Aus dem Lehrstuhl
für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. med. Christoph A. Klein
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Analyse nicht-zellulärer Bestandteile des Liquors von Patienten mit Meningeosis neoplastica

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Maria Moser

2026

Aus dem Lehrstuhl
für Experimentelle Medizin und Therapieverfahren
Prof. Dr. med. Christoph A. Klein
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Analyse nicht-zellulärer Bestandteile des Liquors von Patienten mit Meningeosis neoplastica

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lena Maria Moser

2026

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
Doktorvater:	Prof. Dr. med. Christoph A. Klein
Betreuerin:	Dr. rer. nat. Barbara Alberter
Tag der mündlichen Prüfung:	20. Juli 2026

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG 1

1. EINFÜHRUNG IN DIE THEMATIK 3

1.1. *MENINGEOSIS NEOPLASTICA* - EIN ÜBERBLICK 3

ZAHLEN UND FAKTEN 3
KLINISCHES BILD 3
DIAGNOSTIK 4
THERAPIE UND PROGNOSE 4

1.2. *LIQUID BIOPSY* 5

1.3. ZELLFREIE DNA (CFDNA) 6

DEFINITION 6
CFDNA-FREISETZUNG, NUKLEOSOMEN 6
HERKUNFT DER CFDNA 7
CFDNA UND IHRE ROLLE ALS BIOMARKER 7
VARIANZ DES CFDNA-SPIEGELS 9
FRAGMENTIERUNG DER CFDNA 10

1.4. EXOSOMEN 11

DEFINITION UND VORKOMMEN 11
DIE ENTSTEHUNG DER VESIKEL UND IHRE AUFNAHME IN DIE ZIELZELLE 11
ZUSAMMENSETZUNG DER EXOSOMEN 12
INTERZELLULÄRE KOMMUNIKATION 13
TUMORSPEZIFISCHE EXOSOMEN 14

1.5. THEMATIK DER ARBEIT 15

2. MATERIAL UND METHODEN 16

2.1. LIQUORPROBEN 16

2.2. ISOLATION DER CFDNA 16

2.2.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN 16
2.2.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 17
2.2.3. DURCHFÜHRUNG 17

2.3. FLUOROMETRISCHE QUANTIFIZIERUNG VON DNA-MOLEKÜLEN MITTELS QUBIT™ 19

2.3.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALEN 19
2.3.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 19
2.3.3. DURCHFÜHRUNG 19

2.4. CFDNA-AMPLIFIKATION 20

2.4.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN 20
2.4.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 20
2.4.3. DURCHFÜHRUNG 21
Vorbereitung der DNA für die Amplifikation *21*
Herstellung des Lib1-Adapters *21*
Ligation der Lib1-Adapter an die vorbereitete DNA *22*
Amplifikation *23*
Eluieren der cfDNA *24*

2.5. QUALITÄTSKONTROLLE MITTELS AGILENT 2100 BIOANALYZER *HIGH SENSITIVITY* 25

2.5.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN 25
2.5.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 25
2.5.3. DURCHFÜHRUNG 25
2.5.4. AUSWERTUNG 25

2.6. FRAGMENTAUFTRENNUNG (</> 700 BP) CFDNA MIT HILFE PARAMAGNETISCHER *SPRI BEADS* **26**

2.6.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN 27
2.6.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 27
2.6.3. DURCHFÜHRUNG 27
Fragmentauftrennung innerhalb eines Probengefäßes *27*
Abtrennung und Aufreinigung der Fragmente > 700 bp *28*
Aufreinigung der Fragmente < 700 bp *28*
2.6.4. AUSWERTUNG 28

2.7. REAMPLIFIKATION **29**

2.7.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN 29
2.7.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 30
2.7.3. DURCHFÜHRUNG 30

2.8. VORBEREITUNG DER *LIBRARIES* FÜR DIE GESAMTGENOMSEQUENZIERUNG MIT GERINGER SEQUENZIERTIEFE (*LOW PASS*-SEQUENZIERUNG) **30**

2.8.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN 31
2.8.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 31
2.8.3. DURCHFÜHRUNG UND AUSWERTUNG 32

2.9. ISOLATION DER EXOSOMEN **32**

2.9.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN 32
2.9.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 33
2.9.3. DURCHFÜHRUNG 33

2.10. ISOLATION TUMORSPEZIFISCHER EXOSOMEN **34**

2.11. EXTRAKTION DER DNA AUS DEN EXOSOMEN **35**

2.11.1. GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN 35
2.11.2. CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN 35
2.11.3. DURCHFÜHRUNG 35

3. ARBEITSABLAUF NACH PROBENEMPFANG **37**

4. ERGEBNISSE UND AUSWERTUNG **38**

4.1. CFDNA DES LIQUOR **38**

GEMESSENE CFDNA-KONZENTRATIONEN IM LIQUOR 38
CFDNA WURDE VORZUGSWEISE ÜBER APOPTOSE FREIGESETZT 41
PRÄFERENZ VON CTDNA IN KURZEN BZW. LANGEN CFDNA-FRAGMENTEN NICHT ERMITTELBAR 41
CFDNA AUS LIQUOR STAMMT NICHT AUSSCHLIEßLICH AUS MALIGEN ZELLEN 42
FRAGMENTE < 145 BP LIEFERN KEINEN HINWEIS FÜR ABERRANTES GENOMPROFIL 45
KEIN MUSTER ZWISCHEN BIOANALYZER- UND GENOMPROFILEN DER CFDNA ERKENNBAR 45

4.2. EXOSOMEN IM LIQUOR **47**

EXODNA-KONZENTRATIONEN IM LIQUOR VIEL GERINGER ALS DIE DER CFDNA 47
EXODNA LIEFERT WENIGER AUSWERTBARE GENOMPROFILE ALS CFDNA 47
ERFOLGREICHER NACHWEIS TUMORSPEZIFISCHER EXOSOMEN 49

4.3. ANALYTEN IM VERGLEICH **52**

UNSPEZIFISCHE EXODNA STÄRKER FRAGMENTIERT ALS CFDNA 52
EBENFALLS KEIN MUSTER ZWISCHEN BIOANALYZER- UND GENOMPROFILEN BEI DER EXODNA ERKENNBAR 52
BIOANALYZER-PROFILE (TUMORSPEZIFISCHER) EXODNA SIND PATIENTENSPEZIFISCH 55
ANALYTEN EINES PATIENTEN IM VERGLEICH 56
GROßTEIL DER ERGEBNISSE STIMMT MIT DEN ANGABEN ZUR DIAGNOSE MENINGEOSIS NEOPLASTICA ÜBEREIN 63

5. DISKUSSION **66**

5.1. EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE GEMESSENEN CFDNA-KONZENTRATIONEN 66
5.2. NICHT-ZELLULÄRE BESTANDTEILE DES LIQUORS ALS ERGÄNZENDES DIAGNOSTIKUM 67
5.3. SCHWIERIGE EINORDNUNG VON GENOMPROFILEN 68
5.4. MÖGLICHE GRÜNDE FÜR DIE HOHE ANZAHL AN BALANCIERTEN PROFILEN 68
5.5. ANREICHERUNG VON CTDNA IN KÜRZEREN ODER LÄNGEREN CFDNA-FRAGMENTEN? 69
5.6. ASPEKTE, DIE BEI DER AUSWERTUNG MITBERÜCKSICHTIGT WERDEN MÜSSEN 70
5.7. HINWEISE ZU DEN OBERFLÄCHENANTIGENEN, WELCHE ZUR EXOSOMEN-ISOLATION DIENTEN 70
5.8. WEITERE METHODEN ZUR EXOSOMEN-ISOLATION 71
5.9. CFDNA ALS VERLAUFSPARAMETER EINER ERKRANKUNG 72
5.10. WER IST NUN DER BESSERE BIOMARKER? - EINE GEGENÜBERSTELLUNG DER VERSCHIEDENEN ANALYTEN 73
SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK 76
7. ANHANG 77
7.1. BIOANALYZER-PROFILE 77
7.1.1. CFDNA-BIOANALYZER-PROFILE 77
7.1.2. CFDNA-BIOANALYZER-PROFILE NACH FRAGMENTAUFTRENNUNG 79
7.1.3. EXODNA BIOANALYZER-PROFILE 81
7.1.3. TUMORSPEZIFISCHE EXODNA BIOANALYZER-PROFILE 82
7.2. GENOMPROFILE 83
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 97
9. TABELLENVERZEICHNIS 97
10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 98
11. LITERATURVERZEICHNIS NACH NLM 101
12. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 108

Zusammenfassung

Bis zu zehn Prozent aller malignen Erkrankungen gehen im Verlauf mit einem Befall der Meningen einher. Dies wird als *Meningeosis neoplastica* bezeichnet. Die Diagnostik gestaltet sich allerdings schwierig. Für die Entwicklung eines beschwerdelindernden Therapiekonzepts, sind ein frühzeitiges Stellen der Diagnose und eine molekulargenetische Untersuchung des Tumors entscheidend. Die Zugänglichkeit zur Tumormasse ist jedoch in vielen Fällen nur begrenzt möglich oder würde ein zu großes OP-Risiko darstellen. Eine potenzielle Lösung könnte die Analyse des *Liquor cerebrospinalis* liefern, der in direktem Kontakt mit dem Tumor steht und verhältnismäßig einfach durch eine Lumbalpunktion gewonnen werden kann. Die Zellzahl im Liquor fällt für gewöhnlich sehr gering aus. Daher rückt der zellfreien Überstand, der Bestandteile wie zellfreie DNA (= cfDNA, *cell free* DNA) oder Exosomen mit darin enthaltener exosomaler DNA (= exoDNA) enthält, zunehmend in den Fokus. Diese Arbeit hat untersucht, ob es möglich ist, aus dem zellfreien Überstand von Liquorproben cfDNA und exoDNA zu isolieren und falls ja, ob die Qualität und Menge ausreichend ist, um molekulare Analysen wie die Detektion von genomischen Kopienzahlaberrationen (*CNAs = copy number alterations*) durchzuführen. Diese gelten als Nachweis für das Vorliegen von Tumor-DNA. Die hierfür verwendeten Exosomen sollten einerseits über bestimmte Plasmamembran-Marker (CD9, CD63 und CD81) und andererseits über einen neu etablierten Ansatz zur Isolation tumorspezifischer Exosomen mittels epithelialer (EpCAM) und neuroektodermaler (MCSP) Marker angereichert werden. Anhand der *CNA*-Profile sollte zudem eine Gegenüberstellung der Analyten und Anreicherungsmethoden erfolgen. Die verwendeten Liquorproben stammen von 29 Patientinnen und Patienten mit bzw. mit Verdacht auf *Meningeosis neoplastica*.

In dieser Arbeit gelang es, cfDNA und exoDNA erfolgreich aus dem zellfreien Überstand des Liquors zu extrahieren und zu amplifizieren. Die daraus gewonnene DNA konnte für Analysen wie Fragmentlängenverteilung und Gesamtgenomsequenzierung verwendet werden. Zudem wurde ein Ansatz zur Isolation tumorspezifischer Exosomen mittels oben genannter Marker etabliert. Der Nachweis aberranter Genomprofile legt nahe, dass der zellfreie Überstand trotz sehr geringer DNA-Konzentrationen möglicherweise zur Diagnostik maligner Erkrankungen dienen könnte. Dabei stellte sich heraus, dass die cfDNA die meisten auswertbaren und aussagekräftigsten Profile erzeugte. Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen,

welches Potential in den nicht-zellulären Bestandteilen des Liquors steckt. Zukünftig könnte die Analyse des Liquors frühzeitig Hinweise auf ein malignes Geschehen liefern und helfen, möglichst viel über die genetische Vielfalt eines Tumors zu erfahren.

1. Einführung in die Thematik

1.1. *Meningeosis neoplastica* - ein Überblick

Zahlen und Fakten

Metastasieren Tumoren – am häufigsten Mammakarzinome, gefolgt vom Lungenkarzinom und Melanom - in den *Liquor cerebrospinalis* und die ihn umgebenden Hirnhäute, wird dies als *Meningeosis neoplastica* oder auch als leptomeningeale Metastasierung bezeichnet. Liegt als Primärtumor ein Karzinom vor, kann in diesem Fall von einer *Meningeosis carcinomatosa* gesprochen werden. Bis zu zehn Prozent aller bösartigen Erkrankungen gehen im Krankheitsverlauf mit einem Befall der Meningen einher, wobei sich dieser meist erst in späteren Stadien manifestiert. Innerhalb weniger Wochen und Monate verläuft die Meningeosis trotz Behandlung tödlich (Weller, 2014; DeAngelis & Boutros, 2005). Lang andauernde und unspezifische neurologische Symptome, sowie zum Teil nicht eindeutige radiologische Befunde, gestalten die Diagnostik der Meningeosis schwierig. Sie wird deshalb oft erst zu spät oder gar nicht diagnostiziert (Strik & Prömmel, 2010). Trotz allem ist die Inzidenz der Meningeosis-Fälle weiter ansteigend. Dies erklärt sich zum einen durch wirksame Chemotherapeutika oder andere moderne Substanzen, die systemisch sehr gut wirksam sind, die Blut-Hirn-Schranke jedoch nicht überwinden können. Vermehrt kommt es dadurch zu Rezidiven im zentralen Nervensystem (ZNS) (Bendell et al., 2003). Weitere Gründe für die wachsende Zahl an Meningeosis-Fällen sind die immer häufiger durchgeführten Untersuchungen und das längere Überleben der Patienten (Weller, 2014). Interessanterweise ist ein Befall des Subarachnoidalraums bei primären ZNS-Tumoren wie beispielsweise dem häufig auftretenden *Astrozytom* oder *Oligodendrogliom* eher selten (Strik & Prömmel, 2010).

Klinisches Bild

Da die Aussaat der Tumorzellen entlang des gesamten ZNS erfolgen kann, ist eine sehr vielseitige Symptomatik möglich. Die Patienten berichten über Kopf- und/oder Rückenschmerzen, Schmerzen aus der Nervenwurzel, sowie Hemiparesen und -parästhesien, bis hin zu Doppelbildern, Visusverlust, Schluckstörungen, Hörminderung oder Fazialisparesen, die auf Hirnnervenausfälle zurückzuführen sind (Strik & Prömmel, 2010; Amboss, 2019). Nicht selten (in 30 % der Fälle) kann ein organisches Psychosyndrom auftreten, welches sich in verlangsamten Denkabläufen, Störungen der Aufmerksamkeit und des Bewusstseins, Verwirrtheit oder sogar in Form

von motorischen Störungen äußern kann (Weller, 2014; Amboss, 2019). Da all diese Symptome nicht pathognomonisch für die *Meningeosis neoplastica* sind, wird in den diagnostischen Leitlinien bereits bei geringstem Verdacht eine großzügig indizierte Abklärung empfohlen. Denn eine frühzeitige Diagnostik und eine molekulargenetische Untersuchung des Tumors sind entscheidend für ein beschwerdelinderndes Therapiekonzept (DeAngelis & Boutros, 2005).

Diagnostik

Besteht der Verdacht auf eine Meningeosis, ist eine Kontrastmittel-gestützte Magnetresonanztomografie (MRT) zur Darstellung von Schädel, Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule der erste Schritt in der Abklärung (Strik & Prömmel, 2010).
Andernfalls können durch eine Biopsie aus dem suspekten Gewebe verschiedene Zellen für die Analyse gewonnen werden. Die Zugänglichkeit zur Tumormasse ist jedoch in vielen Fällen nur begrenzt möglich oder die Entnahme der Stanzbiopsie würde ein zu großes OP-Risiko darstellen. Darüber hinaus kann die punktuelle Probenentnahme die Heterogenität innerhalb des Tumors nicht vollständig erfassen. Eine weitere Möglichkeit bietet die Beurteilung der sich im Liquor befindenden Tumorzellen und deren Zellbestandteile. Der Liquor steht in direktem Kontakt mit dem Tumorgewebe und enthält vereinzelt abgelöste Tumorzellen, welche die Diagnose festigen können (Kölmel, 1998; Weller, 2014). Allerdings besteht die Schwierigkeit darin, bei einer entnommenen Liquormenge von 5-10 ml, die Tumorzellen überhaupt ausfindig zu machen. Deswegen wäre es von großem Interesse, auch den zellfreien Überstand und die darin enthaltenen Analyten für diagnostische Zwecke nutzen zu können. Bisher werden alleinig unspezifische Marker (z.B. ein erhöhtes Laktat oder ein erhöhtes Ferritin) zur Fragestellung hinzugezogen. Diese erlauben jedoch nur eine allgemeine Aussage darüber, *ob* gerade ein Krankheitsprozess im ZNS abläuft, aber nicht *welcher* (Strik & Prömmel, 2010).

Therapie und Prognose

Ohne Behandlung beträgt das Gesamtüberleben der Patientinnen und Patienten nur wenige Wochen. Wird die Meningeosis frühzeitig erkannt und therapiert, steigt die mittlere Überlebensdauer auf 4-6 Monate, in den wenigsten Fällen auf 1 Jahr an. Da es sich um eine eher seltenere Erkrankung handelt, gibt es nur wenige Daten bezüglich erfolgreicher und lebensverlängernder Therapiekonzepte (Strik & Prömmel, 2010).

Primäres Therapieziel der *Meningeosis neoplastica* bleibt die palliative Versorgung. Dabei steht die Verbesserung der Lebensqualität und die Linderung neurologischer Defizite im Vordergrund (Leal et al., 2011). Letztendlich führt ein Befall bzw. eine Kompression des Hirnstamms zum Ausfall lebenswichtiger Systeme, welche für die Atem- und Kreislaufregulation essenziell verantwortlich sind. Außerdem kann ein Verschluss der Ventrikel zu einer Liquorabflussstörung führen, woraus ein Hydrozephalus und infolgedessen ein erhöhter Hirndruck resultieren kann (Strik & Prömmel, 2010).

Nachdem die Diagnose *Meningeosis neoplastica* gestellt wurde, muss erörtert werden, welche Therapiemöglichkeiten für den Patienten in Frage kommen. Nutzen und Risiken müssen dabei sorgfältig abgewogen werden. Neben chirurgischer Entfernung solider Metastasen, stehen Strahlentherapie, sowie systemische oder intrathekale medikamentöse Behandlung zur Verfügung. Die Therapie erfordert ein individuell auf den Patienten zugeschnittenes Konzept, welches nicht selten aus einer Kombination oben genannter Mittel besteht (Weller, 2014).

1.2. *Liquid Biopsy*

Unter einer *Liquid Biopsy* („Flüssigbiopsie“) versteht man die Entnahme von flüssigem Probematerial - allermeist Blut - welches bei Verdacht oder Vorliegen eines malignen Geschehens histopathologisch und molekulargenetisch untersucht und für Diagnosesicherung, Verlauf und Therapieentscheidungen der Erkrankung herangezogen werden kann. Dies stellt insofern einen großen Vorteil gegenüber einer gewöhnlichen Biopsie dar, da es sich lediglich um einen minimalinvasiven Eingriff handelt. Bei der *Meningeosis neoplastica* ist die Zugänglichkeit zu Gewebeproben aus den Hirnhäuten häufig erschwert. Da der Liquor in direktem Kontakt zu dem neoplastischen Gewebe steht, rückt dessen Analyse für Diagnostik, Therapieentscheidungen, sowie Verlaufskontrollen immer stärker in den Vordergrund. Studien zeigen, dass längst nicht nur disseminierte Tumorzellen zur Molekularanalyse herangezogen werden können, sondern auch die nicht-zellulären Bestandteile des Liquors wie beispielsweise zellfreie DNA (cfDNA) oder Exosomen (Li et al., 2016; Pentsova et al., 2016 und Thakur et al., 2014). Da diese Zellprodukte im Blut zum Großteil aus gesunden Zellen (z.B. Immunzellen bis zu 10500 Zellen/µl) stammen, ist es schwierig, eine Aussage über die geringen tumorspezifischen Anteile treffen zu können. Die Zellzahl im Liquor hingegen ist normalerweise sehr gering (0-5 Zellen/µl),

wodurch es umso wahrscheinlicher ist, auf analysierbares Material speziell aus Tumorzellen zu stoßen (Pan et al., 2015; Keller et al., 2020).

1.3. Zellfreie DNA (cfDNA)

Definition

Zellfreie DNA (cfDNA) lässt sich in vielen Körperflüssigkeiten des Menschen nachweisen, z.B. im Blut, Urin, Speichel, Lymphe, Galle, sowie im Fruchtwasser, der Muttermilch oder im *Liquor cerebrospinalis*. Es handelt sich dabei um kurze, vorwiegend doppelsträngige DNA-Fragmente, welche sich außerhalb der Zelle befinden (Barbany et al., 2019). Die DNA kann durch Apoptose, Nekrose, aktive Sezernierung oder andere Mechanismen in den Extrazellularraum gelangen (Grabuschnig et al., 2020). Zur cfDNA zählt zum einen die körpereigene genomische und mitochondriale DNA, sowie zum anderen exogene DNA, welche über Viren oder Bakterien in den Körperkreislauf gelangt (Kustanovich et al., 2019).

cfDNA-Freisetzung, Nukleosomen

Stirbt eine Zelle durch Apoptose, wird durch die Aktivierung der endogenen Nuklease die DNA „zerschnitten“ und aus der Zelle geschleust (Sakahira et al., 1998). Im Zellkern liegt die DNA nicht frei, sondern um Proteine - sog. Histone - gewickelt vor (siehe untenstehende Abbildung 2 a). Der Komplex aus Histonen und dem um ihn herumgewickelten doppelsträngigen DNA-Faden bezeichnet man als Nukleosom, dessen Länge etwa 146 bp entspricht. Bereiche des DNA-Doppelstrangs, die sich zwischen zwei Nukleosomen befinden, werden als Linker-Sequenzen bezeichnet. (Spektrum, Lexikon Biologie). Diese Sequenz kann 20-90 bp umfassen und bei der Spaltung von Chromatin mit dem Nukleosom assoziiert bleiben (Thierry et al., 2016).
Spaltet die Nuklease während der Apoptose die DNA an den Linker-Sequenzen, entsteht ein spezifisches Fragmentverteilungsmuster der cfDNA (siehe Abbildung 2 b). Die Fragmente entsprechen dabei den Multimeren eines Nukleosoms (Mono- und Oligonukleosomen) (Ma et al., 2017). Die Länge der Fragmente kann zwischen 146 bp (Nukleosom) *plus* 20-90 bp (Linker-Sequenz) variieren und entspricht somit einer maximalen Größe von ca. 236 bp bzw. Multiplikanden davon.
Kommt es zu einer nekrotischen Freisetzung der Nukleinsäuren, resultieren hauptsächlich größere DNA-Fragmente ab 1000 bp, die bei der Karyolyse abgegeben

werden (Jahr et al, 2001; Schwarzenbach, 2013). Diese Form des Zelltods läuft im Gegensatz zur Apoptose unkontrolliert ab. Es verbleiben große, degradierte DNA-Fragmente (Amboss, 2019).

Herkunft der cfDNA

Der Großteil der zirkulierenden Nukleinsäuren im Blutplasma (bis zu 90 %) stammt beim Gesunden von hämatopoetischen, also blutbildenden Zellen ab (Arthur et al., 2019; Kustanovich et al., 2019). Da die verschiedenen Blutzellen über eine eher geringe Lebensdauer verfügen, gibt es einen ständigen Wechsel zwischen Zelltod und Erneuerung (Grabuschnig et al., 2020). Einen weiteren, jedoch viel geringeren Anteil liefern Endothelzellen, Neuronen und Hepatozyten (Kustanovich et al., 2019).
Darüber hinaus können Tumorzellen große Mengen an cfDNA freisetzen. Da sich maligne Zellen schnell teilen und über einen regen Metabolismus verfügen, ist der Zellumsatz im und um das Tumorgewebe besonders hoch. Durch das sog. *Microenvironment* des Tumors herrschen in der Umgebung hypoxische Bedingungen, wodurch viele Zellen zu Grunde gehen (Kustanovich et al., 2019).
Zirkulierende Tumorzellen (CTCs) an sich gelten als eine vernachlässigbare Quelle für cfDNA im Vergleich zur gesamten cfDNA (Crowley et al., 2013).

cfDNA und ihre Rolle als Biomarker

Wird nachgewiesen, dass es sich bei der cfDNA, um tumorspezifische DNA handelt, also um DNA, welche direkt aus Tumorzellen abstammt, kann von *circulating **t**umor-DNA* (c**t**DNA) gesprochen werden. Nach dem Review von *Kustanovich et al.* aus 2019 ergibt sich ein sehr variabler Anteil der ctDNA an cfDNA von 0.1-89 % abhängig vom Tumorstadium. Je weiter fortgeschritten die Erkrankung ist, desto höher kann der Anteil an ctDNA sein (siehe weiter unten *Varianz des cfDNA-Spiegels*). Da der Großteil der cfDNA möglicherweise nicht vom Tumor selbst, sondern von gesunden Zellen abstammt, könnten die molekularen Besonderheiten des Tumors also von der DNA aus gesunden Zellen überdeckt und dadurch gar nicht erst detektiert werden. Prinzipiell kann die cfDNA jedoch mehr Information über die Tumorheterogenität liefern, als es die Sammlung einzelner CTCs im Blut bzw. Liquor erlauben würde. Sie kann somit als vielversprechender Biomarker gewertet werden.

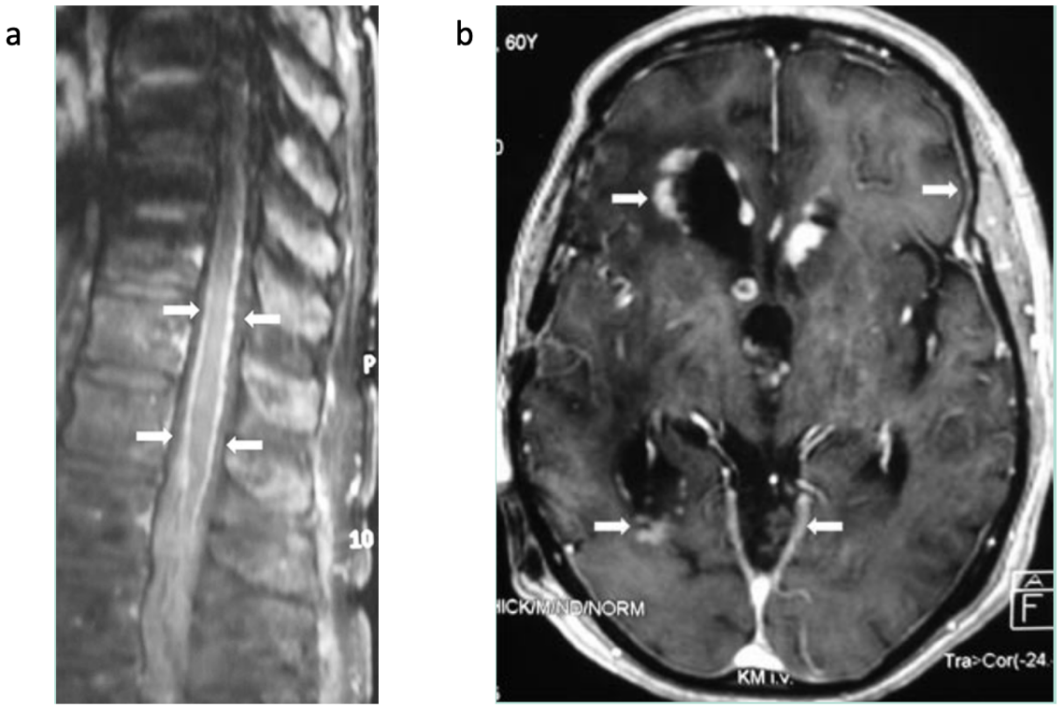


Abbildung 1 *aus Meningeosis neoplastica, Diagnostik und individualisierte Therapie von Strik & Prömmel; der Nervenarzt 2010, © Springer Medizin Verlag 2009:* ***a*** *Die Pfeile deuten auf eine Kontrastmittelanreicherung entlang der Meningen im Spinalkanal im Sinne einer Meningeosis bei einer Patientin mit gesichertem Mammakarzinom.* ***b*** *Auffällige Areale mit Kontrastmittelanreicherung im Bereich der Ventrikel und Meningen im Sinne einer Meningeosis bei einer Patientin mit anaplastischem Oligodendrogliom.*

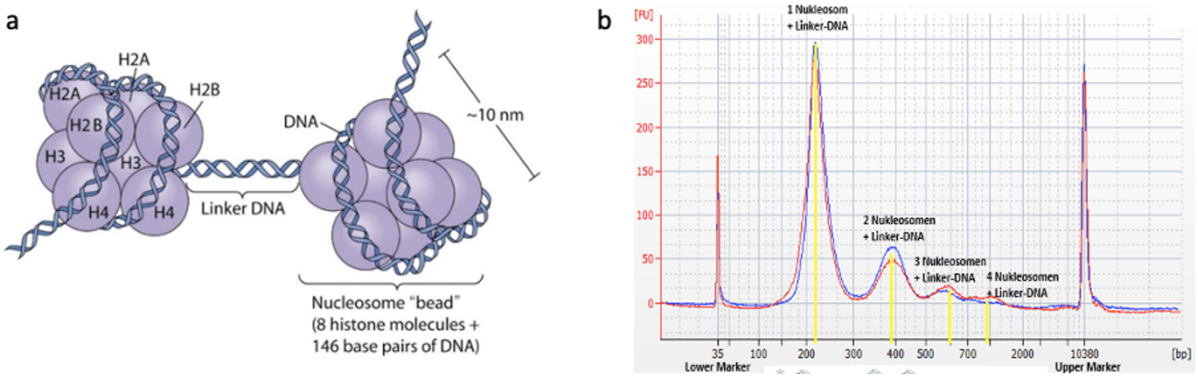


Abbildung 2 a *Reproduziert aus Lu et al., Nucleosome Positioning with Fractal Entropy Increment of Diversity in Telemedicine © 2018 IEEE: Darstellung zweier Histonoktamere und die um sie gewickelte DNA im Zellkern. Der Histonkomplex besteht aus 8 Untereinheiten aus je 2x H2A, H2B, H3 und H4, um die die doppelsträngige DNA gewickelt ist. Der Komplex aus Histonoktamer und DNA-Faden wird als Nukleosom bezeichnet. Die Fragmentlänge der DNA, welche um ein Histon gewickelt ist, entspricht 146 bp. Die Linker-Sequenz kann 20-90 bp umfassen. Ist sie mit dem Nukleosom verbunden, wird der Komplex als Chromatosom bezeichnet. Das Linker-Histon H1 ist auf dieser Grafik nicht dargestellt.* ***b*** *Klassisches Fragmentverteilungsmuster der cfDNA aus zwei Blutplasmaproben dargestellt durch den Bioanalyzer 2100 von Agilent Technologies. Die x-Achse zeigt die Länge der gemessenen Fragmente in Basenpaaren (bp), dabei legen die zwei Marker (Lower und Upper Marker) die Grenzen fest. Die y-Achse stellt die Floureszenzeinheiten (FU) dar. Jede Farbe (Rot bzw. Blau) entspricht einer Probe eines gesunden Probanden. Der erste Peak befindet sich bei ca. 220 bp. Diese Fragmentlänge entspricht dem DNA-Faden, welcher um einen Histonoktamer gewickelt ist (146 bp), dem durch die Amplifikation anligierten Adapter (in diesem Fall 46 bp) plus seiner angehängten Linkersequenz. Werden zwei Nukleosomen durch die Nuklease nicht voneinander getrennt, verdoppelt sich die Fragmentlänge und der Peak befindet sich bei ca. 400 bp. Somit entsprechen die Fragmentlängen den Multimeren der Nukleosomen. Aus der Grafik lässt sich ableiten, dass Mononukleosomen am häufigsten auftreten.*

Varianz des cfDNA-Spiegels

Normalerweise lassen sich im Blutplasma eines Gesunden 0.001-0.01 ng/µl cfDNA nachweisen. Bei Krebspatienten können Werte im Bereich bis zu 1 ng/µl (durchschnittlich 0.180 ng/µl) gemessen werden (Barbany et al., 2019). Bereits 1977 wurde durch *Leon et al*. festgestellt, dass sich mehr cfDNA im Blut von Patienten mit malignen Erkrankungen detektieren lässt. Zum Beispiel besitzen Darmkrebs-Patienten signifikant erhöhte cfDNA-Spiegel im Plasma (Schwarzenbach et al., 2008). Außerdem wurde beobachtet, dass sich die cfDNA-Spiegel nach einer erfolgreichen Behandlung verringerten (Mouliere et al, 2011). Ein hoher Zellumsatz begünstigt die Freisetzung großer Mengen cfDNA. Je größer der Tumor bzw. je mehr maligne Zellen er besitzt, desto höher ist die Menge an nachgewiesener cfDNA (Thierry et al., 2016). Vor allem im fortgeschrittenen, metastasierten Stadium lassen sich große Mengen nachweisen (Bettegowda et al., 2014; Thierry et al., 2016).

Wahrscheinlich ist die Menge an freigesetzter cfDNA auch von der Krebsart abhängig. Zum Beispiel wurden bei fortgeschrittenen Pankreas-, Mamma-, Leber-, Colorektal- oder Gastroduodenaltumoren, sowie bei Melanompatienten hohe cfDNA-Werte im Blut beobachtet. Im Gegensatz dazu waren die cfDNA-Spiegel bei Patienten mit Primärtumoren im Gehirn, Niere oder Schilddrüse niedriger (Bettegowda et al, 2014). Dies könnte sich durch die Blut-Hirn-Schranke oder die Organkapsel um Niere und Schilddrüse erklären lassen (Khier & Lohan, 2018).

Wie lassen sich nun die erhöhten cfDNA-Werte erklären? Die Halbwertszeit der cfDNA im Blut beträgt in der Regel 16 min bis 2.5 Stunden. Die Eliminierung erfolgt entweder durch im Plasma zirkulierende Nukleasen, durch die Aufnahme von Makrophagen in Leber und Milz oder über renale Exkretion (Barbany et al., 2019). Normalerweise werden apoptotische Zellen bzw. Nukleinsäuren schnell aufgeräumt und die Spiegel im Blut bleiben niedrig. Bei pathologischen Prozessen wie beispielsweise einer Entzündung oder einem Tumorgeschehen, kann es zu massivem Zellzerfall kommen. Das Gleichgewicht zwischen cfDNA-Freisetzung und -Eliminierung gerät ins Wanken und die cfDNA akkumuliert (Kustanovich et al., 2019).

Alle dieser Studien beziehen sich auf gemessene Werte im *Blut*, hingegen rar ist die Auswahl an Publikationen, welche über die cfDNA-Spiegel im Liquor von *gesunden* Kontrollgruppen berichtet. Dies rührt daher, dass sich aufgrund der möglicherweise weitreichenderen Risiken nur wenig Probanden für eine medizinisch nicht indizierte Lumbalpunktion zur Verfügung stellen. Eine Studie aus München beschreibt eine

durchschnittliche Konzentration von 3 ng/ml (= 0.003 ng/µl) bei gesunden Probanden. Diese Liquorproben stammen von Patienten, die bei einer elektiven OP eine Spinalanästhesie erhielten (Takousis et al., 2022). Weitere Daten liefert die Publikation von *Kim et al.* aus 2019. Allerdings bestand hier die Kontrollgruppe aus Patienten mit hämatologischen Neoplasien, bei denen letztlich keine Aussaat in die Hirnhäute festgestellt wurde. Die nachgewiesenen Konzentrationen reichen von 5.55 ng/ml (= 0,00555 ng/µl) bis 16.19 ng/ml (= 0.01619 ng/µl) (Kim et al., 2019).
Demgegenüber zahlreich sind die Veröffentlichungen über die cfDNA-Werte im Liquor von Patienten mit neurologischen Erkrankungen, sowie Neoplasien im ZNS-Bereich. Einige wenige werden im Folgenden hier aufgeführt. *Nevel et al.* wiesen bei Patienten mit Meningeosis (Primärtumor Lunge) cfDNA-Werte im Bereich von 0.00393 pg/µl bis 0.562 ng/µl nach (Nevel et al., 2020), *Wu et al.* bei gleichem Krankheitsbild im Median 1.75 ng/ml (= 0.00175 ng/µl) (Wu et al., 2022) und *Angus et. al* bei Patienten mit Meningeosis (Primärtumor Brust) im Median 0.00517 ng/µl (Angus et al., 2021). Bei *Fitzpatrick et al.* zeigten sich Konzentrationen zwischen 0.00398 ng/µl bis 1.363 ng/µl (Fitzpatrick et al., 2022). Diese Studien zeigen, wie stark die cfDNA-Werte variieren können.

Fragmentierung der cfDNA

Wie bereits erwähnt, beträgt die Fragmentgröße der cfDNA bevorzugt 160-200 bp bzw. Multimere davon (Mono- und Oligonukleosomen). Diese sind vor allem bei gesunden Probanden nachweisbar. Im Gegensatz dazu kann cfDNA aus malignen Zellen noch stärker fragmentiert sein. Hier werden häufig Fragmente kleiner als 145 bp nachgewiesen. Wird die DNA nekrotisch freigesetzt, resultieren daraus große cfDNA-Fragmente mit einer Länge von über 1000 bp. Je weiter fortgeschritten und aggressiver der Krebs ist, desto mehr Zellen gehen nekrotisch zu Grunde und setzen große Mengen degradierter DNA frei (Kustanovich et al., 2019). Somit kann die Fragmentgröße bereits einen ersten Hinweis auf das Vorliegen eines Tumorgeschehens geben (Thierry et al.; 2010, Mouliere et al., 2011; Snyder et al., 2016). *Schwarzenbach* et al., beschreibt sogar verschiedene Fragmentationsmuster abhängig vom Tumortyp. Somit würden stark nekrotisierende Tumoren wie beispielsweise das Mammakarzinom vermehrt große DNA-Fragmente freisetzen. Nicht-Karzinome hingegen würden verstärkt kleinere Fragmente sezernieren (Schwarzenbach et al., 2013).

1.4. Exosomen

Definition und Vorkommen

Exosomen sind membranumhüllte extrazelluläre Vesikel (EVs) mit einer Größe von durchschnittlich 100 nm. Sie werden von jeder Zelle sezerniert und erlauben durch den Transport verschiedener Moleküle die Kommunikation der Zellen untereinander. Unter den transportierten Stoffen befinden sich Lipide, Metabolite, zytosolische Proteine, Zell-Oberflächenproteine, als auch Nukleinsäuren (Kalluri & LeBleu; 2020). Diese Art der Verständigung ist essenziell, um als Zelle wachsen oder differenzieren zu können. Sie sind deshalb wichtiger Bestandteil für viele biologischen Prozesse.
Exosomen kommen - ebenso wie die cfDNA – in vielen Körperflüssigkeiten vor. Man kann sie im Blut, Urin, Brustmilch, Fruchtwasser, Samenflüssigkeit, Speichel, Galle, sowie im Liquor nachweisen (Raposo & Stoorvogel, 2013).

Die Entstehung der Vesikel und ihre Aufnahme in die Zielzelle

Die Entstehung der Exosomen beginnt mit der endozytotischen Aufnahme extrazellulären Materials (vergleiche Abbildung 3). Dadurch bildet sich in der Zelle ein frühes Endosom (EE = *early endosome*), das sich durch die Wanderung in Richtung Zellkern zu einem späten Endosom (LE = *late endosome*) weiterentwickeln kann. Durch nach Innen gerichtete Invagination der Endosomenmembran entstehen intraluminale Vesikel (ILV = *intraluminal vesicles*), die Moleküle aus dem Zellinneren enthalten können. Die Endosomen werden nun als multivesikuläre Körperchen (MVB = *multivesicular bodies*) bezeichnet. Diese wandern zur Zelloberfläche, verschmelzen mit dieser und geben die ILVs in Form von Exosomen frei (Kalluri & LeBleu, 2020).
Fusionieren die Endosomen mit Lysosomen, entstehen Endolysosomen. Diese enthalten lysosomale Enzyme (Proteasen, Glykosidasen, Nukleasen, Lipasen) zum Abbau nicht mehr benötigter Zellsubstanzen (Spektrum, Lexikon Biologie, Artikel Lysosomen).
In Abgrenzung zu den Exosomen gibt es noch Mikrovesikel. Diese sind größer als Exosomen (100-1000 nm) und entstehen unabhängig von endosomalen Vorstufen durch Ausstülpungen der Zellmembran (Raposo & Stoorvogel, 2013; Théry et al., 2002). Die Aufnahme in die Empfängerzelle kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Die Plasmamembran des Exosoms kann mit der Membran der Empfängerzelle fusionieren oder das Exosom samt Inhalt wird phagozytotisch aufgenommen (Lin et al., 2015). Ein weiterer Mechanismus ist die Beeinflussung der Zielzelle durch das

Andocken an Oberflächenrezeptoren. Dadurch kann eine Signalkaskade ausgelöst werden (Reiners et al., 2017).

Zusammensetzung der Exosomen

Exosomen besitzen einen hohen Anteil an Lipiden wie Cholesterol, Sphingolipiden, Phospholipiden und Biphosphaten (Lin et al., 2015). Aufgrund ihrer endosomalen Genese können sie je nach Ursprungszelle die unterschiedlichsten Proteine aufweisen (Yáñez-Mó et al., 2015). Am häufigsten detektiert werden Membrantransport- und Fusionsproteine (Szatanek et al., 2015). Zudem wurde nachgewiesen, dass Exosomen zum Transport von Nukleinsäuren dienen (Valadi et al., 2007), insbesondere mRNA, nicht-kodierende RNA, sowie einzel- und doppelsträngige DNA (Kalluri & LeBleu, 2020).

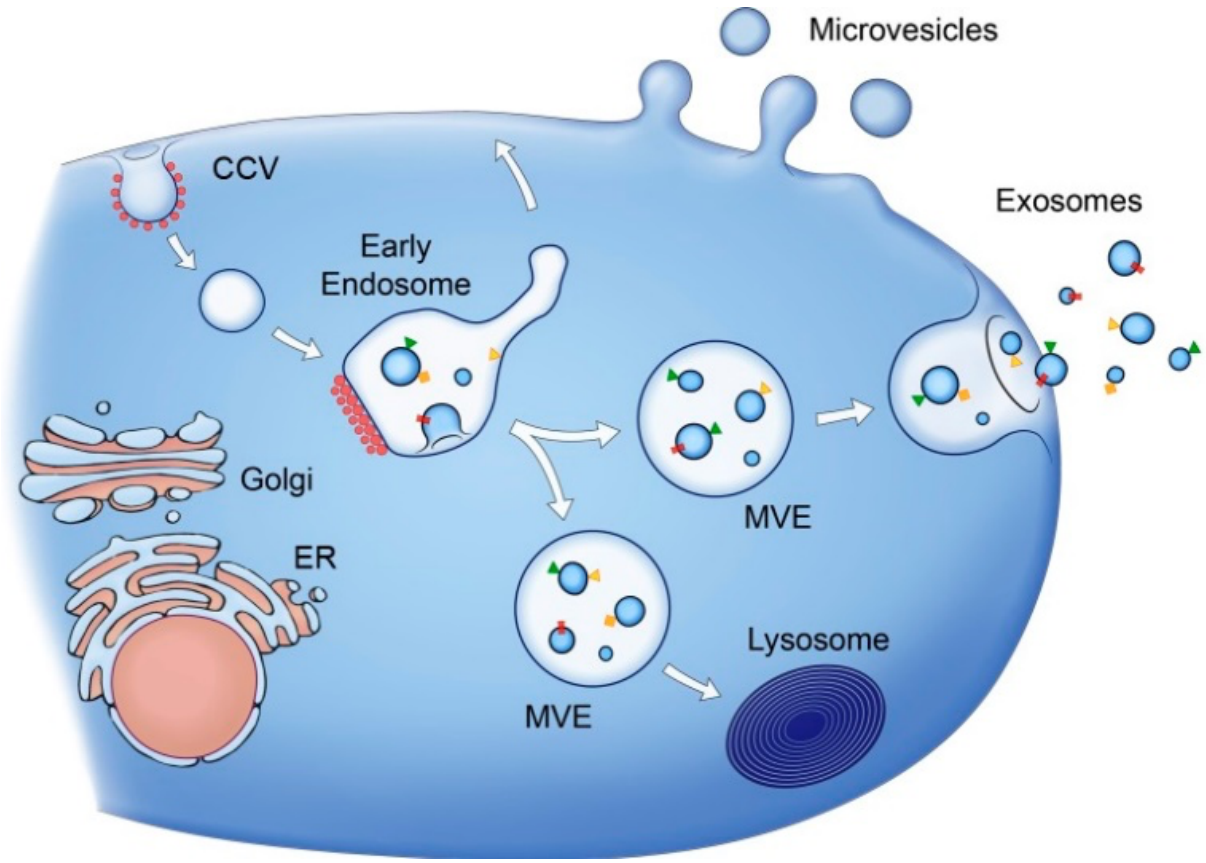


Abbildung 3 *Entstehung und Freisetzung extrazellulärer Vesikel, Darstellung aus Raposo und Stoorvogel, 2013: Die Genese beginnt mit der endozytotischen Aufnahme von Extrazellularmaterial. Dabei ist Clathrin (rote Punkte) beteiligt. Aus dem Clathrin-umhüllten Vesikel (CCV = clathrin coated vesicle) bildet sich ein frühes Endosom (EE = early endosome). Durch nach Innen gerichtete Invagination der Endosomenmembran entstehen multivesikuläre Körperchen (hier nicht als MVBs, sondern als MVEs [= multivesicular endosomes] bezeichnet), die intraluminale Vesikel (ILVs) enthalten. Die ILVs werden nach Fusion der MVEs mit der Zellmembran als Exosomen von der Zelle freigegeben. Die farbigen Drei- und Vierecke stellen Membranproteine dar. Mikrovesikel entstehen unabhängig von endosomalen Vorstufen durch Ausstülpung aus der Zellmembran. MVEs können sich auch zu Lysosomen entwickeln.*

Einen weiteren wichtigen Bestandteil stellen die Tetraspanine CD9, CD63, CD81 und CD82 dar (Szatanek et al., 2015). Es handelt sich um Oberflächenproteine, welche die Lipiddoppelschicht des Vesikels mit vier Transmembrandomänen durchziehen und an der Zelladhäsion, -migration, sowie Membranfusion und Signalübertragung beteiligt sind (Jiang et al., 2015; Andreu & Yáñez-Mó, 2014). Sie dienen als Exosomen-Marker und nehmen eine wichtige Rolle bei der Isolation von Exosomen ein (Lin et al., 2015; Yáñez-Mó et al., 2015). Allerdings sind diese Proteine *nicht spezifisch* für Exosomen (Yáñez-Mó et al., 2015), da sie ubiquitär in Plasmamembranen vorkommen (Andreu & Yáñez-Mó, 2014). Durch den endozytotischen Einschluss der Vesikel während ihrer Genese, werden Tetraspanine an die Exosomen weitergegeben. Dies macht man sich bei deren Isolation zu Nutze. Nach Abtrennung des Zellpellets weisen nur noch die extrazellulären Vesikel die Membranproteine auf. Sie können nun anhand unterschiedlicher Methoden gebunden und dann vom Rest der Probe separiert werden. Allerdings muss bei der Isolation bedacht werden, dass auch Mikrovesikel und andere EVs Tetraspanine besitzen und sich somit die Extraktion einer reinen Subpopulation schwierig gestaltet (Yáñez-Mó et al., 2015).

