

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die simultane Detektion von vier Neuroblastom-DNA-Targets in  
zellfreier DNA mittels droplet digital PCR**

**Simultaneous detection of four neuroblastoma DNA targets in  
cell-free DNA from liquid biopsies via droplet digital PCR**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Constantin Peitz

aus Münster

Datum der Promotion: 04.03.2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	3
<b>Kurzzusammenfassung</b> .....	4
<b>Abstract</b> .....	5
<b>1. Einleitung</b> .....	6
1.1. Das Neuroblastom.....	6
1.2. Diagnostik des Neuroblastoms.....	7
1.3. Chirurgische Biopsie vs. <i>Liquid Biopsy</i> .....	8
1.4. Droplet digital PCR (ddPCR) und Multiplex ddPCR.....	9
<b>2. Material und Methoden</b> .....	11
2.1. Patientenproben.....	11
2.2. Zellkultur.....	12
2.3. Genomische und zellfreie DNA-Präparation.....	13
2.4. Droplet digital PCR.....	14
2.5. Whole-Exome Sequenzierung (WES).....	18
2.6. Statistische Analyse.....	19
<b>3. Ergebnisse</b> .....	19
3.1. Etablierung eines Quadruplex-ddPCR-Protokolls zur Analyse von Kopienanzahl-Veränderungen (CNV) im <i>MYCN</i> - und <i>ALK</i> -Gen.....	19
3.2. Bestimmung der <i>MYCN</i> - und <i>ALK</i> -Kopienanzahl in Neuroblastom-Zelllinien mit den etablierten Multiplex-ddPCR-Protokollen.....	27
3.3. Bestimmung des <i>MYCN</i> - und <i>ALK</i> -Kopienanzahl-Status im Blutplasma und Tumorproben von Patienten mit Neuroblastom mit dem etablierten Quadruplex-Protokoll.....	29
3.4. Etablierung eines Quadruplex-Protokolls für die simultane Detektion der <i>ALK</i> -Hotspot-Mutationen <i>ALK<sup>F1174L</sup></i> und <i>ALK<sup>R1275Q</sup></i> .....	32
3.5. Detektion der MAFs von <i>ALK<sup>F1174L</sup></i> - und <i>ALK<sup>R1275Q</sup></i> -Hotspot-Mutationen in Neuroblastom-Zelllinien mittels des Quadruplex-Protokolls.....	36
3.6. Detektion von <i>ALK<sup>F1174L</sup></i> und <i>ALK<sup>R1275Q</sup></i> und deren <i>mutant allele fractions</i> in Tumor- und Plasmaproben von Neuroblastom-Patienten mit dem etablierten Quadruplex-Protokoll.....	38
<b>4. Diskussion</b> .....	41
<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	51
<b>Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation</b> .....	52
<b>Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)</b> .....	53
<b>Ausgewählte Publikation</b> .....	54
<b>Lebenslauf</b> .....	70
<b>Komplette Publikationsliste</b> .....	71
<b>Danksagung</b> .....	72

## Abkürzungsverzeichnis

cfDNA	cell-free DNA / zellfreie DNA
gDNA	genomic DNA / genomische DNA
ddPCR	droplet digital PCR
FPR	false positive rate
MAF	mutant allele fraction
WES	whole-exome sequencing

## Kurzzusammenfassung

Mit der Analyse von *Liquid Biopsies* kann das Neuroblastom, die häufigste extrakranielle solide Malignität der frühen Kindheit, in seiner inter- und intratumoralen Heterogenität dargestellt werden. Besonders die Detektion von *MYCN*- und *ALK*-Amplifikationen sowie von *ALK*-Mutationen, sind für die Therapieentscheidung essenziell, da diese mit einem schlechten Outcome einhergehen und *ALK* außerdem ein therapeutisches Target darstellt. Aufgrund der geringen Volumina von Blutproben bei Kleinkindern und der generell geringen Konzentration an zellfreier DNA (cfDNA) im Blutplasma bedarf es hochsensitiver Analyseverfahren wie der *droplet digital PCR* (ddPCR). Durch Anpassung der Sonden- und Primerkonzentrationen für eine optimale Trennung der positiven und negativen Droplet-Fractionen im ddPCR-Ansatz konnten zwei neue Quadruplex-ddPCR-Protokolle etabliert werden. Das erste Protokoll detektiert die Kopienanzahl der Zielgene *MYCN* und *ALK* simultan mit den zwei Referenzgenen *NAGK* und *AFF3*, um so eine mögliche Veränderung der Kopienanzahl der Zielgene zu berechnen. Mit dem zweiten Protokoll werden die *Hotspot*-Mutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> (Exon 23, Position 3522, C>A) und *ALK*<sup>R1275Q</sup> (Exon 25, Position 3824, G>A) gemeinsam mit ihren Wildtypen *ALK*<sup>1174</sup> und *ALK*<sup>1275</sup> detektiert und deren *mutant allele fractions* (MAF) bestimmt. Beide Quadruplex-Protokolle messen dieselben Kopienanzahlen von *MYCN* und *ALK* beziehungsweise MAFs der beiden *ALK*-Mutationen in cfDNA von zehn verschiedenen Zelllinien wie bereits etablierte Duplex-Protokolle. Für die Analyse der Kopienanzahl und der MAFs wurden jeweils cfDNA und genomische DNA (gDNA) aus Plasma- und Tumorproben von insgesamt neun Patienten mit einem Neuroblastom mit den Quadruplex-Protokollen vermessen. Hierbei zeigt sich eine Übereinstimmung mit den Messungen im Duplex-Protokoll sowie eine Bestätigung der Ergebnisse durch Sequenzierung der Proben mittels *whole exome sequencing* (WES). Die neuen Quadruplex-ddPCR Protokolle reduzieren somit die benötigte Menge an limitiert verfügbaren Patientenproben auf ein Minimum und beschleunigen zudem die Analyse.

## Abstract

The analysis of liquid biopsies enables the presentation of the inter- and intratumoral heterogeneity of neuroblastoma, the most common extracranial solid malignancy in early childhood. Especially the detection of *MYCN* and *ALK* amplifications as well as *ALK* mutations, which are associated with a poor clinical outcome and *ALK*'s function as a therapeutic target, is essential for choosing the proper treatment. Due to small blood sample volumes in infants and the low concentration of cell-free DNA (cfDNA) in blood plasma in general, highly sensitive analytical methods as the droplet digital PCR (ddPCR) are necessary. By adjusting probe and primer concentrations for an optimal distinction between positive and negative droplet clusters in the ddPCR assay it was possible to establish two new quadruplex ddPCR assay protocols. The first protocol detects the copy numbers of the target genes *MYCN* and *ALK* simultaneously with the two reference genes *NAGK* and *AFF3* to calculate potential copy number variations in the target genes. The second protocol detects the hotspot mutations *ALK*<sup>F1174L</sup> (exon 23, position 3522, C>A) and *ALK*<sup>R1275Q</sup> (exon 25, position 3824, G>A) in combination with their wildtypes *ALK*<sup>1174</sup> and *ALK*<sup>1275</sup> and determines their mutant allele fractions (MAF). Both quadruplex ddPCR protocols measure the same *MYCN* and *ALK* copy numbers or rather the mutant allele fractions of the two *ALK* mutations in cfDNA from ten different cell lines as already established duplex ddPCR protocols. For the analysis of the copy numbers and MAFs, cfDNA and genomic DNA (gDNA) of plasma and tumor samples from nine patients with neuroblastoma were measured with the quadruplex protocols. The results showed an accordance with the measurements from the duplex ddPCR protocols and were confirmed by whole exome sequencing (WES) of each analysed sample. The new quadruplex ddPCR protocols reduce the required amount of limited available patient samples to a minimum and further accelerate the analysis.

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist die am häufigsten vorkommende solide Malignität, welche im ersten Lebensjahr diagnostiziert wird.<sup>1</sup> Es handelt sich um einen embryonalen Tumor, welcher sich aus fehdifferenzierten Neuralleistenzellen entwickelt und sich somit primär in der Nebenniere und/oder dem sympathischen Grenzstrang manifestiert.<sup>2</sup> 90 % der Neuroblastome entstehen bei Kindern vor dem 10. Lebensjahr, wobei das mittlere Erkrankungsalter zum Diagnosezeitpunkt 18 Monate beträgt.<sup>3</sup> Für das klinische Outcome ist das Alter zum Diagnosezeitpunkt prognostisch von Bedeutung, da Patienten mit einem Alter <18 Monaten eine deutlich bessere Überlebenswahrscheinlichkeit besitzen als ältere Patienten.<sup>3</sup> Generell ist die klinische Ausprägung des Neuroblastoms sehr variabel und reicht von spontaner Regression bzw. lokal begrenzter Erkrankung bis hin zur rapiden Progression mit Metastasierung und letalem Ausgang.<sup>4</sup> Die klinische Symptomatik und deren Ausprägung bei Patienten mit einem Neuroblastom ist abhängig von der Lokalisation und Größe des Primärtumors sowie der Lokalisation der Metastasen. In etwa 50 % der Fälle manifestiert sich der Primärtumor in der Nebenniere, wobei dies mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit einhergeht als bei anderen Lokalisationen.<sup>5</sup> Biologisch zeichnet sich das Neuroblastom vor allem durch seine räumliche inter- und intratumorale Heterogenität sowie temporale Heterogenität aus<sup>6</sup>, was die exakte Charakterisierung des Tumors mittels chirurgischer Biopsie erschwert. Die Diagnostik und das Staging erfolgt nach den Richtlinien des International Neuroblastoma Staging Systems (INSS).<sup>7</sup> Hierbei sind neben einer pathohistologischen Diagnostik einer Biopsie des Primärtumors und einer Knochenmarksstanze zur Detektion von Knochenmarkmetastasen auch die Bestimmung des *MYCN*-Status sowie Marker im Urin wie VMA und HVA und ein IMBG- oder MRT-Staging von entscheidender Bedeutung.<sup>8</sup> Anhand der Histologie, dem Alter zum Diagnosezeitpunkt und dem *MYCN*-Status bzw. der DNA-Ploidität lassen sich drei Risikogruppen unterscheiden – *Low risk*, *Intermediate risk* und *High risk* – wobei bei einer *MYCN*-Amplifikation unabhängig von den anderen Parametern in jedem Fall ein *high-risk* Neuroblastom vorliegt.<sup>4</sup> *High-risk* Patienten mit einer *MYCN*-Amplifikation, welche in etwa bei einem Viertel aller Neuroblastome vorliegt, zeigen im Vergleich zu *low-risk* Patienten ohne *MYCN*-Amplifikation ein deutlich erhöhtes Rezidiv-Risiko sowie eine rapidere Progression mit schlechterer Prognose.<sup>2, 4, 9</sup> Durch die *MYCN*-Amplifikation kommt es zu einer *MYCN*-Überexpression, welches zusammen mit MAX ein Heterodimer formt und als Transkriptionsfaktor viele Downstream-Signalwege hochreguliert.<sup>4</sup> Durch die Aktivierung der *MYCN*-Targets wie z.B. ODC, MCM7 und MRP1 kommt es zu einer Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus sowie

zur Suppression von Genen, welche die Zelldifferenzierung fördern.<sup>10-13</sup> Obwohl bisher nur die Bestimmung der *MYCN*-Kopienanzahl Teil der Standarddiagnostik ist, finden sich beim Neuroblastom viele weitere Risikogene. Eines dieser Gene ist die „anaplastische Lymphom-Kinase“ (*ALK*), welches auch bei anderen Tumoren onkogene Wirkung hat. Neben seiner Rolle als Prädispositionsgen für das familiäre Neuroblastom, wurden auch somatische Mutationen im *ALK*-Gen bei etwa 14 % der *high-risk* Neuroblastome nachgewiesen.<sup>14-16</sup> Durch benachbarte Lokalisation auf dem Chromosom 2p, können *ALK* und *MYCN* ko-amplifiziert vorliegen.<sup>2</sup> Über den PI3K-Signalweg, welcher *ALK*-vermittelt induziert wird, kommt es zu einer *MYCN* Stabilisierung und erhöhten *MYCN*-Leveln.<sup>2, 10</sup> Zudem aktiviert *ALK* über RAS den MAPK-Signalweg, welcher bei Neuroblastomen zum Rezidiv-Zeitpunkt vermehrt aktiviert wird.<sup>17-19</sup> Bis heute sind etwa 54 *ALK*-Mutationen im Neuroblastom beschrieben worden, welche mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind, wobei die beiden *Hotspot*-Mutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> und *ALK*<sup>R1275Q</sup> am häufigsten auftreten.<sup>14-16, 20-23</sup> Auch Amplifikationen oder Mutationen des *ALK*-Gens gehen mit einer schlechteren Prognose einher, wobei *ALK*-Mutationen mit 11 % häufiger in Neuroblastom-Tumoren gefunden wurden als *ALK*-Amplifikationen mit 5 %.<sup>20</sup> Neben den *MYCN*- und *ALK*-Gen-Aberrationen gibt es eine Reihe weiterer relevanter Genveränderungen wie den *LIN28B*-Polymorphismus<sup>24, 25</sup>, *Loss-of-function* im *ATRX*-Gen<sup>2</sup>, *TERT*-Rearrangements<sup>26, 27</sup>, *Loss-of 1p* und *11q bzw. 17q-gain*, welche ebenfalls mit einer *MYCN*-Amplifikation korrelieren<sup>28, 29</sup>, sowie viele weitere Veränderungen nicht nur auf genetischer, sondern auch immunologischer Ebene.<sup>2</sup> Die hier vorgelegte Arbeit fokussiert sich auf die Bestimmung von *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl-Veränderungen sowie der Detektion der beiden *ALK Hotspot*-Mutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> und *ALK*<sup>R1275Q</sup> in *Liquid Biopsies* und Tumorgewebe als wichtige Punkte in der Diagnostik.

## 1.2. Diagnostik des Neuroblastoms

Bei Verdacht auf ein Neuroblastom umfasst die Diagnostik neben einem großen Blutbild und Differentialblutbild zur Bestätigung der Diagnose eine Reihe von Tests wie die Abnahme von Laborparametern, einer Bildgebung des Primärtumors und umgebender Strukturen sowie die pathohistologische Begutachtung des Tumors.<sup>2</sup> Bei 90 % der Patienten mit einem Neuroblastom können erhöhte Spiegel von Katecholaminen bzw. Katecholamin-Metaboliten wie Dopamin, Homovanillin-Säure (HVA) und/oder Vanillinmandelsäure (VMA) gemessen werden, wobei die relativen Mengen dieser Metabolite vom Grad der zellulären Reifung der Tumor-Neuralleistenzellen abhängen und höhere Spiegel mit einem ungünstigeren Verlauf einhergehen.<sup>2, 30</sup> Neben Dopamin, HVA und VMA gehen auch erhöhte Spiegel der Neuronen-spezifischen Enolase (NSE) oder der

Laktat-Dehydrogenase (LDH) mit einem ungünstigeren Verlauf einher, wobei diese Marker nicht Neuroblastom-spezifisch sind.<sup>2</sup> In der Erstdiagnostik bzw. bei Verdacht auf ein Neuroblastom wird meist zunächst ein Ultraschall des Abdomens durchgeführt, jedoch ist für das weitere Assessment ein CT oder MRT des Primärtumors erforderlich, wobei meist das MRT aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung bei Kindern bevorzugt eingesetzt wird.<sup>2</sup> Darüber hinaus wird mit Hilfe eines Metaiodobenzylguanidin-Scans (MIBG-Scan) das Ausmaß möglicher Metastasen beurteilt, wobei bevorzugt Iod-123 (<sup>123</sup>I) gegenüber Iod-131 (<sup>131</sup>I) aufgrund einer besseren Bildqualität und geringerer Schilddrüsentoxizität als Iod-131 genutzt wird.<sup>31</sup> Die Sensitivität und Spezifität des MIBG-Scans beträgt etwa 90 % bzw. 99 % und ist bei etwa 90 % aller Neuroblastome anwendbar, da der größte Anteil der Neuroblastome wegen der Expression von Noradrenalin-Transportern MIBG-sensibel ist, welche das MIBG in die Tumorzellen aufnehmen.<sup>2, 32</sup> Bei den übrigen 10 % der Neuroblastome, welche das MIBG nicht aufnehmen, können andere Bildgebungen angewendet werden wie z.B. die Technetium-99-Knochenszintigraphie oder das 18Fluorodeoxyglucose(FDG)-PET-CT.<sup>33, 34</sup> Zur pathohistologischen Begutachtung wird eine Biopsie des Primärtumors entnommen und mittels Immunhistochemie nach der Klassifikation des Internationalen Neuroblastom Pathologie Committees (INPC) bezüglich der Anwesenheit stromaler Schwann-Zellen in vier Kategorien des Neuroblastoms eingeteilt: Neuroblastom, gemischtes Ganglio-Neuroblastom, Ganglioneurom und noduläres Ganglioneuroblastom. Darüber hinaus wird der Mitose-Index und die Karyorrhesis beurteilt.<sup>35-37</sup> Im Rahmen der pathologischen Diagnostik wird auch der *MYCN*-Status mittels Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) bestimmt, wobei eine Amplifikation mit einer schlechten Prognose einhergeht.<sup>38, 39</sup> Des Weiteren können zudem bilaterale Knochenmark-Aspirate aus dem Beckenkamm mittels Immunhistochemie beurteilt werden sowie optional weitere genomische Analysen wie z.B. die Beurteilung des *ALK*-Status durchgeführt werden.<sup>2</sup>

### **1.3. Chirurgische Biopsie vs. *Liquid Biopsy***

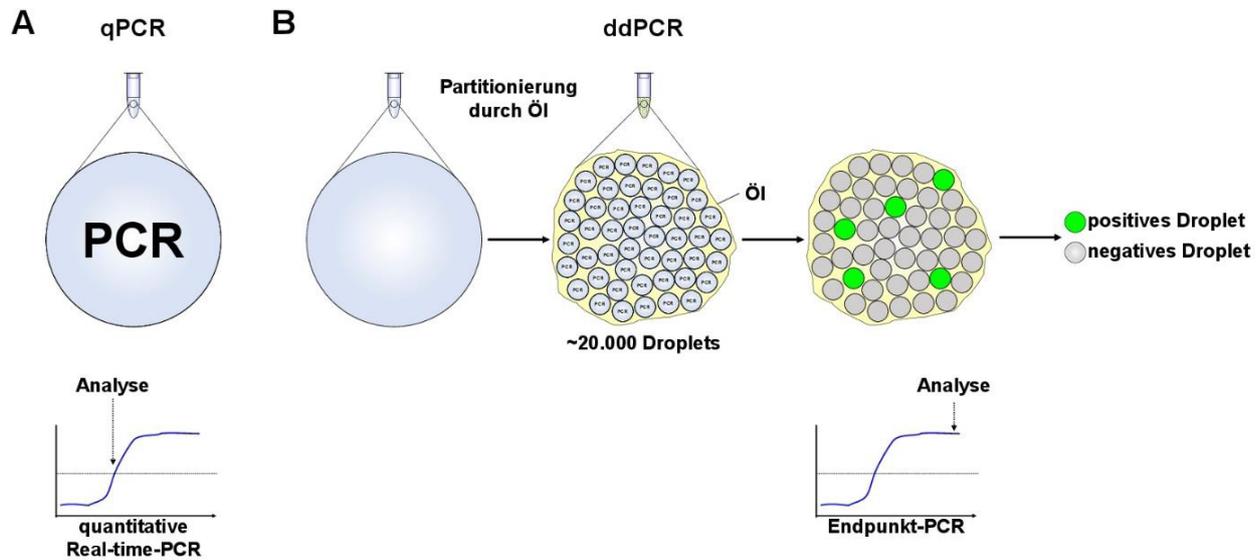
Durch die chirurgische Biopsie als Teil der Standarddiagnostik kann die Diagnose Neuroblastom mittels pathohistologischer Begutachtung eindeutig gesichert werden. Allerdings können gerade bei größeren Tumoren nicht an allen Stellen Stanzentnommen werden, sodass zwar meist die Diagnose Neuroblastom gestellt werden kann, jedoch bleibt die genaue genomische Charakterisierung unter Umständen aufgrund der biologischen inter- und intratumoralen Heterogenität aus.<sup>6</sup> Als Konsequenz daraus kann ein Tumor an einer biopsierten Stelle einen diploiden *MYCN*-Status aufweisen, während an einer anderen Stelle des Tumors oder in einer Metastase eine Amplifikation

vorliegt. Dadurch kann es zu einer Fehleinschätzung bezüglich der Risikogruppe und der daraus resultierenden gewählten Therapie kommen. Zudem ist jede OP und Narkose, gerade bei jungen Kindern mit reduziertem Allgemeinzustand, mit Risiken verbunden. Aufgrund der Kenntnis über die Limitationen chirurgischer Biopsien in der Diagnostik von Tumoren sind in den letzten Jahren die sog. *Liquid Biopsies* immer stärker in den Fokus der Diagnostik gerückt. Hierbei wird Körperflüssigkeit entnommen und diese auf diverse Tumorbestandteile wie z.B. zellfreie DNA (cfDNA), zellfreie RNA (cfRNA), zirkulierende Tumorzellen (CTCs) oder auch Exosomen analysiert.<sup>40</sup> In den meisten Fällen handelt es sich hierbei um die Diagnostik von Blutproben, welche peripher venös entnommen werden, aber auch andere Flüssigkeiten wie Liquor, Speichel, Urin und weitere transzelluläre Flüssigkeiten fallen unter den Begriff *Liquid Biopsies*.<sup>41-45</sup> Das Prinzip von *Liquid Biopsies* im Rahmen von Tumorerkrankungen basiert auf folgendem Modell: Durch die hohe Proliferation der Tumorzellen, steigt das Tumorwachstum und somit der zelluläre Turnover.<sup>46</sup> Auf diese Weise steigt die Anzahl an apoptotischen und nekrotischen Zellen, welche unter physiologischen Umständen durch Phagozytose eliminiert werden. Da dies aufgrund der massiven Anhäufung im Rahmen des hohen Turnovers nicht mehr gewährleistet werden kann, werden die Zellen und ihr Zellinhalt in die Blutbahn freigegeben.<sup>46-48</sup> Durch dieses Prinzip können bei Tumorpatienten oftmals bereits viel höhere Spiegel an normaler cfDNA im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen werden, wenn auch diese alleine keinen zuverlässigen Marker darstellen.<sup>49, 50</sup> In der Blutbahn zerfällt die cfDNA nach kürzester Zeit in viele einzelne Fragmente und degradiert, sodass diese nicht mehr als Strang, sondern in vielen kleinen Fragmenten vorliegt. Hierbei beträgt die durchschnittliche Länge der gemessenen cfDNA-Fragmente 180-200 Basenpaare.<sup>47, 51</sup> Der Anteil an zirkulierender Tumor-DNA (ctDNA) beträgt mit <1,0 % nur einen geringen Anteil an der gesamten cfDNA, während der übrige Anteil normale „Hintergrund“-cfDNA darstellt.<sup>51-53</sup> Dadurch wird die ohnehin schon geringe Konzentration an ctDNA noch stärker verdünnt, was sehr sensitive Analysemethoden wie z.B. die droplet digital PCR (ddPCR) erforderlich macht.<sup>54, 55</sup> Auf diese Weise lässt sich mithilfe von *Liquid Biopsies* der Krankheits- sowie Therapieverlauf einer Tumorerkrankung im Vergleich zur chirurgischen Biopsie nahezu komplikationslos monitoren.

