

Masterarbeit

**Validierung des Oncomine Colon cfDNA Assay für die
Liquid Biopsy Diagnostik mithilfe von NGS**

eingereicht von

Lena Maria Kirisits BSc.

zur Erlangung des akademischen Grades

**Master of Science Continuing Education
(MSc CE)**

an der

Medizinische Universität Graz

ausgeführt im

Universitätslehrgang Medizinische Genetik

unter der Anleitung von Betreuerin

OÄ Dr. Sophia Petschnak, MSc.

Wien, 12.06.2024

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Wien, am 12.06.2024

Lena Kirisits

Zusammenfassung

Hintergrund: Bei der Liquid Biopsy handelt es sich um eine nicht-invasive Methode, welche die wiederholte Analyse und Echtzeitüberwachung von Tumorrezidiven, Metastasen oder therapeutischen Reaktionen ermöglicht. Die Liquid Biopsy wird in metastasierten Tumoren oder zur Feststellung einer MRD eingesetzt. Für alle diese möglichen Anwendungsgebiete sind Methoden mit hoher Sensitivität erforderlich, um kleinste Mengen ctDNA detektieren zu können.

Ziel: Das Ziel dieser Masterarbeit war die Validierung des Oncomine Colon cfDNA Assays hinsichtlich seine Detektionsfähigkeit von SNV sowie Indels in den im Assay enthaltenen Hotspotregionen. Zudem wurde die minimale nachweisbare Allelfrequenz (Limit of Detection) untersucht.

Methode: Es wurden anhand von fünf kommerziellen cfDNA-Kontrollen und fünf Plasmaproben von Patient*innen der Oncomine Colon cfDNA Assay durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzierergebnisse wurden mit den Ergebnissen der Referenzmethode bzw. mit den Herstellerangaben verglichen. Es wurde Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV und die diagnostische Genauigkeit berechnet. Um die LOD bestimmen zu können wurden die Parameter ebenfalls für Varianten mit 1%, 0,5% und 0,1% Allelfrequenz ermittelt.

Ergebnisse: Aus keiner Plasmaprobe konnte genügend cfDNA isoliert werden, um die Qualitätskriterien für die Detektion von 0,1% AF zu erreichen. Für die Detektion von Varianten mit einer AF von 1% konnte eine Sensitivität von 95,45% und eine Spezifität von 97,87% erreicht werden. Die Spezifität für Varianten mit 0,5% betrug 100% und eine Sensitivität von 92,86%, wobei es nicht möglich war die Mutation p.T1556fs*3 (c.4666_4667insA) im Gen *APC* zu detektieren, da diese in einer Homopolymerregion liegt und das Assay hier eine klare Limitation aufweist.

Konklusion: Der Oncomine Colon cfDNA Assay zeigte während der Testphase eine hohe Sensitivität und Spezifität von über 90% bei einer Allelfrequenz von 1% und wird daher zukünftig für die Liquid Biopsy Diagnostik in der Klinik Favoriten verwendet, wobei die minimale nachweisbare Allelfrequenz bei 0,5% liegt. Jedoch ist es notwendig die cfDNA-Ausbeute aus Plasmaproben zu verbessern.

Abstract

Background: Liquid biopsy is a non-invasive method that enables repeated analysis and real-time monitoring of tumor recurrences, metastases, or therapeutic responses. Liquid biopsy is used in metastatic tumors or to detect MRD. For all these possible areas of application, methods with high sensitivity in order to detect the smallest amounts of ctDNA are necessary.

Aim of the study: The aim of this master's thesis was to validate the Oncomine Colon cfDNA Assay with regard to its ability to detect SNVs and Indels in the hotspot regions included in the assay. Additionally, the minimum detectable allele frequency (Limit of Detection) was investigated.

Methods: The Oncomine Colon cfDNA Assay was performed on five commercial cfDNA-controls and five plasma samples from patients. The sequencing results were compared with the results of the reference method and with the manufacturer's specifications. Sensitivity, specificity, PPV, NPV and diagnostic accuracy were calculated. In order to be able to determine the LOD, these parameters were also determined for variants with 1%, 0.5%, and 0.1% allele frequencies.

Results: No plasma sample yielded enough cfDNA to meet the quality criteria for the detection of 0.1% AF. For the detection of variants with an AF of 1% a sensitivity of 95.45% and a specificity of 97.87% could be achieved. The specificity for variants with 0.5% AF was 100% and a sensitivity of 92.86%, although it was not possible to detect the mutation p.T1556fs*3 (c.4666_4667insA) in *APC* because it is in a homopolymer region and the assay has a clear limitation here.

Conclusion: The Oncomine Colon cfDNA Assay showed high sensitivity and specificity of over 90% at an allele frequency of 1% during the test phase and will therefore be used for liquid biopsy diagnostics at Klinik Favoriten, with the minimum detectable allele frequency set at 0.5%. However, it is necessary to improve the cfDNA yield from plasma samples.

Inhalt

Zusammenfassung.....	3
Abstract.....	4
Inhalt.....	5
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	9
Tabellenverzeichnis	10
1. Hintergrund.....	11
1.1. Liquid Biopsy.....	11
1.1.1. ctDNA	12
1.2. Analysemethoden	14
1.2.1. Real-Time PCR.....	14
1.2.2. Digitale PCR	15
1.2.3. Next Generation Sequencing	17
1.3. Anwendung der Liquid Biopsy	20
1.3.1. ctDNA Analyse bei soliden Tumoren.....	20
1.3.2. MRD	21
1.3.3. Früherkennung	22
2. Problemstellung.....	23
2.1. Forschungsfragen	25
2.2. Hypothesen.....	25
3. Material und Methoden	25
3.1. Probenauswahl	26
3.1.1. Referenzproben	26
3.1.2. Patient*innenproben	28
3.2. cfDNA Isolierung, Quantifizierung und Qualitätsüberprüfung.....	29
3.3. Teststrategie	30
3.4. Analyse der cfDNA durch Targeted NGS	32
3.4.1. Library Preparation	32
3.4.2. Sequenzierung.....	34
3.4.3. Datenanalyse.....	34
3.5. Referenzmethoden.....	38
3.6. Statistische Auswertung	39
4. Ergebnisse	39
4.1. Ergebnisse der Tapestation	40
4.2. Qualitätsparameter der Sequenzierungen	43

4.3. Statistische Auswertung der Validierung	45
4.3.1. Gesamtergebnisse	45
4.3.2. Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 1%	47
4.3.3. Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,5%	48
4.3.4. Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,1%	50
4.3.5. Vergleich der Sensitivität, Spezifität, PPV und NNV der Gesamtergebnisse, Allelfrequenz 0,125% und 1 %	51
4.3.6. Inter- und Intraassay Variabilität.....	53
5. Diskussion	54
6. Zusammenfassung und Ausblick	61
Literaturverzeichnis	62
Anhang	67

Abkürzungsverzeichnis

AF	Allelfrequenz
BEAMing	beads, emulsion, amplification, magnetics
bp	Basepaar
cfDNA	cell free DNA
CHIP	clonal hematopoiesis of indeterminate potential
CNV	Copy Number Variation
CRC	Colorectales Carcinom
CTC	Circulation tumor cells
ctDNA	circulating tumor DNA
ddPCR	Droplet Digital PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dPCR	Digital PCR
FDA	Food and Drug Administration
FN	False negative
FP	False positive
HD	Horizon Discovery
HGVS	Human Genome Variation Society
IGV	Integrative Genomics Viewer
Indel	Insertion und Deletion
LOD	Limit of Detection
ml	Milliliter
Mol Freq	molekulare Frequenz
MRD	Minimal Residual Disease
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
NPV	negative prädiktive Wert
NSCLC	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
PCR	Polymerase Chain Reaction
PPV	positive prädiktive Wert
RNA	Ribonukleinsäure
SNV	Single Nucleotid Varianten
TN	True negative

TP	True positive
UMI	Unique Molecular Identifier
VAF	Variant Allele Frequenz
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Freisetzung von cfDNA.....	12
Abbildung 2: Ergebnis der Elektrophorese einer cfDNA-Probe.	13
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Real-Time PCR.	15
Abbildung 4: Ergebnis einer ddPCR.....	16
Abbildung 5. Schematische Darstellung der Funktionsweise von BEAMing.	17
Abbildung 6 Darstellung der Library-Vorbereitung mit UMIs.	19
Abbildung 7: Schritte der Library-Vorbereitung.	33
Abbildung 8: Auszug aus dem Torrent-Suite Report.....	34
Abbildung 9: Beispiel für einen Report der IonReporter Software.....	36
Abbildung 10: Elektropherogramm der Probe #1.....	40
Abbildung 11: Elektropherogramm der Probe #2.....	41
Abbildung 12: Elektropherogramm der Probe #3.....	41
Abbildung 13: Elektropherogramm der Probe #4.....	42
Abbildung 14: Elektropherogramm der Probe #5.....	42
Abbildung 15: Elektropherogramm der Probe #6.....	43
Abbildung 16: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Gesamtergebnisse, wobei die Daten aus Tabelle 12 repräsentiert werden.	47
Abbildung 17: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 1%, wobei die Daten aus Tabelle 13 repräsentiert werden.	48
Abbildung 18: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,5%, wobei die Daten aus Tabelle 14 repräsentiert werden.	50
Abbildung 19: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,1%, wobei die Daten aus Tabelle 15 repräsentiert werden.	51

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Varianten, die in Seraseq ctDNA Mutation Mix v2 enthalten sind und mit dem Oncomine Colon cfDNA Assay detektiert werden können(30).....	27
Tabelle 2: Varianten, die in den Referenzstandards HD 780 enthalten sind und mit dem Oncomine Colon cfDNA Assay detektiert werden können(39).....	28
Tabelle 3: Ausgewählte Plasmaproben von Patient*innen und die darin detektierten Varianten	29
Tabelle 4 Detektierte Variante in Probe #6.....	30
Tabelle 5: Teststrategie.....	31
Tabelle 6: In Oncomine Colon cfDNA Assay enthaltene Gene	32
Tabelle 7: Begriffserklärung aus der Ion Reporter Software(43).....	37
Tabelle 8: Patient*innen Proben und die zuvor durchgeführten Referenzmethoden	39
Tabelle 9: Konzentration der cfDNAs und Anteil der cfDNA in Prozent	43
Tabelle 10: Qualitätsparameter der sequenzierten Proben.....	44
Tabelle 11: Beispiel für eine Kreuztabelle, wie sie später für die Datenveranschaulichung verwendet wird	45
Tabelle 12: Kreuztabelle zur Gegenüberstellung des Oncomine Colon cfDNA Assays und der Referenzmethoden	46
Tabelle 13: Kreuztabelle zur Gegenüberstellung des Oncomine Colon cfDNA Assays von Proben mit 1 % AF und der Referenzmethode	47
Tabelle 14: Kreuztabelle zur Gegenüberstellung des Oncomine Colon cfDNA Assays von Proben mit 1 % AF und der Referenzmethode	49
Tabelle 15: Kreuztabelle zur Gegenüberstellung des Oncomine Colon cfDNA Assays von Proben mit 0,1 % AF und der Referenzmethode	50

1. Hintergrund

1.1. Liquid Biopsy

Bislang gilt die chirurgische Resektion von Tumoren als Goldstandard für klinische Entscheidungen. Da die herkömmliche Gewebebiopsie invasiv ist und manchmal nur eine kleine Probe gewonnen werden kann, ist sie nicht in der Lage, die Heterogenität des Tumors darzustellen oder das Fortschreiten des Tumors dynamisch zu überwachen. Liquid Biopsy ermöglicht eine nicht-invasive Diagnostik sowie auch eine einfache Verlaufskontrolle. Unter Liquid Biopsy versteht man allgemein die Analyse von tumorabgeleitetem Material aus peripherem Blut und anderen Körperflüssigkeiten(1). Neben peripherem Blut können, je nach Lokalisation des Tumors, auch andere Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Urin, Liquor und Pleuraflüssigkeit als Liquid Biopsy herangezogen werden(2).

Da es sich bei Liquid Biopsy um eine nicht invasive Methode handelt, ermöglicht sie eine wiederholte Analyse und Echtzeitüberwachung von Tumorrezidiven, Metastasen oder das Ansprechen auf die Behandlung, wodurch sie in der patientenorientierten Therapie und Präzisionsonkologie eingesetzt werden kann. Von besonderer Bedeutung ist das hinsichtlich der großen Heterogenität innerhalb von Tumoren, da es hier zu unterschiedlichen Resistenzmechanismen in verschiedenen Metastasen kommen kann. Darüber hinaus stellt die Minimal Residual Disease (MRD) ein potenzielles Risiko für Patient*innen in der kurativen Behandlung dar, da das Vorhandensein von solchen kleinsten Rezidiven nicht mit klinisch-diagnostischen Standardmitteln festgestellt werden kann(1). Die Heterogenität einer Tumorerkrankung könnte durch die Analyse von ctDNA besser erfasst werden, da Zellen bzw. DNA Fragmente des gesamten Tumors und von dessen Metastasen in das Blut gelangt. Gerlinger et al. zeigte, dass Primärtumore und Metastasen deutliche Heterogenitäten inter- und intratumoral ausweisen, welche mit Biopsien nicht erfasst werden können, da sie nur einen kleinen Bereich des Primärtumors erreichen(3).

Aufgrund der Zugänglichkeit und der großen Anzahl an Information, die gewonnen werden kann, gilt Blut als die weitverbreitetste Probenart für Liquid Biopsy. Daraus können unterschiedliche Fraktionen als Biomarker verwendet werden. Nach der Zentrifugation werden Bestandteile des Plasmas bzw. des Serums und der zelluläre

Anteil unterschieden. Aus dem zellulären Anteil können CTCs (Circulating tumor cells) und Zellen nicht Tumourursprungs, wie Immunzellen isoliert und analysiert werden. Während aus dem Plasma cfDNA (circulation free DNA), zirkulierende RNA und Proteine isoliert werden. Ein Anteil der cfDNA besteht aus ctDNA (circulating tumor DNA), welche bereits einer Vielzahl von Untersuchungsmethoden als Ausgangsmaterial dient(4).

1.1.1. ctDNA

Bei der sogenannte ctDNA handelt es sich um DNA-Fragmente, die von Tumorzellen stammen, in den Blutkreislauf gelangen und somit im Plasma von Tumorpatient*innen nachweisbar sind(1). Diese ctDNA wird durch unterschiedliche physiologische Ereignisse, wie Apoptose, Nekrose und Sekretion aus den Tumorzellen freigesetzt(5). In Abbildung 1 ist eine schematische Darstellung der Freisetzung von cfDNA zu sehen.

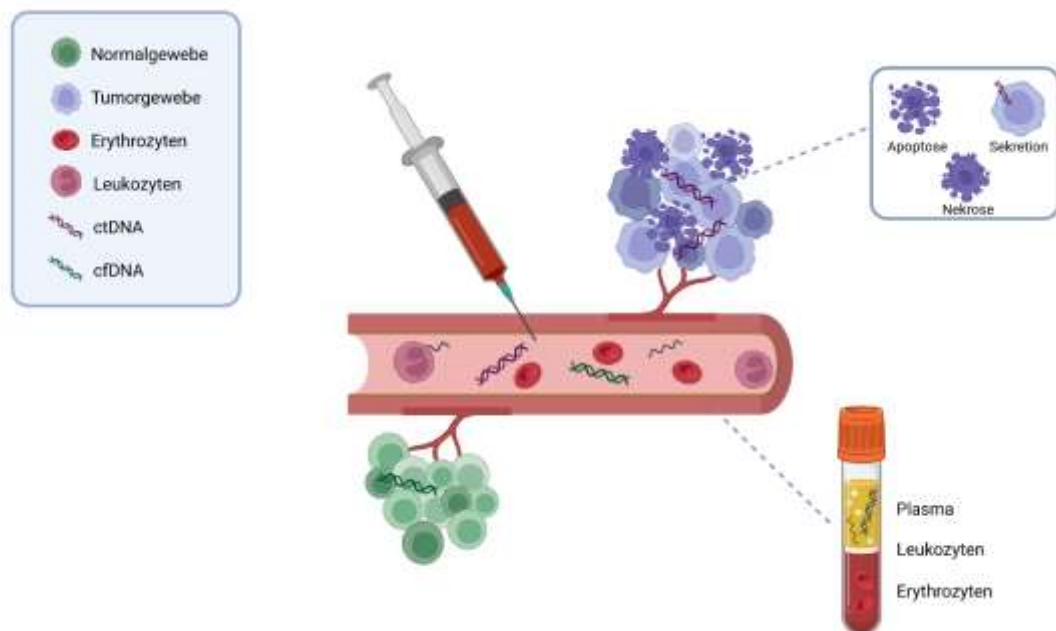


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Freisetzung von cfDNA. Erstellt mit BioRender.com

Verglichen mit genomischer DNA weist ctDNA eine deutlich höhere Fragmentierung auf. Es konnte gezeigt werden, dass ctDNA eine Länge von 70 und 200 bp aufweist kann, wobei ein deutlicher Peak bei 166bp liegt. 166bp entsprechen der Länge der

DNA, welche mit rund 147bp um ein Nucleosom gewickelt ist mit der dazugehörigen Linker-DNA. Des Weiteren können Fragmente mit 320bp oder größer nachgewiesen werden, was der DNA-Länge, welche um zwei Nucleosome gewickelt ist entspricht (5,6). In folgender Abbildung ist das Ergebnis einer Elektrophorese einer cfDNA-Probe zu sehen, welche später für diese Studie verwendet wurde und ungefähr der genannten Länge entspricht.

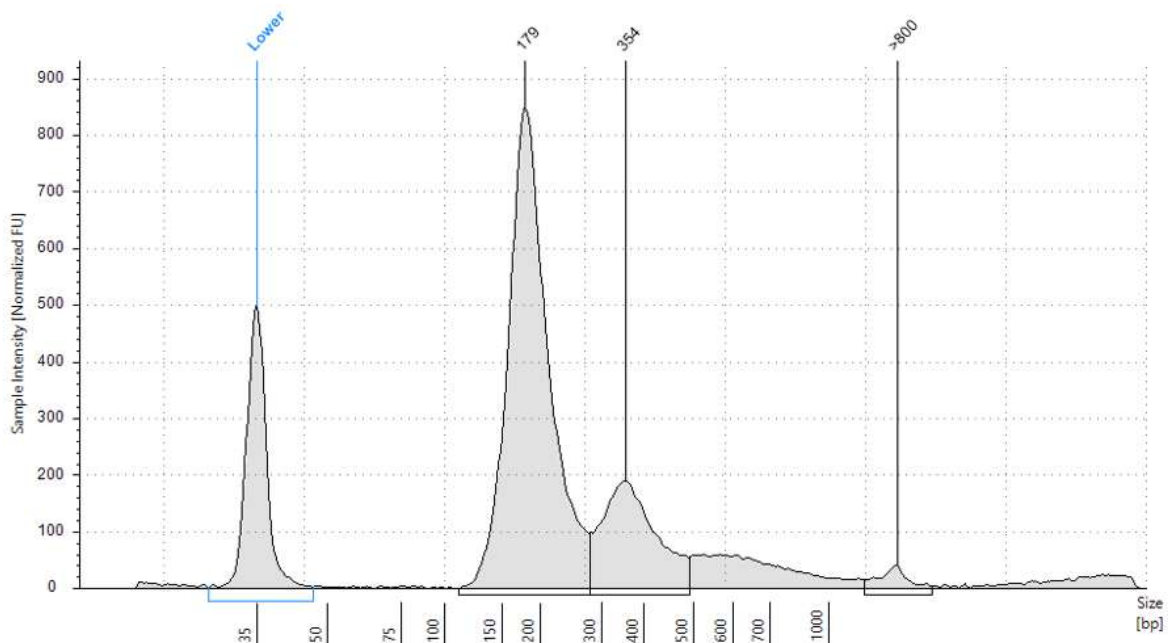


Abbildung 2: Ergebnis der Elektrophorese einer cfDNA-Probe. Der größte Anteil an DNA-Fragmenten weist eine Länge um 179bp auf, ein zweiter Peak ist bei 354bp zu sehen. Fragmente mit mehr als 800bp stammen aus genomischer DNA

Die Konzentration an cfDNA ist laut Studien bei Patient*innen mit Tumorerkrankungen höher als bei Nicht-Erkrankten. Die Menge an cfDNA korreliert nicht ausschließlich mit der Tumorgröße, sondern auch mit der Tumorart und dem Stadium der Erkrankung(7). Dennoch stellt die Konzentration der ctDNA in der Analyse eine Herausforderung dar. Auch bei Tumorpatient*innen im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung können durchschnittlich lediglich 17 ng/ml isoliert werden(8). Die Konzentration der cfDNA kann jedoch auch bei anderen Nicht-Tumorerkrankungen erhöht sein, beispielsweise aufgrund von Entzündungsreaktionen(2). Neben Plasma kann auch Serum für die Analyse herangezogen werden, in welchem höhere Konzentrationen an cfDNA festgestellt wurden, jedoch wird vermutet, dass neben ctDNA auch genomische DNA isoliert wurden. Aufgrund der Gerinnung und Lyse von Zellen, wie Leukozyten, kommt es

zur Kontamination und somit Verdünnung der ctDNA mit genomischen DNA, was zu einer Verfälschung des späteren Ergebnisses führen kann (9). Die durchschnittliche Halbwertszeit der cfDNA, die im Blut nachgewiesen werden kann, wird zwischen 16 Minuten bis 2,5 Stunden angegeben, was sie zu einem geeigneten Echtzeitparameter macht(10).