Ferner können Exosomen Moleküle aufweisen, die auch auf Tumorzellen zu finden sind. Bei EpCAM z.B. handelt es sich um ein epitheliales Zelladhäsionsmolekül (***Ep****ithelial* ***C****ell* ***A****dhesion* ***M****olecule*), welches normalerweise nur auf der Oberfläche von Epithelzellen exprimiert wird. Auch bei Tumoren epithelialen Ursprungs (z.B. Mamma-, Bronchialkarzinom) kann dieses Molekül nachgewiesen werden (Trzpis et al., 2007). Exosomen, die von diesen Tumorzellen abstammen, können dieses Protein ebenfalls auf ihrer Oberfläche exprimieren (Kwizera et al., 2018; Castillo et al., 2018). Gleiches gilt für MCSP (***M****elanoma-associated* ***C****hondroitin* ***S****ulfate* ***P****roteoglycan*), welches von malignen Melanomzellen (Yang et al., 2004) und von ihnen abstammenden Exosomen exprimiert wird (Kang et al., 2020).

Interzelluläre Kommunikation

Exosomen können zelluläre Bestandteile von einer zur nächsten Zelle transportieren und sind somit unerlässlich für deren interzelluläre Kommunikation (Lin et al., 2015). Je nach Ursprungszelltyp variiert ihre Zusammensetzung und somit auch ihr Aufgabenfeld. Es reicht von der Ausscheidung nicht mehr benötigter Moleküle, über immunregulatorische Funktionen (z.B. bei einer Entzündung oder Allergie), bis hin zur

Beeinflussung des zentralen Nervensystems (Raposo und Stoorvogel, 2013) und des Herz-Kreislauf-Systems (Roma-Rodriguez et al., 2014).
Eine vermehrte Sekretion der Exosomen kann durch unterschiedliche Stressoren ausgelöst werden. Sauerstoffmangel, als auch Veränderungen der Temperatur und des pH-Werts können Auswirkungen auf die Exosomenfreisetzung haben. Ebenso oxidativer Stress, Strahlung, Scherbeanspruchung, sowie die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53, können die Zelle dazu veranlassen, mehr Exosomen zu sezernieren (Roma-Rodriguez et al., 2014).

Tumorspezifische Exosomen

Auch Krebszellen sezernieren Exosomen. Sie nutzen die Vesikel, um ihre Ausbreitung voranzutreiben und nehmen daher eine wichtige Rolle für Proliferation, Angiogenese und Metastasierung ein (Rak, 2010; Hood et al., 2011).
Werden sie von gesunden Zellen empfangen, beeinflussen sie das sog. *Microenvironment* des Tumors, also das unmittelbare Umfeld um den Tumor herum. Dem Tumor werden dadurch Nährstoffe und Metabolite für sein Wachstum bereitgestellt. Auch die Architektur der extrazellulären Matrix verändert sich zu Gunsten des Tumors. Nachdem Exosomen die Proteinexpression gesunder Zellen beeinflussen können, werden zum Beispiel vermehrt Metalloproteinasen in das Gewebe sezerniert. Diese Proteine werden normalerweise bei Entzündungen freigesetzt, um das Bindegewebe aufzulockern (Psaila & Lyden, 2009). Auch die Permeabilität der Gefäße kann hiermit erhöht werden (Peinado et al., 2011).
Es wird spekuliert, ob Exosomen auch in der Lage sind, das Immunsystem zu beeinflussen (Zhang & Grizzle, 2011; Whiteside, 2017). Tumorspezifische Exosomen enthalten Moleküle, welche die Immunantwort drosseln, indem sie T-Lymphozyten oder NK-Zellen inaktivieren. Somit bleiben sie vor Angriffen von Immunzellen geschützt (Zhang & Grizzle, 2011). Es ist außerdem ein Feedback-Mechanismus bekannt, bei dem Exosomen aus Brustkrebszellen die Ausschüttung von Vesikeln aus Normalzellen inhibieren, sodass der hemmende Effekt überwiegt (Riches et al., 2014).
Da die Vesikel ein breites Spektrum an Nukleinsäuren und Proteinen besitzen, können tumorspezifische Exosomen wichtige Daten zur molekulargenetischen Zusammensetzung ihres Tumors liefern. Sie haben deshalb großes Potential, als Biomarker zu dienen und stehen daher im Fokus vieler wissenschaftlicher Forschungsgruppen.

1.5. Thematik der Arbeit

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Analyse cfDNA und (tumorspezifischer) exoDNA aus Liquorproben von Patienten mit bzw. mit Verdacht auf *Meningeosis neoplastica*. Folgende Fragestellungen werden in dieser Dissertation behandelt:

- Ist es möglich aus den Proben cfDNA und Exosomen zu isolieren und wenn ja, ist die Qualität und Menge ausreichend für molekulare Analysen wie Gesamtgenomsequenzierung mit geringer Sequenziertiefe?
- Können aus den Proben mit Hilfe epithelialer (EpCAM) und neuroektodermaler (MCSP) Marker auch *tumorspezifische* Exosomen isoliert werden?
- Wie hoch sind die gemessenen Konzentrationen von cfDNA, exoDNA und tumorspezifischer exoDNA im Liquor?
- Liefert bereits die Fragmentgröße der extrahierten DNA Hinweise über deren Herkunft (maligne vs. gesunde Zelle)?
- Gibt uns die Fragmentgröße etwas über den Zelltodmechanismus preis (apoptotisch vs. nekrotisch)?
- Kann durch die Sequenzierung vom Tumor stammende DNA nachgewiesen werden, welche zur Diagnostik der *Meningeosis neoplastica* beitragen könnte?
- Gibt es Unterschiede in den Ergebnissen der Sequenzierung zwischen den verschiedenen Analyten? Und lässt sich daraus ableiten, welcher davon für die Diagnostik am besten geeignet ist?

Die Arbeit soll zeigen, welches Potential in den nicht-zellulären Bestandteilen des Liquors steckt. Zumal disseminierte Tumorzellen aufgrund ihrer meist geringen Anzahl schwer zu isolieren sind, sind cfDNA und exoDNA im Liquor verstärkt vorhanden. Da sie aus einer Vielzahl von Zellen stammen, liefern sie ein breites Spektrum hinsichtlich der Heterogenität eines Tumors.

2.1. Liquorproben

Die Proben stammen aus Lumbalpunktionen der neurologischen und hämatoonkologischen Klinik des Universitätsklinikums Regensburg von Patientinnen und Patienten mit bzw. mit Verdacht auf *Meningeosis neoplastica*.

Die Hälfte des abgenommenen Liquors wurde an die Neuropathologie des Universitätsklinikums gebracht, die andere Hälfte an den Lehrstuhl für Experimentelle Medizin (LEX). Dort wurden die Proben bei 500 g für 5 min zentrifugiert, um das Zellpellet abzutrennen. Für die Analyse der cfDNA und Exosomen wurde der Überstand verwendet. Die Liquorproben wurden bis zu ihrer Verwendung bei - 80 °C weggefroren. Deren Aliquote umfassen Volumina zwischen 0.6-2 ml. Die Vorgehensweise nach Probenerhalt wird in Abbildung 5 *Arbeitsablauf* dargestellt. Eine Übersicht über das Probenkollektiv sowie die zugehörigen Patienteninformationen sind in Tabelle 21 im Anhang zu finden.

2.2. Isolation der cfDNA

Zur Extraktion der cfDNA aus den Liquorproben wurde das QIAmp® Kit *Purification of Circulating Nucleic Acids* von Qiagen verwendet. Das Protokoll besteht aus 4 Schritten: Lyse, Bindung der cfDNA an die Säule, Aufreinigung und Elution.

2.2.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Pipetten mit sterilen Spitzen
- 50 ml Sammelgefäße
- 2 ml Probengefäße
- Heizblock
- Wasserbad
- Eis
- Zentrifuge
- Vortexer

2.2.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 1 *Chemikalien und Reagenzien für die Isolation der cfDNA*

Artikel	Firma
QIAmp® Circulating Nucleic Acid Kit	Qiagen
Ethanol (96-100%)	
Evtl. *PBS*-Puffer	

Abkürzungen Tabelle 1: PBS = Phophate-Buffered Saline

2.2.3. Durchführung

Hinweis: alle im folgenden aufgeführten Reagenzien sind entweder im Kit enthalten oder extra in obenstehender Tabelle 1 gelistet.

Vorbereitungen

Für die Isolation der cfDNA müssen die Überstände aus Liquorproben auf Raumtemperatur gebracht werden. Außerdem wird ein Wasserbad oder ein Heizblock mit einer Temperatur von 60 °C benötigt. Das Protokoll wird für Proben mit 2 ml Volumen verwendet. Dazu werden die Aliquote als erstes bis zum vollen ml mit *PBS*-Puffer aufgefüllt.

Danach muss der Puffer hergestellt werden. Für eine Liquorprobe mit einem Volumen von 2 ml werden 1800 µl *Buffer ACL* und 5.6 µl *Carrier-RNA* in ein 50 ml Probengefäß pipettiert. Die *Carrier-RNA* sorgt dafür, dass die Nukleinsäuren später möglichst vollständig an die Membran der Säule binden können.

Lyse

Da die freien Nukleinsäuren normalerweise an Proteine oder Vesikel gebunden vorliegen, ist ein Lyseschritt zu deren Abtrennung notwendig. Hierfür werden in ein weiteres 50 ml Probengefäß 200 µl QIAGEN Proteinase K, 2 ml der Liquorprobe (bzw. die Liquorprobe + *PBS*-Puffer), sowie 1600 µl des vorbereiteten *ACL Buffers*, welcher bereits die *Carrier-RNA* enthält, überführt. Anschließend wird die hergestellte Lösung 30 s lang intermittierend gevortext. Danach folgt die Inkubation der Probe bei 60 °C im Wasserbad oder im Heizblock für 30 min.

Bindung und Aufreinigung

Als nächstes wird 1800 µl *Buffer ACB* zum Lysat gegeben und erneut intermittierend 15-30 s gevortext. Anschließend wird die Probe für 5 min auf Eis gestellt, um die Reaktion zu beenden.

Um die cfDNA nun von Verunreinigungen zu befreien, sind zunächst mehrere Schritte zur Bindung der cfDNA an die Silikatmembran des Säulengefäßes notwendig. Hierfür wurde abweichend von der Anleitung des QIAmp® Kits keine Vakuumpumpe, sondern eine Zentrifuge verwendet, welche zum selben Ergebnis führt. Dabei erfolgt die Zentrifugation bei 1000 g für 2 min. Nachdem in das Säulengefäß nur ca. 700 µl der Probe passen, muss der Zentrifugationsschritt mit Verwerfen des Überstands so lange wiederholt werden, bis keine Probe mehr übrigbleibt. In diesem Fall 10 Mal. Jetzt liegt die cfDNA im Säulengefäß gebunden an der Silikatmebran vor.

Für die Aufreinigung wird auf die Säule als erstes 600 µl *Buffer ACW1* aufgetragen und bei 1000 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand kann verworfen werden. Danach erfolgt ein weiterer analoger Waschschritt mit 750 µl *Buffer ACW2*.

Um die cfDNA zu trocknen, werden auf die Säule 750 µl Ethanol aufgetragen und ein weiteres Mal bei 1000 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand kann wieder verworfen und die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß überführt werden. Es folgt eine Zentrifugation mit voller Geschwindigkeit bei 17000 g für 3 min, um verbliebene Flüssigkeitsreste zu entfernen. Nochmals wird die Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß gegeben und mit offener Kappe bei 56 °C in einen Heizblock für 10 min inkubiert. Dadurch soll die cfDNA vollständig getrocknet werden.

Elution

Zum Schluss wird die Säule in ein sauberes 1.5 ml Elutionsgefäß überführt, vorsichtig 20 µl *Buffer AVE* in die Mitte der Membran pipettiert und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch lösen sich die Nukleinsäuren von der Membran und die cfDNA befindet sich in der Pufferlösung. Um die extrahierte DNA in das 1.5 ml Probengefäß zu befördern, wird ein letztes Mal mit voller Geschwindigkeit bei 17000 g für 1 min zentrifugiert. Die isolierte DNA kann bei -20 °C weggefroren werden.

2.3. Fluorometrische Quantifizierung von DNA-Molekülen mittels Qubit™

Um festzustellen, ob und wie viele doppelsträngige DNA-Moleküle sich nach der Extraktion im Probengefäß befinden, wird eine Qubit™-Messung durchgeführt. Der im Kit enthaltene DNA-Farbstoff interkaliert sehr schnell in den Doppelstrang der DNA. Zur Messung wird ein Standard bekannter Konzentration verwendet, durch den die Konzentrationsbestimmung der Probe erfolgt.

2.3.1. Geräte und Verbrauchsmaterialen

- 0.5 ml Probengefäße
- Pipetten mit sterilen Spitzen
- Vortexer
- Lichtundurchlässige Schachtel z.B. aus Metall
- Qubit™ 2.0 Fluorometer von Thermo Fisher

2.3.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2 *Chemikalien und Reagenzien für die Qubit*

Artikel	Firma
Qubit® dsDNA High Sensitive Assay Kit (für Messungen im Mengenbereich 2-100 ng/µl)	Invitrogen

2.3.3. Durchführung

Hinweis: alle im folgenden aufgeführten Reagenzien sind im Kit enthalten.

Zuerst müssen alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht werden. Für jede Messung werden zwei Probengefäße für die Standards benötigt, welche die obere (#2) und die untere (#1) messbare Grenze vorgeben, sowie jeweils ein Gefäß je Probe. Da es sich um einen lichtempfindlichen Farbstoff handelt, muss unter abgedunkelten Bedingungen gearbeitet werden und die Proben nach dem Pipettieren in einer lichtundurchlässigen Schachtel verwahrt werden, bis die Messung erfolgt.

Für die Standards werden jeweils 190 µl *Qubit Reagent DMSO* in ein 0.5 ml Probengefäß pipettiert. Von jedem Standard werden jeweils 10 µl hinzugefügt. Für die Probe werden 199 µl *Qubit Reagent DMSO* und 1 µl der zu messenden Probe verwendet. Die Proben werden kurz gevortext und bis zur Messung in der Schachtel verwahrt. Um das Fluorometer für die Messung verwenden zu können, müssen zuerst

die beiden Standards kalibriert werden. Danach errechnet das Gerät anhand dieser die Konzentration der Probe. Alle gemessenen Konzentrationen der Versuchsreihe finden sich in einer gesammelten Tabelle im Anhang (Tabelle 19).

2.4. cfDNA-Amplifikation

Um genügend DNA-Menge für die Sequenzierung zu erhalten, muss die DNA zunächst vervielfältigt werden. Das hier angewendete Protokoll ermöglicht es, geringe Mengen an cfDNA für die abschließende Analyse von Kopienzahlaberrationen (CNAs) mittels Ampli1™ *LowPass*-Sequenzierung vorzubereiten. Verwendete Reagenzien werden in Tabelle 3 gelistet. Im Prinzip werden als erstes die Enden der bereits fragmentierten cfDNA so präpariert, dass sie im nächsten Schritt an den zuvor hergestellten *Adapter* ligiert werden können. Da bei der Amplifikation nur ein einziger, zur Linker-Sequenz komplementäter *Primer (Lib1)* verwendet wird, bindet dieser an alle Fragmente mit derselben Spezifität und ermöglicht dadurch eine weitgehend gleichmäßige Amplifikation. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte genauer erläutert.

2.4.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Pipetten mit sterilen Spitzen
- 0.2 ml und 1.5 ml Probengefäße
- Magnetständer DynaMag™ von Invitrogen für 0.2 ml Probengefäße
- Thermocycler

2.4.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3 *Chemikalien und Reagenzien für die Amplifikation*

Artikel	Firma
KAPA HyperPrep Kit	Roche
Tris-HCl (pH 8)	
10x OPA-Buffer (pH 7.5)	
Lib1	metabion
PCR-H_2O	VWR-International
BSA (20 mg/ml)	Roche Diagnostics
dNTPs (10 mM)	Roche Diagnostics
PolMix (5 U/µl)	metabion
Agencourt AMPure XP Beads	Beckman Coulter

Abkürzungen Tabelle 3: Tris-HCl = Trishydroxymethylaminomethan Hydrochlorid; OPA =One Phor All; Lib1 = Library Adapter 1; PCR = Polymerase chain reaction; H_2O = Diwasserstoffmonoxid, entspricht Wasser; BSA = Bovines Serumalbumin; dNTPs = Desoxynukleosidtriphosphat

Tabelle 4 *Eigenschaften der Oligonukleotide*

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')	Annealing-Temperatur
Lib1	TA AGT GGG ATT CCT GCT GTC AGT	65 °C
ddMse11	TAA CTG ACA G-ddC	65 °C

Abkürzungen Tabelle 4: A = Adenin; G = Guanin; C = Cytosin; T = Thymin; dd = didesoxy

2.4.3. Durchführung

Vorbereitung der DNA für die Amplifikation

Da die cfDNA bereits fragmentiert vorliegt, ist bei dieser Amplifikation kein zusätzlicher Fragmentierungsschritt notwendig. Somit werden als erstes die Enden der cfDNA für das Anhängen des *Lib1-Adapters* kompatibel gemacht. Dafür müssen die Enden repariert und ein Poly(A)-Schwanz angehängt werden. Dies gelingt mit dem im *KAPA Hyper Prep Kit* enthaltenen *End-Repair and A-Tailing Buffer,* sowie den dazugehörigen Enzymen.

Für die Amplifikation sollte eine cfDNA-Menge von ca. 1.5 - 2 ng verwendet werden. Durch die vorausgegangene Konzentrations-Bestimmung der Proben durch die Qubit™-Messung (siehe Punkt 2.3.), kann ausgerechnet werden, wie viel Volumen von jeder Probe benötigt wird. Das Protokoll fordert ein Probenvolumen von 25 µl. Da bereits wenige µl der Probe für die Amplifikation ausreichend sind, kann der Rest mit Tris-HCl Puffer aufgefüllt werden. Untenstehender Ansatz (Tabelle 5) wird für 30 min bei 20 °C und danach 30 min bei 65 °C im Thermocycler inkubiert.

Tabelle 5 *Vorbereitung der DNA für die Amplifikation*

Vorbereitung der DNA	Eingesetzte Menge je Probe
cfDNA	x µl
Tris-HCl	25-x µl
End Repair & A-Tailing Buffer	3.5 µl
End Repair & A-Tailing Enzyme	1.5 µl
Gesamt:	**30 µl**

Herstellung des *Lib1-Adapters*

Nachdem gerade die Enden der DNA im Thermocycler vorbereitet werden, kann als nächstes mit der Herstellung des *Lib1-Adapters* begonnen werden. Dieser besteht aus

dem Primer selbst und dem Oligonukleotid ddMse11. ddMse11 bindet an den Poly(A)-Schwanz der cfDNA und ist gleichzeitig komplementär zu *Lib1*. Es bildet daher eine Art Brücke zwischen der cfDNA und *Lib1*. Das didesoxy-C am 3'-Ende von ddMse11 verhindert dessen Verlängerung, das fehlendes Phosphat am 5'-Ende beugt einer Ligation von ddMse11 mit der cfDNA vor. Im ersten PCR-Zyklus denaturiert der *Adapter* und ddMse11 spielt für die weitere Amplifikation keine Rolle mehr.
Für die Herstellung des *Adapters* wird nach der in Tabelle 6 gelisteten Reagenzien ein Mix erstellt, der anschließend ebenfalls im Thermocycler mit untenstehendem Programm (Tabelle 7) inkubiert wird. Dabei wird in 50 Schritten die Temperatur von 65°C langsam um 1 °C/min gesenkt, sodass ein möglichst reines Produkt entsteht.

Tabelle 6 *Reagenzien zur Herstellung des Lib1-Adapters*

Lib1-Adapter	Eingesetzte Menge je Probe
Lib1 (100 µmol)	0.5 µl
ddMse11 (100 µmol)	0.5 µl
OPA Buffer	0.5 µl
PCR- H_2O	1.5 µl
Gesamt:	**3 µl**

Tabelle 7 *Thermocycler-Programm Lib1-Adapter*

	Zyklen	Temperatur	Dauer	Programm
1.		65 °C	1 min	
2.	50c	-1 °C/c	1 min	
3.		4 °C	*forever*	

Abkürzungen Tabelle 7: c = cycle, Zyklus

Ligation der *Lib1-Adapter* an die vorbereitete DNA

In diesem Schritt wird der soeben hergestellte *Lib1-Adapter* an die Enden der vorbereiteten cfDNA ligiert. Dafür wird untenstehender Ansatz (Tabelle 8) im Thermocycler über Nacht bei 15 °C inkubiert.

Tabelle 8 *Reagenzien für die Ligation des Lib1-Adapters an die vorbereitete cfDNA*

Ligation *Lib1-Adapter*	Eingesetzte Menge je Probe
End-Repair und *A-Tailing* Produkt (aus Schritt 1)	30 µl
Lib1-Adapter (16 µM) (aus Schritt 2)	2.5 µl
Ligation-Buffer	15 µl

DNA-Ligase		5 µl
PCR-H_2O		2.5 µl
	Gesamt:	**55 µl**

Amplifikation

Am nächsten Tag werden 66 µl *AMPure XP Beads* (1.2-faches Volumen des Ansatzes aus Tabelle 8) in jede Probe gegeben, gevortext, abzentrifugiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den hier verwendeten *AMPure XP Beads* handelt es sich um sog. *SPRI Beads* (*Solid Phase Reversible Immobilization-Beads*), welche Nukleinsäuren über Carboxylgruppen an paramagnetische *Beads* binden können. Werden die Proben im Anschluss für 2 min in einen Magnetständer gestellt, erfolgt eine Trennung der Nukleinsäuren von den vorher verwendeten Reagenzien. Die *Beads* samt Nukleinsäuren werden am Gefäßrand fixiert. Dies ermöglicht eine Aufreinigung der DNA, dessen Prinzip in Abbildung 4 a genauer erläutert wird. Dafür wird zuerst der klare Überstand vorsichtig abpipettiert (ca. 180 µl), ohne dabei die *Beads* zu berühren. Im Anschluss daran werden für max. 30 Sekunden 180 µl 80 %-iger Ethanol zu den Proben gegeben. Der Waschschritt mit Ethanol wird ein weiteres Mal wiederholt. Nun werden die Proben mit offener Kappe 2 min stehen gelassen, um letzte Ethanolreste verdampfen zu lassen.

Jetzt können in jede Probe 50 µl des aus Tabelle 9 generierten *PCR*-Amplifikations-Mix gegeben werden. Um eine gleichmäßig braun getrübte Lösung zu erhalten, müssen die Proben kräftig gevortext werden. Es folgt eine *PCR* im Thermocycler nach dem Protokoll in Tabelle 10, wobei die Schritte 3-5 17 Zyklen durchlaufen.

Tabelle 9 *PCR-Amplifikations-Mix*

PCR-Amplifikations-Mix		Eingesetzte Menge je Probe
Buffer 1 (10X)		5 µl
Lib1 (10 µM)		5 µl
dNTPs (je 10 mM)		1.75 µl
BSA (20 mg/ml)		1.25 µl
PolMix (5 U/µl)		1 µl
PCR-H_2O		37 µl
	Gesamt:	**51 µl**

Tabelle 10 *Thermocycler-Programm Amplifikation*

	Zyklen	Temperatur	Dauer	Programm
1.		68 °C	5 min	
2.		95 °C	45 s	
3.	17 c	95 °C	15 s	Denaturierung
4.		60 °C	30 s	Anlagerung
5.		68 °C	30 s	Elongation
6.		63 °C	3 min	
7.		4 °C	*forever*	Kühlung

Nach der Amplifikation können bei Bedarf „festgebackene“ *Beads* vorsichtig mit einer Pipettenspitze vom Gefäßboden entfernt und durch kräftiges Vortexen wieder in Lösung gebracht werden. Anschließend werden 125 µl PEG-NaCl (Polyethylenglykol-NaCl) dazu gegeben und die Proben bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. PEG-NaCl sorgt dafür, dass sich die DNA fest zusammenknäult, sodass die DNA während des Vorgangs fest an die *Beads* gebunden vorliegt und sich nicht davon löst.
Um die Proben ein weiteres Mal mit Ethanol waschen zu können, müssen sie zuerst für 2 min in den Magnetständer gestellt werden, sodass sich die DNA, gebunden an die *Beads*, wieder am Gefäßrand befindet und die Proben erneut mit Ethanol aufgereinigt werden können (siehe oben).

Eluieren der cfDNA

Um zum Schluss die amplifizierte cfDNA von den *Beads* zu lösen, werden 20 µl H_2O ins Probengefäß gegeben und kräftig gevortext. Da Wasser eine größere Ladungsmenge als die Carboxylgruppen der *Beads* besitzt, trennen sich die Nukleinsäuren davon. Die cfDNA befindet sich nun in Lösung. Werden die Proben ein letztes Mal in den Magnetständer gestellt, werden alleinig die *Beads* magnetisch an das Probengefäß gebunden. Da die Nukleinsäuren im Überstand verbleiben, kann dieser abpipettiert und in ein neues 0.5 ml Probengefäß überführt werden. Inwiefern sich die DNA-Menge vervielfacht hat, zeigt eine weitere quantitative Messung mit Hilfe des Qubit™ 2.0 Fluorometers (siehe 2.3.; Ergebnisse siehe Tabelle 21 im Anhang). Ob es sich bei der extrahierten DNA tatsächlich um cfDNA handelt, zeigt das Fragmentverteilungsmuster, das durch Analyse mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer erhalten werden kann (siehe 2.5.).

2.5. Qualitätskontrolle mittels Agilent 2100 Bioanalyzer *High Sensitivity*

Mit Hilfe des Bioanalyzers kann die Fragmentlängenverteilung der doppelsträngigen DNA untersucht werden, um eine Aussage bezüglich der Probenqualität zu erhalten. Der Bioanalyzer entspricht einer semi-automatisierten Gelelektrophorese, welcher die durchschnittliche Länge *(= average size)* der Amplikons misst. Mit Hilfe des *High Sensitivity Chips* wird eine Detektion von dsDNA-Fragmenten in einem Größenbereich von 35 bis 10.800 bp ermöglicht.

2.5.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Pipetten mit sterilen Spitzen
- Vortexer
- *Chip priming station*
- Agilent 2100 Bioanalyzer von Agilent Technologies

2.5.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 11 *Chemikalien und Reagenzien für den Bioanalyzer*

Artikel	Firma
High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies
High Sensitivity DNA reagents	Agilent Technologies
PCR-H_2O	VWR-International

2.5.3. Durchführung

Alle Reagenzien müssen vor Beginn auf Raumtemperatur gebracht werden. Da die amplifizierte cfDNA eine sehr hohe Ausgangskonzentration von ca. 20-80 ng/µl aufweist, müssen die Proben für den Bioanalyzer auf 2 ng/µl verdünnt werden. Für die Herstellung der Verdünnungen kann Wasser verwendet werden. Anschließend wird nach dem Protokoll *Bioanalyzer HS Kit* verfahren und der Lauf für die Messung gestartet.

2.5.4. Auswertung

Nach der Messung werden von der Agilent 2100 Expert Software Diagramme erstellt, anhand deren die Größenverteilung der dsDNA-Amplikons ausgelesen werden kann.

Um die Proben eines Chips auswerten zu können, muss vorher sichergestellt werden, dass alle 15 *Peaks* des Größenstandards zwischen dem oberen (*Upper Marker* bei 10380 bp) und dem unteren Marker (*Lower Marker* bei 35 bp) liegen.
Die Proben in dieser Arbeit wurden anhand ihres Profils in verschiedene Kategorien eingeteilt: Wies es ein klassisches nukleosomales Fragmentverteilungsmuster auf, wurde es direkt für die Erstellung der DNA-*Libraries* mit anschließender Gesamtgenomsequenzierung mit geringer Sequenziertiefe verwendet. Enthielt die cfDNA auch hohe Anteile an längeren Fragmenten, wurde die Probe vor der Sequenzierung mit Hilfe von paramagnetischen *Beads* in zwei Fraktionen (</> 700 bp) aufgetrennt (2.6.).

2.6. Fragmentauftrennung (</> 700 bp) cfDNA mit Hilfe paramagnetischer *SPRI Beads*

Um ergänzend zu untersuchen, ob die ctDNA bevorzugt unter den größeren oder kleineren Fragmenten zu finden ist, wurde ein Teil der cfDNA-Proben in zwei Fraktionen (< 700 bp und > 700 bp) aufgetrennt. Hierfür wurden ausschließlich oben genannte Proben verwendet, welche auch einen erhöhten Anteil an langen Fragmenten aufwiesen.
Die Auftrennung erfolgte ebenfalls mit Hilfe paramagnetischer *SPRI-Beads*, die zuerst die größeren und anschließend die kleineren Fragmente abtrennte. Dies gelang dadurch, dass unterschiedliche Mengen an *Beads* verwendet wurden. Im Allgemeinen gilt: je mehr von der *Bead*-Suspension verwendet wird, desto mehr und besser werden kleinere Fragmente gebunden, und umgekehrt (vergleiche Abbildung 4 b). Zum Beispiel wurden am Anfang nur das 0.5-fache des Probenvolumens an *Bead*-Suspension verwendet, dadurch erhielt man die größeren Fragmente > 700 bp. Die kleineren Fragmente befinden sich dann im Überstand, welcher abgenommen und in ein neues Probengefäß überführt wird. Nach einer Aufreinigung mit Ethanol, wurden beide Fraktionen erneut mit dem Qubit™ 2.0 Fluorometer quantifiziert und die Fragmentauftrennung am Agilent 2100 Bioanalyzer auf Erfolg überprüft (siehe Beispiel Abbildung 4 c). Alle Profile sind vor und nach der Fragmentauftrennung im Anhang gelistet.

2.6.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Pipetten mit sterilen Spitzen
- 0.2 ml Probengefäße
- Vortexer
- Tischzentrifuge
- Magnetständer DynaMag™- 96 Side von Invitrogen für 0.2 ml Probengefäße
- Qubit™ 2.0 oder 3.0 Fluorometer von Thermo Fisher
- Agilent 2100 Bioanalyzer von Agilent Technologies

2.6.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 12 *Chemikalien und Reagenzien für die Fragmentauftrennung der cfDNA*

Artikel	Firma
SPRIselect beads	Beckman Coulter
NGS-H_2O	VWR-International
dsDNA HSAssay Kit	Thermo Fisher
High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies
Ethanol (80%)	

Abkürzungen Tabelle 12: SPRI = Solid Phase Reversible Immobilization-Beads; NGS = Next Generation Sequencing

2.6.3. Durchführung

Fragmentauftrennung innerhalb eines Probengefäßes

Von den aus 2.4. generierten Amplifikaten wird 10 µl Probenvolumen entnommen und in ein neues 0.2 ml Probengefäß überführt. Um das Volumen zu vergrößern, werden 10 µl *NGS*-H_2O hinzugefügt. Anschließend werden 10 µl (0.5-fache des jetzigen Probenvolumens) der *Bead*-Suspension zugegeben. Nach untenstehender Grafik in Abbildung 4 b werden durch diese gezielt zugesetzte Menge überwiegend größere Fragmente paramagnetisch gebunden. Die entstandene Suspension wird ausreichend gevortext und danach kurz abzentrifugiert. Daraufhin werden die Proben zuerst 5 min bei Raumtemperatur in einem normalen Ständer und daraufhin 5 min in einem Magnetständer inkubiert. Jetzt liegen die größeren Fragmente der cfDNA (> 700 bp) an die *Beads* gebunden am Rand des Probengefäßes vor und die kleineren verbleiben im Überstand. Dieser wird abgenommen und in ein neues 0.2 ml Probengefäß überführt.

Abtrennung und Aufreinigung der Fragmente > 700 bp

In das Probengefäß mit den *Beads* werden zur Aufreinigung 40 µl 80 %-iger Ethanol für 30 s hinzugegeben und wieder abgenommen. Dieser Schritt wird noch einmal wiederholt und die Proben im Anschluss daran mit offener Kappe für 2 min stehen gelassen, um letzte Ethanolreste verdampfen zu lassen. Um die DNA zu eluieren, wird 15 µl *NGS*-H_2O hinzugegeben, die Probe gevortext und kurz abzentrifugiert. Nun werden die Proben erneut 5 min bei Raumtemperatur und anschließend 5 min im Magnetständer inkubiert. Jetzt befinden sich die aufgereinigten größeren Fragmente im Überstand. Dieser kann abgenommen und in ein neues 0.2 ml Probengefäß überführt werden.

Aufreinigung der Fragmente < 700 bp

Um die Proben mit den kleineren Fragmenten aus dem anfangs generierten Überstand von Rückständen zu befreien, werden 36 µl *Bead*-Suspension zugegeben. Dies entspricht dem 1.2-fachen des ursprünglichen Probenvolumens aus 10 µl Ausgangsprobe, 10 µl *NGS*-H_2O und 10 µl *Bead*-Suspension. Mit dieser Menge an *Beads* können alle übrig gebliebenen DNA-Fragmente gebunden werden.
Die Proben werden im Anschluss gevortext, kurz abzentrifugiert und anschließend erst 5 min bei Raumtemperatur und daraufhin 5 min im Magnetständer inkubiert. Nun haften die restlichen Fragmente der cfDNA (in diesem Fall die Fragmente < 700 bp) über die *Beads* am Rand des Probengefäßes. Jetzt können die Proben analog zu den größeren Fragmenten mit Ethanol gereinigt und zum Schluss in 15 µl *NGS*-H_2O eluiert werden.

2.6.4. Auswertung

Beide Probengefäße werden wieder mit Hilfe dem Qubit™ 2.0 Fluorometer quantifiziert und die Fraktionierung am Agilent 2100 Bioanalyzer untersucht. Die Auftrennung war erfolgreich, wenn sich untenstehendes Profil (Abbildung 4 c) zeigt. Aus den beiden Fraktionen einer Patientenprobe können nun *Libraries* für die Gesamtgenomsequenzierung erstellt werden (siehe 2.8.).
Sind die Konzentrationen der Fraktionen aufgrund der Auftrennung zu gering (< 2 ng/µl), können diese mit Hilfe des *SpeedVac* aufkonzentriert und/oder vorher reamplifiziert (siehe 2.7.) werden.

2.7. Reamplifikation

Ist die Konzentration der Proben nach Fraktionierung viel zu gering für die Herstellung von Sequenzier-*Libraries* (< 2 ng/µl), können diese vorher reamplifiziert werden. Hierfür wird das gleiche Amplifikationsprotokoll, jedoch ohne magnetische *SPRIselect Beads* aus 2.4. verwendet. Da die Proben nach der Reamplifikation nicht aufgereinigt werden, darf für die Erstellung der *Libraries* in 2.8. nicht auf Schritt 1 verzichtet werden.

2.7.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Pipetten mit sterilen Spitzen
- 0.2 ml und 1.5 ml Probengefäße
- Thermocycler

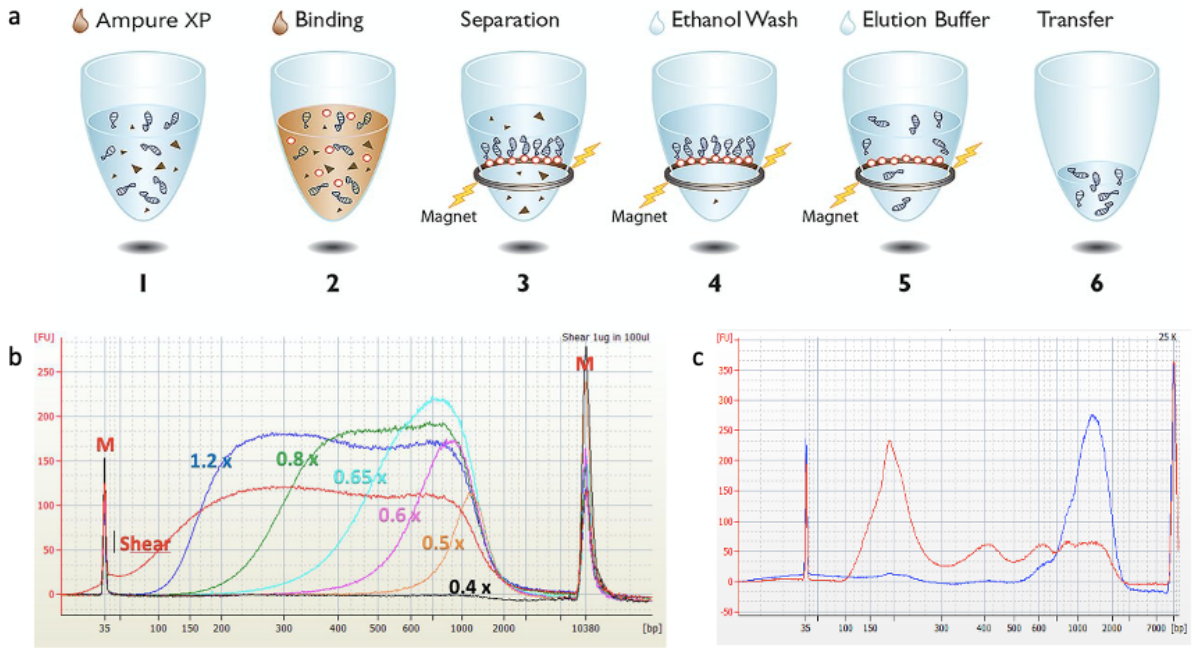


Abbildung 4 a *aus Instructions for Use, Agencourt AMPure XP – PCR Purification von © Beckman Coulter, 2016.: Aufreinigung der cfDNA mit Hilfe der AMPure XP Beads von Beckman Coulter. Die Beads binden spezifisch die Nukleinsäuren in der Probe (2). Werden die Proben in den Magnetständer gestellt, erfolgt die Trennung der Nukleinsäuren von den restlichen Reagenzien aus den vorherigen Schritten. Nachdem nun die cfDNA paramagnetisch am Rand des Probengefäßes haftet, kann der Überstand, welcher die Verunreinigungen enthält, einfach abpipettiert werden (3). Nach einem Waschschritt mit Ethanol (4), erfolgt die Elution der Nukleinsäuren von den Beads mit Hilfe von Wasser. Werden die mit Wasser versetzen Proben nun erneut in den Magnetständer gestellt, haften alleinig die Beads (5). Der Überstand enthält jetzt die aufgereinigte cfDNA und kann in ein neues Probengefäß überführt werden (6).* ***b*** *Size Selection aus SPRIselect User Guide von © Beckman Coulter; Oktober 2012. Je mehr von der Bead-Suspension verwendet wird, desto mehr kleinere Fragmente werden paramagnetisch gebunden und umgekehrt. Wird z.B. nur 0.5-fache des Probenvolumens an Beads hinzugegeben, erhält man hauptsächlich Nukleinsäuren mit einer Fragmentlänge > 700 bp.* ***c*** *Beispiel für die erfolgreiche Auftrennung der größeren Fragmente (Blau) von den kleineren (Rot). Grafik erstellt durch den 2100 Agilent Bioanalyzer High Sensitive Assay von Agilent Technologies.Die x-Achse gibt die Fragmentlänge in bp an. Die y-Achse, die vom Bioanalyzer gemessene Spannung in Floureszenzeinheiten (FU). Die zwei Marker (Lower und Upper Marker) legen die untere (bei 35 bp) und die obere (bei 10380 bp) messbare Grenze fest.*

2.7.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 13 *Chemikalien und Reagenzien für die Reamplifikation*

Artikel	Firma
Buffer 1 (10X)	
Lib1 (10 µM)	metabion
NGS-H_2O	VWR-International
BSA (20 mg/ml)	Roche Diagnostics
dNTPs (10 mM)	Roche Diagnostics
PolMix (5 U/µl)	metabion

2.7.3. Durchführung

Als erstes wird nach untenstehender Tabelle ein Mix für die Reamplifikation hergestellt. Für jede Probe werden 14 µl des Gemisches in ein 0.2 ml Probengefäß überführt. Insgesamt ist für die Amplifikation eine DNA-Menge von 1.5-2 ng erforderlich. Somit wird von jeder Probe unterschiedlich viel Probenvolumen eingesetzt. Die zugegebene Menge an Wasser für jede Probe berechnet sich individuell aus 37 µl minus dem verwendeten Probenvolumen. Nach Vortexen und Abzentrifugieren können die Proben im Thermocycler mit demselben Protokoll inkubiert werden, welches auch für die Amplifikation in Schritt 2.4. verwendet wurde (siehe Tabelle 10). Die Proben können nun erneut mit dem Qubit™ 2.0 Fluorometer quantifiziert werden.

Tabelle 14 *Amplifikationsmix für die Reamplifikation*

PCR-Amplifikations-Mix	Eingesetzte Menge je Probe
Buffer 1 (10X)	5 µl
Lib1 (10 µM)	5 µl
dNTPs (je 10 mM)	1.75 µl
BSA (20 mg/ml)	1.25 µl
PolMix (5 U/µl)	1 µl
Gesamt:	**14 µl**

2.8. Vorbereitung der *Libraries* für die Gesamtgenomsequenzierung mit geringer Sequenziertiefe (*low pass*-Sequenzierung)

Eine *low pass*-Sequenzierung ermöglicht es, die Kopienzahlaberrationen (*CNAs* = *copy number alterations*) des kompletten Genoms zu analysieren. Sie gibt Auskunft über *Gains* (Kopien-Zugewinne) und *Losses* (Kopien-Verluste) von Chromosenabschnitten oder sogar ganzen Chromosomen. Treten solche

Kopienzahlaberrationen auf, ist dies ein Hinweis für das Vorliegen von Tumor-DNA, da gesunde Zellen einen diploiden Chromosomensatz besitzen (siehe weiter unten). Bevor eine Sequenzierung durchgeführt werden kann, müssen aus den Amplifikaten (aus Schritt 2.4.) sogenannte *Libraries* erstellt werden. Dabei wird jedes Amplifikat mit einer bestimmten Kombination aus Indexprimern versehen. Dieser Schritt ist notwendig, da vor dem Sequenziervorgang mehrere Proben in einem Gefäß vereinigt (gepoolt) und bei der Auswertung wieder zur Probe zugeordnet werden müssen. Für die Erstellung der *Libraries* wurde das *Ampli1® LowPass Kit* für Illumina® von Menarini Silicon Biosystems S.p.A. verwendet.

2.8.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Pipetten mit sterilen Spitzen
- 0.2 ml und 1.5 ml Probengefäße
- Vortexer
- Tischzentrifuge
- Thermocycler
- Magnetständer DynaMag™- *96 Side* von Invitrogen für 0.2 ml Probengefäße
- Qubit™ 2.0 oder 3.0 Fluorometer von Thermo Fisher
- Agilent 2100 Bioanalyzer von Agilent Technologies
- Real-Time qPCR Instrument Lightcycler 480 II von Roche
- MiSeq™-System von Illumina®.

2.8.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 15 *Chemikalien und Reagenzien für die Erstellung der Sequenzier-Libraries*

Artikel	Firma
Ampli1® LowPass Kit (Box1) Bestehend aus zwei Sets (Set A und B), wovon jedes 48 individuelle Primerpaare beinhaltet.	Menarini Silicon Biosystems
PEG NaCl Lösung (Box2)	Menarini Silicon Biosystems
dsDNA HS Assay Kit	Thermo Fisher
High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies
SPRIselect beads	Beckman Coulter
LowTE Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 mM EDTA)	Thermo Fisher

qPCR-basierender *Library*-Quantifikationsassay	Illumina®
Ethanol 96-100%	
NaOH	
Nuklease-freies Wasser	

Abkürzungen Tabelle 15: NaOH = Natriumhydroxid, Natronlauge; EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

2.8.3. Durchführung und Auswertung

Für die Durchführung wird auf die im Kit enthaltene Gebrauchsanweisung (Version 4) verwiesen, welche den Titel *Whole Genome Library preparation for NGS Illumina® platforms* trägt. Nachdem die Proben nach der Amplifikation bereits aufgereinigt wurden, kann auf Schritt 1 in der Gebrauchsanweisung verzichtet werden (mit Ausnahme der reamplifizierten Proben). Die Sequenzierung erfolgt mit dem MiSeq™-System von Illumina®.

Von jeder Probe werden für die Erstellung der *Library* insgesamt mindestens 15 ng an DNA benötigt. Da die Amplifikation bei allen Proben erfolgreich war (vergleiche Tabelle 21 im Anhang), sind die verwendeten 3 µl Probenvolumen in Schritt 2 für die DNA-*Library* ausreichend. Nach dem Sequenzierlauf erfolgt die bioinformatische Auswertung. Dabei werden Genom-Profile sowie eine Tabelle mit statistischen Kennwerten generiert (*statistics-file)*. Kriterien für die Wertbarkeit der erhaltenen Genom-Profile sind die Anzahl der *Reads* (*Counts)* von > 200 000, sowie ein *R50-Wert* > 30 und einen *Derivative Log Ratio Spread (= DLRS)* < 0.35. Der *R50-Wert* gibt Auskunft über die Komplexität der erstellten *Library*, der *DLRS*-Wert ist ein Maß für die Streuung der Werte.

2.9. Isolation der Exosomen

Für die Isolation der Exosomen wird das *Exosome Isolation Kit Pan, human* von Miltenyi Biotec verwendet. Durch magnetische *MicroBeads*, welche spezifisch gegen exosomale Oberflächenproteine gerichtet sind (CD9, CD63 und CD81), können diese mit Hilfe eines Magnetfeldes von den restlichen Liquorbestandteilen abgetrennt werden. Da an der Vesikeloberfläche cfDNA gebunden sein könnte, wird in einem extra Schritt ein DNase-Verdau durchgeführt.