#### **1.4. Droplet digital PCR (ddPCR) und Multiplex ddPCR**

Die *droplet digital PCR* (ddPCR) ist eine geeignete Methode zur Detektion von Genveränderungen bei geringen Ausgangskonzentration von cfDNA. Im Vergleich zur herkömmlichen PCR-Reaktion wird der gesamte PCR-Ansatz durch Zugabe eines Öls in bis zu 20.000 gleich große

Wassertröpfchen aufgeteilt, sodass die PCR-Reaktion mit Primer, Sonde, Puffer und Targets in jedem Tröpfchen separat abläuft und im Anschluss analysiert wird (s. Abb. 1).<sup>54</sup>



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der quantitativen real-time PCR und droplet digital PCR.** **A:** Die Signalerkennung bei der quantitativen real-time PCR (qPCR) erfolgt in einer einzelnen Reaktion, die in Echtzeit gemessen und in der exponentiellen Phase der Reaktion analysiert wird. **B:** Die Reaktionsbestandteile bei der droplet digital PCR (ddPCR) werden in ~20.000 Droplets vor dem Start der PCR-Reaktion partitioniert und jedes Droplet individuell am Ende der Plateauphase der Reaktion analysiert. Die Droplets werden anhand der Intensität ihres Fluoreszenzsignals als negativ oder positiv gewertet (modifiziert nach Lodrini et al, Using Droplet Digital PCR to Analyze *MYCN* and *ALK* Copy Number in Plasma From Patients With Neuroblastoma, Oncotarget 2017)<sup>59</sup>

Die Messung der PCR-Reaktion erfolgt in zwei getrennten Kanälen (Kanal 1 und Kanal 2), wobei in jedem Kanal ein anderer Farbstoff detektiert wird. In Kanal 1 wird die Fluoreszenz FAM und in Kanal 2 die Fluoreszenz HEX detektiert. Die beiden Fluoreszenzfarbstoffe sind mit einem Quencher, welcher das Fluoreszenzsignal unterdrückt, an ihre zugehörige Sonde gebunden. Bindet nun eine der Sonden innerhalb eines Tröpfchens an ihre vorhandene Zielsequenz auf dem DNA-Fragment, wird diese abgelesen und somit amplifiziert.<sup>54</sup> Hierbei wird durch die Polymerase der Fluoreszenzfarbstoff von der Sonde gelöst, wodurch dieser nicht mehr im Kontakt mit dem Quencher ist und nun in dem Tröpfchen fluoresziert, sodass dieses Tröpfchen bei der anschließenden Analyse als positiv gewertet wird. Liegt die Zielsequenz bzw. das entsprechende DNA-Fragment nicht in dem Tröpfchen vor bzw. weist das Tröpfchen gar keinen Inhalt auf, kommt es nicht zu einem Fluoreszenzsignal und das Tröpfchen wird als negativ gewertet. Durch die Partitionierung in viele kleine Tröpfchen wird die Sensitivität der ddPCR u.a. durch ein erhöhtes Signal-Rausch-Verhältnis deutlich erhöht und gilt momentan als die sensitivste aller PCR-Methoden.<sup>46, 56</sup> Aufgrund der geringen Konzentration an cfDNA im Blut lässt sich diese mit der häufig angewandten qPCR meist weniger adäquat oder überhaupt nicht analysieren.<sup>55</sup> Diese Methodik wurde bereits vielfach

bei anderen Tumoren wie dem kolorektalen Karzinom angewandt.<sup>57, 58</sup> Beim Neuroblastom existieren bislang Protokolle zur Detektion und Berechnung von Veränderungen der Kopienanzahlen von *MYCN* und *ALK*<sup>59</sup> sowie Protokolle zur Detektion der *ALK*-Hotspot-Mutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> und *ALK*<sup>R1275Q</sup>.<sup>60</sup> Bei den Protokollen zur Analyse der Kopienanzahlen werden jeweils das Target-Gen, also *MYCN* oder *ALK*, in Kanal 1 und das Referenz-Gen, welches *NAGK* ist, in Kanal 2 vermessen.<sup>59</sup> Dasselbe gilt für die Detektion der Hotspot-Mutationen: Die Mutation *ALK*<sup>F1174L</sup> oder *ALK*<sup>R1275Q</sup> wird in Kanal 1 und ihr zugehöriger Wildtyp *ALK*<sup>1174</sup> bzw. *ALK*<sup>1275</sup> in Kanal 2 detektiert.<sup>60</sup> Da bei diesen Protokollen zwei Gene detektiert werden, je ein Gen pro Kanal, wird auch von Duplex-ddPCR-Reaktionen gesprochen. Bei der Detektion von drei oder mehr Genabschnitten in einer ddPCR-Reaktion spricht man auch von Multiplex-ddPCR. Diese Methodik konnte bereits anhand von Tumorgewebe anderer Tumoren erfolgreich angewandt werden.<sup>61-64</sup> Im Rahmen dieser Arbeit haben wir für das Neuroblastom zwei Multiplex-ddPCR-Protokolle etabliert - eines zur Bestimmung der Kopienanzahl von *MYCN* und *ALK* sowie eines zur Detektion der *ALK*-Hotspot-Mutationen - da sich hierdurch wertvolle Patientenproben und Labormaterial sparen lassen und die Diagnostik beschleunigt wird. Zur Analyse der Kopienanzahlen wurde hierfür zunächst neben *NAGK* als zweites Referenzgen *AFF3* eingeführt.<sup>38</sup> Auf diese Weise wurden vier Gene, *MYCN* und *ALK* als Target-Gene und *NAGK* sowie *AFF3* als Referenzgene, in einer gemeinsamen ddPCR Reaktion nachgewiesen. Darüber hinaus haben wir auch ein Quadruplex-Protokoll für Detektion der *ALK*-Hotspot-Mutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> und *ALK*<sup>R1275Q</sup> sowie der beiden zugehörigen Wildtypmoleküle *ALK*<sup>1174</sup> und *ALK*<sup>1275</sup> etabliert. Im Vergleich zu den bisher publizierten ddPCR-Protokollen bei der Neuroblastom-Diagnostik konnten wir diese separaten Duplex-ddPCR-Protokolle in einer gemeinsamen Quadruplex Reaktion etablieren.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Patientenproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Blutplasma- und Tumorproben stammen von Patienten, die an der Charité – Universitätsmedizin Berlin behandelt wurden, sowie von der Deutschen Neuroblastom Biobank in Köln. Alle Patienten waren in der German NB2004 Studie oder dem NB2016 Register geführt. Die schriftliche Zustimmung der Eltern zur Studienteilnahme lag jeweils vor. Die Tumorbiopsie erfolgte jeweils vor dem Beginn der Therapie. Die Blutentnahme erfolgte durch das Krankenhauspersonal peripher venös. Das Blut wurde anschließend bei 1900 x g für 7 min an der Charité bzw. bei 1000 x g für 10 min in der Biobank in Köln zur Auftrennung

des Plasmas zentrifugiert. Zur Entfernung möglicher Zelldebris wurde das Plasma erneut bei 3250 x g für 10 min zentrifugiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

## 2.2. Zellkultur

Die nachfolgenden Schritte in der Zellkultur wurden freundlicherweise von Jasmin Wünschel und Daniela Tiburtius vor Beginn dieser Arbeit bereits durchgeführt. Für die Versuche zur Bestimmung des Kopienanzahl-Status und der Mutations-Detektion wurden folgende Neuroblastom-Zelllinien (mit Angabe der Herkunft) verwendet: BE(2)-C (ECACC Salisbury, UK), Kelly, SH-SY5Y (DSMZ Braunschweig), CLB-GA (hergestellt am Centre Léon Bérard, Lyon, Frankreich), IMR-5, LAN-5 und LAN-6 (J. Schulte, Charité Berlin), NB-1 (I. Oehme, DKZF, Heidelberg), SH-EP und SK-N-AS (L. Savelyeva, DKFZ, Heidelberg). Alle Zelllinien wurden durch *High-throughput* SNP-basierte Assays authentifiziert.<sup>65</sup> Die genomischen Charakteristika der jeweiligen Zelllinie sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% für BE(2)-C, CLB-GA, SH-SY5Y, SK-N-AS und LAN-6 in DMEM (Lonza, Köln) bzw. für IMR-5, Kelly, LAN-5, NB-1, SH-EP in RPMI-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) oder 20% FCS (LAN-6) und 1% nicht-essentiellen Aminosäuren. Zur Risikominimierung einer Langzeit-induzierten Genomveränderung und dem Erhalt niedriger Passage-Anzahlen wurde eine kontinuierliche Kultivierung vermieden.<sup>66</sup> Die Zellen für die Experimente wurden in Kurzzeitkultur aus in Flüssigstickstoff gehaltenen Aliquots mit niedriger Passage gezüchtet. Mittels *High-throughput Multiplex* Tests wurden die Zelllinien regelmäßig auf Infektionen mit *Achelo-plasma laidlawii*, Mykoplasma-Spezies und das „Squirrel Monkey Retrovirus (SMRV)“ getestet.<sup>66, 67</sup>

**Tabelle 1. Überblick über die genomischen Charakteristika der verwendeten Zelllinien.** (modifiziert nach Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Zelllinie	MYCN-Kopienanzahl		ALK-Kopienanzahl		Chromosome 2p gain		ALK-Mutationen	
BE(2)-C	100-240	68, 69	2	70	partial	71	wildtype	23
Kelly	200-480	68, 69, 72	2	14, 70	partial	20	F1174L (c.3522C>A)	14, 23
NB-1	2-20	21, 73	30-40	21, 74, 75	no	71	wildtype	21
LAN-5	100-300	72, 76	2	75, 77	no	71, 78	R1275Q (c.3824, G>A)	21
IMR-5	amplified	79	Amplified	14	n.a.		wildtype	23
SH-SY5Y	2-3	80-82	2-3	75, 82	partial	20, 83	F1174L (c.3522C>A)	23
LAN-6	3	84	2	75	partial	84	D1091N (c.3271G>A)	23
CLB-GA	2	85	2	15, 75	partial	71, 86	R1275Q (c.3824, G>A)	15
SH-EP	2	68	2	75	no	71, 87	F1174L (c.3522C>A)	75
SK-N-AS	2	68	2	14, 75, 77	no	71, 83	wildtype	14, 23

n.a. = nicht analysiert

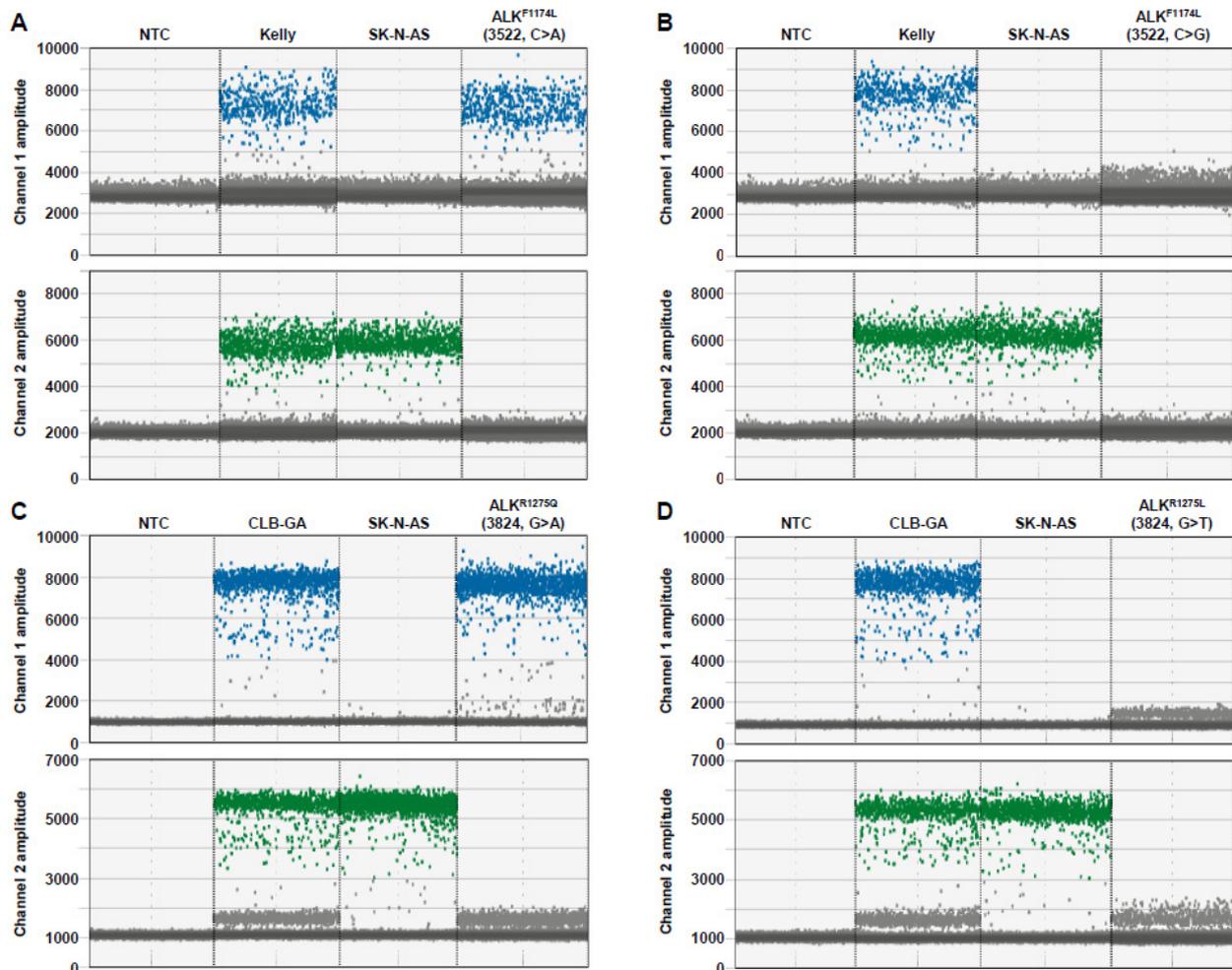
### 2.3. Genomische und zellfreie DNA-Präparation

Die in diesem Abschnitt aufgeführten Schritte erfolgten in Zusammenarbeit mit Daniela Tiburtius. Zur Extraktion der genomischen DNA (gDNA) aus dem Tumorgewebe und den Zelllinien wurde das Qiagen Puregene Core Kit A (Qiagen) oder der QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die gDNA der Zelllinien und Tumorproben musste im Gegensatz zur cfDNA vor der ddPCR fragmentiert werden, was bei der gDNA der Zelllinien mittels Beschallung erfolgte. Die Beschallung der gDNA aus den Tumorproben war aufgrund kleiner Probenvolumina (20 µl) nicht möglich, weshalb die Fragmentierung durch Zugabe von 5 Einheiten des HindIII Restriktionsenzym (New England Biolabs, Frankfurt/Main) zu jeder ddPCR Reaktion erreicht wurde.<sup>66</sup> Das bei -80 °C gelagerte Plasma mit einem Volumen von mindestens 200 µl wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und für 5 min bei 2000 x g und anschließend für 5 min bei 20.000 x g zentrifugiert, um Zelltrümmer und Überstände zu entfernen. Mit Hilfe des QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) wurde die cfDNA aus dem Plasma aufgereinigt und anschließend auf 50 µl mit dem DNA Clean and

Concentrator-5 Kit (Zymo Research, Freiburg) konzentriert.<sup>66</sup> Die extrahierte gDNA und cfDNA wurde mit dem Qubit 2.0 Fluorometer (Life Technologies, Darmstadt) quantifiziert.<sup>66</sup>

## 2.4. Droplet digital PCR

Zur Analyse der Kopienanzahl von *MYCN* (2p24.3), *ALK* (2p23.2-2p23.1), *NAGK* (2p13.3) und *AFF3* (2q11.2) sowie zur Detektion der *ALK*<sup>F1174L</sup> (Exon 23, Position 3522, C>A) und *ALK*<sup>R1275Q</sup> (Exon 25, Position 3824, G>A) Hotspot-Mutationen und deren zugehöriger Wildtyp-Sequenz wurde das QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland) verwendet.<sup>66</sup> Die Primer und Sonden wurden mit der Primer3 Software (Version 0.4.0) erstellt.<sup>88</sup> Damit die Sonden spezifisch die Punktmutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> (3522, C>A) und *ALK*<sup>R1275Q</sup> (3824, G>A) und keine andere Punktmutation an derselben Stelle im Exon detektieren, wurden zur Überprüfung der Spezifität der beiden Sonden vier doppelsträngige synthetische *ALK*-Templates mit folgenden Punktmutationen generiert (Metabion, Planegg, Deutschland): *ALK*<sup>F1174L</sup> (3522, C>A, TTC>TTA); *ALK*<sup>F1174L</sup> (3522, C>G, TTC>TTG); *ALK*<sup>R1275Q</sup> (3824, G>A, CGA>CAA); und *ALK*<sup>R1275L</sup> (3824, G>T, CGA>CTA). Die Sonde, welche für die Erkennung der *ALK*<sup>F1174L</sup> (3522, C>A) Mutation generiert wurde, erkannte verlässlich nur diese Mutation und nicht die *ALK*<sup>F1174L</sup> (3522, C>G).<sup>66</sup> Ebenso erkannte die Sonde zur Detektion der Mutation *ALK*<sup>R1275Q</sup> (3824, G>A) nur diese und nicht die *ALK*<sup>R1275L</sup> (3824, G>T) Mutation (siehe Abb. 2).



**Abbildung 2: Spezifitätskontrolle der Sonden zur Detektion der  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{R1275Q}$  Hotspot Mutationen.** A-D: Die Spezifität wurde getestet durch die Generierung von vier synthetischen doppelsträngigen  $ALK$ -Templates mit den Mutationen  $ALK^{F1174L}$  (3522, C>A) (A),  $ALK^{F1174L}$  (3522, C>G) (B),  $ALK^{R1275Q}$  (3824, G>A) (C), und  $ALK^{R1275Q}$  (3824, G>T) (D). Die Zelllinie Kelly diente als Positivkontrolle für die  $ALK^{F1174L}$  (3522, C>A) Mutation und die CLB-GA Zelllinie als Positivkontrolle für die  $ALK^{R1275Q}$  (3824, G>A) Mutation. Die Zelllinie SK-N-AS mit einem  $ALK$ -Wildtyp-Status wurde in allen Ansätzen als Negativkontrolle verwendet. Die genomische DNA wurde aus den Zelllinien extrahiert und mittels Ultraschall fragmentiert und anschließend eine Inputmenge von jeweils 10 ng in der ddPCR analysiert. Blaue Punkte (Kanal 1) und grüne Punkte (Kanal 2) zeigen die positiven Droplets, die grauen Punkte die negativen Droplets. NTC (no template control). (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Dieser Versuch bestätigt somit die Spezifität der ausgewählten Sonden. Die ddPCR Reaktion erfolgte nach dem TaqMan Prinzip. In einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l pro Reaktion befanden sich der 2x ddPCR Supermix for Probes (no dUTP) (Bio-Rad Laboratories) sowie die optimierten Primer- und Sondenkonzentrationen (s. Tabelle 2 für Kopienanzahl-Analyse; s. Tabelle 3 für  $ALK$ -Hotspot-Mutationen).<sup>66</sup> Für die Triplex- und Quadruplex-ddPCR-Protokolle wurden - wie in Tabelle 2 und 3 dargestellt - die Fluoreszenzfarbstoffe sowie Quencher an den jeweiligen Sonden entsprechend der ddPCR angepasst.<sup>66</sup> Nach dem Pipettieren des Reaktionsmix wurde dieser zum Transfer in den Droplet Generator gemeinsam mit 70  $\mu$ l Droplet Generation Oil (Bio-Rad) auf die Droplet-Generator Cartridges (Bio-Rad) aufgetragen.

**Tabelle 2. Sequenzen und Konzentrationen von Primern und Sonden für die Multiplex-ddPCR-Protokolle zur Bestimmung der MYCN- und ALK-Kopienanzahl. (modifiziert nach Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>**

Primer/Sonde	Sequenz	Konzentration [nmol/L]		
		Duplex ddPCR	Triplex ddPCR	Quadruplex ddPCR
<i>AFF3</i> -for	5'-CACCTAGCATGTGTGGCATT-3'	900	900	900
<i>AFF3</i> -rev	5'-GCAGATCCAGGTCGTTGAAG-3'	900	900	900
<i>AFF3</i> -Sonde	5'-HEX-AACAACCTCTTCTGTCCCCCT-BHQ1-3'	250	125	125
<i>ALK</i> -for	5'-CTTGTCCTCTGACTCTTCTCG-3'	900	900	300
<i>ALK</i> -rev	5'-CAAGACTCCACGAATGAGC-3'	900	900	300
<i>ALK</i> -Sonde	5'-FAM-TCACAGCTCCGAATGTCCTG-BHQ1-3'	250	250	360
<i>MYCN</i> -for*	5'-GTGCTCTCCAATTCTCGCCT-3'	900	900	450
<i>MYCN</i> -rev*	5'-GATGGCCTAGAGGAGGGCT-3'	900	900	450
<i>MYCN</i> -Sonde*	5'-FAM-CACTAAAGTTCCTTCCACCCTCTCCT-BHQ1-3'	250	250	125
<i>NAGK</i> -for*	5'-TGGGCAGACACATCGTAGCA-3'	900	900	900
<i>NAGK</i> -rev*	5'-CACCTTCACTCCACCTCAAC-3'	900	900	900
<i>NAGK</i> -Sonde*	5'-HEX-TGTTGCCCGAGATTGACCCGGT-BHQ1-3'	250	350	350

\* Adaptiert von Gotoh et al., 2005.<sup>89</sup>

Die monomorphen Tröpfchen wurden anschließend im QX200 Droplet Generator (Bio-Rad) erzeugt und danach manuell mit einer 8-Kanal-Pipette auf eine 96-Well PCR Platte (Eppendorf, Hamburg) übertragen. Vor dem Start der PCR-Reaktion wurde die 96-Well Platte mit dem PX1 Plate Sealer (Bio-Rad) heißversiegelt. Die anschließende PCR Reaktion im T100 Thermo Cycler (Bio-Rad) wurde mit folgenden zwei Programmen durchgeführt für (1) Bestimmung der Kopienanzahl: Denaturierung bei 95°C für 10min, 40 Zyklen von 30sek bei 94°C und 1min bei 58°C und finale Denaturierung für 10min bei 98°C und für (2) die Detektion der *ALK*-Hotspot-Mutationen: Denaturierung bei 95°C für 10min, 40 Zyklen von 30sek bei 94°C und 1min bei 62,5°C und finaler Denaturierung für 10min bei 98°C.<sup>66</sup>

**Tabelle 3. Sequenzen und Konzentrationen von Primern und Sonden für die Multiplex-ddPCR-Protokolle zur Detektion der Neuroblastom-spezifischen  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{R1275Q}$  Hotspot-Mutationen.** (modifiziert nach Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Primer/Sonde	Sequenz*	Konzentration [nmol/L]	
		Duplex ddPCR	Quadruplex ddPCR
$ALK^{1174}$ -for	5'-GCCCAGACTCAGCTCAGT-3'	900	900
$ALK^{1174}$ -rev	5'-CCCCAATGCAGCGAACAAT-3'	900	900
$ALK^{F1174L}$ Sonde, FAM	5'-FAM-TCTCTGCTCTGCAGCAAATTAACC-BHQ1-3'	250	350
$ALK^{1174}$ Sonde, FAM	5'-FAM-TCTCTGCTCTGCAGCAAATTCAACC-BHQ1-3'	-	50
$ALK^{1174}$ Sonde, HEX	5'-HEX-TCTCTGCTCTGCAGCAAATTCAACC-BHQ1-3'	250	-
$ALK^{1275}$ -for	5'-GTCCAGGCCCTGGAAGAG-3'	900	600
$ALK^{1275}$ -rev	5'-GGGGTGAGGCAGTCTTTACTC-3'	900	600
$ALK^{R1275Q}$ Sonde, FAM	5'-FAM-TTCGGGATGGCCCAAGACAT-BHQ1-3'	250	-
$ALK^{R1275Q}$ Sonde, HEX	5'-HEX-TTCGGGATGGCCCAAGACAT-BHQ1-3'	-	400
$ALK^{1275}$ Sonde, HEX	5'-HEX-TTCGGGATGGCCCGAGACAT-BHQ1-3'	250	150

\* Adaptiert von Combaret et al., 2015.<sup>60</sup>

Nach Abschluss der PCR-Zyklen wurde die PCR-Platte im QX200 ddPCR Droplet Reader (Bio-Rad) analysiert und die Endpunkte der Droplet-Reaktionen bestimmt. Die exakte Kopienanzahl der einzelnen Target- und Referenzgene sowie die *mutant allele fractions* (MAFs) der beiden  $ALK$ -Hotspot-Mutationen und weitere Analysen wurden mit der QuantaSoft Analysis-Software (Version 1.7.4.0917) und der QuantaSoft Analysis Pro Software (Version 1.0.596) (Bio-Rad) bestimmt.<sup>66</sup> Damit mittels Software spezifische Grenzen zur exakten Zuordnung der einzelnen Droplet-Fractionen festgelegt werden konnten, wurde in jedem ddPCR-Experiment eine Non-Template, Positiv- und Negativkontrolle durchgeführt. Die QuantaSoft Analysis-Software, welche für die Duplex-ddPCR-Ansätze verwendet wurde, determiniert die Kopienanzahl durch die Berechnung des Quotienten der Target-Gen-Konzentration A (Kopien/ $\mu$ l) zur Referenz-Gen-

Konzentration B (Kopien/ $\mu$ l) multipliziert mit der Anzahl an Referenzkopien,  $N_B$ , im menschlichen Genom ( $copy\ number = \frac{A}{B} \times N_B$ ).<sup>66</sup> Die Kopienanzahl im Triplex- und Quadruplex-Protokoll wurde mit der QuantaSoft Analysis Pro Software ermittelt, da sich die QuantaSoft Analysis-Software nicht für Multiplex-Analysen eignet. QuantaSoft Analysis Pro bestimmt die Kopienanzahl mittels des Quotienten aus der Target-Gen-Konzentration A (Kopien/ $\mu$ l) und des geometrischen Mittelwertes der Referenz-Gen-Konzentrationen B und C (Kopien/ $\mu$ l) ( $copy\ number = \frac{A}{\text{geomean}(B,C)} \times N_B$ ). Zur Beurteilung des Amplifikationsstatus von *MYCN* und *ALK* wurden folgende Detektionsgrenzen festgelegt: >8,01 Kopien entspricht einer Amplifikation, 2,74 bis 8,00 Kopien entsprechen einem Gain und ein diploider Status entspricht einer Kopienanzahl von 1,50 bis 2,73 Kopien.<sup>59</sup> Mittels Nachschlagetabellen von Bio-Rad nach dem Modell von Armbruster und Pry<sup>90</sup> wurde die Rate an falsch positiven Droplets (FPR) und das Detektionslimit (Limit of Detection, LOD) für die Analyse der MAFs der *ALK*-Hotspot-Mutationen berechnet.<sup>66</sup> Die Berechnung der FPR basiert auf zwei Parametern: Der Anzahl an falsch positiven Droplets und die minimal erforderliche Konzentration von mutierten Target-Molekülen (Kopien/ $\mu$ l) für jedes Punktmutations-Protokoll wurde definiert durch die Analyse genomischer DNA (gDNA) aus Zelllinien mit der Wildtyp-Sequenz für die entsprechende Mutation.<sup>66</sup> Eine Probe wurde als positiv gewertet, wenn sowohl die Anzahl an Droplets zur Detektion der Mutation als auch die Konzentration an mutierten Target-Molekülen (Kopien/ $\mu$ l) über dem gesetzten Grenzwert nach Angaben der Nachschlage-Tabellen lagen.<sup>66</sup> Durch Vermessen einer 1:10- bis 1:100.000-Verdünnung von gDNA aus Zelllinien mit vorhandener Mutation (SH-EP oder CLB-GA) oder Wildtyp-Sequenz (SK-N-AS) wurde das LOD für jedes Protokoll festgelegt. Die Grenzwerte für Duplex- und Quadruplex-Analysen wurden für Input-DNA-Mengen von 0,5, 2, 10, 20, 80 und 130 ng separat berechnet.

## 2.5. Whole-Exome Sequenzierung (WES)

Die Sequenzierung der Proben wurde in der *Core Facility* des DKFZ (Heidelberg) durchgeführt; die Analyse erfolgte durch Clemens Messerschmidt (Humboldt Universität, Berlin). Die WES-Daten wurden im European Genome-Phenome Archive hinterlegt (Zugangsnummer EGAS00001004275; <https://www.ebi.ac.uk/ega/studies>). Die Vorbereitung der WES Libraries erfolgte mit dem Agilent SureSelect XT v6. Das WES erfolgte nach Poolen von 4-5 Libraries im Anschluss mit dem Illumina HiSeq 4000 Flowcell (Version 2.5) mit einem Median von 84 Millionen Fragmenten pro Probe.<sup>66</sup> Die Standard-Qualitätskontrolle wurde mit FastQC durchgeführt.<sup>66</sup>

<sup>91</sup> Die Reads wurden auf das GRCh37-Referenzgenom mittels BWA-MEM v0.7.15 ausgerichtet.<sup>66,</sup>

<sup>92</sup> Es wurden separate Read-Gruppen für alle Reads von einer Spur zugewiesen und Duplikate mittels Samblaster v0.1.24 maskiert.<sup>66, 93</sup> Die *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl wurde mittels CNVkit für jede WES Library ohne eine Normalkontrolle, wie im Manual beschrieben, geschätzt.<sup>66,94</sup> Die Berechnung der digitalen Kopienanzahl der Tumorproben erfolgte mit folgender Gleichung:  $DCN = (2 * 2^{\log_2 FC} - 2 + 2 * p) / p$ .<sup>66</sup> Der log2fold-change eines Gens wurde mit Copywriter auf eine diploide Baseline geschätzt; p stellt den Tumorzellinhalt dar. Der Tumorzellanteil in jeder Tumorprobe betrug mindestens 70%. Die Kopienanzahl der cfDNA-Proben wurden durch Festlegen des Tumorzellinhaltes auf 1 berechnet.

## 2.6. Statistische Analyse

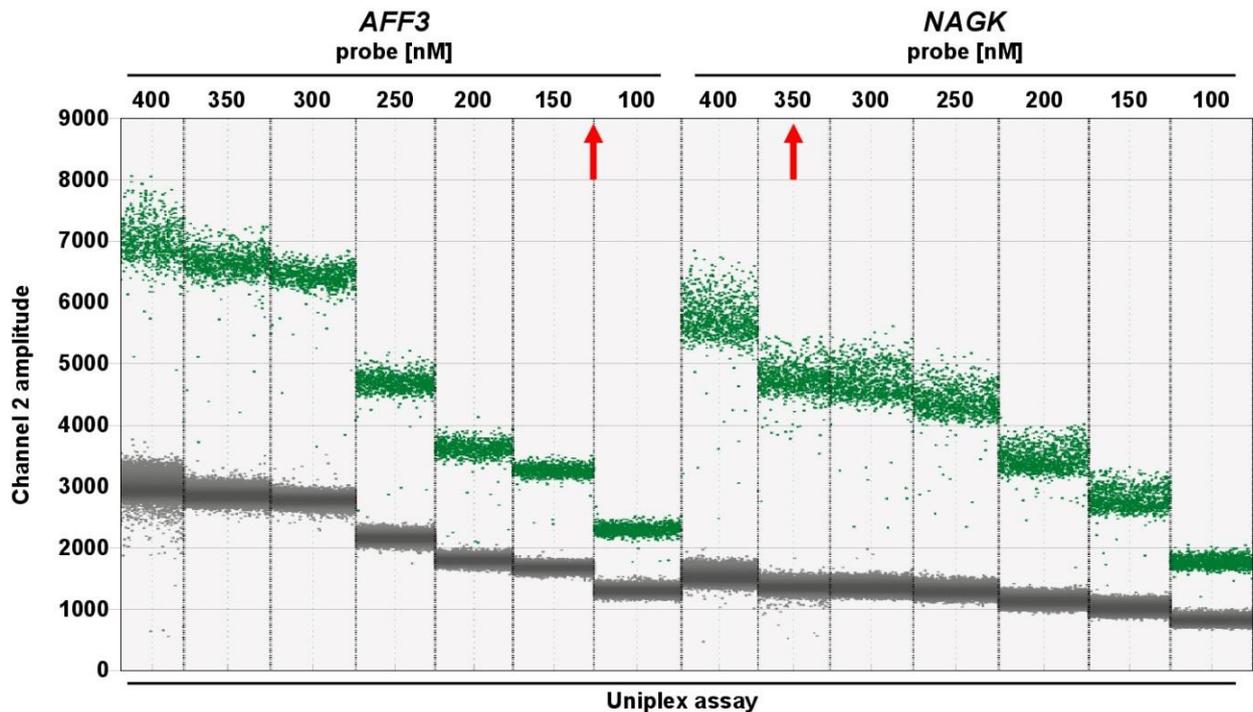
Die Zelllinien wurden mit jedem Protokoll jeweils in Triplikaten vermessen und der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt. Die Korrelationsanalysen im Rahmen der Kopienanzahlen und Mutationsdetektionen wurden mittels GraphPad Prism, Version 6.00 (GraphPad Software, San Diego, Ca, USA) durchgeführt. Hierbei wurden P-Werte unter 0.05 als statistisch signifikant betrachtet.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Etablierung eines Quadruplex-ddPCR-Protokolls zur Analyse von Kopienanzahl-Veränderungen (CNV) im *MYCN*- und *ALK*-Gen

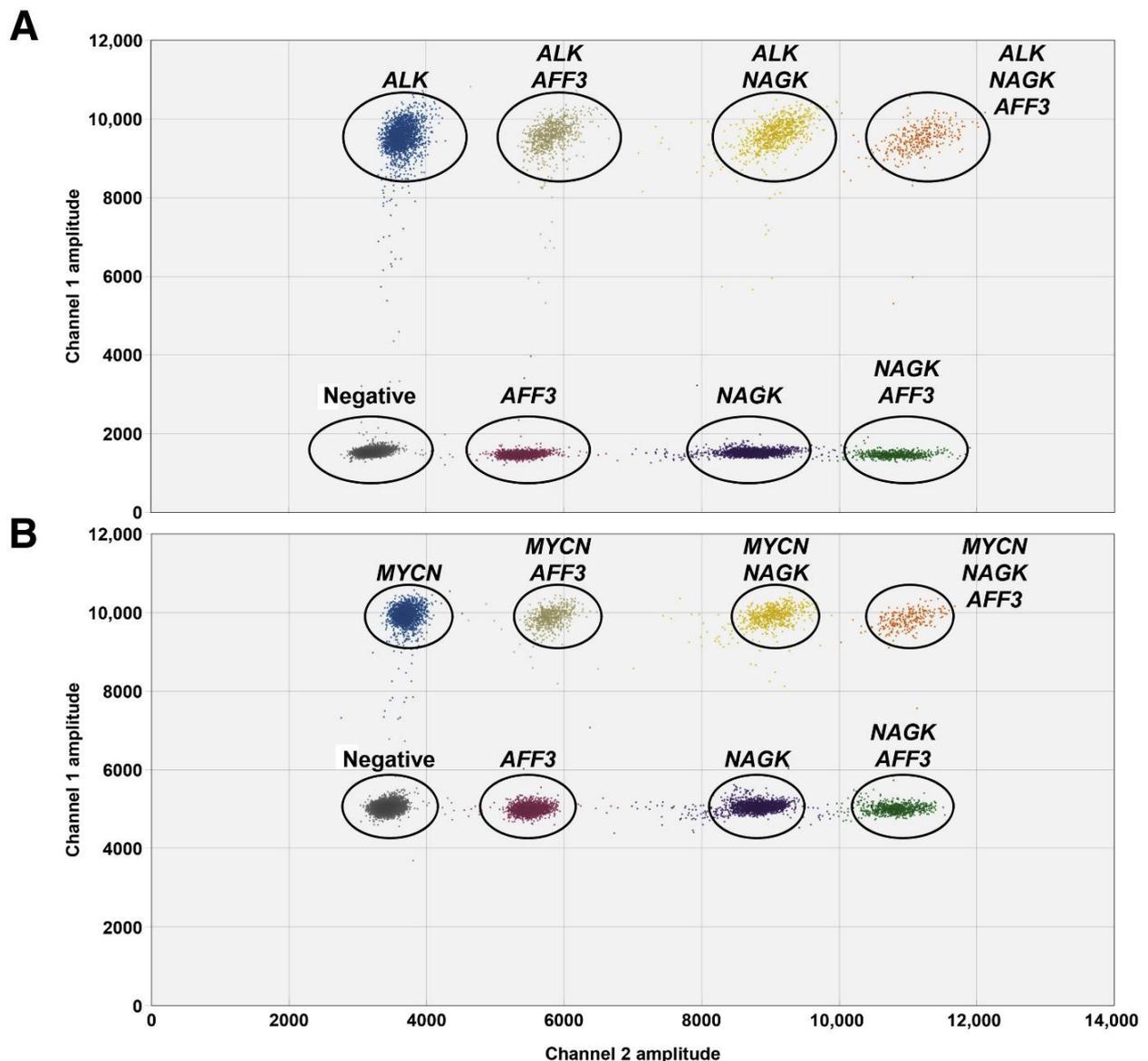
Zur Entwicklung eines Quadruplex-ddPCR-Protokolls zur Bestimmung der *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl dienten als Grundlage etablierte Duplex-ddPCR-Protokolle.<sup>59, 89</sup> In den Duplex-Protokollen wird pro Kanal ein Gen vermessen mit *MYCN* bzw. *ALK* in Kanal 1 (FAM) und *NAGK* als Referenz in Kanal 2 (HEX), sodass eine klare Trennung von negativen, einfach-positiven und doppelt-positiven Droplet-Fraktionen vorliegt. Bei einem geeigneten Quadruplex-Protokoll ist darauf zu achten, dass sich die einfach-positiven Droplet-Fraktionen von *MYCN* und *ALK* in ihrer Amplitude klar unterscheiden, während die negativen Droplet-Fraktionen von beiden Targets dieselbe Amplitude aufweisen. Zur Erhöhung der Robustheit und Messqualität des Quadruplex-Protokolls wurde in Kanal 2 (HEX) neben *NAGK* ein zweites Referenzgen, *AFF3*, hinzugefügt. Mithilfe eines zweiten Referenzgens lassen sich mögliche Abweichungen in einer der beiden Referenzen und somit Messverfälschungen erkennen, da sich die Kopienanzahl eines Target-Gens

aus dem Quotienten der Target-Gen-Konzentration zur Referenz-Gen-Konzentration ergibt. Aus diesem Grund wurde zunächst *AFF3* als zweite Referenz in Triplex-Protokollen etabliert, um mögliche Interaktionen zwischen den verschiedenen Primern und Sonden frühzeitig zu erkennen und bei der weiteren Etablierung des Quadruplex-Protokolls berücksichtigen zu können. Bei Triplex-Protokollen werden drei Gene gleichzeitig detektiert bzw. analysiert, wobei die etablierten Protokolle folgendermaßen aufgebaut waren: *ALK* bzw. *MYCN* als Target-Gen in Kanal 1 (FAM) und *NAGK* und *AFF3* als die beiden Referenzgene in Kanal 2 (HEX). In einem ersten Schritt wurden zunächst *NAGK* und *AFF3* bei verschiedenen Sonden-Konzentrationen jeweils mit einem Uniplex-Protokoll getestet, d.h. jedes Gen wurde einzeln in seinem zugehörigen Kanal ohne ein zweites Gen im „benachbarten“ Kanal getestet. Auf diese Weise lassen sich mögliche Störfaktoren durch Primer und Sonden zur Untersuchung der anderen Gene zunächst vermeiden, sodass die genaue Lokalisation der Droplet-Fraktionen im 1D-Plot ersichtlich ist. Anhand publizierter ddPCR-Protokolle wurden Sondenkonzentrationen von 100-400 nmol/L zur Testung für ein mögliches Multiplex-Protokoll gewählt.<sup>61, 63, 64</sup> Hierbei lag auch die Standard-Sondenkonzentration von 250 nmol/L zum Vergleich vor. Die Primerkonzentration in diesem Versuch entsprach 900 nmol/L gemäß dem Standardprotokoll.<sup>59</sup> Getestet wurde das Uniplex-Protokoll mit der *MYCN*- und *ALK*-diploiden Zelllinie SK-N-AS. Bei der Auswertung des Uniplex-Versuchs zeigte sich für *AFF3* und *NAGK* die beste Auftrennung bei 125 nmol/L (*AFF3*) und 350 nmol/L (*NAGK*), da der Abstand der beiden Fluoreszenzamplituden der einfach-positiven Droplets gut war und auch die negativen Droplets beider Targets auf einer Höhe lagen (s. Abb. 3).



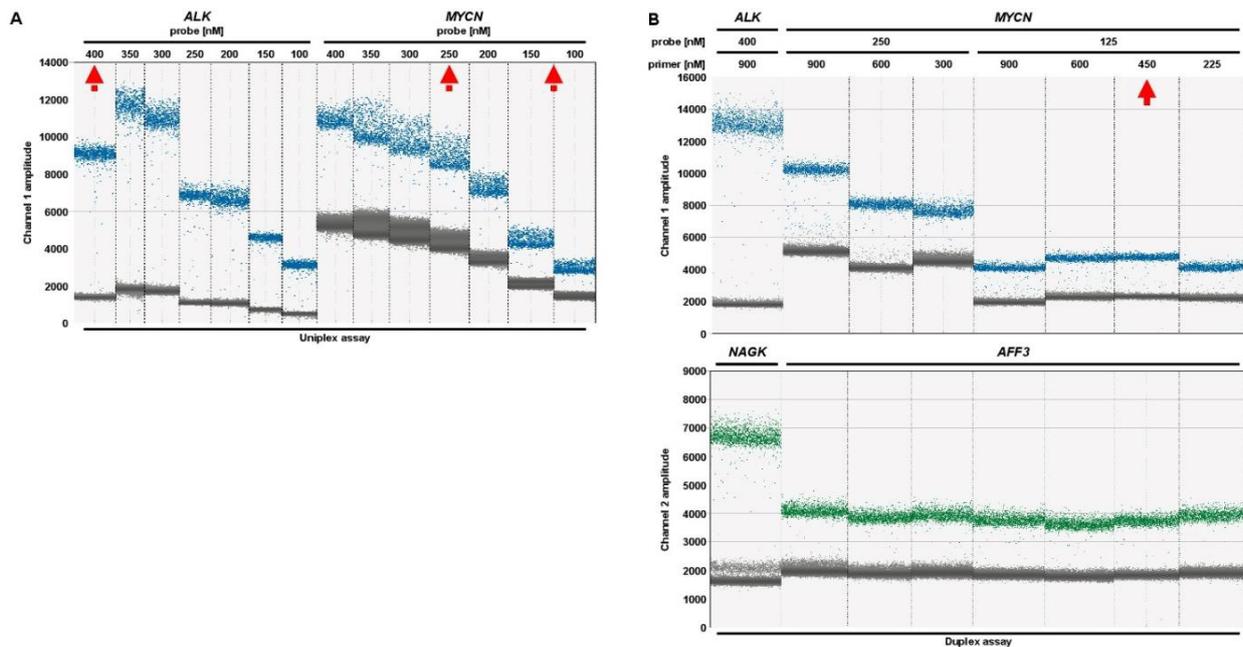
**Abbildung 3: Optimierung der *AFF3*- und *NAGK*-Sondenkonzentrationen.** Gezeigt ist ein exemplarischer 1D-Plot der Fluoreszenzamplituden in Kanal 2 (HEX), generiert in einem Uniplex-ddPCR-Ansatz mit 5 ng fragmentierter DNA aus SK-N-AS Zellen als Template. Die *AFF3*- und *NAGK*-Sonden wurden jeweils in den dargestellten Konzentrationen von 100-400 nmol/L bei einer festgesetzten Primer-Konzentration von 900 nmol/L getestet. Die Konzentrationen von 125 nmol/L und 350 nmol/L wurden als final optimierte Konzentrationen für den weiteren Gebrauch im Triplex- und Quadruplex-ddPCR-Ansatz verwendet (siehe rote Pfeile). Positive Droplets, grün; negative Droplets, grau. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Anhand der Ergebnisse konnten zwei Triplex-Protokolle etabliert werden, wobei die Primer- und Sondenkonzentrationen von *MYCN* bzw. *ALK* den Standardkonzentrationen wie im Duplex-Protokoll entsprachen und für *NAGK* und *AFF3* die o.g. Konzentrationen gewählt wurden (s. Tabelle 2, s. Abb. 4). Die Triplex-Protokolle zur Bestimmung der *MYCN*- (Abb. 4 A) und *ALK*-Kopienanzahl (Abb. 4 B) zeigen eine klare Trennung von negativen, einfach-, doppelt- und dreifach-positiven Droplet-Fractionen.



**Abbildung 4: Repräsentative 2D-Plots von Triplex-ddPCR-Assays zur Bestimmung der *ALK*- und *MYCN*-Kopienanzahl.** Die genomische DNA wurde aus SK-N-AS Zellen extrahiert und mittels Ultraschall fragmentiert. Für die ddPCR wurden jeweils 20 ng als Inputmenge eingesetzt. Die Fluoreszenz aus Kanal 1 (FAM) wurde der aus Kanal 2 (HEX) für jedes Droplet in den Triplex-Reaktionen gegenübergestellt. **A** und **B**: Die *ALK*- und *MYCN*-Kopienanzahl wurde in Kanal 1 detektiert und die normal diploiden Referenzen, *AFF3* und *NAGK*, wurden in Kanal 2 gemessen. Die Kreise markieren die individuellen Droplet-Fractionen. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

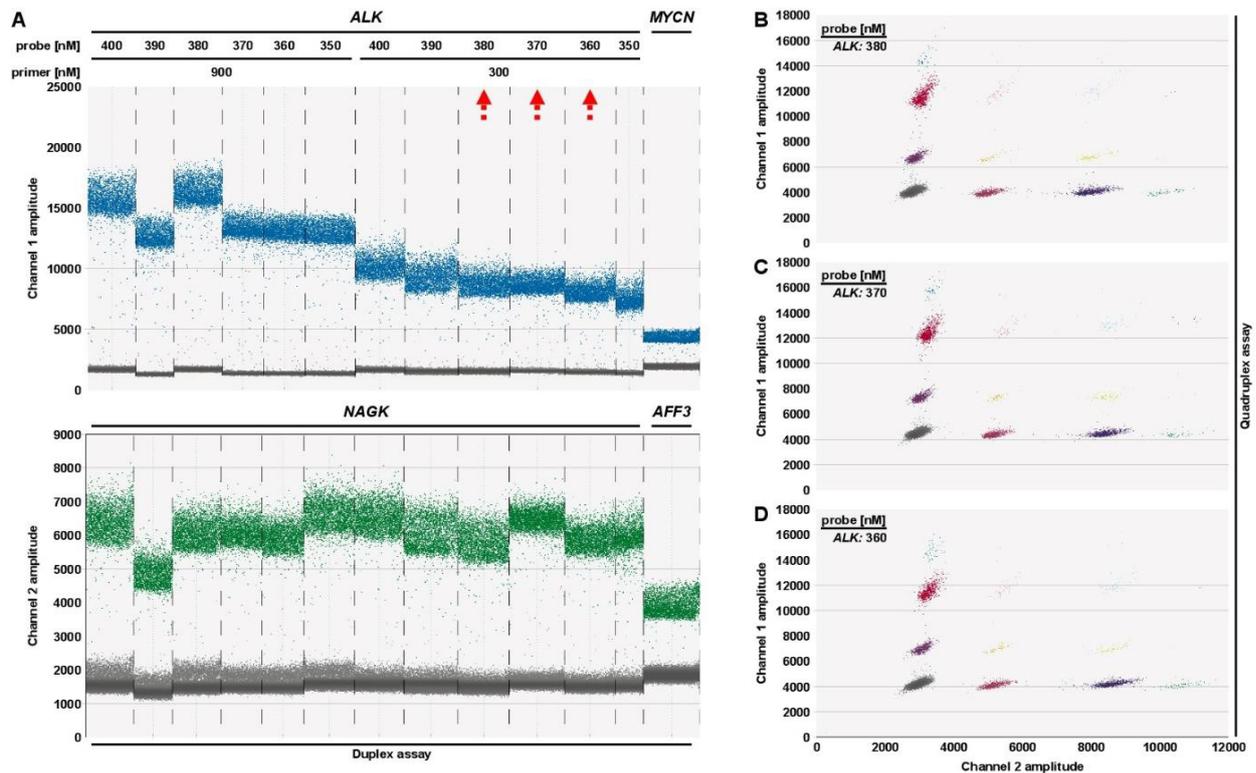
Das angewandte Prozedere für die Etablierung des Triplex-Protokolls wurde anschließend auf das Quadruplex-Protokoll übertragen. Hierfür wurden *MYCN* und *ALK* im Uniplex-Protokoll bei Sondenkonzentrationen von 100-400 nmol/L getestet, wobei die Standard-Primerkonzentration von 900 nmol/L eingesetzt wurde. Hierbei zeigten die Sondenkonzentrationen von 400 nmol/L (*ALK*) und 125 nmol/L (*MYCN*) eine gute Auftrennung der positiven und negativen Droplet-Fractionen (s. Abb. 5 A) und wurden für die weitere Optimierung des Quadruplex-Protokolls verwendet.



**Abbildung 5: Optimierung der MYCN-Primer- und Sondenkonzentrationen.** **A:** Gezeigt ist ein exemplarischer 1-D-Plot der Fluoreszenzamplituden in Kanal 1 (FAM), generiert in einem Uniplex-ddPCR-Ansatz mit 5 ng fragmentierter DNA aus SK-N-AS Zellen als Template. Die *ALK*- und *MYCN*-Sonden wurden jeweils in den dargestellten Konzentrationen von 100-400 nmol/L bei einer festen Primerkonzentration von 900 nmol/L getestet, und 400 nmol/L der *ALK*-Sonde sowie 125 nmol/L und 250 nmol/L der *MYCN*-Sonde für eine weitere Optimierung im Duplex-Ansatz ausgewählt (gestrichelte Pfeile). **B:** Evaluierung verschiedener *MYCN*-Primerkonzentrationen kombiniert mit 125 nmol/L oder 250 nmol/L der *MYCN*-Sonde. Eine definierte *ALK*-Primer- und Sondenkonzentration wurde parallel in Kanal 1 (FAM, **oberes Panel**) vermessen, um die Fluoreszenzamplituden der negativen und positiven Fraktionen für beide DNA-Targets optimal einzustellen. Die Fluoreszenzamplituden der negativen und positiven Fraktionen für die beiden Referenzgene *NAGK* und *AFF3* wurden in Kanal 2 (HEX, **unteres Panel**) in Duplex-Reaktionen generiert (*ALK/NAGK*; *MYCN/AFF3*). Die optimierten Primer-/Sondenkonzentrationen für die Quantifizierung der *MYCN*-Kopienanzahl sind mit einem roten Pfeil hervorgehoben. Positive Droplets, blau (Kanal 1) und grün (Kanal 2); negative Droplets, grau. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

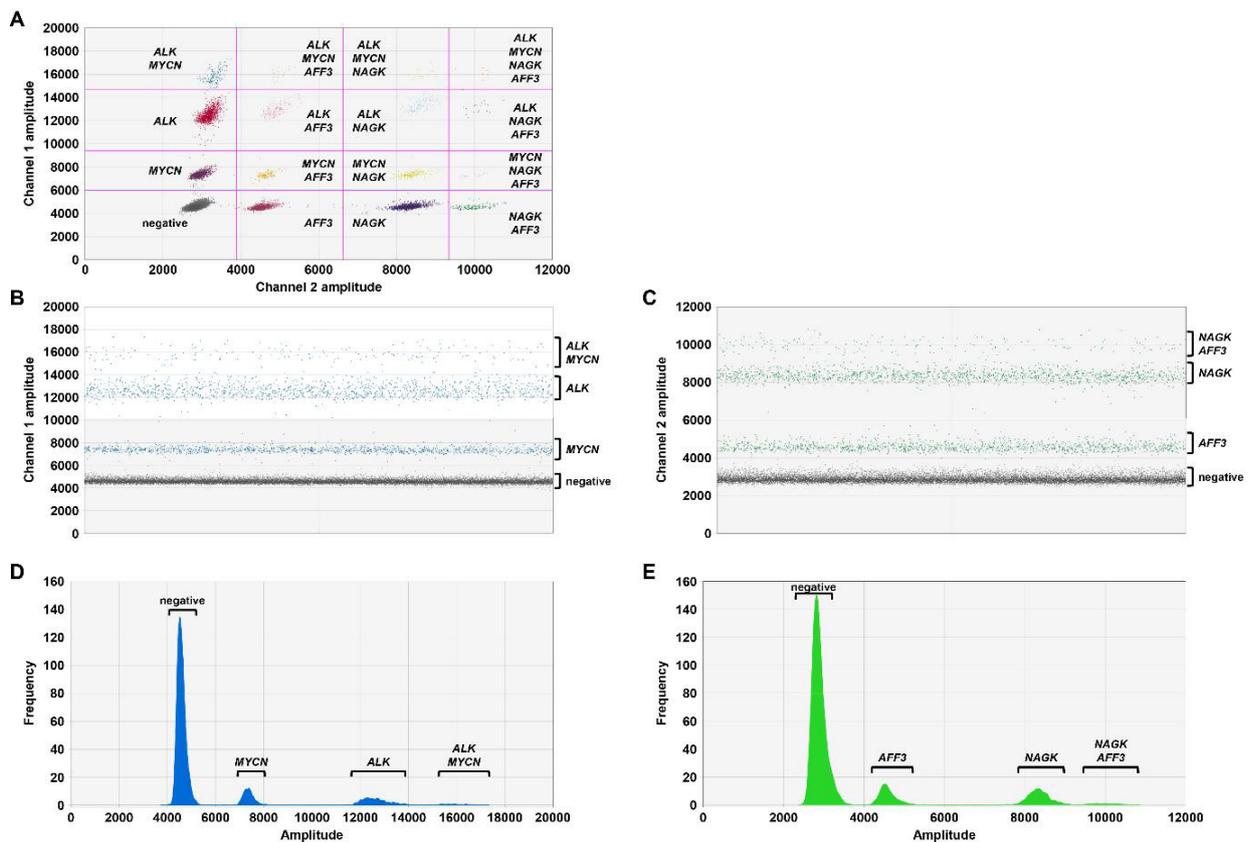
In einem ersten Quadruplex-Ansatz zeigte sich für *MYCN* und *ALK* trotz veränderter Sondenkonzentration jedoch keine klare Auftrennung (nicht gezeigt). Deshalb wurde die Auftrennung durch Variation der Primerkonzentrationen getestet. Die zu testende Range an Primerkonzentrationen wurde anhand von bereits publizierten ddPCR Arbeiten ausgewählt.<sup>61, 63, 64</sup> Vergleicht man die Amplitude der einfach-positiven Droplet-Fractionen im Uniplex- und Triplex-Versuch zeigt sich eine leichte Erhöhung der Fluoreszenzamplitude bei zunehmender Komplexität des Assays. Deshalb wurden die verschiedenen Primerkonzentrationen direkt im Duplex-Versuch getestet, um die spätere Amplitude der Droplet-Fractionen im 2D-Plot des Quadruplex-Protokolls besser abschätzen zu können. Im Duplex-Ansatz wurde zunächst *MYCN* mit *AFF3* bei *MYCN*-Sondenkonzentrationen von 250 nmol/L und 125 nmol/L zusammen mit verschiedenen *MYCN*-Primerkonzentrationen von 225-900 nmol/L getestet und *ALK* mit 400 nmol/L (Sonde) und 900 nmol/L (Primer) zusammen mit *NAGK* zum direkten Vergleich mitgetestet (s. Abb. 5 B). Das

Ergebnis des Duplex-Ansatzes ergab die beste Auftrennung zwischen *ALK* und *MYCN* bei *MYCN*-Konzentrationen von 125 nmol/L (Sonde) und 450 nmol/L (Primer) (s. Abb. 5 B). Die Ergebnisse des Duplex-Ansatzes (s. Abb. 5 B) zeigen, dass die gewählte Primer- und Sondenkonzentration für *MYCN* sowie die bereits gewählten Konzentrationen von *ALK*, *NAGK* und *AFF3* für einen nachfolgenden Quadruplex-Ansatz am besten geeignet sind. Im darauffolgenden Quadruplex-Test zeigte sich eine Auftrennung zwischen *MYCN* und *ALK* (nicht gezeigt), jedoch konnte die QuantaSoft Analysis Pro Software die Thresholds nicht automatisch bestimmen, sodass dies noch manuell erfolgen musste. Um eine automatische Festlegung der Thresholds durch die Software zu gewährleisten, wurde die Auftrennung der Droplet-Fractionen von *MYCN* und *ALK* optimiert. Hierfür wurde die *ALK*-Sonde bei 400, 390, 380, 370, 360 und 350 nmol/L mit einer Primerkonzentration von jeweils 300 bzw. 900 nmol/L getestet. Es zeigte sich, dass bei einer Primerkonzentration von 900 nmol/L (*ALK*) die negativen Droplets in ihrer Amplitude zu stark vom Vergleich mit den *MYCN*-negativen Droplets abwichen und die einfach-positiven Droplets von *ALK* eine sehr große Amplitudenrange aufwiesen (s. Abb. 6 A). Aufgrund dessen wurden die *ALK*-Sondenkonzentrationen von 360, 370 und 380 nmol/L bei einer Primerkonzentration von 300 nmol/L für eine optimale Auftrennung aller Droplet-Fractionen präferiert (s. Abb. 6 B-D) und erneut mit den gewählten Primer-/Sondenkonzentrationen für *MYCN*, *NAGK* und *AFF3* im jeweiligen Quadruplex-Ansatz getestet. Hierbei waren die einzelnen Droplet-Fractionen bei einer *ALK*-Sondenkonzentration von 360 nmol/L (s. Abb. 6 D) am kleinsten in ihrer Amplitudenrange und klar voneinander getrennt, sodass dieses Quadruplex-Protokoll für alle nachfolgenden Messungen gewählt wurde.