Die Analyse von ctDNA hat in der Krebsforschung und -behandlung an Bedeutung gewonnen, da sie Einblicke in genetische Veränderungen von Tumoren ermöglicht. Somatische Mutationen, die im Primärtumor nachgewiesen werden können und Informationen zu Therapieerfolg oder auch zur Prognose der Erkrankung bringen, können ebenfalls in ctDNA detektiert werden. Somit werden Eigenschaften des Primärtumors in der ctDNA reflektiert, was die Anpassung der Therapien zeitnahe ermöglicht(11). Des Weiteren können abweichende Eigenschaften auf Metastasen hindeuten. Neben Punktmutationen und Kopienzahlveränderungen können in ctDNA ebenfalls epigenetische Veränderungen, wie Methylierungsmuster und Fusionsgene, welche auch im ursprünglichen Tumor zu finden sind, nachgewiesen werden(12).

1.2. Analysemethoden

Aufgrund der geringen Konzentration an cfDNA in Plasmaproben und in weiterer Folge noch geringeren Konzentration an ctDNA, ist es von großer Bedeutung Analyseverfahren zu nutzen, welche eine hohe Sensitivität und eine geringen LOD erreichen.

Die drei gängigsten Methoden zur Detektion von Mutationen in ctDNA sind die Real-Time PCR, die digital PCR (dPCR) und das Next Generation Sequencing (NGS) in unterschiedlichen Ausführungen. In folgenden Kapiteln werden die Grundprinzipien sowie die wichtigsten Vor- und Nachteile der Methoden beschrieben.

1.2.1. Real-Time PCR

Aufgrund der geringen Kosten und Schnelligkeit der Real-Time PCR, ist diese Methode in der Routinediagnostik weit verbreitet. Am häufigsten zum Einsatz kommt eine Kombination aus TaqMan-basiertem Assay und allelspezifischen Assays. Die Amplifikation der Ziel-DNA erfolgt hierbei durch sequenzspezifische Primer, welche nur eine Amplifikation ermöglichen, wenn das Zielallel in der Probe enthalten ist. Durch diese Methode können SNVs und kleine Deletionen detektiert

werden. Durch die weitere Verwendung von fluoreszenzmarkierten Sonden für die Real-Time Detektion, wie Taqman oder Scorpion kann die Sensitivität erhöht werden(13). Nachteile von Real-Time PCR Liquid Biopsy Assays sind, dass nur eine limitierte Anzahl an bekannten Varianten in einer Reaktion analysiert werden können und abhängig vom Assay die Limit of Detection, die es ermöglicht lediglich Varianten mit einer Allelfrequenz von mindestens einem Prozent nachzuweisen(14). In Abbildung 3 ist eine schematische Darstellung einer Real-Time PCR zu sehen, bei welcher allelspezifische Primer zunächst die Amplifikation der Zielsequenz ermöglichen und anschließend diese Sequenz mit fluoreszenzmarkierten Primern weiteramplifiziert wird.

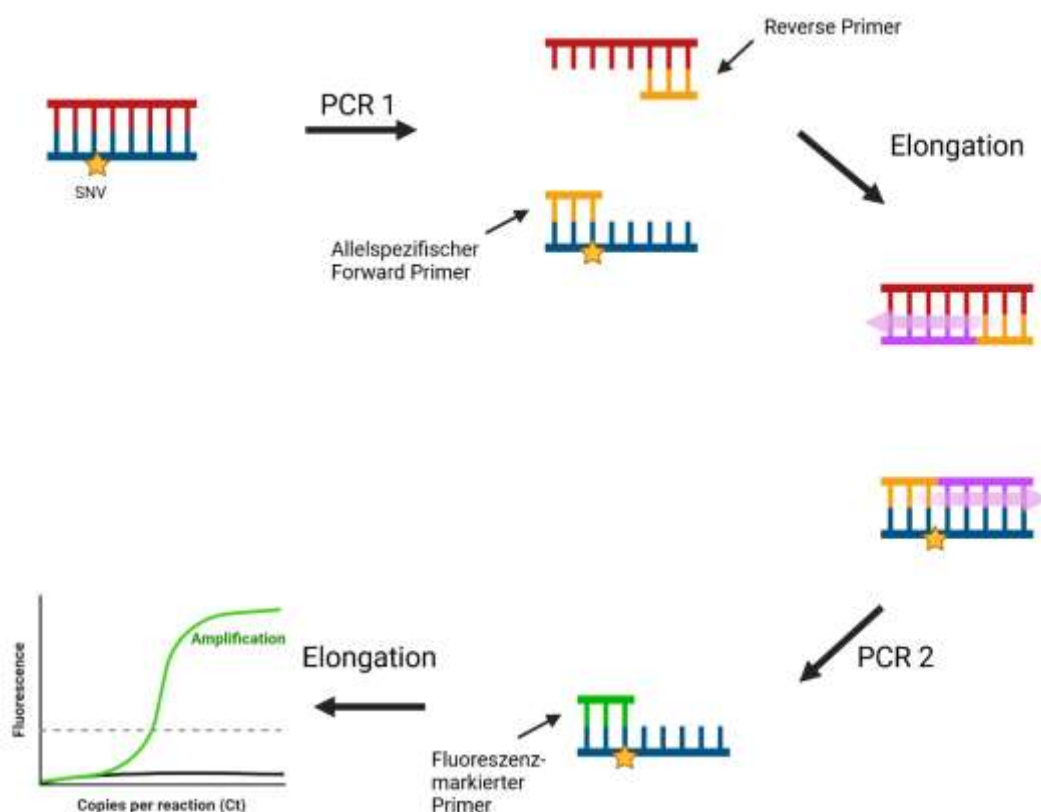


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer Real-Time PCR. Erstellt mit BioRender.com

1.2.2. Digitale PCR

Unter der digitalen PCR (dPCR) versteht man Methoden, welche ähnlich der Real-Time PCR arbeiten, jedoch wird hierbei die Probe nicht als Ganzes amplifiziert. DNA-Fragmente werden in einzelnen Reaktionen amplifiziert, was die Detektion von Mutationen auch in hohem Wildtypintergrund ermöglicht. Zur dPCR gehören die

ddPCR (digital droplet PCR) und BEAMing (beads, emulsions, amplification and magnetics) (13).

Die ddPCR basiert auf der Technologie der Wasser-Öl Emulsion, es entstehen hierbei tausende bis Millionen Tröpfchen, sogenannte Droplets, in diesen befindet sich jeweils ein mutierter bzw. nicht-mutierter DNA-Strang mit einer fluoreszenzmarkierten TaqMan-Sonde, welche während Flow Zytometrie detektiert und entweder einer Mutation oder einem Wildtyp zugeordnet wird (15). Vorteile einer ddPCR sind die hohe Sensitivität, was Detektion von Mutationen mit einer Allelfrequenz von 0,005 bis 0,1% ermöglicht und die kostengünstige Möglichkeit der absoluten Quantifizierung. Ähnlich der Real Time PCR können nur bekannte Varianten nachgewiesen werden und in einer Reaktion ist die Anzahl an Varianten limitiert (13,15). In der nachfolgenden Abbildung sind die Ergebnisse einer ddPCR dargestellt. Die blauen Cluster repräsentieren Droplets, die mutierte DNA enthalten, während die grünen Cluster Wildtyp-DNA aufweisen. Schwarze Cluster hingegen enthalten keine DNA-Fragmente.

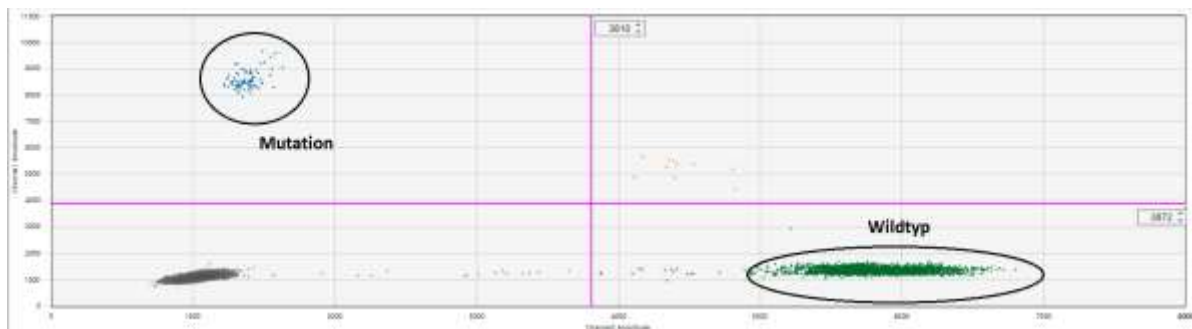


Abbildung 4: Ergebnis einer ddPCR

BEAMing basiert auf einer Technologie, welche Beads, Emulsion, Amplifikation und Magnetics nützt. Hierbei wird ebenfalls eine Wasser-Öl-Emulsion verwendet, jedoch befinden sich in den Droplets neben DNA und Sonden auch magnetische Beads, Primer und andere Komponenten einer PCR. Durch eine Streptavidin-Biotin Interaktion binden die DNA-Fragmente an die magnetischen Beads und es folgt eine PCR in den Droplets während welcher die DNA-Fragmente amplifiziert werden. Nach der Emulsions-PCR werde die magnetischen Beads mit den an sie gebundenen DNA-Fragmente aufgereinigt und mittels Flow Zytometrie analysiert und in Wildtyp und Mutation eingeteilt. Trotz der hohen Sensitivität und Spezifität

der Technologie, wird sie in der Routinediagnostik aufgrund der hohen Kosten und komplexen Workflows kaum eingesetzt (13).

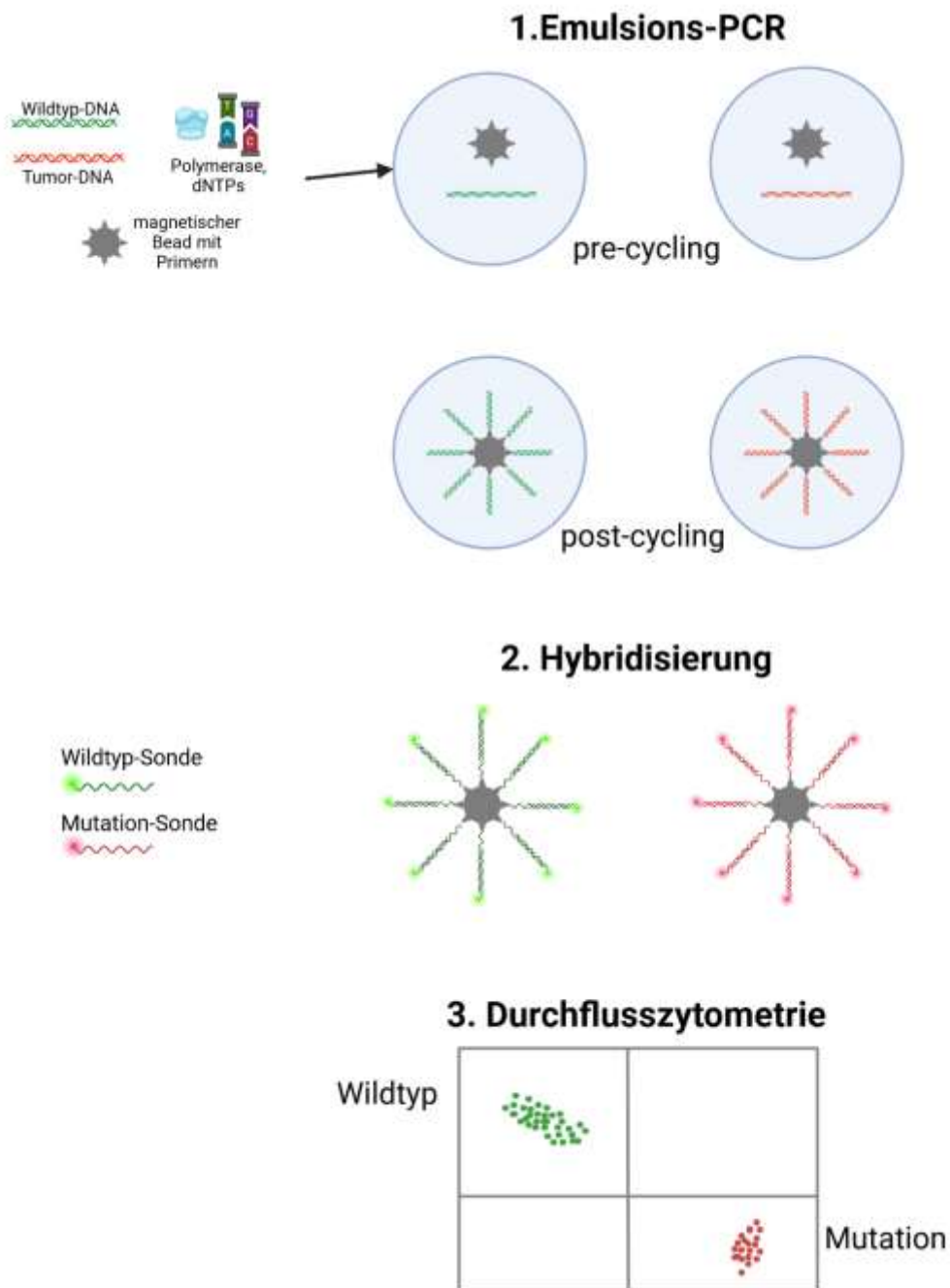


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Funktionsweise von BEAMing. Erstellt mit BioRender.com

1.2.3. Next Generation Sequencing

Die genannten Technologien zur Analyse von ctDNA haben alle gemein, dass lediglich bekannte Mutationen in limitierter Anzahl detektiert werden können.

Dadurch bleiben seltene oder unbekannte Mutationen unentdeckt, was dazu führen kann, dass Patient*innen mit solchen Varianten von potenziellen Therapien ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu stehen Assays, welche auf NGS basieren, hierbei wird das gesamte Gen von Interesse oder auch das gesamte Exom oder Genom sequenziert.

Bei der Analyse von ctDNA kann NGS gezielt oder nicht gezielt eingesetzt werden. Wird gezieltes NGS angewandt, wird vor der Sequenzierung und Library Preparation ein Anreicherungsschritt durchgeführt, in welchen nur jene Gene bzw. Genabschnitte durch Multiplex-PCR amplifiziert werden, welche von Interesse für das entsprechende Assay sind und später sequenziert werden sollen. Bei nicht gezieltem NGS entfällt dieser Anreicherungsschritt und das gesamte Genom wird sequenziert.

Hinsichtlich Kosten, Genauigkeit und Geschwindigkeit der Analyse von ctDNA bringt gezieltes NGS mehr Vorteile mit sich. Da Varianten in ctDNA oftmals sehr niedrigen Varianten Allelfrequenz (VAF) nachzuweisen sind, ist auch eine höhere Sequenziertiefe erforderlich, was mit einem gezielten NGS-Assay leichter zu erreichen ist. Die VAF, die den Anteil von DNA-Molekülen mit einer Mutation im Verhältnis zur Gesamtzahl der Moleküle mit Wildtyp-Allel darstellt, ist ein entscheidender Parameter für NGS-Assays. Je niedriger die nachweisbare VAF ist, desto sensitiver ist die Methode für die Analyse der ctDNA. Hierbei sind die Technologien der Illumina Sequenzierung und die Ion Torrent Technologie marktführend. Während Illumina einen höheren Durchsatz als Ion Torrent erreicht und weniger Sequenzierfehler auftreten, ist die Halbleitertechnologie von Ion Torrent schneller, was in der Liquid Biopsy Diagnostik von Bedeutung ist(7).

Für diese Arbeit wird die Ion Torrent-Technologie verwendet, die durch die Nutzung von Unique Molecular Identifier (UMI) eine besonders niedrige VAF erreichen kann(16). UMI sind Oligonukleotid-Barcodes, die bereits vor dem ersten Amplifikationsschritt an die ursprünglichen DNA-Fragmente gebunden werden. Während des Amplifikationsschrittes werden die DNA-Fragmente mit den UMIs amplifiziert und es entstehen Molekülfamilien. War im ursprünglichen DNA-Fragment eine Mutation, so wird diese auch amplifiziert und die gesamte Molekülfamilie trägt diese Mutation. Kann eine Mutation in 95% einer Molekülfamilie gefunden werden, wird sie als solche angenommen (17). Durch die Barcodes

können Fehler der DNA-Polymerase während der PCR und in den darauffolgenden PCR-Duplikaten oder auch während der Sequenzierung von tatsächlichen Mutationen unterschieden werden, was die Nachweisbarkeit einer VAF von 0,1% ermöglicht(16). In Abbildung 6 ist die vereinfachte Funktionsweise der UMI dargestellt.

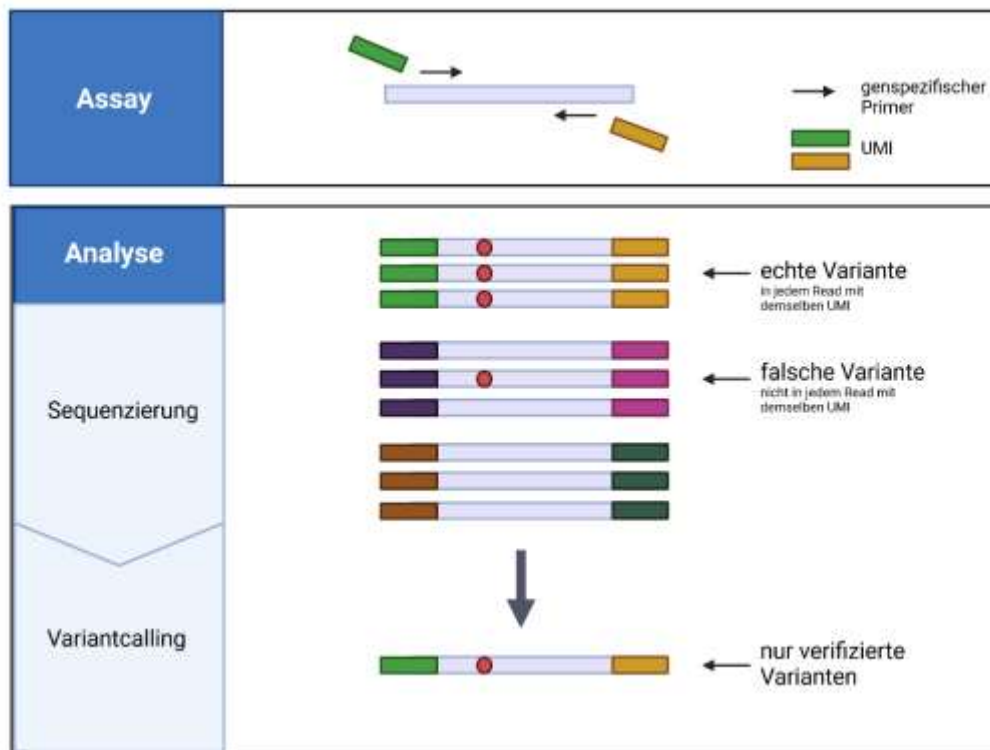


Abbildung 6 Darstellung der Library-Vorbereitung mit UMIs. Die Bindung der UMI erfolgt während der manuellen Library-Vorbereitung des Assays. Während der Analyse werden die einzelnen DNA-Fragmente mit den UMIs sequenziert und falsche Varianten, die nicht in jedem Read mit demselben UMI detektiert werden können, werden während dem Variantcalling ausgefiltert. Erstellt mit BioRender.com.

Ion Torrent basiert auf einer Halbleitertechnologie, während der Sequenzierung werden pH-Schwankungen gemessen, welche durch H⁺-Ionen entsteht, wenn dNTPs während der Synthese des DNA-Strangs eingebaut werden.

NGS bietet in der ctDNA-Analyse den Vorteil, dass nicht nur bekannte und häufig vorkommende Mutationen detektiert werden können, sondern definierte Gene bzw. Genabschnitten sequenziert werden und so Variante in diesen Bereichen detektiert werden können. Da die gesamte Untersuchung aus einem einzigen Reaktionsansatz durchführbar ist, wird der Probeninput im Vergleich zu anderen Methoden deutlich minimiert. Trotz dieser Vorteile sind NGS-Analysen in der Regel kosten- und zeitintensiver als andere Methoden(13).

1.3. Anwendung der Liquid Biopsy

Die konventionelle Gewebsbiopsie wurde historisch gesehen lediglich für die Tumorcharakterisierung verwendet, durch den Fortschritt in der Tumorforschung konnten weitere Tests etabliert werden, welche als prognostische, diagnostische oder prädiktive Parameter gelten und somit präzisere Therapiemöglichkeiten für Patient*innen ermöglichen (18). Jedoch sind die Möglichkeiten mit Gewebsbiopsien durch die eingeschränkte Zugänglichkeit und unvollständige Repräsentation begrenzt. Ausgehend davon gewinnt die Liquid Biopsy immer mehr an Interesse, da sie minimalinvasiv und somit leicht zugänglich ist. Durch die einfache Zugänglichkeit besteht die Möglichkeit die Dynamik und die Heterogenität von Tumoren zu verfolgen und somit Auftreten von Therapieresistenzen und Minimal Residual Disease (MRD) zeitnahe zu entdecken (12). Dieses Kapitel erläutert die potenziellen Anwendungsgebiete der Liquid Biopsy in der klinischen Praxis und geht dabei auch auf die bestehenden Herausforderungen ein.

1.3.1. ctDNA Analyse bei soliden Tumoren

Am besten erforscht ist die Anwendung von ctDNA Analysen im Bereich von metastasierten Tumoren, bei welchen die Untersuchungen bereits in der Routine durchgeführt werden, um Varianten zu detektieren, die als therapeutische Ziele bekannt sind. Hierbei lassen sich in Echtzeit therapierelevante Tumorveränderungen wie die Entwicklung von erworbenen Resistenzmechanismen beobachten.

In Zusammenhang mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren und Chemotherapien ist es von Bedeutung Reaktionen und Resistenzen noch vor bildgebenden Methoden frühzeitig zu erkennen, um die Therapie leiten zu können. Serielle Untersuchungen von ctDNA wurden als Instrument für die Vorhersage solcher Ereignisse evaluiert. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass Patient*innen, die vor einer Behandlung ctDNA-positiv waren und die ct-DNA auch nach der Behandlung nachweisbar war, ein erhöhtes Rückfallrisiko aufwiesen(19). Sirgavani et al. konnten in ctDNA von Patient*innen mit primärer oder erworbener Resistenz gegen EGFR-Inhibitoren Aberrationen in den Genen *KRAS*, *NRAS*, *MET*, *ERBB2*, *FLT3*, *EGFR* und *MAP2K1* identifizieren(20). Insgesamt zeigen serielle Bewertungen von ctDNA vielversprechende Ergebnisse für die frühzeitige Vorhersage von

Reaktionen und möglicher Resistenz gegenüber gezielter Therapie und Chemotherapie. Diese können herkömmliche bildgebende Studien und Tumormarker ergänzen(21).

Es wurden von der Food and Drug Administration (FDA) bereits Tests für die Detektion von Mutationen in der ctDNA genehmigt. Der cobas EGFR Mutation Test v2 kann bei Patient*innen mit Verdacht auf ein Nicht-kleinzelliges-Lungenkarzinom (NSCLC) zur Detektion von Deletionen im Exon 19 und der Substitution L858R im Exon 21 des EGFR-Gens verwendet werden. Mit diesem Kit können Patient*innen identifiziert werden, welche für eine Therapie mit TARCEVA (Erlotinib) in Frage kommen könnten(22). Die FDA genehmigte ebenfalls *Guardant360 liquid* und *FoundationOne liquid biopsy*, beides basierend auf NGS, als zusätzliches diagnostisches Mittel für das molekulare Profiling und die Identifizierung von Genvarianten für gezielte Therapien, was die Richtung einer Behandlung maßgeblich beeinflussen kann (21).

1.3.2. MRD

Die Minimal Residual Disease (MRD) bezieht sich auf Krebszellen, welche nach einer chirurgischen Behandlung oder einer Therapie im Körper von Patient*innen bestehen bleiben und nicht mit radiographischen oder histologischen/laborchemischen Methoden nachweisbar sind. Mit der Liquid Biopsy besteht die Möglichkeit solche Tumorzellen nachzuweisen, bevor dies mit bildgebenden Methoden möglich ist. Dadurch können frühzeitig Therapieentscheidungen getroffen werden(23). Eine Studie berichtet, dass ein Tumolvolumen von $0,034\text{cm}^3$ (entspricht ungefähr einem Durchmesser von 4mm) einer VAF von 0,00018% entspricht(24). Derzeit gibt es jedoch noch keine Plattformen für die ctDNA-Analyse, welche VAF wie diese detektieren können. Die Sensitivität und Spezifität der Methoden werden gesteigert, indem das molekulare Profil des Primärtumors mit dem der ctDNA kombiniert wird(25). Eine höhere Sensitivität kann ebenfalls durch eine gesteigerte Sequenziertiefe und mit Technologien der Fehlerminimierung während der Sequenzierung erreicht werden(26,27).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Patient*innen bei welchen nach einer Operation oder Behandlung ctDNA nachgewiesen werden konnte, das krankheitsfreie Überleben im Vergleich zu Patient*innen ohne nachweisbare ctDNA

signifikant reduziert ist. Durchschnittlich konnte durch die Liquid Biopsy ein Rückfall so zwischen 2 und 11 Monaten vor den durch bildgebende Methoden definierten Rückfall festgestellt werden(23,28).

1.3.3. Früherkennung

Ein mögliches Anwendungsgebiet der Liquid Biopsy ist die Früherkennung von Tumorerkrankungen noch bevor sie mit bildgebenden Methoden entdeckt werden können oder klinische Symptome auftreten. Es wurden bereits ultrasensitive Assays entwickelt, die unterschiedlichste Mutationen und CNVs nachweisen sollen, jedoch sind Assays durch die Anzahl an Varianten, welche detektiert werden können limitiert, was die Entdeckung eines unbekanntes Tumors erschwert. Die größte Herausforderung hierbei liegt in der großen Bandbreite an Aberrationen, die in einem Assay abgedeckt werden müssten. Da der Tumor unbekannter Entität ist und man sich somit nicht auf spezifische tumorrelevante Gene konzentrieren kann, kann nicht selektiv untersucht werden. Je mehr Gene in einem Kit abgedeckt werden sollen, desto weniger sensitiv ist die Methode(4). Neben der Sensitivität ist die Spezifität von Methoden zur Früherkennung von großer Bedeutung. Die Detektion von falsch-positiven Ergebnissen kann neben Kosten für die weitere Diagnosefindung auch Auswirkungen auf Patient*innen haben und Ängste auslösen(29). Trotz technischen Fortschritten, welche Liquid Biopsies deutlich sensitiver gemacht haben, werden auch Mutationen im Plasma von Patient*innen nachgewiesen, welche ihren Ursprung nicht in einem Tumor haben. Insbesondere bei alternden Menschen treten immer wieder Mutationen in Leukozyten auf, welche keinen malignen Geschehen zugrunde liegen und fälschlicherweise als Mutation der ctDNA interpretiert werden könnten(30). In einer Studie, die mit dem Oncomine™ Pan-Cancer Cell-Free Assay durchgeführt wurde, konnten in einer Kontrollgruppe ohne diagnostizierte Tumorerkrankung vermehrt Varianten in *TP53* nachgewiesen werden(31). Hier wird auf eine weitere Studie verwiesen, dass in cfDNA niederfrequente Mutationen in *TP53* detektiert werden können. Diese Mutationen stammen demnach aus Normalgewebe und häufen sich mit steigenden Alter(32). Laut Chen et al. waren Patient*innen mit detektierten *TP53*-Mutationen älter als 60 Jahre, was für eine klonale Mutation des Normalgewebes spricht und die Spezifität von Analysemethoden für die Liquid Biopsy-Diagnostik beeinflussen kann(31). Eine weitere Herausforderung bei der Interpretation von Varianten aus

Liquid Biopsy ist CHIP (clonal hematopoiesis of indeterminate potential), dabei handelt es sich um Mutationen, die in hämatopoetischen Stammzellen im steigenden Alter, jedoch ohne Symptome oder Malignität. Klonale Hematopoese (CH)-Mutationen können sich in den Genen *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* und *JAK2* finden, aber auch in Genen, die für solide Tumore relevant sind wie *KRAS*, *PIK3CA* und *EGFR*. Auch in *TP53* können vermehrt Mutationen einer CH vorkommen, 99% davon werden laut der COSMIC-Datenbank auch als somatische Mutationen solider Tumore genannt. CH-Mutationen, die bei Erstanalyse nicht als solche erkannt werden, könnten nach Therapie wieder erkannt werden und fälschlicherweise als MRD, als Therapiemisserfolg oder Progression interpretiert werden. Um dies zu verhindern wäre eine gleichzeitige Sequenzierung der Leukozyten und cfDNA ein Lösungsansatz(33).

Neben der Detektion von Mutationen in ctDNA gewinnt die Analyse des Methylierungsmusters der ctDNA immer mehr an Bedeutung. Hierbei wird die Methylierung von CpG-Inseln herangezogen, um den Ursprung von ctDNA zu ermitteln. Unterschiedliche Gewebearten und auch Zellen innerhalb eines Gewebes weisen demnach unterschiedliche Methylierungsmuster auf, welche beispielsweise durch Bisulfit-Sequenzierung analysiert werden und einem bestimmten Ursprungsgewebe zugeteilt werden können(12,34). Es wurden bereits einige Methylierungsbasierte Biomarker in Plasma untersucht und identifiziert. MYO1G wurde beispielsweise für das Screening von Hochrisikopatient*innen für kolorektale Karzinome in einer Studie untersucht(35). Eine weitere Studie von Pedersen et al. verwendete die beiden Biomarker BCAT1 und IKZF1 und konnte eine Sensitivität von 66% und eine Spezifität von 94% erreichen(36). Beide Studien konnten vielversprechende Ergebnisse bei Hochrisikopatient*innen für Colorektalkarzinome erzielen(37).

2. Problemstellung

Wie bereits erwähnt, hat die Analyse von ctDNA ihren Platz in der klinischen Routinediagnostik gefunden, so auch hier in der Klinik Favoriten (Wien).

Aktuell wird die Liquid Biopsy-Diagnostik hierorts mit unterschiedlichen Real-Time PCR Assays durchgeführt. Dabei erfolgt die Analyse von *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* unter Einsatz des Idylla Real-Time-PCR Systems, welches eine Detektion von

Allelfrequenzen bis zu 1% ermöglicht. Ebenso ist die Untersuchung von *EGFR* mithilfe des cobas z480 möglich, wobei auch hier eine Allelfrequenz von 1% detektiert werden kann. Diese Real-Time PCR Assays ermöglichen zwar den Nachweis einzelner Mutationen, können diese jedoch teilweise nicht eindeutig identifizieren.

Um das Spektrum der ctDNA-Analyse zu erweitern und Mutationen mit niedrigeren VAF detektieren zu können, wurde entschieden, die Liquid Biopsy-Diagnostik mithilfe von NGS zu etablieren. In Zukunft soll die Liquid Biopsy-Diagnostik konkret mithilfe des Oncomine Colon cfDNA Assay durchgeführt werden. Dieser Assay umfasst nicht nur *KRAS*, *BRAF*, *NRAS* und *EGFR*, sondern auch die Gene *AKT1*, *CTNNB1*, *ERBB2*, *FBXW7*, *GNAS*, *MAP2K1*, *PIK3CA*, *MAD4*, *TP53* sowie *APC*, die alle als relevant für das kolorektale Karzinom und andere Tumorentitäten gelten. Der Assay ermöglicht die Analyse von Single-Nucleotide Variations (SNVs) und kurzen Insertionen/Deletionen (Indels) in über 240 Hotspots dieser genannten Gene, wobei laut Hersteller eine Nachweisgrenze (LOD) von 0,1% erreicht werden kann. Hauptanwendungsbereich soll vor allem die Verlaufskontrolle von kolorektalen Karzinomen mit in der Biopsie detektierter verfolgbarer Variante sein, insbesondere nach geplanter kurativer Operation. Zusätzlich soll das Liquid Biopsy Panel bei weit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen, bei welchen eine biopistische Gewebsgewinnung nicht möglich ist, angewandt werden, um noch mögliche Targets für zielgerichtete Therapien zu identifizieren.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, den Oncomine Colon cfDNA Assay für die Routinediagnostik in der Molekularpathologie der Klinik Favoriten zu validieren. Um das Assay für die Routinediagnostik der Liquid Biopsy zu nutzen, sollten bei einer Allelfrequenz von 1% sowohl eine Sensitivität als auch eine Spezifität von jeweils 90% erreicht werden. Die Validierung erfolgt hauptsächlich unter Verwendung kommerziell erhältlichen Kontrollmaterials, um möglichst viele verschiedene Varianten in unterschiedlichen Allelfrequenzen zu testen. Zusätzlich werden Plasmaproben verwendet, um die Extraktion von zirkulierender freier DNA im Routinelabor zu testen. Zudem soll die tatsächliche VAF definiert werden, mit welcher Mutationen mit dem Oncomine Colon cfDNA Assay nachweisbar sind. Das Projekt zielt darauf ab, die ctDNA-Analyse mittels NGS in der Molekularpathologie zu etablieren und in den Routinebetrieb zu integrieren.

2.1. Forschungsfragen

Die vorliegende Studie fokussiert sich auf die Implementierung des Oncomine Colon cfDNA Assay mittels NGS in die Liquid Biopsy-Diagnostik der Molekularpathologie der Klinik Favoriten. Im Zuge dessen wurden zwei Forschungsfragen formuliert:

- Welche Ergebnisse bezüglich der Detektion (Sensitivität, Spezifität, Richtigkeit) der im Oncomine Colon cfDNA Assay enthaltenen Genabschnitte können erzielt werden?
- Mit welcher Allelfrequenz (Limit of Detection) können im Oncomine Colon cfDNA Assay enthaltenen Genabschnitte nachgewiesen werden?

2.2. Hypothesen

Aus den ersten Fragestellungen ergeben sich folgende Hypothesen:

Erste Hypothese:

- H0: Die Detektion von Varianten mit einer Allelfrequenz von 1% weist eine Spezifität unter 90% auf.
- H1: Die Detektion von Varianten mit einer Allelfrequenz von 1% weist eine Spezifität mehr als 90% auf.

Zweite Hypothese:

- H0: Die Detektion von Varianten mit einer Allelfrequenz von 1% weist eine Sensitivität unter 90% auf.
- H1: Die Detektion von Varianten mit einer Allelfrequenz von 1% weist eine Sensitivität mehr als 90% auf.

3. Material und Methoden

Das Ziel dieser Masterarbeit ist es, die Liquid-Biopsy-Diagnostik in der Klinik Favoriten mittels NGS zu validieren. Hierfür werden sowohl Plasmaproben von Patient*innen als auch käuflich erworbene Referenzkontrollen mittels des amplikonbasierten Oncomine Colon cfDNA Assays unter Verwendung der Ion Torrent-Technologie sequenziert. Die erzielten Ergebnisse werden mit den bereits vorhandenen Untersuchungsergebnissen sowie den Angaben des Herstellers verglichen. Zu Beginn wurden Kriterien für die Auswahl der Proben und die Definition der Validierungsläufe festgelegt:

- Für die Validierung sollten Proben herangezogen werden, welche bereits mithilfe von Sanger-Sequenzierung (extern gekaufte Kontrollen) analysiert wurden. Auch Proben, die mit anderen Methoden untersucht wurden (interne Proben, welche mit Real-Time-PCR analysiert wurden), können verwendet werden.
- Eine große Anzahl unterschiedlicher Varianten sollte für die Testung herangezogen werden.
- Proben sollten eine möglichst große Anzahl unterschiedlicher bestätigter Varianten (SNVs, Indels) enthalten.
- Mindestens eine Intra-Run- und eine Inter-Run-Wiederholung von Proben sollte durchgeführt werden.
- Alle Replikate sollten ab dem Beginn des Experimentes durchgeführt werden und nicht von einzelnen Schritten ausgehend.

3.1. Probenauswahl

Die Testung erfolgt vorwiegend anhand von gekauften Referenzkontrollen, wobei auch Patient*innenproben verwendet werden, die bereits in der Routinediagnostik auf Wunsch der Onkologie mittels Liquid-Biopsy-Testung (Real-Time PCR, NGS) untersucht wurden. Die verwendeten Patient*innenproben werden pseudoanonymisiert.

3.1.1. Referenzproben

Für die Validierung werden fünf kommerziell erhältliche Kontrollen verwendet, sowohl von der Firma SeraCare als auch von Horizon Discovery (HD). Vereinbart wird die Verwendung von bereits isolierter cfDNA als Referenzproben, um die Limit of Detection (LOD) ohne mögliche Einflüsse der DNA-Isolierung zu testen.

Von SeraCare wird Seraseq ctDNA Mutation Mix v2 verwendet, wobei diese mit drei unterschiedlichen Allelfrequenzen (AF) für die Testung herangezogen wird, um die LOD zu ermitteln (0,125%, 0,5% und 1% AF). Die enthaltene DNA stammt aus der Referenzzelllinie GM24385 und enthält zusätzlich DNA-Fragmente mit den entsprechenden Varianten, welche in der gewünschten AF zugefügt wurden. Die DNA ist so prozessiert, dass sie eine Basenpaarlänge von 170 bp aufweist und somit einer cfDNA ähnelt. Die in den Kontrollen enthaltenen Varianten wurden ursprünglich mittels dPCR nachgewiesen. Laut Hersteller kann nicht

ausgeschlossen werden, dass Varianten gefunden werden, die nicht in der Gebrauchsanweisung angeführt sind, diese würden jedoch abweichende Allelfrequenzen im Vergleich zur vorgegebenen aufweisen. Seraseq ctDNA Mutation Mix v2 enthält neben einer großen Anzahl an Substitutionen auch Insertionen und Deletionen, wobei mit dem Oncomine Colon cfDNA Assay nur die in Tabelle 1 angeführten Varianten nachgewiesen werden können (38).

Tabelle 1: Varianten, die in Seraseq ctDNA Mutation Mix v2 enthalten sind und mit dem Oncomine Colon cfDNA Assay detektiert werden können(30)

Gen ID	Aminosäurenaustausch
<i>AKT1</i>	p.E17K
<i>APC</i>	p.1450*
<i>APC</i>	p.T1566fs*3
<i>BRAF</i>	p.V600E
<i>CTNNB1</i>	p.T41A
<i>ERBB2</i>	p.A775_G776ins YVMA
<i>GNAS</i>	p.R201C
<i>KRAS</i>	p.G12D
<i>NRAS</i>	p.Q61R
<i>PIK3CA</i>	p.E545K
<i>PIK3CA</i>	p.H1047R
<i>TP53</i>	p.R175H
<i>TP53</i>	p.R273H
<i>TP53</i>	p.R248Q

Neben den Kontrollen von SeraCare kommt ebenfalls bereits isoliertes cfDNA-Referenzmaterial von Horizon Discovery zum Einsatz (HD 780). Hierbei handelt es sich um ein Set aus mehreren Kontrollen mit unterschiedlichen Allelfrequenzen, wobei diese mit 0,1% und 1% AF verwendet wird. Der Multiplex cfDNA-Referenzstandard besteht aus DNA mehrerer Zelllinien, die gentechnisch verändert und auf eine durchschnittliche Basenpaarlänge von 160 bp prozessiert wurden. Die ursprüngliche Detektion der in der Kontrolle enthaltenen Varianten erfolgte mit Whole Exome Sequencing und die anschließende Bestimmung der Allelfrequenz der einzelnen Referenzstandards durch ddPCR (39). In Tabelle 2 sind die Varianten ersichtlich, die in der Referenzprobe HD 780 enthalten sind und mit dem Oncomine Colon cfDNA Assay nachgewiesen werden können. Horizon Discovery stellt das Whole Exome Sequencing File zur Verfügung, mit welchem zusätzlich gefundene Varianten abgeglichen werden können.

Tabelle 2: Varianten, die in den Referenzstandards HD 780 enthalten sind und mit dem Oncomine Colon cfDNA Assay detektiert werden können(39)

Gen ID	Aminosäurenaustausch
<i>BRAF</i>	p.V600E
<i>NRAS</i>	p.Q61K
<i>KRAS</i>	p.G12D
<i>PIK3CA</i>	p.E545K
<i>PIK3CA</i>	p.H1047R

3.1.2. Patient*innenproben

Neben dem kommerziell erhältlichen Referenzmaterial werden auch Plasmaproben von Patient*innen verwendet, welche im Rahmen der Routinediagnostik auf Wunsch der Onkologie mittels Liquid-Biopsy-Untersuchungen (bereits etablierte Methode der Real-Time-PCR) analysiert werden sollen. Die Auswahl der Proben sowie die detektierten Varianten sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Ausgewählte Plasmaproben von Patient*innen und die darin detektierten Varianten

Probe	Gen	Aminosäurenaustausch
#1	NRAS	p.Q61X
#2	KRAS	p.Q61H
#3	NRAS	p.Q61X
#4	Wildtyp	-
#5	KRAS	p.G12F

3.2. cfDNA Isolierung, Quantifizierung und Qualitätsüberprüfung

Die Blutabnahme für die Liquid Biopsy-Diagnostik von Patient*innen erfolgt mit Cell-Free DNA Collection Tubes von der Firma Roche. Nachfolgend werden die Proben bei Raumtemperatur in die Molekularpathologie gebracht, wo zwei Zentrifugationsschritte durchgeführt werden. Zuerst wird das Tube bei 2000g für 10 Minuten zentrifugiert, das Plasma anschließend in ein 15ml Falcon Tube pipettiert und erneut für 10 Minuten bei 2000g zentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich keine Zellbestandteile mehr im Plasma befindet. Der Überstand wird bei -20°C bis zur Isolierung der cfDNA gelagert.

Die Isolierung der cfDNA aus den Plasmaproben erfolgt unter Verwendung des Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega) am Maxwell® CSC 48 Gerät. Dieses halb-automatisierte Kartuschensystem basiert auf paramagnetischen Beads. An diese bindet die cfDNA und wird durch die Kartusche bewegt, gewaschen und schließlich in einem Elutionspuffer eluiert. Für die Aufreinigung wird ein Milliliter des gesammelten Plasmas als Input verwendet und die cfDNA wurde in 60µl eluiert(40).

Die Messung der DNA-Konzentration der für die Tests vorgesehenen Proben erfolgt mithilfe des Qubit 4 Fluorometers von ThermoFisher Scientific, wobei das Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit verwendet wird. Die spezifische Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzfarbstoffe, welche an doppelsträngige DNA binden(41).

Wie bereits zuvor erwähnt liegt die durchschnittliche Basenpaarlänge einer cfDNA zwischen 70 und 200 bp. Um sicherzustellen, dass tatsächlich cfDNA amplifiziert und sequenziert wird, und nicht genomische DNA, wird eine automatisierte Elektrophorese durchgeführt. Das Cell-free DNA ScreenTape Assay ermöglicht nicht nur die Größenbestimmung der enthaltenen cfDNA, sondern auch eine Quantifizierung und eine Bewertung der DNA-Qualität. Der erhaltene %cfDNA-Score lieferte den Prozentsatz der cfDNA im Vergleich zur genomischen DNA-Kontamination. Aufgrund der Ergebnisse wird Probe #3 aus der Testung ausgeschlossen, da sie einen zu geringem %cfDNA-Score aufwies und eine mögliche genomische DNA-Kontamination die Analyse beeinträchtigen würde. Die Probe #3 wurde durch Probe #6 ersetzt.

Tabelle 4 Detektierte Variante in Probe #6

Nummer	Genname	Aminosäureaustausch
#6	<i>NRAS</i>	p.Q61L

Die Ergebnisse der automatisierten Gelelektrophorese werden im Kapitel Ergebnisse zusammengefasst und veranschaulicht.

3.3. Teststrategie

Basierend auf den zuvor genannten Kriterien wird eine Teststrategie entworfen. Um eine bessere Sequenziertiefe in den ersten Läufen zu erreichen, wurde entschieden, statt sechs Proben mit dem Ion 530 Chip nur je vier gleichzeitig zu sequenzieren. Insgesamt werden drei Validierungsläufe mit vier Proben und einer mit sechs Proben durchgeführt. Es werden insgesamt 18 Sequenzierungen durchgeführt, sechs Proben werden in unterschiedlichen Sequenzierläufen wiederholt, um die Inter-Assay-Variabilität zu testen und zwei Proben werden für die Intra-Assay-Testung im Doppelansatz im selben Sequenzierlauf analysiert. Sowohl die Inter- als auch die Intra-Assay-Testung sollen stets von Beginn an wiederholt bzw. im Doppelansatz durchgeführt werden.

Tabelle 5 zeigt die geplante Durchführung der Validierungsläufe und in den Kommentaren ist vermerkt, ob es sich um eine Inter- oder Intra-Assay-Testung handelt.

Tabelle 5: Teststrategie

RUN 1		
Tag Sequencing Barcode	Probennummer/Kontrolle	Kommentar
1	HD780 1% AF	
2	HD780 0,1% AF	
3	Seraseq™ ctDNA Mutation Mix v2 (AF 0.125%)	
4	Seraseq™ ctDNA Mutation Mix v2 (AF 0.5%)	
RUN 2		
1	HD780 0,1% AF	Inter-run
2	Seraseq™ ctDNA Mutation Mix v2 (AF 0.125%)	Inter-run
3	HD780 1% AF	Inter-run
4	Seraseq™ ctDNA Mutation Mix v2 (AF 1%)	
RUN 3		
1	Seraseq™ ctDNA Mutation Mix v2 (AF 0.5%)	Intra-run
2	Seraseq™ ctDNA Mutation Mix v2 (AF 0.5%)	Inter-run
3	Probe #1	
4	Probe #2	
RUN 4		
1	Probe #1	Inter-run
2	Probe #2	Inter-run
3	Probe #4	
4	Probe #4	Intra-run
5	Probe #5	
6	Probe #6	

3.4. Analyse der cfDNA durch Targeted NGS

Die Mutationsanalysen der cfDNA wurde mithilfe des OncoPrint Colon cfDNA Assay mit dem Ion GeneStudio™ S5 System durchgeführt. Dieser Assay ist ein gezieltes NGS-Panel, das Gene mit über 240 Hotspots umfasst. Diese Hotspots sind in Coloncancer und anderen Tumorentitäten von Bedeutung. Der OncoPrint Colon cfDNA Assay ermöglicht nicht nur den Nachweis von Single Nucleotide Variants (SNV), sondern auch von kurzen Insertionen und Deletionen (Indels). Jedoch handelt es sich hier um ein Hotspot-only Assay, was nur die Detektion von Mutationen in den Hotspots erlaubt, welche im BED-File hinterlegt sind. Die Detektion von de-novo Mutationen ist nicht möglich. Gemäß den Angaben des Herstellers soll eine Limit of Detection von 0,1% erreicht werden können(42). In Tabelle 6 sind jene Gene aufgelistet, in welchen sich die Hotspotregionen, die mit diesem Assay detektiert werden können, befinden.

Tabelle 6: In OncoPrint Colon cfDNA Assay enthaltene Gene

Gennamen	
<i>AKT1</i>	<i>KRAS</i>
<i>BRAF</i>	<i>MAP2K1</i>
<i>CTNNB1</i>	<i>NRAS</i>
<i>EGFR</i>	<i>PIK3CA</i>
<i>ERBB2</i>	<i>MAD4</i>
<i>FBXW7</i>	<i>TP53</i>
<i>GNAS</i>	<i>APC</i>

3.4.1. Library Preparation

Das Assay wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt, wobei je nach Verfügbarkeit 50 ng DNA als Input verwendet wurden. Der Workflow besteht aus zwei Amplifikations- und drei Aufreinigungsschritten. Während der ersten Multiplex-

Touchdown-PCR werden die für das Panel spezifischen Targets amplifiziert und sogenannte Unique Molecular Identifiers (UMI) eingebaut. Jedes ursprüngliche DNA-Fragment wird vor der Amplifikation mit einem UMI versehen, was zur Bildung von Molekülfamilien während der Amplifikation führt.

Die resultierenden markierten Amplicons werden mit magnetischen Beads (AMPure™ XP reagent) aufgereinigt. Im anschließenden zweiten PCR-Schritt werden die aufgereinigten Amplicons erneut amplifiziert und mit probenspezifischen Barcodes (Tag Sequencing Barcode Set 1-24) versehen. Danach erfolgten eine weitere Aufreinigung und die Größenselektion der Library. Die fertige Library wird 1:1000 verdünnt, mittels qPCR (Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit) quantifiziert, auf 50 pM verdünnt, gepoolt und für die klonale Amplifikation und Chip-Beladung verwendet. Abbildung 7 zeigt den Ablauf der Library-Vorbereitung zusammengefasst, es sind auch ungefähre Zeitangaben zu sehen, wie lange für die einzelnen Schritte benötigt wird.



Abbildung 7: Schritte der Library-Vorbereitung. Die Zeitangaben enthalten alle Pipettierschritte und Inkubationszeiten, sowie die Amplifikation mittels PCR. Bis zur fertigen Library werden ungefähr 3 Stunden benötigt, die anschließende qPCR zur Quantifizierung und die dazugehörigen Pipettierschritte dauern weitere 2 Stunden. Erstellt mit BioRender.com

3.4.2. Sequenzierung

Die klonale Amplifikation der Library auf einem Halbleiterchip durch Emulsions-PCR erfolgt am IonChef Instrument. Ein Ion 530™ Chip kann mit sechs Proben beladen werden, was die Sequenzierung von sechs Proben gleichzeitig ermöglicht. Nach der Chip-Beladung wird der Ion 530™ Chip sequenziert. Die Sequenzierung erfolgt am Ion GeneStudio™ S5 System und basiert auf der Ion Torrent-Technologie.

Für die Chip-Beladung und anschließende Sequenzierung wird das Ion 520™ & Ion 530™ Kit und das vorgefertigte Template "Oncomine Colon Liquid Biopsy DNA" verwendet, wobei die Read Length auf 200 bp und die 500 Flows bereits voreingestellt waren.

3.4.3. Datenanalyse

Die Datenanalyse erfolgt mithilfe zweier Softwareprogramme. Die Rohdaten, die während des Sequenzierens auf dem Ion GeneStudio™ S5 System generiert werden, werden von der Torrent Suite Software (Version 5.18.1) verarbeitet, hierbei erfolgt das Basecalling und das Alignment, wobei hg19 als Referenzgenom dient. In dem von der Software generierten Bericht werden statistische Daten zur Sequenzierung und Qualitätsparameter veranschaulicht. Einen Auszug aus diesem ist anschließend in Abbildung 8 zu sehen. Es werden pro Probe die Gesamtzahl an Basen, Anzahl der Basen welche mit mindestens Q20 bewertet sind, die Gesamtanzahl der Reads und die durchschnittliche Länge der Reads angegeben.

Barcode Name	Sample	Bases	>=Q20 Bases	Reads	Mean Read Length
No barcode	None	27,330,853	23,960,100	217,813	125 bp
TagSequencing_7		1,400	1,380	21	66 bp
TagSequencing_8		805,948,074	779,049,350	8,930,882	90 bp
TagSequencing_9		319,309,899	309,010,462	4,075,983	78 bp
TagSequencing_10		222,896,338	215,410,817	3,563,974	62 bp
TagSequencing_11		365,078,238	352,348,493	4,061,757	89 bp
TagSequencing_12		380,377,097	349,934,674	4,047,612	89 bp

Navigation: 10 items per page

Abbildung 8: Auszug aus dem Torrent-Suite Report eines Validierungslaufs

Die in der Torrent Suite Software generierten BAM-Dateien werden automatisch in die IonReporter Software (Version 5.18) hochgeladen und mit dem standardmäßigen OncoPrint Colon Liquid Biopsy-w1.6-Workflow verarbeitet. Hierbei erfolgen eine Qualitätskontrolle, die Variantenanalyse und die Annotation der gefundenen Varianten. Diese Informationen werden in einem Report, wie in folgender Abbildung 9 zu sehen, zusammengefasst.

Ion Reporter

Home | Samples | Analysis | Workflows | Admin

Overview | Launch | My Variants

Analysis Results

Analysis Name: **LOD** | Oncogene: **Chromatin** | Population: **Pharmacogenomics** | QC

Median Read Coverage: 70463 | Median Molecular Coverage: 5277 | Limits of Detection %: 0.0583 - 0.0744

Classification	Locus	Amino Acid Change	Raw Read Depth	Mol Depth	WT Mol Counts	Alt Allele Mol Counts	Mol Freq %	Detection Limit %	Oncogene Gene Class
Unclassified	chr17:7575406	p.R175H	56228	6201	8190	0.11	0.0080	0.1774	Loss-of-Function

1 - 1 of 1 items

20 items per page

Analysis Information

Ion Reporter Version 5.16

Launched by Ion User

Launched on January 4, 2024 07:06 PM

Abbildung 9: Report eines Validierungslaufs der IonReporter Software

Die Qualitätsparameter Median Read Coverage, Median Molecular Coverage und Limits of Detection % stehen in direktem Zusammenhang mit der Sensitivität, welche für die einzelne Probe erreicht werden konnte. Die Median Read Coverage bezieht sich auf die durchschnittliche Anzahl von Sequenzierungsreads, die an einer bestimmten Position im Genom vorhanden ist. Eine hohe Read-Coverage an einer Position im Genom deutet darauf hin, dass diese Region gut abgedeckt und sequenziert wurde. Die Median Molecular Coverage bezieht sich auf die durchschnittliche Anzahl von DNA-Molekülen, die an einer bestimmten Position im Genom vorhanden sind. Im Gegensatz zur Median Read Coverage basiert sie auf der Anzahl der einzelnen DNA-Moleküle, die diese Position abdeckt. Für jede gefundene Variante wird ein Detection Limit aus der Molecular Amplicon Coverage berechnet und daraus wiederum die Limit of Detection %. Die Limit of Detection wird mit zwei Werten angegeben, z.B. 0,0583 – 0,0744. Der erste Wert 0,0583 ist der Median der Limit of Detection von allen Variante auf das gesamte Target gesehen. Der zweite Wert repräsentiert die 80. Perzentile. Damit die laut Hersteller angegebene Limit of Detection von 0,1% erreicht werden kann, muss die Median Read Coverage mehr als 25000, die Median Molecular Coverage mehr als 2500 erreichen und beide Werte der Limit of Detection unter 0,1 liegen(43). Wie in der Abbildung 9 zu sehen, wird eine Variante mit den in folgender Tabelle aufgelisteten Informationen angegeben. In Tabelle 7 werden die Begriffe erläutert:

Tabelle 7: Begriffserklärung aus der Ion Reporter Software(43)

Abkürzung	Erklärung
Gene	Das Gen, in welchem die Variante gefunden wurde
Amino Acid Change	HGVS Nomenklatur der gefundenen Variante
Raw Read Depth	Anzahl an Reads, welche die Variante abdecken
Mol Depth	Anzahl an DNA-Molekülen, welche die Region in der die Variante liegt abdecken
WT Mol Count	Anzahl der DNA-Moleküle, welche das Wildtypallel tragen

Alt Allele Mol Count	Anzahl der DNA-Moleküle, welche die Variante tragen
Mol Freq%	Alt Allele Mol Count in Prozent
Detection Limit %	Geringste VAF, die für diese Variante detektiert werden kann
Oncomine Gene Classification	Funktionelle Annotation des Gens, in welchem die Variante gefunden wurde

Damit eine Variante detektiert wird, muss sie einen Alt Allele Mol Count von mindestens zwei aufweisen und eine molekulare Frequenz (Mol. Freq.) von mindestens 0,05.% Jedoch muss die VAF über dem für diese Position definiertem Detection Limit liegen, damit sie auch im Report als Variante zu sehen ist(42).

3.5. Referenzmethoden

Die Ergebnisse der Patient*innenproben der Validierungsläufe werden mit den Ergebnissen der Referenzmethoden verglichen, welche in der Molekularpathologie der Klinik Favoriten bzw. der Molekularpathologie der Klinik Ottakring im Zuge der Routinediagnostik bei Anforderung der Onkologie für Liquid Biopsy Diagnostik durchgeführt wurden.

In der Molekularpathologie der Klinik Favoriten werden *KRAS*, *BRAF* und *NRAS* mit Real-Time PCR durchgeführt. Es erfolgt eine manuelle cfDNA-Isolierung mit anschließender Real-Time-PCR am Cobas z480 Analyzer mit dem *KRAS* Mutation Test v2 (LSR) bzw. dem *BRAF/NRAS* Mutation Test (LSR). Proben aus der Molekularpathologie Klinik Ottakring wurden bereits mittels NGS getestet, jedoch wurde das Oncomine Precision Assay verwendet, welches abweichende Hotspotregionen in anderen Genen abdeckt.

Tabelle 8: Patient*innen Proben und die zuvor durchgeführten Referenzmethoden

Probe	Referenzmethode
#1	Oncomine Precision Assay
#2	Oncomine Precision Assay
#4	ctKRAS Mutation Assay BRAF/NRAS Mutation Test (LSR)
#5	ctKRAS Mutation Assay BRAF/NRAS Mutation Test (LSR)
#6	ctKRAS Mutation Assay BRAF/NRAS Mutation Test (LSR)

3.6. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Validierungsläufe werden mit Vier-Felder-Tabellen dargestellt, und Sensitivität, Spezifität, Positiv Prädiktiver Wert (PPV), Negativ Prädiktiver Wert (NPV) und diagnostische Genauigkeit werden mithilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism ausgehend der Vier-Felder-Tabelle berechnet. Für die Berechnung werden 23 Varianten herangezogen, welche in allen für die Validierung verwendeten Proben untersucht wurden. Um die Limit of Detection zu definieren werden die Ergebnisse der Referenzproben mit 0,1%, 0,5% und 1% AF separat berechnet. Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV werden anschließend gegenübergestellt. Die Erstellung der Boxplots und Balkendiagramme erfolgt ebenfalls mit GraphPad Prism.

4. Ergebnisse

Die Validierung des Oncomine Colon cfDNA Assays wird anhand von insgesamt zehn Proben durchgeführt, wobei für jede Probe 23 verschiedene Hotspot-SNVs untersucht wurden. Fünf der analysierten Proben sind kommerziell erhältliches Referenzmaterial, während die übrigen fünf Proben von Patient*innen stammten.

Die untersuchten Hotspots wurden aus den Varianten zusammengesetzt, die gemäß der Referenzmethode bzw. den Herstellerangaben in den einzelnen Proben gefunden werden sollten.

Die Ergebnisse der automatisierten Elektrophorese mittels Tapestation werden zunächst visualisiert und anschließend zusammengefasst dargestellt. Danach erfolgt die statistische Auswertung der Sequenziererergebnisse. Neben der Analyse der Gesamtergebnisse wurden sämtliche Parameter auch für die Allelfrequenzen 0,1%, 0,5% und 1% berechnet, um die tatsächliche Nachweisgrenze (LOD) zu bestimmen. Zusätzlich wird die Inter- und Intra-Assay-Variabilität berechnet.

4.1. Ergebnisse der Tapestation

Die Ergebnisse der Tapestation für die sechs ausgewählten Patient*innenproben werden in diesem Abschnitt präsentiert. In den Abbildungen 10 bis 15 sind die Elektropherogramme der Tapestation zu sehen, hier ist die Größenverteilung der in der Probe enthaltenen DNA-Fragmente dargestellt. Gefolgt von einer Zusammenfassung der Ergebnisse in einer Tabelle, einschließlich der Konzentration in ng/µl und des Gehalts an cfDNA in Prozent.

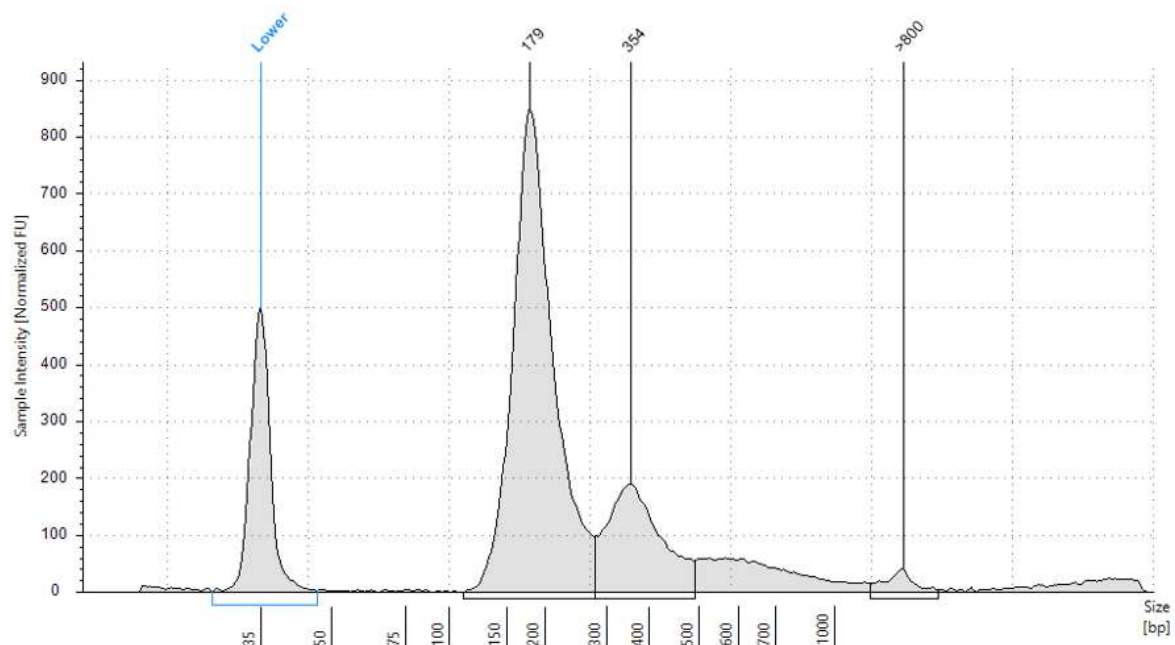


Abbildung 10: Elektropherogramm der Probe #1

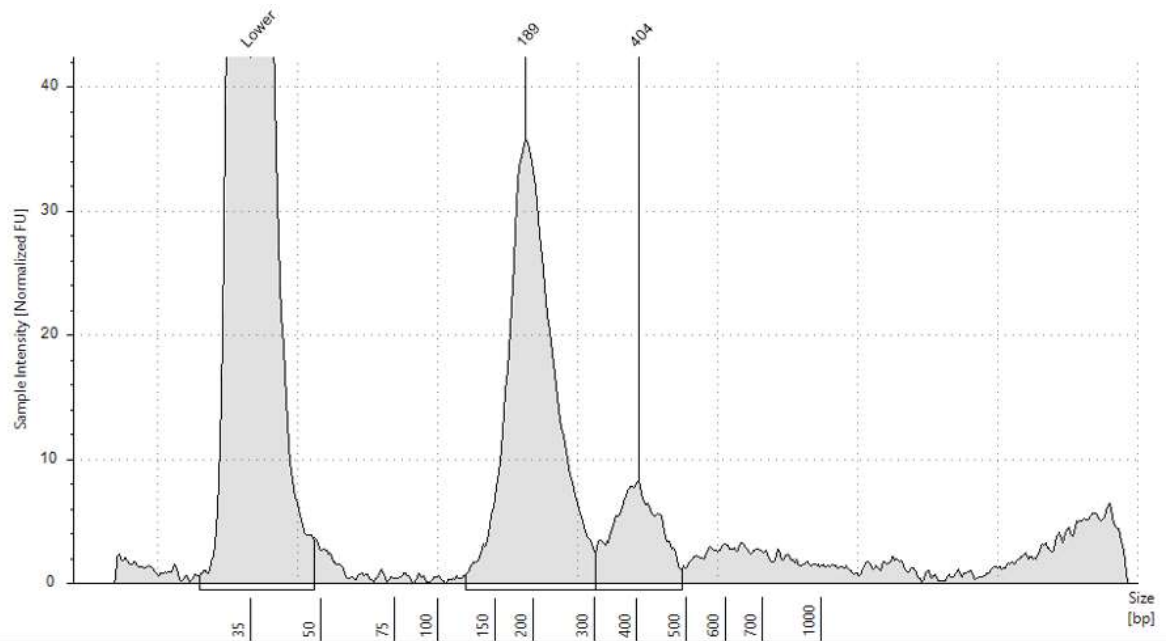


Abbildung 11: Elektropherogramm der Probe #2

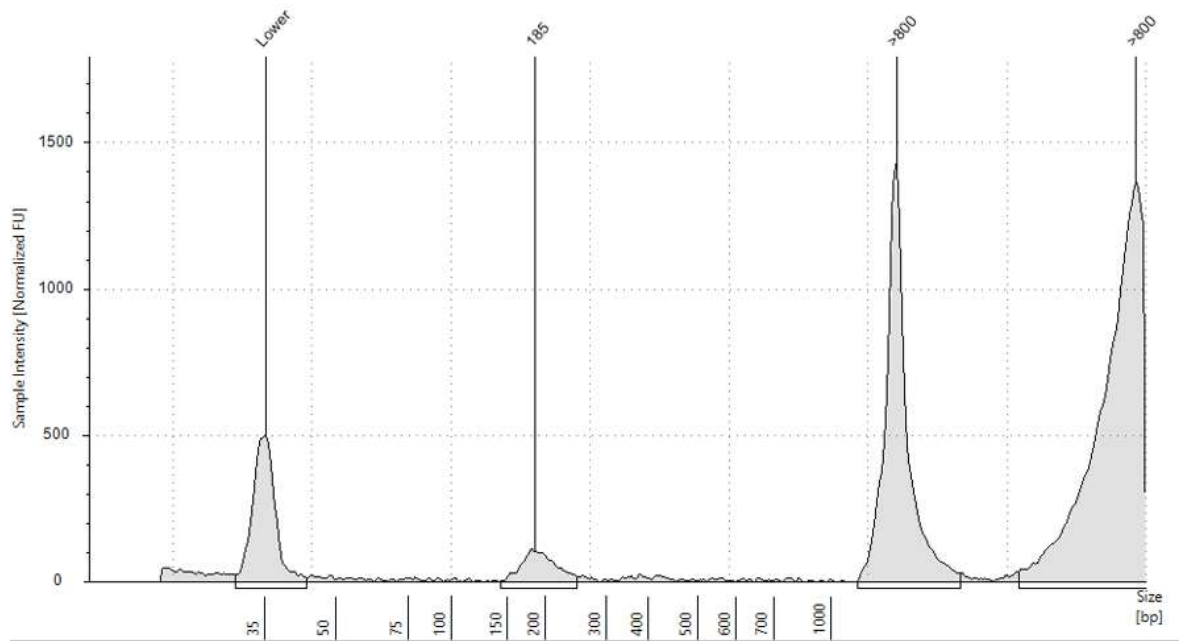


Abbildung 12: Elektropherogramm der Probe #3

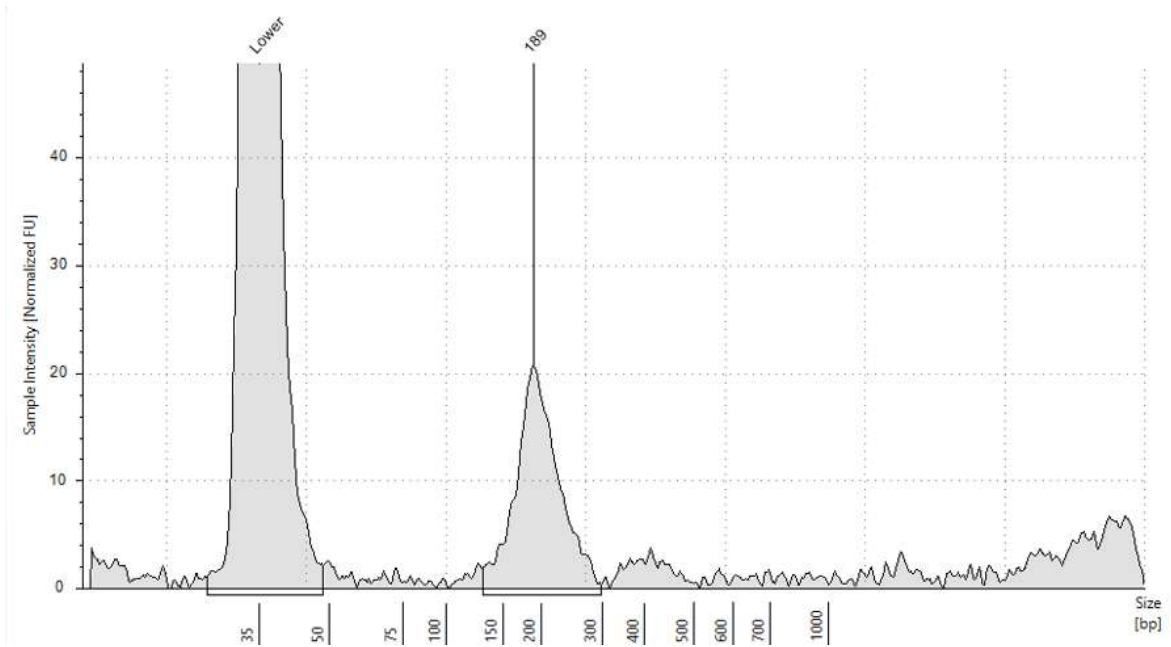


Abbildung 13: Elektropherogramm der Probe #4

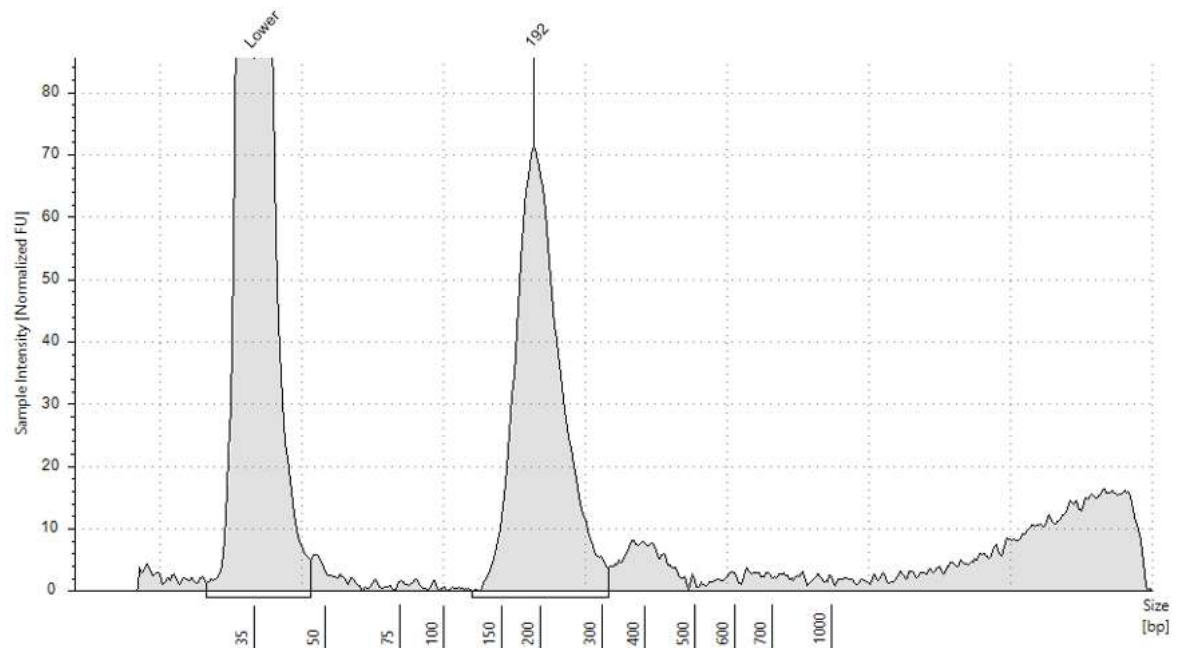


Abbildung 14: Elektropherogramm der Probe #5

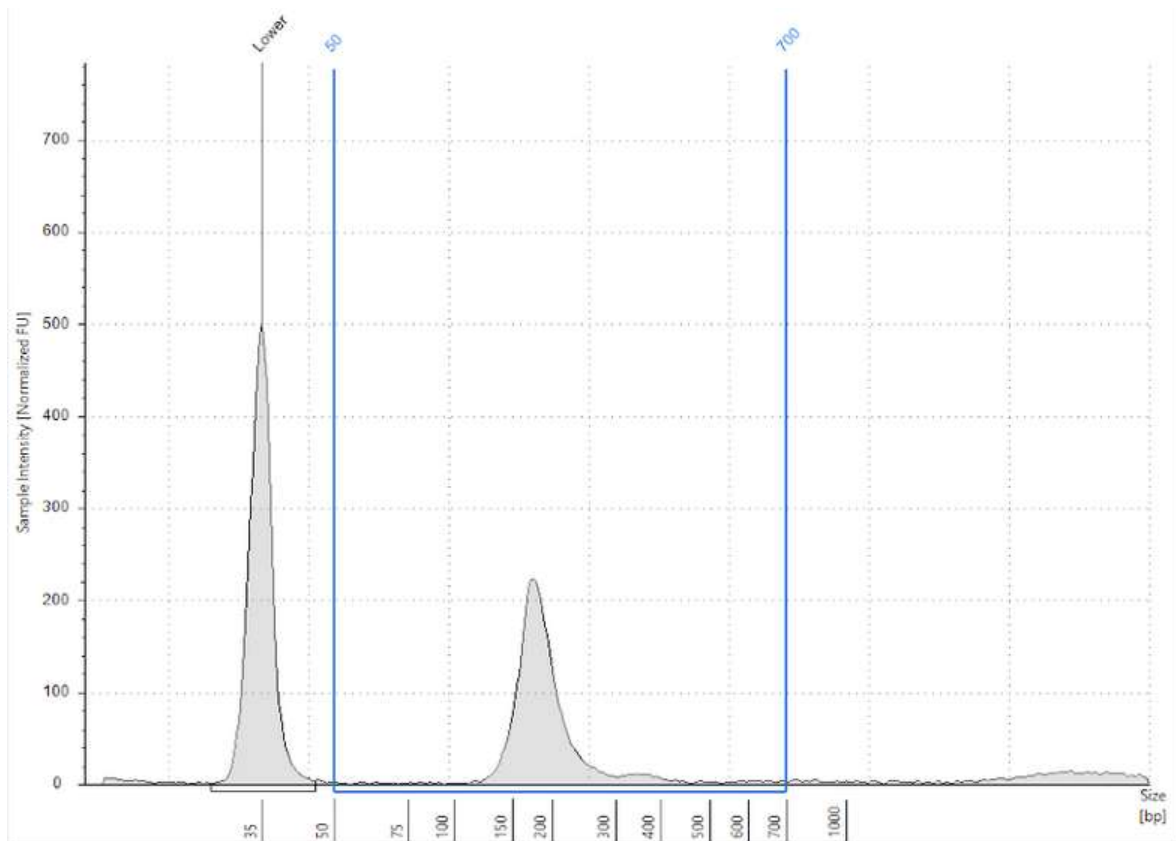


Abbildung 15: Elektropherogramm der Probe #6

Tabelle 9: Konzentration der cfDNAs und Anteil der cfDNA in Prozent

Probe	Konzentration in ng/μl	%cfDNA
#1	1,48	91
#2	0,0671	79
#3	2,22	5
#4	0,0468	-
#5	0,143	65
#6	0,226	80,3

4.2. Qualitätsparameter der Sequenzierungen

In Tabelle 10 sind die Qualitätsparameter Limit of Detection %, Median Molecular Coverage und Median Read Coverage von allen sequenzierten Ansätzen aufgelistet, die ausschlaggebend für die LOD sind.

Tabelle 10: Qualitätsparameter der sequenzierten Proben.

Probe	Limits of Detection %	Median Molecular Coverage	Median Read Coverage
HD 780 1%	0.0578 - 0.0753	5642	110289
	0.0582 - 0.0742	6137	160849
HD 780 0,1%	0.0635 - 0.0911	4716	93057
	0.0682 - 0.0999	4389	88205
SeraSeq 0,125%	0.0591 - 0.0621	7833	107501
	0.0591 - 0.0593	9333	107566
SeraSeq 0,5%	0.0590 - 0.0593	7724	111362
	0.0589 - 0.0593	7126	129604
	0.0588 - 0.0593	7639	132134
SeraSeq 1%	0.0586 - 0.0593	6826	115373
Probe #1	0.0740 - 0.1002	4045	60335
Probe #2	0.5671 - 0.7151	527	45768
	0.4853 - 0.5686	616	85847
Probe #4	2.2771 - 2.7580	130	27713
	2.2345 - 2.9594	133	6745
Probe #5	0.4527 - 0.5677	660	86141
	0.5319 - 0.6613	562	25841
Probe #6	0.5033 - 0.6584	594	62146

4.3. Statistische Auswertung der Validierung

In diesem Kapitel erfolgt die statistische Auswertung der Validierung. Zunächst werden alle erhobenen Daten unabhängig von der Allelfrequenz verwendet, um Sensitivität, Spezifität, Diagnostische Genauigkeit, PPV und NPV zu berechnen, sowie das 95%-Konfidenzintervall der Parameter. Danach erfolgt die Berechnung derselben Werte für Daten aus Referenzmaterial mit laut Hersteller angegebener Allelfrequenz von 0,1%, 0,5% und 1%. Diese Werte werden am Ende des Kapitels mithilfe von Boxplots miteinander verglichen.

Die Ergebnisse werden durch eine Vier-Felder-Tabelle und Balkendiagramme veranschaulicht, wobei die Abkürzungen TP (True Positive), TN (True Negative), FP (False Positive) oder FN (False Negative) verwendet werden. Diese werden wie folgt definiert:

Tabelle 11: Beispiel für eine Kreuztabelle, wie sie später für die Datenveranschaulichung verwendet wird

		Referenzmethode	
		positiv	negativ
Test	positiv	TP	FP
	negativ	FN	TN

4.3.1. Gesamtergebnisse

Es wurden Daten aus vier Sequenzierläufen mit insgesamt 18 sequenzierten Ansätzen aus 10 unterschiedlichen Proben erhoben. Die Ergebnisse von 23 verschiedenen Varianten wurden mit den jeweiligen Referenzmethoden bzw. den Angaben der Referenzmaterial-Hersteller verglichen.

Von den 18 sequenzierten Ansätzen handelte es sich dreimal um einen Doppelansatz im selben Sequenzierlauf zur Überprüfung der Intra-Assay-Variabilität. Sechs Ansätze waren Wiederholungen von Sequenzierungen in unterschiedlichen Sequenzierläufen, um die Inter-Assay-Variabilität zu testen.

Somit wurden insgesamt 414 Variantenergebnisse für die Berechnung herangezogen.

Die Daten wurden in einem Excel-File gesammelt und sind im Anhang zu finden. Eine Veranschaulichung erfolgt in der folgenden Vier-Felder-Tabelle.

Tabelle 12: Kreuztabelle zur Gegenüberstellung des Oncomine Colon cfDNA Assays und der Referenzmethoden

		Referenzmethode		
		positiv	negativ	Summe
Oncomine Colon cfDNA Assay	positiv	98	3	101
	negativ	12	301	313
Summe		110	304	414

Von den 414 Ergebnissen gelten 98 als TP, 301 als TN, 12 als FN und 3 als FP-Ergebnisse.

Ausgehend der Daten aus der Vier-Felder-Tafel wurde Folgendes berechnet:

- Sensitivität: 89,09% [81,90; 93,65]
- Spezifität: 99,01% [97,14; 99,73]
- PPV: 97,03% [91,63; 99,19]
- NPV: 96,17% [93,42; 97,79]
- Diagnostische Genauigkeit: 96,38% [94,09; 97,96]

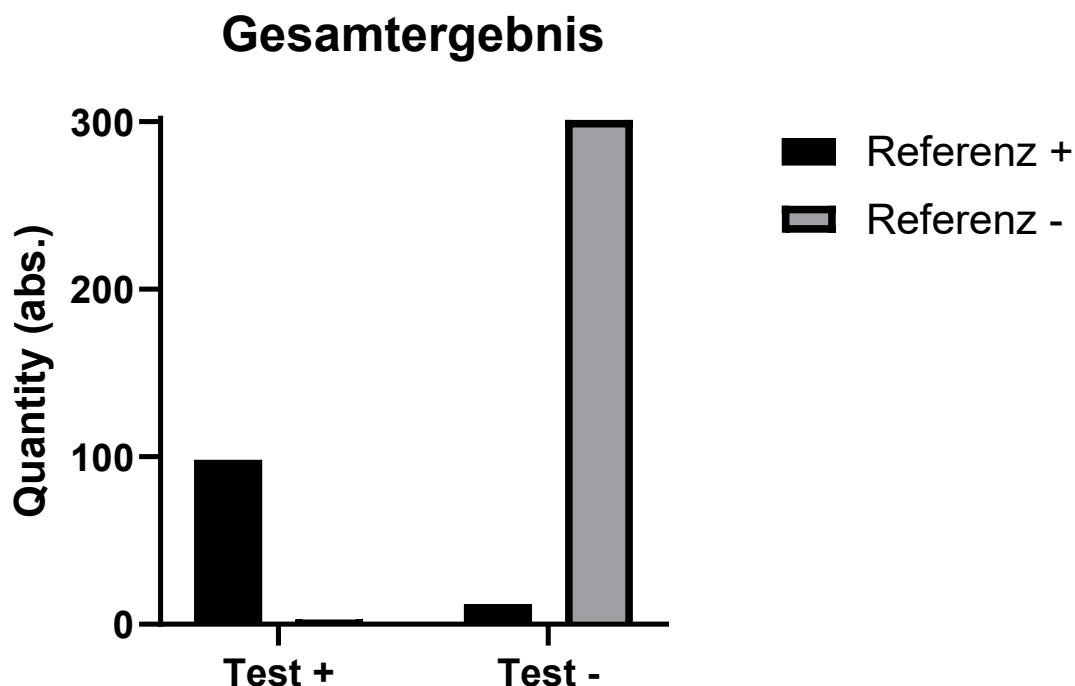


Abbildung 16: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Gesamtergebnisse, wobei die Daten aus Tabelle 12 repräsentiert werden.

4.3.2. Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 1%

Für die Überprüfung der Detektionsfähigkeit des Oncomine Colon cfDNA Assays für Varianten mit einer Allelfrequenz von 1% wurden die beiden kommerziell erhältlichen Kontrollen HD780 1% AF und Sereaseq™ ctDNA Mutation Mix v2 (AF 1%) verwendet, wobei HD 780 1% AF im Zuge der Inter-Assay-Variabilität Testung zweimal sequenziert wurde. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Sequenzierung von Proben mit einer Allelfrequenz von 1% zusammengefasst.

Tabelle 13: Kreuztabelle zur Gegenüberstellung des Oncomine Colon cfDNA Assays von Proben mit 1 % AF und der Referenzmethode

		Referenzmethode		
		positiv	negativ	Summe
Oncomine Colon cfDNA Assay	positiv	21	1	22
	negativ	1	46	47
	Summe	22	47	69

Insgesamt wurden 69 Ergebnisse ermittelt, 21 gelten als TP, 46 als TN und jeweils eines als FP und FN. Anhand der erhobenen Ergebnisse wurden folgende Maßzahlen berechnet:

- Sensitivität: 95,45% [78,20; 99,77]
- Spezifität: 97,87% [88,89; 99,89]
- PPV: 95,45% [78,20; 99,77]
- NPV: 97,87% [88,89; 99,89]
- Diagnostische Genauigkeit: 97,10% [89,92; 99,65]

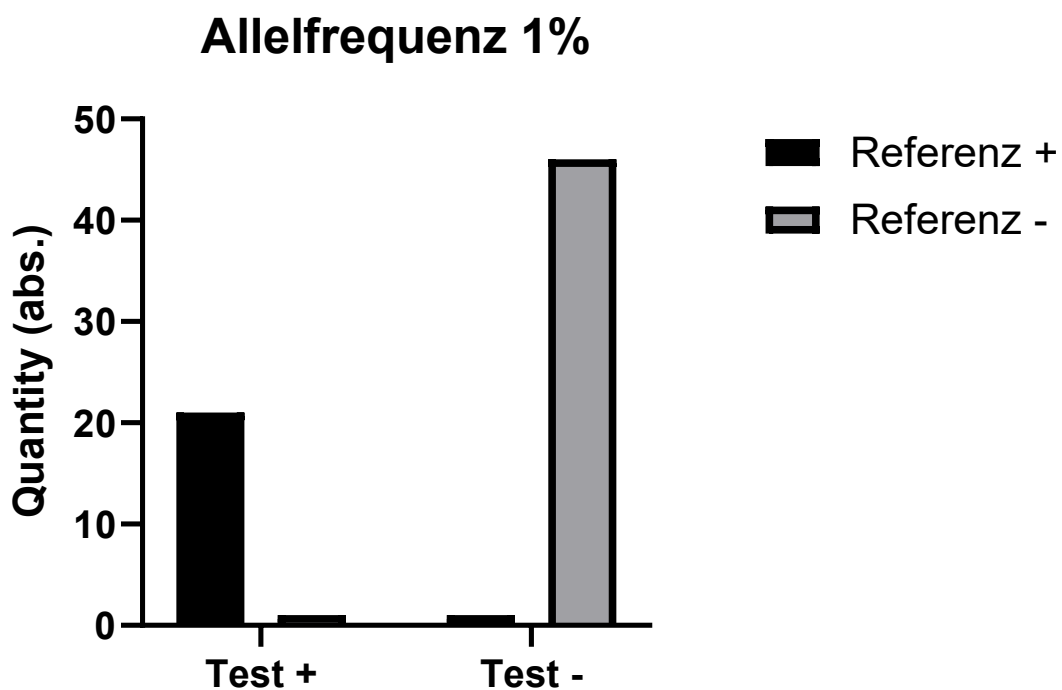


Abbildung 17: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 1%, wobei die Daten aus Tabelle 13 repräsentiert werden.

4.3.3. Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,5%

Die Ermittlung der Detektionsfähigkeit des Oncomine Colon cfDNA Assays für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,5% wurde die Sereq™ ctDNA Mutation Mix v2 (AF 0,5%) herangezogen. Wiederholungen zur Testung der Inter- und Intraassay Variabilität wurden durchgeführt. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Sequenzierung von Proben mit einer Allelfrequenz von 0,5% zusammengefasst.