2.9.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Pipetten mit sterilen Spitzen
- 1.5 ml und 2 ml Probengefäße

- Vortexer
- Tischzentrifuge
- Thermomixer
- Rollenmischer
- *µMACS™ Separator* von Miltenyi Biotec
- *µColumns* mit Kolben von Miltenyi Biotec

2.9.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 16 *Chemikalien und Reagenzien für die Isolation der Exosomen*

Artikel	Firma
Exosome Isolation Kit Pan, human	Miltenyi Biotec
DNase I, RNase-*free* 1 U/µl mit dazugehörigem 10X *Reaction Buffer* mit $MgCl_2$	Thermo Scientific

Abkürzungen Tabelle 16: $MgCl_2$ = Magnesiumchlorid

2.9.3. Durchführung

Hinweis: alle im folgenden aufgeführten Reagenzien sind im Kit enthalten oder in obiger Tabelle gelistet.

Um ein bestmögliches Ergebnis zu erlangen, wird die Probe (max. 2 ml) zu gleichen Anteilen auf 2x 1.5 ml Probengefäße aufgeteilt. In jedes Probengefäß werden 25 µl der *MicroBeads* hinzugefügt, die Proben gevortext und auf einem Rollenmischer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Da sich im Liquor nur sehr wenige Exosomen befinden, wird anstatt der im Protokoll angegebenen 1 h, über Nacht inkubiert. Dadurch haben die *MicroBeads* länger Zeit, an die Exosomen zu binden.
Am nächsten Tag müssen die Puffer (*Equilibration* und *Isolation Buffer*) vor deren Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden, um Schaumbildung der Lösungen zu vermeiden. Bilden sich dennoch Bläschen auf der Säule, sollten diese mit Hilfe einer Pipettenspitze entfernt werden. Die *µColumn* wird in das Magnetfeld des *µMACS™ Separators* gestellt und darunter ein Auffanggefäß (z.B. ein 2.0 ml Probengefäß) platziert. Zur Reinigung der Säule werden als erstes 100 µl *Equilibration Buffer* auf die Säule aufgetragen. Allgemein gilt: Bevor das nächste Reagenz auf die Säule aufgetragen werden darf, muss die Säule leer sein. Anschließend folgen 3x je 100 µl *Isolation Buffer* und danach die Probe. Die Exosomen-bindenden *MicroBeads* werden

durch das Magnetfeld fixiert und können von den restlichen Liquorbestandteilen abgetrennt werden. Zur Aufreinigung werden 4x je 200 µl *Isolation Buffer* auf die Säule aufgetragen. Um die separierten Exosomen von der Säule zu eluieren, wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen und in ein 1.5 ml Probengefäß gesteckt. Nach Zugabe von 89 µl *Isolation Buffer*, wird der Kolben zügig und gleichmäßig nach unten gedrückt. Die an die *MicroBeads* gebundenen Exosomen werden nun in das 1.5 ml Probengefäß gepresst. Da in diesem Protokoll alleinig die exosomale DNA von Interesse ist, muss die extravesikulär gebundene cfDNA entfernt werden. Dies gelingt durch einen DNase I-Verdau. Dafür wird zuerst ein Mix aus 10 µl *10x Reaction Buffer* und 1 µl DNase I hergestellt, welcher unmittelbar danach zu dem Eluat hinzugefügt wird. Nachdem das Gemisch gevortext und kurz abzentrifugiert wurde, kann es im Thermomixer ohne Schütteln bei 37 °C für 15 min inkubiert werden. Die DNA, welche sich währenddessen in den Exosomen befindet, wird dabei nicht zerstört, da sie durch die Vesikelmembran geschützt ist. Die isolierten *MicroBead*-Exosomen-Komplexe befinden sich nun in den 100 µl des 1.5 ml Probengefäßes.

2.10. Isolation tumorspezifischer Exosomen

Für die Isolation tumorspezifischer Exosomen werden *MicroBeads* verwendet, welche gegen EpCAM bzw. MCSP gerichtet sind. Proben von Karzinompatienten (z.B. Bronchial-, Mamma-, oder Kolonkarzinom) wurden mit EpCAM-spezifischen , Proben von Melanompatienten mit MCSP-spezifischen *MicroBeads* versetzt. Bei unbekanntem Primärtumor wurde ebenfalls EpCAM verwendet, da Karzinome häufiger auftreten.

Somit entspricht das Protokoll unter Verwendung der untenstehenden *MicroBeads* demselben wie in Punkt 2.9. Für eine maximale Ausbeute an Exosomen wurden statt der ursprünglichen 50 µl *MicroBeads* je Probe, 70 µl verwendet.

Tabelle 17 *Chemikalien und Reagenzien für die Isolation tumorspezifischer Exosomen*

Artikel	Firma
CD326 (EpCAM) MicroBeads, human	Miltenyi Biotec
Anti-Melanoma (MCSP) MicroBeads, human	Miltenyi Biotec

2.11. Extraktion der DNA aus den Exosomen

Nachdem die Exosomen in 2.9. bzw. 2.10. aus dem Liquor isoliert und somit von den restlichen Liquorbestandteilen abgetrennt wurden, muss die exosomale DNA aus den Vesikeln extrahiert werden. Hierfür wurde das *QIAmp® DNA Micro Kit* von Qiagen und das Protokoll *Isolation of Genomic DNA from small volumes of blood* verwendet.

2.11.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

- Pipetten mit sterilen Spitzen
- Vortexer
- Zentrifuge

2.11.2. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 18 *Chemikalien und Reagenzien für die Extraktion der DNA aus den Exosomen*

Artikel	Firma
QIAmp DNA Micro Kit	Qiagen
Ethanol (96-100%)	

2.11.3. Durchführung

Hinweis: alle im folgenden aufgeführten Reagenzien, sowie Probengefäße sind im Kit enthalten oder in obiger Tabelle gelistet.

Die Proben mit den Exosomen aus Schritt (2.9. bzw. 2.10.) werden bei 1000 g für 1 min kurz abzentrifugiert. Als nächstes muss der Lyse-Puffer vorbereitet werden. Dafür wird ein Mix aus 100 µl *Buffer AL* und 1 µl *Carrier*-RNA hergestellt, welcher zusammen mit 10 µl Proteinase K zur Probe gegeben wird. Die *Carrier*-RNA wird benötigt, um die Effizienz der DNA-Präzipitation zu erhöhen. Durch einen Verdau mit Proteinase K, werden die Nukleinsäuren aus dem Vesikel freigesetzt. Der Ansatz wird 15 s gevortext und für 10 min bei 56 °C im Thermomixer schüttelnd inkubiert. Anschließend werden 50 µl Ethanol dazu gegeben und wieder 15 s gevortext. Die Probe wird nun 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor das Lysat auf die *QIAmp Mini Elute* Säule aufgetragen werden kann, sollte die Probe erneut bei 1000 g 1 min abzentrifugiert werden. Nach dem Auftragen wird die Säule mit der Probe bei 6000 g für 1 min zentrifugiert. Dadurch werden die *MicroBeads* von der exosomalen DNA abgetrennt.

Dieser Durchfluss kann verworfen werden. Die Säule wird in ein neues 2 ml Sammelgefäß überführt und 500 µl *Buffer AW1* hinzugegeben. Es folgt eine Zentrifugation bei 6000 g für 1 min. Der Durchfluss darf wieder verworfen werden. Derselbe Schritt wird mit 500 µl *Buffer AW2* wiederholt. Um die Membran zu trocknen, wird die Probe bei 17000 g für 3 min zentrifugiert und der Durchfluss wird wieder verworfen. Die Säule wird nun in ein neues 1.5 ml Probengefäß gesetzt und vorsichtig 20 µl *Buffer AE* ins Membranzentrum pipettiert, ohne dabei die Membran zu berühren. Um die DNA möglichst vollständig zu eluieren, wird die Kappe des Probengefäßes geschlossen und die Probe 5 min anstatt 1 min bei RT inkubiert. Durch eine Zentrifugation bei 17000 g für 1 min wird das Eluat, welches die DNA aus den Exosomen enthält, in das Sammelgefäß überführt.
Die Amplifikation, sowie die Qualitätskontrolle, Erstellung der *Libraries* und die Sequenzierung erfolgte analog der cfDNA-Protokolle.

3. Arbeitsablauf nach Probenempfang

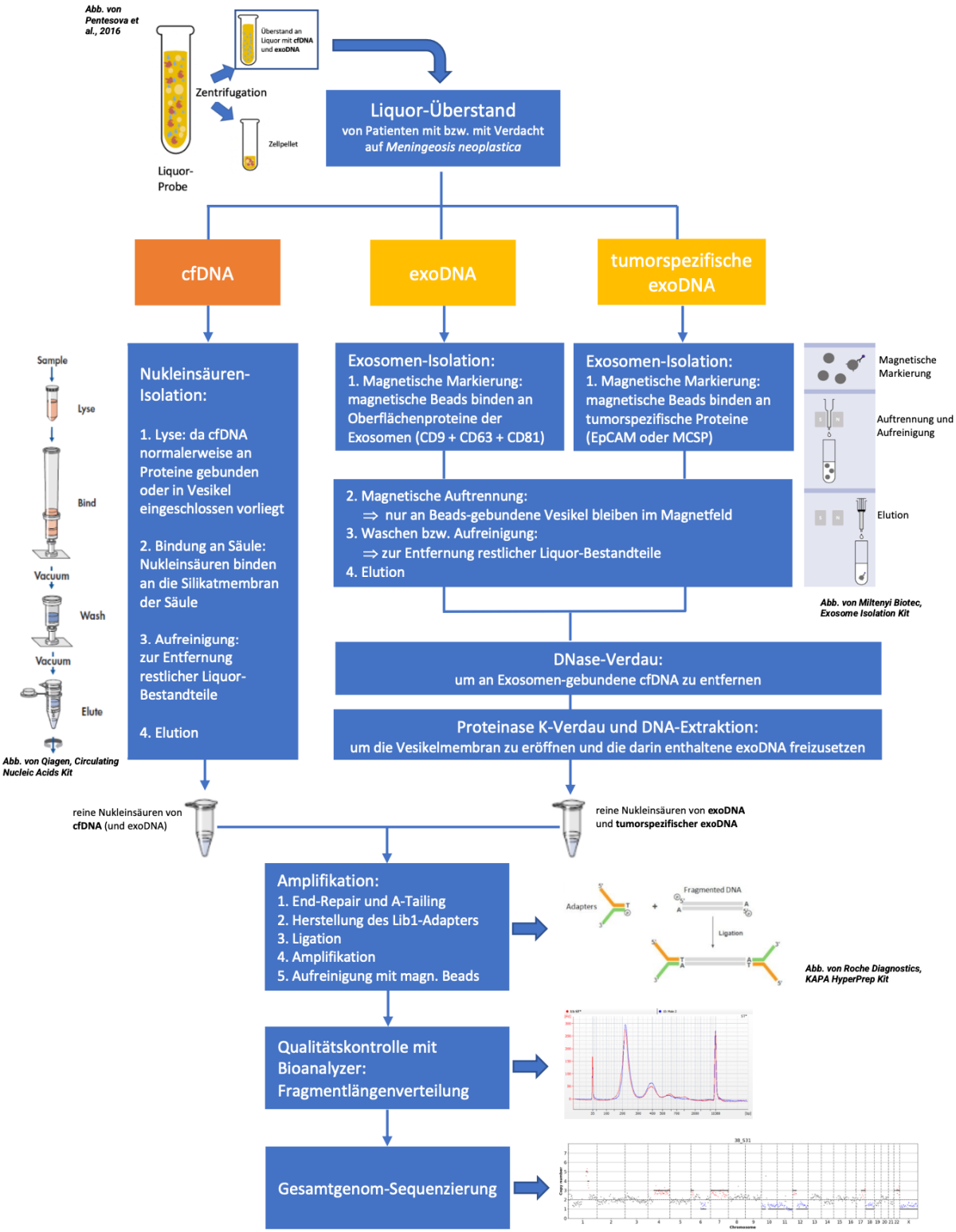


Abbildung 5 *Arbeitsablauf nach Probenerhalt: Bei ausreichendem Liquorvolumen konnten aus dem Überstand bestenfalls alle drei Analyten (cfDNA, Exosomen und tumorspezifische Exosomen) für die Gesamtgenom-Sequenzierung verwendet werden. Dargestellt ist jeweils die Handhabung der untersuchten Analyten.*

Für die Analyse der nicht-zellulärer Bestandteile (cfDNA und Exosomen) des Liquors standen Proben von insgesamt 29 Patientinnen und Patienten zur Verfügung. Es wurden auch Patienten eingeschlossen, bei denen aufgrund der Symptomkonstellation der Verdacht auf eine *Meningeosis neoplastica* bestand (insgesamt 16 Patienten). Hier war vor allem interessant, ob die Analyse des zellfeien Überstandes durch den Nachweis von Genomaberrationen zur Diagnosesicherung beitragen könnte. Bei den restlichen 13 Patienten war die Diagnose bereits histopathologisch oder mittels MRT gesichert worden, somit wurde auf eine Bestätigung durch die Sequenzierung geachtet. Das Kollektiv umfasst Melanom- und Karzinompatienten, sowie Patienten mit unbekanntem Primärtumor (siehe Tabelle 19). Von allen 29 Patienten wurde zunächst die cfDNA auf Kopienzahlveränderungen überprüft. Stand von einem Patienten mehr Probenvolumen zur Verfügung, konnte zusätzlich die exoDNA, bestenfalls – bei ausreichender Liquormenge – die tumorspezifische exoDNA mituntersucht werden. Für eine Gegenüberstellung aller Analyten (cfDNA vs. exoDNA vs. tumorspezifische exoDNA) standen insgesamt sieben Patienten zur Verfügung.

4.1. cfDNA des Liquor

Gemessene cfDNA-Konzentrationen im Liquor

Bei allen 29 Patienten wurde aus den Liquorüberständen die cfDNA isoliert und deren Konzentration bestimmt. Sie liegt bei den messbaren Proben (20 von 29) in einem Bereich von 0.092 ng/µl bis 1.525 ng/µl. Nachdem Volumina zwischen 0.6 ml bis 2.0 ml zur Extraktion verwendet wurden, bezieht sich die angegebene Konzentration auf das ursprüngliche Probenvolumen. Für die übrigen neun cfDNA-Proben (9 von 29) existiert kein valider Messwert, da sie unterhalb der Messgrenze des Qubit™-Fluorometers (< 0.05 ng/µl) liegen.

Der errechnete Durchschnittswert aller *messbaren* Proben beträgt in diesem Kollektiv 0.351 ng/µl. Höchstwerte befinden sich bei 0.681 ng/µl, 0.744 ng/µl oder sogar 1.525 ng/µl (vergleiche Abbildung 6 und Tabelle 19). Wird nun überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen hohen cfDNA-Konzentrationen und einer gesicherten Diagnose besteht, zeigt sich, dass auch Patienten mit Meningeosis niedrige cfDNA-Werte besitzen können. Ein Beispiel hierfür ist Patient Nr. 58, der trotz einer cfDNA-

Konzentration von 0.092 ng/µl von einer leptomeningealen Metastasierung betroffen ist. Es gibt sogar einige Patienten mit gesicherter Diagnose, bei denen die Konzentration so gering ausfällt, dass sie unterhalb der Messgrenze des Qubit™-Fluorometers liegt (Patient Nr. 14, 16, 17, 18, 21 und 24).

Umgekehrt gibt es Patienten, die zwar hohe cfDNA-Werte aufweisen, jedoch kein histopathologisches oder radiologisches Korrelat dazu zeigen (z.B. Patient Nr. 47 mit 0.681 ng/µl oder Patient Nr. 62 mit 0.468 ng/µl. Bei dem Patienten mit der ausgeprägt hohen cfDNA Konzentration (Patient Nr. 65 mit 1.525 ng/µl) konnte eine Meningeosis bestätigt werden. Zu berücksichtigen ist, dass in allen Fällen auch die Möglichkeit einer falsch-negativen bzw. falsch-positiven Diagnostik besteht. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass allein die Höhe der gemessenen cfDNA-Konzentrationen keinen Rückschluss auf das Vorhandensein leptomeningealer Metastasen zulässt.

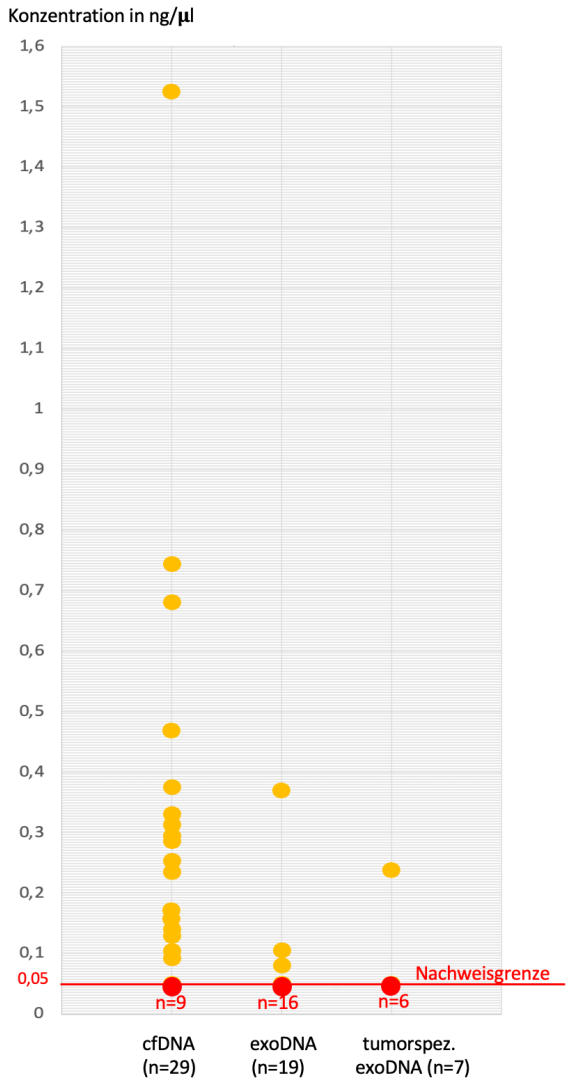


Abbildung 6 *Graphische Darstellung aller gemessener Konzentrationen bezogen auf das ursprüngliche Liquorvolumen. Jeder gelbe Punkt steht für einen Patienten, außer unterhalb der Nachweisgrenze, hier steht der rote Punkt für mehrere nicht messbare Proben (angegeben in Rot). Zum Beispiel liegen von den insgesamt 29 cfDNA-Proben, 9 unterhalb der Nachweisgrenze. Es zeigt einen Ausreißer bei 1.525 ng/µl. Die meisten Werte der cfDNA wurden im Bereich zwischen 0.1 und 0.4 ng/µl gemessen. Eine Auflistung der genauen Messwerte zeigt nachfolgende Tabelle 19.*

Tabelle 19 *Untersuchtes Probenkollektiv mit laufender Patienten-Nummer (1. Spalte) und deren Proben-ID (2. Spalte). Abkürzungen in der Patienten-ID stehen für den jeweiligen Primärtumor siehe Spalte 3. In der 4. Spalte findet sich der M-Status (M0 = keine Metastasen; M1 = bereits metastasiert) und in der 5. Spalte die anhand von Bildgebung und Histologie bestätigten Meningeosis-Fälle. Die letzten drei Spalten geben die Aufteilung der mittels Qubit™-Fluorometer gemessenen DNA-Konzentrationen in ng/µl bezogen auf das ursprüngliche Probenvolumen (cfDNA, exoDNA oder tumorspezifischer exoDNA) wieder. Insgesamt besteht das Kollektiv aus 29 Patienten. Aus jeder Liquorprobe wurde cfDNA isoliert. Falls mehr Probenvolumen von einem Patienten zur Verfügung stand, wurde zusätzlich aus einem weiteren Aliquot die exoDNA und falls möglich, die tumorspezifische exoDNA extrahiert. Die Konzentrationen nach Amplifikation mit sind in Klammern angegeben. Die Konzentrationen, welche vom Qubit™-Fluorometer nicht gemessen werden konnten, sind in Rot dargestellt. Die Tabelle zeigt, dass die Amplifikation bei allen Proben erfolgreich war. Es ist nun genügend DNA für die Sequenzierung vorhanden.*

laufende Nr.	Proben-ID	Primärtumor	M-Status	Meningeosis radiologisch oder histologisch bestätigt	cfDNA in ng/µl	exoDNA in ng/µl	tumorspez. exoDNA in ng/µl
14	MC17-256 Liq	Mamma-Ca	M1	ja	< 0.05 (26.1)	< 0.05 (4.1)	
15	SCLC18-0013 Liq	Bronchial-Ca	M0	nein	< 0.05 (17.9)	< 0.05 (8.8))	
16	MC18-0019 Liq	Mamma-Ca	M1	ja	< 0.05 (47.9)		
17	MC18-0087 Liq	Mamma-Ca	M1	ja	< 0.05 (31.8)		
18	MC18-0123 Liq	Mamma-Ca	M1	ja	< 0.05 (34.7)		
21	MC18-201 Liq	Mamma-Ca	M1	ja	< 0.05 (29.5)		
22	CUP18-210 Liq	unbekannt	M1	nein	< 0.05 (38.3)		
24	CC19-027 Liq	Kolon-Ca	M1	ja	< 0.05 (25.4)		
25	MM19-285-Liq	Malignes Melanom	M1	nein	0.295 (6.6)		
28	MC19-339-Liq	Mamma-Ca	M1	nein	0.316 (16.6)	< 0.05 (14.2)	
29	MC19-355-Liq	Mamma-Ca	M0	nein	0.171 (7.4)		
31	SCLC19-370 Liq	Bronchial-Ca	M1	nein	0.375 (26.0)	< 0.05 (15.9)	
34	CUP20-047 Liq	unbekannt	M1	nein	0.331 (50.9)	0.106 (10.3)	0.238 (1.8)
35	MC20-056 Liq	Mamma-Ca	M0	nein	0.105 (31.0)	0.081 (7.1)	< 0.05 (5.8)
38	MM20-076 Liq	Malignes Melanom	M1	ja	0.143 (45.8)	< 0.05 (2.9)	< 0.05 (1.9)
39	CUP20-080 Liq	unbekannt	M0	ja	0.235 (45.1)	< 0.05 (15.9)	< 0.05 (3.3)
46	MC20-250 Liq	Mamma-Ca	M0	nein	0.256 (2.4)	< 0.05 (3.5)	
47	BC20-273 Liq	Bronchial-Ca	M0	nein	0.681 (6.2)	< 0.05 (18.3)	
48	BC20-279 Liq	Bronchial-Ca	M1	nein	0.130 (24.6)	< 0.05 (25.4)	
49	MM20-301 Liq	Malignes Melanom	M0	nein	< 0.05 (1.4)	< 0.05 (1.6)	< 0.05 (4.7)
53	MM20-327 Liq	Malignes Melanom	M1	nein	0.313 (6.6)	< 0.05 (1.4)	
55	MC20-028 Liq	Mamma-Ca	M1	ja	0.140 (6.3)		
56	MA20-334 Liq	Magen-Ca	M0	ja	0.744 (21.5)	< 0.05 (11.6)	
57	BC20-335 Liq	Bronchial-Ca	M1	nein	0.286 (12.5)	< 0.05 (1.6)	
58	MM20-337 Liq	Malignes Melanom	M1	ja	0.092 (18.7)		
62	BC21-352 Liq	Bronchial-Ca	M1	nein	0.468 (61.2)	< 0.05 (6.1)	
64	MC21-362 Liq	Mamma-Ca	M1	ja	0.254 (133.6)	< 0.05 (2.1)	
65	MM21-367 Liq	Malignes Melanom	M1	ja	1.525 (13.4)	< 0.05 (19.3)	< 0.05 (22.8)
66	BC21-395 Liq	Bronchial-Ca	M1	nein	0.157 (6.7)	0.369 (7.0)	< 0.05 (7.4)

cfDNA wurde vorzugsweise über Apoptose freigesetzt

Um herauszufinden, ob die cfDNA apoptotisch oder nekrotisch freigesetzt wurde, wurde die Fragmentlängenverteilung der extrahierten cfDNA nach deren Amplifikation mit dem 2100 Agilent Bioanalyzer bestimmt. Dabei deutet ein Nukleosomen-typisches Muster auf den programmierten Zelltod hin, währenddessen lange, unspezifische DNA-Fragmente eher aus einer durch Nekrose abgestorbenen Zelle stammen.

Von den insgesamt 29 Proben weisen 27 (93 %) ein Nukleosomen-typisches Muster auf, bei denen sich der Hauptpeak entweder bei 200 oder 400 bp befindet. Dies entspricht der Länge von ein bzw. zwei Nukleosomen plus die Adaptersequenz und die zugehörigen Linker-Sequenzen. Weitere kleinere Peaks finden sich bei 600 bp, 800 bp usw. Ab 2000 bp werden keine weiteren DNA-Fragmente mehr detektiert. Dies liegt daran, dass der hier verwendete Ansatz keine größeren Fragmente amplifiziert. Bitte vergleiche dazu die Auflistung aller cfDNA-Bioanalyzer-Profile im Anhang, sowie untenstehende Abbildung 7 a.

Nur in zwei der 29 Proben (7 %) lässt sich kein Nukleosomen-typisches Muster erkennen. Eine Probe besteht aus einem einzelnen Peak bei ca. 250 bp (Probe Nr. 16) und die andere besitzt eine gleichmäßige Verteilung von Fragmenten unterschiedlicher Länge ohne erkennbaren Peak (Probe Nr. 62). Nachdem fast alle Proben ein klassisches Fragmentverteilungsmuster mit Peaks bei Nukleosomen und deren Multimeren aufzeigen, kann davon ausgegangen werden, dass in diesem Kollektiv die cfDNA hauptsächlich über Apoptose freigesetzt wurde.

Präferenz von ctDNA in kurzen bzw. langen cfDNA-Fragmenten nicht ermittelbar

Durch Beobachtung der Profile fiel auf, dass einige Proben des Kollektivs (10 von 29; 34 %) auch eine vermehrte Anzahl an größeren DNA-Fragmenten mit einer Länge über 500 bp enthalten (exemplarisch in Abbildung 7 b). Jene Proben (Probe Nr. 25, 28, 29, 35, 46, 47, 55, 57, 62 und 66) wurden vor der Sequenzierung mit dem Protokoll aus 2.6. in zwei Fraktionen (</> 700 bp) aufgetrennt, um festzustellen, ob die DNA aus Tumorzellen sich möglicherweise bevorzugt in einer bestimmten Fragmentgröße aufhält. Nachdem durch den Bioanalyzer kontrolliert wurde, ob eine Auftrennung erfolgreich verlief (vergleiche Abbildung 17 im Anhang), wurden die beiden Fraktionen separat voneinander sequenziert. Bis auf drei Proben, konnten alle Profile der kürzeren Fragmente (< 700 bp) ausgewertet werden. Die Erstellung von

Genomprofilen längerer Fragmente (> 700 bp) gestaltete sich äußerst schwierig, da die Konzentrationen - im Vergleich zu den kürzeren Fragmenten - nach der Auftrennung viel geringer ausfielen. Hier konnte aus nur drei Proben ein verwertbares Profil generiert werden.

Interessanterweise zeigen alle auswertbaren Proben ein balanciertes Genomprofil. Allerdings stellte sich im Nachhinein heraus, dass sich nur bei einem Patienten der Verdacht einer Meningeosis radiologisch bestätigte. Dies könnte ein Grund für den ausbleibenden Nachweis von Tumor-DNA gewesen sein.

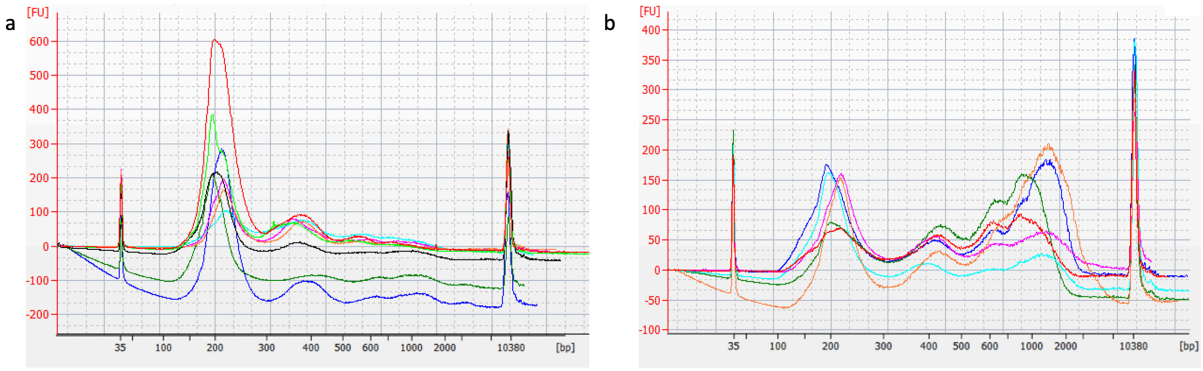


Abbildung 7 a und b *Beispiele verschiedener Bioanalyzer-Profile, erstellt durch den Bioanalyzer 2100 High Sensitive Assay von Agilent Technologies. Die x-Achse gibt die Fragmentlänge in bp an. Die y-Achse, die vom Bioanalyzer gemessene Spannung in Floureszenzeinheiten (FU). Je höher der Peak, desto höher die Konzentration der Fragmente. Die zwei Marker (Lower und Upper Marker) legen die untere (bei 35 bp) und die obere (bei 10380 bp) messbare Grenze fest. Jede Farbe steht für eine andere Patientenprobe. Eine vollständige Auflistung aller Graphen mit zugehörigen Patientendaten findet sich im Anhang.* ***a*** *Überlappung mehrerer Profile mit einem klassischen Fragmentverteilungsmuster. Der Hauptpeak befindet sich bei 200 bp, der zweithöchste Peak bei 400 bp.* ***b*** *Mehrere cfDNA Profile mit einer hohen Anzahl an Fragmenten über 500 bp. Diese wurden mit dem Protokoll aus 2.6 in zwei Fraktionen aufgeteilt. Es kann auch hier ein Nukleosomen-typisches Muster nachgewiesen werden.*

cfDNA aus Liquor stammt nicht ausschließlich aus maligen Zellen

Ob nun die isolierte cfDNA aus Tumorzellen abstammt, kann erst durch die Sequenzierung geklärt werden. Nachdem die cfDNA von gesunden, als auch von malignen Zellen hervorgehen kann, erhält man unterschiedliche Arten von Genomprofilen. Stammt die DNA überwiegend aus nicht-malignen Zellen, entspricht sie in ihrer Kopienzahl einem diploiden Chromosomensatz. Die Kopienzahl (*copy number*) liegt dann bei zwei und man erhält ein balanciertes Profil (Abbildung 8 b). Wurde die DNA hauptsächlich von Tumorzellen freigesetzt, deren Genome häufig chromosomale oder subchromosomale Kopienzahlveränderungen aufweisen, ist dies im Profil in Form von Gewinnen und Verlusten erkennbar. Man spricht von einem *Gain* (dargestellt in Rot), wenn mehr Kopien von einem ganzen Chromosom oder Chromosomenabschnitt vorhanden sind, und von einem *Loss* (dargestellt in Blau),

wenn Kopien verloren gegangen sind. In diesem Fall spricht man von einem aberranten Genomprofil. Zum Beispiel gibt es in Abbildung 8 a eindeutig Kopien-Zugewinne, welche das komplette Chromosom betreffen (wie auf Chromosomen 7) oder nur abschnittsweise (wie auf den Chromosomen 4, 6, 12, 17 und 22) auftreten können. Kopien-Verluste finden sich auf den Chromosomen 6, 10, 11, 12 und 18. Die Probe stammt von einem männlichen Patienten, da das X-Chromosom in einfacher Ausführung vorliegt.

Zu berücksichtigen ist, dass es sich bei allen Profilen um eine Überlagerung von DNA aus mehreren Zellen handelt. Das Profil kann sich aus cfDNA gesunder *und* maligner Zellen zusammensetzen, wodurch die Kopienzahl auch zwischen den Ploidien liegen kann (Beispiel siehe Aberrationen in Abbildung 8 a).

Die erstellten Genomprofile können in unterschiedliche Kategorien eingeordnet werden. Dabei gilt ein Profil als auswertbar, wenn die Mindestanzahl an *Counts* erfüllt ist (> 200 000), der R50-Wert über 50 und die Streuung unter 0.35 liegt. Diese Rohdaten sind essenziell für die objektive Beurteilung der Proben.

Sieben der insgesamt 29 (24 %) cfDNA-Proben weisen ein aberrantes Profil auf, 13 (45 %) ein balanciertes und neun Proben (31 %) sind aufgrund zuvor genannter Kriterien nicht auswertbar. Allerdings gibt es auch Profile, bei denen trotz der geringen *Count*-Anzahl ein klarer Trend in Richtung aberrant beobachtet werden kann. Beispiele für die verschiedenen Profil-Arten finden sich in Abbildung 8, die vollständige Auflistung aller Profile findet sich im Anhang.

Durch den Nachweis aberranter Profile lässt sich schlussfolgern, dass in fast einem Viertel der Fälle (24 %) erfolgreich DNA aus Tumorzellen isoliert und analysiert werden konnte. Die balancierten Profile zeigen, dass hier ein großer Teil der untersuchten cfDNA überwiegend oder gänzlich von normalen, gesunden Zellen abstammt (45 %). Da der Anteil an ctDNA in der cfDNA stark variieren kann, ist es möglich, dass ein geringer Anteil an Tumor-DNA von DNA aus gesunden Zellen überdeckt wird. Trotz einiger nicht auswertbarer Profile (9 von 29; 31 %) scheint es, als könnte sich die cfDNA gut als Biomarker eignen. Immerhin konnten mithilfe der hier durchgeführten Probenprozessierung trotz der sehr geringen Mengen an cfDNA im Liquor in gut 2/3 der Proben (69 %) auswertbare Genomprofile generiert werden.

Werden nun die cfDNA-Profile der gesicherten Meningeosis-Fälle betrachtet, weisen lediglich fünf der insgesamt 13 (5 von 13; 39%) Proben ein aberrantes Profil auf. Die restlichen Proben sind entweder nicht auswertbar (6 von 13; 46 %) oder sogar

balanciert (2 von 13; 15%). Nachdem auch balancierte Profile von Patienten mit bestätigter Diagnose stammen, liefert uns die cfDNA allein keinen zuverlässigen Hinweis auf das Vorliegen einer Meningeosis.

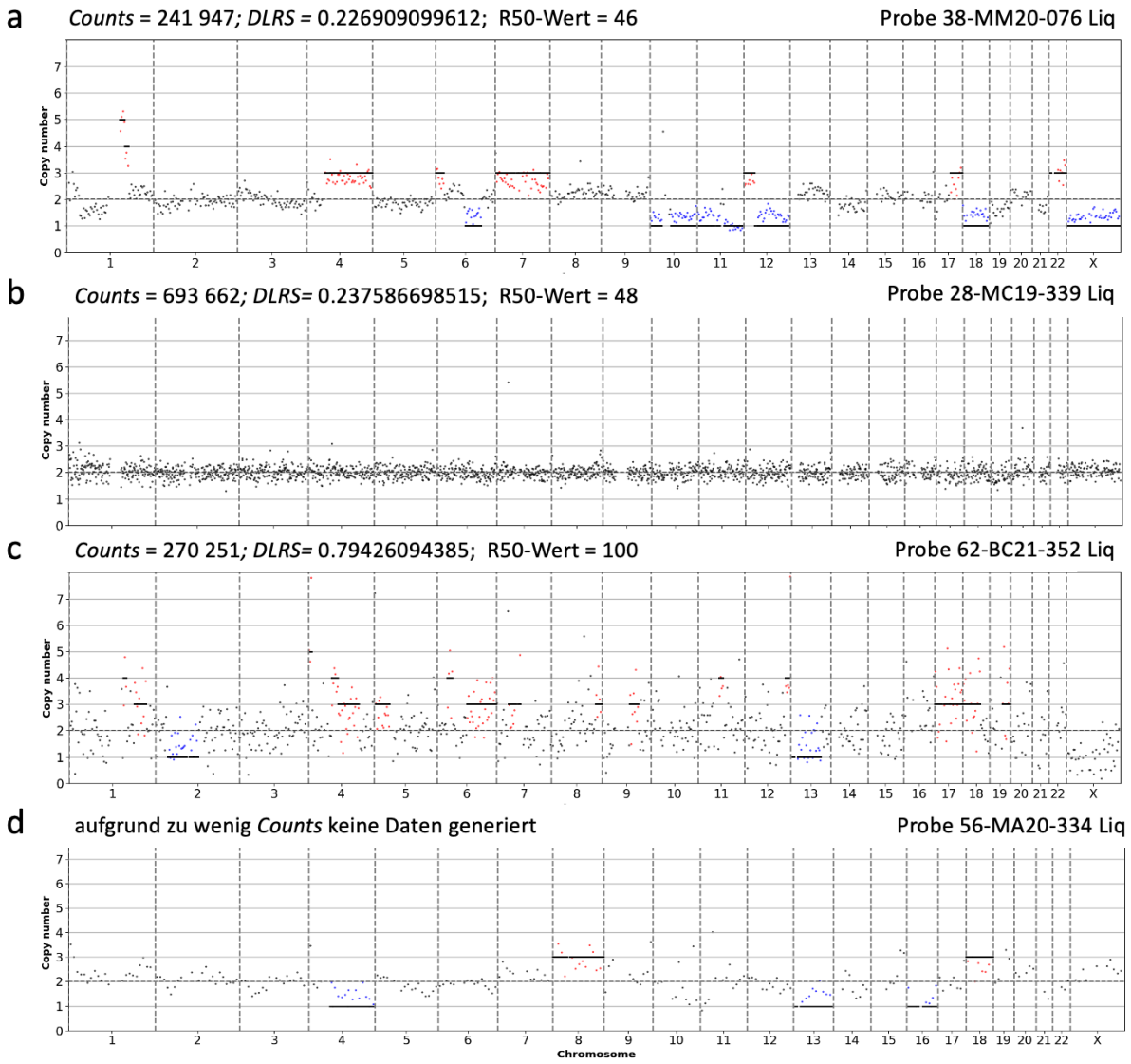


Abbildung 8 *Genomprofile verschiedener cfDNA-Proben. Die x-Achse verweist auf den Chromosomenabschnitt, die y-Achse auf die Copy Number des Genoms.* ***a*** *Stammt die cfDNA aus Tumorzellen, kann das Genom an Kopien gewinnen (Gains in Rot) oder verlieren (Losses in Blau). Es resultiert ein aberrantes Profil. Die Kopienzahl kann zwischen den Ploidien liegen, da es sich um eine Überlagerung von DNA aus gesunden und malignen Zellen handelt.* ***b*** *cfDNA aus gesunden Zellen besitzen einen diploidien (Copy Number = 2) Chromosomensatz. Es entsteht ein balanciertes Profil.* ***c*** *Beispiel für ein nicht auswertbares Profil durch zu große Streuung. Der Spread/DLRS liegt über 0.35.* ***d*** *Genomprofil mit formal zu wenig Counts (< 100 000), jedoch mit einem klaren Trend in Richtung aberrant. Bei solch einer geringen Count-Anzahl können keine statistischen Daten generiert werden.*

Fragmente < 145 bp liefern keinen Hinweis für aberrantes Genomprofil

Laut Literatur können bei Patienten mit malignen Erkrankungen verstärkt kleinere cfDNA-Fragmente (< 145 bp) nachgewiesen werden (Thierry et al.; 2010, Mouliere et al., 2011; Snyder et al., 2016). Dies könnte als erster Hinweis auf das Vorliegen von DNA aus Tumorzellen dienen. Um diesen Zusammenhang zu prüfen, wurden die Genomprofile von Proben mit kleineren DNA-Fragmenten (insgesamt 14) hinsichtlich Aberrationen untersucht. Hierfür dienten die cfDNA-Proben von Patient Nr. 25, 28, 29, 31, 34, 35, 46, 47, 49, 55, 56, 57, 62 und 66 (vergleiche alle Blau umkreisten Profile in Abbildung 16 im Anhang). Es stellte sich jedoch heraus, dass die Mehrzahl der Proben, bei denen eine stärkere Fragmentierung nachgewiesen wurde, ein balanciertes Genomprofil besitzen (9 von 14; 64 %; Probe Nr. 25, 28, 29, 31, 35, 47, 49, 57, 62). In keiner dieser Proben konnte eine leptomeningeale Metastasierung radiologisch oder histopathologisch bestätigt werden. Nur eine der Proben mit kleineren Fragmenten zeigt ein aberrantes Profil (1 von 14; 7 %; Probe Nr. 34). Die übrigen Profile (4 von 14; 29 %) konnten nicht ausgewertet werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass der Nachweis von kurzen cfDNA-Fragmenten (< 145 bp) im Bioanalyzer-Profil kein Garant für den Erhalt eines aberranten Genomprofils darstellt.

Kein Muster zwischen Bioanalyzer- und Genomprofilen der cfDNA erkennbar

Kann das Bioanalyzer-Profil bereits Hinweise auf das Vorliegen eines aberranten Profils geben? Für diese Fragestellung wurden die verschiedenen Bioanalyzer- mit den zugehörigen Genomprofilen der cfDNA-Proben verglichen. Grob kann eine Einteilung in zwei Gruppen vorgenommen werden: Proben mit klassischer Fragmentverteilung mit Peaks bei 200 oder 400 bp (insgesamt 18 von 29; 62 %) oder Proben mit einer hohen Anzahl an größeren Fragmenten über 500 bp (insgesamt 10 von 29; 35 %; Probe Nr. 25, 28, 29, 35, 46, 47, 55, 57, 62 und 66.) (vergleiche Abbildung 9 a). Eine Probe (1 von 29; 3 %, Probe Nr. 16) kann keiner dieser Gruppen zugeordnet werden, sie besitzt einen einzigen Peak bei 250 bp (siehe Auflistung aller Bioanalyzer-Profile im Anhang).

Sieben der 18 Profile (39 %) mit einem Hauptpeak bei 200 oder 400 bp sind aberrant, sechs balanciert (6 von 18; 33 %) und fünf nicht auswertbar (5 von 18; 28 %). Es scheint, als würde das Bioanalyzer-Profil keinen Hinweis liefern, ob es sich nach der Sequenzierung um ein aberrantes oder balanciertes Genomprofil handelt. Angemerkt werden sollte, dass aus Proben, welche eine hohe Anzahl an großen Fragmenten >

500 bp besitzen, einzig balancierte Profile (7 von 10; drei sind nicht auswertbar) resultieren. Dies lag vermutlich daran, dass sich in diesen Patientenproben letztlich keine ctDNA befand und eine Meningeosis radiologisch oder mittels Liquoranalyse ausgeschlossen wurde.

Die Probe, welche keiner Gruppe zuzuordnen ist, hat kein auswertbares Genomprofil generiert. Alle aberranten Genomprofile in diesem Kollektiv hatten jedoch ein klassisches Fragmentverteilungsmuster, ohne dass gleichzeitig größere Fragmente vorlagen. Eine Übersicht dazu soll Abbildung 9 a liefern.

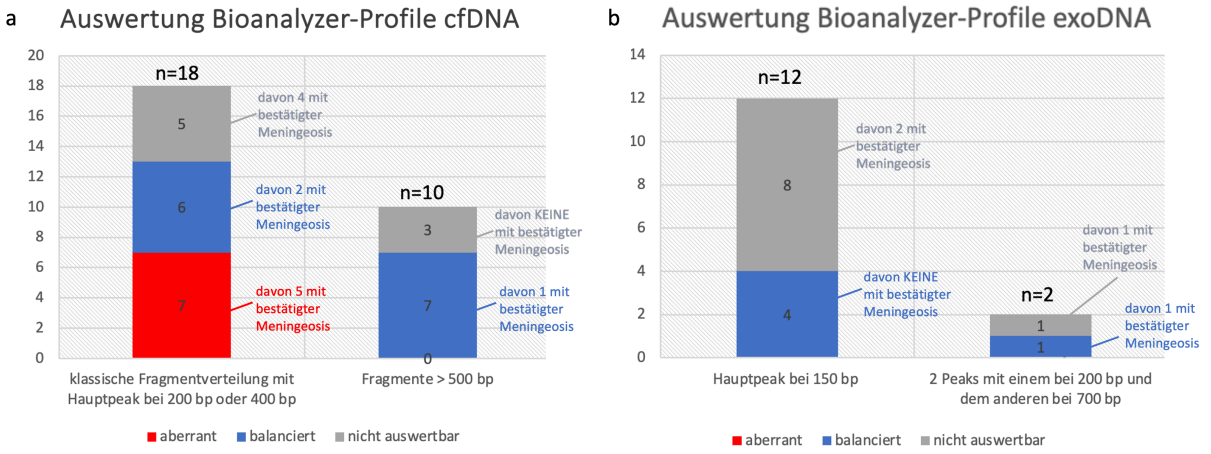


Abbildung 9 *Gruppeneinteilung der Bioanalyzer-Ergebnisse der cfDNA und unspezifischer exoDNA* ***a*** *Die zwei Säulen stellen die Einteilung der cfDNA-Bioanalyzer-Profile in Kategorien dar. Bei den meisten Proben der cfDNA findet sich eine klassische Fragmentverteilung mit einem Hauptpeak bei 200 bzw. 400 bp (1.Säule). Dieser Gruppe können insgesamt 18 Proben zugeordnet werden. Weitere zehn Profile besitzen eine hohe Anzahl an großen Fragmenten ab 500 bp (2. Säule). Nur eine Probe (Probe Nr. 16) konnte keiner dieser Gruppen zugeteilt werden und ist somit aus der Grafik ausgeschlossen. Zusätzlich finden sich in den Säulen noch die Anteile, welche Art von Genomprofil aus den jeweiligen Bioanalyzer-Profilen generiert wurde. Zum Beispiel besitzen knapp mehr als die Hälfte der Proben mit klassischer Fragmentverteilung (1. Säule) aberrante Profile (dargestellt in Rot), sechs balancierte (in Blau) und fünf nicht auswertbare Profile (in Grau). Interessant ist, dass fast alle (7 von 10) Proben aus der 2.Säule balancierte Profile (Blau) aufweisen und aberrante Profile nur bei Proben mit klassischer Fragmentverteilung aufzufinden sind.* ***b*** *Diese zwei Säulen stellen die Einteilung der unspezifischen exoDNA-Bioanalyzer-Profile in ihre Kategorien dar. In der ersten Säule finden sich alle Proben mit einem Hauptpeak bei 150 bp. In der zweiten Säule befinden sich alle Proben mit zwei Hauptpeaks, einem bei 200 bp und den anderen bei 700 bp. Vier Proben (Probe Nr. 47, 48, 56 und 62) konnten keiner dieser Gruppen zugeordnet werden. Aus dieser Abbildung geht hervor, die exoDNA kein aberrantes Profil generierte.*

4.2. Exosomen im Liquor

Stand von einem Patienten ausreichend Probematerial zur Verfügung, konnte ein weiterer nicht-zellulärer Bestandteil des Liquors analysiert werden: die exosomale DNA. Hierfür kamen 19 Patienten in Frage. Bei sieben von ihnen lag genügend Material vor, um eine zusätzliche Untersuchung tumorspezifischer Exosomen durchzuführen (vergleiche Tabelle 19. Zur Darstellung erster Unterschiede wurden die Konzentrationen der extrahierten cfDNA und die der exoDNA miteinander verglichen. Das Material der Probe Nr. 64 ging bei einem Waschvorgang für die Erstellung der Sequenzier – *Libraries* verloren. Somit ergaben sich insgesamt 25 Proben für die Analyse (18 unspezifische + 7 tumorspezifische exoDNA-Proben).

exoDNA-Konzentrationen im Liquor viel geringer als die der cfDNA

Von den insgesamt 26 exoDNA-Proben (darunter auch die der tumorspezifischen exoDNA), konnten lediglich vier (4 von 26; 15 %) vom Qubit™-Messgerät erfasst werden. Die gemessenen Konzentrationen reichen von 0.081 ng/µl bis 0.369 ng/µl gerechnet auf das ursprüngliche Liquorvolumen. Die der restlichen Proben (22 von 26; 85 %) liegen in einem Bereich unter 0.05 ng/µl und können somit nicht zur Wertung hinzugezogen werden (vergleiche Abbildung 6 und Tabelle 19). Bei der cfDNA hingegen konnte immerhin der Großteil der Konzentrationen (20 von 29; 69 %) nach deren Extraktion ermittelt werden. Dieses Experiment zeigt, dass bei gleichem Liquor-Probenvolumen geringere Mengen an exoDNA im Vergleich zur cfDNA vorhanden ist. Jedoch war es stets möglich, die exoDNA mit Hilfe einer Amplifikation (vergleiche Kapitel 2.7.) für eine Sequenzierung anzureichern. Ein Zusammenhang zwischen messbaren exoDNA-Konzentrationen und bestätigter Diagnose Meningeosis lässt sich auch hier nicht erkennen, da es Patienten gibt, die trotz gesicherter Diagnose keine messbaren exoDNA-Werte besitzen - und *vice versa*.

exoDNA liefert weniger auswertbare Genomprofile als cfDNA

Eine Folge der geringen Konzentration an exoDNA im Liquor, könnte die verminderte Auswertbarkeit der Genomprofile sein. Unter den insgesamt 18 Profilen exosomaler DNA (siehe Tabelle 20) sind null aberrant und fünf balanciert (28 %). Die übrigen 13 Proben sind nicht auswertbar (72 %), also weitaus mehr im Vergleich zur cfDNA (31 %). Bei der tumorspezifischen exoDNA konnten immerhin aus drei von sieben Patientenproben (43 %) auswertbare Profile generiert werden (siehe Tabelle 21).

Tabelle 20 *Auflistung aller Patientenproben, bei denen genügend Material für die Untersuchung unspezifischer Exosomen zur Verfügung stand. Die Tabelle zeigt, welchen Primärtumor der Patient besitzt, ob die Generierung eines Genomprofils erfolgreich war (n.a. steht hier für ‚nicht auswertbar') und ob eine Meningeosis radiologisch oder mit Hilfe von histomorphologischer Untersuchung des Liquors bestätigt wurde.*

laufende Nr.	Patienten-ID	Primärtumor	generiertes Genomprofil	bestätigte Diagnose Meningeosis
14	MC17-256 Liq	Mamma-Ca	n.a.	ja
15	SCLC18-0013 Liq	Small Cell Lung Cancer	balanciert	nein
28	MC19-339-Liq	Mamma-Ca	balanciert	nein
31	SCLC19-370 Liq	Small Cell Lung Cancer	n.a.	nein
34	CUP20-047 Liq	unbekannt	n.a.	nein
35	MC20-056 Liq	Mamma-Ca	n.a.	nein
38	MM20-076 Liq	Malignes Melanom	n.a.	ja
39	CUP20-080 Liq	unbekannt	balanciert	ja
46	MC20-250 Liq	Mamma-Ca	n.a.	nein
47	BC20-273 Liq	Bronchial-Ca	n.a.	nein
48	BC20-279 Liq	Bronchial-Ca	n.a.	nein
49	MM20-301 Liq	Malignes Melanom	n.a.	nein
53	MM20-327 Liq	Malignes Melanom	n.a.	nein
56	MA20-334 Liq	Magen-Ca	n.a.	ja
57	BC20-335 Liq	Bronchial-Ca	balanciert	nein
62	BC21-352 Liq	Bronchial-Ca	n.a.	nein
65	MM21-367 Liq	Malignes Melanom	n.a.	ja
66	BC21-395 Liq	Bronchial-Ca	balanciert	nein

Zusammenfassend zeigt sich, dass die cfDNA mehr auswertbare Genomprofile erzeugt als die exoDNA. Grund dafür könnten die höheren Konzentrationen an cfDNA im Liquor sein. Aus der exoDNA ging kein aberrantes Profil hervor, aus der tumorspezifischen exoDNA hingegen schon (vergleiche Abbildung 10).

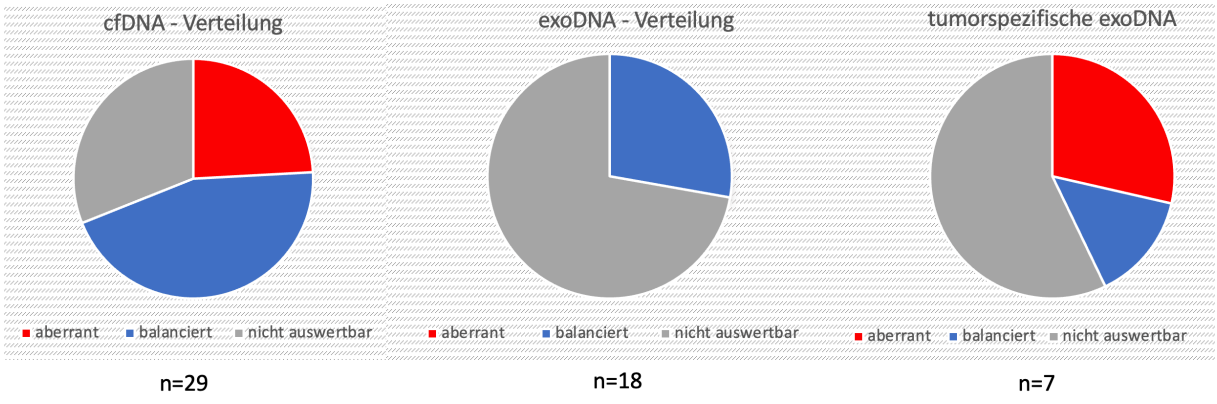


Abbildung 10 *Grafische Auswertung aller Genomprofile für jeweils cfDNA, exoDNA und tumorspezifische exoDNA. Rot steht für den aberranten Anteil, Blau für die balancierten Profile und Grau für die nicht auswertbaren. n gibt die Anzahl der analysierten Patientenproben wieder. Die Darstellung zeigt, dass die exoDNA unspezifischer Exosomen einen sehr großen Anteil an nicht auswertbaren Profilen besitzt und kein aberrantes Profil enthält. Den höchsten Anteil an auswertbaren Profilen liefert die cfDNA.*

Erfolgreicher Nachweis tumorspezifischer Exosomen

Neben der Isolation von Exosomen mittels gängiger Exosomenmarker, konnte ein neues Protokoll zur Isolation tumorspezifischer Exosomen etabliert werden. Hierfür dienten Oberflächenantigene, welche normalerweise auf der Zellmembran epithelialer (EpCAM) bzw. neuroektodermaler (MCSP) Zellen exprimiert werden. Tumorzellen epithelialen bzw. neuroektodermalen Ursprungs, sowie deren Exosomen, weisen ebenfalls diese Antigene auf. Diese Überlegung diente als Ansatz mutmaßlich tumorspezifische Exosomen zu extrahieren (vergleiche 2.10.).

Sieben der 29 Patienten erlaubten aufgrund ausreichender Liquormenge eine zusätzliche Untersuchung auf Exosomen aus maligner Herkunft. Davon wurden – je nach Primärtumor – vier mittels EpCAM-, und drei mittels MCSP-*MicroBeads* isoliert (siehe Tabelle 21).

Tabelle 21 *Auflistung aller Patientenproben, bei denen genügend Material für die Untersuchung tumorspezifischer Exosomen zur Verfügung stand. Die Tabelle zeigt, welches Oberflächenantigen als Marker zur Isolation verwendet wurde, welchen Primärtumor der Patient besitzt, ob die Generierung eines Genomprofils erfolgreich war (n.a. steht hier für ‚nicht auswertbar') und ob eine Meningeosis radiologisch oder mit Hilfe von zytologischer Untersuchung des Liquors bestätigt wurde. Die Sequenzierergebnisse sind in Abbildung 11 aufgelistet.*

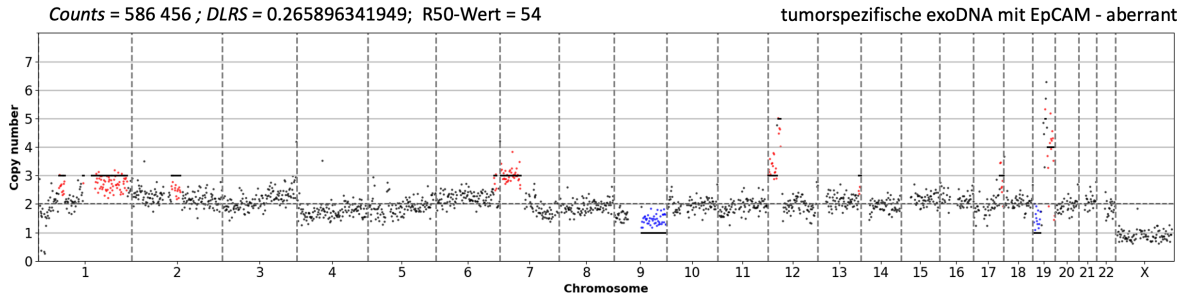
laufende Nr.	Patienten-ID	Primärtumor	verwendetes Oberflächenantigen	generiertes Genomprofil	bestätigte Diagnose Meningeosis
34	CUP20-047 Liq	unbekannt	EpCAM	aberrant	nein
35	MC20-056 Liq	Mamma-Ca	EpCAM	n.a.	nein
38	MM20-076 Liq	Malignes Melanom	MCSP	n.a.	ja
39	CUP20-080 Liq	unbekannt	EpCAM	aberrant	ja
49	MM20-301 Liq	Malignes Melanom	MCSP	n.a.	nein
65	MM21-367 Liq	Malignes Melanom	MCSP	n.a.	ja
66	BC21-395 Liq	Bronchial-Ca	EpCAM	balanciert	nein

Als Bestätigung für das Vorliegen von exoDNA aus Tumorzellen dienen aberrante Genomprofile. Zwei der sieben Profile (2 von 7; 29 %) stellen sich aberrant dar. Weitere vier (4 von 7; 57 %) sind aufgrund zu großer Streuung oder zu wenig gemessener *Counts* nicht auswertbar. Ein Genomprofil liegt (1 von 7; 14 %) balanciert vor. Eine Auflistung der Profile findet sich in Abbildung 11.

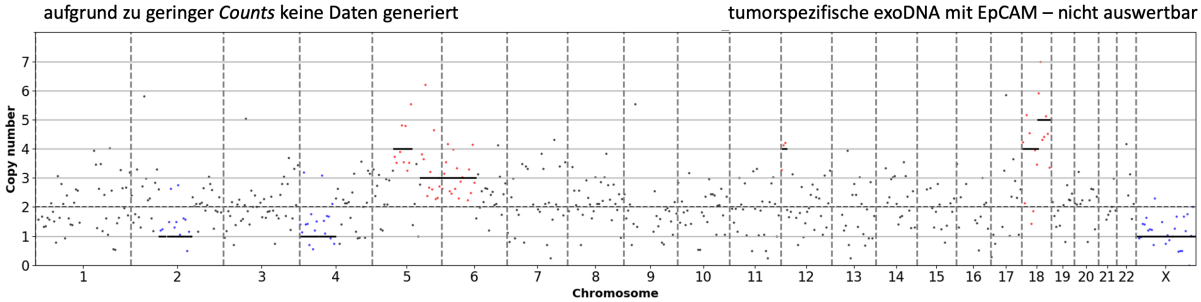
Nachdem Karzinome im Gegensatz zu anderen Tumorarten am häufigsten auftreten, wurde bei Patienten mit unbekanntem Primärtumor (Patient Nr. 34 und 39) EpCAM zur Isolation tumorspezifischer Exosomen verwendet. In beiden zeigen sich aberrante Profile. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei beiden CUPs (*Cancer of Unkown Primary*) um Karzinome handeln könnte.

Auffallend ist, dass nur EpCAM-Exosomen auswertbare aberrante Profile generiert haben. Hingegen ist von den drei MCSP-Exosomen kein Genomprofil anhand der Kriterien beurteilbar.

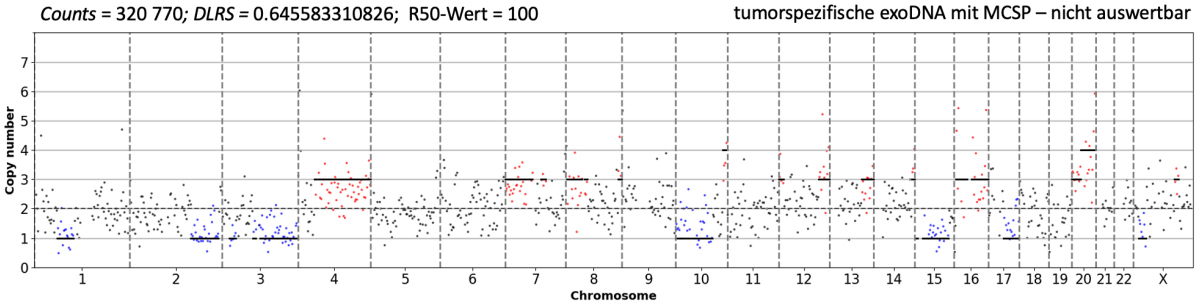
Bei zwei Proben aus der Gruppe der nicht auswertbaren Profile (Probe Nr. 38 und 65) können erst in der Zusammenschau ihrer zugehörigen cfDNA und unspezifischer exoDNA dieselben Aberrationen erahnt werden. Die Proben selbst gelten jedoch aufgrund der zu großen Streuung bzw. zu wenig gemessener *Counts* als nicht auswertbar (siehe Abschnitt 4.3.).



Patient: 34-CUP20-047Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch hochverdächtig, aber nicht bewiesen

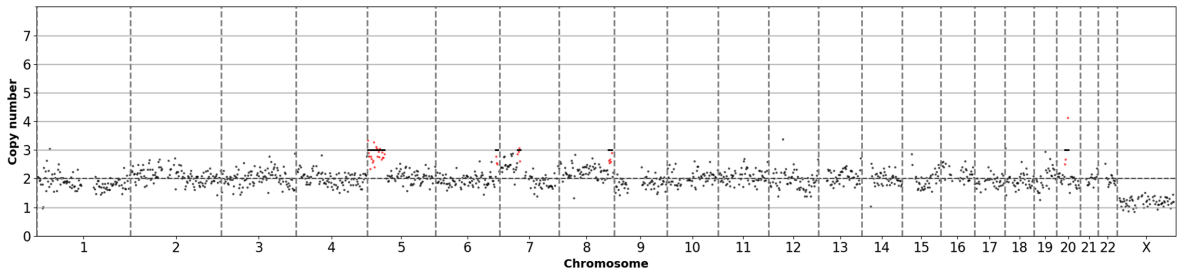


Patient: 35-MC20-056Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt



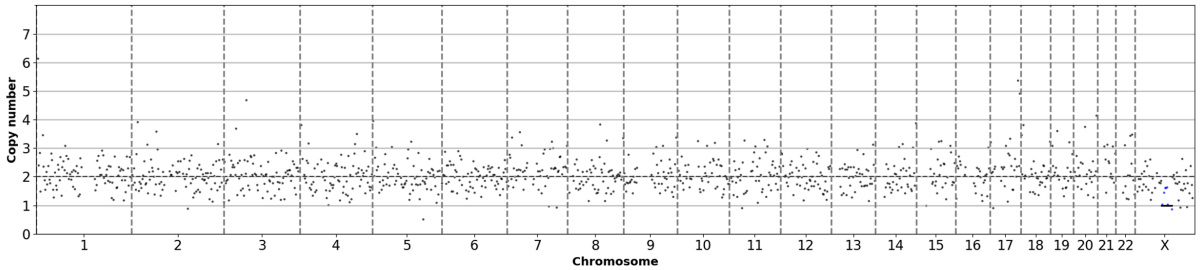
Patient: 38-MM20-076Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

Counts = 432 840*; DLRS* = 0.268799175956; R50-Wert = 72 tumorspezifische exoDNA mit EpCAM - aberrant



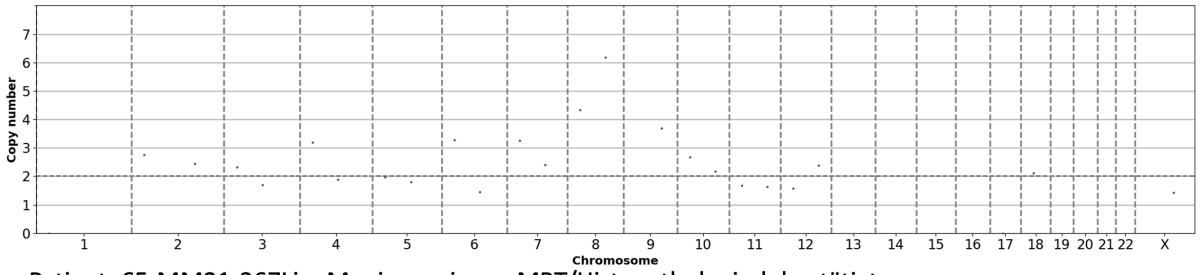
Patient: 39-CUP20-080Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

Counts = 346 871*; DLRS* = 0.663281632753; R50-Wert = 100 tumorspezifische exoDNA mit MCSP – nicht auswertbar



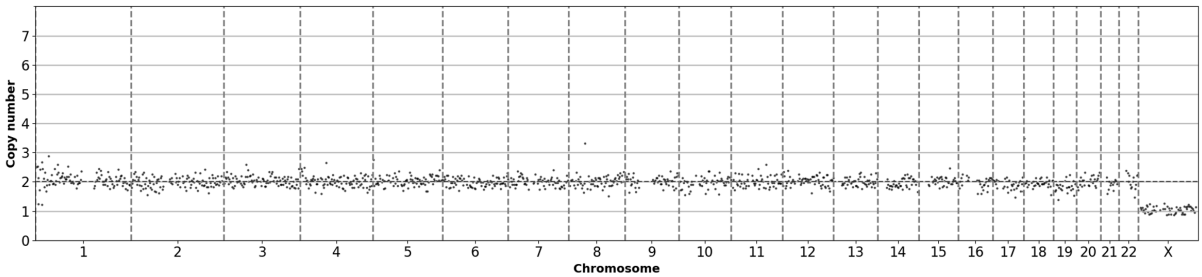
Patient: 49-MM20-301Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

aufgrund zu geringer *Counts* keine Daten generiert tumorspezifische exoDNA mit MCSP – nicht auswertbar



Patient: 65-MM21-367Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

Counts = 392 171; *DLRS* = 0.220084132309; R50-Wert = 54 tumorspezifische exoDNA mit EpCAM - balanciert



Patient: 66-BC21-395Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

Abbildung 11 *Dargestellt sind alle generierten Genomprofile der tumorspezifischen Exosomen. Jedes Profil steht für einen anderen Patienten. Zur Erklärung der Profile vergleiche Abbildung 8.*

4.3. Analyten im Vergleich

Unspezifische exoDNA stärker fragmentiert als cfDNA

Um weitere Unterschiede zwischen cfDNA und unspezifischer exoDNA zu identifizieren, wurden die Bioanalyzer-Profile der beiden Analyten gegenübergestellt. Neben geringeren Konzentrationen im Liquor, zeigen die Bioanalyzer-Profile exosomaler DNA zudem eine stärkere Fragmentierung im Vergleich zur cfDNA.

Insgesamt konnte aus 18 der 29 Patienten zusätzlich exoDNA gewonnen werden. Feststellen lässt sich bei einem Großteil dieser Proben (12 von 18; 67 %; Probe Nr. 14, 15, 28, 31, 34, 35, 38, 46, 53, 57, 65, 66) ein Hauptpeak bei ca. 150 bp. Also im Durchschnitt etwas kürzere Fragmente verglichen mit der cfDNA bei ca. 200 bp. Zwei der 18 Exosomen-Proben (2 von 18; 11 %; Probe Nr. 39 und 49) besitzen ihre Peaks bei ca. 200 bp und > 700 bp. Die verbliebenen vier Proben (4 von 18; 22 %; Probe Nr. 47, 48, 56, 62) zeigen viele Fragmente unterschiedlicher Größe, ohne eindeutigen Peak. Eine Auflistung aller Bioanalyzer-Profile findet sich in Abbildung 12. Eine Übersicht, welche Probe in welche Gruppe eingeteilt wird, zeigt Tabelle 22.

Ebenfalls kein Muster zwischen Bioanalyzer- und Genomprofilen bei der exoDNA erkennbar

Es scheint, als würde es auch hier keinen Zusammenhang zwischen Bioanalyzer- und resultierendem Genomprofil geben. In der größten Gruppe mit einem Hauptpeak bei ca. 150 bp (Probe Nr. 14, 15, 28, 31, 34, 35, 38, 46, 53, 57, 65, 66), gibt es vier balancierte, null aberrante und acht nicht auswertbare Profile. Aus der Gruppe mit dem Hauptpeak bei 200 und 700 bp (Probe Nr. 39 und 49) ergibt sich ein balanciertes und ein nicht auswertbares Profil. In der Gruppe mit den Fragmenten unterschiedlicher Länge (Probe Nr. 47, 48, 56, 62) konnte kein Profil ausgewertet werden. Eine Schlussfolgerung lässt sich aufgrund der willkürlichen Verteilung nicht vornehmen (vergleiche Abbildung 9 b und Tabelle 22).

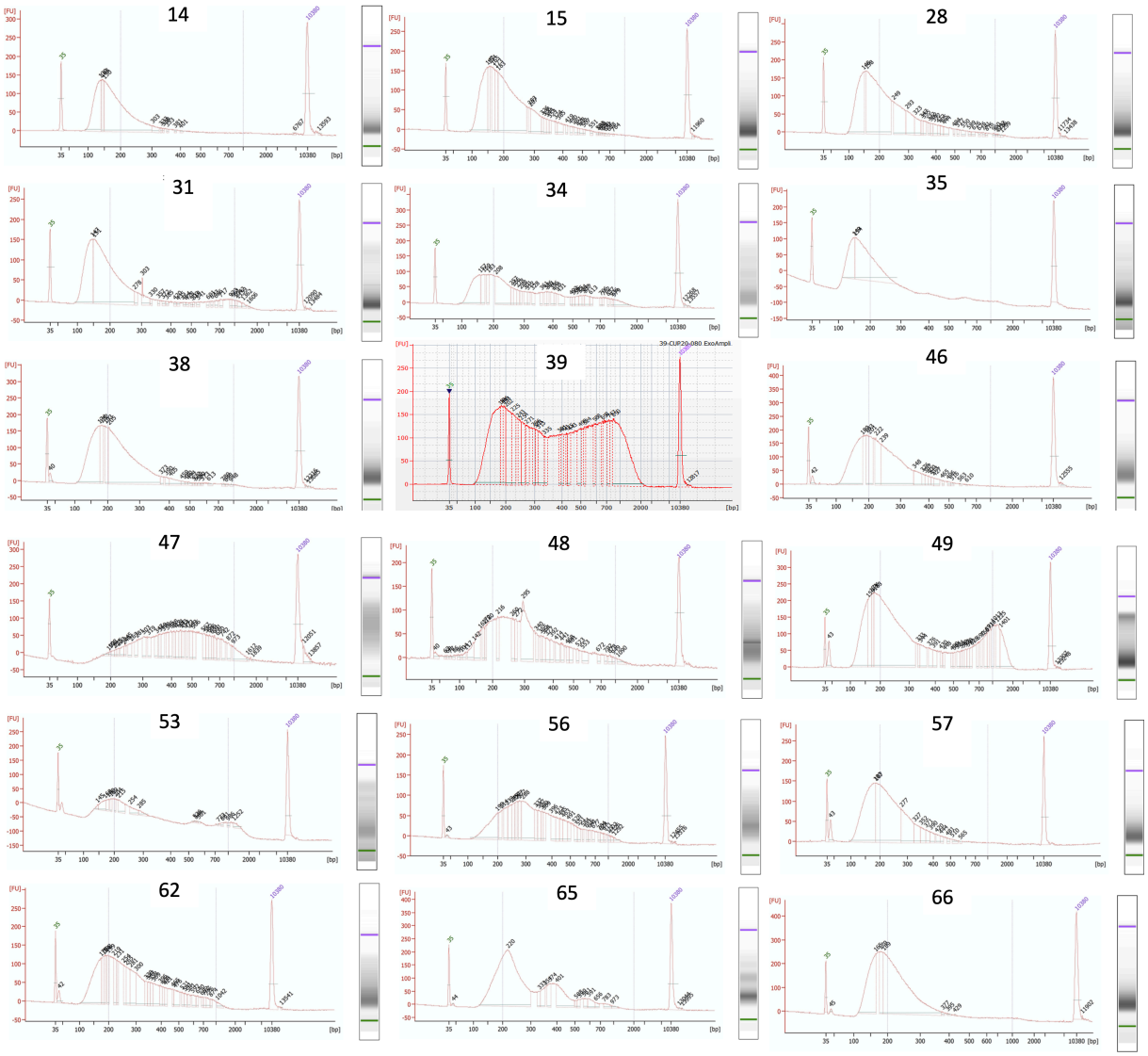


Abbildung 12 *Profile erstellt durch den Bioanalyzer 2100 High Sensitive Assay von Agilent Technologies. Die x-Achse gibt die Fragmentlänge in bp an. Die y-Achse, die vom Bioanalyzer gemessene Spannung. Je höher der Peak, desto höher die Konzentration der Fragmente. Die zwei Marker (Lower und Upper Marker) legen die untere (35 bp) und die obere (10380 bp) Grenze fest. Von den insgesamt 18 exoDNA Proben besitzen 12 einen Hauptpeak bei 150 bp (Probe Nr. 14, 15, 28, 31, 34, 35, 38, 46, 53, 57, 65, 66), 2 besitzen einen Hauptpeak bei 200 und 700 bp (Probe Nr. 39 und 49) und 4 Proben besitzen Fragmente mit ganz unterschiedlicher Länge (Probe Nr. 47, 48, 56, 62).*

Tabelle 22 *Auflistung aller exoDNA-Proben und die Einteilung anhand der Fragmentlängen mit Hilfe der Ergebnisse durch den Bioanlayzer. Es gibt eine Gruppe mit einem Hauptpeak bei 150 bp, eine Gruppe mit zwei Hauptpeaks (einem bei 200 und einem bei 700 bp), sowie eine Gruppe, in der kein Peak ersichtlich ist.*

laufende Nr.	Patienten-ID	Primärtumor	Bioanalyzer-Profil	generiertes Genomprofil	bestätigte Diagnose Meningeosis
14	MC17-256 Liq	Mamma-Ca	Hauptpeak bei 150 bp	n.a.	ja
15	SCLC18-0013 Liq	Small Cell Lung Cancer	Hauptpeak bei 150 bp	balanciert	nein
28	MC19-339-Liq	Mamma-Ca	Hauptpeak bei 150 bp	balanciert	nein
31	SCLC19-370 Liq	Small Cell Lung Cancer	Hauptpeak bei 150 bp	n.a.	nein
34	CUP20-047 Liq	unbekannt	Hauptpeak bei 150 bp	n.a.	nein
35	MC20-056 Liq	Mamma-Ca	Hauptpeak bei 150 bp	n.a.	nein
38	MM20-076 Liq	Malignes Melanom	Hauptpeak bei 150 bp	n.a.	ja
39	CUP20-080 Liq	unbekannt	Peak bei 200 bp und Peak bei 700 bp	balanciert	ja
46	MC20-250 Liq	Mamma-Ca	Hauptpeak bei 150 bp	n.a.	nein
47	BC20-273 Liq	Bronchial-Ca	kein eindeutiger Peak	n.a.	nein
48	BC20-279 Liq	Bronchial-Ca	kein eindeutiger Peak	n.a.	nein
49	MM20-301 Liq	Malignes Melanom	Peak bei 200 bp und Peak bei 700 bp	n.a.	nein
53	MM20-327 Liq	Malignes Melanom	Hauptpeak bei 150 bp	n.a.	nein
56	MA20-334 Liq	Magen-Ca	kein eindeutiger Peak	n.a.	ja
57	BC20-335 Liq	Bronchial-Ca	Hauptpeak bei 150 bp	balanciert	nein
62	BC21-352 Liq	Bronchial-Ca	kein eindeutiger Peak	n.a.	nein
65	MM21-367 Liq	Malignes Melanom	Hauptpeak bei 150 bp	n.a.	ja
66	BC21-395 Liq	Bronchial-Ca	Hauptpeak bei 150 bp	balanciert	nein

Bioanalyzer-Profile (tumorspezifischer) exoDNA sind patientenspezifisch

Wird die Fragmentlängenverteilung der DNA aus tumor- und unspezifischen Exosomen im Bioanalyzer-Profil betrachtet, lässt sich für jeden Patienten trotz der unterschiedlichen Anreicherungsprotokolle jeweils ein individuelles Muster erkennen (siehe Abbildung 13). Das Schema der tumorspezifischen Exosomen spiegelt das der unspezifischen wider. Dieses Phänomen zeigt sich bei allen sieben Patienten, aus denen tumor- und unspezifische exoDNA isoliert werden konnte. Außerdem belegt die Darstellung von DNA-Fragmenten EpCAM/MCSP-positiven Exosomen erneut, dass die Isolation tumorspezifischer Exosomen und deren DNA funktioniert hat.

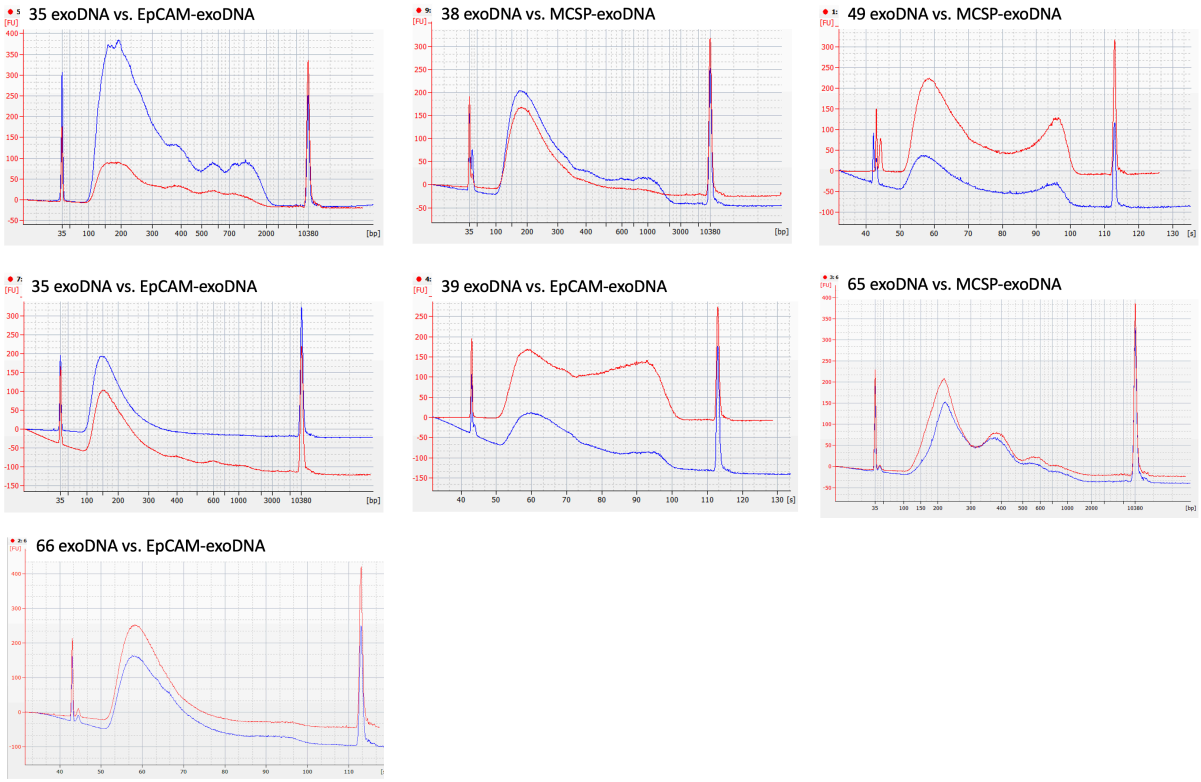


Abbildung 13 *Profile erstellt durch den Bioanalyzer 2100 High Sensitive Assay von Agilent Technologies. Die x-Achse gibt die Fragmentlänge in bp an. Die y-Achse, die vom Bioanalyzer gemessene Spannung. Je höher der Peak, desto höher die Konzentration der Fragmente. Die zwei Marker (Lower und Upper Marker) legen die untere (35 bp) und die obere (10380 bp) Grenze fest. Dargestellt sind alle sieben Patienten, bei denen die DNA aus unspezifischen (jeweils in Rot) und mutmaßlich tumorspezifischen (jeweils in Blau) Exosomen isoliert wurden. Jeder Patient weist ein eigenes Exosomen-spezifisches Muster auf.*

Analyten eines Patienten im Vergleich

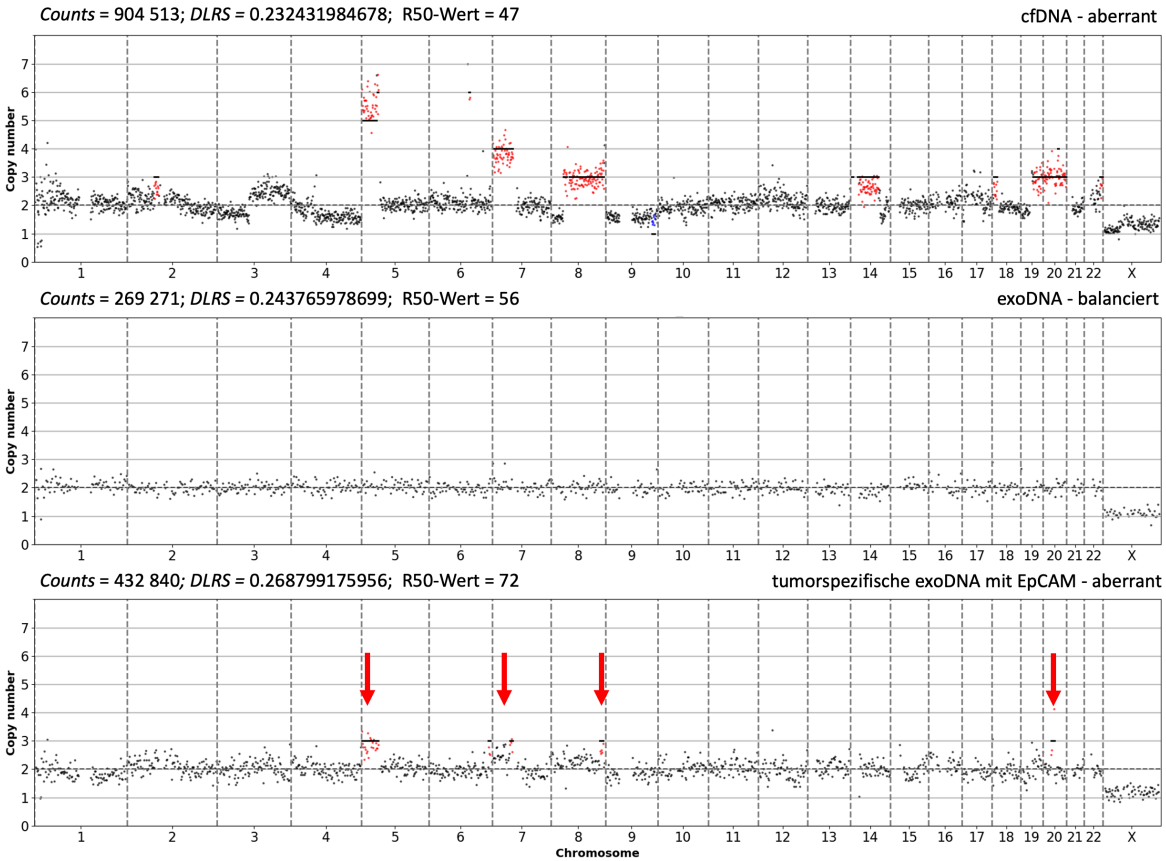
Insgesamt stehen sieben Patienten zur Verfügung, von denen cfDNA, exoDNA und tumorspezifische exoDNA untersucht werden konnte. Fünf cfDNA-, zwei exoDNA- und drei tumorspezifische exoDNA-Profile von diesen sieben Patienten sind auswertbar.

Patient Nr. 39 zeigt Aberrationen in der cfDNA und tumorspezifischen exoDNA (vergleiche Abbildung 14 a). Die DNA aus unspezifischen Exosomen liefert ein balanciertes Profil. Dies lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass der Großteil der exoDNA aus gesunden Zellen stammt und somit die DNA aus den Tumorzellen überlagert wird. Dieses Beispiel zeigt zum einen, dass die Isolation und Analyse von tumorspezifischer exoDNA erfolgreich war und zum anderen, dass die cfDNA aus dem gleichen Probenvolumen über das stärkste und aussagekräftigste Profil verfügt. Außerdem dürfte es sich bei dem CUP um ein Karzinom als Primärtumor handeln, da die Exosomen mittels EpCAM-spezifischer Antikörper isoliert wurden. In der tumorspezifischen exoDNA zeigen sich dieselben Aberrationen wie in der cfDNA (mit Pfeilen gekennzeichnet), jedoch weniger ausgeprägt. Der Nachweis an aberranten Profilen stimmt mit der mittels MRT gesicherten Diagnose Meningeosis überein.

Ein weiteres Beispiel für eine erfolgreiche Isolation tumorspezifischer exoDNA liefert Patient Nr. 34 (vergleiche Abbildung 14 b). Auch hier liegt sehr wahrscheinlich ein Karzinom als Primärtumor vor. Es werden dieselben Aberrationen wie in der cfDNA detektiert. Die exoDNA besitzt nur ein sehr schwaches Profil, womit es aufgrund der sehr geringen *Count*-Anzahl als nicht auswertbar gilt. Dennoch lassen sich angedeutet dieselben aberranten Züge wie in den anderen beiden Profilen erkennen (siehe rote Pfeile). Nachdem laut Angaben die Diagnose eine Meningeosis fraglich war, könnte dieser Nachweis an Tumor-DNA die Diagnostik weiter voran bringen.

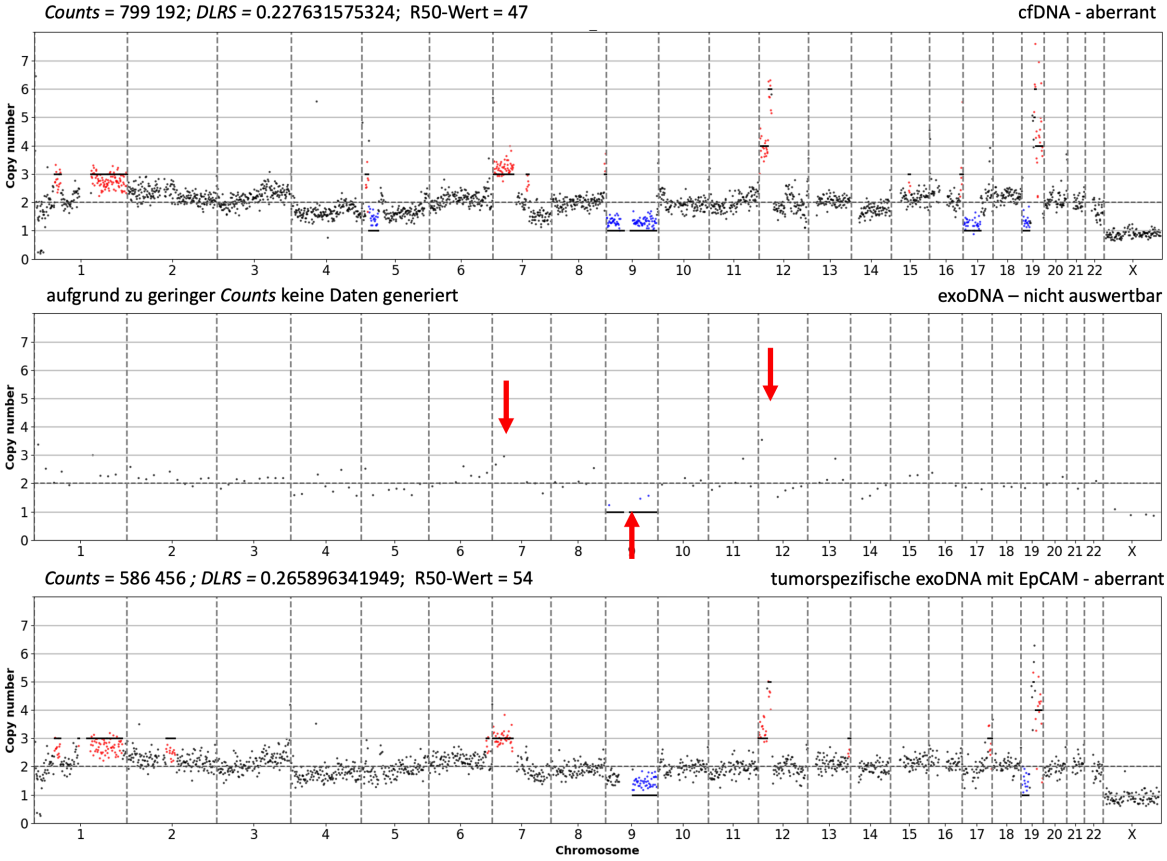
Patient Nr. 35 besitzt ein balanciertes cfDNA-Profil. Die exoDNA, sowie die tumorspezifischen exoDNA können aufgrund der zu großen Streuung nicht ausgewertet werden (siehe Abbildung 14 c). Bei diesem Patienten existieren zwei cfDNA-Profile, da die Probe vor der Sequenzierung in kleinere (< 700 bp; gekennzeichnet mit „K“) und größere (> 700 bp; gekennzeichnet mit „G“) Fragmente aufgetrennt wurde, um herauszufinden, ob die zirkulierende DNA aus Tumorzellen gegebenenfalls in einer bevorzugten Fragmentgröße aufzufinden ist. Hier konnte in keiner Fraktion ctDNA nachgewiesen werden. Auch histopathologisch und radiologisch konnten keine Anhaltspunkte für eine Meningeosis gefunden werden.

a



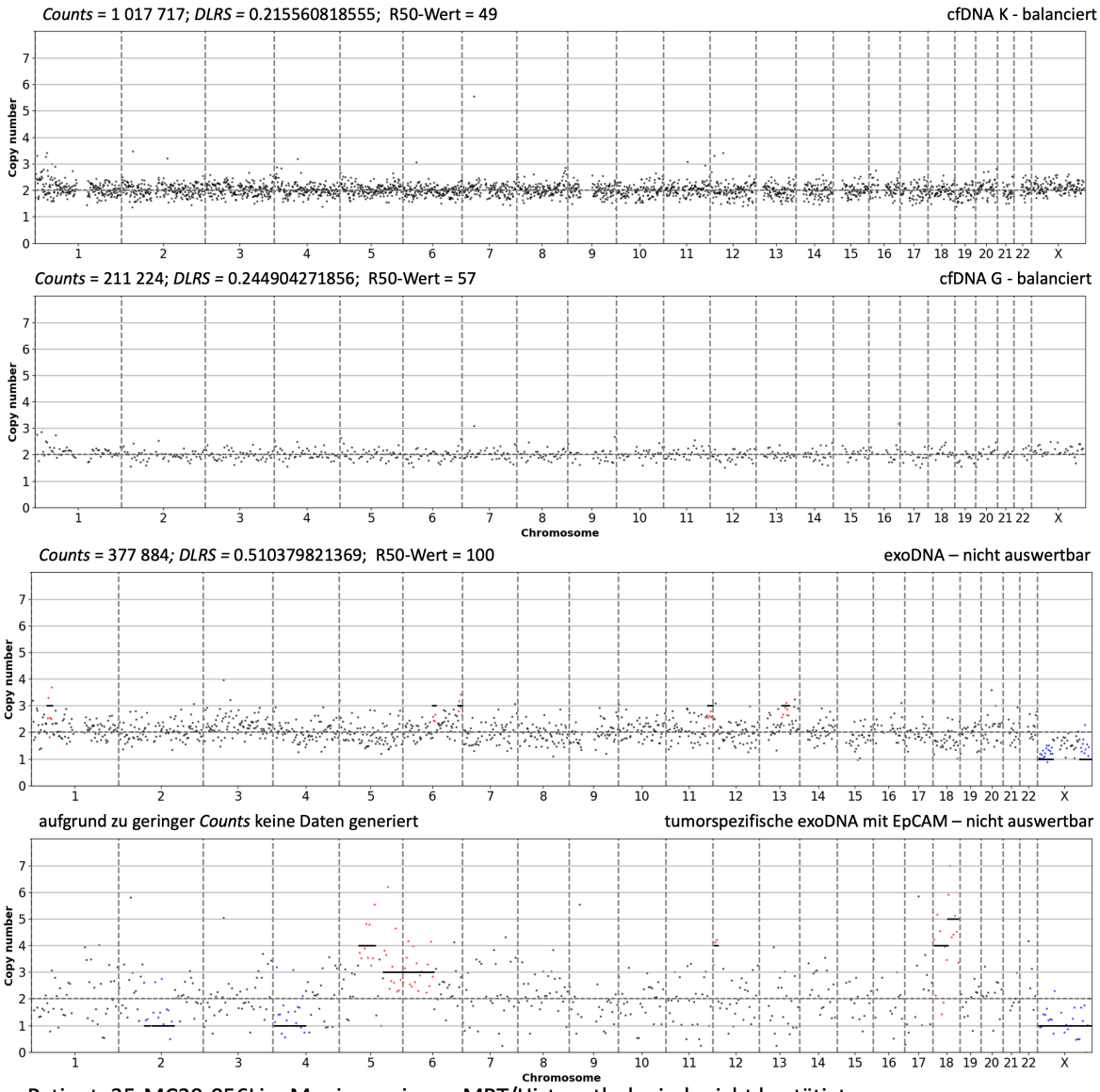
Patient: 39-CUP20-080Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

b



Patient: 34-CUP20-047Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch hochverdächtig, aber nicht bewiesen

c

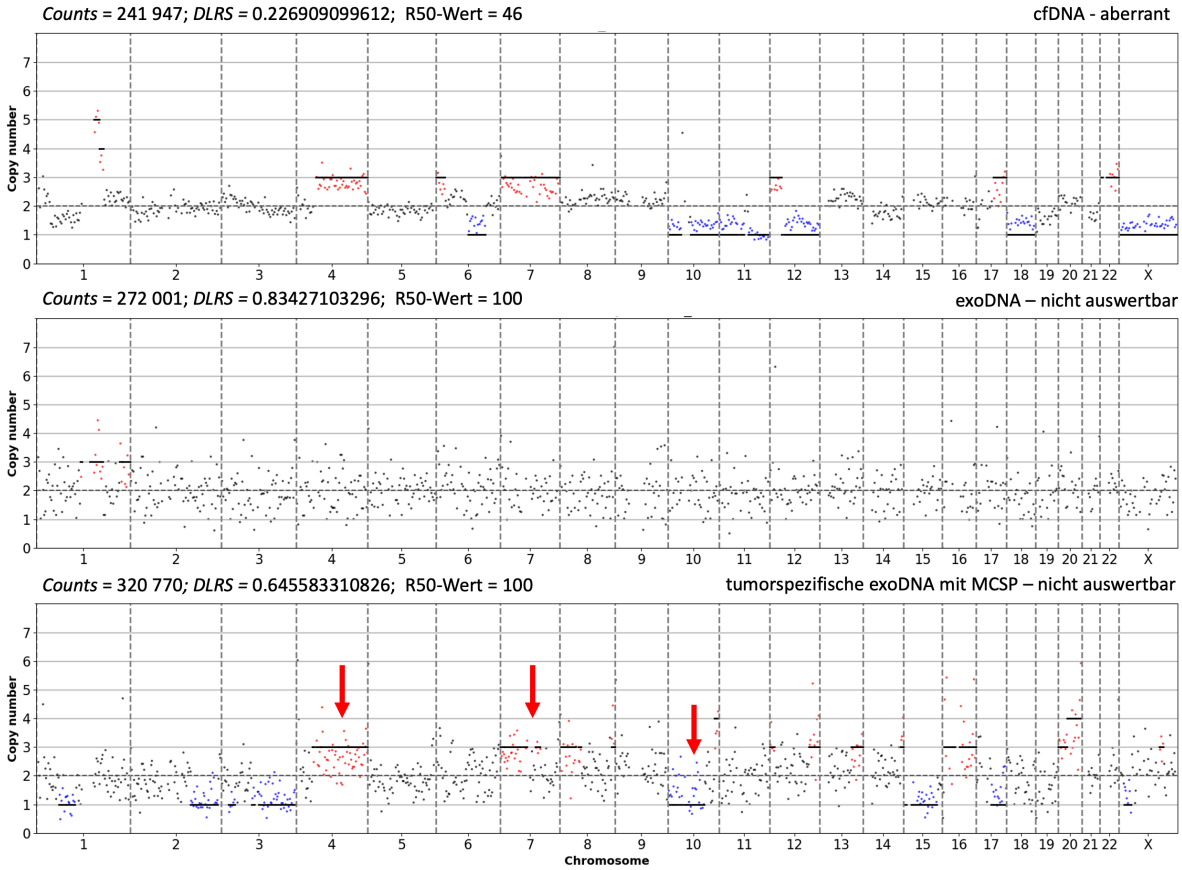


Patient: 35-MC20-056Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

Bei Patient Nr. 38 besitzt die tumorspezifische exoDNA eine sehr breite Streuung und kann somit nicht in die Auswertung einfließen. Wird sie jedoch mit der cfDNA verglichen, lassen sich angedeutet mehrere Überschneidungen in den Aberrationen feststellen (siehe Pfeile). Dennoch liefert die cfDNA das deutlichste Ergebnis. Auch die exoDNA generiert aufgrund der zu großen Streuung kein auswertbares Profil (vergleiche Abbildung 14 d). Hier stimmen die Ergebnisse mit dem Vorliegen einer *Meningeosis neoplastica* überein.

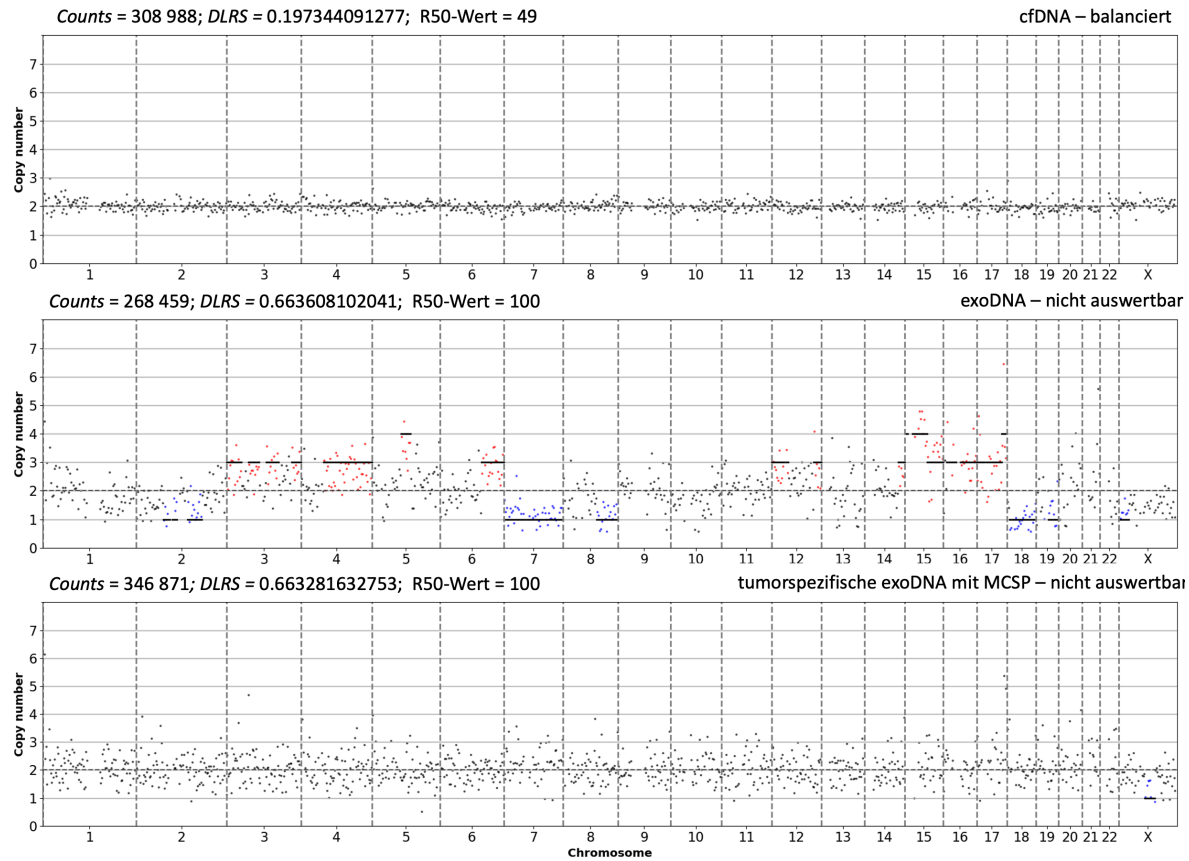
Patient Nr. 49 besitzt ein balanciertes cfDNA-Profil. Die tumor- und unspezifische exoDNA kann aufgrund der zu großen Streuung nicht ausgewertet werden (Abbildung 14 e). Bei diesem Patienten gibt es zum Zeitpunkt der Probenentnahme kein radiologisches oder histopathologisches Korrelat für das Vorliegen einer Meningeosis.

d



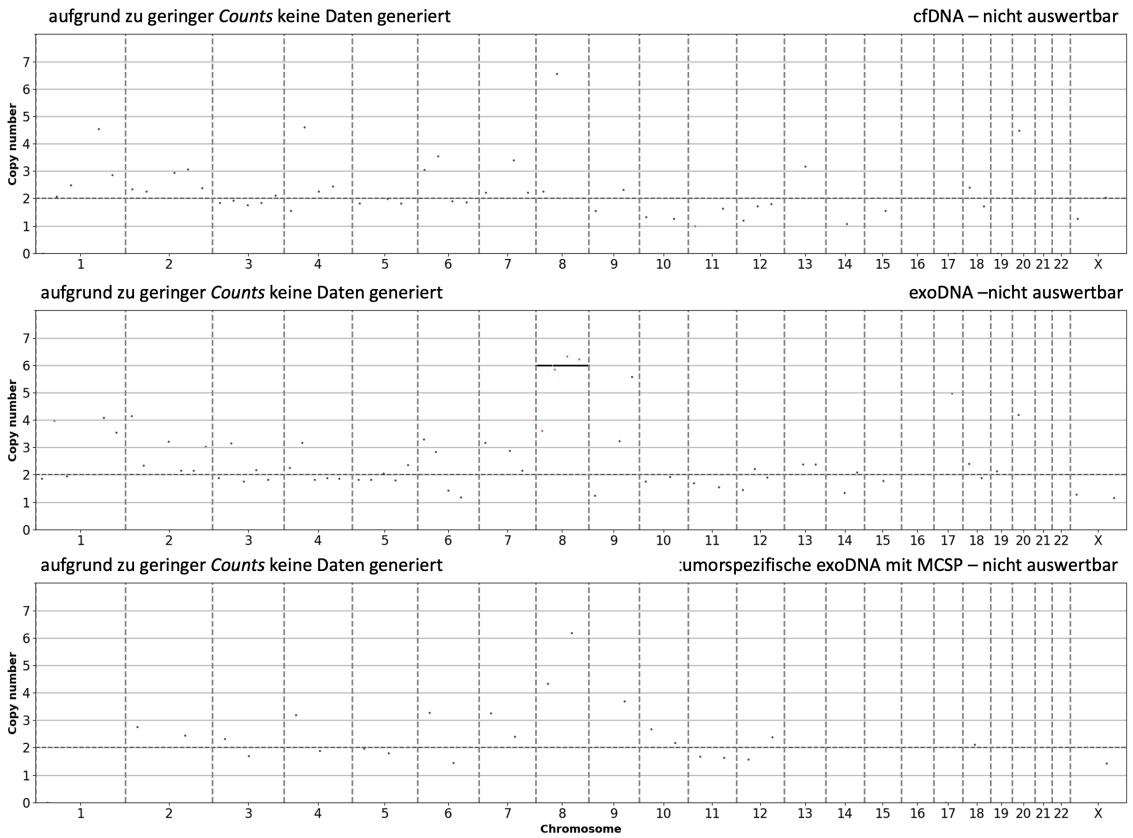
Patient: 38-MM20-076Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

e



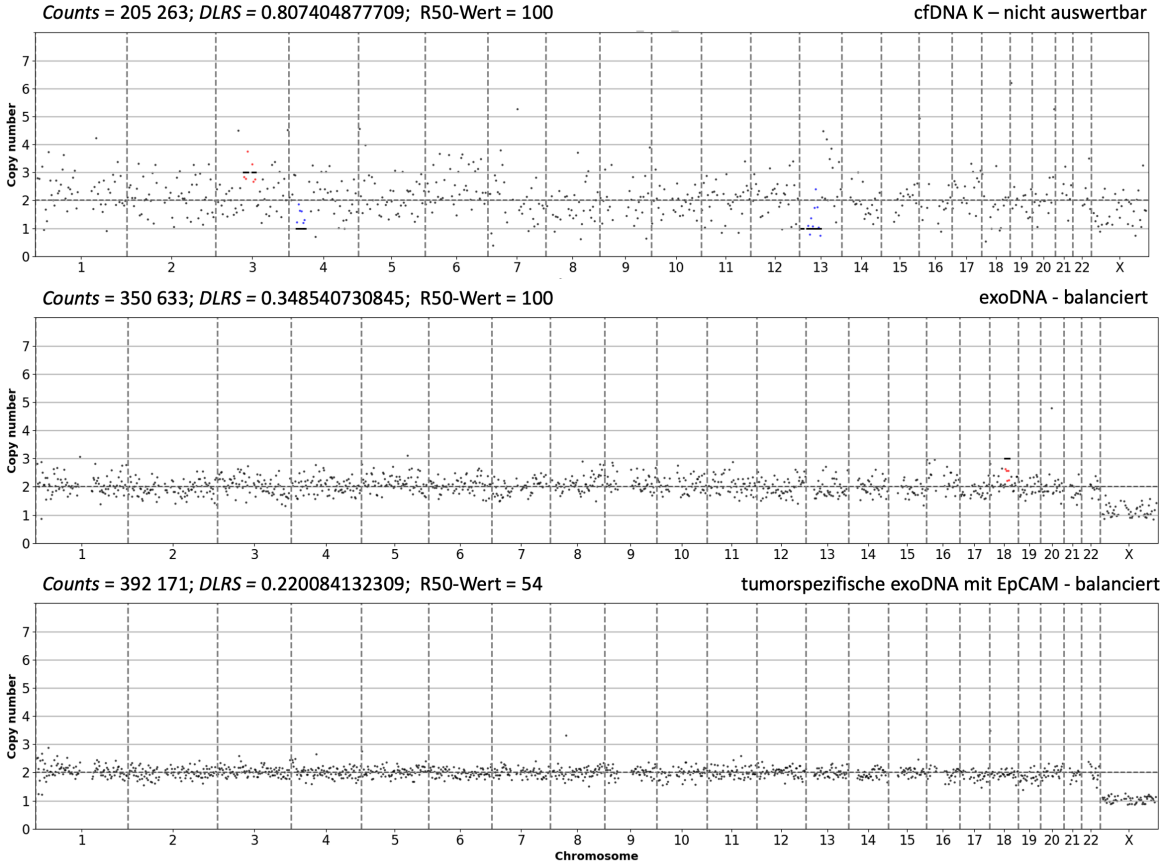
Patient: 49-MM20-301Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

f



Patient: 65-MM21-367Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

g



Patient: 66-BC21-395Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

Abbildung 14 a-g *Gegenüberstellung aller generierten Genomprofile eines Patienten von cfDNA, exoDNA und tumorspezifischer exoDNA. Falls eine cfDNA-Probe in kürzere und längere Fragmente aufgetrennt wurde, wurde dies mit den Kürzeln ‚K' für ‚kurze Fragmente' < 700 bp und ‚G' für ‚große Fragmente' > 700 bp versehen. Die zugehörige Patienten-ID findet sich unter den Genomprofilen. Zur Erklärung der Profile vergleiche Abbildung 8.*

Eine Patientenprobe (Nr. 65) liefert aufgrund der viel zu geringen *Count*-Anzahl bei keinem Analyten ein Ergebnis (vergleiche Abbildung 14 f), obwohl zum Beispiel bei der cfDNA beste Voraussetzungen mit einer Konzentration von 1.525 ng/µl gegeben waren. Somit versprechen hohe DNA-Konzentrationen nach Extraktion nicht automatisch aussagekräftige Genomprofile. Bei Patient Nr. 65 bestätigte sich die Diagnose *Meningeosis neoplastica*.

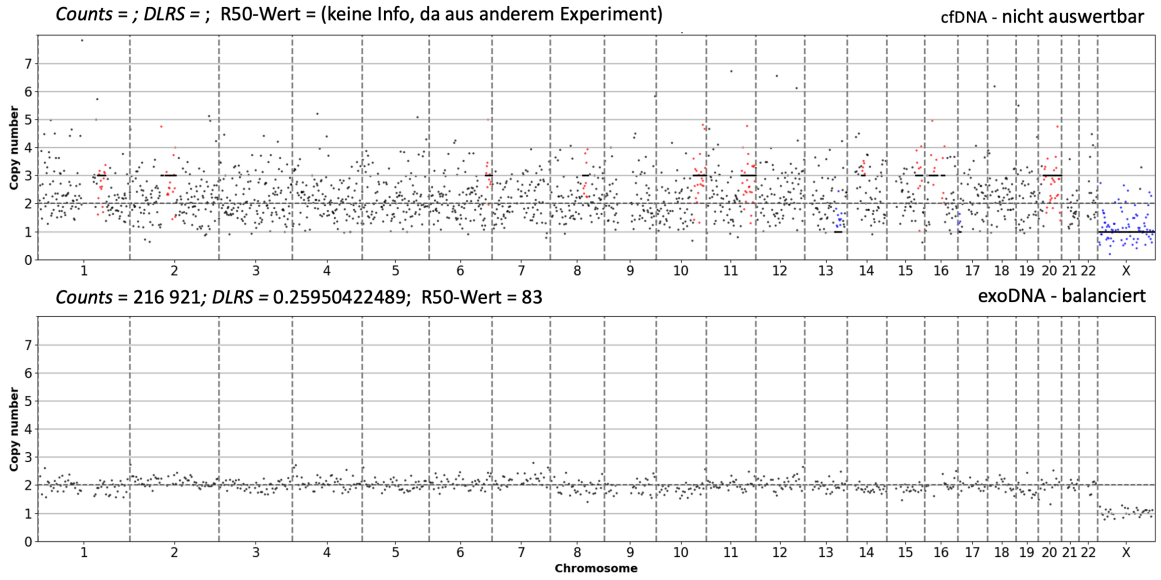
Patient Nr. 66 zeigt kein auswertbares cfDNA-Profil, jedoch balancierte Profile für tumor- und unspezifische exoDNA (vergleiche Abbildung 14 g). Wie es zu einem balancierten Profil aus tumorspezifischer exoDNA kommen konnte, ist fraglich. Möglicherweise finden sich zu einem geringen Anteil Exosomen aus EpCAM-positiven Zellen nicht-maligner Herkunft (z.B. Hautzellen des Plattenepithels) im Liquor. Diese Verschleppung der Zellen könnte sich bei der Punktion ereignet haben. Dabei handelt es sich jedoch um reine Spekulation. Die balancierten Profile stehen jedoch mit der Tatsache im Einklang, dass auch die Verdachtsdiagnose einer Meningeosis weder radiologisch noch histopathologisch bestätigt wurde.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den sieben Liquorproben, aus denen sowohl cfDNA als auch exoDNA und tumorspezifische exoDNA gewonnen werden konnten, aus der cfDNA die aussagekräftigsten Profile hervorgehen. Auch die tumorspezifischen exoDNA erwies sich in zwei Fälle aufschlussreich. Hingegen zeigte sich die unspezifische exoDNA als Marker mit der geringsten diagnostischen Aussagekraft.

Bei den elf Patienten bei denen nur zwei Analyten (cfDNA vs. unspezifische exoDNA) zur Verfügung standen, zeigte sich die exoDNA erneut als der am wenigsten hilfreiche Parameter. Nur drei exoDNA-Proben (3 von 11; 27 %; Probe Nr. 15, 28, 57) generierten ein auswertbares Genomprofil - allesamt balanciert. Die restlichen exoDNA-Proben (8 von 11; 73 %; Probe Nr. 14, 28, 31, 46, 47, 48, 53, 56, 62) konnten aufgrund zu großer Streuung oder einer zu geringen *Count*-Anzahl nicht ausgewertet werden. Bei den Proben 46, 47 und 48 war die Ausgangsmenge an Material so gering, dass weder eine Analyse noch die Generierung eines verwertbaren Datensatzes möglich war. Somit steht zum Abgleich kein exoDNA Genomprofil zur Verfügung.

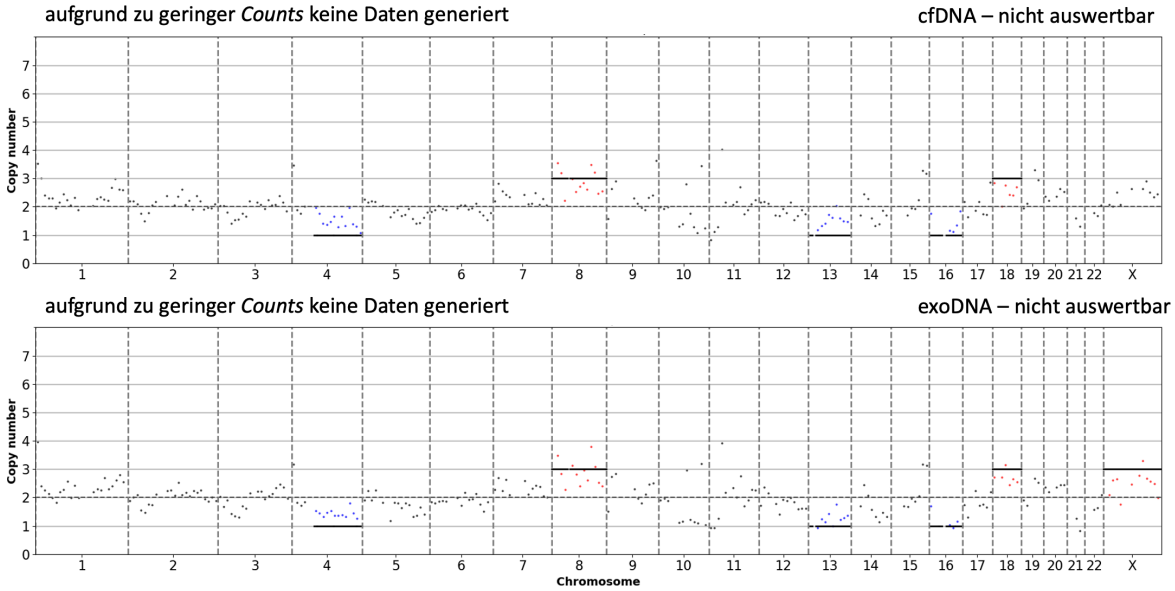
In nur einem Fall (Probe Nr. 15) konnte die exoDNA ein auswertbares Profil liefern, die cfDNA hingegen nicht (siehe Abbildung 15 a). Bei Patient Nr. 56 lässt sich sowohl in der cfDNA als auch in der exoDNA ein aberrantes Muster erahnen, allerdings zählt die Probe aufgrund ihrer geringen *Count*-Anzahl zu den nicht auswertbaren Profilen (siehe Abbildung 15 b). Bei allen Patienten, bei denen mindestens ein auswertbarer Analyt vorlag (alle bis auf Probe Nr. 46 und 56), stimmt die Diagnose mit den erstellten Genomprofilen überein. Eine vollständige Auflistung aller Profile findet sich im Anhang.

a



Patient: 15-SCLC18-0013 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

b



Patient: 56-MA20-334; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

Abbildung 15 *Gegenüberstellung der Genomprofile von cfDNA und exoDNA der Patienten mit laufender Nr. 15 und 56.* ***a*** *Bei Patient Nr. 15 liefert die exoDNA ein auswertbares Profil, die cfDNA hingegen nicht, was in diesem Kollektiv die Ausnahme bildet.* ***b*** *Die Profile von Patient 56 sind aufgrund der zu geringen Countanzahl nicht auswertbar, es lassen sich jedoch Gains und Losses an denselben Stellen erahnen. Zur Erklärung der Profile vergleiche Abbildung 8.*

Großteil der Ergebnisse stimmt mit den Angaben zur Diagnose Meningeosis neoplastica überein

Nachdem sich in diesem Kollektiv auch Patienten befinden, bei denen allein der Verdacht auf eine Meningeosis für die Lumbalpunktion ausreichte, sollte mittels Liquoranalyse überprüft werden, ob die hier generierten Ergebnisse mit der Verdachtsdiagnose übereinstimmen. Dafür wurde untersucht, ob mindestens einer der Analyten eines Patienten (cfDNA, exoDNA oder tumorspezifische exoDNA) genomische Kopienzahl-Aberrationen aufweist und gleichzeitig eine histopathologische oder radiologische Sicherung der Diagnose vorliegt. Sich deckende Resultate von bestätigter Meningeosis und Nachweis aberranter Profile bzw. nicht bestätigter Diagnose und balancierten Profilen, liefert die Mehrheit der Proben mit mindestens einem auswertbaren Analyten (18 von 29; 62 %; Probe Nr. 14, 15, 18, 24, 25, 28, 29, 31, 35, 38, 39, 47, 48, 49, 53, 57, 62 und 66).

Würden die objektiven Bewertungskriterien für die CNA-Profile als zweitrangig betrachtet, könnten drei (3 von 29; 10 %) weitere dieser Gruppe zugeordnet werden. Bei diesen drei Patientenproben lassen sich aberrante Profile erahnen. Lediglich die geringe *Count*-Anzahl war hier limitierender Faktor (Proben-Nr. 56, 58, 65).

Bei einer weiteren Patientenprobe (Probe Nr. 34) war der Verdacht hochgradig, jedoch konnte weder die Bildgebung noch die Liquordiagnostik (Nachweis maligner Zellen) die Diagnose sichern. Bei der Analyse des zellfreien Überstandes konnten jedoch in der cfDNA, exoDNA und der tumorspezifischen exoDNA Kopienzahl-Aberrationen nachgewiesen werden. Dies unterstützt den Verdacht, dass es sich dabei tatsächlich um eine *Meningeosis neoplastica* handelt.

Bei lediglich vier Patienten (4 von 29; 14 %) stimmen die Angaben nicht mit den hier ermittelten Ergebnissen überein. Patient Nr. 17, sowie Patient Nr. 21 und 55 besitzen ein balanciertes cfDNA-Profil, obwohl die Diagnose Meningeosis letztlich bestätigt wurde. Hier könnte wieder die Überlagerung der ctDNA durch den weitaus größeren Anteil an DNA aus gesunden Zellen eine mögliche Erklärung liefern. Bei Patient Nr. 22 hingegen weist die cfDNA eindeutig ein aberrantes Profil auf, der Verdacht auf eine Meningeosis konnte allerdings zum Zeitpunkt der Probenentnahme weder radiologisch noch histopathologisch bestätigt werden. Mutmaßlich war die Erkrankung noch nicht weit genug fortgeschritten. Dies ist ein gutes Beispiel dafür, dass die Analyse der nicht-zellulären Bestandteile des Liquors als ergänzendes Verfahren zur Absicherung der Diagnose dienen könnten.

Die übrigen drei Patienten (3 von 29; 10 %; Probe Nr. 16, 46, 64) generierten weder auswertbare cfDNA- noch exoDNA-Genomprofile und können somit für diese Gegenüberstellung nicht berücksichtigt werden.

laufende Nr.	Patienten-ID	Primärtumor	Analyt	Genomprofil	Meningeosis bestätigt Ja oder Nein
14	**MC17-256 Liq**	Mamma-Ca	cfDNA	aberrant	JA
	MC17-256 Liq	Mamma-Ca	exoDNA	nicht auswertbar	
15	**SCLC18-0013 Liq**	Small Cell Lung Cancer	cfDNA	nicht auswertbar	NEIN
	SCLC18-0013 Liq	Small Cell Lung Cancer	exoDNA	balanciert	
16	**MC18-0019 Liq**	Mamma-Ca	cfDNA	nicht auswertbar	JA
17	**MC18-0087 Liq**	Mamma-Ca	cfDNA	balanciert	JA
18	**MC18-0123 Liq**	Mamma-Ca	cfDNA	aberrant	JA
21	**MC18-201 Liq**	Mamma-Ca	cfDNA	balanciert	JA
22	**CUP18-210 Liq**	Cancer of Unkown Primary	cfDNA	aberrant	NEIN
24	**CC19-027 Liq**	Cancer of Unkown Primary	cfDNA	aberrant	JA
25	**MM19-285-Liq**	Malignes Melanom	cfDNA < 700 bp	balanciert	NEIN
	MM19-285-Liq	Malignes Melanom	cfDNA > 700 bp	nicht auswertbar	
28	**MC19-339-Liq**	Mamma-Ca	cfDNA < 700 bp	balanciert	
	MC19-339-Liq	Mamma-Ca	cfDNA > 700 bp	nicht auswertbar	NEIN
	MC19-339-Liq	Mamma-Ca	exoDNA	balanciert	
29	**MC19-355-Liq**	Mamma-Ca	cfDNA < 700 bp	balanciert	NEIN
	MC19-355-Liq	Mamma-Ca	cfDNA > 700 bp	balanciert	
31	**SCLC19-370 Liq**	Small Cell Lung Cancer	cfDNA	balanciert	NEIN
	SCLC19-370 Liq	Small Cell Lung Cancer	exoDNA	nicht auswertbar	
34	**CUP20-047 Liq**	Cancer of Unkown Primary	cfDNA	aberrant	
	CUP20-047 Liq	Cancer of Unkown Primary	exoDNA	nicht auswertbar	NEIN
	CUP20-047 Liq	Cancer of Unkown Primary	EpCAM exoDNA	aberrant	
35	**MC20-056 Liq**	Mamma-Ca	cfDNA < 700 bp	balanciert	
	MC20-056 Liq	Mamma-Ca	cfDNA > 700 bp	balanciert	NEIN
	MC20-056 Liq	Mamma-Ca	exoDNA	nicht auswertbar	
	MC20-056 Liq	Mamma-Ca	EpCAM exoDNA	nicht auswertbar	
38	**MM20-076 Liq**	Malignes Melanom	cfDNA	aberrant	
	MM20-076 Liq	Malignes Melanom	exoDNA	nicht auswertbar	JA
	MM20-076 Liq	Malignes Melanom	MCSP exoDNA	nicht auswertbar	
39	**CUP20-080 Liq**	Cancer of Unkown Primary	cfDNA	aberrant	
	CUP20-080 Liq	Cancer of Unkown Primary	exoDNA	balanciert	JA
	CUP20-080 Liq	Cancer of Unkown Primary	EpCAM exoDNA	aberrant	
46	**MC20-250 Liq**	Malignes Melanom	cfDNA	nicht auswertbar	NEIN
	MC20-250 Liq	Malignes Melanom	exoDNA	nicht auswertbar	
47	**BC20-273 Liq**	Bronchial-Ca	cfDNA	balanciert	NEIN
	BC20-273 Liq	Bronchial-Ca	exoDNA	nicht auswertbar	
48	**BC20-279 Liq**	Bronchial-Ca	cfDNA	balanciert	NEIN
	BC20-279 Liq	Bronchial-Ca	exoDNA	nicht auswertbar	
49	**MM20-301 Liq**	Malignes Melanom	cfDNA	balanciert	
	MM20-301 Liq	Malignes Melanom	exoDNA	nicht auswertbar	NEIN
	MM20-301 Liq	Malignes Melanom	MCSP exoDNA	nicht auswertbar	
53	**MM20-327 Liq**	Malignes Melanom	cfDNA	balanciert	NEIN
	MM20-327 Liq	Malignes Melanom	exoDNA	nicht auswertbar	
55	**MC20-028 Liq**	Mamma-Ca	cfDNA < 700 bp	nicht auswertbar	JA
	MC20-028 Liq	Mamma-Ca	cfDNA > 700 bp	balanciert	
56	**MA20-334 Liq**	Magen-Ca	cfDNA	nicht auswertbar	JA
	MA20-334 Liq	Magen-Ca	exoDNA	nicht auswertbar	
57	**BC20-335 Liq**	Bronchial-Ca	cfDNA < 700 bp	balanciert	
	BC20-335 Liq	Bronchial-Ca	cfDNA > 700 bp	nicht auswertbar	NEIN
	BC20-335 Liq	Bronchial-Ca	exoDNA	balanciert	
58	**MM20-337-Liq**	Malignes Melanom	cfDNA	nicht auswertbar	JA
62	**BC21-352 Liq**	Bronchial-Ca	cfDNA < 700 bp	balanciert	
	BC21-352 Liq	Bronchial-Ca	cfDNA > 700 bp	nicht auswertbar	NEIN
	BC21-352 Liq	Bronchial-Ca	exoDNA	nicht auswertbar	
64	**MC21-362 Liq**	Mamma-Ca	cfDNA	nicht auswertbar	JA
	MC21-362 Liq	Mamma-Ca	DNA Probe verloren		
65	**MM21-367 Liq**	Malignes Melanom	cfDNA	nicht auswertbar	
	MM21-367 Liq	Malignes Melanom	exoDNA	nicht auswertbar	JA
	MM21-367 Liq	Malignes Melanom	MCSP exoDNA	nicht auswertbar	
66	**BC21-395 Liq**	Bronchial-Ca	cfDNA < 700 bp	nicht auswertbar	
	BC21-395 Liq	Bronchial-Ca	cfDNA > 700 bp	nicht auswertbar	NEIN
	BC21-395 Liq	Bronchial-Ca	exoDNA	balanciert	
	BC21-395 Liq	Bronchial-Ca	EpCAM exoDNA	balanciert	

Tabelle 23 *Vollständige Auflistung aller untersuchter Patientenproben mit zugehörigem Sequenzierergebnis (aberrant vs. balanciert vs. nicht auswertbar. Die 1. Spalte gibt die laufende Nummer, die 2. Spalte die Patienten-ID an. In der 3. Spalte ist der Primärtumor angegeben. Die 4. Spalte zeigt, welche Analyten pro Patient zur Verfügung standen und welches Genomprofil daraus resultierte (5. Spalte). In der letzten Spalte wird ersichtlich, ob letztlich eine Diagnosesicherung radiologisch oder histomorphologisch gelang. Konnten im Bioanalyzer-Profil der cfDNA auch größere Fragmente ausgemacht werden, wurden diese mit dem Protokoll aus 2.6. in kleinere Fragmente (< 700 bp) und größere Fragmente (> 700 bp) aufgetrennt.*

5.1. Einflussfaktoren auf die gemessenen cfDNA-Konzentrationen

Der Durchschnittswert, der gemessenen cfDNA-Konzentrationen, lag bei 0.351 ng/µl mit Höchstwerten von 0.744 ng/µl und 1.525 ng/µl bezogen auf das ursprüngliche Probenvolumen (vergleiche Tabelle 19). Das ist fast doppelt so hoch als die angegebenen Referenzwerte der Blutplasmaproben Krebskranker von *Barbany et al.* mit durchschnittlich 0.180 ng/µl (Barbany et al., 2019). Rein spekulativ müssten die Werte im Liquor eigentlich niedriger als im Blut liegen, da dort für gewöhnlich viel weniger Zellen als in der Blutbahn vorhanden sind.

Hiervon berichten auch Arbeiten wie beispielsweise *Pan et al*. Dabei wurden die cfDNA-Konzentrationen im Liquor und im Blutplasma von insgesamt zehn Patienten (Sieben mit soliden ZNS-Tumoren und drei mit Meningeosis) untersucht. Es stellte sich heraus, dass die durchschnittlichen cfDNA-Konzentrationen im Liquor geringer als die im Blutplasma ausfielen, jedoch war die Detektion von Mutationen aus den Liquorproben am aussagekräftigsten (Pan et al., 2015). Auch Fitzpatrick *et al.* wies im Lumbalpunktat von Brustkrebspatientinnen mit *Meningeosis carcinomatosa* geringere cfDNA-Spiegel als in den Plasmaproben nach. Jedoch wurden Werte mit einer ausgeprägten Varianz zwischen 0.00398 ng/µl bis 1.363 ng/µl verzeichnet (Fitzpatrick et al., 2022), in dessen Bereich sich auch die Ergebnisse dieser Arbeit einordnen lassen. Hingegen berichten *Angus et al.* sowie *Wu et al.* über weitaus geringere Konzentrationen (Median 0.00517 ng/µl bei Angus et al., 2021; 0.00175 ng/µl bei Wu et al., 2022). Bei allen Patientinnen und Patienten lag eine *Meningeosis carcinomatosa* vor. Diese Beispiele zeigen, wie variabel die Werte der cfDNA im Liquor sein können. Für eine vergleichende Analyse bezüglich der cfDNA-Konzentrationen im Blutplasma stand für diese Arbeit kein Material zur Verfügung.

Ein Grund für die angestiegenen cfDNA-Konzentrationen im Liquor könnte das bereits fortgeschrittene Krankheitsgeschehen sein. Maligne bzw. entzündliche Prozesse lassen die Zellzahl dort rasch in die Höhe schnellen. Dadurch ließen sich auch die erhöhten Werte der Patienten ohne radiologisch oder histopathologisch nachgewiesene leptomeningeale Metastasierung erklären. Schließlich wird nicht nur Tumor-DNA, sondern die Gesamt-cfDNA (z.B. in Folge einer Aktivierung des Immunsystems bei einer Entzündung) isoliert.

Ferner fällt auf, dass neun cfDNA-Proben in diesem Kollektiv nach deren Extraktion keine messbaren Konzentrationen aufweisen (vergleiche Tabelle 19). Bei den sehr geringen Mengen an cfDNA im Liquor reichen bereits kleine Abweichungen bei der Bearbeitung der Proben aus, um die Qualität und Aussagekraft der Ergebnisse maßgeblich zu beeinträchtigen. Es muss also an eine herabgesetzte Reliabilität bei der cfDNA-Extraktion gedacht werden. Letztendlich konnten jedoch alle cfDNA-Proben nach der Amplifikation für die Sequenzierung verwendet werden.

5.2. Nicht-zelluläre Bestandteile des Liquors als ergänzendes Diagnostikum

Wie eingangs erwähnt, ist die Diagnostik einer Meningeosis schwierig. Durch unklare MRT-Befunde und unspezifische Symptomatik kann sie auch übersehen werden. Dies könnte die von den Angaben abweichenden *CNA*-Profile erklären, da es Patienten gibt, die trotz nicht nachgewiesener Diagnose aberrante Profile besitzen. Womöglich war die Erkrankung zu diesem Zeitpunkt noch nicht weit genug fortgeschritten, um in einer Bildgebung oder als Tumorzellen im Liquor den entscheidenden Hinweis zu liefern. Selbst die balancierten Profile könnten als Hilfestellung zum Ausschluss einer Meningeosis dienen.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass sich die Untersuchung der nicht-zellulären Bestandteile des Liquors als ergänzendes diagnostisches Verfahren einer Meningeosis eignen kann. Insbesondere die cfDNA-Analyse stellt eine sehr sensitive Methode dar, die bereits bei geringen Probenvolumina vielversprechende Ergebnisse erzielt. Sicherlich können damit nicht alle Patienten identifiziert werden, allerdings würde die Sensitivität und Spezifität durch eine Kombination aus MRT, Histopathologie und Lumbalpunktion deutlich gesteigert werden. *Fitzpatrick et al.* ordnet die cfDNA-Analyse sogar als Diagnostikum mit der höchsten Sensitivität verglichen mit MRT (76-86 %) oder Liquor-Zytologie (45-67 % bei der ersten, 80-89 % nach wiederholten Punktionen) ein. Der Nachweis von malignen Zellen im Liquor hat zwar eine Spezifität von 100 %, geht jedoch mit einer hohen Rate an falsch-negativen Ergebnissen einher. Durch die cfDNA-Analyse könnten auch alle Meningeosis-negativen Patientinnen und Patienten korrekt identifiziert werden (Fitzpatrick et al., 2022).

Im Gegensatz dazu weist die unspezifische exoDNA in diesem Kollektiv aufgrund der unzureichenden Datenqualität die geringste diagnostische Aussagekraft auf. Die Analyse der tumorspezifischen Exosomen zeigt vielversprechendes Potential, setzt jedoch die vorherige Optimierung der Isolationsmethode voraus (vergleiche Abschnitt 5.7.).

5.3. Schwierige Einordnung von Genomprofilen

Grundsätzlich gibt es objektive Bewertungskriterien, ob ein Profil allgemein als auswertbar gilt oder nicht. Hierbei sind die Grenzen klar definiert (*Count*-Anzahl > 200 000*,* R50-Wert > 50*, Spread/DLRS* < 0.35). Allerdings liegen in diesem Kollektiv mehrere Profile vor, bei denen die Kriterien formal nicht erfüllt sind, aber dennoch eine Tendenz in eine Richtung erkennen lassen. Somit könnten Profile wie z.B. von Patient Nr. 56 (Abbildung 8 d) trotzdem als aberrant eingeordnet werden, obwohl zu wenig *Counts* gezählt werden. Manchmal erlaubt erst die Zusammenschau mehrerer Analyten eines Patienten eine Aussage darüber, ob es sich um DNA aus malignen Zellen handeln könnte. Ein Beispiel hierfür zeigt Patient Nr. 65 (Abbildung 14 f). Alle drei Profile können aufgrund der viel zu niedrigen *Count*-Anzahl eigentlich nicht ausgewertet werden, jedoch weisen alle dieselbe Aberration auf Chromosom 8 auf. Es ist nur ein vager Verdacht, dass es sich hierbei um ein aberrantes Profil und folglich um eine Meningeosis handeln könnte. Die Aussagekraft ist jedoch stark eingeschränkt und erlaubt keinesfalls eine Sicherung der Diagnose.

Ein weiterer Grenzfall ist das Vorliegen unebener Profile wie z.B. von Patient Nr. 31 (Anhang). Dieses weist Züge eines aberranten, als auch balancierten Profils auf und kann somit nicht einfach einer Gruppe zugeordnet werden. Es muss also jedes Profil individuell analysiert und bewertet werden. Die Erfahrung des Betrachters spielt dabei eine wesentliche Rolle. Diese Beispiele zeigen, wie uneindeutig die einzelnen Profile erscheinen können und wie komplex ihre objektive Beurteilung trotz vorliegender Bewertungskriterien ist.

5.4. Mögliche Gründe für die hohe Anzahl an balancierten Profilen

Nachdem bei den Patienten bereits der Verdacht auf eine Meningeosis für eine Liquorpunktion genügte, befinden sich auch Proben in diesem Kollektiv, die zum Zeitpunkt der Entnahme keine gesicherte Diagnose aufwiesen. Dies könnte eine Erklärung für die hohe Anzahl an balancierten *CNA*-Profilen abgeben. Von den insgesamt 29 Patienten konnte bei knapp der Hälfte (16 von 29; 55 %) letztlich keine Meningeosis radiologisch oder histopathologisch gesichert werden (vergleiche hierfür Tabelle 19). Darüber hinaus ist es möglich, dass das Tumorwachstum bzw. die Metastasierung und damit die Freisetzung von ctDNA bei einigen Patienten noch nicht genug ausgeprägt war. Damit wäre der Anteil an ctDNA im Genomprofil von cfDNA aus gesunden Zellen einfach überdeckt worden. Wie bereits in der Einführung erwähnt, befinden sich im Liquor normalerweise - im Gegensatz zu Blut - relativ wenige

Zellen. Hiermit sollte sich der Effekt an „störenden“, gesunden Zellen, welche die Analyse der ctDNA überlagert, minimieren. Allerdings muss bedacht werden, dass es sich bei den entnommenen Proben nicht um Liquor von Gesunden, sondern um Proben von Patienten mit Pathologien handelt. Dies könnte dazu führen, dass sich vermehrt Zellen (z.B. Immunzellen) im Liquor befinden, die ebenfalls cfDNA freisetzen und somit die Analyse der Tumor-DNA erschweren. Bisher gibt es keine Studien, die diesen Effekt im Liquor beschreiben, im Blutplasma hingegen schon. Anhand von Methylierungsmustern wurde von *Fox-Fisher et al.* die Dynamik der cfDNA-Spiegel aus Immunzellen im Blutplasma untersucht. Es konnte eine Erhöhung der freigesetzten cfDNA aus Immunzellen bei bestimmten immunologischen Prozessen im Körper wie z.B. nach einer Influenza-Impfung oder während einer akuten Entzündung der Speiseröhre beobachtet werden (Fox-Fisher et al., 2021).

5.5. Anreicherung von ctDNA in kürzeren oder längeren cfDNA-Fragmenten?

Es wird angenommen, dass es bei Karzinomen durch den hohen Zellumsatz vermehrt zu Nekrosen kommt (Kustanovich et al., 2019; Schwarzenbach et al., 2013), aber verhält es sich auch so mit deren Metastasen? Falls ja, wäre - rein hypothetisch - im Liquor eine hohe Menge nekrotischer Tumor-DNA zu erwarten, die sich als lange DNA-Fragmente nachweisen ließen. Auch die Lokalisation der zugrunde gehenden Zellen im Tumor kann Einfluss auf das Vorkommen der ctDNA haben. Laut *Majno et al.* sterben Zellen am Tumorrand eher an Apoptose und Zellen im Inneren des Tumors eher an Nekrose (Majno et al., 1995). Womöglich könnten sich auch Zellen aus dem Liquor - insbesondere Tumorzellen – ähnlich verhalten. All diese Überlegungen sprachen dafür, auch unter den längeren Fragmenten nach Tumor-DNA zu suchen, so dass ein Kollektiv mit den zehn Proben, die eine erhöhte Anzahl an Fragmenten > 700 bp enthielt, erstellt wurde (Probe Nr. 25, 28, 29, 35, 46, 47, 55, 57, 62 und 66). Bei 9 der 10 analysierten Proben handelte es sich um Liquor von Karzinompatienten (Mamma- und Bronchial-Ca), jedoch wurde letztlich nur bei einem Patienten die Diagnose einer *Meningeosis neoplastica* per MRT oder histopathologisch bestätigt. Damit lässt sich offenbar erklären, weshalb sich weder in den größeren noch in den kleineren Fragmenten Tumor-DNA nachweisen ließ. Alle ausgewerteten Profile stellten sich balanciert dar (vergleiche Tabelle 23). Allerdings wurden mit dem hier angewendeten Protokoll kaum Fragmente > 1000 bp amplifiziert, da die Elongationszeit nur sehr kurz (30 s) ist. Die DNA aus Tumorzellen könnte sich demnach - rein spekulativ - weiterhin in den hier nicht amplifizierten Abschnitten

aufhalten. Vielleicht würde eine Verlängerung der Elongationszeit die Detektionsrate an ctDNA erhöhen. Eine weitere Herausforderung für die Auswertung dieses Experiments bilden die z.T. sehr niedrigen DNA-Konzentrationen nach der Fragmentauftrennung. Vorwiegend in der Fraktion mit den langen DNA-Abschnitten konnte bei vielen kein verwertbares Genomprofil generiert werden.
Zusammenfassend war dieses Konzept der Fragmentauftrennung noch nicht weit genug ausgereift, um eine finale Schlussfolgerung daraus abzuleiten. Es wäre sinnvoll gewesen, Patienten mit gesicherter Diagnose *Meningeosis neoplastica* heranzuziehen. Diese Daten lagen zu Beginn des Experiments noch nicht vor. Das hier gewählte Patientenkollektiv erlaubt somit keine Beantwortung der oben aufgeführten Fragestellung.

5.6. Aspekte, die bei der Auswertung mitberücksichtigt werden müssen

Laut einer Arbeit von *Fernando et al.* aus 2017 ist ein Großteil der cfDNA (bis zu 90%) mit Exosomen assoziiert. Entweder haftend an deren Oberfläche oder frei im Vesikellumen (Fernando et al., 2017). Ließe man den Schritt des DNase-Verdaus nach der Exosomen-Extraktion weg, würde auch die an Vesikel-gebundene DNA für die Sequenzierung erhalten bleiben und die DNA-Ausbeute könnte weiter erhöht werden. Das heißt jedoch auch umgekehrt, dass bei der Analyse von cfDNA eigentlich gleichzeitig exoDNA mitanalysiert wird, da im ersten Schritt des Extraktionsprotokolls eine Lyse von Proteinen und Lipiden stattfindet. Hiermit wird die Membran der Vesikel geöffnet und die darin enthaltene exoDNA freigesetzt. Zumal die exoDNA einen sehr geringen, meist nicht messbaren Teil ausmacht, wurde dies für die Beurteilung der cfDNA weitestgehend vernachlässigt. Das Bioanalyzer-Profil der cfDNA stellt also eigentlich eine Überlagerung aus cfDNA *und* exoDNA dar.

5.7. Hinweise zu den Oberflächenantigenen, welche zur Exosomen-Isolation dienten

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass jeder Patient ein individuelles Bioanalyzer-Profil der (tumorspezifischen) exoDNA besitzt. Dies liegt vermutlich daran, dass bei der Isolation unspezifischer Exosomen durch die Verwendung von Membranmarkern automatisch auch tumorspezifische abgetrennt und mitanalysiert wurden.
Dennoch ist fraglich, wie es bei der EpCAM-exoDNA eines Patienten (Nr. 66) zu einem balancierten Genomprofil kommen konnte. Möglicherweise kam es bei der Punktion zu einer Verschleppung der äußersten Hautzellen in den Liquor. Diese sind ebenfalls

epithelialen Ursprungs und tragen EpCAM auf ihrer Oberfläche. Um zu beweisen, dass es sich tatsächlich um isolierte Exosomen handelt, wäre eine elektronenmikroskopische Aufnahme aufschlussreich gewesen, sowie bei *Ruhen et al.* oder *Lee at al.* (Ruhen et al., 2020; Lee at al., 2018). Noch besser wäre eine Methode, welche rein tumorspezifischen Oberflächenproteine auf den Exosomen darstellt, um zu zeigen, dass es sich auch wirklich um Exosomen aus Tumorzellen handelt. Dies lässt sich jedoch wahrscheinlich kaum umsetzen, da auch viele gesunde Zellen diese Proteine exprimieren und es bei Krebszellen lediglich zu einer Überexpression kommt (Hanahan & Weinberg, 2011). Somit darf streng genommen auch nicht von tumorspezifischen, sondern eher von tumor*assoziierten* Proteinen gesprochen werden (MSD Manuals, 2024).

5.8. Weitere Methoden zur Exosomen-Isolation

Einige Arbeitsgruppen, die sich ebenfalls mit der Isolation von Exosomen befassen, setzen auf eine Isolierung mit Hilfe von Ultrazentrifugation. Zuerst werden Zellpellet und -debris bei niedriger Geschwindigkeit abgetrennt, dann erfolgt die Aufreinigung der Vesikel bei unterschiedlich starker Zentrifugation. Je höher die Geschwindigkeit, desto kleiner der Durchmesser der erworbenen Vesikel (100 000 - 120 000 g für Exosomen; 10 000 - 20 000 g für Mikrovesikel und Oncosomen). Allerdings erweist sich diese Methode als leicht störanfällig und nicht sehr effizient, um eine bestimmte Subgruppe an Vesikeln zu extrahieren (Minciacchi et al., 2015). Ferner gelangen bei zu langer Zentrifugation auch viele Proteine in das Pellet, weshalb sich unreine Exosomen-Isolate ergeben können (Cvjetkovic et al., 2014). Außerdem können die Vesikel durch die hohen Geschwindigkeiten bei der Zentrifugation auch beschädigt werden (Sidhom et al., 2020).

Lange Zeit stellte die Ultrazentrifugation den Goldstandard in der Exosomen-Isolation dar. Bis 2015 wurde sie in über 80 % aller Isolationen verwendet. Danach etablierten sich modernere Methoden wie beispielsweise die Dichtegradientenzentrifugation, Größenausschluss-Chromatographie (SEC = *Size-exclusion-Chromatography*) oder die Isolation mit Hilfe von Antikörpern, welche sich gegen Oberflächenproteine der Exosomen richten (Sidhom et al., 2020). Laut dem Review von *Sidhom et al*. repräsentiert die SEC die beste Methode zur Exosomen-Isolation. Im Prinzip werden die Vesikel ihrer Größe nach durch unterschiedlich große Poren in einer Säule abgetrennt. Dabei werden zuerst die größeren Partikel eluiert, gefolgt von immer kleiner werdenden Vesikeln und letztendlich nicht-gebundenen Proteinen. Großer

Vorteil dieser Methode ist, dass nur sehr wenig Probenvolumen benötigt wird. Bei Liquor reichen bereits 100 µl aus. Außerdem werden die Exosomen bei der Extraktion nicht beschädigt und die isolierte Fraktion ist überwiegend frei von störenden Proteinen (Sidhom et al., 2020). Nachdem viele exoDNA-Proben in diesem Kollektiv aufgrund von zu geringer Konzentration und/oder mangelnder Probenreinheit nicht zur Wertung hinzugezogen werden konnten, würde dies eine alternative Methode zur Exosomen-Isolation darstellen. Allerdings können durch diese Methode keine tumorspezifischen Exosomen isoliert werden, da lediglich eine Auftrennung nach Größe erfolgt.

Vagner et al. fanden heraus, dass sich die Mehrheit der Tumor-DNA in großen Vesikeln (L-EVs = *large extracellular vesicles*) aufhält (Vagner et al., 2018). Diese sogenannten Oncosomen besitzen einen Durchmesser von 1-10 µm (10 bis 100-fach größer als normale Exosomen) und kommen beim Gesunden praktisch nicht vor (Minciacchi et al., 2015; Vagner et al., 2018). Rein spekulativ könnte die Isolation von Exosomen anhand ihrer Größe auch die Analyse von tumorspezifischen Exosomen in Blutproben vorantreiben, nicht nur die Extraktion anhand bestimmter Oberflächenmarker.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Isolation von Exosomen maligner Herkunft mittels Antikörper zeigt ein Versuch von *Greening et al.* Hierbei wurden tumorspezifische Exosomen mit Hilfe von magnetisch markierten EpCAM-Antikörpern in einem Zellmodel aus der Kolonkarzinom-Zelllinie LIM1863 extrahiert. Die Antikörper richteten sich gegen das Oberflächenprotein EpCAM auf den Exosomen. Im Vergleich zur Ultrazentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation erzielte diese Methode die besten Ergebnisse hinsichtlich Reinheit des Exosomen-Isolats und Nachweis der Proteinzusammensetzung in den Vesikeln (Greening et al., 2015).

In dieser Arbeit konnte nach ähnlichem Prinzip wie bei *Greening et al.* tumorspezifische Exosomen aus Liquorproben von Patienten gewonnen werden. Durch die Generierung von aberranten Genomprofilen wurde sogar bestätigt, dass es sich tatsächlich um die DNA aus tumorspezifischen Exosomen handelt.

5.9. cfDNA als Verlaufsparameter einer Erkrankung

Der Nutzen des zellfreien Überstandes aus Liquor wird derzeit noch nicht voll ausgeschöpft. Er besitzt zweifellos den Charakter eines aufstrebenden Diagnostikums, welches sogar Aussagen hinsichtlich des Verlaufs einer Erkrankung ermöglichen könnte.

Li et al. untersuchten in ihrer Studie, inwiefern sich der Anteil an mutierter DNA unter laufender Therapie mit einem BRAF-Inhibitor und Bestrahlung bei einem Melanom-Patienten mit Meningeosis auswirkt (BRAF V600E-Mutation). Hierfür wurden über einen Zeitraum von sechs Monaten, neun Liquorproben entnommen. In den ersten sechs konnte eine deutliche Reduktion der ctDNA beobachtet werden (von anfangs 53 % auf 0 %). Nach drei Monaten waren erneut Symptome zu verzeichnen, vereinbar mit einem Anstieg an ctDNA (Li et al., 2016). Zu diesem Ergebnis kommen auch *Bobillo et al.* Hier wurden die Konzentrationen der ctDNA in Lumbal- und Plasmaproben bei Patienten mit ZNS-Lymphomen verglichen. Interessanterweise wies die ctDNA aus dem Liquor auf einen Zusammenhang zwischen Erkrankungsfortschritt und ctDNA-Spiegel hin, wohingegen in den Plasmaproben aufgrund der bereits anfangs zu geringen ctDNA-Konzentrationen keine relevanten Änderungen detektiert werden konnten (Bobillo et al., 2021).

Ein Beispiel dafür, dass auch Plasmaproben bei bestimmten Tumorentitäten zum Monitoring hinzugezogen werden können, liefert *Sanmamed et al.* Hierbei handelte es sich um 20 fortgeschrittene Melanom-Patienten, bei denen die Konzentrationen von BRAF V600E-ctDNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter Behandlung mit BRAF-Inhibitoren analysiert wurde. Während den ersten Therapiemonaten zeigte sich auch hier ein Rückgang der ctDNA-Spiegel, welche sich bei Fortschreiten der Erkrankung wieder erhöhten. Außerdem wiesen niedrige ctDNA-Spiegel auf ein längeres progressionsfreies Überleben hin (27.7 Monate im Vergleich zu 8.6 Monaten bei hohen ctDNA-Konzentrationen) (Sanmamed et al., 2015).

Diese Beispiele zeigen, dass mit Hilfe von minimalinvasiven Methoden wie einer Lumbalpunktion oder Blutprobe frühzeitig Treibermutationen detektiert und ggf. rechtzeitig Therapieänderungen vorgenommen werden können. Zudem gewährt die cfDNA bzw. deren Konzentration an Tumor-DNA einen Ausblick über die Prognose der Patientinnen und Patienten.

5.10. Wer ist nun der bessere Biomarker? - Eine Gegenüberstellung der verschiedenen Analyten

Werden cfDNA, exoDNA und tumorspezifische exoDNA miteinander verglichen, ergibt sich folgende Schlussfolgerung: Die Mehrheit an auswertbaren Genomprofilen geht aus der cfDNA hervor. Sie verspricht auch bei geringen Probenvolumina überwiegend aussagekräftige Profile und scheint deshalb die CTC-Diagnostik gut ergänzen zu können. Hingegen scheint zu jetzigem Zeitpunkt die Analyse der DNA aus

unspezifischen Exosomen nicht sehr vielversprechend zu sein. Mehr als die Hälfte der Profile sind mit der hier verwendeten Herangehensweise nicht auswertbar (vergleiche Abbildung 10).

In einer Studie von *Ruhen et al.* aus 2020 wurden cfDNA und exoDNA einer Mammakarzinom-Patientin genauer untersucht. Dafür wurden Blutproben über einen Zeitraum von 7 Monaten gesammelt und analysiert, um zu beobachten, wie sich die *CNA*s im Verlauf der Erkrankung entwickeln. Es zeigte sich bei beiden Analyten eine Zunahme der Aberrationen mit Progress des Tumors, jedoch vordringlich bei der cfDNA. Auch hier besitzt sie eine höhere Sensitivität als die DNA aus Exosomen. Die im Durchschnitt viel niedrigeren exoDNA-Konzentrationen könnten eine mögliche Erklärung hierfür liefern (Ruhen et al., 2020), denn eigentlich gelten Exosomen gleichermaßen als aufstrebende Biomarker und Alternative zur cfDNA. Die darin enthaltene DNA ist durch die Vesikelmembran vor Umwelteinflüssen und vorzeitigem Nukleaseabbau besser geschützt und somit länger stabil (Jin et al., 2016; Ruhen et al., 2020). Sie sind in der Lage, das Immunsystem zu ihren Gunsten zu drosseln (Zhang & Grizzle, 2011) und können das komplette Genom ihrer Ursprungszelle abbilden. Es wurden doppelsträngige DNA-Fragmenten mit bis zu 10 000 bp nachgewiesen, welche Mutationen des Tumors enthalten (Vagner et al., 2018). Um also an mehr genetische Information zu gelangen, müssen zum einen die Methoden zur Exosomen-Isolation optimiert und zum anderen die Elongationszeit der Amplifikation verlängert werden.

In einer Arbeit von *Lee et al.* wurde im Urin von neun Patienten mit Urothelkarzinom exoDNA und cfDNA nachgewiesen. Obwohl die Konzentrationen an exoDNA geringer ausfielen, zeigten beide Analyten fast deckungsgleich dieselben *CNV*s wie sie auch im Tumor gefunden wurden. In dieser Studie wird die exoDNA aufgrund der Instabilität der cfDNA als geeigneterer Marker gewertet (Lee et al., 2018).

Schlussendlich wäre die Analyse der nicht-zellulären Bestandteile des Liquors am erfolgversprechendsten, wenn diese nicht einzeln, sondern kombiniert stattfinden würden. Um das Potential exosomaler DNA weiter auszuschöpfen, könnten in Zukunft gepoolte Marker (z.B. EpCAM *plus* CD9, CD63 und CD81) zur Exosomen-Isolation verwendet werden, da zu jetzigem Zeitpunkt ein Marker allein nicht ausreicht. Außerdem könnte der anschließende DNase I-Verdau eingespart werden, um aus dem Überstand die restliche cfDNA zu isolieren, welche primär frei und nicht an Vesikel

gebunden vorliegt. Durch diesen Ansatz ließe sich auch bei begrenztem Probevolumen ein maximaler Ertrag erzielen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich eine Lumbalpunktion und die Analyse dessen nicht-zellulärer Bestandteile ergänzend – aber nicht alleinig - zur Diagnostik einer *Meningeosis neoplastica* eignet. Es gibt Fälle, bei denen die Diagnose bereits als bestätigt galt, mit der Analyse des zellfreien Überstands jedoch nur balancierte Profile erzeugt wurden. Wenn möglich, sollten immer mehrere Analyten zur Fragestellung hinzugezogen werden, da es Fälle gibt, bei denen entweder nur die cfDNA oder die (tumorspezifische) exoDNA Hinweise auf Aberrationen gibt. Optimal wäre eine gepoolte Analyse der verschiedenen Analyten.

Schlussfolgerung und Ausblick

Um den höchsten Informationsgewinn über die Heterogenität eines Tumors zu erhalten, sollte eine gemeinsame Analyse von cfDNA und exoDNA aus gepoolten Markern erfolgen. Damit lassen sich gegebenenfalls frühzeitig – z.B. im Sinne eines Screenings - Hinweise auf ein bösartiges Geschehen erkennen und eine rechtzeitige Diagnosestellung vorantreiben. Dies könnte den Patientinnen und Patienten bessere Aussichten auf Therapieerfolge gewähren. Denn wird die Meningeosis zeitnah erkannt, ist ein schnellstmöglicher Therapiebeginn der wichtigste Faktor zur Verhinderung eines rasch voranschreitenden neurologischen Defizits. Die komplexe histopathologische und radiologische Diagnosesicherung würde damit ergänzt werden.

Die Analyse der nicht-zellulären Bestandteile steht noch am Anfang, sie besitzt jedoch das Potenzial sehr breit in vielen Bereichen der Medizin eingesetzt zu werden und die Prognose Erkrankter maßgeblich zu verbessern.

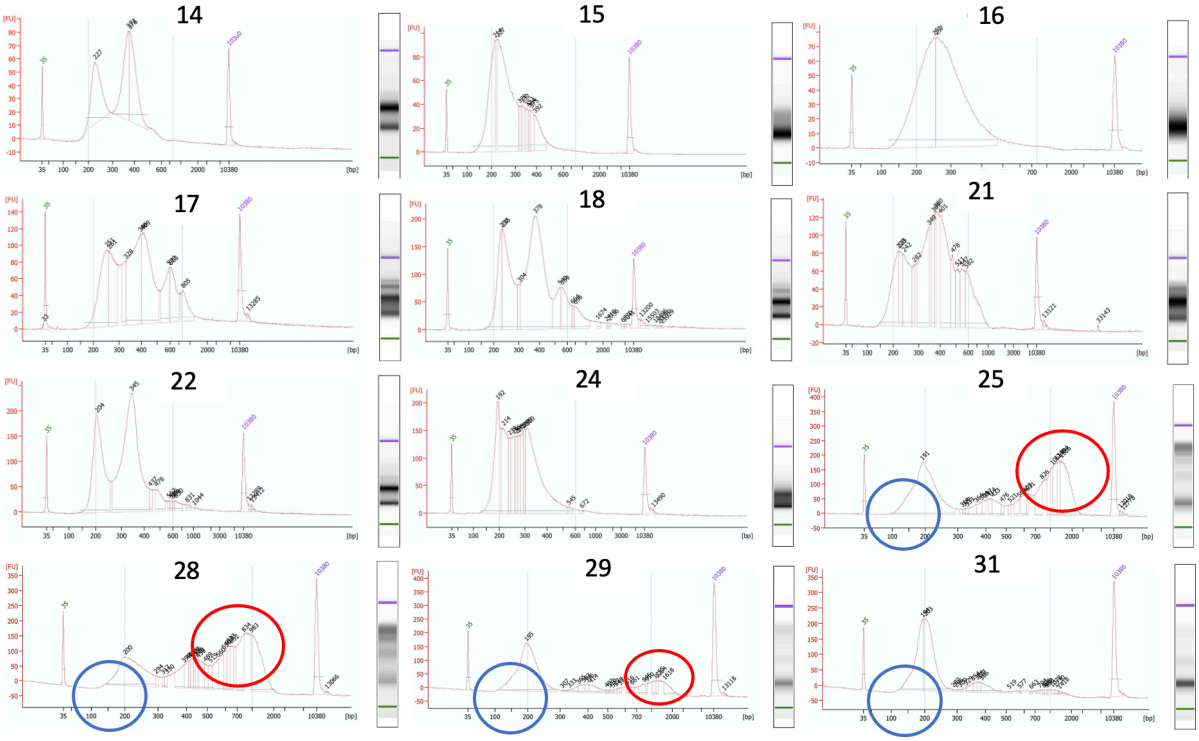
7. Anhang

7.1. Bioanalyzer-Profile

Auflistung aller generierten Bioanalyzer-Profile durch den Bioanalyzer 2100 High Sensitive Assay von Agilent Technologies. Die x-Achse gibt die Fragmentlänge in bp an. Die y-Achse, die vom Bioanalyzer gemessene Spannung. Je höher der Peak, desto höher die Konzentration der Fragmente. Die zwei Marker (*Lower* und *Upper Marker)* legen die untere (35 bp) und die obere (10380 bp) Grenze fest.

7.1.1. cfDNA-Bioanalyzer-Profile

Fast alle cfDNA-Proben (27 von 29) besitzen ein Nukleosomen-typisches Muster, bei denen sich der Hauptpeak entweder bei 200 oder 400 bp befindet. Nur zwei (2 von 29) Proben zeigen kein Nukleosomen-typisches Muster. Eine Probe besteht aus einem einzelnen Peak bei ca. 250 bp (Probe Nr. 16) und die andere besitzt eine gleichmäßige Verteilung von Fragmenten unterschiedlicher Länge ohne erkennbaren Peak (Probe Nr. 62). Alle Proben, die eine erhöhte Anzahl an größeren DNA-Stücken mit einer Länge von über 500 bp enthalten (10 von 29), wurden Rot umkreist. Diese wurden vor der Sequenzierung in zwei Fraktionen </> 700 bp aufgetrennt (Probe Nr. 25, 28, 29, 35, 46, 47, 55, 57, 62, 66). Alle Proben, welche eine erhöhte Anzahl an Fragmenten < 150 bp zeigen, wurden Blau umkreist (Probe Nr. 25, 28, 29, 31, 34, 35, 46, 47, 49, 55, 56, 57, 62 und 66).



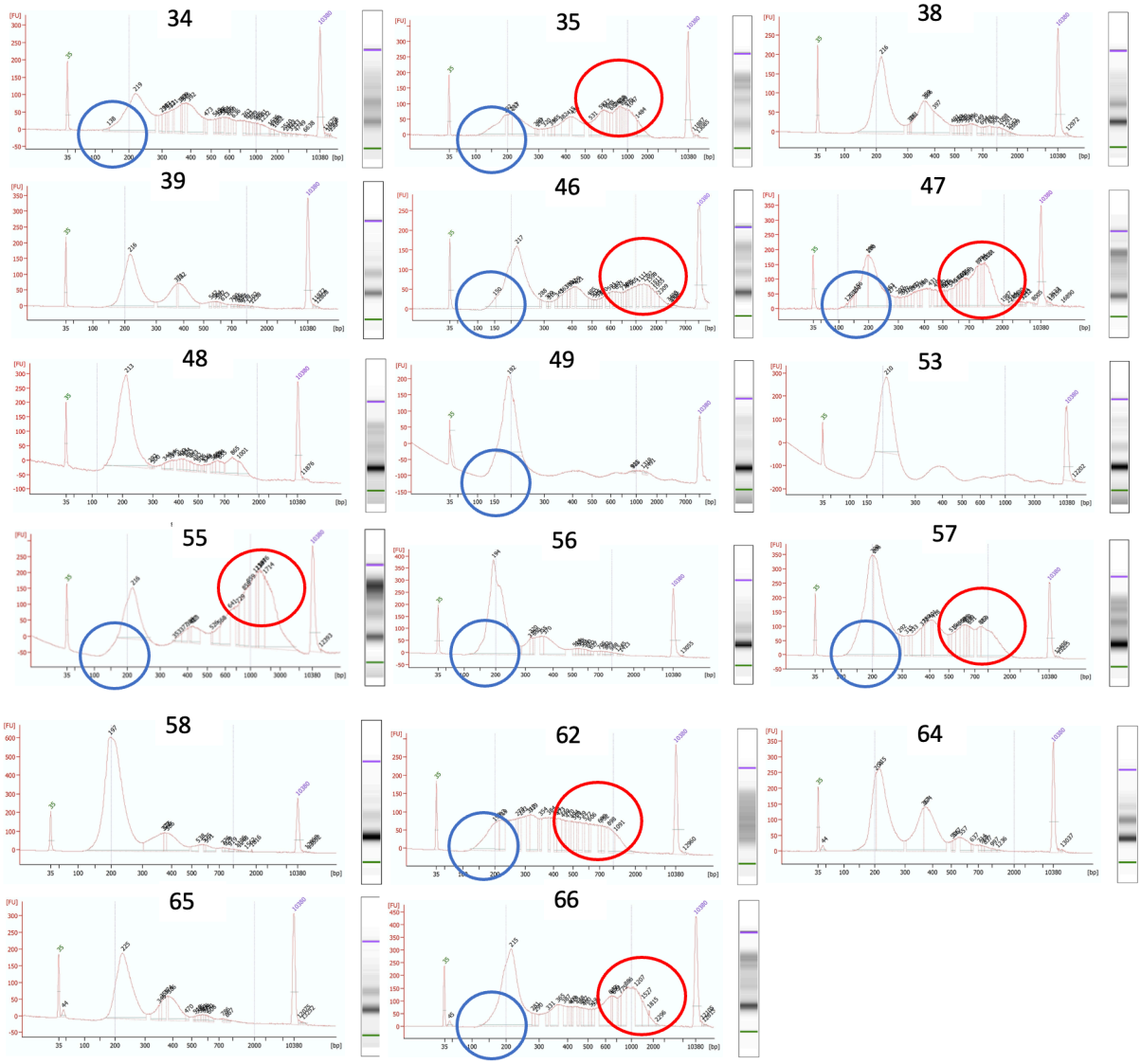
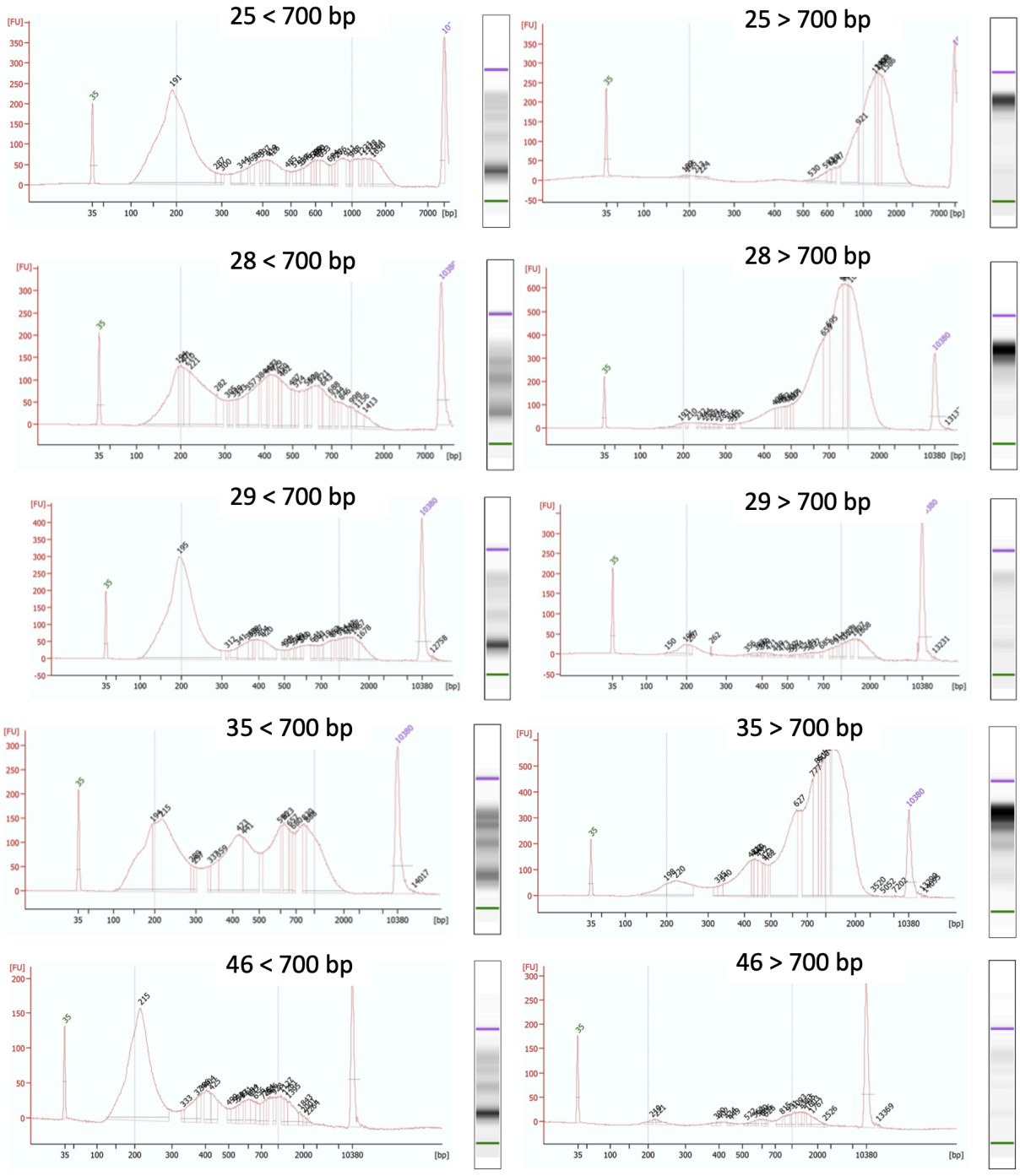


Abbildung 16 *Abbildung aller cfDNA BA-Profile*

7.1.2. cfDNA-Bioanalyzer-Profile nach Fragmentauftrennung

Alle cfDNA-Bioanalyzer-Profile nach Auftrennung in kürzere (< 700 bp) und größere (> 700 bp) Fragmente.



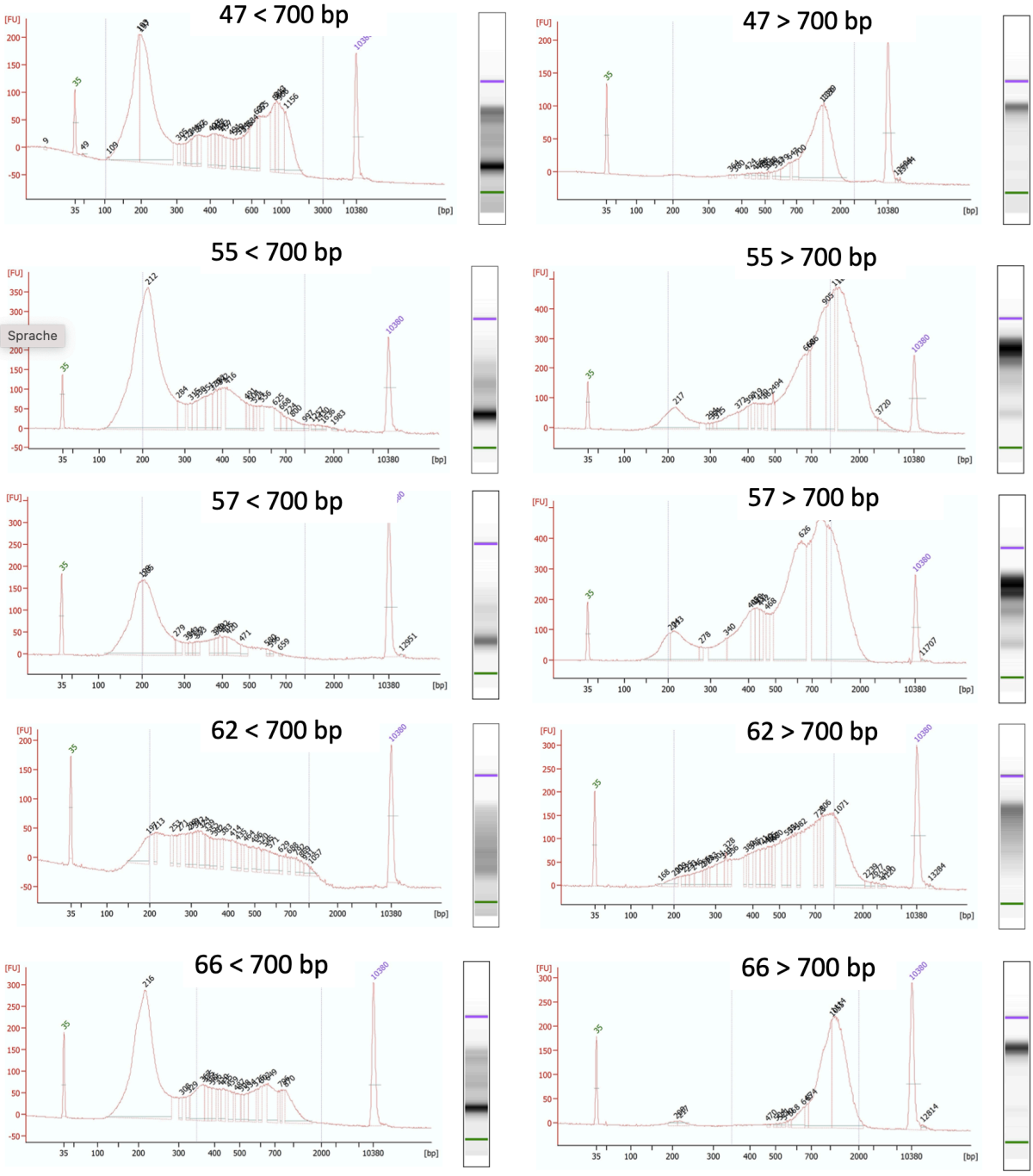


Abbildung 17 *Auflistung aller BA-Profile nach Fragmentauftrennung*

7.1.3. exoDNA Bioanalyzer-Profile

Von den 18 Profilen haben 12 ihren Hauptpeak bei 150 bp, davon haben drei ein Nukleosomen-typisches Muster (Proben Nr. 34, 53, 65); 2 ihren Hauptpeak bei 200 und 700 bp (Proben 39, 49) und 4 Proben mit Fragmenten unterschiedlicher Länge (Proben Nr. 47, 48, 56, 62)

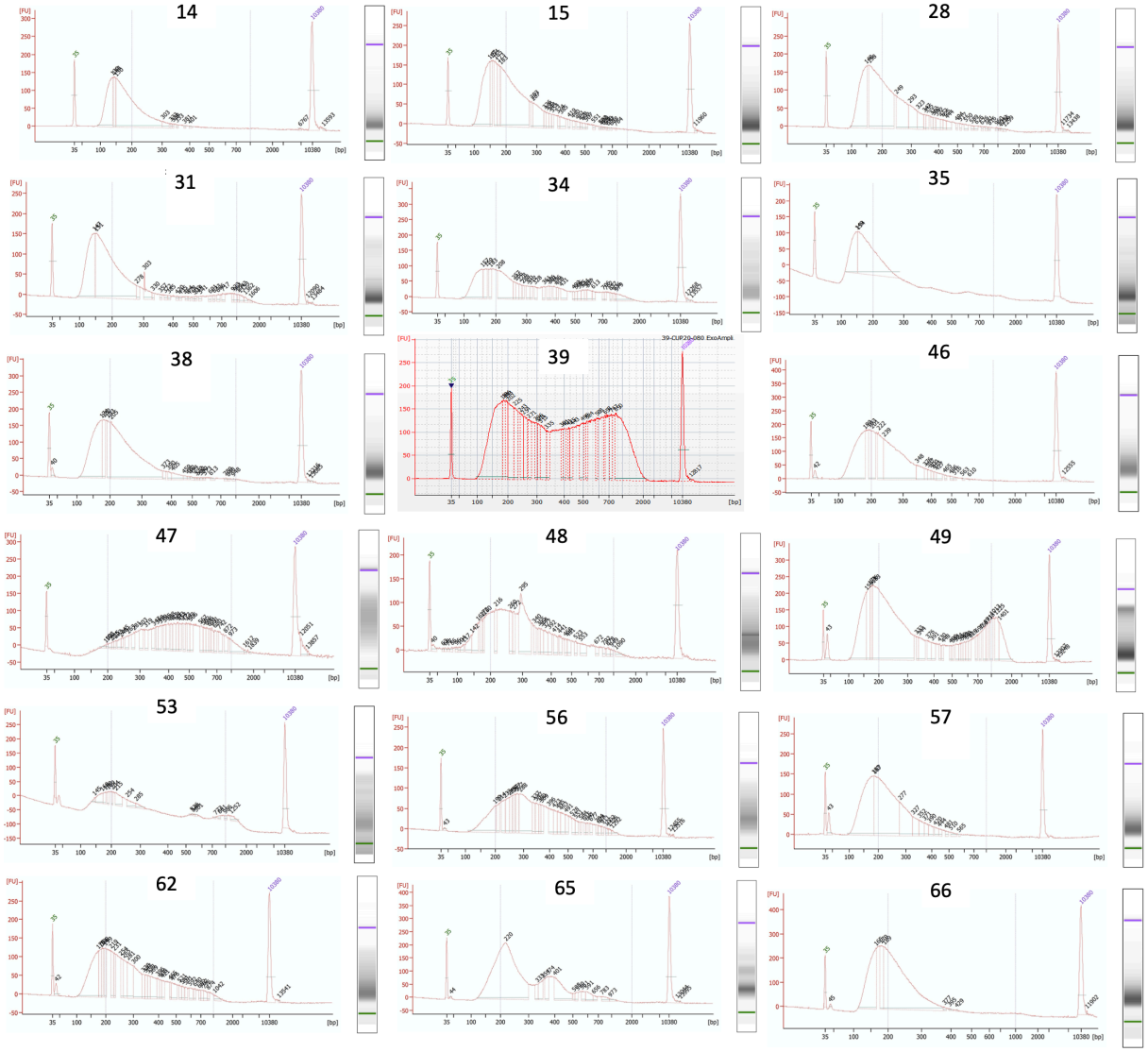


Abbildung 18 *Auflistung aller BA-Profile der exoDNA*

7.1.3. tumorspezifische exoDNA Bioanalyzer-Profile

Dargestellt sind jeweils überlappend die exoDNA und die tumorspezifische exoDNA eines Patienten. Es lässt sich bei allen ein Patienten-spezifisches Muster erkennen.

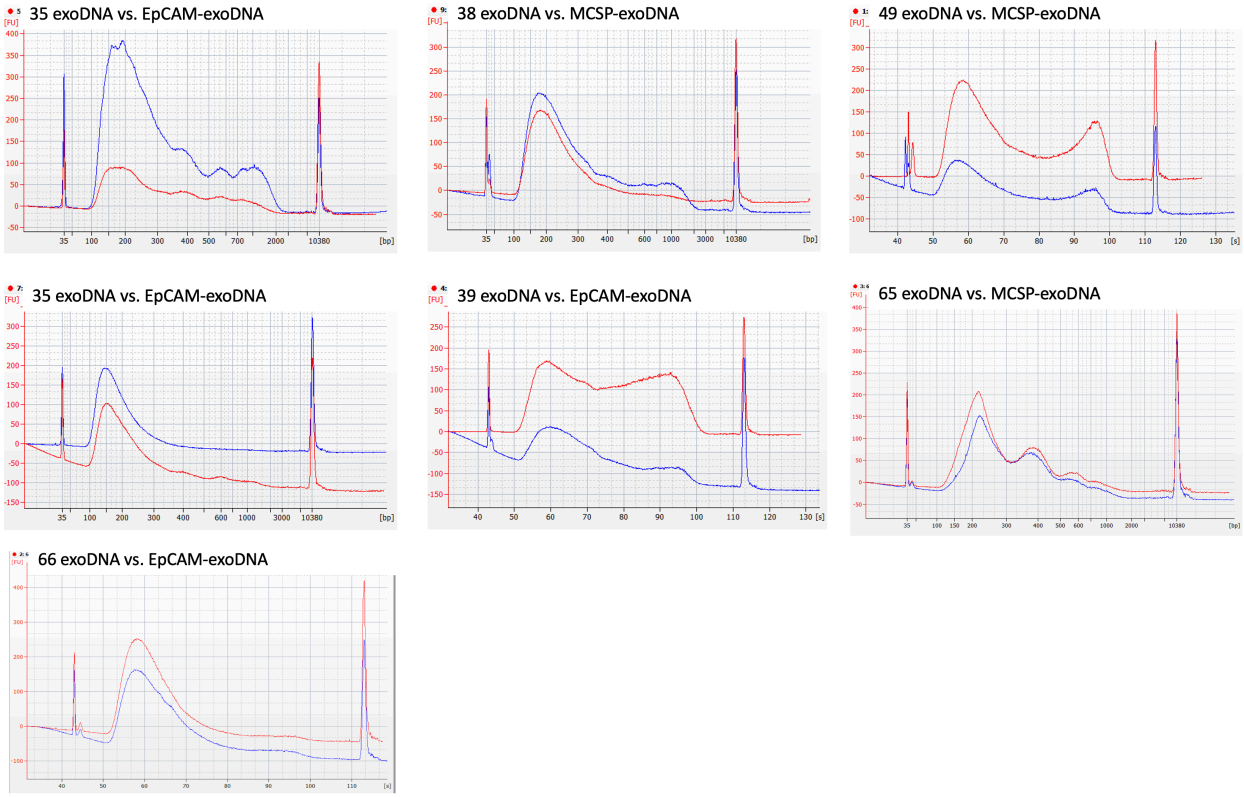
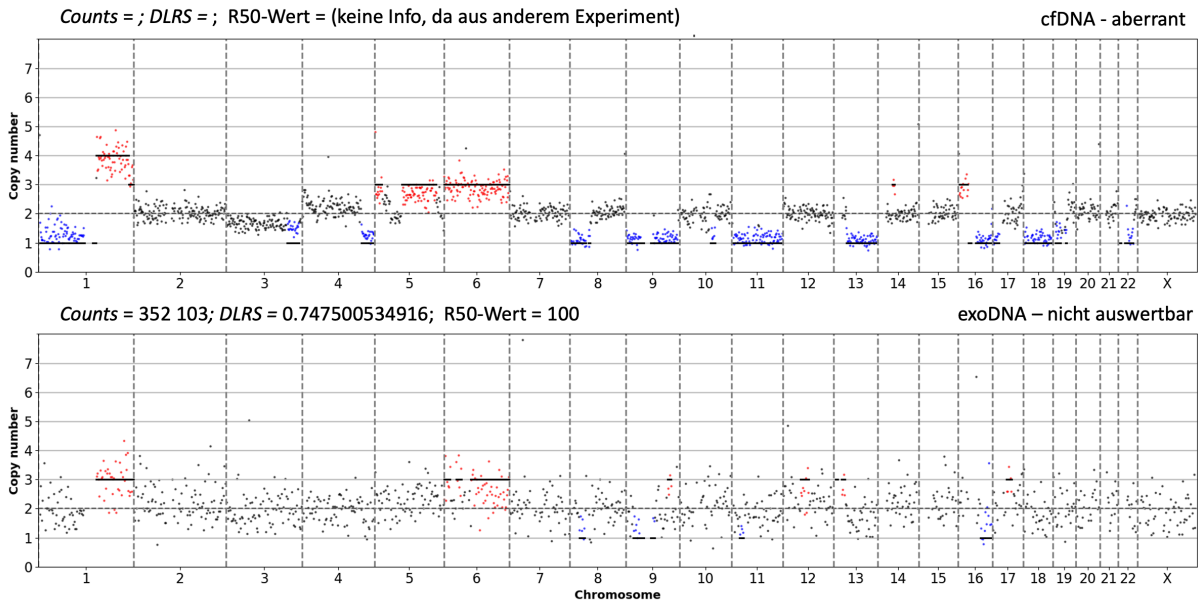


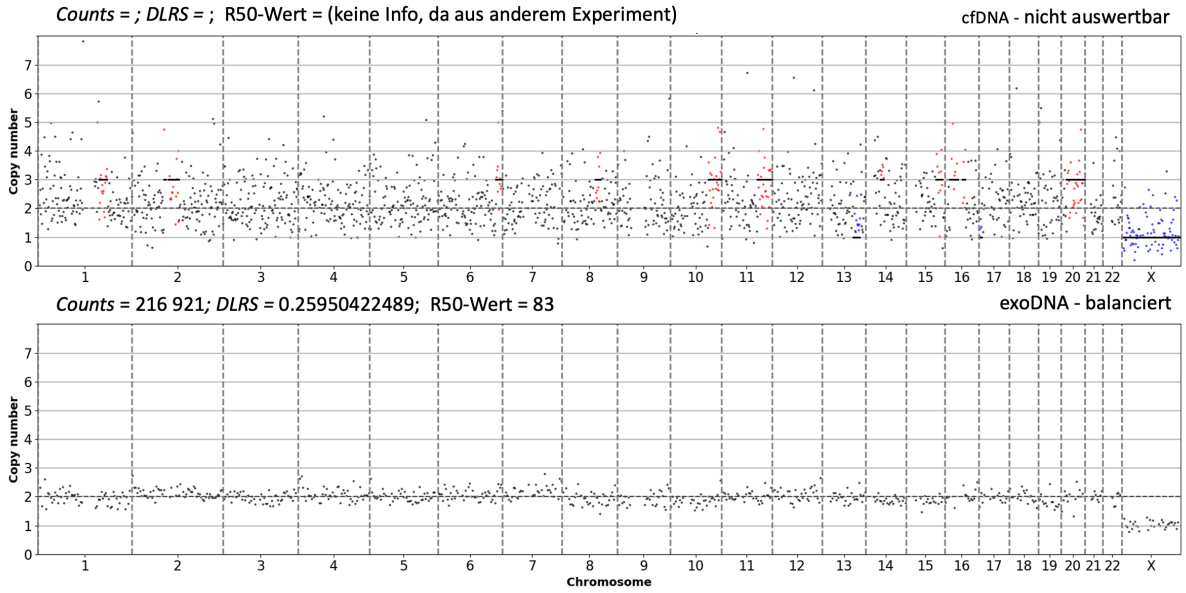
Abbildung 19 *Auflistung aller BA-Profile der tumorspezifischen und unspezifischen exoDNA*

7.2. Genomprofile

Auflistung aller generieten Genomprofile. Die x-Achse verweist auf den Chromosomenabschnitt, die y-Achse auf die *Copy Number* des Genoms.

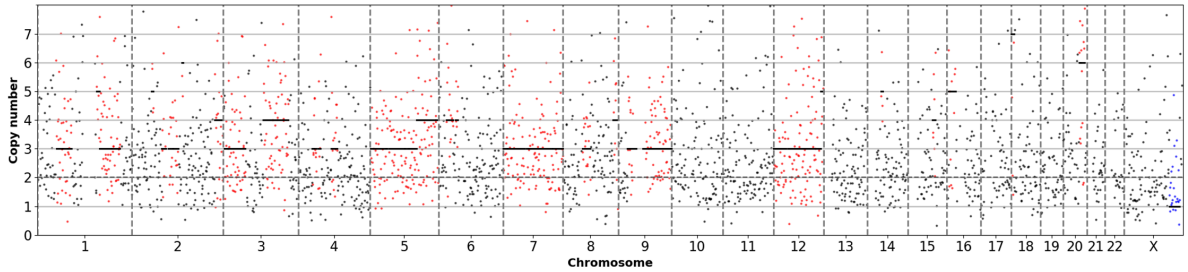


Patient: 14-MC17-256 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt



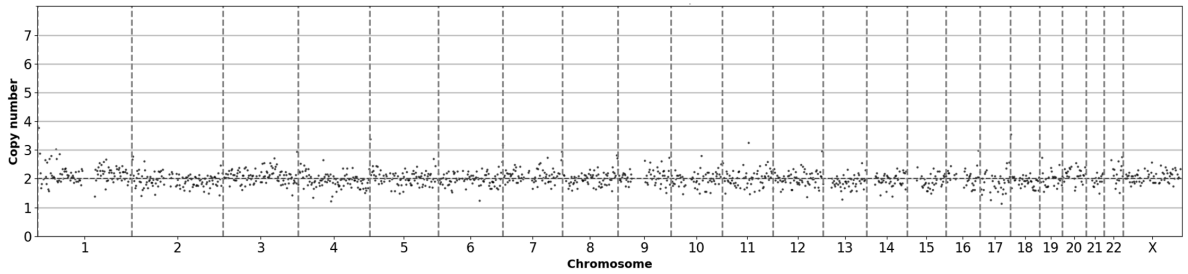
Patient: 15-SCLC18-0013 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

Counts = ; DLRS = ; R50-Wert = (keine Info, da aus anderem Experiment) cfDNA – nicht auswertbar



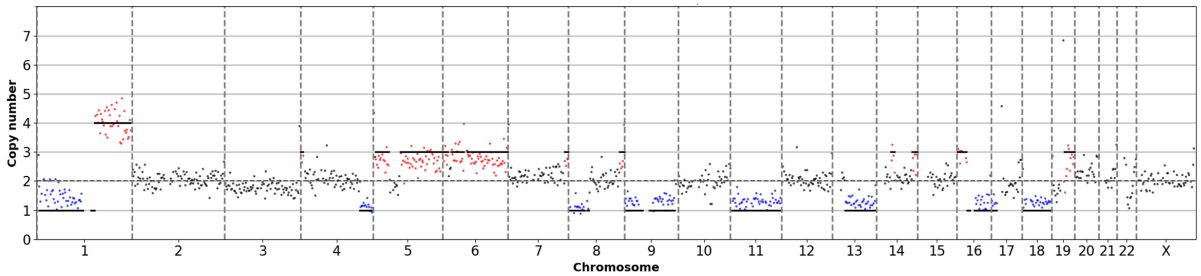
Patient: 16-MC18-0019 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

Counts = ; DLRS = ; R50-Wert = (keine Info, da aus anderem Experiment) cfDNA – balanciert



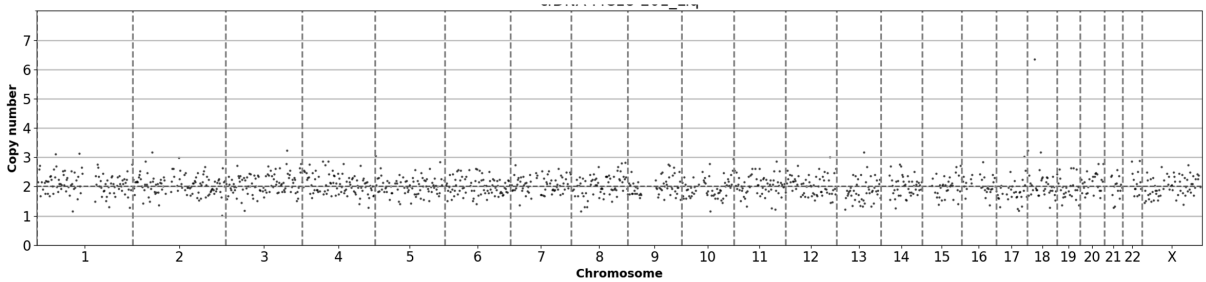
Patient: 17-MC18-087 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

Counts = ; DLRS = ; R50-Wert =. (keine Info, da aus anderem Experiment) cfDNA – aberrant



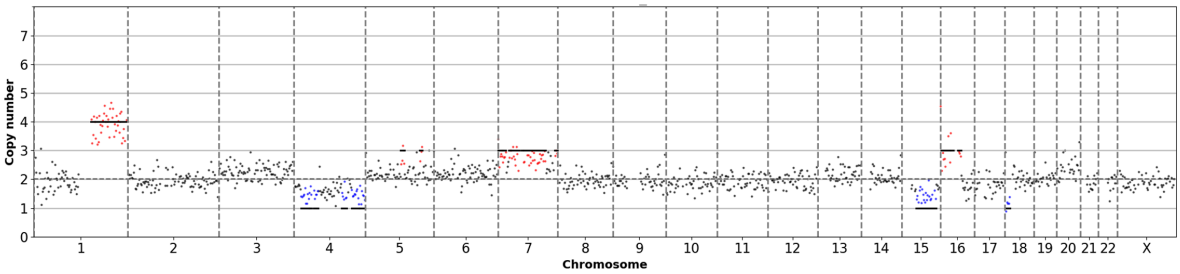
Patient: 18-MC18-0123 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

Counts = ; DLRS = ; R50-Wert = (keine Info, da aus anderem Experiment) cfDNA – balanciert



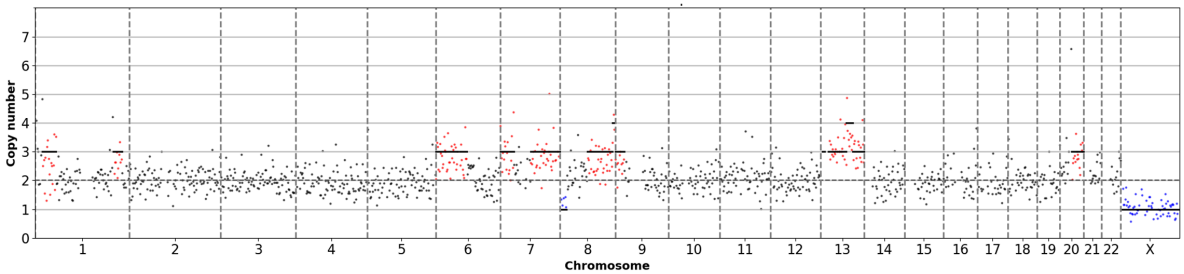
Patient: 21-MC18-201 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

Counts = *; DLRS* = ; R50-Wert = (keine Info, da aus anderem Experiment) cfDNA – aberrant



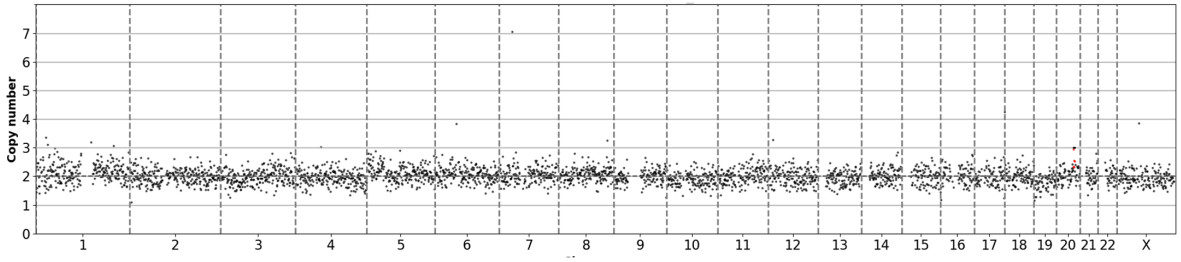
Patient: 22-CUP18-210 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

Counts = *; DLRS* = ; R50-Wert = (keine Info, da aus anderem Experiment) cfDNA – aberrant

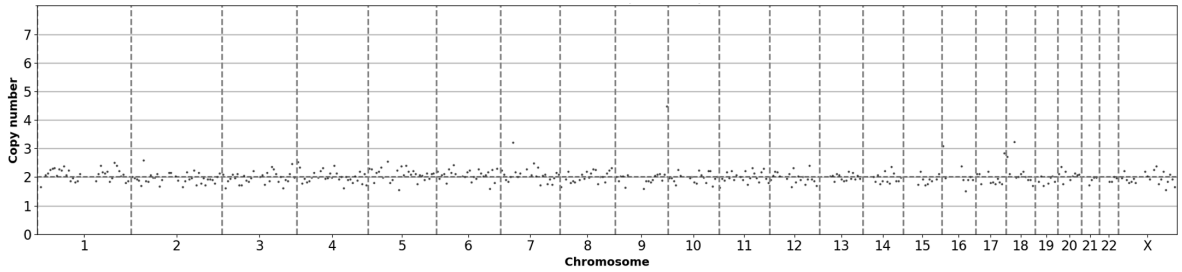


Patient: 24-CC19-027 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

Counts = 377 632*; DLRS* = 0.287476489704; R50-Wert = 41 cfDNA K – balanciert



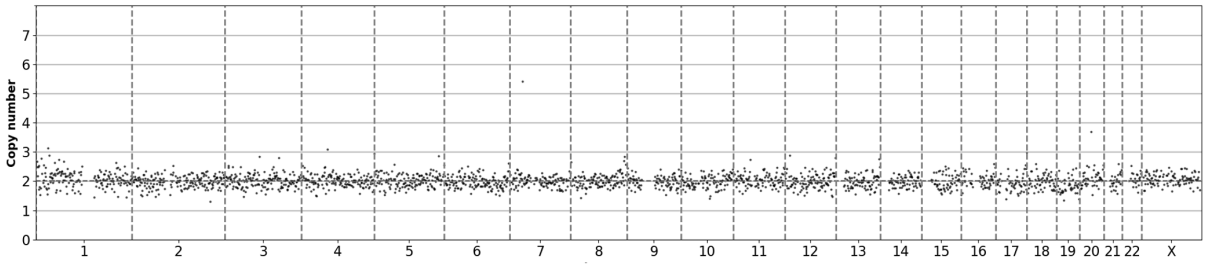
aufgrund zu geringer *Counts* keine Daten generiert cfDNA G – balanciert



Patient: 25-MM19-285 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

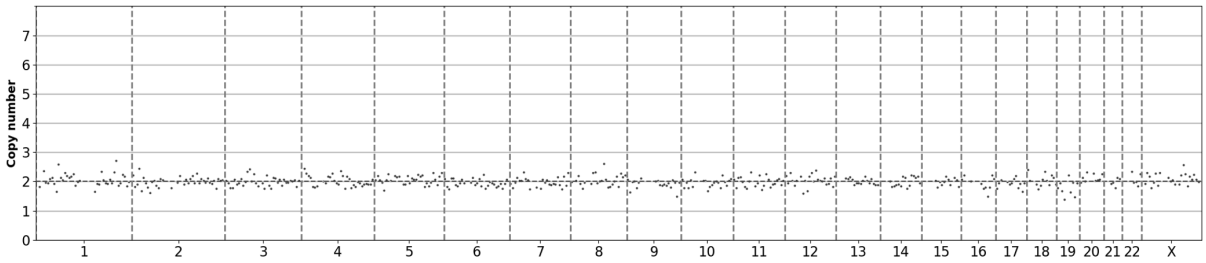
Counts = 693 662*; DLRS* = 0.237586698515; R50-Wert = 48

cfDNA K – balanciert



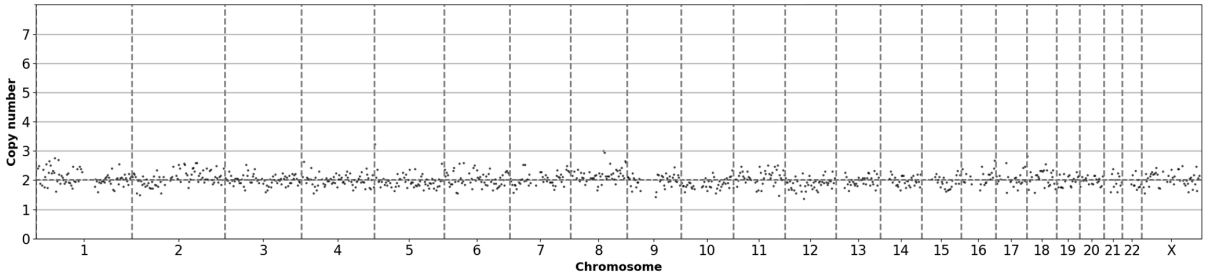
aufgrund zu geringer *Counts* keine Daten generiert

cfDNA G – nicht auswertbar



Counts = 307 352*; DLRS* = 0.270383062746; R50-Wert = 83

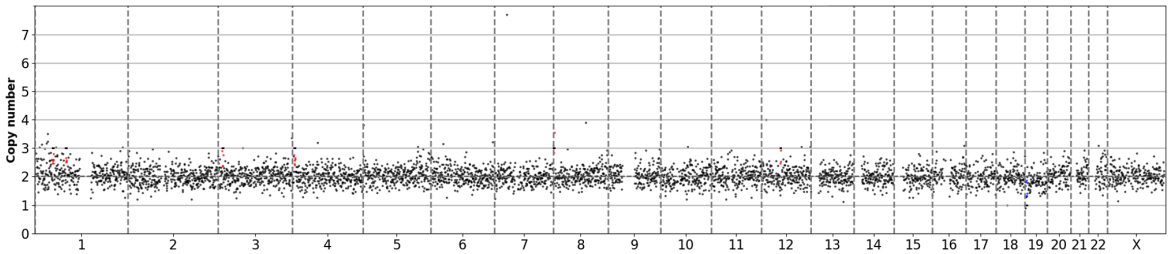
exoDNA - balanciert



Patient: 28-MC19-339 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

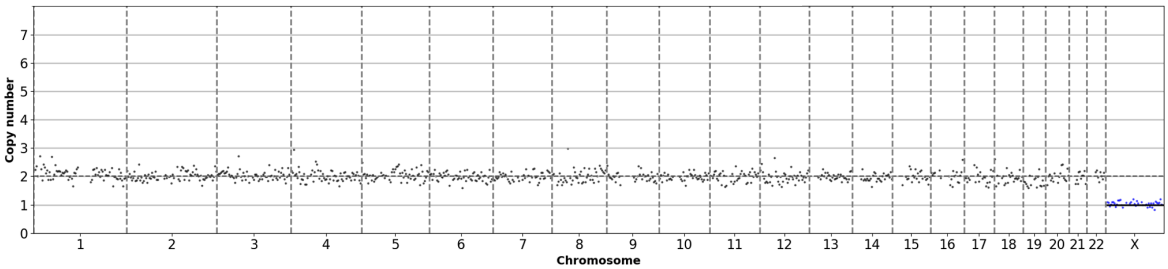
Counts = 1 439 392*; DLRS* = 0.247160598751; R50-Wert = 47

cfDNA K – balanciert

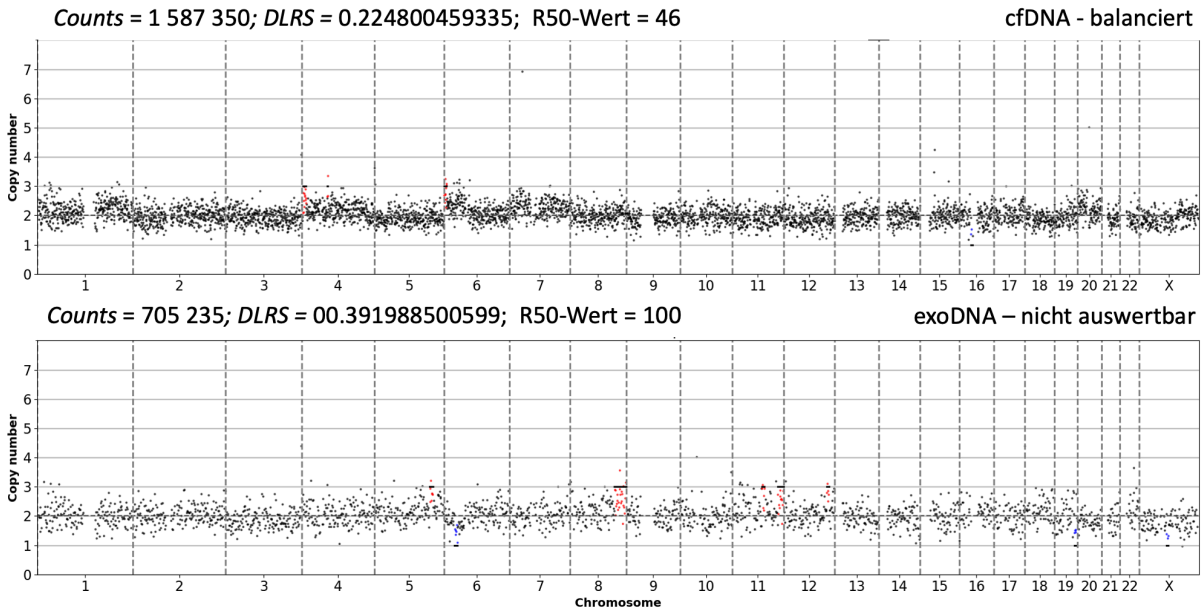


Counts = 273 275*; DLRS* = 0.220796761943; R50-Wert = 53

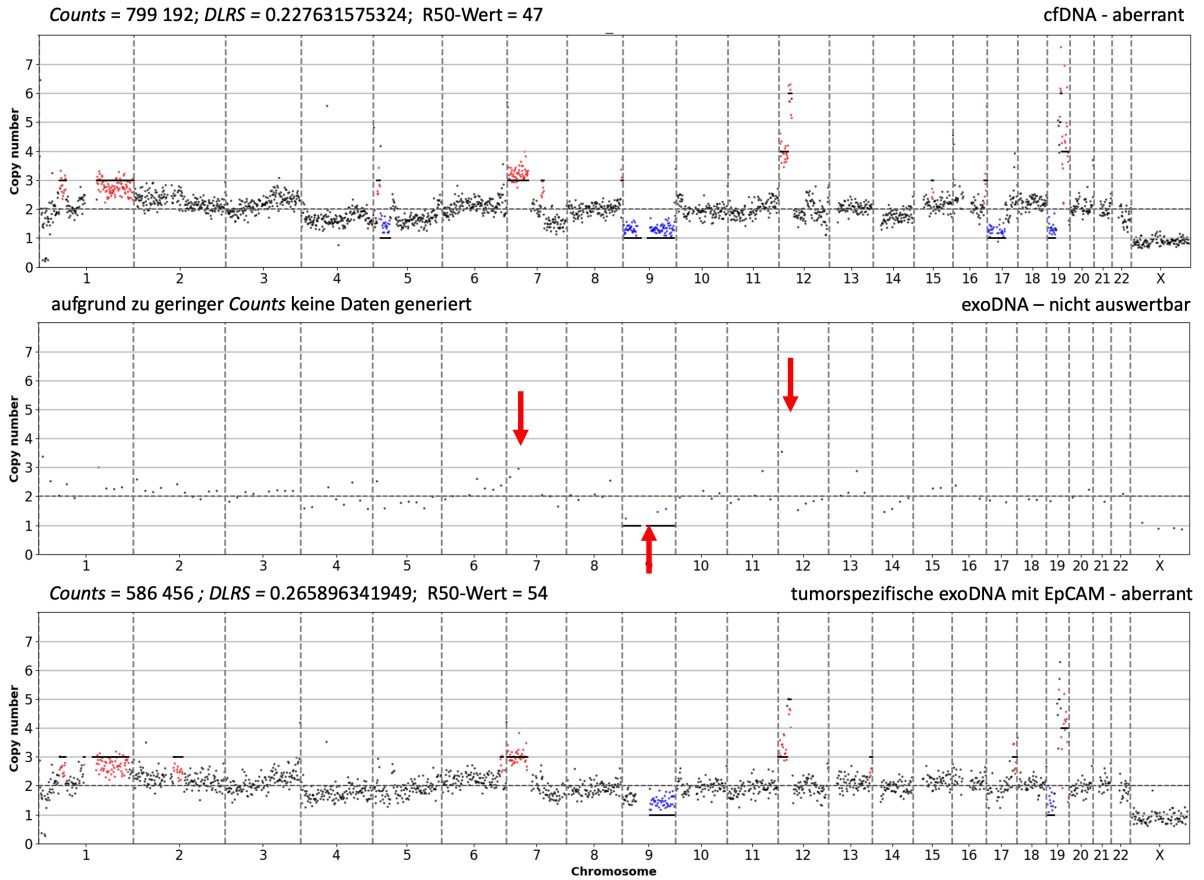
cfDNA G – balanciert



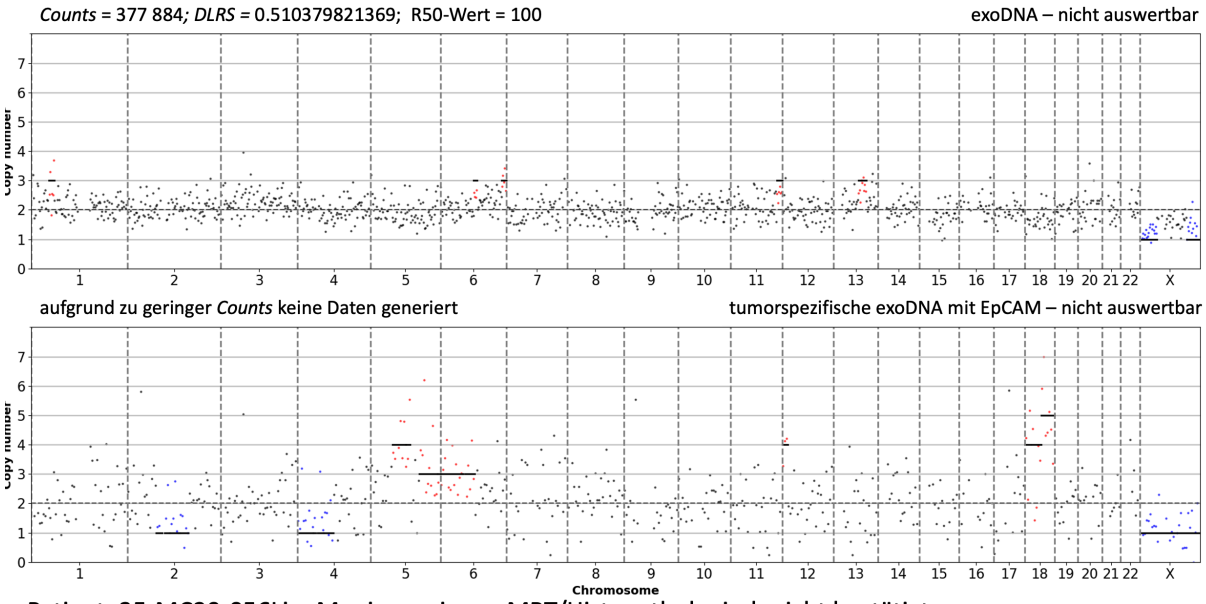
Patient:29-MC19-335 Liq G; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt



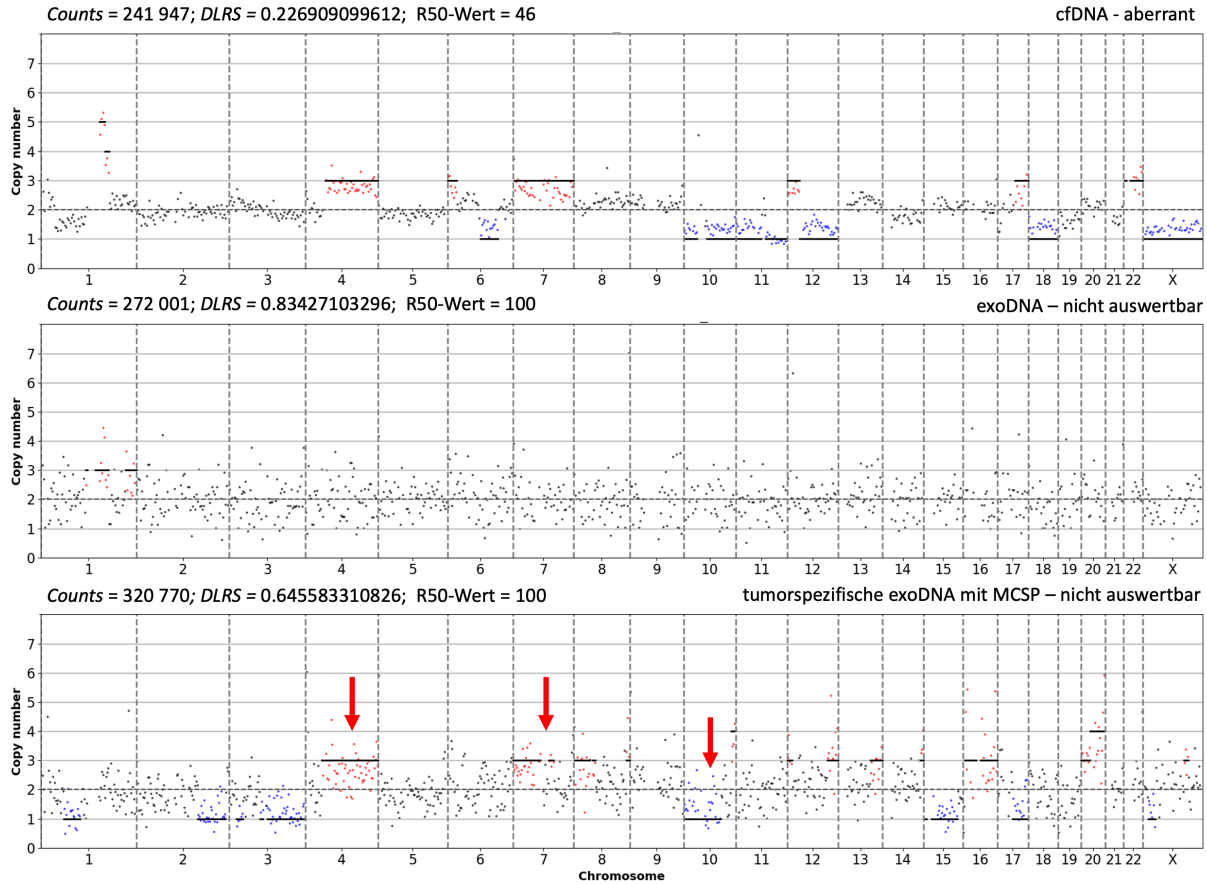
Patient: 31-SCLC19-370 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt



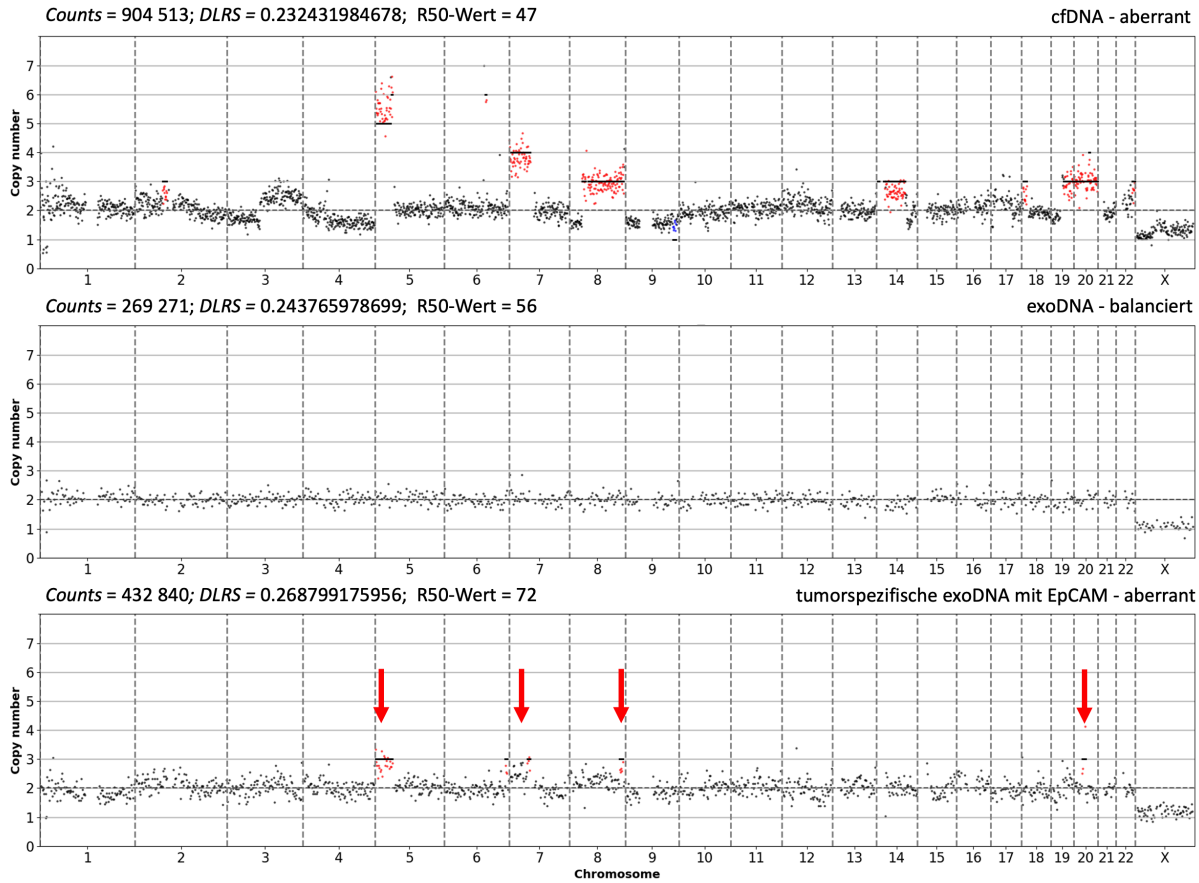
Patient: 34-CUP20-047Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch hochverdächtig, aber nicht bewiesen



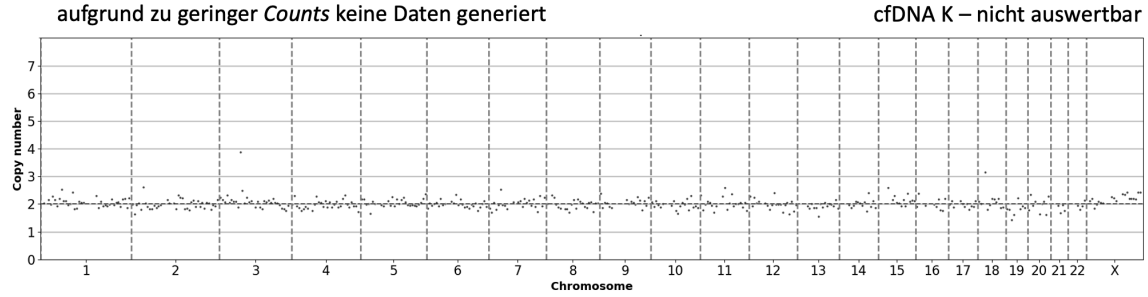
Patient: 35-MC20-056Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt



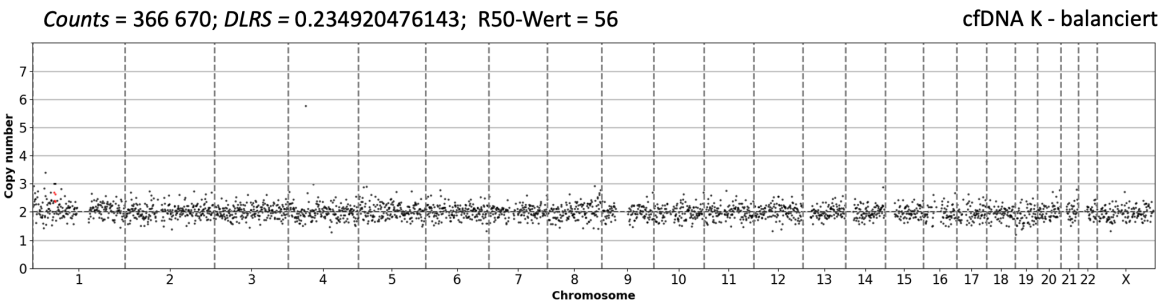
Patient: 38-MM20-076Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt



Patient: 39-CUP20-080Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

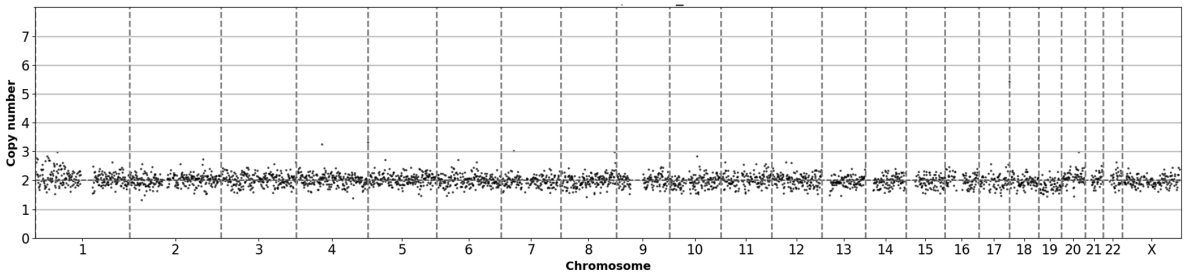


Patient: 46-MC20-250 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt



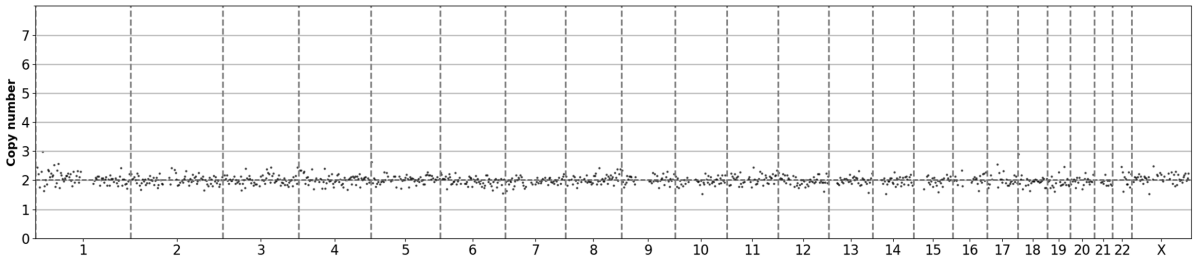
Patient: 47-BC20-273 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

Counts = 1 017 717; *DLRS* = 0.215560818555; R50-Wert = 49 cfDNA - balanciert

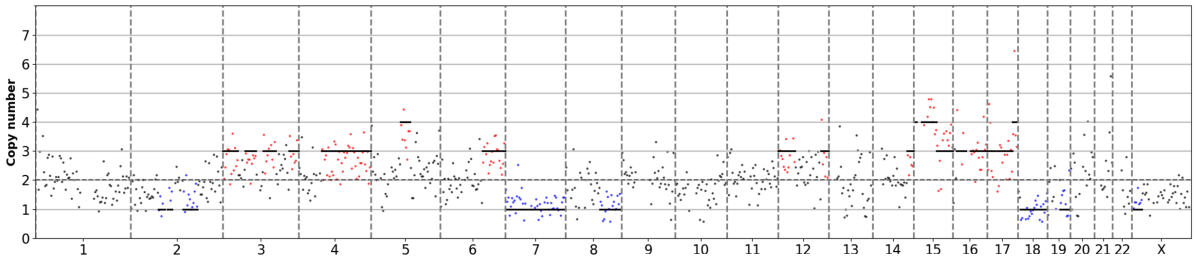


Patient: 48-BC20-279 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

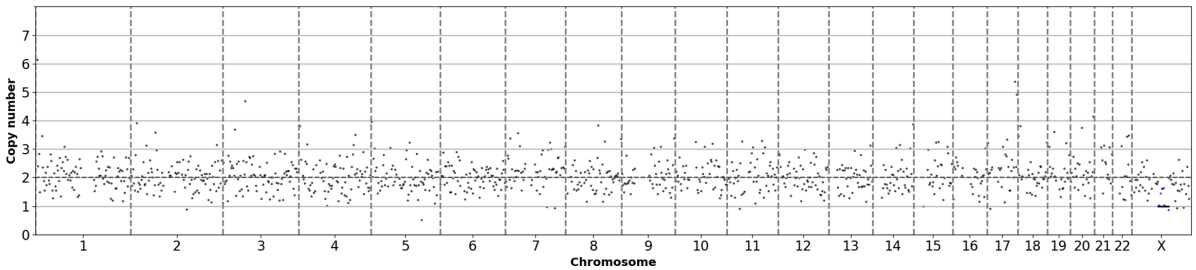
Counts = 308 988; *DLRS* = 0.197344091277; R50-Wert = 49 cfDNA – balanciert



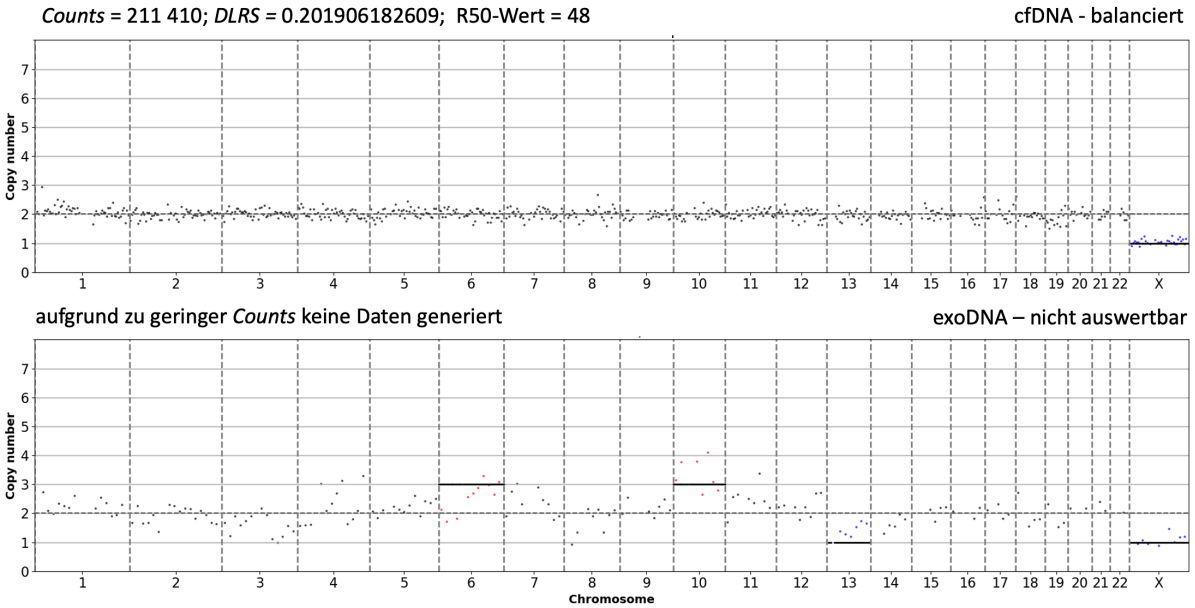
Counts = 268 459; *DLRS* = 0.663608102041; R50-Wert = 100 exoDNA – nicht auswertbar



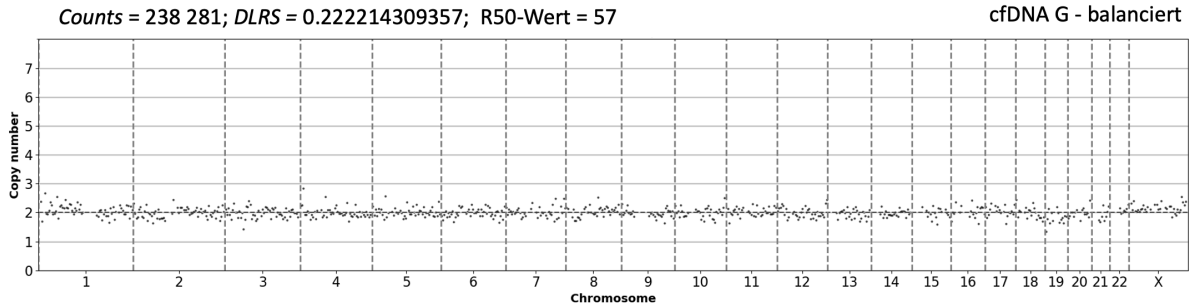
Counts = 346 871; *DLRS* = 0.663281632753; R50-Wert = 100 tumorspezifische exoDNA mit MCSP – nicht auswertbar



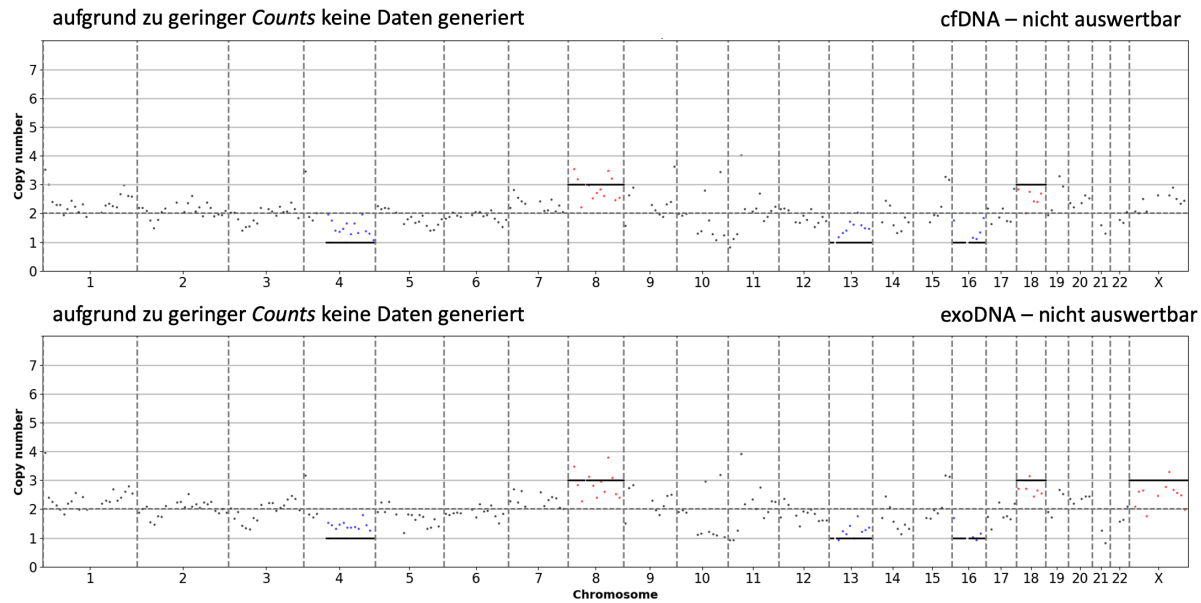
Patient: 49-MM20-301Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt



Patient: 53-MM20-327 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt



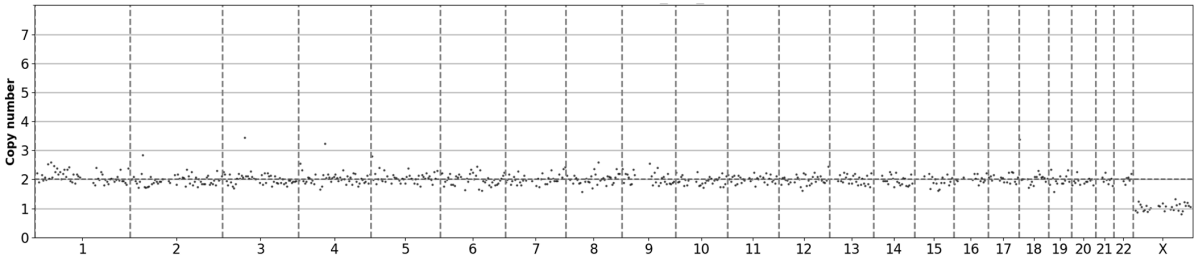
Patient: 55-MC20-028 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt



Patient: 56-MA20-334; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

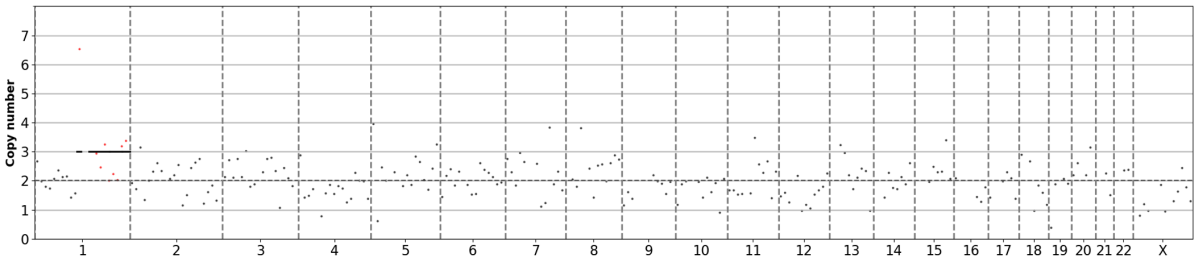
Counts = 216 180; *DLRS* = 0.231266692157; R50-Wert = 40

cfDNA K - balanciert



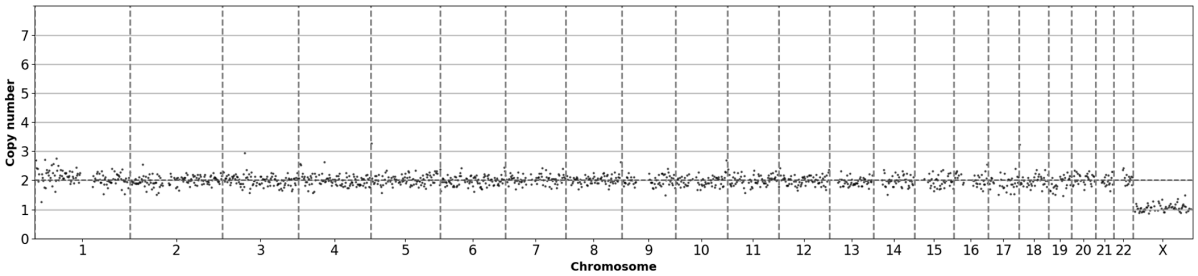
aufgrund zu geringer *Counts* keine Daten generiert

cfDNA G – nicht auswertbar



Counts = 447 926; *DLRS* = 0.226024000697; R50-Wert = 56

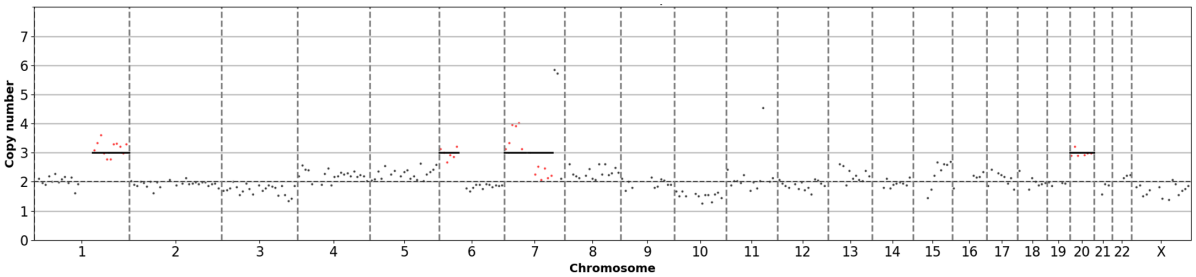
exoDNA – balanciert



Patient: 57-BC20-335 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

aufgrund zu geringer *Counts* keine Daten generiert

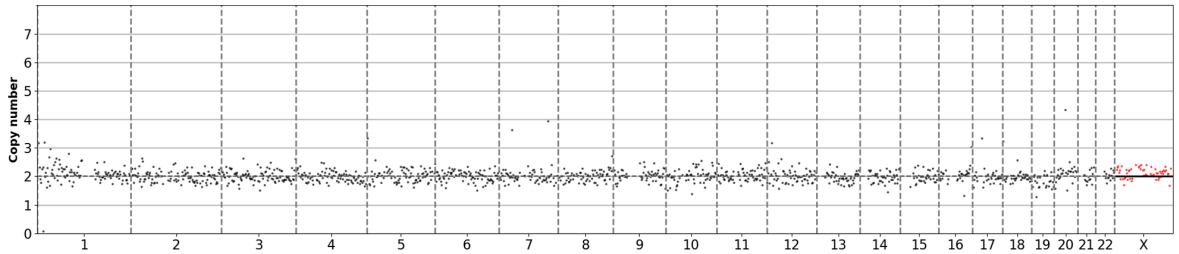
cfDNA – nicht auswertbar



Patient: 58-MM20-337 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt

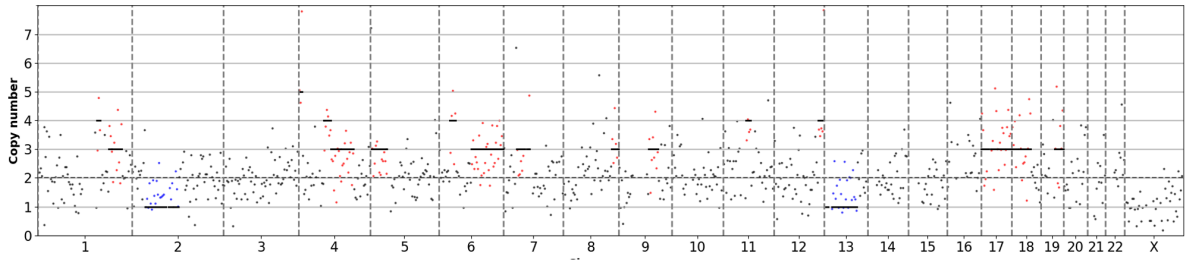
Counts = 409 464; *DLRS* = 0.245099639576; R50-Wert = 50

cfDNA K - balanciert



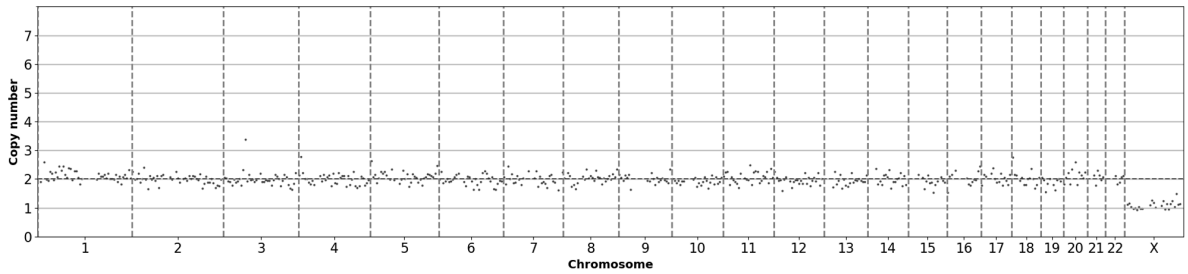
Counts = 270 251; *DLRS* = 0.79426094385; R50-Wert = 100

cfDNA G – nicht auswertbar

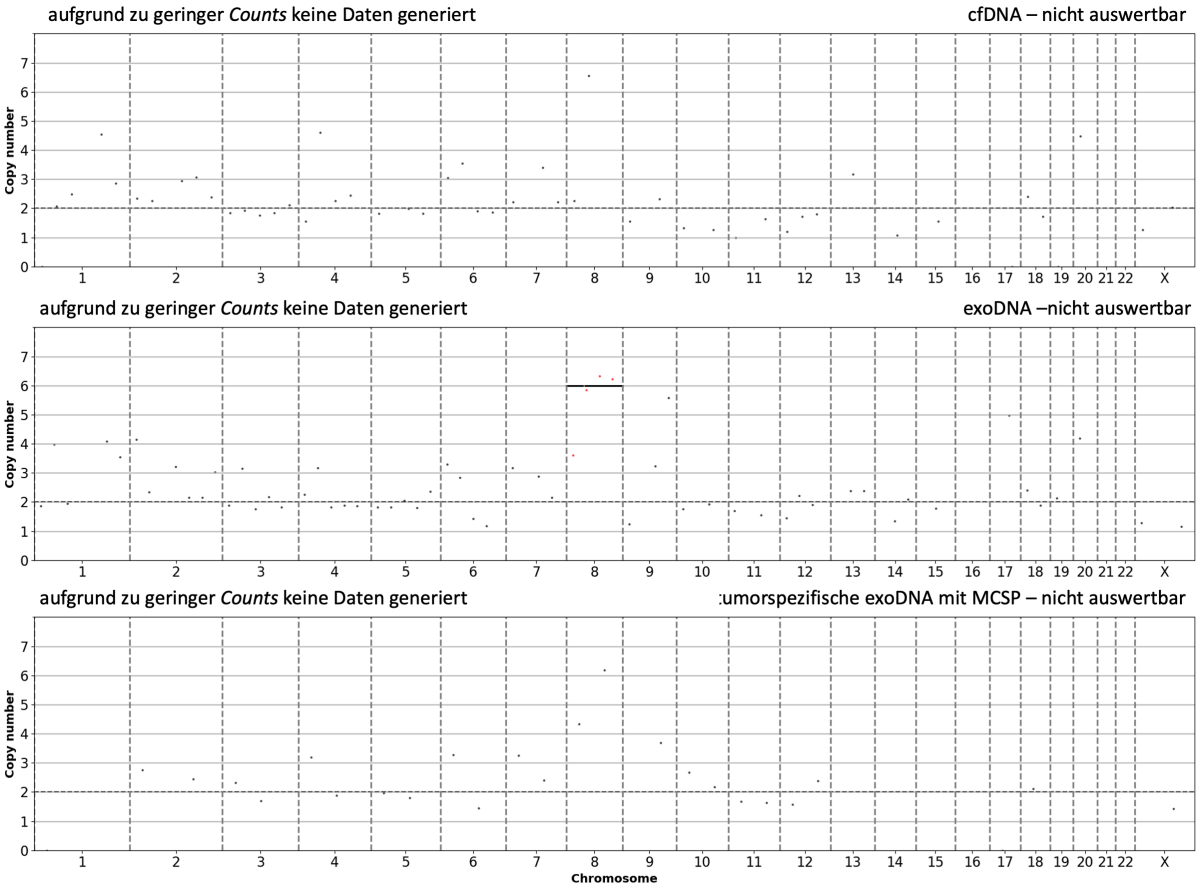


aufgrund zu geringer *Counts* keine Daten generiert

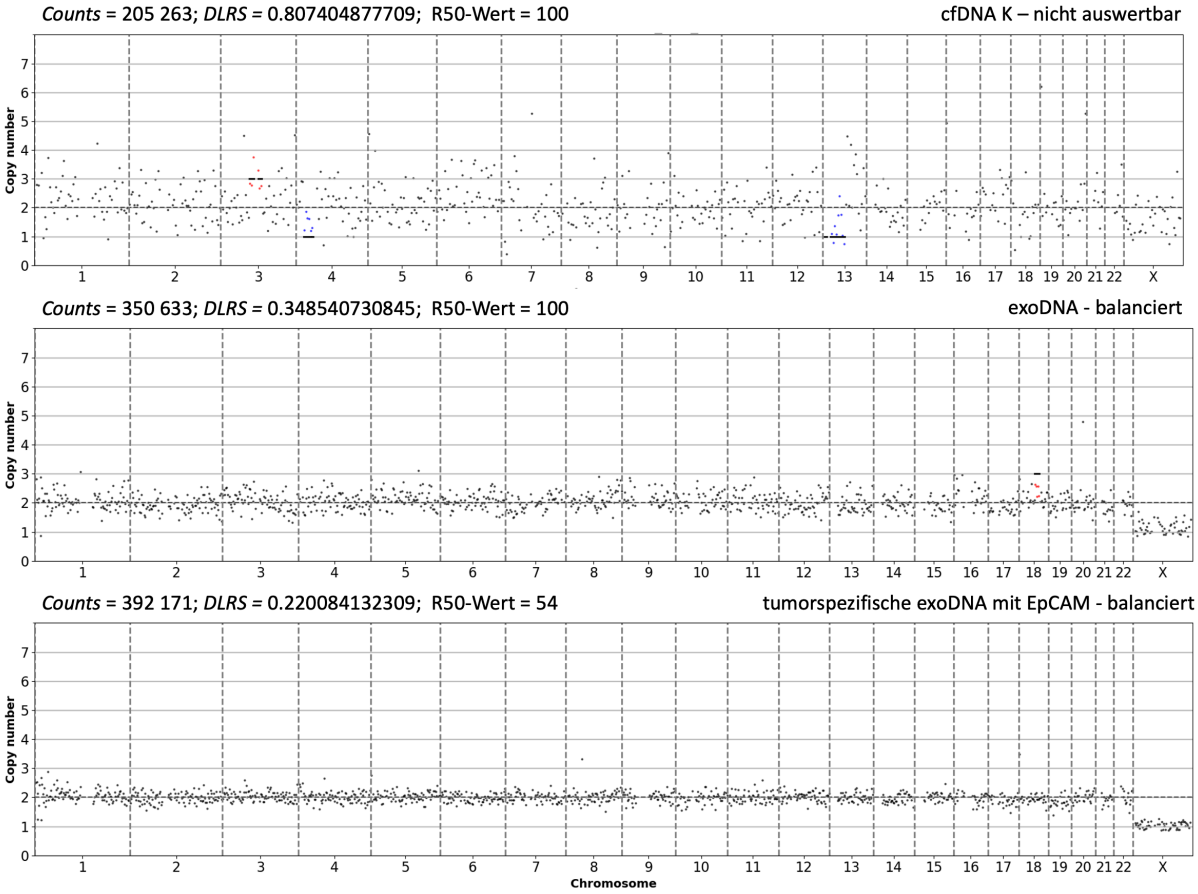
exoDNA – nicht auswertbar



Patient: 62-BC21-352 Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt



Patient: 65-MM21-367Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch bestätigt



Patient: 66-BC21-395Liq; Meningeosis per MRT/Histopathologisch nicht bestätigt

Abbildung 20 *Auflistung aller Genomprofile*

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Diagnostik und individualisierte Therapie von *Meningeosis neoplastica* 8
Abbildung 2 a Darstellung Histonoktamere 8
Abbildung 2 b Klassisches Fragmentverteilungsmuster 8
Abbildung 3 Entstehung und Freisetzung von extrazellulären Vesikeln 12
Abbildung 4 a Aufreinigung der cfDNA mit Hilfe *AMPure XP Beads* 29
Abbildung 4 b *Size Selection* mit Hilfe der *Beads* 29
Abbildung 4 c Beispiele von cfDNA nach Fragmentauftrennung 29
Abbildung 5 Arbeitsablauf nach Probenempfang 37
Abbildung 6 Darstellung aller gemessenen Konzentrationen 39
Abbildung 7 a Profile mit klassischer Fragmentverteilung 42
Abbildung 7 b Profile mit Fragmenten > 500 bp 42
Abbildung 8 Beispiele verschiedener Genomprofile 44
Abbildung 9 Gruppeneinteilung der BA-Ergebnisse der cfDNA und exoDNA 46
Abbildung 10 Grafische Auswertung aller Genomprofile 48
Abbildung 11 Alle Genomprofile tumorspezifischer Exosomen 50
Abbildung 12 BA-Profile aller exoDNA-Proben 53
Abbildung 13 BA-Profile der tumorspezifischen und unspezifischen exoDNA 55
Abbildung 14 a Genomprofile des Patienten Nr. 39 57
Abbildung 14 b Genomprofile des Patienten Nr. 34 57
Abbildung 14 c Genomprofile der Patienten Nr. 35 58
Abbildung 14 d Genomprofile des Patienten Nr. 38 59
Abbildung 14 e Genomprofile des Patienten Nr. 49 59
Abbildung 14 f Genomprofile des Patienten Nr. 65 60
Abbildung 14 g Genomprofile des Patienten Nr. 66 60
Abbildung 15 a Genomprofile des Patienten Nr. 15 62
Abbildung 15 b Genomprofile des Patienten Nr. 56 62
Abbildung 16 Auflistung aller cfDNA BA-Profile 77
Abbildung 17 Auflistung aller cfDNA BA-Profile nach Fragmentauftrennung 79
Abbildung 18 Auflistung aller exoDNA BA-Profile 81
Abbildung 19 BA-Profile der tumorspezifischen und unspezifischen exoDNA 82
Abbildung 20 Auflistung aller Genomprofile ..... ab Seite 83

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalien und Reagenzien für die Isolation der cfDNA 17
Tabelle 2 Chemikalien und Reagenzien für die Qubit 19
Tabelle 3 Chemikalien und Reagenzien für die Amplifikation 20
Tabelle 4 Lib1-TA-Eigenschaften 21
Tabelle 5 *End-Repair* und *A-Tailing* 21
Tabelle 6 Lib1-Adapter 22
Tabelle 7 Thermocycler-Programm Lib1-Adapter 22
Tabelle 8 Ligation Lib1-Adapter an die vorbereitete cfDNA 22
Tabelle 9 PCR-Amplifikations-Mix 23
Tabelle 10 Thermocycler-Programm Amplifikation 24
Tabelle 11 Chemikalien und Reagenzien für den Bioanalyzer 25
Tabelle 12 Chemikalien und Reagenzien für die Fragmentauftrennung der cfDNA 27
Tabelle 13 Chemikalien und Reagenzien für die Reamplifikation 30
Tabelle 14 Amplifikationsmix für die Reamplifikation 30
Tabelle 15 Chemikalien und Reagenzien für die Erstellung der Sequenzier-*Libraries* 31
Tabelle 16 Chemikalien und Reagenzien für die Isolation der Exosomen 33
Tabelle 17 Chemikalien und Reagenzien für die Isolation tumorspezifischer Exosomen 34
Tabelle 18 Chemikalien und Reagenzien für die Extraktion der DNA aus den Exosomen 35
Tabelle 19 Untersuchtes Probenkollektiv mit gemessenen Konzentrationen 40
Tabelle 20 Auflistung aller Patienten mit unspezifischen Exosomen 48
Tabelle 21 Auflistung aller Patienten mit tumorspezifischen Exosomen 49
Tabelle 22 Auflistung aller exoDNA-Proben und die Einteilung anhand der Fragmentlänge 54
Tabelle 23 Vollständige Auflistung aller Patientenproben 65

10. Abkürzungsverzeichnis

α…… alpha
µl …… Mikroliter
µM …… Mikromolar
µm …… Mikrometer
°C ..... Grad Celsius
A …… Adenin
Abb. …… Abbildung
ACB Buffer …… Bindungspuffer
ACL Buffer …… Lysierungs-/Denaturierungspuffer
ACW Buffer…… Waschpuffer
AVE Buffer …… Elutionspuffer
BC …… Bronchialkarzinom
bp …… Basenpaare
BRAF …… B-Raf Proto-Onkogen
BSA …… Bovines Seralbumin
bzw. …… beziehungsweise
C …… Cytosin
CC …… Colonkarzinom
CD…… *Cluster of Differentiation*
CNAs …… *Copy Number Alterations*
CNVs …… *Copy Number Variations*
CTC …… zirkulierende Tumorzelle
CTCs …… zirkulierende Tumorzellen
cfDNA …… *cell free DNA*
ctDNA ……*circulating tumor DNA*
CUP …… *Cancer of Unknown Primary*
DLRS …… *Derivative Log Ratio Spread*
DMSO …… Dimethylsulfoxid
DNA …… Desoxyribonukleinsäure
dNTPs …… desoxy-Nukleotide
dsDNA …… doppelsträngige DNA
EDTA …… Ethylendiamintetraessigsäure
EE ……*early endosome*

EpCAM …….*Epithelial Cell Adhesion Molecule*

et al., ……..…….....…. lateinisch: und andere

EVs ……..…….. Extrazelluläre Vesikel

exoDNA ……..…… exosomale DNA

FU ……. Floureszenzeinheiten

G……..…… Guanin

h ……. Stunde

H_2O ……Diwasserstoffmonoxid, entspricht Wasser

ILV ……intraluminal vesicles

L-EVs …….. *large extracellular vesicles*

LE ……..*late endosome*

LEX …… Lehrstuhl für Experimentelle Medizin

Lib1 ……..….*Library Adapter 1*

LIM ……...Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie

Liq …… Liquor

M ……..…… männlich

MA ……..… Magenkarzinom

mA ..... Milliampère

MC …… Mammakarzinom

MCSP ……...*Melanoma-associated Chondroitin Sulfate Proteoglycan*

mg …….....……..... Milligramm

MgCl2 …….…… Mangnesiumchlorid

min ..... Minuten

ml ……..……..……..……..... Milliliter

MM ……..…….. Multiples Melanom

mM ……..……..... Millimolar

mRNA ……..… *messenger* Ribonukleinsäure

MRT ……... Magnetresonanztomographie

MVB ……*multivesicular bodies*

n ……..…….. lateinisch: numerus; Anzahl

n.a. ……..…….. nicht auswertbar

NaOH ……..... Natronlauge, Natriumhydroxid

ng ..... Nanogramm

NGS ……..... *Next Generation Sequencing*

Nr. ..... Nummer
OPA .....One Phor All
PBS-Puffer ..... *Phosphat-Buffered Saline*
PCR ..... Polymerasekettenreaktion
PEG-NaCl .....Polyethylenglykol-Natriumchlorid
pg ..... Picogramm
qPCR. ..... quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA ..... Ribonukleinsäure
S.p.A. ..... *Società per Azioni*
SCLC ..... *Small Cell Lung Cancer*
SEC .....*Size-exclusion-Chromatography*
sog. ..... sogenannt
SPRI Beads .....*Solid Phase Reversible Immobilization-Beads*
T ..... Thymin
Tab. ..... Tabelle
Tris-HCl .....Trishydroxymethylaminomethan Hydrochlorid
U ..... *Units*
V ..... Volt
V600E ..... Valin (V) wird an Position 600 durch Glutaminsäure (E) ersetzt
vgl. ..... vergleiche
vs. ..... versus
W ..... weiblich
z.B. ..... zum Beispiel
ZNS ..... Zentrales Nervensystem

11. Literaturverzeichnis nach NLM

Amboss, Artikel: “Meningeosis neoplastica” https://www.amboss.com/de/wissen/Meningeosis_neoplastica (abgerufen März 2021)

Amboss, Artikel: „Zellzyklus und Tumorentstehung“ https://www.amboss.com/de/wissen/Zellzyklus_und_Tumorentstehung (abgerufen November 2020)

Andreu Z, Yáñez-Mó M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. Front Immunol. 2014 Sep 16;5:442. doi: 10.3389/fimmu.2014.00442. PMID: 25278937; PMCID: PMC4165315.

Angus L, Deger T, Jager A, Martens JWM, de Weerd V, van Heuvel I, van den Bent MJ, Sillevis Smitt PAE, Kros JM, Bindels EMJ, Heitzer E, Sleijfer S, Jongen JLM, Wilting SM. Detection of Aneuploidy in Cerebrospinal Fluid from Patients with Breast Cancer Can Improve Diagnosis of Leptomeningeal Metastases. Clin Cancer Res. 2021 May 15;27(10):2798-2806. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-3954. Epub 2021 Jan 29. PMID: 33514525.

Antonyak MA, Cerione RA. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer. Methods Mol Biol. 2014;1165:147-73. doi: 10.1007/978-1-4939-0856-1_11. PMID: 24839024.

Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, Johnson JL, Druso JE, Bryant KL, Holowka DA, Cerione RA. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Mar 22;108(12):4852-7. doi: 10.1073/pnas.1017667108. Epub 2011 Feb 28. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Oct 18;108(42):17569. PMID: 21368175; PMCID: PMC3064359.

Barbany G, Arthur C, Liedén A, Nordenskjöld M, Rosenquist R, Tesi B, Wallander K, Tham E. Cell-free tumour DNA testing for early detection of cancer - a potential future tool. J Intern Med. 2019 Aug;286(2):118-136. doi: 10.1111/joim.12897. Epub 2019 Apr 8. PMID: 30861222.

Bendell JC, Domchek SM, Burstein HJ, Harris L, Younger J, Kuter I, Bunnell C, Rue M, Gelman R, Winer E. Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab-based therapy for metastatic breast carcinoma. Cancer. 2003 Jun 15;97(12):2972-7. doi: 10.1002/cncr.11436. PMID: 12784331.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Luber B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih IM, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. Sci Transl Med. 2014 Feb 19;6(224):224ra24. doi: 10.1126/scitranslmed.3007094. PMID: 24553385; PMCID: PMC4017867.

Bobillo S, Crespo M, Escudero L, Mayor R, Raheja P, Carpio C, Rubio-Perez C, Tazón-Vega B, Palacio C, Carabia J, Jiménez I, Nieto JC, Montoro J, Martínez-Ricarte F, Castellvi J, Simó M, Puigdefàbregas L, Abrisqueta P, Bosch F, Seoane J. Cell free circulating tumor DNA in cerebrospinal fluid detects and monitors central nervous system involvement of B-cell lymphomas. Haematologica. 2021 Feb 1;106(2):513-521. doi: 10.3324/haematol.2019.241208. PMID: 32079701; PMCID: PMC7849551.

Castillo J, Bernard V, San Lucas FA, Allenson K, Capello M, Kim DU, Gascoyne P, Mulu FC, Stephens BM, Huang J, Wang H, Momin AA, Jacamo RO, Katz M, Wolff R, Javle M, Varadhachary G, Wistuba II, Hanash S, Maitra A, Alvarez H. Surfaceome profiling enables isolation of cancer-specific exosomal cargo in liquid biopsies from pancreatic cancer patients. Ann Oncol. 2018 Jan 1;29(1):223-229. doi: 10.1093/annonc/mdx542. PMID: 29045505; PMCID: PMC6248757.

Chamberlain MC. Radioisotope CSF flow studies in leptomeningeal metastases. J Neurooncol. 1998 Jun-Jul;38(2-3):135-40. doi: 10.1023/a:1005982826121. PMID: 9696363.

Chiu RW, Chan KC, Gao Y, Lau VY, Zheng W, Leung TY, Foo CH, Xie B, Tsui NB, Lun FM, Zee BC, Lau TK, Cantor CR, Lo YM. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Dec 23;105(51):20458-63. doi: 10.1073/pnas.0810641105. Epub 2008 Dec 10. PMID: 19073917; PMCID: PMC2600580.

Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. Nat Rev Clin Oncol. 2013 Aug;10(8):472-84. doi: 10.1038/nrclinonc.2013.110. Epub 2013 Jul 9. PMID: 23836314.

Cvjetkovic A, Lötvall J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. J Extracell Vesicles. 2014 Mar 25;3. doi: 10.3402/jev.v3.23111. PMID: 24678386; PMCID: PMC3967015.

DeAngelis LM, Boutros D. Leptomeningeal metastasis. Cancer Invest. 2005;23(2):145-54. PMID: 15813508.

Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Oct 21;105(42):16266-71. doi: 10.1073/pnas.0808319105. Epub 2008 Oct 6. PMID: 18838674; PMCID: PMC2562413.

Fernando MR, Jiang C, Krzyzanowski GD, Ryan WL. New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. PLoS One. 2017 Aug 29;12(8):e0183915. doi: 10.1371/journal.pone.0183915. PMID: 28850588; PMCID: PMC5574584.

Fitzpatrick A, Iravani M, Mills A, Childs L, Alaguthurai T, Clifford A, Garcia-Murillas I, Van Laere S, Dirix L, Harries M, Okines A, Turner NC, Haider S, Tutt ANJ, Isacke CM. Assessing CSF ctDNA to Improve Diagnostic Accuracy and Therapeutic Monitoring in Breast Cancer Leptomeningeal Metastasis. Clin Cancer Res. 2022 Mar 15;28(6):1180-1191. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-21-3017. PMID: 34921020; PMCID: PMC7612501.

Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. Biochim Biophys Acta. 2007 Jan;1775(1):181-232. doi: 10.1016/j.bbcan.2006.10.001. Epub 2006 Oct 7. PMID: 17137717.

Fox-Fisher I, Piyanzin S, Ochana BL, Klochendler A, Magenheim J, Peretz A, Loyfer N, Moss J, Cohen D, Drori Y, Friedman N, Mandelboim M, Rothenberg ME, Caldwell JM, Rochman M, Jamshidi A, Cann G, Lavi D, Kaplan T, Glaser B, Shemer R, Dor Y. Remote immune processes revealed by immune-derived circulating cell-free DNA. Elife. 2021 Nov 29;10:e70520. doi: 10.7554/eLife.70520. PMID: 34842142; PMCID: PMC8651286.

Grabuschnig S, Bronkhorst AJ, Holdenrieder S, Rosales Rodriguez I, Schliep KP, Schwendenwein D, Ungerer V, Sensen CW. Putative Origins of Cell-Free DNA in Humans: A Review of Active and Passive Nucleic Acid Release Mechanisms. Int J Mol Sci. 2020 Oct 29;21(21):8062. doi: 10.3390/ijms21218062. PMID: 33137955; PMCID: PMC7662960.

Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A protocol for exosome isolation and characterization: evaluation of ultracentrifugation, density-gradient separation, and immunoaffinity capture methods. Methods Mol Biol. 2015;1295:179-209. doi: 10.1007/978-1-4939-2550-6_15. PMID: 25820723.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230.

Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. Nat Cell Biol. 2012 Feb 12;14(3):249-56. doi: 10.1038/ncb2441. PMID: 22327366.

Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. Cancer Res. 2011 Jun 1;71(11):3792-801. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4455. Epub 2011 Apr 8. PMID: 21478294.

Horstman LL, Jy W, Minagar A, Bidot CJ, Jimenez JJ, Alexander JS, Ahn YS. Cell-derived microparticles and exosomes in neuroinflammatory disorders. Int Rev Neurobiol. 2007;79:227-68. doi: 10.1016/S0074-7742(07)79010-4. PMID: 17531844.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. Cancer Res. 2001 Feb 15;61(4):1659-65. PMID: 11245480.

Jiang X, Zhang J, Huang Y. Tetraspanins in cell migration. Cell Adh Migr. 2015;9(5):406-15. doi: 10.1080/19336918.2015.1005465. Epub 2015 Jun 19. PMID: 26091149; PMCID: PMC4955372.

Jin Y, Chen K, Wang Z, Wang Y, Liu J, Lin L, Shao Y, Gao L, Yin H, Cui C, Tan Z, Liu L, Zhao C, Zhang G, Jia R, Du L, Chen Y, Liu R, Xu J, Hu X, Wang Y. DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions. BMC Cancer. 2016 Sep 23;16(1):753. doi: 10.1186/s12885-016-2783-2. PMID: 27662833; PMCID: PMC5035490.

Johnstone RM, Adam M, Hammond JR, Orr L, Turbide C. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). J Biol Chem. 1987 Jul 5;262(19):9412-20. PMID: 3597417.

Kalluri R, LeBleu VS. The biology**,** function**,**and biomedical applications of exosomes. Science. 2020 Feb 7;367(6478):eaau6977. doi: 10.1126/science.aau6977. PMID: 32029601; PMCID: PMC7717626.

Kang YT, Hadlock T, Lo TW, Purcell E, Mutukuri A, Fouladdel S, Raguera MS, Fairbairn H, Murlidhar V, Durham A, McLean SA, Nagrath S. Dual-Isolation and Profiling of Circulating Tumor Cells and Cancer Exosomes from Blood Samples with Melanoma Using Immunoaffinity-Based Microfluidic Interfaces. Adv Sci (Weinh). 2020 Aug 19;7(19):2001581. doi: 10.1002/advs.202001581. PMID: 33042766; PMCID: PMC7539202.

Keller L, Belloum Y, Wikman H, Pantel K. Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: mutation detection and beyond. Br J Cancer. 2021 Jan;124(2):345-358. doi: 10.1038/s41416-020-01047-5. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32968207; PMCID: PMC7852556.

Khier S, Lohan L. Kinetics of circulating cell-free DNA for biomedical applications: critical appraisal of the literature. Future Sci OA. 2018 Feb 23;4(4):FSO295. doi: 10.4155/fsoa-2017-0140. PMID: 29682327; PMCID: PMC5905581.

Kim EY, Lee ST, Kim YS, Byun JM, Hong J, Shin DY, Koh Y, Kim I. High Cell-Free DNA Levels in Cerebrospinal Fluid Predict Leptomeningeal Seeding of Hematologic Malignancy. J Clin Neurol. 2020 Oct;16(4):581-585. doi: 10.3988/jcn.2020.16.4.581. PMID: 33029963; PMCID: PMC7541998.

Kölmel HW. Cytology of neoplastic meningosis. J Neurooncol. 1998 Jun-Jul;38(2-3):121-5. doi: 10.1023/a:1005970406557. PMID: 9696361.

Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. Cancer Biol Ther. 2019;20(8):1057-1067. doi: 10.1080/15384047.2019.1598759. Epub 2019 Apr 16. PMID: 30990132; PMCID: PMC6606043.

Kwizera EA, O'Connor R, Vinduska V, Williams M, Butch ER, Snyder SE, Chen X, Huang X. Molecular Detection and Analysis of Exosomes Using Surface-Enhanced Raman Scattering Gold Nanorods and a Miniaturized Device. Theranostics. 2018 Apr 9;8(10):2722-2738. doi: 10.7150/thno.21358. PMID: 29774071; PMCID: PMC5957005.

Leal T, Chang JE, Mehta M, Robins HI. Leptomeningeal Metastasis: Challenges in Diagnosis and Treatment. Curr Cancer Ther Rev. 2011 Nov;7(4):319-327. doi: 10.2174/157339411797642597. PMID: 23251128; PMCID: PMC3523178.

Lee DH, Yoon H, Park S, Kim JS, Ahn YH, Kwon K, Lee D, Kim KH. Urinary Exosomal and cell-free DNA Detects Somatic Mutation and Copy Number Alteration in Urothelial Carcinoma of Bladder. Sci Rep. 2018 Oct 2;8(1):14707. doi: 10.1038/s41598-018-32900-6. PMID: 30279572; PMCID: PMC6168539.

Li XB, Zhang ZR, Schluesener HJ, Xu SQ. Role of exosomes in immune regulation. J Cell Mol Med. 2006 Apr-Jun;10(2):364-75. doi: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00405.x. PMID: 16796805; PMCID: PMC3933127.

Li Y, Pan W, Connolly ID, Reddy S, Nagpal S, Quake S, Gephart MH. Tumor DNA in cerebral spinal fluid reflects clinical course in a patient with melanoma leptomeningeal brain metastases. J Neurooncol. 2016 May;128(1):93-100. doi: 10.1007/s11060-016-2081-5. Epub 2016 Mar 9. PMID: 26961773; PMCID: PMC5412509.

Lin J, Li J, Huang B, Liu J, Chen X, Chen XM, Xu YM, Huang LF, Wang XZ. Exosomes: novel biomarkers for clinical diagnosis. ScientificWorldJournal. 2015;2015:657086. doi: 10.1155/2015/657086. Epub 2015 Jan 27. PMID: 25695100; PMCID: PMC4322857.

Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet. 1988;22:631-77. doi: 10.1146/annurev.ge.22.120188.003215. PMID: 2853609.

Ma X, Zhu L, Wu X, Bao H, Wang X, Chang Z, Shao YW, Wang Z. Cell-Free DNA Provides a Good Representation of the Tumor Genome Despite Its Biased Fragmentation Patterns. PLoS One. 2017 Jan 3;12(1):e0169231. doi: 10.1371/journal.pone.0169231. PMID: 28046008; PMCID: PMC5207727.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol. 1995 Jan;146(1):3-15. PMID: 7856735; PMCID: PMC1870771.

McGinty RK, Tan S. Nucleosome structure and function. Chem Rev. 2015 Mar 25;115(6):2255-73. doi: 10.1021/cr500373h. Epub 2014 Dec 12. PMID: 25495456; PMCID: PMC4378457.

Mittl RL Jr, Yousem DM. Frequency of unexplained meningeal enhancement in the brain after lumbar puncture. AJNR Am J Neuroradiol. 1994 Apr;15(4):633-8. PMID: 8010262.

Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. Semin Cell Dev Biol. 2015 Apr;40:41-51. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.010. Epub 2015 Feb 23. PMID: 25721812; PMCID: PMC4747631.

M. Lu, S. Liu, A. K. Sangaiah, Y. Zhou, Z. Pan and Y. Zuo, "Nucleosome Positioning With Fractal Entropy Increment of Diversity in Telemedicine," in *IEEE Access*, vol. 6, pp. 33451-33459, 2018, doi: 10.1109/ACCESS.2017.2779850

Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F, Gongora C, Thierry AR. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. PLoS One. 2011;6(9):e23418. doi: 10.1371/journal.pone.0023418. Epub 2011 Sep 6. PMID: 21909401; PMCID: PMC3167805.

Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, Dritschilo A, Thierry AR. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. Mol Oncol. 2014 Jul;8(5):927-41. doi: 10.1016/j.molonc.2014.02.005. Epub 2014 Mar 24. PMID: 24698732; PMCID: PMC5528519.

MSD Manuals, Artikel: „Tumorantigene“ https://www.msdmanuals.com/de/profi/hämatologie-und-onkologie/tumorimmunologie/tumorantigene?utm_source=chatgpt.com (abgerufen August 2025)

El Messaoudi S, Mouliere F, Du Manoir S, Bascoul-Mollevi C, Gillet B, Nouaille M, Fiess C, Crapez E, Bibeau F, Theillet C, Mazard T, Pezet D, Mathonnet M, Ychou M, Thierry AR. Circulating DNA as a Strong Multimarker Prognostic Tool for Metastatic Colorectal Cancer Patient Management Care. Clin Cancer Res. 2016 Jun 15;22(12):3067-77. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-0297. Epub 2016 Feb 4. PMID: 26847055.

Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. Nat Cell Biol. 2008

May;10(5):619-24. doi: 10.1038/ncb1725. Epub 2008 Apr 20. Erratum in: Nat Cell Biol. 2008 Jun;10(6):752. PMID: 18425114.

Nevel KS, DiStefano N, Lin X, Skakodub A, Ogilvie SQ, Reiner AS, Pentsova E, Boire A. A retrospective, quantitative assessment of disease burden in patients with leptomeningeal metastases from non-small-cell lung cancer. Neuro Oncol. 2020 May 15;22(5):675-683. doi: 10.1093/neuonc/noz208. PMID: 32352148; PMCID: PMC7229251.

Pan W, Gu W, Nagpal S, Gephart MH, Quake SR. Brain tumor mutations detected in cerebral spinal fluid. Clin Chem. 2015 Mar;61(3):514-22. doi: 10.1373/clinchem.2014.235457. Epub 2015 Jan 20. PMID: 25605683; PMCID: PMC5412506.

Pegtel DM, van de Garde MD, Middeldorp JM. Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion. Biochim Biophys Acta. 2011 Nov-Dec;1809(11-12):715-21. doi: 10.1016/j.bbagrm.2011.08.002. Epub 2011 Aug 9. PMID: 21855666.

Pentsova EI, Shah RH, Tang J, Boire A, You D, Briggs S, Omuro A, Lin X, Fleisher M, Grommes C, Panageas KS, Meng F, Selcuklu SD, Ogilvie S, Distefano N, Shagabayeva L, Rosenblum M, DeAngelis LM, Viale A, Mellinghoff IK, Berger MF. Evaluating Cancer of the Central Nervous System Through Next-Generation Sequencing of Cerebrospinal Fluid. J Clin Oncol. 2016 Jul 10;34(20):2404-15. doi: 10.1200/JCO.2016.66.6487. Epub 2016 May 9. Erratum in: J Clin Oncol. 2017 Jun 10;35(17):1972. PMID: 27161972; PMCID: PMC4981784.

Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, Hergueta-Redondo M, Williams C, García-Santos G, Ghajar C, Nitadori-Hoshino A, Hoffman C, Badal K, Garcia BA, Callahan MK, Yuan J, Martins VR, Skog J, Kaplan RN, Brady MS, Wolchok JD, Chapman PB, Kang Y, Bromberg J, Lyden D. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. Nat Med. 2012 Jun;18(6):883-91. doi: 10.1038/nm.2753. Erratum in: Nat Med. 2016 Dec 6;22(12):1502. PMID: 22635005; PMCID: PMC3645291.

Psaila B, Lyden D. The metastatic niche: adapting the foreign soil. Nat Rev Cancer. 2009 Apr;9(4):285-93. doi: 10.1038/nrc2621. PMID: 19308068; PMCID: PMC3682494.

Rak J. Microparticles in cancer. Semin Thromb Hemost. 2010 Nov;36(8):888-906. doi: 10.1055/s-0030-1267043. Epub 2010 Nov 3. PMID: 21049390.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol. 2013 Feb 18;200(4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138. PMID: 23420871; PMCID: PMC3575529.

Reiners, K., Dassler-Plenker, J., Coch, C. & Hartmann, G. (2017). Funktion von extrazellulären Vesikeln und Bedeutung für die labormedizinische Diagnostik. *LaboratoriumsMedizin*, *41*(6), 299-308. https://doi.org/10.1515/labmed-2017-0078

Roma-Rodrigues C, Fernandes AR, Baptista PV. Exosome in tumour microenvironment: overview of the crosstalk between normal and cancer cells. Biomed Res Int. 2014;2014:179486. doi: 10.1155/2014/179486. Epub 2014 May 21. PMID: 24963475; PMCID: PMC4055162.

Ruhen O, Mirzai B, Clark ME, Nguyen B, Salomon C, Erber W, Meehan K. Comparison of Circulating Tumour DNA and Extracellular Vesicle DNA by Low-Pass Whole-Genome Sequencing Reveals Molecular Drivers of Disease in a Breast Cancer Patient. Biomedicines. 2020 Dec 25;9(1):14. doi: 10.3390/biomedicines9010014. PMID: 33375577; PMCID: PMC7823926.

Riches A, Campbell E, Borger E, Powis S. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - a new regulatory pathway. Eur J Cancer. 2014 Mar;50(5):1025-34. doi: 10.1016/j.ejca.2013.12.019. Epub 2014 Jan 22. PMID: 24462375.

Rykova EY, Morozkin ES, Ponomaryova AA, Loseva EM, Zaporozhchenko IA, Cherdyntseva NV, Vlassov VV, Laktionov PP. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. Expert Opin Biol Ther. 2012 Jun;12 Suppl 1:S141-53. doi: 10.1517/14712598.2012.673577. Epub 2012 Apr 14. PMID: 22500614.

Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. Nature. 1998 Jan 1;391(6662):96-9. doi: 10.1038/34214. Erratum in: Nature. 2015 Oct 29;526(7575):728. PMID: 9422513.

Sanmamed MF, Fernández-Landázuri S, Rodríguez C, Zárate R, Lozano MD, Zubiri L, Perez-Gracia JL, Martín-Algarra S, González A. Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. Clin Chem. 2015 Jan;61(1):297-304. doi: 10.1373/clinchem.2014.230235. Epub 2014 Nov 19. PMID: 25411185.

Schwarzenbach H, Stoehlmacher J, Pantel K, Goekkurt E. Detection and monitoring of cell-free DNA in blood of patients with colorectal cancer. Ann N Y Acad Sci. 2008 Aug;1137:190-6. doi: 10.1196/annals.1448.025. PMID: 18837946.

Schwarzenbach H. Circulating nucleic acids as biomarkers in breast cancer. Breast Cancer Res. 2013;15(5):211. doi: 10.1186/bcr3446. PMID: 24090167; PMCID: PMC3978696.

Shankar GM, Balaj L, Stott SL, Nahed B, Carter BS. Liquid biopsy for brain tumors. Expert Rev Mol Diagn. 2017 Oct;17(10):943-947. doi: 10.1080/14737159.2017.1374854. Epub 2017 Sep 6. PMID: 28875730; PMCID: PMC5856481.

Sidhom K, Obi PO, Saleem A. A Review of Exosomal Isolation Methods: Is Size Exclusion Chromatography the Best Option? Int J Mol Sci. 2020 Sep 4;21(18):6466. doi: 10.3390/ijms21186466. PMID: 32899828; PMCID: PMC7556044.

Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. Cell. 2016 Jan 14;164(1-2):57-68. doi: 10.1016/j.cell.2015.11.050. PMID: 26771485; PMCID: PMC4715266.

Spektrum, Lexikon der Biologie, Artikel: „Histone“ https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/histone/32070 (abgerufen November 2020)

Strik H, Prömmel P. Meningeosis neoplastica. Diagnostik und individualisierte Therapie [Neoplastic meningitis. Diagnosis and individualised therapy]. © Springer Medizin Verlag 2009, Nervenarzt. 2010 Feb;81(2):229-41; quiz 242. German. doi: 10.1007/s00115-009-2927-6. PMID: 20140544.

Szatanek R, Baran J, Siedlar M, Baj-Krzyworzeka M. Isolation of extracellular vesicles: Determining the correct approach (Review). Int J Mol Med. 2015 Jul;36(1):11-7. doi: 10.3892/ijmm.2015.2194. Epub 2015 Apr 22. PMID: 25902369; PMCID: PMC4494580.

Takousis P, Devonshire AS, Redshaw N, von Baumgarten L, Whale AS, Jones GM, Fernandez-Gonzalez A, Martin J, Foy CA, Alexopoulos P, Huggett JF, Perneczky R. A standardised methodology for the extraction and quantification of cell-free DNA in cerebrospinal fluid and application to evaluation of Alzheimer's disease and brain cancers. N Biotechnol. 2022 Dec 25;72:97-106. doi: 10.1016/j.nbt.2022.10.001. Epub 2022 Oct 3. PMID: 36202346.

Thakur BK, Zhang H, Becker A, Matei I, Huang Y, Costa-Silva B, Zheng Y, Hoshino A, Brazier H, Xiang J, Williams C, Rodriguez-Barrueco R, Silva JM, Zhang W, Hearn S,
Elemento O, Paknejad N, Manova-Todorova K, Welte K, Bromberg J, Peinado H, Lyden D. Double-stranded DNA in exosomes: a novel biomarker in cancer detection. Cell Res. 2014 Jun;24(6):766-9. doi: 10.1038/cr.2014.44. Epub 2014 Apr 8. PMID: 24710597; PMCID: PMC4042169.

Théry C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. Nat Rev Immunol. 2002 Aug;2(8):569-79. doi: 10.1038/nri855. PMID: 12154376.

Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. Cancer Metastasis Rev. 2016 Sep;35(3):347-76. doi: 10.1007/s10555-016-9629-x. PMID: 27392603; PMCID: PMC5035665.

Thierry AR, Mouliere F, Gongora C, Ollier J, Robert B, Ychou M, Del Rio M, Molina F. Origin and quantification of circulating DNA in mice with human colorectal cancer xenografts. Nucleic Acids Res.

2010 Oct;38(18):6159-75. doi: 10.1093/nar/gkq421. Epub 2010 May 21. PMID: 20494973; PMCID: PMC2952865.

Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC. Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. Am J Pathol. 2007 Aug;171(2):386-95. doi: 10.2353/ajpath.2007.070152. Epub 2007 Jun 28. PMID: 17600130; PMCID: PMC1934518.

Vagner T, Spinelli C, Minciacchi VR, Balaj L, Zandian M, Conley A, Zijlstra A, Freeman MR, Demichelis F, De S, Posadas EM, Tanaka H, Di Vizio D. Large extracellular vesicles carry most of the tumour DNA circulating in prostate cancer patient plasma. J Extracell Vesicles. 2018 Aug 7;7(1):1505403. doi: 10.1080/20013078.2018.1505403. PMID: 30108686; PMCID: PMC6084494.

Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007 Jun;9(6):654-9. doi: 10.1038/ncb1596. Epub 2007 May 7. PMID: 17486113.

Weller, Michael: „Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie - Hirnmetastasen und Meningeosis neoplastica“ https://dgn.org/wp-content/uploads/2013/01/030-060l_S2k_Hirnmetastasen_Meningeosis_neoplastica_2015-06-archiviert-1.pdf (abgerufen November 2020)

Whiteside TL. The effect of tumor-derived exosomes on immune regulation and cancer immunotherapy. Future Oncol. 2017 Dec;13(28):2583-2592. doi: 10.2217/fon-2017-0343. Epub 2017 Dec 4. PMID: 29198150; PMCID: PMC5827821.

Wu X, Xing P, Shi M, Guo W, Zhao F, Zhu H, Xiao J, Wan J, Li J. Cerebrospinal Fluid Cell-Free DNA-Based Detection of High Level of Genomic Instability Is Associated With Poor Prognosis in NSCLC Patients With Leptomeningeal Metastases. Front Oncol. 2022 Apr 28;12:664420. doi: 10.3389/fonc.2022.664420. PMID: 35574310; PMCID: PMC9097599.

Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borràs FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghobrial IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulf P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Linē A, Lipps G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcilla A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-'t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Olivan M, Oliveira C, Pállinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. J Extracell Vesicles. 2015 May 14;4:27066. doi: 10.3402/jev.v4.27066. PMID: 25979354; PMCID: PMC4433489.

Yang J, Price MA, Neudauer CL, Wilson C, Ferrone S, Xia H, Iida J, Simpson MA, McCarthy JB. Melanoma chondroitin sulfate proteoglycan enhances FAK and ERK activation by distinct mechanisms. J Cell Biol. 2004 Jun 21;165(6):881-91. doi: 10.1083/jcb.200403174. PMID: 15210734; PMCID: PMC2172406.

Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. Clin Cancer Res. 2011 Mar 1;17(5):959-64. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1489. Epub 2011 Jan 11. PMID: 21224375; PMCID: PMC3155407.

12. Eidesstattliche Erklärung

Name/Anschrift
Lena Maria Moser

Ehrenwörtliche Erklärung zu meiner Dissertation
mit dem Titel:

„ANALYSE NICHT-ZELLULÄRER BESTANDTEILE DES LIQUORS VON PATIENTEN MIT MENINGEOSIS NEOPLASTICA“

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift