhewerten unterschieden, in der Tumorgruppe hingegen nicht (b).

Tests der Zwischensubjekteffekte						Multiple Comparisons						Deskriptive Statistiken				
Abhängige Variable: DNase-Aktivitätsreduktion (%)						Abhängige Variable: DNase-Aktivitätsreduktion (%)						Abhängige Variable: DNase-Aktivitätsreduktion (%)				
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	0/Zeitpunkt	1/Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95%-Konfidenzintervall	Zeitpunkt	Mittelwert	Standardabweichung	N	
Korrigiertes Modell	3583,412 <sup>a</sup>	2	1791,706	8,880	.001	Prä	Post	18,54	5,571	.006	4,53	32,55	Prä	54,62	17,590	13
Konstanter Term	93427,111	1	93427,111	463,056	.000	Prä	Rest	-3,55	5,886	1,000	-17,85	10,75	Post	36,08	11,310	13
Zeitpunkt	3583,412	2	1791,706	8,880	.001	Post	Prä	-18,54	5,571	.006	-32,55	-4,53	Rest	58,17	12,841	12
Fehler	7061,667	35	201,762			Rest	Post	-22,09 <sup>*</sup>	5,886	.001	-36,39	-7,79	Gesamt	49,39	16,962	38
Gesamt	103359,000	38				Rest	Prä	3,55	5,886	1,000	-10,75	17,85				
Korrigierte Gesamtvariation	10645,079	37					Post	22,09 <sup>*</sup>	5,886	.001	7,79	36,39				
a. R-Quadrat = ,337 (korrigiertes R-Quadrat = ,299)						Grundlage: beobachtete Mittelwerte. Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 201,762. * Die mittlere Differenz ist auf dem .05-Niveau signifikant.										
Tests der Zwischensubjekteffekte Tumorgruppe						Multiple Comparisons Tumorgruppe						Deskriptive Statistiken Tumorgruppe				
Abhängige Variable: DNase-Aktivitätsreduktion (%)						Abhängige Variable: DNase-Aktivitätsreduktion (%)						Abhängige Variable: DNase-Aktivitätsreduktion (%)				
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	0/Zeitpunkt	1/Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95%-Konfidenzintervall	Zeitpunkt	Mittelwert	Standardabweichung	N	
Korrigiertes Modell	2059,821 <sup>a</sup>	2	1029,911	3,625	.045	Prä	Post	18,50	8,428	.120	-3,52	40,52	Prä	57,62	20,989	8
Konstanter Term	62771,458	1	62771,458	220,942	.000	Prä	Rest	-2,66	8,724	1,000	-25,45	20,13	Post	39,13	13,410	8
Zeitpunkt	2059,821	2	1029,911	3,625	.045	Post	Prä	-18,50	8,428	.120	-40,52	3,52	Rest	60,29	14,941	7
Fehler	5682,179	20	284,109			Rest	Post	-21,16	8,724	.075	-43,95	1,63	Gesamt	52,00	18,759	23
Gesamt	69934,000	23				Rest	Prä	2,66	8,724	1,000	-20,13	25,45				
Korrigierte Gesamtvariation	7742,000	22					Post	21,16	8,724	.075	-1,63	43,95				
a. R-Quadrat = ,266 (korrigiertes R-Quadrat = ,193)						Grundlage: beobachtete Mittelwerte. Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 284,109.										
Tests der Zwischensubjekteffekte Kontrollgruppe						Multiple Comparisons Kontrollgruppe						Deskriptive Statistiken Kontrollgruppe				
Abhängige Variable: DNase-Aktivitätsreduktion (%)						Abhängige Variable: DNase-Aktivitätsreduktion (%)						Abhängige Variable: DNase-Aktivitätsreduktion (%)				
Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.	0/Zeitpunkt	1/Zeitpunkt	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig.	95%-Konfidenzintervall	Zeitpunkt	Mittelwert	Standardabweichung	N	
Korrigiertes Modell	1585,200 <sup>a</sup>	2	792,600	10,311	.002	Prä	Post	18,60	5,545	.017	3,19	34,01	Prä	48,80	10,498	5
Konstanter Term	30917,400	1	30917,400	402,221	.000	Prä	Rest	-5,40	5,545	1,000	-20,81	10,01	Post	31,20	4,550	5
Zeitpunkt	1585,200	2	792,600	10,311	.002	Post	Prä	-18,60	5,545	.017	-34,01	-3,19	Rest	55,20	9,985	5
Fehler	922,400	12	76,867			Rest	Post	-24,00 <sup>*</sup>	5,545	.003	-39,41	-8,59	Gesamt	45,40	13,383	15
Gesamt	33425,000	15				Rest	Prä	5,40	5,545	1,000	-10,01	20,81				
Korrigierte Gesamtvariation	2507,600	14					Post	24,00 <sup>*</sup>	5,545	.003	8,59	39,41				
a. R-Quadrat = ,632 (korrigiertes R-Quadrat = ,571)						Grundlage: beobachtete Mittelwerte. Der Fehlerterm ist Mittel der Quadrate(Fehler) = 76,867. * Die mittlere Differenz ist auf dem .05-Niveau signifikant.										

**Abbildung 98** Statistiken der DNase-AR nach Gruppen und Zeitpunkt

Die DNase-AR war in allen Gruppen signifikant variant über die Zeitpunkte hinweg, für die Tumorgruppe separat allerdings nur leicht. Bei der Gesamt- und der Kontrollgruppe unterschieden sich zudem die prä- und rest-Werte signifikant von den post-Werten, untereinander jedoch nicht. Die Werte der Tumorgruppe lagen zu jeder Zeit im Durchschnitt über denen der Kontrollgruppe, allerdings mit hoher Streuung.

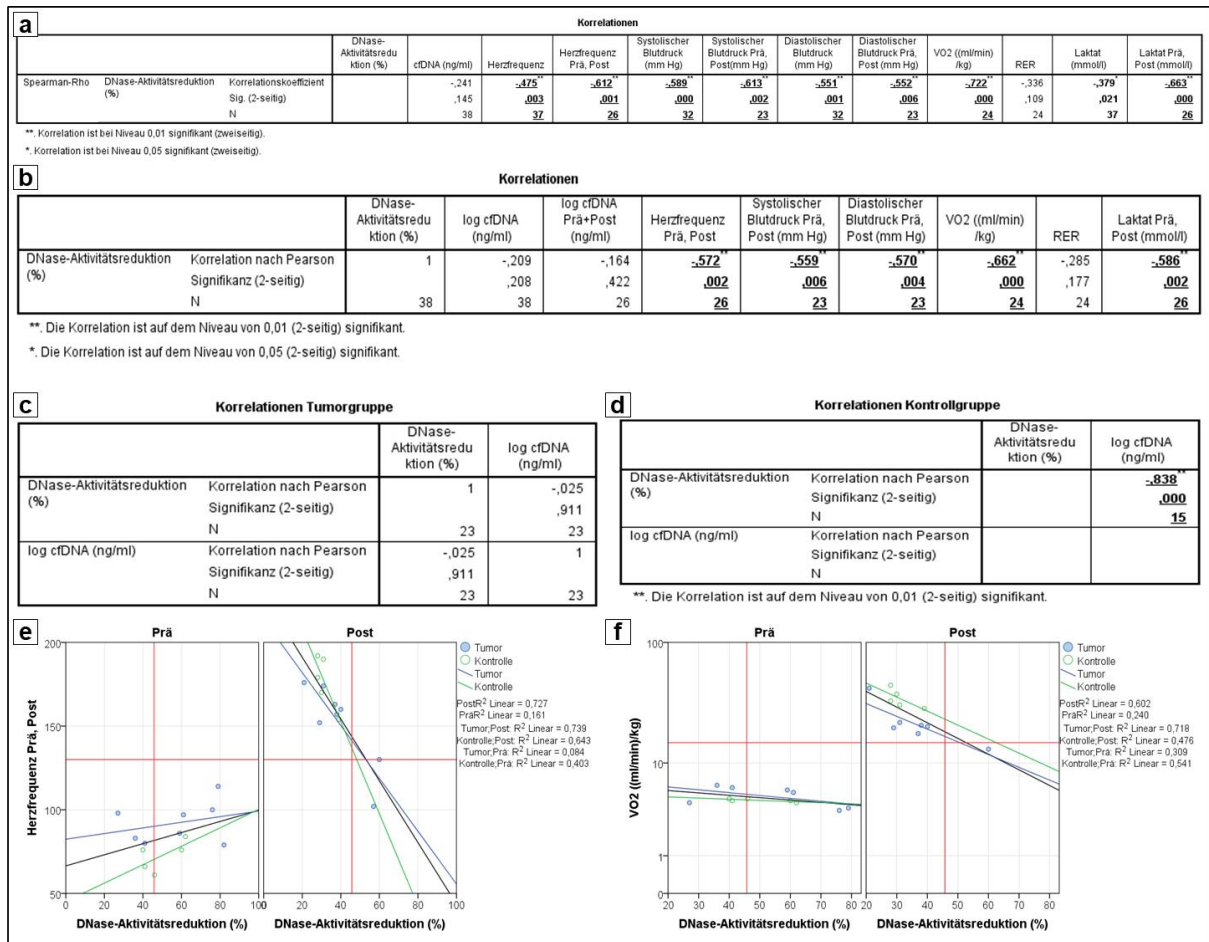
# Ergebnisse



**Abbildung 99** cfDNA und DNase-AR graphisch nach Gruppen

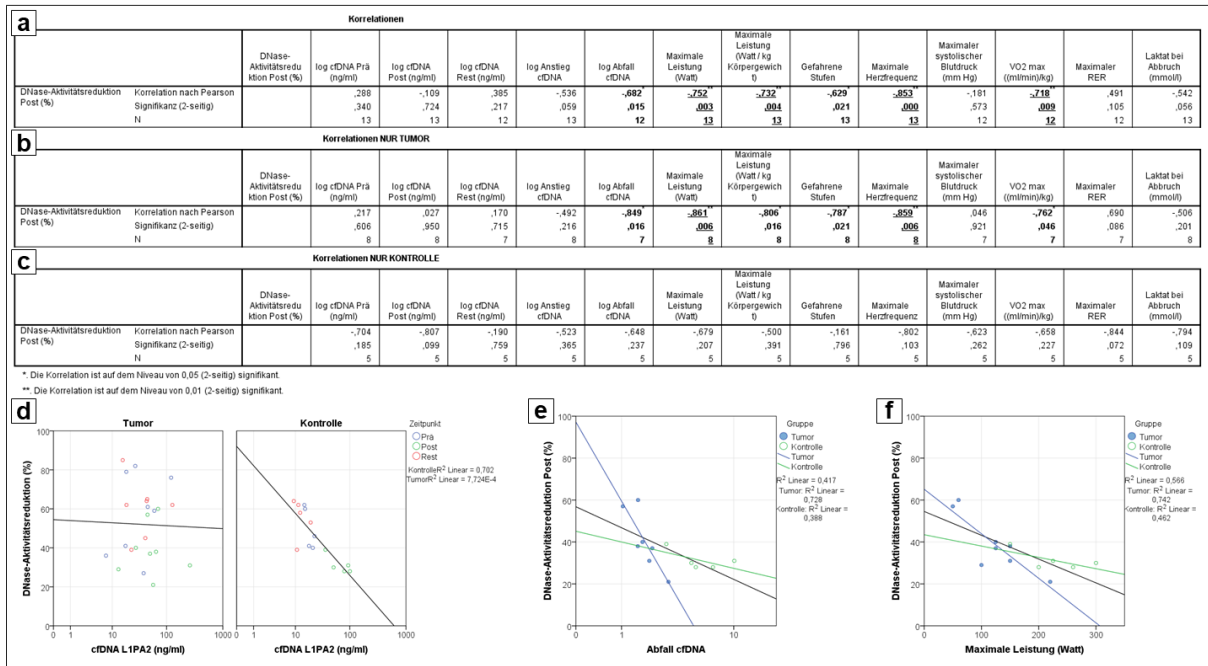
a und b zeigen die individuellen Verläufe von cfDNA und DNase-AR über die Zeitpunkte, getrennt nach Tumor- (a) und Kontrollgruppe (b). Bis auf TP1 und TP7 sind die Entwicklungen klar gegenläufig – die cfDNA-Konzentration steigt durch die Belastung an und fällt im Anschluss wieder ab, die DNase-AR umgekehrt. Die Aktivität der DNase steigt also gleichzeitig zur zunehmenden DNA-Konzentration im Blut an.

# Ergebnisse



**Abbildung 100** Korrelationen der DNase-AR

a) Korrelationen der DNase-AR mit den Belastungsparametern, inklusive der cfDNA, unter Einbezug aller gemessenen Werte sowie für nur prä und post. Da viele Parameter unter Einbezug aller Werte nicht normalverteilt sind, wurde eine Korrelation nach Spearman durchgeführt. Bis auf die cfDNA und den RER korreliert die DNase-AR mit allen Parametern signifikant. In b) wurden nur die prä- und die post-Werte einbezogen, da bei den Belastungsparametern die rest-Werte nicht gleichzeitig zu den cfDNA- und DNase-AR-Werten 90 Min. nach Ende der Belastung erhoben wurden, sondern 6 Min. nach Ende der Belastung, und mit diesen daher nur eingeschränkt vergleichbar sind, auch wenn alles Ruhewerte nach Belastungsende sind. Da diese Werte alle normalverteilt sind, wurde diesmal eine Korrelation nach Pearson durchgeführt. Die Ergebnisse stimmen mit den Korrelationen nach Spearman in a) überein. c-d) Die Korrelationen der DNase-AR-Werte mit den gesamten cfDNA-Konzentrationen nach Tumor- (c, keine Korrelation) und Kontrollgruppe (d, hochsignifikante Korrelation) aufgetrennt. In e und f sind exemplarisch die Korrelationen der prä- und post-Werte der DNase-AR mit der Herzfrequenz (e) und der  $\dot{V}O_2$  (f) dargestellt, jeweils nach Zeitpunkt und Gruppe getrennt. In beiden Fällen korrelieren nur die post-Werte separat, wobei hier die Tumorgruppe besser korrelierte als die Kontrollgruppe.



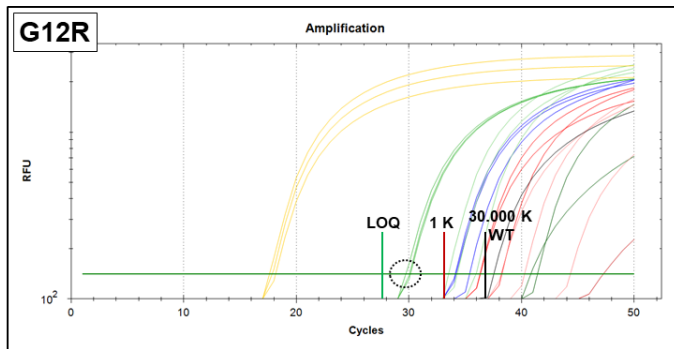
**Abbildung 101** Korrelationen DNase-AR post-Werte

Die Korrelationen der DNase-AR-Nachbelastungswerte (post) der a) Gesamtgruppe, b) Tumorgruppe und c) Kontrollgruppe. In der Gesamt- und Tumorgruppe korrelieren die DNase-AR-Werte mit dem ctDNA-Abfall und den meisten Leistungsparametern – der maximalen Leistung, den gefahrenen Stufen, der maximalen Herzfrequenz und der VO<sub>2</sub>max – nicht aber den Belastungsparametern RER und Laktat. In der Kontrollgruppe korrelieren die Werte nicht signifikant, tendenziell korrelieren nur die ctDNA-post-Konzentration, die maximale Herzfrequenz und der RER. d) Die ctDNA-Konzentrationen (X) und DNase-AR (Y) korrelieren in der Tumorgruppe gar nicht, in der Kontrollgruppe vor und direkt nach Belastung tendenziell und über alle Zeitpunkte hinweg signifikant (siehe auch Abb. 100). e) Der ctDNA-Abfall (X) gegen die DNase-AR-post-Werte (Y) aufgetragen, nach Gruppen differenziert. Für die Tumorgruppe und, weniger deutlich, auch die Gesamtgruppe korrelieren die DNase-AR-post-Werte signifikant negativ mit dem ctDNA-Abfall von post nach rest (auch Abb. a und b). Hohe Abfälle der ctDNA während der Erholungsphase stimmen also mit einer geringen Reduktion der DNase-Aktivität zum vorherigen Messzeitpunkt überein. Die Werte der Kontrollgruppe korrelieren nicht signifikant. f) Die maximale Leistung (X) korreliert in der Gesamt- und der Tumorgruppe signifikant mit den DNase-AR-post-Werten (Y).

### 3.2.4 ctDNA – Fallbericht

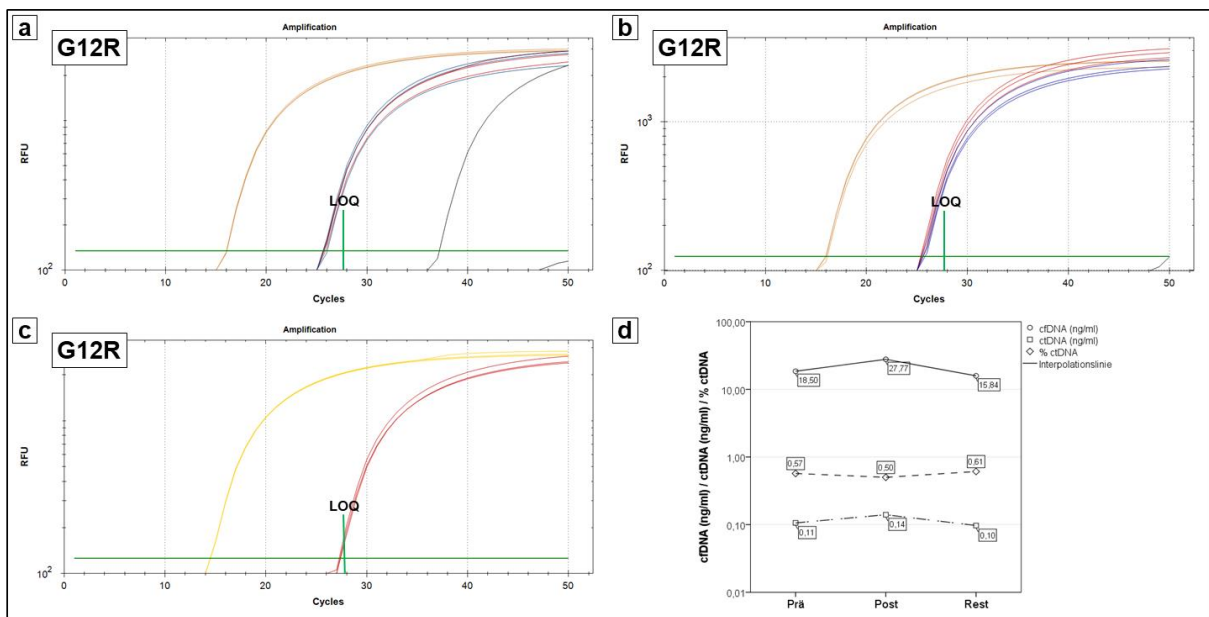
Eines der Hauptziele der Tumorbelastungsstudie war die Untersuchung des Einflusses einer körperlichen Ausbelastung auf die Entwicklung der ctDNA. Aufgrund des geringen Rekrutierungserfolgs konnten allerdings nur vier Patienten mit Kolontumoren (einer postoperativ) getestet werden, die anderen teilnehmenden Patienten hatten andere Tumorentitäten, in denen KRAS-Mutationen sehr selten vorkommen (Magen, Ösophagus, Brust/Schilddrüse). Alle Patienten wurden mit der PNB-qPCR auf KRAS-Mutationen getestet. Bei einem der vier Kolon-Patienten (TP5) wurden Fragmente mit einer KRAS-Mutation im Blutplasma detektiert (Abb. 102). Diese 25% entsprechen in etwa der in der Literatur berichteten Häufigkeit von 30-40% KRAS-mutations-positiven Patienten mit kolorektalen Tumoren (Fearon, 2011). Hier wird sich aufgrund dessen auf eine Einzelfallbeschreibung beschränkt, ohne Vergleiche der ctDNA zu anderen Parametern ziehen zu können.





**Abbildung 102** Nachweis der *KRAS* G12R-Mutation in der Tumorbelastungsstudie PNB-qPCR nach Erstrunden-Standardprotokoll mit Phusion-Polymerase und mit Zweitrunden-Annealing von 65 °C über 40 Sek. Es wurden 3,2 µl Template pro Erstrunde eingesetzt (alle in Aufreinigung 20x aufkonzentriert). Die mutationspezifischen PNB-qPCRs wurden mit allen post-Proben der Tumorpatienten der Tumorbelastungsstudie durchgeführt. Die Messwerte der Probe für TP5 (gestrichelte Linie) lagen deutlich

über dem 1-Kopien-Schnittpunkt, jedoch unterhalb des LOQ.

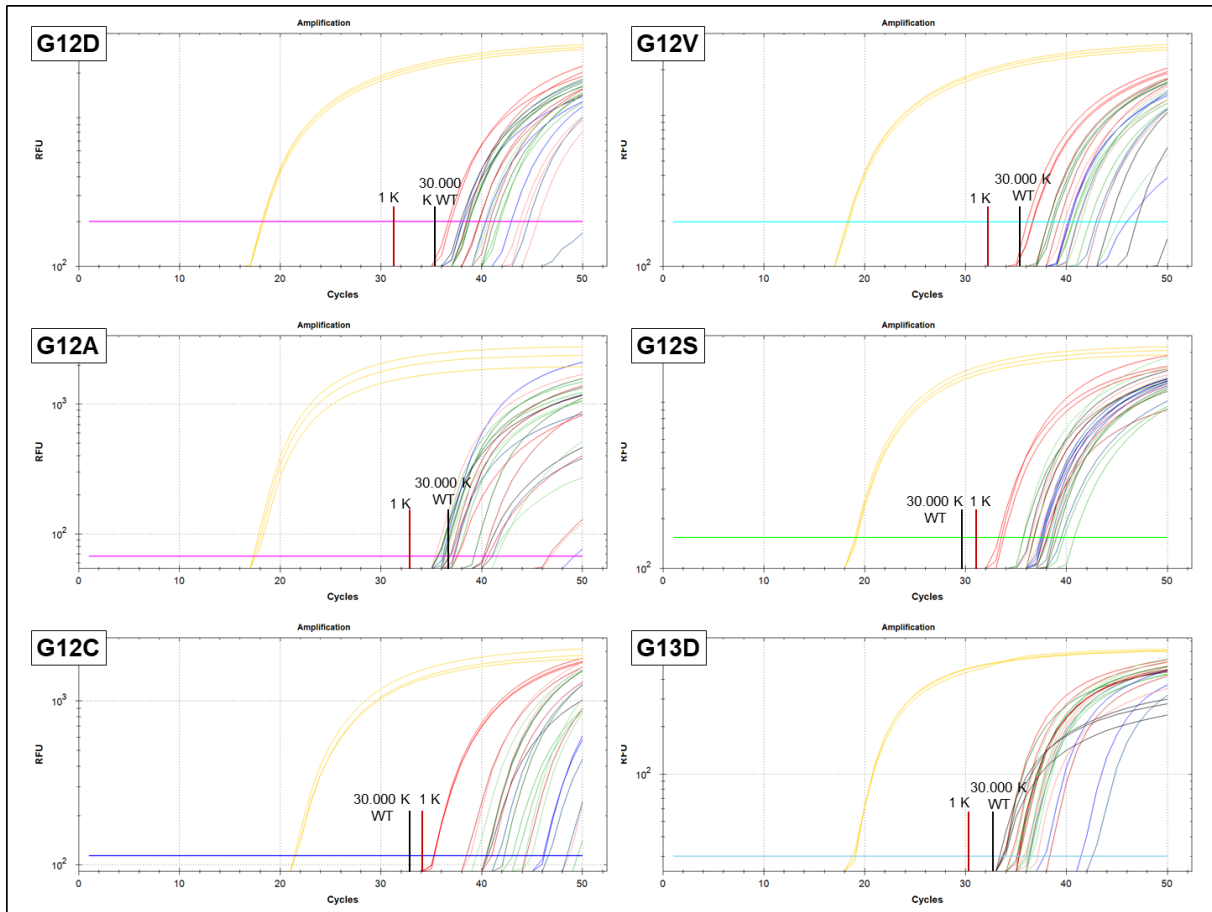


**Abbildung 103** Quantifizierung der ctDNA

Drei PNB-qPCRs zur Quantifizierung der ctDNA im Blut eines Tumorpatienten. a+b) zeigen beide die Quantifizierung der prä- und rest-Proben des Patienten TP5 aus zwei verschiedenen Verdünnungen des gleichen Pools nach der Erstrunde (Standard-Protokoll mit Phusion-Polymerase, 60x-Aufkonzentrierung bei der Aufreinigung, Zweitrunden-Annealing 65 °C 40 Sek.). Die Standardabweichung aller Werte der einzelnen Proben aus beiden Messungen gemeinsam lagen unter 0,2, was die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse belegt. c) zeigt die Quantifizierung der post Probe des gleichen Patienten in der PNB-qPCR (Standard-Protokoll mit Phusion-Polymerase, 26,8x-Aufkonzentrierung bei der Aufreinigung, Zweitrunden-Annealing 65 °C 40 Sek.). Durch den Einsatz von 8 µl Template lagen alle Werte über dem LOQ. Die ctDNA-Konzentrationen sind zusätzlich mit den errechneten ctDNA-Prozentsätzen und der cfDNA in Abbildung d) dargestellt. Die ctDNA steigt während der Belastung absolut an und sinkt in der anschließenden Ruhephase wieder ab. Da die gesamt-cfDNA jedoch stärker ansteigt, fällt der ctDNA-Anteil hingegen zum post-Wert ab und steigt wieder zum rest-Wert.

Für alle drei Zeitpunkte des Belastungstests konnten für TP5 ctDNA-Werte über dem LOQ quantifiziert werden (Abb. 103). Die ctDNA lag in einer Ruhekonzentration von 0,11 ng/ml vor, was im Verhältnis zur L1PA2-Messung (18,5 ng/ml) einen Anteil von 0,57% der cfDNA ergab. Unter Belastung stieg die ctDNA-Konzentration leicht an, auf 0,14 ng/ml, jedoch schwächer als die gesamt-cfDNA, wodurch der Anteil auf 0,5% absank. In der Ruhephase stellte sich der Ausgangswert in etwa wieder her, fiel aber mit einer ctDNA-rest-Konzentration von 0,097 ng/ml

und einem Anteil von 0,61% schwächer wieder ab als die gesamt-cfDNA. Somit ist die Dynamik der ctDNA in dieser Erstbeschreibung etwas niedriger, als die der cfDNA insgesamt, verläuft aber parallel.



**Abbildung 104** Negative Tests auf *KRAS*-Mutationen in der Tumorbelastungsstudie

PNB-qPCRs nach Erstrunden-Standardprotokoll mit Phusion-Polymerase und mit Zweitunden-Annealing von 67 °C über 30 Sek. (G12D, G12V), 65 °C über 30 Sek. (G12S, G13D) und 65 °C über 40 Sek. (G12A, G12C). Es wurden jeweils 3,2 µl Template pro Erstrunde eingesetzt (alle in Aufreinigung 20x aufkonzentriert). Alle Tests auf die Mutation wurden mit allen post-Proben der Tumorpatienten der Tumorbelastungsstudie durchgeführt. Alle Tests waren negativ.

### 3.3 Studienergebnisse „Entwicklungen frei zirkulierender Tumor-DNA bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während des Resektionsprozesses“

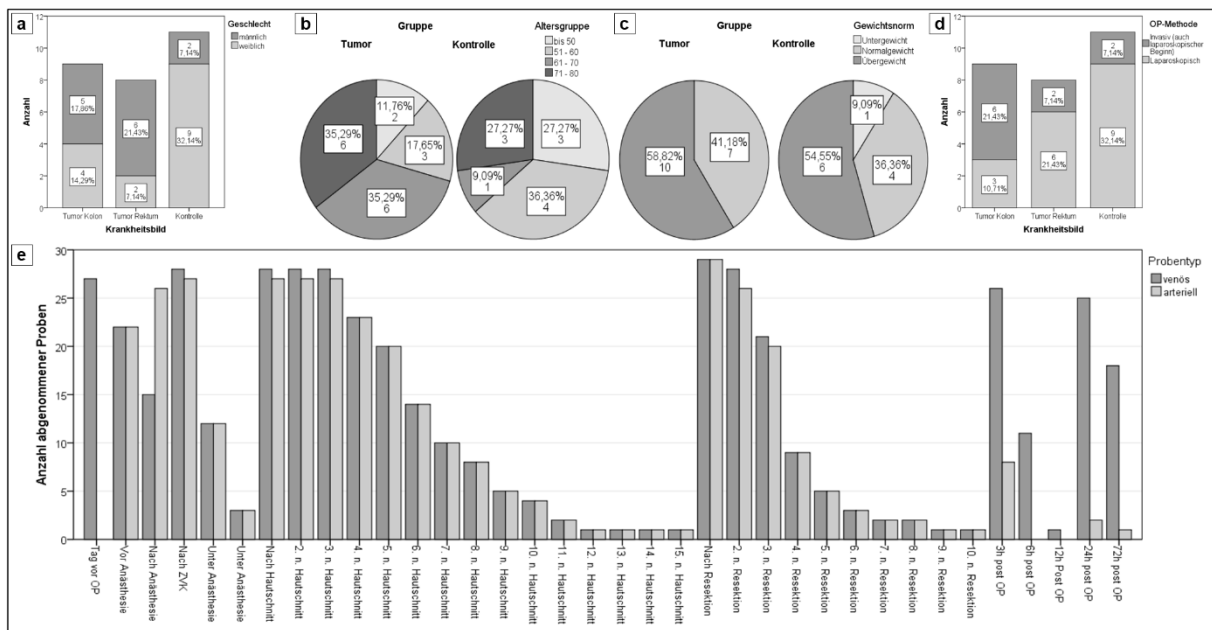
#### 3.3.1 Patienten, Studienablauf und Probengewinnung

In der festgelegten Studiendauer wurden 30 Patienten rekrutiert, von denen 2 Patienten aufgrund des vom Protokoll abweichenden OP-Verlaufs ausgeschlossen werden mussten. Von den verbliebenen 28 Patienten waren 17 Tumorpatienten – 9 mit Kolontumoren und 8 mit Tumoren des Rektums – und 11 Kontrollpatienten mit Krankheiten des kolorektalen Bereichs ohne diagnostizierte Tumoren, die vergleichbaren Operationen unterzogen wurden. Insgesamt waren 13 Patienten männlich und 15 weiblich, die genauere Verteilung ist in Abbildung 105a



## Ergebnisse

zu sehen. Die cfDNA-Konzentrationen zwischen den Geschlechtern unterschieden sich nicht, weder für alle Patienten noch innerhalb der Untergruppen (Tumor- bzw. Kolon- und Rektum- sowie Kontrollpatienten), so dass ein Einfluss des Geschlechts auf die Studienergebnisse weitgehend ausgeschlossen werden kann (Auswertung hier nicht gezeigt). Andere Parameter, wie Alter (Abb. 105b), Gewicht, Gewichtsnorm (Unter-, Normal- oder Übergewicht, Abb. 105c) und Größe waren zwischen den Gruppen vergleichbar.



**Abbildung 105** Übersicht der Patientendaten der OP-Studie

a) Dargestellt ist die Verteilung der Patienten nach Krankheitsbild und Geschlecht getrennt. Obwohl die Geschlechterverteilung insgesamt nahezu ausgeglichen war (13 männlich zu 15 weiblich), war sie zwischen den beiden Tumorgruppen und der Kontrollgruppe nicht gleichmäßig. Aufgrund des ungleichmäßig hohen Auftretens der verschiedenen Krankheitsbilder und eines limitierten Patientenstammes konnten die Gruppen nicht nach Geschlecht angeglichen werden. So bestand die Kontrollgruppe zu 82% aus Frauen, während in der Kolontumorgruppe nur 44% und in der Rektumtumorgruppe sogar nur 25% weiblich waren. b) Dargestellt ist die Verteilung der Patienten nach Tumor- und Kontrollgruppe und nach Alter getrennt. Es wurde in Altersgruppen bis 50 Jahre, 51-60 Jahre, 61-70 Jahre und 71-80 Jahre getrennt. Tumor- und Kontrollgruppe unterschieden sich bei den beiden mittleren Gruppen, die Kontrollgruppe war mit durchschnittlich 58 Jahren jünger als die Tumorgruppe mit durchschnittlich 65 Jahren, allerdings statistisch nicht signifikant ( $P = 0,13$ , ANOVA). c) Dargestellt ist die Verteilung der Patienten nach Tumor- und Kontrollgruppe und nach Gewichtsnorm getrennt. Die Gruppen waren vergleichbar in Bezug auf Übergewicht. d) Dargestellt ist die Verteilung der Patienten nach Krankheitsbild und Operationsmethode getrennt. Die für die Operationen verwendeten Methoden waren ebenfalls nicht gleichmäßig auf die Tumor- und Kontrollgruppen verteilt. So wurden 82% der Operationen der Kontrollpatienten vollständig laparoskopisch durchgeführt, bei den Rektumpatienten 75%, bei den Kolonpatienten aber nur 33%. Abbildung e) zeigt eine Übersicht über alle abgenommenen Proben mit einer Aufteilung in arterielle und venöse Proben über den Operationsverlauf hinweg. Insgesamt wurden 370 arterielle und 463 venöse Proben genommen. Zu den meisten Zeitpunkten wurden annähernd gleich viele arterielle wie venöse Proben gesammelt, mit der Ausnahme aller Proben am Tag vor der OP sowie fast aller Proben nach Ende der OP.

Die Gruppen waren nicht gleichmäßig verteilt in Bezug auf die Operationsmethode – laparoskopisch oder invasiv – in Verbindung mit dem Krankheitsbild (Abb. 105d). Dieser Unterschied ist durch die verschiedenen Möglichkeiten zur Resektion bei den jeweiligen Krankheitsbildern und -stufen bedingt. Da die Gruppe der Patienten mit Kolontumoren zu 66% invasiv operiert

wurde, die der Rektum- und die der Kontrollpatienten jedoch größtenteils laparoskopisch, sind Ergebnisse sowohl aus Vergleichen zwischen den Tumorentitäten und der Kontrollgruppe, als auch zwischen den verschiedenen Operationsmethoden nicht eindeutig zu einer Ursache zuzuordnen und wurden in dieser Arbeit nicht als Unterscheidungsmerkmale untersucht, aber an anderer Stelle separat behandelt (*Tug, unpublished*).

Im Laufe der Studie wurden arterielle und venöse Blutproben abgenommen. Die genaue Verteilung auf alle Patienten über alle Patienten ist in Abbildung 105e dargestellt. Zu den meisten Zeitpunkten wurden zwei Proben abgenommen – eine arterielle und eine venöse. Ausnahmen bildeten einerseits die Probe zwischen Anästhesie und dem ZVK, hier war der arterielle Zugang bereits vorhanden aber der Betriebsablauf gestattete teilweise keine venöse Abnahme. Zusätzlich wurden 3 h nach OP zumeist keine arteriellen Proben genommen und fast nie bei den anderen post-Proben sowie der Probe einen Tag vor OP. Zu diesen Zeitpunkten waren in der Regel keine arteriellen Zugänge vorhanden und sollten im Patienteninteresse auch nicht für diese Einzelabnahmen gelegt werden.

Es wurden nicht bei allen Patienten gleich viele Proben abgenommen. Da der Operationsverlauf und die -dauer nicht einheitlich waren, variierten die Verlaufspuren nach dem Hautschnitt und nach der Resektion sehr stark zwischen den Patienten. Die post-Proben waren aufgrund der Patientenverfügbarkeit teilweise nicht erreichbar; die 72 h post-OP-Probe wurde bei den ersten 10 Patienten nicht abgenommen, erst ab Patient 11.

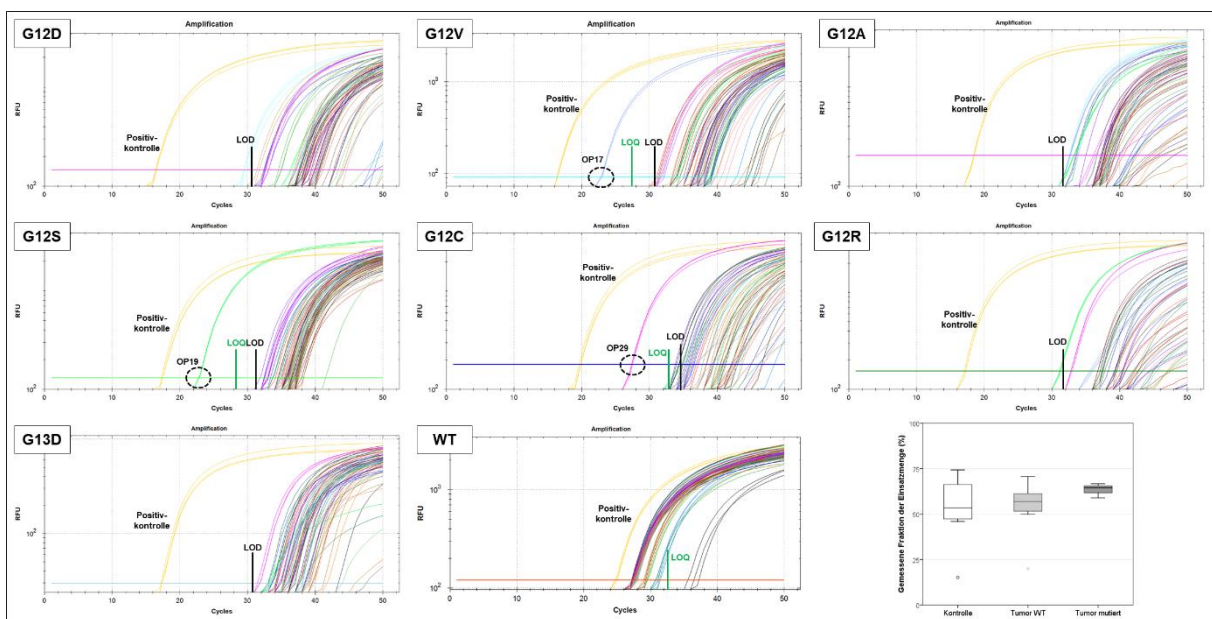
### 3.3.2 Mutationsanalyse

Die *KRAS*-Mutationsanalyse wurde mittels der PNB-qPCR aus isolierter DNA aus FFPE-Proben und isolierter cfDNA aus dem Blutplasma durchgeführt, wie in Abschnitt [2.4.4](#) beschrieben. Im Falle positiver Ergebnisse dieser Mutationsanalysen wurde cfDNA aus den Verlaufsplasmaproben der entsprechenden Patienten isoliert und die cfDNA mittels PNB-qPCR analysiert. Für anschließende statistische Auswertungen der Plasmawerte wurden anschließend drei Gruppen gebildet: Gruppe „Tumor WT“ bzw. „TW“, bestehend aus Tumorpatienten ohne *KRAS*-Mutationen im Plasma, Gruppe „Kontrolle WT“ bzw. „KW“, bestehend aus Kontrollpatienten ohne *KRAS*-Mutationen im Plasma und Gruppe „Plasma mutiert“ bzw. „PM“, bestehend aus Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Plasma. Da in der Mutationsanalyse bei einem Patienten der Kontrollgruppe mit einer Chronischen Lymphatischen Leukämie in der Vergangenheit eine zuvor unbekannte *KRAS*-Mutation detektiert wurde, war die PM-Gruppe kein integraler Bestandteil der Tumorgruppe.

### 3.3.2.1 FFPE-Proben

Es wurde DNA aus FFPE-Proben von 25 Patienten isoliert. Von drei Patienten der Testgruppe waren keine geeigneten Gewebeschnitte angefertigt worden. Alle Eluate wurden mit dem NanoDrop 1000 quantifiziert. Anschließend wurden die Proben auf 1 ng/μl in H<sub>2</sub>O verdünnt, wie in Abschnitt 3.1.6.1 erläutert. Drei Eluate waren bereits sehr niedrig konzentriert, so dass sie nicht weiter verdünnt wurden.

Es konnten *KRAS*-Mutationen in den Isolaten der FFPE-Proben von drei Patienten detektiert werden, wie in Abbildung 106 gezeigt ist. Patient 17 war positiv für G12V, Patient 19 für G12S und Patient 29 für G12C. Alle positiven Messungen lagen deutlich über dem LOQ. Die ctDNA-Fractionen lagen für Patient 29 bei 1,7% (10 ng/ml Eluat), für Patient 17 bei 4,3% (27,8 ng/ml Eluat) und für Patient 19 bei 5,3% (35,3 ng/ml Eluat). Die deutlich positiven Ergebnisse zeigen, dass bei gDNA vermutlich auch weniger Einsatzmaterial problemlos zu positiven Ergebnissen führt.



**Abbildung 106** Ergebnisse der Mutationsanalyse der FFPE-Proben

Amplifikationskurven der Ergebnisse der PNB-qPCR-Detektionen aller *KRAS*-Mutationen für alle FFPE-Isolate, jeweils mit Markierungen für LOD und, im Falle positiver Messungen, LOQ. Die Referenz-Positivkontrollen sind in Gelb und beschriftet. Mutationen wurden detektiert für G12V (OP 17), G12S (OP19) und G12C (OP29). Alle anderen Mutationen und Proben waren negativ. Die Probe für G12R, die über dem LOD liegt, sowie die Probe, die knapp darunter liegt, sind beides Proben, die für andere Mutationen positiv sind und daher durch die Erstrunde angereichert wurden (OP19, OP29). Hierbei handelt es sich also um bedingt falsch positive Signale im Sinne der richtigen Mutation. Da es sich hier um gDNA handelt, wären derart schwach positive Signale allerdings ohnehin nur unter Vorbehalt als positiv zu bewerten. Das Boxplot-Diagramm zeigt die gemessenen Anteile der eingesetzten gDNA (Quantifizierung *KRAS*-Std-qPCR geteilt durch Quantifizierung NanoDrop 1000), aufgeteilt nach Tumorpatienten mit *KRAS*-WT-cfDNA, Kontrollpatienten mit *KRAS*-WT-cfDNA und Tumorpatienten mit *KRAS*-Mutationen in den soliden Tumoren. Die Gruppen unterscheiden sich hierin nicht signifikant voneinander.

Alle Proben wurden auch mit der *KRAS*-Std-qPCR gemessen (Abb. 106). Die FFPE-DNA war unterschiedlich stark degradiert. Zwischen den Untergruppen – Tumor WT, Kontrolle WT und

Tumorpatienten mit Mutationen in den soliden Tumoren – konnten keine Unterschiede in der Degradierung festgestellt werden.

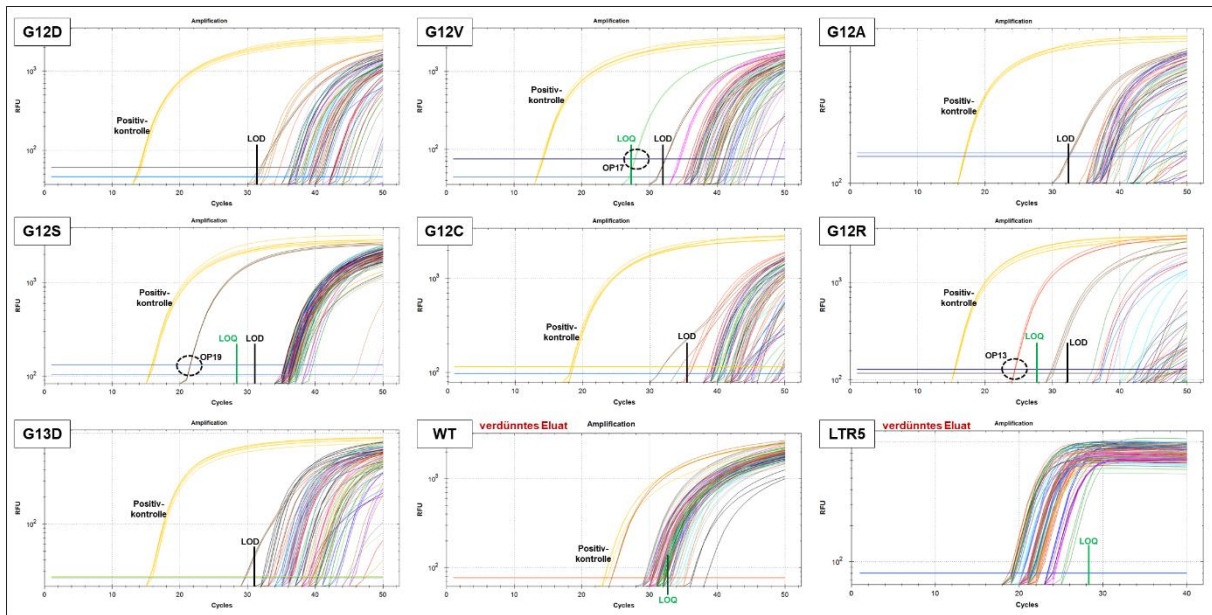
### 3.3.2.2 Plasmaproben

Anschließend an die Mutationsanalyse der FFPE-Gewebeproben wurden die am Tage vor der OP abgenommenen Plasmaproben aller Patienten untersucht. Die cfDNA wurde isoliert und mittels PNB-qPCR auf Mutationen des *KRAS*-Gens getestet sowie mit der *KRAS*-Std-qPCR und der LTR5-qPCR quantifiziert. Es konnten Mutationen im Plasma von OP13 (G12R), OP17 (G12V) und OP19 (G12S) detektiert werden (Abb. 107). Die Ergebnisse für OP17 und OP19 stimmten somit mit den FFPE-Messungen überein. Die in den FFPE-Proben detektierte Mutation von OP29 konnte im Plasma nicht bestätigt werden. Dass im entnommenen Darmgewebe von Patient 13 keine Mutation detektiert worden war, erklärt sich dadurch, dass es sich um einen Kontrollpatienten ohne soliden Tumor im Darm handelte, aber mit einer Chronisch Lymphatischen Leukämie ohne zuvor detektierte *KRAS*-Mutation. Aus dem Quotienten der gemessenen ctDNA und der gesamt-cfDNA (*KRAS*-Std-qPCR) wurden die ctDNA-Fractionen errechnet. Die gemessenen Konzentrationen bzw. eine mögliche Quantifizierung über dem LOQ stand war nicht vom Grade der Aufkonzentrierung des Plasmas bei der Isolierung der cfDNA abhängig. Die ctDNA-Fractionen lagen bei 0,92% (1,07 ng/ml bzw. 311 Kopien/ml Plasma) für Patient OP13 und bei 4,24% (2,26 ng/ml bzw. 654 Kopien/ml Plasma) für Patient OP19. Die Messung für Patient OP17 war ein klar positives Signal über dem LOD, lag aber unter dem LOQ. Die ctDNA-Konzentration war somit sehr niedrig, unter 0,5% ctDNA bzw. unter 0,1 ng/ml Plasma.

Teilweise traten positive Ergebnisse für die Probe von OP19 auch bei Nachweisen anderer Mutationen bei sehr niedrigen Werten um 0,5-3 Kopien herum auf. Diese Kurven ließen sich von richtig positiven Ergebnissen durch atypisch flache Kurvenverläufe unterscheiden. Um solche falsch positiven Ergebnisse von eventuell auftretenden Mehrfachmutationen klarer unterscheiden zu können, könnten zukünftig erneute Zweitunden mit einem Blocking-Primer für die Hauptmutation (hier G12S) durchgeführt werden. Da ein solcher Blocker nicht etabliert war, wurde dies in diesem Fall nicht durchgeführt. Es traten keine falsch positiven Messergebnisse von WT-Proben auf.

Für alle Patienten mit detektierten Mutationen – OP13, OP17, OP19, OP29 – wurde die cfDNA von Verlaufsproben spezifischer Zeitpunkte isoliert und wieder mit der *KRAS*-Std-qPCR und der LTR5-qPCR quantifiziert sowie mittels PNB-qPCR auf die zuvor detektierte Mutation hin analysiert.

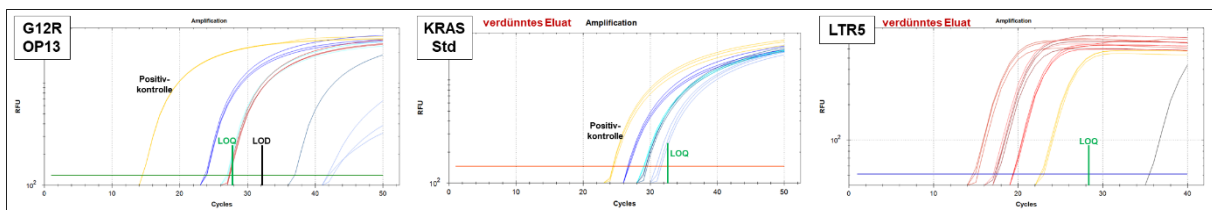
## Ergebnisse



**Abbildung 107** Ergebnisse der Mutationsanalyse der Plasma-Proben

Amplifikationskurven der Ergebnisse der PNB-qPCR-Detektionen aller *KRAS*-Mutationen für alle Plasma-Isolate, jeweils mit Markierungen für LOD und, im Falle positiver Messungen, LOQ. Zusätzlich die beiden WT-Messungen aller Proben mit der *KRAS*-Std-qPCR und der LTR5-qPCR. Die Referenz-Positivkontrollen sind in Gelb und beschriftet. Mutationen wurden detektiert für G12V (OP 17), G12S (OP19) und G12R (OP13). Alle anderen Mutationen und Proben waren negativ. Auch die Messungen für Patient OP29, in dessen FFPE-Probe eine *KRAS*-Mutation nachgewiesen worden war (Abb. 106), war negativ. Teilweise traten positive Ergebnisse für die Probe von OP19 auch bei Nachweisen anderer Mutationen auf, allerdings immer bei sehr niedrigen Werten um 1-3 Kopien herum. Diese falsch positiven Kurven, die durch eine andere Mutation bedingt wurden, wiesen zumeist einen atypischen, flachen Kurvenverlauf auf, am deutlichsten bei G12C zu erkennen.

Alle ctDNA-Detektionen für Patient OP29, dessen FFPE-Isolat eine G12C-Mutation aufwies, waren negativ. Folglich war keine *KRAS*-mutierte ctDNA in den analysierten Plasmaproben und vermutlich auch keine im Blutkreislauf des Patienten OP29 vorhanden (Abb. 111). Für Patient OP17 wurden nur sehr niedrige Werte ermittelt – es lagen nur drei der Verlaufsmessungen über dem LOD (Abb. 109). Diese waren die Probe direkt vor OP-Beginn, die Probe unmittelbar nach der Resektion und die Probe 72 h nach Ende der Operation. Die negativen Ergebnisse für die späteren Messungen bei Patient OP17 unterstreichen die Spezifität der Methode, da hier die cfDNA-Konzentrationen sehr hoch lagen, teilweise über 1000 ng/ml Plasma.

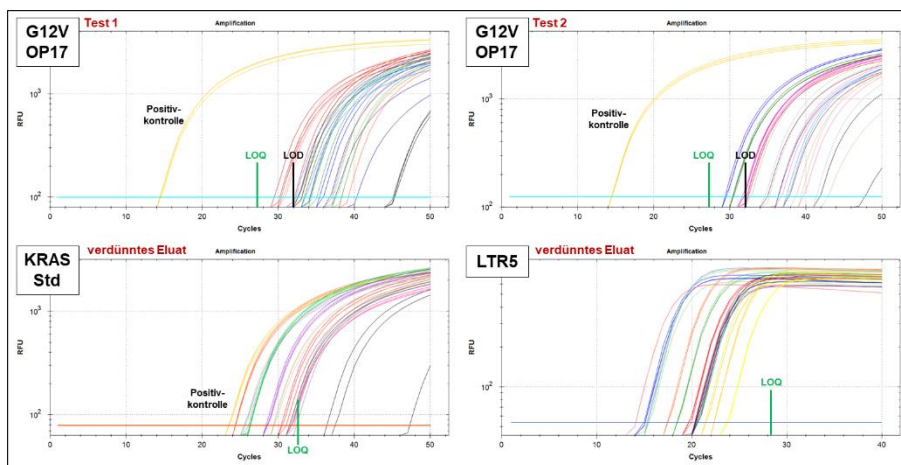


**Abbildung 108** Plasma-Verlaufsmessungen Patient OP13

Gezeigt sind links die ctDNA-Quantifikation mit den G12R-ARMS-Primern in der PNB-qPCR sowie die cfDNA-Quantifikation mittels *KRAS*-Std-qPCR (Mitte) und LTR5-qPCR (rechts). Alle Messungen lagen im LOQ-Bereich oder unter dem LOD.

## Ergebnisse

Für Patient OP13 wurden weniger Zeitpunkte gemessen. Die Konzentrationen lagen entweder über dem LOQ oder unter dem LOD, die ctDNA war also entweder relativ hoch konzentriert oder nicht detektierbar (Abb. 108). Die ctDNA-Konzentration für die Probe direkt nach Resektion lag bei 0,28% ctDNA (0,9 ng/ml bzw. 262 Kopien/ml Plasma), die 72 h nach OP-Ende bei 0,21% ctDNA (0,19 ng/ml bzw. 54 Kopien/ml Plasma). Für Patient OP19 lagen die ctDNA-Konzentrationen mehrerer Proben über dem LOQ und alle über dem LOD (Abb. 110). Die Proben unter dem LOQ lagen in den Zeiträumen vor der Resektion oder nach der dritten Teilresektion (von drei) bis inklusive 24 h nach OP-Ende. Die drei Werte 3 h, 6 h und 24 h nach OP-Ende lagen ungefähr auf gleicher Höhe knapp unter dem LOQ, während die anderen Werte deutlich unter dem LOQ lagen. Die ctDNA-Konzentration für die Proben nach den drei Teilresektionen lagen bei 0,57% ctDNA (0,6 ng/ml bzw. 174 Kopien/ml Plasma), 2,05% ctDNA (1,11 ng/ml bzw. 322 Kopien/ml Plasma) und 0,03% ctDNA (0,04 ng/ml bzw. 12 Kopien/ml Plasma), die Probe 72 h nach OP-Ende bei 0,13% ctDNA (0,23 ng/ml bzw. 67 Kopien/ml Plasma).



**Abbildung 109** Plasma-Verlaufsmessungen Patient OP17

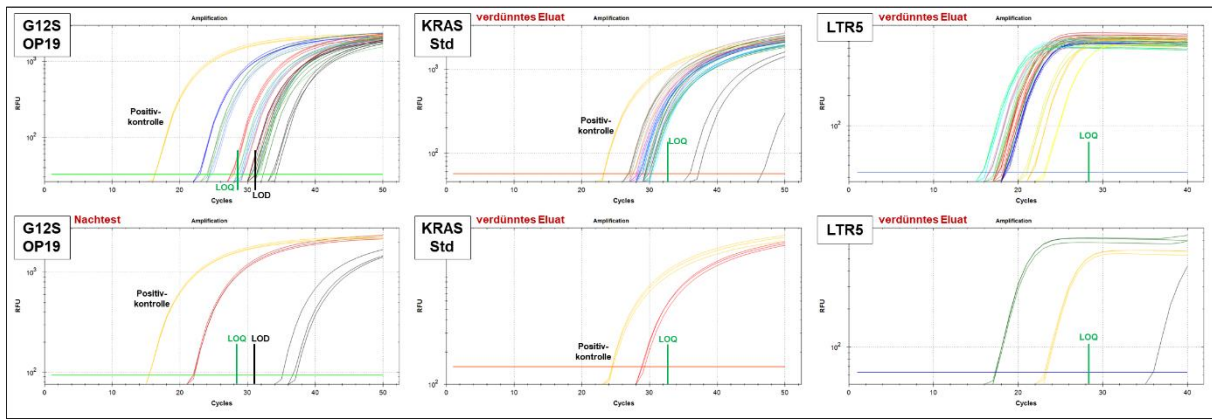
Gezeigt sind oben zwei PNB-qPCR-Messungen zur ctDNA-Detektion und -Quantifikation mit den G12V-ARMS-Primern sowie unten die cfDNA-Quantifikation mittels KRAS-Std-qPCR (links) und LTR5-qPCR (rechts). Alle ctDNA-Messungen lagen unter dem LOQ, viele auch unter dem

LOD. Die Messung oben rechts ist die Wiederholung der Messung oben links zur Bestätigung der Ergebnisse. Die Ergebnisse der beiden Messungen stimmen überein ( $\rho = 0,99$ ,  $P < 10^{-7}$  für 10 Vergleiche).

Für OP19 wurde eine zusätzliche Messung der isolierten DNA aus der isolierten arteriellen Plasma-Probe zum Zeitpunkt der zweiten Abnahme nach der Resektion vorgenommen. Die venöse Probe dieses Zeitpunkts war in den WT-Messungen an isolierter DNA (Abb. 110 obere Reihe) deutlich nach unten von der Messung mit der L1PA2-qPCR direkt aus dem Plasma abgewichen. Daher wurde die cfDNA aus der arteriellen Probe isoliert und gemessen. Diese stimmte mit den Ergebnissen der L1PA2-Messung überein. Da die arteriellen und die venösen Proben weitgehend übereinstimmten ( $\rho = 0,928$ ,  $P = 6,3 \times 10^{-154}$ ,  $n = 355$ , Pearson-Korrelation; Abb. 113), handelte es sich bei der Abweichung vermutlich um eine schlechte Ausbeute bei der cfDNA-Isolierung der venösen Plasmprobe.



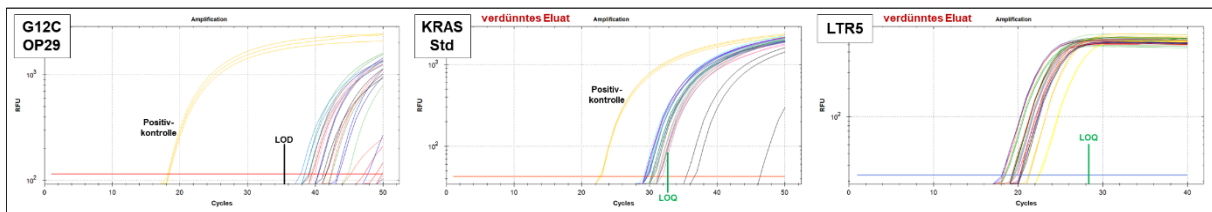
## Ergebnisse



**Abbildung 110** Plasma-Verlaufsmessungen Patient OP19

Gezeigt sind zwei PNB-qPCR-Messungen zur ctDNA-Detektion und -Quantifikation mit den G12S-ARMS-Primern (beide links) sowie die cfDNA-Quantifikation mittels *KRAS*-Std-qPCR (jeweils Mitte) und LTR5-qPCR (rechts). Die Messungen unten wurden mit der isolierten DNA aus der isolierten arteriellen Plasma-Probe zum Zeitpunkt der zweiten Abnahme nach der Resektion durchgeführt.

Die ctDNA-Messungen lagen teilweise über, teilweise unter dem LOQ, manche auch unter dem LOD.



**Abbildung 111** Plasma-Verlaufsmessungen Patient OP29

Gezeigt sind die PNB-qPCR-Messung zur ctDNA-Detektion und -Quantifikation mit den G12C-ARMS-Primern (links) sowie die cfDNA-Quantifikation mittels *KRAS*-Std-qPCR (jeweils Mitte) und LTR5-qPCR (rechts). Es wurde keine ctDNA detektiert.

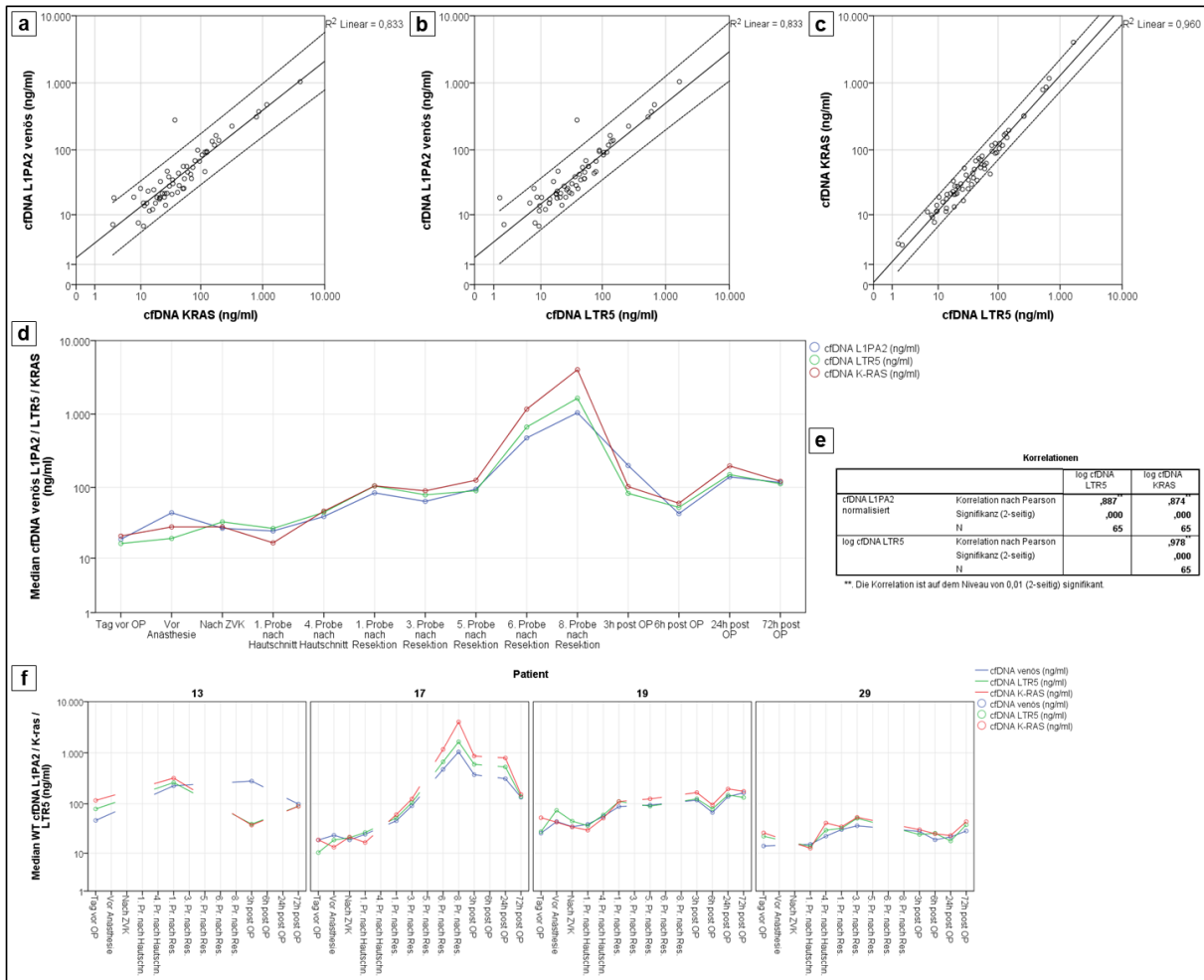
Die Verläufe der ctDNA-Konzentrationen über den Operationszeitraum der drei Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Plasma ähnelten sich. Sie sind in Abbildung 126 zusammen mit den cfDNA-Konzentrationen und der DNase-Aktivitätsreduktion dargestellt. In allen Fällen ist ab dem Zeitpunkt der Anästhesie ein starker Abfall der ctDNA-Konzentrationen ganz oder fast bis auf 0 zu beobachten. Erst mit der Resektion stiegen die Konzentrationen kurzzeitig wieder an, aber nur für die Proben während oder unmittelbar nach der Resektion. Anschließend fielen die Werte wieder ab und stiegen erst zum Zeitpunkt 72 h nach Ende der Operation wieder deutlich an.

### 3.3.3 cfDNA-Messungen

Die cfDNA der Plasmaproben wurde mit drei verschiedenen Methoden quantifiziert, wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben (Abb. 112). Alle Plasmaproben, venös und arteriell, wurden mit der L1PA2-qPCR direkt gemessen (Abb. 113). Von allen Patienten wurden die Proben einen Tag vor OP für die Mutationsanalyse isoliert und die isolierte DNA wurde mit der *KRAS*-Std-qPCR

## Ergebnisse

und der LTR5-qPCR gemessen. Zusätzlich wurde von allen Patienten mit einer *KRAS*-Mutation im Plasma und/oder im Tumorgewebe cfDNA von Verlaufspunkten von bestimmten Zeitpunkten isoliert und quantifiziert. Die mit der L1PA2-qPCR gemessenen arteriellen und venösen cfDNA-Konzentrationen im Studienverlauf waren nicht normalverteilt. Sie wurden nach einer von Templeton beschriebenen Methode in zwei Schritten normalisiert (Templeton, 2011).



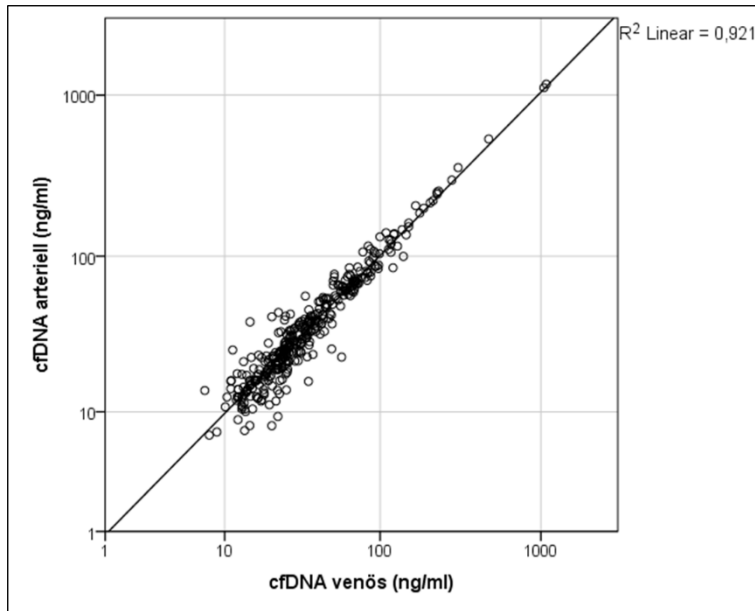
**Abbildung 112** Übereinstimmungen der cfDNA-Messungen in der OP-Studie

a-c) Vergleiche der Ergebnisse der drei qPCRs zur Quantifizierung der cfDNA. a) L1PA2 und *KRAS*-Std, b) L1PA2 und *LTR5*, c) *KRAS*-Std und *LTR5*. Die statistische Auswertung der Korrelationen ist in Abbildung e) gezeigt. Alle zeigen eine hochsignifikante Übereinstimmung. d) Verläufe der gemessenen Werte der drei Messmethoden über den Studienzeitraum als Mediane. In f) sind diese auf die vier gemessenen Patienten mit Mutationen in Plasma oder Gewebe aufgetrennt. Generell stimmen die Methoden zu allen Zeitpunkten gut überein. Eine Ausnahme bildet der 3 h post OP Wert bei Patient 13 (f). Hier weichen die Messungen der beiden qPCRs an isolierter cfDNA stark nach unten ab, vermutlich aufgrund einer ineffektiven DNA-Isolierung aus dem Plasma dieser Probe.

Wie bereits erläutert, war die Übereinstimmung der Messungen der venösen und der arteriellen Proben in derart hoher Übereinstimmung, dass diese Werte als äquivalent angesehen werden können (Abschnitt 3.3.2.2, Abb. 113). Die Ergebnisse der drei qPCR-Methoden waren ebenfalls in hoher Übereinstimmung miteinander (Abb. 112), wobei die Korrelation der beiden Quantifizierungen isolierter cfDNA erwartungsgemäß am höchsten war. Für die *KRAS*-Std und



LTR5 lag der Korrelationskoeffizient bei  $\rho = 0,978$  ( $P < 10^{-44}$ ), für L1PA2 mit *KRAS*-Std bei  $\rho = 0,874$  ( $P < 10^{-20}$ ) und mit LTR5 bei  $\rho = 0,887$  ( $P < 10^{-22}$ ) für je  $n = 65$  Vergleiche. Bei zwei Proben war viel cfDNA im Isolierungsprozess verloren gegangen, da die beiden Messungen am Isolat übereinstimmend deutlich niedriger lagen.



**Abbildung 113** Vergleich cfDNA-Konzentrationen entsprechender venöser und arterieller Plasmaproben.

Die Übereinstimmung der venösen und der arteriellen Plasmaproben ist sehr linear und sowohl in den hohen als auch den niedrigen Konzentrationen nahezu identisch. Hierdurch sind Auswertungen der arteriellen und der venösen cfDNA-Konzentrationen als gleichwertig zu betrachten.

### 3.3.3.1 Statistische Auswertung der cfDNA-Konzentrationen

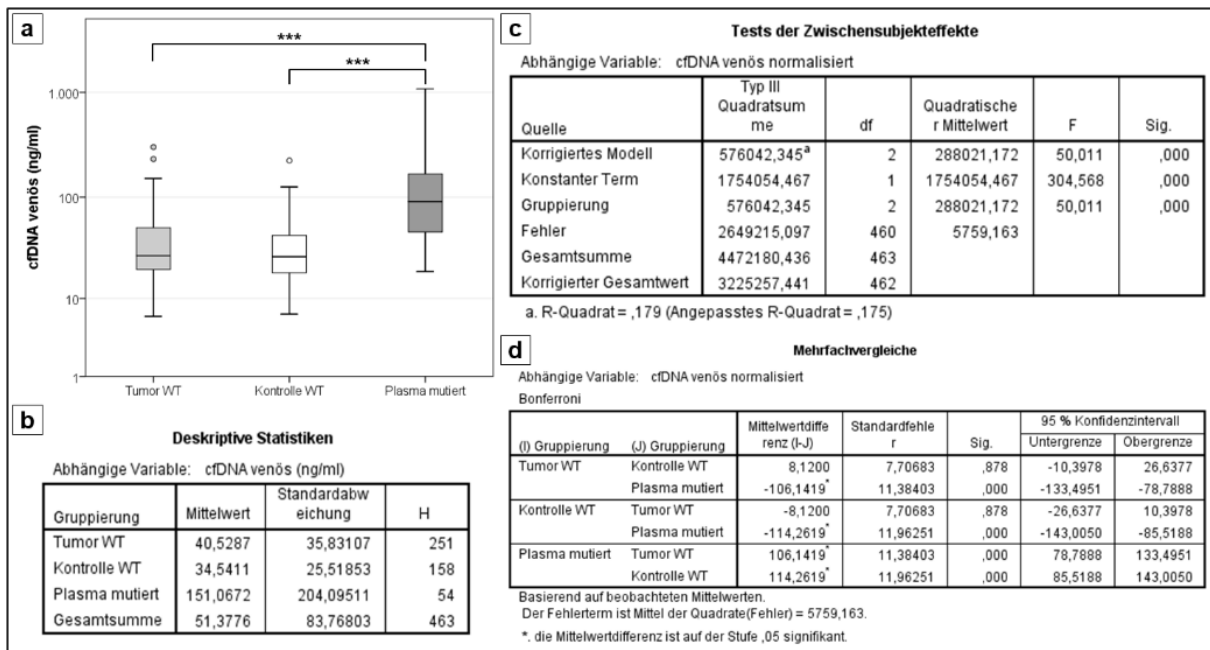
Das Patientenkollektiv wurde anschließend an die Mutationsanalyse des Blutplasmas mittels PNB-qPCR in drei Gruppen unterteilt: Tumorpatienten ohne *KRAS*-Mutationen im Plasma (Gruppe „Tumor-WT“ bzw. „TW“), Kontrollpatienten ohne *KRAS*-Mutationen im Plasma („Kontrolle WT“ bzw. „KW“) und Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Plasma („Plasma mutiert“ bzw. „PM“). Diese Definition schließt nicht aus, dass auch die Patienten der TW-Gruppe ctDNA im Plasma haben, diese weist aber, wenn vorhanden, den *KRAS*-WT auf.

Der OP-Verlauf wurde in vier Zeitabschnitte unterteilt: tI. umschließt alle Zeitpunkte vor Beginn der Operation, tII. alle Zeitpunkte während der OP und vor der Resektion, tIII. alle Zeitpunkte während der OP nach der Resektion und tIV. beinhaltet alle Zeitpunkte nach der OP.

Zusätzlich wurden für jeden der vier Verlaufsabschnitte Mittelwerte der cfDNA-Konzentrationen der einzelnen Patienten gebildet. Somit besaß hiernach jeder Patient für jeden Zeitabschnitt nur noch einen Wert der gemittelten cfDNA-Konzentration. Der Wert jedes Patienten hatte somit gleich viel Einfluss auf die Auswertungen. Hierdurch wurden starke individuelle Schwankungen und Unterschiede in der Anzahl an abgenommenen Proben abgefangen und es wurden kritischere Bedingungen für die Auswertungen geschaffen. Für die statistischen Auswertungen wurden die normalisierten cfDNA-Konzentrationen der venösen L1PA2-Messungen verwendet.

3.3.3.1.1 Unterscheidung cfDNA nach Gruppierung

Nach den drei Patientengruppen getrennt ergaben sich über alle Messzeitpunkte hinweg signifikante Unterschiede bei der cfDNA-Konzentration zwischen der PM-Gruppe und den beiden anderen Gruppen ( $P < 10^{-17}$  zur TW- und  $P < 10^{-18}$  zur KW-Gruppe, ANOVA, Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni), aber keine innerhalb der beiden WT-Gruppen (Abb. 114, auch Werte). Somit ist die Gruppierungseinteilung ein hochsignifikantes Unterscheidungsmerkmal ( $P < 10^{-19}$ ) bezogen auf alle cfDNA-Werte.



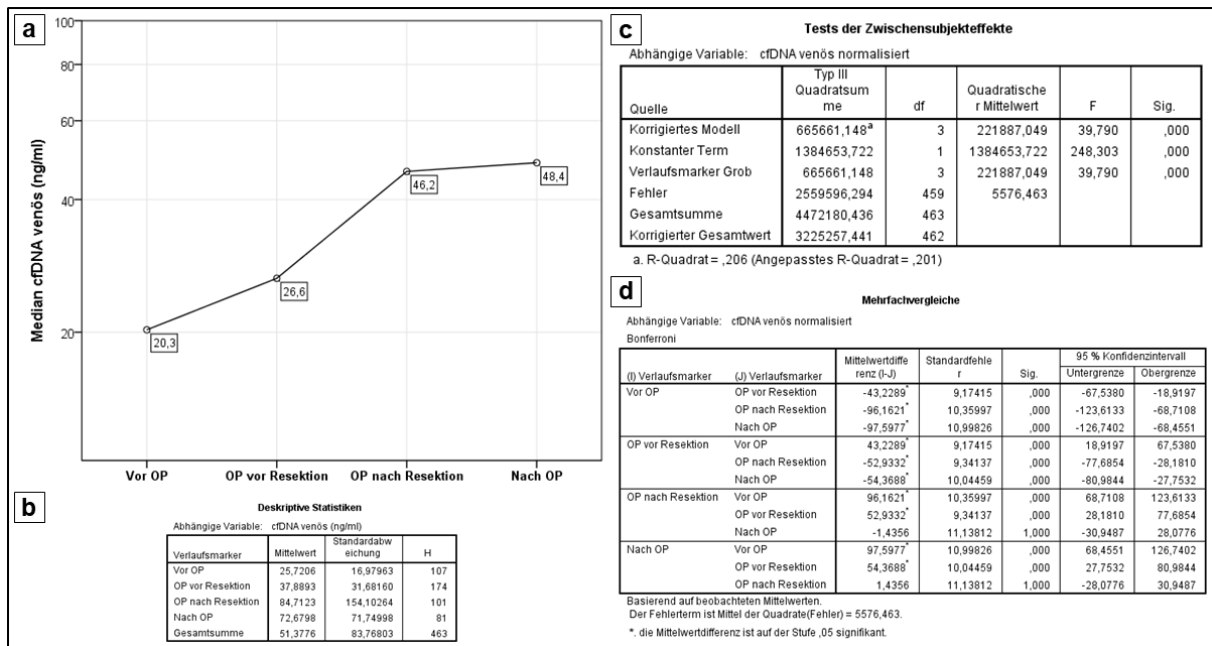
**Abbildung 114** Gruppenunterschiede in der cfDNA-Konzentration

a) Boxplot aller cfDNA-Werte der drei Patientengruppen im Vergleich. Die Asterisken indizieren hochsignifikant höhere Werte der „Plasma mutiert“-Gruppe als der beiden anderen Gruppen. b) Deskriptive Statistik des Vergleichs. Der Mittelwert der „PM“-Gruppe beträgt mehr als das Dreifache der anderen Mittelwerte. c+d) Die Tests der Zwischensubjekteffekte und Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni (beide mit normalisierten Werten) belegen die Aussagen der Graphik.

3.3.3.1.2 Unterscheidung cfDNA nach Verlauf

Nur nach den vier Zeitabschnitten, aber nicht nach Gruppen getrennt, wie in Abbildung 115 dargestellt, ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Werten des Zeitabschnitts tI und allen anderen Zeitabschnitten ( $P = 0,00002$  zu tII,  $P < 10^{-17}$  zu tIII,  $P < 10^{-17}$  zu tIV) sowie von tII zu tIII ( $P = 1,5 \times 10^{-7}$ ) und tIV ( $P < 6 \times 10^{-7}$ , ANOVA, Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni). Somit ist, bezogen auf alle cfDNA-Werte, auch die Zeitabschnittseinteilung ein hochsignifikantes Unterscheidungsmerkmal ( $P < 10^{-22}$ ).

## Ergebnisse



**Abbildung 115** Grobeinteilung des Verlaufs der cfDNA über die OP

Die cfDNA-Konzentrationen sind hier ohne Differenzierung nach Patientengruppen über die vier Zeiträume des gesamten Operationsprozesses der Studie ausgewertet (tl. vor der OP, tII. während der OP, vor der Resektion, tIII. während der OP nach der Resektion, tIV. nach der OP). Pro Zeitabschnitt sind alle cfDNA-Konzentrationen aller Patienten eingeschlossen. a) stellt den Verlauf schematisch als Liniendiagramm dar. Abgebildet ist der Median der gesamt-cfDNA (Y) über die vier Zeitpunkte (X). b) zeigt die zugehörige deskriptive Statistik. Die Ausgangswerte steigen zum OP-Beginn hin an und steigen im OP-Verlauf zu den nach-Resektions-Werten hin noch deutlich stärker weiter an. Die Nach-OP-Werte sind im Median nur geringfügig höher (Abb. a), im Mittelwert sogar niedriger, mit deutlich geringerer Standardabweichung. c+d) zeigen die Tests der Zwischensubjekteffekte und die Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni (beide mit normalisierten Werten). Die zwei einzigen Zeitpunkte, deren Werte sich nicht signifikant voneinander unterscheiden, sind tIII und tIV.

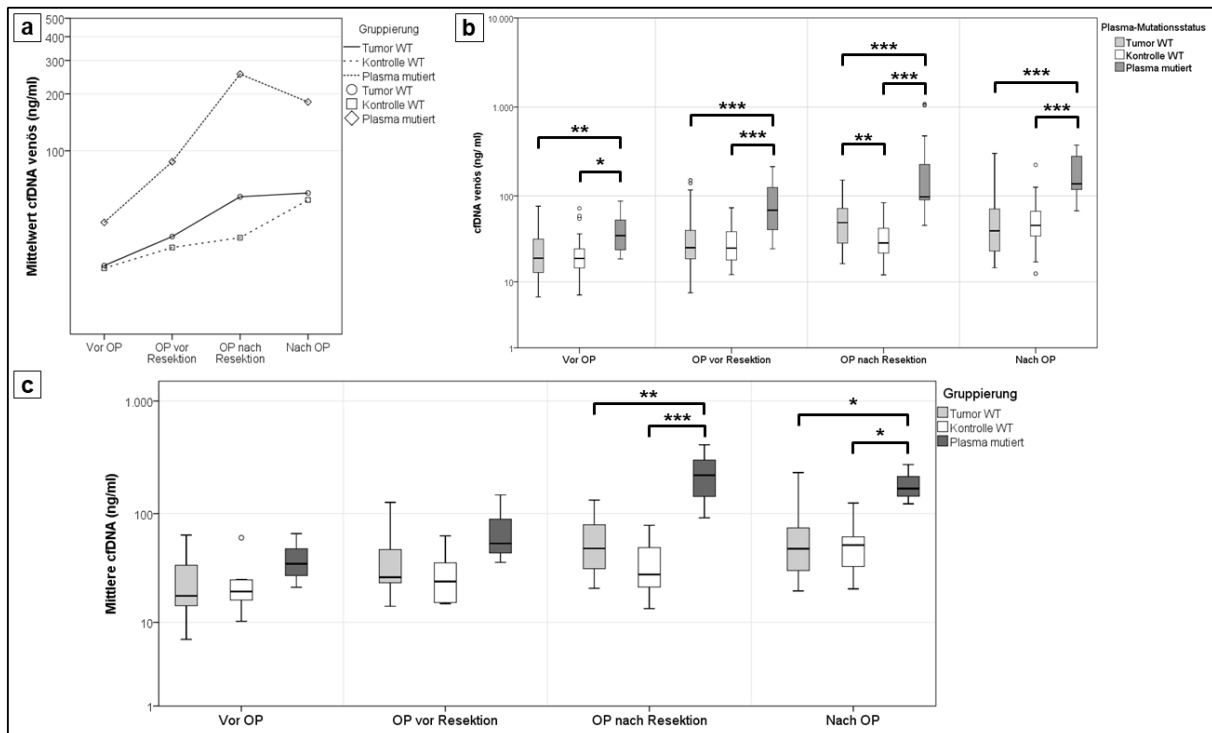
### 3.3.3.1.3 Unterschiede der cfDNA-Konzentrationen zwischen den Gruppierungen in verschiedenen Zeitabschnitten

Zu jedem der vier Zeitabschnitte wurden zusätzlich separat die Varianzen der cfDNA-Konzentrationen der drei Patientengruppen untersucht (Abb. 116b). Unter Einbezug aller gemessenen Konzentrationen war die Gruppierung an jedem der Zeitabschnitte ein signifikantes Unterscheidungskriterium für die cfDNA-Konzentration (tl:  $P = 0,008$ ; tII:  $P = 0,000001$ ; tIII:  $P = 1,5 \times 10^{-12}$ ; tIV:  $P = 0,00002$ , ANOVA, Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni). An Zeitabschnitt tl unterschied sich die PM- von der TW-gruppe ( $P = 0,007$ ) und von der KW-Gruppe signifikant ( $P = 0,014$ ), an Zeitabschnitt tII ebenfalls (jeweils  $P = 0,000002$ ). An Zeitabschnitt tIII unterschieden sich alle Gruppen signifikant voneinander (TW vs. KW:  $P = 0,001$ ; PM vs. TW:  $P < 10^{-6}$ ; TW vs. KW:  $P < 10^{-12}$ ). An Zeitabschnitt tIV unterschieden sich wieder nur Gruppe PM von TW ( $P = 0,000024$ ) und PM von KW ( $P = 0,00004$ ).

Um Unterschiede zwischen den Patienten bezüglich Ausreißern einzelner Messwerte und Anzahl der abgenommenen Proben auszuklammern, wurden die gleichen Auswertungen mit den Mittelwerten der Patienten der einzelnen Zeitabschnitte (siehe Abschnitt 3.3.3.1) wiederholt

## Ergebnisse

(Abb. 116c). Jetzt stellte die Gruppierung der Patienten zu den ersten beiden Zeitabschnitten kein signifikantes Unterscheidungsmerkmal für die cfDNA-Konzentration mehr dar (tI:  $P = 0,25$ ; tII:  $P = 0,056$ ), zu den Zeitabschnitten tIII ( $P = 0,0003$ ) und tIV ( $P = 0,016$ ) jedoch schon (ANOVA, Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni). Zu den beiden letzten Zeitabschnitten unterschieden sich jeweils die Werte der PM-Gruppe signifikant von denen der beiden WT-Gruppen (tIII: PM vs. TW:  $P = 0,003$  und PM vs. KW:  $P = 0,0002$ ; tIV: PM vs. TW und PM vs. KW je  $P = 0,02$ ). Die Verwendung der Mittelwerte zeigte somit, dass vor allem zu den beiden früheren Zeitpunkten entweder die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen durch individuelle Einflüsse herbeigeführt worden war oder aber nach Mittelung der Werte die kleineren Fallzahlen nicht mehr für signifikante Unterschiede ausreichten. Gleichzeitig bestätigt sie die signifikanten Unterschiede zwischen den cfDNA-Konzentrationen der PM-Gruppe und der beiden WT-Gruppen in den Zeitabschnitten nach der Resektion und nach der OP.



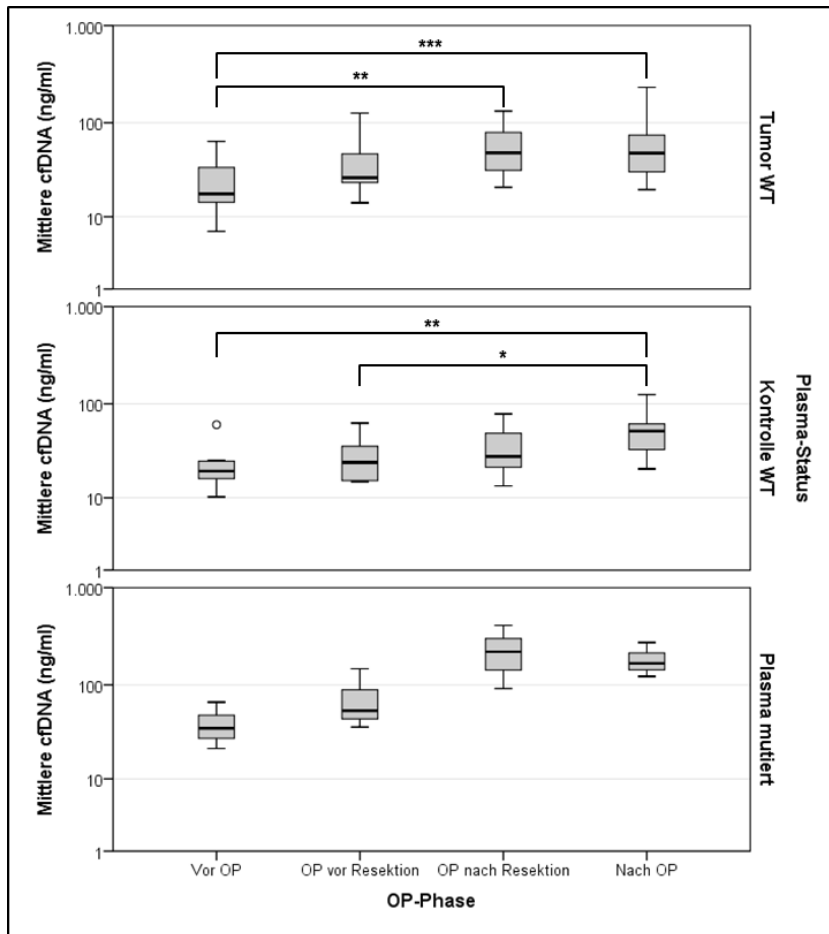
**Abbildung 116** Unterteilung der cfDNA-Werte der OP-Studie nach Gruppierung und Zeiteinteilung.

a) zeigt die Entwicklung der cfDNA-Konzentrationen der drei Untergruppen im Mittelwert (Y) über die vier Zeitabschnitte (X) hinweg als Liniendiagramm. Es zeigt sich, dass die mittleren cfDNA-Konzentrationen der PM-Gruppe die der beiden anderen Gruppen zu jedem Zeitpunkt deutlich übertreffen. Die Werte der beiden anderen Gruppen liegen zu den meisten Zeitpunkten beinahe gleichauf. Zu Zeitabschnitt tIII steigen jedoch die cfDNA-Konzentrationen der Tumorgruppe deutlich stärker an als die der Kontrollgruppe. Diese steigen hingegen nach der Operation stärker an, sodass sich die post-OP-Werte wieder kaum unterscheiden.

Diese Unterteilung ist als Boxplot für alle Werte in Abbildung b) und für die nach Zeitabschnitten gemittelten cfDNA-Konzentrationen der einzelnen Patienten für die vier Zeitabschnitte in Abbildung c) gezeigt. Bei der Auswertung aller cfDNA-Konzentrationen (b) lagen die Werte der PM-Gruppe zu jedem Zeitpunkt signifikant über denen der beiden anderen Gruppen, während sich diese nur zum Zeitabschnitt tIII nach der Resektion signifikant unterschieden. Nach einer Reduzierung auf die Mittelwerte der Patienten zu den einzelnen Zeitabschnitten (c) lag die ctDNA-positive Gruppe nur noch zu den Zeitpunkten tIII und tIV signifikant über den beiden anderen Gruppen, welche sich zu keinem Zeitpunkt mehr signifikant unterschieden.

### 3.3.3.1.4 Unterscheidung mittlerer cfDNA der Gruppen im Verlauf

Nach der Analyse der Gruppenunterschiede zu den einzelnen Zeitpunkten wurden umgekehrt auch die Unterschiede der Entwicklungen der individuell gemittelten cfDNA-Konzentrationen der einzelnen Gruppen über den Operationsverlauf hinweg analysiert (Abb. 117). Daher wurde für jede der drei Gruppen einzeln die Entwicklung der mittleren cfDNA-Konzentrationen über die vier Zeitabschnitte statistisch ausgewertet.



**Abbildung 117** Entwicklungen der individuellen cfDNA-Mittelwerte der einzelnen Gruppen, unterteilt nach den drei Patientengruppen der OP-Studie. Gezeigt sind die individuell gemittelten cfDNA-Konzentrationen (Y) über die vier Phasen des Operationsverlaufs hinweg. Die drei Patientengruppen sind hierbei getrennt dargestellt. In der TW-Gruppe unterscheidet sich Phase tI signifikant von den Phasen tIII und tIV. In der KW-Gruppe unterscheiden sich die Phasen tI und tIII signifikant von Phase tIV. Die Unterschiede zwischen den Phasen in der PM-Gruppe sind deutlich zu sehen aber aufgrund der geringen Fallzahlen nicht signifikant.

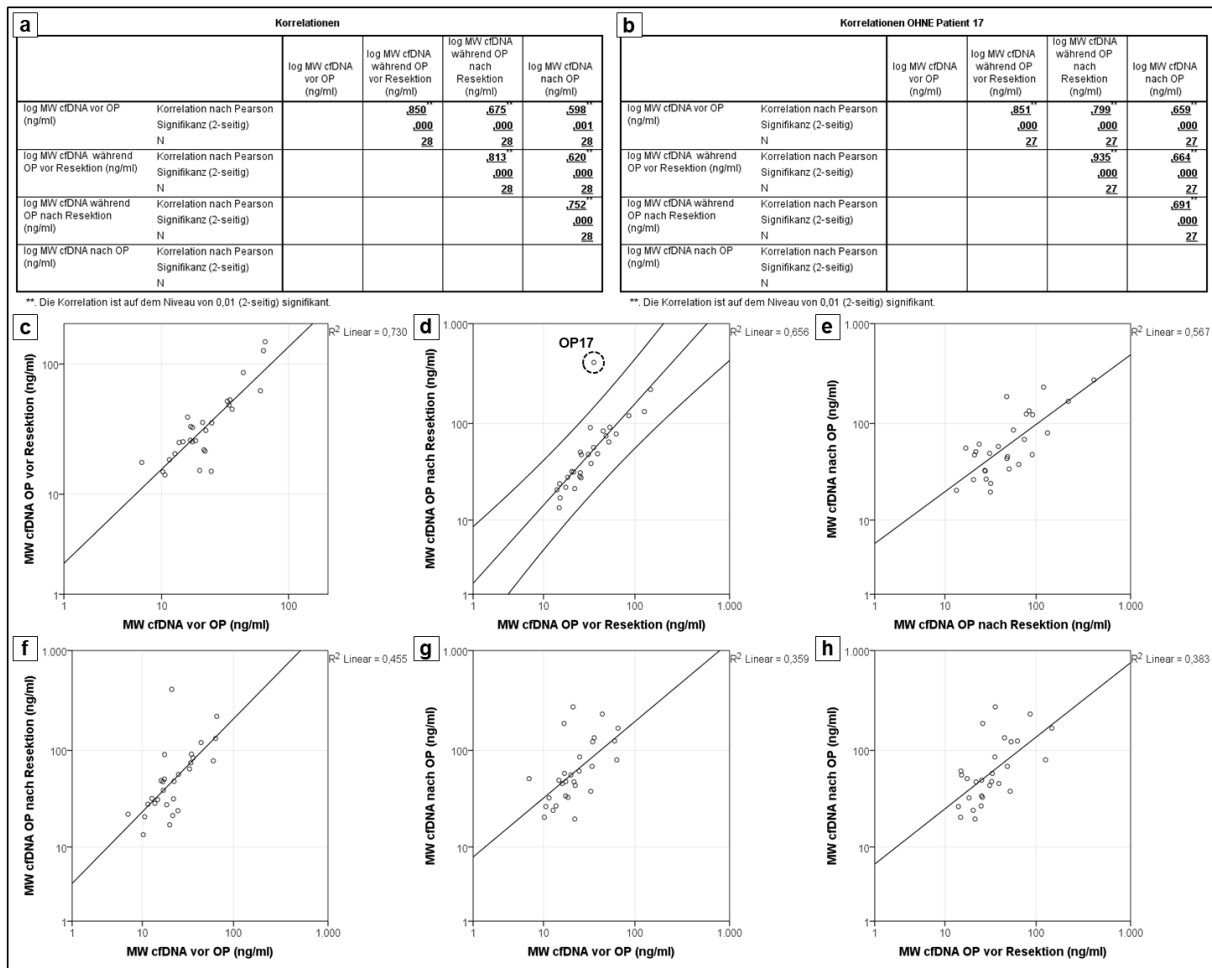
Die Ergebnisse der drei Gruppen sind jedoch aufgrund der sehr unterschiedlichen Gruppengrößen nicht direkt vergleichbar. So wurden für die TW-Gruppe pro Zeitabschnitt 15 Werte ausgewertet, für die KW-Gruppe 10 und für die PM-Gruppe nur 3. Dennoch war der OP-Verlauf in den vier Zeitabschnitten in allen drei Gruppen ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal der cfDNA-Mittelwerte (TW:  $P = 0,0004$ ; KW:  $P = 0,002$ ; PM:  $P = 0,029$ , ANOVA, Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni). In der TW-Gruppe unterschieden sich die cfDNA-Konzentrationen des Zeitabschnitts tI signifikant von denen der Abschnitte tIII ( $P = 0,002$ ) und tIV ( $P = 0,001$ ). In der Gruppe KW unterschieden sich die cfDNA-Konzentrationen der Zeitabschnitte tI und tIII signifikant von denen des Zeitabschnitts tIV (tI vs. tIV:  $P = 0,002$ ; tIII vs. tIV:  $P = 0,03$ ). Die Unterschiede dieser beiden Gruppen sind auch in Abbildung 116a graphisch veranschaulicht:

Die Anstiege der cfDNA-Konzentrationen der WT-Tumorpatienten waren am größten während der OP nach der Tumorresektion und nahmen danach kaum noch zu oder gingen sogar eher zurück. Die Anstiege der cfDNA-Konzentrationen in der WT-Kontrollgruppe hingegen waren am größten nach Ende der Operation. In der Gruppe der Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Plasma unterschieden sich die Zeitabschnitte untereinander nicht signifikant, wenn auch Tendenzen bei den Unterscheidungen zwischen den Zeitabschnitten tI und tIII ( $P = 0,062$ ) und tI und tIV ( $P = 0,091$ ) zu erkennen waren (Abb. 117). Dass diese Unterscheidungen statistisch nicht signifikant waren, ist auf die kleine Fallzahl zurückzuführen.

### 3.3.3.1.5 Unterscheidung cfDNA – Korrelationen innerhalb der Zeitabschnitte

Zusätzlich wurde individuelle Schwankungen der cfDNA-Konzentrationen über den Operationsverlauf hinweg überprüft, also ob die Entwicklungen der cfDNA-Konzentrationen einzelner Patienten über die vier OP-Phasen hinweg kontinuierlich waren. Hierfür wurden die individuell gemittelten cfDNA-Konzentrationen der vier Zeitabschnitte untereinander korreliert (Abb. 118). Alle Korrelationen waren signifikant (Abb. 118a), was belegt, dass die Entwicklungen cfDNA-Konzentrationen über die gesamte OP-Phase hinweg individuell relativ kontinuierlich waren. Insbesondere die aufeinanderfolgenden Zeitabschnitte tI und tII (Abb. 115c) sowie tII und tIII (Abb. 115d) korrelierten stark. Die Korrelationen von Zeitabschnitt tIV mit den drei anderen Zeitabschnitten waren die schwächsten. Dies kann einerseits durch höhere Zeitabstände bedingt sein, oder aber durch eine andere Kinetik oder Steuerung der cfDNA-Freisetzung. Einzig Patient OP17 zeigte zum Zeitabschnitt tIII eine abweichend hohe cfDNA-Konzentration (Abb. 118d), die vermutlich auf eine zusätzlich in diesem Zeitabschnitt durchgeführte Leberteilresektion zurückzuführen ist. Eine Korrelationsanalyse unter Ausschluss von Patient OP17 zeigte verbesserte Werte in Korrelationen mit tIII aber gleiche oder schwächere Werte in den anderen Vergleichen (Abb. 118b).

# Ergebnisse



**Abbildung 118** Korrelationen der individuell gemittelten cfDNA-Konzentrationen der vier OP-Phasen.

a) zeigt die Auswertung der sechs Korrelationen zwischen allen vier Zeitabschnitten. Alle Korrelationen sind hochsignifikant, die jeweils aufeinander folgenden Zeitabschnitte zeigen höhere Übereinstimmungen als weiter voneinander entfernte. Die höchsten Übereinstimmungen zeigen sich zwischen Phasen tI und tII sowie tII und tIII. b) aufgrund der hohen Abweichung des nach-Resektions-Wertes von Patient OP17 aufgrund der starken cfDNA-Anstiege nach der Leberteilresektion während der Operation wurden die Korrelationen erneut ohne OP17 durchgeführt. Die Übereinstimmungen dieses Vergleichs lagen in den meisten Fällen noch höher, insbesondere die Korrelation der Zeitabschnitte tII und tIII während der Operation. Die Abbildungen c-h stellen die einzelnen Korrelationen graphisch dar. Die schwächsten Korrelationen sind die des Zeitabschnitts tIV mit den drei anderen Zeitabschnitten.

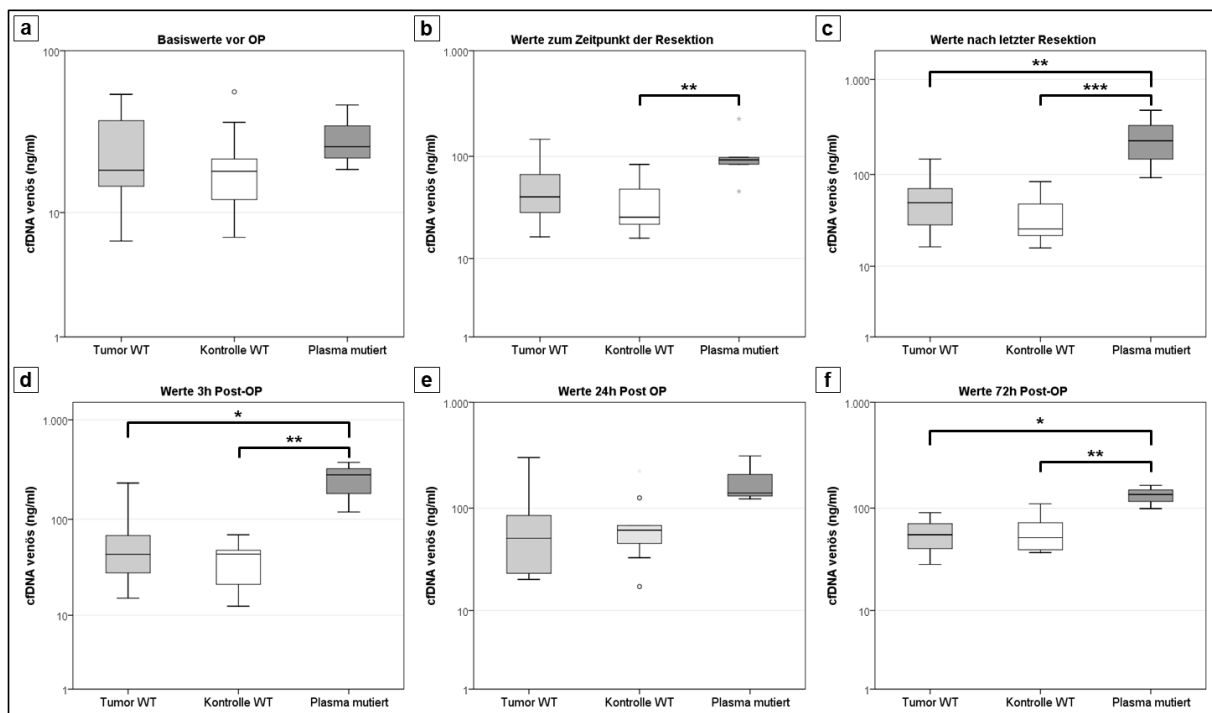
### 3.3.3.1.6 Unterscheidung cfDNA nach Gruppierung an Zeitpunkten

Um die Unterschiede zwischen den Patientengruppen während der Operationsphasen noch weiter zu präzisieren, wurden die cfDNA-Konzentrationen der drei Gruppen zu fixen Einzelzeitpunkten der Operationsphase verglichen (Abb. 119). Diese Zeitpunkte waren vor OP, direkt nach Resektion, im Falle mehrerer Teilresektionen nach der letzten Resektion, sowie 3, 24 und 72 Stunden nach Operationsende.

Die Basiswerte der drei Gruppen unterschieden sich am Tag vor der Operation nicht signifikant, die cfDNA-Konzentrationen der PM-Gruppe lagen jedoch mit 30,7 ng/ml (Stabw. 14,6 ng/ml) im Durchschnitt über denen der TW-Gruppe (25,3 ng/ml, Stabw. 15,4 ng/ml) und der KW-Gruppe (21,4 ng/ml, Stabw. 15,1 ng/ml). Hierbei unterschieden sich die *KRAS*-mutierten

## Ergebnisse

Patienten und die Patienten mit Kolontumor, welche durchschnittlich bei etwa 30 ng/ml lagen von den Kontrollpatienten und den Patienten mit Rektumtumor, welche im Durchschnitt etwa bei 21 ng/ml lagen, wobei sich die Streuungen nicht unterschieden. Da die Unterteilungen zwischen den Kolon- und den Rektumpatienten im weiteren Verlauf nicht voneinander abwichen, wurde hier im Folgenden nicht mehr unterschieden. Die Gruppierung war ein statistisch signifikantes Unterscheidungsmerkmal zu den Zeitpunkten der 1. Resektion ( $P = 0,006$ ), der letzten Resektion ( $P = 0,001$ ) sowie 3 Stunden ( $P = 0,005$ ) und 72 Stunden ( $P = 0,012$ ) nach Operationsende (ANOVA, Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni). Die Unterscheidung zwischen erster und letzter Resektion wurde nur in einzelnen Fällen getroffen, wenn die Resektion sich entweder über einen längeren Zeitraum mit mehreren Blutabnahmen erstreckte oder in mehreren Teilschritten durchgeführt wurde. Die Fallproben dieser beiden Zeitpunkte sind daher größtenteils identisch.



**Abbildung 119** Gruppenunterschiede der cfDNA zu Einzelzeitpunkten der Operation.

Die cfDNA-Konzentrationen zwischen den drei Patientengruppen zu sechs einzelnen Zeitpunkten der OP-Phase im Vergleich. a) Basiswerte vom Tag vor der Operation. Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. b) cfDNA-Konzentrationen zum Zeitpunkt der Resektion – hier zu Beginn der Resektion. In den meisten Fällen wurde nur eine Probe direkt nach der Resektion abgenommen, in einigen Fällen dauerte die Resektion entweder länger oder wurde in mehrere Resektionen unterteilt, so dass mehrere Resektionszeitpunkte entstanden. Nach der ersten Resektionsprobe unterschieden sich die cfDNA-Konzentrationen der PM-Gruppe signifikant von denen der KW-Gruppe. c) zeigt den Vergleich zum Zeitpunkt der letzten Resektion, welche zumeist mit dem der ersten Resektion identisch ist. Hier unterscheiden sich die cfDNA-Konzentrationen der PM-Gruppe zusätzlich signifikant von denen der TW-Gruppe. Die PM-Gruppe unterschied sich auch signifikant von den beiden anderen Gruppen zu den Zeitpunkten 3 Stunden (d) und 72 Stunden (f) nach OP-Ende. Zu dem dazwischenliegenden Zeitpunkt 24 Stunden nach OP-Ende unterschieden sich die drei Gruppen hingegen nicht signifikant. Die cfDNA-Konzentrationen der TW- und die KW-Gruppe unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant.



Die Basiswerte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Zum Zeitpunkt der 1. Resektion unterschieden sich die PM- und die KW-Gruppe ( $P = 0,005$ ; PM: MW 109,5 ng/ml, Stabw. 68,7 ng/ml; KW: MW 35,5 ng/ml, Stabw. 21,9 ng/ml). Zum Zeitpunkt der letzten Resektion unterschieden sich die PM- und die TW-Gruppe ( $P = 0,009$ ; PM: MW 264,6 ng/ml, Stabw. 193,7 ng/ml; TW: MW 56 ng/ml, Stabw. 35,2 ng/ml) sowie die PM- und die KW-Gruppe ( $P = 0,001$ ; KW: MW 35,5 ng/ml, Stabw. 21,9 ng/ml). Zwischen den beiden Zeitpunkten stiegen folglich insbesondere die cfDNA-Konzentrationen in der PM-Gruppe stark weiter an. Zum Zeitpunkt 3 h post-OP unterschied sich die *KRAS*-mutierte Gruppe ebenfalls signifikant von beiden WT-Gruppen (PM vs. TW:  $P = 0,014$ ; PM vs. KW:  $P = 0,004$ ; PM: MW 257,3 ng/ml, Stabw. 129,3 ng/ml; TW: MW 61,9 ng/ml, Stabw. 58,2 ng/ml; KW: MW 39,5 ng/ml, Stabw. 17,2 ng/ml). Zum Zeitpunkt 24 h post-OP unterschieden sich die Gruppen interessanterweise nicht signifikant voneinander, da hier die beiden WT-Gruppen ihre Maxima erreichten ( $P = 0,079$ ; PM: MW 191,2 ng/ml, Stabw. 104,9 ng/ml; TW: MW 75,3 ng/ml, Stabw. 79,5 ng/ml; KW: MW 77,4 ng/ml, Stabw. 62,6 ng/ml). Zum Zeitpunkt 72 h post-OP unterschied sich die PM-Gruppe wieder signifikant von den beiden WT-Gruppen, da die Standardabweichungen deutlich niedriger lagen als 24 h post-OP (PM vs. TW:  $P = 0,018$ ; PM vs. KW:  $P = 0,018$ ; PM: MW 132,8 ng/ml, Stabw. 32,8 ng/ml; TW: MW 57,1 ng/ml, Stabw. 21,7 ng/ml; KW: MW 60 ng/ml, Stabw. 25,4 ng/ml). Die Werte beider WT-Gruppen erreichten ihre Maxima 24 h post-OP, die der PM-Gruppe bereits während der Operation oder kurz danach. Alle Analysen waren ANOVAs mit Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni.

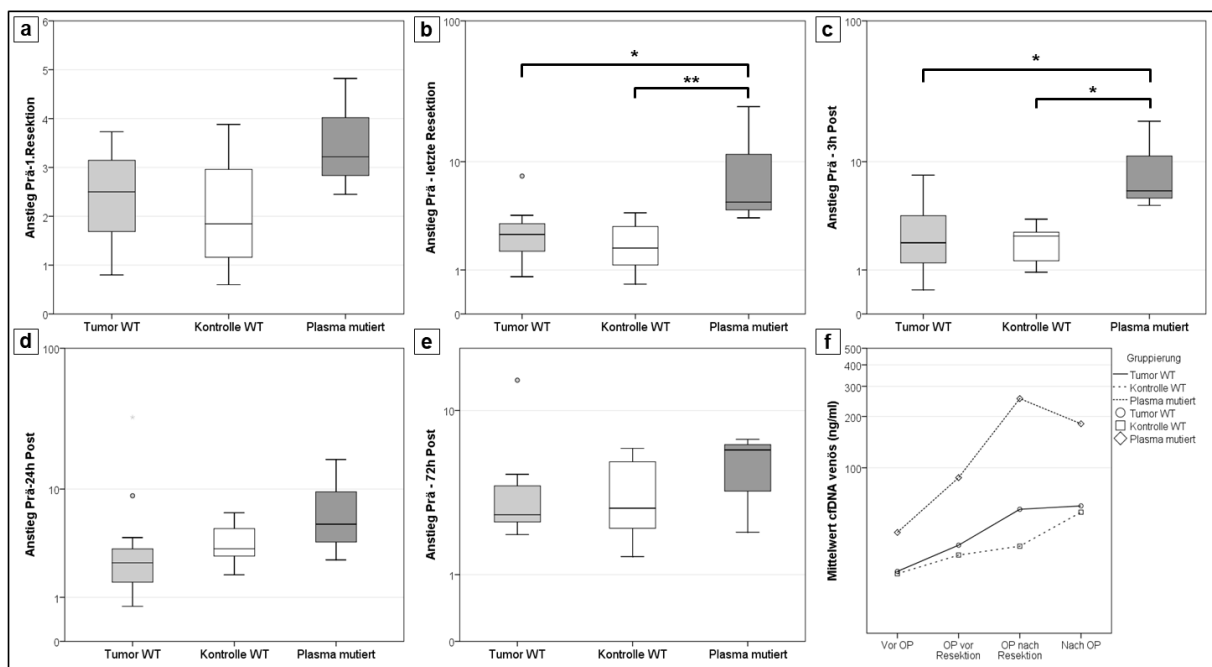
### 3.3.3.1.7 Unterscheidung cfDNA-Anstiege

Zuletzt wurden noch die Anstiege der cfDNA-Konzentrationen über den OP-Verlauf von den Abnahmen vor Operation bis zu verschiedenen einzelnen Zeitpunkten als Mehrfache der Ausgangskonzentrationen berechnet und zwischen den drei Gruppen verglichen. Durch diese Vergleiche wurden die höheren Basiswerte der PM-Gruppe egalisiert und die Analyse wurde auf die Entwicklungen beschränkt. Aus Konzentrationen wurden demnach dynamische Werte generiert.

Die Anstiege der PM-Gruppe waren zu jedem analysierten Zeitpunkt höher als die der WT-Gruppen, jedoch war die Gruppierung nur zu den Zeitpunkten nach der letzten Resektion ( $P = 0,006$ ) und 3 h post-OP ( $P = 0,011$ ) ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal. In beiden Fällen lagen die Anstiege der PM-Gruppe signifikant über denen der WT-Gruppen (letzte Resektion: PM vs. TW:  $P = 0,018$ ; PM vs. KW: 0,005; PM: MW 11,2, Stabw. 12,1; TW: MW 2,7, Stabw 1,7; KW: MW 2, Stabw 1,1; 3 h post-OP: PM vs. TW:  $P = 0,014$ ; PM vs. KW: 0,012; PM: MW 10,1, Stabw. 8,4; TW: MW 2,8, Stabw 2,1; KW: MW 2,2, Stabw 0,8, ANOVA mit Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni). Die beiden WT-Gruppen unterschieden sich in ihren Anstiegen zu keinem Zeitpunkt. Dies unterstreicht die Beobachtung, dass die cfDNA-Konzentrationen

der *KRAS*-mutierten Patienten stärker im OP-Verlauf anstiegen als die der WT-Gruppen, aber im post-OP-Verlauf nicht in gleichem Maße weiter anstiegen, sondern eher stagnierten, während die cfDNA-Konzentrationen der WT-Gruppen in diesem Zeitraum im Durchschnitt weiter anstiegen.

Im Vergleich der Mittelwerte der gemittelten cfDNA-Konzentrationen zu den vier Zeitabschnitten (Abb. 120f) zeigt sich, dass die Verläufe der PM-Gruppe und der TW-Gruppe sich ähnlicher sind, obwohl die Werte der TW-Gruppe eher der Kontrollgruppe entsprechen. Die cfDNA-Konzentrationen der PM-Gruppe und TW-Gruppe steigen beide über den OP-Verlauf stärker an und weniger im post-OP-Prozess, die der Kontrollgruppe steigen am stärksten nach Ende der Operation an.



**Abbildung 120** Vergleiche der cfDNA-Anstiege über den Operationszeitraum im Gruppenvergleich

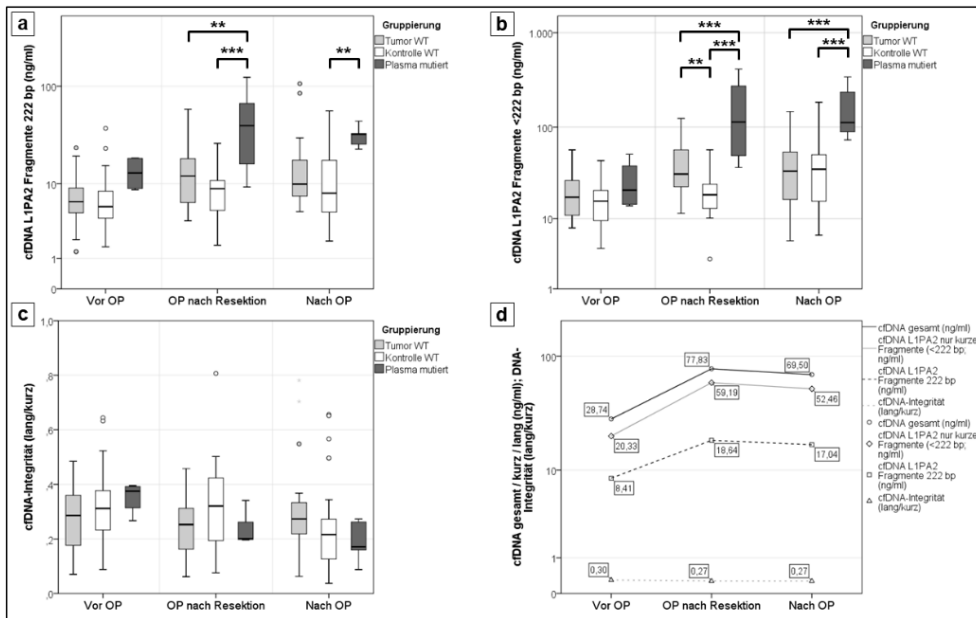
Die Anstiege der cfDNA-Konzentrationen zwischen den Basiswerten und verschiedenen späteren Zeitpunkten ist für jeden einzelnen Zeitpunkt separat für alle drei Gruppen getrennt dargestellt. a) bis zur 1. Resektion, b) bis zur letzten Resektion, c) bis 3 h post-OP, d) bis 24 h post-OP, e) bis 72 h post-OP. f) zeigt die Verläufe der drei Gruppen über die grob eingeteilten OP-Phasen im Mittelwert der individuell gemittelten Einzelwerte.

Die Anstiege der PM-Gruppe waren zu jedem Zeitpunkt höher als die der WT-Gruppen, aber nur zu den Zeitpunkten der letzten Resektion (b) und 3 h post-OP (c) statistisch signifikant höher.

### 3.3.3.2 DNA-Integrität

Die DNA-Integrität berechnet sich als Quotient aus der Konzentration der langen cfDNA-Fragmente, in diesem Fall alle Fragmente einer Länge über 222 bp, durch die Summe aller gemessenen cfDNA-Fragmente, in diesem Fall mindestens 90 bp. Die beiden Fragmente wurden in der L1PA2-qPCR direkt im Plasma gemessen (siehe Abschnitt 2.2.3.5.2). Zusätzlich wurde

auch aus der Differenz der Konzentration der 90-bp-Fragmente abzüglich der 222-bp-Fragmente die Konzentration der kurzen Fragmente berechnet. Somit konnten die Konzentrationen kurzer (maximal mononukleosomal) und langer Fragmente sowie deren Quotient (DNA-Integrität) untereinander und mit der Gesamtkonzentration verglichen werden.



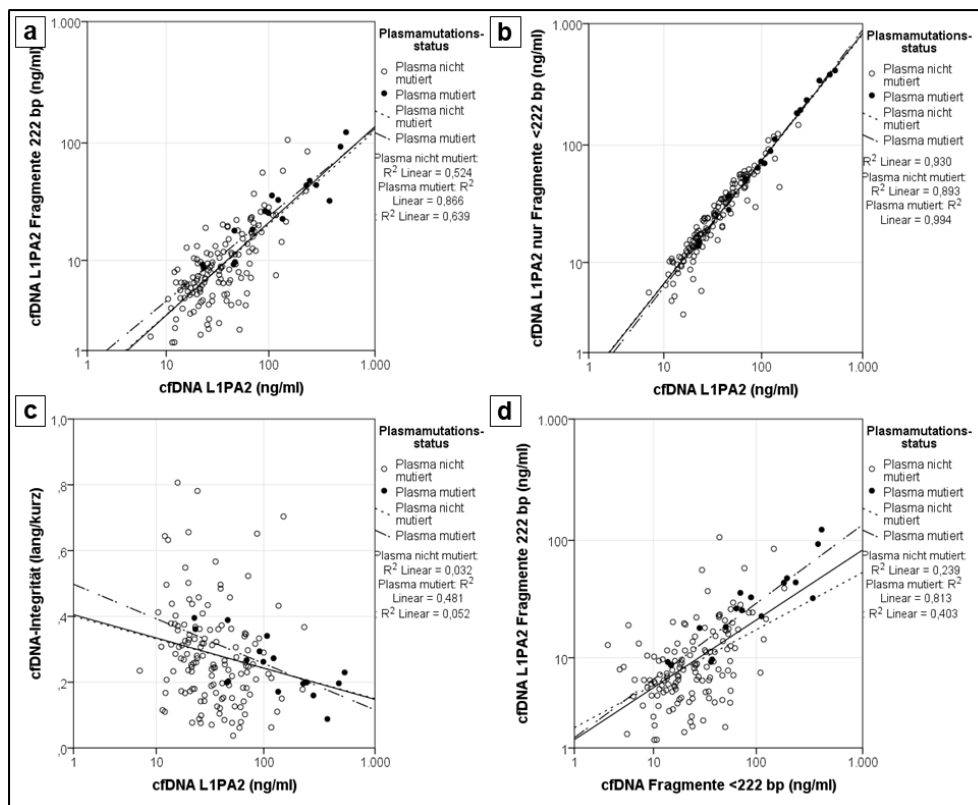
**Abbildung 121** OP-Verlauf und DNA-Integrität  
a) Die Konzentrationen der langen cfDNA-Fragmente der drei Patientengruppen über den OP-Verlauf im Boxplot. Die Werte steigen im OP-Verlauf an und stagnieren dann im postoperativen Verlauf weitgehend. Die Gruppen unterschieden sich signifikant nach der Resektion und nach Ende der

Operation. b) Die Konzentrationen nur der kurzen cfDNA-Fragmente der drei Patientengruppen im OP-Verlauf als Boxplot. Die Werte steigen im OP-Verlauf an und stagnieren dann im postoperativen Verlauf für die TW und PM-Gruppe, steigen in der KW-Gruppe aber weiter an. Die Gruppen unterschieden sich signifikant nach der Resektion und nach Ende der Operation. c) Die cfDNA-Integrität der drei Patientengruppen über den OP-Verlauf im Boxplot. Die Werte der TW-Gruppe sind weitgehend konstant über den OP-Verlauf, die der beiden anderen Gruppen sinken leicht ab. Keine Unterschiede zwischen den Gruppen sind signifikant. d) Die Konzentrationen der beiden cfDNA-Unterfraktionen (kurz und lang) verändern sich gleich im OP-Verlauf. Die cfDNA-Integrität ist konstant.

Die cfDNA-Konzentrationen in den beiden unterschiedlichen Fragmentlängen entwickelten sich über den Operationsverlauf gleichmäßig, wobei die DNA-Integrität leicht abfiel (Abb. 121). Sowohl bei den langen als auch bei den kurzen Fragmenten lagen die Konzentrationen der Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Plasma im Schnitt jederzeit über denen der anderen Gruppen. Signifikante Unterschiede für die langen Fragmente fanden sich während der Operation nach der Resektion (PM vs. TW:  $P = 0,003$ ; PM vs. KW:  $0,00008$ ; PM: MW 48,9, Stabw. 40,  $n = 8$ ; TW: MW 14,3, Stabw 12,3,  $n = 22$ ; KW: MW 8,8, Stabw 6,1,  $n = 15$ ) und nach Ende der Operation (PM vs. TW:  $P = 0,06$  (nicht signifikant); PM vs. KW:  $0,006$ ; PM: MW 32, Stabw. 8,4,  $n = 5$ ; TW: MW 18,4, Stabw 23,8,  $n = 26$ ; KW: MW 12,8, Stabw 12,6,  $n = 26$ ). Für die kurzen Fragmente separat fanden sich ebenfalls signifikante Unterschiede während der Operation nach der Resektion, hier sogar zwischen allen Gruppen (PM vs. TW:  $P = 0,001$ ; PM vs. KW:  $5,6 \times 10^{-7}$ ; TW vs. KW:  $P = 0,007$ ; PM: MW 172,6, Stabw. 151,2,  $n = 8$ ; TW: MW 44,9, Stabw 31,2,  $n = 22$ ; KW: MW 19,7, Stabw 12,3,  $n = 15$ ) und nach Ende der Operation (PM vs. TW:  $P = 0,001$ ; PM vs. KW:  $0,001$ ; PM: MW 170,1, Stabw. 114,8,  $n = 5$ ; TW: MW 41,3, Stabw 33,2,

n = 26; KW: MW 41, Stabw 35,2, n = 26; jeweils ANOVA mit Post-Hoc-Analyse nach Bonferoni). Die Konzentrationen der unterschiedlichen Fragmente verhalten sich also gleichmäßig, sodass einzelne Analysen mit den Analysen der gesamten cfDNA übereinstimmen (Abschnitt 3.3.3.1 ff). Da die cfDNA-Integrität sich somit kaum verändert, kann nicht darauf geschlossen werden, dass entweder nur kurze oder nur längere Fragmente für die Veränderungen der cfDNA-Konzentrationen verantwortlich sein können, was auch aus Abbildung 121d ersichtlich wird.

Die Gegenüberstellung der einzelnen Konzentrationen zeigt zudem, dass die einzelnen Fraktionen insbesondere in der Gruppe mit *KRAS*-Mutationen im Plasma deutlich miteinander korrelieren (Abb. 122). Bei dieser Gruppe deutet sich auch an, dass sehr hohe cfDNA-Konzentrationen mit einer niedrigen cfDNA-Integrität einhergehen (Abb. 122c).



**Abbildung 122** Korrelationen von kurzen, langen und allen cfDNA-Fragmenten sowie der DNA-Integrität

a) Korrelation der langen Fragmente (Y) mit allen Fragmenten (X). Beide Konzentrationen korrelieren miteinander, die Werte der PM-Gruppe korrelieren besser als die der Gesamtgruppe. b) Korrelation nur der kurzen Fragmente (Y) mit allen Fragmenten (X). Beide Konzentrationen korrelieren sehr gut miteinander, die Werte der PM-Gruppe korrelieren

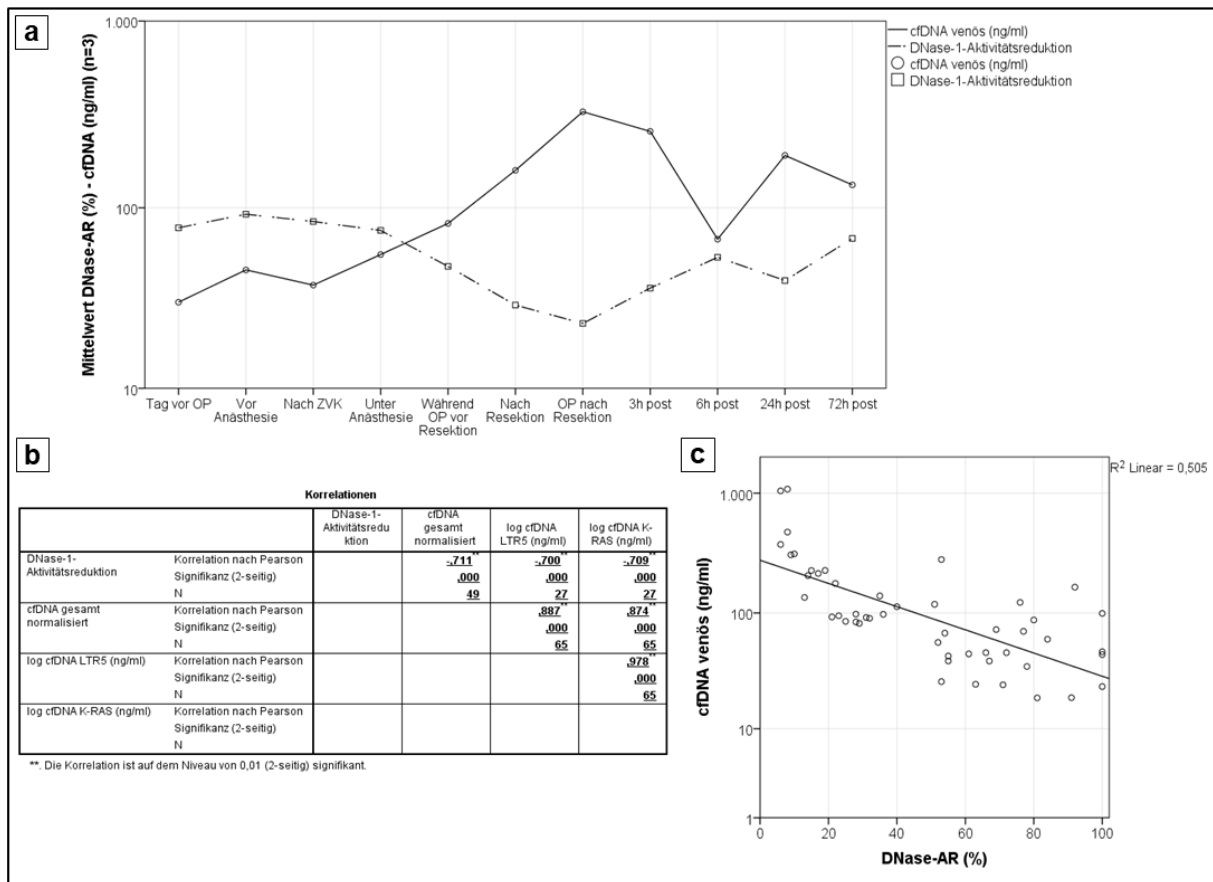
besser als die der Gesamtgruppe. c) Korrelation der cfDNA-Integrität (Y) mit allen Fragmenten (X). Die Werte korrelieren nicht miteinander, wobei für die PM-Gruppe die beiden Werte leicht negativ miteinander korrelieren. d) Korrelation der langen Fragmente (Y) mit nur den kurzen Fragmenten (X). Beide Konzentrationen korrelieren in der Gesamtgruppe und gut innerhalb der PM-Gruppe miteinander, die Werte der Plasma-negativen Teilnehmer korrelieren nicht.

### 3.3.4 DNase-1-Aktivitätsreduktion

In den Plasmaproben, für die ctDNA-Analysen und Quantifizierungen der isolierten cfDNA durchgeführt wurden, wurde auch die DNase-1-Aktivitätsreduktion (DNase-AR) bestimmt.

## Ergebnisse

Diese gibt in einem Prozentwert an, wie stark die DNase-1-Aktivität herunterreguliert ist. Eine hohe DNase-AR bedeutet also eine niedrige Aktivität der DNase-1.

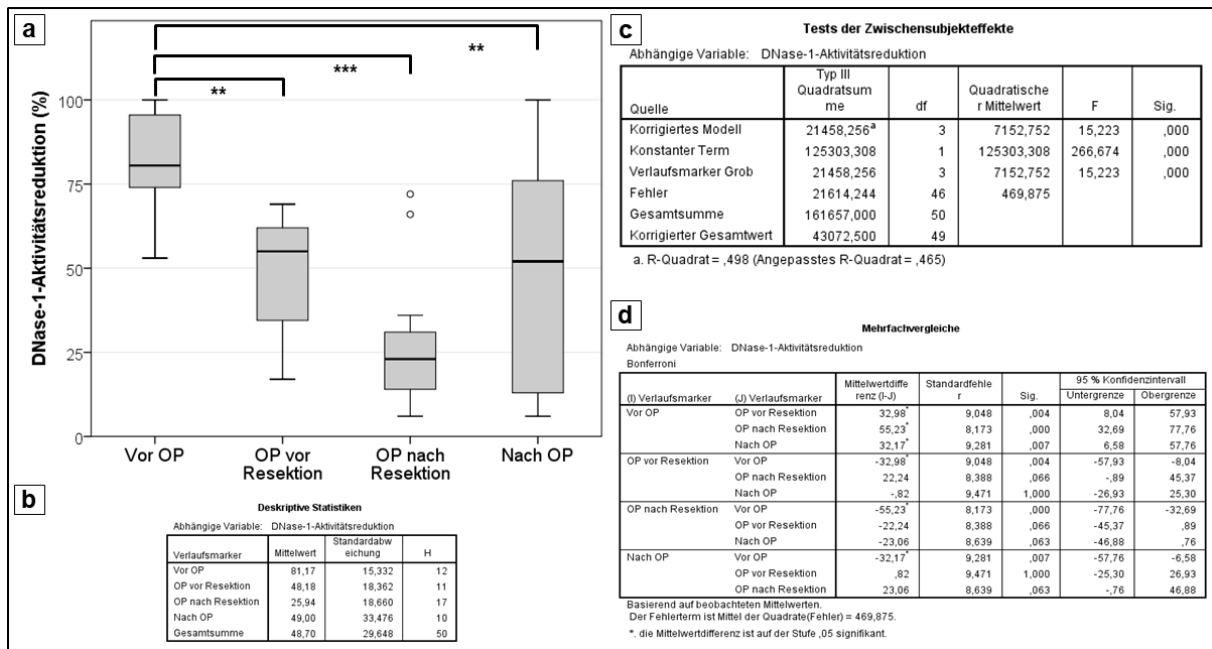


**Abbildung 123** Verläufe und Korrelationen DNase-AR

a) Die gemittelten DNase-AR-Werte der drei Patienten mit mutierter *KRAS*-ctDNA zusammen mit den cfDNA-Konzentrationen im Operationsverlauf dargestellt. Die Verläufe sind gegenläufig – bei einer Steigung der cfDNA sinkt gleichzeitig die DNase-AR ab. b) bestätigt die gegenläufige Korrelation der DNase-AR mit der cfDNA, hier am Beispiel aller Messwerte der drei Methoden für die Quantifizierung der gesamt-cfDNA – L1PA2, LTR5, *KRAS*-Std (oberste Reihe). c) Korrelation der DNase-AR-Werte mit den L1PA2-cfDNA-Konzentrationen. Es ist eine deutliche negative Korrelation erkennbar. Dieser Zusammenhang ist am deutlichsten bei sehr niedriger DNase-AR und am geringsten bei sehr hoher DNase-AR.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass sich die DNase-AR der cfDNA-Konzentration gegenüber gegenläufig verhält, also negativ mit dieser korreliert (Abb. 123). Diese negativen Korrelationen waren sowohl für die L1PA2-Direktmessungen des Plasmas, als auch für die qPCR-Messungen der isolierten cfDNA signifikant (L1PA2:  $\rho = -0,771$ ,  $P = 10^{-8}$ ,  $n = 49$ ; LTR5:  $\rho = -0,7$ ,  $P = 0,00005$ ,  $n = 27$ ; KRAS:  $\rho = -0,709$ ,  $P = 0,000035$ ,  $n = 27$ , Korrelationen nach Pearson). Entgegengesetzt der cfDNA sank die DNase-AR folglich über den Operationsverlauf ab (Abb. 124), sodass die DNase-Aktivität im Laufe der Operation anstieg.

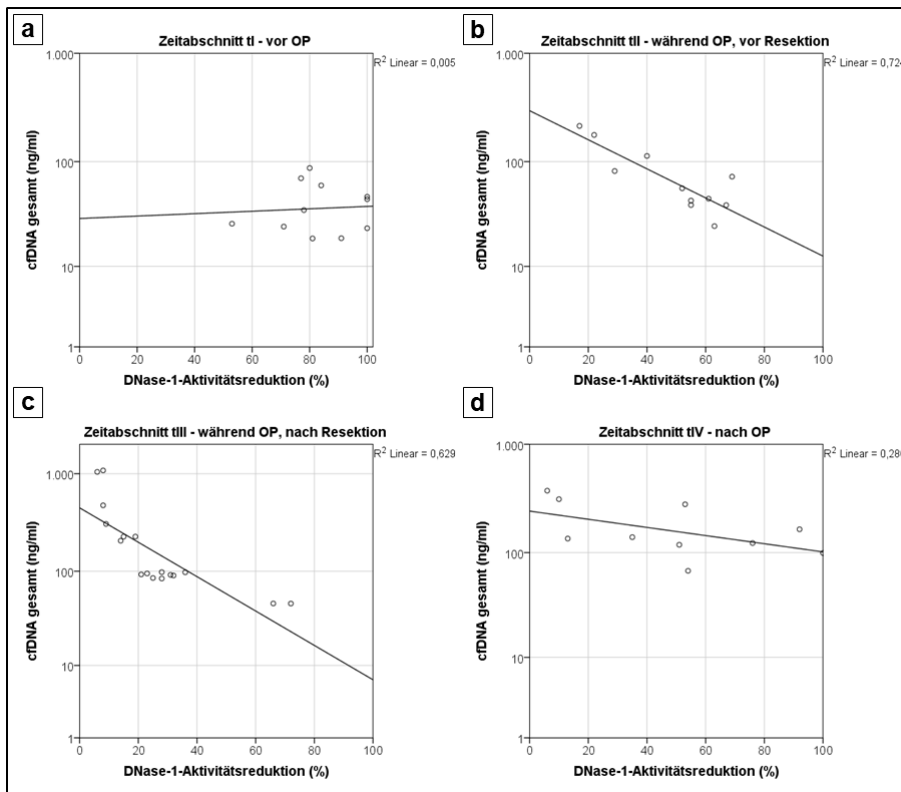
## Ergebnisse



**Abbildung 124** Entwicklung der DNase-AR über den Operationsverlauf

a) Die DNase-AR dargestellt im Boxplot über die vier Zeitabschnitte der OP-Phase. Die DNase-AR sank über den Operationsverlauf ab und stieg im post-OP-Zeitraum wieder an – hier aber mit einer Abweichung von fast 100% AR. b) Die deskriptive Statistik zu a. c+d) zeigen die Tests der Zwischensubjekteffekte und die Mehrfachvergleiche nach Bonferroni. Die Einteilung in die vier OP-Phasen ist ein signifikanter Unterscheidungsmarker für die DNase-AR (c), zwischen den Zeitabschnitten unterscheiden sich aber nur die vor-OP-Werte (tl) signifikant von allen anderen Zeitabschnitten, diese untereinander (teilweise knapp) nicht (d).

Eine Unterteilung der Korrelationen zwischen der DNase-AR und der cfDNA-Konzentration in die vier Operationsphasen ist in Abbildung 125 gezeigt. Hier zeigt sich, dass die Parameter zu den unterschiedlichen Zeitabschnitten sehr unterschiedlich gut miteinander korrelierten. Vor Beginn der Operation in Zeitabschnitt tI korrelierten DNase-AR und cfDNA gar nicht (Abb. 125a), während sie in den Abschnitten tII (Abb. 125b) und tIII (Abb. 125c) hochsignifikant korrelierten und in der postoperativen Phase tIV wieder nicht signifikant, sondern nur in der Tendenz korrelierten (Abb. 125d), obwohl die cfDNA-Konzentrationen in dieser Phase nicht niedriger waren, als in den vorherigen. Eine Korrelation war demnach nicht abhängig von der cfDNA-Konzentration. Dies zeigt somit, dass in der Phase, in der physisch Einfluss auf den Körper genommen wurde, die DNase-AR und die cfDNA sich signifikant gegenläufig zueinander verhielten, zu den anderen Zeitabschnitten jedoch nicht.



**Abbildung 125** Korrelationen DNase-AR mit cfDNA zu den Phasen des OP-Verlaufs

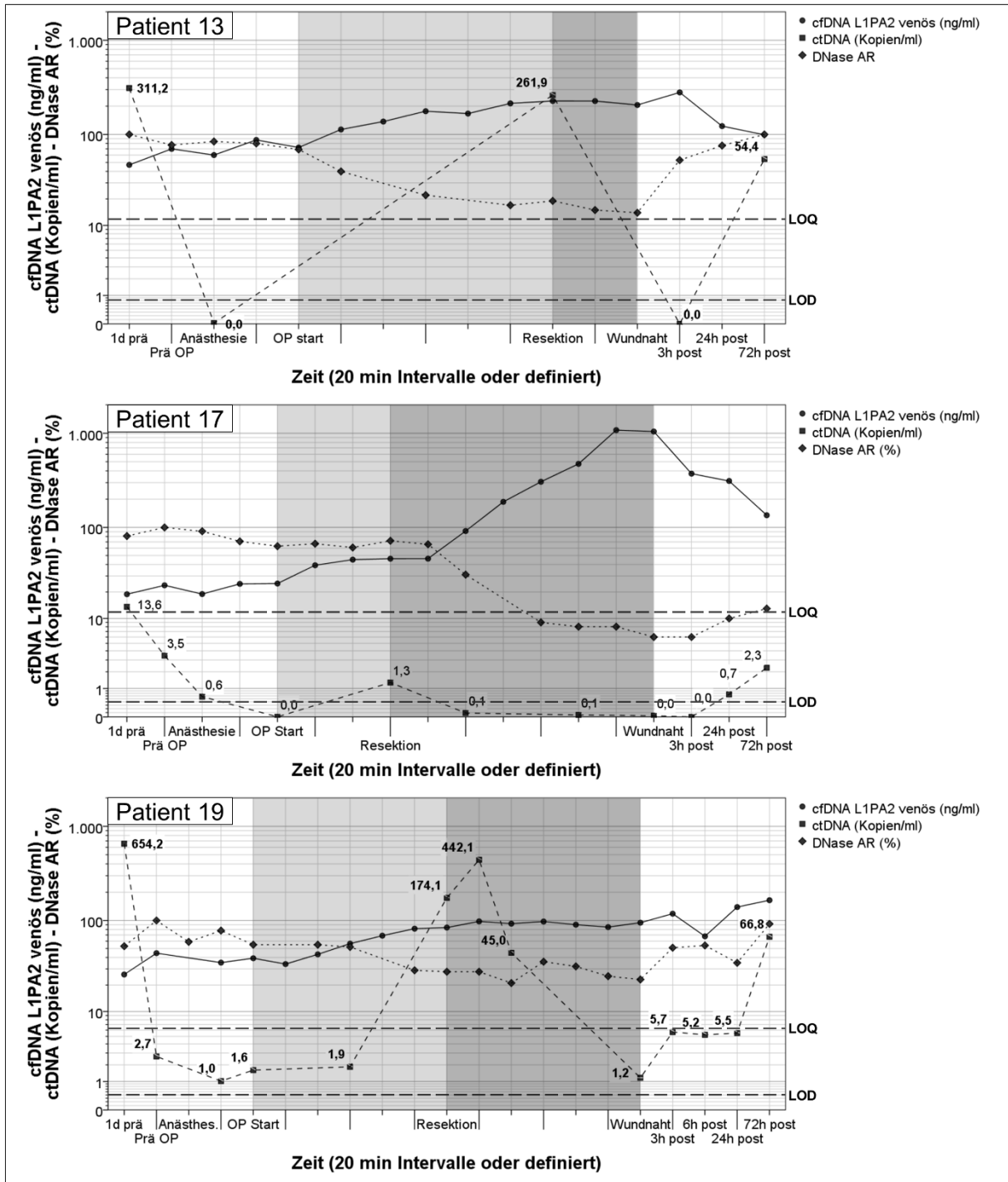
Auf den vier abgebildeten Graphiken ist jeweils die DNase-1-Aktivitätsreduktion (X) gegen die cfDNA-Konzentration (Y) für alle Tests nach den vier Operationsphasen aufgetragen. Die Korrelation der DNase-AR mit der cfDNA war in den Zeitabschnitten des OP-Verlaufs unterschiedlich. a) In Zeitabschnitt tI vor Beginn der OP korrelieren die beiden Parameter nicht. b+c) In den Zeitabschnitten tII und tIII, während der OP, korrelieren DNase-AR und cfDNA hochsignifikant negativ miteinander (tII:  $\rho = -0,826$ ,  $P = 0,002$ ,

n = 11; tIII:  $\rho = -0,881$ ,  $P = 0,000003$ , n = 17, Pearson-Korrelationen). d) In Zeitabschnitt tIV, nach Ende der OP, korrelieren DNase-AR und cfDNA wieder nicht signifikant miteinander.

### 3.3.5 Vergleiche der verschiedenen Parameter

In Abbildung 126 ist eine Übersicht über die drei gemessenen Hauptparameter – cfDNA, ctDNA und DNase-AR – für die drei Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Plasma abgebildet. Wie zuvor bereits beschrieben, verhielten sich cfDNA und DNase-AR gegenläufig zueinander, während sich die ctDNA-Konzentrationen unabhängig von den beiden anderen Parametern verhielten. Am Tag der Operation waren die ctDNA-Konzentrationen in allen Fällen deutlich niedriger als am Tag zuvor. Direkt nach Beginn der Operation fielen die Konzentrationen in den Bereich des LOD oder darunter – es waren somit so gut wie keine ctDNA-Fragmente mehr im Blut vorhanden (Abb. 126). In ebenfalls allen drei Fällen stiegen die ctDNA-Konzentrationen kurzzeitig und sehr unterschiedlich ausgeprägt direkt nach der Resektion an. Im Anschluss sanken die Werte wieder deutlich ab und stiegen erst wieder zum 72-Stunden-Wert auf Quantifizierbare Konzentrationen an.

## Ergebnisse



**Abbildung 126** Individuelle Verläufe der ctDNA, cfDNA und DNase-AR

Die Gegenüberstellung der Entwicklungen der ctDNA mit der cfDNA und der DNase-AR für die drei Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Blutplasma. Auf der X-Achse sind die Probenabnahmen im Operationsverlauf abgebildet. Die wichtigsten Zeitpunkte sind definiert, die weiteren Einteilungen repräsentieren Abnahmen in 20-Minuten-Abschnitten. Auf der Y-Achse sind die cfDNA-Konzentrationen in ng/ml, die ctDNA-Konzentrationen in Kopien/ml sowie die DNase-AR in % Aktivitätsreduktion angegeben. Die Operationen sind graphisch grob in die vier Zeitabschnitte unterteilt: vor der Operation (weiß), während der Operation aber vor der Resektion (hellgrau), während der Operation und nach der Resektion (dunkelgrau), nach Ende der Operation (weiß). Da die Operationsabläufe nicht identisch verliefen, sind nicht bei allen Patienten Proben zu allen aufgeführten Zeitpunkten abgenommen worden. Als Anhaltspunkt für die jeweilige Operationsdauer dienen hier also nicht alle Striche auf der X-Achse, sondern die Anzahl genommener Proben.

cfDNA und DNase-AR verlaufen gegenläufig und es besteht keine Korrelation zu den Verläufen der ctDNA. Die cfDNA stieg über den Operationsverlauf an, während die DNase-AR abfiel. Die cfDNA-Verläufe nach Ende der OP sind nicht gleichmäßig. Bei OP13 und OP17 sank die cfDNA nach der OP wieder ab, bei OP19 stieg sie weiter an.



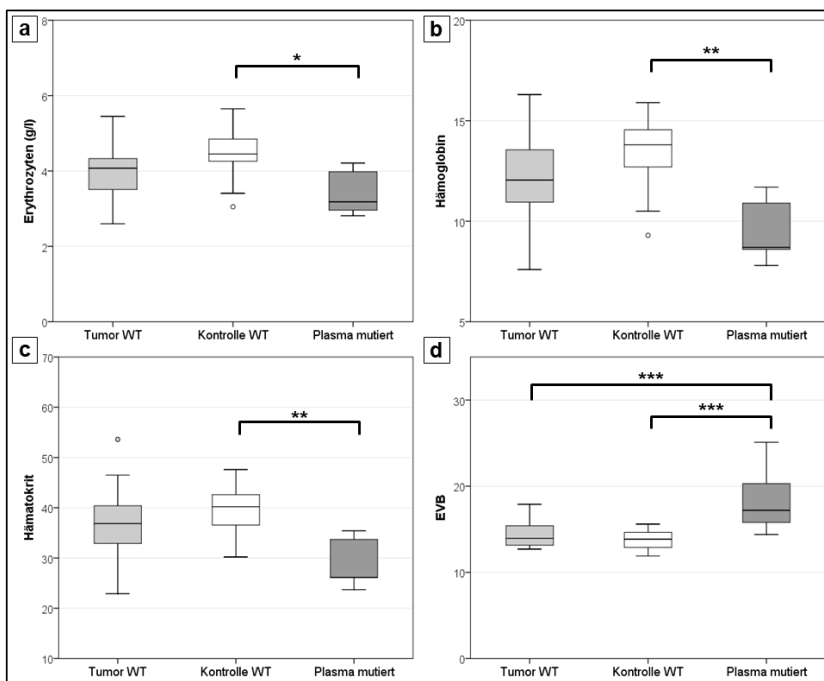
## Ergebnisse

Die DNase-AR stieg nach OP-Ende konstant wieder an. Die ctDNA-Konzentrationen fielen schon vor Beginn der Operation, nach Gabe des Anästhetikums, deutlich ab und stiegen nur nach der Resektion kurzzeitig an. Nach Ende der OP stiegen die ctDNA-Konzentrationen ebenfalls wieder an.

Die gestrichelten Linien für LOD und LOQ beziehen sich auf die ctDNA und gelten für cfDNA-Eluat, das bei der Isolierung 40x aufkonzentriert wurde.

### 3.3.6 Einfluss des Mutationsstatus im Plasma im Blutbild

Die drei Gruppierungen wurden auf die in den Blutbildern erhobenen Blutwerte verglichen. Die meisten Werte unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Signifikante Unterschiede gab es zwischen den Faktoren des Sauerstofftransports im Blut – der Erythrozytenkonzentration ( $P = 0,014$ , PM vs. KW:  $P = 0,017$ ), dem Hämoglobinwert ( $P = 0,004$ , PM vs. KW:  $P = 0,004$ ), dem Hämatokritwert ( $P = 0,011$ , PM vs. KW:  $P = 0,008$ ) und der EVB (Erythrozytenverteilungsbreite,  $P = 0,001$ , PM vs. TW und PM vs. KW:  $P = 0,001$ , alle ANOVA, Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni, Abb. 127). Die ersten drei Werte waren bei den *KRAS*-mutierten Patienten im Verhältnis zu den anderen Patienten erniedrigt. Die EVB hingegen, die die Volumenabweichung der Erythrozyten beschreibt, war in der PM-Gruppe über den Normwert erhöht und lag signifikant über den beiden anderen Gruppen. Dies alles weist auf einen verschlechterten Sauerstofftransport im Blut in der PM-Gruppe hin.

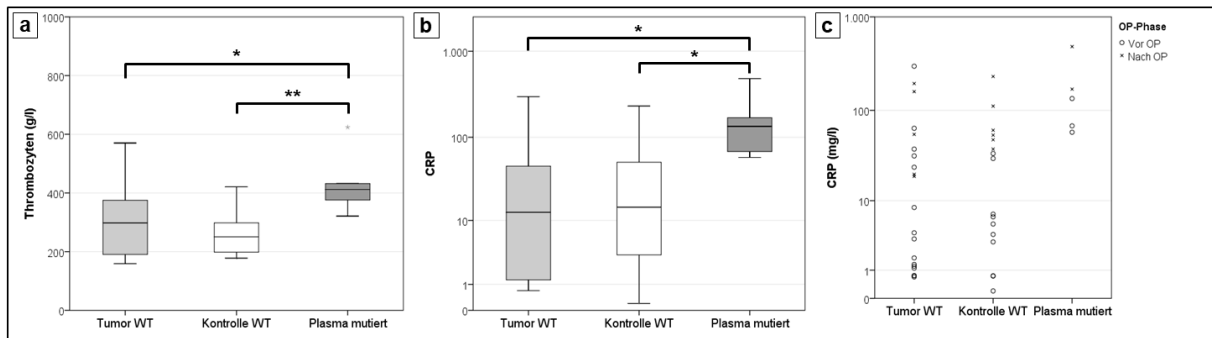


**Abbildung 127** Sauerstofftransport und Plasmamutationsstatus  
In vier Blutwerten, die mit dem Sauerstofftransport im Blut assoziiert sind, unterscheidet sich die PM-Gruppe signifikant von den beiden WT-Gruppen. a) zeigt die Erythrozytenkonzentration, b) zeigt den Hämoglobinwert, c) den Hämatokritwert und d) die EVB. a-c sind in der PM-Gruppe signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe, die TW-Gruppe unterscheidet sich nicht signifikant von den beiden anderen Gruppen. Die Werte der PM-Gruppe sind pathologisch erniedrigt. Die EVB der PM-Gruppe liegt hingegen signifikant über den beiden WT-Gruppen.

Zusätzlich waren die Thrombozytenzahl ( $P = 0,007$ , PM vs. TW:  $P = 0,049$ , PM vs. KW:  $P = 0,005$ , Abb. 128a) und das C-reaktive Protein (CRP;  $P = 0,028$ , PM vs. TW:  $P = 0,029$ , PM vs. KW:  $P = 0,048$ , Abb. 128b+c) in der PM-Gruppe erhöht. Die CRP-Werte waren erwartungsgemäß in den Messungen nach der Operation innerhalb der Gruppen höher, in der TW-Gruppe

## Ergebnisse

nur tendenziell, in den beiden anderen Gruppen absolut. Beide Werte deuten einen schlechteren Gesundheitszustand der PM-Gruppe an.



**Abbildung 128** Entzündungsmarker und Plasmamutationsstatus

Gezeigt sind die Werte zweier Blutparameter im Boxplot unterteilt nach den drei Patientengruppen. a) zeigt die Thrombozytenkonzentration, die in der PM-Gruppe signifikant höher ist, als in den beiden WT-Gruppen. b) zeigt die CRP-Werte, die ebenfalls in der PM-Gruppe signifikant höher sind, als in den beiden WT-Gruppen. In Abbildung c sind die CRP-Werte weiter nach dem Zeitpunkt der Abnahme – vor oder nach der OP – unterteilt. Die Werte nach der OP sind generell höher als vor der OP. Alle CRP-Werte nach der OP und der PM-Gruppe sind pathologisch erhöht, einige vor OP-Werte der WT-Gruppen ebenfalls.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Allgemeines und Methodisches**

Es gibt eine Vielzahl an Behandlungsansätzen und Medikamenten zur Krebsbekämpfung. Tumoren sind jedoch hochkomplexe Systeme, die sich durch die hohe Heterogenität und Mutationsrate individuell sehr unterscheiden (*Gerlinger et al., 2012, Heppner, 1984*). Um ein derart komplexes, sich ständig veränderndes System wie einen Tumor effizient und erfolgreich angreifen zu können, ist eine genaue Kenntnis des einzelnen Tumors notwendig. Dies beinhaltet nicht nur die Größe, Position, Anatomie und Physiologie des Tumors, sondern auch das Genom (*Fearon, 2011, Vogelstein et al., 2013, Wood et al., 2007*) und Epigenom (*Lao and Grady, 2011*). Somit ist absehbar, dass die molekulare Tumordiagnostik eine entscheidende Rolle in der Krebsbekämpfung spielen muss (*Papadopoulos et al., 2006*).

Im Rahmen der Diagnostik des Tumorgenoms gibt es verschiedene methodische Herangehensweisen, die eine Untersuchung verfolgen kann. Je nach Ziel der Untersuchung gibt es verschiedene molekularbiologische Methoden, mit denen ein Erkenntnis unterschiedlich gut gewonnen werden können. Beispielsweise ist es nicht effektiv, mit der qPCR alle möglichen Mutationen aller bekanntermaßen oft mutierenden Gene zur Charakterisierung eines Gesamtgenoms zu untersuchen. Ebenso ist es nicht zielführend, teuer und teilweise, aufgrund des niedrigen Probenvolumens, schlicht nicht möglich, von seriellen Blutabnahmen Sequenzierungen des gesamten Genoms durchzuführen. Die in dieser Arbeit vorgestellte Methode wurde speziell zu dem Zwecke entwickelt, zirkulierende Tumor-DNA aus Blutproben auch von geringem Volumen und mit möglicherweise sehr niedrigen cfDNA-Konzentrationen hochsensitiv zu quantifizieren. Dies wurde am Beispiel der sieben häufigsten *KRAS*-Mutationen spezifisch etabliert und im Rahmen von zwei Studien erfolgreich angewandt. So konnten aus minimalen Blutmengen verlässliche Informationen über die jeweiligen ctDNA-Konzentrationen gewonnen werden. Dies war insbesondere in der zweiten Studie nötig, in der teilweise Blutvolumina von nicht mehr als einem Milliliter für die Analyse zur Verfügung standen. Diese Methode ist in vielen Untersuchungen anwendbar, kann auf andere Genloci problemlos übertragen werden, und ist immer dann von erheblichem Vorteil, wenn das Probenmaterial begrenzt ist. Zudem übertrifft sie alle bisher vorgestellten Methoden in ihrer Sensitivität in der Detektion von ctDNA (Tab. 11).

### **4.2 Methodenetablierung**

Die Etablierung der PNB-qPCR wurde in mehreren, aufeinander aufbauenden Schritten durchgeführt. Zunächst wurde separat die qPCR der Zweitrunde, anschließend dann die Erstrunde und der Gesamtablauf der Methode etabliert und optimiert. So konnte jeder Schritt einzeln

bestmöglich gestaltet werden und möglicherweise auftretende methodische Probleme und Hindernisse einzelnen Teilschritten zugeordnet werden.

Mittels PCR, Kultur von Tumorzellen, Klonierung und Site Directed Mutagenesis wurden dauerhaft verfügbare Standards für den *KRAS*-WT sowie die sieben häufigsten Hotspot-Mutationen in Exon 2 des *KRAS*-Gens hergestellt, um alle Ergebnisse untereinander vergleichbar zu machen. Aus diesen Standards wurden Standardreihen nach fest vorgeschriebenen Arbeitsabläufen und Qualitätsstandards erstellt und diese wurden nach maximal einer Woche verworfen, um einer Degenerierung der DNA und folgender Verfälschung der Ergebnisse vorzubeugen. Alle Standards wurden bei -20 °C gelagert, immer schonend auf Eis aufgetaut und sobald wie möglich nach Verwendung wieder eingefroren. Die Konzentrationen der Ausgangsstocks für die Standardreihen, sowohl mutierte oder WT-Fragmente als auch gDNA, wurden vor jeder Erstellung einer Standardreihe mit dem NanoDrop 3300 quantifiziert, um eine maximal mögliche Genauigkeit in den Standardreihen zu gewährleisten.

Nachfolgend wurden ARMS-Primer (Position und Art der ARMS-Base), Sonden (LNA-Basen, Strangspezifität, Position), qPCR-Protokolle (Zyklen, Anlagerungstemperatur und -zeit, Zahl der Schritte) und -Reagenzien für die spätere Zweitrunde genauestens einzeln etabliert, um maximale Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Hohe Hintergründe von WT-DNA, in Form von fragmentierter genomischer DNA oder artifiziellen WT-Fragmenten, kontrollierten die Spezifität der Primer. Hier konnten bereits gute Sensitivitäten und niedrige LOQs erreicht werden, wobei bei einzelnen Mutationen die Ergebnisse deutlich schwächer waren als bei den anderen. Die Spezifität einiger Primer war in der alleinstehenden qPCR neben dem hohen Probenverbrauch die größte Schwachstelle. Diese wurde erfolgreich in der nested qPCR behoben, die durch den Einsatz von WT-Blocking-Primern eine extreme Erhöhung der Spezifität aufweisen konnte. Dies geschah jedoch auf Kosten der Linearität der LOQ-Reihen, so dass die Detektion stark verbessert, die Quantifizierung jedoch leicht verschlechtert war. Für die Erstrunde der nested qPCR wurden äußere Primer, Blocking-Primer sowie das Protokoll der PCR wieder genau optimiert, um die Möglichkeiten der Methode voll ausschöpfen zu können.

Im dritten und entscheidenden Schritt der Methodenetablierung wurden die Mängel der nested qPCR, bestehend in der Ungenauigkeit, die durch die zwei PCR-Durchläufe sowie die dazwischenliegende Verdünnung entstehen, beseitigt. Für die PNB-qPCR wurden die Erstrundenprodukte von fünf Erstrunden mit identischem Edukt gepoolt, wodurch die Abweichungen der Erstrunde egalisiert wurden. Die Poolgröße von fünf wurde hier als eine optimale Kombination aus maximaler Linearität und möglichst geringem Aufwand etabliert. Die PNB-qPCR wies die hohe Spezifität der nested qPCR auf und verband sie mit der hohen Linearität der qPCR, so dass in beinahe allen Fällen gleichgute oder bessere LOQs erzielt werden konnten als in der

qPCR, jedoch mit rechnerischen LODs von unter einer Kopie der einzelnen Erstrunden. Wiederholungen von LOQ-Reihen zeigten zudem eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Methode (Abb. 68).

**Tabelle 22** Vergleich verschiedener ctDNA-Detektionsmethoden

Die in grau gehaltenen Methoden sind die in dieser Arbeit vorgestellten (Teil-)Methoden.

	qPCR	nested qPCR	PNB-qPCR	ddPCR (Multiplex) <sup>1</sup>	BEAMing <sup>2</sup>	capp-seq <sup>3</sup>
Vol. PCR 1. Runde	-	8 µl	5*8 µl	-	15 µl	>=7 ng
Vol. PCR/Detektion 2. Runde	6,4 µl	3,2 µl	3,2 µl	6,25 µl inkl. 6 ng DNA	10 µl	NA
# möglicher Test-Wiederholungen*	1	348	279	1 - 4***	15 (3*5)	1 - 7
LOQ (Kopien/Quantifizierung)	6,25 - 50	12,5 - 50	3,13 - 12,5	2 - 7	NA	1
LOQ (% mutierte Allele)	0,02% - 0,17%	0,04% - 0,17%	0,01% - 0,04%	0,01% - 0,1%	0,01%	0,02%
LOD (Kopien/ Detektion)	6,25 - 25	1 - 4	1	2 - 7	NA	1
LOD (% mutierte Allele)	0,02% - 0,08%	0,003% - 0,012%	<0,003%	0,01% - 0,1%	0,01%	0,02%
Benötigtes Volumen Plasma für Quantifizierung**	1,7 - 6,8 ml	2,7 - 10,8 ml	0,14 - 0,54 ml	0,6 - 1,9 ml	NA	0,7 ml
Benötigtes Volumen Plasma für Detektion**	1,7 - 6,8 ml	0,22 - 0,86 ml	0,04 ml	0,6 - 1,9 ml	0,11 ml	0,7 ml

\*= Mögliche Anzahl an Wiederholungen des Tests in finalen Detektionen aller 8 Varianten; aus 50 µl Eluat

\*\*= Für 1 Detektion aller 8 KRAS-Varianten, für angenommene 10 ng cfDNA / ml Plasma und 1% ctDNA, alle Werte in ml

\*\*\*= Abhängig von der DNA-Konzentration

<sup>1</sup> = (Taly et al., 2013), <sup>2</sup> = (Dressman et al., 2003), <sup>3</sup> = (Newman et al., 2014)

Die Stärken der PNB-qPCR werden in Tabelle 22 im Vergleich mit anderen hochsensitiven Methoden deutlich. Sie ist in der Quantifizierung einem Multiplex-Ansatz in der digitalen PCR ebenbürtig, während sie diesen und auch das bereits kommerziell eingesetzte BEAMing oder auch hochsensitive Sequenzieransätze in der Detektion von minimalen Mengen von mutierten Fragmenten übertrifft. Die besondere Stärke der Methode liegt jedoch in der Effizienz der Auswertung in Bezug auf das benötigte Probenvolumen. Während in einer qPCR oder der digitalen PCR für jeden einzelnen Nachweis vergleichsweise viel Probenvolumen in jedem der mehrfach-Ansätze (meistens Triplets) benötigt wird, diese Methoden somit in ihrer Anwendbarkeit stark limitiert sind, und in Sequenzierungen zumeist größere Mengen DNA als Einsatzmaterial notwendig sind (Heitzer et al., 2015), benötigt die PNB-qPCR nur das Einsatzvolumen der Erstrunden. Dieses wiederum ist durch die fünffach-Ansätze extrem flexibel, theoretisch von 1-560 µl (letzteres bei fünf Erstrunden-PCR-Ansätzen von 200 µl pro Erstrunde mit je 112 µl Template, siehe Abschnitt 2.2.3.3). Hieraus folgen dann anschließend die verschiedenen Zweitrundennachweise. Da nach den Erstrunden und der anschließenden Verdünnung sehr viel Template für die Zweitunden verfügbar ist, ist keine Limitation der Methode durch das Probenvolumen gegeben. Somit braucht die PNB-qPCR in einem rechnerischen Beispiel für eine durchgeführte Detektion aller sieben Mutationen nur ein Plasmavolumen von 40 µl vor der DNA-Isolierung bei einer Konzentration von 10 ng cfDNA/ ml Plasma und einer Fraktion

von 1% ctDNA, während jede der verglichenen Methoden mindestens das zehnfache Plasmavolumen für einen solchen Nachweis benötigt (Tab. 11).

Tabelle 22 vergleicht mehrere verschiedene Ansätze zur Detektion und Quantifizierung von Tumor-DNA im Plasma im Hinblick auf die Effizienz der Ausnutzung der Plasmaprobe, der Sensitivität von Detektion und Quantifizierung sowie minimal benötigtes Volumen der Plasmaprobe, um positive Ergebnisse erzielen zu können. Das benötigte Plasmavolumen einer Probe für die Methoden berechnet sich aus dem eingesetzten Templatevolumen und der Sensitivität der Methode. Die Anzahl möglicher Test-Wiederholungen berechnet sich aus dem in die jeweilige Methode eingesetzten Volumen, dem für eine Detektion benötigten Volumen, dem angenommenen Probenvolumen von 50 µl und eventuellen Präamplifikationsschritten.

Für eine optimale Sensitivität und Spezifität der angewandten Methode war es notwendig, DNA Polymerasen zu verwenden, die einerseits sehr leistungsfähig sind und andererseits eine so geringe Fehlerwahrscheinlichkeit wie möglich aufweisen. Daher wurden sowohl in der Erstrunde als auch in der Zweitrunde high fidelity Polymerasen verwendet. In der Erstrunde wurde die Phusion® Hot Start Flex DNA Polymerase (NEB, Frankfurt, Deutschland) verwendet, für die Fehlerwahrscheinlichkeiten von  $4,2 \times 10^{-7}$  (Li et al., 2006) bis  $2,6 \times 10^{-6}$  (McInerney et al., 2014) veröffentlicht wurden.

Durch die Verwendung des Nested-Ansatzes würde sich ein Fehler in der Erstrunde-PCR stärker auf das Endergebnis der Methode auswirken als ein Fehler in der Zweitrunden-qPCR, da er im Laufe der weiteren Anwendung vervielfacht würde. Daher wurden zusätzlich zur high fidelity-Polymerase verschiedene Vorkehrungen getroffen, um mögliche Verzerrungen abzuschwächen. Zunächst wurde die Fehleranfälligkeit der Methode durch das Poolen von fünf Erstrundenprodukten stark verringert, wie in der Etablierung der PNB-qPCR gezeigt werden konnte. Zusätzlich wurden die Erstrundenprodukte 1:50 in H<sub>2</sub>O verdünnt, so dass weniger Edukt in die Zweitrunde eingesetzt wurde. Durch eine Beschränkung der Zyklenzahl auf 20 wurde zusätzlich die Fehlerwahrscheinlichkeit reduziert. Da außerdem in der Regel geringe Konzentrationen an ctDNA-Fragmenten amplifiziert werden und so eine begrenzte Zahl von Amplifikationen stattfindet, ist die Wahrscheinlichkeit eines fehlerhaften oder falschen Ergebnisses generell gering. Um ein falsch positives Ergebnis einer Detektion zu erreichen müssten in den fünf Erstrunden-PCRs im ersten Zyklus insgesamt mindestens vier falsch positive Amplifikationen stattfinden, die eine der untersuchten Mutationen in die Sequenz einführen. Für ein falsch negatives Ergebnis müssten in mehreren der fünf PCR-Ansätze die einzigen vorhandenen ctDNA-Kopien mit der Mutation falsch negativ in den WT umgeschrieben werden. Somit ist die Möglichkeit einer artifizell durch die DNA-Polymerase der Erstrunde herbeigeführten Verzerrung des Endergebnisses weitgehend ausgeschlossen.

In der Zweitrunde ist die Fehleranfälligkeit höher. Die hier verwendete Sso7d fusion DNA-Polymerase (Bio-Rad, München, Deutschland) weist eine Fehlerwahrscheinlichkeit von

$2,79 \times 10^{-5}$  (Ppyun et al., 2012) bis  $2,04 \times 10^{-6}$  (Lee et al., 2010) auf und liegt somit über der der Erstrunde. Zudem besteht die qPCR aus 50 Zyklen, wird nur im Triplet angelegt, das Ergebnis der qPCR wird direkt ausgewertet und das Template ist in der Regel höher konzentriert. Dennoch müssten für ein falsches Ergebnis mit geringer Standardabweichung innerhalb der Triplets, egal ob falsch negativ oder falsch positiv, mehrere Fehler gleichzeitig in allen drei qPCRs des gleichen Ausgangstemplates passieren. Zudem können bei Abweichungen oder Unregelmäßigkeiten die Zweitrunden-qPCRs aufgrund des im Überfluss vorhandenen Erstrundenprodukts beliebig oft wiederholt werden. Insgesamt sind falsche Detektionen aufgrund von Polymerasefehlern somit extrem unwahrscheinlich und Abweichungen in der Quantifikation vermutlich marginal, da diese in den frühen Zyklen der qPCR begründet sein müssten, um einen Unterschied im Endergebnis zu machen.

Die PNB-qPCR konnte nachfolgend in zwei Studien erfolgreich angewendet werden. In beiden Fällen wurde eine hochsensitive Methode benötigt, die aus den gegebenen Plasmaproben genaue Auskünfte, nicht nur über die mögliche Anwesenheit von ctDNA, sondern auch über deren Konzentration liefern konnte. Dies war notwendig, um Rückschlüsse über Entwicklungen in der ctDNA unter den untersuchten physiologischen Ausnahmesituationen treffen zu können. Zudem war unumgänglich, diese Informationen aus den gegebenen limitierten Plasmavolumina heraus treffen zu können. Die PNB-qPCR lieferte durch ihre hohe Spezifität für jede Probe eine klare Aussage und konnte in vielen Fällen auch niedrigste Fraktionen von ctDNA erfolgreich erkennen und durch den niedrigen LOQ zumeist auch quantifizieren. Sie ermöglichte somit eine genaue Analyse von in Reihe abgenommenen Blutproben niedriger Volumina. Zusätzlich wurde gezeigt, dass auch genomische DNA, hier aus FFPE-Proben gewonnen, mit der PNB-qPCR problemlos analysiert werden kann, wenn sie verdünnt wird.

Die Reliabilität der cfDNA-Messungen mit der *L1PA2*-qPCR direkt aus dem Plasma wurde in beiden durchgeführten Studie durch Vergleiche mit anderen Messtechniken oder qPCR-Ansätzen bestätigt. In der ersten Studie wurden die Ergebnisse mit NanoDrop 3300- und *KRAS*-Std-qPCR-Messungen verglichen (Abb. 83), in der zweiten Studie mit *LTR5*-qPCR- und *KRAS*-Std-qPCR-Messungen (Abb. 112). In allen Fällen wurden die gemessenen Werte durch klare, hochsignifikante Übereinstimmungen bestätigt.

### **4.3 Studie 1 - Entwicklungen frei zirkulierender DNA bei Krebspatienten unter erschöpfender körperlicher Belastung**

Die erste Studie wurde durchgeführt, um die Kinetik der zirkulierenden Tumor-DNA bei Tumorpatienten unter körperlicher Belastung zu messen und mit der Kinetik der gesamt-cfDNA zu vergleichen. Es sollte überprüft werden, ob die Freisetzungsmechanismen, die zu Erhöhungen der cfDNA führen, auch die ctDNA in gleichem Maße beeinflussen würden. In diesem Fall würde auch die ctDNA unter körperlicher Belastung verstärkt freigesetzt. Zusätzlich sollten die

Unterschiede und Zusammenhänge in der cfDNA-Kinetik und der DNase-1-Aktivitätsreduktion im Belastungsverlauf zwischen der Tumorgruppe und einer Kontrollgruppe gesunder Probanden untersucht werden.

In dieser Studie zur Untersuchung der Entwicklungen von cfDNA und ctDNA bei Tumorpatienten im Rahmen einer körperlichen Ausbelastung konnten zum ersten Mal die Auswirkungen eines Belastungstests sowie der anschließenden Ruhephase auf die Konzentrationen der zirkulierenden Tumor-DNA beschrieben werden. Da in der Testgruppe nur bei einem Patienten eine *KRAS*-Mutation detektiert wurde, wurden die hierbei gewonnenen Erkenntnisse im Rahmen einer Erstbeschreibung rein deskriptiv vorgestellt. Zusätzlich wurden erstmals die Veränderungen der cfDNA-Konzentrationen von Tumorpatienten mit verschiedenen Tumorentitäten sowie gesunden Kontrollprobanden unter körperlicher Ausbelastung gemessen und mit belastungsphysiologischen Parametern verglichen. Da die Tumorgruppe in Bezug auf das Krankheitsbild heterogen war und mit der Kontrollgruppe in Bezug auf das Geschlecht der Teilnehmer nicht angepasst war, ist es notwendig, die hier gewonnenen Erkenntnisse in weiteren Studien unter strengeren Auswahlkriterien und mit mehr Teilnehmer/innen zu verifizieren.

Es konnte beobachtet werden, dass die Kontrollgruppe aus Patienten der Abteilung Sportmedizin der Universität Mainz ohne bekannte Tumorerkrankungen körperlich deutlich leistungsfähiger war als die Tumorgruppe, insbesondere die Frauen mit Tumoren, gemessen in Watt/kg Körpergewicht. Da aber nicht die erbrachte Leistung, sondern die subjektive Ausbelastung der Testpersonen für eine Vergleichbarkeit der Testparameter relevant war, stellte dies keine Ungleichstellung der Gruppen dar. Kritischer war, dass die Frauen deutlich geringere Stufenzahlen fuhren, wodurch die körperliche Ausbelastung in einem kürzeren Zeitraum herbeigeführt wurde und daher vermutlich nicht die gleichen Stoffwechsellanpassungen eintreten konnten, wie bei den Männern. Daher wäre vermutlich eine noch geringere Last pro Stufe bei den teilnehmenden Frauen sinnvoller gewesen, um die Belastungsdauer zu erhöhen. Die BORG-Werte bei Abbruch der Belastung unterschieden sich jedoch nicht signifikant zwischen den Gruppen, sodass von einer weitgehend gleichmäßigen individuellen Ausbelastung ausgegangen werden kann. Zusätzlich sollten für folgende Studien auch für die Kontrollgruppe die Auswahlkriterien enger an die Testgruppe angepasst werden, zum Beispiel in Bezug auf das Geschlecht, aber auch im Hinblick auf die Bewegungsgewohnheiten im Alltag, um eine bessere Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

In der Entwicklung der cfDNA-Konzentrationen zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen der Tumor- und der Kontrollgruppe, insbesondere in der Dynamik der Konzentrationen. Sowohl die höhere Ausgangskonzentration als auch die hohe Streuung der Werte der cfDNA der Tumorpatienten in Ruhe stimmt mit in der Literatur beschriebenen Unterschieden überein (*Danese et al., 2010, Schwarzenbach et al., 2008, Taly et al., 2013*), wenn die Unterschiede



hier auch nicht statistisch signifikant waren. In der Entwicklung der cfDNA über den Belastungstest hinweg und in der folgenden Ruhephase zeigte sich eine signifikant höhere Dynamik in der Kontrollgruppe als in der Tumorgruppe, wobei sich Männer und Frauen weder in den Absolutwerten noch in den Anstiegen unterschieden. Der Anstieg und der Abfall der cfDNA-Konzentrationen unterschieden sich signifikant zwischen den Gruppen, ebenso wie die Absolutwerte in Ruhe 90 Min. nach Belastungsende in der Tumorgruppe signifikant höher waren als in der Kontrollgruppe. In der rest-Phase unterschieden sich die beiden Gruppen am deutlichsten, da die cfDNA-Konzentrationen der Kontrollpatienten alle deutlich unter die Ausgangswerte fielen und somit der Abfall der cfDNA den vorherigen Anstieg hier signifikant überstieg. In der Tumorgruppe hingegen sanken die cfDNA-Konzentrationen ungefähr wieder auf das Ausgangsniveau ab.

Der deutlichste Unterschied der beiden Gruppen besteht somit in der Ruhephase nach Belastungsende. Möglicherweise ist dies in der DNase-AR während der Ruhephase begründet, dies wird aber nicht durch die gemessenen DNase-AR-Werte direkt nach und 90 Min. nach Belastungsende bestätigt. Hierfür wären parallele Messungen von cfDNA und DNase-AR innerhalb der Ruhephase notwendig, zum Beispiel 10, 20, 30, 45 oder 60 Minuten nach Ende der Belastung. Eine Studie an gesunden, trainierten Probanden hat gezeigt, dass die DNase-Aktivität in den meisten Fällen bereits 30 Min. nach Ende eines Laufbandtests wieder den ursprünglichen Zustand erreicht hatte, während die cfDNA-Konzentrationen noch leicht erhöht waren (*Beiter et al., 2014*). Dies stellt jedoch ebenfalls nur einen Zeitpunkt dar und die Versuchsgruppe von Sportlern ist mit den hier untersuchten Teilnehmern nur bedingt vergleichbar. Zusätzlich wäre interessant, wie sich die cfDNA-Konzentrationen beider Gruppen im Folgenden verhielten – ob sich zum Beispiel die cfDNA-Konzentrationen der Kontrollgruppe sich wieder den Ausgangswerten annäherten, oder ob sich die cfDNA-Konzentrationen der Tumorgruppe weiter verringerten. Eine vergleichbare Analyse an Sportlern hat gezeigt, dass die cfDNA-Dynamik in den ersten 20 Minuten nach Belastungsende individuell sehr unterschiedlich sein kann, anschließend aber bei allen Individuen die cfDNA-Konzentrationen deutlich abfielen, bis sie fast wieder die Ruhewerte erreicht hatten (*Breitbach et al., 2014a*). In einer anderen Studie wurden die cfDNA-Konzentrationen gesunder Probanden 10, 30 und 90 Min. nach Ende eines Laufbandtests gemessen und ein Plateau bis 10 Min. nach Ende festgestellt, gefolgt von einem linearen Abstieg der Konzentrationen auf den Ruhewert vor Belastung (*Helmig et al., 2015*). Eine engmaschigere Analyse der cfDNA-Kinetik von Tumorpatienten, die auch mittels minimaler Blutmengen aus kapillarem Blut durchgeführt werden kann (*Breitbach et al., 2014b*), wäre hier also gut durchführbar und sinnvoll. Für eine Analyse der DNase-AR, die sich derart detailliert nicht in der Literatur findet, werden allerdings größere Blutvolumina benötigt, die nicht aus

Kapillaren entnommen werden können. Insgesamt ist die Erholungsphase nach Belastungsende daher vermutlich der entscheidende Zeitraum, wenn zwischen Tumorpatienten und Individuen ohne Tumorerkrankung verglichen werden soll.

Wie bereits zuvor in der Literatur postuliert (*Breitbach et al., 2014a*), stimmen die Entwicklungen der cfDNA-Konzentrationen über den Belastungsverlauf und teilweise auch in der anschließenden Erholungsphase mit den belastungsphysiologischen Parametern überein, insbesondere mit der Herzfrequenz und den Laktatwerten. Zusätzlich korrelierten die dynamischen cfDNA-Werte – der Anstieg und der Abfall der cfDNA – sehr gut mit der erbrachten Leistung, der maximalen Herzfrequenz, der  $\dot{V}O_2\text{max}$  und dem Laktatwert bei Abbruch der Belastung. Dass in dieser Studie die dynamischen cfDNA-Parameter besser mit den belastungsphysiologischen Parametern übereinstimmten als die absoluten cfDNA-Konzentrationen (siehe Tab. 9), könnte in der breiten Streuung der individuellen cfDNA-Konzentrationen der Tumorpatienten in Ruhe sowie der Differenz der Ruhekonzentrationen zwischen den beiden Gruppen begründet sein.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass sich sowohl die Art, als auch die Intensität der Belastung in den Veränderungen der cfDNA-Konzentrationen widerspiegeln und sich die cfDNA somit potentiell als physiologischer Belastungsmarker eignet. In der Konsequenz gilt es herauszufinden, welche cfDNA-Werte sich für welche Probanden oder Patienten am besten eignen, um Aussagen über die individuelle Belastung treffen zu können. Aufgrund der geringen Gruppengrößen in dieser Studie sind Schlussfolgerungen schwierig, in der Tendenz lässt sich aber folgendes erkennen: In einer stark heterogenen Gruppe, wie der hier vorhandenen Gesamtgruppe, eignen sich die dynamischen Parameter besser als die Absolutwerte. Im Falle der Tumorgruppe konnte dies hier demonstriert werden und müsste für größere Tumorpatientengruppen sowie andere Kollektive mit Leistungseinschränkungen, wie zum Beispiel chronischen Krankheiten oder starkem Übergewicht, überprüft werden. In einer recht homogenen Gruppe mit einem besseren Leistungsvermögen, wie in diesem Fall der Kontrollgruppe und ansonsten beispielsweise Sportlerkollektiven, scheinen die Absolutwerte der cfDNA besser geeignet als Messgröße für Leistungsfähigkeit und Belastung, insbesondere im Vergleich mit dem Laktatwert (Tab. 9). In beiden Bereichen sind zusätzliche Studien notwendig, die diese Differenzierung an größeren Kollektiven eingehend untersuchen und die Eignung der beiden Arten von cfDNA-Parametern zur Messung von Leistung oder Belastung gegenüberstellen, wenn die cfDNA in der Praxis Anwendung als Belastungsmarker finden soll.

Dass der Abfall der cfDNA in der Erholungsphase mit der NLR, einem Entzündungsmarker (*Walsh et al., 2005*), korrelierte, stützt die Annahme, dass die cfDNA möglicherweise Aussagen über den Gesundheitszustand der Patienten treffen kann.

Die Verbindungen der cfDNA-Konzentrationen und -Veränderungen mit den Konzentrationen der verschiedenen Zelltypen wurde hier nur für die Tumorgruppe durchgeführt, da für die Kontrollgruppe keine Daten erhoben worden waren. In den Korrelationen der cfDNA-Parameter mit den Zellkonzentrationen konnten Unterschiede zwischen den Phasen der Belastung beobachtet werden. Wenn die Belastungsphase als aktive Phase und die anschließende Erholungsphase sowie der ursprüngliche Ruhezustand als passive Phase eingeteilt wurden, traten unterschiedliche Zusammenhänge auf. Als cfDNA-Parameter können die cfDNA-Konzentration post und der cfDNA-Anstieg der aktiven Phase zugeordnet werden, während die cfDNA-Konzentration prä und rest sowie der cfDNA-Abfall der passiven Phase angehören. In der aktiven Phase scheinen vor allem die Lymphozyten von Bedeutung zu sein. Die Nachbelastungswerte der cfDNA und der Lymphozyten korrelieren miteinander, der Anstieg der cfDNA korreliert mit den Anteilen der Lymphozyten und ein hoher Abfall der cfDNA geht mit einer ausgeprägten Dynamik der Lymphozytenwerte einher. Patienten mit vielen Lymphozyten wiesen eine ausgeprägtere Dynamik der cfDNA-Konzentrationen in der aktiven Phase auf, so dass ein Zusammenhang der beiden Parameter während der Belastung wahrscheinlich ist. Möglicherweise senden Lymphozyten Signale aus, die zur Freisetzung von cfDNA führen, oder sie setzen sie selbst frei, zum Beispiel in Form von Vesikeln. Diese Ergebnisse werfen im wissenschaftlichen Kontext allerdings Fragen auf: allgemein wird davon ausgegangen, dass die Zahlen der Lymphozyten direkt nach körperlicher Belastung absinkt (*Walsh et al., 2011*), wobei auch Lymphozytenanstiege bereits in der Literatur berichtet wurden (*Kraemer et al., 2013*). In dieser Studie stiegen die Lymphozytenwerte und -fraktionen durch die Belastung bei allen Patienten an. Zudem wurden Lymphozyten bisher nur vereinzelt direkt mit der Freisetzung von cfDNA in Verbindung gebracht (*Anker et al., 1975*). Die in dieser Studie in dieser Hinsicht getroffenen Beobachtungen können daher nur als erster Anhaltspunkt betrachtet werden, der in der Folge verifiziert werden muss. Zudem kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass cfDNA und Lymphozyten nur gleich stimuliert werden und somit aus dem gleichen Grund, aber ohne weitere Verbindung ansteigen.

Die passive Phase war durch Zusammenhänge der cfDNA mit neutrophilen und basophilen Granulozyten sowie Monozyten gekennzeichnet. Hohe Konzentrationen neutrophiler und basophiler Granulozyten korrelierten mit hohen cfDNA-Ruhekonzentrationen und, eventuell infolgedessen, geringen cfDNA-Anstiegen und Abfällen. Auch hohe Monozytenzahlen gingen mit niedrigen cfDNA-Abfällen in der Erholungsphase einher. Dies könnte für eine Freisetzung von cfDNA in dieser Phase direkt oder vermittelt durch die genannten Zellpopulationen sprechen.

Dass die DNase-Aktivitätsreduktion negativ mit den cfDNA-Konzentrationen korreliert und bei starker körperlicher Belastung gegenläufig zu den steigenden cfDNA-Konzentrationen abfällt, wurde bereits in der Literatur beschrieben (*Beiter et al., 2014, Velders et al., 2014*) und ist

vermutlich ein Mechanismus zur Kontrolle der zellfreien DNA im Blut (*Hawes et al., 2015*). Diese Konzentrationsverläufe konnten in dieser Studie nur innerhalb der Kontrollgruppe wie erwartet beobachtet werden (Abb. 98-101). Innerhalb der Tumorgruppe fanden sich hingegen abweichende Muster. Ebenso wie die cfDNA, wiesen auch die DNase-AR-Werte im Ruhezustand vor der Belastung eine deutliche Streuung auf, wobei keine Übereinstimmung der beiden Parameter zu beobachten war. Während bei der Kontrollgruppe niedrige DNase-AR-Werte mit höheren cfDNA-Ruhekonzentrationen einhergingen, gab es bei den Tumorpatienten hier keinen Zusammenhang (Abb. 100+101). Die gleiche Situation trat direkt nach Belastung auf, nach der Erholungsphase bestand auch in der Kontrollgruppe kein deutlicher Zusammenhang mehr zwischen cfDNA und DNase-AR.

Interessanterweise gab es in der Tumorgruppe zwar keinerlei Übereinstimmung der Werte von cfDNA und DNase-AR, aber eine deutlich signifikante Korrelation der DNase-AR-post-Werte mit dem cfDNA-Abfall in der Erholungsphase und den belastungsphysiologischen Parametern für die Leistung, was wiederum in der Kontrollgruppe nicht der Fall war (Abb. 101e+f). Dies lässt vermuten, dass erstens innerhalb der Tumorgruppe die Regelmechanismen für das Zusammenspiel von DNase-AR und cfDNA gestört sind und zweitens in der Tumorgruppe ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Leistungsfähigkeit und der DNase-AR post sowie dem cfDNA-Abbau in der Erholungsphase besteht. Dieser Zusammenhang tritt in der Tumorgruppe möglicherweise aufgrund der teilweise sehr geringen Leistungsfähigkeit oder aber der sehr ausgeprägten Heterogenität der Tumorgruppe auf, basiert möglicherweise aber auch auf dem gestörten Verhältnis zwischen DNase-AR und cfDNA.

Insgesamt lassen sich gemeinsame Muster innerhalb der Gruppen und auch gruppenübergreifend erkennen. Die cfDNA stieg bei allen Teilnehmern unabhängig von der Gruppe an. Während aber bei gesunden Probanden die Absolutwerte und auch die Anstiege der cfDNA eher als Indikator für die Leistungsfähigkeit dienen konnten, war in der Tumorgruppe der Abbau der cfDNA in der Erholungsphase der entscheidende Parameter im Vergleich mit DNase-AR, belastungsphysiologischen Parametern und auch einem Teil der Zellpopulationen. Die beiden cfDNA-Konzentrationen in Ruhe und der systemisch verwandte cfDNA-Abfall korrelierten mit Zelltypen der Granulozyten und der Monozyten, der Anstieg während körperlicher Belastung scheint mit den Lymphozyten im Zusammenhang zu stehen (myeloide vs. lymphatische Zellen). Diese Ergebnisse empfehlen für zukünftige belastungsphysiologische Untersuchungen unter Einbezug der cfDNA ein besonderes Augenmerk auf die Veränderungen der cfDNA in der Erholungsphase zu legen, falls die Testgruppe aus Tumorpatienten oder auch Patienten mit anderen pathologischen Einschränkungen zusammengesetzt ist.

Die PNB-qPCR wurde im Rahmen dieser Studie erfolgreich eingesetzt. Erstmals wurde die zirkulierende Tumor-DNA eines Tumorpatienten unter körperlicher Belastung quantifiziert, und dies über drei Messzeitpunkte hinweg verglichen. Insgesamt konnten alle Patienten für jede

der sieben *KRAS*-Hotspot-Mutationen getestet und als eindeutig negativ oder positiv deklariert werden, wobei ein Patient (TB5) positiv für die Mutation G12R war (Abb. 102, 104). Die Plasmaproben von Patient TB5 wurden zu allen drei Testzeitpunkten – prä, post und rest – gemessen und die ctDNA-Konzentration und -Fraktion bestimmt. Während die ctDNA-Konzentration über den Belastungszeitraum leicht anstieg, fiel der prozentuale Anteil der ctDNA an der gesamten cfDNA, die ctDNA-Fraktion, ab (Abb. 103d). In der Erholungsphase nach Ende der Belastung drehte sich diese Entwicklung um und die ctDNA sank unter den Ausgangswert ab, prozentual stieg der Anteil der ctDNA-Fraktion jedoch sogar noch über den Ausgangsanteil. Die Veränderung der ctDNA-Konzentration über den beobachteten Zeitraum gleicht folglich der der allgemeinen cfDNA, ist in ihrer Ausprägung aber etwas schwächer. Die beobachteten Unterschiede zwischen dem prä- und dem rest-Wert liegen allerdings bei 2 errechneten mutierten *KRAS*-Kopien oder 7 pg ctDNA pro ml Blutplasma, was etwa einer Kopie oder 3,5 pg ctDNA pro ml Blut entspricht, bzw. 0,04% ctDNA. Möglicherweise wird die ctDNA im Verhältnis zur sonstigen cfDNA während der Erholungsphase etwas schwächer abgebaut, aber da es sich hier um Einzelfallbeobachtungen handelt, kann in diesem Bereich keine klare Aussage getroffen werden. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber, dass die ctDNA durch körperliche Belastung ebenfalls verstärkt freigesetzt wird und lassen vermuten, dass der anschließende Abbau bis zum Ausgangsniveau oder sogar darunter vergleichbar zur gesamt-cfDNA abläuft. Diese Ergebnisse deuten daher eindeutig nicht darauf hin, dass auf die starke körperliche Belastung andauernd höhere ctDNA-Konzentrationen im Blut folgen. Dies ist eine entscheidende Fragestellung in der Untersuchung körperlicher Belastung bei Tumorerkrankungen, da in mehreren Arbeiten beschrieben wurde, dass zirkulierende Tumor-DNA-Fragmente in Zellen und in deren nukleäre DNA eindringen und so durch horizontalen Gentransfer das Zielgenom verändern können (*Garcia-Olmo et al., 2010, Lee et al., 2014, Trejo-Becerril et al., 2012*). Durch den starken Abbau der ctDNA während der Erholungsphase wird ein belastungsinduzierter, potentiell negativer Einfluss von zusätzlich erhöhten ctDNA-Konzentrationen im Blut sehr unwahrscheinlich.

Basierend auf den Studienergebnissen ergeben sich viele wichtige Fragestellungen, die in Folgeuntersuchungen zu klären sind. Zunächst sollten die hier erzielten Ergebnisse in einer Studie mit mehr Patienten, insbesondere mehr Patienten mit *KRAS*-Mutation zur Quantifizierung der ctDNA, bestätigt werden. Zudem ist die genaue Herkunft und der Art der Freisetzung der ctDNA unter körperlicher Belastung von Bedeutung, bisher aber ungeklärt. Für die Zukunft könnte es hierzu interessant sein, die DNA-Integrität der ctDNA zu bestimmen und mit der der cfDNA zu vergleichen. Dies könnte möglicherweise Rückschlüsse über die Herkunft der ctDNA zulassen. Denn falls die ctDNA, die direkt nach der Belastung zusätzlich im Blut zu finden ist, direkt aus Tumorzellen stammt, weist sie vermutlich eine hohe DNA-Integrität auf. Falls diese ctDNA hingegen von Vesikeln oder Phagozyten freigesetzt wurde, weist sie wahrscheinlich

eine niedrigere DNA-Integrität auf. In der Literatur sind in körperlicher Ruhe sowohl eine erhöhte (*Umetani et al., 2006c, Wang et al., 2003*) als auch eine erniedrigte cfDNA-Integrität (*Thierry et al., 2010*) bei Tumorpatienten beschrieben worden. Allerdings ist die genaue Herkunft und Beschaffenheit der freigesetzten cfDNA ebenfalls meistens nicht ausreichend bekannt. Für eine abschließende und umfassende Charakterisierung der freigesetzten ctDNA und cfDNA wäre eine vollständige Sequenzierung sowie Analyse der Methylierungsmuster der optimale Weg. Hierfür würden größere Mengen an Blutplasma benötigt, was im Falle von lediglich drei Blutabnahmen über den gesamten Zeitraum einer körperlichen Belastung durchführbar und ethisch vertretbar wäre.

Als zweite Folgeuntersuchung wäre eine genauere Kinetik von ctDNA-Freisetzung und -Abbau sinnvoll. Da Untersuchungen an gesunden Probanden kontinuierliche und belastungsabhängige Anstiege der cfDNA gezeigt haben (*Breitbach et al., 2014a*), kann dies möglicherweise auch für die ctDNA beobachtet werden, auch wenn es sich um vielfach weniger DNA handelt. Da für die PNB-qPCR allerdings aus kapillarem Blut abgenommene Blutvolumina nicht ausreichen, ist die technische Umsetzung hier schwieriger. Es müsste in einem solchen Versuchsaufbau nach jeder getesteten Stufe eine venöse Blutprobe entnommen werden, was während eines Belastungstests nicht nur schwierig ist, sondern für die Probanden auch nicht angenehm.

Aufgrund der Beobachtungen zu dieser Studie im Bereich der cfDNA-Unterschiede im Belastungsverlauf zwischen den beiden Testgruppen ist zudem die entscheidende, für Tumorpatienten belastungsphysiologisch vermutlich relevantere Phase, die Erholungsphase nach Ende der Belastung. Hier ist die wiederholte venöse Blutabnahme in der Umsetzung auch weniger problematisch, so dass eine serielle Blutabnahme – beispielsweise alle zehn Minuten – über einen bestehenden Zugang umsetzbar ist. Da sich ctDNA- und cfDNA-Abbau in Tumorpatienten nach Ende der Belastungsphase anscheinend von dem gesunder Individuen unterscheiden und die Entwicklung der DNase-AR zusätzlich nicht mit gesunden Individuen übereinstimmt, wären Serienblutabnahmen nach Belastungsende zur gekoppelten Analyse von cfDNA, ctDNA und DNase-AR vermutlich der logische nächste Schritt, um die veränderte Physiologie der Erholungsphase nach körperlicher Belastung zu ergründen.

Ergänzend ist die Langzeitwirkung von wiederholten körperlichen Belastungen, im besten Fall einem kontrollierten Sportprogramm, auf die Ruhe-ctDNA-Konzentrationen und auch die ctDNA-Anstiege unter Belastung notwendig. Dass sich wiederholte sportliche Aktivität für Tumorpatienten vorteilhaft auf Gesundheit und Lebensqualität auswirkt, ist nachgewiesen und wurde in der Einleitung bereits ausgeführt. Ob und wie genau sich dieser Einfluss in den ctDNA-Konzentrationen in Ruhe, nach Belastung und in der Erholungsphase auswirkt, kann eine wichtige Erkenntnis zur Erklärung und Koordinierung des Nutzens sportlicher Betätigung sein. Für diese Untersuchung ist ein betreutes längerfristiges Sportprogramm gekoppelt mit

Belastungstests mindestens vor und nach Ende der Sportintervention sinnvoll. Im besten Fall würden auch noch ein zusätzlicher Belastungstest zu einem weiteren Zeitpunkt während der Intervention sowie ein Test einige Zeit nach Beendigung der Intervention zur Untersuchung der Reversibilität eventueller Veränderungen durchgeführt.

In der hier beschriebenen Studie konnten erstmalig Erkenntnisse zur unterschiedlichen ctDNA- und cfDNA-Kinetik sowie den gleichzeitigen DNase-AR-Veränderungen in Tumorpatienten unter erschöpfender körperlicher Belastung und der anschließenden Erholungsphase gewonnen werden, die eine wichtige Basis für weitere Studien schaffen.

#### **4.4 Studie 2 - Entwicklungen frei zirkulierender Tumor-DNA bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während des Resektionsprozesses**

In der zweiten präsentierten Studie wurden Patienten mit kolorektalen Tumoren und Kontrollpatienten mit vergleichbaren Krankheitsbildern vor, während und nach Tumor- bzw. Darmteilresektionen Blutproben entnommen. Die cfDNA des gewonnenen Blutplasmas wurde mit drei verschiedenen qPCR-Anwendungen quantifiziert. Eine *KRAS*-Mutationsanalyse mittels PNB-qPCR wurde aus genomischer DNA aus Gewebeschnitten der betroffenen pathologischen Gewebe der Patienten sowie den Plasmaproben der Ruhewerte aller Patienten und aus ausgewählten Verlaufsproben *KRAS*-mutierter Patienten durchgeführt. Zudem wurde die DNase-1-Aktivitätsreduktion der entsprechenden Proben bestimmt.

Diese Studie ist ein neuer Ansatz zur Untersuchung von Kurzzeit-cfDNA- und -ctDNA-Kinetik, insbesondere durch die serielle Blutabnahme zum Zwecke der ctDNA-Analyse während des Operationsprozesses. So konnten für diesen Zeitraum genaue Übersichten über die bisher unbekanntem Entwicklungen der gesamten cfDNA- und der ctDNA-Konzentrationen sowie der DNase-AR im Vergleich erstellt werden. Durch die geringen Volumenansforderungen der PNB-qPCR bei gleichzeitig höchster Sensitivität konnten häufig abgenommene serielle Blutabnahmen geringer Volumina durchgeführt und analysiert werden, ohne den Patienten insgesamt zu hohe Blutmengen entnehmen zu müssen.

Es wurden in drei Patienten *KRAS*-Mutationen in der gDNA aus den FFPE-Schnitten detektiert, von denen zwei in den Plasmaproben bestätigt wurden. Zusätzlich wurde bei einem Kontrollpatienten mit einer zuvor *KRAS*-negativen Leukämie eine *KRAS*-Mutation im Plasma detektiert. Für diese drei Patienten konnten Verlaufsanalysen der ctDNA über wichtige Zeitpunkte des Operationsprozesses hinweg erstellt werden. Der Verlauf der ctDNA-Konzentrationen ähnelte sich bei allen drei Patienten. Nachdem die Werte direkt vor der Operation bereits deutlich unter denen vom Vortag gelegen hatten, sanken sie nach der Anästhesie weiter ab, bis keine oder kaum noch ctDNA detektiert werden konnte. Unmittelbar nach der Resektion stiegen die ctDNA-Werte dann steil an, fielen direkt im Anschluss aber wieder stark ab. Interessanterweise ließ sich der starke Anstieg der ctDNA nach Resektion auch bei OP13 beobachten, bei der die

*KRAS*-Mutation gar nicht in dem entfernten Gewebe zu finden war, sondern durch eine Leukämie in den Blutkreislauf und die cfDNA gelangt war. Die Ursache bzw. das Signal zur Freisetzung von ctDNA wird also vermutlich durch die Resektion ausgelöst, liegt aber nicht in der direkten Schädigung von mutiertem Gewebe begründet. Im postoperativen Zeitraum stiegen die ctDNA-Konzentrationen zum 24 h-post-Wert hin leicht und zum 72 h-post-Wert stärker an, allerdings nicht bis auf den Ausgangswert (Abb. 126). Diese Entwicklung war bei allen drei Patienten zu beobachten und steht im Kontrast zu den cfDNA-Entwicklungen. Die Kinetik der ctDNA und der allgemeinen cfDNA verliefen also unterschiedlich und unterliegen daher vermutlich anderen Mechanismen. Dass die ctDNA-Konzentrationen in den Tagen nach der Operation bei Patienten ohne bekannte Metastasen wieder anstieg, obwohl die Tumormasse entfernt worden war, sollte weiter untersucht werden. Es könnte durch tägliche Folgeblutabnahmen die postoperative Kinetik der ctDNA charakterisiert werden. Falls die Freisetzung 72 Stunden nach Ende der OP ein vorübergehender, einmaliger Vorgang ist, bei dem entstandene apoptotische oder nekrotische DNA freigesetzt wird, könnte möglicherweise eine Intervention überlegt werden, den Körper zu unterstützen, diese ctDNA-Anstiege schnellstmöglich abzubauen (*Hawes et al., 2015*), da ein tumorigener Einfluss von frei zirkulierender Tumor-DNA-Fragmente durch sogenannte „Genometastase“ nicht auszuschließen ist (*Garcia-Olmo et al., 2010, Mitra et al., 2012*). In Studien an Mäusen wurde bereits 1961 gezeigt, dass eine Behandlung mit DNase-1 einen Tag nach Implantation eines Tumors deutlich effektiver war als vier Tage danach (*De Lamirande, 1961*). In einer neueren Arbeit von Patutina *et al.* konnte dieses Ergebnis bestätigt werden, indem in einem Mausmodell gezeigt wurde, dass die Gabe von niedrigen Dosen DNase-1 oder auch RNase die Metastasierung von Tumoren hemmte (*Patutina et al., 2011*). Dies spricht ebenfalls für eine Kurzzeitüberwachung der ctDNA-Entwicklungen nach der Resektion.

Falls die gemessenen ctDNA-Konzentrationen nach der Tumorresektion bei Patienten ohne bekannte Metastasen dauerhaft auftreten, muss ihre Herkunft genauer bestimmt werden, da eine langfristige Freisetzung von ctDNA nur aus Tumor-Gewebe erfolgen kann. Eine Studie von Diehl *et al.* beschrieb einen Zusammenhang von postoperativ detektierter ctDNA und einem Wiederauftreten der Tumorerkrankung (*Diehl et al., 2008*), allerdings wurde dort in größeren Zeitabständen gemessen und eine tages- oder halbtagesgenaue Analyse wurde nicht durchgeführt. Möglicherweise lassen sich in den ersten Tagen oder sogar Stunden nach der Operation also basierend auf dem Wiederauftreten der ctDNA bereits prognostische Aussagen zum weiteren Krankheitsverlauf treffen.

Nach den Ergebnissen der Plasmaanalyse wurden die Patienten der Studie zur Auswertung in drei Gruppen eingeteilt: die Kontrollpatienten und die Tumorpatienten ohne *KRAS*-Mutationen im Plasma und die Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Plasma. Für alle Patienten wurden cfDNA-Verläufe aller Abnahmezeitpunkte mittels L1PA2-qPCR-Quantifizierung direkt aus dem



Plasma erstellt. Die cfDNA-Konzentrationen stiegen alle im Operationsverlauf an und erreichten ihr Maximum entweder nach der Resektion (PM-Gruppe), oder erst postoperativ (WT-Gruppen, Abb. 116, 117). Die gemessene postoperative Kinetik entsprach den Erwartungen der Hypothese und ähnelte der in der Literatur beschriebenen (*Diehl et al., 2008*), auch wenn ähnlich detaillierte Aufschlüsselungen bisher nicht veröffentlicht wurden.

Die cfDNA-Konzentrationen der in dieser Studie untersuchten Patienten lagen in Ruhe am Tag vor der Operation bei leicht erhöhten Werten im Vergleich zu Werten gesunder Gruppen, die in der Literatur zu finden sind und zumeist im Durchschnitt um die 10 ng/ml liegen (*Breitbach et al., 2012, Tug et al., 2014*). Zwischen den Gruppen lagen allerdings keine statistisch signifikanten Differenzen vor. Der Anstieg der cfDNA-Konzentrationen über den Operationsverlauf hingegen war unterschiedlich zwischen den Gruppen (Abb. 120), so dass sich spätere Werte zwischen den Gruppen signifikant unterschieden. Hier lagen die cfDNA-Konzentrationen der PM-Gruppe zu jeder Zeit über denen der WT-Gruppen. *KRAS*-Mutations-positive Patienten hatten somit höhere cfDNA-Grundkonzentrationen, die zusätzlich über den OP-Verlauf stärker anstiegen als die von WT-Patienten.

Durch die Verwendung einer individuellen Mittelung der cfDNA-Konzentrationen in bestimmten Zeitabschnitten in Kombination mit gruppeninternen Mittelwerten wurde der Einfluss abweichender Werte stark reduziert, so dass entstandene Ergebnisse weniger durch einzelne Patienten beeinflusst wurden (Abb. 116). Um dies weiter zu überprüfen, wurde der Vergleich der cfDNA-Entwicklungen auch unter Ausschluss von Patient OP17 durchgeführt, dessen cfDNA-Werte während einer Leber-Teilresektion drastisch anstiegen, mit dem gleichen Ergebnis. Sowohl die Unterteilung in die drei Gruppen, als auch die Unterteilung des Operationsverlaufs waren unabhängige signifikante Unterscheidungsmerkmale. Die Gruppenunterteilung war selbst nach Mittelung der individuellen Patientendaten innerhalb der letzten beiden der vier grob eingeteilten OP-Phasen – dem OP-Verlauf nach der Resektion und der postoperativen Phase – sowie an den Einzelzeitpunkten der Resektion, 3 h post-OP und 72 h post-OP, ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal, da die cfDNA-Konzentrationen in der Gruppe mit *KRAS*-Mutationen im Plasma signifikant höher waren als in den anderen Gruppen. Innerhalb jeder dieser Gruppen war zudem die grobe Unterteilung des Studienzeitraums in vier Zeitabschnitte ein signifikantes Unterscheidungsmerkmal, wobei in den beiden Tumorgruppen die stärksten Anstiege der cfDNA vor allem nach der Resektion, in der Kontrollgruppe erst nach Operationsende stattfanden (Abb. 117, 120).

Zudem wurde durch Korrelationen der individuell gemittelten Werte zwischen den Zeitabschnitten gezeigt, dass die cfDNA-Konzentrationen zwischen den ersten drei Zeitabschnitten deutlich besser miteinander korrelierten, als mit den Werten nach Ende der Operation. Dies deutet an, dass die schnellen, durch die Reize während der Operation ausgelösten cfDNA Anstiege individueller zu sein scheinen als die langsamen Anstiege in der Folgephase nach

Ende der Operation, insbesondere in der Kontrollgruppe. Dass die cfDNA-Konzentrationen der Tumorgruppe mit Plasmamutationen nachfolgend auf die Resektion ihren Höhepunkt erreichen, die der Kontrollgruppe und der Tumorgruppe ohne *KRAS*-Plasmamutationen jedoch erst in der postoperativen Phase, legt eine tumorspezifische Signalkaskade, ausgelöst durch den Resektionsprozess, nahe. Ob die *KRAS*-Mutation einen direkten Einfluss auf diesen Prozess hat, oder ob sie hier nur ein Marker für den Mutationsgrad der Tumoren war, muss noch geklärt werden.

Die Unterschiede der Differenzen zwischen den Gruppen in den cfDNA-Anstiegen während und nach der Operation sowie die genannten Unterschiede in den individuellen Korrelationen legen die Schlussfolgerung nahe, dass es sich hier um zwei unterschiedliche Mechanismen der cfDNA-Freisetzung handelt. Zusätzlich zeigte die ctDNA eine andere Kinetik als die gesamte cfDNA (Abb. 126), was wiederum zwei mögliche Komponenten von schnellen Freisetzungen mit unterschiedlichen Auslösern vermuten lässt. Dies wird in Abschnitt 4.5 diskutiert.

In der DNase-1-AR fand sich eine signifikant gegenläufige Entwicklung zur cfDNA, die DNase-AR nahm über den Operationsverlauf stark ab. Die DNase-Aktivität nahm also parallel zu den steigenden cfDNA-Konzentrationen zu. Somit findet eine stetige Freisetzung und keine konstante Akkumulation von cfDNA statt, da diese gleichzeitig verstärkt abgebaut wird. Im postoperativen Verlauf variierte die DNase-AR stärker, entwickelte sich aber auch hier den Erwartungen entsprechend gegenläufig zur cfDNA-Konzentration. Interessanterweise korrelierte die DNase-AR aber nur während der OP mit den cfDNA-Konzentrationen, wenn die vier gewählten Phasen des Operationsprozesses separat ausgewertet wurden, wie in Abbildung 125 gezeigt. In der präoperativen und der postoperativen Phase korrelierten DNase-AR und cfDNA nicht miteinander, unabhängig von der cfDNA-Konzentration. Möglicherweise zeigt dies, dass die schnelle Freisetzung der cfDNA einen größeren Einfluss auf die DNase-AR ausübt, als die Ruhewerte, oder aber, dass die cfDNA der Ruhephasen weniger von der DNase-1 abgebaut wird. Dies könnte in der Form begründet liegen, in der die cfDNA im Blut vorliegt. In diesem Fall läge die cfDNA bei schneller Freisetzung in einer Form vor, in der sie die DNase-AR beeinflusst, von der DNase also als abzubauenendes Edukt erkannt und folglich auch abgebaut wird. Vor und nach der Operation müsste die cfDNA nach dieser Theorie in einer Form vorliegen, in der sie von der DNase-1 entweder nicht erkannt wird, nicht erreicht wird oder diese zumindest nicht steuert. Möglicherweise ist also der extrazelluläre Abbau der cfDNA durch die DNase-1 in diesen Zuständen entweder nicht aktiv, oder er ist in diesen Phasen bei den untersuchten Patienten gestört. Eine solche Störung des Ruhestoffwechsels bei Tumorpatienten, bei gleichzeitig unauffällig verlaufenden Stoffwechselprozessen unter Belastung, entspräche den Beobachtungen der ersten Studie, in der die Tumorgruppe sich von der Kontrollgruppe vor allem in Ruhe und hier wiederum vor allem in der Erholungsphase unterschied, wobei in

der ersten Studie die DNase-AR mit der cfDNA in der Tumorguppe nicht, sondern nur in der Kontrollgruppe korrelierte. Allerdings korrelierten die Werte auch hier vor allem über den Verlauf der drei Zeitpunkte – prä, post und rest – hinweg und weniger zu den einzelnen Zeitpunkten. Diese Diskrepanz der Korrelation in einem Ruhezustand und einem Ausnahmezustand findet sich auch in anderen Studien wieder. So fanden Fahmüller *et al.* eine signifikante Korrelation zwischen im Blut zirkulierenden Nukleosomen und DNase-AR bei Tumorpatienten zwar nach einer Radioembolisationstherapie, aber nicht im Ruhezustand davor (Fahmueller *et al.*, 2013). An anderer Stelle wurden aber im direkten Vergleich zwischen Tumorpatienten und Kontrollpersonen Korrelationen zwischen hohen cfDNA-Konzentrationen mit niedrigen DNase-AR-Werten beschrieben (Cherepanova *et al.*, 2008, Tamkovich *et al.*, 2006). Die Wechselwirkungen der DNase-AR mit der cfDNA müssen in Zukunft noch weiter untersucht werden, um die Regulationsmechanismen der DNase mit den verschiedenen Freisetzungskinetiken und -mechanismen der cfDNA zu verstehen.

Insgesamt konnten hier in den Fallbeschreibungen der drei Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Plasma wichtige, gleich verlaufende Entwicklungen der untersuchten Parameter cfDNA, ctDNA und DNase-AR über den Operationsprozess und die angrenzenden Phasen beschrieben werden. Diese Studie ist die bisher erste Untersuchung, die zeigen konnte, dass die ctDNA unter der Anästhesie abfällt, kurzzeitig unmittelbar nach der Resektion ansteigt und anschließend wieder abfällt, bis sie in der postoperativen Phase wieder langsam ansteigt. Die cfDNA-Konzentrationen der Patienten mit *KRAS*-Mutationen im Plasma lag über denen der anderen Teilnehmer, unabhängig vom Tumorstatus, und stieg zusätzlich deutlich stärker im Operationsverlauf an. Des Weiteren konnte ein klarer Zusammenhang der bei allen Patienten auftretenden cfDNA-Anstiege über den Operationsverlauf mit der gegenläufigen Entwicklung der DNase-AR gezeigt werden. Dies ist die erste umfassende Analyse dieser drei molekularen Marker während des Operationsprozesses sowie der angrenzenden Tage und zeigt wichtige Entwicklungen in Abhängigkeit vom Einfluss der Operation und der Folgezeit. Basierend auf den Erkenntnissen zur ctDNA-Entwicklung wird klar, dass eine Analyse der ctDNA nicht zu jedem Zeitpunkt möglich ist, da die ctDNA-Konzentrationen im Operationsverlauf stark schwanken und zeitweise verschwanden. Darauf basierend konnten andererseits mit eindeutige Zeitpunkte für mögliche Analysen bestimmt werden – mindestens einen Tag vor Operationsbeginn, direkt nach der Resektion und dann erst wieder mindestens drei Tage nach Ende der Operation.

Diese Erkenntnisse sollten nachfolgend in weiteren Studien und Untersuchungen belegt oder erweitert werden, um die genauen Mechanismen der Freisetzungsprozesse und auch des Abbaus der zirkulierenden DNA zu verstehen. Die Ergebnisse der cfDNA-Kinetik sollten ebenso wie die ctDNA-Kinetik und die Entwicklung der DNase-AR aufgrund der geringen Gruppen-

größe der PM-Gruppe sowie der sehr hohen, vermutlich durch eine Leberresektion enorm gesteigerten, cfDNA-Konzentrationen des Patienten OP17 durch weitere Studien validiert werden. Zudem ist es unbedingt notwendig, die Auswirkungen verschiedener Anästhetika auf die ctDNA besser zu untersuchen, um die Reaktion der reduzierten ctDNA-Freisetzung zu verstehen, die in einem deutlichen Gegensatz zu der erhöhten Freisetzung von cfDNA steht. Es ist sinnvoll, diese Untersuchungen auf weitere Tumorentitäten auszuweiten, um durch mögliche Unterschiede und Gemeinsamkeiten weitere Informationen über die verschiedenen Eigenschaften der Tumoren zu gewinnen. Durch derartige Folgeuntersuchungen können direkte Rückschlüsse für den Operationsprozess und auch die angrenzenden Behandlungsphasen der Tumorpatienten möglich werden.

#### 4.5 Ursprung der cfDNA

Die „langsame“ Freisetzung von cfDNA nach Ende der Operation entsteht potentiell durch Zellnekrose oder Apoptose, deren Zeitablauf mit der beobachteten Kinetik übereinstimmt. Die Apoptose erreicht ihren Höhepunkt erst bei etwa 16-24 Stunden (*Lizard et al., 1995*), was genau mit den Anstiegen der cfDNA-Konzentrationen in den WT-Patienten, vor allem der Kontrollgruppe, übereinstimmt, die die höchsten Werte bei 24 Stunden nach Ende der OP zeigten (Abb. 119). Ein Argument für eine vorwiegend apoptotische Freisetzung ist die Beobachtung, dass sich das Verhältnis von langen zu kurzen cfDNA-Fragmenten während dieses Zeitraums nicht verändert, was bei nekrotischen Prozessen unwahrscheinlich wäre. Zudem steigt die DNA-Integrität, die sich aus dem Quotienten der langen Fragmente durch die kurzen Fragmente ergibt, im postoperativen Prozess nicht an, und belegt somit, dass die langen cfDNA-Fragmente keinen entscheidenden Einfluss auf cfDNA-Anstiege haben (Abb. 121 + 122). Apoptotische DNA-Produkte liegen zumeist als Vielfache von 180 bp vor, der Länge der DNA, die von einem Nukleosom eingeschlossen wird (*Nagata, 2000*). In der cfDNA liegt der größte Teil der apoptotischen Fragmente in kurzer Form vor (ca. 180 bp), da DNasen die Fragmente an der Linker-DNA zwischen den Nukleosomen zerschneiden (*Jahr et al., 2001*). Im Gegensatz dazu liegt nekrotische DNA in verschiedenen Längen vor, vor allem aber zunächst in langen Fragmenten, da mit der Nekrose keine systematische Zerschneidung der DNA einhergeht, bevor diese freigesetzt wird (*Jahr et al., 2001*). Allerdings können DNA-Fragmente aus nekrotischen Zellen auch in kurzer Form vorliegen, wenn sie zuvor von Makrophagen phagozytiert und anschließend abgegeben worden sind (*Tran et al., 2008*).

Nekrose und Apoptose können hingegen als direkte Ursache für die schnelle Freisetzung von cfDNA während der Operationen größtenteils ausgeschlossen werden, da diese Prozesse langwieriger sind. Obwohl die zelluläre initiale Aktivierung der apoptotischen Prozesse innerhalb weniger Minuten stattfinden kann, dauert der Gesamtprozess mehrere Stunden oder Tage (*Green, 2005, Jiang et al., 2003, Lizard et al., 1995*). Für den Vorgang der cfDNA- und

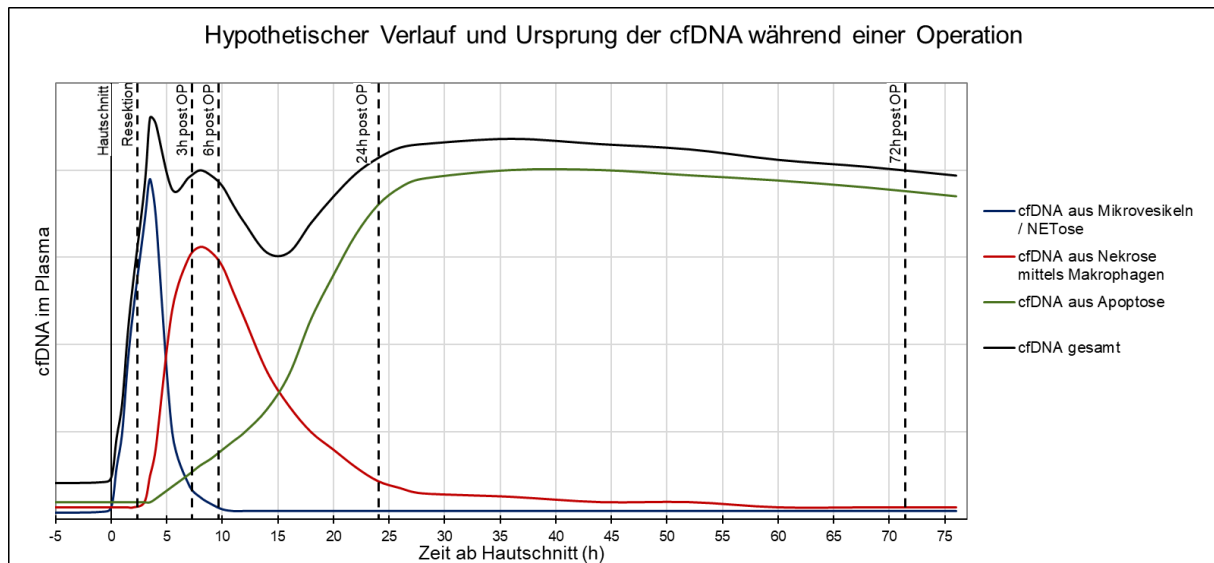
auch ctDNA-Freisetzung während der Operation sind vermutlich aktive Mechanismen verantwortlich, wie die Freisetzung durch Mikrovesikel (*Balaj et al., 2011, Kahlert et al., 2014, Lazaro-Ibanez et al., 2014, Lee et al., 2014, Thakur et al., 2014*), monozytäre Zellen (*Choi et al., 2005*), oder auch in Form von Extracellular Traps (*Demers et al., 2012*).

Ein erhöhtes Vorkommen von Exosomen in Patienten mit kolorektalem Karzinom im Verhältnis zu einer gesunden Kontrollpopulation wurde bereits beschrieben (*Silva et al., 2012*). Außerdem wurden in mehreren Arbeiten lange und kurze doppelsträngige Sequenzen in Exosomen detektiert, die aus dem Serum (*Kahlert et al., 2014*) und Plasma (*Lazaro-Ibanez et al., 2014*) von Patienten mit Pankreastumoren stammten oder in Studien mit verschiedenen Zelllinien gewonnen wurden (*Thakur et al., 2014*). Auch hier konnten Sequenzen des gesamten Genoms detektiert werden, teilweise auch mutierte *KRAS*- und *p53*- (*Kahlert et al., 2014*) bzw. *BRAF*- und *EGFR*-Sequenzen (*Thakur et al., 2014*). *Lee et al.* beschrieben eine Stimulation der Freisetzung kleiner extrazellulärer Vesikel durch mutierte *HRAS*-Sequenzen in Rattenzellen *in vitro*, welche doppelsträngige DNA-Sequenzen des gesamten Genoms beinhalteten (*Lee et al., 2014*). Die meisten dieser extrazellulären Vesikel konnte vermutlich den Exosomen zugeordnet werden, da diese größtenteils erst nach Zentrifugationsschritten mit hoher Zentrifugationskraft sedimentierten (*Lee et al., 2014*).

Dies stimmt mit der Beobachtung dieser Arbeit überein, dass Patienten mit *KRAS*-Mutationen, insbesondere während der Phasen der schnellen Freisetzung von cfDNA, im Genom höhere cfDNA-Konzentrationen aufwiesen und spricht für eine Freisetzung, zumindest eines Teils der cfDNA, via extrazellulärer Vesikel.

Einen weiteren Anteil an der cfDNA in dieser sowie auch in anderen Phasen des Operationsprozesses könnte die Bildung von Neutrophil Extracellular Traps (NETs) haben. Diesen Verbindungen aus DNA-Ketten und Peptiden, deren Funktion die Abwehr von eindringenden Mikroorganismen ist (*Brinkmann et al., 2004, Brinkmann and Zychlinsky, 2012*), wird zunehmend eine größere Rolle in der Tumorentstehung und -progression zugesprochen (*Cools-Lartigue et al., 2014*). *Demers et al.* zeigten in einem Mausmodell, dass durch einen externen Stimulus bereits nach einer Stunde die Freisetzung von NETs ausgelöst werden konnte, einhergehend mit starken Anstiegen der cfDNA und deutlichen Verringerungen der Zahl neutrophiler Granulozyten (*Demers et al., 2012*). Auch wenn diese Studie keine strukturelle Verbindung zu den hier durchgeführten Studien aufweist, unter anderem da chemische externe Reize verwendet wurden, so zeigt sie doch die Möglichkeit einer sehr schnellen Freisetzung von cfDNA in Form von NETs in Anwesenheit von Tumoren auf. Da die Formierung und Freisetzung von NETs vermutlich in erster Linie immunologische Gründe hat, könnte ein operativer Eingriff durchaus als Auslöser in Frage kommen. Die Anwesenheit von NETs in Tumorsektionen aber nicht im umliegenden gesunden Gewebe nach der Tumoresektion wurde bereits in einer kürzlich veröffentlichten Studie belegt (*Arelaki et al., 2016*). Ein solcher Zusammenhang wurde zudem *in*

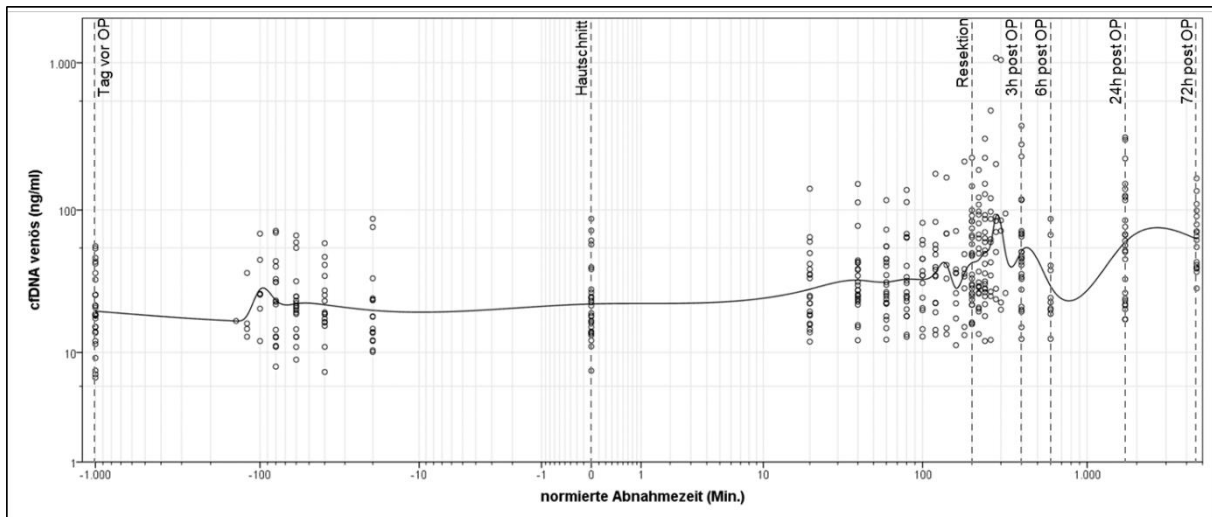
*vivo* in einem Mausmodell gezeigt, in dem unter Einwirkung von operativem Stress auf Mäuse deutliche Anstiege in NET-DNA im Blut dieser Mäuse bereits sechs Stunden nach der Operation festgestellt werden konnte (Tohme et al., 2016). Der Zusammenhang dieser Formationen mit einer gesteigerten Wahrscheinlichkeit der Metastasierung und einem geringeren Disease Free Survival deutete zudem einen negativen Einfluss der NETs auf den Gesundheitszustand im postoperativen Prozess an (Tohme et al., 2016). Ob NETs und tumorassoziierte neutrophile Granulozyten (TANs) in ihrer Wirkung nur pro-Tumor oder auch pro-Wirt funktionieren ist nach wie vor unklar und muss in zukünftigen Studien untersucht werden (Kim and Bae, 2016).



**Abbildung 129** Hypothetischer Verlauf der cfDNA-Freisetzung und Anteil verschiedener Mechanismen

In dieser Graphik ist das postulierte Zusammenspiel der verschiedenen Mechanismen der cfDNA-Freisetzung im Operationsverlauf abgebildet. Die zeitlich früheste Freisetzung durch Mikrovessikel oder NETose ist in Blau dargestellt, die Freisetzung durch das Zusammenspiel von Nekrose und Makrophagen, die etwa 5 Stunden nach Beginn der OP stattfindet, in Rot, die Freisetzung durch Apoptose in Grün und die Gesamtfreisetzung von cfDNA in Braun. Die Verläufe und auch die Vorgänge an sich sind hypothetisch und von in der Literatur beschriebenen Prozessen abgeleitet. Die Kinetiken richten sich nach beschriebenen Verläufen. Die Entwicklung der gesamt-cfDNA-Konzentration stimmt weitgehend mit den beobachteten cfDNA-Werten überein (Abb. 130). Unklar sind die Geschwindigkeiten, in denen die jeweiligen Mechanismen nach dem Anstieg wieder absinken.

Gegen einen hohen Anteil der NETs am schnellen Anstieg der cfDNA während der Operation spricht hingegen die Fragmentlänge der NETs, die aus langkettiger DNA bestehen (Pisetsky, 2012). Die Konzentrationen langer Fragmente steigen zwar über den OP-Verlauf an, der Anteil der langen DNA-Fragmente nimmt aber tendenziell eher ab. Dies spricht für eine andere Herkunft des Großteils dieser cfDNA, jedoch nicht gegen die generelle Freisetzung von NETs. Da diese Strukturen noch nicht umfassend erforscht sind, ist ein Zusammenhang der intraoperativ ansteigenden cfDNA mit NETs zudem noch nicht abschließend zu klären.



**Abbildung 130** cfDNA-Konzentrationen im normierten Kurvenverlauf

Die mit der L1PA2-qPCR gemessenen venösen cfDNA-Werte (Y) gegen die Zeit in Minuten (X) aufgetragen. Die Zeiten der einzelnen Messwerte wurden insofern normiert, als alle Resektionszeitpunkte auf 200 Minuten nach dem Hautschnitt gelegt wurden und die nachfolgenden Abnahmen von diesem Punkt ausgehend weitergeführt wurden. Die genauen Abnahmezeiten wurden zum Zwecke der Übersicht und Vergleichbarkeit auf 20-Minuten-Schritte gerundet. Der Wert 3 h nach Operationsende wurde auf 400 Minuten nach Operationsbeginn festgelegt, der 6 h post-Wert auf 600 Minuten, der 24 h post-Wert auf 1700 Minuten und der 72 h post-Wert auf 4600 Minuten. In den meisten Fällen stimmten diese Näherungswerte weitgehend mit den tatsächlichen Werten überein. Durch die Normierung wurden die gemittelten Zeitabläufe nicht durch abweichend lange oder kurze Operationszeiten verfälscht. Die normierte Abnahmezeit korrelierte über alle Werte verglichen besser mit den cfDNA-Werten als die tatsächliche Abnahmezeit. Der Kurvenverlauf zeigt drei Peaks: einen ersten nach der Resektion, allerdings nicht direkt, sondern etwa zwei Abnahmen später, einen zweiten zum Zeitpunkt drei Stunden nach Operationsende und einen langen Peak ab 24 Stunden nach OP-Ende. Dies stimmt ungefähr mit dem hypothetischen Kurvenverlauf basierend auf den möglichen Freisetzungsmechanismen in Abbildung 129 überein. Da nicht für alle Patienten alle Zeitpunkte vorhanden waren und sich die interindividuellen cfDNA-Konzentrationen sehr unterschieden, schwanken die Mittelwerte naturgemäß.

Über die mögliche Freisetzung von nekrotischer und apoptotischer DNA unter Mitwirkung von Makrophagen ist ebenfalls noch wenig bekannt. Choi *et al.* konnten bereits 2005 in einer Studie in einem *in-vitro*-Modell zeigen, dass nekrotische Zellen in Anwesenheit von Makrophagen in der Zellkultur hohe Mengen an DNA ins extrazelluläre Medium freisetzen, ohne Makrophagen jedoch nicht (Choi *et al.*, 2005). Hierbei war die Längenstruktur der DNA von der Art der induzierten Nekrose abhängig und die Konzentration der freigesetzten DNA vom Verhältnis der nekrotischen zu apoptotischen Zellen (Choi *et al.*, 2005). Auf die Freisetzung von DNA aus apoptotischen Zellen hatten die Makrophagen keinen Einfluss. In dieser Studie wurde jedoch die Kinetik der DNA-Freisetzung nicht untersucht. In einer weiteren Arbeit wurde hingegen *in vivo* in einem Mausmodell die Freisetzung von DNA nach Gabe von apoptotischen und nekrotischen humanen Zellen in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Makrophagen nachgewiesen (Jiang *et al.*, 2003). Diese DNA bestand vorrangig aus kurzen Fragmenten, stammte zu großen Teilen aus den applizierten Zellen und wurde in einem Zeitraum von ca. 5 Stunden nach Gabe der sterbenden Zellen freigesetzt (Jiang *et al.*, 2003). Eine Untersuchung von Tran *et al.*, in der in einem Mausmodell Leberzellen durch Hepatotoxine abgetötet worden waren,

zeigte, dass sowohl DNA apoptotischen als auch nekrotischen Ursprungs in kurzen mononucleosomalen Fragmenten oder in vielfachen von 180 bp 6 Stunden nach der Induktion des Zelltodes im Blut der Mäuse vorlagen (*Tran et al., 2008*). Aufgrund dieser Studien alleine können hier keine definitiven Schlussfolgerungen für die vorliegende Freisetzungskinetik aufgestellt werden. Möglich wäre aber, dass durch den Operationsprozess Nekrose in Zellen induziert wurde und Makrophagen die Freisetzung von DNA aus diesen nekrotischen Zellen bewirken. Allerdings würde diese Freisetzung aufgrund der berichteten Zeitverläufe nicht die unmittelbare, sondern eher eine Freisetzung von cfDNA im mittleren Zeitverlauf von 3 bis 6 Stunden nach Ende der Operation begründen. An diese Freisetzung schliesse sich der postulierte cfDNA-Anstieg durch Apoptose an, wie in Abbildung 129 hypothetisch dargestellt ist.

Die DNA könnte auch im Falle aktiver Freisetzung ebenfalls apoptotischen Ursprungs sein, in diesem Fall aber bereits existenten Apoptotic Bodies, die von Zellen aufgenommen werden (*Bergsmedh et al., 2001*) und möglicherweise in der Folge wieder abgegeben werden können. Falls zu einem früheren Zeitpunkt apoptotische DNA von Makrophagen aufgenommen wurde und auf ein Signal hin während der Operation abgegeben wird, lässt sich durch eine Fraktionierungsanalyse vermutlich kein Unterschied zu DNA direkt aus der Apoptose feststellen.

Die Mechanismen der Freisetzung von cfDNA unter körperlicher Belastung, die in der Belastungsstudie festgestellt wurden, verlaufen vermutlich zumindest teilweise auf anderem Wege als die durch die Operationen ausgelösten Mechanismen. Der Freisetzung von cfDNA unter körperlicher Belastung in Form von Exosomen wurde in einer Studie widersprochen, in der Blutproben nach Belastungstests auf dem Fahrradergometer durch Hyperzentrifugation in verschiedene Fraktionen aufgeteilt worden waren (*Helmig et al., 2015*). Hierbei hatte sich in der sedimentierten Fraktion nach Zentrifugation bei 100.000 x g kaum cfDNA gefunden, im Überstand dieser Zentrifugation hingegen schon, obwohl die Freisetzung von Vesikeln durch die körperliche Belastung stark angestiegen war (*Fruhbeis et al., 2015, Helmig et al., 2015*). Die cfDNA, die während der Belastung freigesetzt wurde, könnte teilweise in Form von NETs in das Blut gelangt sein. Die durch körperlicher Belastung ausgelöste Entstehung von NETs und die Korrelation der post-cfDNA-Werte mit Konzentrationen von Myeloperoxidase, die vor allem in den Granula der neutrophilen Granulozyten vorkommt, wurde bereits von *Beiter et al.* nachgewiesen (*Beiter et al., 2014*). Gleichzeitig wurde dort gezeigt, dass die cfDNA-Anstiege nicht mit Markern für Muskelschäden korrelierten, was wiederum die Theorie der aktiven Freisetzung von cfDNA, zum Beispiel in Form von NETs, stützt. Im Gegensatz zur NETose, bei der die Zellen in der Regel sterben (*Brinkmann and Zychlinsky, 2007*) und die mehrere Stunden dauert, zeigten *Pilsczek et al.*, dass NETs auch innerhalb sehr kurzer Zeitabschnitte, bereits nach wenigen Minuten, freigesetzt werden können, ohne dass die Zellen sterben (*Pilsczek et al., 2010*). Sowohl die Geschwindigkeit der Freisetzung von NETs als auch die andauernde



Lebensfähigkeit der neutrophilen Granulozyten konnten in anderen Untersuchungen bestätigt werden (*Yipp et al., 2012*). Dies macht NETs als Quelle der cfDNA nach Belastung nicht von der Zahl neutrophiler Granulozyten abhängig. In einer Studie, in der Sportler in Form eines Laufbandtests belastet wurden, konnte für eine Mehrheit der Probanden gezeigt werden, dass nach der körperlichen Belastung vermehrt lange DNA-Fragmente ( $\geq 222$  bp) im Blut zu finden waren und somit die DNA-Integrität anstieg (*Breitbach et al., 2014a*). Dies spricht ebenfalls für die Möglichkeit der cfDNA-Freisetzung in Form von NETs, da diese, wie bereits erwähnt, aus längerer DNA bestehen.

Zusätzlich spricht die Beobachtung der vorliegenden Arbeit dafür, dass ein Teil der cfDNA in der Erholungsphase aus NETose resultierte, da die Zahl der neutrophilen Granulozyten nur prä und post, aber nicht rest mit den rest-Konzentrationen der cfDNA korrelierte, wohingegen es keine Zusammenhänge zwischen Granulozyten und cfDNA in der Belastungsphase gab (Tab. 10). Die Zahl der neutrophilen Granulozyten vor Belastung korrelierte also mit der cfDNA-Konzentration 90 min nach Belastung. Zudem fiel der Abfall der cfDNA geringer aus, wenn rest viele neutrophilen Granulozyten vorhanden waren. Diese Ergebnisse betreffen allerdings die cfDNA-rest-Konzentrationen und die cfDNA-Abfälle, also die Nachbelastungsphase. Die schnellen cfDNA-Anstiege in der Belastungsphase scheinen hier eher in einem Zusammenhang mit den Lymphozyten zu stehen, wobei mögliche direkte Zusammenhänge und die Mechanismen der Freisetzung nicht geklärt wurden. Diese Hypothesen werden weiter gestützt von der Beobachtung, dass ein Großteil der, durch körperliche Belastung freigesetzten, cfDNA aus hämatopoetischen Blutzellen stammt (*Tug et al., 2015*).

Da die cfDNA-Konzentrationen unter körperlicher Belastung innerhalb weniger Minuten stark ansteigen, sich in nur 3 Minuten verdoppeln können (*Breitbach et al., 2014a*), ist eine Freisetzung mittels regulärer Apoptose oder Nekrose ausgeschlossen. Eine mögliche cfDNA-Quelle wäre aber die Freisetzung in Form von Apoptotic Bodies (*Bergsmedh et al., 2001*), was praktisch eine verzögerte Freisetzung zuvor entstandener apoptotischer DNA darstellen würde. Zusätzlich berichteten *Fatouros et al.* von erhöhten cfDNA-Konzentrationen zwischen vier und sechs Stunden nach einer erschöpfenden Belastung, nachdem die Konzentrationen innerhalb von einer Stunde nach Ende der Belastung abgefallen waren. Diese Anstiege könnten potentiell mit den Beobachtungen der Operationsstudie übereinstimmen, eventuell mit dem Hintergrund der nekrotisch bedingten Freisetzung (*Fatouros et al., 2010*). Dieser Zeitraum wurde in den meisten Studien zur körperlichen Belastung und cfDNA nicht untersucht. Insgesamt scheinen somit aktive Mechanismen für die schnelle Freisetzung von cfDNA während körperlicher Belastung verantwortlich zu sein, wobei die Beteiligung von NETs und eventuell Mikrovesikeln, aber nicht Exosomen, wahrscheinlich ist. Eine genaue Untersuchung dieser cfDNA könnte mit

neuen Methoden zur Charakterisierung von cfDNA auf der Methylierungsebene möglich werden (*Snyder et al., 2016*), so dass Art und Herkunft der schnell freigesetzten cfDNA abschließend geklärt werden könnten.

Während die ctDNA unter körperlicher Belastung parallel zur cfDNA verstärkt auftrat, was in diesem Fall auf ähnliche Mechanismen schließen lässt, verlief die Konzentrationsentwicklung der ctDNA über den Operationsverlauf gänzlich anders als die der gesamten cfDNA. NETose scheidet vermutlich als Herkunft der ctDNA aus, das diese ja von nichtmutierten körpereigenen Granulozyten durchgeführt wird. Mehrere Freisetzungsmechanismen bieten sich an.

Vesikel von Fresszellen, die zuvor Tumorzellen oder deren Überreste aufgenommen hatten, könnten durch einen Reiz ausgeschüttet werden und könnten potentiell die schnell ansteigenden ctDNA-Konzentrationen in beiden Studien erklären. Da das Vorkommen von ctDNA in freigesetzten extrazellulären Vesikeln bereits beschrieben wurde (*Lee et al., 2014*) und diese Art der Freisetzung vermutlich die schnellste ist, ist diese die am wahrscheinlichsten erscheinende Quelle der hier beschriebenen ctDNA-Kinetik.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine aktive Freisetzung der ctDNA aus zirkulierenden Tumorzellen, wobei diese selten sind und vor allem in fortgeschrittenen, zumeist metastasierten, Tumoren auftreten (*Alix-Panabieres et al., 2012*) und somit für einen Großteil der ctDNA nicht verantwortlich sein können. Tumorassoziierte Immunzellen wie vor allem tumorassoziierte Makrophagen (TAMs), tumorassoziierte neutrophile Granulozyten (TANs), aber auch tumorassoziierte Leukozyten (TILs) oder regulatorische T-Zellen könnten in die Freisetzung der ctDNA eingebunden sein. Eine Studie an Frauen mit Ovarialkarzinomen konnte allerdings keine Zusammenhänge von TAMs und TILs mit Tumor-DNA im Plasma in Ruhe feststellen (*Shah et al., 2008*), was für CRC und die hier untersuchten physiologischen Ausnahmezustände neu untersucht werden müsste. Ob TANs verstärkt NETs ausschütten ist trotz erster Hinweise noch unklar (*Berger-Achituv et al., 2013*), einen Zusammenhang mit verstärkter Tumor-DNA konnte man bisher noch nicht nachweisen. Die in dieser Arbeit getroffene Beobachtung, dass der Patient OP13 mit einer *KRAS*-Mutation in Zusammenhang mit einer Leukämie die gleichen ctDNA-Anstiege aufwies wie die Patienten mit soliden Tumoren, spricht allerdings gegen tumorinfiltrierende Immunzellen als ctDNA-Herkunft, da hier keine solide Tumormasse vorlag. Apoptose und Nekrose scheiden aus oben bereits genannten Gründen als Ursachen für die schnelle ctDNA-Freisetzung aus, könnten in der Operationsstudie aber verantwortlich für die späte Freisetzung im Zeitraum 72 Stunden nach Operationsende sein.

Basierend auf der aktuellen Studienlage und den getroffenen Beobachtungen lassen sich also vielfältige Hypothesen aufstellen, aber noch nicht überprüfen. Neueste Fortschritte in der Analyse von cfDNA-Fragmenten, die deren Herkunft aufgrund von Längenunterschieden und Methylierungsmustern zuordnen können, könnten die Klärung dieser Fragen ein großes Stück

näherbringen (*Lehmann-Werman et al., 2016, Snyder et al., 2016*). Zudem können neue Methoden der DNA-Ligation, zum Beispiel vor Sequenzierungen, umfassendere Bandbreiten an DNA-Fragmenten erfassen und analysieren (*Burnham et al., 2016*). Somit sollte Herkunft der cfDNA und der ctDNA technisch in absehbarer Zeit zu ergründen sein. Mit diesem Wissen sind in der Folge die Erkenntnisse über Mechanismen und damit auch verschiedene Auslöser der ctDNA-Entstehung und Freisetzung in greifbarer Nähe.

## 5 Zusammenfassung

Krebs ist in den Industrienationen eines der höchsten Gesundheitsrisiken, mit steigender Tendenz. Auch steigende Kenntnisse zu gesunder Ernährung, sportlicher Aktivität, Risikofaktoren und einem allgemein gesunden Lebensstil sind bisher nicht in der Lage gewesen, die Inzidenzrate der Tumorneuerkrankungen signifikant zu senken. Durch die unterschiedlichen Krankheitsverläufe und die hohe Heterogenität von Tumoren wird zudem immer deutlicher, dass es kein universelles Allheilmittel geben wird. Somit kommt der Krebsdiagnostik die entscheidende Rolle zu, das benötigte Wissen für optimale, möglichst individuelle Therapien für Patienten zu generieren. In den letzten Jahren und Jahrzehnten wurden viele molekularbiologische Methoden entwickelt, um genaue Kenntnisse über Tumoranatomie, -physiologie und insbesondere Tumorgenetik zu gewinnen, die ein Schlüssel zur Therapie sein kann.

Verschiedenste Ansätze, wie die Quantifizierung zirkulierender Tumorzellen (CTCs), zellfreier DNA (cfDNA) und zellfreier Tumor-DNA (ctDNA) zeigten ihren diagnostischen, prognostischen und prädiktiven Wert in zahlreichen Studien. Gerade die ctDNA scheint hierbei einen großen Wert zu besitzen. Sie kann auf nicht- bis gering-invasivem Wege gewonnen werden, entweder durch Stuhl- oder Urinproben, oder aber durch Blutserum oder -plasma. Mittels DNA-Sequenzierung, quantitativer real-time- oder digitaler PCR oder Verbindungen dieser Ansätze ist es mittlerweile möglich, kleinste Konzentrationen an ctDNA anhand von einzelnen Mutationen, Methylierungsmustern Strukturanomalien oder zu detektieren und zu quantifizieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde im ersten Schritt eine hochsensitive und -spezifische mutationspezifische nested-qPCR Methode mit WT-Blocker entwickelt, genannt PNB-qPCR, die ctDNA anhand von *KRAS*-Punktmutationen erkennt. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung auch einstelliger Konzentrationen an ctDNA-Fragmenten in einem tausendfachen WT-DNA-Überschuss. Diese Methode ist kostengünstig, mittels Standardapparaturen durchführbar und im Einsatzvolumen sehr flexibel, so dass sehr geringe Templatevolumina eingesetzt werden können, wenn das Probenvolumen eingeschränkt ist, andererseits aber auch sehr große Volumina analysiert werden können, wenn die ctDNA-Konzentration sehr niedrig ist.

Diese Analysemethode wurde in zwei Studien an Tumorpatienten erfolgreich eingesetzt. In der ersten Studie wurden Tumorpatienten und Kontrollprobanden auf einem Fahrradergometer ausbelastet und es wurden vor, direkt nach und 90 Minuten nach Ende der Belastung Blutproben entnommen. In diesen wurden cfDNA- und potentiell ctDNA-Konzentrationen sowie DNase-1-Aktivitätsreduktion und Blutparameter bestimmt. Es zeigte sich, dass die ctDNA, ebenso wie die cfDNA, während der Belastung ansteigt und in der Erholungsphase wieder absinkt. Außerdem wies die Tumorgruppe eine deutlich reduzierte Erholungskinetik bezüglich der cfDNA nach der Belastung auf.

In der zweiten Studie wurden Tumorpatienten und Kontrollpatienten vor, während und in den Tagen nach einer Tumor- bzw. Darmgeweberesektion Blutproben entnommen und auf cfDNA

und ctDNA sowie DNase-AR hin analysiert. Während die cfDNA über den OP-Verlauf hin anstieg, und dies besonders stark bei Patienten mit nachweisbaren *KRAS*-Mutationen im Plasma, zeigte die ctDNA einen spezifischeren Verlauf. Sie fiel während des OP-Verlaufs ab, stieg nur direkt nach der Resektion kurzzeitig an und stieg dann wieder in den Tagen nach der Operation langsamer wieder an. Diese Entwicklung ließ sich nicht anhand anderer Parameter erklären und wurde vermutlich durch spezifische Signale ausgelöst. In beiden Studien zeigte die DNase-AR eine der cfDNA gegenläufige Entwicklung bei deutlichen Veränderungen, korrelierte mit dieser aber nicht im Ruhezustand.

In beiden Studien konnte die PNB-qPCR erfolgreich minimale ctDNA-Konzentrationen quantifizieren und wichtige Erkenntnisse und Anhaltspunkte für weitere Studien generieren, die die Herkunft der ctDNA sowie genaue Mechanismen der Freisetzung klären müssen.

## 6 Literatur

- ABIOYE, A. I., ODESANYA, M. O. & IBRAHIM, N. A. 2015. Physical activity and risk of gastric cancer: a meta-analysis of observational studies. *British journal of sports medicine*, 49, 224-9.
- ALEKSANDROVA, K., PISCHON, T., JENAB, M., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., FEDIRKO, V., NORAT, T., ROMAGUERA, D., KNUPPEL, S., BOUTRON-ROUULT, M. C., DOSSUS, L., DARTOIS, L., KAAKS, R., LI, K., TJONNELAND, A., OVERVAD, K., QUIROS, J. R., BUCKLAND, G., SANCHEZ, M. J., DORRONSORO, M., CHIRLAQUE, M. D., BARRICARTE, A., KHAW, K. T., WAREHAM, N. J., BRADBURY, K. E., TRICHOPOULOU, A., LAGIOU, P., TRICHOPOULOS, D., PALLI, D., KROGH, V., TUMINO, R., NACCARATI, A., PANICO, S., SIERSEMA, P. D., PEETERS, P. H., LJUSLINDER, I., JOHANSSON, I., ERICSON, U., OHLSSON, B., WEIDERPASS, E., SKEIE, G., BORCH, K. B., RINALDI, S., ROMIEU, I., KONG, J., GUNTER, M. J., WARD, H. A., RIBOLI, E. & BOEING, H. 2014. Combined impact of healthy lifestyle factors on colorectal cancer: a large European cohort study. *BMC medicine*, 12, 168.
- ALIX-PANABIÈRES, C., SCHWARZENBACH, H. & PANTEL, K. 2012. Circulating tumor cells and circulating tumor DNA. *Annual review of medicine*, 63, 199-215.
- AMADO, R. G., WOLF, M., PEETERS, M., VAN CUTSEM, E., SIENA, S., FREEMAN, D. J., JUAN, T., SIKORSKI, R., SUGGS, S., RADINSKY, R., PATTERSON, S. D. & CHANG, D. D. 2008. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26, 1626-34.
- ANDERSEN, R. F., SPINDLER, K. L., BRANDSLUND, I., JAKOBSEN, A. & PALLISGAARD, N. 2015. Improved sensitivity of circulating tumor DNA measurement using short PCR amplicons. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 439, 97-101.
- ANKER, P., LEFORT, F., VASIOUKHIN, V., LYAUTEY, J., LEDERREY, C., CHEN, X. Q., STROUN, M., MULCAHY, H. E. & FARTHING, M. J. 1997. K-ras mutations are found in DNA extracted from the plasma of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology*, 112, 1114-20.
- ANKER, P., STROUN, M. & MAURICE, P. A. 1975. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer research*, 35, 2375-82.
- ARELAKI, S., ARAMPATZIOGLOU, A., KAMBAS, K., PAPAGORAS, C., MILTIADES, P., ANGELIDOU, I., MITSIOS, A., KOTSIANIDIS, I., SKENDROS, P., SIVRIDIS, E., MAROULAKOU, I., GIATROMANOLAKI, A. & RITIS, K. 2016. Gradient Infiltration of Neutrophil Extracellular Traps in Colon Cancer and Evidence for Their Involvement in Tumour Growth. *PLoS one*, 11, e0154484.
- ATAMANIUK, J., STUHLMEIER, K. M., VIDOTTO, C., TSCHAN, H., DOSENBACH-GLANINGER, A. & MUELLER, M. M. 2008. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *European journal of applied physiology*, 104, 711-7.
- ATAMANIUK, J., VIDOTTO, C., KINZLBAUER, M., BACHL, N., TIRAN, B. & TSCHAN, H. 2010. Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *European journal of applied physiology*, 110, 695-701.
- ATAMANIUK, J., VIDOTTO, C., TSCHAN, H., BACHL, N., STUHLMEIER, K. M. & MULLER, M. M. 2004. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clinical chemistry*, 50, 1668-70.
- BALAJ, L., LESSARD, R., DAI, L., CHO, Y. J., POMEROY, S. L., BREAKEFIELD, X. O. & SKOG, J. 2011. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature communications*, 2, 180.
- BALLARD-BARBASH, R., FRIEDENREICH, C. M., COURNEYA, K. S., SIDDIQI, S. M., MCTIERNAN, A. & ALFANO, C. M. 2012. Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: a systematic review. *Journal of the National Cancer Institute*, 104, 815-40.

- BARDELLI, A. & SIENA, S. 2010. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28, 1254-61.
- BARTLEY, P. A., ROSS, D. M., LATHAM, S., MARTIN-HARRIS, M. H., BUDGEN, B., WILCZEK, V., BRANFORD, S., HUGHES, T. P. & MORLEY, A. A. 2010. Sensitive detection and quantification of minimal residual disease in chronic myeloid leukaemia using nested quantitative PCR for BCR-ABL DNA. *International journal of laboratory hematology*, 32, e222-8.
- BASNET, S., ZHANG, Z. Y., LIAO, W. Q., LI, S. H., LI, P. S. & GE, H. Y. 2016. The Prognostic Value of Circulating Cell-Free DNA in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Journal of Cancer*, 7, 1105-13.
- BECK, J., URNOVITZ, H. B., RIGGERT, J., CLERICI, M. & SCHUTZ, E. 2009. Profile of the circulating DNA in apparently healthy individuals. *Clinical chemistry*, 55, 730-8.
- BEITER, T., FRAGASSO, A., HUDEMANN, J., NIESS, A. M. & SIMON, P. 2011. Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clinical chemistry*, 57, 633-6.
- BEITER, T., FRAGASSO, A., HUDEMANN, J., SCHILD, M., STEINACKER, J., MOOREN, F. C. & NIESS, A. M. 2014. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *Journal of applied physiology*, 117, 325-33.
- BERGER-ACHITUV, S., BRINKMANN, V., ABED, U. A., KUHN, L. I., BEN-EZRA, J., ELHASID, R. & ZYCHLINSKY, A. 2013. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Frontiers in immunology*, 4, 48.
- BERGSMEDH, A., SZELES, A., HENRIKSSON, M., BRATT, A., FOLKMAN, M. J., SPETZ, A. L. & HOLMGREN, L. 2001. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 6407-11.
- BEROUKHIM, R., MERMEL, C. H., PORTER, D., WEI, G., RAYCHAUDHURI, S., DONOVAN, J., BARRETINA, J., BOEHM, J. S., DOBSON, J., URASHIMA, M., MC HENRY, K. T., PINCHBACK, R. M., LIGON, A. H., CHO, Y. J., HAERY, L., GREULICH, H., REICH, M., WINCKLER, W., LAWRENCE, M. S., WEIR, B. A., TANAKA, K. E., CHIANG, D. Y., BASS, A. J., LOO, A., HOFFMAN, C., PRENSNER, J., LIEFELD, T., GAO, Q., YECIES, D., SIGNORETTI, S., MAHER, E., KAYE, F. J., SASAKI, H., TEPPER, J. E., FLETCHER, J. A., TABERNERO, J., BASELGA, J., TSAO, M. S., DEMICHELIS, F., RUBIN, M. A., JANNE, P. A., DALY, M. J., NUCERA, C., LEVINE, R. L., EBERT, B. L., GABRIEL, S., RUSTGI, A. K., ANTONESCU, C. R., LADANYI, M., LETAI, A., GARRAWAY, L. A., LODA, M., BEER, D. G., TRUE, L. D., OKAMOTO, A., POMEROY, S. L., SINGER, S., GOLUB, T. R., LANDER, E. S., GETZ, G., SELLERS, W. R. & MEYERSON, M. 2010. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, 463, 899-905.
- BINGHAM, S. A., DAY, N. E., LUBEN, R., FERRARI, P., SLIMANI, N., NORAT, T., CLAVEL-CHAPELON, F., KESSE, E., NIETERS, A., BOEING, H., TJONNELAND, A., OVERVAD, K., MARTINEZ, C., DORRONSORO, M., GONZALEZ, C. A., KEY, T. J., TRICHOPOULOU, A., NASKA, A., VINEIS, P., TUMINO, R., KROGH, V., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., PEETERS, P. H., BERGLUND, G., HALLMANS, G., LUND, E., SKEIE, G., KAKS, R. & RIBOLI, E. 2003. Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet*, 361, 1496-501.
- BLANCHARD, C. M., COURNEYA, K. S. & STEIN, K. 2008. Cancer survivors' adherence to lifestyle behavior recommendations and associations with health-related quality of life: results from the American Cancer Society's SCS-II. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26, 2198-204.
- BORG, G. 1970. Perceived exertion as an indicator of somatic stress. *Scand J Rehabil Med*, 2, 92-8.
- BOUCHAHDA, M., KARABOUE, A., SAFFROY, R., INNOMINATO, P., GORDEN, L., GUETTIER, C., ADAM, R. & LEVI, F. 2010. Acquired KRAS mutations during

- progression of colorectal cancer metastases: possible implications for therapy and prognosis. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 66, 605-9.
- BOZIC, I., ANTAL, T., OHTSUKI, H., CARTER, H., KIM, D., CHEN, S., KARCHIN, R., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & NOWAK, M. A. 2010. Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 18545-50.
- BREITBACH, S., STERZING, B., MAGALLANES, C., TUG, S. & SIMON, P. 2014a. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. *Journal of applied physiology*, 117, 119-30.
- BREITBACH, S., TUG, S., HELMIG, S., ZAHN, D., KUBIAK, T., MICHAL, M., GORI, T., EHLERT, T., BEITER, T. & SIMON, P. 2014b. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PloS one*, 9, e87838.
- BREITBACH, S., TUG, S. & SIMON, P. 2012. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports medicine*, 42, 565-86.
- BRENNER, D. R., YANNITSOS, D. H., FARRIS, M. S., JOHANSSON, M. & FRIEDENREICH, C. M. 2016. Leisure-time physical activity and lung cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *Lung cancer*, 95, 17-27.
- BRINKMANN, V., REICHARD, U., GOOSMANN, C., FAULER, B., UHLEMANN, Y., WEISS, D. S., WEINRAUCH, Y. & ZYCHLINSKY, A. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303, 1532-5.
- BRINKMANN, V. & ZYCHLINSKY, A. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nature reviews. Microbiology*, 5, 577-82.
- BRINKMANN, V. & ZYCHLINSKY, A. 2012. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *The Journal of cell biology*, 198, 773-83.
- BRONKHORST, A. J., AUCAMP, J. & PRETORIUS, P. J. 2015. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 450, 243-53.
- BURNHAM, P., KIM, M. S., AGBOR-ENOH, S., LUIKART, H., VALANTINE, H. A., KHUSH, K. K. & DE VLAMINCK, I. 2016. Single-stranded DNA library preparation uncovers the origin and diversity of ultrashort cell-free DNA in plasma. *Scientific reports*, 6, 27859.
- CHANG, C. P., CHIA, R. H., WU, T. L., TSAO, K. C., SUN, C. F. & WU, J. T. 2003. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 327, 95-101.
- CHEREPANOVA, A. V., TAMKOVICH, S. N., BRYZGUNOVA, O. E., VLASSOV, V. V. & LAKTIONOV, P. P. 2008. Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137, 218-21.
- CHOI, J. J., REICH, C. F., 3RD & PISETSKY, D. S. 2005. The role of macrophages in the in vitro generation of extracellular DNA from apoptotic and necrotic cells. *Immunology*, 115, 55-62.
- CHURCH, T. R., WANDELL, M., LOFTON-DAY, C., MONGIN, S. J., BURGER, M., PAYNE, S. R., CASTANOS-VELEZ, E., BLUMENSTEIN, B. A., ROSCH, T., OSBORN, N., SNOVER, D., DAY, R. W. & RANSOHOFF, D. F. 2014. Prospective evaluation of methylated SEPT9 in plasma for detection of asymptomatic colorectal cancer. *Gut*, 63, 317-25.
- COHEN, S. J., PUNT, C. J., IANNOTTI, N., SAIDMAN, B. H., SABBATH, K. D., GABRAIL, N. Y., PICUS, J., MORSE, M., MITCHELL, E., MILLER, M. C., DOYLE, G. V., TISSING, H., TERSTAPPEN, L. W. & MEROPOL, N. J. 2008. Relationship of circulating tumor cells to tumor response, progression-free survival, and overall survival in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26, 3213-21.
- COOLS-LARTIGUE, J., SPICER, J., NAJMEH, S. & FERRI, L. 2014. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 71, 4179-94.
- CROWLEY, E., DI NICOLANTONIO, F., LOUPAKIS, F. & BARDELLI, A. 2013. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature reviews. Clinical oncology*, 10, 472-84.
- DANESE, E., MONTAGNANA, M., MINICOZZI, A. M., DE MATTEIS, G., SCUDO, G., SALVAGNO, G. L., CORDIANO, C., LIPPI, G. & GUIDI, G. C. 2010. Real-time



- polymerase chain reaction quantification of free DNA in serum of patients with polyps and colorectal cancers. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 48, 1665-8.
- DAVIES, H., BIGNELL, G. R., COX, C., STEPHENS, P., EDKINS, S., CLEGG, S., TEAGUE, J., WOFFENDIN, H., GARNETT, M. J., BOTTOMLEY, W., DAVIS, N., DICKS, E., EWING, R., FLOYD, Y., GRAY, K., HALL, S., HAWES, R., HUGHES, J., KOSMIDOU, V., MENZIES, A., MOULD, C., PARKER, A., STEVENS, C., WATT, S., HOOPER, S., WILSON, R., JAYATILAKE, H., GUSTERSON, B. A., COOPER, C., SHIPLEY, J., HARGRAVE, D., PRITCHARD-JONES, K., MAITLAND, N., CHENEVIX-TRENCH, G., RIGGINS, G. J., BIGNER, D. D., PALMIERI, G., COSSU, A., FLANAGAN, A., NICHOLSON, A., HO, J. W., LEUNG, S. Y., YUEN, S. T., WEBER, B. L., SEIGLER, H. F., DARROW, T. L., PATERSON, H., MARAIS, R., MARSHALL, C. J., WOOSTER, R., STRATTON, M. R. & FUTREAL, P. A. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417, 949-54.
- DAWSON, S. J., TSUI, D. W., MURTAZA, M., BIGGS, H., RUEDA, O. M., CHIN, S. F., DUNNING, M. J., GALE, D., FORSHEW, T., MAHLER-ARAUJO, B., RAJAN, S., HUMPHRAY, S., BECQ, J., HALSALL, D., WALLIS, M., BENTLEY, D., CALDAS, C. & ROSENFELD, N. 2013. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*, 368, 1199-209.
- DE BACKER, I. C., SCHEP, G., BACKX, F. J., VREUGDENHIL, G. & KUIPERS, H. 2009. Resistance Training in Cancer Survivors: A Systematic Review. *International Journal of Sports Medicine*, 30, 703-712.
- DE LA CHAPELLE, A. 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature reviews. Cancer*, 4, 769-80.
- DE LAMIRANDE, G. 1961. Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Nature*, 192, 52-4.
- DEMERS, M., KRAUSE, D. S., SCHATZBERG, D., MARTINOD, K., VOORHEES, J. R., FUCHS, T. A., SCADDEN, D. T. & WAGNER, D. D. 2012. Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109, 13076-81.
- DER, C. J., KRONTIRIS, T. G. & COOPER, G. M. 1982. Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79, 3637-40.
- DEVONSHIRE, A. S., WHALE, A. S., GUTTERIDGE, A., JONES, G., COWEN, S., FOY, C. A. & HUGGETT, J. F. 2014. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406, 6499-512.
- DIAZ, L. A., JR., WILLIAMS, R. T., WU, J., KINDE, I., HECHT, J. R., BERLIN, J., ALLEN, B., BOZIC, I., REITER, J. G., NOWAK, M. A., KINZLER, K. W., OLINER, K. S. & VOGELSTEIN, B. 2012. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. *Nature*, 486, 537-40.
- DIEHL, F., LI, M., DRESSMAN, D., HE, Y., SHEN, D., SZABO, S., DIAZ, L. A., JR., GOODMAN, S. N., DAVID, K. A., JUHL, H., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 2005. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 16368-73.
- DIEHL, F., LI, M., HE, Y., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & DRESSMAN, D. 2006. BEAMing: single-molecule PCR on microparticles in water-in-oil emulsions. *Nature methods*, 3, 551-9.
- DIEHL, F., SCHMIDT, K., CHOTI, M. A., ROMANS, K., GOODMAN, S., LI, M., THORNTON, K., AGRAWAL, N., SOKOLL, L., SZABO, S. A., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & DIAZ, L. A., JR. 2008. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*, 14, 985-90.
- DRESSMAN, D., YAN, H., TRAVERSO, G., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 2003. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection

- and enumeration of genetic variations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 8817-22.
- EBERT, M. P., TANZER, M., BALLUFF, B., BURGERMEISTER, E., KRETZSCHMAR, A. K., HUGHES, D. J., TETZNER, R., LOFTON-DAY, C., ROSENBERG, R., REINACHER-SCHICK, A. C., SCHULMANN, K., TANNAPFEL, A., HOFHEINZ, R., ROCKEN, C., KELLER, G., LANGER, R., SPECHT, K., PORSCHEN, R., STOHLMACHER-WILLIAMS, J., SCHUSTER, T., STROBEL, P. & SCHMID, R. M. 2012. TFAP2E-DKK4 and chemoresistance in colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 366, 44-53.
- EGHOLM, M., BUCHARDT, O., CHRISTENSEN, L., BEHRENS, C., FREIER, S. M., DRIVER, D. A., BERG, R. H., KIM, S. K., NORDEN, B. & NIELSEN, P. E. 1993. PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules. *Nature*, 365, 566-8.
- EHLERT, T., SIMON, P. & MOSER, D. A. 2013. Epigenetics in sports. *Sports medicine*, 43, 93-110.
- EISENHAEUER, E. A., THERASSE, P., BOGAERTS, J., SCHWARTZ, L. H., SARGENT, D., FORD, R., DANCEY, J., ARBUCK, S., GWYTHYR, S., MOONEY, M., RUBINSTEIN, L., SHANKAR, L., DODD, L., KAPLAN, R., LACOMBE, D. & VERWEIJ, J. 2009. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *European journal of cancer*, 45, 228-47.
- EL MESSAOUDI, S., MOULIERE, F., DU MANOIR, S., BASCOUL-MOLLEVI, C., GILLET, B., NOUAILLE, M., FIESS, C., CRAPEZ, E., BIBEAU, F., THEILLET, C., MAZARD, T., PEZET, D., MATHONNET, M., YCHOU, M. & THIERRY, A. R. 2016. Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. *Clin Cancer Res*, 22, 3067-77.
- EMBL-EBI. *ClustalW2* [Online]. Available: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> [2012].
- EXIQON. *LNA™ probe designer* [Online]. Qiagen. Available: <https://www.exiqon.com/oligo-tools> 2011-2012].
- FAHMUELLER, Y. N., NAGEL, D., HOFFMANN, R. T., TATSCH, K., JAKOBS, T., STIEBER, P. & HOLDENRIEDER, S. 2013. Immunogenic cell death biomarkers HMGB1, RAGE, and DNase indicate response to radioembolization therapy and prognosis in colorectal cancer patients. *International journal of cancer*, 132, 2349-58.
- FATOUROS, I. G., DESTOUNI, A., MARGONIS, K., JAMURTAS, A. Z., VRETTOU, C., KOURETAS, D., MASTORAKOS, G., MITRAKOU, A., TAXILDARIS, K., KANAVAKIS, E. & PAPASSOTIRIOU, I. 2006. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clinical chemistry*, 52, 1820-4.
- FATOUROS, I. G., JAMURTAS, A. Z., NIKOLAIDIS, M. G., DESTOUNI, A., MICHAILIDIS, Y., VRETTOU, C., DOUROUDOS, II, AVLONITI, A., CHATZINIKOLAOU, A., TAXILDARIS, K., KANAVAKIS, E., PAPASSOTIRIOU, I. & KOURETAS, D. 2010. Time of sampling is crucial for measurement of cell-free plasma DNA following acute aseptic inflammation induced by exercise. *Clinical biochemistry*, 43, 1368-70.
- FEARON, E. R. 2011. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual review of pathology*, 6, 479-507.
- FEARON, E. R. & VOGELSTEIN, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-67.
- FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. 1983. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301, 89-92.
- FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., PARKIN, D. M., FORMAN, D. & BRAY, F. 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136, E359-86.
- FERRARI, P., JENAB, M., NORAT, T., MOSKAL, A., SLIMANI, N., OLSEN, A., TJONNELAND, A., OVERVAD, K., JENSEN, M. K., BOUTRON-RUAULT, M. C., CLAVEL-CHAPELON, F., MOROIS, S., ROHRMANN, S., LINSEISEN, J., BOEING, H., BERGMANN, M., KONTOPOULOU, D., TRICHOPOULOU, A., KASSAPA, C., MASALA, G., KROGH, V., VINEIS, P., PANICO, S., TUMINO, R., VAN GILS, C. H.,

- PEETERS, P., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., OCKE, M. C., SKEIE, G., LUND, E., AGUDO, A., ARDANAZ, E., LOPEZ, D. C., SANCHEZ, M. J., QUIROS, J. R., AMIANO, P., BERGLUND, G., MANJER, J., PALMQVIST, R., VAN GUELPHEN, B., ALLEN, N., KEY, T., BINGHAM, S., MAZUIR, M., BOFFETTA, P., KAAKS, R. & RIBOLI, E. 2007. Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *International journal of cancer*, 121, 2065-72.
- FORSHEW, T., MURTAZA, M., PARKINSON, C., GALE, D., TSUI, D. W., KAPER, F., DAWSON, S. J., PISKORZ, A. M., JIMENEZ-LINAN, M., BENTLEY, D., HADFIELD, J., MAY, A. P., CALDAS, C., BRENTON, J. D. & ROSENFELD, N. 2012. Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Science translational medicine*, 4, 136ra68.
- FRAGA, M. F., BALLESTAR, E., PAZ, M. F., ROPER, S., SETIEN, F., BALLESTAR, M. L., HEINE-SUNER, D., CIGUDOSA, J. C., URIOSTE, M., BENITEZ, J., BOIX-CHORNET, M., SANCHEZ-AGUILERA, A., LING, C., CARLSSON, E., POULSEN, P., VAAG, A., STEPHAN, Z., SPECTOR, T. D., WU, Y. Z., PLASS, C. & ESTELLER, M. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102, 10604-9.
- FRIEDENREICH, C., NORAT, T., STEINDORF, K., BOUTRON-ROUULT, M. C., PISCHON, T., MAZUIR, M., CLAVEL-CHAPELON, F., LINSEISEN, J., BOEING, H., BERGMAN, M., JOHNSEN, N. F., TJONNELAND, A., OVERVAD, K., MENDEZ, M., QUIROS, J. R., MARTINEZ, C., DORRONSORO, M., NAVARRO, C., GURREA, A. B., BINGHAM, S., KHAW, K. T., ALLEN, N., KEY, T., TRICHOPOULOU, A., TRICHOPOULOS, D., ORFANO, N., KROGH, V., PALLI, D., TUMINO, R., PANICO, S., VINEIS, P., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., PEETERS, P. H., MONNINKHOF, E., BERGLUND, G., MANJER, J., FERRARI, P., SLIMANI, N., KAAKS, R. & RIBOLI, E. 2006. Physical activity and risk of colon and rectal cancers: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 15, 2398-407.
- FRIEDENREICH, C. M., NEILSON, H. K. & LYNCH, B. M. 2010. State of the epidemiological evidence on physical activity and cancer prevention. *European journal of cancer*, 46, 2593-604.
- FRUHBEIS, C., HELMIG, S., TUG, S., SIMON, P. & KRAMER-ALBERS, E. M. 2015. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *Journal of extracellular vesicles*, 4, 28239.
- GAL, S., FIDLER, C., LO, Y. M., TAYLOR, M., HAN, C., MOORE, J., HARRIS, A. L. & WAINSCOAT, J. S. 2004. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *British journal of cancer*, 90, 1211-5.
- GARCIA-OLMO, D. C., DOMINGUEZ, C., GARCIA-ARRANZ, M., ANKER, P., STROUN, M., GARCIA-VERDUGO, J. M. & GARCIA-OLMO, D. 2010. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer research*, 70, 560-7.
- GERLINGER, M., ROWAN, A. J., HORSWELL, S., LARKIN, J., ENDEFELDER, D., GRONROOS, E., MARTINEZ, P., MATTHEWS, N., STEWART, A., TARPEY, P., VARELA, I., PHILLIMORE, B., BEGUM, S., MCDONALD, N. Q., BUTLER, A., JONES, D., RAINE, K., LATIMER, C., SANTOS, C. R., NOHADANI, M., EKLUND, A. C., SPENCER-DENE, B., CLARK, G., PICKERING, L., STAMP, G., GORE, M., SZALLASI, Z., DOWNWARD, J., FUTREAL, P. A. & SWANTON, C. 2012. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *The New England journal of medicine*, 366, 883-92.
- GEVENSLEBEN, H., GARCIA-MURILLAS, I., GRAESER, M. K., SCHIAVON, G., OSIN, P., PARTON, M., SMITH, I. E., ASHWORTH, A. & TURNER, N. C. 2013. Noninvasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clin Cancer Res*, 19, 3276-84.

- GIOVANNUCCI, E. 2001. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 10, 725-31.
- GIOVANNUCCI, E., ASCHERIO, A., RIMM, E. B., COLDITZ, G. A., STAMPFER, M. J. & WILLETT, W. C. 1995. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Annals of internal medicine*, 122, 327-34.
- GOVINDAN, R., DING, L., GRIFFITH, M., SUBRAMANIAN, J., DEES, N. D., KANCHI, K. L., MAHER, C. A., FULTON, R., FULTON, L., WALLIS, J., CHEN, K., WALKER, J., MCDONALD, S., BOSE, R., ORNITZ, D., XIONG, D., YOU, M., DOOLING, D. J., WATSON, M., MARDIS, E. R. & WILSON, R. K. 2012. Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers. *Cell*, 150, 1121-34.
- GRAY, E. S., RIZOS, H., REID, A. L., BOYD, S. C., PEREIRA, M. R., LO, J., TEMBE, V., FREEMAN, J., LEE, J. H., SCOLYER, R. A., SIEW, K., LOMMA, C., COOPER, A., KHATTAK, M. A., MENIAWY, T. M., LONG, G. V., CARLINO, M. S., MILLWARD, M. & ZIMAN, M. 2015. Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget*, 6, 42008-18.
- GREEN, D. R. 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*, 121, 671-4.
- HADANO, N., MURAKAMI, Y., UEMURA, K., HASHIMOTO, Y., KONDO, N., NAKAGAWA, N., SUEDA, T. & HIYAMA, E. 2016. Prognostic value of circulating tumour DNA in patients undergoing curative resection for pancreatic cancer. *British journal of cancer*, 115, 59-65.
- HAFF, L. A. 1994. Improved Quantitative Pcr Using Nested Primers. *Pcr-Methods and Applications*, 3, 332-337.
- HAMAKAWA, T., KUKITA, Y., KUROKAWA, Y., MIYAZAKI, Y., TAKAHASHI, T., YAMASAKI, M., MIYATA, H., NAKAJIMA, K., TANIGUCHI, K., TAKIGUCHI, S., MORI, M., DOKI, Y. & KATO, K. 2015. Monitoring gastric cancer progression with circulating tumour DNA. *British journal of cancer*, 112, 352-6.
- HAWES, M. C., WEN, F. & ELQUZA, E. 2015. Extracellular DNA: A Bridge to Cancer. *Cancer research*, 75, 4260-4.
- HEITZER, E., ULZ, P., BELIC, J., GUTSCHI, S., QUEHENBERGER, F., FISCHEREDER, K., BENEZEDER, T., AUER, M., PISCHLER, C., MANNWEILER, S., PICHLER, M., EISNER, F., HAEUSLER, M., RIETHDORF, S., PANTEL, K., SAMONIGG, H., HOEFLER, G., AUGUSTIN, H., GEIGL, J. B. & SPEICHER, M. R. 2013. Tumor-associated copy number changes in the circulation of patients with prostate cancer identified through whole-genome sequencing. *Genome medicine*, 5, 30.
- HEITZER, E., ULZ, P. & GEIGL, J. B. 2015. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical chemistry*, 61, 112-23.
- HELMIG, S., FRUHBEIS, C., KRAMER-ALBERS, E. M., SIMON, P. & TUG, S. 2015. Release of bulk cell free DNA during physical exercise occurs independent of extracellular vesicles. *European journal of applied physiology*, 115, 2271-80.
- HEPPNER, G. H. 1984. Tumor heterogeneity. *Cancer research*, 44, 2259-65.
- HEYN, H. & ESTELLER, M. 2012. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nature reviews. Genetics*, 13, 679-92.
- HOLDENRIEDER, S., STIEBER, P., VON PAWEL, J., RAITH, H., NAGEL, D., FELDMANN, K. & SEIDEL, D. 2004. Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10, 5981-7.
- HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B. & HARRIS, C. C. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-53.
- HOLMES, M. D., CHEN, W. Y., FESKANICH, D., KROENKE, C. H. & COLDITZ, G. A. 2005. Physical activity and survival after breast cancer diagnosis. *JAMA*, 293, 2479-86.
- HOW KIT, A., MAZALEYRAT, N., DAUNAY, A., NIELSEN, H. M., TERRIS, B. & TOST, J. 2013. Sensitive detection of KRAS mutations using enhanced-ice-COLD-PCR mutation enrichment and direct sequence identification. *Hum Mutat*, 34, 1568-80.

- HU, C., LIU, X., CHEN, Y., SUN, X., GONG, Y., GENG, M. & BI, L. 2012. Direct serum and tissue assay for EGFR mutation in non-small cell lung cancer by high-resolution melting analysis. *Oncology reports*, 28, 1815-21.
- HUANG, Z., HUANG, D., NI, S., PENG, Z., SHENG, W. & DU, X. 2010. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *International journal of cancer*, 127, 118-26.
- HUDECOVA, I. 2015. Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clinical biochemistry*, 48, 948-56.
- IANNONE, A., LOSURDO, G., PRICCI, M., GIRARDI, B., MASSARO, A., PRINCIPI, M., BARONE, M., IERARDI, E. & DI LEO, A. 2016. Stool Investigations for Colorectal Cancer Screening: From Occult Blood Test to DNA Analysis. *J Gastrointest Cancer*, 47, 143-51.
- IRIZARRY, R. A., LADD-ACOSTA, C., WEN, B., WU, Z., MONTANO, C., ONYANGO, P., CUI, H., GABO, K., RONGIONE, M., WEBSTER, M., JI, H., POTASH, J. B., SABUNCIYAN, S. & FEINBERG, A. P. 2009. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*, 41, 178-86.
- JAHR, S., HENTZE, H., ENGLISCH, S., HARDT, D., FACKELMAYER, F. O., HESCH, R. D. & KNIPPERS, R. 2001. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*, 61, 1659-65.
- JIANG, N., REICH, C. F., 3RD & PISETSKY, D. S. 2003. Role of macrophages in the generation of circulating blood nucleosomes from dead and dying cells. *Blood*, 102, 2243-50.
- JIANG, P., CHAN, C. W., CHAN, K. C., CHENG, S. H., WONG, J., WONG, V. W., WONG, G. L., CHAN, S. L., MOK, T. S., CHAN, H. L., LAI, P. B., CHIU, R. W. & LO, Y. M. 2015. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, E1317-25.
- KAHLERT, C., MELO, S. A., PROTOPOPOV, A., TANG, J., SETH, S., KOCH, M., ZHANG, J., WEITZ, J., CHIN, L., FUTREAL, A. & KALLURI, R. 2014. Identification of double-stranded genomic DNA spanning all chromosomes with mutated KRAS and p53 DNA in the serum exosomes of patients with pancreatic cancer. *The Journal of biological chemistry*, 289, 3869-75.
- KARAPETIS, C. S., KHAMBATA-FORD, S., JONKER, D. J., O'CALLAGHAN, C. J., TU, D., TEBBUTT, N. C., SIMES, R. J., CHALCHAL, H., SHAPIRO, J. D., ROBITAILLE, S., PRICE, T. J., SHEPHERD, L., AU, H. J., LANGER, C., MOORE, M. J. & ZALCBERG, J. R. 2008. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 359, 1757-65.
- KIM, J. & BAE, J. S. 2016. Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators of inflammation*, 2016, 6058147.
- KINUGASA, H., NOUSO, K., MIYAHARA, K., MORIMOTO, Y., DOHI, C., TSUTSUMI, K., KATO, H., MATSUBARA, T., OKADA, H. & YAMAMOTO, K. 2015. Detection of K-ras gene mutation by liquid biopsy in patients with pancreatic cancer. *Cancer*, 121, 2271-80.
- KORESSAAR T, R. M. 2007. *Enhancements and modifications of primer design program Primer3*[Online]. *Bioinformatics* 23(10):1289-91. Available: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> [2011-2013].
- KOSHKIN, A. A., SINGH, S. K., NIELSEN, P., RAJWANSHI, V. K., KUMAR, R., MELDGAARD, M., OLSEN, C. E. & WENGEL, J. 1998. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, 54, 3607-3630.
- KRAEMER, W. J., FRAGALA, M. S., VAN HENEGOUWEN, W. R., GORDON, S. E., BUSH, J. A., VOLEK, J. S., TRIPLETT, N. T., DUNN-LEWIS, C., COMSTOCK, B. A., SZIVAK, T. K., FLANAGAN, S. D., HOOPER, D. R., LUK, H. Y. & MASTRO, A. M. 2013.

- Responses of proenkephalin Peptide F to aerobic exercise stress in the plasma and white blood cell biocompartments. *Peptides*, 42, 118-24.
- KRANENBURG, O. 2005. The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochimica et biophysica acta*, 1756, 81-2.
- LAHMANN, P. H., FRIEDENREICH, C., SCHUIT, A. J., SALVINI, S., ALLEN, N. E., KEY, T. J., KHAW, K. T., BINGHAM, S., PEETERS, P. H., MONNINKHOF, E., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., WIRFALT, E., MANJER, J., GONZALES, C. A., ARDANAZ, E., AMIANO, P., QUIROS, J. R., NAVARRO, C., MARTINEZ, C., BERRINO, F., PALLI, D., TUMINO, R., PANICO, S., VINEIS, P., TRICHOPOULOU, A., BAMIA, C., TRICHOPOULOS, D., BOEING, H., SCHULZ, M., LINSEISEN, J., CHANG-CLAUDE, J., CHAPELON, F. C., FOURNIER, A., BOUTRON-ROUULT, M. C., TJONNELAND, A., FONS JOHNSON, N., OVERVAD, K., KAAKS, R. & RIBOLI, E. 2007. Physical activity and breast cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16, 36-42.
- LANG, A. H., DREXEL, H., GELLER-RHOMBERG, S., STARK, N., WINDER, T., GEIGER, K. & MUENDLEIN, A. 2011. Optimized allele-specific real-time PCR assays for the detection of common mutations in KRAS and BRAF. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 13, 23-8.
- LAO, V. V. & GRADY, W. M. 2011. Epigenetics and colorectal cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 8, 686-700.
- LATORRA, D., CAMPBELL, K., WOLTER, A. & HURLEY, J. M. 2003. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3' locked nucleic acid (LNA) primers. *Human mutation*, 22, 79-85.
- LAZARO-IBANEZ, E., SANZ-GARCIA, A., VISAKORPI, T., ESCOBEDO-LUCEA, C., SILJANDER, P., AYUSO-SACIDO, A. & YLIPERTTULA, M. 2014. Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes. *The Prostate*, 74, 1379-90.
- LEARY, R. J., KINDE, I., DIEHL, F., SCHMIDT, K., CLOUSER, C., DUNCAN, C., ANTIPOVA, A., LEE, C., MCKERNAN, K., DE LA VEGA, F. M., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B., DIAZ, L. A., JR. & VELCULESCU, V. E. 2010. Development of personalized tumor biomarkers using massively parallel sequencing. *Science translational medicine*, 2, 20ra14.
- LEARY, R. J., SAUSEN, M., KINDE, I., PAPADOPOULOS, N., CARPTEN, J. D., CRAIG, D., O'SHAUGHNESSY, J., KINZLER, K. W., PARMIGIANI, G., VOGELSTEIN, B., DIAZ, L. A., JR. & VELCULESCU, V. E. 2012. Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. *Science translational medicine*, 4, 162ra154.
- LECOMTE, T., BERGER, A., ZINZINDOHOUE, F., MICARD, S., LANDI, B., BLONS, H., BEAUNE, P., CUGNENC, P. H. & LAURENT-PUIG, P. 2002. Detection of free-circulating tumor-associated DNA in plasma of colorectal cancer patients and its association with prognosis. *International journal of cancer*, 100, 542-8.
- LEE, J. I., CHO, S. S., KIL, E. J. & KWON, S. T. 2010. Characterization and PCR application of a thermostable DNA polymerase from *Thermococcus pacificus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 47, 147-152.
- LEE, S. T., KIM, J. Y., KOWN, M. J., KIM, S. W., CHUNG, J. H., AHN, M. J., OH, Y. L., KIM, J. W. & KI, C. S. 2011. Mutant enrichment with 3'-modified oligonucleotides a practical PCR method for detecting trace mutant DNAs. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, 13, 657-68.
- LEE, T. H., CHENNAKRISHNAIAH, S., AUDEMARD, E., MONTERMINI, L., MEEHAN, B. & RAK, J. 2014. Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 451, 295-301.

- LEE, T. H., MONTALVO, L., CHREBTOW, V. & BUSCH, M. P. 2001. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*, 41, 276-82.
- LEHMANN-WERMAN, R., NEIMAN, D., ZEMMOUR, H., MOSS, J., MAGENHEIM, J., VAKNIN-DEMBINSKY, A., RUBERTSSON, S., NELLGARD, B., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H., SPALDING, K., HALLER, M. J., WASSERFALL, C. H., SCHATZ, D. A., GREENBAUM, C. J., DORRELL, C., GROMPE, M., ZICK, A., HUBERT, A., MAOZ, M., FENDRICH, V., BARTSCH, D. K., GOLAN, T., BEN SASSON, S. A., ZAMIR, G., RAZIN, A., CEDAR, H., SHAPIRO, A. M., GLASER, B., SHEMER, R. & DOR, Y. 2016. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113, E1826-34.
- LEHNER, J., STOTZER, O. J., FERSCHING, D., NAGEL, D. & HOLDENRIEDER, S. 2013. Circulating plasma DNA and DNA integrity in breast cancer patients undergoing neoadjuvant chemotherapy. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 425, 206-11.
- LENGAUER, C., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, 386, 623-7.
- LEON, S. A., SHAPIRO, B., SKLAROFF, D. M. & YAROS, M. J. 1977. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*, 37, 646-50.
- LEUFKENS, A. M., VAN DUIJNHOFEN, F. J., SIERSEMA, P. D., BOSHUIZEN, H. C., VRIELING, A., AGUDO, A., GRAM, I. T., WEIDERPASS, E., DAHM, C., OVERVAD, K., TJONNELAND, A., OLSEN, A., BOUTRON-RUAULT, M. C., CLAVEL-CHAPELON, F., MOROIS, S., PALLI, D., GRIONI, S., TUMINO, R., SACERDOTE, C., MATTIELLO, A., HERMAN, S., KAKS, R., STEFFEN, A., BOEING, H., TRICHOPOULOU, A., LAGIOU, P., TRICHOPOULOS, D., PEETERS, P. H., VAN GILS, C. H., VAN KRANEN, H., LUND, E., DUMEAUX, V., ENGESET, D., RODRIGUEZ, L., SANCHEZ, M. J., CHIRLAQUE, M. D., BARRICARTE, A., MANJER, J., ALMQUIST, M., VAN GUELPEL, B., HALLMANS, G., KHAW, K. T., WAREHAM, N., TSILIDIS, K. K., STRAIF, K., LEON-ROUX, M., VINEIS, P., NORAT, T., RIBOLI, E. & BUENO-DE-MESQUITA, H. B. 2011. Cigarette smoking and colorectal cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, 9, 137-44.
- LI, B. T., DRILON, A., JOHNSON, M. L., HSU, M., SIMA, C. S., MCGINN, C., SUGITA, H., KRIS, M. G. & AZZOLI, C. G. 2016. A prospective study of total plasma cell-free DNA as a predictive biomarker for response to systemic therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancers. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 27, 154-9.
- LI, J., WANG, L., MAMON, H., KULKE, M. H., BERBECO, R. & MAKRIGIORGOS, G. M. 2008. Replacing PCR with COLD-PCR enriches variant DNA sequences and redefines the sensitivity of genetic testing. *Nature medicine*, 14, 579-84.
- LI, M., DIEHL, F., DRESSMAN, D., VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 2006. BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nature methods*, 3, 95-7.
- LIAO, W., YANG, H., XU, H., WANG, Y., GE, P., REN, J., XU, W., LU, X., SANG, X., ZHONG, S., ZHANG, H. & MAO, Y. 2016. Noninvasive detection of tumor-associated mutations from circulating cell-free DNA in hepatocellular carcinoma patients by targeted deep sequencing. *Oncotarget*.
- LIEVRE, A., BACHET, J. B., BOIGE, V., CAYRE, A., LE CORRE, D., BUC, E., YCHOU, M., BOUCHE, O., LANDI, B., LOUVET, C., ANDRE, T., BIBEAU, F., DIEBOLD, M. D., ROUGIER, P., DUCREUX, M., TOMASIC, G., EMILE, J. F., PENNAULT-LLORCA, F. & LAURENT-PUIG, P. 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26, 374-9.
- LIEVRE, A., BACHET, J. B., LE CORRE, D., BOIGE, V., LANDI, B., EMILE, J. F., COTE, J. F., TOMASIC, G., PENNA, C., DUCREUX, M., ROUGIER, P., PENNAULT-LLORCA, F.

- & LAURENT-PUIG, P. 2006. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer research*, 66, 3992-5.
- LIGGETT, T., MELNIKOV, A., YI, Q. L., REPLOGLE, C., BRAND, R., KAUL, K., TALAMONTI, M., ABRAMS, R. A. & LEVENSON, V. 2010. Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis. *Cancer*, 116, 1674-80.
- LIZARD, G., FOURNEL, S., GENESTIER, L., DHEDIN, N., CHAPUT, C., FLACHER, M., MUTIN, M., PANAYE, G. & REVILLARD, J. P. 1995. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry*, 21, 275-83.
- LO, Y. M., CORBETTA, N., CHAMBERLAIN, P. F., RAI, V., SARGENT, I. L., REDMAN, C. W. & WAINSCOAT, J. S. 1997. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350, 485-7.
- LO, Y. M., RAINER, T. H., CHAN, L. Y., HJELM, N. M. & COCKS, R. A. 2000. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clinical chemistry*, 46, 319-23.
- LOFTON-DAY, C., MODEL, F., DEVOS, T., TETZNER, R., DISTLER, J., SCHUSTER, M., SONG, X., LESCHE, R., LIEBENBERG, V., EBERT, M., MOLNAR, B., GRUTZMANN, R., PILARSKY, C. & SLEDZIEWSKI, A. 2008. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. *Clinical chemistry*, 54, 414-23.
- MADHAVAN, D., WALLWIENER, M., BENTS, K., ZUCKNICK, M., NEES, J., SCHOTT, S., CUK, K., RIETHDORF, S., TRUMPP, A., PANTEL, K., SOHN, C., SCHNEEWEISS, A., SUROWY, H. & BURWINKEL, B. 2014. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast cancer research and treatment*, 146, 163-74.
- MANDEL, P. & METAIS, P. 1948. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme. *Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et de ses filiales*, 142, 241-3.
- MCGRATH, J. P., CAPON, D. J., SMITH, D. H., CHEN, E. Y., SEEBURG, P. H., GOEDEL, D. V. & LEVINSON, A. D. 1983. Structure and organization of the human Ki-ras proto-oncogene and a related processed pseudogene. *Nature*, 304, 501-6.
- MCINERNEY, P., ADAMS, P. & HADI, M. Z. 2014. Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Molecular biology international*, 2014, 287430.
- MCKUSICK, V. A., HAMOSH, A. 1986-2016. OMIM®, Online Mendelian Inheritance in Man®, V-KI-RAS2 KIRSTEN RAT SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG; KRAS [Online]. John Hopkins University. Available: <http://omim.org/entry/190070> [Accessed 2016/08/03].
- MCTIERNAN, A. 2008. Mechanisms linking physical activity with cancer. *Nature reviews. Cancer*, 8, 205-11.
- MEYERHARDT, J. A., GIOVANNUCCI, E. L., HOLMES, M. D., CHAN, A. T., CHAN, J. A., COLDITZ, G. A. & FUCHS, C. S. 2006a. Physical activity and survival after colorectal cancer diagnosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24, 3527-34.
- MEYERHARDT, J. A., HESELTINE, D., NIEDZWIECKI, D., HOLLIS, D., SALTZ, L. B., MAYER, R. J., THOMAS, J., NELSON, H., WHITTON, R., HANTEL, A., SCHILSKY, R. L. & FUCHS, C. S. 2006b. Impact of physical activity on cancer recurrence and survival in patients with stage III colon cancer: findings from CALGB 89803. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24, 3535-41.
- MEYERHARDT, J. A. & MAYER, R. J. 2005. Systemic therapy for colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 352, 476-87.
- MILLER, S. A., DYKES, D. D. & POLESKY, H. F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16, 1215.
- MISALE, S., YAEGER, R., HOBOR, S., SCALA, E., JANAKIRAMAN, M., LISKA, D., VALTORTA, E., SCHIAVO, R., BUSCARINO, M., SIRAVEGNA, G., BENCARDINO, K., CERCEK, A., CHEN, C. T., VERONESE, S., ZANON, C., SARTORE-BIANCHI, A., GAMBACORTA, M., GALLICCHIO, M., VAKIANI, E., BOSCARO, V., MEDICO, E., WEISER, M., SIENA, S., DI NICOLANTONIO, F., SOLIT, D. & BARDELLI, A. 2012.



- Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature*, 486, 532-6.
- MITCHELL, P. S., PARKIN, R. K., KROH, E. M., FRITZ, B. R., WYMAN, S. K., POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L., PETERSON, A., NOTEBOOM, J., O'BRIANT, K. C., ALLEN, A., LIN, D. W., URBAN, N., DRESCHER, C. W., KNUDSEN, B. S., STIREWALT, D. L., GENTLEMAN, R., VESSELLA, R. L., NELSON, P. S., MARTIN, D. B. & TEWARI, M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 10513-8.
- MITTRA, I., NAIR, N. K. & MISHRA, P. K. 2012. Nucleic acids in circulation: are they harmful to the host? *Journal of biosciences*, 37, 301-12.
- MOCK, V., FRANGAKIS, C., DAVIDSON, N. E., ROPKA, M. E., PICKETT, M., PONIATOWSKI, B., STEWART, K. J., CAMERON, L., ZAWACKI, K., PODEWILS, L. J., COHEN, G. & MCCORKLE, R. 2005. Exercise manages fatigue during breast cancer treatment: a randomized controlled trial. *Psycho-oncology*, 14, 464-77.
- MOHAN, S., HEITZER, E., ULZ, P., LAFER, I., LAX, S., AUER, M., PICHLER, M., GERGER, A., EISNER, F., HOEFLER, G., BAUERNHOFER, T., GEIGL, J. B. & SPEICHER, M. R. 2014. Changes in colorectal carcinoma genomes under anti-EGFR therapy identified by whole-genome plasma DNA sequencing. *PLoS genetics*, 10, e1004271.
- MORELLI, M. P., OVERMAN, M. J., DASARI, A., KAZMI, S. M., MAZARD, T., VILAR, E., MORRIS, V. K., LEE, M. S., HERRON, D., ENG, C., MORRIS, J., KEE, B. K., JANKU, F., DEATON, F. L., GARRETT, C., MARU, D., DIEHL, F., ANGENENDT, P. & KOPETZ, S. 2015. Characterizing the patterns of clonal selection in circulating tumor DNA from patients with colorectal cancer refractory to anti-EGFR treatment. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 26, 731-6.
- MOULIERE, F., ROBERT, B., ARNAU PEYROTTE, E., DEL RIO, M., YCHOU, M., MOLINA, F., GONGORA, C. & THIERRY, A. R. 2011. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PloS one*, 6, e23418.
- MURTAZA, M., DAWSON, S. J., TSUI, D. W., GALE, D., FORSHEW, T., PISKORZ, A. M., PARKINSON, C., CHIN, S. F., KINGSBURY, Z., WONG, A. S., MARASS, F., HUMPHRAY, S., HADFIELD, J., BENTLEY, D., CHIN, T. M., BRENTON, J. D., CALDAS, C. & ROSENFELD, N. 2013. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, 497, 108-12.
- NAGAI, Y., MIYAZAWA, H., HUQUN, TANAKA, T., UDAGAWA, K., KATO, M., FUKUYAMA, S., YOKOTE, A., KOBAYASHI, K., KANAZAWA, M. & HAGIWARA, K. 2005. Genetic heterogeneity of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cell lines revealed by a rapid and sensitive detection system, the peptide nucleic acid-locked nucleic acid PCR clamp. *Cancer research*, 65, 7276-82.
- NAGATA, S. 2000. Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*, 256, 12-8.
- NARAYAN, A., CARRIERO, N. J., GETTINGER, S. N., KLUYTENAAR, J., KOZAK, K. R., YOCK, T. I., MUSCATO, N. E., UGARELLI, P., DECKER, R. H. & PATEL, A. A. 2012. Ultrasensitive measurement of hotspot mutations in tumor DNA in blood using error-suppressed multiplexed deep sequencing. *Cancer research*, 72, 3492-8.
- NEB. *Tm Calculator v 1.9.6* [Online]. Available: <http://tmcalculator.neb.com/#/> 2012].
- NEUMANN, J., ZEINDL-EBERHART, E., KIRCHNER, T. & JUNG, A. 2009. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathology, research and practice*, 205, 858-62.
- NEWMAN, A. M., BRATMAN, S. V., TO, J., WYNNE, J. F., ECLOV, N. C., MODLIN, L. A., LIU, C. L., NEAL, J. W., WAKELEE, H. A., MERRITT, R. E., SHRAGER, J. B., LOO, B. W., JR., ALIZADEH, A. A. & DIEHN, M. 2014. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nature medicine*, 20, 548-54.
- NEWTON, C. R., GRAHAM, A., HEPTINSTALL, L. E., POWELL, S. J., SUMMERS, C., KALSHEKER, N., SMITH, J. C. & MARKHAM, A. F. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic acids research*, 17, 2503-16.

- NIELSEN, P. E., EGHOLM, M., BERG, R. H. & BUCHARDT, O. 1991. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide. *Science*, 254, 1497-500.
- NIH. *The Cancer Genome Atlas* [Online]. National Institute of Health. Available: <https://cancergenome.nih.gov/> [Accessed 2017/04/09].
- NORAT, T., BINGHAM, S., FERRARI, P., SLIMANI, N., JENAB, M., MAZUIR, M., OVERVAD, K., OLSEN, A., TJONNELAND, A., CLAVEL, F., BOUTRON-RUAULT, M. C., KESSE, E., BOEING, H., BERGMANN, M. M., NIETERS, A., LINSEISEN, J., TRICHOPOULOU, A., TRICHOPOULOS, D., TOUNTAS, Y., BERRINO, F., PALLI, D., PANICO, S., TUMINO, R., VINEIS, P., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., PEETERS, P. H., ENGESET, D., LUND, E., SKEIE, G., ARDANAZ, E., GONZALEZ, C., NAVARRO, C., QUIROS, J. R., SANCHEZ, M. J., BERGLUND, G., MATTISSON, I., HALLMANS, G., PALMQVIST, R., DAY, N. E., KHAW, K. T., KEY, T. J., SAN JOAQUIN, M., HEMON, B., SARACCI, R., KAAKS, R. & RIBOLI, E. 2005. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Journal of the National Cancer Institute*, 97, 906-16.
- NYGAARD, A. D., GARM SPINDLER, K. L., PALLISGAARD, N., ANDERSEN, R. F. & JAKOBSEN, A. 2013. The prognostic value of KRAS mutated plasma DNA in advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer*, 79, 312-7.
- OBIKA, S., NANBU, D., HARI, Y., MORIO, K., IN, Y., ISHIDA, T. & IMANISHI, T. 1997. Synthesis of 2'-O,4'-C-methyleneuridine and -cytidine. Novel bicyclic nucleosides having a fixed C-3,-endo sugar pucker. *Tetrahedron Letters*, 38, 8735-8738.
- OLSSON, E., WINTER, C., GEORGE, A., CHEN, Y., HOWLIN, J., TANG, M. H., DAHLGREN, M., SCHULZ, R., GRABAU, D., VAN WESTEN, D., FERNO, M., INGVAR, C., ROSE, C., BENDAHL, P. O., RYDEN, L., BORG, A., GRUVBERGER-SAAL, S. K., JERNSTROM, H. & SAAL, L. H. 2015. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO molecular medicine*, 7, 1034-47.
- ORNTOFT, M. B., NIELSEN, H. J., ORNTOFT, T. F. & ANDERSEN, C. L. 2015. Performance of the colorectal cancer screening marker Sept9 is influenced by age, diabetes and arthritis: a nested case-control study. *BMC cancer*, 15, 819.
- PAEZ, J. G., JANNE, P. A., LEE, J. C., TRACY, S., GREULICH, H., GABRIEL, S., HERMAN, P., KAYE, F. J., LINDEMAN, N., BOGGON, T. J., NAOKI, K., SASAKI, H., FUJII, Y., ECK, M. J., SELLERS, W. R., JOHNSON, B. E. & MEYERSON, M. 2004. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304, 1497-500.
- PALLES, C., CAZIER, J. B., HOWARTH, K. M., DOMINGO, E., JONES, A. M., BRODERICK, P., KEMP, Z., SPAIN, S. L., GUARINO, E., SALGUERO, I., SHERBORNE, A., CHUBB, D., CARVAJAL-CARMONA, L. G., MA, Y., KAUR, K., DOBBINS, S., BARCLAY, E., GORMAN, M., MARTIN, L., KOVAC, M. B., HUMPHRAY, S., LUCASSEN, A., HOLMES, C. C., BENTLEY, D., DONNELLY, P., TAYLOR, J., PETRIDIS, C., ROYLANCE, R., SAWYER, E. J., KERR, D. J., CLARK, S., GRIMES, J., KEARSEY, S. E., THOMAS, H. J., MCVEAN, G., HOULSTON, R. S. & TOMLINSON, I. 2013. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nature genetics*, 45, 136-44.
- PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 2006. The role of companion diagnostics in the development and use of mutation-targeted cancer therapies. *Nature biotechnology*, 24, 985-95.
- PARIKH, R. B. & PRASAD, V. 2016. Blood-Based Screening for Colon Cancer: A Disruptive Innovation or Simply a Disruption? *JAMA*, 315, 2519-20.
- PATUTINA, O., MIRONOVA, N., RYABCHIKOVA, E., POPOVA, N., NIKOLIN, V., KALEDIN, V., VLASSOV, V. & ZENKOVA, M. 2011. Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I. *Biochimie*, 93, 689-96.
- PEDDLE, C. J., AU, H. J. & COURNEYA, K. S. 2008. Associations between exercise, quality of life, and fatigue in colorectal cancer survivors. *Diseases of the colon and rectum*, 51, 1242-8.

- PEREIRA, E., CAMACHO-VANEGAS, O., ANAND, S., SEBRA, R., CATALINA CAMACHO, S., GARNAR-WORTZEL, L., NAIR, N., MOSHIER, E., WOOTEN, M., UZILOV, A., CHEN, R., PRASAD-HAYES, M., ZAKASHANSKY, K., BEDDOE, A. M., SCHADT, E., DOTTINO, P. & MARTIGNETTI, J. A. 2015. Personalized Circulating Tumor DNA Biomarkers Dynamically Predict Treatment Response and Survival In Gynecologic Cancers. *PLoS one*, 10, e0145754.
- PILSCZEK, F. H., SALINA, D., POON, K. K., FAHEY, C., YIPP, B. G., SIBLEY, C. D., ROBBINS, S. M., GREEN, F. H., SURETTE, M. G., SUGAI, M., BOWDEN, M. G., HUSSAIN, M., ZHANG, K. & KUBES, P. 2010. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *Journal of immunology*, 185, 7413-25.
- PISCHON, T., LAHMANN, P. H., BOEING, H., FRIEDENREICH, C., NORAT, T., TJONNELAND, A., HALKJAER, J., OVERVAD, K., CLAVEL-CHAPELON, F., BOUTRON-ROUAULT, M. C., GUERNEC, G., BERGMANN, M. M., LINSEISEN, J., BECKER, N., TRICHOPOULOU, A., TRICHOPOULOS, D., SIERI, S., PALLI, D., TUMINO, R., VINEIS, P., PANICO, S., PEETERS, P. H., BUENO-DE-MESQUITA, H. B., BOSHUIZEN, H. C., VAN GUELPEM, B., PALMQVIST, R., BERGLUND, G., GONZALEZ, C. A., DORRONSORO, M., BARRICARTE, A., NAVARRO, C., MARTINEZ, C., QUIROS, J. R., RODDAM, A., ALLEN, N., BINGHAM, S., KHAW, K. T., FERRARI, P., KAAKS, R., SLIMANI, N. & RIBOLI, E. 2006. Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC). *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 920-31.
- PISETSKY, D. S. 2012. The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clinical immunology*, 144, 32-40.
- POLISENO, L., SALMENA, L., ZHANG, J., CARVER, B., HAVEMAN, W. J. & PANDOLFI, P. P. 2010. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature*, 465, 1033-8.
- POPESCU, N. C., AMSBAUGH, S. C., DIPAOLO, J. A., TRONICK, S. R., AARONSON, S. A. & SWAN, D. C. 1985. Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. *Somatic cell and molecular genetics*, 11, 149-55.
- POWELL, S. M., ZILZ, N., BEAZER-BARCLAY, Y., BRYAN, T. M., HAMILTON, S. R., THIBODEAU, S. N., VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 1992. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359, 235-7.
- PPYUN, H., KIM, I., CHO, S. S., SEO, K. J., YOON, K. & KWON, S. T. 2012. Improved PCR performance using mutant Tpa-S DNA polymerases from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus pacificus*. *J Biotechnol*, 164, 363-70.
- RAINER, T. H., WONG, L. K., LAM, W., YUEN, E., LAM, N. Y., METREWELI, C. & LO, Y. M. 2003. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clinical chemistry*, 49, 562-9.
- REIK, W., DEAN, W. & WALTER, J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293, 1089-93.
- REINERT, T., SCHOLER, L. V., THOMSEN, R., TOBIASEN, H., VANG, S., NORDENTOFT, I., LAMY, P., KANNERUP, A. S., MORTENSEN, F. V., STRIBOLT, K., HAMILTON-DUTOIT, S., NIELSEN, H. J., LAURBERG, S., PALLISGAARD, N., PEDERSEN, J. S., ORNTOFT, T. F. & ANDERSEN, C. L. 2016. Analysis of circulating tumour DNA to monitor disease burden following colorectal cancer surgery. *Gut*, 65, 625-34.
- RKI 2015. Krebs in Deutschland 2011/2012. 10. Ausgabe. *Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin.*
- ROSCHEWSKI, M., DUNLEAVY, K., PITTALUGA, S., MOORHEAD, M., PEPIN, F., KONG, K., SHOVLIN, M., JAFFE, E. S., STAUDT, L. M., LAI, C., STEINBERG, S. M., CHEN, C. C., ZHENG, J., WILLIS, T. D., FAHAM, M. & WILSON, W. H. 2015. Circulating tumour DNA and CT monitoring in patients with untreated diffuse large B-cell lymphoma: a correlative biomarker study. *The Lancet. Oncology*, 16, 541-9.
- SAMUELS, Y., WANG, Z., BARDELLI, A., SILLIMAN, N., PTAK, J., SZABO, S., YAN, H., GAZDAR, A., POWELL, S. M., RIGGINS, G. J., WILLSON, J. K., MARKOWITZ, S.,

- KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & VELCULESCU, V. E. 2004. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, 304, 554.
- SANMAMED, M. F., FERNANDEZ-LANDAZURI, S., RODRIGUEZ, C., ZARATE, R., LOZANO, M. D., ZUBIRI, L., PEREZ-GRACIA, J. L., MARTIN-ALGARRA, S. & GONZALEZ, A. 2015. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clinical chemistry*, 61, 297-304.
- SATO, K. A., HACHIYA, T., IWAYA, T., KUME, K., MATSUO, T., KAWASAKI, K., ABIKO, Y., AKASAKA, R., MATSUMOTO, T., OTSUKA, K. & NISHIZUKA, S. S. 2016. Individualized Mutation Detection in Circulating Tumor DNA for Monitoring Colorectal Tumor Burden Using a Cancer-Associated Gene Sequencing Panel. *PLoS one*, 11, e0146275.
- SAUKKONEN, K., LAKKISTO, P., PETTILA, V., VARPULA, M., KARLSSON, S., RUOKONEN, E. & PULKKI, K. 2008. Cell-free plasma DNA as a predictor of outcome in severe sepsis and septic shock. *Clinical chemistry*, 54, 1000-7.
- SCHIMANSKI, C. C., LINNEMANN, U. & BERGER, M. R. 1999. Sensitive detection of K-ras mutations augments diagnosis of colorectal cancer metastases in the liver. *Cancer research*, 59, 5169-75.
- SCHMID, D., BEHRENS, G., KEIMLING, M., JOCHEM, C., RICCI, C. & LEITZMANN, M. 2015. A systematic review and meta-analysis of physical activity and endometrial cancer risk. *European journal of epidemiology*, 30, 397-412.
- SCHMID, D. & LEITZMANN, M. F. 2014. Association between physical activity and mortality among breast cancer and colorectal cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 25, 1293-311.
- SCHMIDT, B., WEICKMANN, S., WITT, C. & FLEISCHHACKER, M. 2008. Integrity of cell-free plasma DNA in patients with lung cancer and nonmalignant lung disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137, 207-13.
- SCHMITZ, K. H., COURNEYA, K. S., MATTHEWS, C., DEMARK-WAHNEFRIED, W., GALVAO, D. A., PINTO, B. M., IRWIN, M. L., WOLIN, K. Y., SEGAL, R. J., LUCIA, A., SCHNEIDER, C. M., VON GRUENIGEN, V. E. & SCHWARTZ, A. L. 2010. American College of Sports Medicine roundtable on exercise guidelines for cancer survivors. *Medicine and science in sports and exercise*, 42, 1409-26.
- SCHUTZ, E., AKBARI, M. R., BECK, J., URNOVITZ, H., ZHANG, W. W., BORNEMANN-KOLATZKI, K., MITCHELL, W. M., NAM, R. K. & NAROD, S. A. 2015. Chromosomal instability in cell-free DNA is a serum biomarker for prostate cancer. *Clinical chemistry*, 61, 239-48.
- SCHWARTZ, A. L., MORI, M., GAO, R., NAIL, L. M. & KING, M. E. 2001. Exercise reduces daily fatigue in women with breast cancer receiving chemotherapy. *Medicine and science in sports and exercise*, 33, 718-23.
- SCHWARZENBACH, H., HOON, D. S. & PANTEL, K. 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature reviews. Cancer*, 11, 426-37.
- SCHWARZENBACH, H., STOEHLMACHER, J., PANTEL, K. & GOEKKURT, E. 2008. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1137, 190-6.
- SEGAL, R. J., REID, R. D., COURNEYA, K. S., MALONE, S. C., PARLIAMENT, M. B., SCOTT, C. G., VENNER, P. M., QUINNEY, H. A., JONES, L. W., D'ANGELO, M. E. & WELLS, G. A. 2003. Resistance exercise in men receiving androgen deprivation therapy for prostate cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21, 1653-9.
- SHAH, C. A., ALLISON, K. H., GARCIA, R. L., GRAY, H. J., GOFF, B. A. & SWISHER, E. M. 2008. Intratumoral T cells, tumor-associated macrophages, and regulatory T cells: association with p53 mutations, circulating tumor DNA and survival in women with ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 109, 215-9.
- SHAW, J. A., PAGE, K., BLIGHE, K., HAVA, N., GUTTERY, D., WARD, B., BROWN, J., RUANGPRATHEEP, C., STEBBING, J., PAYNE, R., PALMIERI, C., CLEATOR, S.,

- WALKER, R. A. & COOMBES, R. C. 2012. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. *Genome research*, 22, 220-31.
- SHERWOOD, J. L., CORCORAN, C., BROWN, H., SHARPE, A. D., MUSILOVA, M. & KOHLMANN, A. 2016. Optimised Pre-Analytical Methods Improve KRAS Mutation Detection in Circulating Tumour DNA (ctDNA) from Patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *PloS one*, 11, e0150197.
- SIDRANSKY, D., TOKINO, T., HAMILTON, S. R., KINZLER, K. W., LEVIN, B., FROST, P. & VOGELSTEIN, B. 1992. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science*, 256, 102-5.
- SIEGEL, R. L., MILLER, K. D. & JEMAL, A. 2016. Cancer statistics, 2016. *CA: a cancer journal for clinicians*, 66, 7-30.
- SILVA, J., GARCIA, V., RODRIGUEZ, M., COMPTE, M., CISNEROS, E., VEGUILLAS, P., GARCIA, J. M., DOMINGUEZ, G., CAMPOS-MARTIN, Y., CUEVAS, J., PENA, C., HERRERA, M., DIAZ, R., MOHAMMED, N. & BONILLA, F. 2012. Analysis of exosome release and its prognostic value in human colorectal cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 51, 409-18.
- SIMON, R. & ROYCHOWDHURY, S. 2013. Implementing personalized cancer genomics in clinical trials. *Nature reviews. Drug discovery*, 12, 358-69.
- SLAMON, D. J., GODOLPHIN, W., JONES, L. A., HOLT, J. A., WONG, S. G., KEITH, D. E., LEVIN, W. J., STUART, S. G., UDOVE, J., ULLRICH, A. & ET AL. 1989. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, 244, 707-12.
- SNYDER, M. W., KIRCHER, M., HILL, A. J., DAZA, R. M. & SHENDURE, J. 2016. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*, 164, 57-68.
- SONODA, H., KOHNOE, S., YAMAZATO, T., SATOH, Y., MORIZONO, G., SHIKATA, K., MORITA, M., WATANABE, A., KAKEJI, Y., INOUE, F. & MAEHARA, Y. 2011. Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection. *Gut*, 60, 814-9.
- SPINDLER, K. L., APPELT, A. L., PALLISGAARD, N., ANDERSEN, R. F., BRANDSLUND, I. & JAKOBSEN, A. 2014. Cell-free DNA in healthy individuals, noncancerous disease and strong prognostic value in colorectal cancer. *International journal of cancer*, 135, 2984-91.
- SPINDLER, K. L., PALLISGAARD, N., VOGELIUS, I. & JAKOBSEN, A. 2012. Quantitative cell-free DNA, KRAS, and BRAF mutations in plasma from patients with metastatic colorectal cancer during treatment with cetuximab and irinotecan. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18, 1177-85.
- STEFFENSEN, K. D., MADSEN, C. V., ANDERSEN, R. F., WALDSTROM, M., ADIMI, P. & JAKOBSEN, A. 2014. Prognostic importance of cell-free DNA in chemotherapy resistant ovarian cancer treated with bevacizumab. *European journal of cancer*, 50, 2611-8.
- TALY, V., PEKIN, D., BENHAIM, L., KOTSOPOULOS, S. K., LE CORRE, D., LI, X., ATOCHIN, I., LINK, D. R., GRIFFITHS, A. D., PALLIER, K., BLONS, H., BOUCHE, O., LANDI, B., HUTCHISON, J. B. & LAURENT-PUIG, P. 2013. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clinical chemistry*, 59, 1722-31.
- TAMKOVICH, S. N., CHEREPANOVA, A. V., KOLESNIKOVA, E. V., RYKOVA, E. Y., PYSHNYI, D. V., VLASSOV, V. V. & LAKTIONOV, P. P. 2006. Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075, 191-6.
- TAN, E. M., SCHUR, P. H., CARR, R. I. & KUNKEL, H. G. 1966. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation*, 45, 1732-40.

- TEMPLETON, G. F. 2011. A two-step approach for transforming continuous variables to normal: implications and recommendations for IS research. *Communications of the Association for Information Systems*, 28, 41-58.
- THAKUR, B. K., ZHANG, H., BECKER, A., MATEI, I., HUANG, Y., COSTA-SILVA, B., ZHENG, Y., HOSHINO, A., BRAZIER, H., XIANG, J., WILLIAMS, C., RODRIGUEZ-BARRUECO, R., SILVA, J. M., ZHANG, W., HEARN, S., ELEMENTO, O., PAKNEJAD, N., MANOVA-TODOROVA, K., WELTE, K., BROMBERG, J., PEINADO, H. & LYDEN, D. 2014. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. *Cell research*, 24, 766-9.
- THERMO-FISHER-SCIENTIFIC. *DNA Copy Number and Dilution Calculator* [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/dna-copy-number-calculator.html> [2017].
- THIAGALINGAM, S., LENGAUER, C., LEACH, F. S., SCHUTTE, M., HAHN, S. A., OVERHAUSER, J., WILLSON, J. K., MARKOWITZ, S., HAMILTON, S. R., KERN, S. E., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1996. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nature genetics*, 13, 343-6.
- THIBODEAU, S. N., BREN, G. & SCHAID, D. 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*, 260, 816-9.
- THIERRY, A. R., MOULIERE, F., EL MESSAOUDI, S., MOLLEVI, C., LOPEZ-CRAPEZ, E., ROLET, F., GILLET, B., GONGORA, C., DECHELOTTE, P., ROBERT, B., DEL RIO, M., LAMY, P. J., BIBEAU, F., NOUAILLE, M., LORIOT, V., JARROUSSE, A. S., MOLINA, F., MATHONNET, M., PEZET, D. & YCHOU, M. 2014. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nature medicine*, 20, 430-5.
- THIERRY, A. R., MOULIERE, F., GONGORA, C., OLLIER, J., ROBERT, B., YCHOU, M., DEL RIO, M. & MOLINA, F. 2010. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic acids research*, 38, 6159-75.
- TIE, J., KINDE, I., WANG, Y., WONG, H. L., ROEBERT, J., CHRISTIE, M., TACEY, M., WONG, R., SINGH, M., KARAPETIS, C. S., DESAI, J., TRAN, B., STRAUSBERG, R. L., DIAZ, L. A., JR., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & GIBBS, P. 2015. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 26, 1715-22.
- TIE, J., WANG, Y., TOMASETTI, C., LI, L., SPRINGER, S., KINDE, I., SILLIMAN, N., TACEY, M., WONG, H. L., CHRISTIE, M., KOSMIDER, S., SKINNER, I., WONG, R., STEEL, M., TRAN, B., DESAI, J., JONES, I., HAYDON, A., HAYES, T., PRICE, T. J., STRAUSBERG, R. L., DIAZ, L. A., JR., PAPADOPOULOS, N., KINZLER, K. W., VOGELSTEIN, B. & GIBBS, P. 2016. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Science translational medicine*, 8, 346ra92.
- TOHME, S., YAZDANI, H. O., AL-KHAFAJI, A. B., CHIDI, A. P., LOUGHRAN, P., MOWEN, K., WANG, Y., SIMMONS, R. L., HUANG, H. & TSUNG, A. 2016. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer research*, 76, 1367-80.
- TRAN, T. T., GROBEN, P. & PISETSKY, D. S. 2008. The release of DNA into the plasma of mice following hepatic cell death by apoptosis and necrosis. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals*, 13, 184-200.
- TREJO-BECERRIL, C., PEREZ-CARDENAS, E., TAJA-CHAYEB, L., ANKER, P., HERRERA-GOEPFERT, R., MEDINA-VELAZQUEZ, L. A., HIDALGO-MIRANDA, A., PEREZ-MONTIEL, D., CHAVEZ-BLANCO, A., CRUZ-VELAZQUEZ, J., DIAZ-CHAVEZ, J., GAXIOLA, M. & DUENAS-GONZALEZ, A. 2012. Cancer progression mediated by horizontal gene transfer in an in vivo model. *PLoS one*, 7, e2754.
- TUG, S., HELMIG, S., DEICHMANN, E. R., SCHMEIER-JURCHOTT, A., WAGNER, E., ZIMMERMANN, T., RADSACK, M., GIACCA, M. & SIMON, P. 2015. Exercise-induced

- increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exercise immunology review*, 21, 164-73.
- TUG, S., HELMIG, S., MENKE, J., ZAHN, D., KUBIAK, T., SCHWARTING, A. & SIMON, P. 2014. Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. *Cellular immunology*, 292, 32-9.
- TUG, S., MEHDORN, M., HELMIG, S., BREITBACH, S., EHLERT, T. & SIMON, P. 2016. Exploring the Potential of cfDNA Measurements After an Exhaustive Cycle Ergometer Test as a Marker for Performance Related Parameters. *Int J Sports Physiol Perform*, 1-24.
- TUG, S. N., V; EHLERT, T; JANSEN-WINKELN, B; LANG, H; WERNER, C; KNEIST, W; HEID, F; GOCKEL, I; SIMON, P unpublished. The impact of intra- and perioperative events on cell free DNA in colorectal cancer patients and non-cancer patients with inflammatory gastrointestinal diseases
- UHR, J. W. & PANTEL, K. 2011. Controversies in clinical cancer dormancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 12396-400.
- UMETANI, N., GIULIANO, A. E., HIRAMATSU, S. H., AMERSI, F., NAKAGAWA, T., MARTINO, S. & HOON, D. S. 2006a. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24, 4270-6.
- UMETANI, N., HIRAMATSU, S. & HOON, D. S. 2006b. Higher amount of free circulating DNA in serum than in plasma is not mainly caused by contaminated extraneous DNA during separation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075, 299-307.
- UMETANI, N., KIM, J., HIRAMATSU, S., REBER, H. A., HINES, O. J., BILCHIK, A. J. & HOON, D. S. 2006c. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clinical chemistry*, 52, 1062-9.
- UNDERHILL, H. R., KITZMAN, J. O., HELLWIG, S., WELKER, N. C., DAZA, R., BAKER, D. N., GLIGORICH, K. M., ROSTOMILY, R. C., BRONNER, M. P. & SHENDURE, J. 2016. Fragment Length of Circulating Tumor DNA. *PLoS genetics*, 12, e1006162.
- UNTERGASSER A, C. I., KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M, ROZEN SG. 2012. *Primer3 - new capabilities and interfaces* [Online]. *Nucleic Acids Research* 40(15):e115. Available: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/> 2011-2013].
- VALLEE, A., MARCQ, M., BIZIEUX, A., KOURI, C. E., LACROIX, H., BENNOUNA, J., DOUILLARD, J. Y. & DENIS, M. G. 2013. Plasma is a better source of tumor-derived circulating cell-free DNA than serum for the detection of EGFR alterations in lung tumor patients. *Lung cancer*, 82, 373-4.
- VAUGHN, C. P., ZOBELL, S. D., FURTADO, L. V., BAKER, C. L. & SAMOWITZ, W. S. 2011. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 50, 307-12.
- VELDERS, M., TREFF, G., MACHUS, K., BOSNYAK, E., STEINACKER, J. & SCHUMANN, U. 2014. Exercise is a potent stimulus for enhancing circulating DNase activity. *Clinical biochemistry*, 47, 471-4.
- VOGELSTEIN, B., FEARON, E. R., KERN, S. E., HAMILTON, S. R., PREISINGER, A. C., NAKAMURA, Y. & WHITE, R. 1989. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, 244, 207-11.
- VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*, 10, 789-99.
- VOGELSTEIN, B., PAPADOPOULOS, N., VELCULESCU, V. E., ZHOU, S., DIAZ, L. A., JR. & KINZLER, K. W. 2013. Cancer genome landscapes. *Science*, 339, 1546-58.
- WALSH, N. P., GLEESON, M., SHEPHARD, R. J., WOODS, J. A., BISHOP, N. C., FLESHNER, M., GREEN, C., PEDERSEN, B. K., HOFFMAN-GOETZ, L., ROGERS, C. J., NORTHOFF, H., ABBASI, A. & SIMON, P. 2011. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exercise immunology review*, 17, 6-63.

- WALSH, S. R., COOK, E. J., GOULDER, F., JUSTIN, T. A. & KEELING, N. J. 2005. Neutrophil-lymphocyte ratio as a prognostic factor in colorectal cancer. *Journal of surgical oncology*, 91, 181-4.
- WANG, B. G., HUANG, H. Y., CHEN, Y. C., BRISTOW, R. E., KASSAUEI, K., CHENG, C. C., RODEN, R., SOKOLL, L. J., CHAN, D. W. & SHIH IE, M. 2003. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer research*, 63, 3966-8.
- WANG, Z., CHEN, R., WANG, S., ZHONG, J., WU, M., ZHAO, J., DUAN, J., ZHUO, M., AN, T., WANG, Y., BAI, H. & WANG, J. 2014. Quantification and dynamic monitoring of EGFR T790M in plasma cell-free DNA by digital PCR for prognosis of EGFR-TKI treatment in advanced NSCLC. *PloS one*, 9, e110780.
- WEAVER, I. C., CERVONI, N., CHAMPAGNE, F. A., D'ALESSIO, A. C., SHARMA, S., SECKL, J. R., DYMOV, S., SZYF, M. & MEANEY, M. J. 2004. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature neuroscience*, 7, 847-54.
- WEN, L., LI, J., GUO, H., LIU, X., ZHENG, S., ZHANG, D., ZHU, W., QU, J., GUO, L., DU, D., JIN, X., ZHANG, Y., GAO, Y., SHEN, J., GE, H., TANG, F., HUANG, Y. & PENG, J. 2015. Genome-scale detection of hypermethylated CpG islands in circulating cell-free DNA of hepatocellular carcinoma patients. *Cell research*, 25, 1376.
- WOOD, L. D., PARSONS, D. W., JONES, S., LIN, J., SJOBLOM, T., LEARY, R. J., SHEN, D., BOCA, S. M., BARBER, T., PTAK, J., SILLIMAN, N., SZABO, S., DEZSO, Z., USTYANKSKY, V., NIKOLSKAYA, T., NIKOLSKY, Y., KARCHIN, R., WILSON, P. A., KAMINKER, J. S., ZHANG, Z., CROSHAW, R., WILLIS, J., DAWSON, D., SHIPITSIN, M., WILLSON, J. K., SUKUMAR, S., POLYAK, K., PARK, B. H., PETHIYAGODA, C. L., PANT, P. V., BALLINGER, D. G., SPARKS, A. B., HARTIGAN, J., SMITH, D. R., SUH, E., PAPADOPOULOS, N., BUCKHAULTS, P., MARKOWITZ, S. D., PARMIGIANI, G., KINZLER, K. W., VELCULESCU, V. E. & VOGELSTEIN, B. 2007. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science*, 318, 1108-13.
- XIA, S., KOHLI, M., DU, M., DITTMAR, R. L., LEE, A., NANDY, D., YUAN, T., GUO, Y., WANG, Y., TSCHANNEN, M. R., WORTHEY, E., JACOB, H., SEE, W., KILARI, D., WANG, X., HOVEY, R. L., HUANG, C. C. & WANG, L. 2015. Plasma genetic and genomic abnormalities predict treatment response and clinical outcome in advanced prostate cancer. *Oncotarget*, 6, 16411-21.
- YEO, C. D., KIM, J. W., KIM, K. H., HA, J. H., RHEE, C. K., KIM, S. J., KIM, Y. K., PARK, C. K., LEE, S. H., PARK, M. S. & YIM, H. W. 2013. Detection and comparison of EGFR mutations in matched tumor tissues, cell blocks, pleural effusions, and sera from patients with NSCLC with malignant pleural effusion, by PNA clamping and direct sequencing. *Lung cancer*, 81, 207-12.
- YIPP, B. G., PETRI, B., SALINA, D., JENNE, C. N., SCOTT, B. N., ZBYTNUIK, L. D., PITTMAN, K., ASADUZZAMAN, M., WU, K., MEIJNDERT, H. C., MALAWISTA, S. E., DE BOISFLEURY CHEVANCE, A., ZHANG, K., CONLY, J. & KUBES, P. 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature medicine*, 18, 1386-93.



## **7 Anhang**

### **7.1 Informationsmaterialien zu den durchgeführten Studien**

Studie 1 – Entwicklungen frei zirkulierender DNA bei Krebspatienten unter erschöpfender körperlicher Belastung

Inhalt der Anlagen:

Information und Einwilligungserklärung für Tumorpatienten (s. 213-215)

Information und Einwilligungserklärung für gesunde Probanden (s. 216-218)

Studie 2 – Entwicklungen frei zirkulierender Tumor-DNA bei Patienten mit kolorektalem Karzinom während des Resektionsprozesses

Inhalt der Anlagen:

Information und Einwilligungserklärung für Tumorpatienten (s. 219-221)

Information und Einwilligungserklärung für Kontrollprobanden (s. 222-224)

Wissenschaftliche Studie zu:

## Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten unter körperlicher Belastung

### Information und Einwilligungserklärung für Tumorpatienten

Sehr geehrter Proband/ Patient, sehr geehrte Probandin/ Patientin,

bei bestehendem Interesse laden wir Sie hiermit ein, an der Studie zur "Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten unter körperlicher Belastung" teilzunehmen. Diese Studienteilnahme ist freiwillig. Ziel dieser Studie ist es im Rahmen ihrer klinischen Betreuung Messungen zur frei zirkulierenden Erbsubstanz (DNA) vor und nach körperlicher Belastung durchzuführen. Wir wollen damit überprüfen, ob die zellfreie DNA im Blut unter körperlicher Belastung als möglicher diagnostischer Marker im Kampf gegen Krebserkrankungen verwendet werden kann. In diesem Fall könnte in Zukunft im Rahmen einer sportmedizinischen Belastungsuntersuchung ein Routinetest auf mögliche Krebserkrankungen durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Studie werden wir Sie durch einen Mehrstufentest auf dem Fahrradergometer der Abteilung Sportmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz nach standardisiertem Protokoll belasten. Der Mehrstufentest beginnt für Tumorpatienten mit einer Anfangs Leistung von 25 Watt. Nach jeweils 3 Minuten wird die Leistung um 25 Watt gesteigert. Sowohl Anfangsleistung als auch Steigerung können an die Leistungsfähigkeit des jeweiligen Patienten angepasst werden, da die individuelle Belastbarkeit, nicht die nominale Leistung, für die Vergleichbarkeit der Messwerte ausschlaggebend ist. Belastungsende ist die maximale individuelle Belastbarkeit. Vor und nach der Belastung auf dem Fahrradergometer wird Ihnen jeweils 20 ml Vollblut durch Punktion der Armvene entnommen. Hinzu kommt die Entnahme von 20 µl Kapillarblut aus dem hyperämisierten Ohrläppchen und aus der Fingerbeere nach den einzelnen Belastungsstufen und 1, 3 und 6 Minuten nach Ende der Belastung, um anhand von einer Laktatmessung die individuelle Belastbarkeit zu bestimmen. Auch werden Ihre persönlichen Daten wie Alter, Gewicht und Geschlecht notiert. Die gesamte Zeitdauer der Studienteilnahme beträgt in etwa 3 Stunden.

Ihre Blutproben und persönlichen Daten werden noch im Untersuchungsraum pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Name, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) und können dann nur noch durch einen Entschlüsselungscode Ihrer Person zugeordnet werden. Dieser Code ist nur dem Studienleiter bekannt. Bei der Blutabnahme gibt es normalerweise keine Komplikationen. Dennoch kann es gewöhnlich zu leichten blauen Flecken und geringfügigen Schmerzen an der Einstichstelle kommen. Gelegentlich kommt es auch zu größeren blauen Flecken, Infektionen (mit Fieber), oder auch zu Kreislauf-Problemen. In sehr seltenen Fällen zu Venenentzündungen oder auch Blutgerinnselbildungen an den Venen oder Arterien. Des Weiteren kann durch versehentliches Verletzen der Hautnerven Sensibilitätsstörungen um die Einstichstelle herum auftreten, es dort zur Narbenbildung oder auch zu Blutungen kommen.

FB 02  
Sozialwissenschaften,  
Medien und Sport

Institut für Sportwissen-  
schaft  
Abt. Sportmedizin, Prä-  
vention und Rehabilita-  
tion

**Prof. Dr. med. Dr. rer.  
nat. Perikles Simon**  
Studien- und Abtei-  
lungsleiter

Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz

Albert-Schweitzer-Str.  
22  
D-55128 Mainz

Tel. +49(0)6131-39  
23586  
Fax +49(0)6131-39  
23598

sportmedizin@uni-  
mainz.de

www.spomed.sport.uni-  
mainz.de

Auch wenn Sie sich zur Teilnahme an der Studie entschlossen haben, können Sie Ihre Einwilligung sich Blut abnehmen zu lassen jederzeit widerrufen und die Studie formlos und ohne Angaben von Gründen abbrechen und beenden. Nachdem Sie Ihre Einwilligungserklärung widerrufen haben, werden wir Ihre persönlichen Daten löschen und die Blutproben vernichten.

Vorsorglich werden Sie darauf hingewiesen, dass eine Versicherung für nicht\_schuldhaft verursachte Schäden, die im Zusammenhang mit der Studie auftreten können, nicht abgeschlossen wurde. Ein Versicherungsschutz besteht damit nur, wenn den Arzt oder einen anderen Mitarbeiter der Prüfstelle der Vorwurf eines schuldhaften Fehlverhaltens trifft. In Zweifelsfällen muss dabei der Entlastungsbeweis geführt werden, dass kein Verschulden vorliegt. Weunfälle sind ebenfalls nicht versichert.

Ihre freiwillige Teilnahme an dieser Studie dient ausschließlich zu Forschungszwecken, es ist kein persönlicher Nutzen damit verbunden. Des Weiteren sind die weitere Betreuungen durch die Abteilung für Sportmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (sportliche und/ oder ärztliche Betreuung) vollständig unabhängig von dieser Studie.

FB 02  
Sozialwissenschaften,  
Medien und Sport

Institut für Sportwissen-  
schaft  
Abt. Sportmedizin, Prä-  
vention und Rehabilita-  
tion

**Prof. Dr. med. Dr. rer.  
nat. Perikles Simon**  
Studien- und Abtei-  
lungsleiter

Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz

Albert-Schweitzer-Str.  
22  
D-55128 Mainz

Tel. +49(0)6131-39  
23586  
Fax +49(0)6131-39  
23598

sportmedizin@uni-  
mainz.de

www.spomed.sport.uni-  
mainz.de

**Einwilligungserklärung zur klinischen Studie „Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten unter körperlicher Belastung“ mit Erklärung zum Datenschutz**

„Ich erkläre mich hiermit bereit an der oben genannten Studie freiwillig teilzunehmen. Ich bin in einem persönlichen Gespräch ausführlich und verständlich über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der Studie aufgeklärt worden. Ich hatte die Gelegenheit zu einem Beratungsgespräch. Alle meine Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet, ich kann jederzeit neue Fragen stellen. Ich habe darüber hinaus den Text der Studienaufklärung gelesen und verstanden. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.“

**Ich habe verstanden und bin damit einverstanden, dass meine studienbezogenen Gesundheitsdaten pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Name, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) erhoben, auf Datenträgern gespeichert und vom Auftraggeber der Studie ausgewertet werden; die Weitergabe an Dritte einschließlich Publikation erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form, d.h. kann nicht meiner Person zugeordnet werden.**

Ein Exemplar der Studieninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten, gelesen und verstanden.

_____	_____	_____
Datum, Ort	Patient (Name in Druckbuchstaben)	Patient (Unterschrift)

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Teilnehmers eingeholt.

_____	_____	_____
Datum, Ort	Arzt (Name in Druckbuchstaben)	Arzt (Unterschrift)

Leiter der Studie:

Prof. Dr. med. Peter R. Galle, Direktor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik

PD Dr. med. Carl Christoph Schimanski, Oberarzt

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Perikles Simon, Leiter der Abteilung für Sportmedizin Johannes-Gutenberg-Universität

Klinik der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik; Langenbeckstraße 1; D – 55131 Mainz

Telefon: (0) 6131 17-0

Wissenschaftliche Studie zu:

## Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von gesunden Probanden unter körperlicher Belastung

### Information und Einwilligungserklärung für gesunde Probanden

Sehr geehrter Proband/ Patient, sehr geehrte Probandin/ Patientin,

bei bestehendem Interesse laden wir Sie hiermit ein, an der Studie zur "Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten unter körperlicher Belastung" teilzunehmen. Diese Studienteilnahme ist freiwillig. Ziel dieser Studie ist es im Rahmen ihrer klinischen Betreuung Messungen zur frei zirkulierenden Erbsubstanz (DNA) vor und nach körperlicher Belastung durchzuführen. Wir wollen damit überprüfen, ob die zellfreie DNA im Blut unter körperlicher Belastung als möglicher diagnostischer Marker im Kampf gegen Krebserkrankungen verwendet werden kann. In diesem Fall könnte in Zukunft im Rahmen einer sportmedizinischen Belastungsuntersuchung ein Routinetest auf mögliche Krebserkrankungen durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Studie werden wir Sie durch einen Mehrstufentest auf dem Fahrradergometer der Abteilung Sportmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz nach standardisiertem Protokoll belasten. Der Mehrstufentest beginnt für gesunde Probanden je nach körperlichem Zustand mit einer Anfangs Leistung von 25 oder 50 Watt. Nach jeweils 3 Minuten wird die Leistung um 25 Watt gesteigert. Sowohl Anfangsleistung als auch Steigerung können an die Leistungsfähigkeit des jeweiligen Probanden angepasst werden, da die individuelle Belastbarkeit, nicht die nominale Leistung, für die Vergleichbarkeit der Messwerte ausschlaggebend ist. Belastungsende ist die maximale individuelle Belastbarkeit. Vor und nach der Belastung auf dem Fahrradergometer wird Ihnen jeweils 20 ml Vollblut durch Punktion der Armvene entnommen. Hinzu kommt die Entnahme von 20 µl Kapillarblut aus dem hyperämisierten Ohrläppchens und aus der Fingerbeere nach den einzelnen Belastungsstufen und 1, 3 und 6 Minuten nach Ende der Belastung, um anhand von einer Laktatmessung die individuelle Belastbarkeit zu bestimmen. Auch werden Ihre persönlichen Daten wie Alter, Gewicht und Geschlecht notiert. Die gesamte Zeitdauer der Studienteilnahme beträgt in etwa 3 Stunden.

Ihre Blutproben und persönlichen Daten werden noch im Untersuchungsraum pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Name, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) und können dann nur noch durch einen Entschlüsselungscode Ihrer Person zugeordnet werden. Dieser Code ist nur dem Studienleiter bekannt. Bei der Blutabnahme gibt es normalerweise keine Komplikationen. Dennoch kann es gewöhnlich zu leichten blauen Flecken und geringfügigen Schmerzen an der Einstichstelle kommen. Gelegentlich kommt es auch zu größeren blauen Flecken, Infektionen (mit Fieber), oder auch zu Kreislauf-Problemen. In sehr seltenen Fällen zu Venenentzündungen oder auch Blutgerinnselbildungen an den Venen oder Arterien. Des Weiteren kann durch versehentliches Verletzen der Hautnerven Sensibilitätsstörungen um die Einstichstelle herum auftreten, es dort zur Narbenbildung oder auch zu Blutungen kommen.

FB 02  
Sozialwissenschaften,  
Medien und Sport

Institut für Sportwissen-  
schaft  
Abt. Sportmedizin, Prä-  
vention und Rehabilita-  
tion

**Prof. Dr. med. Dr. rer.  
nat. Perikles Simon**  
Studien- und Abtei-  
lungsleiter

Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz

Albert-Schweitzer-Str.  
22  
D-55128 Mainz

Tel. +49(0)6131-39  
23586  
Fax +49(0)6131-39  
23598

sportmedizin@uni-  
mainz.de

www.spomed.sport.uni-  
mainz.de

## Anhang

Johannes Gutenberg-Universität Mainz D-55099 Mainz

Auch wenn Sie sich zur Teilnahme an der Studie entschlossen haben, können Sie Ihre Einwilligung sich Blut abnehmen zu lassen jederzeit widerrufen und die Studie formlos und ohne Angaben von Gründen abbrechen und beenden. Nachdem Sie

Ihre Einwilligungserklärung widerrufen haben, werden wir Ihre persönlichen Daten löschen und die Blutproben vernichten.

Vorsorglich werden Sie darauf hingewiesen, dass eine Versicherung für nicht schuldhaft verursachte Schäden, die im Zusammenhang mit der Studie auftreten können, nicht abgeschlossen wurde. Ein Versicherungsschutz besteht damit nur, wenn den Arzt oder einen anderen Mitarbeiter der Prüfstelle der Vorwurf eines schuldhaften Fehlverhaltens trifft. In Zweifelsfällen muss dabei der Entlastungsbeweis geführt werden, dass kein Verschulden vorliegt. Wegunfälle sind ebenfalls nicht versichert.

Ihre freiwillige Teilnahme an dieser Studie dient ausschließlich zu Forschungszwecken, es ist kein persönlicher Nutzen damit verbunden. Des Weiteren sind die weitere Betreuungen durch die Abteilung für Sportmedizin der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (sportliche und/ oder ärztliche Betreuung) vollständig unabhängig von dieser Studie.

FB 02  
Sozialwissenschaften,  
Medien und Sport

Institut für Sportwissen-  
schaft  
Abt. Sportmedizin, Prä-  
vention und Rehabilita-  
tion

**Prof. Dr. med. Dr. rer.  
nat. Perikles Simon**  
Studien- und Abtei-  
lungsleiter

Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz

Albert-Schweitzer-Str.  
22  
D-55128 Mainz

TEL. +49(0)6131-39  
23586  
FAX +49(0)6131-39  
23598

sportmedizin@uni-  
mainz.de

www.spomed.sport.uni-  
mainz.de

**Einwilligungserklärung zur klinischen Studie „Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von gesunden Probanden unter körperlicher Belastung“ mit Erklärung zum Datenschutz**

Ich erkläre mich hiermit bereit an der oben genannten Studie freiwillig teilzunehmen. Ich bin in einem persönlichen Gespräch ausführlich und verständlich über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der Studie aufgeklärt worden. Ich hatte die Gelegenheit zu einem Beratungsgespräch. Alle meine Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet, ich kann jederzeit neue Fragen stellen. Ich habe darüber hinaus den Text der Studienaufklärung gelesen und verstanden. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.“

**Ich habe verstanden und bin damit einverstanden, dass meine studienbezogenen Gesundheitsdaten pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Name, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) erhoben, auf Datenträgern gespeichert und vom Auftraggeber der Studie ausgewertet werden; die Weitergabe an Dritte einschließlich Publikation erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form, d.h. kann nicht meiner Person zugeordnet werden.**

Ein Exemplar der Studieninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten, gelesen und verstanden.

_____	_____	_____
Datum, Ort	Patient (Name in Druckbuchstaben)	Patient (Unterschrift)

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Teilnehmers eingeholt.

_____	_____	_____
Datum, Ort	Arzt (Name in Druckbuchstaben)	Arzt (Unterschrift)

Leiter der Studie:

Prof. Dr. med. Peter R. Galle, Direktor der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik

PD Dr. med. Carl Christoph Schimanski, Oberarzt

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Perikles Simon, Leiter der Abteilung für Sportmedizin Johannes-Gutenberg-Universität

Klinik der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik; Langenbeckstraße 1; D – 55131 Mainz

Telefon: (0) 6131 17-0

Wissenschaftliche Studie zu:

## Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten während der Tumorresektion

### Information und Einwilligungserklärung für Tumorpatienten

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten fragen, ob Interesse besteht, an der Studie zur "Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten während der Tumorresektion" teilzunehmen. Diese Studienteilnahme ist freiwillig. Ziel dieser Studie ist es, die Auswirkungen der klinischen Entfernung des Tumors auf die frei zirkulierende Erbsubstanz (DNA) im Blut zu untersuchen. Wir wollen damit überprüfen, ob die zellfreie DNA im Blut bereits während der Entfernung des Primärtumors zur Diagnose von Tumorresten oder als prognostischer Marker für einen möglichen Rückfall der Krebserkrankung verwendet werden kann. In diesem Fall könnte in Zukunft im Rahmen der Tumorentfernung ein Routinetest auf zellfreie DNA durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Studie werden wir Ihnen mehrfach minimale Mengen venösen und arteriellen Blutes abnehmen. Zwei Blutentnahmen von je 1 ml finden vor der Operation vor und nach der Anästhesie statt, während der Operation werden durch einen routinemäßig gelegten Zugang höchstens 10 ml venöses bzw. arterielles Blut entnommen. An fünf weiteren Terminen nach der Operation werden jeweils noch einmal je 1 ml Blut entnommen. Diese im Blut gemessenen Werte sollen durch eine Untersuchung von Gewebeproben aus den während der Operation entnommenen Geweben bestätigt werden. Es wird für die Studie kein zusätzliches Gewebe entnommen.

Auch werden Ihre persönlichen Daten wie Alter, Gewicht und Geschlecht notiert. Es wird keine zusätzliche Zeitdauer durch die Studienteilnahme anfallen.

Ihre Blutproben, Gewebeproben und persönlichen Daten werden noch im Untersuchungsraum pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Name, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) und können dann nur noch durch einen Entschlüsselungscode Ihrer Person zugeordnet werden. Dieser Code ist nur dem Studienleiter bekannt. Die gewonnenen Blutproben und die daraus extrahierten DNA Proben werden 6-12 Monate aufbewahrt, um Messwiederholungen zu gewährleisten. Danach werden die Proben fachgerecht entsorgt. Die aus den Werten gewonnenen Daten werden in internationalen Literaturen veröffentlicht. Bei der Blutabnahme gibt es normalerweise keine Komplikationen. Dennoch kann es gewöhnlich zu leichten blauen Flecken und geringfügigen Schmerzen an der Einstichstelle kommen. Gelegentlich kommt es auch zu größeren blauen Flecken, Infektionen (mit Fieber), oder auch zu Kreislauf-Problemen. In sehr seltenen Fällen kann es zu Venenentzündungen oder auch Blutgerinnselbildungen an den Venen oder Arterien kommen. Des Weiteren können durch versehentliches Verletzen der Hautnerven Sensibilitätsstörungen um die Einstichstelle herum auftreten und es dort zur Narbenbildung oder auch zu Blutungen kommen. Da bei Ihrem Eingriff ohnehin entsprechende venöse bzw. arterielle Zugänge (dabei handelt es sich um ca. 1-2 mm dünne Kunststoffröhrchen) gelegt werden, verursachen die Blutabnahmen während der Operation keine zusätzlichen Risiken für Sie.

FB 02  
Sozialwissenschaften,  
Medien und Sport

Institut für Sportwissen-  
schaft  
Abt. Sportmedizin, Prä-  
vention und Rehabilita-  
tion

**Prof. Dr. med. Dr. rer.  
nat. Perikles Simon**  
Studien- und Abtei-  
lungsleiter

Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz

Albert-Schweitzer-Str.  
22  
D-55128 Mainz

Tel. +49(0)6131-39  
23586  
Fax +49(0)6131-39  
23598

sportmedizin@uni-  
mainz.de

www.spomed.sport.uni-  
mainz.de



Auch wenn Sie sich zur Teilnahme an der Studie entschlossen haben, können Sie Ihre Einwilligung sich Blut abnehmen zu lassen jederzeit widerrufen und die Studie formlos und ohne Angaben von Gründen abbrechen und beenden. Nachdem Sie Ihre Einwilligungserklärung widerrufen haben, werden wir Ihre persönlichen Daten löschen und die Blutproben sowie die für diese Studie gewonnenen Gewebeproben vernichten.

Vorsorglich werden Sie darauf hingewiesen, dass eine Versicherung für nicht\_schuldhaft verursachte Schäden, die im Zusammenhang mit der Studie auftreten können, nicht abgeschlossen wurde. Ein Versicherungsschutz besteht damit nur, wenn den Arzt oder einen anderen Mitarbeiter der Prüfstelle der Vorwurf eines schuldhaften Fehlverhaltens trifft. In Zweifelsfällen muss dabei der Entlastungsbeweis geführt werden, dass kein Verschulden vorliegt. Wegunfälle sind ebenfalls nicht versichert.

Ihre freiwillige Teilnahme an dieser Studie dient ausschließlich zu Forschungszwecken, es ist kein persönlicher Nutzen damit verbunden. Des Weiteren sind die weitere Betreuungen durch die Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und die Abteilung für Sportmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (sportliche und/ oder ärztliche Betreuung) vollständig unabhängig von dieser Studie.

FB 02  
Sozialwissenschaften,  
Medien und Sport

Institut für Sportwissen-  
schaft  
Abt. Sportmedizin, Prä-  
vention und Rehabilita-  
tion

**Prof. Dr. med. Dr. rer.  
nat. Perikles Simon**  
Studien- und Abtei-  
lungsleiter

Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz

Albert-Schweitzer-Str.  
22  
D-55128 Mainz

**Tel.** +49(0)6131-39  
23586  
**Fax** +49(0)6131-39  
23598

sportmedizin@uni-  
mainz.de

www.spomed.sport.uni-  
mainz.de

**Einwilligungserklärung zur klinischen Studie „Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten während der Tumorresektion“ mit Erklärung zum Datenschutz**

„Ich erkläre mich hiermit bereit an der oben genannten Studie freiwillig teilzunehmen. Ich bin in einem persönlichen Gespräch ausführlich und verständlich über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der Studie aufgeklärt worden. Ich hatte die Gelegenheit zu einem Beratungsgespräch. Alle meine Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet, ich kann jederzeit neue Fragen stellen. Ich habe darüber hinaus den Text der Studienaufklärung gelesen und verstanden. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.“

**Ich habe verstanden und bin damit einverstanden, dass meine studienbezogenen Gesundheitsdaten pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Name, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) erhoben, auf Datenträgern gespeichert und vom Auftraggeber der Studie ausgewertet werden; die Weitergabe an Dritte einschließlich Publikation erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form, d.h. kann nicht meiner Person zugeordnet werden.**

Ein Exemplar der Studieninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten, gelesen und verstanden.

_____	_____	_____
Datum, Ort	Patient (Name in Druckbuchstaben)	Patient (Unterschrift)

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Teilnehmers eingeholt.

_____	_____	_____
Datum, Ort	Arzt (Name in Druckbuchstaben)	Arzt (Unterschrift)

Leiter der Studie: Univ.-Prof. Dr. med. Hauke Lang  
Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Perikles Simon, Leiter der Abteilung für Sportmedizin Johannes-Gutenberg-Universität  
Prof. Dr. med. Ines Gockel, Oberärztin  
Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Abdominalchirurgie; Langenbeckstraße 1; D – 55131 Mainz

Wissenschaftliche Studie zu:

## Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten während der Tumorresektion

### Information und Einwilligungserklärung für Kontrollprobanden

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

wir möchten fragen, ob Interesse besteht, an der Studie zur "Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten während der Tumorresektion" teilzunehmen. Diese Studienteilnahme ist freiwillig. Ziel dieser Studie ist es, die Auswirkungen der klinischen Entfernung des Tumors auf die frei zirkulierende Erbsubstanz (DNA) im Blut zu untersuchen. Wir wollen damit überprüfen, ob die zellfreie DNA im Blut bereits während der Entfernung des Primärtumors zur Diagnose von Tumorresten oder als prognostischer Marker für einen möglichen Rückfall der Krebserkrankung verwendet werden kann. In diesem Fall könnte in Zukunft im Rahmen der Tumorentfernung ein Routinetest auf zellfreie DNA durchgeführt werden.

Im Rahmen dieser Studie werden wir Ihnen mehrfach minimale Mengen venösen und arteriellen Blutes abnehmen. Zwei Blutentnahmen von je 1 ml finden vor der Operation vor und nach der Anästhesie statt, während der Operation werden durch einen routinemäßig gelegten Zugang höchstens 10 ml venöses bzw. arterielles Blut entnommen. An fünf weiteren Terminen nach der Operation werden jeweils noch einmal je 1 ml Blut entnommen. Diese im Blut gemessenen Werte sollen durch eine Untersuchung von Gewebeproben aus den während der Operation entnommenen Geweben bestätigt werden. Es wird für die Studie kein zusätzliches Gewebe entnommen.

Auch werden Ihre persönlichen Daten wie Alter, Gewicht und Geschlecht notiert. Es wird keine zusätzliche Zeitdauer durch die Studienteilnahme anfallen. Die gewonnenen Blutproben und die daraus extrahierten DNA Proben werden 6-12 Monate aufbewahrt, um Messwiederholungen zu gewährleisten. Danach werden die Proben fachgerecht entsorgt.

Ihre Blutproben, Gewebeproben und persönlichen Daten werden noch im Untersuchungsraum pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Name, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) und können dann nur noch durch einen Entschlüsselungscode Ihrer Person zugeordnet werden. Dieser Code ist nur dem Studienleiter bekannt. Bei der Blutabnahme gibt es normalerweise keine Komplikationen. Dennoch kann es gewöhnlich zu leichten blauen Flecken und geringfügigen Schmerzen an der Einstichstelle kommen. Gelegentlich kommt es auch zu größeren blauen Flecken, Infektionen (mit Fieber), oder auch zu Kreislaufproblemen. In sehr seltenen Fällen kann es zu Venenentzündungen oder auch Blutgerinnselbildungen an den Venen oder Arterien kommen. Des Weiteren können durch versehentliches Verletzen der Hautnerven Sensibilitätsstörungen um die Einstichstelle herum ausgelöst werden und es dort zur Narbenbildung oder auch zu Blutungen kommen. Da bei Ihrem Eingriff ohnehin entsprechende venöse bzw. arterielle Zugänge (dabei handelt es sich um ca. 1-2 mm dünne Kunststoffröhrchen) gelegt werden, verursachen die Blutabnahmen während der Operation keine zusätzlichen Risiken für Sie.

FB 02  
Sozialwissenschaften,  
Medien und Sport

Institut für Sportwissen-  
schaft  
Abt. Sportmedizin, Prä-  
vention und Rehabilita-  
tion

**Prof. Dr. med. Dr. rer.  
nat. Perikles Simon**  
Studien- und Abtei-  
lungsleiter

Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz

Albert-Schweitzer-Str.  
22  
D-55128 Mainz

Tel. +49(0)6131-39  
23586  
Fax +49(0)6131-39  
23598

sportmedizin@uni-  
mainz.de

www.spomed.sport.uni-  
mainz.de

Auch wenn Sie sich zur Teilnahme an der Studie entschlossen haben, können Sie Ihre Einwilligung sich Blut abnehmen zu lassen jederzeit widerrufen und die Studie formlos und ohne Angaben von Gründen abbrechen und beenden. Nachdem Sie Ihre Einwilligungserklärung widerrufen haben, werden wir Ihre persönlichen Daten löschen und die Blutproben sowie die für diese Studie gewonnenen Gewebeproben vernichten.

Vorsorglich werden Sie darauf hingewiesen, dass eine Versicherung für nicht schuldhaft verursachte Schäden, die im Zusammenhang mit der Studie auftreten können, nicht abgeschlossen wurde. Ein Versicherungsschutz besteht damit nur, wenn den Arzt oder einen anderen Mitarbeiter der Prüfstelle der Vorwurf eines schuldhaften Fehlverhaltens trifft. In Zweifelsfällen muss dabei der Entlastungsbeweis geführt werden, dass kein Verschulden vorliegt. Wegunfälle sind ebenfalls nicht versichert.

Ihre freiwillige Teilnahme an dieser Studie dient ausschließlich zu Forschungszwecken, es ist kein persönlicher Nutzen damit verbunden. Des Weiteren sind die weitere Betreuungen durch die Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und die Abteilung für Sportmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (sportliche und/ oder ärztliche Betreuung) vollständig unabhängig von dieser Studie.

FB 02  
Sozialwissenschaften,  
Medien und Sport  
  
Institut für Sportwissen-  
schaft  
Abt. Sportmedizin, Prä-  
vention und Rehabilita-  
tion

**Prof. Dr. med. Dr. rer.  
nat. Perikles Simon**  
Studien- und Abtei-  
lungsleiter

Johannes Gutenberg-  
Universität Mainz

Albert-Schweitzer-Str.  
22  
D-55128 Mainz

Tel. +49(0)6131-39  
23586  
Fax +49(0)6131-39  
23598

sportmedizin@uni-  
mainz.de

www.spomed.sport.uni-  
mainz.de

**Einwilligungserklärung zur klinischen Studie „Untersuchung der qualitativen und quantitativen Veränderung zellfreier DNA im Blutplasma von Tumorpatienten während der Tumorresektion“ mit Erklärung zum Datenschutz**

Ich erkläre mich hiermit bereit an der oben genannten Studie freiwillig teilzunehmen. Ich bin in einem persönlichen Gespräch ausführlich und verständlich über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der Studie aufgeklärt worden. Ich hatte die Gelegenheit zu einem Beratungsgespräch. Alle meine Fragen wurden zufriedenstellend beantwortet, ich kann jederzeit neue Fragen stellen. Ich habe darüber hinaus den Text der Studienaufklärung gelesen und verstanden. Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden. Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angaben von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir daraus Nachteile entstehen.“

**Ich habe verstanden und bin damit einverstanden, dass meine studienbezogenen Gesundheitsdaten pseudonymisiert (d.h. kodiert ohne Angaben von Name, Anschrift, Initialen oder Ähnliches) erhoben, auf Datenträgern gespeichert und vom Auftraggeber der Studie ausgewertet werden; die Weitergabe an Dritte einschließlich Publikation erfolgt ausschließlich in anonymisierter Form, d.h. kann nicht meiner Person zugeordnet werden.**

Ein Exemplar der Studieninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten, gelesen und verstanden.

_____	_____	_____
Datum, Ort	Patient (Name in Druckbuchstaben)	Patient (Unterschrift)

Ich habe das Aufklärungsgespräch geführt und die Einwilligung des Teilnehmers eingeholt.

_____	_____	_____
Datum, Ort	Arzt (Name in Druckbuchstaben)	Arzt (Unterschrift)

Leiter der Studie: Univ.-Prof. Dr. med. Hauke Lang  
Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Perikles Simon, Leiter der Abteilung für Sportmedizin Johannes-Gutenberg-Universität  
Prof. Dr. med. Ines Gockel, Oberärztin  
Klinik und Poliklinik für Allgemein- und Abdominalchirurgie; Langenbeckstraße 1; D – 55131 Mainz

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den

---

Tobias Ehlert

## Danksagung

Nicht zuletzt gilt mein besonders herzlicher Dank allen Patientinnen und Patienten, die durch ihren selbstlosen Einsatz für die Forschung die Studien, auf denen diese Arbeit basiert erst möglich gemacht haben.

Vielen Dank auch an die Dr. Gerhard und Martha-Röttger-Stiftung für humanmedizinische Forschungsprojekte für die finanzielle Unterstützung der Tumorbelastungsstudie.







## Publikationen mit Zusammenfassungen

Zusammenfassungen der Artikel mit Erstautorenschaft sind in kursiver Schreibweise ergänzt.

## Veröffentlichungen in Zeitschriften mit Peer Review Verfahren

**Ehlert T.**, Tug S., Brahmer A., Neef V., Heid F., Werner C., Jansen-Winkel B., Kneist W., Lang H., Gockel I., Simon P., **Establishing PNB-qPCR for quantifying minimal ctDNA concentrations during tumour resection.** *Scientific Reports*, under Revision

### Abstract

*The analysis of blood plasma or serum as a non-invasive alternative to tissue biopsies is a much-pursued goal in cancer research. Various methods and approaches have been presented to determine a patient's tumour status, chances of survival, and response to therapy from serum or plasma samples. We established PNB-qPCR (Pooled, Nested, WT-Blocking qPCR), a highly specific nested qPCR with various modifications to detect and quantify minute amounts of circulating tumour DNA (ctDNA) from very limited blood plasma samples. PNB-qPCR is a nested qPCR technique combining ARMS primers, blocking primers, LNA probes, and pooling of multiple first round products for sensitive quantification of the seven most frequent point mutations in KRAS exon 2. Using this approach, we were able to characterize ctDNA and total cell-free DNA (cfDNA) kinetics by selective amplification of KRAS mutated DNA fragments in the blood plasma over the course of tumour resection and the surrounding days. Whereas total cfDNA concentrations increased over the surgical and regenerative process, ctDNA levels showed a different scheme, rising only directly after tumour resection and about three days after the surgery. For the first time, we present insights into the impact of surgery on the release of ctDNA and total cfDNA.*

Neuberger E.W., Perez I., Le Guiner C., Moser D., **Ehlert T.**, Allais M., Moullier P., Simon P., Snyder R.O., **Establishment of Two Quantitative Nested qPCR Assays Targeting the Human EPO Transgene.** *Gene Therapy*. 2016. doi: 10.1038/gt.2016.2.

Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D., Kubiak T., Michal M., Gori, T., **Ehlert T**, Beiter T, Simon P: **Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma.** *PLOS one*. 2014. 9, e87838.

**Ehler T, Simon P, Moser DA: Epigenetics in sports.** *Sports Medicine.* 2013. 43, 93-110

Abstract

*The heritability of specific phenotypical traits relevant for physical performance has been extensively investigated and discussed by experts from various research fields. By deciphering the complete human DNA sequence, the human genome project has provided impressive insights into the genomic landscape. The hope that this information would reveal the origin of phenotypical traits relevant for physical performance or disease risks has proven overly optimistic, and it is still premature to refer to a 'post-genomic' era of biological science. Linking genomic regions with functions, phenotypical traits and variation in disease risk is now a major experimental bottleneck. The recent deluge of genome-wide association studies (GWAS) generates extensive lists of sequence variants and genes potentially linked to phenotypical traits, but functional insight is at best sparse. The focus of this review is on the complex mechanisms that modulate gene expression. A large fraction of these mechanisms is integrated into the field of epigenetics, mainly DNA methylation and histone modifications, which lead to persistent effects on the availability of DNA for transcription. With the exceptions of genomic imprinting and very rare cases of epigenetic inheritance, epigenetic modifications are not inherited transgenerationally. Along with their susceptibility to external influences, epigenetic patterns are highly specific to the individual and may represent pivotal control centers predisposing towards higher or lower physical performance capacities. In that context, we specifically review how epigenetics combined with classical genetics could broaden our knowledge of genotype-phenotype interactions. We discuss some of the shortcomings of GWAS and explain how epigenetic influences can mask the outcome of quantitative genetic studies. We consider epigenetic influences, such as genomic imprinting and epigenetic inheritance, as well as the life-long variability of epigenetic modification patterns and their potential impact on phenotype with special emphasis on traits related to physical performance. We suggest that epigenetic effects may also play a considerable role in the determination of athletic potential and these effects will need to be studied using more sophisticated quantitative genetic models. In the future, epigenetic status and its potential influence on athletic performance will have to be considered, explored and validated using well controlled model systems before we can begin to extrapolate new findings to complex and heterogeneous human populations. A combination of the fields of genomics, epigenomics and transcriptomics along with improved bioinformatics tools and precise phenotyping, as well as a precise classification of the test populations is required for future research to better understand the inter-relations of exercise physiology, performance traits and also susceptibility towards diseases. Only this combined input can provide the overall outlook necessary to decode the molecular foundation of physical performance.*

**Ehler T, Simon P: Genetik und Epigenetik der körperlichen Leistungsfähigkeit.**

*Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin.* 2011. 4 (62) 86-91

Abstract

*Die Frage in wie weit körperliche Leistungsfähigkeit angeboren ist, oder durch Umwelteinflüsse erworben werden kann, ist für die sportmedizinische Praxis und Forschung von tragender Bedeutung. Dieser Beitrag liefert einen kurzen Überblick über die Fortschritte in der Untersuchung des Einflusses unserer Gene auf die phänotypischen Merkmale der Leistungsfähigkeit und gibt einen Ausblick auf ein Themengebiet, das Molekulargenetik und Sportmedizin in den nächsten Jahren gleichermaßen beschäftigen wird: die Epigenetik. Die Epigenetik ist eine vielschichtige Disziplin, die mehrere Mechanismen zur Modifizierung des Erbguts wie z.B. Basenmethylierung und Histonmodifikationen zusammenfasst. In ihr vereint sich der Faktor der Determination von Eigenschaften, mit Einschränkungen auch der Vererbbarkeit, den wir aus der Genetik kennen, mit dem Faktor der Induzierbarkeit durch Umwelteinflüsse in vielfältiger Weise. Epigenetische Muster werden individuell während bestimmter Lebensabschnitte festgelegt und nur zu geringen Teilen vererbt. Die etablierten epigenetischen Merkmale regulieren Genaktivitäten bis hin zu einer vollständigen Abschaltung des betroffenen Gens. Hierdurch wird eine Zuordnung komplexer Phänotypen, wie der Leistungsfähigkeit zu bestimmten Genotypen erschwert. Ein Vergleich zu den Erkenntnissen der Abklärung anderer polygenetisch bedingter, phänotypischer Merkmale wie dem Typ 2 Diabetes kann helfen, Einblicke über Aufwand, methodisches Vorgehen und mögliche Praxisrelevanz weiterer Forschung zu gewinnen. Vor allem mit Blick auf epigenetische Regulationen von Genen ist das Ergebnis eines solchen Vergleichs ernüchternd und für den Praktiker stellt sich die Frage, ob der Versuch einer direkten Zuordnung des Genotyps zum Phänotyp zielführend sein kann.*

**Ehler T, Simon P, Tug S: Misleading interpretations and public misinformation on human growth hormone in athletes.** *Annals of Internal Medicine.* 2010. 345-346

Brief an den Herausgeber:

*TO THE EDITOR: Meinhardt and colleagues (1) reported significant water retention and reduction of fat mass after administration of growth hormone, whereas endurance, strength, power, and muscle mass were not significantly altered. These findings are in line with previous studies (2, 3). Meinhardt and colleagues are the first to suggest an effect of growth hormone in a Wingate test procedure. Experts in exercise physiology are critically debating the athletic significance of the Wingate test (4), but Meinhardt and colleagues speculate in their article and in a video message addressed to the mass media that their findings could translate into an improvement of 0.4 second in a 10-second sprint over 100 meters. Given the study population, a more rational speculation could have been that a recreational athlete might be able to improve their time in the 100-meter dash by about half a second. Therefore, we should have a*

closer look at the precise scientific findings of this study and at their potential significance for the field of exercise physiology.

The authors clearly state that this is an analysis of secondary outcome data. Therefore, it is not surprising that “training quantity” as an important factor influencing performance outcome measurements is not well-distributed between the different groups, as shown in Table 1. This raises the question of whether the study should be called “a randomized trial.” The study uses the term “ $\dot{V}O_2\text{max}$ .” In fact, the Methods section reads as if only an “estimated  $\dot{V}O_2\text{max}$ ” had been determined by using a population-derived nomogram for a relationship between heart rate and power output, a method that is irrelevant for the determination of growth hormone-induced intraindividual differences in  $\dot{V}O_2\text{max}$ . Concerning the “significant” improvement in the Wingate value as 1 of 4 other secondary outcome variables for physical performance, the authors corrected for multiple comparisons across the different groups by a not very conservative Holm correction, although they did not correct for the number of different secondary outcome variables. We speculate that *Annals* would not have published this study if it was related to a clinically relevant outcome measure. The study is just about an 0.4-second improvement in the 100-meter dash, which does not hurt any patient. However, it just may harm athletes, who are not within the scope of the journal.

### **Vorträge und Posterpräsentationen**

- **Posterpräsentation:** **Ehlert T**, Simon P. *K-ras mutation detection from limited sample volumes by nested quantitative PCR*. 93rd Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Mainz Germany, 03.2014
- **Vortrag:** **Ehlert T**, Simon P. *Sportmedizinische Intervention bei Krebs und Exemplarische Vorstellung einer Bewegungstherapieeinheit bei Darmkrebs*. Fortbildungsveranstaltung „Sportmedizinische Diagnostik und Therapie bei Darmkrebs“ für niedergelassene Ärzte, Sportmedizin Mainz, Deutschland, 11.2012
- **Posterpräsentation:** **Ehlert T**, Mehdorn M, Tug S, Simon P. *Changes in free circulating DNA levels in human blood plasma after an exhaustive incremental cycling test*. 91st Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Dresden, Germany, 03.2012
- **Vortrag:** **Ehlert T**, Tug S, Simon P. *Epigenetics in Sports: A potential strong confounder in genetic association studies*. 90th Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Regensburg, Germany, 03.2011
- **Vortrag:** **Ehlert T**, Simon P. *Genetik und Epigenetik der körperlichen Leistungsfähigkeit: Wo liegen die Grenzen der Trainierbarkeit eines Individuums?* 10. Tagung der Kommission Leichtathletik in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Leichtathletik-Verband (DLV), Mainz, Deutschland, 10.2010
- **Posterpräsentation:** **Ehlert T**, Hirschhaeuser F, Mueller-Klieser W. *Characterization of infiltration of immune cells into tumor spheroids mediated by ertumaxomab*. CIMT, Mainz, Germany, 06.2009