Tabelle 14: Kreuztabelle zur Gegenüberstellung des Oncomine Colon cfDNA Assays von Proben mit 1 % AF und der Referenzmethode

		Referenzmethode		
		positiv	negativ	Summe
Oncomine Colon cfDNA Assay	positiv	39	0	39
	negativ	3	27	30
Summe		42	27	69

Insgesamt wurden 69 Ergebnisse ermittelt, 39 gelten als TP, 27 als TN und drei Ergebnisse als FN. Anhand der erhobenen Ergebnisse wurden folgende Maßzahlen berechnet:

- Sensitivität: 92,86% [80,99; 97,54]
- Spezifität: 100% [87,54; 100]
- PPV: 100% [91,03; 100]
- NPV: 90% [74,38; 96,54]
- Diagnostische Genauigkeit: 95,65% [87,82; 99,09]

Allelfrequenz 0,5%

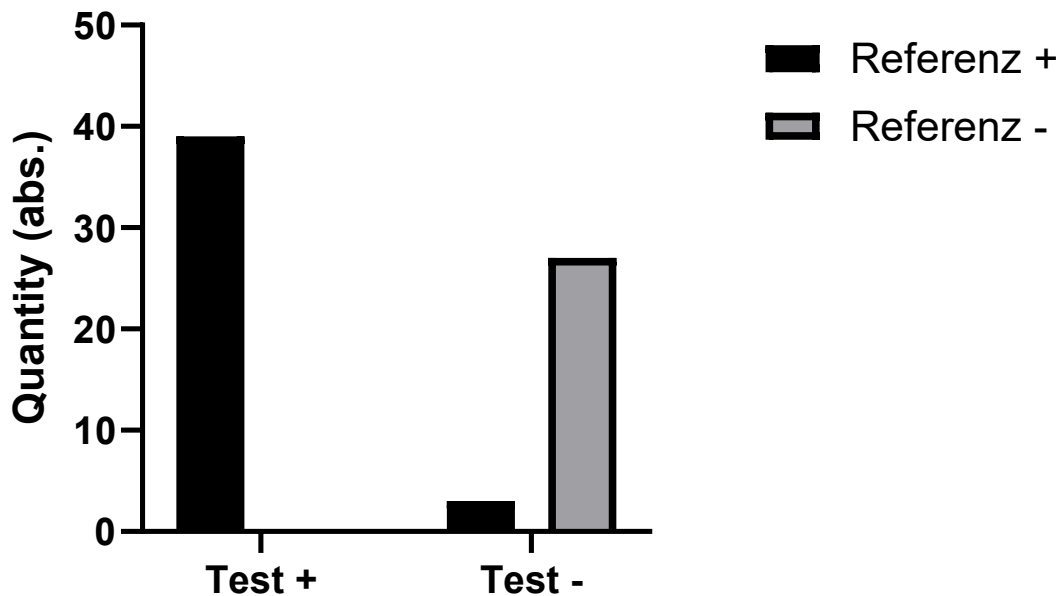


Abbildung 18: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,5%, wobei die Daten aus Tabelle 14 repräsentiert werden.

4.3.4. Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,1%

Um die diagnostischen Parameter für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,1% zu bestimmen, wurden die beiden Kontrollen SeraSeq 0,125% und HD 780 0,1% herangezogen. Beide wurden zweimal analysiert. Die Ergebnisse für die jeweils 23 Hotspot SNV sind in folgender Kreuztabelle zusammengefasst:

Tabelle 15: Kreuztabelle zur Gegenüberstellung des Oncomine Colon cfDNA Assays von Proben mit 0,1 % AF und der Referenzmethode

		Referenzmethode		
		positiv	negativ	Summe
Oncomine Colon cfDNA Assay	positiv	35	2	37
	negativ	5	50	55
	Summe	40	52	92

35 der 92 Ergebnisse gelten als TP, 50 als TN und 5 als FN, des Weiteren wurden 2 FP Ergebnisse erzielt. Ausgehend dieser Ergebnisse wurden folgende Maßzahlen berechnet:

- Sensitivität: 87,5% [73,89; 94,54]
- Spezifität: 96,15% [87,02; 99,32]
- PPV: 94,59% [82,30; 99,04]
- NPV: 90,91% [80,42; 96,05]
- Diagnostische Genauigkeit: 92,39% [84,95; 96,89]

Allelfrequenz 0,1%

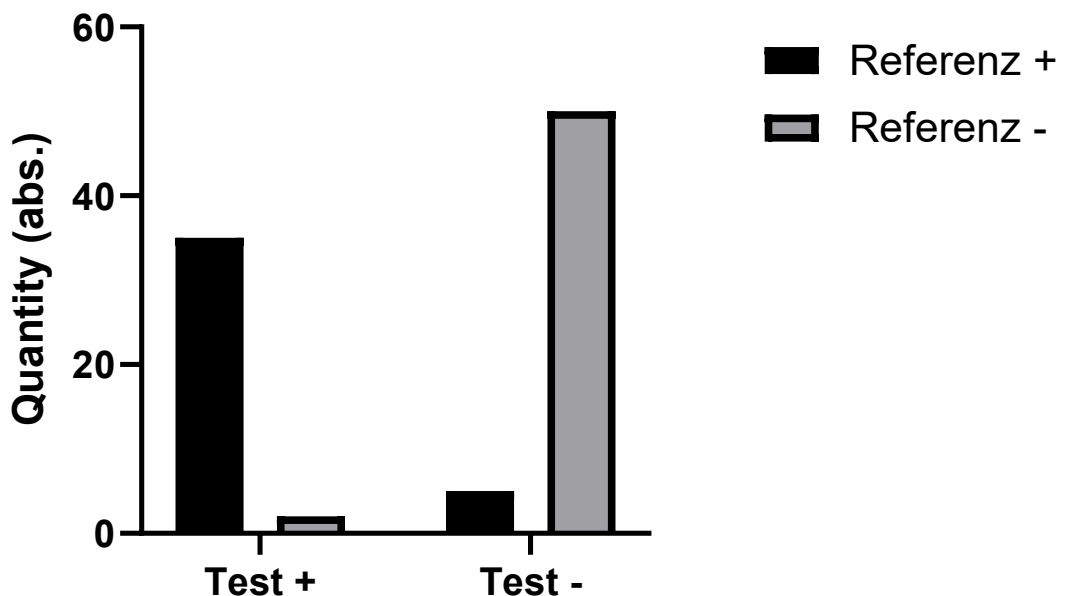
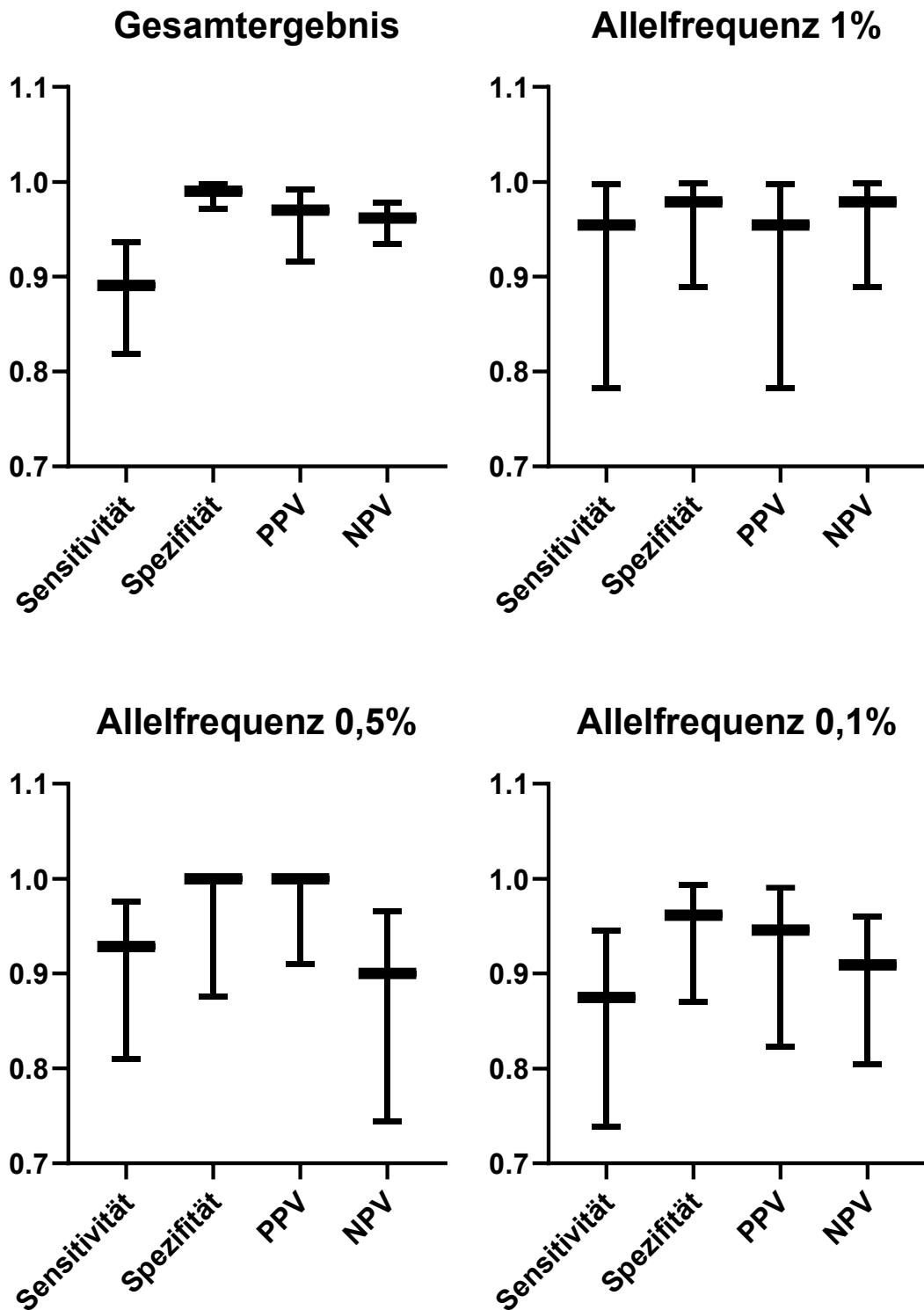


Abbildung 19: Balkendiagramm zur Veranschaulichung der Ergebnisse für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,1%, wobei die Daten aus Tabelle 15 repräsentiert werden.

4.3.5. Vergleich der Sensitivität, Spezifität, PPV und NNV der Gesamtergebnisse, Allelfrequenz 0,125% und 1 %

In folgenden Boxplots werden die Sensitivität, Spezifität, PPV und NPV mit ihren 95%-Konfidenzintervallen für das Gesamtergebnis mit denen von Referenzmaterial mit einer Allelfrequenz von 0,125%, 0,5% und 1% durch Boxplots verglichen.

Hierbei zeigt der mittlere Balken den jeweiligen Parameter wie an der x-Achse benannt und die beiden äußeren Balken die 95%-Konfidenzintervalle.



4.3.6. Inter- und Intraassay Variabilität

Die Inter- und Intraassay Variabilität des Oncomine Colon cfDNA Assays wurde durch Wiederholungen des genannten Referenzmaterial und den Patient*innenproben getestet. Zur Testung der Interassay Variabilität wurden insgesamt sechs Proben in unterschiedlichen Sequenzierläufen ab dem ersten Amplifikationsschritt wiederholt. Somit wurde die Analyse von 138 Varianten wiederholt, wobei die Ergebnisse für 130 Varianten in den beiden Läufen übereinstimmte, was einem Prozentsatz von 94,20% entspricht.

Die Intraassay Variabilität wurde mit zwei Proben im Doppelansatz ab dem ersten Amplifikationsschritt getestet. Es wurden 46 Varianten im selben Sequenzierlauf zweimal analysiert und sie stimmten in 46 Fällen überein, was 100% entspricht.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Masterarbeit ist die Validierung des Oncomine Colon cfDNA Assays. Der Fokus der formulierten Forschungsfragen liegt hier bei der Sensitivität, Spezifität und Richtigkeit der Methode, bei der Detektion von SNV und auch von kurzen Indels in den Hotspotregionen der Gene, die durch das Kit abgedeckt werden und darüber hinaus bei der Allelfrequenz (Limit of Detection), mit der diese Varianten nachgewiesen werden können. Die Beantwortung dieser Forschungsfragen ist von entscheidender Bedeutung, um das Potenzial des Oncomine Colon cfDNA Assays für die Liquid Biopsy Diagnostik zu bestimmen.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden fünf kommerziell erhältliche Kontrollen und fünf Patient*innenproben verwendet. Die Kontrollen bestanden aus bereits isolierter cfDNA, während für die Analyse der Patient*innenproben zunächst cfDNA aus Plasma isoliert werden musste, wofür der Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit (Promega) verwendet wurde. Nach der Quantifizierung der DNA-Konzentration mit dem Qubit 4 Fluorometer und der Überprüfung der Qualität der erhaltenen cfDNA durch automatisierte Elektrophorese, wurde die manuelle Library-Präparation gemäß den Vorgaben des Oncomine Colon cfDNA Assays durchgeführt. Das Chip-Templating wurde am IonChef durchgeführt und die Sequenzierung am Ion S5 Instrument. Die anschließende Datenanalyse erfolgt durch die Torrent Suite und Ion Torrent Software.

In Kapitel 4.1 wurden die Ergebnisse der Tapestation dargestellt. Es wurde die Konzentration der cfDNA in ng/µl und der Prozentsatz der cfDNA in den einzelnen Proben angegeben. Die Konzentrationen lagen hier zwischen 0,0468ng/µl und 2,22ng/µl, wobei der Anteil an cfDNA zwischen 5 und 91% variierte. Probe #3 wurde aufgrund des Ergebnisses der Tapestation von der Validierung ausgeschlossen. Mit 2,22ng/µl war die Konzentration zwar vergleichsweise hoch, der %cfDNA-Score mit 5% jedoch sehr niedrig. Laut Johansson et al. (2019) kann die Analysesensitivität von Methoden zur Detektion von Mutationen in cfDNA beeinträchtigt werden, wenn der Anteil an kontaminierender zellulärer DNA ähnlich oder höher als der Anteil an zellfreier DNA ist(44).

Für Probe #4 konnte kein Anteil an cfDNA berechnet werden, vermutlich aufgrund der sehr geringen Konzentration von 0,0468ng/µl. Das Cell-free DNA Screen Tape

Assay kann laut Herstellerangaben zwischen 100 und 5000 pg/ μ l cfDNA nachweisen, da die Konzentration der cfDNA in dieser Probe bereits sehr gering war, könnte der Anteil an cfDNA unter der Nachweisgrenze liegen und somit nicht berechnet werden(45). Die Probe wurde dennoch für die Validierung herangezogen, da im Elektropherogramm (Abbildung 13) zu sehen war, dass die durchschnittliche Basenpaarlänge der detektierten DNA 189 bp beträgt und somit davon ausgegangen werden konnte, dass es sich dabei tatsächlich um cfDNA handelt.

Zusammengefasst weisen die Proben, obwohl bei allen dieselbe Ausgangsmenge von einem Milliliter Plasma verwendet wurde, unterschiedliche Konzentrationen von cfDNA auf. Durch diese Unterschiede können wichtige Informationen für die Interpretation von Ergebnissen im Rahmen der Liquid Biopsy-Diagnostik gesammelt werden. Aufgrund der Informationen über die Qualität der isolierten cfDNA, der Repräsentativität der Probe für die Untersuchung und der möglichen Kontamination durch genomische DNA wäre die Durchführung einer automatisierten Gelelektrophorese vor der Analyse sinnvoll. Allerdings ist dies in der Molekularpathologie der Klinik Favoriten derzeit nicht möglich, da die entsprechende Ausrüstung nicht vorhanden ist.

Gemäß den Herstellerangaben können 50ng cfDNA für das Oncomine Colon cfDNA Assay eingesetzt werden, wobei ein Volumen von 13 μ l verwendet werden kann. Es war jedoch bei keiner Patient*innenprobe möglich diese Konzentration einzusetzen, da die Ausgangskonzentration mit maximal 1,48ng/ μ l zu gering war. Es wurde das Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit mit einem Milliliter Plasma als Ausgangsmaterial und 60 μ l Elutionspuffer als Endvolumen verwendet. Als Alternative bietet Promega den Maxwell® RSC ccfDNA LV Plasma Kit an, hier können bis zu 8ml Plasma als Ausgangsmaterial eingesetzt werden. Es wäre empfehlenswert, diesen Kit zu testen, um möglicherweise eine höhere cfDNA-Ausbeute zu erzielen und somit die laut Hersteller empfohlene DNA-Konzentration für das Oncomine Colon cfDNA Assay zu erreichen. Hierfür könnten Plasmaproben einmal mit dem Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit und mit dem Maxwell® RSC ccfDNA LV Plasma Kit aufgereinigt und die erhaltene cfDNA im Partnerlabor der automatisierten Elektrophorese unterzogen werden. Alternativ könnte das Oncomine Colon cfDNA Assay mit beiden Eluatn durchgeführt und die erhaltenen Qualitätskriterien, wie Median Read

Coverage, Median Molecular Coverage und Limits of Detection %, verglichen werden.

Bei der statistischen Analyse wurden Ergebnisse insgesamt sowie getrennt nach Allelfrequenzen von 1%, 0,5% und 0,1 % berücksichtigt. Hierbei wurden Sensitivität, Spezifität, PPV, NPV und diagnostische Genauigkeit ermittelt. Außerdem sind die 95%-Konfidenzintervalle der genannten Werte berechnet worden. Es wurden Daten aus vier Sequenzierläufen mit insgesamt 18 sequenzierten Ansätzen aus 10 verschiedenen Proben erhoben. Die Ergebnisse von 23 verschiedenen Varianten wurden mit den jeweiligen Referenzmethoden verglichen. Die folgende Zusammenfassung der statistischen Analyse wurde durchgeführt und soll die erste Forschungsfrage beantworten.

Betrachtet man die Gesamtergebnisse stimmten die Ergebnisse von 399 von 414 untersuchten Varianten überein, was einer diagnostischen Genauigkeit von 96,38% [94,09; 97,96] entspricht. Es konnte für eine Allelfrequenz von 1% eine diagnostische Genauigkeit von 97,10% [89,92; 99,65], für 0,5% von 95,65% [87,82; 99,09] und für 0,1% 92,39% [84,95; 96,89] ermittelt werden. Vergleicht man die diagnostischen Genauigkeiten ist sie bei einer Allelfrequenz von 1% am höchsten, gefolgt vom Gesamtergebnis, der Allelfrequenz von 0,5% und schließlich der Allelfrequenz von 0,1%. Die Unterschiede könnten jedoch nicht signifikant sein, da sich die Konfidenzintervalle überschneiden.

Die Sensitivität des Gesamtergebnisses betrug 89,09% [81,90; 93,65], 95,45% [78,20; 99,77] für eine Allelfrequenz von 1%, 92,86% [80,99; 97,54] für 0,5% und 87,5% [73,89; 94,54] für 0,1% Allelfrequenz. Auch hier konnten die besten Ergebnisse mit einer Allelfrequenz von 1% erreicht werden, gefolgt von den Ergebnissen für Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,5%. Dies bedeutet, dass der Oncomine Colon cfDNA Assay bei Varianten mit höheren Allelfrequenzen sensitiver ist.

Von den 12 falsch negativen Ergebnissen betrafen sechs das Gen *APC* und zwar die Mutation p.T1556fs*3 (c.4666_4667insA), die in den Kontrollen Seraseq ctDNA Mutation Mix v2 (0,125%, 0,5% und 1%) zu finden sein sollte. Bei der Mutation handelt es sich um eine Insertion, die in einer Homopolymerregion zu einem Frameshift führt. Es ist bekannt, dass die Ion Torrent Technologie eine hohe

Fehlerrate in Homopolymerregionen aufweist. Die pH-Wert-Änderung sollte direkt proportional der freigesetzten Wasserstoffionen sein, die während dem Einbau einer Base freigesetzt werden. Diese Linearität nimmt jedoch ab, wenn Homopolymerregionen mehr als vier Basen umfassen, was zu falsch positiven aber auch falsch negativen Ergebnissen führen kann. Da Homopolymer-Bereiche anfälliger für Indels sind, können verstärkt Probleme auftreten, wie im Fall der sechsmal nicht detektierten APC-Mutation(46). Diese Limitation des Oncomine Colon cfDNA Assay muss bei der Verwendung für die Liquid Biopsy-Diagnostik berücksichtigt werden.

In Probe #2 konnte die zuvor mit der Referenzmethode detektierte Mutation p.Q61H in *KRAS* zweimal und in Probe #6 die Mutation p.Q61L in *NRAS* nicht nachgewiesen werden. Betrachtet man Tabelle 10 ist zu sehen, dass die gekauften Kontrollen von Horizon und SeraSeq die Qualitätskriterien laut Herstellerfirma des Oncomine Colon cfDNA Assay für das Erreichen der Allelfrequenz von 0,1% erfüllen und die Patient*innenproben, zu der Probe #2 und #6 zählt, nicht. Die Qualitätskriterien Limit of Detection %, Median Molecular Coverage und Median Read Coverage sind ausschlaggebend ob in den einzelnen Proben Varianten mit einer Allelfrequenz von 0,1% detektiert werden können. Diese Parameter werden auch durch den DNA-Input zu Beginn der Analyse beeinflusst, welcher bei beiden Proben geringer als die Herstellerangaben war. Die falsch negativen Ergebnisse betreffend dieser beiden Proben könnten somit aufgrund der nicht erreichten Qualitätskriterien erklärt werden.

Die übrigen drei falsch negativen Ergebnisse wurden in gekauften Kontrollen detektiert, in denen laut Qualitätskriterien die Allelfrequenz von 0,1% erreicht werden sollte. Es konnte in der Seraseq ctDNA Mutation Mix v2 (0,125% AF) Kontrolle in zwei unterschiedlichen Läufen einmal die Mutation p.R273H in *TP53* und einmal die Mutation p.E17K in *AKT* nicht nachgewiesen werden. In der Kontrolle HD 780 mit 0,1% Allelfrequenz wurde die Mutation p.E545K des *PIK3CA*-Gens nicht nachgewiesen. Mithilfe des IGV wurden die Positionen an denen die Mutationen zu finden sein sollten, betrachtet. In allen drei Fällen liegt keine Homopolymerregion vor und es konnte eine gute Abdeckung erzielt werden. Es wurden auch Reads mit den Varianten generiert, jedoch lagen sie unter der Nachweisgrenze und wurden somit nicht als Varianten in der Ion Reporter Software gelistet.

Wie gut der Test falsch positive Ergebnisse ausschließen kann, wurde durch Berechnung der Spezifität ermittelt. Die Spezifität des Gesamtergebnisses lag bei 99,01% [97,14; 99,73], bei einer Allelfrequenz von 1% bei 97,87 % [88,89; 99,89], bei einer Allelfrequenz von 0,5% bei 100% [87,54; 100] und bei 96,15% [87,02; 99,32] für eine Allelfrequenz von 0,1%.

Insgesamt wurden drei falsch positive Ergebnisse erzielt, davon betrafen zwei das Gen *TP53* und eine das Gen *APC*. Diese falsch positiven Ergebnisse wurden in den kommerziell erhältlichen Kontrollen von Horizon (HD 780 0,1% AF und 1% AF) nachgewiesen. Es handelte sich hierbei um die Mutationen p.R1114* in *APC* (Mol. Freq. 0,0599%), p.G245S (Mol. Freq. 0,0523%) und p.P152L (Mol. Freq. 0,0908%) des *TP53*-Gens. Alle drei Varianten wurden lediglich mit zwei Molekülfamilien nachgewiesen. Damit eine Variante in der Ion Torrent Software als solche aufgelistet wird, müssen mindestens zwei Molekülfamilien die Variante tragen und eine molekulare Frequenz (Mol. Freq.) von 0,05% erreicht werden. Vergleicht man nun die erhaltenen falsch positiven Ergebnisse mit diesen Kriterien, wurden diese bei p.R1114* und p.G245S nur knapp erfüllt. Auf Anfrage bei Thermo Fisher Scientific sollen Varianten mit Vorsicht behandelt werden, die mit nur zwei bis drei Molekülfamilien im Oncomine Colon cfDNA Assay detektiert werden, da es in diesem Bereich zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Die Variante p.P152L des *TP53*-Gens wurde mit 0,0908% molekularer Frequenz nachgewiesen, hier wurde verglichen mit den anderen falsch positiven Ergebnissen eine schlechtere Abdeckung erreicht und die Variante liegt in einer Homopolymerregion, in denen wie bereits erwähnt häufiger Probleme auftreten. Für den Einsatz in der Liquid Biopsy Diagnostik sollte ein eigener Cut-off gesetzt werden, ab wann Varianten als solche angenommen werden. Des Weiteren sollten die Variante im IGV visualisiert werden, um weitere mögliche Einflüsse, wie beispielsweise Homopolymerregionen, welche falsch positive Ergebnisse begünstigen, auszuschließen.

Der PPV betrug für die Gesamtergebnisse 97,03% [91,63; 99,19], für eine Allelfrequenz von 1% 95,45% [78,20; 99,77], für eine Allelfrequenz von 0,5% 100% [91,03; 100] und für eine Allelfrequenz von 0,1% 94,59% [82,30; 99,04]. Das beste Ergebnis wurde für eine Allelfrequenz von 0,5 % erzielt, was bedeutet, dass ein positives Ergebnis hier am zuverlässigsten ist.

Der NPV des Gesamtergebnisses lag bei 96,17% [93,42; 97,79], bei einer Allelfrequenz von 1% bei 97,87% [88,89; 99,89], bei einer Allelfrequenz von 0,5% bei 90% [74,38; 96,54] und bei einer Allelfrequenz von 0,1% bei 90,91% [80,42; 96,05]. Ein negatives Testergebnis ist somit bei einer Allelfrequenz von 1% am wahrscheinlichsten korrekt.

Zusammenfassend zeigen die diagnostischen Maßzahlen, dass der Oncomine Colon cfDNA Assay eine gute Leistungsfähigkeit bei der Erkennung von Varianten aufweist, wobei bessere Ergebnisse tendenziell bei höheren Allelfrequenzen erzielt wurden.

Gemäß den Angaben von Thermo Fisher Scientific erreicht der Oncomine Colon cfDNA Assay eine Sensitivität von 85,9% und eine Spezifität von über 99,9% bei einer Allelfrequenz von 0,1%. Bei einer Allelfrequenz von 0,5% weisen sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität Werte von über 99,9% auf. Darüber hinaus ist im vorliegenden Dokument ersichtlich, dass mit zunehmendem DNA-Input die LOD gesenkt werden kann. Bei einem DNA-Input von 5ng liegt die LOD bei 0,25%, bei 10ng cfDNA bei 0,15% und mit einem Input von 20ng kann die versprochene LOD von 0,1% erreicht werden(47).

Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wird für die erste Hypothese H0 verworfen und H1 angenommen. Die Detektion von Varianten mit einer Allelfrequenz von 1% weist eine Spezifität von mindestens 90% auf. Bezüglich der zweiten Hypothese wird H0 ebenfalls verworfen und H1 angenommen, somit weist die Detektion von Varianten mit einer Allelfrequenz von 1% eine Sensitivität von mindestens 90% auf.

Zusammenfassend kann bestätigt werden, dass mit dem Oncomine Colon cfDNA Assay Varianten mit bis zu 0,1% Allelfrequenz detektiert werden können, jedoch mit abnehmender Sensitivität und Spezifität. Zuverlässige Ergebnisse können bis zu einer Allelfrequenz von 0,5% erzielt werden. Die Sensitivität konnte hier zwar nur 92,86% [80,99; 97,54] erzielt werden, jedoch handelt es sich bei den falsch negativen Ergebnissen, welche die Sensitivität negativ beeinflussen, um die zuvor erwähnte Mutation des APC-Gens. Mit einer Spezifität von 100% [87,54; 100] liegen hier die Ergebnisse über den Erwartungen.

Trotz der zufriedenstellenden Ergebnisse, die im Zuge dieser Validierung erzielt wurden, gibt es Aspekte die berücksichtigt werden müssen, um das Oncomine Colon cfDNA Assay in die Routinediagnostik zu integrieren. Zum einen ist es in der Molekularpathologie der Klinik Favoriten derzeit nicht möglich den Mutationsstatus des Primärtumors mit der Liquid Biopsy vollständig zu vergleichen. Für solide Tumore wird hierorts der Oncomine Focus Assay verwendet, der beispielsweise keine Hotspotregionen des *TP53*-Gens, wie sie im Oncomine Colon cfDNA Assay detektiert werden können, abdeckt. Dadurch können Varianten, die tatsächlich von Tumor stammen nicht von Mutationen des Normalgewebes bzw. der hämatopoetischen Stammzellen unterschieden werden. Bestrebungen deckungsgleiche Assays zur Varianten-Detektion aus Paraffin-/ Tumormaterial und Liquid Biopsy zu etablieren, um einen besseren Abgleich zu ermöglichen, sollten angedacht werden.

Des Weiteren enthält der Oncomine Colon cfDNA Assay lediglich Gene, welche für das kolorektale Karzinom als relevant gelten. In der Klinik Favoriten besteht jedoch seitens der Klinik der Wunsch nach Liquid Biopsy Diagnostik auch bei anderen Tumorentitäten, wie dem NSCLC (nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom). Hierbei ist die Mutation T790M in *EGFR* von besonderen Interesse, da es sich dabei um eine Resistenzmutation handelt, die sich bei Patient*innen unter EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitor Therapie entwickelt und die Therapie in weiterer Folge angepasst werden muss(48). Dieser Hotspot wird vom Oncomine Colon cfDNA Assay nicht abgedeckt, was eine zusätzliche Analyse mittels Real-Time PCR erforderlich macht, die jedoch lediglich eine Allelfrequenz von 1% erreicht.

Während der Dauer des Projekts dieser Masterarbeit wurde in der Molekularpathologie Klinik Favoriten ein weiteres Gerät für die Durchführung von NGS angeschafft, das Ion Torrent Genexus System, eine vollautomatisierte Plattform von der Herstellung der Library bis hin zur Sequenzierung und Datenanalyse. Ein Kit von Thermo Fisher Scientific, der Oncomine Precision Assay, das mit diesem Gerät angewendet werden kann, ermöglicht die Analyse sowohl solider Tumore als auch der Liquid Biopsy. Das ermöglicht den Abgleich zwischen Primärtumor und Liquid Biopsy und erlaubt so eine verbesserte Interpretation der in ctDNA gefundenen Varianten. Dieser Assay umfasst Hotspots in 50 Genen und ermöglicht die Detektion sowohl von SNVs als auch von CNVs und Fusionen. Ein

weiterer Vorteil wäre die verkürzte Hands-on-Time, die laut Herstellerfirma bei 15 Minuten sein soll, während wie in Abbildung 7 zu sehen für das Oncomine Colon cfDNA Assay fast durchgehend drei Stunden für die reine Library-Vorbereitung und weitere zwei Stunden für die Quantifizierung der Library mittels qPCR benötigt werden(49).

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Masterarbeit war die Validierung des Oncomine Colon cfDNA Assays für die Liquid Biopsy Diagnostik in der Klinik Favoriten in Wien. Während der Testphase zeigte der Assay eine gute Leistungsfähigkeit, wobei eine Sensitivität und Spezifität von über 90% bei Varianten mit einer Allelfrequenz von 1% erreicht wurde, wie ursprünglich als Ziel definiert. Angesichts dieser Ergebnisse wird das Oncomine Colon cfDNA Assay zukünftig als Methode für die Liquid Biopsy Diagnostik verwendet und als Limit of Detection 0,5% festgelegt, vorausgesetzt es konnte genügend cfDNA aus der Plasmaprobe isoliert werden. Zur Verbesserung der cfDNA-Ausbeute und damit der Sensitivität des Assays wird das Maxwell® RSC ccfDNA LV Plasma Kit getestet.

Stammt die Liquid Biopsy jedoch von Patient*innen mit einem NSCLC wird anstatt des NGS eine Real-Time PCR mit dem cobas EGFR Mutation Test v2 durchgeführt, um eine möglich Resistenzmutation detektieren zu können.

Obwohl der Oncomine Colon cfDNA Assay gute Ergebnisse erzielen konnte, wird das neu erhaltene NGS-Gerät mit dem Oncomine Precision Assay in Zukunft für die Liquid Biopsy Diagnostik getestet. Dieses Assay bietet die Vorteile, Hotspots in mehreren Genen enthalten sind, die auch für andere Tumorentitäten relevant sind. Zudem kann das Assay sowohl bei FFPE-Proben und Liquid Biopsy durchgeführt werden, was den Vergleich von Primärtumor und Mutationen der ctDNA erlaubt.

Literaturverzeichnis

1. Haupts A, Roth W, Hartmann N. Liquid Biopsy im kolorektalen Karzinom: Ein Überblick zur ctDNA-Analyse in der Tumordiagnostik. *Pathologe*. Dezember 2019;40(S3):244–51.
2. Heitzer E, Ulz P, Geigl JB. Circulating Tumor DNA as a Liquid Biopsy for Cancer. *Clinical Chemistry*. 1. Januar 2015;61(1):112–23.
3. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, u. a. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *N Engl J Med*. 8. März 2012;366(10):883–92.
4. Alix-Panabières C, Pantel K. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discovery*. 1. April 2021;11(4):858–73.
5. Schwarzenbach H, Hoon DSB, Pantel K. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*. Juni 2011;11(6):426–37.
6. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, u. a. Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nat Rev Cancer*. April 2017;17(4):223–38.
7. Lin C, Liu X, Zheng B, Ke R, Tzeng CM. Liquid Biopsy, ctDNA Diagnosis through NGS. *Life*. 28. August 2021;11(9):890.
8. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. August 2013;10(8):472–84.
9. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta*. September 2013;424:222–30.
10. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, u. a. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. September 2008;14(9):985–90.
11. Polasik A, Tzschaschel M, Schochter F, De Gregorio A, Friedl T, Rack B, u. a. Circulating Tumour Cells, Circulating Tumour DNA and Circulating MicroRNA in Metastatic Breast Carcinoma – What is the Role of Liquid Biopsy in Breast Cancer? *Geburtshilfe Frauenheilkd*. Dezember 2017;77(12):1291–8.
12. Heitzer E, Haque IS, Roberts CES, Speicher MR. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat Rev Genet*. Februar 2019;20(2):71–88.
13. Sorber L, Zwaenepoel K, Deschoolmeester V, Van Schil PEY, Van Meerbeeck J, Lardon F, u. a. Circulating cell-free nucleic acids and platelets as a liquid biopsy in the provision of personalized therapy for lung cancer patients. *Lung Cancer*. Mai 2017;107:100–7.

14. Akhoundova D, Mosquera Martinez J, Musmann LE, Britschgi C, Rüttsche C, Rechsteiner M, u. a. The Role of the Liquid Biopsy in Decision-Making for Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *JCM*. 16. November 2020;9(11):3674.
15. Elazezy M, Joosse SA. Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2018;16:370–8.
16. Calapre L, Giardina T, Beasley AB, Reid AL, Stewart C, Amanuel B, u. a. Identification of TP53 mutations in circulating tumour DNA in high grade serous ovarian carcinoma using next generation sequencing technologies. *Sci Rep*. 6. Januar 2023;13(1):278.
17. Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7. Juni 2011;108(23):9530–5.
18. Cescon DW, Bratman SV, Chan SM, Siu LL. Circulating tumor DNA and liquid biopsy in oncology. *Nat Cancer*. 20. März 2020;1(3):276–90.
19. Magbanua MJM, Swigart LB, Wu HT, Hirst GL, Yau C, Wolf DM, u. a. Circulating tumor DNA in neoadjuvant-treated breast cancer reflects response and survival. *Annals of Oncology*. Februar 2021;32(2):229–39.
20. Siravegna G, Mussolin B, Buscarino M, Corti G, Cassingena A, Crisafulli G, u. a. Clonal evolution and resistance to EGFR blockade in the blood of colorectal cancer patients. *Nat Med*. Juli 2015;21(7):795–801.
21. Nikanjam M, Kato S, Kurzrock R. Liquid biopsy: current technology and clinical applications. *J Hematol Oncol*. 12. September 2022;15(1):131.
22. FDA. cobas EGFR Mutation Test v2. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/cobas-egfr-mutation-test-v2>
23. Jiang J, Ye S, Xu Y, Chang L, Hu X, Ru G, u. a. Circulating Tumor DNA as a Potential Marker to Detect Minimal Residual Disease and Predict Recurrence in Pancreatic Cancer. *Front Oncol*. 30. Juli 2020;10:1220.
24. The TRACERx consortium, The PEACE consortium, Abbosh C, Birkbak NJ, Wilson GA, Jamal-Hanjani M, u. a. Phylogenetic ctDNA analysis depicts early-stage lung cancer evolution. *Nature*. 25. Mai 2017;545(7655):446–51.
25. Sausen M, Phallen J, Adleff V, Jones S, Leary RJ, Barrett MT, u. a. Clinical implications of genomic alterations in the tumour and circulation of pancreatic cancer patients. *Nat Commun*. 7. Juli 2015;6(1):7686.
26. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, u. a. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. Mai 2014;20(5):548–54.

27. Newman AM, Lovejoy AF, Klass DM, Kurtz DM, Chabon JJ, Scherer F, u. a. Integrated digital error suppression for improved detection of circulating tumor DNA. *Nat Biotechnol.* Mai 2016;34(5):547–55.
28. Olsson E, Winter C, George A, Chen Y, Howlin J, Tang ME, u. a. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. *EMBO Mol Med.* August 2015;7(8):1034–47.
29. Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Rev Clin Oncol.* Oktober 2008;5(10):588–99.
30. Chan HT, Nagayama S, Chin YM, Otaki M, Hayashi R, Kiyotani K, u. a. Clinical significance of clonal hematopoiesis in the interpretation of blood liquid biopsy. *Molecular Oncology.* August 2020;14(8):1719–30.
31. Chan RH, Lin PC, Chen SH, Lin SC, Chen PC, Lin BW, u. a. Clinical Utility of a Cell-Free DNA Assay in Patients With Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 19. März 2021;11:589673.
32. Salk JJ, Loubet-Seneor K, Maritschnegg E, Valentine CC, Williams LN, Higgins JE, u. a. Ultra-Sensitive TP53 Sequencing for Cancer Detection Reveals Progressive Clonal Selection in Normal Tissue over a Century of Human Lifespan. *Cell Reports.* Juli 2019;28(1):132-144.e3.
33. Chan HT, Chin YM, Nakamura Y, Low SK. Clonal Hematopoiesis in Liquid Biopsy: From Biological Noise to Valuable Clinical Implications. *Cancers.* 14. August 2020;12(8):2277.
34. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer.* Oktober 2011;11(10):726–34.
35. Luo H, Zhao Q, Wei W, Zheng L, Yi S, Li G, u. a. Circulating tumor DNA methylation profiles enable early diagnosis, prognosis prediction, and screening for colorectal cancer. *Sci Transl Med.* Januar 2020;12(524):eaax7533.
36. Pedersen SK, Symonds EL, Baker RT, Murray DH, McEvoy A, Van Doorn SC, u. a. Evaluation of an assay for methylated BCAT1 and IKZF1 in plasma for detection of colorectal neoplasia. *BMC Cancer.* Dezember 2015;15(1):654.
37. Luo H, Wei W, Ye Z, Zheng J, Xu R hua. Liquid Biopsy of Methylation Biomarkers in Cell-Free DNA. *Trends in Molecular Medicine.* Mai 2021;27(5):482–500.
38. Seraseq® ctDNA Mutation Mix v2 Package Insert. [zitiert 28. September 2023]; Verfügbar unter: <https://www.seracare.com/globalassets/seracare-resources/pi-0710-0139.0140.0141.0142.0143.0144-Seraseq-ctdna-mutation-mix-v2.pdf>

39. Multiplex I cfDNA Reference Standard Set. [zitiert 28. September 2023]; Verfügbar unter: <https://horizondiscovery.com/en/reference-standards/products/multiplex-i-cfdna-reference-standard-set>
40. TECHNICAL MANUAL Maxwell® RSC ccfDNA Plasma Kit. 01/21 [zitiert 9. Oktober 2023]; Verfügbar unter: <https://at.promega.com/products/nucleic-acid-extraction/genomic-dna/maxwell-rsc-ccfdna-plasma-kit/?catNum=AS1480>
41. Qubit 1X dsDNA assays: simplified workflow and improved performance. [zitiert 9. Oktober 2023]; Verfügbar unter: <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FBID%2FTechnical-Notes%2Fqubit-1x-dsdna-assays-simplified-workflow-tech-note.pdf>
42. Oncomine™ cfDNA Assays Part III: Variant Analysis USER GUIDE. [zitiert 30. Mai 2024]; Verfügbar unter: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0015874_Oncomine_cfDNA_Assay_Part_III.pdf
43. Ion Reporter™ Software 5.18. MAN0024776 [Internet]. 2021; Verfügbar unter: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0024776_IonReporter5_18_UG.pdf
44. Johansson G, Andersson D, Filges S, Li J, Muth A, Godfrey TE, u. a. Considerations and quality controls when analyzing cell-free tumor DNA. *Biomolecular Detection and Quantification*. März 2019;17:100078.
45. Agilent Technologies. Cell-free DNA ScreenTape Assay for TapeStation Systems Quick Guide. (01/2021). Verfügbar unter: https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/cfDNA_QuickGuide.pdf
46. Ivády G, Madar L, Dzsudzsák E, Koczok K, Kappelmayer J, Krulisova V, u. a. Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system. *BMC Genomics*. Dezember 2018;19(1):158.
47. Thermo Fisher Scientific. Oncomine Colon cfDNA Assay. [zitiert 22. Mai 2024]; Verfügbar unter: <https://www.iqnpath.org/wp-content/uploads/2015/09/Thomas-Bitteck-ctDNA-Workshop-Florence-May-2017.pdf>
48. Filipits M, Kainz V, Sebek V, Zach H, on behalf of the Liquid Biopsy Collaborative Study Group. Epidermal Growth Factor Receptor T790M Mutation Testing in Non-Small Cell Lung Cancer: An International Collaborative Study to Assess Molecular EGFR T790M Testing in Liquid Biopsy. *Cancers*. 7. Juli 2023;15(13):3528.
49. Oncomine™ Precision Assay GX USER GUIDE. [zitiert 30. Mai 2024]; Verfügbar unter: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0015874_Oncomine_Precision_Assay_GX_User_Guide.pdf

connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-
Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FMAN0018508_OncominePrecisionAssayGX_
UG.pdf

Anhang

Patienten-ID	GEN	MUT	Referenz	NGS
SeraSeq 0,125%	AKT1	p.E17K	pos	pos
SeraSeq 0,125%	APC	p.1450*	pos	pos
SeraSeq 0,125%	APC	p.T1566fs*3	pos	neg
SeraSeq 0,125%	BRAF	p.V600E	pos	pos
SeraSeq 0,125%	CTNNB1	p.T41A	pos	pos
SeraSeq 0,125%	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	pos	pos
SeraSeq 0,125%	GNAS	p.R201C	pos	pos
SeraSeq 0,125%	KRAS	p.G12D	pos	pos
SeraSeq 0,125%	NRAS	p.Q61R	pos	pos
SeraSeq 0,125%	PIK3CA	p.E545K	pos	pos
SeraSeq 0,125%	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
SeraSeq 0,125%	TP53	p.R175H	pos	pos
SeraSeq 0,125%	TP53	p.R273H	pos	neg
SeraSeq 0,125%	TP53	p.R248Q	pos	pos
SeraSeq 0,125%	NRAS	p.Q61K	neg	neg
SeraSeq 0,125%	KRAS	p.G12F	neg	neg
SeraSeq 0,125%	KRAS	p.Q61H	neg	neg
SeraSeq 0,125%	NRAS	p.Q61L	neg	neg
SeraSeq 0,125%	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
SeraSeq 0,125%	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
SeraSeq 0,125%	TP53	p.G245S	neg	neg
SeraSeq 0,125%	TP53	p.P152L	neg	neg
SeraSeq 0,125%	APC	p.R1114*	neg	neg
SeraSeq 0,125% WH	AKT1	p.E17K	pos	neg
SeraSeq 0,125% WH	APC	p.1450*	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	APC	p.T1566fs*3	pos	neg
SeraSeq 0,125% WH	BRAF	p.V600E	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	CTNNB1	p.T41A	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	GNAS	p.R201C	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	KRAS	p.G12D	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	NRAS	p.Q61R	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	PIK3CA	p.E545K	pos	pos

SeraSeq 0,125% WH	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	TP53	p.R175H	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	TP53	p.R273H	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	TP53	p.R248Q	pos	pos
SeraSeq 0,125% WH	NRAS	p.Q61K	neg	neg
SeraSeq 0,125% WH	KRAS	p.G12F	neg	neg
SeraSeq 0,125% WH	KRAS	p.Q61H	neg	neg
SeraSeq 0,125% WH	NRAS	p.Q61L	neg	neg
SeraSeq 0,125% WH	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
SeraSeq 0,125% WH	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
SeraSeq 0,125% WH	TP53	p.G245S	neg	neg
SeraSeq 0,125% WH	TP53	p.P152L	neg	neg
SeraSeq 0,125% WH	APC	p.R1114*	neg	neg
SeraSeq 0,5%	AKT1	p.E17K	pos	pos
SeraSeq 0,5%	APC	p.1450*	pos	pos
SeraSeq 0,5%	APC	p.T1566fs*3	pos	neg
SeraSeq 0,5%	BRAF	p.V600E	pos	pos
SeraSeq 0,5%	CTNNB1	p.T41A	pos	pos
SeraSeq 0,5%	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	pos	pos
SeraSeq 0,5%	GNAS	p.R201C	pos	pos
SeraSeq 0,5%	KRAS	p.G12D	pos	pos
SeraSeq 0,5%	NRAS	p.Q61R	pos	pos
SeraSeq 0,5%	PIK3CA	p.E545K	pos	pos
SeraSeq 0,5%	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
SeraSeq 0,5%	TP53	p.R175H	pos	pos
SeraSeq 0,5%	TP53	p.R273H	pos	pos
SeraSeq 0,5%	TP53	p.R248Q	pos	pos
SeraSeq 0,5%	NRAS	p.Q61K	neg	neg
SeraSeq 0,5%	KRAS	p.G12F	neg	neg
SeraSeq 0,5%	KRAS	p.Q61H	neg	neg
SeraSeq 0,5%	NRAS	p.Q61L	neg	neg
SeraSeq 0,5%	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
SeraSeq 0,5%	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
SeraSeq 0,5%	TP53	p.G245S	neg	neg

SeraSeq 0,5%	TP53	p.P152L	neg	neg
SeraSeq 0,5%	APC	p.R1114*	neg	neg
SeraSeq 0,5% WH	AKT1	p.E17K	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	APC	p.1450*	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	APC	p.T1566fs*3	pos	neg
SeraSeq 0,5% WH	BRAF	p.V600E	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	CTNNB1	p.T41A	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	GNAS	p.R201C	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	KRAS	p.G12D	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	NRAS	p.Q61R	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	PIK3CA	p.E545K	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	TP53	p.R175H	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	TP53	p.R273H	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	TP53	p.R248Q	pos	pos
SeraSeq 0,5% WH	NRAS	p.Q61K	neg	neg
SeraSeq 0,5% WH	KRAS	p.G12F	neg	neg
SeraSeq 0,5% WH	KRAS	p.Q61H	neg	neg
SeraSeq 0,5% WH	NRAS	p.Q61L	neg	neg
SeraSeq 0,5% WH	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
SeraSeq 0,5% WH	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
SeraSeq 0,5% WH	TP53	p.G245S	neg	neg
SeraSeq 0,5% WH	TP53	p.P152L	neg	neg
SeraSeq 0,5% WH	APC	p.R1114*	neg	neg
SeraSeq 0,5%WH_2	AKT1	p.E17K	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	APC	p.1450*	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	APC	p.T1566fs*3	pos	neg
SeraSeq 0,5%WH_2	BRAF	p.V600E	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	CTNNB1	p.T41A	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	GNAS	p.R201C	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	KRAS	p.G12D	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	NRAS	p.Q61R	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	PIK3CA	p.E545K	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	TP53	p.R175H	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	TP53	p.R273H	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	TP53	p.R248Q	pos	pos
SeraSeq 0,5%WH_2	NRAS	p.Q61K	neg	neg
SeraSeq 0,5%WH_2	KRAS	p.G12F	neg	neg
SeraSeq 0,5%WH_2	KRAS	p.Q61H	neg	neg
SeraSeq 0,5%WH_2	NRAS	p.Q61L	neg	neg

SeraSeq 0,5%WH_2	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
SeraSeq 0,5%WH_2	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
SeraSeq 0,5%WH_2	TP53	p.G245S	neg	neg
SeraSeq 0,5%WH_2	TP53	p.P152L	neg	neg
SeraSeq 0,5%WH_2	APC	p.R1114*	neg	neg
SeraSeq 1%	AKT1	p.E17K	pos	pos
SeraSeq 1%	APC	p.1450*	pos	pos
SeraSeq 1%	APC	p.T1566fs*3	pos	neg
SeraSeq 1%	BRAF	p.V600E	pos	pos
SeraSeq 1%	CTNNB1	p.T41A	pos	pos
SeraSeq 1%	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	pos	pos
SeraSeq 1%	GNAS	p.R201C	pos	pos
SeraSeq 1%	KRAS	p.G12D	pos	pos
SeraSeq 1%	NRAS	p.Q61R	pos	pos
SeraSeq 1%	PIK3CA	p.E545K	pos	pos
SeraSeq 1%	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
SeraSeq 1%	TP53	p.R175H	pos	pos
SeraSeq 1%	TP53	p.R273H	pos	pos
SeraSeq 1%	TP53	p.R248Q	pos	pos
SeraSeq 1%	NRAS	p.Q61K	neg	neg
SeraSeq 1%	KRAS	p.G12F	neg	neg
SeraSeq 1%	KRAS	p.Q61H	neg	neg
SeraSeq 1%	NRAS	p.Q61L	neg	neg
SeraSeq 1%	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
SeraSeq 1%	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
SeraSeq 1%	TP53	p.G245S	neg	neg
SeraSeq 1%	TP53	p.P152L	neg	neg
SeraSeq 1%	APC	p.R1114*	neg	neg
HD 780 0,1%	AKT1	p.E17K	neg	neg
HD 780 0,1%	APC	p.1450*	neg	neg
HD 780 0,1%	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
HD 780 0,1%	BRAF	p.V600E	pos	pos
HD 780 0,1%	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
HD 780 0,1%	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
HD 780 0,1%	GNAS	p.R201C	neg	neg
HD 780 0,1%	KRAS	p.G12D	pos	pos
HD 780 0,1%	NRAS	p.Q61R	neg	neg
HD 780 0,1%	PIK3CA	p.E545K	pos	neg
HD 780 0,1%	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
HD 780 0,1%	TP53	p.R175H	neg	neg
HD 780 0,1%	TP53	p.R273H	neg	neg
HD 780 0,1%	TP53	p.R248Q	neg	neg
HD 780 0,1%	NRAS	p.Q61K	pos	pos

HD 780 0,1%	KRAS	p.G12F	neg	neg
HD 780 0,1%	KRAS	p.Q61H	neg	neg
HD 780 0,1%	NRAS	p.Q61L	neg	neg
HD 780 0,1%	CTNNB1	p.S33Y	pos	pos
HD 780 0,1%	MAP2K1	p.Q56P	pos	pos
HD 780 0,1%	TP53	p.G245S	neg	neg
HD 780 0,1%	TP53	p.P152L	neg	neg
HD 780 0,1%	APC	p.R1114*	neg	pos
HD 780 0,1% WH	AKT1	p.E17K	neg	neg
HD 780 0,1% WH	APC	p.1450*	neg	neg
HD 780 0,1% WH	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
HD 780 0,1% WH	BRAF	p.V600E	pos	pos
HD 780 0,1% WH	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
HD 780 0,1% WH	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
HD 780 0,1% WH	GNAS	p.R201C	neg	neg
HD 780 0,1% WH	KRAS	p.G12D	pos	pos
HD 780 0,1% WH	NRAS	p.Q61R	neg	neg
HD 780 0,1% WH	PIK3CA	p.E545K	pos	pos
HD 780 0,1% WH	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
HD 780 0,1% WH	TP53	p.R175H	neg	neg
HD 780 0,1% WH	TP53	p.R273H	neg	neg
HD 780 0,1% WH	TP53	p.R248Q	neg	neg
HD 780 0,1% WH	NRAS	p.Q61K	pos	pos
HD 780 0,1% WH	KRAS	p.G12F	neg	neg
HD 780 0,1% WH	KRAS	p.Q61H	neg	neg
HD 780 0,1% WH	NRAS	p.Q61L	neg	neg
HD 780 0,1% WH	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
HD 780 0,1% WH	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
HD 780 0,1% WH	TP53	p.G245S	neg	neg
HD 780 0,1% WH	TP53	p.P152L	neg	pos
HD 780 0,1% WH	APC	p.R1114*	neg	neg
HD 780 1%	AKT1	p.E17K	neg	neg
HD 780 1%	APC	p.1450*	neg	neg
HD 780 1%	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
HD 780 1%	BRAF	p.V600E	pos	pos
HD 780 1%	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
HD 780 1%	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
HD 780 1%	GNAS	p.R201C	neg	neg
HD 780 1%	KRAS	p.G12D	pos	pos
HD 780 1%	NRAS	p.Q61R	neg	neg
HD 780 1%	PIK3CA	p.E545K	pos	pos
HD 780 1%	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
HD 780 1%	TP53	p.R175H	neg	neg

HD 780 1%	TP53	p.R273H	neg	neg
HD 780 1%	TP53	p.R248Q	neg	neg
HD 780 1%	NRAS	p.Q61K	pos	pos
HD 780 1%	KRAS	p.G12F	neg	neg
HD 780 1%	KRAS	p.Q61H	neg	neg
HD 780 1%	NRAS	p.Q61L	neg	neg
HD 780 1%	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
HD 780 1%	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
HD 780 1%	TP53	p.G245S	neg	pos
HD 780 1%	TP53	p.P152L	neg	neg
HD 780 1%	APC	p.R1114*	neg	neg
HD 780 1% WH	AKT1	p.E17K	neg	neg
HD 780 1% WH	APC	p.1450*	neg	neg
HD 780 1% WH	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
HD 780 1% WH	BRAF	p.V600E	pos	pos
HD 780 1% WH	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
HD 780 1% WH	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
HD 780 1% WH	GNAS	p.R201C	neg	neg
HD 780 1% WH	KRAS	p.G12D	pos	pos
HD 780 1% WH	NRAS	p.Q61R	neg	neg
HD 780 1% WH	PIK3CA	p.E545K	pos	pos
HD 780 1% WH	PIK3CA	p.H1047R	pos	pos
HD 780 1% WH	TP53	p.R175H	neg	neg
HD 780 1% WH	TP53	p.R273H	neg	neg
HD 780 1% WH	TP53	p.R248Q	neg	neg
HD 780 1% WH	NRAS	p.Q61K	pos	pos
HD 780 1% WH	KRAS	p.G12F	neg	neg
HD 780 1% WH	KRAS	p.Q61H	neg	neg
HD 780 1% WH	NRAS	p.Q61L	neg	neg
HD 780 1% WH	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
HD 780 1% WH	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
HD 780 1% WH	TP53	p.G245S	neg	neg
HD 780 1% WH	TP53	p.P152L	neg	neg
HD 780 1% WH	APC	p.R1114*	neg	neg
Probe #5	AKT1	p.E17K	neg	neg
Probe #5	APC	p.1450*	neg	neg
Probe #5	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
Probe #5	BRAF	p.V600E	neg	neg
Probe #5	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
Probe #5	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
Probe #5	GNAS	p.R201C	neg	neg
Probe #5	KRAS	p.G12D	neg	neg
Probe #5	NRAS	p.Q61R	neg	neg

Probe #5	PIK3CA	p.E545K	neg	neg
Probe #5	PIK3CA	p.H1047R	neg	neg
Probe #5	TP53	p.R175H	neg	neg
Probe #5	TP53	p.R273H	neg	neg
Probe #5	TP53	p.R248Q	neg	neg
Probe #5	NRAS	p.Q61K	neg	neg
Probe #5	KRAS	p.G12F	pos	pos
Probe #5	KRAS	p.Q61H	neg	neg
Probe #5	NRAS	p.Q61L	neg	neg
Probe #5	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
Probe #5	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
Probe #5	TP53	p.G245S	neg	neg
Probe #5	TP53	p.P152L	neg	neg
Probe #5	APC	p.R1114*	neg	neg
Probe #5 WH	AKT1	p.E17K	neg	neg
Probe #5 WH	APC	p.1450*	neg	neg
Probe #5 WH	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
Probe #5 WH	BRAF	p.V600E	neg	neg
Probe #5 WH	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
Probe #5 WH	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
Probe #5 WH	GNAS	p.R201C	neg	neg
Probe #5 WH	KRAS	p.G12D	neg	neg
Probe #5 WH	NRAS	p.Q61R	neg	neg
Probe #5 WH	PIK3CA	p.E545K	neg	neg
Probe #5 WH	PIK3CA	p.H1047R	neg	neg
Probe #5 WH	TP53	p.R175H	neg	neg
Probe #5 WH	TP53	p.R273H	neg	neg
Probe #5 WH	TP53	p.R248Q	neg	neg
Probe #5 WH	NRAS	p.Q61K	neg	neg
Probe #5 WH	KRAS	p.G12F	pos	pos
Probe #5 WH	KRAS	p.Q61H	neg	neg
Probe #5 WH	NRAS	p.Q61L	neg	neg
Probe #5 WH	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
Probe #5 WH	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
Probe #5 WH	TP53	p.G245S	neg	neg
Probe #5 WH	TP53	p.P152L	neg	neg
Probe #5 WH	APC	p.R1114*	neg	neg
Probe #4	AKT1	p.E17K	neg	neg
Probe #4	APC	p.1450*	neg	neg
Probe #4	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
Probe #4	BRAF	p.V600E	neg	neg
Probe #4	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
Probe #4	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg

Probe #4	GNAS	p.R201C	neg	neg
Probe #4	KRAS	p.G12D	neg	neg
Probe #4	NRAS	p.Q61R	neg	neg
Probe #4	PIK3CA	p.E545K	neg	neg
Probe #4	PIK3CA	p.H1047R	neg	neg
Probe #4	TP53	p.R175H	neg	neg
Probe #4	TP53	p.R273H	neg	neg
Probe #4	TP53	p.R248Q	neg	neg
Probe #4	NRAS	p.Q61K	neg	neg
Probe #4	KRAS	p.G12F	neg	neg
Probe #4	KRAS	p.Q61H	neg	neg
Probe #4	NRAS	p.Q61L	neg	neg
Probe #4	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
Probe #4	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
Probe #4	TP53	p.G245S	neg	neg
Probe #4	TP53	p.P152L	neg	neg
Probe #4	APC	p.R1114*	neg	neg
Probe #4 WH	AKT1	p.E17K	neg	neg
Probe #4 WH	APC	p.1450*	neg	neg
Probe #4 WH	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
Probe #4 WH	BRAF	p.V600E	neg	neg
Probe #4 WH	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
Probe #4 WH	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
Probe #4 WH	GNAS	p.R201C	neg	neg
Probe #4 WH	KRAS	p.G12D	neg	neg
Probe #4 WH	NRAS	p.Q61R	neg	neg
Probe #4 WH	PIK3CA	p.E545K	neg	neg
Probe #4 WH	PIK3CA	p.H1047R	neg	neg
Probe #4 WH	TP53	p.R175H	neg	neg
Probe #4 WH	TP53	p.R273H	neg	neg
Probe #4 WH	TP53	p.R248Q	neg	neg
Probe #4 WH	NRAS	p.Q61K	neg	neg
Probe #4 WH	KRAS	p.G12F	neg	neg
Probe #4 WH	KRAS	p.Q61H	neg	neg
Probe #4 WH	NRAS	p.Q61L	neg	neg
Probe #4 WH	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
Probe #4 WH	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
Probe #4 WH	TP53	p.G245S	neg	neg
Probe #4 WH	TP53	p.P152L	neg	neg
Probe #4 WH	APC	p.R1114*	neg	neg
Probe #2	AKT1	p.E17K	neg	neg
Probe #2	APC	p.1450*	neg	neg
Probe #2	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
Probe #2	BRAF	p.V600E	neg	neg

Probe #2	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
Probe #2	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
Probe #2	GNAS	p.R201C	neg	neg
Probe #2	KRAS	p.G12D	neg	neg
Probe #2	NRAS	p.Q61R	neg	neg
Probe #2	PIK3CA	p.E545K	neg	neg
Probe #2	PIK3CA	p.H1047R	neg	neg
Probe #2	TP53	p.R175H	neg	neg
Probe #2	TP53	p.R273H	neg	neg
Probe #2	TP53	p.R248Q	neg	neg
Probe #2	NRAS	p.Q61K	neg	neg
Probe #2	KRAS	p.G12F	neg	neg
Probe #2	KRAS	p.Q61H	pos	neg
Probe #2	NRAS	p.Q61L	neg	neg
Probe #2	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
Probe #2	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
Probe #2	TP53	p.G245S	neg	neg
Probe #2	TP53	p.P152L	neg	neg
Probe #2	APC	p.R1114*	neg	neg
Probe #2 WH	AKT1	p.E17K	neg	neg
Probe #2 WH	APC	p.1450*	neg	neg
Probe #2 WH	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
Probe #2 WH	BRAF	p.V600E	neg	neg
Probe #2 WH	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
Probe #2 WH	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
Probe #2 WH	GNAS	p.R201C	neg	neg
Probe #2 WH	KRAS	p.G12D	neg	neg
Probe #2 WH	NRAS	p.Q61R	neg	neg
Probe #2 WH	PIK3CA	p.E545K	neg	neg
Probe #2 WH	PIK3CA	p.H1047R	neg	neg
Probe #2 WH	TP53	p.R175H	neg	neg
Probe #2 WH	TP53	p.R273H	neg	neg
Probe #2 WH	TP53	p.R248Q	neg	neg
Probe #2 WH	NRAS	p.Q61K	neg	neg
Probe #2 WH	KRAS	p.G12F	neg	neg
Probe #2 WH	KRAS	p.Q61H	pos	neg
Probe #2 WH	NRAS	p.Q61L	neg	neg
Probe #2 WH	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
Probe #2 WH	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
Probe #2 WH	TP53	p.G245S	neg	neg
Probe #2 WH	TP53	p.P152L	neg	neg
Probe #2 WH	APC	p.R1114*	neg	neg
Probe #6	AKT1	p.E17K	neg	neg

Probe #6	APC	p.1450*	neg	neg
Probe #6	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
Probe #6	BRAF	p.V600E	neg	neg
Probe #6	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
Probe #6	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
Probe #6	GNAS	p.R201C	neg	neg
Probe #6	KRAS	p.G12D	neg	neg
Probe #6	NRAS	p.Q61R	neg	neg
Probe #6	PIK3CA	p.E545K	neg	neg
Probe #6	PIK3CA	p.H1047R	neg	neg
Probe #6	TP53	p.R175H	neg	neg
Probe #6	TP53	p.R273H	neg	neg
Probe #6	TP53	p.R248Q	neg	neg
Probe #6	NRAS	p.Q61K	neg	neg
Probe #6	KRAS	p.G12F	neg	neg
Probe #6	KRAS	p.Q61H	neg	neg
Probe #6	NRAS	p.Q61L	pos	neg
Probe #6	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
Probe #6	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
Probe #6	TP53	p.G245S	neg	neg
Probe #6	TP53	p.P152L	neg	neg
Probe #6	APC	p.R1114*	neg	neg
Probe #1	AKT1	p.E17K	neg	neg
Probe #1	APC	p.1450*	neg	neg
Probe #1	APC	p.T1566fs*3	neg	neg
Probe #1	BRAF	p.V600E	neg	neg
Probe #1	CTNNB1	p.T41A	neg	neg
Probe #1	ERBB2	p.A775_G776 ins YVMA	neg	neg
Probe #1	GNAS	p.R201C	neg	neg
Probe #1	KRAS	p.G12D	neg	neg
Probe #1	NRAS	p.Q61R	neg	neg
Probe #1	PIK3CA	p.E545K	neg	neg
Probe #1	PIK3CA	p.H1047R	neg	neg
Probe #1	TP53	p.R175H	neg	neg
Probe #1	TP53	p.R273H	neg	neg
Probe #1	TP53	p.R248Q	neg	neg
Probe #1	NRAS	p.Q61K	neg	neg
Probe #1	KRAS	p.G12F	neg	neg
Probe #1	KRAS	p.Q61H	neg	neg
Probe #1	NRAS	p.Q61L	pos	pos
Probe #1	CTNNB1	p.S33Y	neg	neg
Probe #1	MAP2K1	p.Q56P	neg	neg
Probe #1	TP53	p.G245S	neg	neg

Probe #1	TP53	p.P152L	neg	neg
Probe #1	APC	p.R1114*	neg	neg