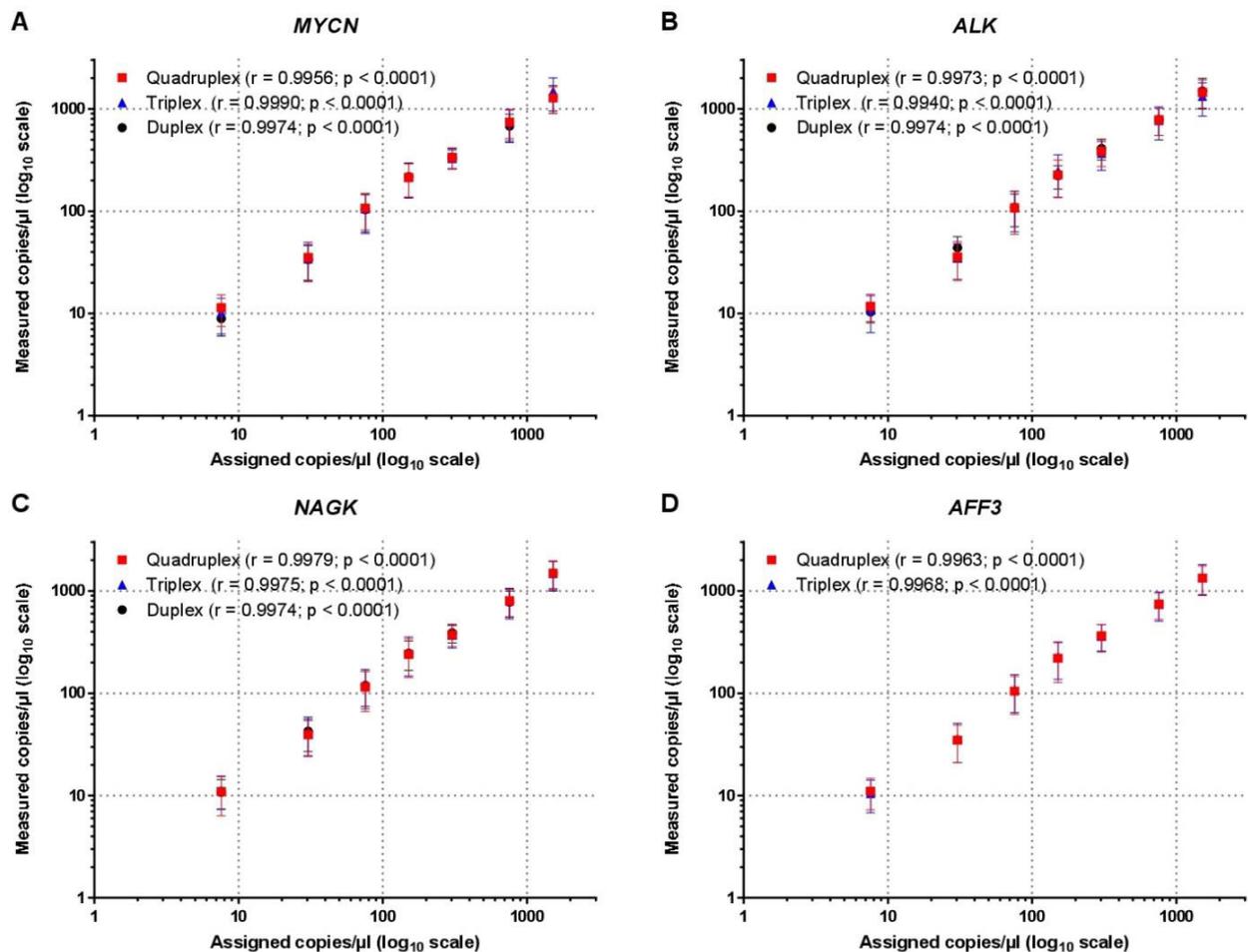
**Abbildung 6: Optimierung der ALK-Primer- und Sondenkonzentrationen.** **A:** Gezeigt ist ein exemplarischer 1-D-Plot der Fluoreszenzamplituden in Kanal 1 (FAM) generiert in einem Uniplex-ddPCR-Ansatz mit 10 ng fragmentierter DNA aus SK-N-AS Zellen als Template. Die *ALK*-Sonden und -Primer wurden in den gezeigten Konzentrationen getestet. Eine definierte *MYCN*-Primer- und Sondenkonzentration wurde parallel in Kanal 1 (FAM, **oberes Panel**) vermessen, um die Fluoreszenzamplituden der negativen und positiven Fraktionen für beide DNA-Targets optimal einzustellen. Die Fluoreszenzamplituden der negativen und positiven Fraktionen für die beiden Referenzgene *NAGK* und *AFF3* wurden in Kanal 2 (HEX, **unteres Panel**) in Duplex-Reaktionen generiert (*ALK/NAGK*; *MYCN/AFF3*). Die gewählten Primer-/Sondenkonzentrationen für die Quantifizierung der *ALK*-Kopienanzahl für die finale Optimierung in Quadruplex-Reaktionen sind mit **gestrichelten roten Pfeilen** hervorgehoben. Positive Droplets, **blau** (Kanal 1) und **grün** (Kanal 2); negative Droplets, **grau**. **B-D:** Vergleich der besten drei *ALK*-Primer-/Sondenkonzentrationen in Quadruplex-Reaktionen. Exemplarische 2-D-Plots mit *MYCN/ALK* in Kanal 1 (FAM) und *AFF3/NAGK* in Kanal 2 (HEX). Negative Droplets, **grau**; einfach-, zweifach-, dreifach- und vierfach-positive Droplets sind in verschiedenen Farben dargestellt. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Die Trennung der negativen, einfach-, doppelt-, dreifach- und vierfach-positiven Droplets ist in diesem Protokoll so klar, dass die Software die Thresholds automatisch festsetzen konnte (s. Abb. 7 A). Auch im 1D-Plot für die jeweiligen Kanäle ist bereits eine klare Trennung erkennbar (s. Abb. 7 B und C), wobei die doppelt-positiven Fraktionen von geringerer Anzahl als die einfach-positiven Fraktionen sind, da statistisch betrachtet hiervon weniger vorkommen. Diese klare Trennung stellt sich auch in den Histogrammen mit der Häufigkeit der einzelnen Droplet-Fraktionen eindeutig dar (s. Abb. 7 D und E).



**Abbildung 7: Repräsentative Plots und Histogramme des Quadruplex-ddPCR-Protokolls zur Bestimmung der Kopienanzahl von *ALK* und *MYCN*.** Die genomische DNA wurde aus SK-N-AS Zellen extrahiert und vor dem Start der ddPCR mittels Ultraschall fragmentiert und 10 ng als Inputmaterial eingesetzt. **A:** Repräsentative 2-D-Plots der Droplet-Fluoreszenzen in der Quadruplex-Reaktion. Die *MYCN*- und *ALK*-Droplets wurden in Kanal 1 (FAM) gegen die *AFF3*- und *NAGK*-Droplets in Kanal 2 (HEX) dargestellt. Die Linien zeigen die Grenzen für negative sowie einfach-, doppelt-, dreifach- und vierfach-positive Droplet-Fractionen an. **B** und **C:** Gezeigt sind eindimensionale Plots der Droplet-Fluoreszenzen in Kanal 1 für *MYCN* und *ALK* (**B**) und in Kanal 2 für *AFF3* und *NAGK* (**C**). Die Plots zeigen eine optimale Trennung der negativen, einfach- und doppelt-positiven Droplets. Die blauen (Kanal 1) und grünen Punkte (Kanal 2) zeigen die positiven Droplets, die grauen Punkte sind negative Droplets. **D** und **E:** Die Histogramme zeigen die Droplet-Frequenz bei spezifischen Fluoreszenzamplituden in Kanal 1 (**D**, *MYCN* und *ALK*) und in Kanal 2 (**E**, *AFF3* und *NAGK*). Auch hier sind die Droplet-Frequenzen für die negativen, einfach- und doppelt-positiven Fractionen klar getrennt. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Abschließend erfolgte die Untersuchung der Genauigkeit und Sensitivität der Quadruplex- und Triplex-Protokolle im Vergleich zu den publizierten Duplex-Protokollen mit Hilfe genomischer DNA aus der SK-N-AS-Zelllinie in einer Verdünnungsreihe von 0,5-100 ng. Es zeigt sich eine signifikante und vergleichbare Korrelation der detektierten und theoretisch berechneten Konzentrationen aller gemessenen Gene in den Duplex-, Triplex- und Quadruplex-Protokollen ( $r=0.9940$  bis  $r=0.9979$  und  $p < 0,05$ ) (s. Abb. 8 A-D).



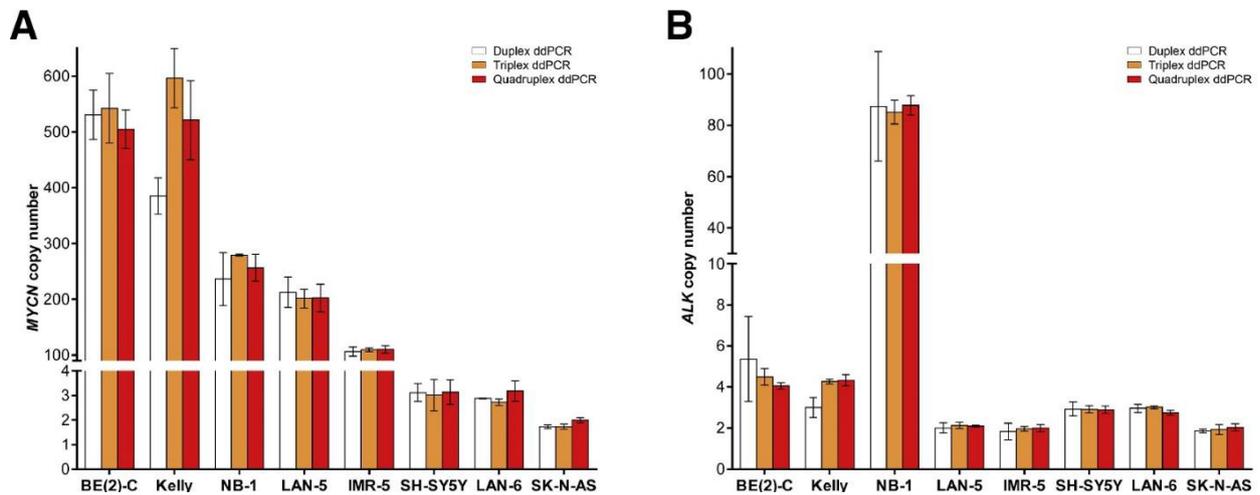
**Abbildung 8: Die Multiplex-ddPCR-Protokolle zur Bestimmung der absoluten Kopienanzahl von *MYCN* und *ALK* messen die Input-Konzentrationen über einen breiten Bereich linear.** Aus SK-N-AS Zellen extrahierte und durch Ultraschall fragmentierte genomische DNA wurde als Template für die ddPCR-Reaktionen eingesetzt und seriell mit H<sub>2</sub>O verdünnt, zur Analyse von Input-DNA-Mengen von 0,5, 2, 5, 10, 20, 50 und 100 ng. **A-D:** Dargestellt ist die Korrelationsanalyse der theoretisch berechneten *MYCN*- (**A**), *ALK*- (**B**), *NAGK*- (**C**) und *AFF3*-Konzentrationen (**D**) (x-Achse) und der gemessenen Konzentrationen in der Verdünnungsreihe mit dem Quadruplex- (rote Quadrate), Triplex- (blaue Dreiecke) und Duplex-ddPCR-Protokoll (schwarze Kreise) (y-Achse). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD; n=3. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Die Daten zeigen, dass das Quadruplex-Protokoll dieselbe Sensitivität wie die Triplex- und Duplex-Protokolle für die Bestimmung der *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl bei DNA-Inputmengen von 0,5-100 ng besitzt.

### 3.2. Bestimmung der *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl in Neuroblastom-Zelllinien mit den etablierten Multiplex-ddPCR-Protokollen

Das etablierte Quadruplex-Protokoll wurde in acht unterschiedlichen Neuroblastom-Zelllinien mit dem Triplex- und Duplex-Protokoll verglichen. Es wurden Zelllinien mit *MYCN*- und/oder *ALK*-

Amplifikation, *MYCN*- und/oder *ALK*-Gain und normalem diploiden Chromosomensatz mit jeweils drei unterschiedlichen Extrakten in Triplikaten untersucht. Von diesen wiesen aus bereits publizierten Daten folgende Zelllinien eine **(Ia)** *MYCN*-Amplifikation (BE(2)-C, Kelly, NB-1), LAN-5, IMR-5) bzw. einen **(Ib)** *MYCN*-Gain (SH-SY5Y, LAN-6) und eine **(IIa)** *ALK*-Amplifikation (NB-1, IMR-5) bzw. einen **(IIb)** *ALK*-Gain (BE(2)-C, Kelly, LAN-6, SH-SY5Y) auf (s. Tab. 1). Ein diploider Status für *MYCN* bzw. *ALK* zeigt sich bei SK-N-AS.<sup>14, 68, 75, 77</sup> Im Quadruplex- (521,3) und Triplex-Protokoll (596,6) war die absolute *MYCN*-Kopienanzahl für Kelly etwa ein Drittel höher im Vergleich zu der Messung im Duplex-Protokoll (385,4) (s. Abb. 9 A). In den übrigen *MYCN*-amplifizierten Zelllinien BE(2)-C, NB-1, LAN-5 und IMR-5 zeigten sich im Quadruplex- (109,9 – 504,8), Triplex- (109,3 – 542,6) und Duplex-Protokoll (106,2 – 530,8) sehr ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die *MYCN*-Kopienanzahl (s. Abb. 9 A). Ein *MYCN*-Gain konnte in SH-SY5Y (Quadruplex  $3,1 \pm 0,50$ ; Triplex  $3,02 \pm 0,64$ ; Duplex  $3,12 \pm 0,36$ ) sowie in LAN-6 im Quadruplex- ( $3,2 \pm 0,42$ ) und Duplex-Protokoll ( $2,88 \pm 0,02$ ) nachgewiesen werden, wobei im Triplex-Protokoll ( $2,72 \pm 0,13$ ) ein diploider *MYCN*-Status knapp unter dem Grenzwert von 2,74 für einen Gain gemessen wurde (s. Abb. 9 A). Für SK-N-AS zeigte sich in allen drei Protokollen ein diploider *MYCN*-Status (Quadruplex  $1,99 \pm 0,11$ ; Triplex  $1,73 \pm 0,11$ ; Duplex  $1,73 \pm 0,08$ ) (s. Abb. 9 A). Die hohe *ALK*-Amplifikation in NB-1 bestätigte sich im Quadruplex- ( $87,8 \pm 3,79$ ), Triplex- ( $85,1 \pm 4,61$ ) und Duplex-Protokoll ( $87,4 \pm 21,32$ ) (s. Abb. 9 B). Die aus bereits publizierten Daten angegebene *ALK*-Amplifikation in IMR-5 bestätigte sich in keinem der drei ddPCR-Protokolle (Quadruplex  $1,99 \pm 0,13$ ; Triplex  $1,95 \pm 0,10$ ; Duplex  $1,85 \pm 0,37$ ) (s. Abb. 9 B).<sup>14</sup> Der bekannte *ALK*-Gain in BE(2)-C, Kelly, LAN-6 und SH-SY5Y bestätigte sich in jedem der drei ddPCR-Protokolle. Auch hier war die Kopienanzahl im Quadruplex- (2,74 – 4,05), Triplex- (2,92 – 4,49) und Duplex-Protokoll (2,92 – 5,35) sehr ähnlich (s. Abb. 9 B). Bei der Messung der Kelly-Zelllinie zeigte sich bezüglich der *ALK*-Kopienanzahl im Quadruplex- ( $4,32 \pm 0,28$ ) und Triplex-Protokoll ( $4,27 \pm 0,11$ ) ein etwa ein Drittel höherer Wert im Vergleich zum Duplex-Protokoll ( $3,00 \pm 0,49$ ) (s. Abb. 9 B). Der diploide *ALK*-Status in SK-N-AS bestätigte sich im Quadruplex- ( $2,03 \pm 0,17$ ), Triplex- ( $1,93 \pm 0,24$ ) und Duplex-Protokoll ( $1,86 \pm 0,09$ ) (s. Abb. 9 B).



**Abbildung 9: Vergleich der absoluten Kopienanzahl von *MYCN* und *ALK* in Neuroblastom-Zelllinien durch Bestimmung mit den Multiplex-ddPCR-Protokollen.** A und B: Die genomische DNA wurde extrahiert und mittels Ultraschall vor dem Start der ddPCR fragmentiert, um die Kopienanzahl von *MYCN* (A) und *ALK* (B) zu quantifizieren. Für jede Messung wurden 2 ng DNA als Input-Material verwendet. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD; n=3. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Die Daten zeigen, dass mit dem etablierten Quadruplex-Protokoll die *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl in Neuroblastom-Zelllinien eindeutig bestimmt und zwischen einem diploiden Status, einem Gain und einer Amplifikation unterschieden werden kann.

### 3.3. Bestimmung des *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl-Status im Blutplasma und Tumorproben von Patienten mit Neuroblastom mit dem etablierten Quadruplex-Protokoll

In einem letzten Schritt wurden Plasma- und die dazugehörigen Tumorproben von drei Patienten mit einem Neuroblastom mit dem Quadruplex-Protokoll vermessen und die Werte mit Messungen aus dem Triplex- und Duplex-Protokoll verglichen. Zum Sparen von Patientenmaterial wurde jede Plasma- und Tumorprobe einmalig mit jedem ddPCR-Protokoll vermessen. Die Ergebnisse der ddPCR-Protokolle wurden untereinander verglichen und anschließend mit Messungen aus dem *Whole Exome Sequencing* (WES) bestätigt. Die *MYCN*-Amplifikation bei Patient 1 und 2 war in ihrer Kopienanzahl bzgl. der gDNA-Probe zwischen dem Quadruplex- (140,1 – 290,6), Triplex- (135,0 – 239,2) und Duplex-Protokoll (141,1 – 233,9) sehr ähnlich (s. Tabelle 4). Auch in der cfDNA-Probe von Patient 1 und 2 konnte die *MYCN*-Amplifikation im Quadruplex- (32,3 – 43,5), Triplex- (36,1 – 48,7) und Duplex-Protokoll (35,1 – 48,9) detektiert werden, wobei die Kopienanzahl im Vergleich zu den Ergebnissen der gDNA-Probe geringer war (s. Tabelle 4).

**Tabelle 4: Vergleich der in den verschiedenen Multiplex-ddPCR-Protokollen bestimmten *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl in Patientenproben.** (modifiziert nach Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

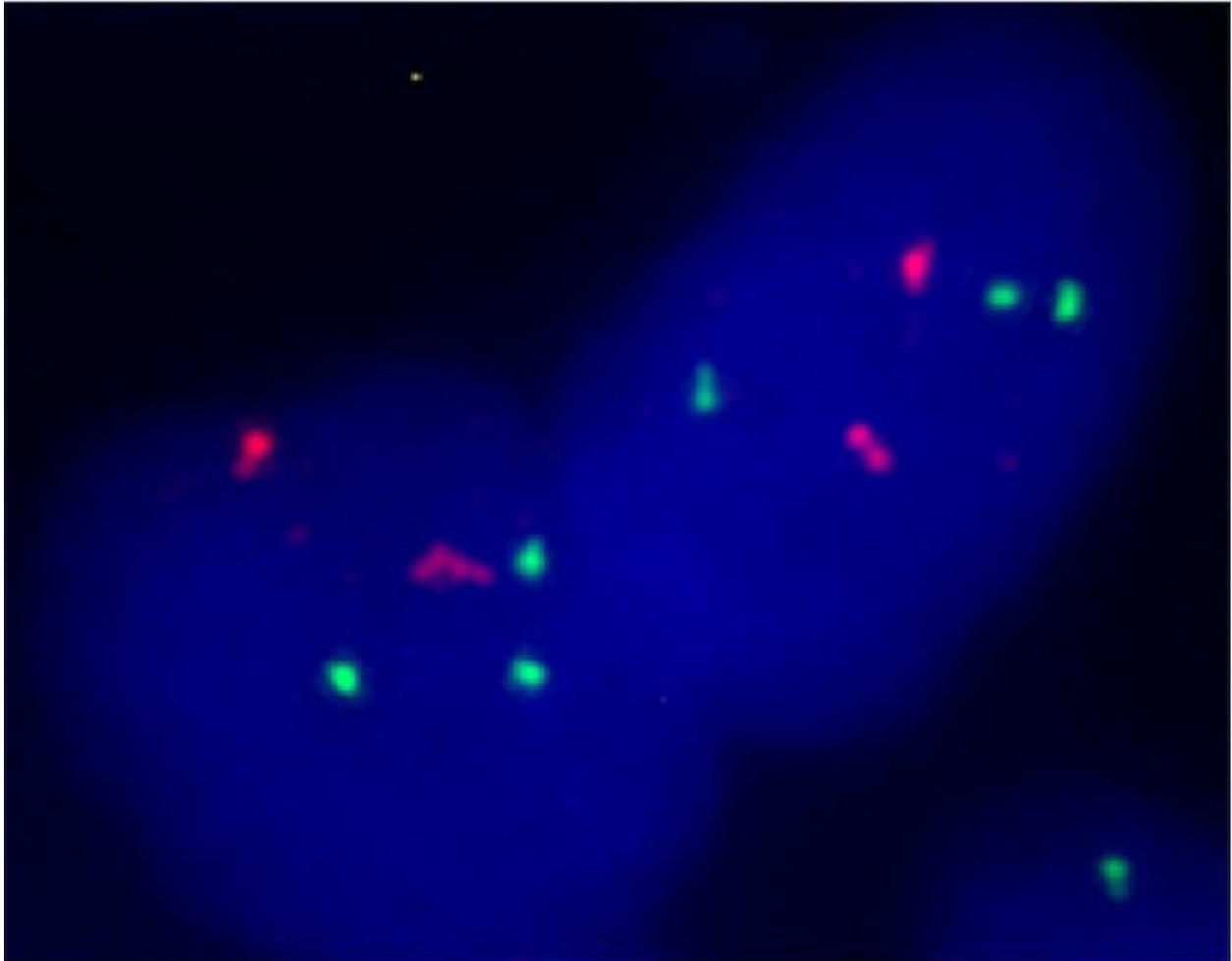
Patient	Stadium	Probe	Tumorzell-Inhalt (%)	cfDNA-Inhalt (%)	<i>MYCN</i> Kopienanzahl				<i>ALK</i> Kopienanzahl			
					Quadruplex ddPCR*	Triplex ddPCR*	Duplex ddPCR*	WES**	Quadruplex ddPCR*	Triplex ddPCR*	Duplex ddPCR*	WES**
1	M	gDNA	75	-	290.6	239.2	233.9	239.7	3.24	2.80	2.89	2.30
		cfDNA	-	69.8	43.5	48.7	48.9	58.3	3.00	2.89	3.35	2.13
2	M	gDNA	70	-	140.1	135.0	141.4	142.6	2.07	1.97	2.17	1.81
		cfDNA	-	81.1	32.3	36.1	35.1	37.9	1.96	2.40	2.26	1.88
3	M	gDNA	90	-	1.86	1.82	1.64	1.92	2.05	2.17	1.78	1.92
		cfDNA	-	n.a.	2.23	2.68	2.15	1.91	1.70	2.41	2.38	1.91

gDNA, genomische DNA; cfDNA, zellfreie (cell-free) DNA; ddPCR, droplet digital PCR; WES, whole-exome sequencing; n.a., nicht analysiert.

\* DNA Inputmenge für die ddPCR Reaktion reichte von 1 bis 2 ng.

\*\* DNA Inputmenge für das WES reichte von 8 bis 110 ng.

Die *MYCN*-Amplifikation bei Patient 1 und 2 konnte in den WES-Daten für die gDNA- (142,6 – 239,7) und cfDNA-Probe (37,9 – 58,3) bestätigt werden und ähnelte den Ergebnissen der ddPCR-Protokolle (s. Tabelle 4). Der diploide *MYCN*-Status von Patient 3 zeigte sich in der gDNA- und cfDNA-Probe im Quadruplex- (1,86 – 2,23), Triplex- (1,82 – 2,68) und Duplex-Protokoll (1,64 – 2,15) und wurde in den WES-Daten bestätigt (1,91 – 1,92) (s. Tabelle 4). Der *ALK*-Gain bei Patient 1 wurde sowohl in der gDNA-Probe im Quadruplex- (3,24), Triplex- (2,80) und Duplex-Protokoll (2,89) als auch in der cfDNA-Probe in allen drei ddPCR-Protokollen (2,89 – 3,35) nachgewiesen, jedoch bestätigten die WES-Daten den *ALK*-Gain weder in der gDNA-Probe (2,30) noch in der cfDNA-Probe (2,13) (s. Tabelle 4). Aus diesem Grund wurde eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung der Tumorprobe von Patient 1 zum Nachweis der *ALK*-Kopienanzahl vorgenommen, welche drei *ALK*-Kopien detektierte (s. Abbildung 10) und somit die ddPCR Daten und eine falsch-negative Messung aus den WES-Daten bestätigt.



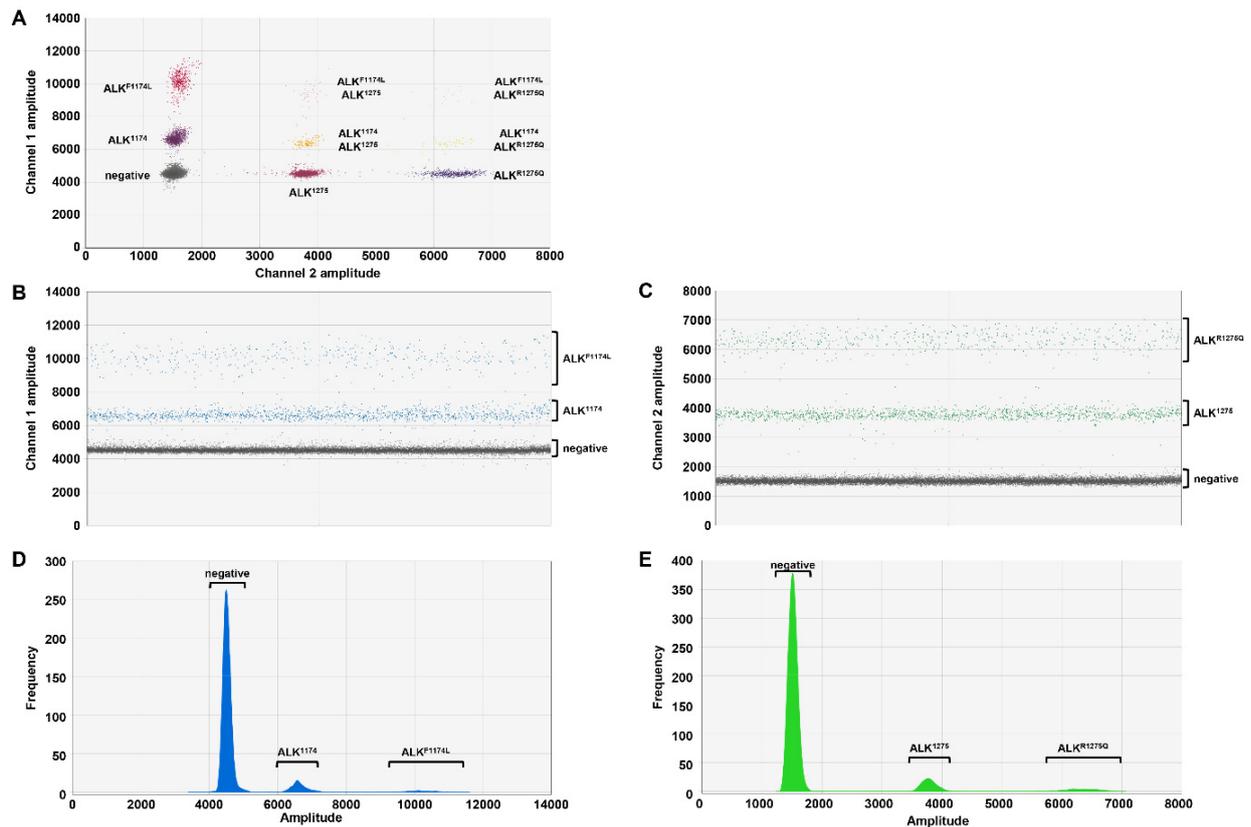
**Abbildung 10: *ALK*-Kopienanzahl-Gain in Interphasenzellkernen der Neuroblastomtumorprobe von Patient 1.** Drei grüne Signale (*ALK*) und zwei rote Signale der Kontrollregion (2q11) sind dargestellt. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (blau). Originale Vergrößerung, x100. Die FISH-Analyse dieser Probe wurde vom Labor von Prof. Dr. Matthias Fischer aus Köln durchgeführt. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Der diploide *ALK*-Status bei Patient 2 und 3 konnte sowohl in der gDNA- als auch cfDNA-Probe mit allen ddPCR-Protokollen nachgewiesen werden. Bei der gDNA-Probe zeigten sich im Quadruplex- (2,05 – 2,07), Triplex- (1,97 – 2,17) und Duplex-Protokoll (1,78 – 2,17) sehr ähnliche Ergebnisse, was sich in den WES-Daten (1,81 – 1,92) bestätigte (s. Tabelle 4). Bezüglich der cfDNA-Probe waren die Ergebnisse der ddPCR-Protokolle (1,70 – 2,38) ebenfalls identisch mit denen der WES-Daten (1,88 – 1,91) (s. Tabelle 4). Die Daten zeigen, dass das in dieser Arbeit etablierte Quadruplex-Protokoll den *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl-Status in Tumorproben sowie *Liquid Biopsies* in Form von Blutplasma bei Patienten akkurat bestimmen kann. Durch die simultane Analyse des *MYCN*- und *ALK*-Status wird somit wertvolles Patientenmaterial gespart.

### 3.4. Etablierung eines Quadruplex-Protokolls für die simultane Detektion der *ALK*-Hotspot-Mutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> und *ALK*<sup>R1275Q</sup>

Bereits publizierte ddPCR-Daten zeigen, dass die *ALK*-Hotspot-Mutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> (C>A Konversion am Nukleotid 3522 im Exon 23) und *ALK*<sup>R1275Q</sup> (G>A Konversion am Nukleotid 3824 im Exon 25) mittels Duplex-ddPCR detektiert und die MAFs berechnet werden können.<sup>60</sup> Bei anderen Tumoren konnte bereits gezeigt werden, dass die Detektion mehrerer Mutationen in einem ddPCR-Protokoll möglich ist.<sup>63, 95</sup> Deshalb wurde ein Quadruplex-Protokoll zur simultanen Detektion der beiden *ALK*-Hotspot-Mutationen im Neuroblastom etabliert. Für die Etablierung wurde eine 1:1-Mischung genomischer DNA aus der SH-EP- (*ALK*<sup>F1174L</sup>) und CLB-GA-Zelllinie (*ALK*<sup>R1275Q</sup>) hergestellt. Durch das gDNA-Gemisch aus SH-EP und CLB-GA wurde sichergestellt, dass in den nachfolgenden Etablierungsschritten alle erwarteten Droplet-Fraktionen dargestellt werden. Für die Etablierung wurden die Mutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> und *ALK*<sup>R1275Q</sup> in Kanal 1 (FAM) und die zugehörigen Wildtypen *ALK*<sup>1174</sup> und *ALK*<sup>1275</sup> in Kanal 2 (HEX) in Anlehnung an das bereits etablierte Duplex-Protokoll vermessen.<sup>60</sup> Zur Untersuchung, auf welcher Amplitudenhöhe im 1D- und 2D-Plot die einzelnen Droplet-Fraktionen zu erwarten sind, wurden zunächst in einem Uniplex-Ansatz verschiedene Sondenkonzentrationen von 100-400 nmol/L für *ALK*<sup>F1174L</sup> und *ALK*<sup>R1275Q</sup> sowie *ALK*<sup>1174</sup> und *ALK*<sup>1275</sup> getestet. In diesem Versuch zeigten sich für *ALK*<sup>F1174L</sup> und *ALK*<sup>1174</sup> bei 150 nmol/L (Sonde) sowie für *ALK*<sup>R1275Q</sup> und *ALK*<sup>1275</sup> bei 400 nmol/L (Sonde) eine mögliche Auftrennung für ein nachfolgendes Quadruplex-Protokoll (nicht gezeigt). In einem zweiten Schritt wurden die gewählten Sondenkonzentrationen aus dem Uniplex-Ansatz gemeinsam mit verschiedenen Primerkonzentrationen von 300-1100 nmol/L im Duplex-Versuch getestet, wobei sich die zu testende Range an Primerkonzentrationen aus bereits publizierten ddPCR-Arbeiten ergab.<sup>61, 63, 64</sup> Aus diesen beiden ersten Versuchen wurden die Primerkonzentrationen 540 nmol/L (*ALK*<sup>F1174L</sup>) und 900 nmol/L (*ALK*<sup>R1275Q</sup>) sowie die Sondenkonzentrationen 150 nmol/L (*ALK*<sup>F1174L</sup>- und *ALK*<sup>1174</sup>-Sonde) und 400 nmol/L (*ALK*<sup>R1275Q</sup>- und *ALK*<sup>1275</sup>-Sonde) für einen ersten Quadruplex-Testversuch ausgewählt. In diesem ersten Quadruplex-Versuch konnte jedoch keine optimale Auftrennung der Fraktionen erreicht werden, da die erwarteten Droplet-Fraktionen sich überlagerten und nicht orthogonal zueinander, sondern stattdessen nahezu linear zwischen den einfach-positiven Fraktionen von *ALK*<sup>R1275Q</sup> und *ALK*<sup>1275</sup> verteilt lagen (nicht gezeigt). In der Literatur wurde das Konzept eines invertierten ddPCR-Protokolls beschrieben, wobei Mutante und Wildtyp im selben Kanal analysiert werden und so die Droplet-Fraktionen in Multiplex-ddPCR-Protokollen im 2D-Plot orthogonal zueinander liegen.<sup>63</sup> Nach diesem Konzept wurde das vorab aufgestellte Quadruplex-Protokoll so verändert, dass *ALK*<sup>F1174L</sup> und die zugehörige

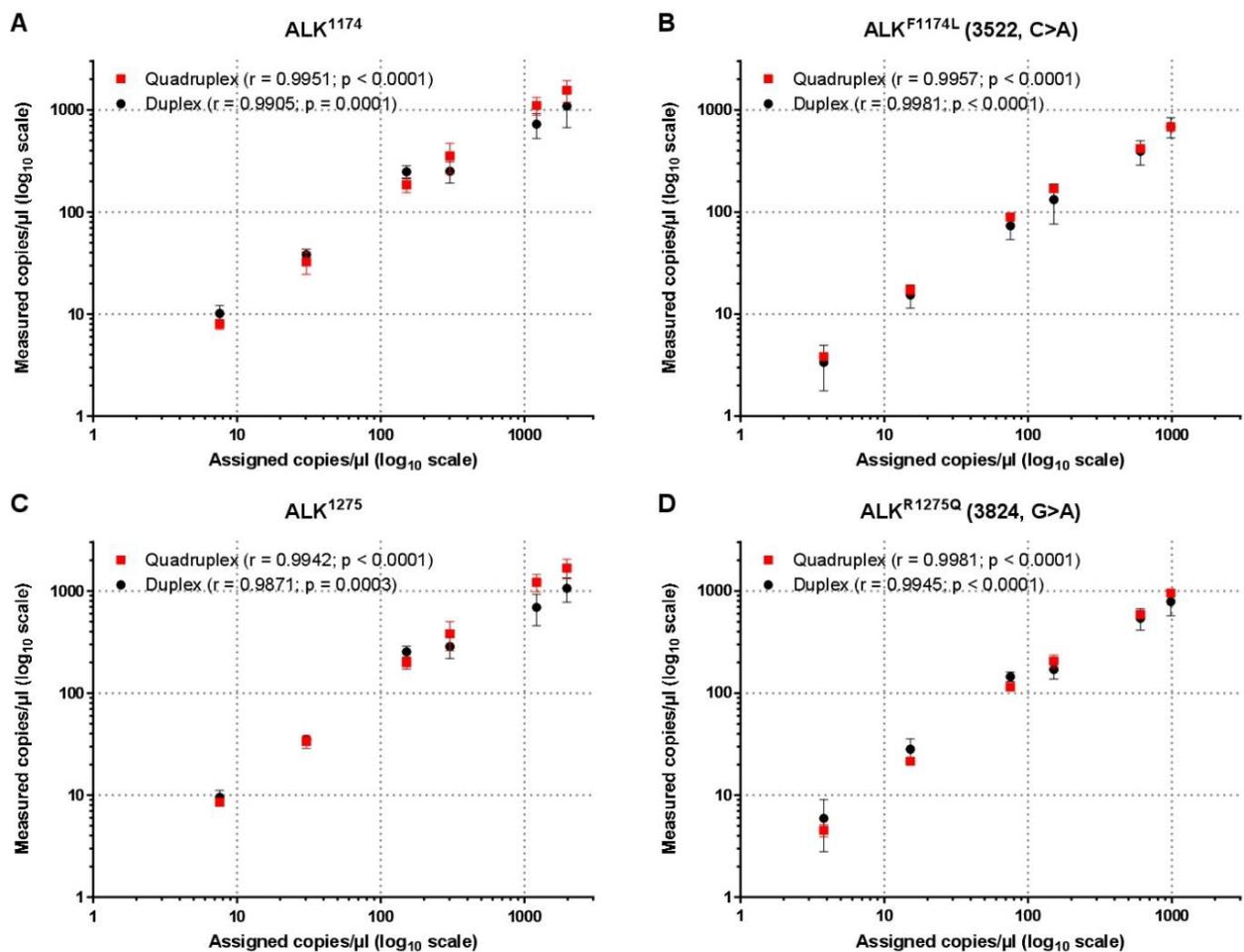
Wildtypsequenz  $ALK^{1174}$  in Kanal 1 (FAM) und  $ALK^{R1275Q}$  und die zugehörige Wildtypsequenz  $ALK^{1275}$  in Kanal 2 (HEX) detektiert wurden. Hierfür wurden die  $ALK^{R1275Q}$ -Sonde mit dem HEX-Fluoreszenzfarbstoff und die  $ALK^{1174}$ -Sonde mit dem FAM-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die neu-markierten Sonden wurden zunächst im Duplex-Ansatz in ihrem jeweiligen Kanal erneut bei Primerkonzentrationen von 300, 600 und 900 nmol/L getestet. Für  $ALK^{R1275Q}$  und  $ALK^{1275}$  zeigte sich bei der Kombination von 600 nmol/L (Primer), 400 nmol/L (Mutations-Sonde) und 150 nmol/L (Wildtyp-Sonde) bereits eine klare Auftrennung der einfach-positiven Droplet-Fractionen bei gleichzeitig derselben Amplitude der negativen Droplet-Fractionen (nicht gezeigt). Zur weiteren Optimierung der Auftrennung von  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{1174}$  wurde im Duplex-Ansatz die  $ALK^{F1174L}$ -Sonde bei 150, 250 und 350 nmol/L sowie die  $ALK^{1174}$ -Sonde bei 50, 100 und 150 nmol/L jeweils bei einer Primerkonzentration von 300 nmol/L und 900 nmol/L getestet. In diesem Versuch stellte sich eine Primerkonzentration von 900 nmol/L sowie Sondenkonzentrationen von 350 nmol/L ( $ALK^{F1174L}$ -Sonde) und 50 nmol/L ( $ALK^{1174}$ -Sonde) am geeignetsten für einen nachfolgenden Quadruplex-Versuch heraus. Durch die Optimierung der Auftrennung der Droplet-Fractionen in den Kanälen 1 und 2 im Duplex-Ansatz konnte somit erfolgreich ein Quadruplex-Protokoll für die Detektion der  $ALK$ -Hotspot-Mutationen  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{R1275Q}$  mit den in Tabelle 3 angegebenen Konzentrationen etabliert werden (s. Tabelle 3).



**Abbildung 11: Quadruplex-ddPCR-Protokoll zur Detektion der Neuroblastom-spezifischen Hotspot-Mutationen  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{R1275Q}$ .** Für das Design des Ansatzes wurde genomische DNA aus SH-EP ( $ALK^{F1174L}$ ) und CLB-GA ( $ALK^{R1275Q}$ ) Zellen extrahiert, mittels Ultraschall fragmentiert und im Verhältnis 1:1 vor dem Start der ddPCR zur Generierung eines DNA-Mixes, welcher beide Mutationen beinhaltet, gemischt. Insgesamt wurden 20 ng dieses DNA-Mixes als Inputmaterial eingesetzt. **A:** Repräsentative 2-D-Plots der Droplet-Fluoreszenz.  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{1174}$  Droplets wurden in Kanal 1 (FAM) gegen  $ALK^{R1275Q}$  und  $ALK^{1275}$  Droplets in Kanal 2 (HEX) dargestellt. Gezeigt sind negative, einfach- und doppel-positive Droplet-Fraktionen. **B und C:** Gezeigt sind eindimensionale Plots der Droplet-Fluoreszenz von  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{1174}$  in Kanal 1 (**B**) und von  $ALK^{R1275Q}$  und  $ALK^{1275}$  in Kanal 2 (**C**). Die Plots zeigen eine optimale Trennung von negativen und einfach-positiven Droplets. Die blauen (Kanal 1) und grünen Punkte (Kanal 2) zeigen die positiven Droplets, die grauen Punkte sind negative Droplets. **D und E:** Die Histogramme zeigen die Droplet-Frequenz bei spezifischen Fluoreszenzamplituden in Kanal 1 (**D**,  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{1174}$ ) und in Kanal 2 (**E**,  $ALK^{R1275Q}$  und  $ALK^{1275}$ ). Die Droplet-Frequenzen sind klar unterscheidbar. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Es zeigt sich eine klare Auftrennung von negativen, einfach-positiven sowie doppel-positiven Droplet-Fraktionen aus dem jeweils anderen Kanal (s. Abb. 11 A). Jedoch zeigen sich keine doppel-positiven Fraktionen im selben Kanal sowie dreifach- und vierfach-positive Fraktionen (s. Abb. 11 A), was sich in den 1D-Plots (s. Abb. 11 B und C) und Histogrammen (s. Abb. 11 D und E) bestätigte. Dieses Phänomen wurde auch im vorherigen invertierten ddPCR-Protokoll nach Alcaide et al beschrieben.<sup>63</sup> Als nächstes wurde das neue Quadruplex-Protokoll auf Robustheit und Linearität anhand einer Verdünnungsreihe von gDNA getestet. Hierfür wurde gDNA der Zelllinie SK-N-AS mit DNA-Inputmengen 0,5-130 ng verwendet und dieselben Mengen an gDNA von SH-EP ( $ALK^{F1174L}$ ) und CLB-GA ( $ALK^{R1275Q}$ ) als Referenzkontrollen untersucht. Die gemessenen Konzentrationen (Kopien/ $\mu$ l) der Targets  $ALK^{1174}$ ,  $ALK^{F1174L}$ ,  $ALK^{1275}$  und  $ALK^{R1275Q}$

wurden in Bezug zu der theoretisch zu erwartenden Konzentration dargestellt und Duplex- und Quadruplex-Protokolle miteinander verglichen. Es zeigt sich eine signifikante ( $p < 0,0001 - 0,0003$ ) und vergleichbare Korrelation der detektierten und theoretisch berechneten Konzentrationen aller gemessenen Gene im Duplex- und Quadruplex-Protokoll (Pearson's Korrelationskoeffizient „ $r$ “: Duplex 0,9871 – 0,9981; Quadruplex 0,9942 – 0,9981) (s. Abb. 12 A-D).



**Abbildung 12: Die Multiplex-ddPCR-Protokolle zur Quantifizierung der  $ALK^{F1174L}$ - und  $ALK^{R1275Q}$ -Konzentrationen messen die Input-Konzentrationen über einen breiten Bereich linear.** Aus SK-N-AS ( $ALK^{1174}$ ,  $ALK^{1275}$ ), SH-EP ( $ALK^{F1174L}$ ) und CLB-GA ( $ALK^{R1275Q}$ ) Zellen extrahierte und durch Ultraschall fragmentierte genomische DNA wurde als Template für die ddPCR-Reaktionen genutzt und seriell mit  $H_2O$  verdünnt, um Input-DNA-Mengen von 0,5, 2, 5, 10, 20, 80 und 130 ng Input-DNA zu analysieren. Dargestellt ist die Korrelationsachse von theoretisch berechneten  $ALK^{1174}$ - (A),  $ALK^{F1174L}$ - (B),  $ALK^{1275}$ - (C) und  $ALK^{R1275Q}$ -Konzentrationen (D) (x-Achse) und den gemessenen Konzentrationen in der Verdünnungsreihe mit dem Quadruplex- (rote Quadrate) und Duplex-ddPCR-Protokoll (schwarze Kreise) (y-Achse). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert  $\pm$  SD;  $n=3$ . (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Die Daten zeigen, dass das neu etablierte Quadruplex-Protokoll die *ALK*-Hotspot-Mutationen *ALK<sup>F1174L</sup>* und *ALK<sup>R1275Q</sup>* im Neuroblastom bei Input-DNA-Mengen von 0,5-130 ng konstant und akkurat detektieren kann.

Als nächstes wurden die Grenzwerte für die Sensitivität des Quadruplex-Protokolls ermittelt und mit den Grenzwerten der Duplex-Protokolle verglichen. Dafür wurde gDNA aus SH-EP (*ALK<sup>F1174L</sup>*) und CLB-GA (*ALK<sup>R1275Q</sup>*) mit Wildtyp-gDNA aus SK-N-AS in Schritten von 1:10 – 1:100.000 verdünnt. In Zellen mit dem *ALK*-Wildtyp wurden die MAFs als 0 % bestimmt.<sup>66</sup> Eine Neuroblastom-Zelle wurde als *ALK<sup>F1174L</sup>*-positiv bezeichnet bei folgenden Grenzwerten:  $\geq 4$  positive Droplets und mindestens 0.31 Kopien/ $\mu$ l bei bis zu 10 ng Input-DNA und  $\geq 5$  positive Droplets und mindestens 0.57 Kopien/ $\mu$ l für höhere DNA-Inputmengen.<sup>66</sup> Diese im Quadruplex-Protokoll ermittelten Grenzwerte waren denen der Duplex-Protokolle ( $\geq 4$  positive Droplets und mindestens 0.33 Kopien/ $\mu$ l) sehr ähnlich. Um eine Neuroblastom-Zelle als *ALK<sup>R1275Q</sup>*-positiv zu bezeichnen, variierten die Grenzwerte bezüglich der DNA-Inputmengen im Quadruplex- ( $\geq 5$  bis  $\geq 15$  positive Droplets und 0.42 bis 1.34 Kopien/ $\mu$ l) und Duplex-Protokoll ( $\geq 4$  bis  $\geq 17$  positive Droplets und 0.32 bis 1.31 Kopien/ $\mu$ l).<sup>66</sup> Zusammengefasst waren die Grenzwerte zur Detektion einer Neuroblastom-spezifischen *ALK*-Mutation im Quadruplex-Protokoll ähnlich zu den Grenzwerten im Duplex-Protokoll.

### **3.5. Detektion der MAFs von *ALK<sup>F1174L</sup>*- und *ALK<sup>R1275Q</sup>*-Hotspot-Mutationen in Neuroblastom-Zelllinien mittels des Quadruplex-Protokolls**

Das Quadruplex-Protokoll wurde in sechs verschiedenen Neuroblastom-Zelllinien getestet und die MAFs dieser bestimmt, wobei jeweils zwei Zelllinien die *ALK<sup>F1174L</sup>*-Mutation (SH-EP, Kelly), die *ALK<sup>R1275Q</sup>*-Mutation (CLB-GA, LAN-5) und einen *ALK*-Wildtyp aufwiesen (SK-N-AS, BE(2)-C). Von jeder dieser Zelllinien wurden 10 ng gDNA für den Versuch eingesetzt und jede Zelllinie in Triplikaten mit jeweils drei verschiedenen Extrakten vermessen. Anschließend wurden die gemessenen MAFs mit den Ergebnissen aus dem Duplex-Protokoll verglichen. Die MAFs von *ALK<sup>F1174L</sup>* bei Kelly waren im Quadruplex- ( $31,58 \pm 0,69$ ) und Duplex-Protokoll ( $31,20 \pm 0,52$ ) nahezu identisch (s. Tabelle 5). Dies bestätigte sich auch bei SH-EP bezüglich *ALK<sup>F1174L</sup>* im Quadruplex- ( $45,82 \pm 0,87$ ) und Duplex-Protokoll ( $48,64 \pm 0,31$ ) (s. Tabelle 5).

**Tabelle 5: Vergleich der Multiplex-ddPCR-Protokolle zur Detektion der  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{R1275Q}$  mutant allele fractions in Neuroblastom-Zelllinien. (modifiziert nach Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>**

Zelllinie *	$ALK^{F1174L}$ (3522, C>A)**		$ALK^{R1275Q}$ (3824, G>A)**	
	Quadruplex ddPCR	Duplex ddPCR	Quadruplex ddPCR	Duplex ddPCR
SH-EP	45.82 ± 0.87	48.64 ± 0.31	0	0
Kelly	31.58 ± 0.69	31.20 ± 0.52	0	0
CLB-GA	0	0	53.77 ± 0.52	53.04 ± 0.64
LAN-5	0	0	53.55 ± 1.95	51.45 ± 0.82
SK-N-AS	0	0	0	0
BE(2)-C	0	0	0	0

ddPCR, droplet digital PCR.

\*DNA Input: 10 ng.

\*\* Die mutant allele fraction ist dargestellt in % ± SD für  $n \geq 3$  Replikate; Eine mutant allele fraction von 0% weist einen  $ALK$  Wildtyp auf.

Die MAFs in CLB-GA, LAN-5 sowie den beiden  $ALK$ -Wildtyp-Zelllinien SK-N-AS und BE(2)-C betragen bezüglich  $ALK^{F1174L}$  wie erwartet 0 % in beiden ddPCR-Protokollen (s. Tabelle 5). Die  $ALK^{R1275Q}$ -positive Zelllinie CLB-GA zeigte bzgl. der MAF nahezu identische Ergebnisse im Quadruplex- ( $53,77 \pm 0,52$ ) und Duplex-Protokoll ( $53,04 \pm 0,64$ ) (s. Tabelle 5). Ähnliche Ergebnisse in der MAF wurden auch für LAN-5 im Quadruplex- ( $53,55 \pm 1,95$ ) und Duplex-Protokoll ( $51,45 \pm 0,82$ ) gemessen (s. Tabelle 5). Für SH-EP und Kelly sowie die beiden  $ALK$ -Wildtyp-Zellen SK-N-AS und BE(2)-C wurde bzgl.  $ALK^{R1275Q}$  mit beiden ddPCR-Protokollen eine MAF von 0 % gemessen (s. Tabelle 5). Die Ergebnisse der Zelllinien zeigen, dass das etablierte Quadruplex-Protokoll die beiden  $ALK$ -Hotspot-Mutationen  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{R1275Q}$  eindeutig detektieren kann.

### 3.6. Detektion von $ALK^{F1174L}$ und $ALK^{R1275Q}$ und deren *mutant allele fractions* in Tumor- und Plasmaproben von Neuroblastom-Patienten mit dem etablierten Quadruplex-Protokoll

Als nächstes wurde mit dem Quadruplex-Protokoll gDNA aus Tumorproben und deren zugehörige cfDNA aus Blutplasma von sechs verschiedenen Patienten mit Neuroblastom vermessen. Die Patienten waren entweder positiv für  $ALK^{F1174L}$  oder  $ALK^{R1275Q}$  oder wiesen einen  $ALK$ -Wildtyp auf. Für die Messungen wurde ein definiertes Volumen von 5  $\mu$ l eingesetzt und die Bestimmung der eingesetzten Input-DNA-Menge erfolgte anschließend durch die ddPCR selbst. Alle Proben wurden nur einmal vermessen, um Patientenmaterial zu sparen, und die MAF-Messungen des Quadruplex-Protokolls mit dem Duplex-Protokoll verglichen. Patient 4 und 5 waren nach ddPCR-Messungen positiv für  $ALK^{F1174L}$  und negativ bzw. Wildtyp für  $ALK^{R1275Q}$ . In der MAF von Patient 4 ergab sich bei der gDNA kein Unterschied (Quadruplex 48,17 % und Duplex 48,36 %), während bei der cfDNA die MAF mittels Quadruplex-Protokoll (59,29 %) deutlich von der Duplex-Messung (45,40 %) abwich (s. Tabelle 6). Auch bei Patient 5 waren die MAFs im Quadruplex- (11,07 % in der gDNA 36,27 % in der cfDNA) und Duplex-Protokoll (12,95 % in der gDNA und 35,20 % in der cfDNA) sehr ähnlich (s. Tabelle 6). Generell zeigt sich, dass die bestimmten MAFs – bis auf Patient 4 und 5 – in den gDNA Proben höher waren als in der cfDNA (s. Tabelle 6). Die Patienten 6, 7 und 8 waren alle  $ALK^{R1275Q}$ -positiv und wiesen einen Wildtyp bezüglich  $ALK^{F1174L}$  auf (s. Tabelle 6). Die MAFs bei Patient 6 waren in der gDNA (Quadruplex 47,92 % und Duplex 48,19 %) sehr ähnlich, während bei der cfDNA die Quadruplex-Messung (32,91 %) etwas höher als die Duplex-Messung war (28,90 %) (s. Tabelle 6). Für Patient 7 waren ebenfalls keine Unterschiede in den MAFs zwischen Quadruplex- (43,48 % in der gDNA und 21,99 % in der cfDNA) und Duplex-Protokoll (43,56 % in der gDNA und 22,10 % in der cfDNA) festzustellen (s. Tabelle 6). Patient 8 zeigte nach Untersuchung der gDNA eine höhere MAF beim Quadruplex-Protokoll (87,29 %) im Vergleich zum Duplex-Protokoll (77,96 %). Diese Unterschiede zeigten sich auch in der cfDNA, jedoch mit einer kleineren Abweichung (Quadruplex 71,90; Duplex 68,00) (s. Tabelle 6). Patient 9 war für beide Mutationen negativ und zeigte in beiden ddPCR-Protokollen für die gDNA und cfDNA eine MAF von 0 % und damit einen Wildtyp-Status (s. Tabelle 6).

**Tabelle 6: Vergleich der determinierten  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{R1275Q}$  mutant allele fractions in paarigen Blutplasma- und Tumorproben von Patienten mit Neuroblastom. (modifiziert nach Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>**

Patient	Probe*	$ALK^{F1174L}$ (3522, C>A)**		$ALK^{R1275Q}$ (3824, G>A)**	
		Quadruplex ddPCR	Duplex ddPCR	Quadruplex ddPCR	Duplex ddPCR
4	gDNA	48.17	48.36	0	0
	cfDNA	59.29	45.40	0	0
5	gDNA	11.07	12.95	0	0
	cfDNA	36.27	35.20	0	0
6	gDNA	0	0	47.92	48.19
	cfDNA	0	0	32.91	28.90
7	gDNA	0	0	43.48	43.65
	cfDNA	0	0	21.99	22.10
8	gDNA	0	0	87.29	77.96
	cfDNA	0	0	71.90	68.00
9	gDNA	0	0	0	0
	cfDNA	0	0	0	0

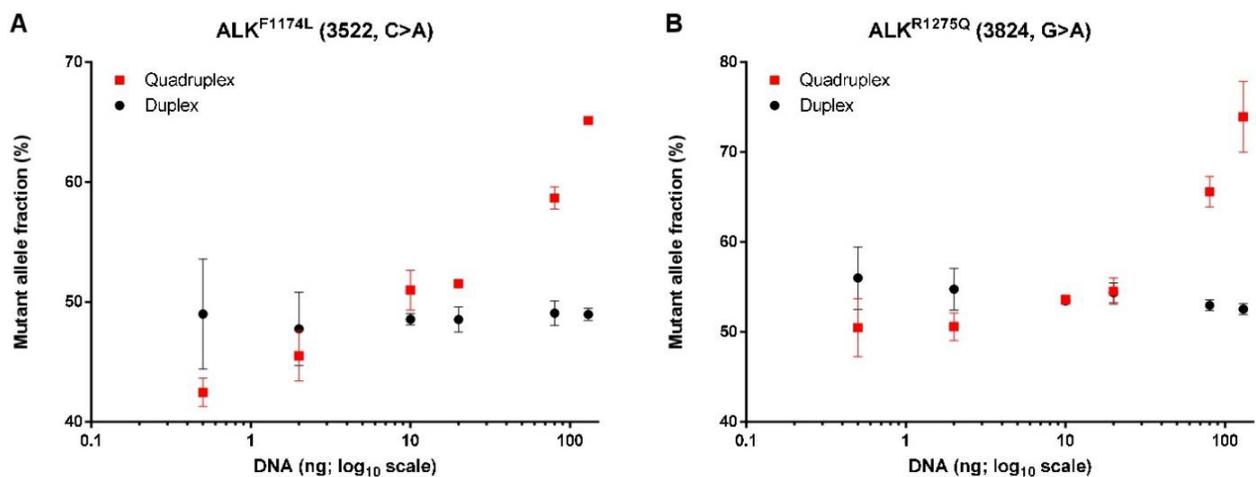
gDNA, genomische DNA; cfDNA, zellfreie (cell-free) DNA; ddPCR, droplet digital PCR.

\*Die Inputmenge an cfDNA reichte von 6,9 bis 72,6 ng, und die Inputmenge an gDNA reichte von 6,9 bis 98,5 ng.

\*\*Eine mutant allele fraction von 0% weist einen  $ALK$  Wildtyp auf.

Bei den Messunterschieden zwischen dem Duplex- und Quadruplex-Protokoll in der gDNA-Probe von Patient 8 und der cfDNA-Probe von Patient 4 zeigte sich, dass eine höhere DNA-Inputmenge im Vergleich zu den übrigen Patientenproben eingesetzt wurde (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde anhand von Zelllinien der Einfluss verschiedener Input-DNA-Mengen auf die MAF im Quadruplex- und Duplex-Protokoll überprüft. Hierzu wurden zwei Verdünnungsreihen mit jeweils einer  $ALK^{F1174L}$ -positiven Zelllinie (SH-EP) und einer  $ALK^{R1275Q}$ -positiven Zelllinie (CLB-GA) untersucht. Mit dem Duplex- und Quadruplex-Protokoll wurden DNA-Inputmengen von 0,5, 2, 10, 20, 80 und 130 ng vermessen und die MAFs bestimmt. Die Versuchsergebnisse zeigen für  $ALK^{F1174L}$  bei DNA-Inputmengen bis zu 20 ng vernachlässigbar geringe Unterschiede durch mit

dem Quadruplex- und Duplex-Protokoll bestimmten MAFs (s. Abb. 13 A). Bei Mengen von >20 ng steigt die MAF im Quadruplex-Protokoll jedoch deutlich an, während im Duplex-Protokoll weiterhin dieselbe MAF über alle Mengen hinweg gemessen wird (s. Abb. 13 A). Auch für  $ALK^{R1275Q}$  zeigen sich bis zu einer DNA-Inputmenge von 20 ng nahezu identische MAFs in den Quadruplex- und Duplex-Protokollen, wohingegen bei Mengen von 80 und 130 ng das Duplex-Protokoll weiterhin dieselbe MAF misst, während diese im Quadruplex-Protokoll stark ansteigt (s. Abb. 13 B).



**Abbildung 13:** Der Vergleich der  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{R1275Q}$  mutant allele fractions zwischen den Duplex- und Quadruplex-ddPCR-Protokollen zeigt sehr ähnliche Ergebnisse in Ansätzen mit einem DNA-Input von weniger als 20 ng und eine Überschätzung in Quadruplex-Protokollen bei höherem DNA-Input. **A** und **B:** Aus SH-EP ( $ALK^{F1174L}$ ) (**A**) und CLB-GA ( $ALK^{R1275Q}$ ) Zellen (**B**) extrahierte und durch Ultraschall fragmentierte genomische DNA wurde als Template für die ddPCR-Reaktionen genutzt und seriell mit  $H_2O$  verdünnt, um Input-DNA-Mengen von 0,5, 2, 5, 10, 20, 80 und 130 ng zu analysieren. Die mutant allele fractions (y-Achse) wurden mit dem Duplex- (schwarze Kreise) und Quadruplex-Protokollen (rote Quadrate) bestimmt und gegen die Menge an Input-DNA (x-Achse) aufgetragen. Die Daten sind dargestellt als mittlere Prozentwerte  $\pm$  SD; n=3. (Abbildung aus Peitz et al, 2020)<sup>66</sup>

Dieses Phänomen basiert am ehesten auf der Unterschätzung der doppelt-positiven Droplets (Mutante + Wildtyp) im selben Kanal, da deren Fluoreszenz aufgrund des Mechanismus der kompetitiven ddPCR nicht stark genug ist, um eine höhere Amplitude zu erreichen und daher in den einfach-positiven Droplets maskiert ist, wodurch die Software eine höhere MAF berechnet.<sup>63</sup> Die Ergebnisse zeigen, dass das Quadruplex-Protokoll akkurat die  $ALK$ -Hotspot-Mutationen  $ALK^{F1174L}$  und  $ALK^{R1275Q}$  in Tumor- und Plasmaproben von Patienten mit Neuroblastom detektieren und die MAF bis zu einem Limit von 20 ng Input-DNA genau bestimmen kann.

## 4. Diskussion

Bei Säuglingen und Kleinkindern mit einem Körpergewicht kleiner als 10 kg ist es eine große Herausforderung in regelmäßigen Abständen genügend Blutvolumen für eine Molekularanalyse zu erhalten, ohne dabei die Hämoglobinwerte beträchtlich zu senken oder im Extremfall sogar eine iatrogen induzierte Bluttransfusion erforderlich zu machen.<sup>66</sup> Die Volumina für Blutproben sind bei Säuglingen und Kindern aus ethischer Sicht auf ein Maximum von 1 ml bzw. 3 ml beschränkt.<sup>66</sup> Bei der Aufreinigung von Blutproben für Analysen in unserer Arbeitsgruppe haben wir die Erfahrung gemacht, dass wir im Schnitt DNA-Mengen zwischen 10 und 130 ng in 50 µl Elutionsbuffer für die molekulare Analyse zur Verfügung haben. Bei den publizierten Duplex-ddPCR-Protokollen zur Analyse der *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl werden jeweils 5 µl des cfDNA-Extraktes benötigt.<sup>59</sup> Mit dem bisherigen Duplex-Protokoll sind somit bereits 20 % des cfDNA-Extraktes der jeweiligen Probe verbraucht. Das Detektieren von >2 DNA-Targets in einer ddPCR-Reaktion konnte bereits bei anderen Tumoren wie dem diffusen großzelligen B-Zell und follikulärem Lymphom sowie dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom gezeigt werden.<sup>63, 96</sup> Um Multiplex-ddPCR-Protokolle zu etablieren, sind diverse Optimierungen der PCR-Reaktion erforderlich, wobei in der Literatur im Wesentlichen drei Hauptpunkte für Multiplex-Protokolle beschrieben sind: (i) Veränderung der Sondenkonzentrationen, (ii) Veränderung der Primerkonzentrationen oder (iii) Veränderung der Annealing-Temperatur des PCR-Cycler Programms.<sup>62</sup> Durch Variieren der Sonden- und Primerkonzentration ist es uns gelungen, die *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl mit den beiden Referenzen *NAGK* und *AFF3* in einer gemeinsamen ddPCR Reaktion zu bestimmen. Das neue Protokoll zeigte bezüglich Linearität und Robustheit in DNA-Verdünnungsreihen ähnliche Ergebnisse wie in den Duplex- und Triplex-Protokollen. Mit unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass die Quadruplex-ddPCR nicht nur eine hocheffiziente, sondern auch eine robuste Analysemethodik ist und den Status der *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl genau bestimmen kann. Mit unserem neuen Quadruplex Protokoll benötigen wir nur noch 5 µl des cfDNA-Extraktes für die gesamte Analyse des Kopienanzahl-Status, wodurch mehr Volumen für weitere Analysen vorhanden ist. Eine Limitierung bei der ddPCR-Analyse ist, dass es sich um eine Target-Analyse handelt, welche auf einen sehr kurzen Abschnitt an DNA-Basenpaaren, oftmals weniger als 100 Nukleotide, beschränkt ist.<sup>66</sup> Unser Protokoll hat somit eine sehr hohe Messgenauigkeit, jedoch auf einen kleinen Bereich im Gen begrenzt. Diese Erkenntnis spiegelt sich auch in unseren Ergebnissen wieder. In der NB-1 Zelllinie maßen wir im Vergleich zu unseren vorher publizierten Daten eine höhere *ALK*-Amplifikation, was darauf zurückzuführen ist, dass wir in unseren neuen Multiplex-Protokollen ein neues *ALK*-Primerpaar und eine neue *ALK*-Sonde gesetzt

haben, welcher auf einem anderen Genabschnitt von *ALK* liegt, der stärker amplifiziert zu sein scheint. Das neue *ALK*-Primerpaar sowie die neue *ALK*-Sonde wurden gewählt, da die Fluoreszenzamplitude der neuen Sonde sich stärker von den negativen Droplet-Fractionen im Vergleich zur vorher verwendeten Sonde unterschied.<sup>59, 89</sup> Aus dem gleichen Grund zeigt sich dies auch bei der fehlenden Detektion der partiellen *ALK*-Amplifikation in der IMR-5-Zelllinie.<sup>75</sup> Die Ergebnisse zeigen, dass sich die ddPCR als hochsensitives Analysetool im klinischen Alltag im Rahmen des longitudinalen Monitorings von Patienten mit Neuroblastom bei der Analyse von *Liquid Biopsies* anbietet. Aufgrund der natürlichen Limitationen der ddPCR sollte diese jedoch mit einem Next Generation Sequencing, welches zwar weniger sensitiv ist, dafür aber viele Gene parallel analysieren kann, kombiniert werden, wie z.B. zum Zeitpunkt der Initialdiagnose oder beim Verdacht auf ein Rezidiv.<sup>66</sup> Durch Einführen von *AFF3* (auf dem 2q11.2-Arm) als zweite Referenz konnten wir die Robustheit unseres neuen Multiplex-Protokolls erhöhen, da wir nun eine interne Kontrolle zwischen beiden Referenzgenen zur Verfügung hatten. Auf diese Weise lässt sich eine potenzielle Veränderung der Kopienanzahl in einem der beiden gut etablierten Referenzgene in Patientenproben detektieren und somit eine Fehlkalkulation der *MYCN*- und *ALK*-Kopienanzahl vermeiden.<sup>66</sup> *AFF3* wurde als Referenzgen gewählt, da dieses sowohl in der Pathologie der Charité als Referenz bei den FISH-Analysen zur Neuroblastom-Diagnostik verwendet als auch in der Literatur als weitere Referenz neben *NAGK* empfohlen wird.<sup>38</sup> Die Analyse der Kelly-Zelllinie zeigt bei Verwendung des Triplex- und Quadruplex-Protokolls eine etwa 30 % höhere *MYCN*- und *ALK*-Amplifikation, die darauf schließen lässt, dass eine der beiden Referenzen in ihrer Kopienanzahl vom diploiden Status abweicht. Die Etablierung der Detektion der beiden *ALK*-Hotspot-Mutationen *ALK*<sup>F1174L</sup> und *ALK*<sup>R1275Q</sup> in einem Quadruplex-Protokoll erfolgte durch Anwendung eines zuvor publizierten „invertierten“ ddPCR-Protokolls.<sup>63</sup> Bei geringen DNA-Mengen bis 20 ng konnten wir *ALK*<sup>F1174L</sup> und die entsprechende Wildtyp-Sequenz *ALK*<sup>1174</sup> in Kanal 1 (FAM) und *ALK*<sup>R1275Q</sup> und die entsprechende Wildtyp-Sequenz *ALK*<sup>1275</sup> in Kanal 2 (HEX) erfolgreich detektieren sowie die MAFs akkurat bestimmen. Beim ddPCR-Protokoll zur Detektion von Mutationen zeigt sich im Versuchsaufbau ein wesentlicher Unterschied zur ddPCR der Kopienanzahl-Bestimmung. Im Protokoll zur Mutationsdetektion erfolgt die Amplifikation der mutierten Sequenz und der Wildtyp-Sequenz mittels des gleichen Primerpaares. Daher kommt es zur Konkurrenz beider PCR-Reaktionen um die gleichen Ressourcen im Droplet, was zu einer verminderten Fluoreszenzintensität der doppel-positiven Droplets führt.<sup>63</sup> Dieses bekannte Phänomen zeigt sich auch bei Duplex-ddPCR-Reaktionen in denen Mutante und Wildtyp in zwei Kanälen getrennt detektiert werden, was dazu führt, dass die doppelt-positiven Droplet-Fractionen zu den einfach-positiven Fractionen des jeweils anderen Kanals hin verschoben werden und somit vielmehr

diagonal als orthogonal im 2D-Plot lokalisiert sind.<sup>57, 58, 60, 97</sup> Bei Proben mit geringer Input-DNA-Menge ist die Häufigkeit des Auftretens von doppelt-positiven Droplets statistisch gesehen gering, sodass sich die gemessene MAF im Duplex- und Quadruplex-Protokoll nicht signifikant unterscheidet. Bei Einsatz höherer DNA-Mengen hingegen wird die MAF mit dem invertierten Quadruplex-Protokoll überschätzt, da die doppelt-positiven Droplets keine höhere Fluoreszenzamplitude wie die einfach-positiven Droplets aufweisen und dadurch nicht von diesen unterschieden werden können.<sup>66</sup> Im Duplex-Protokoll hingegen sind die doppelt-positiven Droplets zwischen den beiden einfach-positiven Droplet-Fraktionen aus dem jeweiligen Kanal lokalisiert, sodass diese auch noch bei DNA-Mengen von >20 ng klar abgegrenzt und die MAF präzise berechnet werden kann. Die natürliche Limitation des invertierten ddPCR-Protokolls, welches in dieser Arbeit etabliert wurde, erfordert daher, die DNA-Inputmenge auf maximal 20 ng zu beschränken, sodass eine akkurate Analyse der MAFs gewährleistet ist.<sup>66</sup> Die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Quadruplex-ddPCR-Protokolle ermöglichen mit einer hohen Sensitivität und geringen Kosten, die Kopienanzahl zu bestimmen und Hotspot-Mutationen zu detektieren, die für das Monitoring und die Behandlung von Kindern mit einem Neuroblastom eine wichtige Grundlage in der klinischen Routine bilden.<sup>66</sup>

## Referenzen

1. Stiller CA, Parkin DM. International variations in the incidence of neuroblastoma. *International journal of cancer*. 1992;52(4):538-43.
2. Matthay KK, Maris JM, Schleiermacher G, Nakagawara A, Mackall CL, Diller L, Weiss WA. Neuroblastoma. *Nature reviews Disease primers*. 2016;2:16078.
3. London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL. Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(27):6459-65.
4. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(3):203-16.
5. Vo KT, Matthay KK, Neuhaus J, London WB, Hero B, Ambros PF, Nakagawara A, Miniati D, Wheeler K, Pearson AD, Cohn SL, DuBois SG. Clinical, biologic, and prognostic differences on the basis of primary tumor site in neuroblastoma: a report from the international neuroblastoma risk group project. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(28):3169-76.
6. Chicard M, Boyault S, Colmet Daage L, Richer W, Gentien D, Pierron G, Lapouble E, Bellini A, Clement N, Iacono I, Brejon S, Carrere M, Reyes C, Hocking T, Bernard V, Peuchmaur M, Corradini N, Faure-Contier C, Coze C, Plantaz D, Defachelles AS, Thebaud E, Gambart M, Millot F, Valteau-Couanet D, Michon J, Puisieux A, Delattre O, Combaret V, Schleiermacher G. Genomic Copy Number Profiling Using Circulating Free Tumor DNA Highlights Heterogeneity in Neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(22):5564-73.
7. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castleberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al. Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1993;11(8):1466-77.
8. Simon T, Hero B, Schulte JH, Deubzer H, Hundsdoerfer P, von Schweinitz D, Fuchs J, Schmidt M, Prasad V, Krug B, Timmermann B, Leuschner I, Fischer M, Langer T, Astrahantseff K, Berthold F, Lode H, Eggert A. 2017 GPOH Guidelines for Diagnosis and Treatment of Patients with Neuroblastic Tumors. *Klinische Padiatrie*. 2017;229(3):147-67.
9. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas. *The New England journal of medicine*. 1985;313(18):1111-6.
10. Huang M, Weiss WA. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2013;3(10):a014415.
11. Seeger RC, Wada R, Brodeur GM, Moss TJ, Bjork RL, Sousa L, Slamon DJ. Expression of N-myc by neuroblastomas with one or multiple copies of the oncogene. *Progress in clinical and biological research*. 1988;271:41-9.
12. Norris MD, Bordow SB, Haber PS, Marshall GM, Kavallaris M, Madafiglio J, Cohn SL, Salwen H, Schmidt ML, Hipfner DR, Cole SPC, Deeley RG, Haber M. Evidence that the MYCN oncogene regulates MRP gene expression in neuroblastoma. *European Journal of Cancer*. 1997;33(12):1911-6.
13. Shohet JM, Hicks MJ, Plon SE, Burlingame SM, Stuart S, Chen S-Y, Brenner MK, Nuchtern JG. Minichromosome Maintenance Protein MCM7 Is a Direct Target of the MYCN Transcription Factor in Neuroblastoma. *Cancer research*. 2002;62(4):1123-8.
14. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P, Laureys G, Speleman F, Kim C, Hou C, Hakonarson H, Torkamani A, Schork NJ, Brodeur GM, Tonini GP, Rappaport E, Devoto M, Maris JM. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. 2008;455(7215):930-5.
15. Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G, Valteau-Couanet D, Frebourg T, Michon J, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O. Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. 2008;455(7215):967-70.

16. Bresler SC, Weiser DA, Huwe PJ, Park JH, Krytska K, Ryles H, Laudenslager M, Rappaport EF, Wood AC, McGrady PW, Hogarty MD, London WB, Radhakrishnan R, Lemmon MA, Mosse YP. ALK mutations confer differential oncogenic activation and sensitivity to ALK inhibition therapy in neuroblastoma. *Cancer cell*. 2014;26(5):682-94.
17. Mosse YP, Lim MS, Voss SD, Wilner K, Ruffner K, Laliberte J, Rolland D, Balis FM, Maris JM, Weigel BJ, Ingle AM, Ahern C, Adamson PC, Blaney SM. Safety and activity of crizotinib for paediatric patients with refractory solid tumours or anaplastic large-cell lymphoma: a Children's Oncology Group phase 1 consortium study. *The Lancet Oncology*. 2013;14(6):472-80.
18. Mosse YP. Anaplastic Lymphoma Kinase as a Cancer Target in Pediatric Malignancies. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(3):546-52.
19. Eleveld TF, Oldridge DA, Bernard V, Koster J, Colmet Daage L, Diskin SJ, Schild L, Bentahar NB, Bellini A, Chicard M, Lapouble E, Combaret V, Legoix-Ne P, Michon J, Pugh TJ, Hart LS, Rader J, Attiyeh EF, Wei JS, Zhang S, Naranjo A, Gastier-Foster JM, Hogarty MD, Asgharzadeh S, Smith MA, Guidry Auvil JM, Watkins TB, Zwijnenburg DA, Ebus ME, van Sluis P, Hakkert A, van Wezel E, van der Schoot CE, Westerhout EM, Schulte JH, Tytgat GA, Dolman ME, Janoueix-Lerosey I, Gerhard DS, Caron HN, Delattre O, Khan J, Versteeg R, Schleiermacher G, Molenaar JJ, Maris JM. Relapsed neuroblastomas show frequent RAS-MAPK pathway mutations. *Nature genetics*. 2015;47(8):864-71.
20. Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T. High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours. *The Biochemical journal*. 2008;416(2):153-9.
21. Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S. Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature*. 2008;455(7215):971-4.
22. Trigg RM, Turner SD. ALK in Neuroblastoma: Biological and Therapeutic Implications. *Cancers*. 2018;10(4).
23. George RE, Sanda T, Hanna M, Fröhling S, Ii WL, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London WB, McGrady P, Xue L, Zozulya S, Gregor VE, Webb TR, Gray NS, Gilliland DG, Diller L, Greulich H, Morris SW, Meyerson M, Look AT. Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature*. 2008;455(7215):975-8.
24. Diskin SJ, Capasso M, Schnepf RW, Cole KA, Attiyeh EF, Hou C, Diamond M, Carpenter EL, Winter C, Lee H, Jagannathan J, Latorre V, Iolascon A, Hakonarson H, Devoto M, Maris JM. Common variation at 6q16 within HACE1 and LIN28B influences susceptibility to neuroblastoma. *Nature genetics*. 2012;44(10):1126-30.
25. Molenaar JJ, Domingo-Fernandez R, Ebus ME, Lindner S, Koster J, Drabek K, Mestdagh P, van Sluis P, Valentijn LJ, van Nes J, Broekmans M, Haneveld F, Volckmann R, Bray I, Heukamp L, Sprussel A, Thor T, Kieckbusch K, Klein-Hitpass L, Fischer M, Vandesompele J, Schramm A, van Noesel MM, Varesio L, Speleman F, Eggert A, Stallings RL, Caron HN, Versteeg R, Schulte JH. LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nature genetics*. 2012;44(11):1199-206.
26. Valentijn LJ, Koster J, Zwijnenburg DA, Hasselt NE, van Sluis P, Volckmann R, van Noesel MM, George RE, Tytgat GA, Molenaar JJ, Versteeg R. TERT rearrangements are frequent in neuroblastoma and identify aggressive tumors. *Nature genetics*. 2015;47(12):1411-4.
27. Peifer M, Hertwig F, Roels F, Dreidax D, Gartlgruber M, Menon R, Kramer A, Roncaioli JL, Sand F, Heuckmann JM, Ikram F, Schmidt R, Ackermann S, Engesser A, Kahlert Y, Vogel W, Altmüller J, Nurnberg P, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Mariappan A, Heynck S, Mariotti E, Henrich KO, Gloeckner C, Bosco G, Leuschner I, Schweiger MR, Savelyeva L, Watkins SC, Shao C, Bell E, Hofer T, Achter V, Lang U, Theissen J, Volland R, Saadati M, Eggert A, de Wilde B, Berthold F, Peng Z, Zhao C, Shi L, Ortmann M, Buttner R, Perner S, Hero B, Schramm A, Schulte JH, Herrmann C, O'Sullivan RJ, Westermann F, Thomas RK, Fischer M. Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*. 2015;526(7575):700-4.
28. Bown N, Cotterill S, Lastowska M, O'Neill S, Pearson AD, Plantaz D, Meddeb M, Danglot G, Brinkschmidt C, Christiansen H, Laureys G, Speleman F, Nicholson J, Bernheim A, Betts DR,

- Vandesompele J, Van Roy N. Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. 1999;340(25):1954-61.
29. Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM. Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *The New England journal of medicine*. 2005;353(21):2243-53.
  30. Strenger V, Kerbl R, Dornbusch HJ, Ladenstein R, Ambros PF, Ambros IM, Urban C. Diagnostic and prognostic impact of urinary catecholamines in neuroblastoma patients. *Pediatric blood & cancer*. 2007;48(5):504-9.
  31. Matthay KK, Shulkin B, Ladenstein R, Michon J, Giammarile F, Lewington V, Pearson AD, Cohn SL. Criteria for evaluation of disease extent by (123)I-metaiodobenzylguanidine scans in neuroblastoma: a report for the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Task Force. *British journal of cancer*. 2010;102(9):1319-26.
  32. Dubois SG, Geier E, Batra V, Yee SW, Neuhaus J, Segal M, Martinez D, Pawel B, Yanik G, Naranjo A, London WB, Kreissman S, Baker D, Attiyeh E, Hogarty MD, Maris JM, Giacomini K, Matthay KK. Evaluation of Norepinephrine Transporter Expression and Metaiodobenzylguanidine Avidity in Neuroblastoma: A Report from the Children's Oncology Group. *International journal of molecular imaging*. 2012;2012:250834.
  33. Biermann M, Schwarzlmuller T, Fasmer KE, Reitan BC, Johnsen B, Rosendahl K. Is there a role for PET-CT and SPECT-CT in pediatric oncology? *Acta radiologica (Stockholm, Sweden : 1987)*. 2013;54(9):1037-45.
  34. Sharp SE, Shulkin BL, Gelfand MJ, Salisbury S, Furman WL. 123I-MIBG scintigraphy and 18F-FDG PET in neuroblastoma. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2009;50(8):1237-43.
  35. Shimada H, Chatten J, Newton WA, Jr., Sachs N, Hamoudi AB, Chiba T, Marsden HB, Misugi K. Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 1984;73(2):405-16.
  36. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP. The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer*. 1999;86(2):364-72.
  37. Shimada H, Umehara S, Monobe Y, Hachitanda Y, Nakagawa A, Goto S, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK. International neuroblastoma pathology classification for prognostic evaluation of patients with peripheral neuroblastic tumors: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer*. 2001;92(9):2451-61.
  38. Ambros PF, Ambros IM, Brodeur GM, Haber M, Khan J, Nakagawara A, Schleiermacher G, Speleman F, Spitz R, London WB, Cohn SL, Pearson AD, Maris JM. International consensus for neuroblastoma molecular diagnostics: report from the International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Biology Committee. *British journal of cancer*. 2009;100(9):1471-82.
  39. Bagatell R, Beck-Popovic M, London WB, Zhang Y, Pearson AD, Matthay KK, Monclair T, Ambros PF, Cohn SL. Significance of MYCN amplification in international neuroblastoma staging system stage 1 and 2 neuroblastoma: a report from the International Neuroblastoma Risk Group database. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(3):365-70.
  40. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017;14(9):531-48.
  41. Reckamp KL, Melnikova VO, Karlovich C, Sequist LV, Camidge DR, Wakelee H, Perol M, Oxnard GR, Kosco K, Croucher P, Samuels E, Vibat CR, Guerrero S, Geis J, Berz D, Mann E, Matheny S, Rolfe L, Raponi M, Erlander MG, Gadgeel S. A Highly Sensitive and Quantitative Test Platform for Detection of NSCLC EGFR Mutations in Urine and Plasma. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2016;11(10):1690-700.
  42. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, James N, Rettig EM, Guo T, Pickering CR, Bishop JA, Chung CH, Califano JA, Eisele DW, Fakhry C, Gourin CG, Ha PK, Kang H, Kiess A, Koch WM, Myers JN, Quon H, Richmon JD, Sidransky D, Tufano RP, Westra

- WH, Bettegowda C, Diaz LA, Jr., Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Agrawal N. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Science translational medicine*. 2015;7(293):293ra104.
43. Kimura H, Fujiwara Y, Sone T, Kunitoh H, Tamura T, Kasahara K, Nishio K. EGFR mutation status in tumour-derived DNA from pleural effusion fluid is a practical basis for predicting the response to gefitinib. *British journal of cancer*. 2006;95(10):1390-5.
  44. De Mattos-Arruda L, Mayor R, Ng CKY, Weigelt B, Martinez-Ricarte F, Torrejon D, Oliveira M, Arias A, Raventos C, Tang J, Guerini-Rocco E, Martinez-Saez E, Lois S, Marin O, de la Cruz X, Piscuoglio S, Towers R, Vivancos A, Peg V, Ramon y Cajal S, Carles J, Rodon J, Gonzalez-Cao M, Tabernero J, Felip E, Sahuquillo J, