

Aus dem Zentrum für Kardiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

# **Amplifikationsunabhängige Direkt-Fluorometrie zellfreier DNA**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Stefan Rothfuß

aus Heidelberg

Mainz, 2023

Wissenschaftlicher Vorstand: Aus Datenschutzgründen entfernt.

1. Gutachter: Aus Datenschutzgründen entfernt.

2. Gutachter: Aus Datenschutzgründen entfernt.

Datum der Promotion: 30.11.2023



## Inhaltsverzeichnis

I.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VII
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	XI
III.	TABELLENVERZEICHNIS .....	XVI
1	EINLEITUNG .....	1
2	LITERATURDISKUSSION .....	3
2.1	Definition & Historie zellfreier DNA .....	3
2.2	Biologie der zellfreien DNA .....	4
2.3	Klinische Relevanz zellfreier DNA .....	10
2.3.1	Onkologie .....	13
2.3.2	Sportmedizin .....	19
2.4	Methodik der Quantifizierung zellfreier DNA .....	21
2.4.1	Prä-Analytik .....	21
2.4.2	Methoden der Quantifizierung .....	24
2.4.2.1	Quantifizierung ohne Nukleinsäuren-Extraktion .....	26
2.4.2.2	Amplifikationsunabhängige Quantifizierung ohne Nukleinsäure-Extraktion .....	27
2.5	Zusammenfassung der Literaturdiskussion: Forschungslücke und eigener Ansatz .....	28
3	MATERIAL .....	30
3.1	Software .....	30
3.2	Geräte .....	31
3.3	Verbrauchsmaterialien .....	32
3.4	Chemikalien, Kits .....	34
3.5	Medium/Puffer .....	35
3.6	Primer .....	35
4	METHODEN .....	36
4.1	Akquirierung von Probenmaterial .....	36
4.2	Isolation von Nukleinsäuren und Plasma-Aufreinigung .....	37

4.2.1	Zentrifugation .....	38
4.2.2	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	39
4.2.3	RNA-Extraktion .....	40
4.2.4	DNA-Degradation (Desoxyribonuklease I) .....	41
4.2.5	Proteolyse (Proteinase K) .....	42
4.3	Analyse von Nukleinsäuren .....	42
4.3.1	Spektroskopische DNA-Quantifizierung.....	43
4.3.2	PCR und quantitative real time PCR.....	44
4.4	Amplifikationsunabhängige Direkt-Fluorometrie (ADF).....	48
4.5	Statistische Auswertung .....	51
5	ERGEBNISSE .....	52
5.1	Etablierung der amplifikationsunabhängigen Direkt-Fluorometrie (ADF).....	52
5.1.1	Etablierung der Standardreihe .....	56
5.1.1.1	Plasma-Aufreinigung .....	63
5.1.1.2	Adaptation Standard-DNA .....	79
5.1.2	Absolute Quantifizierung.....	87
5.1.2.1	Individuen-spezifisch .....	88
5.1.2.2	Plasma-Pooling .....	90
5.1.3	Relative Quantifizierung.....	97
5.2	Relative Quantifizierung der perioperativen Dynamik zellfreier DNA bei Resektion benigner und maligner Kolorektaltumoren .....	102
5.2.1	Analyse der verwendeten Methodik anhand klinischer Endpunkte .....	105
5.2.1.1	Perioperative Dynamik .....	105
5.2.1.2	Tumor-Dignität.....	107
5.2.1.3	Operationstechnik .....	113
6	DISKUSSION .....	117
6.1	Etablierung einer rein fluorospektroskopischen Methode direkt aus Plasma zur absoluten und relativen Quantifizierung zellfreier DNA.....	117

6.1.1	Etablierung der Standardreihe .....	120
6.1.1.1	Plasma-Aufreinigung .....	121
6.1.1.2	Adaptation Standard-DNA.....	127
6.1.1.3	Individuen-spezifische- & Pooling-Standardreihe .....	128
6.1.2	Quantifizierung.....	129
6.2	Relative Quantifizierung der perioperativen Dynamik zellfreier DNA bei Resektion benigner und maligner Kolorektalpathologien .....	133
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	140
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	142
9	ANHANG .....	158
9.1	Literatur .....	158
9.1.1	Zellfreie DNA in verschiedenen klinischen Fachbereichen .....	158
9.2	Ergebnisse .....	162
9.2.1	Vorversuche zu Plasmakonz., Puffer und Fluorochrom .....	162
9.2.2	Schmelzkurven-Analyse: Evaluation Temperatureinfluss .....	165
9.2.3	Einflussfaktor Ribonukleinsäure.....	167
9.2.4	DNA-Degradation.....	169
9.2.5	Einfluss der DNA-Degradation auf Standardreihen.....	178
9.2.6	Temperatur-Einfluss nach Proteolyse .....	180
9.2.7	Differenzierbarkeit der Standard-Konzentrationen (cfDNA-Isolat) .....	183
9.2.8	Differenzierbarkeit der Standard-Konzentrationen nach Proteolyse ...	185
9.2.9	Evaluation von Standardreihen basierend auf Pooling-Plasma im Vergleich zu Standardreihen basierend auf den enthaltenen Einzelproben ....	186
10	DANKSAGUNG .....	191
11	LEBENS LAUF .....	192

## I. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADF	Amplifikationsunabhängige Direkt-Fluorometrie
AK	Antikörper
APC	Adenomatöses Polyposis Coli Gen
bp	base pairs / Basenpaare
BRAF	Gen der Serin /Threonin-Kinase B-Raf
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CD-4	“cluster of differentiation 4”-Rezeptor
cfDNA	cell free DNA / zellfreie DNA
Ct	Threshold Cycle time / Schwellenwert-Zyklus
Ct-DNA	circulating tumor-DNA / zellfreie Tumor-DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
ds	double stranded / doppelsträngig
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
EL-Puffer	Erythrozyten-Lyse-Puffer
FF	Fluoreszenz-Farbstoff

FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanat
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitationskonstante (G-Zahl der Zentrifuge)
h	hour / Stunde
HER-2	human epidermal growth factor receptor 2
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HWZ	Halbwertszeit
IcfDNA	Isolat zellfreier DNA
IgDNA	Isolat genomischer DNA
IL	Interleukin
Ind.	Individuum
INF	Interferon
kDa	kilo-Dalton
Konz.	Konzentration
KP	Kontrollproband
l	Liter
L1PA2	LINE-1-Retrotransposon 2
LOH	loss of heterozygosity
M	Molare Masse
M.	Mittelwert
Med.	Median
mg	Milligramm
min.	Minuten
mm	Millimeter



mtDNA	mitochondriale DNA
nDNA	nukleäre DNA
NETs	neutrophil extracellular traps
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCE	Phenol-Chloroform-Extraktion
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PG	PICO Green
pg	Picogramm
pH	potentia hydrogenii / Potenzial des Wasserstoffs
prä	lat. vor
ProtK	Proteinase K
post	lat. nach
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
qPCR	quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion
RA	Rheumatoide Arthritis
rest	engl. ausruhen
RFU	relative fluorescence unit / Relative Fluoreszenzeinheit
RG	RIBO Green
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Runden/Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur

SD	standard deviation / Standardabweichung
sec.	Sekunde
SG1	SYBR Green 1
SGO	SYBR Gold
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SOFA	sequential organ failure
ss	single stranded / einzelsträngig
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TH1	T-Helferzellen
TNF	Tumornekrosefaktor
TP	Tumorpatient
TVT	tiefe Venenthrombose
U	Unit / Einheit
V	Volt
v.a.	vor allem
xg	Mehrfaches der Gravitationskonstante

## II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Temperaturabhängige Änderung der Strahlungsintensität entlang einer Schmelzkurve 40-65 °C .....	55
Abbildung 2: Direktfluorometrische Messung von Standardreihen in Wasser .....	57
Abbildung 3: Direktfluorometrische Messung von Standardreihen in Wasser (0-40 ng/ml) .....	58
Abbildung 4: Direktfluorometrische Messung von Standardreihen auf Plasma von Kontrollprobanden in einer physikalischen Belastungsstudie .....	60
Abbildung 5: Direktfluorometrische Messung von Standardreihen auf Plasma von Tumorpatienten in einer physikalischen Belastungsstudie .....	61
Abbildung 6: Korrelation der Messmethoden AD-Fluorometrie und L1PA2-qPCR anhand Standardreihen in Plasma aufgetrennt nach Probandentypus.....	62
Abbildung 7: Vergleich der direktfl. Strahlungsintensität nach Ultrazentrifugation/-filtration .....	64
Abbildung 8: Direktfl. Messung einer Standardreihe auf ultrazentrifugierten Plasma	66
Abbildung 9: Arbeitsschema zur Evaluation einer suffizienten DNase-Konzentration .....	69
Abbildung 10: DNA-Konz. nach differenter DNase-Konz. (L1PA2-qPCR).....	70
Abbildung 11: Strahlungsintensität nach differenter DNase-Konz (AD-Fluorometrie) .....	70
Abbildung 12: Arbeitsschema zur Evaluation einer suffizienten chemischen DNase-Inaktivierung .....	72
Abbildung 13: DNA-Konz. nach chemischer Dnase-Inaktivierung mit differenter EDTA-Konz. (L1PA2-qPCR) .....	74
Abbildung 14: Strahlungsintensität nach chemischer Dnase-Inaktivierung mit differenter EDTA-Konz. (AD-Fluorometrie).....	74
Abbildung 15: Korrelation der Methoden anhand Standardreihen nach DNA-Verdau und Vergleich dieser mit Standardreihen auf den dafür verwendeten Reagenzien sowie Plasma.....	75
Abbildung 16: Arbeitsschema zur Erstellung einer Standardreihe unter DNA-Degradation und Proteolyse .....	76
Abbildung 17: Korrelation der AD-Fluorometrie mit spektroskopischer DNA-Quantifizierung und Vergleich von chemischer mit enzymatischer DNase-Inaktivierung .....	78

Abbildung 18: Std.-Abweichung der AD-Fluorometrie nach chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung .....	79
Abbildung 19: Arbeitsschema zur Erstellung einer Standardreihe unter DNase-Verdau und Verwendung isolierter cfDNA als DNA-Standards .....	80
Abbildung 20: Vergleich der Standardreihen nach verwendetem DNA-Isolat (L1PA2-qPCR).....	82
Abbildung 21: Vergleich der Standardreihen nach verwendetem DNA-Isolat (AD-Fluorometrie) .....	82
Abbildung 22: Korrelation der Methoden im Vergleich der Standardreihen nach DNA-Isolat.....	83
Abbildung 23: Arbeitsschema zur Erstellung einer Standardreihe mit aus Plasma-Pooling generierten Standards .....	85
Abbildung 24: Vergleich zwischen proteolyzierter und nativer Standardreihe aus mit Plasma-Pooling generierten Standards .....	86
Abbildung 25: Std.-Abweichung der AD-Fluorometrie proteolyzierter Standards gegen nativ belassene Standards .....	87
Abbildung 26: Korrelation der Ind.-spezifischen Standardreihen nach direktfluorometrischer und spektroskopischer Messung .....	89
Abbildung 27: Korrelation der Quantifizierung nach ADF (anhand Ind.-spez. Standardreihen) und L1PA2-qPCR .....	90
Abbildung 28: Korrelation der auf Basis von Pooling-Plasma generierten Standardreihen nach direktfluorometrischer und spektroskopischer Messung und im Vergleich von chemischer gegen enzymatische DNase-Inaktivierung .....	93
Abbildung 29: Korrelation der Quantifizierung nach ADF (anhand Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma) und L1PA2-qPCR .....	94
Abbildung 30: Dynamik zellfreier DNA unter Belastung im Vergleich der zur Quantifizierung verwendeten Methodik .....	95
Abbildung 31: Korrelation der Quantifizierung nach ADF (anhand von Standardreihen mit aus Pooling-Plasma generierten Standards) und L1PA2-qPCR.....	96
Abbildung 32: Korrelation der verwendeten Methodik im Vergleich proteolyzierter und nativer Plasmaproben einer physikalischen Belastungsstudie .....	98
Abbildung 33: Vergleich der Methoden anhand der relativen Dynamik zellfreier DNA unter physikalischer Belastung (Kontrollprobanden) .....	100
Abbildung 34: Vergleich der Methoden anhand der relativen Dynamik zellfreier DNA unter physikalischer Belastung (Tumorpatienten).....	101

Abbildung 35: Finales Arbeitsschema zur Prozessierung und Analyse von Plasma (AD-Fluorometrie) .....	101
Abbildung 36: Arbeitsschema zur Gegenüberstellung der AD-Fluorometrie und L1PA2-qPCR anhand der relativen Quantifizierung perioperativer Plasmaproben .....	102
Abbildung 37: Vergleich der Methoden anhand der relativen Dynamik zellfreier DNA unter operativer Resektion (Patient 1-4) .....	103
Abbildung 38: Vergleich der Methoden anhand der relativen Dynamik zellfreier DNA unter operativer Resektion (Patient 5-10) .....	104
Abbildung 39: Korrelation der Methoden anhand Gesamtheit der prä-/intra-/ und postoperativ einer kolorektalen Tumorsektion akquirierten Plasmaproben .....	105
Abbildung 40: Vergleich der Methoden anhand der perioperativen Dynamik zellfreier DNA (jeweils Mittelwerte aller Patienten) .....	107
Abbildung 41: Perioperative cfDNA-Konz. nach Tumordignität (L1PA2-qPCR) .....	108
Abbildung 42: Perioperative Strahlungsintensität der cfDNA nach Tumor-Dignität (AD-Fluorometrie) .....	109
Abbildung 43: cfDNA-Konz. nach Tumor-Dignität prä- und postoperativ (L1PA2-qPCR) .....	110
Abbildung 44: Strahlungsintensität nach Tumor-Dignität prä- und postoperativ (AD-Fluorometrie) .....	111
Abbildung 45: Korrelation der Methoden nach Tumor-Dignität .....	112
Abbildung 46: Vergleich der Methoden anhand der perioperativen Dynamik zellfreier DNA (Patienten mit benignen Kolorektal-Tumoren) .....	112
Abbildung 47: Vergleich der Methoden anhand der perioperativen Dynamik zellfreier DNA (Patienten mit malignen Kolorektal-Tumoren) .....	113
Abbildung 48: Perioperative cfDNA-Konz. nach angewandter Operationstechnik (L1PA2-qPCR) .....	114
Abbildung 49: Perioperative cfDNA-Konz. nach angewandter Operationstechnik (AD-Fluorometrie) .....	115
Abbildung 50: Korrelation der Methoden nach angewandter Operationstechnik ....	116
Abbildung 51: Korrelationsparameter der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie über perioperative Zeitpunkte .....	135
Abbildung 52: Perioperative Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie (Bsp. Patient 3) .....	137
Abbildung 53: Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie nach verwendeter Plasma-Dilution .....	163

Abbildung 54: Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie nach verwendeter Fluorochrom-Dilution.....	164
Abbildung 55: Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie abhängig der verwendeten Fluorochrom-Konzentration.....	165
Abbildung 56: Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie abhängig des verwendeten Schmelzkurven-Protokolls.....	166
Abbildung 57: Korrelation der Maxima an temperaturabhängiger Änderung der Strahlungsintensität mit cfDNA-Konz. in Plasma (L1PA2-qPCR) .....	167
Abbildung 58: Korrelation der Maxima an temperaturabhängiger Änderung der Strahlungsintensität mit cfDNA-Konz. in Plasma (AD-Fluorometrie) .....	167
Abbildung 59: Interferenz von RNA auf Fluorochrom SYBR Green (AD-Fluorometrie) .....	168
Abbildung 60: Dynamik der Strahlungsintensität unter Belastung im Vergleich der verwendeten Fluorochrome SYBR Green und RIBO Green (AD-Fluorometrie) .....	169
Abbildung 61: Arbeitsschema zur Evaluation einer suffizienten DNase-Inkubationsdauer.....	170
Abbildung 62: Vergleich der DNA-Konz. nach differenter DNase-Inkubationsdauer (L1PA2-qPCR).....	171
Abbildung 63: Vergleich der DNA-Konz. nach differenter DNase-Inkubationsdauer (AD-Fluorometrie).....	171
Abbildung 64: DNA-Konz. nach differenter geringkonzentrierter DNase-Konz. (L1PA2-qPCR).....	173
Abbildung 65: Strahlungsintensität nach differenter geringkonzentrierter DNase-Konz. (AD-Fluorometrie).....	174
Abbildung 66: Effizienz der chemischen DNase-Inaktivierung mittels EDTA (L1PA2-qPCR).....	175
Abbildung 67: Effizienz der chemischen DNase-Inaktivierung mittels EDTA (AD-Fluorometrie) .....	175
Abbildung 68: Temperaturabhängige Änderung der Strahlungsintensität über Schmelzkurve einer Standardreihe nach chemischer DNase-Inaktivierung (EDTA) .....	180
Abbildung 69: Temperaturabhängige Änderung der Strahlungsintensität über Schmelzkurve einer Standardreihe nach enzymatischer DNase-Inaktivierung (Proteinase K).....	180

Abbildung 70: Minima der temperaturabhängigen Änderung der Strahlungsintensität in Korrelation zur enthaltenen Standard-Konzentration (Standardreihen im Vergleich zwischen chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung) .....	181
Abbildung 71: Maxima der temperaturabhängigen Änderung der Strahlungsintensität in Korrelation zur enthaltenen Standard-Konzentration (Standardreihen im Vergleich zwischen chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung) .....	182
Abbildung 72: Korrelation der Strahlungsintensität mit enthaltener DNA-Konz von Individuums-spez. Standardreihen .....	189
Abbildung 73: Korrelation der Strahlungsintensität mit enthaltener DNA-Konz Im Vergleich der Mittelwerte Individuums-spez. und aus diesen rechnerisch/laborchemisch gepoolten Standardreihen .....	190

### III. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Übersicht zu klinischer Relevanz zellfreier DNA .....	12
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Software .....	30
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte.....	32
Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	33
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Kits .....	35
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Medien/Puffer .....	35
Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer .....	35
Tabelle 8: Perioperativer Zeitpunkt der Probenakquirierung .....	37
Tabelle 9: Zentrifugationsprotokoll der Ultrafiltration nach Filtergröße .....	39
Tabelle 10: Zusammensetzung und finale Konzentration der Reagenzien im Ansatz eines DNase-Verdau .....	41
Tabelle 11: Zusammensetzung und finale Konzentration der Reagenzien im Ansatz eines Proteinase-Verdau .....	42
Tabelle 12: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien im Ansatz der L1PA2-qPCR.....	47
Tabelle 13: Protokoll des Thermozyklers für L1PA2-qPCR .....	47
Tabelle 14: Zusammensetzung und finale Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe für die AD-Fluorometrie.....	49
Tabelle 15: Zusammensetzung und finale Konzentration der Reagenzien von Plasmaproben für die AD-Fluorometrie .....	50
Tabelle 16: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien von Plasmaproben im Etablierungs-Prozess der AD-Fluorometrie (1).....	56
Tabelle 17: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe in Wasser im Etablierungs-Prozess der AD-Fluorometrie .....	57
Tabelle 18: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe in Nativplasma im Etablierungs-Prozess der AD-Fluorometrie.....	59
Tabelle 19: Zielsetzung und Durchführung zur Aufreinigung von Plasma .....	63
Tabelle 20: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien von Plasmaproben im Etablierungs-Prozess der AD-Fluorometrie (2).....	64
Tabelle 21: Statistische Auswertung der Separationsverfahren Ultrazentrifugation und Ultrafiltration .....	65
Tabelle 22: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe auf Basis von ultrazentrifugiertem Plasma im Etablierungs-Prozess der AD-Fluorometrie (3).....	65



Tabelle 23: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien zur Evaluation der benötigten DNase-Konzentration.....	69
Tabelle 24: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien zur Evaluation der benötigten EDTA-Konzentration zur DNase-Inaktivierung.....	72
Tabelle 25: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe auf Basis von DNA- und proteinfreien Plasmas .....	77
Tabelle 26: Parameter der linearen Funktionen und Bestimmtheitsmaß der Standardreihen im Vergleich zwischen chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung .....	78
Tabelle 27: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien der Standardreihen mit differenter Isolat-DNA der Standards (IgDNA, IcfDNA).....	81
Tabelle 28: Parameter der linearen Funktionen korrelierter Standardreihen im Vergleich der Standardreihen mit differenter Isolat-DNA (L1PA2-qPCR) .....	82
Tabelle 29: Parameter der linearen Funktionen korrelierter Standardreihen im Vergleich der Standardreihen mit differenter Isolat-DNA (AD-Fluorometrie) .....	83
Tabelle 30: Zusammensetzung der Standards aus Pooling-Plasma hochkonzentrierter und niedrigkonzentrierter Plasmaproben.....	85
Tabelle 31: Zusammensetzung und Konzentration der Standards auf Basis von proteolysiertem Pooling-Plasma .....	85
Tabelle 32: Parameter der linearen Funktion und Bestimmtheitsmaß korrelierter Standardreihen im Vergleich proteolysierter und nativ belassener Standardreihen mit Standards aus Poolingplasma .....	86
Tabelle 33: Zielsetzung und Durchführung der finalen Etablierung einer Standardreihe zur Quantifizierung von cfDNA .....	88
Tabelle 34: Finales Protokoll für Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien zur Quantifizierung von Plasmaproben.....	91
Tabelle 35: Parameter der Korrelation zwischen Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma und mittels NanoDrop 3300 ermittelter DNA-Konz. der Standards .....	92
Tabelle 36: Parameter der linearen Funktionen und Bestimmtheitsmaß korrelierter Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma (im Vergleich zwischen chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung).....	92
Tabelle 37: Parameter der Korrelation zwischen nach ADF (anhand Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma) quantifizierter DNA-Konz. und L1PA2-qPCR .....	93

Tabelle 38: Parameter der Korrelation zwischen nach ADF (anhand Standardreihen mit aus Pooling-Plasma generierten Standards) quantifizierter DNA-Konz. und L1PA2-qPCR.....	96
Tabelle 39: Parameter der Korrelation zwischen L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie anhand der Messung von Plasmaproben einer physikalischen Belastungsstudie....	98
Tabelle 40: Parameter der Korrelation zwischen L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie abhängig des Probandentypus.....	98
Tabelle 41: Parameter der Korrelation zwischen AD-Fluorometrie und L1PA2-qPCR nach Zeitpunkt der perioperativen Probenentnahme.....	106
Tabelle 42. Statistische Kenngrößen der cfDNA-Messung abhängig der Tumor-Dignität (L1PA2-qPCR) .....	107
Tabelle 43: Statistische Kenngrößen der RFU-Messung abhängig der Tumor-Dignität (AD-Fluorometrie).....	108
Tabelle 44: Statistische Kenngrößen der cfDNA/RFU prä- und postoperativ (L1PA2-qPCR/ AD-Fluorometrie).....	110
Tabelle 45: Parameter der Korrelation zwischen L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie abhängig der Tumor-Dignität.....	111
Tabelle 46: Statistische Kenngrößen der cfDNA-Messung abhängig der Operationstechnik (L1PA2-qPCR).....	113
Tabelle 47: Statistische Kenngrößen der RFU-Messung abhängig der Operationstechnik (AD-Fluorometrie).....	114
Tabelle 48: Parameter der Korrelation zwischen L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie abhängig der Operationstechnik.....	115
Tabelle 49: Statistische Auswertung der DNase-Konzentration 500-50 U/ml (L1PA2-qPCR).....	172
Tabelle 50: Statistische Auswertung der DNase-Konzentration 500-50 U/ml (AD-Fluorometrie) .....	173
Tabelle 51: Statistische Auswertung differenter EDTA-Konzentrationen zur chemischen DNase-Inaktivierung (L1PA2-qPCR) .....	177
Tabelle 52: Statistische Auswertung differenter EDTA-Konzentrationen zur chemischen DNase-Inaktivierung (AD-Fluorometrie) .....	178
Tabelle 53: Parameter der linearen Funktion korrelierter Standardreihen im Vergleich der verwendeten Reagenzien zur DNA-Degradation.....	179
Tabelle 54: Parameter der Korrelation von Standardreihen mit differenter Zusammensetzung der Reagenzien zur DNA-Degradation.....	179

Tabelle 55: Statistische Auswertung der Differenzierbarkeit von aus isolierter gDNA generierten Standard-Konzentrationen (AD-Fluorometrie) .....	183
Tabelle 56: Statistische Auswertung der Differenzierbarkeit von aus isolierter cfDNA generierten Standard-Konzentrationen (AD-Fluorometrie) .....	184
Tabelle 57: Statistische Auswertung der Differenzierbarkeit von Standard-Konzentrationen nach chemischer DNase-Inaktivierung (AD-Fluorometrie) .....	185
Tabelle 58: Statistische Auswertung der Differenzierbarkeit von Standard-Konzentrationen nach enzymatischer DNase-Inaktivierung (AD-Fluorometrie).....	186
Tabelle 59: Parameter der Korrelation Individuums-spezifischer Standardreihen mit Standardreihen basierend auf Pooling-Plasma dieser Individuen und mittels ND3300 ermittelter DNA-Konz. (AD-Fluorometrie) .....	188
Tabelle 60: Parameter der linearen Funktionen korrelierter Individuums-spezifischer Standardreihen .....	189
Tabelle 61: Parameter der linearen Funktionen korrelierter Mittelwerte von Standardreihen im Vergleich individueller und Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma.....	189

# 1 EINLEITUNG

Der Nachweis und die Analyse erhöhter Konzentrationen zellfreier DNA im menschlichen Blutplasma treten seit der klinischen Erstbeschreibung durch Mandel und Metais im Jahr 1948 vermehrt in den Fokus wissenschaftlicher Forschung (1). Darauf folgend konnte im Rahmen verschiedener Pathologien, beispielsweise Autoimmunerkrankungen, Apoplex, Sepsis, Verbrennungstraumata sowie verschiedener Krebs-Entitäten eine signifikante Akkumulation zellfreier DNA nachgewiesen werden (2-5). Untersuchungen in der sportmedizinischen Leistungsdiagnostik zeigen unterdessen ebenfalls einen Anstieg zellfreier DNA bei körperlich gesunden Probanden während sowie nach intensiver Belastung. Dazu gehören Marathon-Lauf, Kraftsport und andere Sportarten, die den menschlichen Körper bis zur Erschöpfung auslasten (6-8). Im Rahmen dieser physiologischen und pathologischen Prozesse im menschlichen Körper wird sowohl eine passive zelltodassoziierte als auch aktive immunologische Herkunft zellfreier DNA diskutiert (9, 10).

Darauf aufbauend zeigt die aktuelle Studienlage ein hohes Potenzial für quantitative und qualitative Analytik zellfreier DNA als klinischer Biomarker hinsichtlich Diagnostik, Prognostik und Verlaufsmonitoring auf (11). Speziell tumorassoziierte DNA birgt eine große Menge an Information über Tumor- sowie Mutationsstatus, Epigenetik und allelischen Imbalancen, die die onkologische Therapie stärker personalisiert gestalten könnten (12).

Obwohl sich die bisher etablierten Methoden der quantitativen Analytik im Einzelnen sensitiv und reliabel präsentieren, scheint der oft nötige Kosten- sowie Zeit- und Arbeitsaufwand eine große Hürde für die routinemäßige klinische Anwendung darzustellen (13). Des Weiteren herrscht Uneinigkeit bzgl. eines einheitlichen Protokolls zu Prä-Analytik, Quantifizierung und Interpretation, was die Analyse der aktuellen Studienlage hinsichtlich Vergleichbarkeit und Signifikanz erschwert (11, 14).

Daher verfolgen einige Autoren neue Ansätze, um die quantitative Analytik hinsichtlich dieser Problematiken zu vereinfachen. Dabei steht vor allem die Vermeidung einer aufwändigen Prozessierung des Probenmaterials sowie alternative Verfahren der Detektion und Quantifizierung von Nukleinsäuren im Fokus (15-17).

Angelehnt an diese Ansätze sowie anhand aktueller Literatur verfolgt diese Arbeit das Ziel, eine rein fluorometrische Methodik zur Quantifizierung zellfreier DNA ohne

Amplifikation und direkt aus Plasma zu etablieren. Diese soll sich sowohl äquivalent sensitiv als auch gleichzeitig praktikabler im Vergleich zum derzeitigen Goldstandard „quantitative PCR“ darstellen. Die methodische Anwendung zur Darstellung perioperativer Dynamik zellfreier DNA anhand einer klinischen Resektionsstudie soll dabei speziell die Hypothese evaluieren, ob zellfreie DNA vorrangig als Parameter des Monitorings von Krankheits- oder Therapieverläufen geeignet sein könnte (18).

## 2 LITERATURDISKUSSION

Im folgenden Abschnitt soll die zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Dissertation veröffentlichte Literatur aufgearbeitet und diskutiert werden. Dabei liegt der Fokus einerseits auf den biologischen Grundlagen zellfreier DNA sowie deren Stellenwert in der heutigen Medizin. Zum anderen wird auch der aktuelle Stand der laborchemischen Analytik zellfreier DNA hinsichtlich Praktikabilität und Sensitivität im Vergleich verschiedener Methoden genauer beleuchtet.

### 2.1 Definition & Historie zellfreier DNA

Die nicht zellgebundene, zellfreie Form der Desoxyribonukleinsäure stellt erbgenetisches Material dar, welches außerhalb der Zellen in der Blutzirkulation des menschlichen Körpers zu finden ist (19). Die Begriffe der zellfreien DNA und zirkulierenden zellfreien DNA werden in der Literatur meist äquivalent verwendet. Hierbei bezieht sich zellfreie DNA als Überbegriff auf DNA in jedem möglichen biologischen Milieu unabhängig ob Mensch, Tier oder Pflanze. Zirkulierende, zellfreie DNA bezeichnet hingegen spezifisch DNA, welche sich in physiologisch zirkulierenden Flüssigkeiten befindet. Diese Arbeit beschäftigt sich hauptsächlich mit Letzterem; der Einfachheit halber wird diese als zellfreie DNA, wörtlich kurz cfDNA, bezeichnet.

Der historisch erste Beweis für die Existenz zellfreier DNA im menschlichen Organismus wurde im Jahr 1948 durch Mandel und Metais erbracht, der Nachweis für das Vorkommen in der Pflanzen- (1971) und Tierwelt (2005) erfolgte erst später (1, 20, 21). 1966 erfolgte die erste medizinisch angelegte Studie, die eine erhöhte Konzentration an cfDNA bei Patienten, die an aktivem systemischen Lupus erythematoses (SLE) litten, nachwies und diese als Auslöser für die Bildung von SLE-typischen Antikörpern gegen doppelsträngige DNA in Betracht zog (22). Auch im Blut gesunder Menschen wurde es in den nächsten Jahren möglich cfDNA nachzuweisen und sogar auch zu quantifizieren (23). Leon et al. sahen im Jahr 1977 erstmals eine positive Korrelation von signifikant erhöhten Konzentrationen an cfDNA im Blut von Patienten, die an einer aktiven Tumorerkrankung litten (24). Gleichermaßen konnten die Autoren auch Veränderungen dieser Konzentrationswerte zellfreier DNA durch die Effekte onkologischer Therapien präsentieren (24). Durch Isolation, Extraktion, Fragmentierung und Hybridisierungsanalyse des frei zirkulierenden genetischen Materials konnte weiter gezeigt werden, dass dieses endogener Herkunft ist.

## 2.2 Biologie der zellfreien DNA

cfDNA ist außer im Blutplasma ubiquitär in verschiedensten biologischen Flüssigkeiten nachweisbar. Dies gilt für Urin (25), Stuhl (26), Amnionflüssigkeit/Fruchtwasser (27), Speichel (28), Bronchialflüssigkeit (29), Liquor (30) und Samenflüssigkeit (31).

cfDNA setzt sich nach neueren Erkenntnissen im Wesentlichen aus DNA nukleärer (nDNA) und mitochondrialer Herkunft (mtDNA) zusammen (32). Nukleäre cfDNA unterscheidet sich v.a. hinsichtlich ihrer Struktur und Größe: Der größere Teil der Publikationen zeigen cfDNA als doppelsträngig (double stranded DNA, dsDNA), andere als einzelsträngig (single stranded DNA, ssDNA) auf (22, 24, 33, 34). Die zellfreien DNA-Fragmente präsentieren sich hinsichtlich ihrer molekularen Größe je nach Studie zwischen ca. 100 bis größer als 80.000 Basenpaare (bp). Die Hauptmasse der DNA-Fragmente liegt bei 166 bp und geringer ausgeprägten Häufungen bei 145 bp und kleiner und weist ein Molekulargewicht von  $3,5 \times 10^2$  kDa bis  $3,7 \times 10^3$  kDa auf (35, 36). Insgesamt fallen starke interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Quantität sowie Integrität der zellfreien DNA auf. Letzteres bezeichnet das Ausmaß der Fragmentierung des genetischen Materials im Vergleich zu dessen unversehrten Version im zellulären Genom (37). cfDNA präsentiert sich in variierendem Anteil frei im Plasma, in Vesikeln oder Apoptosekörperchen, als Nukleosomen oder in Komplexen mit Proteinen (10, 33, 38). Als nukleinsäurebindende Proteine werden hauptsächlich Immunglobuline, Albumin, Lactoferrin und Fibronectin aufgezeigt (39). Außerdem kommt cfDNA auch an Zelloberflächen von Erythrozyten und Leukozyten gebunden vor (40, 41). Neue Ergebnisse fluorometrischer Messungen zeigen, dass der oberflächengebundene Anteil vorherrschend aus der einzelsträngigen Fraktion der cfDNA stammt und sich antiproportional zur Aktivität maligner Krankheiten verhält (42, 43)

Gleichermaßen verhält es sich mit der Integrität der cfDNA: Bei Vorliegen einer malignen Erkrankung konnte anhand des Verhältnisses von langen zu kurzen Fragmenten eine signifikant stärkere Fragmentierung gezeigt werden (35). Dabei korreliert die Konzentration an freier Tumor-DNA im Plasma mit dem Anteil kurzer Fragmente (<150 bp) (36). Eine Ausnahme scheinen die nicht-soliden, der hämatopoetischen Stammzelllinien entspringenden Tumor-Entitäten zu sein. Gao et al. wiesen hierbei einen höheren Anteil an längeren Fragmenten bei Patienten mit Akuter Leukämie nach (44). Diese erhöhte Integrität war durch Therapie reversibel und mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

## Ursprung zellfreier DNA

Die variierende Fragmentierung und Struktur scheint vor allem auf der unterschiedlichen Herkunft der zellfreien DNA innerhalb unserer Blutzirkulation zu basieren (38). Die jeweilige Herkunft unterscheidet sich hierbei vor allem darin, ob die Freisetzung durch physiologische oder pathologische Prozesse und durch aktive oder passive Mechanismen stattfindet (9, 10).

Lediglich ein kleiner Anteil der zirkulierenden zellfreien DNA kann den, lange als Hauptquelle zirkulierender DNA vermuteten, passiven Freisetzungsmechanismen Apoptose und Nekrose zugeschrieben werden. Durch den Prozess der Apoptose wird nukleäre DNA in nukleosomale Einheiten, bestehend aus Histon-Oktameren und DNA, der Länge 180-200 bp und deren Vielfache fragmentiert, was auch als charakteristisches Längenmuster durch die elektrophoretische Analyse zellfreier DNA nachgewiesen werden kann (37). Dem gegenüber steht die Beobachtung, dass apoptotische Zellbestandteile sofort durch Immunzellen oder benachbarte Zellen phagozytiert und chromosomale DNA lysosomal mittels DNase II zu Nukleotiden verdaut wird (45). Nekrose als ungeordnetes Pendant der Apoptose führt lediglich zu einem unvollständigen Verdau des genetischen Materials, dessen Überreste im größten Anteil eine Länge von über 10.000 bp aufweisen, was sich nicht mit allgemein beobachteten Längenprofilen zellfreier DNA (s.o.) deckt (37). Nichtsdestotrotz kann ein kleiner Teil der zirkulierenden freien DNA dem Zelluntergang zugeordnet werden. Diese Annahme beruht darauf, dass dieser Anteil eine verminderte Stabilität des DNA-Strangs aufweist. Dieses Merkmal ist charakteristisch für DNA aus Zellen tumoröser Herkunft (46).

Dass zellfreie DNA nicht allein endogenen Ursprungs sein muss, zeigten Untersuchungen an Karzinom-Entitäten, die mit viralen Infektionen in Verbindung stehen. So konnte für Nasopharyngealkarzinome und dem Epstein-Barr-Virus (EBV) sowie für Zervixkarzinome und dem Humanen-Papilloma-Virus (HPV) ein Nachweis der jeweiligen viralen DNA in der Blutzirkulation erbracht werden (47, 48). Im Falle des HP-Virus gilt dies auch für asymptomatische Infektionen (49).

Als Hauptquelle zellfreier endogener DNA in unserer Zirkulation scheinen daher aktive Freisetzungsmechanismen ausschlaggebend zu sein (9). Dieser Prozess wurde erstmalig 1972 durch Stroun et al. beschrieben und nicht auf bakteriellen, sondern nukleären Ursprung zurückgeführt (50). Diese Hypothese von lebenden Zellen als



Ursprung zellfreier DNA wird von der Beobachtung, dass Zelluntergang-induzierender Strahlentherapie kein Anstieg, sondern ein Abfall der Konzentration an zellfreier DNA folgt, unterstützt (24). Außerdem stellte sich die Konzentration zellfreier DNA unbeeinflusst von der absoluten oder relativen Menge sterbender Zellen dar (51).

Des Weiteren zeigten Rogers et al. 1972, dass stimulierte Lymphozyten in Kulturmedium zellfreie DNA ohne begleitenden Zelluntergang unabhängig der Inkubationszeit bis zu einer gewissen Konzentration aktiv freisetzen (52). Die Hypothese des hämatopoetischen Zellsystems als „normale“ Quelle zellfreier DNA bestätigte sich in den darauffolgenden Publikationen (53, 54). Snyder et al. war es durch epigenetische Analyse von Nukleosomen möglich die Herkunft auf lymphoide und myeloide Zellen einzugrenzen (55). Dies bestätigten Moss et al. anhand der spezifischen Methylierungsmustern zellfreier DNA, welche charakteristisch einem Ursprungsgewebe zugeordnet werden können (56). Die Fähigkeit zellfreie DNA aktiv freizusetzen besitzen hierbei speziell, wie zuvor erwähnt, Lymphozyten, Mastzellen, eosinophile Granulozyten und neutrophile Granulozyten (33, 52, 57, 58).

Die neutrophilen Granulozyten geraten in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Analyse aktiver Freisetzungsmechanismen. Diese stellen den größten Anteil der weißen Blutkörperchen dar und besitzen als immunologische „First-Line-Defence“ neben Phagozytose und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auch die Fähigkeit zur „NETose“ (59, 60). Dies beschreibt die Freisetzung neutrophiler extrazellulärer „Traps“ (NETs), welche sich aus Chromatin, Enzymen und speziellen antimikrobiellen Proteinen zusammensetzen (61). Bakterien, Viren, Pilze und auch Parasiten fungieren dabei über Toll-like-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren und Zytokine gleichzeitig als pathogene Trigger zur Freisetzung der NETs als auch als deren Ziel (61-64). Da Neutrophile während dieses Vorgangs vital sind, wird NETose explizit als aktiver Prozess deklariert (65). Man unterscheidet im Folgenden die selbstzerstörende NETosis, die zum anschließenden Zelluntergang der Neutrophilen führt und die vitale NETose (64). Letztere findet schneller und zum Schutz der Zellwand in Vesikeln statt. Neutrophile bleiben so unter physiologischen Konditionen weiter strukturell intakt und behalten ihre chemotaktischen sowie phagozytären Fähigkeiten (66).

Konditionen, die den Körper unter unphysiologischen Stress setzen, nehmen einen stimulierenden Einfluss auf die Ausschüttung von NETs, die einen Anteil an der Menge zirkulierender cfDNA darstellt. Dies kann z.B. für kanzerogene Pathologien sowie

sportliche Belastung nachgewiesen werden: Tumore erwirken über das Peptidhormon bzw. als Zytokin fungierendes „Granulocyte-Colony Stimulating Factor“ (G-CSF) eine verstärkte Proliferation von Neutrophilen; Belastung induziert über zelluläre Signalwege und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) eine verstärkte Ausschüttung und Rekrutierung von Neutrophilen in die Muskelkapillaren (67, 68).

Die Freisetzung von NETs besitzt jedoch neben dessen immunologischer Funktion auch negative Aspekte. So kann eine dauerhaft übermäßig oder unregulierte Freisetzung durch eine gestörte Blutkoagulation zu Thrombosen (TVT) oder Immunthrombosen führen, arteriosklerotisch bedingte Plaques destabilisieren oder als Autoantigene zur Entwicklung autoimmuner Pathologien beitragen (69-72). Im karzinogenen Milieu fördert eine erhöhte Neutrophilen-Aktivität durch angiogenetische Prozesse die Tumor-Progression und kann sogar die Migration von Tumorzellen und so die Metastasenbildung beeinflussen (73). Dennoch werden auch durch Sauerstoffradikale vermittelte toxische Effekte auf die Metastasierungsprozesse beschrieben (74).

### Clearance und Kinetik

Eine essenzielle Rolle für die Akkumulation freier Nukleinsäuren in der Blutzirkulation spielt nicht nur die Bildung und Freisetzung dieser, sondern auch deren Abbau und Ausscheidung. Neben einer intrinsischen Resistenz gegen Ribonukleasen und Proteinasen, spielt die Hydrolyse durch Desoxyribonuclease I (DNase I) im Blutplasma hierbei mit eine der wichtigsten Rollen (75). Diese gewährleistet unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen Freisetzung und Abbau der Nukleinsäuren (76). Dieses Gleichgewicht kann durch eine karzinom-induzierte Minderung von Präsenz und Aktivität der DNase I gestört werden, was folglich als weiterer wichtiger Faktor zu einer erhöhten Konzentration zellfreier DNA beiträgt (77). Sportliche Belastung hingegen evoziert im gleichen Zug wie die verstärkte Freisetzung zellfreier DNA eine verstärkte DNase I-Aktivität und so eine Erhaltung des physiologischen Gleichgewichts (78). Neben der plasmatischen Hydrolyse werden zirkulierende freie Nukleinsäuren auch intrazellulär abgebaut. Dies geschieht im Sinne eines endogenen „Recycling“-Prozesses: cfDNA bindet an spezielle DNA-Bindeproteine auf Zelloberflächen, welche diese über die Plasma-Membran transportieren und internalisieren. Nach Degradation zu Mononukleotiden im Zytoplasma werden diese in

den Nukleus transportiert und wiederverwendet (39). Die Bindung und Internalisierung ist hierbei pH- sowie temperaturabhängig und kann ebenfalls durch unphysiologische Konditionen gestört werden.

Der nicht direkt plasmatisch oder intrazellulär abgebaute Anteil zellfreier DNA wird organvermittelt eliminiert. Die Aufnahme stellt hierbei die erste schnelle, die Exkretion die zweite, etwas verzögerte, Phase des Clearings dar (79). Den Anteil, der über Organaufnahme verstoffwechselt wird, stellt mit ca. 90% den größeren Anteil dar. Auch wenn für Niere, Milz und Weichteilgewebe ebenfalls eine Aufnahme zellfreier Nukleinsäuren nachgewiesen werden konnte, übernimmt die Leber den Hauptanteil dieser Aufgabe (80, 81). Die Exkretion von cfDNA erfolgt über die Nieren und kann anhand von Fragmenten der Länge 150-250 bp im Urin detektiert werden (82).

Weiter konnten Emlen et al. zeigen, dass ssDNA präferenziell über die Leber aufgenommen wird, dsDNA hingegen zum überwiegenden Teil über die Niere ausgeschieden wird. Dies gilt auch als einer der Gründe für die längere Verweildauer doppelsträngiger cfDNA in der Blutzirkulation (79).

Durch ein Zusammenspiel dieser Prozesse wird unter physiologischen Konditionen gewährleistet, dass zellfreie DNA, unabhängig von Struktur und Abbauweg, mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 16,3 min. aus der Zirkulation eliminiert wird (47).

### Endogene Funktionen zellfreier DNA

Zusätzlich zu neutrophil-induzierter Immunantwort über NETs ist es auch zellfreie DNA selbst möglich in regulierender/modulierender Funktion immunogen zu wirken. Diese immunstimulierende Funktion ist für praktisch alle Zellen des angeborenen Immunsystems nachgewiesen (83). cfDNA tritt in diesem Prozess „nackt“ oder in fremdmolekularen Komplexen mit den Immunzellen in Kontakt (84). Das genetische Material bindet im Folgenden an extrazelluläre Toll-like-Rezeptoren (TLR) (85). Hervorzuheben ist hier neben TLR 3,7 und 8 vor allem TLR 9, der über Sequenzmuster spezifisch endogene von exogener, z.B. bakterieller DNA, differenzieren kann (86). Analysiert werden dabei Frequenz und Methylierung von CpG-Dinukleotiden, welche in Prokaryoten häufiger in unmethylierter Form auftreten als in Eukaryoten (87). Durch TLR aktivierte Signalkaskaden stimulieren genregulatorisch die Ausdifferenzierung und Proliferation von Natürlichen Killer-Zellen (NK), T-Zellen und Monozyten (88, 89).

Deren Sekretion von Zytokinen und Chemokinen wie Interferon (INF), Interleukin (IL) 1,6,18 und Tumornekrosefaktor (TNF) resultiert in einer, v.a. Th (T-Helfer-Zell) -1 basierten, proinflammatorischen Immunantwort (90, 91). Unter physiologischen Bedingungen wird diese Aktivierungskette mit zellfreier DNA als Trigger durch deren Elimination verhindert. Durch Malfunktion oder Defizienz der dafür zum großen Teil verantwortlichen DNase I und einer überschießenden Immunantwort auf autologes genetisches Material steigt daher das Risiko für Autoimmunkrankheiten (92). So kann bei 20 % der Patienten mit SLE (Systemischer Lupus erythematoses) eine DNase-Defizienz nachgewiesen werden (93, 94). Auch für erhöhte Konzentrationen an fetaler DNA ist eine durch TLR9-vermittelte inflammatorische „anti-embryonale“ Immunantwort detektierbar, durch welche das Risiko für Fehlgeburten aufgrund Frühgeburt oder Präeklampsie steigt (95).

Weiter postulierten Stroun et al. in den 50er- bis 60er Jahren im Rahmen von Nachforschungen bzgl. der Darwinistischen Evolutionstheorie erstmals eine Funktion von cfDNA als „Messenger“, indem sie im Pflanzenversuch einen horizontalen Transfer von genetischer Information nachwiesen (5). Dies konnte wenig später im Tierversuch auf immunologischer Basis bestätigt werden: Nach Injektion von Herpes- oder Polioviren exponierten humanen T-Lymphozyten in die Blutbahn von Mäusen, folgte eine Produktion von speziell human-charakteristischen Antikörpern (96). Es hatte also ein genetischer Austausch zwischen T- und B-Zellen stattgefunden. Im virologischen Zusammenhang zeigten Spetz et al., dass auch Immunzellen ohne den für die Internalisierung HI-viraler RNA notwendigen CD4 (cluster of differentiation 4) - Rezeptor HIV-DNA in sich tragen. Der interzelluläre Transfer sowie die Internalisierung und genomische Inklusion dieses genetischen Materials wird hierbei durch Apoptosekörperchen vermittelt (97). Gleichermaßen verhält es sich für den horizontalen Transfer von Onkogenen (98), was die Hypothese der „Genometastasis“ begründete. Diese besagt, dass sich tumor-assoziierte, onkogene zellfreie DNA wie „endogene Onkoviren“ verhalten und durch Infektion anderer Organe zur Metastasierung beitragen könnten (99). Garcia et al. bestätigten dies im Tierversuch: Das Plasma von Patienten mit K-Ras positiven Kolorektalkarzinomen wurde in vitro mit murinen Fibroblasten inkubiert, worauf diese maligne entarteten und zu K-Ras-Trägern mutierten. Durch Reinjektion dieser transformierten Fibroblasten in Mäuse entwickelten sich humanspezifische K-Ras-Tumore (100). Im gesunden Körper wird

eine solche kanzerogene Progression und Metastasierung durch Abwehrmechanismen, wie Desoxyribonukleasen und Serin-/Threonin-Kinase 2 (Chk2), unterbunden. Letztere leitet Signalwege zur Reparatur beschädigter oder fehlerhafter DNA auch Signalwege zur Apoptose ein (101). So konnten Patutina et al. im Mausmodell zeigen, dass schon geringe Dosen an DNase I oder RNase die Metastasierung von implantierten Tumoren hemmt (102). Dies war effektiver, je früher die Behandlung mittels DNase I initiiert wird (103). Weiter sprechen für die Hypothese der Genometastasis Unterschiede bzgl. Phänotyp und Morphologie zwischen Primärtumor und Metastasen (104). So weisen durch Prostatakarzinom induzierte Knochenmetastasen osteoblastische Proliferationen und Lebermetastasen mit gastrointestinalem Primärtumor fibroblastische Proliferationen auf (105). Daher könnte Genometastasis auch als Erklärung für das Auftreten von Sekundärtumoren oder multiplen Primärtumoren dienen (104).

Auch im Rahmen der primären Karzinomentwicklung wird der Transfer zellfreier DNA als Initiator evaluiert: Die mit dem Alter einhergehende steigende Konzentration an zellfreier DNA erhöht die Wahrscheinlichkeit der Integration dieser in das Genom gesunder Zellen und dessen Schädigung, was in einem erhöhten Risiko für Karzinome resultieren könnte (98).

### 2.3 Klinische Relevanz zellfreier DNA

Im Rahmen der laborchemischen Analyse zellfreier DNA sind Krankheitsbilder, die eine pathologische Belastungssituation für den menschlichen Körper darstellen, von besonderem Interesse. Mit der Intention zellfreie DNA als Biomarker zu etablieren, versucht man sowohl diagnostische als auch prognostische Fortschritte für die jeweilige Therapie zu erzielen.

Methodisch unterteilt sich die Forschung an zellfreier DNA im Zusammenhang mit klinischen Pathologien in quantitative und qualitative Analysen. Letztere finden vor allem in den Fachbereichen der Perinatalmedizin und der Onkologie Verwendung, worauf im nächsten Abschnitt genauer eingegangen wird.

Die folgende tabellarische Übersicht veranschaulicht die aktuelle Studienlage in verschiedenen klinischen Fachbereichen. Es werden innerhalb dieser Fachbereiche einzelne Krankheitsbilder mit den Kernaussagen der dazugehörigen aktuellen Literatur

beleuchtet. Diese Übersicht erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit, genauere Ausführungen der entsprechenden Literatur finden sich im Anhang (s. 9.1.1).

<b>Rheumatologie</b>	Systemischer Lupus erythematoses	Signifikant erhöhte cfDNA-Konzentration im Vgl. zu Kontrollpopulation.  Widersprüchliche Studienlage hinsichtlich Korrelation mit Krankheitsaktivität und Therapieverlauf.	(2, 22, 34, 106-110)
	Rheumatoide Arthritis	Signifikant erhöhte cfDNA-Konzentration im Vgl. zu Kontrollpopulation.  Quantitative Korrelation hinsichtlich Krankheitsaktivität und Therapie-Erfolg.	(111-113)
<b>Kardiologie</b>	Koronare Herzkrankheit & Myokardinfarkt	Differenzierung zwischen kardiovaskulär gesunden Probanden, ausgeprägten Formen der koronaren Atherosklerose und akuten myokardialen Ischämien.  Signifikante Korrelation hinsichtlich des Ausmaßes der Ischämie und Funktionsdefizits.  Widersprüchliche Korrelationen mit klinisch etablierten kardiospezifischen Biomarkern.	(114-119)
		Zerebralinfarkt	Signifikanter Anstieg der cfDNA bei zerebralen Ischämien.  Korrelation des Schweregrades des Ischämieareals und neurologischem Outcome.  Hoher prädiktiver Wert hinsichtlich Mortalität während Krankenhausaufenthalt.
<b>Intensivmedizin</b>	Sepsis/ Septischer Schock	cfDNA als Parameter der Risikostratifizierung aufgrund im Vergleich zu anderen intensivpflichtigen Pathologien erhöhte Quantität.  cfDNA als sensitiver Prädiktor für Mortalitätsrisiko.  Signifikante Korrelation mit Laktat und SOFA-Score; stärkere prognostische Aussagekraft als MODS- und APACHE-Score.	(4, 121, 122)
<b>Traumatologie</b>	Schädel-Hirn-Trauma	Korrelation mit SHT-Schweregrad.  Prognostischer Marker bzgl. notwendiger Interventionen und dauerhafter neurologischer Folgeschäden.	(123, 124)
	Pränatal-Screening	Geschlechtsbestimmung, Identifikation des Rhesus-Faktors und Trisomie-Screening mittels fetaler cfDNA in maternalen Serum mit gleichwertiger bis stärkerer Sensitivität und Spezifität als klinisches Standard-Screening.  Widersprüchliche Studienlage zu Risikostratifizierung von Frühgeburtlichkeit.	(125-135)
	Präeklampsie	Widersprüchliche Studienlage hinsichtlich Diagnostik einer manifesten Präeklampsie und Diskrimination zu schwangerschaftsinduzierter Hypertonie.	(135-138)

Tabelle 1: Übersicht zu klinischer Relevanz zellfreier DNA

### 2.3.1 Onkologie

Im Fachbereich der Onkologie ergeben sich durch verschiedene Methoden der laborchemischen Analytik aussichtsreiche Möglichkeiten zellfreie, tumorassoziierte DNA als klinisches Werkzeug zu integrieren. Dies beruht vor allem auf den Informationen, die man über Menge, Ursprung, Migration und Funktion dieser zirkulierenden Nukleinsäuren gewinnen kann. In diesem Sinne können bei Karzinompatienten sowohl Untersuchungen zu absoluten bzw. relativen Konzentrationen zellfreier DNA (quantitative Analytik) als auch die Sequenzierung dieser (qualitative Analytik) Aufschluss über Diagnose, Prognose und Therapie geben.

#### Quantitative Analytik

Während die Hauptmasse zellfreier DNA in gesunden Individuen wie zuvor dargelegt aus immunologischen Prozessen und regulärer Zellzyklus lymphoider und myeloider Zelllinien stammt, addiert sich hierzu für Karzinom-Patienten ein gewisser Anteil zellfreier tumor-DNA (ct-DNA). Dieser Anteil kann, abhängig von verschiedenen Faktoren, von 0,01 % bis zu 60 % variieren (139, 140).

Die daraus resultierenden erhöhten Konzentrationen zellfreier DNA im Blut und anderen biologischen Flüssigkeiten werden für Karzinome verschiedenster Organsysteme wie Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltrakt sowie Haut, Zentrales Nervensystem, Bewegungsapparat etc. nachgewiesen (30, 139, 141-145). Aufgrund der zuvor dargelegten Herkunft und Freisetzung zellfreier DNA aus zirkulierenden Tumorzellen und nekrotischen Prozessen sollten diese in der Blutzirkulation karzinombelasteter Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpatienten rein quantitativ erhöht sein. Diese Schlussfolgerung scheint sich anhand einzelner Studien zu bestätigen, Meta-Analysen als Grundlage evidenzbasierter Medizin lassen dies aber nur in einzelnen Fällen zu (11). Dies beruht auf starken Abweichungen methodischer Aspekte wie Probenverarbeitung sowie unterschiedlichen Prozessen der Isolation und Quantifizierung zellfreier DNA. Auf diese Thematik wird später im Kapitel Methodik näher eingegangen (s. 2.4). Diese uneinheitliche Analytik resultiert in starken Diskrepanzen betreffend cfDNA-Konzentrationen und uneinheitlichen „Cut-off-Levels“, was wiederum starken Einfluss auf Sensitivität und Spezifität der jeweils verwendeten Methode hat (11, 14). Weiter haben Variablen wie Tumorstadium, Größe und Lokalisation Einfluss auf die Quantität



zellfreier DNA. Dies kann allerdings sowohl zwischen Tumor-Entitäten als auch innerhalb einzelner Tumor-Entitäten variieren, was sich in einer widersprüchlichen Studienlage bzgl. einer konsistenten Assoziation zwischen cfDNA und klinisch-pathologischen Parametern widerspiegelt. So zeigten sich für die Entitäten des Lungen-, Prostata- und Mamma -Karzinoms Korrelationen zwischen erhöhten cfDNA-Konzentrationen und Tumorstadium, Histologie sowie bereits erfolgter Metastasierung (144, 146-148). Diese Zusammenhänge konnten jedoch andere Studien für exakt diese Karzinom-Entitäten nicht bestätigen (141-143, 149). Ähnlich widersprüchlich stellt sich die Datenlage quantitativer Analysen zellfreier DNA dar, die eine Aussagekraft im Sinne eines diagnostischen Screenings untersuchten: Eine Meta-Analyse zu Lungenkarzinomen bewertete cfDNA hierbei als nicht sinnvollen Parameter (150). Genauer überstieg die cfDNA-Konzentration gesunder Raucher oftmals die der Karzinompatienten (151), wodurch zu dieser Population sowie zu benignen Lungenerkrankungen nur eine ungenügende Abgrenzung gewährleistet werden kann (152). Eine aktuellere Studie konnte hingegen signifikant zwischen entzündlichen Lungenerkrankungen und nicht-kleinzelligen-Lungenkarzinomen (NSCLC) differenzieren (153). Eine präzise Differenzierung zwischen benignen und malignen Prostata-Hyperplasien zeigte sich ebenfalls als nicht möglich und auch hier übertrafen teilweise cfDNA Konzentrationen bei Prostata-Hyperplasien (BPH) quantitativ die von Patienten mit Prostata-Karzinomen (143, 154). Gleichermaßen verhält es sich mit benignen Brust-Läsionen im Vergleich zum Mamma-Karzinom (155). Zusammenfassend wird hieraus deutlich, dass allein ein statistischer Unterschied zwischen zwei Gruppen keinerlei Abgrenzung bzw. „Cut-Off“ generiert und sich daher auch nur sehr begrenzt klinisch verwerten lässt.

Erschwerend kommt hinzu, dass auch cfDNA-Konzentrationen gesunder Kontrollpatienten starken Varianzen unterworfen sind. Dies wird anhand einer prospektiven Multi-Center Studie mit 776 Kontrollindividuen deutlich, die für diese Kontrollpopulation eine arithmetisch mittlere Konzentration von 67 ng/ml, einem Median von 26 ng/ml und einer Standardabweichung von 405 ng/ml aufzeigte (156).

Hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft konnte für Karzinomentitäten an Mamma, Leber, Lunge, Ovar und Prostata eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten Konzentrationen zellfreier DNA und einem schlechteren Outcome betreffend Gesamtüberleben und rezidivfreier Überlebenszeit nachgewiesen werden (143, 146,

157, 158). Jedoch bestehen hierzu ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse anderer Studien (155, 159, 160).

Daher evaluieren einige Autoren quantitative Analysen weniger diagnostisch oder prognostisch, sondern eher als sinnvoller Verlaufsparemeter im Sinne eines Monitorings von Therapie und Nachkontrolle (14, 158). Hierbei zeigten sich die Konzentration an cfDNA bei Karzinomen an Mamma, Kolon, Ösophagus, Niere und Lunge nach operativer Intervention in Form einer angestrebten R0-Resektion stark fallend (140, 155, 161-163). Persistierend hohe, weiter ansteigende oder zuerst fallende, dann wieder steigende Werte deuteten dabei auf Rezidive, inkomplette Resektion oder sonstiges Nicht-Ansprechen auf die Therapie an (140, 161). Letzteres galt jedoch beispielsweise nicht für Nephrektomien bei Nierenzellkarzinomen: Hier wiesen etwa die Hälfte der operierten Patienten persistierend hohe oder ansteigende Werte auf, ohne in Nachkontrollen ein Rezidiv zu entwickeln (162). Nach chemo- oder radiotherapeutischer Intervention korrelierte ein Abfall der cfDNA-Konz. ebenfalls mit einem Therapie-Ansprechen und persistierende bzw. ansteigende Werte mit einem erfolglosen Therapie-Versuch und dementsprechender Tumor-Progression (160). Andere Studien konnten hingegen keinerlei Änderung durch Therapie feststellen bzw. zwischen Erfolg oder Misserfolg dieser differenzieren (159, 164).

### Qualitative Analytik

In der Tumorforschung werden neben quantitativen Analysen zellfreier DNA auch qualitative Analysen angewendet. Diese verfolgen im Unterschied zur quantitativen Analytik nicht das Ziel die vorhandene Menge an zellfreier DNA in absoluten oder relativen Zahlen darzustellen, sondern Information aus den zirkulierenden Tumorzellen, der Tumor-entstammenden DNA und rein tumor-assoziiertes DNA zu gewinnen. In der Gesamtheit stellt diese Form der Tumor-Analytik eine nicht-invasive Alternative von Biopsien und Untersuchung von nicht-soliden Geweben dar. Dadurch wird allein anhand von Plasmaproben eine unkomplizierte Re-Analytik der Tumorpathologie- und Kinetik zu mehreren Zeitpunkten möglich. So gewinnt der Kliniker Aufschluss über weitere wichtige Aspekte bzgl. Diagnostik, Prognostik, Therapie und Monitoring (12).

Angefangen mit der Analyse der Fragmentlängen zellfreier DNA, der sogenannten Integrität, findet hierbei eine einfache, nicht sequenzspezifische Methode Verwendung. Als Untersuchungsgröße zu definieren ist hier der sogenannte Integritäts-Index, welcher den Quotienten aus langen zu kurzen DNA-Fragmenten darstellt (14, 165). Diese Methodik beruht auf dem in Abschnitt 2.2 dargelegten Prinzip, dass sich frei zirkulierende DNA-Fragmente je nach Herkunft und Freisetzung spezifisch in ihrer Länge unterscheiden (166). Je mehr DNA aus nekrotischen Tumorzellen gegenüber apoptotischen oder sonstigen Prozessen freigesetzt werden, desto höher ist der Anteil längerer Fragmente (> 201 bp) im Blutplasma. Dies resultiert in einem höheren Integritäts-Index, welcher so als Marker für die Tumorlast im Körper fungieren soll (166). An verschiedenen Karzinom-Entitäten (bspw. Brust, Kolon, Ösophagus, Prostata, Niere und Nasopharynx) untersucht, sehen einige Autoren diesen Parameter der alleinigen quantitativen Analyse der totalen Menge an zellfreier DNA diagnostisch überlegen (165, 167, 168). Außerdem soll die Integrität zellfreier DNA auch stärker mit Tumorstadium, -größe und Lymphknotenbefall korrelieren und daher besser die Tumorlast im Körper darstellen (169). Ergebnisse anderer Forschungsgruppen konnten diese These jedoch nur teilweise oder gar nicht unterstützen (152, 170, 171). Weiter gilt die Integrität zellfreier DNA auch in Bezug auf Mortalität und rezidivfreies Überleben prognostisch signifikanter (147, 164, 170). Hinsichtlich des Monitorings onkologischer Therapie zeigte sich der Integritäts-Index in mehreren Studien nach operativer sowie chemo- und/oder radiotherapeutischer Behandlung fallend (44, 145, 168).

Die genetische Sequenz zirkulierender DNA zu analysieren, stellt eine weitere Form der qualitativen Analytik dar. Dabei können mutierte Onkogene und Tumorsuppressorgene detektiert werden. Deren physiologische Funktion, die Regulation und Kontrolle der Proliferation und Differenzierung von Zellen, wird durch Mutationen gestört, was sehr häufig ursächlich zur Karzinogenese verschiedener Tumor-Entitäten beiträgt. (172). Da der Anteil an cfDNA mit solchen Mutationen nur 0,18 % der gesamten cfDNA ausmacht und diese zum größten Teil nur in kleinen Fragmenten zu finden sind, gelten präzise Isolationsverfahren als essenziell für eine hohe Qualität dieser Analysen (140). Zudem steigt, je niedriger die Frequenz des untersuchten Allels, die notwendige Masse an zellfreier DNA, um eine spezifische Detektion gewährleisten zu können (173). Die Allelfrequenz steht dabei in einem linearen Zusammenhang mit der Tumorgröße (35).

Mit Studien zu Karzinomen der Brust, Kolon, Lunge, Leber, Pankreas, Blase und Uterus ist das Onkogen „KRAS“ und das Tumorsuppressorgen „p53“ als Mutationsmarker am häufigsten untersucht (157, 174-177). Jedoch bewegen sich meta-analytisch die Raten für eine konkordante Detektion dieser Mutationsmarker in Tumorgewebe und Plasma für KRAS zwischen 0-56 % und für p53 zwischen 14-65 % (14). Als weiterer limitierender Faktor kommt hinzu, dass auch in bis zu 30 % der Individuen mit nicht-kanzerösen Pathologien wie Nikotinabusus und auch in gesunden Kontrollpatienten diese Mutationsmarker im Blut vorgefunden werden (176). Für andere Mutationsmarker wie APC, BRAF, EGFR, MYC und HER-2 im Kontext verschiedener Karzinom-Entitäten ergab sich eine ähnlich limitierte diagnostische Aussagekraft wie für KRAS und p53 (178-182). Da viele Chemotherapeutika über Signalwege wirken, die solche Mutationsmarker wie p53, KRAS, BRAF oder EGFR enthalten, könnte ein spezifischer, nicht-invasiver Nachweis dieser im Blut ebenfalls ein Vorteil für ein angepasstes Therapie-Regime darstellen (183).

Eine weitere mögliche sequenzspezifische Änderung zellfreier DNA aus tumorpathologischer Herkunft betrifft deren epigenetischen Status. Durch Addition von Methylgruppen an Cytosin-Basen mit einer darauffolgenden Guanin-Base (CpG-Dinukleotide) wird in synergistischer Kooperation mit Ausbildung einer sehr kompakten Chromatinstruktur durch Histon-Modifikation die Transkription bestimmter Gene verhindert. Führt diese „funktionelle Deletion“ zu einer Repression von Tumorsuppressorgen, resultiert das in unkontrolliertem Zellwachstum. Gleichzeitig kommt es im Rahmen der Karzinogenese neben der Hypermethylierung spezifischer Gensequenzen auch zu einer generalisierten Hypomethylierung, wodurch sowohl eine Reexpression onkogen wirkender Sequenzen erwirkt werden kann als auch eine verminderte chromosomale Integrität aufgrund instabiler Chromatinstrukturen (184). Diese epigenetischen Läsionen wurden nach deren Entdeckung in den 1980er Jahren für praktisch alle menschlichen Krebserkrankungen nachgewiesen und 1999 auch erstmals konkordant in zellfreier DNA in Serum von Lungenkarzinom-Patienten detektiert (185). Am häufigsten von solchen Modifikationen betroffen scheint das p16-Tumorsuppressorgen, was beispielsweise in der Entstehung von Karzinomen von Leber, Lunge und Mamma eine Rolle spielt (185). Für diese und auch andere Organe lassen sich weiter eine variable Bandbreite und auch höherfrequent Kombinationen verschiedener hypermethylierter Gene nachweisen (186, 187). Aufgrund dessen scheint es erforderlich, dass die zu analysierenden Gene sehr genau ausgewählt

werden, um eine ausreichend hohe Sensitivität zu erhalten (186). Eine Konkordanz detektierter Hypermethylierungen von Tumoronkogenen in Tumorgewebe und Blutzirkulation wird dabei durch mehrere Studien bestätigt (188-190). Eine Korrelation mit Tumorstadium, sowie Differenzierungsgrad und Metastasierungsstatus wird hingegen verneint (191, 192). Zudem zeigt eine Meta-Analyse von 31 Studien eine Spannweite der Detektionsrate einzelner Hypermethylationsmarker von 5-80 % (193). Weiter scheinen diese Marker weder spezifisch für einzelne Tumor-Entitäten noch spezifisch onko-pathologisch zu sein (186). So lassen sich auch in nicht-malignen Erkrankungen wie benigner Prostata-Hyperplasie oder Fibroadenomen hypermethylierte CpG-„Inseln“ nachweisen (144, 189, 191). Und auch in der Blutzirkulation gesunder Kontrollpatienten sind diese in 8-12 % zu finden (194).

Eine weitere Methode karzinogenetische Aberrationen im zirkulierenden, zellfreien Erbgut zu identifizieren, widmet sich der Analyse von Mikrosatelliten. Dabei handelt es sich um repetitive Sequenzen von 1-6 Nukleotiden mit unbekannter Funktion, die über das komplette menschliche Genom verteilt sind (195). Anhand dieser lassen sich sogenannte „allelische Imbalancen“ detektieren. Man unterscheidet hierbei die Mikrosatelliteninstabilität (MSI) von einem Verlust der Heterozygotie („Loss of Heterozygosity, LOH). Ersteres bezeichnet abnorm lange oder kurze Mikrosatelliten, die durch fehlerhafte DNA-Reparaturprozesse entstehen; ein LOH hingegen den Verlust eines Allels im Vergleich zu gesunder DNA des gleichen Individuums. Derartige genetische Fehler können in einem Defekt oder Deletion von Tumorsuppressorgenen und so zu unkontrolliertem Tumorwachstum führen. Beide Defektarten sind sowohl in Tumorgewebe als auch im Blut nachweisbar und besitzen nach aktueller Studienlage einen potenziellen Wert in der Karzinom-Diagnostik von beispielsweise Mamma, Ovar, Prostata, oralem Plattenepithel oder Melanomen (149, 188, 196). Jedoch zeigte eine Meta-Analyse zu 46 Studien verschiedener Karzinom-Entitäten auf, dass die Detektionsrate von Mikrosatellitenaberrationen sowohl zwischen verschiedener Tumor-Entitäten als auch für die gleiche Entität stark variierte (197). Diese Varianzen sind nach Jung et al. uneinheitlichen Abgrenzungswerten, bzw. Cut-off-Points, geschuldet (14). Dieser wird nötig, da abermals auch bei bis zu 20 % der gesunden Kontrollindividuen Mikrosatelliten ausgemacht wurden (198).

### 2.3.2 Sportmedizin

Ähnlich zu akuten klinisch-pathologischen Ereignissen im menschlichen Körper kann auch physiologischer Stress, der beispielsweise durch sportliche Belastung induziert wird, innerhalb kurzer Zeit für signifikante Anstiege zellfreier DNA in der Blutzirkulation sorgen. Dies wurde für verschiedene Belastungsformen wie beispielsweise Ausdauerläufe, Intervalltraining, Gewichtheben, Krafttraining und Rudern gezeigt (7, 199-203). Hierbei werden Konzentrationen erreicht, die deren individuellen Basiswerte vor Belastung um ein Vielfaches übersteigen. Der Ursprung des primären, direkten Anstiegs nach Belastung wird dabei ähnlich den zuvor dargelegten Freisetzungsmechanismen kontrovers diskutiert. Zum einen scheint eine verstärkte Aktivierung von Neutrophilen und deren darauffolgenden Ausstoß von NETs sowie Untergang plausibel (NETosis) (78). Die Neutrophilen-Aktivierung erfolgt durch belastungsinduzierten Sauerstoffmangel und Laktatakkumulation (112, 201). Zum anderen wäre eine verstärkte Freisetzung aus extrazellulären Vesikeln wie Mikrovesikeln oder Exosomen möglich (204). Diese These wurde jedoch durch Helmig et al. widerlegt, da sich durch Auftrennung mittels Zentrifugation zeigte, dass sich der Hauptanteil zellfreier DNA im flüssigen Überstand und nicht in der Fraktion der extrazellulären Vesikel befand (205). Des Weiteren wiesen Tug et al. anhand von Patienten mit geschlechtsspezifischer Knochenmarkstransplantation zellfreier DNA eine Herkunft aus hämatopoetischen Zelllinien zu (54). Daher wird den extrazellulären Vesikeln unter sportphysiologischen Aspekten eher eine unabhängige Form der Zell-Zell-Kommunikation zugeschrieben (204). Mittels einer ebenfalls belastungsinduzierten Steigerung der DNase-Aktivität in der Blutzirkulation wird die akkumulierte zellfreie DNA in kürzester Zeit degradiert und kehrt spätestens innerhalb von 2 Stunden auf ihr Ausgangsniveau vor der Belastung zurück (7, 78, 200, 201, 203). Dieser rapide sportphysiologische Prozess gilt nach Breitbach et al. vor allem für intensive anaerobe Belastungen. Ausdauernde Belastungen im aeroben Bereich oder repetitive, intensive Trainingsreize ohne ausreichende Ruhe unterliegen anderen Mechanismen (41). Für den zuletzt genannten Fall scheinen apoptotische sowie nekrotische Prozesse, basierend auf lokalen Schäden und Inflammation am beanspruchten Muskelgewebe eine wichtige Rolle zu spielen (41). Während und bis zu 24 Stunden nach sportlicher Belastung infiltrieren Lymphozyten und neutrophile Granulozyten die verletzten Muskelzellen, degradieren diese und gehen anschließend zur Beendigung der inflammatorischen Immunantwort apoptotisch unter (206, 207). Diese Kinetik zeigt sich deutlich zeitlich verzögert im Vergleich zur akuten

Freisetzung zellfreier DNA. So wiesen Teilnehmer eines Ultra-Marathons auch bis zu 24 Stunden nach dem Lauf noch erhöhte Konzentrationen zellfreier DNA auf. Und auch für eine chronische Überbelastung durch repetitives Krafttraining wurden persistierend hohe Konzentrationen zellfreier DNA, begleitet von Biomarkern für Muskelzellschäden und Inflammation, nachgewiesen (200). Eine Analyse der Fragmentlängen zellfreier DNA während und nach Belastung unterstützt die Hypothese der differenten Freisetzungsmechanismen: In der akuten Belastungsphase waren die kurzen Fragmente, in der Phase nach Belastung die langen Fragmente vorherrschend (208). Diese Ergebnisse deuten dementsprechend darauf hin, dass als sportphysiologische Parameter sowohl die Belastungsdauer als auch der dafür notwendige Metabolismus (aerob/anaerob) Einfluss auf Freisetzung und Kinetik zellfreier DNA haben (41). In Intervallbelastungen spielt außerdem die Pausendauer, in Kraftsportarten die Intensität der Übungen eine wichtige Rolle (209, 210). Hieraus ergeben sich potenzielle Vorteile von cfDNA gegenüber Laktat als Biomarker in der Leistungsdiagnostik. Laktat zeigt keinen vollständigen linearen Anstieg über aerobe und anaerobe Phase ausdauernder Belastungen (211) und korrelierte im Mannschaftssport nicht gleichwertig mit der in Saisonspielen zurückgelegten Gesamtstrecke (209). Des Weiteren zeigte sich Laktat unbeeinflusst davon, mit welcher Intensität Kraftübungen ausgeführt wurden (210). Ein Nachteil zellfreier DNA könnte wiederum darin bestehen, dass es nicht möglich war, zwischen sportlich austrainierten oder untrainierten Probanden und damit zwischen Unterschieden hinsichtlich der maximal möglichen Sauerstoffaufnahme, kurz VO<sub>2</sub>max, zu differenzieren (78). Weiter unterliegt zellfreie DNA anderen, nicht-physikalischen Einflüssen wie psychosozialem Stress oder Krankheiten (212). Andere Autoren stellten hingegen, zumindest für akute Belastungen, eine enge Korrelation zwischen diesen beiden Parametern fest (201, 202). Ein klarer Vorteil zellfreier DNA scheint sich aber bzgl. des Monitorings der Trainingspensums über eine längere Dauer, auch Trainings-„Load“ genannt, anzudeuten (213). Dieser widmet sich ein immer größeres Interesse seitens Vereinen, Trainern und Athleten, um eine individuelle Beurteilung darüber zu erhalten, wie gut sich der Athleten-Körper an neue Trainingsreize anpasst, den individuellen Fortschritt zu evaluieren und um Verletzungsrisiken zu minimieren (214). Trotz positiver Korrelationen innerhalb sowie nach mehrwöchiger Trainingsphasen mit objektivierbaren Parametern für Überbelastung auf muskulärer und metabolischer Ebene sind hierbei weitere Untersuchungen nötig, um den potenziellen Nutzen zellfreier DNA als Parameter der Trainings-„Load“ auszuloten (200, 213).

## 2.4 Methodik der Quantifizierung zellfreier DNA

### 2.4.1 Prä-Analytik

Um eine hochwertige Evaluation zellfreier DNA im menschlichen Blut zu gewährleisten, sind vor dessen Analyse einige Variablen der Prä-Analytik wie Akquirierung, Prozessierung und Lagerung des Probenmaterials sorgfältig anzugehen. Sowohl für quantitative als auch qualitative Analysen zellfreier DNA sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine allgemein gültige bzw. standardisierte Protokolle für die Probenverarbeitung etabliert. Es werden jedoch auf Basis der verfügbaren Literatur Empfehlungen getroffen (215).

Bei der Auswahl der Probanden sind verschiedene biologische Einflüsse auf Konzentration und absolute Menge zellfreier DNA zu beachten: So zeigten sich erhöhte Werte bei männlichem Geschlecht, älteren Menschen, Frauen in der Menopause, Rauchern und Menschen mit erhöhten Body-Mass-Index (216, 217). Auch körperlicher Stress wie Sport oder Fasten können die Konzentration zellfreier DNA in der Blutzirkulation steigern (209, 216). Für die Abnahme sollten großlumige Nadeln verwendet werden, um eine Beschädigung von Zellen und darauffolgende Verfälschung der Probe durch zelluläre genomische DNA zu verhindern (215). Das native Blut sollte präferenziell in Monovetten (Blutentnahmeröhrchen) erfolgen, die nicht aus Polypropylen bestehen, da dieser Stoff DNA binden und denaturieren kann (218). Hier bieten Monovetten aus Polyallomer einen Vorteil, sind allerdings gleichzeitig mit hohen Kosten verbunden (218). Weiter wird empfohlen, Monovetten, die mit dem Chelatbildner Ethylendiamintetraacetat (EDTA) versetzt sind, zu benutzen, um eine Probengerinnung und Zelllyse zu verhindern (18, 219). Von Heparin und Citrat als Antikoagulans wird abgeraten, da sich diese bei verzögerter Prozessierung nachteilig zeigen und eine Auswertung mittels qPCR behindern können (220).

Einige Autoren gehen davon aus, dass es schon innerhalb von zwei bis spätestens sechs Stunden nach Abnahme zu einem Anstieg der Menge an DNA im Probenmaterial durch Zelllyse und andere Prozesse kommt (219, 221). Andere Autoren hingegen sehen keinerlei Änderungen der zellfreien DNA-Konzentration in diesem Zeitfenster oder sogar darüber hinaus bis zu 24 Stunden nach Abnahme (222). Da sich die Studienlage hierzu dementsprechend uneindeutig bleibt, wird letztlich dazu geraten, das Probenmaterial sobald als möglich zu bearbeiten (215). Ob das



Probenmaterial dabei auf Raumtemperatur gelagert oder auf 4°C gekühlt wird, scheint sowohl für Konzentration als auch für Fragmentierung der zellfreien DNA nicht von Relevanz zu sein (223). Jedoch wird aufgrund potenzieller Nuklease-Aktivität im Nativblut zu einer Kühlung geraten. Bei der Wahl zwischen Serum und Plasma als Ausgangsmaterial quantitativer cfDNA-Analytik bestehen ebenfalls unterschiedliche Meinungen, jedoch zeigt sich hierbei Plasma wertvoller und wird daher auch in den aktuellen Empfehlungen bevorzugt (215). Speziell für die Untersuchung von ct-DNA wird Plasma eine höhere Aussagekraft nachgesagt (224). Zwar sind die Konzentrationen an cfDNA in Serum 20-fach höher und damit einfacher nachweisbar bzw. isolierbar als in Plasma, jedoch entsteht der Großteil dieser Serum-cfDNA aus Gerinnungsprozessen („Clotting“) während der Lagerung und steigt daher auch im Gegensatz zu Plasma von Tag zu Tag an (225-227). Das bedeutet, dass die DNA in Serum nicht allein die zellfreie, zirkulierende DNA im menschlichen Körper widerspiegelt, sondern im wesentlich größeren Anteil genomische DNA zellulärer Herkunft. Diese stammt hauptsächlich aus gerinnungsinduzierter Lyse von Leukozyten und hämatopoetischen Zellen, was auch in einer durchschnittlich höheren Fragmentlänge in Serum ersichtlich wird (222, 223). Diese Kontamination durch genomische DNA aus Leukozyten und hämatopoetischen Zellen ist in Plasma wesentlich geringer präsent als in Serum (171, 223). Gleichzeitig wies man Serum stärkere intra-individuelle sowie zeitliche Variabilität und Instabilität hinsichtlich messbarer freier DNA nach (228). Des Weiteren könnten Partikel wie High-Density-Lipoproteine (HDL) oder Exosome, die sowohl mit zellfreier DNA als auch mit Fibrinogen assoziiert sind, gerinnungsbedingt verloren gehen (229). Dadurch könnte die wirkliche Menge zellfreier DNA am Gesamt-DNA im Probenmaterial fälschlicherweise weiter gesenkt werden (18).

Um eine optimale Aussagekraft zellfreier DNA in Plasma zu erhalten, wird eine Zentrifugation in zwei Schritten empfohlen: Zu Anfang sollte eine Zentrifugation bei niedrigerer Geschwindigkeit von 800-1200 xg für 10 min. bei 4 °C erfolgen, um die Probe von Blutzellen zu befreien. Nach Entfernung des Überstandes wird empfohlen unter sonst gleichen Bedingungen mit einer höheren Geschwindigkeit von 14000-16000 xg zu zentrifugieren. So wird im zweiten Schritt eine Aufreinigung der Zell-Organellen und Zelltrümmer gewährleistet (127, 230). Lui et al. zeigten, dass mehrere Zentrifugationsschritte keine ex vivo Kontamination genomischer DNA aus Blutzellen

induziert und so die Reinheit sowie Homogenität zellfreier DNA im Analysat gesteigert wird (222).

Sowohl für Serum als auch Plasma bietet sich anschließend eine Extraktion der enthaltenen DNA an. Diese wird häufig praktiziert, da so geringe Mengen an cfDNA von dem großen Anteil an Proteinen im Blut aufgereinigt, konzentriert und besser detektierbar/analysierbar werden (215). Des Weiteren sind cfDNA-Extrakte weniger anfällig gegen Degradation durch Dilution, Lagerung und Verwendung (5, 18). Hierfür bieten sich sowohl spezifische Isolationsmethoden als auch kommerzielle Kits an (221, 231). Letztere zeigen allerdings bessere Bedingungen für anwender-unabhängige Standardisierung und routinemäßige Verwendung (232). Empfohlen wird dabei das Nucleo-Spin-Kit (Macherey-Nagel) und QuiAMp Kit (Quiagen) (231, 233). Hinsichtlich der Analyse zellfreier DNA zeigte sich das NucleoSpin Kit jedoch überlegen, da kleinere DNA-Fragmente effizient und gleichwertig zu größeren Fragmenten extrahiert werden (231, 233). Des Weiteren ist in der Forschungsgruppe um Lee et al. eine vielversprechende neue Methode in der Entwicklung, die speziell für die sorgfältige Extraktion zellfreier DNA angedacht und sich ebenbürtig mit den kommerziell etablierten Kits zeigt (234).

Das gewünschte prozessierte Probenmaterial sollte anschließend in mehrere Aliquots der Größe 300 µl – 2 ml verteilt werden, um qualitative Schäden bzw. quantitative Verluste sowie Kontaminationen durch Frost-Auftau-Wechselbeanspruchung und Materialentnahme zu reduzieren (219). Diese Veränderungen treten meist nach drei dieser Zyklen auf und resultierten vor allem in einer stärkeren Fragmentierung zellfreier DNA (223). Hinsichtlich der Dauer und Temperatur der Lagerung für eine optimale Konservierung der zu analysierenden Informationen bestehen widersprüchliche Informationen (219, 223). Da jedoch gesichert ist, dass die Konzentration zellfreier DNA in Plasma und isoliertem Material jährlich bis zu 30 % abnimmt, wird aktuell für quantitative Analysen eine maximale Lagerungsdauer von bis zu 9 Monaten bei -80 °C empfohlen (215, 228). Da qualitative Analysen im Wesentlichen unabhängig der Konzentration zellfreier DNA sind, wird hierfür eine längere mögliche Aufbewahrungsdauer von bis zu 10 Jahren angegeben. Jedoch ist auch hierbei zu bedenken, dass spezifische Sequenzen etc. mit geringerer Konzentration schwieriger detektierbar werden.

#### 2.4.2 Methoden der Quantifizierung

Nach erfolgreicher Probenverarbeitung sowie -vorbereitung erfolgt die quantitative Analyse mittels verschiedener Methoden/Technologien.

Als Basis oder Gold-Standard zählt hier die Echtzeit („real-time-/RT-“) bzw. quantitative („q-“) PCR, hier als qPCR bezeichnet. Zusätzlich zur enzymatischen Vervielfältigung des genetischen Materials mittels Primer, DNA-Polymerase und Nukleotiden wird hierbei die Amplifikationsreaktion durch Zugabe eines für Nukleinsäuren-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes oder fluoreszierenden Sonden und Detektion deren Fluoreszenzsignals in Echtzeit erfasst. Anschließend wird der Ct-Wert, engl. Threshold Cycle, der analysierten Probe ermittelt. Der Ct-Wert bezeichnet den PCR-Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt, also den Schnittpunkt zwischen exponentieller Amplifikationskurve und Schwellenwertlinie („Threshold“). Je mehr amplifizierbares genetisches Material in der Ausgangsprobe vorliegt, desto früher bzw. mit weniger Amplifikations-Zyklen wird dieser Schnittpunkt erreicht. Anhand einer zuvor etablierten Standardkurve wird aus dem Ct-Wert der Konzentrationswert im Ursprungsmaterial ermittelt und kann bei konstanter Amplifikationseffizienz auch mit anderen Proben verglichen werden (235, 236). Weiter ist der Ct-Wert von der Wahl des amplifizierten Gens bzw. Amplikon und dessen Häufigkeit im menschlichen Genom abhängig (237). Häufig und daher oft benutzt sind beispielsweise Sequenzen von Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT), Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ -Actin,  $\beta$ -Globin sowie repetitive ALU-Sequenzen und (117, 238, 239). Diese präsentieren das menschliche Genom jedoch sehr variabel, sodass Studien mit unterschiedlichen Amplifikationsgenen schwer vergleichbar sind (237).

Eine andere Form der PCR für die quantitative Analyse genetischen Materials ist die Duplex-bzw. Multiplex-PCR. Hier werden zwei oder mehrere Einzel-PCR-Reaktionen verschiedener DNA-Abschnitte in einem Reagenzansatz unter identischen Bedingungen kombiniert. Die Auswertung erfolgt als Real-Time-PCR mit sequenzspezifisch fluoreszenzmarkierten Gensonden oder über elektrophoretische Auftrennung nach Fragmentlänge (240). Für Letzteres ist Voraussetzung, dass sich die zu amplifizierenden DNA-Fragmente hinsichtlich ihrer Länge unterscheiden. So kann zum einen zwischen ct-DNA und cfDNA oder fetaler und maternaler cfDNA differenziert werden (36, 241). Zum anderen können auch sequenzspezifisch mehrere genetische Aberrationen detektiert werden (242). Allerdings steigt mit der Anzahl der

gleichzeitig ablaufenden Amplifikationsreaktionen und Addition von Primern und Sonden das Risiko für Wechselwirkungen zwischen diesen Oligonukleotiden, was die Sensitivität dieser Methode beeinträchtigen könnte (240). Eine wiederum andere Variante genetisches Material zu amplifizieren und quantifizieren ist die Digital PCR. Durch Separation nach Poisson-Verteilung in eine große Anzahl getrennter Reaktionsgefäße im Femtoliter-Bereich wird eine Vereinzelnung der DNA-Moleküle erreicht. So befinden sich in einem Reaktionsgefäß optimalerweise entweder ein einzelne Gensequenz oder kein genetisches Material. Wenn genetisches Material vorhanden ist, kann dieses amplifiziert und ein Fluoreszenzsignal detektiert werden. Die Auszählung dieser digitalen (0/1) Antwort erfolgt durch Hochdurchsatz-Screening von ca. 20.000 Reaktionsgefäßen pro mm<sup>2</sup> (139, 241). Im Vergleich zur PCR nehmen so Varianzen der Amplifikationseffizienz sowie PCR-Inhibitoren einen geringeren Einfluss auf die methodische Sensitivität bei gleichzeitiger Steigerung der Nachweisgrenze. So können niedrigfrequente Zielsequenzen optimal vor einem prominenten Hintergrund detektiert werden, was sich für ct-DNA anbietet (140). Allerdings ist die Durchsatzrate im Vergleich stark vermindert und die Sensitivität durch die Anzahl der Reaktionsgefäße limitiert (243).

Auch Methoden ohne PCR zeigten sich in vielen Studien als verlässlich für die Quantifizierung zellfreien genetischen Materials. Anstatt der aufwendigen Amplifikation wird das verdünnte Probenmaterial nach Zentrifugation direkt mit dem ausgewählten Fluoreszenzfarbstoff vermischt (237). Hier wird also allein auf fluoreszenzspektroskopischer Basis gearbeitet: Nach Exzitation durch UV-Licht einer bestimmten Wellenlänge sind Fluorochrome in der Lage, die eingestrahlte Energie in Form von Fluoreszenzlicht eines differenten Wellenlängen-Spektrums wieder abzugeben (Emission) (244). Die Fluorochrome binden je nach strukturellen und elektrostatischen Eigenschaften an spezifische Arten von Nukleinsäuren, wodurch ihre Fluoreszenzintensität um ein Vielfaches verstärkt wird (245-247). Die Sensitivität dieser Methode wird durch die fehlende Amplifikation, die Hintergrundfluoreszenz im Probenmaterial oder nicht-gebundenene Fluorochrome beeinflusst (237). Einige Forschungsgruppen wendeten diese Methode mittels des Fluoreszenzfarbstoffe „Höchst 33528“ oder „Höchst 33342“ und eines auf diese Farbstoffe kalibrierten Fluorometers an (43, 248). Dieser Farbstoff bindet potenziell an alle Nukleinsäuren, ein signifikanter Fluoreszenz-Anstieg erfolgt jedoch nur bei dsDNA (249). Bindungsstärke sowie Fluoreszenzstärke sind allerdings zusätzlich stark abhängig von

Nukleotidsequenz und Farbstoffkonzentration (250). Andere Forschungsgruppen verwendeten den Fluoreszenzfarbstoff „PicoGreen“ (PG) (251, 252). Dieser weist im Vergleich zu Höchst-Fluorochromen einen über 1000-fach stärkeren Fluoreszenzanstieg bei gleichzeitig höherer Selektivität für dsDNA auf (253). Das resultiert in einer 400-fach niedrigeren Nachweisgrenze bis 25 pg/ml (254). Allerdings bindet auch PG präferentiell an Nukleotidsequenzen, die reich an Guanin (G) oder Cytosin (C) sind (246). Die Anwendung erfolgte auch hier mittels eines speziell für PG entwickelten Fluorimeters oder mithilfe von Mikrotiterplatten-Lesegeräten (252, 255). In der klinischen Anwendung zeigte sich diese Anwendung signifikant korrelierend mit  $\beta$ -Globin-qPCR bei gleichzeitig verminderten Kosten und Arbeitsaufwand (256). Allerdings wies die fluorometrische Quantifizierung mittels PicoGreen Assay/Kit im Vergleich zu der qPCR-Analyse, die allgemein als Goldstandard angesehen wird, Varianzen von bis zu 59,8% auf (257).

#### 2.4.2.1 Quantifizierung ohne Nukleinsäuren-Extraktion

Die zuvor dargelegten Methoden verwenden ausnahmslos Proben, deren genetischer Inhalt zuvor aus Serum oder Plasma isoliert wurde. Das macht nicht nur einen weiteren Prozessierungsschritt notwendig, sondern bringt auch den Nachteil einer gesteigerten Variabilität durch verschiedene verwendete Extraktionsmethoden mit sich (231, 258). Ein Vergleich von 56 europäischen Laboratorien offenbarte dabei eine Spannweite zwischen 2,87-224,02 ng/ml mit einem Median von 23,15 ng/ml zellfreier DNA nach Extraktion (259). Weiter induzierte die Extraktion in 87,5 % eine stärkere Fragmentierung sowie einen absoluten Verlust an DNA-Fragmenten (15). Dieser Verlust betrifft vor allem kurze Fragmente (<150 bp) (260). Für eine vollständige, hochwertige Analyse ist jedoch neben der hohen Konzentrierung des zellfreien genetischen Materials, die durch die verwendeten Methoden entstehen und als Effizienzkriterium angegeben werden, vor allem die Erfassung möglichst aller vorhandenen Fragmente notwendig (261).

Um diese Störfaktoren zu minimieren und sowohl Zeit als auch Kosten zu sparen, etablierten Studiengruppen den Ansatz direkt aus Serum oder Plasma zu quantifizieren (15, 167). Umetani et al. verwendeten Serum, das nach Zentrifugation lediglich mit Puffer und Proteinase K versetzt wurde, um eine Kontamination durch Proteine und deren Bindung an DNA oder Polymerase zu verhindern. Die Amplifikation

erfolgte mittels repetitiver ALU-Sequenzen und Primern der Länge 115 bp und 247 bp. Als Fluorochrom wurde „SYBR Gold“ verwendet (167). Breitbach et al. verwendeten Plasma, das zuvor zweifach bei 1600 xg und 16000 xg zentrifugiert wurde. Anschließend wurde das Plasma lediglich im Verhältnis 1:40 mit sterilem Wasser verdünnt. Für die enzymatische Amplifikation entschied man sich für eine Velocity-Polymerase sowie Primern der Länge 90 bp und 220 bp. Diese Polymerase zeichnet sich durch Stabilität, eine hohe Syntheserate bei gleichzeitig sehr geringer Fehlerrate aus. Weiter diente ein ähnlich hochfrequentes LINE-1-Retrotransposon/Repeat (L1PA2) als Amplikon und SYBR Green I als Fluorochrom (15). Im Vergleich zu Extraktionen mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit oder Phenol-Chlorophorm-Isolation zeigte sich eine bis zu 2,96-fach höhere Konzentration in den nicht-purifizierten Proben. Dieser hohe Extraktionsverlust konnte zudem quantitativ in der benutzten Aufreinigungs-Lösung nachgewiesen werden. Beide Methoden konnten im Folgenden für quantitative sowie qualitative Analytik von Patienten der Kardiologie und Onkologie erfolgreich angewendet werden (15, 147, 167).

#### 2.4.2.2 Amplifikationsunabhängige Quantifizierung ohne Nukleinsäure-Extraktion

Goldshstein et al. etablierten wiederum eine rein spektrophotometrische Methode für die Direktmessung ohne Extraktion und Amplifikation der cfDNA. Sie verwendeten unbehandeltes Serum als Template und SYBR Gold als Fluorochrom. Dieses Fluorochrom lag nach Diluton in Dimethylsulfoxid (DMSO) und Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) sowie Zugabe des Serums in einem Verhältnis von 1:1000 zu der Ausgangskonzentration vor (16). SYBR Gold (SGO) bindet unspezifisch an dsDNA, ssDNA und RNA. Da die bindungsinduzierte Fluoreszenzverstärkung sowohl stärker (100-fach) als auch gleichwertig für jede gebundene Form von Nukleinsäure ist, detektiert SGO Nukleinsäuren insgesamt sensitiver als SYBR Green 1 (SG1) (245). Die Bindung erfolgt, ähnlich zu PG, präferenziell an GC-reiche Sequenzen (262). SGO hat also den Vorteil einzelsträngige DNA-Fragmente gleichwertig zu erfassen, ist jedoch anfällig für Kontaminationen durch RNA. Goldshstein et al. zeigten allerdings, dass sich im verwendeten Probenmaterial nur geringe Spuren von Ribonukleinsäuren befinden. Letztlich können die Autoren mit dieser Methode Nukleinsäuren bis zu einer Nachweisgrenze von 170 ng/ml detektieren bei gleichzeitig signifikanter Korrelation zu Ergebnissen einer  $\beta$ -Globin qPCR. Im Vergleich zu qPCR sehen die Autoren zudem den Vorteil ohne Amplifikation unempfindlicher gegen Fragmentierung oder andere

DNA-Schäden zu sein, indem auch Fragmente mit einer geringen Größe von 12-18 bp miterfasst werden können (245). In den folgenden Jahren wurde diese Methode auf ihre klinische Anwendbarkeit getestet: Anhand von Patienten mit Kolorektalkarzinomen konnte man hierbei eine signifikant diagnostische sowie prognostische Relevanz nachweisen, die in Kombination mit dem Tumormarker CEA dem histologischen Staging überlegen war (263). Für die Entität des Mamma-Karzinoms ließen sich anhand dieser Methode maligne Läsionen sowohl von benignen Läsionen und gesunden Kontrollen differenzieren. Gleichzeitig korrelierten die gemessenen Konzentrationen zellfreier DNA mit Tumorgöße, Tumorstadium und LK-Beteiligung (264). Weiter war es möglich für intensivmedizinisch betreute Verbrennungsoffer eine signifikante Korrelation zu Verbrennungsgrad und betroffener Körperoberfläche herzustellen, sowie diese Patienten anhand ihres Mortalitätsrisiko einzustufen (265). Yang et al. verzichteten ebenfalls auf die Amplifikation mittels PCR und ersetzten die chemische Isolation genetischen Materials durch eine „Extraktion“ und Konzentration mittels Elektrophorese: Durch Anlegen einer Spannung bewegen sich die DNA-Fragmente in einem Gel in Richtung der Anode. Anstatt aufgrund der unterschiedlichen Größe separiert zu werden, akkumulieren sie hier an einer Barriere. So wird gleichzeitig eine hinreichende Abtrennung/Extraktion von nicht-geladenen Blut-Kontaminanten als auch eine Konzentrierung der Gesamtmasse des genetischen Materials erreicht. Da das Probenmaterial zuvor mit dem Fluorochrom PicoGreen vermischt wurde, kann eine fluorometrische Erfassung dieses Prozesses in Echtzeit sowie eine Quantifizierung der akkumulierten Fragmente erfolgen (17). Um verlässlich zwischen Konzentrationsstufen von 3,6 und 20 µg/ml zu differenzieren waren hierbei lediglich ein Probenvolumen von 10 µl und ein Arbeitsaufwand von 5 min. nötig. Weiter konnten cfDNA-Konzentrationen in Plasmaproben von Sepsis-Patienten signifikant von gesunden Kontrollen differenziert werden. Diese Differenzierung war allerdings schon vor elektrophoretischer Akkumulation fluorometrisch quantifizierbar.

## 2.5 Zusammenfassung der Literaturdiskussion: Forschungslücke und eigener Ansatz

In Zusammenschau des aktuellen Stands der Forschung und dessen Diskussion lässt sich feststellen, dass quantitativen Analysen zellfreier DNA im Gegensatz zu qualitativen Analysen als Biomarker im Kontext verschiedener klinischer Pathologien nur eine eingeschränkte Aussagekraft innewohnt (11). Dies ist zu einem großen Anteil

einer uneinheitlichen Methodik der Quantifizierung und Interpretation geschuldet, die eine Vergleichbarkeit der Studien untereinander sowie eine gesamtheitliche Bewertung der Signifikanz zellfreier DNA erschwert (14). Diese hohe Diversität der methodischen Varianten und Widersprüchlichkeit derer Resultate könnten dabei auf die zumeist sehr aufwändige Prozessierung des Probenmaterials sowie die Komplexität der einzelnen Messverfahren zurückzuführen sein.

Auf dieser Überlegung basierend entsteht die Motivation weitere Untersuchungen hinsichtlich einer praktikableren Methodik zu initiieren, was auch in dieser Arbeit aufgegriffen werden soll (15-17, 167). Entsprechend der zuvor dargelegten methodischen Ansätze, stellt dabei der Verzicht einer Nukleinsäuren-Extraktion den Grundstein einer höheren Praktikabilität sowie verminderter methodischer Variabilität dar (231, 258). Abweichend der zuvor etablierten Methodiken sollen drei weitere methodische Ansätze festgelegt werden, die auf Basis aktueller Literatur und theoretischen Überlegungen eine zusätzliche Optimierung erbringen könnten: Zuerst sollte Plasma als Analysat verwendet werden, da dieses die Quantität und Qualität zellfreier DNA in der humanen Blutzirkulation am besten reflektiert (215, 224). Weiter soll statt einer Amplifikation eine direkte fluorometrische Erfassung der zellfreien DNA erfolgen, was den zeitlichen und arbeitstechnischen Aufwand stark reduzieren könnte. Allerdings könnte dies gleichzeitig auf Kosten der methodischen Sensitivität geschehen. SYBR Green 1 soll dabei als Fluorochrom agieren, da sich dessen fluorometrische Spezifität stärker mit den Eigenschaften zellfreier DNA deckt als andere verwandte Fluorochrome. Anhand der laborchemischen Anwendung an Proben einer perioperativen Resektionsstudie soll anschließend evaluiert werden, inwieweit sich die etablierte Methodik hinsichtlich der Darstellung dynamischer Verläufe zellfreier DNA im Vergleich zum derzeitigen „Goldstandard“ präsentiert.



### 3 MATERIAL

#### 3.1 Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller/Anbieter/Vertrieb</b>
Bio-Rad CFX Manager 3.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bio-Rad iQ™5 Optical System Software 2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Endnote X9	Thomson Reuters, Philadelphia, PA, USA
IQ. 5 Optical System Software, Version 2.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
JMP 11	SAS Institute Inc., Cary, NC, USA
Microsoft Excel (2013/2016) Microsoft Powerpoint (2013/2016) Microsoft Word (2013/2016)	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 GenBank® (Benson <i>et al.</i> 2013)
Quantity One® 1-D Analysis Software 4.6.9	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SPSS Statistics (22/23/25)	IBM Corporation, 2015, Ehningen

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Software

### 3.2 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller/Anbieter/Vertrieb</b>
Autoklav, Systec VX 150	Systec GmbH Labor-Systemtechnik, Wettenberg
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™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Geldokumentation, Universal Hood II 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
iMark™ Microplate Absorbance Reader	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubator Mini Incubator	Labnet International, Inc, Edison, NJ, USA
iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Kolbenhubpipetten 2,5/10/100/1.000 µl Eppendorf Research®/Eppendorf Research® plus/Eppendorf Reference®	Eppendorf AG, Hamburg
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 Multipette® stream	Eppendorf AG, Hamburg
NanoDrop 1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
NanoDrop 3300	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen

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 CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Ultrazentrifuge Optima L-90 K, SW40 Ti Rotor	Beckman Coulter, Kalifornien
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	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte

### 3.3 Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller/Anbieter/Vertrieb</b>
Amicon® Ultra Centrifugal Filters 100kD/10kD/3kD 6ml/4ml/0,5ml	Merck KGaA, Darmstadt
Butterfly zur Blutentnahme: Safety-Multifly®-Set (Nadel: 0,8 x 19 mm)	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Desinfektionsspray Kodan® Tinktur	Pro Medico Plan GmbH, Mainz

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
Kimtech Science precision wipes Reinigungstücher	Kimberly-Clark GmbH, Koblenz/Rheinhafen
Klebefolie qPCR 384-Well Platte, Ampiseal	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
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 S-Monovetten® ohne Füllung	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Mundschutz	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Nitril-Einmalhandschuhe	Axon Labortechnik GmbH, Kaiserslautern
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)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Stabpipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tupfer Pur-Zellin®	Pro Medico Plan GmbH, Mainz

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

### 3.4 Chemikalien, Kits

<b>Chemikalie/Kit</b>	<b>Hersteller/Anbieter/Vertrieb</b>
Agar-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	VWR International GmbH, Darmstadt
DNA Away	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNase I rekombinant, RNase-frei	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
dNTPs	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Glykogen	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) 25mM	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
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
PicoGreen®	Invitrogen., Life Technologies GmbH, Darmstadt
Proteinase K Solution	Qiagen GmbH, Hilden
QIAamp RNA Blood Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden
RiboGreen®	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
SYBR® Gold (10,000x)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
SYBR® Green I (10,000x)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Tego PCR-Puffer (2x)	Bioline GmbH, Luckenwalde
Triton X-100	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
VELOCITY DNA Polymerase	Bioline GmbH, Luckenwalde

Wasser (H <sub>2</sub> O)	Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
---------------------------	---

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Kits

### 3.5 Medium/Puffer

<b>Medium/Puffer</b>	<b>Zusammensetzung/Hersteller/Vertrieb</b>
PBS (phosphate buffered saline)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
DNase I Inkubationspuffer	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
TE-Puffer	Ambion®, Life Technologies GmbH, Darmstadt

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Medien/Puffer

### 3.6 Primer

<b>Primer</b>	<b>Richtung</b>	<b>Sequenz (5' - 3')</b>	<b>Länge (bp)</b>
L1PA2 for	sense	TGCCGCAATAAACATACGTG	20
L1PA2 rev 90bp	antisense	GACCCAGCCATCCCATTAC	19
L1PA2 rev 222bp	antisense	AACAACAGGTGCTGGAGAGG	20

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Primer

## 4 METHODEN

Im folgenden Kapitel werden die Herkunft und Akquirierung der für die in dieser Dissertation vorgelegten Studien verwendeten Proben vorgestellt. Anschließend folgt die Darstellung der bereits etablierten Prozessierung und Analyse dieser Proben. Diese dienten als Basis der in dieser Arbeit etablierten Methode einer amplifikationsunabhängigen Direkt-Fluorometrie, welche abschließend vorgestellt wird.

### 4.1 Akquirierung von Probenmaterial

Um die in dieser Studie vorgestellte Methodik zur Detektion zellfreier DNA zu etablieren wurden Blutproben von 5 gesunden Kontrollprobanden und 5 Tumorpatienten der Belastungsstudie von Dr. Ehlert verwendet (266). Eingeschlossen wurden Patienten, bei denen eine Krebserkrankung vorlag, wobei mindestens ein Teil der Tumormasse oder Metastasen noch im Körper vorhanden sein mussten. Für die weiteren Ein- sowie Ausschlusskriterien verweise ich direkt auf die Arbeit von Dr. Ehlert (266). Jeder dieser Probanden führte eine Ausbelastung mittels Fahrradergometer nach einem individuellen Belastungsprotokoll durch. Venöse Plasmaproben von je 20 ml wurden jeweils vor, direkt nach Belastung und 90 min. nach Belastung entnommen.

Um die entwickelte Methode zur amplifikationsunabhängigen Direkt-Fluorometrie anzuwenden und mit der vorbestehenden Analytik zu vergleichen, dienten Plasmaproben einer klinischen Studie aus der gleichen Arbeit von Dr. Ehlert aus dem Jahr 2013 als Untersuchungsmaterial (266). Diese Studie von Dr. Ehlert untersuchte die Dynamik von cfDNA und ctDNA während des operativen Resektionsprozesses bei malignen und vergleichbaren benignen kolorektalen Pathologien. Hierfür wurden präoperativ, perioperativ und postoperativ zu einheitlichen Zeitpunkten arterielle und venöse Blutproben genommen, anschließend bearbeitet und sowohl quantitativ als auch qualitativ analysiert. Für die in dieser Dissertation vorgelegten Studie wurden lediglich venöse Proben verwendet und der analytische Fokus auf die Gesamtheit der zellfreien DNA im Plasma gesetzt.

Hinsichtlich der Ein- und Ausschlusskriterien sowie Anpassung der Testgruppen aneinander möchte ich erneut direkt auf die Arbeit von Dr. Ehlert verweisen (266).

Es wurden Proben von 10 Patienten für die in dieser Dissertation vorgelegten Studie (s. 5.2) ausgewählt, darunter 7 Tumorpatienten und 3 Kontrollpatienten.

Die Blutentnahmen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten über insgesamt 4 Tage durchgeführt. Da sich die zeitlichen Abstände während des Operationsverlaufes sowie die Dauer der Operationen nicht einheitlich darstellten, variierte die Anzahl der entnommenen Proben je nach Patient. Die Entnahme der letzten postoperativen Probe erfolgte aufgrund von variierender Patientenverfügbarkeit entweder nach 24 oder nach 72 Stunden.

Für die in dieser Dissertation vorgelegten Studie wurde daher versucht eine einheitliche Wahl der Zeitpunkte zu treffen, die für sich für Quantifizierung und Analyse am relevantesten darstellten. Diese Zeitpunkte werden in der folgenden Tabelle aufgeführt.

<b>Probennummer</b>	<b>Zeitpunkt</b>
1	1 Tag vor OP
2	Nach Narkoseeinleitung und Anlage eines zentralen Venenkatheters
3	Direkt nach dem 1. Hautschnitt
4	Intraoperativ zwischen Hautschnitt und Resektion
5	Direkt nach Resektion
6	Operations-Ende
7	3 Stunden postoperativ
8	24/72 h postoperativ

Tabelle 8: Perioperativer Zeitpunkt der Probenakquirierung

Alle Blutproben wurden in EDTA-beschichteten S-Monovetten® (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen und spätestens 60 Minuten nach Abnahme weiterverarbeitet.

#### 4.2 Isolation von Nukleinsäuren und Plasma-Aufreinigung

Im Folgenden werden verschiedene Methoden zur Prozessierung von Vollblut vorgestellt, die in den experimentellen Studien dieser Dissertation in variierender Kombination der einzelnen Prozesse verwendet wurden. Die einfache Zentrifugation



stellte für alle Blutproben den ersten Verarbeitungsschritt dar. Jede weitere Form der Plasma-Aufreinigung oder Isolation der enthaltenen Nukleinsäuren wurde entsprechend der benötigten Information einzeln oder kombiniert durchgeführt. Das entsprechende Protokoll ist im jeweiligen Kapitel der experimentellen Studien nochmals vermerkt.

#### 4.2.1 Zentrifugation

Zuerst wurde das venöse Vollblut in ein Falcon überführt und für 10 min. bei 4 °C mit 1.600 xg (Zentrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Anschließend wurde der klare, zellfreie Überstand in ein frisches Reagenzgefäß abgenommen, das Pellet blieb zurück. Der Überstand wurde daraufhin nochmals für 5 min. bei 4 °C mit 16.000 xg zentrifugiert, um die letzten Zellbestandteile/-fragmente aus dem Plasma zu entfernen. Nach dieser zweiten Zentrifugation wurde der Überstand wieder abpipettiert und bei minus 20 °C oder minus 80 °C eingefroren. Die Lagerungsdauer bei dieser Temperatur bis zur weiteren Prozessierung und Analyse dieser Arbeit betrug ca. 6-7 Jahre.

#### Ultrazentrifugation und Ultrafiltration

Auf Basis des nach zuvor beschriebenen Protokoll separierten Plasmas wurde eine stärkere zentrifugale Auftrennung der enthaltenen Bestandteile vorgenommen. Dies erfolgte mithilfe einer Ultrazentrifuge (Optima L-90 K Ultracentrifuge; SW40 Ti Rotor, Beckman Coulter), die mit 10 ml Falcons beladen wurde. Die Ultrazentrifugation wurde für 2 h bei 100.000 xg (Raumtemperatur) durchgeführt. Danach wurde der Überstand in ein frisches Reagenzgefäß übernommen, das Pellet blieb zurück. Anschließend wurde der Überstand bei minus 20 °C eingefroren.

Auf Basis des nach zuvor beschriebenen Protokoll separierten Plasmas wurde eine weitere Filtration der enthaltenen Bestandteile vorgenommen. Diese Ultrafiltration erfolgte mithilfe von Ultrazentrifugationsfiltern (Amicon® Ultra Centrifugal Filters, Merck KGaA, Darmstadt) verschiedener Filtergrößen und entsprechend den Herstellerangaben unter verschiedenen Protokollen:

<b>Amicon® Ultra Centrifugal Filter</b>	<b>Zentrifugationsprotokoll</b>
100kD (6ml)	14.000 xg, RT, 120 min.
10kD (4ml)	4000 xg, 25 °C, 120 min.
3kD (0,5ml)	5000 xg, 21 °C, 60 min.

Tabelle 9: Zentrifugationsprotokoll der Ultrafiltration nach Filtergröße

Anschließend wurde der Filter mit den separierten Plasmabestandteilen aus dem Reagenzgefäß entfernt und das gefilterte Plasma bei minus 20 °C eingefroren.

#### 4.2.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung und Isolierung von cfDNA aus Blutplasma wurde die Phenol-Chloroform-Extraktion (PCE) angewendet. Im ersten Schritt wurden 25 µl des Blutplasmas mit 175 µl einer einfach-konzentrierten konzentrierten Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) auf 200 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz mit dem 0,01-fachen Volumen Triton X-100 versetzt und nach kurzem Vortexen zuerst 5 min. bei 98 °C inkubiert. Nach weiteren 5 min. auf Eis wurde das gleiche Gesamtvolumen an Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzugegeben und nach erneutem Vortexen für 10 min. bei 20 °C mit 16.000 xg zentrifugiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Abnahme der wässrigen Phase, welche in ein neues Reagenzgefäß überführt wurde. Der wässrigen Phase wurde daraufhin das 2,5-fache Volumen an 100% Ethanol, sowie das 0,1-fache Volumen Natriumacetat und 20 µg Glycogen hinzugefügt und nach kurzem Vortexen über ca. 12 Stunden bei minus 20 °C zur Präzipitation inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Ansatz im ersten Schritt für 30 min. bei 4 °C mit 16.000 xg zentrifugiert. Um danach das Pellet zu isolieren, wurde der Überstand abgenommen. Anschließend wurde das Pellet mit 1000 µl 70 % Ethanol gewaschen, für 5 min. bei 4 °C mit 16.000 xg zentrifugiert und der Überstand wieder abgenommen. Dieser Waschschrift wurde zuerst nochmals in identischer Weise wiederholt, danach nochmals mit 1000 µl 100% Ethanol. Nachfolgend wurde der Überstand möglichst vollständig abgenommen und das Pellet bei 55 °C getrocknet. Im letzten Schritt wurde die Probe in DNase- sowie RNase-freien Wasser resuspendiert und 30 min. bei 37 °C und 200 rpm auf dem Heizblock gelöst.

### 4.2.3 RNA-Extraktion

RNA wurde mithilfe des QIAamp RNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden) aus Vollblut aufgereinigt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. Hierfür wurde ein Blutvolumen von max. 1,5 ml mit dem fünffachen Volumen an Erythrozytenlyisierenden Puffer (EL-Puffer) gemischt. Dieser Ansatz wurde auf dem Laborschüttler durchmischt und für 10-15 min. auf Eis inkubiert, um eine Lyse der Erythrozyten zu initiieren. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 400 xg bei 4 °C für 10 min. Anschließend wird der daraus resultierende Überstand abpipettiert und verworfen, wobei eine Durchmischung mit dem zurückbleibenden Pellet, bestehend aus Leukozyten, möglichst vermieden wurde. Danach erfolgte eine zweite Zugabe des EL-Puffers in doppeltem Volumen-Verhältnis zu der anfänglich verwendeten Menge an Vollblut. Nach vorsichtigem Vortexen wurde wieder eine Zentrifugation mit 400 xg bei 4 °C für 10 min durchgeführt, um durch erneutes Entfernen des Überstandes übriggebliebene Erythrozytenreste zu eliminieren. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von RLT-Puffer (RNAeasy Lysis Tissue Puffer) zu dem Leukozyten-Pellet, um auch diese Zellen aufzubrechen. Das Puffervolumen orientierte sich dabei an der Menge des verwendeten Blutvolumens (bis 0,5 ml Vollblut: 350 µl Puffer RLT; 0,5-1,5 ml Vollblut: 600 µl Puffer RLT). Dieses Lysat wurde nach kurzem Schütteln in einem 2 ml Sammelgefäß auf einer „QIA-Shredder“-Säule für 2 min. zentrifugiert. Das homogenisierte Lysat wurde anschließend gesichert, die Spin-Säule verworfen. Diesem Lysat wurde darauffolgend in äquivalentem Volumen Ethanol (70 %) hinzugefügt und gemischt. Dieser Mix wurde erneut in ein neues 2 ml Sammelgefäß überführt, einer QIAamp Mini Säule zugeführt und für 15 sec. bei 8.000 xg zentrifugiert. Diese Säule wurde in ein neues 2 ml Sammelgefäß und diesem anschließend 700 µl RW1-Puffer („RNA-Washing“ Puffer) zugegeben. Danach erfolgte eine Zentrifugation für 15 sec. bei 8.000 xg. Anschließend wurde die Säule in ein 2 ml Sammelgefäß überführt und 500 µl RPE-Puffer (ebenfalls „RNA-Washing“ Puffer) hinzugegeben. Diese Säule wurde nochmals für 15 sec. bei 8000 xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Säule nochmals 500 µl Puffer RPE-Puffer zugeführt und bei 20.000 xg für 3 min. zentrifugiert. Die Säule wurde letztendlich in ein 1,5 ml Mikrozentrifugationsgefäß überführt und nach Zugabe von 30-50 µl RNase-freien Wasser bei 8.000 xg für 1 min. zentrifugiert.

#### 4.2.4 DNA-Degradation (Desoxyribonuklease I)

Der enzymatische Verdau der DNA in Plasmaproben erfolgte mittels Desoxyribonuklease I nach Anpassung der Herstellerangaben (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) nach folgendem Protokoll: Die Blutproben wurden wie in Abschnitt 4.2.1 zu Plasma prozessiert. Anschließend wurde die nötige Menge an Units/ml DNase I und zugehörigem Puffer ermittelt, die für das jeweilige Volumen erforderlich war. DNase I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurde in dieser Arbeit in einer Konzentration von 1000 U/ml Plasma bzw. 100 U/ml für die 1:10 Verdünnung des Plasmas verwendet. Nach Herstellerangaben sollte 1 Unit DNase angewendet werden, um 1 µg DNA zu verdauen. 1 µl Plasma bzw. 10 µl der 1:10 Verdünnung enthält in dieser Arbeit maximal ca. 1000 ng/ml bzw. 1 ng/µl. Für diese absolute Menge an DNA würde also nur  $1 \cdot 10^{-3}$  Units an DNase benötigt. Jedoch zeigten unsere Messungen (siehe 5.1.5.4), dass in einem Ansatz mit Plasma-DNA und anderen Plasmabestandteilen 1 Unit DNase pro 1 µl reinen Plasmas benötigt werden. Die Konzentration des zugehörigen Inkubationspuffers (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) wurde nach Herstellerangaben beibehalten: 10-fach in der Ausgangskonzentration, 1-fach im Reaktionsansatz. Die Dauer der darauffolgenden Inkubation betrug 60 min. Falls eine Inaktivierung des Enzyms notwendig war, erfolgte diese mittels 0,05 M EDTA (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) zu einer Zielkonzentration von 6 mmol/l. Die Inkubationsdauer der chemischen Inaktivierung betrug 40 min. und wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen / µl Plasma</b>	<b>Volumen/ 20 µl Plasma (1:10)</b>	<b>Finale Konzentration</b>
DNase I (10 U/µl)	0,1 µl (1 U)	0,2 µl (2 U)	0,01x
Inkubationspuffer (10x)	1 µl	2 µl	0,1
Plasma (unverdünnt)	1 µl	2 µl	0,1x
H <sub>2</sub> O	0,8 µl	0,8 µl + 18 µl	

Tabelle 10: Zusammensetzung und finale Konzentration der Reagenzien im Ansatz eines DNase-Verdaus

#### 4.2.5 Proteolyse (Proteinase K)

Der enzymatische Verdau von Proteinen mittels Proteinase K Lösung (Qiagen GmbH, Hilden) erfolgte nach Anpassung der Herstellerangaben. Die zu behandelnden Blutproben wurden zuvor, wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, zu Plasma prozessiert. Anschließend wurde die benötigte Menge errechnet, um das Volumen der jeweiligen Plasmaprobe adäquat von dessen Proteinanteil zu bereinigen. Hier wurden, wie vom Hersteller empfohlen, eine finale Konzentration von 0,1x der Ausgangskonzentration eingesetzt. Die Dauer und Temperatur der darauffolgenden Inkubation wurde im Vergleich zu den Herstellerangaben auf 40 min. bei 40 °C herabgesetzt, um Schäden an Nukleinsäuren und sonstigen Plasmabestandteilen zu mindern. Eine Inaktivierung der Proteinase erfolgte nicht.

<b>Reagenz</b>	Volumen / µl Plasma	Volumen / 20 µl Plasma (1:10 Verdünnung) Messansatz	Finale Konzentration
<b>Proteinase K Solution (20mg/ml)</b>	1,2 µl	2,4 µl	1,92 mg/ml
<b>Plasma (unverdünnt)</b>	1 µl	2 µl	0,1x
<b>H<sub>2</sub>O</b>		18 µl	

Tabelle 11: Zusammensetzung und finale Konzentration der Reagenzien im Ansatz eines Proteinase-Verdau

#### 4.3 Analyse von Nukleinsäuren

Das folgende Kapitel erläutert verschiedene Methoden zur Analyse genetischen Materials, mit deren Hilfe das prozessierte Probenmaterial tiefergehend untersucht werden konnte. Diese waren bereits entsprechend vor Erarbeitung dieser Dissertation etabliert und wurden so je nach Fragestellung weitestgehend unverändert angewendet.

#### 4.3.1 Spektroskopische DNA-Quantifizierung

##### NanoDrop 1000

Der NanoDrop 1000 (PeqLab, VWR, Erlangen, Deutschland) dient zur Quantifizierung von Nukleinsäurekonzentrationen mittels Spektrophotometrie. Die Verwendung des Spektrophotometers erfolgte standardgemäß nach Herstellerangaben. Vor der Messung wurde das Gerät mit 1-2 µl H<sub>2</sub>O initialisiert. Anschließend wurden 1-2 µl des Puffers, in welchem die Nukleinsäuren gelöst waren, als Referenz auf das Messplateau des NanoDrop 1000 gegeben, um einen Hintergrund für die darauffolgende Messung zu eruieren. Für die eigentliche Messung wurden 1,5 µl Volumen der Proben verwendet. Nach jeder Messung wurden die Kontaktflächen des Geräts mit einem fusselfreien Reinigungstuch gereinigt. DNA sowie RNA absorbieren Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm. In diesem Bereich von Wellenlängen können zudem Verunreinigungen in Form von Proteinen und Lösungsmitteln detektiert werden. Abhängig von der Zusammensetzung der Nukleinsäuren können mittels eines Kopienzahlrechners (Thermo-Fisher-Scientific) die in der Probe enthaltene Menge quantifiziert werden. Dies ist mit dem NanoDrop100 bis zu Konzentrationen von 3700 ng/µl möglich.

##### NanoDrop 3300

Der NanoDrop 3300 (PeqLab, VWR, Erlangen, Deutschland) ist im Vergleich zu dem NanoDrop 1000 ein Fluorospektrometer und unterscheidet sich hinsichtlich der Anwendung darin, dass die Proben unter Zugabe des mit doppelsträngiger DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes PicoGreen (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) bei 520 nm gemessen werden. Um die hierbei gemessenen Werten an Strahlungs-Intensität (RFU) in eine bestimmte DNA-Konzentration übertragen zu können, dient eine Standard-Verdünnungsreihe aus λ-Phagen-DNA (Invitrogen, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) als Bezugsgröße. Auch hier muss vor der Messung das Gerät mit dem Puffer, in welchem die Proben gelöst sind, kalibriert werden. Der Fluoreszenzfarbstoff PicoGreen wird im Vorfeld der Messung im Verhältnis 1:1 in TE-Puffer verdünnt. Anschließend werden 5 µl der Probe mit 5 µl Picogreen vermischt, kurz abzentrifugiert und 4 min. lichtgeschützt inkubiert. Nach

dieser Inkubationszeit werden 5 mal jeweils 2 µl direkt aufeinanderfolgend gemessen. Mit dem NanoDrop 3300 sind Konzentrationen von 1 bis 1500 ng/ml quantifizierbar.

#### 4.3.2 PCR und quantitative real time PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifikation geringer Mengen an Matrizen-DNA (z.B. aus Bakterien oder Viren). Dabei synthetisiert eine thermostabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase in vitro spezifisch neue komplementäre DNA-Fragmente mit definierter Länge abhängig von der vorhandenen DNA-Matrize. Ein synthetisch hergestelltes Oligonukleotid bekannter Sequenz (Primer) dient als Startpunkt für die Synthese des komplementären Stranges. Je nach Wahl dieses Primers können so spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden.

Die drei Teilschritte der PCR (Denaturierung, Anlagerung und Elongation) sind jeweils von variabler Dauer und Temperatur und werden in einer unterschiedlich hohen Anzahl an Zyklen wiederholt. So verdoppelt sich durch jeden Zyklus die durch die Primer eingerahmten DNA-Fragmente, welche wiederum im nächsten Zyklus als Matrize dienen. Die DNA wird also theoretisch exponentiell nach der Formel  $2^n$  vermehrt, wobei  $n$  die Zyklenzahl darstellt. Praktisch wird die Kettenreaktion allerdings durch verschiedene Faktoren limitiert, weshalb die initiale exponentielle Phase in eine lineare Phase übergeht und schlussendlich ein Plateau erreicht.

Die quantitative real time PCR basiert auf dem gleichen Grundprinzip der PCR. Hierbei erlaubt allerdings die Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoffes oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation nach jedem Zyklus. Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung finden also in einem Schritt statt. Die Messung der Fluoreszenz-Intensität erfolgt immer am Ende der Elongations-Phase, jedoch nur in der exponentiellen Phase, um eine korrekte Quantifizierung ohne Störfaktoren zu gewährleisten. Die Fluoreszenz-Intensität verhält sich dabei proportional zur amplifizierten Menge an DNA.

Positivkontrollen erlauben die Kalibrierung eines Schwellenwerts („Threshold“, kurz „Cq-Wert“), welcher der Hintergrund-Fluoreszenz entspricht. Sobald das Fluoreszenzsignal diese signifikant übersteigt, wird der zugehörige Zyklus positiv und als Quantifizierungszyklus gewertet. Gleichzeitig markiert dieser Cq-Wert den Anfang der exponentiellen Phase einer qPCR.

## L1PA2-qPCR in Plasma

Die Methode der L1PA2-qPCR wurde von Frau Dr. Sarah Breitbach et al. übernommen (15). Der Vorteil der etablierten Methode besteht darin, sowohl isolierte DNA als auch verdünntes Plasma als Template benutzen zu können. Durch Verwendung von verdünntem Plasma kann der Verlust von DNA durch die Aufreinigung der Blutproben minimiert werden.

Alle Arbeitsschritte der qPCR wurden unter der PCR-Arbeitsbank (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) durchgeführt.

Grundlegend wurde pro Ansatz das Template mit einem Primer-Mix sowie einem Master-Mix vermischt. Alle Ansätze wurden in Triplikaten gemessen.

Der verwendete Primer-Mix beinhaltet einen Forward-Primer, der komplementär an ein Amplikon der Länge von 90 bp des L1PA2-Repeats bindet, sowie ein Reverse-Primer, der an Amplikons von 90 bp Länge derselben Sequenz bindet. Alternativ kann mit einem Reverse-Primer der Länge 222 bp ein dementsprechend längeres Fragment amplifiziert werden. Da beide Amplikons des L1PA2-Repeats über 3000-fach im menschlichen Genom vorkommen wird gewährleistet, dass auch geringe Mengen an DNA-Template sicher amplifiziert werden können. Außerdem können aus dem Konzentrations-Verhältnis zwischen den 90 bp-/222 bp-Amplifikaten Rückschlüsse auf die Integrität der DNA gezogen werden.

### Primer-Mix (2,1 µM):

383,2 µl H<sub>2</sub>O

8,4 µl Primer Forward (100 µM)

8,4 µl Primer Reverse (100 µM)

Finale Konzentration in PCR = 140 nM

Der Master-Mix beinhaltet eine Polymerase, freie Nukleotide (Desoxynucleosidtriphosphate, dNTPs), den Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) und einen Puffer (HiFi Puffer). Bei der verwendeten Taq-Polymerase handelte es sich um eine Velocity-Polymerase (Velocity Polymerase, Biorline, Luckenwalde, Germany), welche in einer hohen Geschwindigkeit von 1 kb pro 10 sec. DNA-Stränge replizieren kann. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green (Sigma-Aldrich Co., Taufkirchen, Germany) interkaliert spezifisch mit doppelsträngiger DNA. Durch die Bindung erfolgt ein Anstieg der Fluoreszenz-Intensität.



Master-Mix (for 1 ml Volume):

25 µl VELOCITY DNA-Polymerase (2U/µl) (Bioline GmbH, Luckenwalde)

37,5 µl 10 mM dNTPs (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe)

300 µl 5x HiFi Puffer (Bioline GmbH, Luckenwalde)

18,75 µl 10x SYBR Green (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

13,02 µl 1 µM FITC (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

605,73 µl H<sub>2</sub>O, steril (Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt)

Als Template wurde in dieser Arbeit isolierte DNA und Plasma verwendet. Diese wurden im Verhältnis 1:10 in Wasser verdünnt.

Template:

2 µl Plasma/isolierte DNA

18 µl H<sub>2</sub>O.

Pro Probenansatz wurde nun Master-Mix und Primer-Mix im Verhältnis von 12 µl zu 1 µl vermischt. Dieser finale Primer-Master-Mix wurde jeweils mit 14,3 µl vorgelegt. Diesem wurden 2,2 µl des verdünnten Plasmas als Template hinzugefügt, was final einem totalen Volumen von 16,5 µl entsprach. Dieses wurde anschließend in Triplikaten von jeweils 5 µl auf eine 384-Well-qPCR-Platte geladen.

Finaler Messansatz:

12,5 µl Master-Mix

1 µl Primer-Mix

2,2 µl Template

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well (5 µl)</b>	<b>Finale Konzentration in PCR</b>
HiFi-Puffer (5x)	1,17 µl	1,2x
dNTPs (10 mM)	0,15 µl	0,3 mM
FITC (1 µM)	0,05 µl	0,001 µM
SYBR Green (10x)	0,07 µl	0,15x
VELOCITY DNA Polymerase (2U/µl)	0,098 µl	0,04 U/µl
H <sub>2</sub> O	2,4 µl	
L1PA2-Primer-Mix (Forward-/Reverse-Primer je 100 µM)	0,33 µl	140 nm
Template	0,73 µl	

Tabelle 12: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien im Ansatz der L1PA2-qPCR

Jede Platte wurde zusätzlich mit je zwei Negativkontrollen (H<sub>2</sub>O pur sowie Mausplasma 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt) und zwei Positivkontrollen bestückt. Bei den Positivkontrollen handelte es sich um venöses Plasma eines Probanden vor und nach Durchführung eines Stufenbelastungstest, welches ebenfalls 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt wurde.

Nach vollständiger Beladung der Platte wurde diese mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen und bei 22 °C für 2 min. bei 1500 xg zentrifugiert.

Alle qPCRs wurden auf einem Bio-Rad CFX384 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<b>Zyklen</b>	<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer</b>	<b>Temperatur</b>
1	Aktivierung	120 sec.	98 °C
	Denaturierung	10 sec.	94 °C
35	Anlagerung	40 sec.	64 °C
	Elongation	10 sec.	75 °C
51	Schmelzkurve mit je 0,5°C Inkrement	10 sec.	70-95 °C

Tabelle 13: Protokoll des Thermozyklers für L1PA2-qPCR

Die Auswertung der qPCRs erfolgte mit dem Bio-Rad CFX-Manger V.3.1 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Aus den C<sub>q</sub>-Werten eines Triplikats,

welcher der gleichen Probe zugehörig waren wurde der Mittelwert gebildet. Eine Standardabweichung von bis zu 0,4 Cq wurde toleriert, bei einer höheren Standardabweichung erfolgte die Wiederholung der Messung.

Um schlussendlich aus den Cq-Werten die absolute Menge der initial in der Probe enthaltenen DNA zu ermitteln, bediente man sich einer zuvor etablierten Standardkurve. Hierfür wurde seriell eine definierte Menge an L1PA2-Kopien von 106 - 78 Kopien/ $\mu$ l benutzt. Diese wurden in TE-Puffer verdünnt und mit Mausplasma versetzt, um die Standardkurve auf Basis eines Plasmahintergrunds zu erstellen.

#### 4.4 Amplifikationsunabhängige Direkt-Fluorometrie (ADF)

Auf Basis bzw. mit Hilfe der zuvor dargelegten Möglichkeiten Blut aufzubereiten und dessen DNA-Gehalt zu untersuchen, etablierten wir eine vereinfachte Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren auf Basis der Fluorospektroskopie. Statt der sonst notwendigen Isolation bzw. Extraktion und Amplifikation der Nukleinsäuren wird die Menge an enthaltenem genetischem Material direkt im humanen Plasma gemessen. Die Stärke dieser Methode besteht vor allem in einem geringeren Arbeitsaufwand und dadurch schnelleren Ergebnissen. Gerade für Krankheitsbilder, bei denen eine möglichst schnelle Diagnostik und unmittelbarer Therapiebeginn lebensentscheidend sein kann (bspw. Sepsis) kann dies von enormem Nutzen sein. Diese Vorteile, kombiniert mit den gleichermaßen geringeren Materialkosten sind Voraussetzungen einer möglichen routinemäßigen Anwendung im klinischen Alltag. Als Nachteile stellte sich eine verminderte absolute Sensitivität aufgrund starker individueller Varianzen heraus.

#### Etablierung Standardkurve

Als Template der Standardkurve wurde gepooltes Plasma verwendet. Dieses stellte sich in gleichen Anteilen aus Plasma der Probandengruppe zusammen. Das gepoolte Plasma liegt durch Zugabe von sterilem Wasser (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) und der folgenden Reagenzien final in einer Dilution von 1:10 vor. Das genetische Material dieses Plasma-Pools wurde anschließend enzymatisch durch Zugabe der DNase I und zugehörigen Inkubationspuffer (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen) verdaut. Das Ziel hierin besteht einen Plasma-Hintergrund zu

erhalten, der frei von jeglichem genetischen Material ist. Der Verdau erfolgte über eine Dauer von 60 min. bei einer Temperatur von 37 °C. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Proteinase K (Qiagen GmbH, Hilden) hinzugegeben. Dies geschieht zum einen, um die noch aktive DNase I zu inaktivieren. Zum anderen erzielt man damit die Proteolyse der sonstigen Plasmabestandteile, um Varianzen und Interferenzen mit DNA und Farbstoff zu minimieren. Der Pooling-Ansatz mit Proteinase K inkubierte für 45 min. bei 40 °C. Anschließend wurde auf die Basis des Protein- und DNA-freien Pooling-Plasmas Standards genomischer DNA pipettiert. Diese DNA-Standards wurden zuvor durch Phenol-Chloroform-Extraktion aus Blutplasma isoliert. Die Konzentration der Standards wurden durch Anwendung des NanoDrop 3300 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) spektroskopisch überprüft und in die Berechnung aufgenommen. Zuletzt erfolgt die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen).

Entsprechend setzten sich die Volumina der verschiedenen Reagenzien, Standardplasma und DNA-Standards wie in der folgenden Tabelle aufgelistet zusammen und resultierten in den angegebenen Konzentrationen:

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well (25 µl)</b>	<b>Konzentration in Well (25 µl)</b>
Plasma/Template	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O	11,8 µl	
DNase I (10 U/µl)	0,18 µl	0,08 U/µl
DNase I - Inkubationspuffer (10x)	1,82 µl	0,8x
Proteinase K (20 mg/ml)	2,2 µl	1,76 mg/ml
DNA - Standard	2,0 µl	
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 14: Zusammensetzung und finale Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe für die AD-Fluorometrie

Zu beachten gilt, dass die Konzentration von Plasma und isolierter DNA auf das Verdünnungsverhältnis genormt wurde, da diese durch das Gesamtvolumen variierte. Die Konzentrationen von DNase I und Proteinase wurden unabhängig des Gesamtvolumens beibehalten, da diese sich entsprechend ihrer Funktion auf den absoluten Gehalt an DNA bzw. Protein bezieht.

### Ansatz nativer Plasmaproben

Nach Anwendung des unter Abschnitt 4.2 beschriebenen Zentrifugation-Protokolls wurde das Blutplasma mit sterilem H<sub>2</sub>O (Gibco®, Life Technologies GmbH, Darmstadt) und Proteinase K (Qiagen GmbH, Hilden) im Verhältnis von 1:10 verdünnt. Anschließend erfolgte durch Inkubation bei 40 °C für 45 min. der enzymatische Protein-Verdau, um die individuellen Varianzen des Protein-Anteils im Plasmahintergrund der verschiedenen Plasma-Proben zu ebnen und gleichermaßen die Ergebnisse mit der zuvor etablierten Standardkurve evaluieren zu können. Nach Inkubation erfolgte die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen). Anschließend wurden Triplikate von jeweils 25 µl des finalen Ansatzes auf eine 96-Well-Platte (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) pipettiert.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well (25 µl)</b>	<b>Konzentration in Well (25 µl)</b>
Plasma/Template	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O	15,8 µl	
Proteinase K (20 mg/ml)	2,2 µl	1,92 mg/ml
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 15: Zusammensetzung und finale Konzentration der Reagenzien von Plasmaproben für die AD-Fluorometrie

### Quantifizierung und Berechnung der cfDNA-Konzentration

Die fertigen Ansätze von Standardreihe und Plasmaproben wurden anschließend in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA).

Nach vollständiger Beladung der Platte wurde diese mit einer Klebefolie luftdicht verschlossen und bei 22 °C für 2 min. bei 1500 g zentrifugiert. Die fluorometrische Messung wurde für alle Platten auf einem iQ5 Multicolor Real Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt. Dabei wurde eine Schmelzkurve von 30-65 °C mit graduellem Temperatur-Anstieg um 1 °C pro 30 sec. angewendet. Im gleichen Zeitintervall erfolgten Messungen der absoluten Strahlungsintensität RFU („relative fluorescence units“).

Die Erfassung dieser Messwerte erfolgte mit Bio-Rad iQ™5 Optical System Software V2.1 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

Die Prüfung der Standardabweichung innerhalb der Triplikate wurde anhand des Mittelwertes der RFU aus diesem Triplikat gebildet. Bei einer prozentualen Standardabweichung größer als 10 % in Relation zum absoluten RFU-Mittelwert des Triplikats wurde das Ergebnis verworfen und es erfolgte eine Wiederholungsmessung der betroffenen Probe. Dies galt sowohl für die Standardreihe als auch für die nativen Plasmaproben.

Anhand der ermittelten Strahlungsintensitäten der Standardproben und deren zuvor spektroskopisch validierten DNA-Konzentration wurde eine Standardkurve ermittelt. Anhand der mathematischen Funktion dieser konnte die Konzentration der in den Plasmaproben enthaltenen genetischen Materials errechnet werden. Hierbei wurde als absolute Einheit „ng cfDNA pro Well“ verwendet und anschließend relativ in die Konzentration von ng/ml umgerechnet.

#### 4.5 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mithilfe der Software SPSS Statistics 25 für Windows (IBM Corporation, 2015, Ehningen) statistisch ausgewertet und graphisch dargestellt.

Festgelegt wurde das statistische Signifikanzniveau auf  $\alpha = 0,05$ , womit p-Werte  $< 0,05$  als statistisch signifikant gelten.

Vor Anwendung statistischer Tests wurde eine Überprüfung auf Normalverteilung nach Shapiro-Wilk durchgeführt, wonach sich entschied, welcher Test für die vorliegenden Daten verwendet wurde. Waren die Werte normalverteilt, kam der t-Test zur Überprüfung der Signifikanz zum Einsatz. Lag keine Normalverteilung vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Im Falle des Vergleichs von mehr als zwei Gruppen ohne Normalverteilung wurde sich des Kruskal-Wallis-Tests bedient. Um zwei bzw. mehrere Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten zu vergleichen, wurde eine ein- bzw. mehrfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt.

Bei etwaigen Stichproben von zu geringer Größe wurden statistische Tests und deren Signifikanz, wenn möglich, mithilfe der Bonferroni-Korrektur angepasst. In solchen Fällen wurde diese Exakte Signifikanz direkt als normale Signifikanz ausgegeben und nicht gesondert markiert.

## 5 ERGEBNISSE

In diesem Kapitel sollen primär Arbeitsschritte und Ergebnisse auf dem Weg zur Etablierung einer rein fluorospektroskopischen Methode zur absoluten und relativen Quantifizierung zellfreier DNA direkt aus Plasma dargelegt werden. Anschließend soll diese Methode in einer Pilotstudie anhand der Plasmaproben von Patienten (s. 4.1), die sich einer operativen Resektion von Kolorektaltumoren unterzogen hatten, angewendet und mit der aktuellen Standard-Methode zur Quantifizierung zellfreier DNA verglichen werden.

### 5.1 Etablierung der amplifikationsunabhängigen Direkt-Fluorometrie (ADF)

Ein Teilziel dieser Arbeit bestand darin, eine absolute und relative Messmethode für cfDNA zu etablieren. Dabei sollte sowohl auf eine Isolation/Extraktion als auch auf eine Amplifikation verzichtet werden. Plasma als Template zeigt allerdings durch dessen sonstige Bestandteile allein schon höheres Potenzial für Kontaminationen, Inhibitoren und individuelle Einflussfaktoren. Gleichzeitig kommt erschwerend hinzu, dass sich die freien Nukleinsäuren hinsichtlich ihrer Fluoreszenz durch die ausgelassene Amplifikation nur in einem stark geringeren Anteil in Relation zu der sonstigen Plasma-Eigenfluoreszenz präsentieren können. Um diese Probleme anzugehen, wurden unterschiedliche Variablen wie Dilution, Puffer-Lösung, enzymatische Prozesse und Temperatur im Messverfahren variiert, um eine sensitive Quantifizierung gewährleisten zu können.

Die dafür initial angewendeten motivatorischen Studien bzw. Etablierungsschritte dienten der Ermittlung von Trends und Hypothesen. Daher werden die Ergebnisse in diesem Kapitel nur in gekürzter Form behandelt, für genauere Ausführungen wird auf den Anhang verwiesen (s. Anhang 9.2).

Die Auswertung der ersten Versuchsreihen ohne Plasma-Aufreinigung in diesem Kapitel erfolgte anhand der gemessenen rohen Strahlungsintensität (RFU). Da initial keine adäquate Standardkurve ermittelt werden konnte, war anhand dieser Rohdaten keine Quantifizierung der Konzentration oder absoluter Menge an DNA der Proben möglich. Um dennoch die Ergebnisse der ersten Etablierungsschritte evaluieren zu können, wurden die Messwerte der unter 4.3.3.1 beschriebenen L1PA2-qPCR der gleichen Proben als Referenzwerte herangezogen. Insgesamt entsprach die statistische Auswertung und Interpretation aufgrund kleiner Stichproben nicht strengen

statistischen Vorgaben, sondern fungierte eher als richtungsweisende Tendenz für die nächsten Etablierungsschritte und werden in diesem Kapitel nicht explizit angegeben.

Als Untersuchungsmaterial dienten Plasmaproben von Kontrollprobanden und Tumorpatienten der Fahrradergometer-Belastungsstudie von Dr. Ehlert (s. 4.1). Als Fluoreszenzfarbstoff wurde primär SYBR Green 1 (SG1) verwendet, da sich dessen fluorometrische Spezifität stärker mit den Eigenschaften zellfreier DNA deckt als andere verwandte Fluorochrome (s. 2.4.2).

Die fluorometrische Messung dieser Vorversuche erfolgte bei konstanter Temperatur von 30 °C über einen Zeitraum von 20 min. Die dadurch erhaltenen Rohwerte der Strahlungsintensität (RFU) wurden mittels Subtraktion des Hintergrunds, also Referenzproben ohne Nukleinsäure-Isolaten, Enzymen oder Plasma und dementsprechend bestehend aus Dilutionsmittel und Fluoreszenzfarbstoff, kalibriert. Als Negativkontrolle diente Wasser in äquivalentem Probenvolumen.

Primär sollte ein Schema zur optimalen Dilution des Plasmas in einer geeigneten Pufferlösung ermittelt werden. Das Ziel bestand darin eine ausreichende Menge an zellfreier DNA im Ansatz als auch gleichermaßen eine möglichst geringe Interferenz durch andere Plasmabestandteile zu gewährleisten. Dabei zeigte sich die Dilution des zu untersuchenden Plasmas im Verhältnis von 1:10 in H<sub>2</sub>O als Puffer im Vergleich zu anderen Konzentrationen und Pufferlösungen überlegen (s. Anhang 9.2.1). Dies begründete sich vor allem durch die im Vergleich stärkste Signifikanz ( $r = 0,571$ ,  $p = 0,26$ ,  $n = 15$ ) zu qPCR-Daten im Vergleich zu anderen Konzentrationen und Pufferlösungen (TE, PBS).

Auch für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green 1 zeigte sich die Dilution in H<sub>2</sub>O vorteilhaft (s. Anhang 9.2.19.2). Im Vergleich zu anderen Pufferlösungen erbrachte dies die stärkste Korrelation mit den Messwerten der qPCR ( $r = 0,597$ ,  $p=0,019$ ,  $n = 15$ ). Der Dilutionsfaktor für SYBR Green 1 entsprach hierbei Herstellerangaben, was einer einfachen Konzentration im Ansatz entsprach.

Es zeigte sich im Laufe der bisherigen Messungen, dass die Strahlungsintensität der bisher entwickelten Messmethodik bzgl. der Relationen zwischen höher bzw. niedrig konzentrierten Proben nicht den Relationen der qPCR entsprach. Als Grund dieses Problems wurde zum größten Teil der prominente Plasmahintergrund verantwortlich gemacht, vor dessen eigener Strahlungsintensität/Hintergrundrauschen das



Intensitätssignal des an doppelsträngige cfDNA gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes die unterschiedlichen Konzentrationen nicht adäquat abbilden konnte. Um dieses Problem anzugehen, wurde durch eine höhere Konzentrierung (zweifach, vierfach) des Fluoreszenzfarbstoffes versucht die Strahlungsintensität der im Plasma befindlichen Nukleinsäuren weiter zu stärken und deren Signal weiter vom Plasmahintergrund abzuheben.

Bis auf eine in Relation zu der verwendeten höheren SG1-Konzentration äquivalent verstärkten Strahlungsintensität konnte in der praktischen Umsetzung dieser Überlegung jedoch keine genauere Darstellung der cfDNA-Konzentrationen erreicht werden.

Da wiederholt Schwierigkeiten auftraten Messungen der Proben bei Raumtemperatur zu reproduzieren und damit vergleichen zu können, wurde anschließend ein gradueller Erhitzungsprozess durchgeführt. Damit sollte eine optimale Temperatur ermittelt werden, die eine stärkere Interkalation zwischen Fluorochrom und DNA ermöglichen und damit die zuvor genannten Varianzen ebnen könnte. Diese Schmelzkurvenanalyse erfolgte in der Spannweite von 40-65 °C mit jeweils einer Messung der Strahlungsintensität sowie dessen Änderung  $-d(\text{RFU})/dT$  nach jeder Temperatursteigerung. So konnten eventuelle Einflüsse der Temperatur auf die Nukleinsäuren selbst, deren Bindung an SG1 und den Plasmahintergrund evaluiert werden. Hier zeigte sich eine stärkere Korrelation zu den mittels qPCR ermittelten Werten im Temperaturfeld von ca. 50-55 °C und der besten Korrelation bei 54 °C ( $r = 0,714$ ,  $p = 0,003$ ,  $n = 15$ ). Eine Fluorometrie unter dieser konstanten Temperatur ohne graduelle Temperatursteigerung erbrachte interessanterweise keine gleichwertige Korrelation ( $r = 0,652$ ,  $p = 0,008$ ,  $n = 15$ , s. Anhang 9.2.2).

Im Weiteren konnte ein konstanter Abfall der Strahlungsintensität (negative Änderung) über die Dauer der Inkubation bzw. über die Schmelzkurve beobachtet werden. Diese negative Ableitung  $d(\text{RFU})/dT$  zeigte im Bereich von 47-54 °C abrupt eine positive Änderung entsprechend einem Anstieg der Strahlungsintensität. Diese gipfelte ebendort bei 50 °C (s. Abbildung 1).

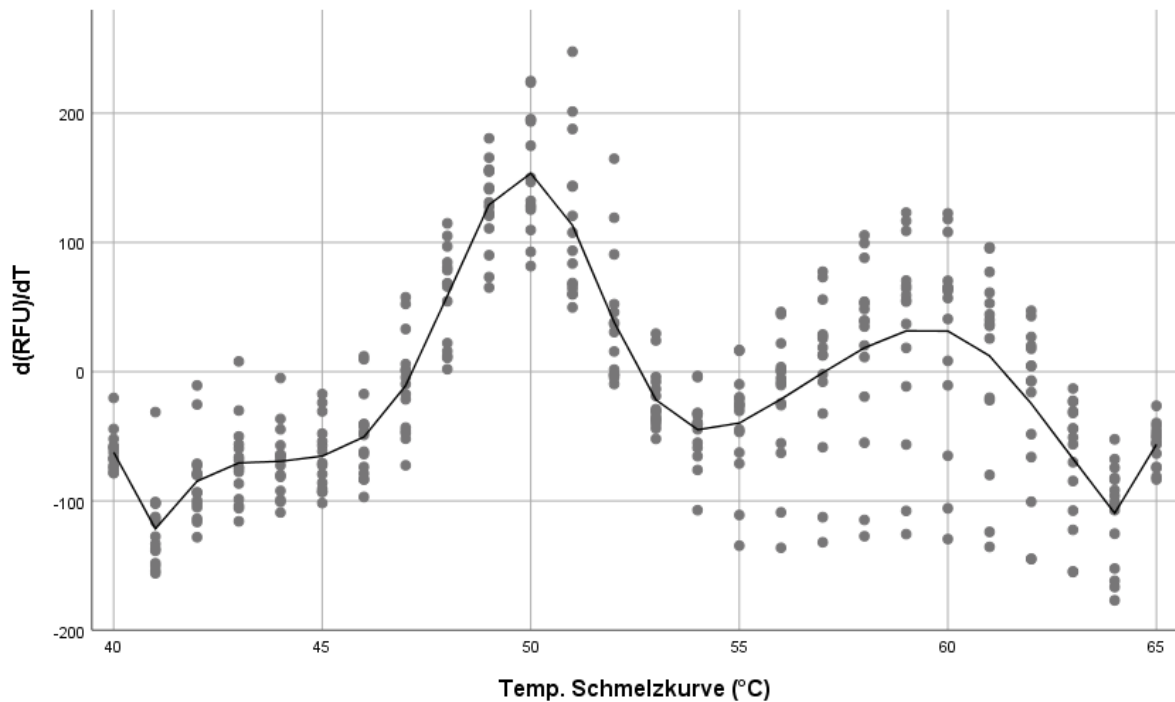


Abbildung 1: Temperaturabhängige Änderung der Strahlungsintensität entlang einer Schmelzkurve 40-65 °C

Weiter zeigte sich eine signifikante Korrelation dieser Maxima der RFU-Änderung ( $d(\text{RFU})/dT$ ) und den mittels L1PA2-qPCR ermittelten cfDNA-Konzentrationen. ( $r = 0,777$ ,  $p = 0,001$ ,  $n = 15$ ) (s. Anhang 9.2.2). Unter der Annahme, dass an diesem Temperaturpunkt der ausschlaggebende Anteil zellfreier DNA durch Dissoziation detektiert wird, wurde für die weiteren Versuche die fluorometrische Messung unter dem zuvor dargelegten Schmelzkurven-Protokoll belassen und Messwerte im Bereich von 50-55 °C verwendet.

Speziell für die starken interindividuellen Varianzen, die durch Belastung nochmals verstärkt wurden, könnten zudem variable Konzentrationen an Ribonukleinsäuren (RNA) eine Erklärung darstellen. SG1 soll nach Herstellerangaben (Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt) selbst unempfindlich gegen physiologische RNA-Konzentrationen sein. Dies sollte mittels einer Messreihe isolierter RNA validiert werden. Dabei wurden sowohl Standards benutzt, die den physiologischen RNA-Konzentrationen entsprachen, als auch Standards, die diese bis zum Faktor 160 überstiegen. Letztere dienten vor allem zur Veranschaulichung, ab welcher Konzentration SG1 in Abwesenheit von DNA unselektiv an andere Nukleinsäuren im Plasma binden könnte. Die Ausgangskonzentration des RNA-Isolats wurde mittels NanoDrop 1000 bestimmt und entsprechend der benötigten Standard-Konzentration in H<sub>2</sub>O diluiert. Hierbei ließ sich mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse ( $F = 1,175$ ,  $p = 0,328$ ,  $n = 58$ ) selbst für unphysiologisch hohe RNA-Konzentrationen von

100 ng/ml bis 400 ng/ml (100 ng/ml (M. = 13452,7, SD. = 1237,5), 200 ng/ml (M. = 13641,6, SD. = 1448,7), 400 ng/ml (M. = 14073,04, SD. = 1542,44)) keine signifikante Differenz zur Negativkontrolle (M. = 14330,5, SD. = 1271,3) feststellen (s. Anhang 9.2.3).

Der bis zu diesem Zeitpunkt der Etablierung entwickelte Ansatz der Plasmaproben stellte sich wie in der folgenden Tabelle (s. Tabelle 16) zusammen. Diese erläutert die Zusammensetzung des Ansatzes, der final in ein Well der Mikrotiterplatte eingesetzt wird, und die Konzentration der darin enthaltenen Reagenzien. Diese Übersichtstabelle wird für die weitere Darstellung des Etablierungsprozesses beibehalten und entsprechend angepasst.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well (25 µl)</b>	<b>Konzentration in Well (25 µl)</b>
Template (Plasma)	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O (Dilution)	18 µl	
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 16: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien von Plasmaproben im Etablierungsprozess der AD-Fluorometrie (1)

### 5.1.1 Etablierung der Standardreihe

Bis zu diesem Schritt der Etablierung hatten nur Messungen des Nukleinsäure-Gehalts anhand der absoluten Strahlungsintensität in den zu untersuchenden Proben stattgefunden. Um diese quantifizieren zu können und damit auch mit verwandter Methodik vergleichbar zu machen, sollten Referenzwerte in Form von Standardreihen ermittelt werden.

Als Referenz-DNA für diese Standardreihen wurden initial Isolate genomischer DNA (IgDNA), im späteren Verlauf Isolate zellfreier DNA (IcfDNA), verwendet. Diese waren zuvor mittels Phenol-Chloroform-Isolation aus Plasma extrahiert worden (s. 4.2.2). Die Ursprungskonzentrationen dieser Isolate wurden mithilfe des NanoDrop 1000 gemessen. Die Konzentrationen der Standardproben, die aus diesen Isolaten mittels Dilution hergestellt waren, wurden anschließend nochmals durch NanoDrop 3300 sowie L1PA2-qPCR überprüft.

Um vorab die Sensitivität von SG1 für diese DNA-Isolate verschiedener Konzentrationsgrößen zu testen, wurden drei Standardreihen in Wasser statt Plasma durchgeführt. Diese Standardreihen deckten Spannweiten geringerer Konzentrationen (1,25-40 ng/ml), höherer Konzentrationen (20-320 ng/ml) als auch eine Kombination der zuvor genannten (0,625-320 ng/ml) ab. Die Zusammensetzung der Standardproben sind hiernach folgend tabellarisch (s. Tabelle 17) aufgelistet. Das bisher etablierte Messverfahren mittels Schmelzkurve und Ermittlung der Werte bei 50-55 °C wurde für die komplette Etablierung der Standardkurve beibehalten.

Reagenz	Volumen pro Well (25 µl)	Konzentration in Well (25 µl)
gDNA-Isolat	1,0 µl	0,04x
H <sub>2</sub> O	21 µl	
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 17: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe in Wasser im Etablierungs-Prozess der AD-Fluorometrie

Der Strahlungswert einer Negativkontrolle (NTC) wurde als Referenzwert einer Konzentration von 0 ng/ml festgelegt. Dieser wurde mit den anderen Messwerten verrechnet.

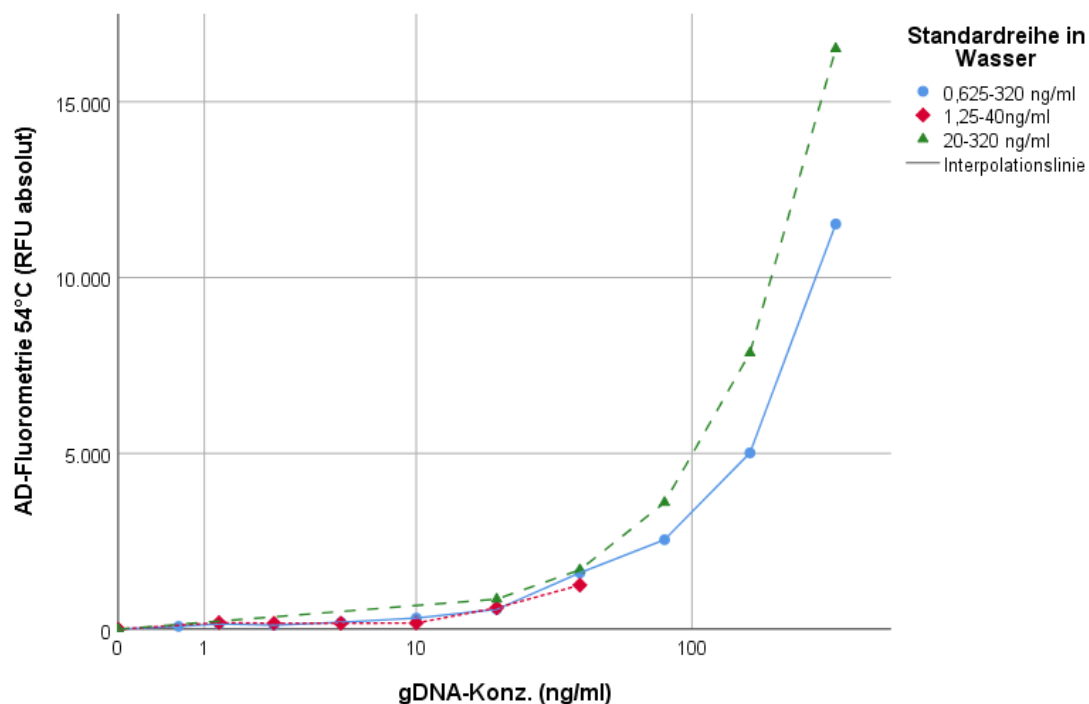


Abbildung 2: Direktfluorometrische Messung von Standardreihen in Wasser

Zur besseren Veranschaulichung der graphischen Ergebnispräsentation wurde entsprechend der numerischen Abfolge der Standardreihe primär eine logarithmische Darstellung gewählt.

Es ergaben sich signifikante Korrelationen für jede dieser Standardreihen in Bezug auf die errechneten Konzentrationen genomischer DNA im Analysat: 0,625-320 ng/ml ( $r = 0,998$ ,  $p = 0,09 \cdot 10^{-10}$ ,  $n = 11$ ), 1,25-40 ng/ml ( $r = 0,980$ ,  $p = 0,01 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 7$ ), 20-320 ng/ml ( $r = 0,999$ ,  $p = 0,05 \cdot 10^{-5}$ ,  $n = 6$ ). Bei Fokus auf den Konzentrationsbereich kleiner 20 ng/ml wies die Standardreihe 0,625-320 ng/ml einen Korrelationskoeffizienten  $r = 0,941$  und Signifikanz  $p = 0,005$  bei  $n = 6$  auf, die Standardreihe 1,25-40 ng/ml korrelierte nicht mehr signifikant ( $r = 0,504$ ,  $p = 0,387$ ,  $n = 5$ ). Entsprechend der folgenden Grafik (s. Abbildung 3) war speziell im Konzentrationsbereich von 0-10 ng/ml eine Differenzierung der unterschiedlichen Konzentrationen nicht sicher möglich, da sich diese trotz ihrer differenten enthaltenen Konzentrationen hinsichtlich ihrer Strahlungsintensität auf einem ähnlichen Niveau bewegten. Eine Differenzierung dieser Konzentrationen in deren gesamten Mittelwert ( $< 10$  ng/ml;  $M. = 172,5$ ,  $SD: 65,2$ ) gegen den Nukleinsäure-freien Hintergrund bzw. Negativkontrolle war nach Ergebnis eines Mann-Whitney-U-Tests hingegen signifikant ( $U = 18,0$ ,  $p = 0,036$ ).

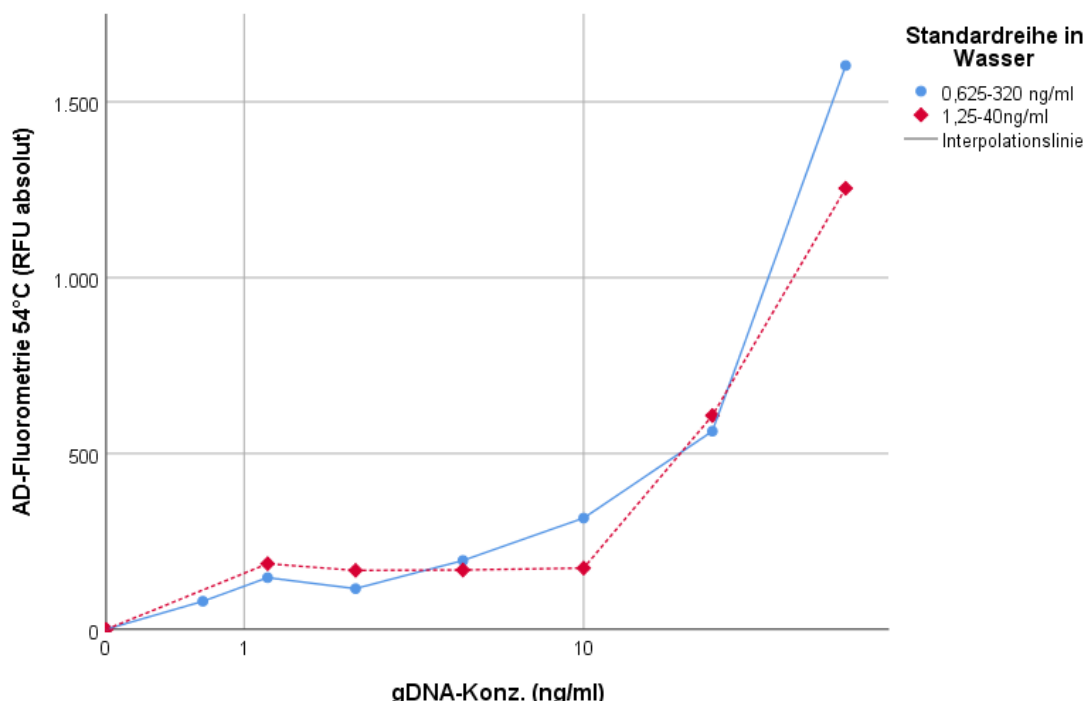


Abbildung 3: Direktfluorometrische Messung von Standardreihen in Wasser (0-40 ng/ml)

Um überhaupt eine Quantifizierung von DNA in Plasma selbst gewährleisten zu können, wurden im nächsten Schritt Standardreihen mit Plasma als Hintergrund hergestellt. Dieses Plasma wurde nativ entsprechend der Messreihen in Kapitel 5.1 im

Verhältnis 1:10 verdünnt. Es beinhaltete also sowohl eigene zellfreie DNA als auch alle sonstigen Plasmabestandteile. Um einen möglichst vielfältigen Plasmahintergrund abzubilden, wurden sowohl Plasmaproben von gesunden Kontrollprobanden (KP) als auch von Patienten mit karzinogenen Erkrankungen (Tumorpatienten, TP) der Fahrradergometer-Belastungsstudie verwendet. Aus jeder dieser Gruppen wurde jeweils eine Probe vor Belastung („prä“; KP3, TP7), eine Probe nach Belastung („post“; KP4, TP5) und eine Probe 90 min. nach Belastung („rest“; KP5, TP6) verwendet. Dabei wurde beachtet, dass diese Plasmaproben gleichzeitig ein möglichst breites Spektrum an enthaltenen cfDNA-Konzentrationen und verschiedene Individuen widerspiegeln. Das Plasma wurde wie bisher mit einer bestimmten Konzentration von Isolaten genomischer DNA verwendet. Hier lag der Fokus auf dem Konzentrationsbereich, der im vorherigen Versuch als Bereich höherer Varianzen/ erschwerter Differenzierbarkeit der Strahlungsintensität in Bezug auf die enthaltenen cfDNA-Konzentrationen ausgemacht wurde. Daher wurden für die Standardreihen der Kontrollprobanden tendenziell geringere Konzentrationen (0,15625-10 ng/ml), für die Standardreihen der Tumorpatienten eher höhere Konzentrationen ausgewählt (0,625-40 ng/ml). Die Standardreihen wurden für beide Fälle in exponentieller Abfolge mit dem Wachstumsfaktor 2 vorgenommen. Die Dilution erfolgte in Wasser. Die Zusammensetzung der Proben stellte sich entsprechend folgender Tabelle (s. Tabelle 18) dar.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well (25 µl)</b>	<b>Konzentration in Well (25 µl)</b>
Plasma	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O (Dilution)	17,0 µl	
gDNA - Isolat	1,0 µl	0,04x
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 18: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe in Nativplasma im Etablierungs-Prozess der AD-Fluorometrie

Die errechneten Werte der Standard-Konzentrationen wurden anhand der qPCR-Daten des nativen Plasmas angepasst, um die im jeweiligen Plasma enthaltene Menge an Nukleinsäuren einzubeziehen. Die dadurch berechnete Konzentration spiegelte die Gesamt-Konzentration an DNA in den Standardproben wider. Als Basiswert bzw. Konzentrationswert des Standards mit 0 ng/ml sollte die RFU des nativen Plasmas verwendet und subtraktiv verrechnet werden. Da sich dieser Wert häufig nicht von

denen geringer DNA-Konzentrationen differenzieren ließ und dadurch negative RFU-Werte resultiert wären, wurde darauf verzichtet. Die Subtraktion der Negativkontrolle wurde weiterhin beibehalten. Da sich diese Konstellation im weiteren Verlauf der Etablierung einer Standardreihe durchweg häufiger präsentierte, wurde diese Variante der Berechnung für diesen Fall beibehalten und wird nicht für jedes Kapitel einzeln erläutert.

Die Standardreihen der Kontrollprobanden korrelierten signifikant mit der errechneten Gesamt-DNA-Konz. ( $r = 0,837$ ,  $p = 0,035 \cdot 10^{-5}$ ,  $n = 24$ ). Auch die Standardreihen der Tumorpatienten korrelierten signifikant mit der errechneten Gesamt-DNA-Konz. ( $r = 0,743$ ;  $p = 0,032 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 24$ ).

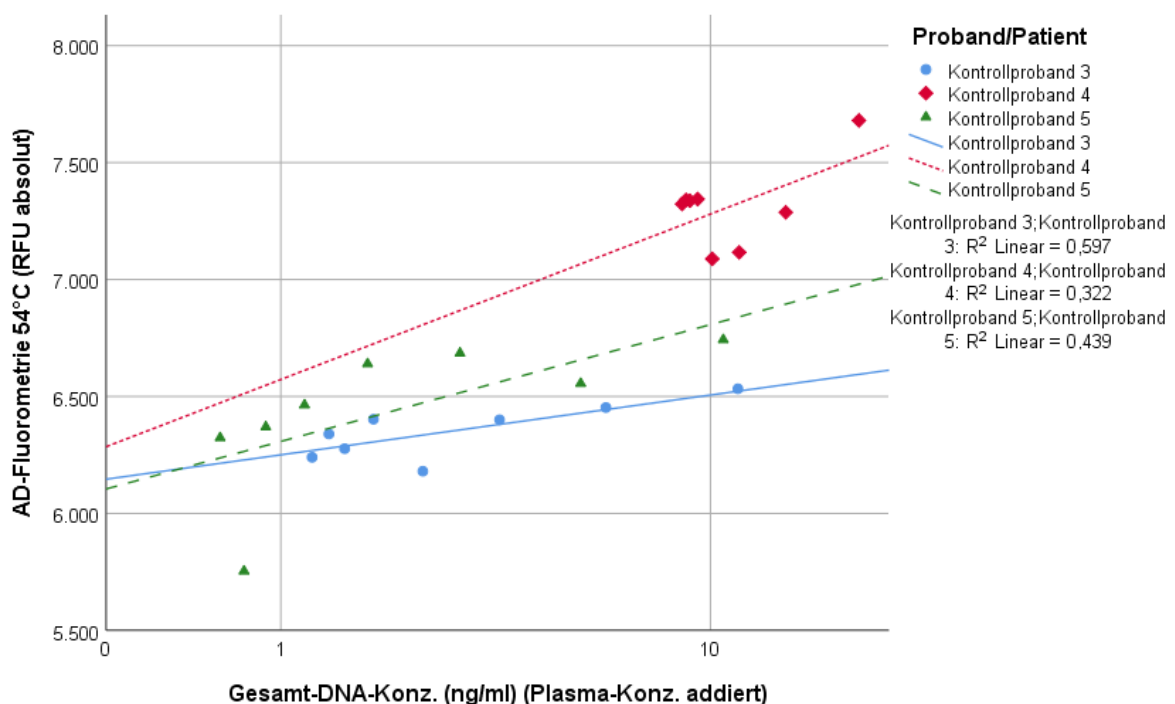


Abbildung 4: Direktfluorometrische Messung von Standardreihen auf Plasma von Kontrollprobanden in einer physikalischen Belastungsstudie

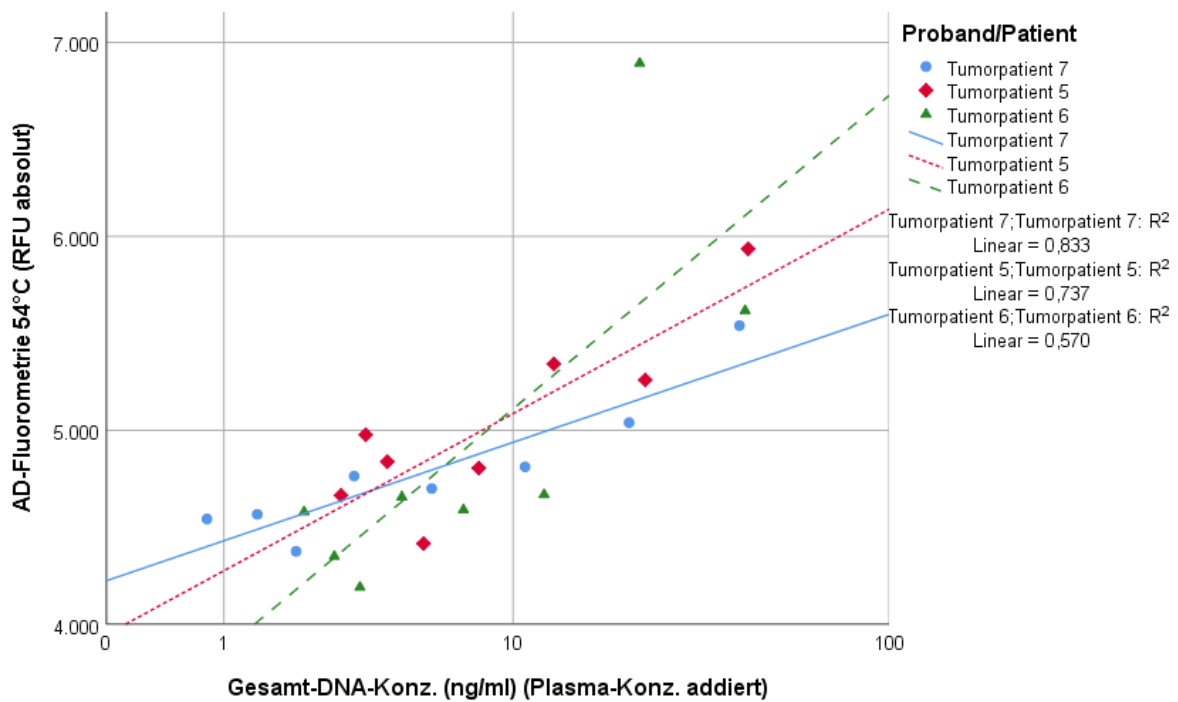


Abbildung 5: Direktfluorometrische Messung von Standardreihen auf Plasma von Tumorpatienten in einer physikalischen Belastungsstudie

Durch Fokus auf die Standardkonzentrationen besonderen Interesses (0,625 - 10ng/ml) zeigte sich, dass die Standardreihen der Kontrollprobanden stärkere Korrelationen sowie höhere Bestimmtheitsmaße (s. Abbildung 4) als die Standardreihen der Tumorpatienten (s. Abbildung 5) aufwiesen. Die Standardreihen der Kontrollprobanden korrelierten weiterhin signifikant mit der Gesamt-DNA-Konz. ( $r = 0,834$ ;  $p = 0,0017 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 18$ ). Die Korrelationen der Standardreihen der Tumorpatienten zeigten sich schlechter, korrelierten dennoch weiterhin signifikant mit der Gesamt-DNA-Konz. ( $r = 0,566$ ;  $p = 0,014$ ,  $n = 0,014$ ). Graphisch zeigte es sich jedoch auch für die Standardreihen in Plasma, dass für Konzentrationen um bzw. geringer als 10 ng/ml eine genaue Differenzierung anhand der etablierten Methode nicht möglich war. Eine genaue statistische Analyse im paarweisen Vergleich war auch für diesen Sachverhalt aufgrund der kleinen Stichprobe nicht ergebnisorientiert durchführbar. Im Vergleich zu Standardreihen in Wasser zeigte sich hier auch rein nach absoluten RFU-Werten häufiger, dass Proben mit geringkonzentrierter DNA-Zugabe eine geringere RFU als Plasma ohne DNA-Zugabe aufwies. Ob das nur ein Artefakt der Messung oder ein aussagekräftiges Ergebnis war, konnte aufgrund der geringen Stichprobengröße nicht geprüft werden.

Gleichzeitig waren die Probenansätze dieser Standardreihen mittels L1PA2-qPCR gemessen, sowie in die Konzentration des verwendeten Templates umgerechnet und statistisch ausgewertet worden. Hierbei ergab sich zwar eine signifikante Korrelation



zu den Ergebnissen der mit der bisher etablierten AD-Fluorometrie gemessenen Standardreihen beider Probandengruppen (Kontrollprobanden:  $r = 0,724$ ,  $p = 0,065 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 24$ ; Tumorpatienten:  $r = 0,754$ ,  $p = 0,021 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 24$ ), jedoch keine lineare Vergleichbarkeit.

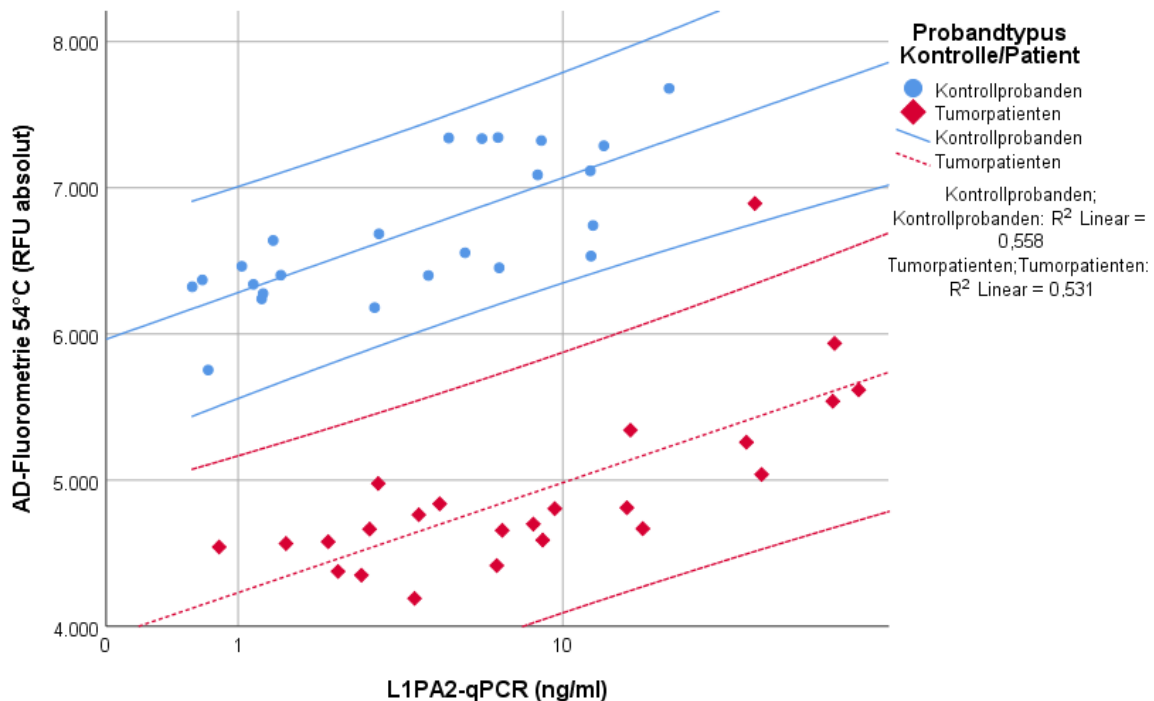


Abbildung 6: Korrelation der Messmethoden AD-Fluorometrie und L1PA2-qPCR anhand Standardreihen in Plasma aufgetrennt nach Probandentypus

Das 95%-Konfidenzintervall (KI) der AD-Fluorometrie, hier entsprechend den Anpassungslinien gekennzeichnet, beträgt bei 54 °C 610 RFU (s. Abbildung 6). Weiter wurde hinsichtlich der RFU-Anstiege in Relation zu im Template enthaltenen DNA-Konz. die Steigungen der Standardreihen in Wasser und in Plasma zueinander verglichen. Dieser Vergleich wurde zum einen für die Standardreihen bis 10 ng/ml ( $H_2O$ :  $M. = 35,8$ ,  $SD. = 5,8$ ; Plasma:  $M. = 35,0$ ,  $SD. = 11,0$ ) als auch betreffend der vollständigen Standardreihen ( $H_2O$ :  $M. = 38,9$ ,  $SD. = 11,7$ ; Plasma:  $M. = 35,0$ ,  $SD. = 10,5$ ) durchgeführt. Für diese Frage wurde ein nicht parametrischer Test unabhängiger Stichproben nach Mann-Whitney verwendet. Hierbei ergab sich sowohl für die Steigungen bis 10 ng/ml ( $U = 7,0$ ,  $p = 0,714$ ) als auch für die Steigungen der kompletten Standardreihen ( $U = 6$ ,  $p = 0,584$ ) keine signifikante Differenz zwischen Wasser oder Plasma als Template.

Um noch spezifischere Referenzwerte zellfreier DNA, die auch gleichzeitig möglichst genau auf Messung in Plasma übertragbar sind, zu generieren und damit auch geringkonzentrierte Proben entsprechend genau quantifizieren zu können sollten

weitere Varianten und Modifikationen von Standardreihen bzw. des Plasmas getestet werden. Die folgende Tabelle (s. Tabelle 19) veranschaulicht mit welchen Methoden versucht wurde dieses Ziel zu erreichen. Die Ergebnisse dieser sollen im weiteren Verlauf dieses Kapitels dargelegt werden.

<b>Ziel</b>	<b>Umsetzung</b>
Reiner Plasmahintergrund als Basis der Standardreihe & Reduktion des Störfaktors sonstiger Plasmabestandteile	Labortechnisch (Ultrazentrifugation & Ultrafiltration)  Enzymatisch (DNase & Proteinase)
Äquivalente Darstellung des genetischen Materials in Plasma	Standards aus Isolaten zellfreier DNA (statt aus Isolaten genomischer DNA)  Standards aus variierend konzentriertem Plasma (nicht-isolierte zellfreie DNA)

Tabelle 19: Zielsetzung und Durchführung zur Aufreinigung von Plasma

#### 5.1.1.1 Plasma-Aufreinigung

Ziel der folgenden Versuchsreihen war es also, die im Plasma vorhandenen Nukleinsäuren von den sonstigen Bestandteilen zu separieren, um einen möglichst reinen Plasmahintergrund zu generieren. Gleichmaßen sollten auch die im Plasma enthaltenen Proteine, die mit dem verwendeten Fluorochrom interagieren oder intrinsisch die Strahlungsintensität verfälschen könnten, reduziert werden. Diese Ziele wurden einmal mit labortechnischer Methodik in Form einer Ultra- Zentrifugation sowie -filtration, als auch enzymatisch mittels DNA-Degradation und Proteolyse verfolgt.

##### 5.1.1.1.1 Ultrazentrifugation und Ultrafiltration

Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 100.000 xg; die Ultrafiltration wurde mit Filtern der Filterstärken 100 kD, 10 kD und 3 kD durchgeführt (siehe 4.2.1.1). Anschließend wurden die dadurch erhaltenen Überstände bzw. Filtrate als Template nach bisherigem Protokoll (s. Tabelle 20) auf deren Strahlungsintensität gemessen und mit einer Negativkontrolle mit Wasser als Template verglichen.

Reagenz	Volumen pro Well (25 µl)	Konzentration in Well (25 µl)
Plasma (Ultrazentr.)/ Plasma (Ultrafiltration)	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O	18 µl	
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 20: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien von Plasmaproben im Etablierungs-Prozess der AD-Fluorometrie (2)

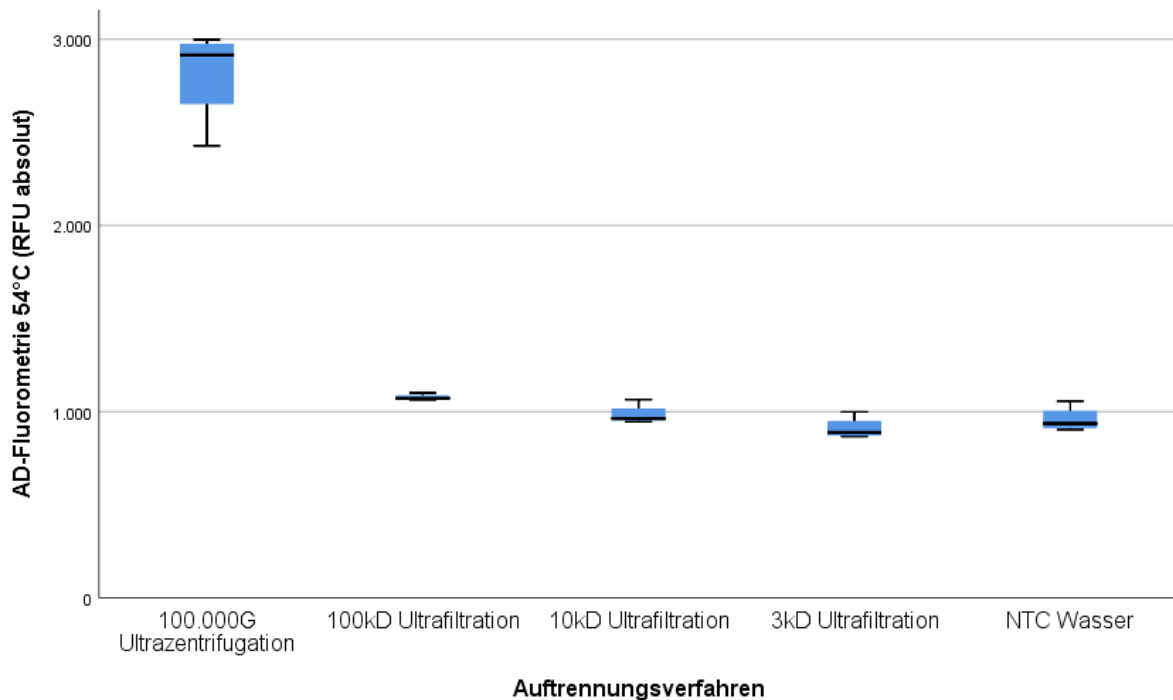


Abbildung 7: Vergleich der direktfl. Strahlungsintensität nach Ultrazentrifugation/-filtration

Gleichzeitig wurde mittels L1PA2-qPCR die nach Zentrifugation bzw. Filtration noch enthaltene DNA-Menge ermittelt. Hier ergab sich für alle vier Auftrennungsverfahren eine Konz. von 0-1 ng/ml, was einer nahezu vollständigen Entfernung genetischen Materials aus dem Plasma entsprach.

Um die Ergebnisse der Separationsverfahren zu vergleichen, wurden diese statistisch nach Kruskal-Wallis-Test bei unabhängigen Stichproben überprüft ( $H = 15,6$ ,  $p = 0,004$ ,  $df = 4$ ). Hierbei ergab sich nur für die Ultrazentrifugation ( $z = 2,8$ ,  $p = 0,05$ ) eine signifikante Differenz zur Negativkontrolle. Für die Variante der Ultrafiltration mit 10 kD ergab sich keine signifikante Differenz zur Negativkontrolle (s. Tabelle 21).

<u>Kruskal-Wallis-Test Paarweise Vergleich</u> <u>„Separationsverfahren“</u>	<b>Standardteststatistik</b> (z)	<b>Signifikanz</b> (p)
NTC Wasser – 10 kD Ultrafiltration	,286	1,000
NTC Wasser - 100.000 g Ultrazentrifugation	3,435	,006
10 kD Ultrafiltration – 100.000 g Ultrazentrifugation	3,063	,022

Tabelle 21: Statistische Auswertung der Separationsverfahren Ultrazentrifugation und Ultrafiltration

Für den Ansatz der Ultrafiltration wurde angenommen, dass sowohl DNA als auch alle sonstigen Plasmabestandteile, die zur Strahlungsintensität beigetragen hatten, nahezu komplett entfernt wurden. Da dies nicht dem Ziel entsprach einen reinen Plasmahintergrund ohne DNA darzustellen wurde dieser experimentelle Ansatz verworfen. Im Falle der Ultrazentrifugation wurde aufgrund der im Vergleich höheren Strahlungsintensität und gleichzeitig fehlenden Nachweises von DNA im Überstand angenommen, dass hierbei genetisches Material von den sonstigen Plasmabestandteilen getrennt worden war. Daher sollte der Überstand als aufgereinigter, „reiner“ Plasmahintergrund evaluiert werden. Dieser Überstand wurde im nächsten Schritt als DNA-freies Plasma behandelt und auf dessen Basis, äquivalent zu Abschnitt 5.1.1 eine Standardreihe mit IgDNA von 2,5-40 ng/ml angesetzt und in Duplikaten nach sonst unverändertem Protokoll (s. Tabelle 22) gemessen. Als Referenzwert von 0 ng/ml gDNA diente das native ultrazentrifugierte Plasma. Die RFU-Mittelwerte der Duplikate korrelierten hierbei signifikant mit der zugesetzten Konz. an IgDNA ( $r = 0,967$ ,  $p = 0,002$ ,  $n = 6$ ).

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well</b> (25 $\mu$ l)	<b>Konzentration in Well</b> (25 $\mu$ l)
Ultrazentrifugiertes Plasma (100.000 xg)	2,0 $\mu$ l	0,08x
H <sub>2</sub> O (Dilution)	17,0 $\mu$ l	
gDNA - Isolat	1,0 $\mu$ l	0,04x
SYBR Green (5x)	5,0 $\mu$ l	1x

Tabelle 22: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe auf Basis von ultrazentrifugiertem Plasma im Etablierungs-Prozess der AD-Fluorometrie (3)

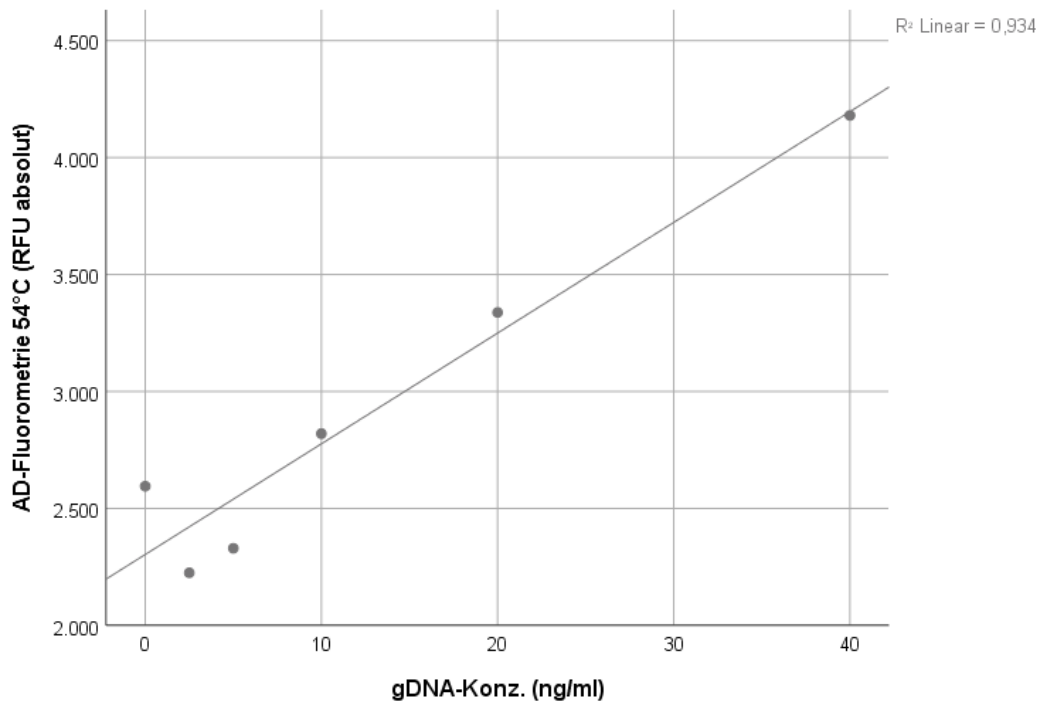


Abbildung 8: Direktfl. Messung einer Standardreihe auf ultrazentrifugierten Plasma

Für den Bereich der gDNA-Konz.  $\leq 10$  ng/ml ergaben sich geringere RFU-Werte als für das native Ultrazentrifugationsplasma (s. Abbildung 8). Hier sollte statistisch ermittelt werden, ob sich diese signifikant voneinander unterscheiden oder einer einheitlichen Messvarianz entsprachen. Für diesen Zweck wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, die keine signifikante Differenz zwischen den Gruppen/Konzentrationen von 0 bis inklusive 10 ng/ml ( $F = 3,3$ ,  $p = 0,77$ ,  $n = 12$ ) aufzeigte.

Letztendlich wurde der Ansatz ultrazentrifugiertes Plasma als reinen Plasmahintergrund zu verwenden verworfen, da für die Zentrifugation ein erhöhter zeitlicher Aufwand von 120 min. nötig war und nicht sicher festgestellt werden konnte, welche enthaltenen Plasmabestandteile durch dieses Verfahren von der zellfreien DNA separiert wurden und inwieweit das Filtrat den exakten Plasmahintergrund präsentierte.

#### 5.1.1.1.2 DNA-Degradation (Desoxyribonuklease I)

Als nächste Möglichkeit, um einen sauberen Plasmahintergrund ohne DNA herzustellen, wurde ein enzymatischer Abbau dieser Nukleinsäuren mithilfe der Desoxyribonuklease I (DNase I) getestet. Dieser sollte im Anschluss ebenfalls benutzt

werden, um mithilfe einer Standardreihe auf DNA-freien Plasma eine Quantifizierung von nativen Plasmaproben zu ermöglichen.

Wie für jedes Enzym müssen auch für die DNase I verschiedene Faktoren variiert und optimiert werden, um eine effiziente Elimination der DNA aus dem Plasma gewährleisten zu können. Diese Faktoren betreffen vor allem Puffer, Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur, Konzentrierung der DNase I und deren Inaktivierung. Den DNase-Puffer und dessen Konzentration im Verhältnis zur verwendeten Menge DNase I sowie die Inkubationstemperatur von 37 °C wurde entsprechend der Herstellerangaben exakt übernommen (s. 4.2.4). Die anderen Faktoren wurden mit dem Ziel, dass sowohl DNA vollständig verdaut als auch gleichzeitig das bestehende Messprotokoll möglichst gering verändert wird, variiert und auf Plasma als Medium angepasst. Die Ratio hinter der Änderung der Hersteller-Empfehlungen und die Umsetzung sollen im Folgenden einzeln erläutert werden.

Primär wurden verschiedene Zeitintervalle für die Inkubation der DNase mit dem Plasma evaluiert (30 min., 60 min. und 90 min.). Alle Varianten der Inkubationsdauer wiesen nach Ergebnissen der L1PA2-qPCR kein quantifizierbares genetisches Material auf. Dies bedeutet, dass die DNA des Plasmas durch die Dnase 1 unter das bestimmbare Limit („Limit of detection, LOD“) abgebaut wurde (ausführliche Darstellung der Ergebnisse s. Anhang 9.2.4).

Des Weiteren sollte die Auswirkung der Inkubation auf die Plasmaproben selbst untersucht werden. Dafür wurden einfache Plasmaproben ohne Zugabe von DNase der äquivalenten Inkubationstemperatur und -dauer unterzogen und mit Proben, die lediglich die gleiche Dauer bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, verglichen. Dabei konnte eine relevante Auswirkung der Inkubation auf das Plasma bzw. auf die Strahlungsintensität der enthaltenen Plasmabestandteile ausgeschlossen werden (ausführliche Darstellung der Ergebnisse s. Anhang 9.2.4).

Obwohl, dass auch eine geringe Inkubationsdauer von nur 30 min. eine vollständige Elimination der DNA in Plasma erbracht hatte, wurde für die weiteren Versuche eine Inkubationsdauer von 60 min. festgelegt. Gerade hinsichtlich des Ansatzes geringere Konzentrationen der DNase I zu testen, sollte eine längere Inkubationsdauer, die aber gleichzeitig keinen Einfluss auf das Plasma selbst hatte, für einen sicheren bzw. äquivalenten DNA-Verdau sorgen. Diese Überlegung beruhte auf Basis der

Enzymkinetik: Eine verminderte Menge an Enzymen benötigt eine längere Zeit, um die gleiche Menge an Substrat zu bewältigen.

Nach Herstellerangaben sollen für den Verdau von 1 µg DNA lediglich 1 Einheit (Unit, U) an DNase I benötigt werden. Mit der bisher verwendeten Konzentration von 500 U/ml (0,5 U/µl) enthielt ein Template der Plasmaverdünnung (20 µl) 10 Einheiten. Mit dieser Menge Enzym könnte dementsprechend 10 µg bzw. 10.000 ng DNA verdaut werden. Ausgehend von Plasmaproben, die maximal eine cfDNA-Konzentration von 1000 ng/ml enthalten, und entsprechend der Dilution im Verhältnis 1:10 würden sich jedoch maximal 2 ng DNA im verwendeten Template befinden. Dementsprechend sollten theoretisch schon DNase-Konzentration von bis zu 0,002 U/µl bzw. 2 U/ml für den Verdau solcher Mengen an DNA ausreichen. Daher wurde im folgenden Versuch ausgetestet ob und welche geringeren Konzentrationen der DNase I weiterhin effizient die plasmatische DNA sowie zugegebene IgDNA verdauen können. Eine geringere Konzentration DNase würde die Zusammensetzung, gerade hinsichtlich einer potenziellen Eigenfluoreszenz oder Fluoreszenz-Inhibition, des durch den Verdau erhaltenen reinen Plasmahintergrund in geringerem Maße verfälschen. Daher wurde, ausgehend von der bisher verwendeten Konzentration 500 U/ml, absteigende Konzentrationen von 400 U/ml, 300 U/ml, 200 U/ml, 100 U/ml und unverdauten Plasmaproben einander gegenübergestellt. Äquivalente Proben wurden mit einem IgDNA-Spike (absolut ca. 1 ng) versetzt, um auch abhängig der verwendeten Konzentration an DNase I die Fähigkeit größere Mengen an DNA abzubauen, auszutesten (s. Abbildung 9). Die Proben wurden mithilfe der AD-Fluorometrie (soweit bisher etabliert) als auch wie bisher mit L1PA2-qPCR als Referenz gemessen. Die verwendeten Plasmaproben der Kontrollprobanden enthielten nach L1PA2-qPCR cfDNA-Konzentrationen von 10-50 ng/ml. Die sonstige Zusammensetzung des Templates (s. Tabelle 23) sowie das Protokoll des DNase-Verdaus mit 60 min. als Inkubationsdauer bei 37 °C und anschließender Messung wurde unverändert beibehalten.

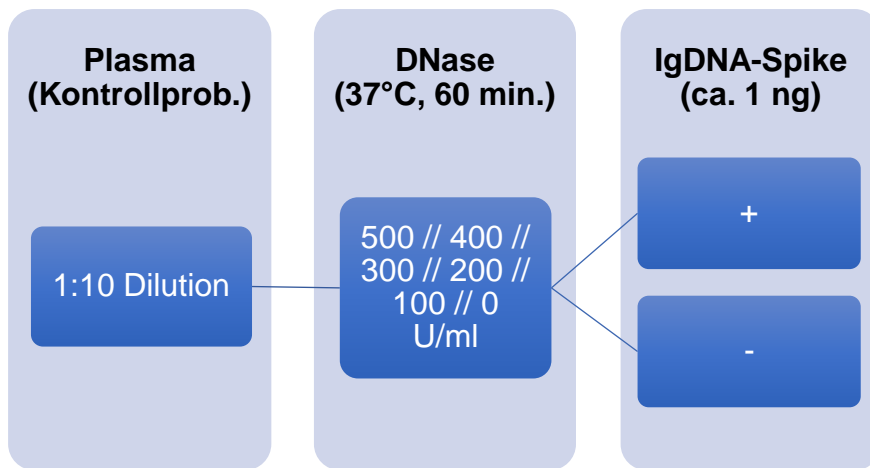


Abbildung 9: Arbeitsschema zur Evaluation einer suffizienten DNase-Konzentration

Reagenz	Volumen pro Well (25 µl)	Konzentration in Well (25 µl)
Plasma/Template	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O	15,28 µl	
DNase I (variierende Dilution)	0,8 µl	400 U/ml 320 U/ml 240 U/ml 160 U/ml 80 U/ml
DNase I - Inkubationspuffer (10x)	1,82 µl	0,73x
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 23: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien zur Evaluation der benötigten DNase-Konzentration

Auch für geringere Konzentrationen an DNase I zeigten die Messwerte der L1PA2-qPCR eine Reduktion der cfDNA-Konzentration auf Werte unterhalb des LOD. Gleiches gilt näherungsweise für Proben, die mithilfe eines Spike IgDNA einer Konzentration von ca. 600-800 ng/ml entsprachen (s. Abbildung 10).

Im paarweisen Vergleich nach Kruskal-Wallis-Test ( $H = 11,62$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0,04$ ) ergaben die Ergebnisse der AD-Fluorometrie für jede der verwendeten DNase-Konzentrationen eine signifikante Differenz zu den äquivalenten Proben, deren Inhalt nicht enzymatisch verdaut worden war. Gleichzeitig zeigte sich für jede angewendete DNase-Konzentration keine signifikante Differenz zur bisher verwendeten DNase-Konzentration von 500 U/ml (s. Abbildung 11).



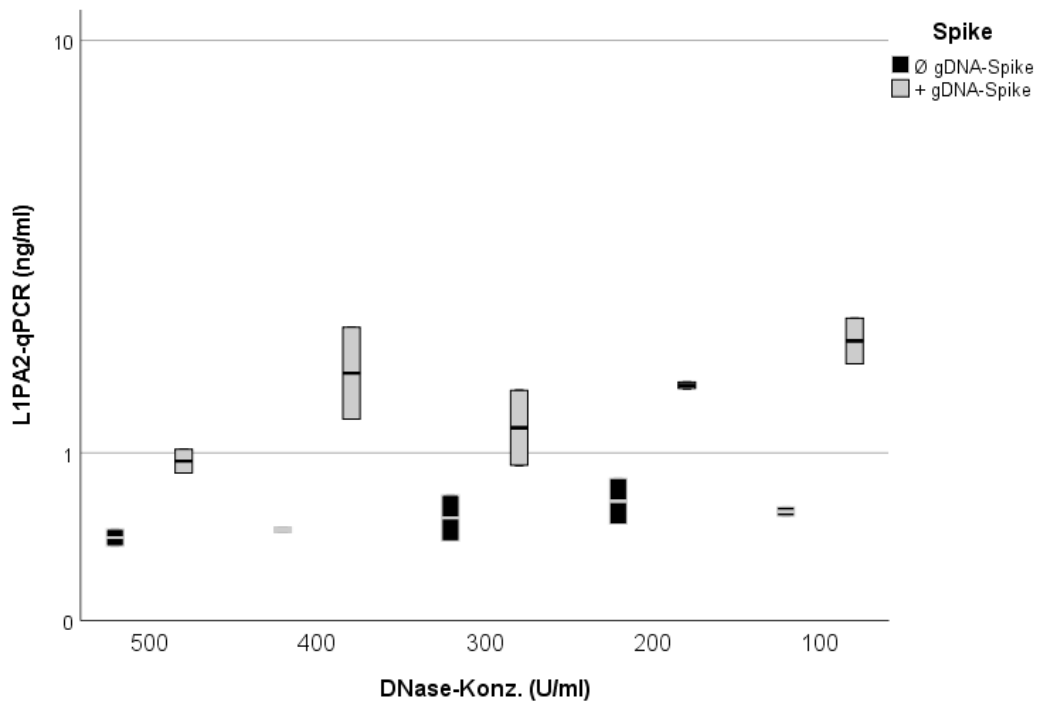


Abbildung 10: DNA-Konz. nach differenter DNase-Konz. (L1PA2-qPCR)

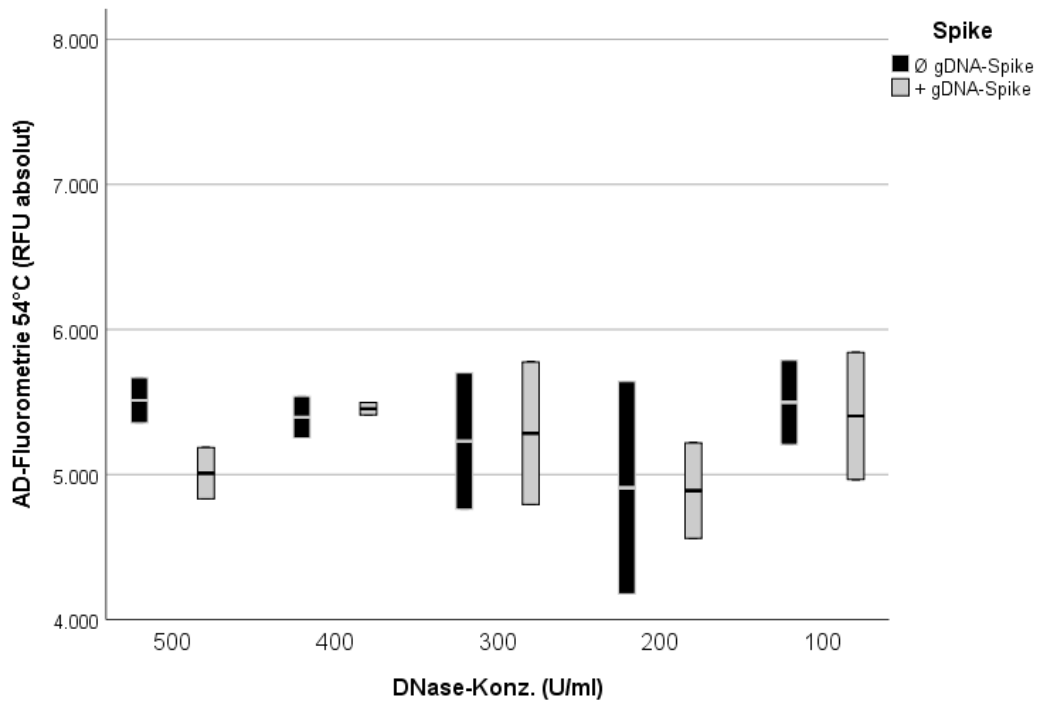


Abbildung 11: Strahlungsintensität nach differenter DNase-Konz. (AD-Fluorometrie)

Versuchsreihen mit geringer konzentrierter DNase I zeigten einen nur unvollständigen Abbau von Nukleinsäuren in größerer Menge (s. Anhang 9.2.4). Da letzten Endes eine DNase-Konzentration von 100 U/ml (0,1 U/  $\mu$ l) bei einer Inkubationsdauer von 60 min. eine effiziente und vollständige Elimination von DNA im Plasma gewährleistete, wurde diese Konzentration für die weitere Arbeit verwendet.

Um erfolgreich eine IgDNA-Standardreihe auf Basis von Plasma, dessen enthaltene DNA zuvor mittels DNase I entfernt worden war, zu etablieren, musste das Enzym DNase I inaktiviert oder aus den Proben entfernt werden. Ansonsten würde jede zugegebene Standard-DNA direkt verdaut und der DNA-Gehalt der Standardprobe verfälscht werden. Eine Inaktivierung kann sowohl physikalisch als auch chemisch erfolgen. Für die physikalische Inaktivierung werden nach Herstellerangaben zwei Formen der Erhitzung empfohlen: Inkubation bei 98 °C für 2 min. oder Inkubation bei 75 °C für 10 min. Es wurden beide Varianten getestet und mittels L1PA2-qPCR sowie AD-Fluorometrie nach bisherigem Messprotokoll ausgewertet. Aufgrund einer weißlichen Trübung sowie Ausfällung des Plasmas, unabhängig der Form der Erhitzung, war eine Messung mittels AD-Fluorometrie nicht sicher möglich. Die plasmatischen Effekte durch Erhitzung resultierten dabei in bis zu fünffachen Anstiegen der Strahlungsintensität ohne Möglichkeit der Differenzierung zwischen Proben mit DNA-Zugabe und Proben ohne zusätzliche DNA. Weiter wäre durch die Effekte der Erhitzung eine Vergleichbarkeit mit nativen Plasmaproben und dementsprechend die Übertragbarkeit der Standardreihe auf diese Proben vermindert. Die Ergebnisse der L1PA2-qPCR hingegen zeigten sich sinnvoll interpretierbar und durch die Erhitzung unbeeinflusst. In Zusammenschau der Ergebnisse wurde die Variante der physikalischen DNase-Inaktivierung jedoch verworfen.

Als chemischen Inaktivator wird seitens des Enzymherstellers Ethylendiamintetraacetat (EDTA) in einer Konzentration von 8 mmol empfohlen. EDTA als Chelator inaktiviert DNase inhibitorisch, verändert jedoch auch die Zusammensetzung der Standards und damit deren Vergleichbarkeit zu Nativplasma. Da eine 0,2-fache Konzentration der empfohlenen DNase-Konzentration als gleichwertig getestet und verwendet wurde, sollten auch geringere EDTA-Konzentrationen auf deren Inaktivierungseffizienz getestet werden. Die empfohlene Inkubationszeit von 30 min. wurde für alle EDTA-Konzentrationen einheitlich belassen. Hierfür wurden sowohl Plasmaproben mit EDTA versetzt, die dem bisherigen DNase-Protokoll unterzogen wurden, als auch Proben, deren DNA-Gehalt nicht enzymatisch verdaut wurde (s. Abbildung 12). Die anschließende Zugabe von EDTA erfolgte in verschiedenen Konzentrationen: Absteigend von der empfohlenen Konzentration 8 mmol bis 1 mmol (s. Tabelle 24). Die Effizienz dieser Inaktivierung sollte mithilfe der Zugabe von IgDNA zu diesen Proben evaluiert werden.

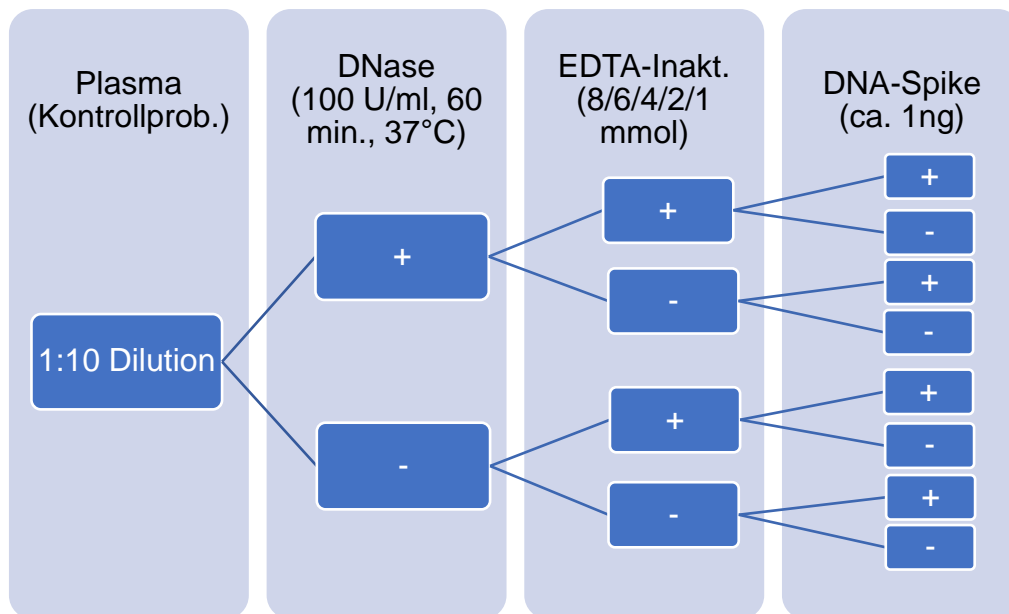


Abbildung 12: Arbeitsschema zur Evaluation einer suffizienten chemischen DNase-Inaktivierung

Reagenz	Volumen pro Well (25 µl)	Konzentration in Well (25 µl)
Plasma/Template	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O	11,8 µl	
DNase I (10 U/µl /10.000 U/ml)	0,18 µl	80 U/ml
DNase I - Inkubationspuffer (10x)	1,82 µl	0,73x
EDTA (variierende Dilution)	2,2 µl	6,4 4,8 3,2 1,6 0,8 mmol
DNA - Standard	1,0 µl	
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 24: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien zur Evaluation der benötigten EDTA-Konzentration zur DNase-Inaktivierung

EDTA hatte im Vergleich zu Proben ohne EDTA (unabhängig von dessen Konzentrierung) als Chelator bei physiologischer cfDNA-Konzentration keinen Einfluss auf das Probenmaterial bzw. die bisher etablierte Methodik (s. Anhang 9.2.4). Im nächsten Schritt sollte evaluiert werden ob und inwieweit EDTA die Aktivität der DNase inhibiert. Für diese Analyse wurden nur Proben ausgewählt, die einem DNase-Verdau unterzogen worden waren und anschließend einen IgDNA-Spike erhalten hatten (unabhängig der EDTA-Konz.). Bei erfolgreicher Inaktivierung sollte diese artifizielle

DNA-Menge nicht abgebaut, sondern erhalten und messbar bleiben. Letzteres zeigte sich für sowohl für die Ergebnisse der L1PA2-qPCR als auch der AD-Fluorometrie (s. Abbildung 13, Abbildung 14). Eine statistisch signifikante Differenz von Ausgangskonzentration zu Endkonzentration nach Zugabe des IgDNA-Spikes konnte nur für die Ergebnisse der L1PA2-qPCR bestätigt werden (s. Anhang 9.2.4).

Zuvor konnte gezeigt werden, dass EDTA einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Messgrößen der L1PA2-qPCR und auch der ADF nehmen könnte. Daher sollte in der letzten Analyse dieser Versuchsreihe evaluiert werden, ob geringere EDTA-Konzentrationen äquivalent zu der vom Hersteller empfohlenen EDTA-Konzentration wirken könnten. Dies hätte den Vorteil die Standards bzw. deren reinen Plasmahintergrund möglichst vergleichbar zu nativem Plasma zu belassen und den Einfluss auf Ergebnisse der L1PA2-qPCR als Referenzmethode zu reduzieren. Für diese Analyse wurden wie zuvor nur DNase-behandelte Proben mit anschließender Zugabe eines IgDNA-Spikes ausgewählt. Für diese Proben wurde die jeweilige Effektivität der DNase-Inaktivierung der unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen einander gegenübergestellt. Dabei zeigte sich anhand L1PA2-qPCR nur für die EDTA-Konzentration 6 mmol gleichzeitig eine signifikante Differenz zu EDTA-unbehandelten Proben (0 mmol) als auch keine signifikante Differenz zu der vom Hersteller empfohlenen EDTA-Konzentration (8 mmol) auf (s. Anhang 9.2.4). Im Falle der AD-Fluorometrie zeigten sich die EDTA-Konzentrationen 6 und 4 mmol ohne signifikante Differenz zur vom Hersteller empfohlenen EDTA-Konzentration (8 mmol). Eine signifikante Differenz zu EDTA unbehandelten Proben (0 mmol) wies keine dieser beiden EDTA-Konzentrationen auf (s. Anhang Kap 9.2.4).

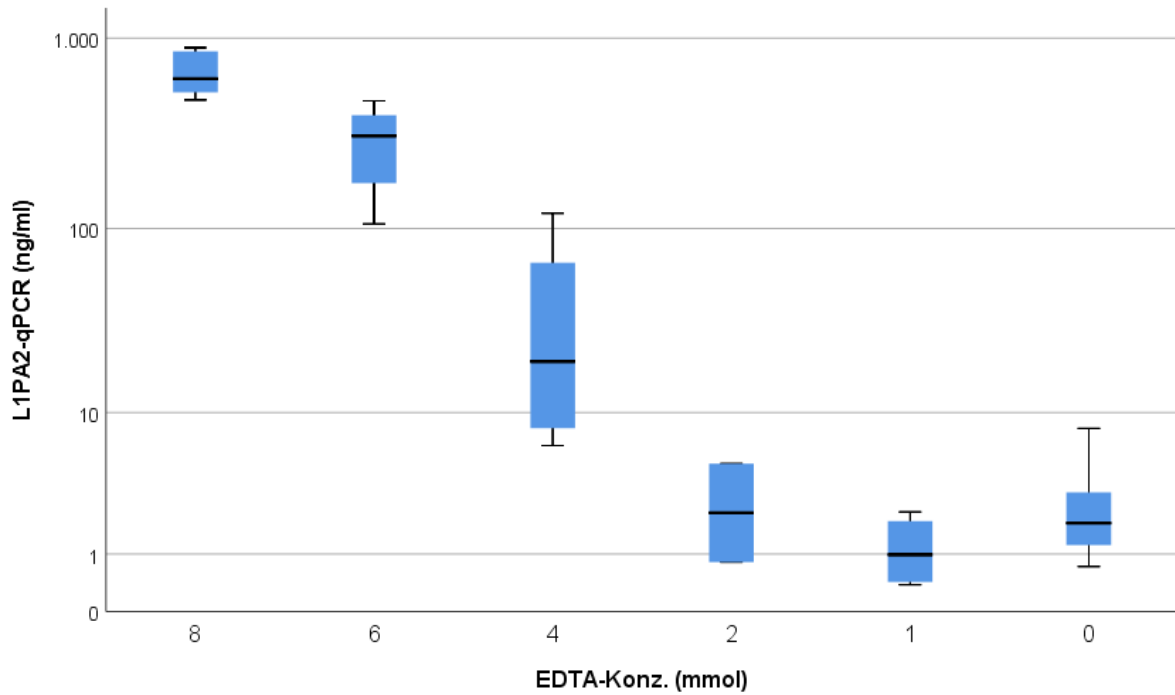


Abbildung 13: DNA-Konz. nach chemischer Dnase-Inaktivierung mit differenter EDTA-Konz. (L1PA2-qPCR)

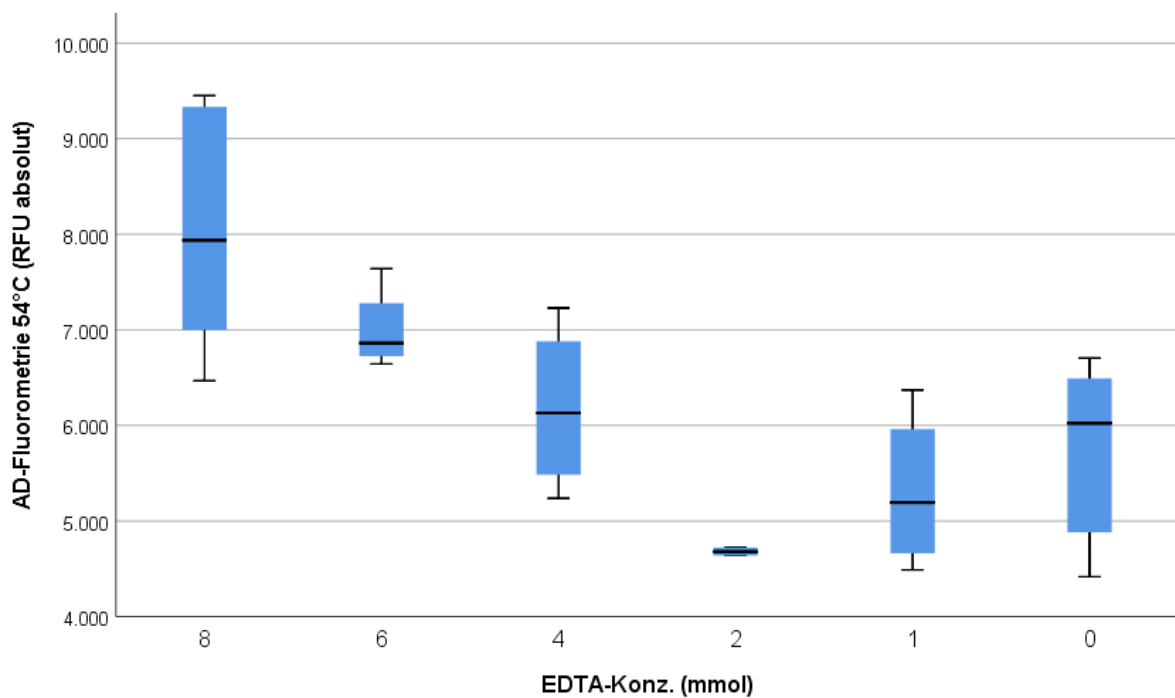


Abbildung 14: Strahlungsintensität nach chemischer Dnase-Inaktivierung mit differenter EDTA-Konz. (AD-Fluorimetrie)

In Zusammenschau der Ergebnisse wurde sich für eine EDTA-Konzentration von 6 mmol zur Inaktivierung der DNase I entschieden. Diese Form der Enzym-Inaktivierung wurde jedoch entsprechend dem hierauf folgenden Kapitel durch eine enzymatische Inaktivierung ersetzt.

Hiernach sollte getestet werden, ob und inwieweit das Enzym DNase bzw. dessen Inkubationspuffer oder EDTA die Messung von Standardreihen mit artifizierter DNA beeinflussen könnte. Hierzu wurden vier verschiedene Standardreihen auf Basis desselben Plasmas angesetzt. Diese Standardreihen setzten sich aus den einzelnen Komponenten zusammen, die für DNA-Degradation (DNase, Inkubationspuffer) und der Inaktivierung der Dnase (EDTA) nötig waren. Des Weiteren wurde eine Standardreihe auf Basis von reinem, unbehandeltem Plasma angesetzt. Es wurde für alle Standardreihen einheitlich das bisher etablierte Messprotokoll verwendet, um eine eindeutige Aussage bzgl. des Einflusses der Reagenzien im Probenansatz treffen zu können. Die statistische Analyse ergab signifikante Korrelationen für alle Standardreihen mit und -untereinander (s. Abbildung 15, genauere statistische Darstellung der Ergebnisse s. Anhang Kap 9.2.5). Mit diesem Ergebnis war eine grobe Verfälschung der Standardreihen durch die Anwendung der DNase und speziell der begleitenden Reagenzien unwahrscheinlich.

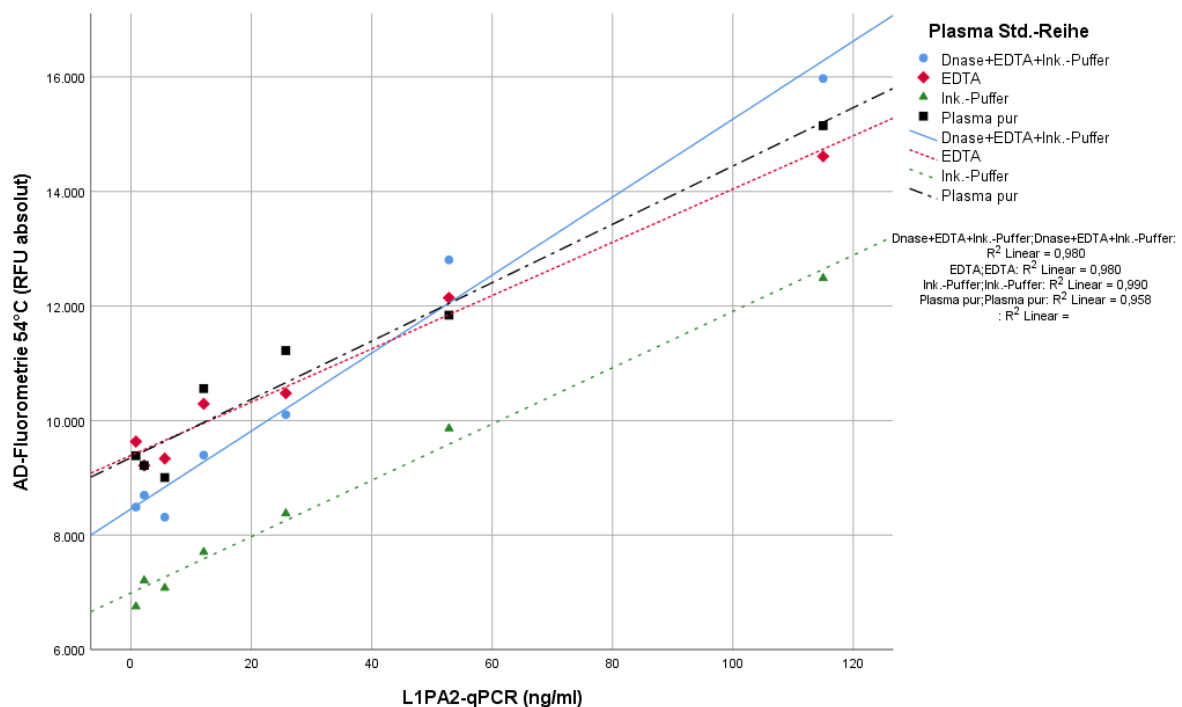


Abbildung 15: Korrelation der Methoden anhand Standardreihen nach DNA-Verdau und Vergleich dieser mit Standardreihen auf den dafür verwendeten Reagenzien sowie Plasma

### 5.1.1.1.3 Proteolyse

Aufgrund der starken interindividuellen Differenzen, die höchstwahrscheinlich auf den Plasmahintergrund bzw. dessen Strahlungsintensität zurückzuführen waren, wurde im nächsten Ansatz getestet, ob ein Verdau des potenziell sehr variablen Anteils an Protein im Plasma einen Ausgleich dieser Differenzen und eine Quantifizierung auf

Basis eines einheitlichen Hintergrunds ermöglichen könnte (s. Abbildung 16). Gleichzeitig sollte ein solcher Verdau von Proteinen auch das Enzym DNase I inaktivieren und so die Zugabe von EDTA ersetzen, um so ggf. auch dessen Interferenz auf Ergebnisse der qPCR und Einfluss auf Plasmabestandteile zu verhindern. Der Verdau erfolgte mithilfe der Proteinase K, welche sich bereits in einer Lösung mit dem notwendigen Puffer befand. Nach Herstellerangaben sollte eine Behandlung mit dieser Proteinase K- Lösung in einer Konzentration des 0,1-fachen des Plasmavolumens für 30 min. bei 60 °C angewendet werden. Die Inkubationstemperatur wurde für diese Methodenetablierung auf 40 °C angepasst, um einen potenziellen Einfluss bzw. Änderung des genetischen Materials oder anderer Plasmabestandteile zu reduzieren. Um trotz dieser Maßnahme eine erfolgreiche Elimination der Proteine im Plasma zu gewährleisten, wurde die Konzentration auf den Dilutionsfaktor 0,12 und die Inkubationsdauer auf 45 min. angepasst. Dieser Schritt erfolgte an gleicher Stelle wie zuvor die DNase-Inaktivierung mittels EDTA. Im Folgenden sollte mithilfe von Standardreihen evaluiert werden, ob eine äquivalente DNase-Inaktivierung mittels Proteinase K möglich ist, der Protein-Verdau einen Einfluss auf die enthaltene Menge an DNA hat und ob eine Reduktion der interindividuellen Unterschiede im Plasmahintergrund eine einheitlichere Quantifizierung ermöglichen kann.

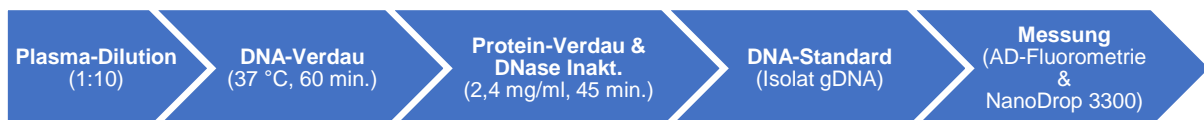


Abbildung 16: Arbeitsschema zur Erstellung einer Standardreihe unter DNA-Degradation und Proteolyse

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well (25 µl)</b>	<b>Konzentration in Well (25 µl)</b>
Plasma/Template	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O	11,8 µl	
DNase I (10 U/µl)	0,18 µl	0,08 U/µl
DNase I - Inkubationspuffer (10x)	1,82 µl	0,8x
Proteinase K (20 mg/ml)	2,2 µl	1,76 mg/ml
DNA - Standard	2,0 µl	
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 25: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien einer Standardreihe auf Basis von DNA- und proteinfreien Plasmas

Um die Effizienz der Proteolyse und speziell die DNase-Inaktivierung, die daraus gleichzeitig resultieren sollte, zu testen und mit der bisher etablierten Inaktivierungsmethode EDTA vergleichen zu können, wurden jeweils 5 Standardreihen auf Basis von Einzelproben angesetzt. Als Plasmaproben dienten Belastungsproben der Kontrollprobanden: Hier wurden insgesamt Proben von 5 verschiedenen Individuen zu unterschiedlichen Belastungszeitpunkten gewählt (zwei Proben vor Belastung, eine Probe nach Belastung und zwei Proben 90 min. nach Belastung). Die Ansetzung und Bearbeitung der Standardreihen wurden gleichzeitig und für beide Varianten nach sonst unverändertem Protokoll ohne Proteolyse durchgeführt. Die Messung erfolgte nach dem bisherigen Schmelzkurvenprotokoll und in Duplikaten, deren Mittelwerte als Ergebnisse für die folgende Analyse dienten. Als Referenz der Standardreihen und deren DNA-Konz. wurden die Standards mithilfe des NanoDrop 3300 gemessen. Eine Referenzmessung mittels L1PA2-qPCR war aufgrund der Zugabe von Proteinase K und dessen destruktiven Effekt auf enzymabhängige Amplifikation nicht möglich. Im Temperaturkorridor 50-55 °C korrelierten sowohl die Standardreihen nach EDTA-DNase-Inaktivierung ( $r = 0,976$ ,  $p = 0,04 \cdot 10^{-18}$ ,  $n = 30$ ) als auch die Standardreihen nach Protein-Verdau ( $r = 0,979$ ,  $p = 0,006 \cdot 10^{-18}$ ,  $n = 30$ ) signifikant mit der durch NanoDrop 3300 ermittelten DNA-Konz (s. Abbildung 17).



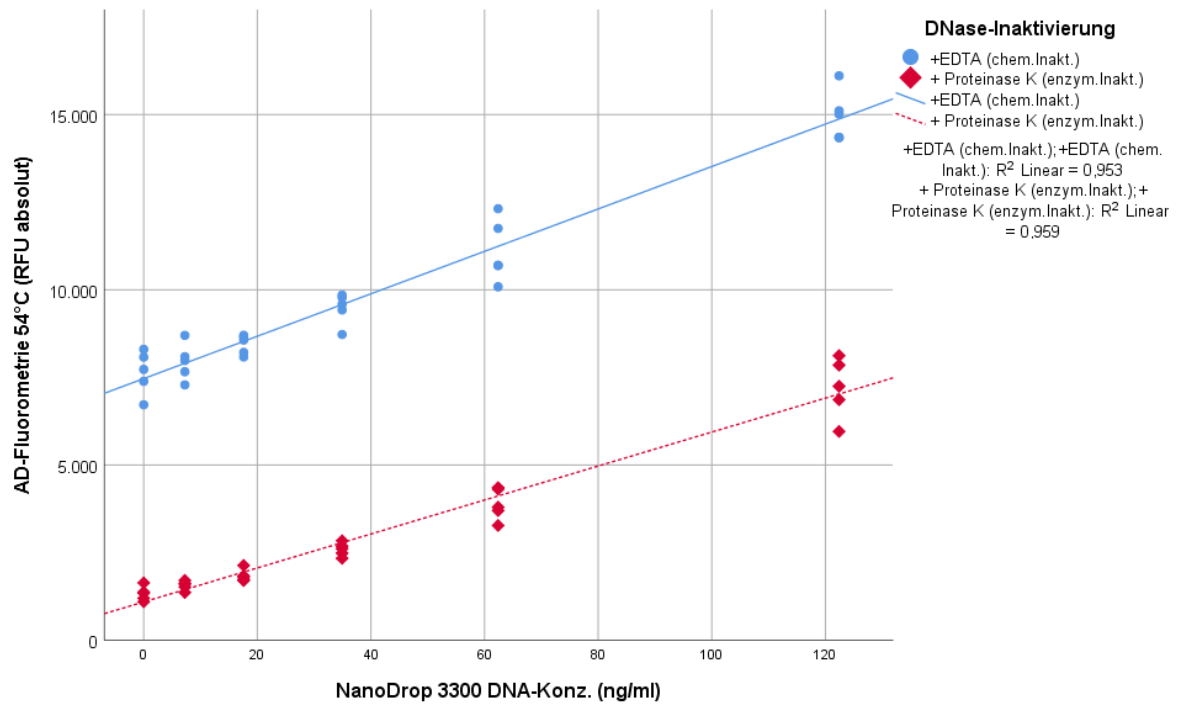


Abbildung 17: Korrelation der AD-Fluorometrie mit spektroskopischer DNA-Quantifizierung und Vergleich von chemischer mit enzymatischer DNase-Inaktivierung

Durch Auswertung der Mittelwerte der Standards für die jeweils 5 einzelnen Standardreihen ergaben sich Steigung und Achsenabschnitt. Weiter wurde das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  als Maß der linearen Regression ermittelt (s. Tabelle 26).

Gleichermaßen korrelierten auch die fluorometrischen Ergebnisse der Standardreihen untereinander statistisch signifikant ( $r = 0,985$ ,  $p = 0,007 \cdot 10^{-21}$ ,  $n = 30$ ).

	Standardreihen „+EDTA“	Standardreihen „+ProtK“
Steigung m	60,53	48,47
Achsenabschnitt y (RFU)	7470	1090
Bestimmtheitsmaß $R^2$	0,953	0,959

Tabelle 26: Parameter der linearen Funktionen und Bestimmtheitsmaß der Standardreihen im Vergleich zwischen chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung

Die Auswertung hinsichtlich der Differenzierbarkeit für die möglichst niedrige Konzentration an DNA-Standard gegen den Standard ohne DNA-Isolat (0 ng/ml) zeigte mittels einfaktorieller Varianzanalyse für beide Standardreihen eine signifikante Differenz („+EDTA“:  $F = 101,5$ ,  $df = 29$ ,  $p = 0,024 \cdot 10^{-13}$ ; „+ProtK“:  $F = 140,3$ ,  $df = 29$ ,  $p = 0,06 \cdot 10^{-15}$ ). Dabei wurde in Post-Hoc-Test nach Bonferroni für beide Varianten die Standards mit 34,92 ng/ml als niedrigst von 0 ng/ml differenzierbare Konzentration ausgegeben (vollständige statistische Auswertung s. Anhang 9.2.8).

Da sowohl Standardreihen als auch Plasma in Triplikaten aus dem gleichen Ansatz pipettiert wurden, erfolgte die Analyse der Standardabweichung dieser Triplikate untereinander und vor allem im Vergleich zwischen Proben, die einem Protein-Verdau unterzogen worden waren und denen die diesen Prozess nicht durchlaufen hatten. Bezüglich der Triplikate der Standardreihen zeigte ein t-Test eine signifikante Differenz ( $T = 5,594$ ,  $df = 10$ ,  $p = 0,023 \cdot 10^{-2}$ ) der Standardabweichungen zwischen den beiden Varianten der Probenverarbeitung („+EDTA“:  $M. = 392,8$ ,  $SD. = 112,3$ ; „+Proteinase K“:  $M. = 98,5$ ,  $SD. = 63,2$ ) auf.

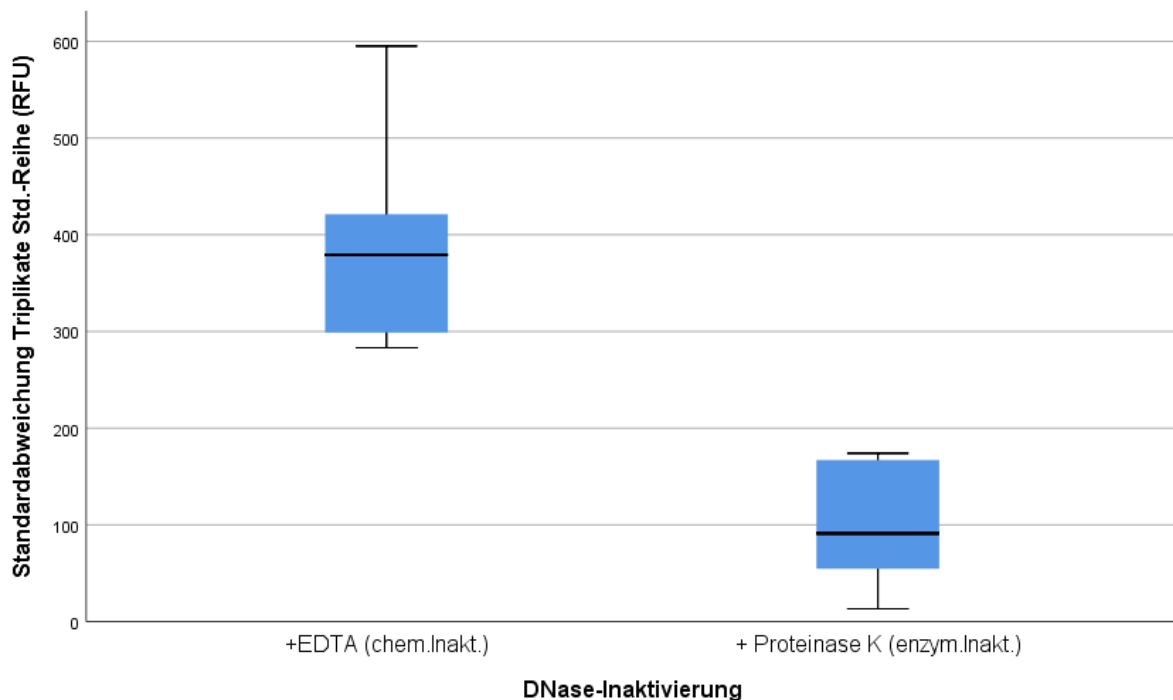


Abbildung 18: Std.-Abweichung der AD-Fluorometrie nach chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung

Aufgrund der Annahme, dass die DNase-Inaktivierung mittels Protein-Verdau mindestens gleichwertig zu einer DNase-Inaktivierung mittels EDTA war und gleichzeitig den Vorteil erbrachte den Protein-Anteil, der maßgeblich an der Strahlungsintensität des Plasmahintergrunds beteiligt war, zu reduzieren, wurde diese Methodik für die finale Etablierung der Standardreihen zur Quantifizierung von Nativproben beibehalten (s. 5.1.2).

#### 5.1.1.2 Adaptation Standard-DNA

Damit die Standards der angestrebten Standardreihen möglichst genau die Zusammensetzung zellfreier DNA in Plasma repräsentieren, war eine Anpassung der verwendeten Standards nötig. Zuvor waren hierfür Isolate genomischer DNA

verwendet worden, welche die Gesamtheit der nukleären DNA repräsentieren. Deren Integrität ist nicht vollständig auf zellfreie DNA übertragbar. Daher sollte evaluiert werden, ob aus Plasma isolierte zellfreie DNA als Standard-DNA Isolaten genomischer DNA überlegen ist. Letztere sollten in ihrer Beschaffenheit und Zusammensetzung noch stärker den Nukleinsäuren ähneln, die final in Plasma gemessen und quantifiziert werden sollten. Im darauffolgenden Versuch dieses Kapitels sollte dieser Gedanke weiterverfolgt werden und Standard-Konzentrationen direkt aus Plasmaproben unterschiedlicher Konzentration angefertigt werden.

#### 5.1.1.2.1 Standard-DNA aus cfDNA-Isolat

Plasma, dessen enthaltene DNA nach dem etablierten DNase-Protokoll enzymatisch entfernt worden war, sollte nun als Template bzw. Plasmahintergrund für die Evaluation von Standards aus isolierter zellfreier DNA dienen (<sup>1</sup>). Diese sollte mit Standards aus Isolaten genomischer DNA verglichen werden. Diese Prozesse wurden zweifach mit äquivalenten Proben durchgeführt, um Messungen mit der AD-Fluorometrie als auch mit L1PA2-qPCR als Referenz zu ermöglichen.



Abbildung 19: Arbeitsschema zur Erstellung einer Standardreihe unter DNase-Verdau und Verwendung isolierter cfDNA als DNA-Standards

Der Ansatz des Templates erfolgte zu diesem Zeitpunkt der Versuchreihen mit enzymatischem DNA-Abbau und DNase-Inaktivierung mittels EDTA. Lediglich der Anteil der DNA-Standards ersetzte den entsprechenden Anteil an Wasser, damit eine 1:10 Dilution des Plasmas weiterhin gegeben war (s. Tabelle 27). Die DNA-Standards wurden in deren Konzentration so berechnet, dass sich final eine quadratische Standardreihe mit Konzentrationen der Abfolge 128-64-32-16-8-4-2 ng/ml ergab. Diese Standard-Konzentrationen wurden entsprechend auch den Templates der L1PA2-qPCR angepasst.

Um einen variablen Plasmahintergrund darzustellen wurden 4 verschiedene Plasmaproben von 2 Kontrollprobanden der Belastungsstudie ausgewählt, auf deren Plasmahintergrund die Standardreihen etabliert werden sollten. Dabei handelte es sich

<sup>1</sup> Anm.: Eine proteolytische Aufreinigung war zum Zeitpunkt dieser Versuchsreihe noch nicht etabliert.

jeweils um Proben zu den Zeitpunkten vor Belastung und nach Belastung. Die beiden Varianten der DNA-Isolate wurden in äquivalenter Konzentrierung eingesetzt und jeweils mittels ADF und L1PA2-qPCR nach bisherigem Protokoll gemessen. In der anschließenden Auswertung sollten die beiden Varianten der DNA-Isolate miteinander verglichen als auch der errechneten DNA-Konz. der Standardreihe und L1PA2-qPCR gegenübergestellt werden.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well (25 µl)</b>	<b>Konzentration in Well (25 µl)</b>
Plasma/Template	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O	11,8 µl	
DNase I (10 U/µl)	0,18 µl	0,07 U/µl
DNase I - Inkubationspuffer (10x)	1,82 µl	0,8x
EDTA (0,4 Mol)	2,2 µl	4,8 mmol
DNA - Standard (128-0 ng/ml)	2,0 µl	
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 27: Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien der Standardreihen mit differenter Isolat-DNA der Standards (IgdDNA, IcfDNA)

Für die statistische Auswertung wurden die RFU-Werte der AD-Fluorometrie wieder in ihren Rohwerten belassen, da eine Subtraktion des Plasmahintergrunds bzw. des RFU-Werts der Probe ohne Standard-DNA (0 ng/ml) nicht möglich war. Dies beruhte darauf, dass sich diese Werte in manchen Fällen in ihrer absoluten Zahl höher bzw. nicht differenzierbar zu der kleinsten Konzentration (2 ng/ml) der Standardreihe darstellten.

Die Ergebnisse der L1PA2-qPCR korrelierten sowohl für die Standardreihe mit IgdDNA ( $r = 0,992$ ,  $p = 0,04 \cdot 10^{-26}$ ,  $n = 32$ ) als auch für die Standardreihe mit IcfDNA ( $r = 0,990$ ,  $p = 0,05 \cdot 10^{-25}$ ,  $n = 32$ ) statistisch signifikant mit den errechneten bzw. erwarteten DNA-Konzentrationen der Standards (s. Abbildung 20). Gleiches ergab sich nach bivariater Korrelation für die Ergebnisse der AD-Fluorometrie (IgdDNA:  $r = 0,966$ ,  $p = 0,03 \cdot 10^{-17}$ ,  $n = 32$ ; IcfDNA:  $r = 0,978$ ,  $p = 0,05 \cdot 10^{-20}$ ,  $n = 32$ ).

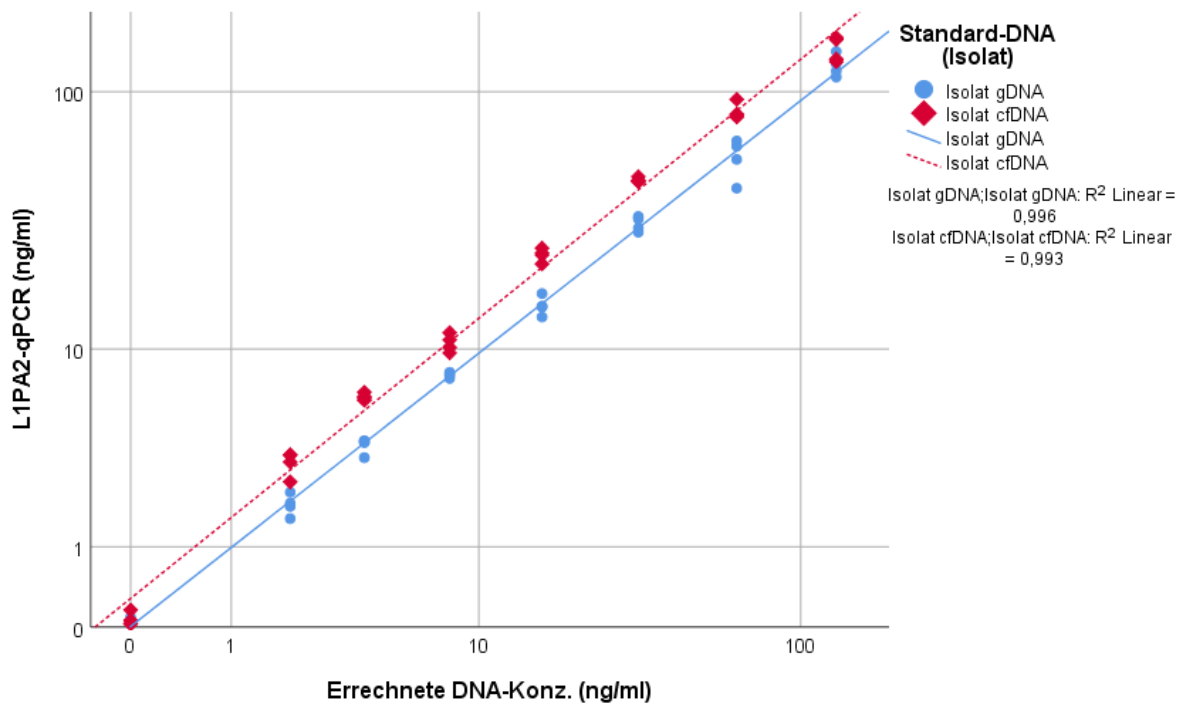


Abbildung 20: Vergleich der Standardreihen nach verwendetem DNA-Isolat (L1PA2-qPCR)

<u>L1PA2-qPCR (ng/ml)</u>	Standardreihe „lgDNA“	Standardreihe „lcfDNA“
Steigung m	0,97	1,15
Achsenabschnitt (ng/ml)	-0,48	3,53

Tabelle 28: Parameter der linearen Funktionen korrelierter Standardreihen im Vergleich der Standardreihen mit differenter Isolat-DNA (L1PA2-qPCR)

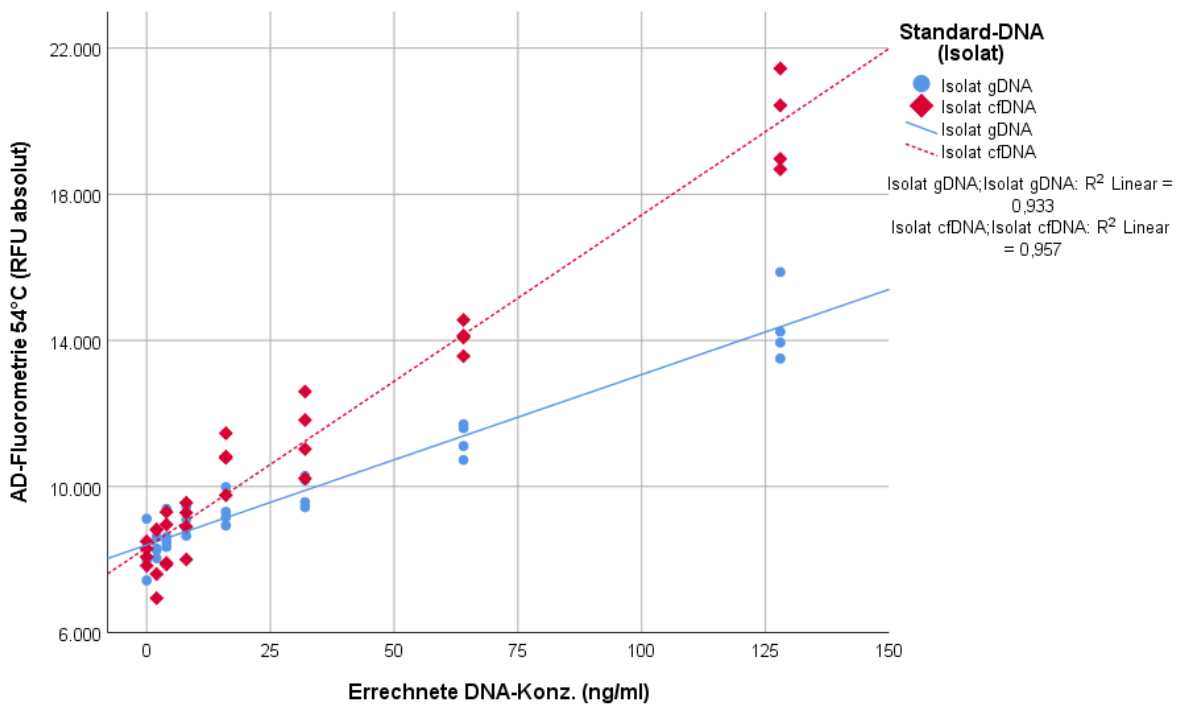


Abbildung 21: Vergleich der Standardreihen nach verwendetem DNA-Isolat (AD-Fluorometrie)

<b><u>AD-Fluorometrie 54° (RFU absolut)</u></b>	Standardreihe „IgDNA“	Standardreihe „IcfDNA“
Steigung m (RFU/(ng/ml))	46,66	91,08
Achsenabschnitt (RFU)	8430	8330

Tabelle 29: Parameter der linearen Funktionen korrelierter Standardreihen im Vergleich der Standardreihen mit differenter Isolat-DNA (AD-Fluorometrie)

Gleichzeitig korrelierten die Ergebnisse der L1PA2-qPCR statistisch signifikant mit den Ergebnissen der AD-Fluorometrie, unabhängig davon welches DNA-Isolat für die Standards eingesetzt wurde (IgDNA:  $r = 0,957$ ,  $p = 0,01 \cdot 10^{-17}$ ,  $n = 32$ ; IcfDNA:  $r = 0,971$ ,  $p = 0,03 \cdot 10^{-18}$ ,  $n = 32$ , s. Abbildung 22).

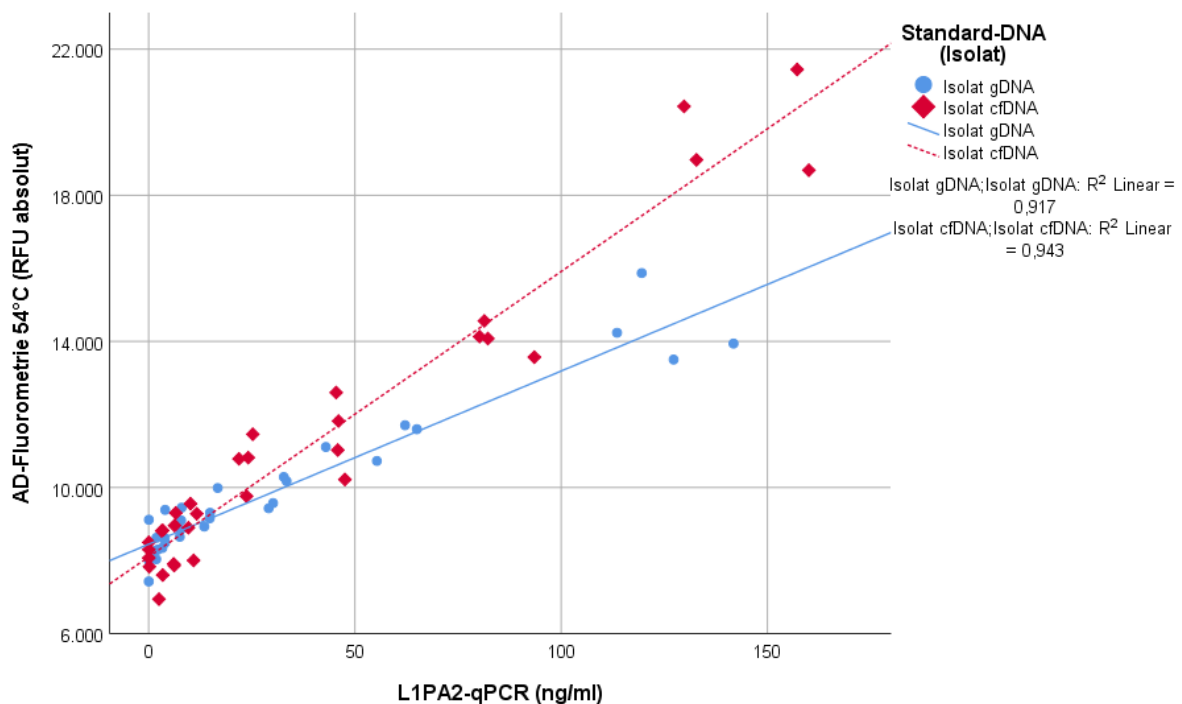


Abbildung 22: Korrelation der Methoden im Vergleich der Standardreihen nach DNA-Isolat

Gleichermaßen korrelierten auch die Standardreihen der verschiedenen Isolate methodenspezifisch signifikant (L1PA2-qPCR:  $r = 0,980$ ,  $p = 0,01 \cdot 10^{-20}$ ,  $n = 32$ , ADF:  $r = 0,971$ ,  $p = 0,03 \cdot 10^{-18}$ ,  $n = 32$ ).

Weiter wurde für die Ergebnisse der AD-Fluorometrie mithilfe eines Kruskal-Wallis-Test analysiert, ab welcher Standard-Konzentration eine signifikante Differenz zu Proben ohne artifizielle DNA (0 ng/ml) bzw. dem reinen Plasmahintergrund zu finden war. Dieser Test ergab eine statistisch signifikante Differenz über die verschiedenen Konzentrationen (gDNA:  $H = 27,114$ ,  $df = 7$ ,  $p = 0,032 \cdot 10^{-2}$ ; IcfDNA:  $H = 27,642$ ,  $df = 7$ ,  $p = 0,026 \cdot 10^{-2}$ ) und zeigte die Konzentration von 64 ng/ml als niedrigste, statistisch

zu 0 ng/ml differente, Konzentration auf (ausführliche statistische Auswertung s. Anhang 9.2.7).

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigten Standardreihen mit isolierter cfDNA als Standard-DNA tendenziell bessere Ergebnisse, wenn auch beide signifikant, als mit isolierter genomischer DNA. Daher wurde das Protokoll zur Etablierung einer Standardreihe für die Quantifizierung in Abschnitt 5.1.2 in dieser Art fortgeführt.

#### 5.1.1.2.2 Rein aus Plasma generierte cfDNA-Standards (ohne Isolation)

Aufgrund der guten Resultate, die die in 5.1.1.1.3 etablierte Proteolyse hinsichtlich der Reduktion variabler Strahlungsintensitäten im Plasma erwirkt hatte, sollte eine Standardreihe ohne Standards aus Isolaten genomischer oder zellfreier DNA verwendet werden. Stattdessen war es die Intention direkt zellfreie DNA aus Plasma als „natürlichen“ Standard zu verwenden, indem hochkonzentrierte Plasmaproben in unterschiedlichem Verhältnis mit niedrigkonzentrierten Plasmaproben gemischt werden, um so eine gleichwertige lineare Standardreihe zu erhalten. Aufgrund des Versuchsaufbaus konnte der Plasmahintergrund an sich nicht mittels Einsatzes von DNase, sondern nur durch Referenzmessungen rechnerisch ermittelt werden. Sowohl das hochkonzentrierte als auch das niedrigkonzentrierte Plasma wurden als Pool aus jeweils drei hochkonzentrierten bzw. niedrigkonzentrierten Plasmaproben hergestellt. Die daraus resultierende Konzentration wurde mittels L1PA2-qPCR überprüft und für die weiteren Berechnungen verwendet. Die Standardreihe stellte sich daher wie folgend zusammen (s. Tabelle 30):

<b>Standard-Konz. Std.-Reihe</b> (errechnet / L1PA2-qPCR)	<b>Hochkonz. Plasma-Pool</b> (Anteil)	<b>Niedrigkonz. Plasma-Pool</b> (Anteil)
191 ng/ml	1	0
174 ng/ml	0,9	0,1
156 ng/ml	0,8	0,2
138 ng/ml	0,7	0,3
121 ng/ml	0,6	0,4
103 ng/ml	0,5	0,5
86 ng/ml	0,4	0,6
68 ng/ml	0,3	0,7
50 ng/ml	0,2	0,8
33 ng/ml	0,1	0,9
15 ng/ml	0	1

Tabelle 30: Zusammensetzung der Standards aus Pooling-Plasma hochkonzentrierter und niedrigkonzentrierter Plasmaproben

Diese Standardreihe wurde zweifach angesetzt und in einem Fall einem Protein-Verdau unterzogen, um dessen Einfluss auch für diese Art der Standardreihe evaluieren zu können. Beide Standardreihen wurden in Triplikaten angesetzt. Die Zusammensetzung der Standardreihe wird folgend dargestellt (s. Tabelle 31). Das sonstige Messprotokoll wurde wie bisher beibehalten.

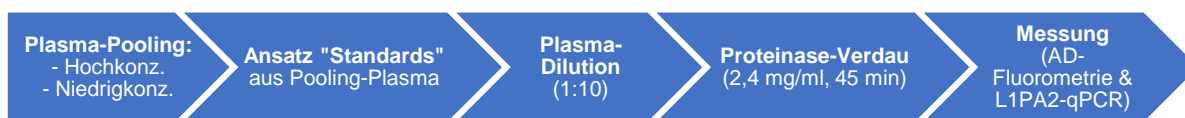


Abbildung 23: Arbeitsschema zur Erstellung einer Standardreihe mit aus Plasma-Pooling generierten Standards

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well</b> (25 µl)	<b>Konzentration in Well</b> (25 µl)
Plasma/ „Standards“	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O	15,8 µl	
Proteinase K (20 mg/ml)	2,2 µl	1,76 mg/ml
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 31: Zusammensetzung und Konzentration der Standards auf Basis von proteolysiertem Pooling-Plasma



Die Standardreihen auf Basis von Standards aus gepooltem Plasma korrelierten ohne Zugabe von Proteinase K ( $r = 0,983$ ,  $p = 0,06 \cdot 10^{-6}$ ,  $n = 11$ ) als auch nach Zugabe von Proteinase K ( $r = 0,985$ ,  $p = 0,03 \cdot 10^{-6}$ ,  $n = 11$ ) signifikant mit den aus den Ergebnissen der L1PA2-qPCR errechneten Standardkonzentrationen. Dabei wiesen die Anpassungsgeraden die in der folgenden Tabelle (s. Tabelle 32) dargestellten Parameter auf. Weiter korrelierten die fluorometrischen Ergebnisse beider Varianten an Standardreihen statistisch signifikant miteinander ( $r = 0,970$ ,  $p = 0,008 \cdot 10^{-4}$ ,  $n = 11$ )

	Standardreihe „Ø Proteinase K“	Standardreihe „+ Proteinase K“
Steigung m (RFU/(ng/ml))	14,83	6,37
Achsenabschnitt (RFU)	6390	780
Bestimmtheitsmaß $R^2$	0,967	0,971

Tabelle 32: Parameter der linearen Funktion und Bestimmtheitsmaß korrelierter Standardreihen im Vergleich proteolyzierter und nativ belassener Standardreihen mit Standards aus Poolingplasma

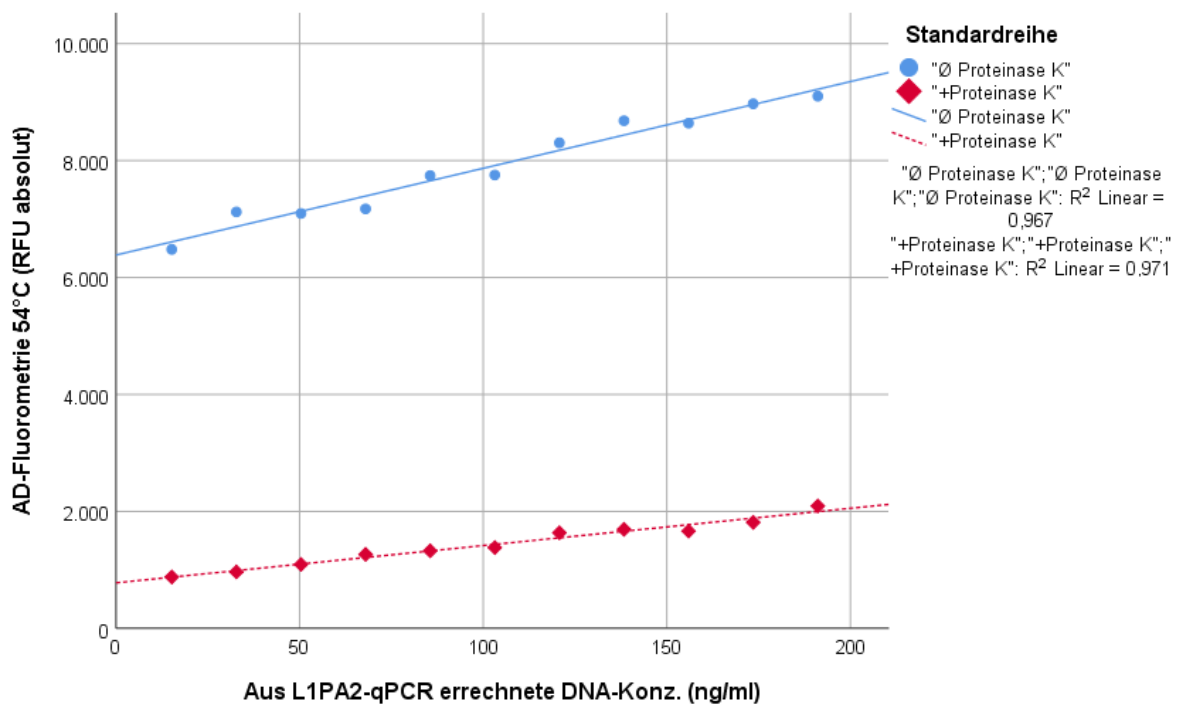


Abbildung 24: Vergleich zwischen proteolyzierter und nativer Standardreihe aus mit Plasma-Pooling generierten Standards

Die Standardabweichung innerhalb der Triplikate der Standards zeigte nach Mann-Whitney-U-Test eine statistisch signifikante Differenz ( $U = 14,0$ ,  $p = 0,001$ ) zwischen Standardreihe ohne Protein-Verdau ( $M. = 224,2$ ,  $SD. = 179,7$ ) und Standardreihe mit Protein-Verdau ( $M. = 71,1$ ,  $SD. = 33,1$ ).

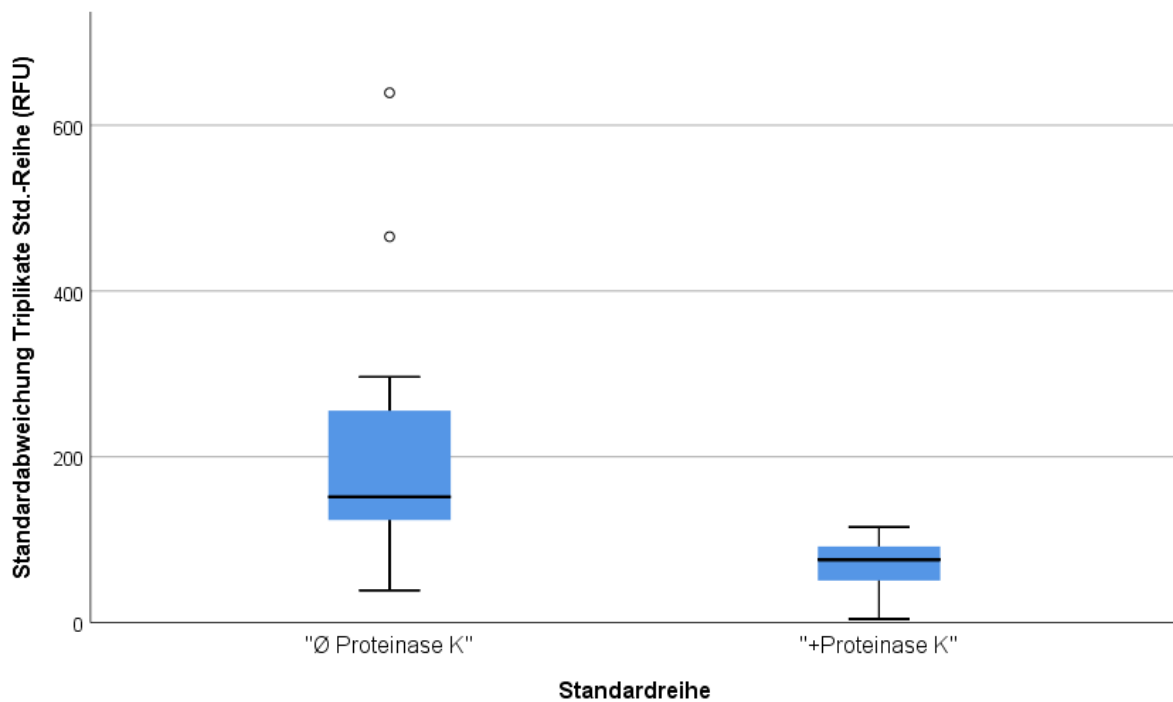


Abbildung 25: Std.-Abweichung der AD-Fluorometrie proteolysierter Standards gegen nativ belassene Standards

### 5.1.2 Absolute Quantifizierung

Im nächsten Schritt sollte mittels final etablierter Standardreihen und derer Funktion die cfDNA-Konzentration von nativen Plasmaproben in verwertbare, dimensionsbezogene Werte quantifiziert werden. Schon vor und auch nach Plasma-Aufreinigung war deutlich aufgefallen, dass die RFU-Werte der AD-Fluorometrie individuell in der Strahlungsintensität des Plasmahintergrunds variierten und eine Quantifizierung dementsprechend stark erschwerte. Daher sollte primär evaluiert werden, ob eine Quantifizierung nur anhand personalisierter Standardreihen möglich war oder auch mittels Pooling von Plasma auf eine Gesamtpopulation übertrag- und verwendbar wäre. Des Weiteren sollte auch eine Quantifizierung mithilfe der im vorigen Kapitel beschriebenen Standardreihe auf Basis von nicht isolierter, rein aus Plasma generierter DNA-Standards avisiert werden. Auch zuletzt genannte Variante beruhte auf gepooltem Plasma, das sowohl als Hintergrund als auch für die DNA-Standards fungierte.

Ziel	Umsetzung
Adaptation an interindividuelle Variabilität des Plasmahintergrunds	Personenbezogene Standardreihe auf individuellem Plasmahintergrund
Vereinheitlichung des Plasmahintergrunds auf Gesamtpopulation	Pooling des Plasmahintergrunds Pooling von Plasmahintergrund und rein plasmatischer Standard-DNA

Tabelle 33: Zielsetzung und Durchführung der finalen Etablierung einer Standardreihe zur Quantifizierung von cfDNA

#### 5.1.2.1 Individuen-spezifisch

Primär sollten personenbezogene Standardreihen verwendet werden, um Plasmaproben des gleichen Individuums zu quantifizieren. Daher wurden insgesamt vier Standardreihen, davon jeweils zwei auf Basis des gleichen Individuums etabliert. Die zwei Proben eines Individuums unterschieden sich jeweils noch anhand des Belastungszeitpunktes: Vor und nach Belastung. Verwendet wurden Plasmaproben der Kontrollprobanden aus der Fahrradergometer-Belastungsstudie (s. 4.1). Der Ansatz dieser Standardreihe erfolgte nach dem bisher etablierten Protokoll und mit Standards entsprechend 128-0 ng/ml im Probenansatz. Die verwendeten DNA-Standards wurden mittels NanoDrop 3300 einzeln auf deren DNA-Gehalt getestet. Anhand der Ergebnisse wurden die DNA-Konzentrationen der Standardreihe errechnet. Diese Werte dienten als Referenz zur Validierung der Standardreihen und auch zur Quantifizierung des Nativplasmas.

Für die Quantifizierung wurde nicht die DNA-Konzentration (ng/ml), sondern die absolut enthaltene Menge DNA pro Well (ng) als Referenz der Standardreihe und deren Funktion verwendet. Die Berechnung wurde wie folgend durchgeführt: Die RFU des Nativplasmas wurde in die Funktion der Standardreihe, die auf Basis der gleichen Plasmaprobe etabliert worden war, eingesetzt, und entsprechend der Formel der Funktion einer Subtraktion des Achsenabschnitts und einer Division durch die Steigung der Standardreihe unterzogen. Daraufhin ergab sich die absolute DNA-Menge, die in dieser Plasmaprobe enthalten sein sollte. Diese musste aufgrund der Dilution nach Protokoll (1:10) mit diesem Faktor multipliziert werden. Die Umrechnung in eine relative Konzentration erfolgte durch Division mit dem Well-Volumen (25 µl) und eine Multiplikation mit dem Faktor  $1 \cdot 10^3$  konvertierte diese Konzentration in die final verwendete Einheit ng/ml.

Die erstellten Referenzwerte aus der Messung des NanoDrop 3300 korrelierten statistisch signifikant mit den errechneten Werten der Standards ( $r = 0,999$ ,  $p = 0,03 \cdot 10^{-43}$ ,  $n = 32$ ). Die Werte der Standardreihen wurden durch Subtraktion des Plasmahintergrunds (Standard 0 ng/ml) angepasst. Die durch AD-Fluorometrie erhobenen RFU-Werte der Standardreihen korrelierten sowohl mit der errechneten bzw. erwarteten DNA-Konz. ( $r = 0,974$ ,  $p = 0,06 \cdot 10^{-19}$ ,  $n = 32$ ) als auch mit der durch NanoDrop 3300 überprüften DNA-Konz. ( $r = 0,972$ ,  $p = 0,02 \cdot 10^{-18}$ ,  $n = 32$ ) statistisch signifikant (s. Abbildung 26).

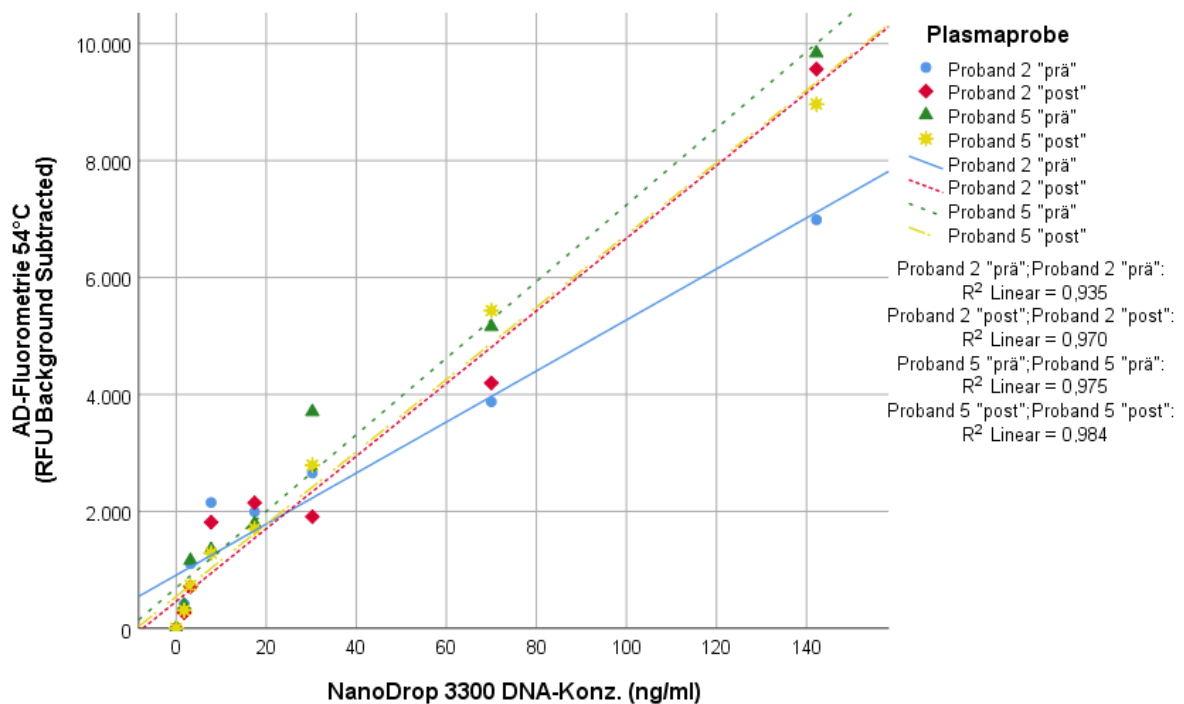


Abbildung 26: Korrelation der Ind.-spezifischen Standardreihen nach direktfluorometrischer und spektroskopischer Messung

Anhand der „personalisiert“ berechneten bzw. quantifizierten Ergebnisse wurde leider deutlich, dass einige der errechneten cfDNA-Konzentrationen im negativen Bereich lagen (s. Abbildung 27). Gleichzeitig bewegten sich auch die errechneten Werte interindividuell auf unterschiedlichen Niveaus der Strahlungsintensität (RFU absolut). Da gleichzeitig die Notwendigkeit pro Individuum eine spezifische Standardreihe etablieren zu müssen, nur eingeschränkt mit dem Ziel einer breiten Anwendung der Messmethodik zu vereinbaren war, wurde diese Art der Quantifizierung für die weitere Arbeit verworfen.

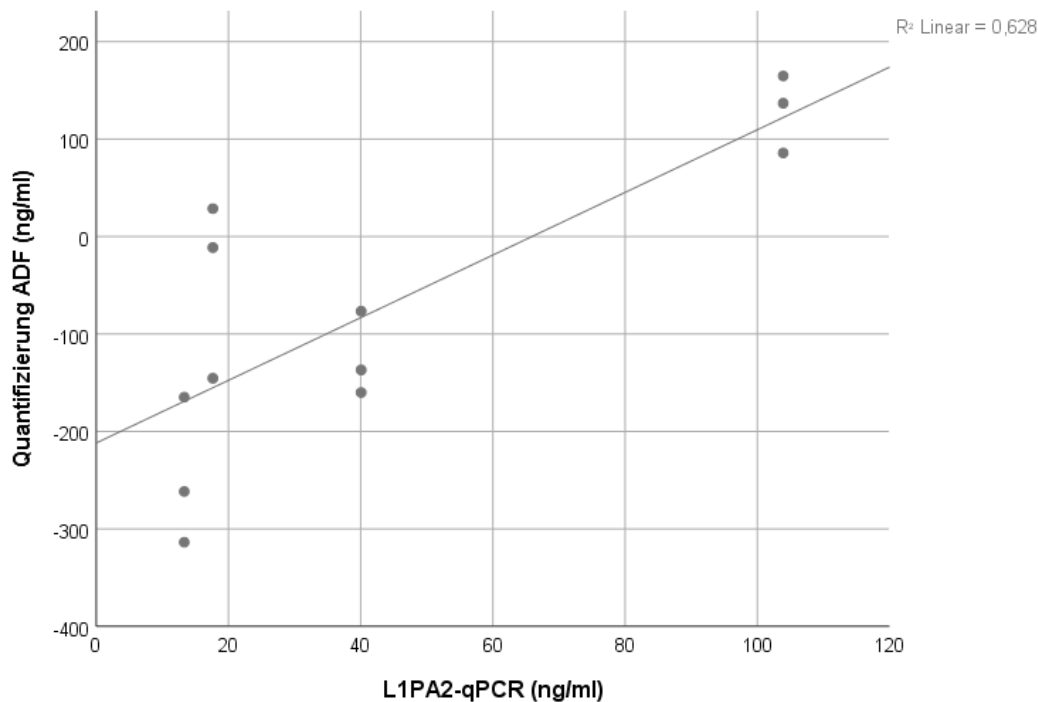


Abbildung 27: Korrelation der Quantifizierung nach ADF (anhand Ind.-spez. Standardreihen) und L1PA2-qPCR

#### 5.1.2.2 Plasma-Pooling

Aufgrund der individuell stark variierenden Ergebnisse hinsichtlich der Standardreihen und quantifizierter cfDNA-Konzentrationen sollte versucht werden eine einheitliche Standardreihe zu etablieren. Das Ganze mit dem Ziel einheitlich positive und realistische quantifizierte Werte zu erhalten.

Im Rahmen der vorherigen Versuche zu Individuen-spezifischen Standardreihen war bereits mit einem Pooling des Plasmas von drei verschiedenen Individuen ein Vergleich mit den jeweils dazugehörigen personalisierten Standardreihen evaluiert worden (s. Anhang 9.2.9). Dabei konnte eine signifikante Korrelation zwischen den probenbezogenen Standardreihen und der Standardreihe auf Basis von Pooling Plasma nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, dass eine Reaktion von Plasmabestandteilen der unterschiedlichen Individuen einen Einfluss auf IcfDNA und die Fluoreszenzentwicklung nehmen könnte, da das Pooling vor Dilution und der weiteren Prozessierung stattfindet.

Weiter sollte aufgrund der richtungsweisenden Ergebnisse durch Proteolyse getestet werden, ob sich mit dieser auch in Pooling-Plasma eine nochmal bessere Reduktion der Fluoreszenz-interferierenden Plasmabestandteile erreichen ließ. Die

Standardreihe nach Proteolyse (und entsprechend enzymatischer DNase-Inaktivierung) und die daraus resultierende Quantifizierung wurde daher einer Standardreihe ohne Proteinase-Verdau (und entsprechend chemische DNase-Inaktivierung mittels EDTA) und deren Quantifizierungswerten gegenübergestellt und verglichen. Die Standardreihen wurden jeweils in Triplikaten angesetzt und gemessen. Das Pooling-Plasma, bestehend aus 12 Proben von 5 verschiedenen Kontrollprobanden und unterschiedlichen Belastungszeitpunkten, wurde äquivalent für beide Standardreihen verwendet. Die Zusammensetzung der Reagenzien für die Standardreihen wurde unverändert übernommen, als Referenzwerte der Standards diente eine Messung mittels NanoDrop 3300. Als Nativproben, die letztlich quantifiziert werden sollten, dienten ebenfalls die Plasmaproben, die den Plasma-Pool darstellten. Diese Nativproben wurden in „+EDTA“/“Ø-ProtK“-Standardreihen unverändert als pures Plasma angesetzt, für die „ProtK“-Standardreihen wurden die Nativproben zusätzlich angepasst, indem sie ebenfalls einem Protein-Verdau unterzogen wurden (s. Tabelle 34). Als Referenz der Nativproben wurden Messwerte der L1PA2-qPCR dieser Proben herangezogen. Das sonstige Messprotokoll wurde unverändert beibehalten.

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Well (25 µl)</b>	<b>Konzentration in Well (25 µl)</b>
Plasma/Template	2,0 µl	0,08x
H <sub>2</sub> O	15,8 µl	
Proteinase K (20mg/ml)	2,2 µl	1,92 mg/ml
SYBR Green (5x)	5,0 µl	1x

Tabelle 34: Finales Protokoll für Zusammensetzung und Konzentration der Reagenzien zur Quantifizierung von Plasmaproben

Für diesen Test war es möglich, die Standardreihen mittels einer Subtraktion des Hintergrunds, präsentiert durch die Strahlungsintensität des gepoolten Nativplasmas, anzupassen. Dieser Wert stellte jeweils den Standard ohne DNA (0 ng/ml) dar. Beide Varianten der Standardreihen auf Basis von äquivalenten Pooling-Plasma korrelierten signifikant mit den Referenzwerten des NanoDrop 3300, die durch Messung der verwendeten DNA-Standards ermittelt worden waren (s. Tabelle 35).

	<b>Standardreihe „+EDTA“ (Pooling-Plasma)</b>	<b>Standardreihe „+ProtK“ (Pooling-Plasma)</b>
<b>NanoDrop 3300 DNA-Konz. (ng/ml)</b>	r = 0,979	r = 0,999
	p = 0,001	p = 0,003•10 <sup>-3</sup>
	n = 6	n = 6

Tabelle 35: Parameter der Korrelation zwischen Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma und mittels NanoDrop 3300 ermittelter DNA-Konz. der Standards

Weiter korrelierten die fluorometrischen Ergebnisse der beiden Varianten der Standardreihen („+EDTA“, „+ProtK“) untereinander statistisch signifikant (r = 0,985, p = 0,04•10<sup>-2</sup>, n = 6).

Die Parameter der Anpassungsgeraden für diese beiden Varianten an Standardreihen, sowie deren Bestimmtheitsmaß sind in folgender Tabelle 36 dargestellt.

	<b>Standardreihe „+EDTA“</b>	<b>Standardreihe „+ProtK“</b>
<b>Steigung m (RFU/(ng/ml))</b>	56,11	42,46
<b>Achsenabschnitt y (RFU Background-Subtracted)</b>	2750	1090
<b>Bestimmtheitsmaß R<sup>2</sup></b>	0,959	0,979

Tabelle 36: Parameter der linearen Funktionen und Bestimmtheitsmaß korrelierter Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma (im Vergleich zwischen chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung)

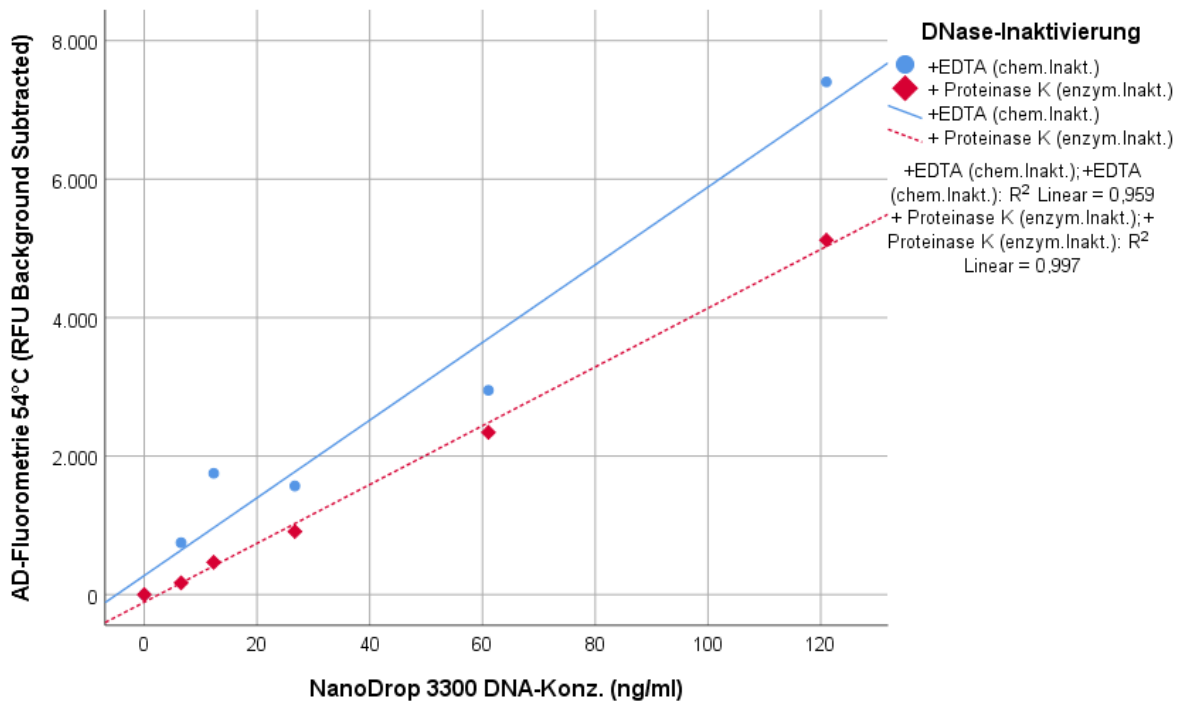


Abbildung 28: Korrelation der auf Basis von Pooling-Plasma generierten Standardreihen nach direktfluorometrischer und spektroskopischer Messung und im Vergleich von chemischer gegen enzymatische DNase-Inaktivierung

Die nach der gleichen rechnerischen Methode wie in Abschnitt 5.1.3.1 quantifizierten Werte wurden für beide Varianten der Standardreihen mit den Referenzwerten aus L1PA2-qPCR korreliert und für diese beiden Varianten verglichen. Hierbei ergab sich nur für die quantifizierten Werte, die mittels Standardreihen und Plasma, welche zuvor einem Protein-Verdau unterzogen worden waren, eine signifikante Korrelation zu den Konzentrationswerten der L1PA2-qPCR (s. Tabelle 37). Auch das Bestimmtheitsmaß dieser Variablen zeigte einen stärkeren linearen Zusammenhang für diese Variante der Quantifizierung auf („+EDTA“:  $R^2 = 0,364$ ; „+Proteinase K“:  $R^2 = 0,688$ ).

	<b>Quantifizierung</b> nach Standardreihe: „+EDTA“	<b>Quantifizierung</b> nach Standardreihe: „+Proteinase K“
<b>L1PA2-qPCR (ng/ml)</b>	$r = 0,603$	$r = 0,829$
	$p = 0,114$	$p = 0,021$
	$n = 8$	$n = 8$

Tabelle 37: Parameter der Korrelation zwischen nach ADF (anhand Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma) quantifizierter DNA-Konz. und L1PA2-qPCR



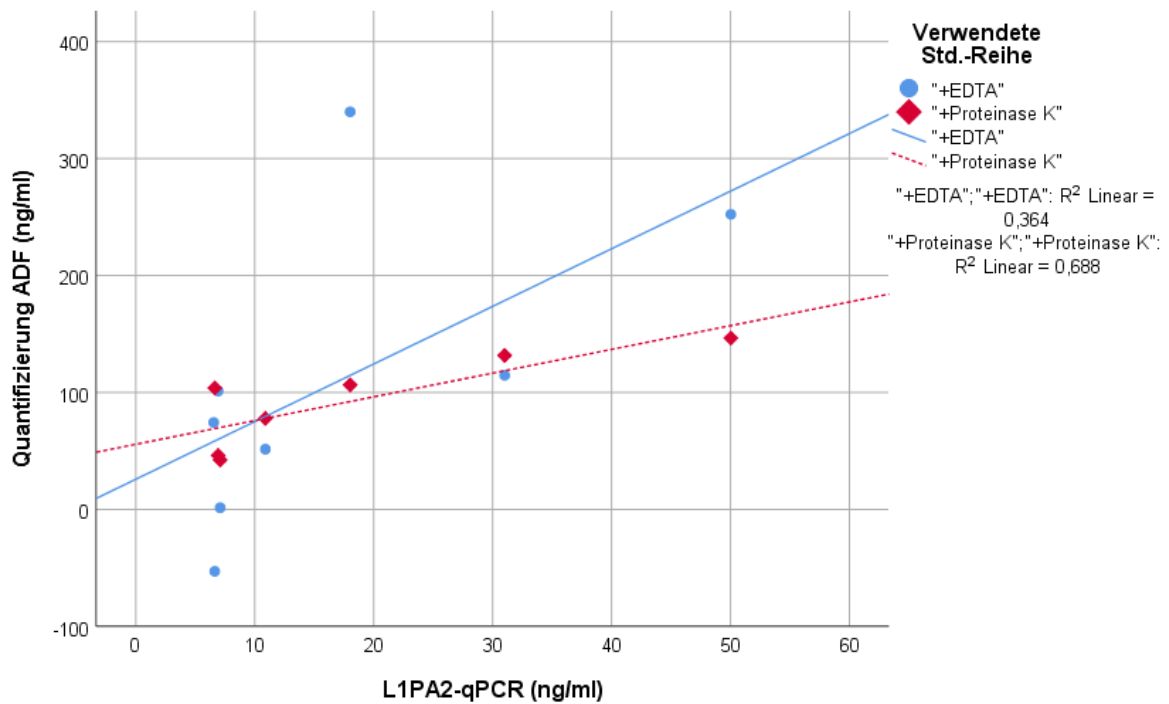


Abbildung 29: Korrelation der Quantifizierung nach ADF (anhand Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma) und L1PA2-qPCR

Gleichzeitig wurden die Quantifizierungswerte in Abhängigkeit der Belastungskinetik in ihren Mittelwerten graphisch den Ergebnissen der L1PA2-qPCR gegenübergestellt und verglichen. Aufgrund der zu geringen Stichprobengröße pro Belastungszeitpunkt konnte kein statistischer Test durchgeführt werden, um eine sichere Differenzierung dieser Kinetik zu belegen. Im Vergleich zu L1PA2-qPCR zeigten sich jedoch deutlich höhere errechnete Konzentrationswerte (s. Abbildung 30).

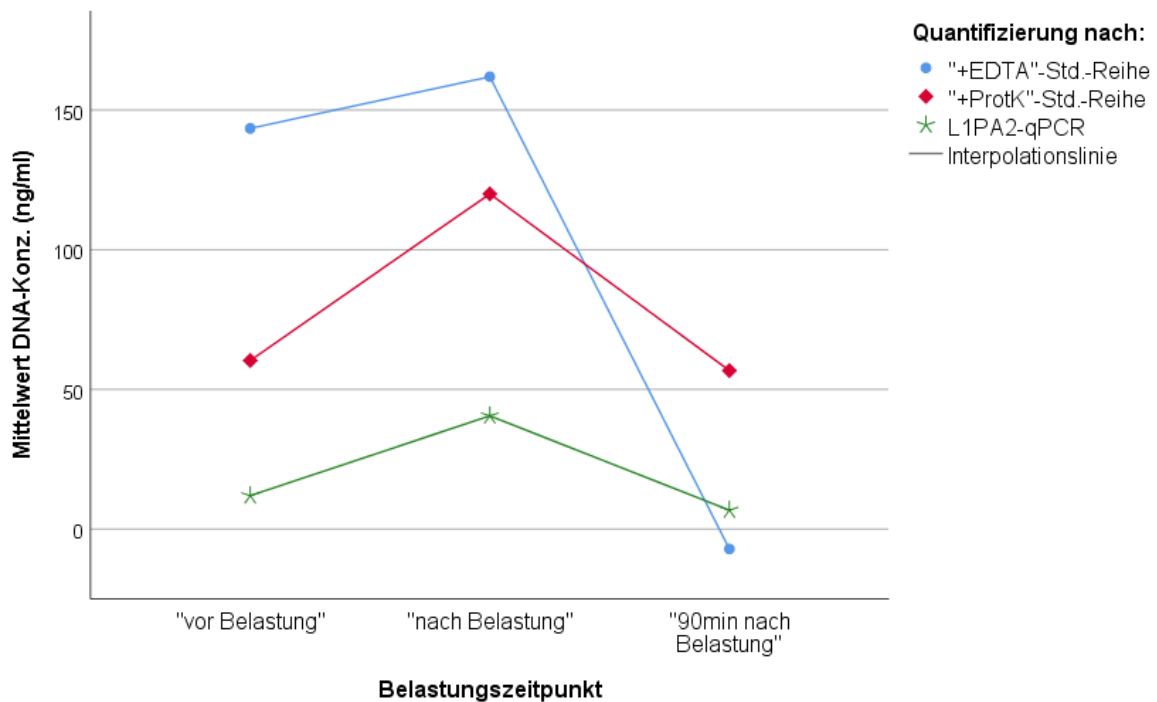


Abbildung 30: Dynamik zellfreier DNA unter Belastung im Vergleich der zur Quantifizierung verwendeten Methodik

Die Standardreihe auf Basis von proteolysierten Pooling-Plasma zur Quantifizierung des Nativplasmas zu verwenden, wurde anhand der vorliegenden Ergebnisse als mindestens gleichwertig zu der Quantifizierung aus Individuen-spezifischen Standardreihen interpretiert. Gleichzeitig ließ sich diese mit einem geringeren Aufwand herstellen als viele einzelne Standardreihen und wurde auch aufgrund dieses praktischen Vorteils für die weiteren Messungen in dieser Form angewendet. Jedoch erlaubte auch diese Variante der Quantifizierung aufgrund mäßiger Korrelationen sowie negativen Werten keine Berechnung, die man als gleichwertig zu etablierter Methodik wie der L1PA2-qPCR Berechnung bezeichnen hätte können.

Auch anhand der Standardreihe auf Basis von variierend konzentrierten Plasmaproben (s. 5.1.1.2.2) sollten native Plasmaproben quantifiziert werden. Dabei wurden die für das Pooling der Standardreihen verwendeten Proben, sowie das gepoolte Plasma selbst als Nativplasma verwendet. Auch für diese Variante wurde gleichzeitig nochmals überprüft, ob sich ein Protein-Verdau des Pooling-Plasmas und der Nativproben sinnvoll hinsichtlich einer Individuums-unabhängigen Quantifizierung auswirken könnte.

Die aus den Standardreihen und Messungen der Nativproben quantifizierten Konzentrationswerte für die Proben des Pooling-Plasmas wurden mit den Referenzwerten dieser Proben aus L1PA2-qPCR verglichen. Dabei ergaben sich für

beide Varianten der Standardreihen signifikante Korrelationen (s. Tabelle 38). Das Bestimmtheitsmaß der in graphischer Darstellung angezeigten Anpassungsgeraden wies als Parameter linearer Regression ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,782$  für die Quantifizierung nach Standardreihe ohne Protein-Verdau und ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,864$  für die Quantifizierung nach Standardreihe mit Protein-Verdau auf.

	Quantifizierung nach Standardreihe: „Ø Proteinase K“	Quantifizierung nach Standardreihe: „+ Proteinase K“
<b>L1PA2-qPCR (ng/ml)</b>	$r = 0,884$	$r = 0,930$
	$p = 0,004$	$p = 0,001$
	$n = 8$	$n = 8$

Tabelle 38: Parameter der Korrelation zwischen nach ADF (anhand Standardreihen mit aus Pooling-Plasma generierten Standards) quantifizierter DNA-Konz. und L1PA2-qPCR

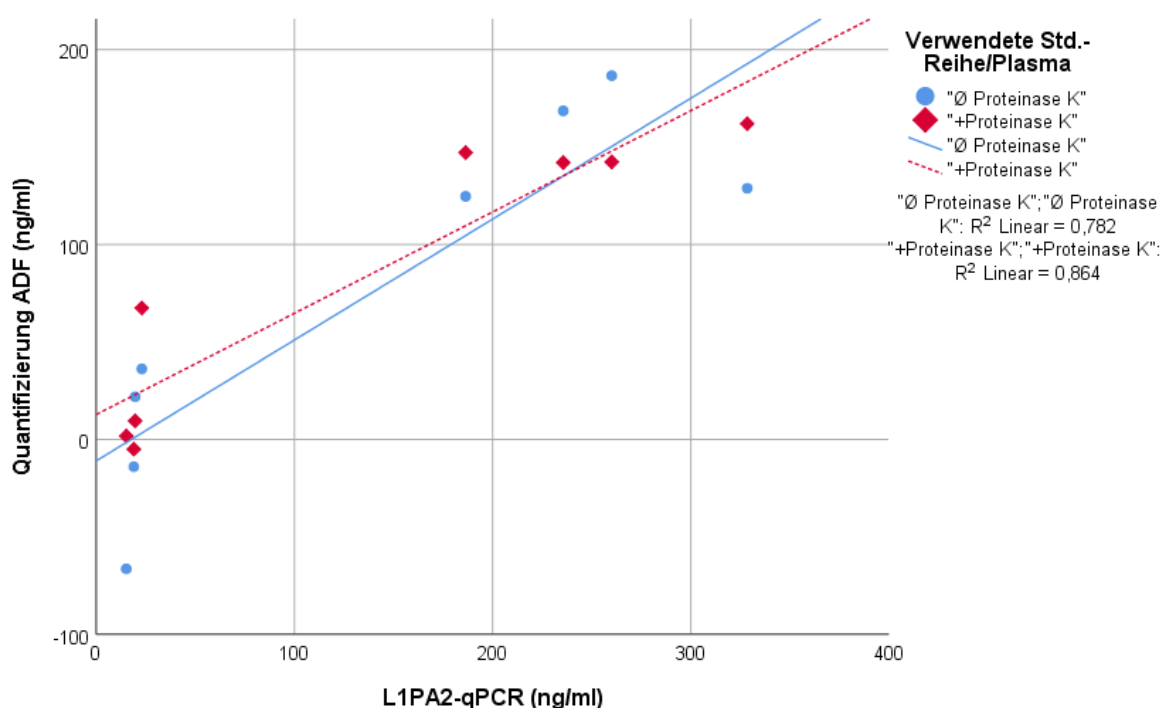


Abbildung 31: Korrelation der Quantifizierung nach ADF (anhand von Standardreihen mit aus Pooling-Plasma generierten Standards) und L1PA2-qPCR

Aufgrund der in Abbildung 31 dargestellten Ergebnisse mit vor allem starker Abweichung der quantifizierten Werte von den Referenzwerten als auch negativ errechneten Werten wurde die Methodik einer Quantifizierung anhand einer Standardreihe ohne DNase-Verdau auf Basis von hochkonzentriertem bzw. niedrigkonzentrierten Pooling-Plasma verworfen.

### 5.1.3 Relative Quantifizierung

Die Genauigkeit der absoluten Quantifizierung in den vorigen Abschnitten stellte sich trotz Protein-Verdau mit starken interindividuellen Unterschieden sowie teils starken Abweichungen zu Referenzmessungen der L1PA2-qPCR dar. Gleichzeitig war es nur möglich Proben aus dem verwendeten Plasma-Pool der Standardreihe adäquat zu quantifizieren. Proben, die dabei außerhalb der Standardabweichung lagen, wurden oft falsch hoch oder falsch niedrig quantifiziert. Speziell gering konzentrierte Plasma-Proben konnten nur auf einem einheitlichen unpräzisen Niveau quantifiziert und nicht sicher untereinander differenziert werden. Da sich die absolute Quantifizierung über diese Art der entwickelten Methode insgesamt nicht vollends etabliert zeigte, sollte sich der Fokus dieser Arbeit auf die Darstellung der Dynamik zellfreier DNA unter Belastungssituationen richten. Dies wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit als „relative Quantifizierung“ bezeichnet. Als Belastungssituation wurde die sportliche Betätigung, die die Probanden (Kontrollpatienten und Tumorpatienten) der Belastungsstudie von Dr. Ehlert absolvierten (266), gewertet. Die Darstellung der individuellen Kinetik war zu Anfang der Versuchsreihen zur Methoden-Etablierung bereits qualitativ betrachtet worden und sollte in diesem Versuch mittels der etablierten Proteolyse nochmals verbessert werden. Hierfür wurde das bisher etablierte Protokoll zu Ansatz von Nativproben unverändert übernommen. Als Plasma dienten Proben der bekannten Fahrradergometer-Belastungsstudie von insgesamt 8 verschiedenen Individuen. Diese unterteilten sich in 5 gesunde Kontrollprobanden und 3 Tumorpatienten. Alle Nativproben wurden jeweils unter Zugabe von Proteinase K und einmal ohne diesen Prozess angesetzt. Als Referenzwerte dienten Ergebnisse der L1PA2-qPCR.

Für beide Varianten der Probenverarbeitung zeigte sich eine statistisch signifikante Korrelation der AD-Fluorometrie mit den Referenzergebnissen der L1PA2-qPCR, wobei die Ergebnisse der Plasmaproben, die einem Protein-Verdau unterzogen worden waren, insgesamt höhere Korrelationswerte aufwies (s. Tabelle 39). Weiter zeigte sich deren Bestimmtheitsmaß in linearer Regresson mit den Ergebnissen der L1PA2-qPCR ( $R^2 = 0,705$ ) höher als das der Proben, die keinem Protein-Verdau unterzogen worden waren ( $R^2 = 0,389$ ). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die weitere statistische Analyse nur für die Proben, die mit Proteinase K behandelt worden waren, durchgeführt.

	<b>AD-Fluorometrie (54 °C, RFU absolut) „Ø Proteinase K“</b>	<b>AD-Fluorometrie (54 °C, RFU absolut) „+ Proteinase K“</b>
<b>L1PA2-qPCR (ng/ml)</b>	$r = 0,624$	$r = 0,839$
	$p = 0,001$	$p = 0,003 \cdot 10^{-4}$
	$n = 24$	$n = 24$

Tabelle 39: Parameter der Korrelation zwischen L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie anhand der Messung von Plasmaproben einer physikalischen Belastungsstudie

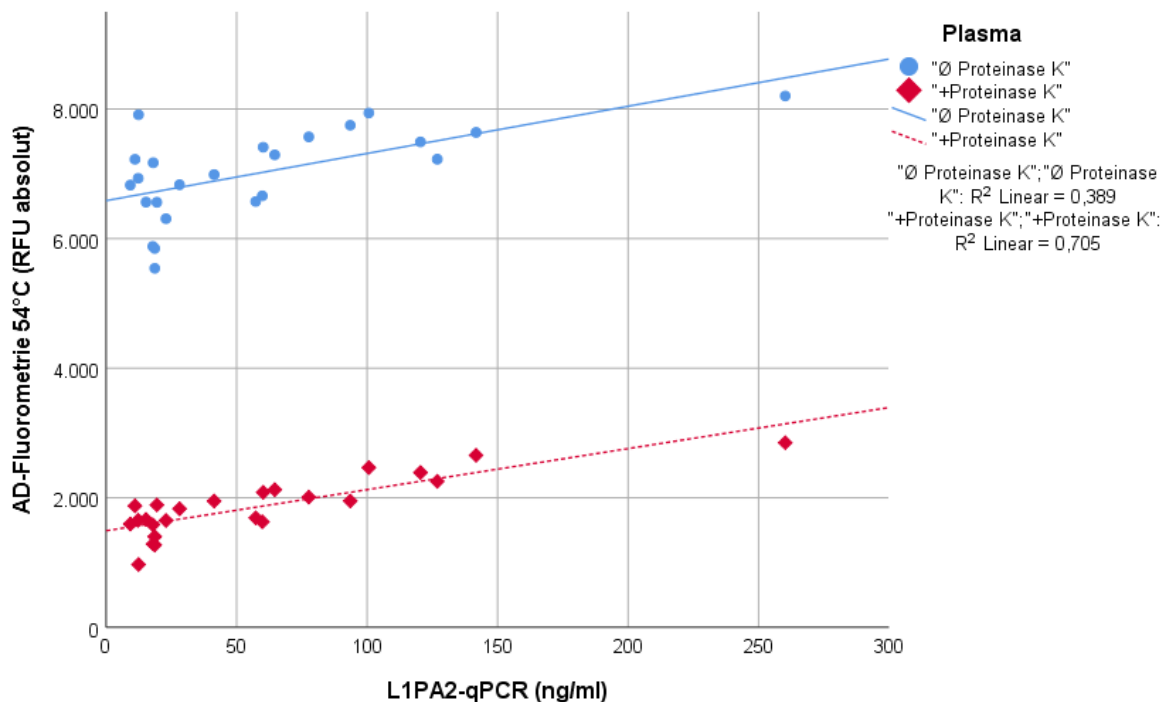


Abbildung 32: Korrelation der verwendeten Methodik im Vergleich proteolyzierter und nativer Plasmaproben einer physikalischen Belastungsstudie

Des Weiteren zeigte sich, dass diese signifikante Korrelation für beide Probandengruppen galt und sich dementsprechend unabhängig des Gesundheitszustandes darstellte (s. Tabelle 40).

	<b>„+ Prot. K, Kontrollprobanden“ AD-Fluorometrie (54 °C, RFU absolut)</b>	<b>„+ Prot. K, Tumorpatienten“ AD-Fluorometrie (54 °C, RFU absolut)</b>
<b>L1PA2-qPCR (ng/ml)</b>	$r = 0,797$	$r = 0,896$
	$p = 0,04 \cdot 10^{-2}$	$p = 0,001$
	$n = 15$	$n = 9$

Tabelle 40: Parameter der Korrelation zwischen L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie abhängig des Probandentypus

Letztendlich war es möglich die relative Kinetik der Konzentration, die aus physiologischer Belastung resultierte, für jedes Individuum einzeln darzustellen. Die folgenden Grafiken (s. Abbildung 33, Abbildung 34) zeigen, dass aufgrund eines uneinheitlichen Hintergrunds der Plasmaproben diese Konzentrationsänderung zellfreier DNA, sich auch nach Protein-Verdau des Plasmas auf einem stark unterschiedlichen RFU-Niveau darstellen. Gleichmaßen erkennt man anhand der Grafiken nochmals deutlich, dass sich die Ergebnisse der fluorometrischen Methoden zur Detektion von cfDNA hinsichtlich derer Dynamik unter Belastung gleichgerichtet präsentieren.

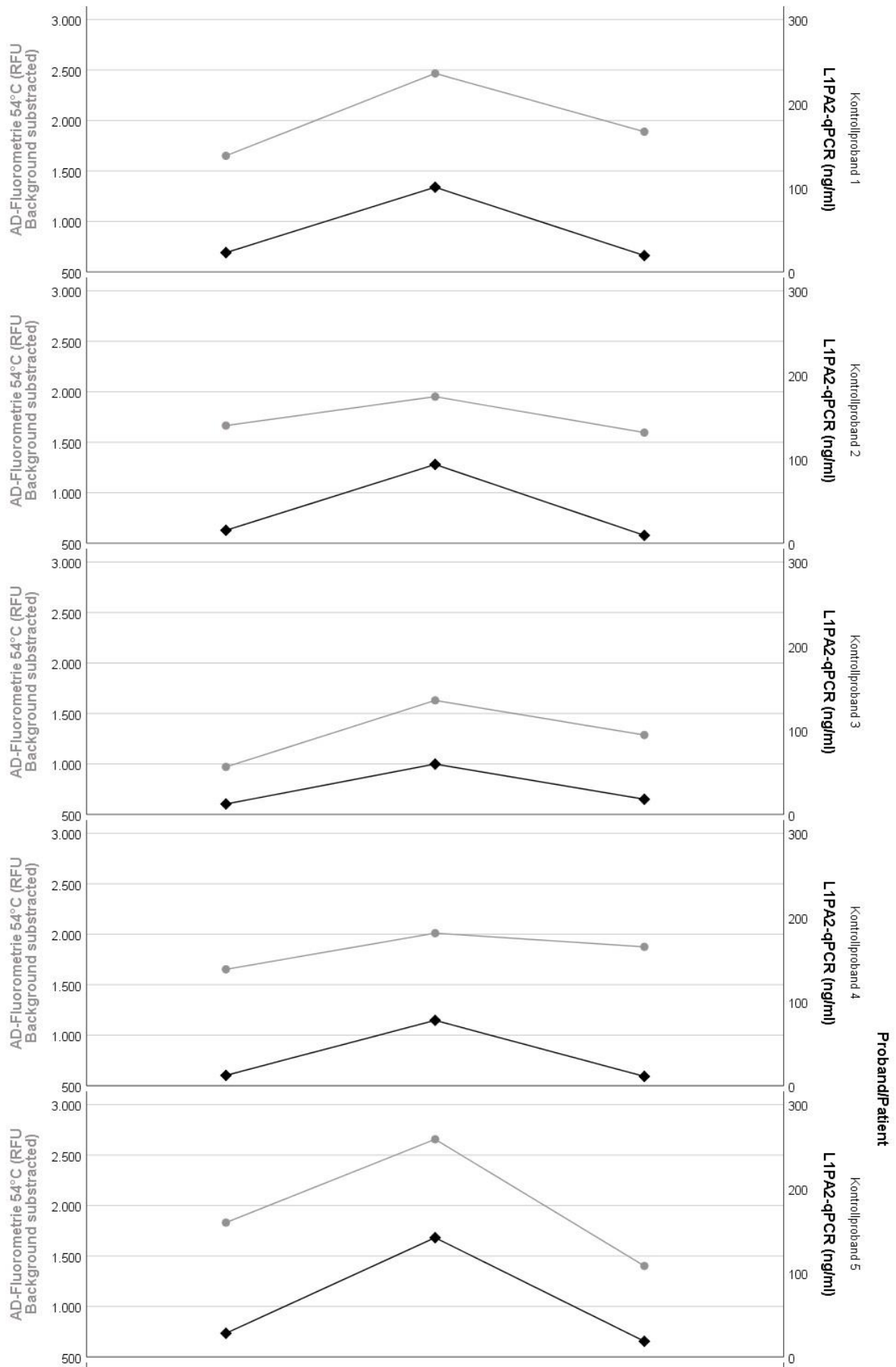


Abbildung 33: Vergleich der Methoden anhand der relativen Dynamik zellfreier DNA unter physikalischer Belastung (Kontrollprobanden)

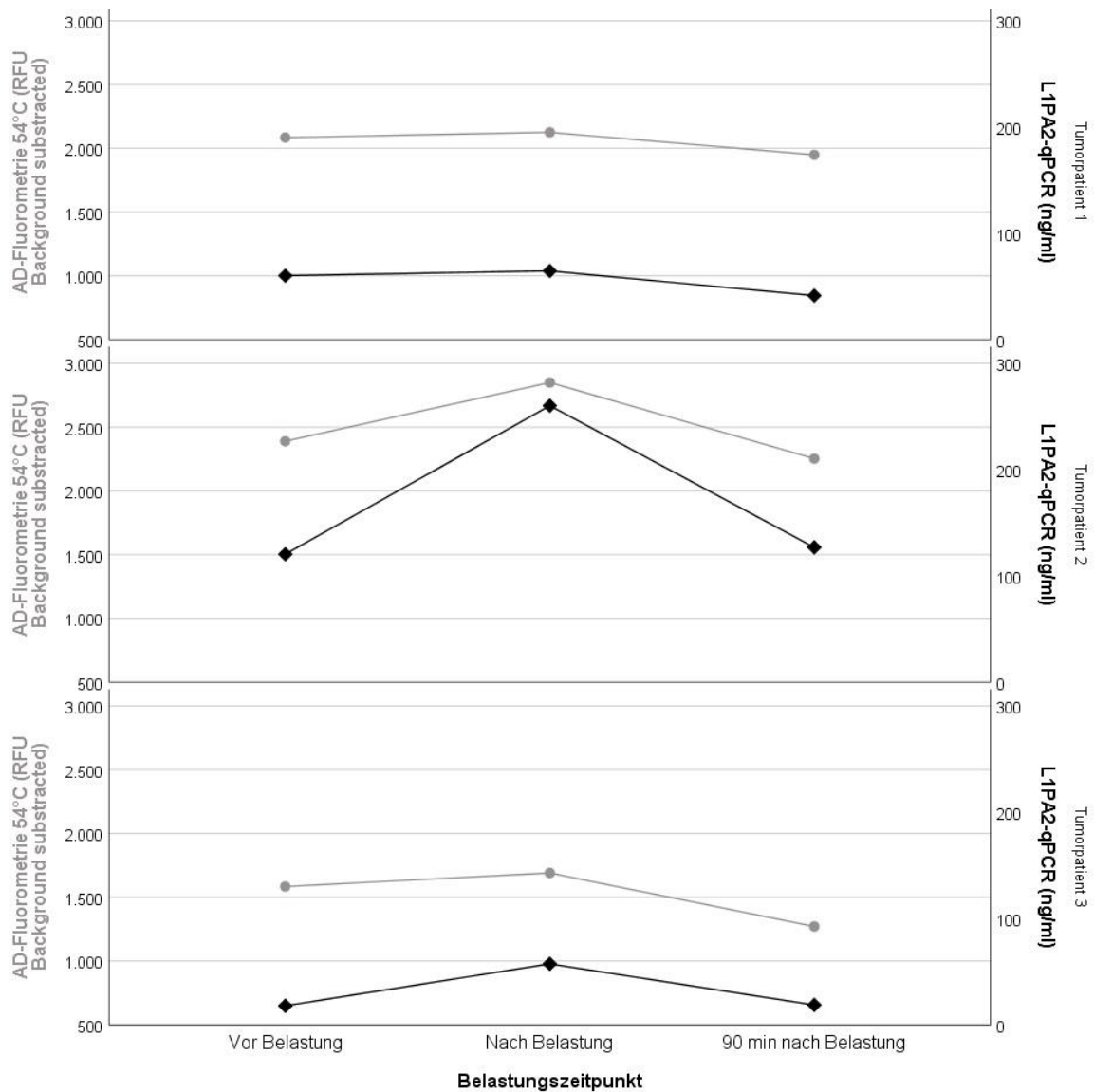


Abbildung 34: Vergleich der Methoden anhand der relativen Dynamik zellfreier DNA unter physikalischer Belastung (Tumorpatienten)

Das finale Protokoll der Amplifikationsunabhängigen Direkt-Fluorometrie von Plasmaproben stellte sich entsprechend der zuvor dargestellten Etablierungsschritte wie folgend zusammen (s. Abbildung 35):



Abbildung 35: Finales Arbeitsschema zur Prozessierung und Analyse von Plasma (AD-Fluorometrie)

Da letzten Endes die Etablierung einer Standardreihe, mit deren Hilfe eine präzise Quantifizierung erfolgen sollte, nicht erfolgreich war, sollte dieses Protokoll zur rein qualitativen Auswertung einer klinischen Studie angewendet werden (s. 5.2)



## 5.2 Relative Quantifizierung der perioperativen Dynamik zellfreier DNA bei Resektion benigner und maligner Kolorektaltumoren

Die zuvor etablierte relative Quantifizierung sollte durch Messung von Proben einer klinischen Studie auf dessen Sensitivität gegenüber der L1PA2-qPCR evaluiert werden. Bei dieser klinischen Studie handelte es sich um die Untersuchung des Blutplasmas von Patienten, die sich einer operativen kolorektalen Resektion Ausmaßes unterzogen (266). Darunter befanden sich Patienten mit benignen (Kontrollgruppe, n = 3), als auch Patienten mit malignen GIT-Entartungen (Tumorpat., n = 7), welche jeweils eine operative Resektion indizierten. Die venösen Blutabnahmen fanden zu 8 definierten Zeitpunkten über einen Zeitraum von einem Tag präoperativ bis zu drei Tage postoperativ statt. Der Fokus lag dabei darauf, die Dynamik zellfreier DNA über diesen Zeitraum zu erfassen und zu analysieren.

Die Messung dieser Plasmaproben erfolgte mittels der in Abschnitt 5.1 etablierten Amplifikationsunabhängigen Direkt-Fluorometrie. Dabei wurde nicht das Ziel einer absoluten Quantifizierung mittels Standardreihe verfolgt, sondern die Erfassung der Rohdaten zur Abbildung der relativen Dynamik. Diese Ansätze wurden in Triplikaten angefertigt und gemessen. Gleichzeitig wurden die Plasmaproben nach in Abschnitt 4.3.2 beschriebenen Protokoll mit der L1PA2-qPCR absolut quantifiziert (s. Abbildung 36). Die Ergebnisse dieser Messungen dienten als Referenz der AD-Fluorometrie. Für jede der im folgenden Kapitel vorgestellten klinischen Endpunkte sollte auch eine Gegenüberstellung der zwei Methoden erfolgen, um die AD-Fluorometrie hinsichtlich ihrer Sensitivität zu beurteilen.



Abbildung 36: Arbeitsschema zur Gegenüberstellung der AD-Fluorometrie und L1PA2-qPCR anhand der relativen Quantifizierung perioperativer Plasmaproben

Primär sollte die individuelle Kinetik der einzelnen Patienten im perioperativen Verlauf qualitativ betrachtet werden (s. Abbildung 37, Abbildung 38). Rein anhand der graphischen Gegenüberstellung ließen sich auch für die Proben dieser Studie eine sehr hohe Übereinstimmung der verwendeten Methoden feststellen. Diese sollen im nächsten Kapitel (s. 5.2.1) statistisch belegt werden.

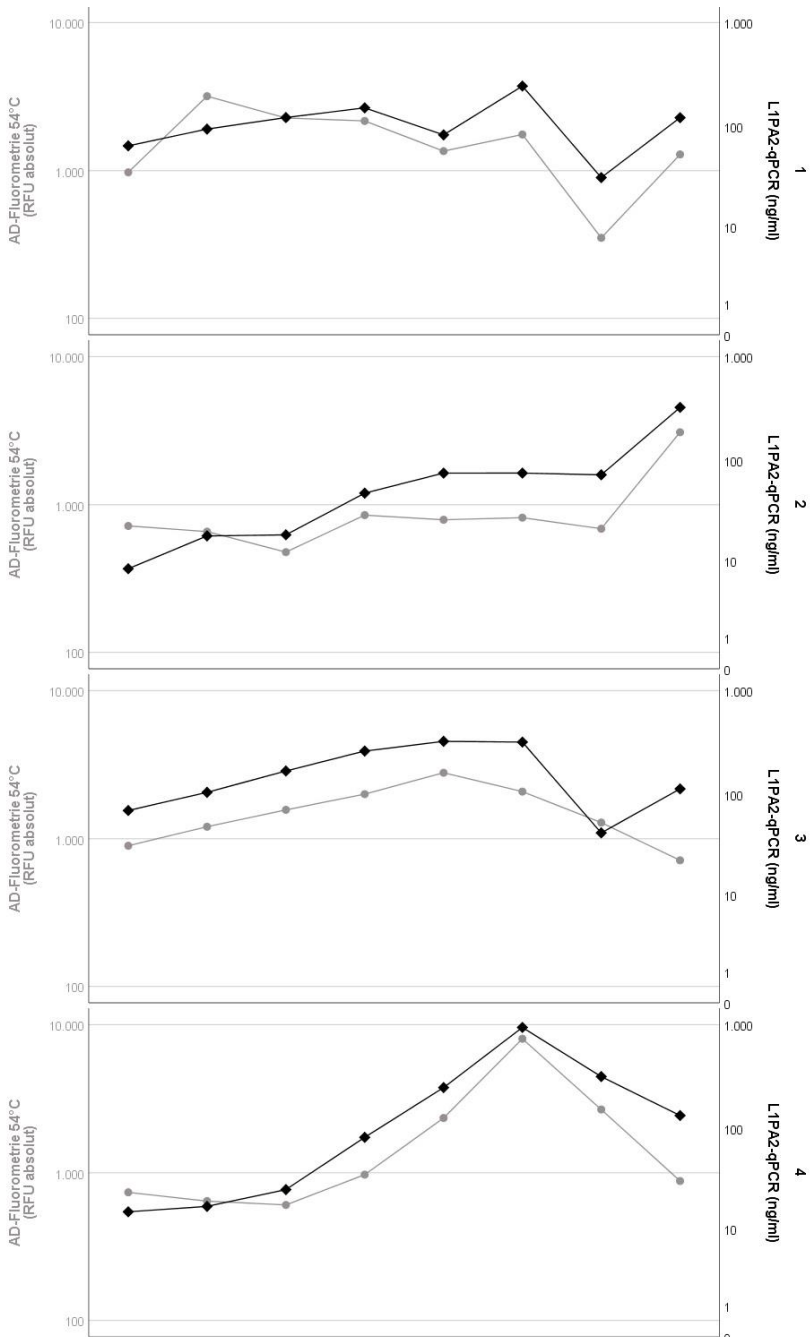


Abbildung 37: Vergleich der Methoden anhand der relativen Dynamik zellfreier DNA unter operativer Resektion (Patient 1-4)

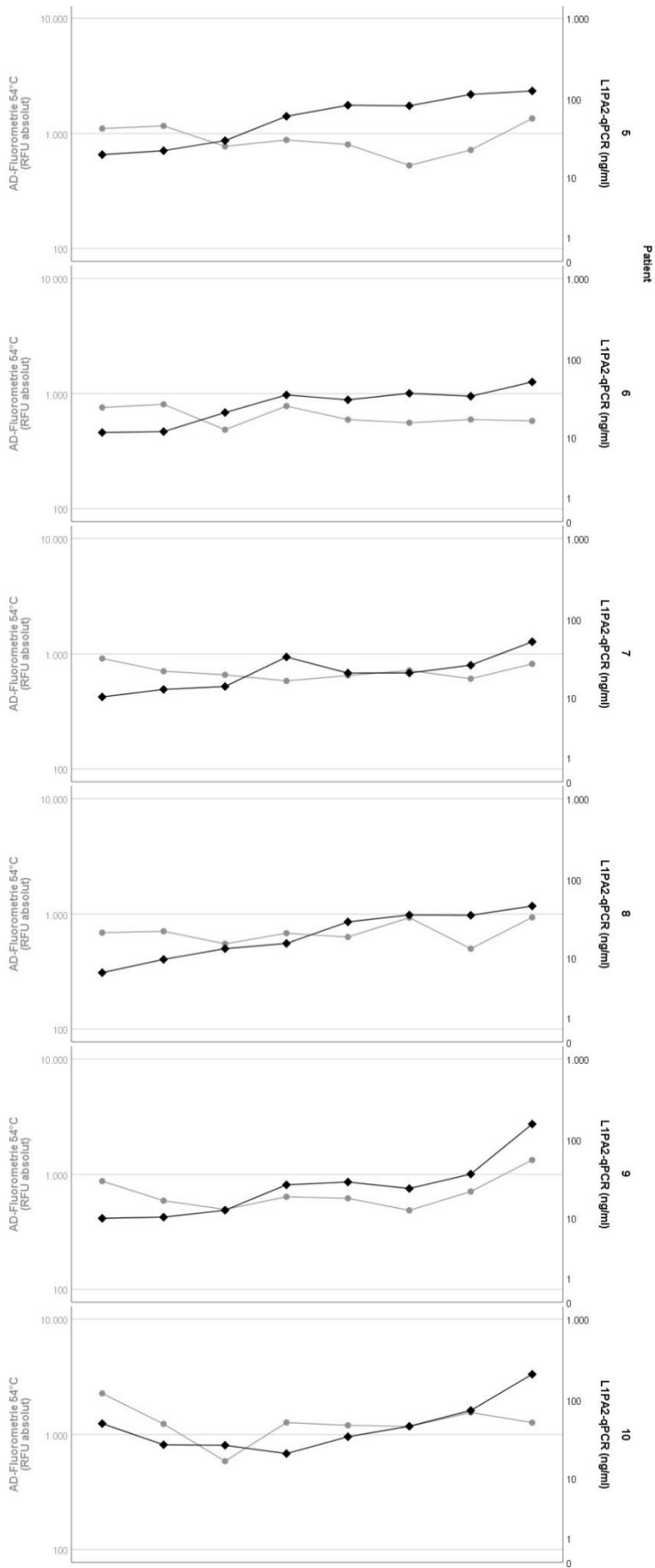


Abbildung 38: Vergleich der Methoden anhand der relativen Dynamik zellfreier DNA unter operativer Resektion (Patient 5-10)

### 5.2.1 Analyse der verwendeten Methodik anhand klinischer Endpunkte

Über alle Patienten und Zeitpunkte hinweg korrelierten die Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie zur Erfassung zellfreier DNA in Plasma statistisch signifikant ( $r = 0,908$ ,  $p = 0,04 \cdot 10^{-29}$ ,  $n = 80$ ). Das Bestimmtheitsmaß als Gütemaß linearer Regression war dabei  $R^2 = 0,528$  (s. Abbildung 39).

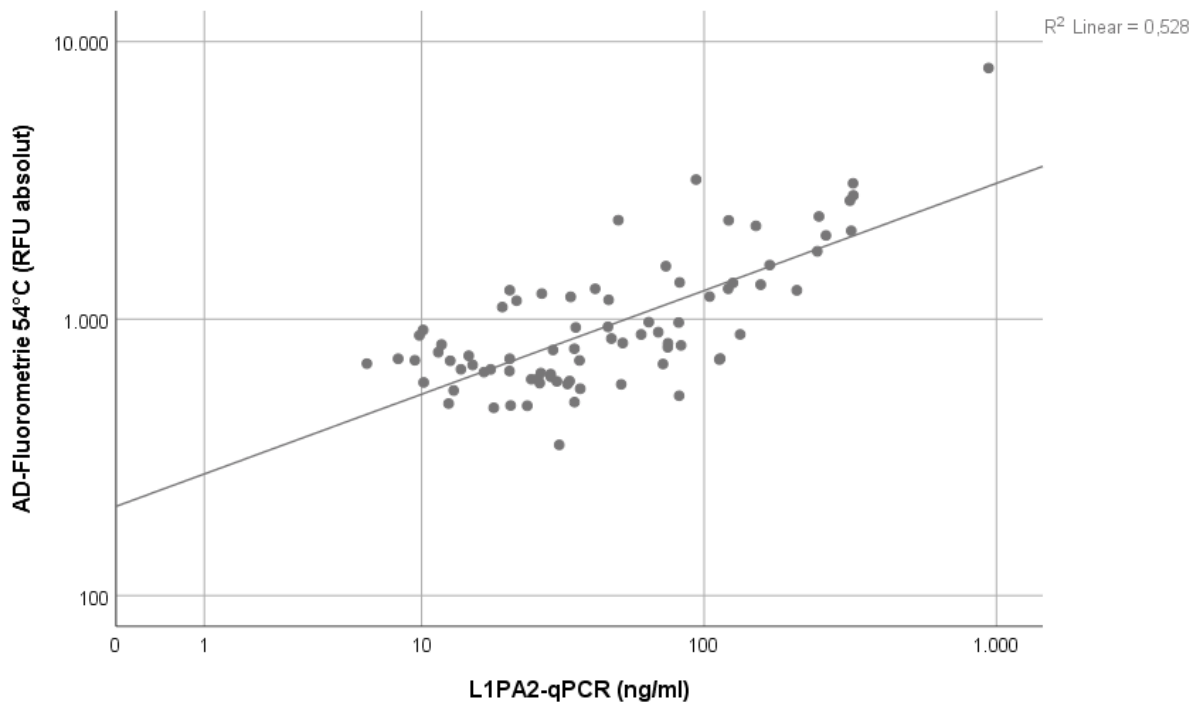


Abbildung 39: Korrelation der Methoden anhand Gesamtheit der prä-/intra-/ und postoperativ einer kolorektalen Tumorresektion akquirierten Plasmaproben

#### 5.2.1.1 Perioperative Dynamik

Weiter wurde für die jeweiligen Zeitpunkte einzeln eine Korrelationsanalyse zwischen den beiden zu vergleichenden Methoden durchgeführt. Hierbei ergab sich für jeden Zeitpunkt bis auf die Probenentnahme am Tag vor der geplanten Op („1d präOP“) eine statistisch signifikante Korrelation (s. Tabelle 41). Die beste Korrelation ergab sich für den Zeitpunkt zum Ende der operativen Resektion („OP-Ende“).

<b>Zeitpunkt:</b> „Operative Resektionsstudie“	<b>Bivariate Korrelation:</b> „L1PA2-qPCR (ng/ml)“ – „AD-Fluorometrie 54 °C (RFU absolut)“
1d präOP	r = 0,441 p = 0,202 n = 10
ZVK-Anlage	r = 0,731 p = 0,016 n = 10
1. Hautschnitt	r = 0,875 p = 0,001 n = 10
Intra-operativ	r = 0,842 p = 0,002 n = 10
finale Resektion	r = 0,957 p = 0,014*10 <sup>-3</sup> n = 10
OP-Ende	r = 0,984 p = 0,003*10 <sup>-4</sup> n = 10
3h postOP	r = 0,864 p = 0,001 n = 10
24h/72h postOP	r = 0,891 p = 0,001 n = 10

Tabelle 41: Parameter der Korrelation zwischen AD-Fluorometrie und L1PA2-qPCR nach Zeitpunkt der perioperativen Probenentnahme

Gleichermaßen ergaben sich diese Differenzen in grafischer Darstellung der Mittelwerte zwischen L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie mit Fokus auf die Zeit vor der

operativen Resektion. Hier weisen die Methoden teilweise gegengleiche Verläufe auf (s. Abbildung 40).

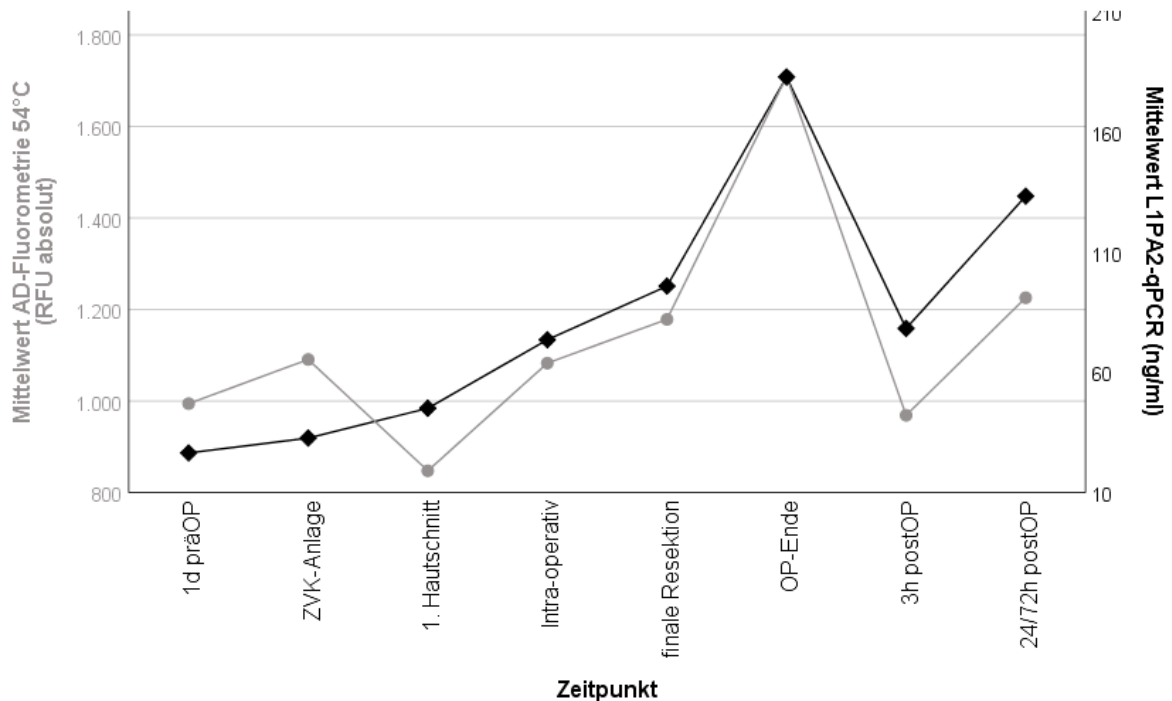


Abbildung 40: Vergleich der Methoden anhand der perioperativen Dynamik zellfreier DNA (jeweils Mittelwerte aller Patienten)

### 5.2.1.2 Tumor-Dignität

Weiter wurden die vorliegenden Ergebnisse für die Patientengruppen („Kontrollpat.“, „Tumorpat.“) einzeln betrachtet und gegenübergestellt. Hierbei ergaben sich, je nach verwendeter Quantifizierungsmethode, folgende Parameter über die jeweils eingeschlossenen Patienten:

<u>L1PA2-qPCR (ng/ml)</u>	<b>Kontrollpat.</b>	<b>Tumorpat.</b>
<b>M</b>	25,7	108,1
<b>med</b>	23,8	70,8
<b>SD</b>	13,7	143,86

Tabelle 42. Statistische Kenngrößen der cfDNA-Messung abhängig der Tumor-Dignität (L1PA2-qPCR)

<u>AD-Fluorometrie (RFU)</u>	<b>Kontrollpat.</b>	<b>Tumorpat.</b>
<b>M</b>	686,6	1330,4
<b>med</b>	671,1	973,6
<b>SD</b>	128,7	1146,4

Tabelle 43: Statistische Kenngrößen der RFU-Messung abhängig der Tumor-Dignität (AD-Fluorometrie)

Der durch L1PA2-qPCR quantifizierte Mittelwert der Tumorpatienten zeigte sich dabei nach Mann-Whitney-U-Test signifikant höher als der Mittelwert der Kontrollpatienten ( $U = 1051,5$ ,  $z = 3,984$ ,  $p = 0,07 \cdot 10^{-3}$ ,  $n = 80$ ; M und SD (s. Tabelle 42)). Die Ergebnisse der ADF wiesen diese signifikante Differenz zwischen den Patientengruppen nach Mann-Whitney-U-Test ebenfalls und in gleicher Richtung auf ( $U = 1035,0$ ,  $z = 3,811$ ,  $p = 0,01 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 80$ ; M und SD s. Tabelle 43).

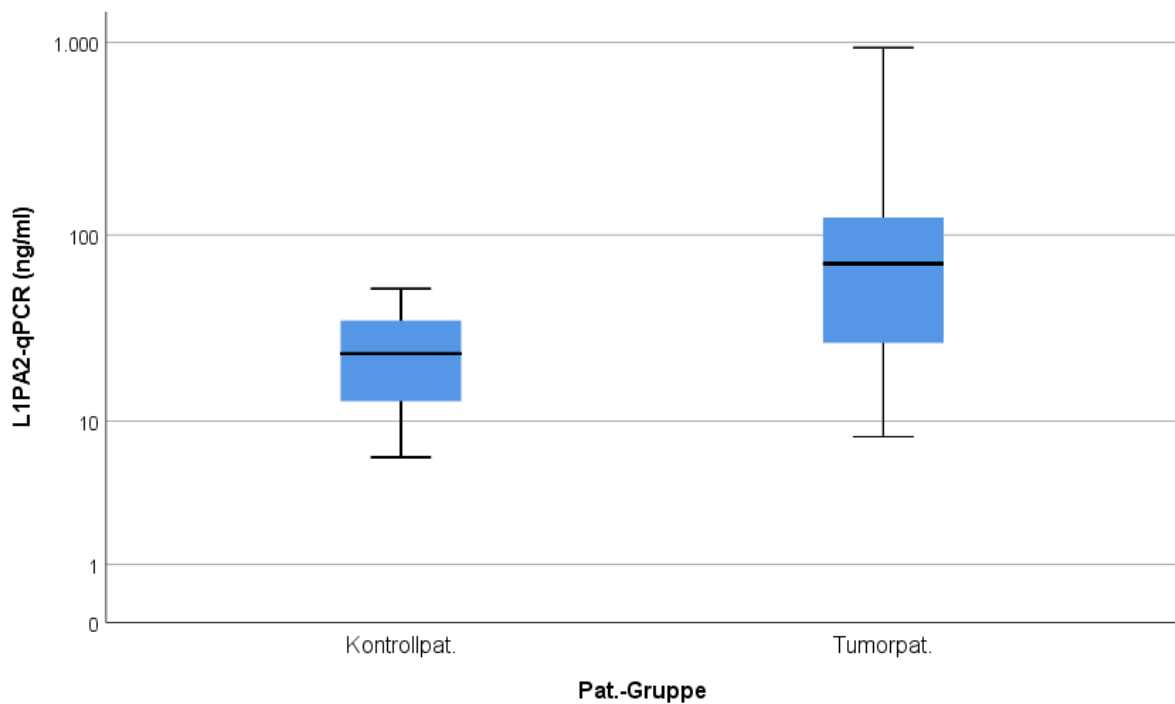


Abbildung 41: Perioperative cfDNA-Konz. nach Tumordignität (L1PA2-qPCR)

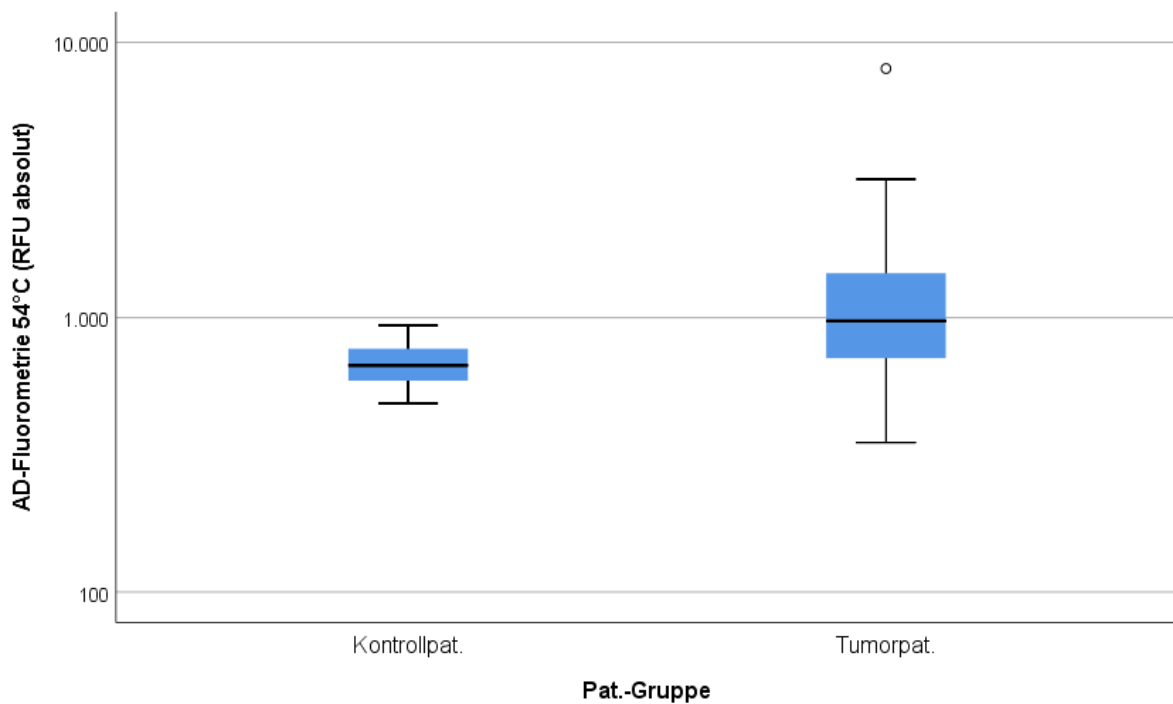


Abbildung 42: Perioperative Strahlungsintensität der cfDNA nach Tumor-Dignität (AD-Fluorometrie)

Bei Betrachtung der prä- und postoperativen Situation zeigte sich mittels L1PA2-qPCR nach Mann-Whitney-U-Test zum Zeitpunkt „1 Tag vor operativem Eingriff“ keine signifikante Differenz ( $U = 17,0$ ,  $p = 0,183$ ) bzgl. der cfDNA-Konz. zwischen Kontrollpatienten und Tumorpatienten (s. Tabelle 44). 24 bzw. 72 Stunden postoperativ differenzierten sich diese Gruppen signifikant voneinander ( $U = 21,0$ ,  $p = 0,017$ ). Im Falle der AD-Fluorometrie ergab sich weder zum präoperativen ( $U = 15,0$ ,  $p = 0,383$ ) noch zum postoperativen ( $U = 18,0$ ,  $p = 0,117$ ) Zeitpunkt eine signifikante Differenz zwischen diesen Patientengruppen (s. Tabelle 44).



<b><u>L1PA2-qPCR (ng/ml)</u></b>	<b>M</b>	<b>SD</b>
„1d präOP“ – Kontrollpat.	9,3	2,8
„1d präOP“ – Tumorpat.	33,8	26,7
„24h/72h postOP“ – Kontrollpat.	50,1	3,2
„24h/72h postOP“ – Tumorpat.	168,6	75,7

<b><u>AD-Fluorometrie (RFU absolut)</u></b>	<b>M</b>	<b>SD</b>
„1d präOP“ – Kontrollpat.	787,9	113,7
„1d präOP“ – Tumorpat.	1083,0	541,7
„24h/72h postOP“ – Kontrollpat.	779,7	181,6
„24h/72h postOP“ – Tumorpat.	1417,0	776,4

Tabelle 44: Statistische Kenngrößen der cfDNA/RFU prä- und postoperativ (L1PA2-qPCR/ AD-Fluorometrie)

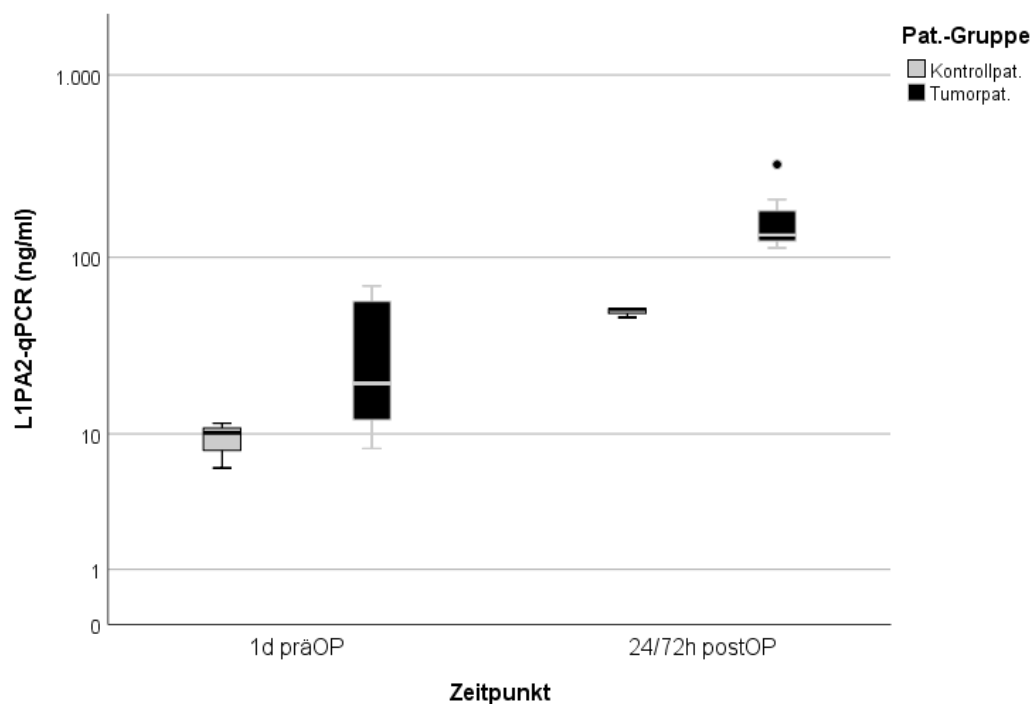


Abbildung 43: cfDNA-Konz. nach Tumor-Dignität prä- und postoperativ (L1PA2-qPCR)

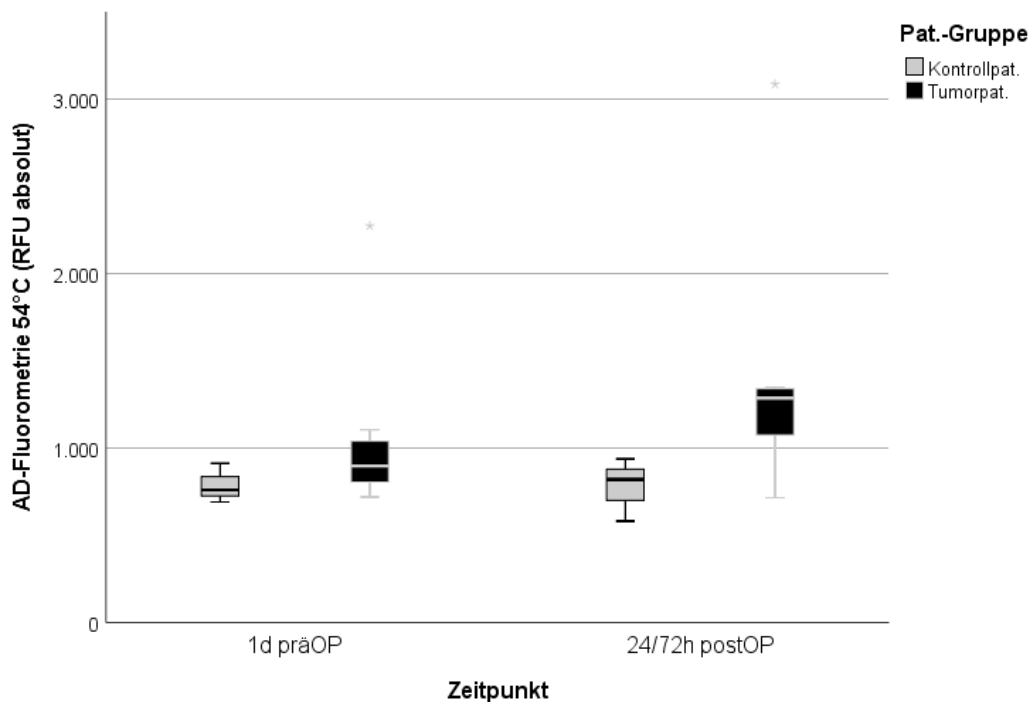


Abbildung 44: Strahlungsintensität nach Tumor-Dignität prä- und postoperativ (AD-Fluorometrie)

Im Vergleich der beiden Methoden mit L1PA2-qPCR als Referenz der AD-Fluorometrie zeigten sich nach bivariater Korrelation in Abhängigkeit der Patientengruppen nur für die Gruppe der Tumorpatienten eine signifikante Korrelation (s. Tabelle 45) und wies dabei gleichzeitig ein höheres Bestimmtheitsmaß auf (s. Abbildung 45).

<u>Bivariate Korrelation:</u> „L1PA2-qPCR (ng/ml)“ – „AD-Fluorometrie 54°C (RFU absolut)“	
<b>Kontrollpat.</b>	r = - 0,002
	p = 0,992
	n = 24
<b>Tumorpat.</b>	r = 0,903
	p = 0,02•10 <sup>-19</sup>
	n = 56

Tabelle 45: Parameter der Korrelation zwischen L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie abhängig der Tumor-Dignität

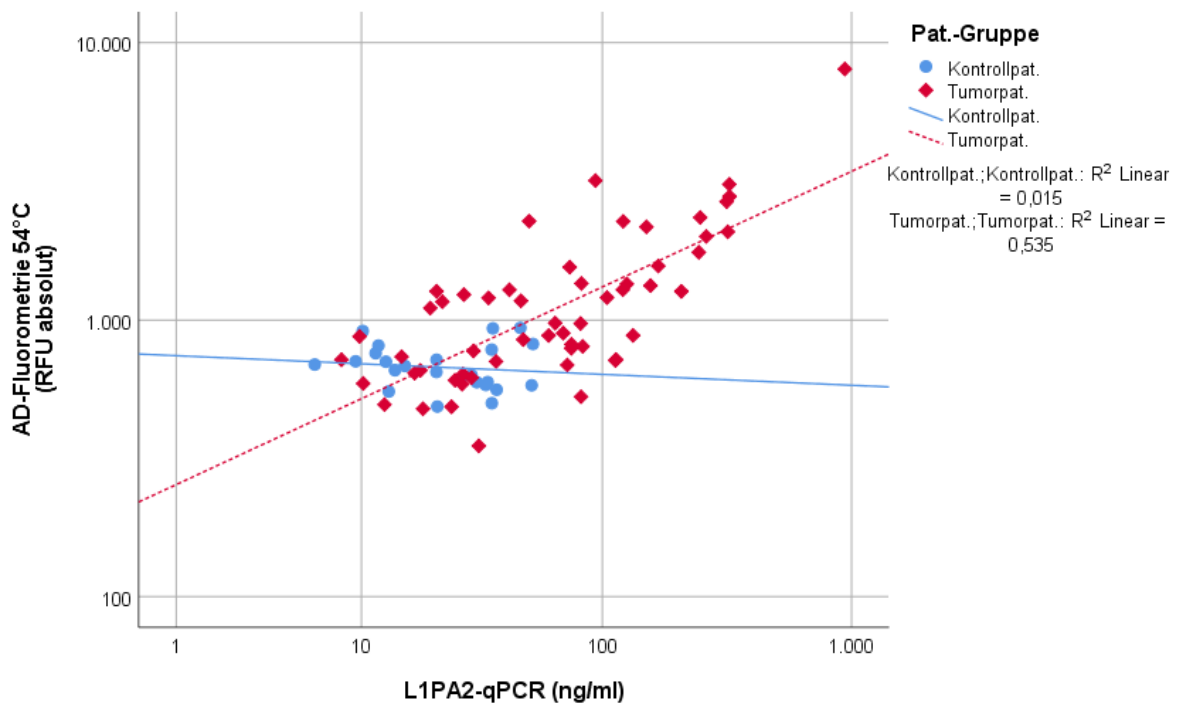


Abbildung 45: Korrelation der Methoden nach Tumor-Dignität

Auch über die perioperativen Zeitpunkte hinweg ist im Falle der Patienten mit benignen Tumoren eine starke Abweichung der Methoden untereinander ersichtlich (s. Abbildung 46). Im Falle der Patienten mit malignen Tumoren bestätigt die perioperative Dynamik rein graphisch die stark signifikante Korrelation (s. Abbildung 47).

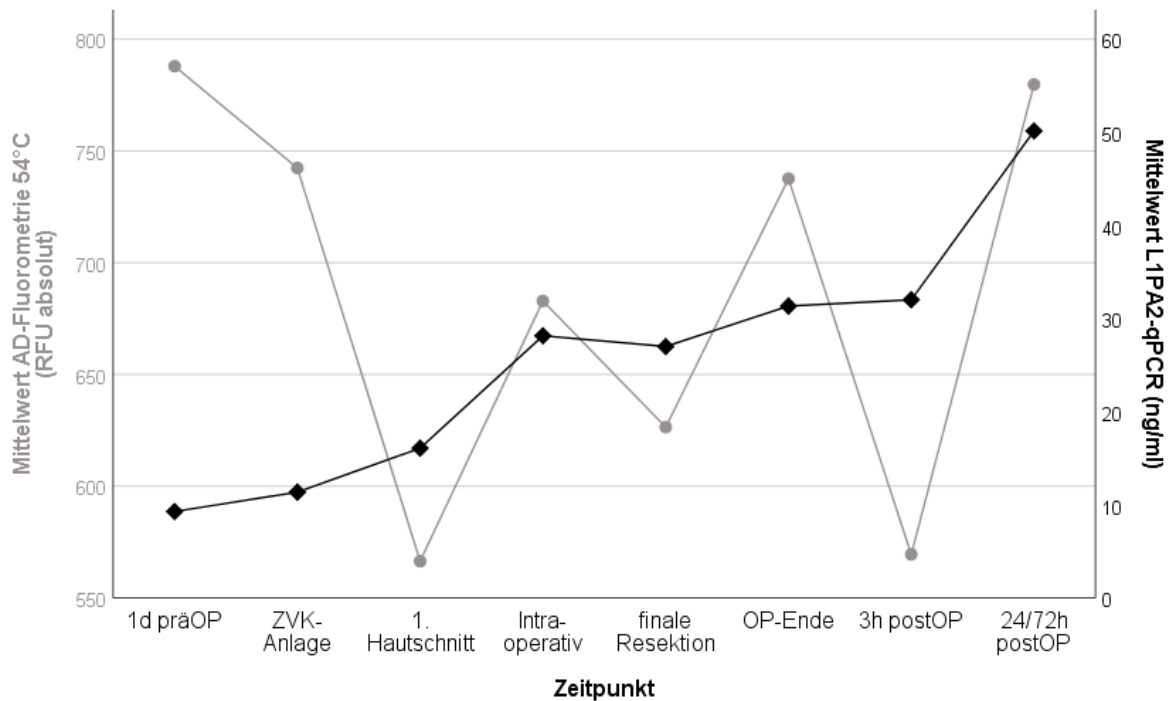


Abbildung 46: Vergleich der Methoden anhand der perioperativen Dynamik zellfreier DNA (Patienten mit benignen Kolorektal-Tumoren)

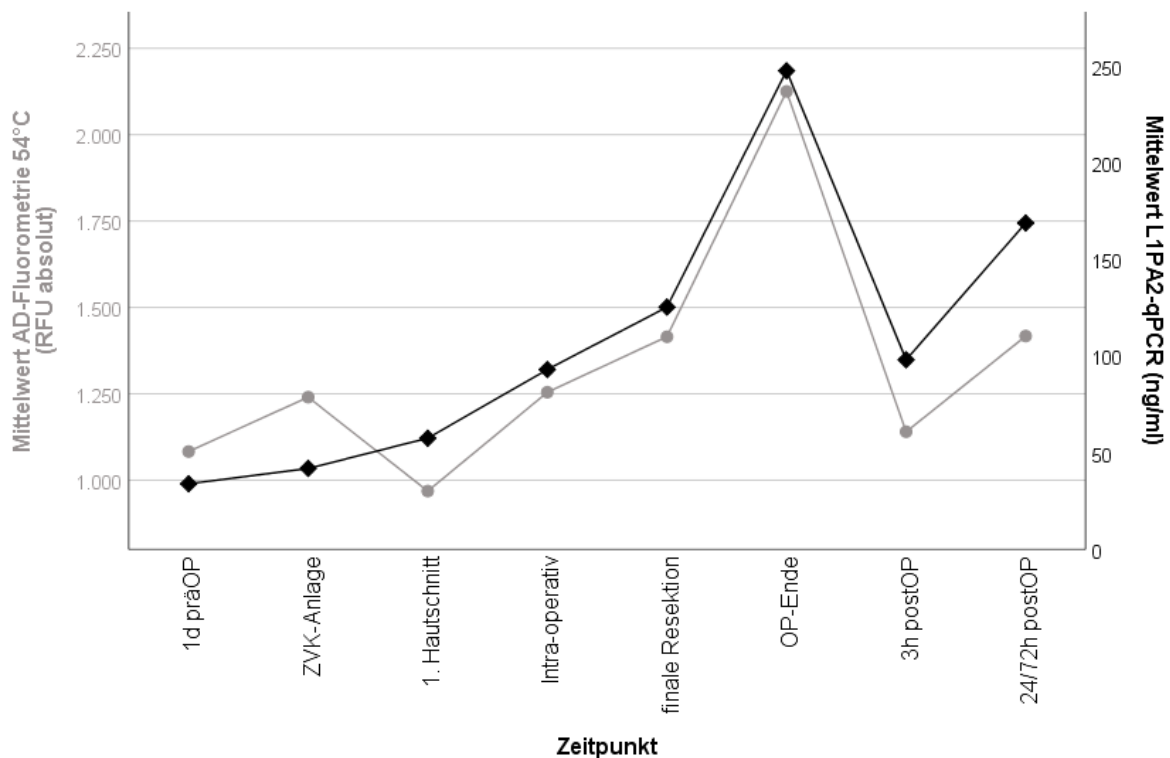


Abbildung 47: Vergleich der Methoden anhand der perioperativen Dynamik zellfreier DNA (Patienten mit malignen Kolorektal-Tumoren)

### 5.2.1.3 Operationstechnik

Weiter wurden die vorliegenden Ergebnisse für die Operationstechniken („Minimal invasiv“, „Offen“) einzeln betrachtet und gegenübergestellt. Hierbei ergaben sich, je nach verwendeter Quantifizierungsmethode, folgende Parameter über die jeweils eingeschlossenen Patienten (s. Tabelle 46, Tabelle 47):

<u>L1PA2-qPCR (ng/ml)</u>	<b>Minimal-Invasiv</b>	<b>Offen</b>
<b>M</b>	35,3	131,5
<b>med</b>	27,1	82,1
<b>SD</b>	37,6	161,4

Tabelle 46: Statistische Kenngrößen der cfDNA-Messung abhängig der Operationstechnik (L1PA2-qPCR)

<u>AD-Fluorometrie (RFU)</u>	<b>Minimal-Invasiv</b>	<b>Offen</b>
<b>M</b>	819,7	1454,9
<b>med</b>	699,3	973,6
<b>SD</b>	357,2	1306,6

Tabelle 47: Statistische Kenngrößen der RFU-Messung abhängig der Operationstechnik (AD-Fluorometrie)

Der durch L1PA2-qPCR quantifizierte Mittelwert für die Patienten, für deren Resektion eine offene Operation notwendig war, zeigte sich dabei nach Mann-Whitney-U-Test signifikant höher als der Mittelwert der Patienten, für deren Resektion ein minimal invasives Vorgehen ausreichend war ( $U = 1283,0$ ,  $z = 4,648$ ,  $p = 0,03 \cdot 10^{-4}$ ,  $n = 80$ ; M und SD; s. Tabelle 46, Abbildung 48). Die Ergebnisse der ADF wiesen diese signifikante Differenz zwischen den Operationstechniken nach Mann-Whitney-U-Test ebenfalls und in gleicher Richtung auf ( $U = 1168,0$ ,  $z = 3,541$ ,  $p = 0,04 \cdot 10^{-2}$ ,  $n = 80$ ; M und SD; s. Tabelle 47, Abbildung 49).

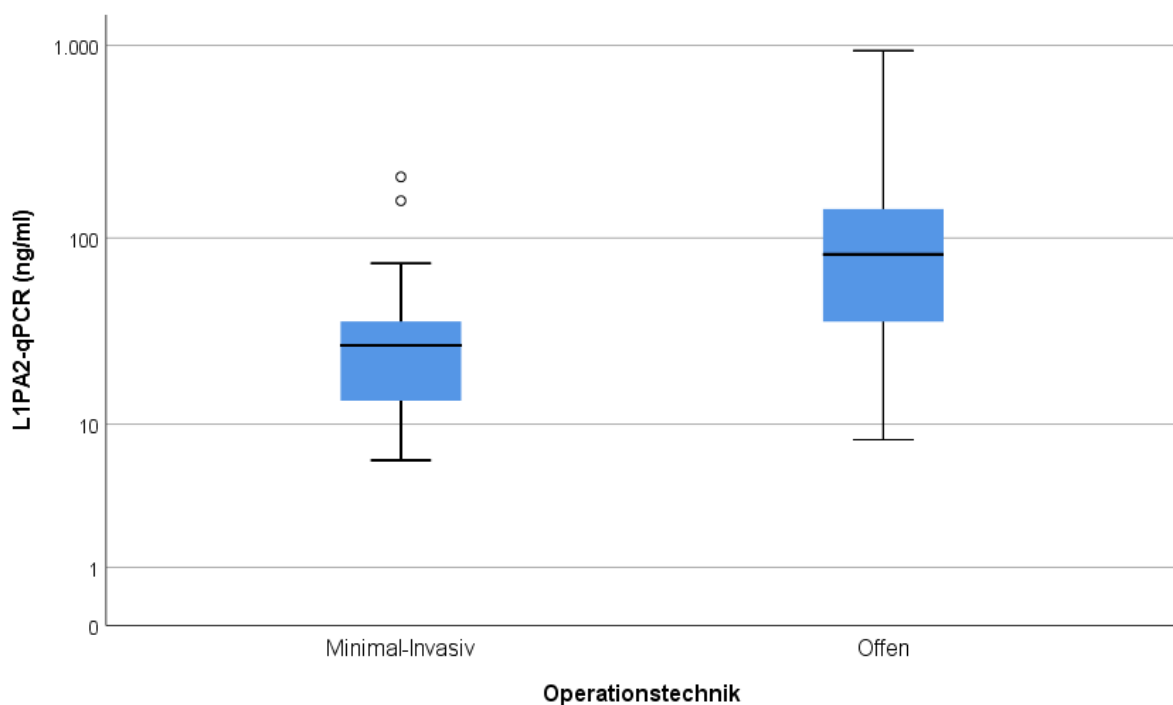


Abbildung 48: Perioperative cfDNA-Konz. nach angewandter Operationstechnik (L1PA2-qPCR)

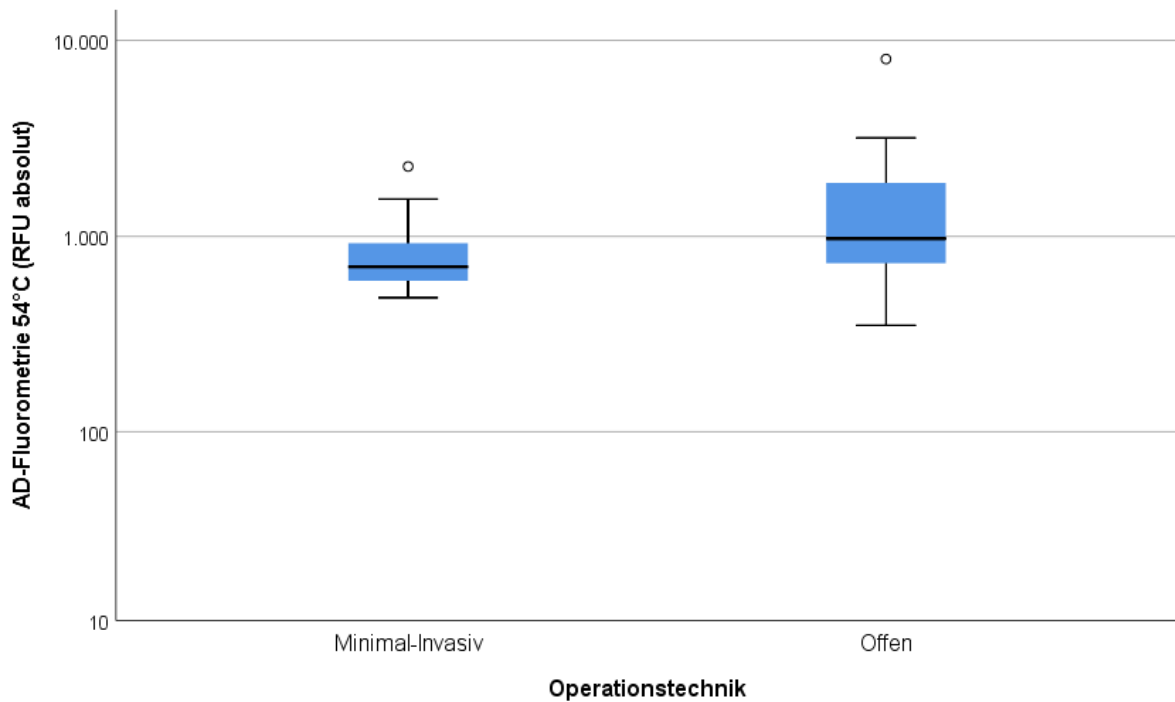


Abbildung 49: Perioperative cfDNA-Konz. nach angewandter Operationstechnik (AD-Fluorometrie)

In Abhängigkeit der Operationstechniken zeigte sich im Vergleich der beiden verwendeten Methoden zur Erfassung zellfreier DNA eine signifikante Korrelation für beide Varianten (s. Tabelle 48). Hierbei wies die Gruppe der Patienten, die einer offenen Operation unterzogen worden waren, eine stärkere Korrelation sowie ein höheres Bestimmtheitsmaß auf (s. Abbildung 50).

<u>Bivariate Korrelation:</u> „L1PA2-qPCR (ng/ml)“ – „AD-Fluorometrie 54°C (RFU absolut)“	
<b>Minimal- invasiv</b>	$r = 0,447$
	$p = 0,004$
	$n = 40$
<b>Offen</b>	$r = 0,927$
	$p = 0,09 \cdot 10^{-16}$
	$n = 40$

Tabelle 48: Parameter der Korrelation zwischen L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie abhängig der Operationstechnik

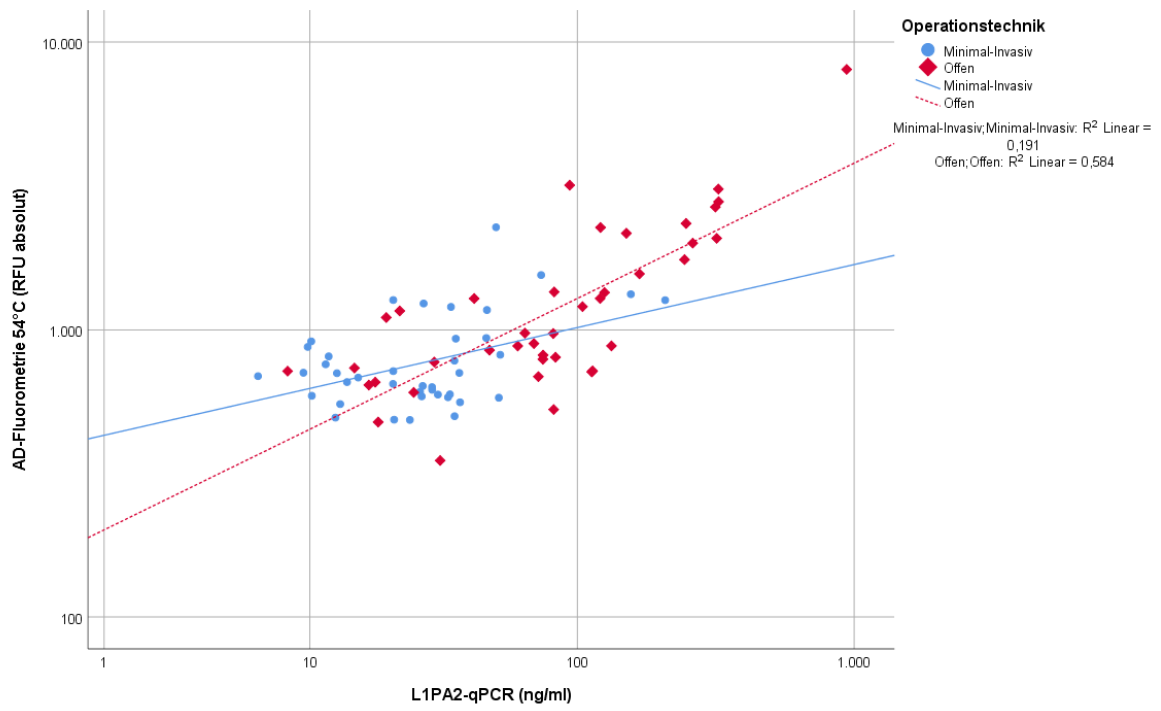


Abbildung 50: Korrelation der Methoden nach angewandter Operationstechnik

## 6 DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Methode zur direkten Quantifizierung zellfreier DNA aus Plasma etabliert werden. Für diese Methode bestand das Ziel, äquivalent zu den durch Goldshtein et al. sowie Yang et al. entwickelten Protokollen, keine Extraktion und Amplifikation des genetischen Materials zu benötigen (16, 17). Dieses Ziel der absoluten Quantifizierung konnte trotz vieler optimierender Ansätze nicht vollständig erfüllt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Etablierungsprozesses evaluiert, kritisch betrachtet und im Kontext aktueller Literatur diskutiert. Gleichmaßen soll die Anwendung einer reduzierten bzw. vereinfachten Methode zur Darstellung der cfDNA-Kinetik am Beispiel perioperativer Verläufe einer Resektionsstudie betrachtet werden. Anschließend werden die daraus resultierenden Erkenntnisse in Relation zum aktuellen Standpunkt der Forschung eingeordnet. Dabei soll der Fokus auf den Limitationen und der Zukunft der cfDNA-Quantifizierung liegen.

### 6.1 Etablierung einer rein fluorospektroskopischen Methode direkt aus Plasma zur absoluten und relativen Quantifizierung zellfreier DNA

Ziel der zu etablierenden Methode war es, zellfreie DNA direkt aus Plasma fluorometrisch zu quantifizieren. Der grundlegende Aufbau orientiert sich an verwandten Publikationen direkt-fluorometrischer Methoden. Jedoch wurden diverse Anpassungen vorgenommen, um möglichst effizient die eigene Zielsetzung zu erreichen.

Die zellfreie DNA des Analysats, in diesem Fall Blut, sollte nicht isoliert bzw. extrahiert werden. Dies soll die Erfassung von möglichst allen Fragmenten garantieren und speziell dem Verlust kurzer Fragmente, die für diese Methodik und im Vergleich zur qPCR einen besonderen Stellenwert einnehmen, vorbeugen (15, 16, 261). Gleichzeitig könnte der ausbleibende Schritt der cfDNA-Extraktion diese Methode stärker mit verwandter Methodik zur Quantifizierung zellfreier DNA vergleichbar machen (231, 258). Eine gewisse Aufbereitung des Blutes muss jedoch durchgeführt werden, um eine Kontamination des Analysats mit DNA zellulärer Herkunft zu verhindern: Hierbei gilt Plasma im Vergleich zu Serum als das reliablere Medium, um Quantität und Qualität der zellfreien DNA im Blut möglichst exakt abzubilden (215). In Serum wird dieses Abbild durch die Fibrinogen-aktivierten Gerinnungs- und Lyseprozesse



hinsichtlich Herkunft, Konzentration und Integrität verzerrt (18, 223, 226, 227). Die Prozessierung zu Plasma beinhaltet entsprechend der aktuellen Leitlinien eine zweifache Zentrifugation (215). Diese ermöglicht eine sichere Elimination von Zellen, Zellorganellen und Zelltrümmern und verhindert gleichzeitig eine Freisetzung von DNA aus diesen Blutbestandteilen (222, 230).

Die Voraussetzungen für ein geeignetes Fluorochrom zur Erfassung zellfreier DNA bestehen in einem ausgewogenen Verhältnis zwischen Spezifität sowie Sensitivität für doppelsträngige DNA, die den Hauptanteil zellfreier DNA darstellt (24, 33). Gleichzeitig soll das Fluorochrom praktikabel und kostengünstig in der Anwendung und Beschaffung sein. Diese Voraussetzungen erfüllt für diese Arbeit das Fluorochrom SYBR Green 1 (246). Die geringere Sensitivität, die SG1 im Vergleich zu Fluorochromen anderer verwandter Publikationen aufweist, wurde mittels eines geringeren Dilutionsfaktors des Plasmas evaluiert und angepasst (s. 5.1, s. 9.2.1). Dieser könnte für die verwendete Farbstoffkonzentration sowohl eine sichere Detektion der enthaltenen Nukleinsäuren als auch ein möglichst geringes Interaktionspotenzial mit anderen Plasmabestandteilen gewährleisten. Eine Dilution in H<sub>2</sub>O zeigte dabei bessere Ergebnisse als in anderen Puffermedien (s. 9.2.1). Dies bringt den Vorteil mit sich das native Plasma weniger in dessen Zusammensetzung zu verfälschen, da H<sub>2</sub>O an sich schon den Hauptbestandteil von Plasma darstellt (267). Allerdings könnte eine Pufferlösung die Bindungseigenschaften des Fluorochroms an DNA in positiver Art beeinflussen (16). Daher wäre eine Evaluation weiterer Pufferlösungen sinnvoll.

### Einfluss der Temperatur auf das Analysat und Detektionsverfahren

Durch eine Schmelzkurven-Analyse präsentierte sich die Strahlungsintensität der Plasmaproben am Temperaturpunkt von 54 °C mit der besten Korrelation zu Referenzwerten derselben Proben aus NanoDrop 3300 und L1PA2-qPCR. Dabei weist eine Schmelzkurve mit langsamer Temperatursteigerung von 1 °C pro 30 sec. nicht nur stärkere Korrelationen, sondern auch eine absolut höhere Strahlungsintensität auf als eine schnellere graduelle Temperatursteigerung oder eine direkte Erhitzung auf 54 °C (s. Kapitel 5.1, 9.2.2). Dies könnte bedeuten, dass ein vorsichtiger gradueller Temperatur-Anstieg weniger gefährdend für DNA, Farbstoff sowie andere Plasmabestandteile mit Eigenfluoreszenz ist und damit zu vermindert variablen Ergebnissen führen könnte.

Über die steigende Temperatur der Schmelzkurve hinweg zeigte sich gleichzeitig eine im Mittel in absoluter Zahl fallende Strahlungsintensität (s. 5.1). Die stärkste negative Steigung bzw. das Minimum der Änderung  $d(\text{RFU})/dT$  wiesen dabei Temperaturen um 40-45 °C auf (s. Abbildung 1). Diese absolute Reduktion der RFU könnte auf die Denaturierung bzw. Aufschmelzung von autofluoreszierenden Plasmabestandteilen zurückzuführen sein. 40 °C würde dabei die Temperatur darstellen, die diese Prozesse äquivalent zur humanen Biophysikologie initiieren würde (268). Um die Schmelzkurventemperatur von ca. 50-55 °C zeigte sich wiederum eine andere Dynamik: Hier war eine Steigerung der absoluten Strahlungsintensität bzw. ein Maximum positiver Änderung ersichtlich (s. Abbildung 1). Dieser Gipfel war für Proben, die zuvor einem Protein-Verdau unterzogen wurden, nicht erkennbar (s. Anhang 9.2.6). Daher könnte der Zuwachs an Strahlungsintensität aus den DNA-Fragmenten resultieren, die aus Bindungen mit den nun denaturierenden Proteinen frei und dem Fluorochrom SG1 zugänglich werden.

#### Einfluss der Ribonukleinsäure auf das Detektionsverfahren

Vitzthum et al. zeigten, dass SG1 unempfindlich gegen physiologische RNA-Konzentrationen ist (246). Physiologische Konzentrationen von RNA in Plasma entsprechen ca 2,5 ng/ml (269). In dieser Arbeit konnte diese Beobachtung im gewählten Temperaturbereich von 50-55 °C auch für Konzentrationen von bis zu 400 ng/ml nachgewiesen werden (s. 5.1), da sich die Strahlungsintensität dieser Proben nicht signifikant von der Strahlungsintensität der Negativkontrolle aus Wasser differenzierte. Dies gilt sowohl für das Medium Wasser als auch für Plasma.

Das Messprotokoll für native Plasmaproben wurde auch für den Fluoreszenzfarbstoff RIBO Green (Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt) anhand der Proben der Belastungsstudie angewendet. Obwohl die belastungsabhängige Kinetik von Messungen der Belastungsproben mittels RG im Gegensatz zu äquivalenten Messungen mit SG1 als Fluorochrom keine signifikanten Differenzen der Mittelwerte zwischen den einzelnen Belastungszeitpunkte zeigte, war doch allein graphisch eine deutliche Tendenz bzgl. der absoluten Strahlungsintensitäten erkennbar (s. Abbildung 60). Gleichzeitig korrelierten die Messungen mit den Fluorochromen SG1 und RG untereinander (s. Anhang 9.2.3). Einen Erklärungsansatz hierfür bietet die Möglichkeit, dass sich unabhängig des verwendeten Fluorochroms durch den Einfluss von

Belastung die sonstige Zusammensetzung anderer Plasmabestandteile ändern und diese mit ihrer Eigenfluoreszenz zu dem RFU-Anstieg unter Belastung beitragen könnten.

#### 6.1.1 Etablierung der Standardreihe

Im Vergleich zwischen Standardreihen auf Basis von Wasser oder Plasma zeigte sich, dass die Standardreihen in Wasser trotz gleicher Konzentration der DNA-Standards wesentlich geringere absolute Strahlungsintensitäten aufwiesen als die Standardreihen in Plasma. Gleichzeitig stellte sich der Anteil an Strahlungsintensität, der in Plasma aus der Fluoreszenz von DNA mit SG1 resultierte, in Relation zur Gesamtfluoreszenz stark vermindert dar. Daraus wurde ersichtlich, dass die sonstigen Plasmabestandteile außer DNA und Wasser einen wesentlichen Beitrag zur Gesamtfluoreszenz beitrugen und die Fluoreszenz von DNA mit SG1 bis zum Faktor 10 überstiegen (s. 5.1.1). Unter der Annahme, dass allein der Plasmahintergrund für die Unterschiede bzgl. der absoluten RFU-Werte, im Sinne einer Verschiebung des y-Achsenabschnitts der Standard-Geraden verantwortlich ist, sollte die Steigung der Standardreihen in Wasser und Plasma nicht voneinander differenzieren. Die Steigung der Standard-Geraden präsentiert dabei die Relation zwischen DNA-Konz. und der daraus entwickelten Strahlungsintensität. Diese Annahme wurde jedoch nicht bestätigt (s. 5.1.1), was sich mit den Ergebnissen anderer Studien deckt: Yang et al. weisen für Standards derselben DNA-Konzentration eine schwächere Fluoreszenz in Plasma als in Pufferlösung oder Wasser nach (17). Dies wird auf eine erschwerte Bindung des Fluorochroms an doppelsträngige DNA in Anwesenheit von Proteinen oder anderen Plasmabestandteilen zurückgeführt.

Mit Fokus auf die Standard-Konzentrationen  $< 20$  ng/ml wurde für diese Medien ersichtlich, dass eine sensitive Detektion von DNA in dieser Größenordnung, mit der bis zu diesem Zeitpunkt etablierten Methode nicht sicher gewährleistet werden konnte. Speziell für diese Standard-Konzentrationen war erkennbar, dass sich diese in Wasser nicht voneinander differenzierbar darstellten, aber zumindest auf einem einheitlichen RFU-Niveau präsentierten und über der Negativkontrolle ohne IgDNA lagen. In Plasma hingegen zeigten diese geringkonzentrierten Standards eine starke Variabilität untereinander und differenzierten sich nicht einheitlich durch eine höhere Strahlungsintensität gegenüber der Negativkontrolle (s. 5.1.1, s. Abbildung 4). Dies

könnte aus dem prominenten Anteil des fluoreszierenden Plasma-Hintergrunds resultieren, da von diesem, unabhängig von der An- oder Abwesenheit artifizierender Isolat-DNA, eine größere Variabilität der Messergebnisse ausging als im Falle von Wasser als Hintergrund. Insgesamt zeigten sich in der statistischen Analyse die Ergebnisse der Standardreihen in Wasser mit besseren Korrelationen sowie stärkeren Bestimmtheitsmaßen in Bezug auf die enthaltene DNA-Konz. als die Standardreihen, die in Plasma als Medium angesetzt werden (s. Kapitel 5.1.1). Dies könnte auf die im Gegensatz zu Plasma stark verminderte Eigenfluoreszenz von Wasser sowie das Fehlen von Inhaltsstoffen, die potenziell mit Nukleinsäuren oder deren Bindung an das Fluorochrom interagieren, zurückzuführen sein.

Im Falle der Standardreihen in Plasma wurde Plasma von gesunden Kontrollprobanden sowie von Patienten mit kanzerogenen Vorerkrankungen verwendet. Hierbei zeigten sich speziell für Standards im Konzentrationsbereich < 20 ng/ml schlechtere Korrelationen sowie schlechtere lineare Regressionen der Standardreihen auf Basis des Plasmas von Tumorpatienten (s. Abbildung 5). Dies könnte sich durch Anwesenheit verschiedener Störfaktoren im Plasma bei aktiven kanzerogenen Prozessen im menschlichen Körper erklären lassen. Gleichzeitig differenziert sich cfDNA bei Vorhandensein kanzerogener Erkrankungen hinsichtlich deren Fragmentierung und Integrität von cfDNA im gesunden Milieu (35, 166). In niedrigeren Konzentrationsbereichen nimmt dieser plasmatische DNA-Anteil im Gegensatz zur Standard-DNA einen in Relation größeren Anteil ein. Falls dieser Anteil durch die etablierte Methode schlechter oder mit größerer individueller Variabilität detektiert und gemessen wird, könnte das einen weiteren Erklärungsansatz für die schlechteren Korrelationen der Standardreihen mit Plasma von Tumorpatienten bieten.

#### 6.1.1.1 Plasma-Aufreinigung

##### Ultrafiltration & Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation bei 100.000 xg und Ultrafiltrationen bei 3-100 kD gleichen sich hinsichtlich der Intention welche Bestandteile des Plasmas voneinander separiert werden sollten: Durch die Ultrafiltration sollten die verwendeten Filter je nach

Porengröße für möglichst alle Plasmabestandteile, jedoch nicht für zellfreie DNA durchlässig sein (35, 36). Im Falle der Ultrazentrifugation sollte sich zellfreie DNA im Sediment sammeln und damit von den übrigen Plasmabestandteilen im dadurch erhaltenen Überstand separiert werden. Für beide Varianten bestünde also im Idealfall das resultierende Lysat rein aus Plasma ohne zellfreie DNA.

Die Hauptmasse zellfreier DNA liegt bei 166 bp und weist mit dieser Größe ein Molekulargewicht von ca. 6,142 kD auf (270). Unabhängig der verwendeten Filtergröße weist die Referenzmessung der L1PA2-qPCR jedoch keine cfDNA im resultierenden Lysat nach (s. 5.1.1.1.1). Dies wäre dadurch erklärbar, dass die Filterporen durch die anderen Inhalte des Plasmas, deren Molekulargewicht das der verwendeten Filterpore übersteigt, verstopft werden.

Im Falle der Ultrazentrifugation wies die L1PA2-qPCR, entsprechend der Zielsetzung, keinerlei DNA im Lysat nach. Die Strahlungsintensität des Lysats nach AD-Fluorometrie stellte sich jedoch signifikant höher als die Negativkontrolle dar (s. Abbildung 7). Entsprechend dieses Ergebnisses wird mittels AD-Fluorometrie im Lysat der Ultrazentrifugation etwas detektiert, was nach L1PA2-qPCR nicht erfasst wird. Dies könnten DNA-Fragmente sein, die kleiner als die verwendete Primerlänge von 90 bp sind und sich aufgrund des geringeren Molekulargewichts nicht im Sediment sammeln. Diese Fragmente können im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion nicht amplifiziert und quantifiziert und damit mittels L1PA2-qPCR nicht detektiert werden. Die Fragmentlänge stellt im Falle der AD-Fluorometrie kein Hindernis dar und SG1 bindet diese kurzen Fragmente äquivalent stark wie lange Fragmente. Lediglich die Fluoreszenzintensität fällt dabei für kurze Fragmente geringer aus (246). Auch Plasmabestandteile wie Proteine, Fette oder Elektrolyte mit einem geringeren Molekulargewicht als DNA könnten mit einer gewissen Eigenfluoreszenz oder fälschlicher Bindung mit SG1 ebenfalls für die höhere Strahlungsintensität des ultrazentrifugierten Lysats verantwortlich sein oder in gewissem Maße dazu beitragen. Zu diesem Zeitpunkt der experimentellen Studien war noch nicht klar, dass der größte Anteil der Hintergrundstrahlung im Plasma auf die Plasmaproteine selbst zurückzuführen war. Gerade diese präsentieren jedoch im Vergleich zu zellfreier DNA häufig eine ähnliche oder auch höhere Molekulargröße und könnten damit auch teilweise im Sediment separiert werden. Insgesamt konnte also nicht sicher festgestellt werden, dass durch die Ultrazentrifugation allein zellfreie DNA separiert wird und die

Strahlungsintensität des Überstandes wirklich vollumfänglich die gesamten sonstigen Plasmabestandteile repräsentiert.

Aufgrund dieser unklaren Ergebnisse bzw. deren potenziell fälschlichen Interpretation ist keines der Lysate für die rechnerische Ermittlung der Strahlungsstärke des DNA-freien Plasmahintergrunds oder als Äquivalent von diesem geeignet.

### DNA-Degradation

Das Ziel des enzymatischen DNA-Verdaus besteht darin einen DNA-freien Plasmahintergrund zu generieren. Entsprechend den Gesetzen der Enzymkinetik wurde in dieser Arbeit (s. 5.1.1.1.2) dargestellt, dass mit einer hohen Enzymkonzentration und äquivalenter Substratmenge die notwendige Inkubationsdauer zweitrangig wird (271). Gleichzeitig veränderte die Inkubation selbst, unabhängig der angewendeten Dauer, das Plasma nicht. Das ist höchstwahrscheinlich auf die verwendete Inkubationstemperatur, die mit 37 °C der physiologischen Körpertemperatur entspricht, zurückzuführen. Unter dieser Voraussetzung ist gleichzeitig eine optimale Enzymaktivität als auch eine Unversehrtheit des Plasmas gewährleistet. Durch verminderte DNase-Konzentration bei festgelegter Inkubationsdauer von 60 min. war für physiologische DNA-Konzentrationen weiterhin ein vollständiger Verdau zu verzeichnen (s. Abbildung 10).

Das Protokoll wurde letzten Endes mit einer DNase-Konz. von 100 U/ml bei einer Inkubationsdauer von 60 min. festgelegt und angewendet. Diese notwendige Modifikation des Protokolls im Vergleich zu den Empfehlungen des Herstellers könnte dahingehend notwendig sein, da das Enzym in Plasma statt Wasser oder einfachen Pufferlösungen als Medium und mit teils nicht einfach zugänglicher cfDNA in Plasma nicht mit der maximalen katalytischen Effizienz arbeiten kann. Gleichzeitig beruht eine höhere DNase-Konzentration auf der Intention diese einer eventuell notwendigen längeren Inkubationsdauer vorzuziehen, was sich auch hinsichtlich des Ziels eine zeitsparende Messmethodik zu entwickeln praktikabler darstellt. Gleichmaßen könnte jedoch eine höhere DNase-Konz. die Zusammensetzung des Plasmahintergrunds stärker verfälschen und in größerem Maß vom Hintergrund der zu quantifizierenden nativen Plasmaproben abweichen.

Nach dem erfolgten enzymatischen Abbau von DNA ist eine ebenso effiziente und vollständige Inaktivierung der DNase notwendig, da eine Restaktivität die Sensitivität der Nukleinsäuren-Quantifizierung mindert (16, 77). Eine DNase-Inaktivierung durch Hitze, die durch den Hersteller als gleichwertig zu EDTA empfohlen wird, war im Falle der ADF-Messung aufgrund einer weißlichen Ausfällung des Plasmas nicht anwendbar (s. 5.1.1.1.2). Als Ursache der Ausfällung bzw. Trübung des Plasmas könnten die hitzeempfindlichen Bestandteile Plasmas, wie Proteine und Fette, in Frage kommen (268, 272). Die Messung dieser Proben mittels L1PA2-qPCR entsprechen jedoch logischen Erwartungen. Dieser Unterscheid wäre durch die stattfindende DNA-Amplifikation erklärbar: Die daraus resultierende verstärkte Strahlungsintensität der DNA könnte das getrübe Plasma in Relation deutlich überstrahlen.

EDTA als Möglichkeit der chemischen Inaktivierung der DNase hingegen könnte theoretisch einen stärkeren Einfluss auf die L1PA2-qPCR nehmen, da EDTA als Chelator ubiquitär inhibitorisch auf Enzyme wirkt. Somit würde auch die für die DNA-Amplifikation notwendige Polymerase gehemmt werden. Dies wurde erst für höhere DNA-Konzentrationen nach Zugabe artifizieller IgDNA ersichtlich (s. 9.2.4, s. Abbildung 66). Dies könnte in der Relation von vorliegendem Substrat zu amplifiziertem Produkt begründet sein: Je mehr Substrat amplifiziert werden könnte, desto stärker würde eine Inhibition hinsichtlich der resultierenden Produktmenge ins Gewicht fallen. Im Idealfall sollte nach Inaktivierung mittels EDTA die zugegebene DNA-Menge unverdaut bleiben und sich durch die detektierte Strahlungsintensität von Proben ohne Inaktivierung differenzieren. Dass die Ergebnisse der AD-Fluorometrie dies nicht bestätigt, könnte in der Relation des DNA-Signals zu der Signalstärke des Plasmahintergrunds begründet sein. Im Gegensatz zur L1PA2-qPCR wird dieser Hintergrund nicht verrechnet und das DNA-Signal erscheint in Relation zum Plasmahintergrund kleiner als gegen den Wert 0 (s. Abbildung 13, s. Abbildung 14, s. Tabelle 51, s. Tabelle 52).

Die Anpassung auf eine geringere EDTA-Konz. als durch den Hersteller empfohlen ist dahingehend erforderlich, dass der Einfluss auf die L1PA2-qPCR als Referenzmethode möglichst reduziert werden sollte und eine Vergleichbarkeit des DNase-verdauten Plasma zu Nativplasma zu gewährleisten.

Auch nach Zugabe der für den DNase-Verdau notwendigen Chemikalien zeigten diese in Standardreihen sowohl in Kombination mit dem Enzym DNase selbst als auch

einzel (EDTA, DNase-Inkubationspuffer) signifikante Korrelationen zu einer Standardreihe in unbehandeltem Plasma (s. 9.2.5). Diese Korrelationen präsentieren jedoch nur eine äquivalente Detektion der Strahlungsintensität artifiziell zugesetzter DNA. Ob der DNase-Verdau bzw. die hierfür benötigten Chemikalien das Plasma selbst entscheidend verändern, wäre hingegen an einem abweichenden Achsenabschnitt ersichtlich. Dieser markiert näherungsweise die Strahlungsintensität des Plasmahintergrunds. Tatsächlich zeigte die Standardreihe nach DNA-Degradation einen geringeren Wert des y-Achsenabschnitts als die Standardreihe in unbehandeltem Plasma auf. Dies könnte bedeuten, dass durch die Verwendung von DNase nicht nur die plasmaleigene cfDNA eliminiert werden würde, sondern eventuell auch Plasmabestandteile mit einer gewissen Eigenfluoreszenz. Eine Vergleichbarkeit mit dem Plasmahintergrund von Nativplasma bleibt damit erschwert.

### Proteolyse

Yang et al. zeigen auf, dass sowohl in nativen Plasmaproben als auch in Standardreihen mit isolierter DNA ein hohes Interaktionspotenzial zwischen den enthaltenen Nukleinsäuren und Proteinen besteht (17). Diese können DNA-Protein-Komplexe bilden, wodurch eine Bindung des Fluorochroms erschwert und die Fluoreszenzentwicklung vermindert wird (17). Hierfür ist beispielsweise das Plasmaprotein Albumin verantwortlich, das eine hohe Affinität zu Guanin-Cytosin-Basenpaaren besitzt (273). Diese Basenpaar-Kombination gilt sowohl für das Fluorochrom PicoGreen als auch für SYBR Green 1 als präferierte Bindungsstelle an doppelsträngiger DNA (247, 262).

Der an die DNA-Degradation anschließende Einsatz von Proteinase K soll daher den Vorteil erzielen einen großen Teil der interindividuellen Differenzen hinsichtlich der Plasmainhalte zu ebnen (s. 5.1.1.1.3). Gleichzeitig soll der Protein-Verdau die Inaktivierung der DNase mittels EDTA ersetzen, wodurch dessen Einfluss als Chelator auf die Polymerase der qPCR verringert wird. Dass der Anteil der Proteine in Plasma und hinsichtlich der Fluoreszenz des Plasmahintergrunds einen hohen Stellenwert einnimmt, wird durch den Vergleich zwischen Standardreihen, deren Plasma nach DNase-Verdau entweder mit EDTA oder Proteinase K behandelt werden, offensichtlich: Der y-Achsenabschnitt dieser Standardreihen, repräsentativ für die Strahlungsintensität des Plasmahintergrunds, unterschied sich mit bis zu 7000 RFU



voneinander. Für DNA-freies Plasma nach Proteinverdau blieb damit eine „Rest“-Hintergrundfluoreszenz von 1000 RFU (s. Tabelle 26, s. Abbildung 17). Die Genese dieser deutlich nachweisbaren Reduktion der RFU im Sinne eines verminderten y-Achsenabschnitts im Vergleich zwischen EDTA-behandelten und proteolysierten Standards kann nicht eindeutig der Proteolyse oder einer Fluoreszenzreduktion durch die Proteinase K selbst zugeordnet werden. Ebenfalls bleibt ungeklärt, ob der potenzielle Fluoreszenz-Anteil der Proteine auf deren Eigenfluoreszenz oder einer fälschlichen Bindung von SG1 beruht.

Obwohl die Ergebnisse der zuvor erwähnten Standardreihen signifikant miteinander korrelierten, wurde eine Differenz hinsichtlich der Steigung dieser Standardreihen ersichtlich (s. Tabelle 26). Die Steigungswerte der Standardreihen im Vergleich dienen der Evaluation, inwieweit der Protein-Verdau Einfluss auf den DNA-Gehalt der Standards bzw. dessen Fluoreszenz nimmt. Hierbei zeigte die mit EDTA behandelte Standardreihe eine höhere Steigung auf als die mit Proteinase K behandelte Standardreihe. Die Linearität der Standardreihe selbst dient als Gütemaß der DNase-Inaktivierung. Bei erfolgloser bzw. nicht vollständiger DNase-Inaktivierung würde die Restaktivität einer hohen Substratmenge in Form der DNA-Standards gegenüberstehen. Entsprechend der Enzymkinetik nach Michaelis-Menten würde der Umsatz des Substrates eine Sättigung erfahren und für jede Standardprobe eine äquivalente Menge DNA eliminieren (271). Der Verdau dieser DNA würde in einer für alle Standards äquivalenten Fluoreszenzreduktion resultieren und die Linearität der Standardreihe aufheben. Im Falle der mit Proteinase K behandelten Standardreihen zeigte das Bestimmtheitsmaß von 0,997 eine sehr hohe Linearität und damit eine effiziente DNase-Inaktivierung durch Proteinase K auf (s. Abbildung 17).

Ein weiterer Vorteil der enzymatischen Proteolyse besteht in der Reduktion der Proteinfluoreszenz der Standardabweichungen innerhalb von Triplikaten einzelner Proben. Dies galt sowohl für native Plasmaproben als auch für DNA-Standards (s. Abbildung 18, s. Abbildung 25). Das bedeutet, dass der hohe Proteinanteil im Plasma einer einzelnen Probe trotz gleichen Ansatzes zu abweichenden Messwerten führen kann und mit einer Proteolyse dementsprechend eine höhere Messgenauigkeit erzielt werden kann.

### 6.1.1.2 Adaptation Standard-DNA

Im Vergleich zwischen Standardreihen mit Isolat zellfreier DNA oder Isolat genomischer DNA als artifizielle Standard-DNA wiesen diese innerhalb der jeweiligen Methodik eine signifikante Korrelation zueinander sowie ein Bestimmtheitsmaß nahe 1 auf (s. Abbildung 20, s. Abbildung 21). Trotz dessen wurde anhand der Steigung dieser Standardreihen zueinander sowie in Bezug auf die errechnete DNA-Konz. der Standards ein Unterschied deutlich: Im Falle der Standardreihen mit lcfDNA erfuhr die Strahlungsintensität mit steigender DNA-Konz. einen stärkeren Zuwachs als im Falle der Standardreihen mit IgDNA (s. Tabelle 29). Dies wurde mit höherer DNA-Konz. nochmals deutlicher und war sowohl in L1PA2-qPCR als auch AD-Fluorometrie zu beobachten. Eine einfache Falschmessung der Ausgangskonzentration des Isolats mittels NanoDrop 1000 ist hierbei auszuschließen, da eine solche lediglich zu einer in der y-Achse parallel verschobenen Standardreihe geführt hätte. Beide Methoden basieren auf einer Fluoreszenzverstärkung mittels SG1. Dieses Fluorochrom entwickelt eine stärkere Fluoreszenz, je länger das gebundene DNA-Fragment ist (246, 247). Unter der Annahme, dass das Isolat zellfreier DNA eine höhere Konz. längerer DNA-Fragmente aufweisen würde als das Isolat genomischer DNA, könnte das die Differenz hinsichtlich der Steigungswerte der Standardreihen erklären. Dass sich diese Differenz nach L1PA2-qPCR geringer ausgeprägt darstellte, könnte in der Methodik der DNA-Amplifikation und dem daraus resultierenden geringeren Einfluss der DNA-Fragmentierung begründet sein (s. Tabelle 28).

Trotz des positiven Trends durch DNA-Degradation und Proteolyse kann im Falle der AD-Fluorometrie nach absoluten RFU-Werten lediglich 64 ng/ml nach alleinigem DNase-Verdau respektive 34 ng/ml nach zusätzlicher Proteolyse als niedrigste von 0 ng/ml differenzierbare DNA-Konz. ausgewiesen werden (s. Tabelle 56, s. Tabelle 58). Dieses Ergebnis zeigt sich unabhängig des verwendeten DNA-Isolats und steht in Kontrast zu den Ergebnissen der L1PA2-qPCR. Allerdings wird im Falle der qPCR schon eine Subtraktion des Hintergrunds sowie Umrechnung in Konzentrationswerte vorgenommen; die absoluten RFU-Werte der AD-Fluorometrie beinhalten weiter die Signalstärke des Plasmahintergrunds, da dieser nicht subtrahiert wird. Dementsprechend wird im Falle der AD-Fluorometrie nicht gegen 0, sondern gegen einen ähnlich hohen RFU-Wert getestet, da das DNA-Signal nur einen kleinen Anteil der Gesamtfluoreszenz einnimmt. Einen weiteren Grund könnte die unterschiedliche Steigung der Standardreihen der jeweiligen Methoden darstellen: Nach L1PA2-qPCR

zeigt jede Verdopplung der Standard-DNA auch eine Verdopplung der gemessenen DNA-Konz. auf. Auch mit einer Subtraktion der RFU des Plasmahintergrunds für die Werte der AD-Fluorometrie, welche erst durch Etablierung der Proteolyse möglich wurde, war diese Steigung geringer ausgeprägt und lag unter dem Wert 1. Erst für höhere Konzentrationen (bspw. ab 34 ng/ml) näherte sich diese dem Wert 1 an.

Im Falle der in Abschnitt 5.1.1.2 etablierten Standardreihe auf Basis von gemischtem Plasma hoch- und niedrigkonzentrierter Proben wurde die plasmaeigene cfDNA statt artifizieller isolierter DNA als Standard-DNA verwendet. Bei Betrachtung der Steigung dieser Standardreihe präsentierte sich diese im Vergleich zu der zuvor beschriebenen Steigung der Standardreihen mit Standards aus artifizieller IgDNA deutlich geringer. Daraus könnte geschlossen werden, dass SG1 in Kombination mit artifiziell isolierter gDNA eine stärkere Fluoreszenz entwickelt als mit plasmaeigener cfDNA. Dies könnte darauf beruhen, dass unbehandelte cfDNA in Plasma zu einem größeren Anteil oberflächengebunden, proteingebunden oder in Histone verpackt vorliegt und damit schwerer zugänglich für das Fluorochrom SG1 sein könnte.

Des Weiteren wurde im Vergleich zwischen Standardreihen mit Standards aus isolierter DNA und Standards aus plasmaeigener cfDNA eine stärker abweichende Steigung für die mit Proteinase behandelten Standards ersichtlich (s. Tabelle 32, s. Abbildung 24). Auf Standards auf Basis plasmaeigener cfDNA könnte ein Protein-Verdau stärkeren Einfluss nehmen, da ein höherer Anteil der DNA proteingebunden vorliegt als in Standards auf Basis isolierter DNA (17). Diese proteingebundene DNA könnte durch einen Protein-Verdau beschädigt oder sogar verloren gehen.

#### 6.1.1.3 Individuen-spezifische- & Pooling-Standardreihe

Das Ziel des Poolings von Plasma besteht darin mit nur einer gepoolten Probe eine größere Diversität ähnlicher Proben abbilden und repräsentieren zu können. Gleichmaßen soll dadurch, ähnlich zu der Behandlung mittels Proteinase K, intra- und interindividuelle Unterschiede zwischen den Plasmaproben geebnet werden, um eine einheitliche Quantifizierung zu ermöglichen. Die Etablierung einer Standardreihe auf Basis von Pooling-Plasma statt mehrerer Standardreihen auf Basis einzelner Plasmaproben spart gleichzeitig materielle Ressourcen sowie Zeit und gestaltet sich dementsprechend praktischer und einfacher in der Anwendung. Für die Standardreihen auf Basis einzelner Plasmaproben reduzierte sich der Einfluss des

individuellen Plasmahintergrunds allein durch die Subtraktion dieses Hintergrunds (s. Abbildung 26). Diese Standardreihen unterschieden sich jedoch weiterhin hinsichtlich derer Steigung. Die Steigung bildet das Verhältnis zwischen artifizieller IcfDNA und emittierter Fluoreszenz ab. Dass sich dieses Verhältnis bei Plasma einzelner Individuen unterscheidet, könnte auf der Amplifikation oder Inhibition des DNA-Fluoreszenzsignals durch individuelle oder situative Inhaltsstoffe im Plasma beruhen. Dieser Effekt zeigt sich wiederum ausgeprägter, je höher die enthaltene DNA-Konz. der Standards ist. Ob diese Differenz auf dem abweichenden Belastungszeitpunkt oder aufgrund prinzipieller individueller Unterschiede hinsichtlich der Plasmainhaltsstoffe beruht, kann hierbei nicht eindeutig bestimmt werden. Möglich wäre jedoch die belastungsinduzierte Ausschüttung von Proteinen o.ä., die die zuvor beschriebene Fluoreszenzänderung durch z.B. Bindung des Fluorochroms verursachen.

Der Nachteil des Poolings von Plasma könnte jedoch in einer erschwerten Interpretation der DNA-Konz. von Nativproben bestehen: Das Pooling ebnet die von Individuum und Belastungszeitpunkt unterschiedliche Fluoreszenzstärke des Hintergrunds. Dadurch könnte gleichzeitig das DNA-Signal von Nativplasma mit einer stärkeren Hintergrundfluoreszenz fälschlicherweise zu hoch interpretiert und das DNA-Signal von Nativplasma mit einer geringeren Hintergrundfluoreszenz fälschlicherweise zu niedrig interpretiert werden. Diese Unsicherheit wird durch die Reduktion der Hintergrundfluoreszenz mittels Protein-Verdau zwar minimiert, kann jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden.

### 6.1.2 Quantifizierung

#### Absolute Quantifizierung

Eine Quantifizierung von Nativproben mithilfe von auf deren Plasma etablierten Standardreihen ohne Protein-Verdau wies speziell für niedrigere Konzentrationen erschwert differenzierbare Ergebnisse auf. Gleichzeitig zeigten sich für diese probenbezogenen Standardreihen trotzdem oft negative Ergebnisse (s. Abbildung 27). Dies resultierte daraus, dass der RFU-Wert des nativen Plasmas, unter dem RFU-Wert der niedrigsten Standardkonzentration (0 ng/ml) bzw. unter dem RFU-Niveau der

gesamten Standardreihe lag. Diese Beobachtung könnte aus einer Diskrepanz hinsichtlich der Fluoreszenzverstärkung zwischen isolierter und plasmaeigener DNA resultieren: Durch erschwerte Bindung des Fluorochroms, stärkere Fragmentierung oder anderweitiger unterschiedlicher Beschaffenheit der zellfreien DNA wäre im Falle der Nativproben trotz gleicher DNA-Konz. eine schwächere Fluoreszenz als für die Standards der Standardreihe zu erwarten. Yang et al. weisen „in vivo“-Proben ebenfalls eine verminderte Fluoreszenz zu: Die Strahlungsintensität nativer Patientenproben zeigte im Vergleich zu Proben mit äquivalenter oder sogar niedrigerer artifizierter DNA-Konz. in Plasma oder Puffer eine signifikant geringere Strahlungsintensität (17). Daher wären herkömmliche Standardreihen mit artifizierter, isolierter DNA nur eingeschränkt als Referenz zur Quantifizierung nativer Plasmaproben anwendbar. Eine sinnvolle Alternative könnten die in Abschnitt 5.1.2.2 etablierten Standardreihen auf Basis plasmaeigener, nicht isolierter cfDNA-Standards bieten. Da jedoch auch diese Standardreihen negative Ergebnisse aufwiesen, kann diese Hypothese nicht bestätigt werden (s. Abbildung 31). Als anderer Erklärungsansatz wäre auch ein Einfluss der zusätzlichen Prozessierung der Standardreihe zu nennen. Durch die zusätzliche enzymatische Behandlung mittels DNase und Proteinase inklusive notwendiger Inkubationszeiten könnte sich der Plasmahintergrund verändern. So wäre zum einen eine stärkere Eigenfluoreszenz des Hintergrunds möglich, wodurch sich die gesamte Standardreihe parallel entlang der y-Achse in positiver Richtung verschieben würde. Zum anderen wäre auch eine Elimination von Plasmabestandteilen, die auf unbekannte Weise fluoreszenz-inhibitorisch wirken, durch die Prozessierung und ein daraus resultierender Fluoreszenzanstieg möglich. Auch bei Quantifizierung mittels Pooling-Plasma korrelieren die Ergebnisse zwar signifikant mit den Referenzwerten der L1PA2-qPCR, jedoch zeigen sich auch für die auf Basis von Standardreihen mit Pooling-Plasma quantifizierten Ergebnisse initial negative Werte. Durch Anwendung einer Proteolyse trat dieses Problem jedoch nicht mehr auf (s. Abbildung 29). Gleichmaßen steigerte sich im Vergleich zu nicht mit Proteinase behandelten Proben auch die Korrelation zu Referenzwerten der L1PA2-qPCR (s. 5.1.2.2). Im Bereich geringer cfDNA-Konz. (< 15 ng/ml) zeigten sich die quantifizierten Werte jedoch trotzdem sehr variabel und nicht eindeutig voneinander differenzierbar (s. Abbildung 29). Gleichmaßen wies die AD-Fluorometrie absolut höhere quantifizierte DNA-Konzentrationen auf als die Referenzwerte der L1PA2-qPCR. Dies ist im wahrscheinlichsten Fall auf eine Diskrepanz der Methodiken hinsichtlich der errechneten Konzentrationen der DNA-

Standards zurückzuführen. Theoretisch könnte hierfür auch ein hoher Anteil von Fragmenten, die eine Länge kleiner als 90 bp aufweisen, verantwortlich sein. Diese können nicht durch die L1PA2-qPCR amplifiziert werden und könnten dementsprechend nur durch eine direkte Bindung des Fluorochroms, wie im Falle der AD-Fluorometrie angewandt, erfasst werden. Die Quantifizierung anhand der auf Standards aus plasmaeigener cfDNA basierenden Standardreihen zeigte ebenfalls die zuvor beschriebene erschwerte Differenzierbarkeit von Proben mit geringer DNA-Konz. auf (s. Abbildung 31). Des Weiteren waren hierbei trotz Protein-Verdau häufiger negative Ergebnisse zu finden. Gleichzeitig sind die Ergebnisse eingeschränkt interpretierbar, da auch hier lediglich die Proben quantifiziert wurden, mithilfe deren Plasma die cfDNA-Standards mit hoher oder niedriger DNA-Konz. hergestellt wurden. Die aus diesen nativen Plasmaproben quantifizierten Ergebnisse befanden sich jeweils auf einem einheitlich niedrigen oder hohen Niveau der DNA-Konz und waren auf diesem eingeschränkt voneinander differenzierbar. In diesem Fall wäre eine Messung von Plasmaproben, die nicht einen Anteil des Plasmapools darstellen, interessant und weiter zu verfolgen gewesen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass eine absolute Quantifizierung mittels der etablierten direktfluorometrischen Methode speziell für Proben mit geringen cfDNA-Konzentrationen nicht adäquat möglich ist. Nach den vorliegenden Ergebnissen könnte eine sensitive Quantifizierung erst ab cfDNA-Konzentrationen von 50-100 ng/ml durchführbar sein. Dies deckt sich mit den Ergebnissen ähnlicher methodischer Ansätze, die ein Quantifizierungslimit zellfreier DNA bis minimal 170 ng/ml in Serum ausgeben oder lediglich Konzentrationen zwischen 1000 – 5000 ng/ml differenzieren (16, 17). Da speziell in Plasmaproben gesunder Individuen ohne Einflüsse physiologischer oder pathologischer Belastungen die Konzentrationen zellfreier DNA im Bereich zwischen 10-40 ng/ml liegen, wäre eine sensitive Quantifizierung in dieser Größenordnung für eine praktische Anwendbarkeit der Methodik sinnvoll und notwendig (23, 156, 173). Eine andere Anwendungsvariante könnte sich daher in Form eines „Screening“-Verfahrens darstellen: Das Blut von Patienten mit Verdacht auf Pathologien, die mit hohen Konzentrationen zellfreier DNA im Blutkreislauf einhergehen, könnten mittels direktfluorometrischer Methoden quantifiziert werden. Der Cut-Off-Wert würde dabei in einem Bereich liegen, der sowohl eine Detektion bzw. Quantifizierung und entsprechende Aussagefähigkeit ermöglicht als auch eine aktive Pathologie signalisiert. Bei Ergebnissen über diesem Cut-Off-Wert würde sich eine

sensitivere quantitative Diagnostik, bspw. in Form einer qPCR, anschließen. Im weiteren Verlauf wäre jedoch die Erhebung anderer diagnostischer Parameter sowie qualitative Untersuchungen zellfreier DNA unentbehrlich, um bspw. eine Differenzierung zwischen malignen und benignen sowie nicht-tumorösen Pathologien zu ermöglichen (150) (s. 9.1.1).

### Relative Quantifizierung

Laut aktueller Studienlage zeigt sich die Kinetik zellfreier DNA eines Individuums aussagekräftiger und mit einem größeren Nutzen für den klinischen Alltag als eine quantifizierte Konzentration (18). Dies ist zum einen wie zuvor erwähnt (s. 2.4.2) uneinheitlicher Methodik geschuldet. Zum anderen ist eine absolute cfDNA-Konzentration eines Zeitpunkts nur eingeschränkt interpretierbar.

Stattdessen soll die Beobachtung relativer Änderung zellfreier DNA eine höhere Aussagekraft besitzen. Eine solche relative Quantifizierung bezieht sich nicht auf ein einheitliches Niveau, sondern beurteilt die Änderung zellfreier DNA in Bezug zu den Werten des gleichen Individuums bzw. in Bezug zu dessen eigener „Baseline“. Gleichzeitig veranschaulicht diese Arbeit noch einen weiteren Aspekt, der die Interpretation absoluter cfDNA-Quantifizierung mittels direktfluorometrischer Methodik weiter erschwert: Trotz Protein-Verdau und entsprechender Reduktion der Variabilität der individuellen Hintergrundfluoreszenz wiesen Probanden, die ein einheitliches Belastungsprotokoll durchlaufen, nach wie vor hinsichtlich der Strahlungsintensität interindividuell abweichende Hintergrundstrahlung auf (s. Abbildung 33, s. Abbildung 34). Diese sind jedoch nicht eindeutig allein auf die unterschiedliche cfDNA-Konz. vor Belastung zurückzuführen, sondern könnten auch durch andere Plasmabestandteile mitbeeinflusst werden. Interessanterweise wurden für die gesunden Kontrollprobanden stärkere Korrelationswerte ausgegeben als für die Tumorpatienten, obwohl die zuletzt genannten einen höheren Mittelwert der cfDNA-Konz und RFU aufweisen. Da Messungen höherer DNA-Konzentrationen in dieser Arbeit zumeist mit entsprechend verbesserten Korrelationswerten in Bezug auf Referenzproben einhergehen, könnte das auf interferierende Faktoren im Plasma von Patienten mit kanzerösen Vorerkrankungen hinweisen. Auf diese Thematik und die potenziell eingeschränkte Anwendbarkeit einer solchen Methode im klinisch-onkologischen

Alltag wird zu einem späteren Zeitpunkt anhand der klinischen Studie näher eingegangen.

## 6.2 Relative Quantifizierung der perioperativen Dynamik zellfreier DNA bei Resektion benigner und maligner Kolorektalpathologien

Diese Studie dient der Evaluation, in welchem Maße sich die individuelle cfDNA-Kinetik in Form von prä-, intra- und postoperativer Verläufe durch die etablierte direktfluorometrische Methode monitorisieren und vereinfacht darstellen lässt. Die L1PA2-qPCR stellt hierbei als Methode der absoluten Quantifizierung die Referenzmethode dar. Das Ziel wäre im Idealfall gleichwertige Aussagen hinsichtlich Dignität/Klassifikation, Therapieerfolg und Prognose treffen zu können. Speziell für Patienten mit kanzerogenen Erkrankungen besitzen diese Parameter einen hohen Stellenwert. Dabei wird die Sensitivität der Quantifizierung hinsichtlich Dignität sowie Prognostik nach aktueller Literatur als eingeschränkt, hinsichtlich Therapieevaluation zumindest vielversprechend beurteilt (146, 158, 159). Diese Parameter könnten jedoch gerade durch eine dynamische Beurteilung zu mehreren Zeitpunkten über einen gewissen Zeitraum eine höhere Sensitivität erlangen. Eine diagnostische Aussagekraft von cfDNA-Analysen stellt sich nach aktueller Literatur mehrheitlich widersprüchlich dar und besitzt entsprechend des Studienprotokolls keine Relevanz in der hier vorgelegten Studie (11).

An dieser Stelle ist nochmals aufzugreifen, was anhand dieser Arbeit als Vorteile und Nachteile der AD-Fluorometrie im Vergleich zu L1PA2-qPCR gelten: Im Falle der ADF wird die Gesamtheit der doppelsträngigen cfDNA unabhängig der Länge erfasst. Einzelsträngige cfDNA wird nur sehr eingeschränkt durch das Fluorochrom gebunden. Gleichzeitig nimmt die Hintergrundfluoreszenz aufgrund der fehlenden Amplifikation in Relation einen stärkeren Einfluss auf die Erfassung der cfDNA-Strahlungsintensität. Im Falle der L1PA2-qPCR werden alle Fragmente ab einer Länge von 90 bp amplifiziert und erfasst. Die Amplifikation erfolgt dabei unabhängig der Molekülstruktur.

Die Ergebnisse der L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie zeigten hinsichtlich der Ergebnisse dieser Studie unabhängig des Patiententypus und über alle erfasste Zeitpunkte hinweg eine signifikante Korrelation auf hohem Niveau (s. 5.2.1). Hierbei



ist allerdings zu erwähnen, dass die Linearität dieses Zusammenhangs durch eine enorm hoch konzentrierte Plasmaprobe des Patienten 4 positiv beeinflusst wurde (s. Abbildung 39). Diese Ergebnisse sollen im Folgenden anhand der Gesichtspunkte Patiententypus, Kinetik über alle Zeitpunkte, Operationstechnik sowie der jeweiligen klinisch-medizinischen Interpretationsmöglichkeiten analysiert werden.

### Perioperative Dynamik

Da eine absolute Quantifizierung mittels AD-Fluorometrie nicht vollständig etabliert werden konnte, sollen die Ergebnisse von cfDNA-Konzentration (L1PA2-qPCR) und Strahlungsintensitäten (RFU) rein qualitativ hinsichtlich derer Dynamik beurteilt werden. Die Aussagekraft ist daher eingeschränkt.

Versucht man jedoch die graphische Darstellung der perioperativen Dynamik zellfreier DNA der beiden Methoden einander anzugleichen wird ein Trend deutlich: Über die Zeitspanne der Probenentnahmen verlief die AD-Fluorometrie im Mittel aller Patienten zu fast allen Zeitpunkten unter dem Niveau der L1PA2-qPCR. Die Ausnahme stellen die präoperativen Entnahmezeitpunkte dar und nach diesen kehrt sich das Verhältnis zwischen den Methoden für den Rest der Zeitspanne um (s. Abbildung 40). Entlang des perioperativen Verlaufs variierte die Stärke der Korrelation zwischen den verwendeten Methoden in folgendem Bezug zu den gemessenen Mittelwerten:

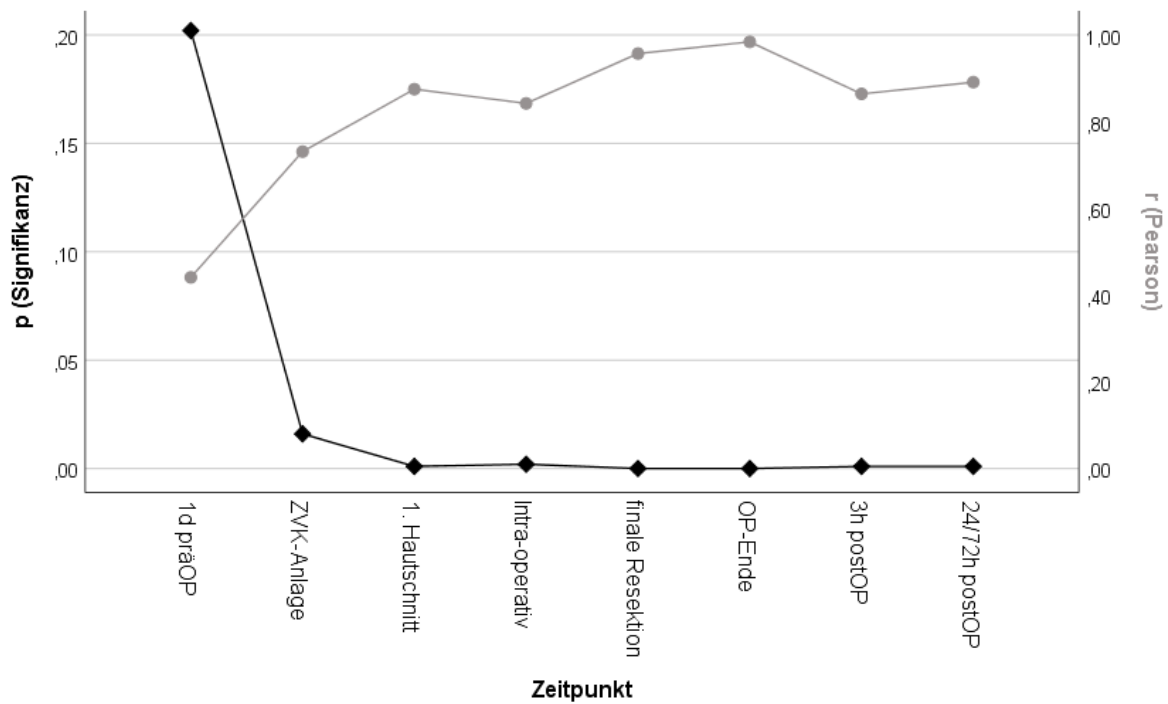


Abbildung 51: Korrelationsparameter der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie über perioperative Zeitpunkte

Die Ergebnisse am Tag vor der geplanten OP wiesen die schlechteste und gleichzeitig nicht signifikante Korrelation auf (s. Tabelle 41). Mit steigender cfDNA-Konz. direkt prä- und intraoperativ kletterten auch die Korrelationswerte auf höhere Werte. Das Maximum wurde dabei zum Zeitpunkt „OP-Ende“ erreicht, das im Mittel gleichzeitig die höchste cfDNA-Konz. bzw. RFU aufweist. Nach diesem Punkt persistierten DNA-Konzentration im Median aller Patienten bzw. dessen Signal zusammen mit den Korrelationswerten auf einem hohen Niveau. Diese Entwicklung der Korrelationsstärke könnte einfach auf deren antiproportionaler Verknüpfung mit der Konzentration zellfreier DNA, die sich in dieser Arbeit in mehreren Versuchen präsentiert, zurückzuführen sein. Jedoch könnte auch eine Dynamik hinsichtlich Fragmentierung und Clearance der DNA im Blutplasma als Ursache dieser Diskrepanzen zwischen ADF und L1PA2-qPCR dienen: Präoperativ könnte ein „Ruhezustand“ mit einem größeren Anteil kleiner DNA-Fragmenten immunologischer Herkunft herrschen (9). Diese kleinen Fragmente würden stärker durch ADF als durch L1PA2-qPCR erfasst werden. Mit Beginn der Operation und entsprechender Gewebeschäden benignen oder malignen Herkunft wird vermehrt DNA mit größerer Fragmentlänge frei. Dies beruht auf den destruktiven sowie nekrotischen Prozessen, die nur eine unvollständige DNA-Prozessierung zulassen (37). Gleichzeitig resultiert aus der steigenden DNA-Konz. im Plasma eine stärkere Aktivität der endogenen DNase, welche DNA unabhängig der Fragmentlänge verdaut (76, 77). Insgesamt steigt so der Anteil der längeren DNA-

Fragmente, die von beiden Methoden äquivalent erfasst werden können und so zu einer hohen Korrelation dieser Methoden führt. Mit dem Ende der Resektion und verminderter DNA-Freisetzung aus gewebsdestruktiven Prozessen fielen oder persistierten die gemessenen DNA-Konzentrationen. Zu diesem Zeitpunkt könnte die cfDNA immunologischer Herkunft wieder einen größeren Anteil an der Gesamt-DNA im Plasma übernehmen. Dies entspräche einem ähnlichen Zustand wie präoperativ und könnte äquivalent die postoperativ leicht fallenden Korrelationswerte erklären (s. Abbildung 51).

Einige Autoren bewerten cfDNA als sinnvollen Verlaufsparemeter für Therapie und Nachkontrolle onkologischer Patienten (14, 158). Dies soll anhand der individuellen Kinetik eines Tumorpazienten dieser Resektionsstudie veranschaulicht werden. Im Falle von Patient 3 (s. Abbildung 52) zeigten L1PA2-qPCR und ADF einen sehr ähnlichen Anstieg von 1 Tag präoperativ bis zum Zeitpunkt der finalen Resektion. Dieser Anstieg könnte wie zuvor erwähnt aus Gewebedestruktion und dem prinzipiellen Stress, den eine Operation für den menschlichen Körper darstellt, resultieren. Dass ADF und L1PA2-qPCR während dieses Anstiegs sehr ähnlich verliefen, wäre dabei äquivalent der zuvor dargestellten Erklärungsansätzen auf ein DNA-Profil zurückzuführen, das hinsichtlich Molekülstruktur und Fragmentlänge nahezu äquivalent durch beide Methoden erfasst wird. Solch ein DNA-Profil könnte beispielsweise auf eine Tumorentität, die schon präoperativ einen sehr aktiven Stoffwechsel inklusive aktiver sowie passiver cfDNA-Freisetzung besitzt, rückschließen lassen (10). Nach Resektion bzw. OP-Ende fiel das DNA-Signal für beide Methoden stark ab, teilweise bis unter präoperative Werte. Diese Kinetik könnte nach Studienlage auf eine erfolgreiche Therapie in Form einer R0-Resektion schließen lassen (140, 155). Dadurch bleibt eine weitere starke Freisetzung tumorassoziierter DNA in den Blutkreislauf aus. Bei dem erneuten Anstieg am späteren postoperativen Zeitpunkt könnte es sich sowohl um eine situationsbedingte Ursache in Form von Schmerzexazerbation, körperlichem Stress durch Wundheilung als auch um eine prognostisch bzw. therapeutisch relevante Ursache handeln. Dabei wäre zum einen eine inkomplette Resektion oder aber auch die Existenz von Sekundärtumoren bzw. Metastasen zu diskutieren (155, 158). Dass ADF und L1PA2-qPCR zu diesem Zeitpunkt nicht mehr derart parallel verliefen wie zuvor, sondern fast gegengleich, gibt jedoch Rätsel auf, da die cfDNA-Konzentration in Bereichen von  $> 100$  ng/ml liegt und damit auch durch AD-Fluorometrie detektierbar sein sollte. Eventuell könnte eine zum

Anstieg zellfreier DNA parallel veränderte Komponente im Plasma zu einer verminderten Fluoreszenz-Emission bei fehlender Amplifikation zugrunde liegen.

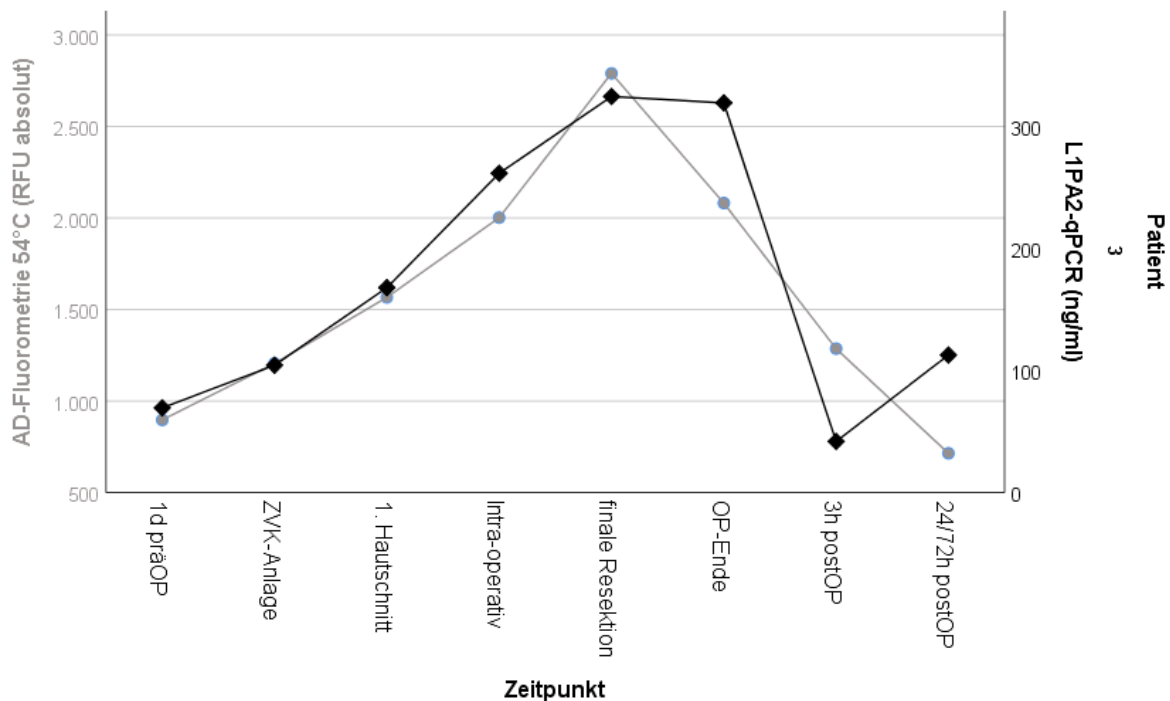


Abbildung 52: Perioperative Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie (Bsp. Patient 3)

### Tumor-Dignität

Die ermittelte cfDNA-Konzentration bzw. Strahlungsintensität der Tumorpatienten zeigte sich hinsichtlich Mittelwertes und Median signifikant höher als die der Kontrollpatienten (s. Tabelle 42, s. Tabelle 43). Dies entspricht dem aktuellen Stand der Literatur und ist vorrangig durch die Freisetzung tumorassoziierter cfDNA sowie ein tumorbedingtes höheres immunologisches Stresslevel verursacht (139). Allerdings tritt diese Beobachtung in der Analyse der einzelnen Zeitpunkte erst im postoperativen Verlauf mit signifikanter Differenz auf (s. Tabelle 44). Präoperativ zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den Patientengruppen. Dies könnte einerseits der geringen Stichprobengröße geschuldet sein, deckt sich jedoch andererseits mit der widersprüchlichen Studienlage zum diagnostischen Potenzial der quantitativen cfDNA-Analyse: Aufgrund uneinheitlicher Messungs- sowie Analyseprotokollen wird cfDNA meta-analytisch nicht als sensitiver Screening-Parameter bewertet, obwohl dies im Falle einiger Tumorentitäten aufgrund erfolversprechender Ergebnisse naheliegend erscheint (11, 150, 154). Die direktfluorometrische Messung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen zum prä- oder postoperativen Zeitpunkt

(s. Tabelle 44). Dies könnte darauf beruhen, dass diese Methodik weniger durch die tumorbedingten cfDNA-Anstiege beeinflusst oder das Fluoreszenzsignal dieses Anstiegs in Relation zur Hintergrundfluoreszenz und aufgrund der fehlenden Amplifikation nicht in äquivalenter Stärke zu L1PA2-qPCR erfasst wird. Des Weiteren wies die Gruppe der Tumorpatienten im Mittel eine höhere Standardabweichung auf als die Gruppe der Kontrollpatienten (s. Tabelle 42, s. Tabelle 43). Dies könnte vorrangig den teilweise sehr hohen intraoperativen „Peaks“ durch die Resektion geschuldet sein. Gleichzeitig wirft dies die Frage auf, ob und inwieweit die aus dieser hohen Standardabweichung resultierenden interindividuell unterschiedlichen Konz.-Niveaus innerhalb der Tumorgruppe eine Aussage bezüglich der jeweiligen Prognose zulassen. Nach der aktuellen Studienlage sprechen absolut höhere cfDNA-Werte nur eingeschränkt für ein schlechteres Outcome und Überlebenszeit (146, 160). Eine Korrelation zwischen L1PA2-qPCR und ADF ist nur im Falle der Tumorpatienten zu beobachten. Dies könnte einerseits aus der geringen Stichprobengröße der Kontrollgruppe resultieren. Die mittlere cfDNA-Konzentration innerhalb dieser Gruppe bewegt sich gleichzeitig in einem Bereich, für den, wie in der Diskussion zur Etablierung der AD-Fluorometrie (s. 6.1) dargelegt, eine geringe Sensitivität und eingeschränkte Differenzierbarkeit der Plasmaproben untereinander gilt. Aus dieser Beobachtung heraus wäre die nicht signifikante Korrelation in Bezug auf die Kontrollgruppe ebenfalls zu erklären.

### Operationstechnik

Die Gruppe der Patienten, die offen operiert wurden, zeigte sich hinsichtlich der cfDNA-Konz. und RFU signifikant höher als die Gruppe der Patienten, die nur einen minimal-invasiven Eingriff erhielten (s. Tabelle 46, Tabelle 47). Eine offene Operation stellt unabhängig der zugrundeliegenden Pathologie intra- sowie postoperativ eine größere Belastung für den menschlichen Körper dar, was durch diese Zahlen weiter bestätigt werden kann. So wird erneut die Relevanz zellfreier DNA als Stressmarker deutlich. Allerdings könnte dieses Ergebnis wie folgend einer gewissen Verzerrung unterliegen: Pathologien, die eine offene Resektion erfordern, könnten sich grundlegend komplexer darstellen. In onkologischer Sichtweise könnte dies eine größere Tumormasse, invasives Wachstum in angrenzende Organe/Weichteile oder eine höhere Malignität bedeuten. Diese Eigenschaften sind nach den Angaben einiger

Autoren mit höheren cfDNA-Konz. assoziiert (144, 148, 167). Daher können die erhöhten cfDNA-Konz. der offen operierten Patienten nicht eindeutig dem operativen Prozess zugeordnet werden. Gleichzeitig befinden sich unter diesen laparotomisch operierten Patienten nur Personen aus der Gruppe der Tumorpatienten, was eine Aussagekraft dieses Ergebnisses weiter einschränkt.

In Zusammenschau der Ergebnisse kann die etablierte amplifikationsunabhängige, direkfluorometrische Methodik zur Messung zellfreier DNA in Plasma im Vergleich zur Referenzmethode L1PA2-qPCR eine reliable Darstellung der perioperativen Dynamik gewährleisten. Dies gilt jedoch beschränkt auf einen Konzentrationsbereich bzw. bis zu einem Konzentrationslimit, das im Laufe der Etablierung dargestellt wurde. Der Vorteil der etablierten Methode besteht dabei vor allem in einem geringeren Zeit- und Kostenaufwand. Denkbar wäre daher eine Anwendung dieser Methode im Falle von Pathologien, die grundsätzlich mit einer höheren cfDNA-Konzentration einhergehen. Hierbei wäre speziell der onkologische Fachbereich zu nennen, für den gleichzeitig die insgesamt breiteste Studienlage hinsichtlich der Aussagekraft quantitativer und qualitativer cfDNA-Analysen besteht. So könnte diese Methode als Verlaufsparemeter für Therapie und Nachkontrolle fungieren. Das würde nicht nur operative Interventionen, sondern auch radio- und chemotherapeutische sowie kombinierte Therapieansätze miteinschließen (140, 159, 274, 275).

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Zellfreie DNA zählt zu den aussichtsreichen Biomarkern im Kontext zahlreicher physischer und pathologischer Konditionen des menschlichen Körpers. Die Einführung dieses Biomarkers in die klinische Routine gestaltet sich jedoch aufgrund eines hohen arbeits- und kostentechnischen Aufwands sowie einer starken Diversität bzw. Heterogenität hinsichtlich Methodik und Interpretation erschwert.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand daher darin, eine vereinfachte Methode der quantitativen Analytik zellfreier DNA zu etablieren. Diese unterschied sich zu bisheriger Methodik dahingehend, dass sowohl auf eine Extraktion als auch auf die Amplifikation der Nukleinsäuren verzichtet wurde. Stattdessen erfolgte die Erfassung der zellfreien DNA rein fluorometrisch mithilfe des Fluorochroms SYBR Green 1 direkt in Plasma. Die etablierte Methode sollte im Idealfall eine gleichwertige Sensitivität wie die Methode der qPCR, die zumeist den Goldstandard der cfDNA-Quantifizierung darstellt, aufweisen. Diese Fragestellung wurde anschließend anhand perioperativer Proben von Patienten, die einer Resektion benigner oder maligner Kolorektal-Pathologien unterzogen worden waren, untersucht.

Die Ergebnisse der methodischen Etablierung zeigen dabei verschiedene Problematiken der absoluten Quantifizierung auf: Zum einen war eine exakte Ermittlung oder Eliminierung der Hintergrundfluoreszenz in Plasma nicht möglich. Dies war vorrangig auf eine interindividuelle Heterogenität des Plasmahintergrunds zurückzuführen. Aufgrund der fehlenden Amplifikation der DNA und daher in Relation schwachem Fluoreszenzsignal stellt die Ermittlung der Hintergrundfluoreszenz eine wichtige Voraussetzung für eine reliable Quantifizierung dar. Zum anderen wurde eine starke Diskrepanz hinsichtlich der Fluoreszenzstärke isolierter und nativer zellfreier DNA ersichtlich, was die Quantifizierung anhand eines einheitlichen Maßstabes erheblich erschwert. Speziell im Bereich niedriger DNA-Konzentrationen war eine Differenzierung der Plasmaproben mithilfe der etablierten Methodik nicht möglich. Jedoch war es hingegen möglich die Kinetik zellfreier DNA im Verlauf von physiologischer und pathologischer Belastung darzustellen. Dies wurde anhand der perioperativen Studie und einer starken Korrelation zur qPCR bestätigt.

Damit spiegelt diese Arbeit die limitierte Aussagekraft der absoluten Quantifizierung zellfreier DNA wider und deckt sich dabei mit der aktuellen Studienlage.

Diese publizierten analytischen Methoden arbeiten zumeist fluoreszenzbasiert, was einen großen Nachteil mit sich bringt: Die Messgenauigkeit wird durch eine gewisse Hintergrundfluoreszenz ungebundener Fluorochrom-Moleküle, Kontamination mit Salzen oder Detergenzien sowie freien Nukleotiden und einzelsträngiger DNA vermindert. Speziell isolierte genomische DNA als Referenzstandard zu verwenden kann zu einer Unterschätzung des realen Ergebnisses führen (173). Gleichzeitig weisen die verwendeten Methodiken stark unterschiedliche Protokolle sowie Interpretationsansätze der Messergebnisse auf (11, 14). Daher wird eine absolute Quantifizierung zu nur einem Zeitpunkt für den klinischen Alltag als alleiniger Parameter als nicht applikabel bewertet (11). Analysen zu einzelnen Zeitpunkten, ohne diese in Bezug zu anderen Zeitpunkten oder des untersuchten Individuums selbst zu setzen, lassen nur sehr eingeschränkt Interpretationen hinsichtlich Diagnostik und Prognostik zu, was diese Arbeit bestätigt. Das Monitoring dynamischer Veränderungen zellfreier DNA einer Person hingegen gilt als vielversprechend für die Evaluation von Therapie und Krankheitsverlauf (18, 158).

Damit rückt sowohl im Kontext quantitativer als auch qualitativer Analytik das individuelle bzw. personalisierte Monitoring vermehrt in den Fokus aktueller Forschung. Ziel sollte dabei bleiben eine klinisch applikable Methodik auf einheitlicher Basis zu etablieren, um Therapie und Nachkontrolle persönlicher gestalten und verfolgen zu können.



## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Mandel P, Metais P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'Homme. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142(3-4):241-3.
2. Tug S, Helmig S, Menke J, Zahn D, Kubiak T, Schwarting A, et al. Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. *Cellular Immunology.* 2014;292(1):32-9.
3. Rainer TH, Wong LK, Lam W, Yuen E, Lam NY, Metreweli C, et al. Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clinical chemistry.* 2003;49(4):562-9.
4. Saukkonen K, Lakkisto P, Pettila V, Varpula M, Karlsson S, Ruokonen E, et al. Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock. *Clinical chemistry.* 2008;54(6):1000-7.
5. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev.* 2016;35(3):347-76.
6. Atamaniuk J, Vidotto C, Kinzlbauer M, Bachl N, Tiran B, Tschan H. Cell-free plasma DNA and purine nucleotide degradation markers following weightlifting exercise. *Eur J Appl Physiol.* 2010;110(4):695-701.
7. Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Muller MM. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clinical chemistry.* 2004;50(9):1668-70.
8. Tug S, Mehdorn M, Helmig S, Breitbach S, Ehlert T, Simon P. Exploring the Potential of Cell-Free-DNA Measurements After an Exhaustive Cycle-Ergometer Test as a Marker for Performance-Related Parameters. *Int J Sports Physiol Perform.* 2017;12(5):597-604.
9. Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Aucamp J, van Dyk E, du Plessis L, Pretorius PJ. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(1):157-65.
10. Mouliere F, Thierry AR. The importance of examining the proportion of circulating DNA originating from tumor, microenvironment and normal cells in colorectal cancer patients. *Expert opinion on biological therapy.* 2012;12 Suppl 1:S209-15.
11. van der Vaart M, Pretorius PJ. Is the role of circulating DNA as a biomarker of cancer being prematurely overrated? *Clin Biochem.* 2010;43(1-2):26-36.
12. Mader S, Pantel K. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncol Res Treat.* 2017;40(7-8):404-8.
13. Ulrich BC, Paweletz CP. Cell-Free DNA in Oncology: Gearing up for Clinic. *Ann Lab Med.* 2018;38(1):1-8.
14. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker—A critical appraisal of the literature. *Clinica Chimica Acta.* 2010;411(21):1611-24.
15. Breitbach S, Tug S, Helmig S, Zahn D, Kubiak T, Michal M, et al. Direct quantification of cell-free, circulating DNA from unpurified plasma. *PLoS One.* 2014;9(3):e87838.
16. Goldshtein H, Hausmann MJ, Douvdevani A. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann Clin Biochem.* 2009;46(Pt 6):488-94.
17. Yang J, Selvaganapathy PR, Gould TJ, Dwivedi DJ, Liu D, Fox-Robichaud AE, et al. A microfluidic device for rapid quantification of cell-free DNA in patients with severe sepsis. *Lab Chip.* 2015;15(19):3925-33.
18. Bronkhorst AJ, Aucamp J, Pretorius PJ. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry.* 2015;450:243-53.
19. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Badenhorst CP, Pretorius PJ. A historical and evolutionary perspective on the biological significance of circulating DNA and extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(23):4355-81.
20. Stroun M, Anker P. Bacterial nucleic acid synthesis in plants following bacterial contact. *Mol Gen Genet.* 1971;113(1):92-8.

21. Schutz E, Urnovitz HB, Iakoubov L, Schulz-Schaeffer W, Wemheuer W, Brenig B. Bov-tA short interspersed nucleotide element sequences in circulating nucleic acids from sera of cattle with bovine spongiform encephalopathy (BSE) and sera of cattle exposed to BSE. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2005;12(7):814-20.
22. Tan EM, Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of clinical investigation.* 1966;45(11):1732-40.
23. Kamm RC, Smith AG. Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clinical chemistry.* 1972;18(6):519-22.
24. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research.* 1977;37(3):646-50.
25. Goessl C, Krause H, Müller M, Heicappell R, Schrader M, Sachsinger J, et al. Fluorescent Methylation-specific Polymerase Chain Reaction for DNA-based Detection of Prostate Cancer in Bodily Fluids. *Cancer research.* 2000;60(21):5941-5.
26. Zhang J, Yang S, Xie Y, Chen X, Zhao Y, He D, et al. Detection of methylated tissue factor pathway inhibitor 2 and human long DNA in fecal samples of patients with colorectal cancer in China. *Cancer Epidemiol.* 2012;36(1):73-7.
27. Lapaire O, Bianchi DW, Peter I, O'Brien B, Stroh H, Cowan JM, et al. Cell-free fetal DNA in amniotic fluid: unique fragmentation signatures in euploid and aneuploid fetuses. *Clinical chemistry.* 2007;53(3):405-11.
28. Zubakov D, Hanekamp E, Kokshoorn M, van Ijcken W, Kayser M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med.* 2008;122(2):135-42.
29. Schmidt B, Carstensen T, Engel E, Jandrig B, Witt C, Fleischhacker M. Detection of cell-free nucleic acids in bronchial lavage fluid supernatants from patients with lung cancer. *Eur J Cancer.* 2004;40(3):452-60.
30. Wong LJ, Lueth M, Li XN, Lau CC, Vogel H. Detection of mitochondrial DNA mutations in the tumor and cerebrospinal fluid of medulloblastoma patients. *Cancer research.* 2003;63(14):3866-71.
31. Li H-G, Huang S-Y, Zhou H, Liao A-H, Xiong C-L. Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. *Asian J Androl.* 2009;11(6):703-9.
32. Budnik LT, Kloth S, Baur X, Preisser AM, Schwarzenbach H. Circulating mitochondrial DNA as biomarker linking environmental chemical exposure to early preclinical lesions elevation of mtDNA in human serum after exposure to carcinogenic halo-alkane-based pesticides. *PLoS One.* 2013;8(5):e64413.
33. Anker P, Stroun M, Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes as shown in an in vitro system. *Cancer research.* 1975;35(9):2375-82.
34. Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG. The occurrence of single-stranded DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus and other diseases. *The Journal of clinical investigation.* 1973;52(1):198-204.
35. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, et al. High Fragmentation Characterizes Tumour-Derived Circulating DNA. *PLoS ONE.* 2011;6(9):e23418.
36. Jiang P, Chan CWM, Chan KCA, Cheng SH, Wong J, Wong VW-S, et al. Lengthening and shortening of plasma DNA in hepatocellular carcinoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2015;112(11):E1317-E25.
37. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research.* 2001;61(4):1659-65.

38. Stroun M, Maurice P, Vasioukhin V, Lyautey J, Lederrey C, Lefort F, et al. The origin and mechanism of circulating DNA. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;906:161-8.
39. Chelobanov BP, Laktionov PP, Vlasov VV. Proteins involved in binding and cellular uptake of nucleic acids. *Biochemistry (Moscow)*. 2006;71(6):583-96.
40. Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Rykova EY, Permyakova VI, Vlassov VV, Laktionov PP. Circulating nucleic acids in blood of healthy male and female donors. *Clinical chemistry*. 2005;51(7):1317-9.
41. Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating cell-free DNA: an up-coming molecular marker in exercise physiology. *Sports Med*. 2012;42(7):565-86.
42. Lázaro-Ibáñez E, Lässer C, Shelke GV, Crescitelli R, Jang SC, Cvjetkovic A, et al. DNA analysis of low- and high-density fractions defines heterogeneous subpopulations of small extracellular vesicles based on their DNA cargo and topology. *Journal of extracellular vesicles*. 2019;8(1):1656993.
43. Laktionov P, Tamkovich S, Rykova E, Bryzgunova O, Starikov A, Kuznetsova N, et al. Extracellular Circulating Nucleic Acids in Human Plasma in Health and Disease. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids*. 2004;23:879-83.
44. Gao YJ, He YJ, Yang ZL, Shao HY, Zuo Y, Bai Y, et al. Increased integrity of circulating cell-free DNA in plasma of patients with acute leukemia. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48(11):1651-6.
45. Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):108-16.
46. Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. 1989;46(5):318-22.
47. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 1999;64(1):218-24.
48. Kenny D, Shen L-P, Kolberg JA. Detection of viral infection and gene expression in clinical tissue specimens using branched DNA (bDNA) in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(9):1219-27.
49. Cocuzza CE, Martinelli M, Sina F, Piana A, Sotgiu G, Dell'Anna T, et al. Human papillomavirus DNA detection in plasma and cervical samples of women with a recent history of low grade or precancerous cervical dysplasia. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188592.
50. Stroun M, Anker P. Nucleic acids spontaneously released by living frog auricles. *Biochem J*. 1972;128(3):100p-1p.
51. Chen X, Bonnefoi H, Diebold-Berger S, Lyautey J, Lederrey C, Faltin-Traub E, et al. Detecting tumor-related alterations in plasma or serum DNA of patients diagnosed with breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1999;5(9):2297-303.
52. Rogers JC, Boldt D, Kornfeld S, Skinner A, Valeri CR. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin or antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1972;69(7):1685-9.
53. Lui YY, Woo KS, Wang AY, Yeung CK, Li PK, Chau E, et al. Origin of plasma cell-free DNA after solid organ transplantation. *Clinical chemistry*. 2003;49(3):495-6.
54. Tug S, Helmig S, Deichmann ER, Schmeier-Jurchott A, Wagner E, Zimmermann T, et al. Exercise-induced increases in cell free DNA in human plasma originate predominantly from cells of the haematopoietic lineage. *Exercise immunology review*. 2015;21:164-73.
55. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016;164(1-2):57-68.
56. Moss J, Magenheimer J, Neiman D, Zemmour H, Loyfer N, Korach A, et al. Comprehensive human cell-type methylation atlas reveals origins of circulating cell-free DNA in health and disease. *Nature Communications*. 2018;9(1).

57. von Köckritz-Blickwede M, Goldmann O, Thulin P, Heinemann K, Norrby-Teglund A, Rohde M, et al. Phagocytosis-independent antimicrobial activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood*. 2008;111(6):3070-80.
58. Yousefi S, Gold JA, Andina N, Lee JJ, Kelly AM, Kozłowski E, et al. Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nature medicine*. 2008;14(9):949-53.
59. Remijsen Q, Vanden Berghe T, Wirawan E, Asselbergh B, Parthoens E, De Rycke R, et al. Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res*. 2011;21(2):290-304.
60. Steinberg BE, Grinstein S. Unconventional Roles of the NADPH Oxidase: Signaling, Ion Homeostasis, and Cell Death. *Science's STKE*. 2007;2007(379):pe11.
61. Urban CF, Ermert D, Schmid M, Abu-Abed U, Goosmann C, Nacken W, et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2009;5(10):e1000639.
62. Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, Misawa T, Takahama M, Kozaki T, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012;12(1):109-16.
63. Guimaraes-Costa AB, Nascimento MT, Froment GS, Soares RP, Morgado FN, Conceicao-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(16):6748-53.
64. Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, et al. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature medicine*. 2007;13(4):463-9.
65. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *The Journal of Cell Biology*. 2007;176(2):231-41.
66. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytniuk LD, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature medicine*. 2012;18(9):1386-93.
67. Demers M, Krause DS, Schatzberg D, Martinod K, Voorhees JR, Fuchs TA, et al. 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*. 2012;109(32):13076-81.
68. Nunes-Silva A, Bernardes PT, Rezende BM, Lopes F, Gomes EC, Marques PE, et al. Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study. *PLoS One*. 2014;9(5):e96464.
69. Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, Thomas GM, Martinod K, De Meyer SF, et al. Neutrophil extracellular traps promote deep vein thrombosis in mice. *J Thromb Haemost*. 2012;10(1):136-44.
70. von Brühl M-L, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, et al. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med*. 2012;209(4):819-35.
71. Soehnlein O. Multiple Roles for Neutrophils in Atherosclerosis. 2012;110(6):875-88.
72. Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Science translational medicine*. 2011;3(73):73ra20-73ra20.
73. Huh SJ, Liang S, Sharma A, Dong C, Robertson GP. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. *Cancer research*. 2010;70(14):6071-82.
74. Granot Z, Henke E, Comen EA, King TA, Norton L, Benezra R. Tumor entrained neutrophils inhibit seeding in the premetastatic lung. *Cancer cell*. 2011;20(3):300-14.

75. Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1987;23(6):707-12.
76. Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY. Extracellular nucleic acids. *Bioessays.* 2007;29(7):654-67.
77. Tamkovich SN, Cherepanova AV, Kolesnikova EV, Rykova EY, Pyshnyi DV, Vlassov VV, et al. Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006;1075:191-6.
78. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Schild M, Steinacker J, Mooren FC, et al. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117(3):325-33.
79. Emlen W, Mannik M. Effect of DNA size and strandedness on the in vivo clearance and organ localization of DNA. *Clin Exp Immunol.* 1984;56(1):185-92.
80. Hisazumi J, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. Significant role of liver sinusoidal endothelial cells in hepatic uptake and degradation of naked plasmid DNA after intravenous injection. *Pharm Res.* 2004;21(7):1223-8.
81. Emlen W, Mannik M. Kinetics and mechanisms for removal of circulating single-stranded DNA in mice. *J Exp Med.* 1978;147(3):684-99.
82. Su YH, Wang M, Brenner DE, Ng A, Melkonyan H, Umansky S, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2004;6(2):101-7.
83. Harandi AM, Holmgren J. CpG oligodeoxynucleotides and mobilization of innate mucosal immunity: tasks and tactics. *Vaccine.* 2006;24:S48-S9.
84. Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes. *J Exp Med.* 2004;199(12):1631-40.
85. Ivanov S, Dragoi A-M, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood.* 2007;110(6):1970-81.
86. Takeshita F, Leifer C, Gursel I, Ishii K, Takeshita S, Gursel M, et al. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 9 in CpG DNA-Induced Activation of Human Cells1. *The Journal of Immunology.* 2001;167:3555-8.
87. Cardon LR, Burge C, Clayton DA, Karlin S. Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994;91(9):3799-803.
88. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996;93(7):2879-83.
89. Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 1996;157(5):1840-5.
90. Mor G, Klinman DM, Shapiro S, Hagiwara E, Sedegah M, Norman JA, et al. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein plasmid DNA. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 1995;155(4):2039-46.
91. Halpern MD, Kurlander RJ, Pisetsky DS. Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cellular immunology.* 1996;167(1):72-8.
92. Napirei M, Karsunky H, Zevnik B, Stephan H, Mannherz HG, Möröy T. Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice. *Nature Genetics.* 2000;25(2):177-81.

93. Martínez-Valle F, Balada E, Ordi - Ros J, Bujan-Rivas S, Sellas A, Vilardell-Tarres M. DNase I activity in patients with systemic lupus erythematosus: Relationship with epidemiological, clinical, immunological and therapeutical features. *Lupus*. 2009;18:418-23.
94. Napirei M, Gultekin A, Kloeckl T, Moroy T, Frostegard J, Mannherz HG. Systemic lupus-erythematosus: deoxyribonuclease 1 in necrotic chromatin disposal. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006;38(3):297-306.
95. Scharfe-Nugent A, Corr S, Carpenter S, Keogh L, Doyle B, Martin C, et al. TLR9 Provokes Inflammation in Response to Fetal DNA: Mechanism for Fetal Loss in Preterm Birth and Preeclampsia. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012;188:5706-12.
96. Anker P, Jachertz D, Maurice PA, Stroun M. Nude mice injected with DNA released by antigen stimulated human T lymphocytes produce specific antibodies expressing human characteristics. *Cell biochemistry and function*. 1984;2(1):33-7.
97. Spetz A-L, Patterson B, Loré K, Andersson J, Holmgren L. Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1999;163:736-42.
98. Mittra I, Khare NK, Raghuram GV, Chaubal R, Khambatti F, Gupta D, et al. Circulating nucleic acids damage DNA of healthy cells by integrating into their genomes. *J Biosci*. 2015;40(1):91-111.
99. García-Olmo DC, Gutiérrez-González L, Ruiz-Piqueras R, Picazo MG, García-Olmo D. Detection of circulating tumor cells and of tumor DNA in plasma during tumor progression in rats. *Cancer Letters*. 2005;217(1):115-23.
100. García-Olmo DC, Domínguez C, García-Arranz M, Anker P, Stroun M, García-Verdugo JM, et al. Cell-free nucleic acids circulating in the plasma of colorectal cancer patients induce the oncogenic transformation of susceptible cultured cells. *Cancer research*. 2010;70(2):560-7.
101. Bergsmedh A, Ehnfors J, Kawane K, Motoyama N, Nagata S, Holmgren L. DNase II and the Chk2 DNA Damage Pathway Form a Genetic Barrier Blocking Replication of Horizontally Transferred DNA. *Molecular Cancer Research*. 2006;4(3):187.
102. Patutina O, Mironova N, Ryabchikova E, Popova N, Nikolin V, Kaledin V, et al. Inhibition of metastasis development by daily administration of ultralow doses of RNase A and DNase I. *Biochimie*. 2011;93(4):689-96.
103. De Lamirande G. Action of deoxyribonuclease and ribonuclease on the growth of Ehrlich ascites carcinoma in mice. *Nature*. 1961;192:52-4.
104. Chen Z, Fadiel A, Naftolin F, Eichenbaum KD, Xia Y. Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology. *Med Hypotheses*. 2005;65(5):956-61.
105. Fu Z, Dozmorov IM, Keller ET. Osteoblasts produce soluble factors that induce a gene expression pattern in non-metastatic prostate cancer cells, similar to that found in bone metastatic prostate cancer cells. *The Prostate*. 2002;51(1):10-20.
106. Atamaniuk J, Hsiao YY, Mustak M, Bernhard D, Erlacher L, Fodinger M, et al. Analysing cell-free plasma DNA and SLE disease activity. *European journal of clinical investigation*. 2011;41(6):579-83.
107. Hendy OM, Motalib TA, El Shafie MA, Khalaf FA, Kotb SE, Khalil A, et al. Circulating cell free DNA as a predictor of systemic lupus erythematosus severity and monitoring of therapy. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*. 2016;17(1):79-85.
108. Xu Y, Song Y, Chang J, Zhou X, Qi Q, Tian X, et al. High levels of circulating cell-free DNA are a biomarker of active SLE. *European journal of clinical investigation*. 2018;48(11):e13015-e.
109. <RiboGreen.pdf>.
110. Petri M, Orbai AM, Alarcon GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2012;64(8):2677-86.

111. Hajizadeh S, DeGroot J, TeKoppele JM, Tarkowski A, Collins LV. Extracellular mitochondrial DNA and oxidatively damaged DNA in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(5):R234-R40.
112. Hashimoto T, Yoshida K, Hashimoto N, Nakai A, Kaneshiro K, Suzuki K, et al. Circulating cell free DNA: a marker to predict the therapeutic response for biological DMARDs in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis.* 2017;20(6):722-30.
113. Abdelal IT, Zakaria MA, Sharaf DM, Elakad GM. Levels of plasma cell-free DNA and its correlation with disease activity in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients. *The Egyptian Rheumatologist.* 2016;38(4):295-300.
114. Borissoff JI, Joosen IA, Versteyleen MO, Brill A, Fuchs TA, Savchenko AS, et al. Elevated levels of circulating DNA and chromatin are independently associated with severe coronary atherosclerosis and a prothrombotic state. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(8):2032-40.
115. Shimony A, Zahger D, Gilutz H, Goldstein H, Orlov G, Merkin M, et al. Cell free DNA detected by a novel method in acute ST-elevation myocardial infarction patients. *Acute cardiac care.* 2010;12:109-11.
116. Jing R-R, Wang H-M, Cui M, Fang M-K, Qiu X-J, Wu X-H, et al. A sensitive method to quantify human cell-free circulating DNA in blood: Relevance to myocardial infarction screening. *Clinical Biochemistry.* 2011;44(13):1074-9.
117. Lou X, Hou Y, Liang D, Peng L, Chen H, Ma S, et al. A novel Alu-based real-time PCR method for the quantitative detection of plasma circulating cell-free DNA: sensitivity and specificity for the diagnosis of myocardial infarction. *Int J Mol Med.* 2015;35(1):72-80.
118. Xie J, Yang J, Hu P. Correlations of Circulating Cell-Free DNA With Clinical Manifestations in Acute Myocardial Infarction. *Am J Med Sci.* 2018;356(2):121-9.
119. Cui M, Fan M, Jing R, Wang H, Qin J, Sheng H, et al. Cell-Free circulating DNA: a new biomarker for the acute coronary syndrome. *Cardiology.* 2013;124(2):76-84.
120. Vajpeyee A, Wijatmiko T, Vajpeyee M, Taywade O. Cell free DNA: A Novel Predictor of Neurological Outcome after Intravenous Thrombolysis and/or Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke Patients. *Neurointervention.* 2018;13(1):13-9.
121. Dwivedi DJ, Toltl LJ, Swystun LL, Pogue J, Liaw K-L, Weitz JI, et al. Prognostic utility and characterization of cell-free DNA in patients with severe sepsis. 2012;16(4):R151.
122. Rhodes A, Wort SJ, Thomas H, Collinson P, Bennett ED. Plasma DNA concentration as a predictor of mortality and sepsis in critically ill patients. *Critical care.* 2006;10(2):R60.
123. Lo YM, Rainer TH, Chan LY, Hjelm NM, Cocks RA. Plasma DNA as a prognostic marker in trauma patients. *Clinical chemistry.* 2000;46(3):319-23.
124. Shaked G, Douvdevani A, Yair S, Zlotnik A, Czeiger D. The role of cell-free DNA measured by a fluorescent test in the management of isolated traumatic head injuries. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2014;22:21.
125. Honda H, Miharu N, Ohashi Y, Ohama K. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of maternal serum. *Clinical chemistry.* 2001;47(1):41-6.
126. Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma. *Lancet.* 2000;356(9236):1170.
127. Chiu RW, Poon LL, Lau TK, Leung TN, Wong EM, Lo YM. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clinical chemistry.* 2001;47(9):1607-13.
128. Mackie FL, Hemming K, Allen S, Morris RK, Kilby MD. The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology.* 2017;124(1):32-46.
129. Porreco RP, Garite TJ, Maurel K, Marusiak B, Ehrich M, van den Boom D, et al. Noninvasive prenatal screening for fetal trisomies 21, 18, 13 and the common sex chromosome

- aneuploidies from maternal blood using massively parallel genomic sequencing of DNA. *Am J Obstet Gynecol.* 2014;211(4):365.e1-12.
130. Chitty LS, Finning K, Wade A, Soothill P, Martin B, Oxenford K, et al. Diagnostic accuracy of routine antenatal determination of fetal RHD status across gestation: population based cohort study. *Bmj.* 2014;349:g5243.
131. Dugoff L, Barberio A, Whittaker PG, Schwartz N, Sehdev H, Bastek JA. Cell-free DNA fetal fraction and preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2016;215(2):231.e1-e7.
132. Jakobsen TR, Clausen FB, Rode L, Dziegiel MH, Tabor A. High levels of fetal DNA are associated with increased risk of spontaneous preterm delivery. *Prenat Diagn.* 2012;32(9):840-5.
133. Poon LC, Musci T, Song K, Syngelaki A, Nicolaides KH. Maternal plasma cell-free fetal and maternal DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to fetal and maternal characteristics and pregnancy outcomes. *Fetal Diagn Ther.* 2013;33(4):215-23.
134. Quezada MS, Francisco C, Dumitrascu-Biris D, Nicolaides KH, Poon LC. Fetal fraction of cell-free DNA in maternal plasma in the prediction of spontaneous preterm delivery. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45(1):101-5.
135. Thurik FF, Lamain-de Ruyter M, Javadi A, Kwee A, Woortmeijer H, Page-Christiaens GCML, et al. Absolute first trimester cell-free DNA levels and their associations with adverse pregnancy outcomes. *Prenat Diagn.* 2016;36(12):1104-11.
136. Leung TN, Zhang J, Lau TK, Chan LY, Lo YM. Increased maternal plasma fetal DNA concentrations in women who eventually develop preeclampsia. *Clinical chemistry.* 2001;47(1):137-9.
137. Eche S, Mackraj I, Moodley J. Circulating fetal and total cell-free DNA, and sHLA-G in black South African women with gestational hypertension and pre-eclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2017;36(4):295-301.
138. Silver RM, Myatt L, Hauth JC, Leveno KJ, Peaceman AM, Ramin SM, et al. Cell-Free Total and Fetal DNA in First Trimester Maternal Serum and Subsequent Development of Preeclampsia. *Am J Perinatol.* 2017;34(2):191-8.
139. Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Science Translational Medicine.* 2014;6(224):224ra24-ra24.
140. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine.* 2008;14(9):985-90.
141. Sozzi G, Conte D, Leon ME, Cirincione R, Roz L, Roz E, et al. O-297 Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *Lung Cancer.* 2003;41:S86-S7.
142. Paci M, Maramotti S, Bellesia E, Formisano D, Albertazzi L, Ricchetti T, et al. Circulating plasma DNA as diagnostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2009;64(1):92-7.
143. Jung K, Stephan C, Lewandowski M, Klotzek S, Jung M, Kristiansen G, et al. Increased cell-free DNA in plasma of patients with metastatic spread in prostate cancer. *Cancer letters.* 2004;205(2):173-80.
144. Altimari A, Grigioni AD, Benedettini E, Gabusi E, Schiavina R, Martinelli A, et al. Diagnostic role of circulating free plasma DNA detection in patients with localized prostate cancer. *Am J Clin Pathol.* 2008;129(5):756-62.
145. Pinzani P, Salvianti F, Zaccara S, Massi D, De Giorgi V, Pazzagli M, et al. Circulating cell-free DNA in plasma of melanoma patients: Qualitative and quantitative considerations. *Clinica Chimica Acta.* 2011;412(23):2141-5.
146. Bastian PJ, Palapattu GS, Yegnasubramanian S, Lin X, Rogers CG, Mangold LA, et al. Prognostic value of preoperative serum cell-free circulating DNA in men with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2007;13(18 Pt 1):5361-7.



147. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S, et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol.* 2006;24(26):4270-6.
148. Kohler C, Radpour R, Barekati Z, Asadollahi R, Bitzer J, Wight E, et al. Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer.* 2009;8:105-.
149. Schwarzenbach H, Müller V, Stahmann N, Pantel K. Detection and characterization of circulating microsatellite-DNA in blood of patients with breast cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2004;1022:25-32.
150. Zhang R, Shao F, Wu X, Ying K. Value of quantitative analysis of circulating cell free DNA as a screening tool for lung cancer: a meta-analysis. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands).* 2010;69(2):225-31.
151. Belinsky SA, Klinge DM, Dekker JD, Smith MW, Bocklage TJ, Gilliland FD, et al. Gene promoter methylation in plasma and sputum increases with lung cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2005;11(18):6505-11.
152. Schmidt B, Weickmann S, Witt C, Fleischhacker M. Integrity of cell-free plasma DNA in patients with lung cancer and nonmalignant lung disease. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2008;1137:207-13.
153. Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, Kupis W, Rudzinski P, Langfort R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease. *British Journal of Cancer.* 2015;113(3):476-83.
154. Chun FKH, Müller I, Lange I, Friedrich MG, Erbersdobler A, Karakiewicz PI, et al. Circulating tumour-associated plasma DNA represents an independent and informative predictor of prostate cancer. *BJU Int.* 2006;98(3):544-8.
155. Huang ZH, Li LH, Hua D. Quantitative analysis of plasma circulating DNA at diagnosis and during follow-up of breast cancer patients. *Cancer letters.* 2006;243(1):64-70.
156. Gormally E, Hainaut P, Caboux E, Airolidi L, Autrup H, Malaveille C, et al. Amount of DNA in plasma and cancer risk: a prospective study. *International journal of cancer.* 2004;111(5):746-9.
157. Silva JM, Silva J, Sanchez A, Garcia JM, Dominguez G, Provencio M, et al. Tumor DNA in plasma at diagnosis of breast cancer patients is a valuable predictor of disease-free survival. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2002;8(12):3761-6.
158. Yoon K-A, Park S, Lee SH, Kim JH, Lee JS. Comparison of circulating plasma DNA levels between lung cancer patients and healthy controls. *The Journal of molecular diagnostics : JMD.* 2009;11(3):182-5.
159. Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Efficacy of circulating plasma DNA as a diagnostic tool for advanced non-small cell lung cancer and its predictive utility for survival and response to chemotherapy. *Lung Cancer.* 2010;70(2):211-7.
160. Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Plasma DNA level in predicting therapeutic efficacy in advanced nonsmall cell lung cancer. *European Respiratory Journal.* 2010;36(4):885-92.
161. Banki F, Mason RJ, Oh D, Hagen JA, DeMeester SR, Lipham JC, et al. Plasma DNA as a molecular marker for completeness of resection and recurrent disease in patients with esophageal cancer. *Arch Surg.* 2007;142(6):533-9.
162. Perego RA, Corizzato M, Brambilla P, Ferrero S, Bianchi C, Fasoli E, et al. Concentration and microsatellite status of plasma DNA for monitoring patients with renal carcinoma. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 2008;44(7):1039-47.
163. Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, et al. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer research.* 2001;61(12):4675-8.

164. Deligezer U, Eralp Y, Akisik EE, Akisik EZ, Saip P, Topuz E, et al. Size distribution of circulating cell-free DNA in sera of breast cancer patients in the course of adjuvant chemotherapy. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2008;46(3):311-7.
165. Tomita H, Ichikawa D, Ikoma D, Sai S, Tani N, Ikoma H, et al. Quantification of circulating plasma DNA fragments as tumor markers in patients with esophageal cancer. *Anticancer research*. 2007;27(4C):2737-41.
166. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kassaei K, Cheng CC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer research*. 2003;63(14):3966-8.
167. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ, et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clinical chemistry*. 2006;52(6):1062-9.
168. Jiang W-W, Zahurak M, Goldenberg D, Milman Y, Park HL, Westra WH, et al. Increased plasma DNA integrity index in head and neck cancer patients. *International journal of cancer*. 2006;119(11):2673-6.
169. Chen H, Sun L-y, Zheng H-q, Zhang Q-f, Jin X-m. Total serum DNA and DNA integrity: diagnostic value in patients with hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Pathology*. 2012;44(4):318-24.
170. Ellinger J, Bastian PJ, Ellinger N, Kahl P, Perabo FG, Büttner R, et al. Apoptotic DNA fragments in serum of patients with muscle invasive bladder cancer: a prognostic entity. *Cancer letters*. 2008;264(2):274-80.
171. Holdenrieder S, Burges A, Reich O, Spelsberg FW, Stieber P. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1137:162-70.
172. Werner M. Allgemeine Onkogenese und Tumorpathologie. In: Siewert JR, Rothmund M, Schumpelick V, editors. *Praxis der Viszeralchirurgie Onkologische Chirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 3-12.
173. Volckmar A-L, Sültmann H, Riediger A, Fioretos T, Schirmacher P, Endris V, et al. A field guide for cancer diagnostics using cell-free DNA: From principles to practice and clinical applications. *Genes Chromosomes Cancer*. 2018;57(3):123-39.
174. Szymańska K, Chen J-G, Cui Y, Gong YY, Turner PC, Villar S, et al. TP53 R249S mutations, exposure to aflatoxin, and occurrence of hepatocellular carcinoma in a cohort of chronic hepatitis B virus carriers from Qidong, China. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(5):1638-43.
175. Lindfors U, Zetterquist H, Papadogiannakis N, Olivecrona H. Persistence of K-ras mutations in plasma after colorectal tumor resection. *Anticancer research*. 2005;25(1B):657-61.
176. Magistrelli P, Neri M, Granone P, Cesario A, Paleari L, Russo P. K-ras mutations in circulating DNA from pancreatic and lung cancers: bridging methodology for a common validation of the molecular diagnosis value. *Pancreas*. 2008;37(1):101-2.
177. Dobrzycka B, Terlikowski SJ, Mazurek A, Kowalczyk O, Niklinska W, Chyczewski L, et al. Circulating free DNA, p53 antibody and mutations of KRAS gene in endometrial cancer. *International journal of cancer*. 2010;127(3):612-21.
178. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, et al. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16368-73.
179. Page K, Hava N, Ward B, Brown J, Guttery DS, Ruangpratheep C, et al. Detection of HER2 amplification in circulating free DNA in patients with breast cancer. *British journal of cancer*. 2011;104(8):1342-8.
180. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2013;368(13):1199-209.

181. Mack PC, Holland WS, Burich RA, Sangha R, Solis LJ, Li Y, et al. EGFR mutations detected in plasma are associated with patient outcomes in erlotinib plus docetaxel-treated non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009;4(12):1466-72.
182. Park KU, Lee HE, Park DJ, Jung EJ, Song J, Kim H-H, et al. MYC quantitation in cell-free plasma DNA by real-time PCR for gastric cancer diagnosis. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2009;47(5):530-6.
183. Gadgeel SM, Cote ML, Schwartz AG, Matherly LH, Wozniak A, Bepler G. Parameters for individualizing systemic therapy in non-small cell lung cancer. *Drug Resist Updat.* 2010;13(6):196-204.
184. Lehmann U. DNA-Methylierung. *Der Pathologe.* 2010;31(2):274-9.
185. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer research.* 1999;59(1):67-70.
186. Radpour R, Barekati Z, Kohler C, Lv Q, Bürki N, Diesch C, et al. Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes Involved in Critical Regulatory Pathways for Developing a Blood-Based Test in Breast Cancer. *PLOS ONE.* 2011;6(1):e16080.
187. Ling ZQ, Zhao Q, Zhou SL, Mao WM. MSH2 promoter hypermethylation in circulating tumor DNA is a valuable predictor of disease-free survival for patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol.* 2012;38(4):326-32.
188. Sunami E, Shinozaki M, Higano CS, Wollman R, Dorff TB, Tucker SJ, et al. Multimarker circulating DNA assay for assessing blood of prostate cancer patients. *Clinical chemistry.* 2009;55(3):559-67.
189. Chuang C-K, Chu D-C, Tzou R-D, Liou S-I, Chia J-H, Sun C-F. Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking GSTP1 gene is a potential plasma DNA biomarker for detecting prostate carcinoma. *Cancer Detect Prev.* 2007;31(1):59-63.
190. Mirza S, Sharma G, Parshad R, Srivastava A, Gupta SD, Ralhan R. Clinical significance of Stratifin, ERalpha and PR promoter methylation in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients. *Clinical biochemistry.* 2010;43(4-5):380-6.
191. Ellinger J, Haan K, Heukamp LC, Kahl P, Büttner R, Müller SC, et al. CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer. *The Prostate.* 2008;68(1):42-9.
192. Bastian PJ, Palapattu GS, Lin X, Yegnasubramanian S, Mangold LA, Trock B, et al. Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following radical prostatectomy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;11(11):4037-43.
193. Board RE, Knight L, Greystoke A, Blackhall FH, Hughes A, Dive C, et al. DNA methylation in circulating tumour DNA as a biomarker for cancer. *Biomark Insights.* 2008;2:307-19.
194. Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, et al. Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006;24(26):4262-9.
195. Dietmaier W. Mikrosatelliteninstabilität. *Der Pathologe.* 2010;31(2):268-73.
196. Hamana K, Uzawa K, Ogawara K, Shiiba M, Bukawa H, Yokoe H, et al. Monitoring of circulating tumour-associated DNA as a prognostic tool for oral squamous cell carcinoma. *British journal of cancer.* 2005;92(12):2181-4.
197. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1775(1):181-232.
198. Utting M, Werner W, Dahse R, Schubert J, Junker K. Microsatellite analysis of free tumor DNA in urine, serum, and plasma of patients: a minimally invasive method for the detection of bladder cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2002;8(1):35-40.

199. Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, Dossenbach-Glaninger A, Mueller MM. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur J Appl Physiol*. 2008;104(4):711-7.
200. Fatouros IG, Destouni A, Margonis K, Jamurtas AZ, Vrettou C, Kouretas D, et al. Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clinical chemistry*. 2006;52(9):1820-4.
201. Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Niess AM, Simon P. Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clinical chemistry*. 2011;57(4):633-6.
202. Breitbach S, Sterzing B, Magallanes C, Tug S, Simon P. Direct measurement of cell-free DNA from serially collected capillary plasma during incremental exercise. *J Appl Physiol* (1985). 2014;117(2):119-30.
203. Velders M, Treff G, Machus K, Bosnyak E, Steinacker J, Schumann U. Exercise is a potent stimulus for enhancing circulating DNase activity. *Clin Biochem*. 2014;47(6):471-4.
204. Fruhbeis C, Helmig S, Tug S, Simon P, Kramer-Albers EM. Physical exercise induces rapid release of small extracellular vesicles into the circulation. *Journal of extracellular vesicles*. 2015;4:28239.
205. Helmig S, Fruhbeis C, Kramer-Albers EM, Simon P, Tug S. Release of bulk cell free DNA during physical exercise occurs independent of extracellular vesicles. *Eur J Appl Physiol*. 2015;115(11):2271-80.
206. Mooren FC, Blöming D, Lechtermann A, Lerch MM, Völker K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md : 1985). 2002;93(1):147-53.
207. Kruger K, Agnischock S, Lechtermann A, Tiwari S, Mishra M, Pilat C, et al. Intensive resistance exercise induces lymphocyte apoptosis via cortisol and glucocorticoid receptor-dependent pathways. 2011;110(5):1226-32.
208. Tug S, Tross A-K, Hegen P, Neuberger EWI, Helmig S, Schöllhorn W, et al. Acute effects of strength exercises and effects of regular strength training on cell free DNA concentrations in blood plasma. *PloS one*. 2017;12(9):e0184668-e.
209. Haller N, Helmig S, Taenny P, Petry J, Schmidt S, Simon P. Circulating, cell-free DNA as a marker for exercise load in intermittent sports. *PloS one*. 2018;13(1):e0191915-e.
210. Andreatta MV, Curty VM, Coutinho JVS, Santos MÂA, Vassallo PF, de Sousa NF, et al. Cell-Free DNA as an Earlier Predictor of Exercise-Induced Performance Decrement Related to Muscle Damage. *International journal of sports physiology and performance*. 2018;13(7):953-6.
211. Haller N, Tug S, Breitbach S, Jorgensen A, Simon P. Increases in Circulating Cell-Free DNA During Aerobic Running Depend on Intensity and Duration. *Int J Sports Physiol Perform*. 2017;12(4):455-62.
212. Hummel EM, Hesas E, Müller S, Beiter T, Fisch M, Eibl A, et al. Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Transl Psychiatry*. 2018;8(1):236-.
213. Haller N, Ehlert T, Schmidt S, Ochmann D, Sterzing B, Grus F, et al. Circulating, Cell-Free DNA for Monitoring Player Load in Professional Football. *International journal of sports physiology and performance*. 2019;14(6):718-26.
214. Halson SL. Monitoring Training Load to Understand Fatigue in Athletes. *Sports Medicine*. 2014;44(2):139-47.
215. Meddeb R, Pisareva E, Thierry AR. Guidelines for the Preanalytical Conditions for Analyzing Circulating Cell-Free DNA. *Clinical chemistry*. 2019;65(5):623-33.
216. Meddeb R, Dache ZAA, Thezenas S, Otandault A, Tanos R, Pastor B, et al. Quantifying circulating cell-free DNA in humans. *Scientific Reports*. 2019;9(1):5220.
217. Caboux E, Lallemand C, Ferro G, Hémon B, Mendy M, Biessy C, et al. Sources of pre-analytical variations in yield of DNA extracted from blood samples: analysis of 50,000 DNA samples in EPIC. *PloS one*. 2012;7(7):e39821-e.

218. Gaillard C, Strauss F. Avoiding adsorption of DNA to polypropylene tubes and denaturation of short DNA fragments. *Technical Tips Online*. 1998;3(1):63-5.
219. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*. 2013;424:222-30.
220. Lam NYL, Rainer TH, Chiu RWK, Lo YMD. EDTA is a better anticoagulant than heparin or citrate for delayed blood processing for plasma DNA analysis. *Clinical chemistry*. 2004;50(1):256-7.
221. Xue X, Teare MD, Holen I, Zhu YM, Woll PJ. Optimizing the yield and utility of circulating cell-free DNA from plasma and serum. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2009;404(2):100-4.
222. Lui YYN, Chik K-W, Lo YMD. Does centrifugation cause the ex vivo release of DNA from blood cells? *Clinical chemistry*. 2002;48(11):2074-6.
223. Chan KCA, Yeung S-W, Lui W-B, Rainer TH, Lo YMD. Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clinical chemistry*. 2005;51(4):781-4.
224. Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, Mollevi C, Lopez-Crapez E, Rolet F, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. *Nature medicine*. 2014;20(4):430-5.
225. Lee TH, Montalvo L, Chrebtow V, Busch MP. Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*. 2001;41(2):276-82.
226. Thijssen MAMA, Swinkels DW, Ruers TJM, de Kok JB. Difference between free circulating plasma and serum DNA in patients with colorectal liver metastases. *Anticancer research*. 2002;22(1A):421-5.
227. Jung M, Klotzek S, Lewandowski M, Fleischhacker M, Jung K. Changes in concentration of DNA in serum and plasma during storage of blood samples. *Clinical chemistry*. 2003;49(6 Pt 1):1028-9.
228. Sozzi G, Roz L, Conte D, Mariani L, Andriani F, Verderio P, et al. Effects of prolonged storage of whole plasma or isolated plasma DNA on the results of circulating DNA quantification assays. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(24):1848-50.
229. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001;85(4):639-46.
230. El Messaoudi S, Thierry AR. Pre-analytical Requirements for Analyzing Nucleic Acids from Blood. In: Gahan PB, editor. *Circulating Nucleic Acids in Early Diagnosis, Prognosis and Treatment Monitoring: An Introduction*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2015. p. 45-69.
231. Fleischhacker M, Schmidt B, Weickmann S, Fersching DMI, Leszinski GS, Siegele B, et al. Methods for isolation of cell-free plasma DNA strongly affect DNA yield. 2011;412(23-24):2085-8.
232. Devonshire AS, Whale AS, Gutteridge A, Jones G, Cowen S, Foy CA, et al. Towards standardisation of cell-free DNA measurement in plasma: controls for extraction efficiency, fragment size bias and quantification. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(26):6499-512.
233. Kirsch C, Weickmann S, Schmidt B, Fleischhacker M. An improved method for the isolation of free-circulating plasma DNA and cell-free DNA from other body fluids. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008;1137:135-9.
234. Lee H, Na W, Park C, Park KH, Shin S. Centrifugation-free extraction of circulating nucleic acids using immiscible liquid under vacuum pressure. *Scientific Reports*. 2018;8(1):5467.
235. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HRH. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*. 2005;5(2):209-19.
236. Holzapfel B, Wickert L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Methoden und Anwendungsgebiete. Biologie in unserer Zeit*. 2007;37(2):120-6.

237. Weng J-L, Atyah M, Zhou C-H, Ren N. Progress in quantitative technique of circulating cell free DNA and its role in cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Genet.* 2019;239:75-84.
238. Alcaide M, Yu S, Davidson J, Albuquerque M, Bushell K, Fornika D, et al. Targeted error-suppressed quantification of circulating tumor DNA using semi-degenerate barcoded adapters and biotinylated baits. *Scientific reports.* 2017;7(1):10574-.
239. Gal S, Fidler C, Lo YMD, Taylor M, Han C, Moore J, et al. Quantitation of circulating DNA in the serum of breast cancer patients by real-time PCR. *British journal of cancer.* 2004;90(6):1211-5.
240. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal.* 2002;16(1):47-51.
241. Manokhina I, Singh TK, Peñaherrera MS, Robinson WP. Quantification of cell-free DNA in normal and complicated pregnancies: overcoming biological and technical issues. *PloS one.* 2014;9(7):e101500-e.
242. Nicolaides KH, Syngelaki A, del Mar Gil M, Quezada MS, Zinevich Y. Prenatal detection of fetal triploidy from cell-free DNA testing in maternal blood. *Fetal Diagn Ther.* 2014;35(3):212-7.
243. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X, et al. Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect *KRAS* Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clinical chemistry.* 2013;59(12):1722.
244. Atkins P. *Physikalische Chemie, 5. Auflage.* Weinheim: Wiley-VCH; 2013.
245. Tuma RS, Beaudet MP, Jin X, Jones LJ, Cheung C-Y, Yue S, et al. Characterization of SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain: A Dye Optimized for Use with 300-nm Ultraviolet Transilluminators. *Analytical Biochemistry.* 1999;268(2):278-88.
246. Vitzthum F, Geiger G, Bisswanger H, Brunner H, Bernhagen J. A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system. *Anal Biochem.* 1999;276(1):59-64.
247. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(12):e103.
248. Maire F, Micard S, Hammel P, Voitot H, Lévy P, Cugnenc PH, et al. Differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic cancer: value of the detection of *KRAS2* mutations in circulating DNA. *British journal of cancer.* 2002;87(5):551-4.
249. Latt SA, Stetten G, Juergens LA, Willard HF, Scher CD. Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry.* 1975;23(7):493-505.
250. Busto N, Cano B, Tejido R, Biver T, Leal JM, Venturini M, et al. Aggregation features and fluorescence of Hoechst 33258. *J Phys Chem B.* 2015;119(13):4575-81.
251. Beau-Faller M, Gaub MP, Schneider A, Ducrocq X, Massard G, Gasser B, et al. Plasma DNA microsatellite panel as sensitive and tumor-specific marker in lung cancer patients. *International journal of cancer.* 2003;105(3):361-70.
252. Mori T, O'Day SJ, Umetani N, Martinez SR, Kitago M, Koyanagi K, et al. Predictive utility of circulating methylated DNA in serum of melanoma patients receiving biochemotherapy. *J Clin Oncol.* 2005;23(36):9351-8.
253. Rengarajan K, Cristol SM, Mehta M, Nickerson JM. Quantifying DNA concentrations using fluorometry: a comparison of fluorophores. *Mol Vis.* 2002;8:416-21.
254. Singer VL, Jones LJ, Yue ST, Haugland RP. Characterization of PicoGreen reagent and development of a fluorescence-based solution assay for double-stranded DNA quantitation. *Analytical biochemistry.* 1997;249(2):228-38.
255. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao K, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin Chim Acta.* 2002;321(1-2):77-87.

256. Chiminigi M, Moutereau S, Pernet P, Conti M, Barbu V, Lemant J, et al. Specific real-time PCR vs. fluorescent dyes for serum free DNA quantification. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(8):993-5.
257. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. Comparison of methods for the quantification of cell-free DNA isolated from cell culture supernatant. *Tumour Biol.* 2019;41(8):1010428319866369-.
258. Pérez-Barrios C, Nieto-Alcolado I, Torrente M, Jiménez-Sánchez C, Calvo V, Gutierrez-Sanz L, et al. Comparison of methods for circulating cell-free DNA isolation using blood from cancer patients: impact on biomarker testing. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(6):665-72.
259. Malentacchi F, Pizzamiglio S, Verderio P, Pazzagli M, Orlando C, Ciniselli CM, et al. Influence of storage conditions and extraction methods on the quantity and quality of circulating cell-free DNA (ccfDNA): the SPIDIA-DNAplas External Quality Assessment experience. *Clinical chemistry and laboratory medicine.* 2015;53(12):1935-42.
260. Fong SL, Zhang JT, Lim CK, Eu KW, Liu Y. Comparison of 7 methods for extracting cell-free DNA from serum samples of colorectal cancer patients. *Clinical chemistry.* 2009;55(3):587-9.
261. Jorgez CJ, Dang DD, Simpson JL, Lewis DE, Bischoff FZ. Quantity versus quality: optimal methods for cell-free DNA isolation from plasma of pregnant women. *Genet Med.* 2006;8(10):615-9.
262. Han X, Wang E, Cui Y, Lin Y, Chen H, An R, et al. The staining efficiency of cyanine dyes for single-stranded DNA is enormously dependent on nucleotide composition. *ELECTROPHORESIS.* 2019;40(12-13):1708-14.
263. Czeiger D, Shaked G, Eini H, Vered I, Belochitski O, Avriel A, et al. Measurement of Circulating Cell-Free DNA Levels by a New Simple Fluorescent Test in Patients With Primary Colorectal Cancer. *American Journal of Clinical Pathology.* 2011;135(2):264-70.
264. Agassi R, Czeiger D, Shaked G, Avriel A, Sheynin J, Lavrenkov K, et al. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a simple fluorescent test in patients with breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 2015;143(1):18-24.
265. Shoham Y, Krieger Y, Perry ZH, Shaked G, Bogdanov-Berezovsky A, Silberstein E, et al. Admission Cell Free DNA as a Prognostic Factor in Burns: Quantification by Use of a Direct Rapid Fluorometric Technique. *BioMed research international.* 2014;2014:1-5.
266. Ehlert T. Analyse zellfreier Tumor-DNA im Blut von Tumorpatienten in Situationen physischer Belastung mittels einer neuen, hochsensitiven quantitativen nested real-time-PCR-Anwendung [Ph.D. Thesis]. Mainz2017.
267. Silbernagl S. Physiologie. Würzburg: Georg Thieme Verlag; 2009.
268. Walter EJ, Hanna-Jumma S, Carraretto M, Forni L. The pathophysiological basis and consequences of fever. *Critical care (London, England).* 2016;20(1):200-.
269. Rykova EY, Wunsche W, Brizgunova OE, Skvortsova TE, Tamkovich SN, Senin IS, et al. Concentrations of circulating RNA from healthy donors and cancer patients estimated by different methods. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006;1075:328-33.
270. Molbiol.ru. 2013.
271. Kratochwil A, Scheibe R, Wiczorek H. Campbell, N.A. & Reece, J.B.: Biologie. 7. Auflage. Deutsche Übersetzung2009.
272. Charuwat P, Boardman G, Bott C, Novak JT. Thermal Degradation of Long Chain Fatty Acids. *Water Environ Res.* 2018;90(3):278-87.
273. Malonga H, Neault JF, Arakawa H, Tajmir-Riahi HA. DNA interaction with human serum albumin studied by affinity capillary electrophoresis and FTIR spectroscopy. *DNA and cell biology.* 2006;25(1):63-8.
274. Zitt M, Müller HM, Rochel M, Schwendinger V, Zitt M, Goebel G, et al. Circulating cell-free DNA in plasma of locally advanced rectal cancer patients undergoing preoperative

- chemoradiation: a potential diagnostic tool for therapy monitoring. *Dis Markers*. 2008;25(3):159-65.
275. Cheng C, Omura-Minamisawa M, Kang Y, Hara T, Koike I, Inoue T. Quantification of circulating cell-free DNA in the plasma of cancer patients during radiation therapy. *Cancer Sci*. 2009;100(2):303-9.
276. Bartoloni E, Ludovini V, Alunno A, Pistola L, Bistoni O, Crino L, et al. Increased levels of circulating DNA in patients with systemic autoimmune diseases: A possible marker of disease activity in Sjogren's syndrome. *Lupus*. 2011;20(9):928-35.
277. Chang CP, Chia RH, Wu TL, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta*. 2003;327(1-2):95-101.
278. Sanchis J, García-Blas S, Ortega-Paz L, Dantas AP, Rodríguez E, Abellán L, et al. Cell-free DNA and Microvascular Damage in ST-segment Elevation Myocardial Infarction Treated With Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)*. 2019;72(4):317-23.
279. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*. 1997;350(9076):485-7.
280. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YM. Prenatal exclusion of beta thalassaemia major by examination of maternal plasma. *Lancet*. 2002;360(9338):998-1000.
281. van Boeckel SR, Davidson DJ, Norman JE, Stock SJ. Cell-free fetal DNA and spontaneous preterm birth. *Reproduction*. 2018;155(3):R137-R45.
282. Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*. 2010;2(61):61ra91.
283. Quezada MS, Gil MM, Francisco C, Orosz G, Nicolaidis KH. Screening for trisomies 21, 18 and 13 by cell-free DNA analysis of maternal blood at 10-11 weeks' gestation and the combined test at 11-13 weeks. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015;45(1):36-41.
284. Norton ME, Jacobsson B, Swamy GK, Laurent LC, Ranzini AC, Brar H, et al. Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *The New England journal of medicine*. 2015;372(17):1589-97.
285. Curnow KJ, Wilkins-Haug L, Ryan A, Kirkizlar E, Stosic M, Hall MP, et al. Detection of triploid, molar, and vanishing twin pregnancies by a single-nucleotide polymorphism-based noninvasive prenatal test. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212(1):79.e1-9.
286. Canick JA, Palomaki GE, Kloza EM, Lambert-Messerlian GM, Haddow JE. The impact of maternal plasma DNA fetal fraction on next generation sequencing tests for common fetal aneuploidies. *Prenat Diagn*. 2013;33(7):667-74.



## 9 ANHANG

### 9.1 Literatur

#### 9.1.1 Zellfreie DNA in verschiedenen klinischen Fachbereichen

##### Systemischer Lupus erythematoses & Rheumatoide Arthritis

Wie in Abschnitt 2.1 erwähnt, wurde die erste klinische Studie zu zellfreier DNA an SLE-Patienten durchgeführt, die eine signifikant höhere Konzentration als die Kontrollpopulation aufwies (22). Dies konnte in den folgenden Jahren mehrfach bestätigt werden (2, 22, 34, 106-109). Im Gegensatz dazu stellt sich der Zusammenhang zwischen zellfreier DNA und Krankheitsaktivität in der Literatur uneindeutig dar. Obwohl die Mehrheit der Forschungsgruppen hierbei eine signifikante Korrelation aufweisen, finden sich auch widersprüchliche Studien (2, 106, 107). Gleichmaßen verhält es sich hinsichtlich der Dynamik zellfreier DNA nach therapeutischer Intervention (107, 276).

Koffler et al. zeigten 1973 erstmals eine positive Korrelation zellfreier DNA mit Antikörpern (AK) gegen einzelsträngige DNA, welche in ca. 50 % der untersuchten SLE-Blutproben, aber nicht in Kontrollproben nachweisbar waren, auf (34). Da Auto-Antikörper mit Eigen-DNA als Antigen einen wesentlichen Bestandteil der SLE-Pathologie darstellen, eröffnete dies die Frage, inwieweit zirkulierende zellfreie DNA ursächlich am Entstehungsprozess und der Krankheitsaktivität beteiligt sein könnte (110). Weitere Untersuchungen konnten diese These allerdings aufgrund fehlender oder sogar inverser Korrelationen nicht unterstützen (107, 276).

Auch für die Rheumatoide Arthritis (RA), eine weitere Autoimmunerkrankung aus dem rheumatoiden Formenkreis, die primär Gelenke befällt und destruiert, konnte in vielfältigen Studien eine signifikante Erhöhung zellfreier DNA in Serum und Plasma nachgewiesen werden (111-113). Spezielle Untersuchungen der Synovialflüssigkeit betroffener Gelenke zeigten hier sogar nochmals um ein Vielfaches erhöhte Konzentrationen (111, 112). Die Literatur hinsichtlich Krankheitsaktivität und Therapie-Ansprechen spricht sich hier im Gegensatz zu SLE fast überwiegend dafür aus, dass quantitative Änderungen zellfreier DNA diese gleichsinnig reflektieren (112, 113).

## Sepsis und Septischer Schock

Ein deutlicher Anstieg zellfreier DNA ist auch bei intensivtherapeutisch betreuten Patienten zu finden. Speziell für septische und damit verwandten Pathologien, die trotz Intensivbehandlung ein höheres Mortalitätsrisiko mit sich bringen, konnten signifikant erhöhte Konzentration an zellfreier DNA nachgewiesen werden (4, 121). Da diese nicht nur Konzentrationen gesunder Kontrollpatienten, sondern auch anderer Intensiv-Patienten übersteigen, könnte zellfreie DNA als Parameter der Risikostratifizierung dienlich sein. Weiter zeigte sich zellfreie DNA als sensitiver Prädiktor für das Mortalitätsrisiko während des Krankenhausaufenthaltes und korrelierend mit Laktat und Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) -Score (4, 122). Im Vergleich mit dem Multiple-Organ-Dysfunction-Syndrom (MODS) und Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) -Scores konnte zellfreie DNA sogar eine stärkere prognostische Aussagekraft aufweisen, welche durch Kombination mit den zuvor genannten Scores weiter gesteigert werden konnte (121).

## Koronare Herzkrankheit & Myokardinfarkt

Hinsichtlich kardiovaskulärer Risiken konnte Borisoff et al. erhöhte Konzentrationen zellfreier DNA und Nukleosomen bei ausgeprägten Formen koronarer Atherosklerose, welche mit einem erhöhten Risiko für letale Koronarstenosen behaftet sind, nachweisen (114). Akute myokardiale Ischämien lassen sich sowohl gegenüber kardiovaskulär gesunden als auch gegenüber den zuvor genannten kardiovaskulär vorerkrankten Patienten differenzieren (115-118). Zellfreie DNA zeigt weiter eine Korrelation hinsichtlich des Ausmaßes der Ischämie und des Funktionsdefizits (118). Zellfreie DNA steigt im Akutfall früh an, gipfelt allerdings später als die vorwiegend im Myokard lokalisierte Kreatinkinase (CK-MB) (277). Untersuchungen bezüglich einer Korrelation von cfDNA mit dem klinisch etablierten kardiospezifischen Parameter hs (hochsensitiv)-Troponin I erbrachte widersprüchliche Ergebnisse (115, 116, 119). Anders verhielt es sich im Vergleich zu nicht-hochsensitivem Troponin I als Biomarker für myokardialen Zelluntergang: Hier messen quantitative Analysen zellfreier DNA eine stärkere diagnostische Aussagekraft bei (117, 119). Eine aktuelle Studie untersuchte erstmals den Quotienten aus peripherer und koronarer Konzentration zellfreier DNA im Zusammenhang mit der interventionell-therapeutischen Erfolgsrate bei ST-Strecken-Hebungsinfarkten: Ein geringerer Quotient, gleichbedeutend mit einer

höheren intrakoronaren cfDNA-Konz., korreliert signifikant mit einer schlechteren Erfolgsrate der Rekanalisierungs-Intervention (278). Die Autoren führen die erhöhte intrakoronare Akkumulation zellfreier DNA auf eine verstärkte neutrophile Aktivierung durch das akute Infarktgeschehen zurück und sehen einen potenziellen Zusammenhang mit einer dadurch erhöhten Thrombogenität.

### Zerebrale Infarkte

Weiter weisen auch zerebrale Ischämien einen signifikanten Anstieg zellfreier DNA in Plasma sowie Serum auf (3, 120). Hierbei bestehen positive Korrelationen mit dem kurzfristigen (48 h) neurologischen Outcome, sowie dem neurologischen Defizit vor und nach therapeutischer Intervention als auch des Schweregrades hinsichtlich Ischämie-/Hämatom-Areals. Nachdem cfDNA weiter auch signifikant zwischen Patienten, die überlebten und jenen, die im Krankenhaus an den Folgen des Schlaganfalls verstarben, differenzieren konnte, wird der quantitativen Analyse hierbei ein hoher prädiktiver Wert hinsichtlich der Mortalität während des Krankenhausaufenthalts zugesprochen (3).

### Sonstige Traumata (SHT, Verbrennung, Rauchgas-Intoxikationen)

Die Untersuchung von Patienten mit Traumata unterschiedlicher Genese zeigten auch hierbei eine signifikante Erhöhung zellfreier DNA, welche zudem mit dem Trauma-Schweregrad korrelierte und auch hier als Risikofaktor für Mortalität und schwere Folgeerkrankungen gehandelt wird (123). Speziell hinsichtlich Schädelhirntraumata zeigten Shaked et al. erhöhte Konzentrationen an zellfreier DNA sowohl als sensitiven Marker für den Schweregrad des SHT als auch prognostisch bedeutsam bzgl. notwendiger Interventionen und dauerhafter neurologischer Folgeschäden (124). Gleichwertige Ergebnisse lieferten Untersuchungen an Patienten mit Verbrennungstraumata: Zusätzlich zum Anstieg zellfreier DNA konnte auch hierbei eine signifikante Korrelation zu Verbrennungsgrad und betroffener Körperoberfläche festgestellt werden (265).

## Perinatalmedizin

Im Fachbereich der Perinatalmedizin werden ebenfalls quantitative wie auch qualitative Analysen zellfreier DNA durchgeführt. Allerdings gibt hier neben der maternalen cfDNA speziell auch zirkulierende fetale DNA und deren Gesamtmenge Aufschluss über verschiedene den Feten und/oder die Mutter betreffende Pathologien.

Lo et al. erbrachten 1997 den erstmaligen Nachweis fetaler DNA im maternalen Serum und Plasma (279). Dies initiierte in den folgenden Jahren die ersten Analysen bzgl. einer möglichen Geschlechtsbestimmung und des Risikos für Frühgeburtlichkeit und Präeklampsie (125, 136). Auch im Rahmen eines Pränatal-Screenings auf numerische und strukturelle Chromosomaberrationen zeigten diverse Studien vielversprechende Ergebnisse (126, 280).

Die Geschlechtsbestimmung mittels PCR-Quantifizierung Y-/X-chromosomal-spezifischer Sequenzen besitzt laut einer Meta-Analyse von 60 Studien eine Sensitivität von 98,9 % und eine Spezifität von 99,6 %, was sich mit der größten hierzu angelegten Studie von Porreco et al. deckt (128, 129). Eine gleichwertige Sensitivität und Spezifität zeigt die, ebenfalls mittels PCR durchgeführte, Bestimmung des fetalen Rhesusfaktors (130).

Hingegen uneindeutig reflektiert die Studienlage die Assoziation erhöhter Konzentration zellfreier fetaler DNA mit dem Risiko für spontane Frühgeburten (131-135). Die gegensätzlichen Ergebnisse könnten sich mit den unterschiedlichen verwendeten Analysemethoden begründen lassen (281). Während einige Forschungsgruppen allein die totale Menge an zellfreier DNA im maternalen Plasma untersuchten, legten Andere allein den Y-Chromosom-spezifischen Anteil der cfDNA männlicher Feten zugrunde, um diese genauer vom maternalen Anteil separiert analysieren zu können (132, 133, 135). Wiederum andere Forschungsgruppen bedienten sich des Quotienten aus fetaler und maternaler cfDNA, auch als „fetale Fraktion“ bezeichnet (131, 134). Diese Fraktionen zu separieren und einander gegenüberzustellen wird durch die unterschiedlich stark präsentierten Fragmentlängen zwischen Mutter und Fetus möglich (282). Hierbei zeigt sich fetale cfDNA kürzer und mit dem prominentesten Gipfel bei 143 bp, nicht-fetale cfDNA hingegen hat diesen bei 166 bp.

Gleichermaßen widersprüchlich stellen sich die Studienergebnisse bzgl. des Präeklampsie-Risikos dar. Neben der alleinigen Differenzierung zwischen gesunden Schwangeren und Schwangeren, die eine Präeklampsie entwickelten, konnten Eche et al. diese auch von Patientinnen mit schwangerschaftsinduzierter Hypertonie unterscheiden und den Schweregrad der Präeklampsie diskriminieren (136, 137). Andere Studien sahen hier allerdings keinerlei Assoziation (135, 138).

Das Screening mittels Genom-Sequenzierung und/oder Karyotypisierung zellfreier fetaler DNA auf Trisomien 21,18 und 13 sowie auf X-chromosomale Monosomie zeigte sich in Studien mit großen Fallzahlen sowie in Meta-Analysen ebenfalls mit einer Sensitivität und Spezifität von jeweils > 98 %, was einen gleichwertigen oder sogar höheren prädiktiven Wert bietet als das klinische Standard-Screening (128, 283, 284). Neben numerischen Chromosomen-Aberrationen weisen auch Untersuchungen bzgl. Strukturdefekten einzelner Chromosomen, wie z.B. Achondroplasie, Muskeldystrophie Duchenne oder  $\beta$ -Thalassämie, positive Resultate auf. Hierfür fehlt allerdings bisher eine breitere Studienlage (126, 280).

Der Vorteil dieser nicht-invasiven Pränatal-Tests (NIPS) wird allerdings durch folgende Faktoren limitiert: Falsch-positive Ergebnisse durch Zwillingsschwangerschaften oder auch chromosomale Mosaikaberrationen der Mutter (285). Weiter kann aufgrund zu geringer DNA-Mengen fetalen Ursprungs in der zu analysierenden Probe die Analyse dieser Fraktion erschwert oder verhindert werden (286). Da gerade Trisomien und Monosomien mit einer verminderten Fraktion an fetaler DNA einhergehen, sind diese Schwangerschaften davon mit einer höheren Wahrscheinlichkeit betroffen (242, 284).

## 9.2 Ergebnisse

### 9.2.1 Vorversuche zu Plasmakonz., Puffer und Fluorochrom

Die Dilution des zu untersuchenden Plasmas im Verhältnis von 1:10 in H<sub>2</sub>O als Puffer zeigte sich mit der besten Korrelation und stärksten Signifikanz ( $r = 0,571$ ,  $p = 0,26$ ,  $n = 15$ ) zu qPCR-Daten im Vergleich zu anderen Konzentrationen (hier nicht dargestellt) und anderen Pufferlösungen wie TE. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR Green 1 verwendet.

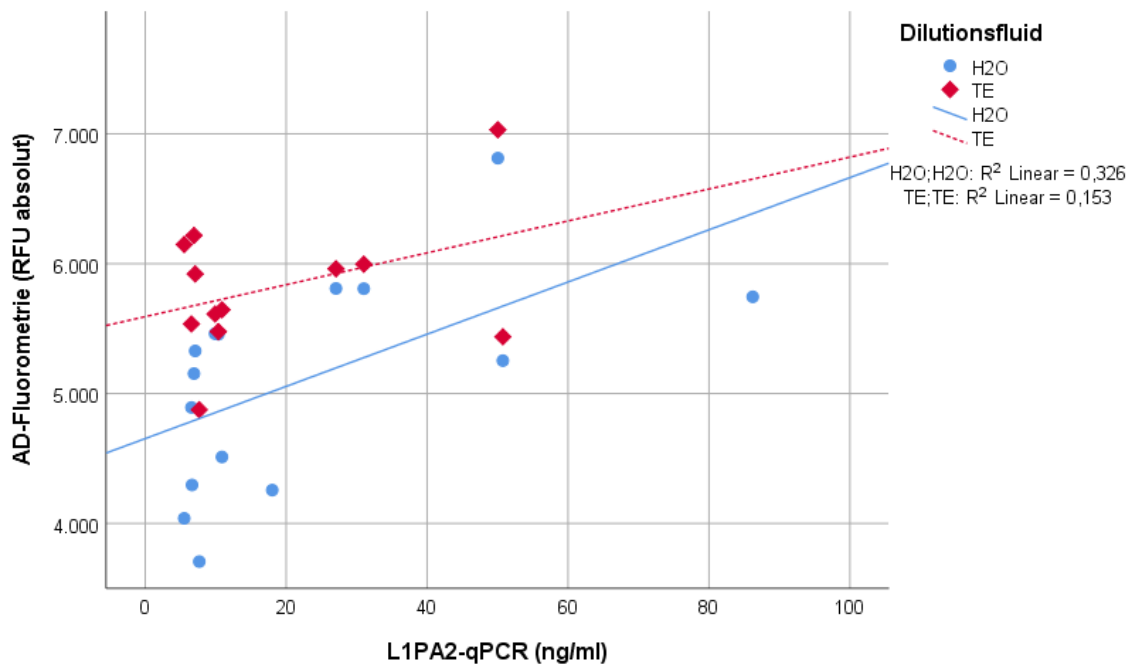


Abbildung 53: Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie nach verwendeter Plasma-Dilution

In dieser Konstellation konnte gleichzeitig eine ausreichende Menge an cfDNA im Ansatz als auch eine möglichst geringe Kontamination anderer Plasmabestandteile, die eine Detektion der cfDNA verhindern könnten, gewährleistet werden.

Auch für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green 1 wies die Dilution in H<sub>2</sub>O Vorteile im Vergleich zu anderen Pufferlösungen auf: Gegenüber der zuvor genannten Pearson-Korrelation und Signifikanz der Dilution in TE ( $r = 0,571$ ,  $p = 0,26$ ,  $n = 15$ ), zeigte eine Dilution des Fluoreszenzfarbstoffes in PBS eine tendenziell schlechtere und nicht signifikante Korrelation ( $r = 0,43$ ,  $p=0,109$ ,  $n = 15$ ) auf. Eine Dilution in H<sub>2</sub>O korrelierte statistisch signifikant und am stärksten ( $r = 0,597$ ,  $p=0,019$ ,  $n = 15$ ) mit den Messwerten der qPCR. Auch das Bestimmtheitsmaß als Gütemaß der linearen Regression zeigte für die Dilution in H<sub>2</sub>O den höchsten Wert auf. Der Dilutionsfaktor für SYBR Green 1 entsprach hierbei Herstellerangaben, was eine finale Konzentration von 1 im Ansatz ergab. Die fluorometrische Messung dieses Vorversuchs erfolgte wie zuvor bei konstanter Temperatur von 30 °C über einen Zeitraum von 20 min. Die dadurch erhaltenen Rohwerte der Strahlungsintensität wurden mittels Subtraktion des Hintergrunds, bestehend aus Dilutionsmittel und Fluoreszenzfarbstoff angepasst.

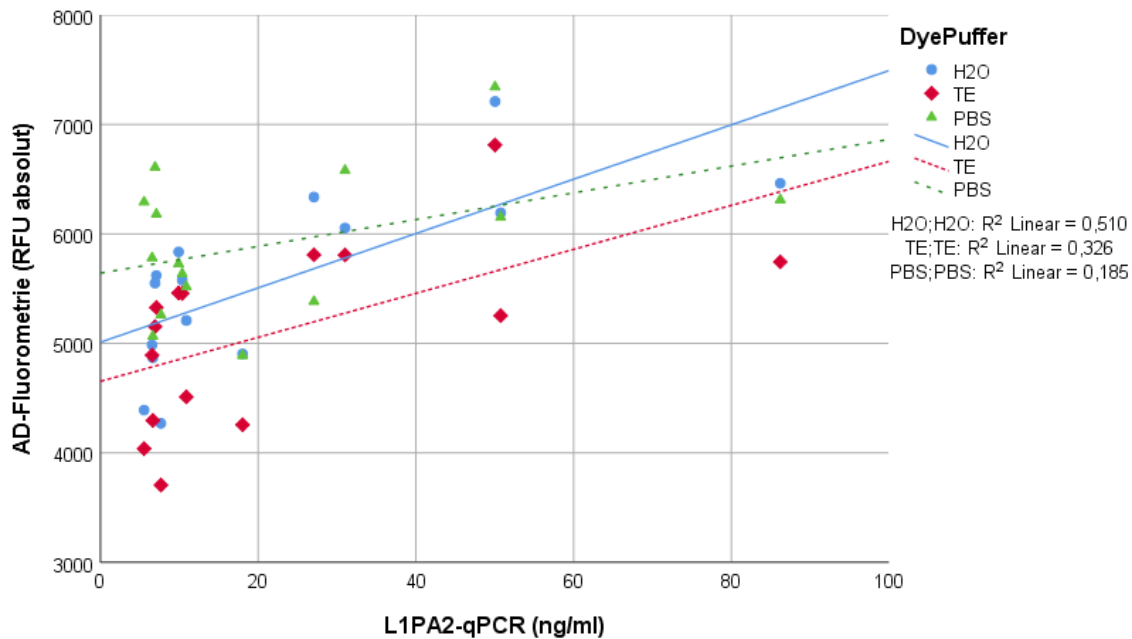


Abbildung 54: Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie nach verwendeter Fluorochrom-Dilution

Es zeigte sich im Laufe der hier dargelegten Vorversuche, dass die Strahlungsintensität der bisher entwickelten Messmethodik bzgl. der Relationen zwischen höher bzw. niedrig konzentrierten Proben nicht den Relationen der qPCR entsprach. Als Grund dieses Problems wurde zum größten Teil der prominente Plasmahintergrund verantwortlich gemacht. Vor dessen eigener Strahlungsintensität konnte das Intensitätssignal des an doppelsträngige cfDNA gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes die unterschiedlichen Konzentrationen nicht adäquat abbilden. Um dieses Problem anzugehen, wurde durch eine höhere Konzentrierung (zweifach, vierfach) des Fluoreszenzfarbstoffes versucht die Strahlungsintensität der im Plasma befindlichen Nukleinsäuren weiter zu stärken und deren Signal weiter vom Plasmahintergrund abzuheben. Die fluorometrische Messung dieses Vorversuchs erfolgte ebenfalls wie zuvor bei konstanter Temperatur von 30 °C über einen Zeitraum von 20 min. Die dadurch erhaltenen Rohwerte der Strahlungsintensität wurden mittels Subtraktion des Hintergrunds, bestehend aus Dilutionsmittel und Fluoreszenzfarbstoff, sowie dessen spezifischer Konzentration, angepasst.

Bis auf eine in Relation zu der verwendeten höheren SG1-Konzentration äquivalent verstärkten Strahlungsintensität konnte keine genauere Darstellung der cfDNA-Konzentrationen erreicht werden (s. Abbildung 55). Dies zeigte sich auch in tendenziell schlechteren, nicht signifikanten Korrelationskoeffizienten (2x-Konzentration:  $r =$

0,110,  $p = 0,696$ ,  $n = 15$ ; 4x-Konzentration:  $r = 0,202$ ,  $p = 0,47$ ,  $n = 15$ ) im Vergleich zu einfach konzentriertem SG1 ( $r = 0,597$ ,  $p = 0,019$ ,  $n = 15$ ).

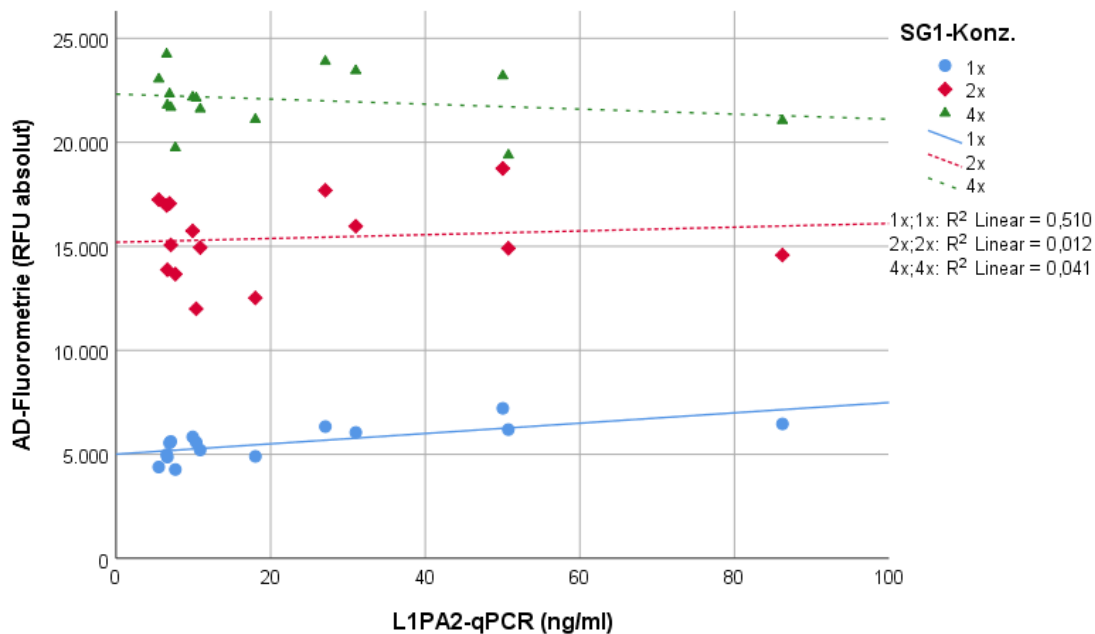


Abbildung 55: Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorometrie abhängig der verwendeten Fluorochrom-Konzentration

### 9.2.2 Schmelzkurven-Analyse: Evaluation Temperatureinfluss

Aufgrund von persistierenden Varianzen hinsichtlich Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit mit qPCR-Messungen der Probenmessungen bei Raumtemperatur erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse. Diese Schmelzkurve erfolgte in der Spannweite von 40-65 °C mit jeweils einer Messung der Strahlungsintensität sowie dessen Änderung  $-d(\text{RFU})/dT$  nach jeder Temperatursteigerung. So konnten eventuelle Einflüsse der Temperatur auf die Nukleinsäuren selbst, deren Bindung an SGR1 und den Plasmahintergrund evaluiert werden. Hier zeigte sich eine stark verbesserte Korrelation ab ca. 50 °C bis ca. 55 °C, welche unter und über diesen Temperaturen stark abnahm. Die insgesamt beste Korrelation zu Werten der qPCR-Messung, auch im Vergleich zu den vorigen Messungen, zeigte sich statistisch signifikant bei 54 °C ( $r = 0,714$ ,  $p = 0,003$ ,  $n = 15$ ). Daher wurde anschließend sowohl eine schnellere graduelle Temperatursteigerung in den Intervallen 30-45-54-65 °C durchgeführt als auch eine Fluorometrie bei konstant 54 °C über 20 Messzyklen. Da diese jedoch nicht äquivalente bzw. bessere Korrelationen aufwiesen (graduelle Temperatursteigerung:



$r = 0,481$ ,  $p = 0,70$ ,  $n = 15$ ; konstant 54 °C:  $r = 0,652$ ,  $p = 0,008$ ,  $n = 15$ ), wurde das bisherige Schmelzkurvenprotokoll beibehalten.

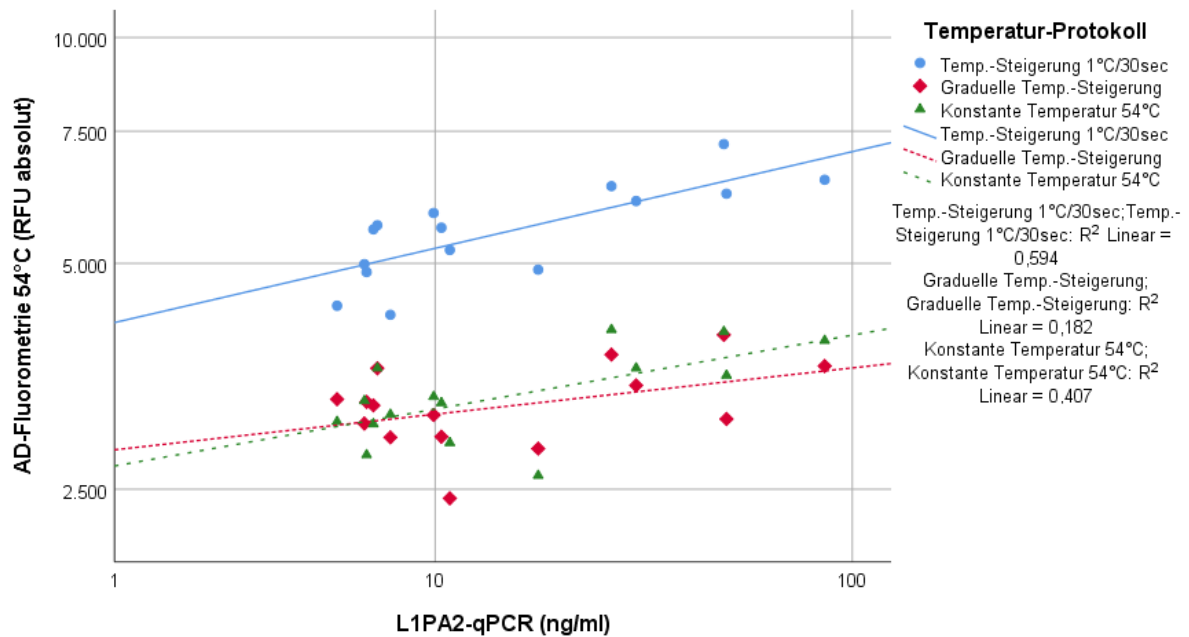


Abbildung 56: Korrelation der Methoden L1PA2-qPCR und AD-Fluorimetrie abhängig des verwendeten Schmelzkurven-Protokolls

Durch die Analyse des Thermozykler-Protokolls konnte weiter ein konstanter Abfall der Strahlungsintensität (negative Änderung) über die Dauer der Inkubation bzw. über die Schmelzkurve beobachtet werden (s. Abbildung 1). Diese negative zeitliche Ableitung  $d(\text{RFU})/dT$  änderte sich um ca. 50 °C in einen positiven Gipfel um und kehrte danach zu negativen Ableitungswerten zurück. Dies entspricht einem absoluten Anstieg der Strahlungsintensität über diese Temperaturen.

Weiter bestand ein positiver linearer Zusammenhang zwischen Maxima  $d(\text{RFU})/dT$  und den cfDNA-Konzentrationen (s. Abbildung 57, s. Abbildung 58). Hier zeigte sich eine signifikante Korrelation sowohl zu Ergebnissen der L1PA2-qPCR ( $r = 0,777$ ,  $p = 0,001$ ,  $n = 15$ ) als auch zu Ergebnissen der bis zu diesem Zeitpunkt etablierten AD-Fluorimetrie ( $r = 0,521$ ,  $p = 0,046$ ,  $n = 15$ ).

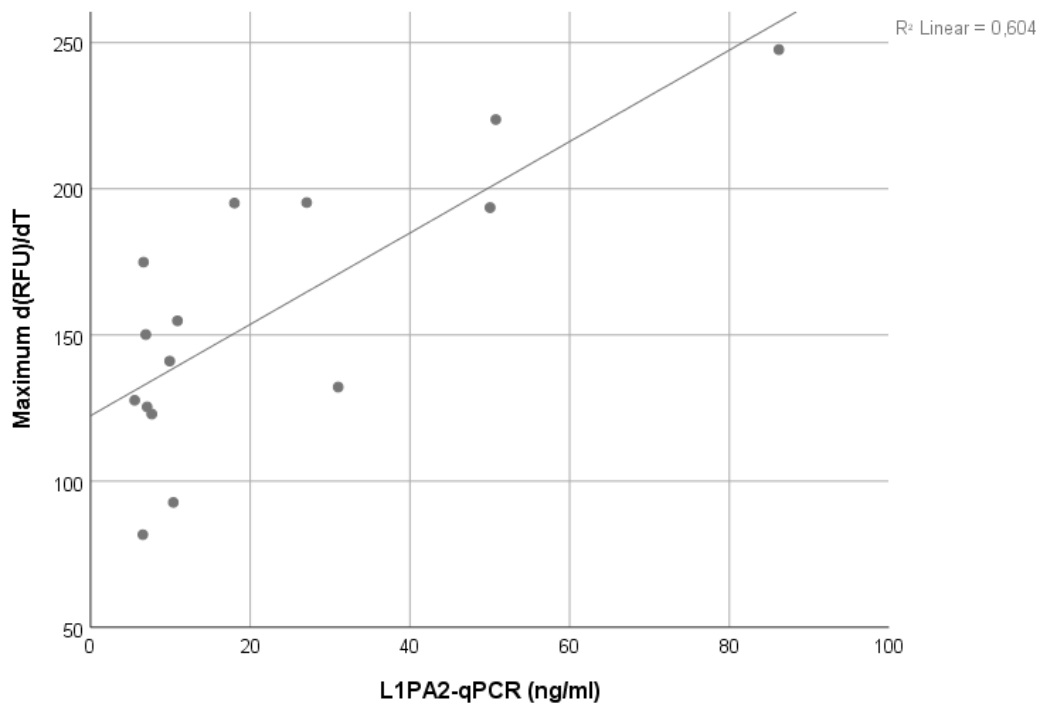


Abbildung 57: Korrelation der Maxima an temperaturabhängiger Änderung der Strahlungsintensität mit cfDNA-Konz. in Plasma (L1PA2-qPCR)

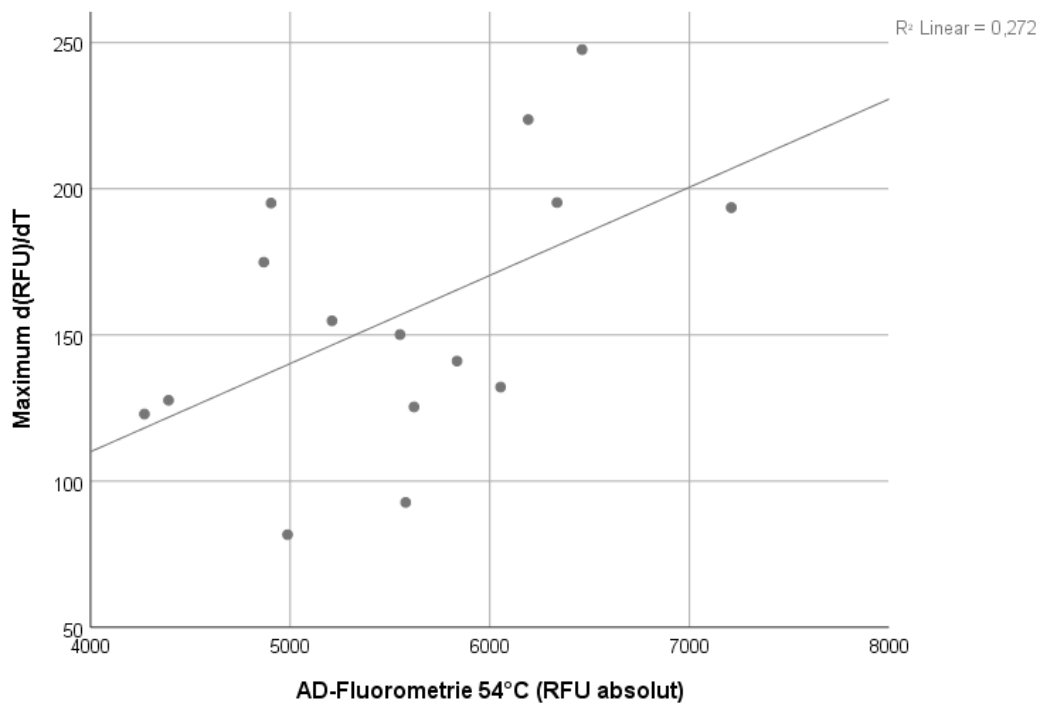


Abbildung 58: Korrelation der Maxima an temperaturabhängiger Änderung der Strahlungsintensität mit cfDNA-Konz. in Plasma (AD-Fluorometrie)

### 9.2.3 Einflussfaktor Ribonukleinsäure

Des Weiteren wurde der Einfluss von RNA auf SG1 in Plasma getestet. Dies geschah nach dem zuvor beschriebenen Messprotokoll, jedoch wurden statt H<sub>2</sub>O

Plasmaproben verwendet und eine ausgedünnte Standardreihe von 100-400 ng/ml RNA (s. Abbildung 59).

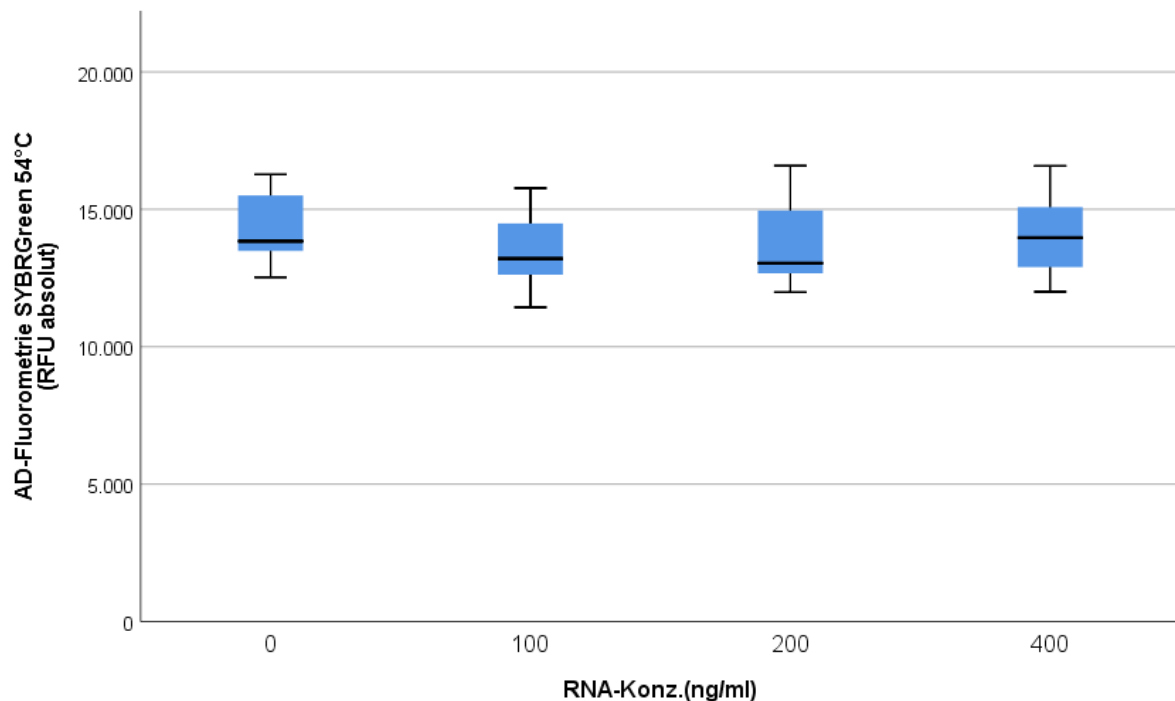


Abbildung 59: Interferenz von RNA auf Fluorochrom SYBR Green (AD-Fluorometrie)

Auch in Plasma konnte für den Schmelzkurvenkorridor 50-55 °C mithilfe einer einfaktoriellen Varianzanalyse ( $F = 1,175$ ,  $p = 0,328$ ,  $n = 58$ ) keine signifikante Differenz der Mittelwerte von 100 ng/ml (M. = 13452,7, SD. = 1237,5), 200 ng/ml (M. = 13641,6, SD. = 1448,7) und 400 ng/ml (M. = 14073,04, SD. = 1542,44) RNA zur Negativkontrolle 0 ng/ml RNA (M. = 14330,5, SD. = 1271,3) aufgezeigt werden.

Um die Varianzen physiologischer bzw. unphysiologischer RNA-Konzentrationen unter Belastung abschätzen zu können wurde das zuvor für die Belastungsproben der Kontrollprobanden etablierte Messprotokoll mit RG statt SG1 durchgeführt. RIBO Green ist laut Herstellerangaben spezifisch für Ribonukleinsäuren. Da sich dieser Fluoreszenzfarbstoffe in seinen Exzitations- und Emissionsspektren stark SG1 ähnelt (SG1 495nm/520nm, RG 500nm/525nm), konnte das Protokoll des Thermozyklers ohne Änderung beibehalten werden.

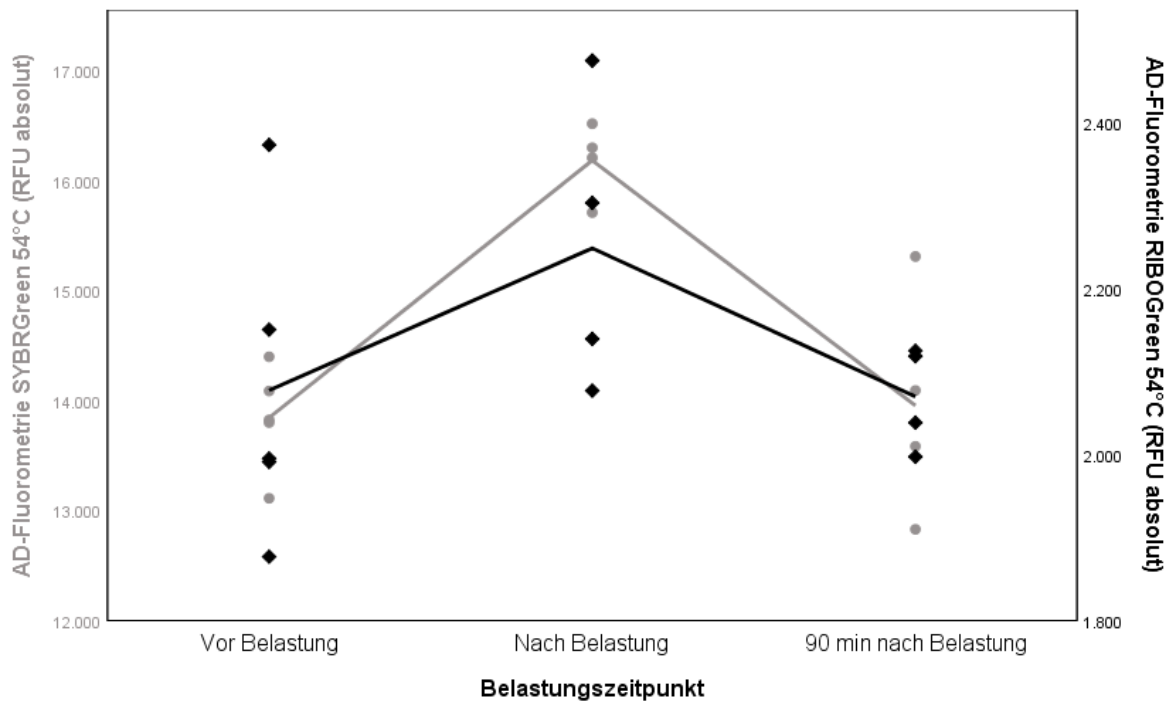


Abbildung 60: Dynamik der Strahlungsintensität unter Belastung im Vergleich der verwendeten Fluorochrome SYBR Green und RIBO Green (AD-Fluorometrie)

Die Messung des Ribonukleinsäure-Anteils im Plasma zeigte graphisch einen signifikanten Anstieg nach Belastung auf, sowie einen Abfall 90 min. danach (s. Abbildung 60). Diese Dynamik korrelierte signifikant mit den Ergebnissen der bisher etablierten fluorometrischen SGR1-Messung ( $r = 0,559$ ,  $p = 0,047$ ,  $n = 13$ ).

#### 9.2.4 DNA-Degradation

##### Inkubationsdauer

Nach Herstellerangaben wären bei je nach vorhandener Menge DNA im Template entsprechend konzentrierter DNase I 30 min. für einen vollständigen Abbau der Nukleinsäuren nötig. Dies gilt jedoch für ein „sauberes“ Medium sowie frei zugängliche bzw. in purer Form vorliegende DNA. Da dies in Plasma und gerade für cfDNA nicht gegeben ist, sollte evaluiert werden was für eine Inkubationsdauer nötig wäre. Ziel war insgesamt eine möglichst kurze Inkubationsdauer anzustreben, um den Einfluss dieser auf die sonstigen Plasmabestandteile möglichst gering zu halten. Gleichzeitig würde sich die Methode dadurch zeiteffizienter bzw. praktischer gestalten. Das Enzym DNase I selbst wurde für diesen Versuch mit 0,5 U/μl bzw. 500 U/ml überproportional hoch konzentriert, um auch für hochkonzentrierte cfDNA-Konzentrationen eine Aussage

treffen zu können. Um die Effekte der Inkubation auf das Plasma selbst zu testen, wurde auch Plasma ohne DNase der äquivalenten Inkubationstemperatur und -dauer unterzogen und mit Proben, die lediglich die Dauer der Inkubation bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, verglichen.

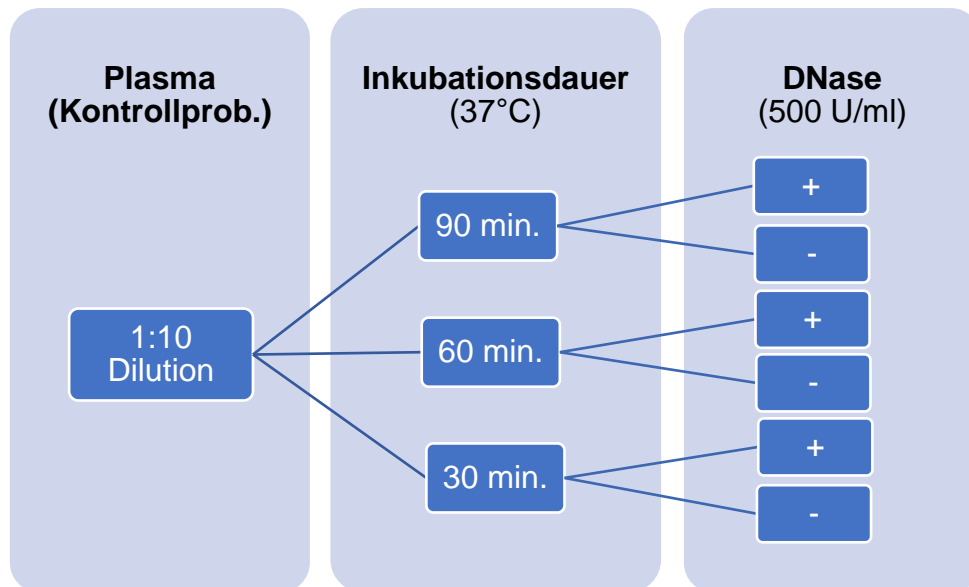


Abbildung 61: Arbeitsschema zur Evaluation einer suffizienten DNase-Inkubationsdauer

Als Ziel der DNase I dienten vier Plasmaproben der Kontrollprobanden der bekannten Belastungsstudie (s. 4.1, (266)). Hier wurden von 2 verschiedenen Individuen jeweils eine Probe vor Belastung (prä) sowie eine Probe nach Belastung (post) verwendet. Als methodische Referenz wurden die gleichen Proben mittels L1PA2-qPCR gemessen.

Für alle Varianten der Inkubationsdauer ergab sich nach L1PA2-qPCR, dass DNA des Plasmas durch die Dnase 1 unter das bestimmbare Limit („Limit of detection, LOD“) abgebaut wurde. Ein t-Test unabhängiger Stichproben bestätigte für die Ergebnisse der ADF eine signifikante Differenz ( $T = 9,945$ ,  $p=0,0013 \cdot 10^{-8}$ ,  $n = 36$ ) bzw. RFU-Reduktion der verdauten Proben ( $M. = 5685,0$ ,  $SD. = 453,3$ ) im Vergleich zu unbehandelten Proben ( $M. = 7530,2$ ,  $SD. = 555,7$ ).

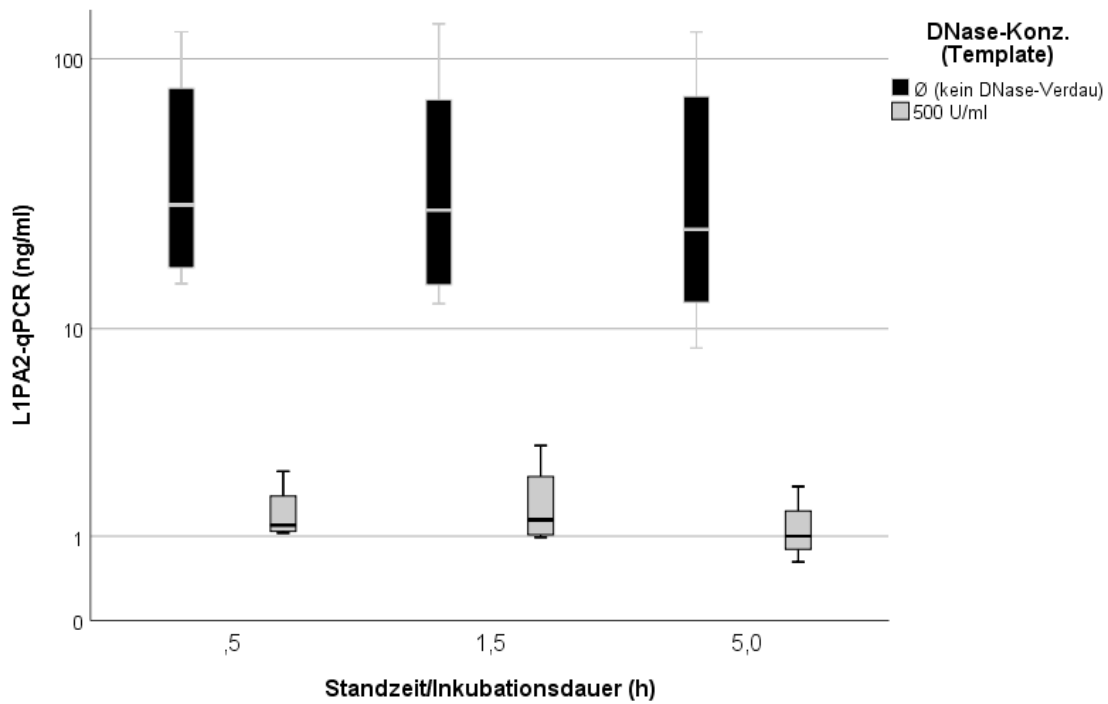


Abbildung 62: Vergleich der DNA-Konz. nach differenter DNase-Inkubationsdauer (L1PA2-qPCR)

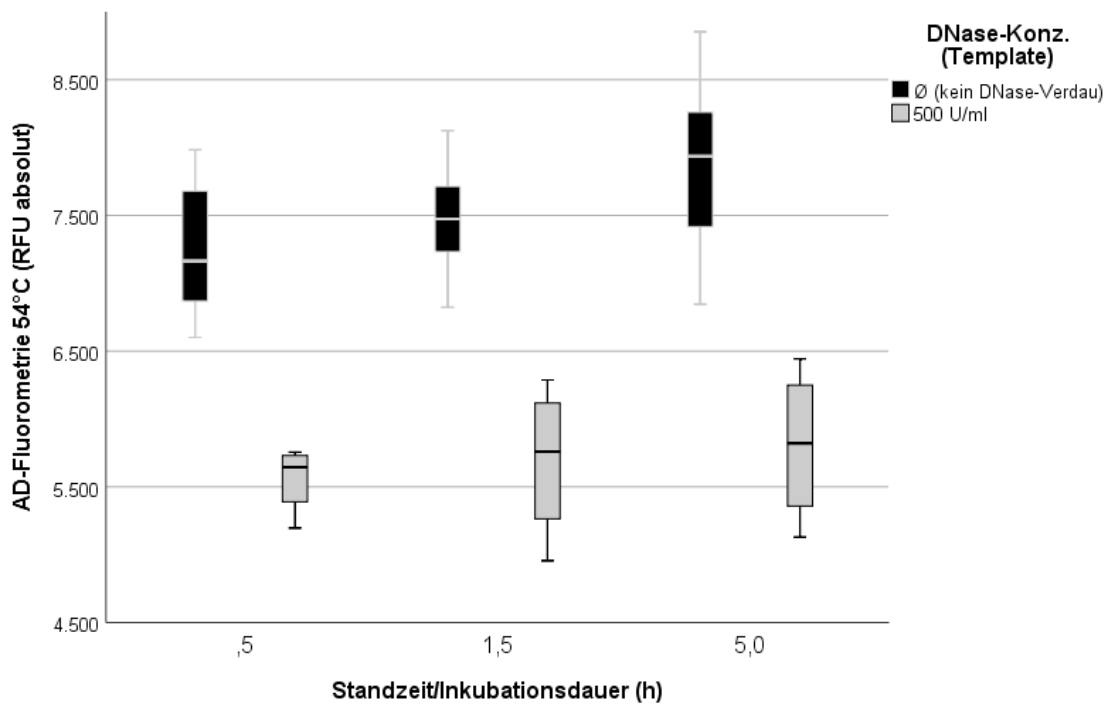


Abbildung 63: Vergleich der DNA-Konz. nach differenter DNase-Inkubationsdauer (AD-Fluorometrie)

Zwischen der Gruppe der Plasmaproben, die äquivalent zu den Proben mit zugegebener DNase I inkubiert wurden (M. = 45,3, SD = 44,1), und den bei Raumtemperatur aufbewahrten Plasmaproben, konnte eine relevante Auswirkung der Inkubation selbst auf das Plasma unabhängig der verwendeten Messvariante statistisch ausgeschlossen werden.

### DNase-Konzentrierung < 100 U/ml

Da auch eine DNase-Konzentration von 100 U/ml (0,1 U/ µl) eine effiziente Elimination von DNA im Plasma gewährleistete, wurden im nächsten Schritt in logarithmischer Abstufung noch geringere Konzentrationen ausgetestet: 500 U/ml, 50 U/ml und 5 U/µl. Auch diese Ansätze wurden unverdauten Proben gegenübergestellt. Als Referenz der AD-Fluorometrie diente wieder die L1PA2-qPCR. Die verwendeten Proben sowie deren Ansatz und Messprotokoll wurde wie bisher beibehalten.

Für die geringeren DNase-Konzentrationen bis 5 U/ml zeigte sich anhand der Ergebnisse der L1PA2-qPCR graphisch ab 50 U/ml nach 60-minütiger Inkubationsdauer ein unvollständiger DNA-Verdau der Proben mit IgDNA-Spike (ca. 500-600 ng/ml). Die DNase-Konzentration 5 U/ml zeigte graphisch einen unvollständigen Verdau der alleinigen cfDNA im Plasma. Die statistische Auswertung nach Kruskal-Wallis-Test ( $H = 18,41$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,036 \cdot 10^{-2}$ ) bestätigte eine signifikante Differenz der DNase-Konzentration 50 U/ml gegenüber unverdauten Proben, sowie keine signifikante Differenz zur bisher verwendeten DNase-Konz. 500 U/ml. Das Ergebnis betreffend der DNase-Konz. 5 U/ml zeigte eine signifikante Differenz zu den beiden zuvor genannten Konzentrationen, sowie keine signifikante Differenz zu unverdauten Proben auf (s. Tabelle 49).

<u>Kruskal-Wallis-Test, Paarweise Vergleich</u> <u>„DNase-Konz. 500-5 U/ml (L1PA2-qPCR)“</u>	<b>Standardteststatistik</b> (z)	<b>Signifikanz</b> (p)
500 U/ml - 50 U/ml	1,184	1,000
500 U/ml - 5 U/ml	3,042	,014
500 U/ml - 0 U/ml	3,859	,001
50 U/ml - 5 U/ml	1,858	,379
50 U/ml - 0 U/ml	2,675	,045
5 U/ml - 0 U/ml	,817	1,000

Tabelle 49: Statistische Auswertung der DNase-Konzentration 500-50 U/ml (L1PA2-qPCR)

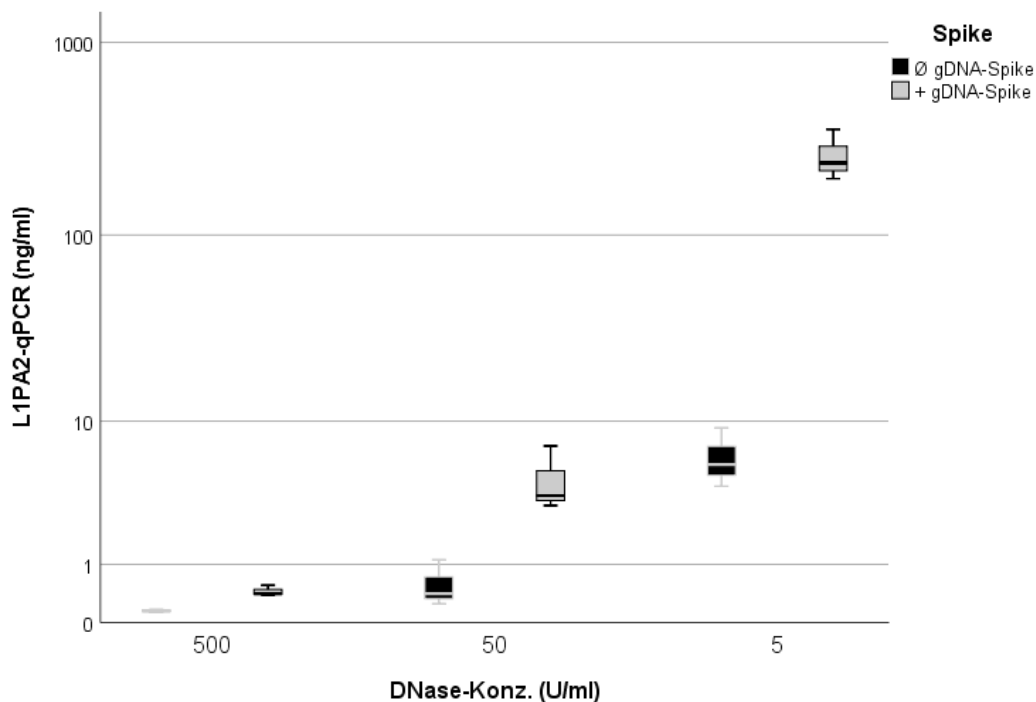


Abbildung 64: DNA-Konz. nach differenter geringkonzentrierter DNase-Konz. (L1PA2-qPCR)

Die Ergebnisse der AD-Fluorometrie dieses Versuches wies im Gegensatz zu Ergebnissen der L1PA2-qPCR graphisch keinen deutlichen Hinweis hinsichtlich der Effizienz des enzymatischen DNA-Verdaus auf (s. Abbildung 65). Der statistische Vergleich der einzelnen Konzentrationen nach Kruskal-Wallis ( $H = 13,34$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0,004$ ) bestätigte die Ergebnisse der L1PA2-qPCR: Die RFU-Werte der DNase-Konzentration 50 U/ml differenzierten nicht signifikant gegenüber der zuvor verwendeten DNase-Konz. von 500 U/ml und wiesen gleichzeitig eine signifikante Differenz gegenüber den unverdauten Proben auf (s. Tabelle 50).

<u>Kruskal-Wallis-Test, Paarweise Vergleich „DNase-Konz. 500-5 U/ml (AD-Fluorometrie)“</u>	<u>Standardteststatistik (z)</u>	<u>Signifikanz (p)</u>
500 U/ml - 50 U/ml	,245	1,000
500 U/ml - 5 U/ml	,612	1,000
500 U/ml - 0 U/ml	3,225	,008
50 U/ml - 5 U/ml	,367	1,000
50 U/ml - 0 U/ml	2,980	,017
5 U/ml - 0 U/ml	2,613	,054

Tabelle 50: Statistische Auswertung der DNase-Konzentration 500-50 U/ml (AD-Fluorometrie)



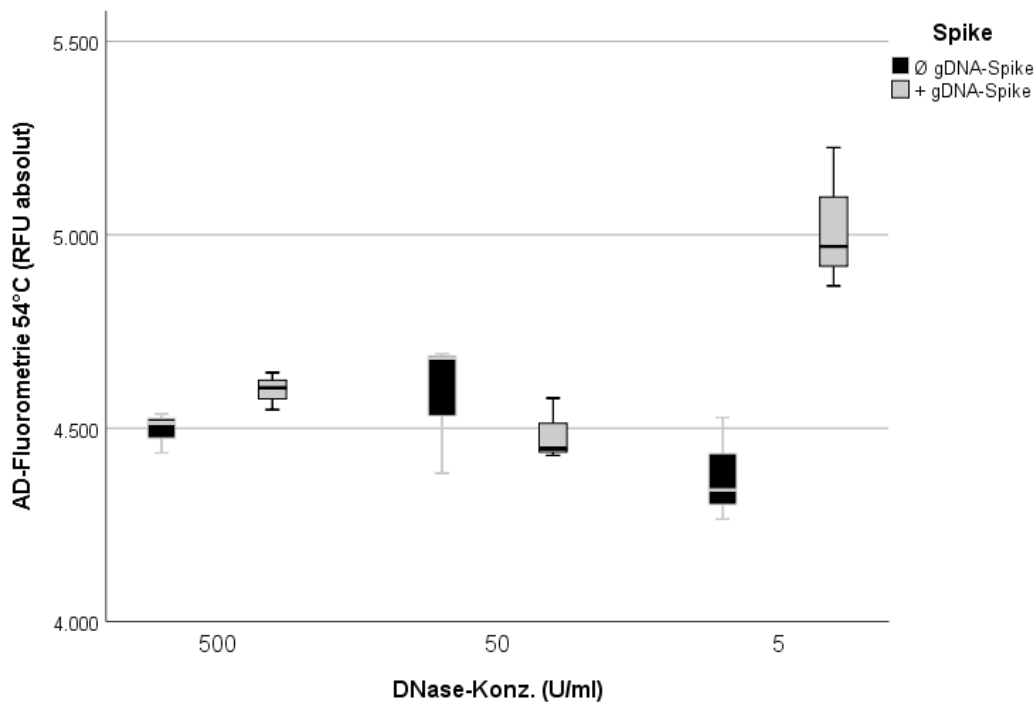


Abbildung 65: Strahlungsintensität nach differenter geringkonzentrierter DNase-Konz. (AD-Fluorimetrie)

### Chemische DNase-Inaktivierung (EDTA)

EDTA hatte im Vergleich zu Proben ohne EDTA (unabhängig von dessen Konzentrierung) als Chelator bei physiologischer cfDNA-Konzentration keinen Einfluss auf das Probenmaterial bzw. die bisher etablierte Methodik. Für die Ergebnisse der qPCR zeigte ein Mann-Whitney-U-Test (Ø IgDNA-Spike) keine signifikante Differenz ( $U = 46,0$ ,  $p = 0,68$ ) zwischen EDTA-behandelten Proben ( $M. = 28,5$ ,  $SD. = 25,9$ ) und Proben ohne EDTA ( $M. = 37,6$ ,  $SD. = 35,2$ ). Die Ergebnisse der ADF wiesen nach einfaktorieller Varianzanalyse ebenfalls keine signifikante Differenz ( $F = 0,275$ ,  $n = 22$ ,  $p = 0,606$ ) durch den Einfluss von EDTA auf (+EDTA:  $M. = 7431,4$ ,  $SD. = 876,9$ ; Ø EDTA:  $M. = 7627,7$ ,  $SD. = 659,1$ ). Durch Zugabe von artifizieller DNA (+ IgDNA-Spike) zeigten die Ergebnisse der qPCR statistisch nach Mann-Whitney-U-Test eine signifikante Differenz ( $U = 16,0$ ,  $p = 0,009$ ) zwischen EDTA-behandelten Proben ( $M. = 499,8$ ,  $SD. = 166,1$ ) und Proben ohne EDTA ( $M. = 784,6$ ,  $SD. = 239,3$ ). Die Ergebnisse der ADF wiesen nach einfaktorieller Varianzanalyse keine signifikante Differenz ( $F =$

2,2, n = 22, p = 0,154) zwischen diesen beiden Gruppen auf (+EDTA: M. = 8238,7, SD. = 1621,2; Ø EDTA: M. = 9386,6, SD. = 1844,7).

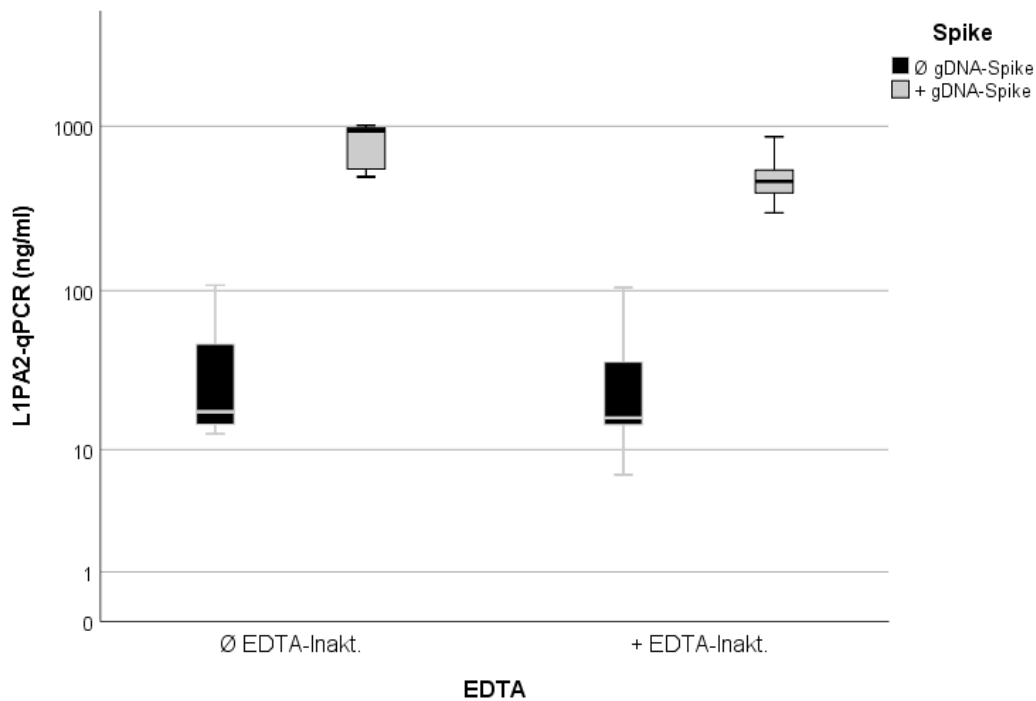


Abbildung 66: Effizienz der chemischen DNase-Inaktivierung mittels EDTA (L1PA2-qPCR)

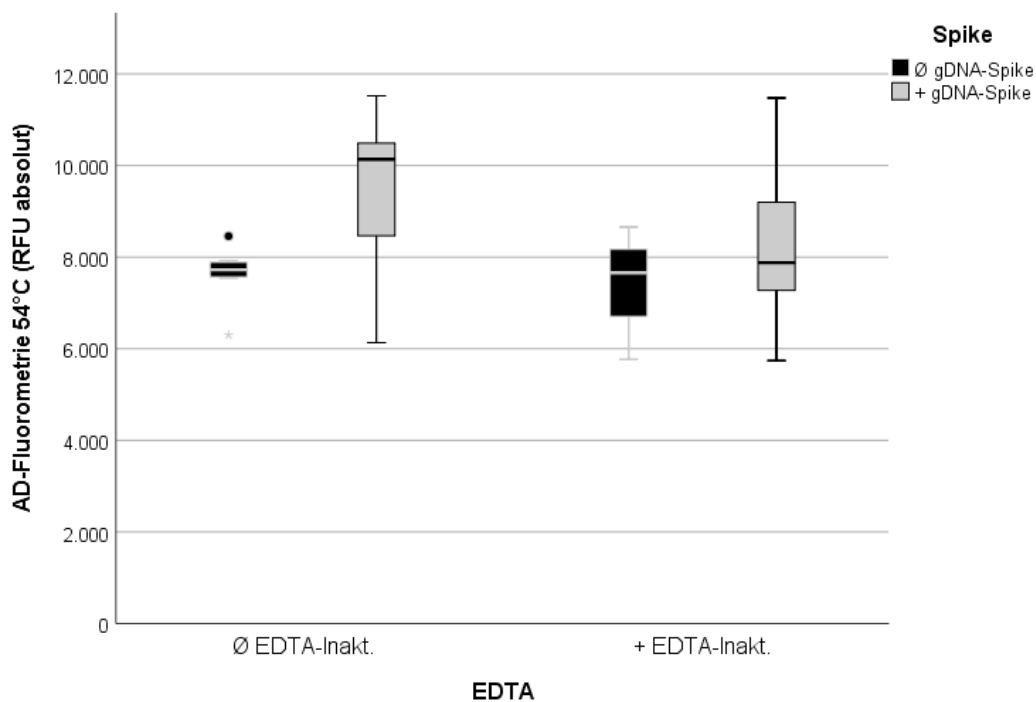


Abbildung 67: Effizienz der chemischen DNase-Inaktivierung mittels EDTA (AD-Fluorometrie)

Im nächsten Schritt sollte evaluiert werden ob und inwieweit EDTA die Aktivität der DNase inhibiert bzw. das Enzym inaktiviert. Für diese Analyse wurden nur Proben ausgewählt, die einem DNase-Verdau unterzogen worden waren und anschließend einen IgDNA-Spike erhalten hatten (unabhängig der EDTA-Konz.). Bei erfolgreicher

Inaktivierung sollte diese artifizielle DNA-Menge nicht abgebaut, sondern erhalten und messbar bleiben. Hier zeigte sich für die Ergebnisse der L1PA2-qPCR nach Mann-Whitney-U-Test eine signifikante Differenz ( $U = 127,0$ ,  $p = 0,016$ ) zwischen EDTA-inaktivierten ( $M. = 267,8$ ,  $SD. = 308,0$ ) und unbehandelten Proben ( $M. = 2,7$ ,  $SD. = 2,4$ ). Eine einfaktorielle Varianzanalyse ergab keine statistisch signifikante Differenz ( $F = 2,29$ ,  $n = 28$ ,  $p = 0,142$ ) der ADF-Ergebnisse zwischen diesen beiden Gruppen (+EDTA-Inaktivierung:  $M. = 6573,3$ ,  $SD. = 1445,4$ ;  $\emptyset$  EDTA-Inaktivierung:  $M. = 5739,2$ ,  $SD. = 883,9$ ).

In dieser Versuchsreihe sollte unter anderem evaluiert werden, ob geringere EDTA-Konzentrationen äquivalent zu der vom Hersteller empfohlenen EDTA-Konzentration wirken könnten. Für diese Analyse wurden wie zuvor nur DNase-behandelte Proben mit anschließender Zugabe eines IgDNA-Spikes ausgewählt. Für diese Proben wurde die jeweilige Effektivität der DNase-Inaktivierung der unterschiedlichen EDTA-Konzentrationen einander gegenübergestellt. Für die dementsprechende Analyse der L1PA2-qPCR wurde ein Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dieser zeigte eine signifikante Differenz zwischen einzelnen Gruppen, hier EDTA-Konzentrationen, auf ( $H = 23,406$ ,  $df = 5$ ,  $p = 0,028 \cdot 10^{-2}$ ). Im paarweisen Vergleich wiesen die Signifikanzwerte nach deren Anpassung mittels Bonferroni-Korrektur nur für die EDTA-Konzentration 6 mmol gleichzeitig eine signifikante Differenz zu EDTA-unbehandelten Proben (0 mmol) als auch keine signifikante Differenz zu der vom Hersteller empfohlenen EDTA-Konzentration (8 mmol) auf (s. Tabelle 51).

<u>Kruskal-Wallis-Test, Paarweise Vergleich „EDTA-Konz. 8-1 mmol (L1PA2-qPCR)“</u>	<b>Standardteststatistik (z)</b>	<b>Signifikanz (p)</b>
1 mmol – 0 mmol	,720	1,000
1 mmol – 2 mmol	-,491	1,000
1 mmol – 4 mmol	-1,977	,720
1 mmol – 6 mmol	-2,622	,131
1 mmol – 8 mmol	-3,861	,002
2 mmol – 0 mmol	,019	1,000
2 mmol – 4 mmol	-1,123	1,000
2 mmol – 6 mmol	-1,650	1,000
2 mmol – 8 mmol	-2,531	,170
4 mmol – 0 mmol	-1,564	1,000
4 mmol – 6 mmol	-,645	1,000
4 mmol – 8 mmol	-1,695	1,000
6 mmol – 0 mmol	-2,308	,031
6 mmol – 8 mmol	-,989	1,000
8 mmol – 0 mmol	-3,799	,002

Tabelle 51: Statistische Auswertung differenter EDTA-Konzentrationen zur chemischen DNase-Inaktivierung (L1PA2-qPCR)

Für die Analyse der Ergebnisse der AD-Fluorometrie wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-Hoc Test nach Bonferroni verwendet. Dieser ergab eine signifikante Differenz zwischen den einzelnen Konzentrationen ( $F = 7,825$ ,  $n = 28$ ,  $p = 0,023 \cdot 10^{-2}$ ). Im Mehrfachvergleich zeigten sich die EDTA-Konzentrationen 6 und 4 mmol ohne signifikante Differenz zur vom Hersteller empfohlenen EDTA-Konzentration (8 mmol). Eine signifikante Differenz zu EDTA unbehandelten Proben (0 mmol) wies keine dieser beiden EDTA-Konzentrationen auf (s. Tabelle 52).

<u>ANOVA</u> <u>„EDTA-Konz.“</u>	<b>M.</b>	<b>SD.</b>	<b>Multiples Testen</b> (Dunn-Bonferroni)	<b>Signifikanz</b> (p)
0 mmol	5739,24	883,9	1 mmol	1,000
			2 mmol	1,000
			4 mmol	1,000
			6 mmol	,470
			8 mmol	,002
1 mmol	5311,3	833,2	2 mmol	1,000
			4 mmol	1,000
			6 mmol	,211
			8 mmol	,002
2 mmol	4679,3	59,2	4 mmol	,990
			6 mmol	,101
			8 mmol	,002
4 mmol	6181,3	878,2	6 mmol	1,000
			8 mmol	,065
6 mmol	7002,0	440,3	8 mmol	1,000
8 mmol	8021,5	1203,0		

Tabelle 52: Statistische Auswertung differenter EDTA-Konzentrationen zur chemischen DNase-Inaktivierung (AD-Fluorometrie)

### 9.2.5 Einfluss der DNA-Degradation auf Standardreihen

Es sollte getestet werden, ob und inwieweit das Enzym DNase bzw. dessen Inkubationspuffer oder EDTA die Messung von Standardreihen mit artifizieller DNA beeinflussen könnte. Hierzu wurden 4 verschiedene Standardreihen auf Basis desselben Plasmas angesetzt. Diese Standardreihen setzten sich aus unterschiedlichen, teils kombinierten Bestandteilen der bisher etablierten Standardreihe nach DNase-Verdau und EDTA-Inaktivierung zusammen. Des Weiteren wurde eine Standardreihe auf Basis reinen, unbehandelten Plasmas angesetzt (s. Abbildung 15). Bei Fehlen eines Bestandteils wurde dieser Anteil durch Wasser ersetzt, um ein äquivalentes Probenvolumen zu generieren. Die Menge zellfreier DNA, die der Standardreihe mit DNase-Verdau fehlte, wurde rechnerisch

berücksichtigt und an die anderen Standardreihen angepasst. Es wurde für alle Standardreihen einheitlich das bisher etablierte Messprotokoll verwendet, um eine eindeutige Aussage bzgl. des Einflusses der Reagenzien im Probenansatz treffen zu können. Die statistische Analyse ergab signifikante Korrelationen für alle Standardreihen mit und -untereinander (s. Tabelle 54). Mit diesem Ergebnis war eine grobe Verfälschung/ Änderung der Standardreihen durch die Anwendung der DNase unwahrscheinlich und das Protokoll konnte unverändert beibehalten werden.

<u>L1PA2-qPCR //</u> <u>AD-Fluorometrie 54°</u>	<b>„DNase+EDTA</b> <b>+Ink.-Puffer</b>	<b>EDTA</b>	<b>Ink.-</b> <b>Puffer</b>	<b>Plasma</b> <b>pur</b>
<b>Steigung m</b>	68,1	46,5	49,2	50,92
<b>Achsenabschnitt</b> (RFU absolut)	8460	9390	6990	9350

Tabelle 53: Parameter der linearen Funktion korrelierter Standardreihen im Vergleich der verwendeten Reagenzien zur DNA-Degradation

	<b>Korrelation</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Std.-Reihe 1</b> <b>„DNase+EDTA+</b> <b>Inkubationspuffer“</b>	r		0,994	0,975	0,996
	p		$0,057 \cdot 10^{-5}$	$0,037 \cdot 10^{-3}$	$0,014 \cdot 10^{-5}$
	n		8	8	8
<b>Std.-Reihe 2</b> <b>„EDTA“</b>	r			0,986	0,989
	p			$0,07 \cdot 10^{-4}$	$0,03 \cdot 10^{-4}$
	n			8	8
<b>Std.-Reihe 3</b> <b>„Inkubationspuffer“</b>	r				0,979
	p				$0,021 \cdot 10^{-3}$
	n				8
<b>Std.-Reihe 4</b> <b>„Plasma pur“</b>	r				
	p				
	n				

Tabelle 54: Parameter der Korrelation von Standardreihen mit differenter Zusammensetzung der Reagenzien zur DNA-Degradation

### 9.2.6 Temperatur-Einfluss nach Proteolyse

Für die mit Proteinase behandelten Proben wurde das Steigungsprofil der absoluten RFU über die Schmelzkurve hinweg ( $d(\text{RFU})/dT$ ) analysiert und für die beiden Varianten der Standardreihen verglichen (s. Abbildung 68, s. Abbildung 69).

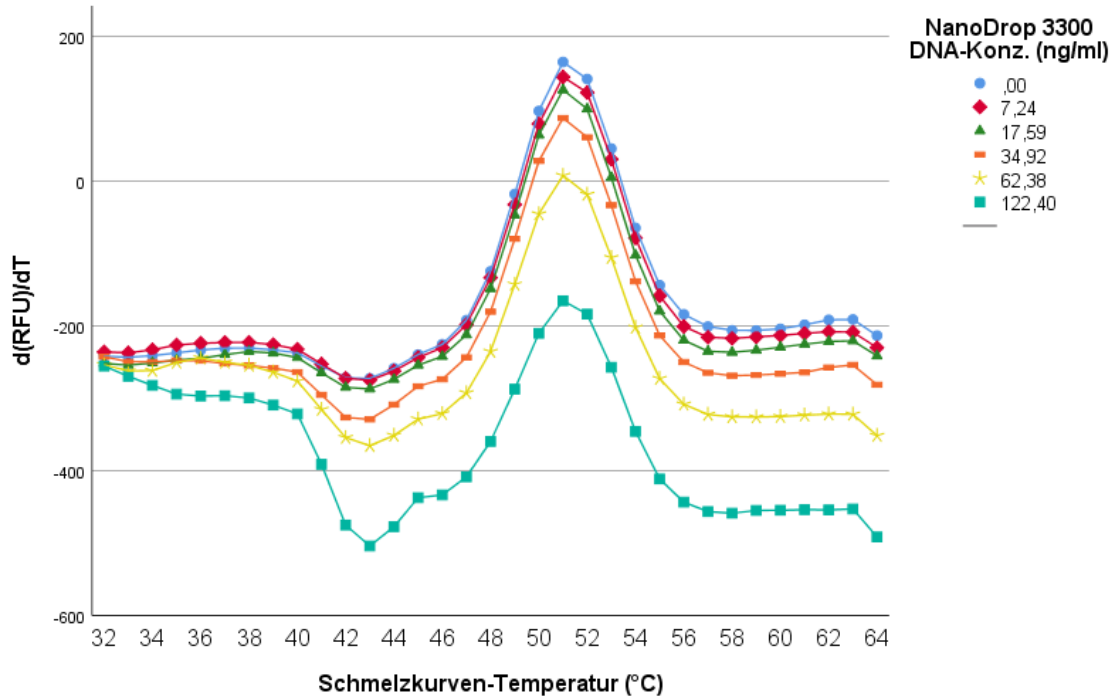


Abbildung 68: Temperaturabhängige Änderung der Strahlungsintensität über Schmelzkurve einer Standardreihe nach chemischer DNase-Inaktivierung (EDTA)

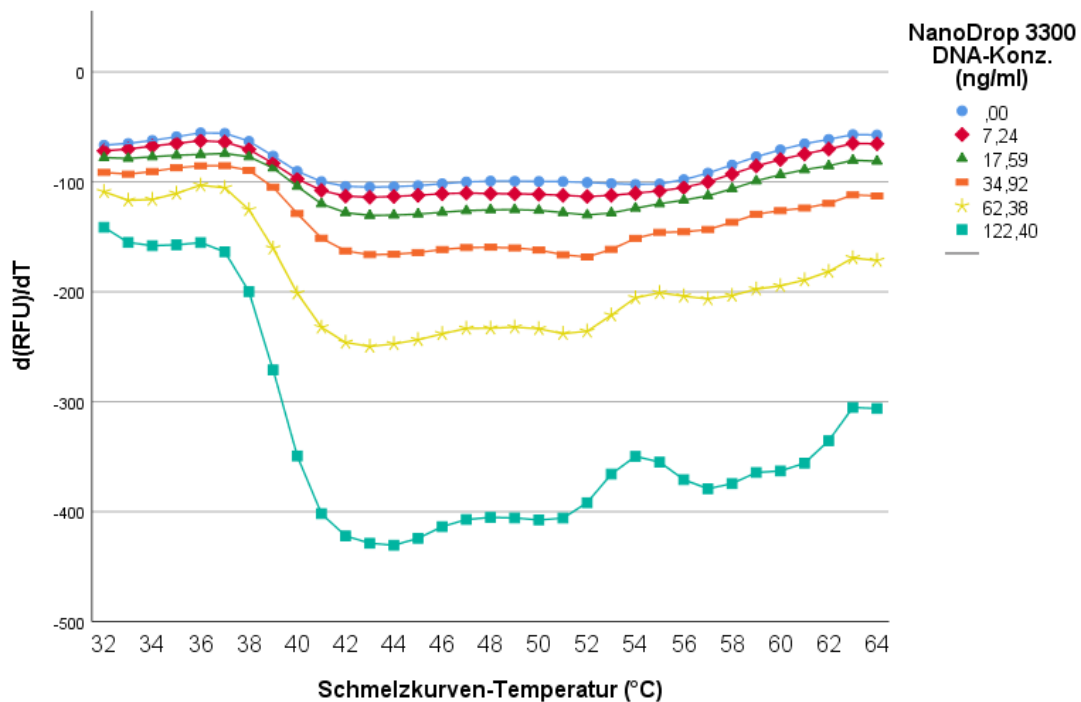


Abbildung 69: Temperaturabhängige Änderung der Strahlungsintensität über Schmelzkurve einer Standardreihe nach enzymatischer DNase-Inaktivierung (Proteinase K)

Hierbei war für beide Varianten der Standardreihen eine stark negative Steigung entsprechend eines starken Abfalls der absoluten RFU bei ca. 42-45 °C ersichtlich, der sich für alle Standardreihen als Minimum  $d(\text{RFU})/dT$  darstellte. Die Mittelwerte dieser Minima wiesen in Abhängigkeit zur enthaltenen DNA-Konz. der Standards für beide Varianten der Standardreihen einen linearen Zusammenhang (+EDTA:  $R^2 = 0,974$ , +ProtK:  $R^2 = 0,982$ ) in antiproportionaler Art auf (s. Abbildung 70).

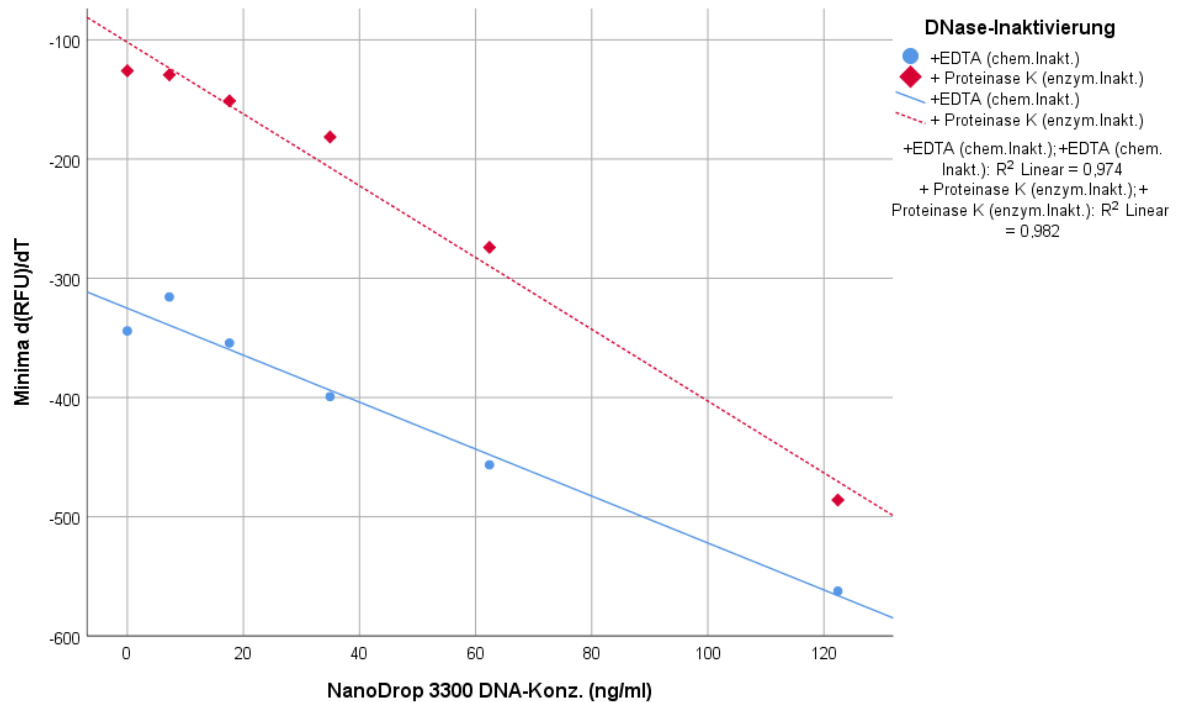


Abbildung 70: Minima der temperaturabhängigen Änderung der Strahlungsintensität in Korrelation zur enthaltenen Standard-Konzentration (Standardreihen im Vergleich zwischen chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung)

Für den Schmelzkurvenabschnitt von 50-55 °C bot  $d(\text{RFU})/dT$  für die Standardreihen „+EDTA“ graphisch den bekannten Gipfel, welche sich als Maxima von  $d(\text{RFU})/dT$  darstellten. Diesen Gipfel weisen die Standardreihen „+ProtK“ nicht auf und die Maxima der  $d(\text{RFU})/dT$  liegen an anderen Schmelzkurventemperaturen. Für die Standardreihen „+EDTA“ war für die Mittelwerte dieser Maxima an diesem Temperaturpunkt ein linearer Zusammenhang ( $R^2 = 0,962$ ) in ebenfalls antiproportionaler Abhängigkeit zur enthaltenen DNA-Konz. nachzuweisen (s. Abbildung 71). Ein äquivalent ausgeprägter linearer Zusammenhang bzgl. dieser Maxima konnte für die Standardreihen „ProtK“ nicht nachgewiesen werden ( $R^2 = 0,373$ ).



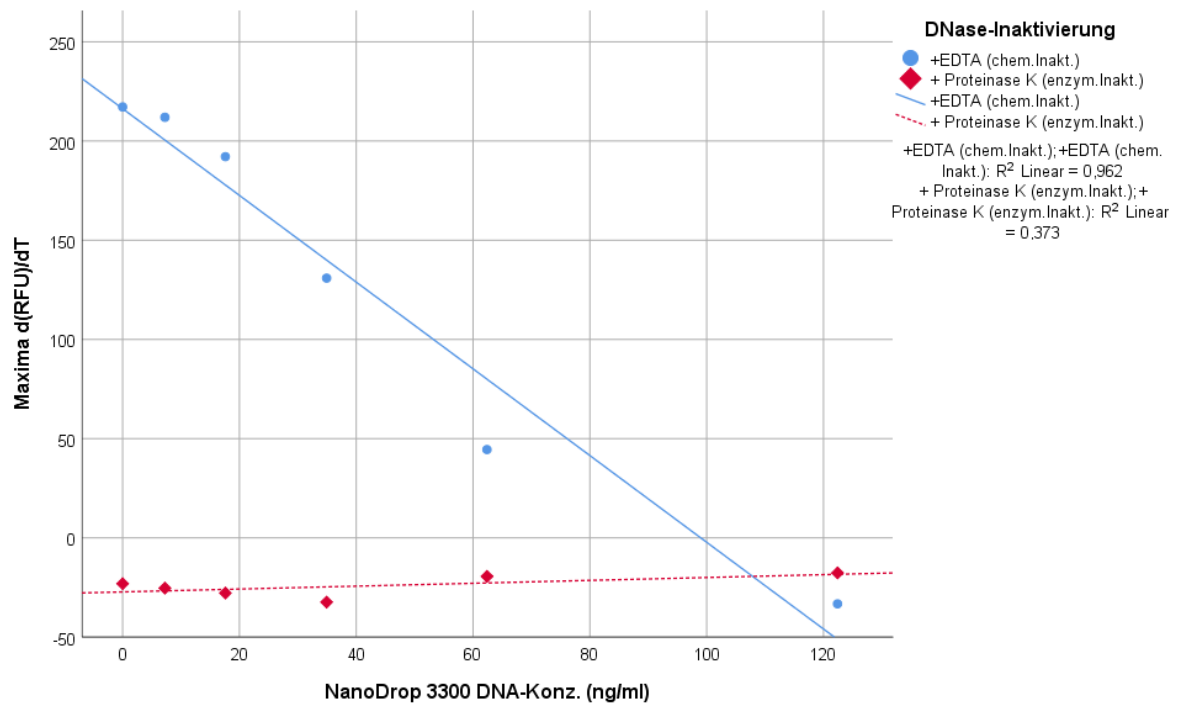


Abbildung 71: Maxima der temperaturabhängigen Änderung der Strahlungsintensität in Korrelation zur enthaltenen Standard-Konzentration (Standardreihen im Vergleich zwischen chemischer und enzymatischer DNase-Inaktivierung)

### 9.2.7 Differenzierbarkeit der Standard-Konzentrationen (cfDNA-Isolat)

<u>Kruskal-Wallis-Test, Paarweise Vergleich</u> <u>„DNA-Konz. Standardreihen IqDNA“</u>	<b>Standardteststatistik</b> (z)	<b>Signifikanz</b> (p)
0 ng/ml -2 ng/ml	-,151	1,000
0 ng/ml -4 ng/ml	-,791	1,000
0 ng/ml - 8 ng/ml	-1,357	1,000
0 ng/ml -16 ng/ml	-1,771	1,000
0 ng/ml -32 ng/ml	-2,487	,360
0 ng/ml -64 ng/ml	-3,204	,038
0 ng/ml -128 ng/ml	-3,807	,004
2 ng/ml -4 ng/ml	-,641	1,000
2 ng/ml -8 ng/ml	-1,206	1,000
2 ng/ml -16 ng/ml	-1,621	1,000
2 ng/ml -32 ng/ml	-2,337	,545
2 ng/ml -64 ng/ml	-3,053	,063
2 ng/ml -128 ng/ml	-3,656	,007
4 ng/ml -8 ng/ml	-,565	1,000
4 ng/ml -16 ng/ml	-,980	1,000
4 ng/ml -32 ng/ml	-1,696	1,000
4 ng/ml -64 ng/ml	-2,412	,444
4 ng/ml -128 ng/ml	-3,015	,072
8 ng/ml -16 ng/ml	-,415	1,000
8 ng/ml -32 ng/ml	-1,131	1,000
8 ng/ml -64 ng/ml	-1,847	1,000
8 ng/ml -128 ng/ml	-2,450	,400
16 ng/ml -32 ng/ml	-,716	1,000
16 ng/ml -64 ng/ml	-1,432	1,000
16 ng/ml -128 ng/ml	-2,035	1,000
32 ng/ml -64 ng/ml	-,716	1,000
32 ng/ml -128 ng/ml	-1,319	1,000
64 ng/ml -128 ng/ml	-,603	1,000

Tabelle 55: Statistische Auswertung der Differenzierbarkeit von aus isolierter gDNA generierten Standard-Konzentrationen (AD-Fluorometrie)

<u>Kruskal-Wallis-Test, Paarweise Vergleich „DNA-Konz. Standardreihen lcfDNA“</u>	<b>Standardteststatistik (z)</b>	<b>Signifikanz (p)</b>
0 ng/ml -2 ng/ml	,113	1,000
0 ng/ml -4 ng/ml	-,490	1,000
0 ng/ml - 8 ng/ml	-,905	1,000
0 ng/ml -16 ng/ml	-2,035	1,000
0 ng/ml -32 ng/ml	-2,337	,545
0 ng/ml -64 ng/ml	-3,090	,046
0 ng/ml -128 ng/ml	-3,694	,006
2 ng/ml -4 ng/ml	-,377	1,000
2 ng/ml -8 ng/ml	-,791	1,000
2 ng/ml -16 ng/ml	-1,922	1,000
2 ng/ml -32 ng/ml	-2,224	,733
2 ng/ml -64 ng/ml	-2,977	,081
2 ng/ml -128 ng/ml	-3,580	,010
4 ng/ml -8 ng/ml	-,415	1,000
4 ng/ml -16 ng/ml	-1,545	1,000
4 ng/ml -32 ng/ml	-1,847	1,000
4 ng/ml -64 ng/ml	-2,601	,261
4 ng/ml -128 ng/ml	-3,204	,038
8 ng/ml -16 ng/ml	-1,131	1,000
8 ng/ml -32 ng/ml	-1,432	1,000
8 ng/ml -64 ng/ml	-2,186	,807
8 ng/ml -128 ng/ml	-2,789	,148
16 ng/ml -32 ng/ml	-,302	1,000
16 ng/ml -64 ng/ml	-1,055	1,000
16 ng/ml -128 ng/ml	-1,658	1,000
32 ng/ml -64 ng/ml	-,754	1,000
32 ng/ml -128 ng/ml	-1,357	1,000
64 ng/ml -128 ng/ml	-,603	1,000

Tabelle 56: Statistische Auswertung der Differenzierbarkeit von aus isolierter cfDNA generierten Standard-Konzentrationen (AD-Fluorometrie)

### 9.2.8 Differenzierbarkeit der Standard-Konzentrationen nach Proteolyse

<u>ANOVA</u> <u>„DNA-Konz. (ND 3300)“ –</u> <u>„+EDTA“</u>	<b>M.</b>	<b>SD.</b>	<b>Multiples Testen</b> (Dunn-Bonferroni)	<b>Signifikanz</b> (p)
,00	7642,86	621,81	7,24	1,000
			17,59	0,768
			34,92	0,001
			62,38	0,000
			122,40	0,000
7,24	7944,52	525,30	17,59	1,000
			34,92	0,010
			62,38	0,000
			122,40	0,000
17,59	8442,32	277,08	34,92	0,213
			62,38	0,000
			122,40	0,000
34,92	9472,75	450,00	62,38	0,005
			122,40	0,000
62,38	11108,86	901,04	122,40	0,000
122,40	14982,80	722,59		

Tabelle 57. Statistische Auswertung der Differenzierbarkeit von Standard-Konzentrationen nach chemischer DNase-Inaktivierung (AD-Fluorometrie)

<u>ANOVA</u> <u>„DNA-Konz. (ND3300)“ –</u> <u>„+ProtK“</u>	<b>M.</b>	<b>SD.</b>	<b>Multiples Testen</b> (Dunn-Bonferroni)	<b>Signifikanz</b> (p)
,00	1329,54	205,22	7,24	1,000
			17,59	1,000
			34,92	0,001
			62,38	0,000
			122,40	0,000
7,24	1562,43	129,92	17,59	1,000
			34,92	0,011
			62,38	0,000
			122,40	0,000
17,59	1834,40	174,98	34,92	0,136
			62,38	0,000
			122,40	0,000
34,92	2590,44	191,73	62,38	0,001
			122,40	0,000
62,38	3887,12	451,89	122,40	0,000
122,40	7207,98	855,68		

Tabelle 58: Statistische Auswertung der Differenzierbarkeit von Standard-Konzentrationen nach enzymatischer DNase-Inaktivierung (AD-Fluorometrie)

### 9.2.9 Evaluation von Standardreihen basierend auf Pooling-Plasma im Vergleich zu Standardreihen basierend auf den enthaltenen Einzelproben

In diesem zusätzlichen Versuch sollten 3 Standardreihen auf Basis einer einzelnen Plasmaprobe, jeweils eines anderen Individuums, etabliert werden. Gleichzeitig sollte das Plasma dieser Proben in äquivalentem Verhältnis gemischt werden und als Pooling-Plasma ebenfalls als Basis einer Standardreihe dienen. Eine fünfte Standardreihe sollte rechnerisch aus den RFU-Mittelwerten der 3 zuvor genannten Standardreihen erstellt werden. Die Standardreihen aus Pooling-Plasma und Mittelwerten der Einzel-Plasmaproben sollten eine einheitliche Methode darstellen, mit der für jede der 3 Proben bzw. für jedes der 3 Individuen präzise deren Nativplasma quantifiziert werden konnte. Als Plasmaproben dienten Proben der Kontrollprobanden (s. 4.1), jeweils eines anderen Individuums und anderen Belastungszeitpunktes.

Aufgrund der größeren Menge an Standardreihen wurden nur 5 Standards der bisher verwendeten Reihe 128-0 ng/ml verwendet. Sowohl Standardreihen als auch Nativplasma wurden in Triplikaten angesetzt, um akzidentielle Pipettierfehler etc. zu erkennen und auszugleichen. Die Auswertung erfolgte, nach Prüfung der Standardabweichung innerhalb des Triplikats, indem ein Mittelwert der RFU aus diesem Triplikat gebildet wurde. Bei einer prozentualen Standardabweichung größer 10 % in Relation zum absoluten RFU-Mittelwert des Triplikats wurde das Ergebnis verworfen und es erfolgte eine Wiederholungsmessung der betroffenen Probe. Als Referenzwerte der Standardreihen wurden wieder eine Messung der Standards mittels NanoDrop 3300 verwendet, als Referenzwerte des Nativplasmas Ergebnisse der L1PA2-qPCR.

Die Standardreihe auf Basis des Poolings-Plasmas und die aus den Mittelwerten der Einzelproben errechnete Standardreihe korrelierten sowohl signifikant mit der durch NanoDrop 3300 ermittelten DNA.-Konz. als auch untereinander. Gleichzeitig korrelierten diese jede für sich signifikant mit jeder der Standardreihen der Einzelproben. Gleiches galt für die Standardreihen der Einzelproben selbst (s. Tabelle 59).

Bivariate Korrelation	NanoDrop 3300 DNA-Konz. (ng/ml)	Std.-Reihe Einzelprobe 1 prä	Std.-Reihe Einzelprobe 3 rest	Std.-Reihe Einzelprobe 4 post	Std.-Reihe Mittelwerte Einzelproben	Std.-Reihe Pooling-Plasma
<b>NanoDrop 3300 DNA-Konz. (ng/ml)</b>						
<b>Std.-Reihe Einzelprobe 1 prä</b>	$r = 0,994$ $p = 0,05 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$					
<b>Std.-Reihe Einzelprobe 3 rest</b>	$r = 0,991$ $p = 0,01$ $n = 5$	$r = 0,999$ $p = 0,05 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$				
<b>Std.-Reihe Einzelprobe 4 post</b>	$r = 0,999$ $p = 0,05 \cdot 10^{-3}$ $n = 5$	$r = 0,997$ $p = 0,02 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$	$r = 0,996$ $p = 0,03 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$			
<b>Std.-Reihe Mittelwerte Einzelproben</b>	$r = 0,993$ $p = 0,01$ $n = 5$	$r = 0,994$ $p = 0,01$ $n = 5$	$r = 0,996$ $p = 0,03 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$	$r = 0,997$ $p = 0,02 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$		
<b>Std.-Reihe Pooling-Plasma</b>	$r = 0,996$ $p = 0,05 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$	$r = 0,999$ $p = 0,05 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$	$r = 0,999$ $p = 0,05 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$	$r = 0,999$ $p = 0,05 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$	$r = 0,997$ $p = 0,05 \cdot 10^{-2}$ $n = 5$	

Tabelle 59: Parameter der Korrelation Individuums-spezifischer Standardreihen mit Standardreihen basierend auf Pooling-Plasma dieser Individuen und mittels ND3300 ermittelter DNA-Konz. (AD-Fluorometrie)

<u>DNA-Konz.</u> (ND 3300, ng/ml) // <u>AD-Fluorometrie 54°</u> (RFU absolut)	Std.-Reihe <b>Einzelprobe 1 prä</b>	Std.-Reihe <b>Einzelprobe 3 rest</b>	Std.-Reihe <b>Einzelprobe 4 post</b>
<b>Steigung m</b>	51,7	58,4	77,47
<b>Achsenabschnitt</b> (RFU Background Subtracted)	7,4	140	151

Tabelle 60: Parameter der linearen Funktionen korrelierter Individuums-spezifischer Standardreihen

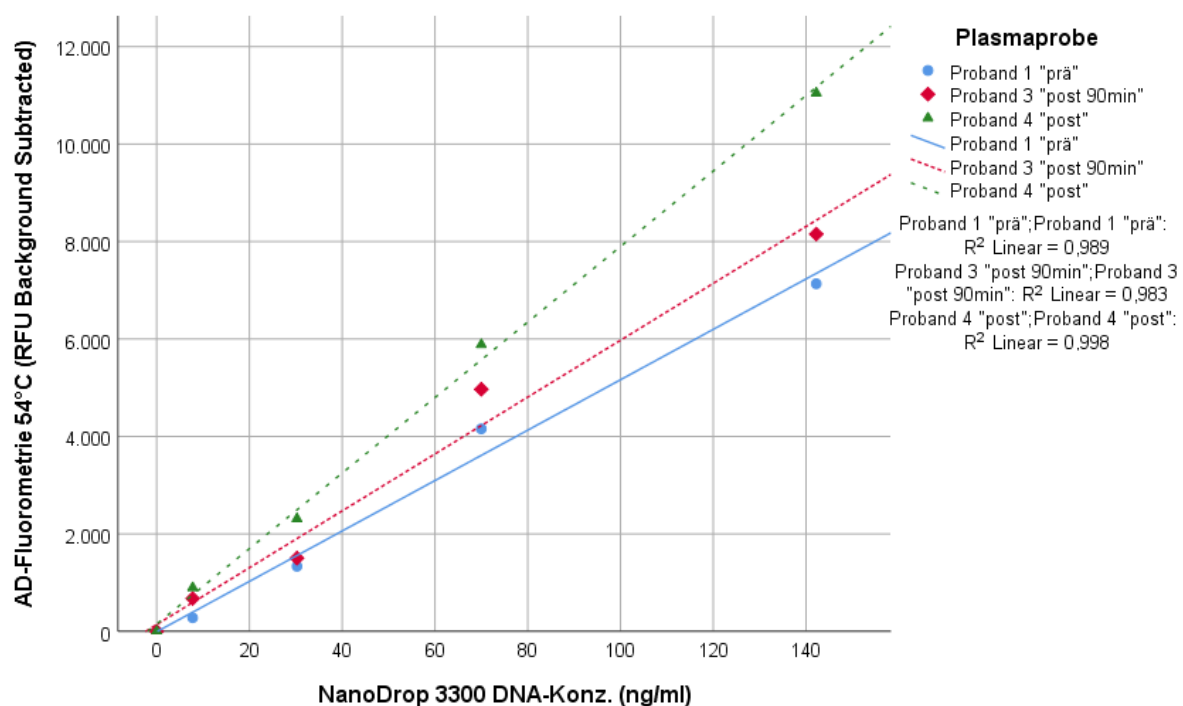


Abbildung 72: Korrelation der Strahlungsintensität mit enthaltener DNA-Konz von Individuums-spez. Standardreihen

<u>DNA-Konz.</u> (ND 3300, ng/ml) // <u>AD-Fluorometrie 54°</u> (RFU absolut)	Std.-Reihe <b>Einzelproben</b>	Std.-Reihe <b>Mittelwerte Einzelproben</b>	Std.-Reihe <b>Pooling- Plasma</b>
<b>Steigung m</b>	62,5	62,5	59,26
<b>Achsenabschnitt</b> (RFU Background-Subtracted)	94,4	94,4	534

Tabelle 61: Parameter der linearen Funktionen korrelierter Mittelwerte von Standardreihen im Vergleich individueller und Standardreihen auf Basis von Pooling-Plasma



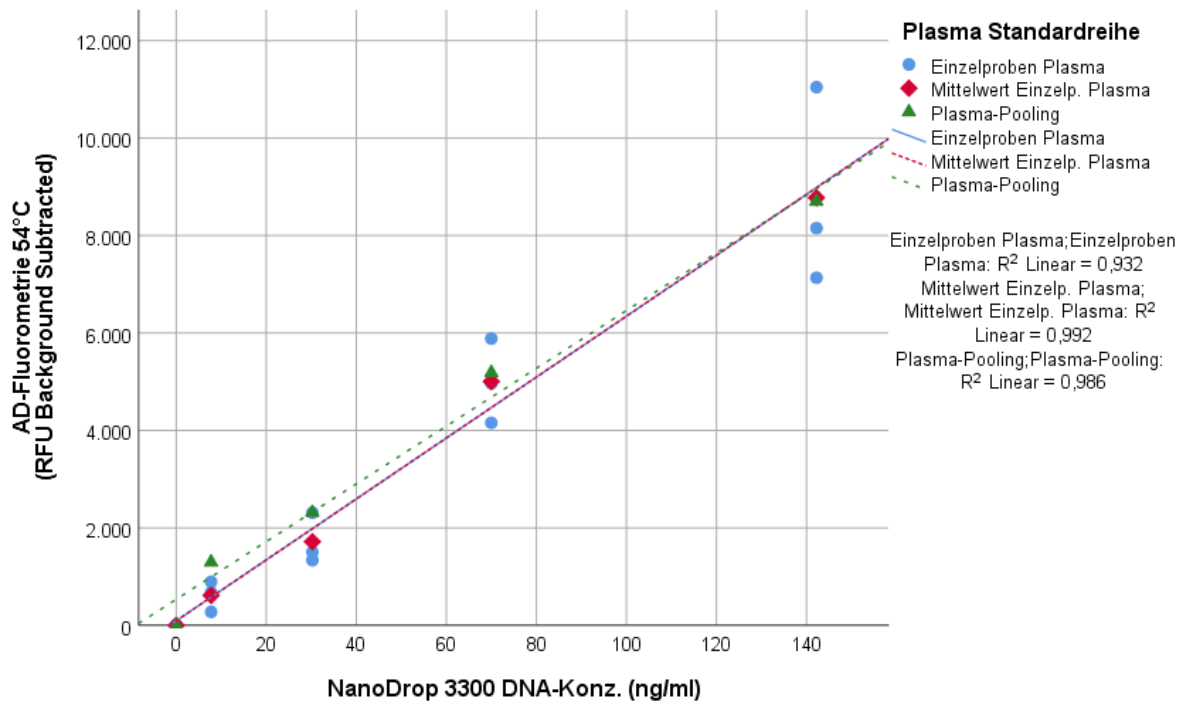


Abbildung 73: Korrelation der Strahlungsintensität mit enthaltener DNA-Konz. Im Vergleich der Mittelwerte Individuums-spez. und aus diesen rechnerisch/laborchemisch gepoolten Standardreihen

## 10 DANKSAGUNG

Aus Datenschutzgründen entfernt.

# 11 LEBENS LAUF

## **Persönliche Daten**

---

Aus Datenschutzgründen entfernt.

## **Berufliche Erfahrung**

---

- |             |  |
|-------------|--|
| 2020 - 2023 | <b>Stadtpital Zürich (CH)</b><br>Institut für Anästhesiologie & Intensivmedizin                            |
| Seit 2023   | <b>Universitätsklinikum Frankfurt</b><br>Institut für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie |

## **Promotion**

---

- |             |   |
|-------------|---|
| 2018 - 2023 | <b>„Amplifikationsunabhängige Direktfluorometrie zellfreier DNA“</b><br>Zentrum für Kardiologie, Universitätsmedizin Mainz<br>Institut für Sportmedizin, Johannes Gutenberg-Universität Mainz |
|-------------|---|

## **Studium**

---

- |             |   |
|-------------|---|
| 2018 – 2019 | <b>Praktisches Jahr</b><br>Anästhesiologie, Universitätsmedizin Mainz<br>Innere Medizin, Spital Männedorf (CH)<br>Chirurgie, Klinik Gut St. Moritz (CH) |
| 2014 – 2019 | <b>Humanmedizin, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz</b><br>3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung<br>2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung                 |
| 2012 – 2014 | <b>Humanmedizin, Universität Rostock</b><br>1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung   |
| 2004 – 2012 | <b>Helmholtz-Gymnasium Heidelberg</b><br>Deutsche Hochschulreife  |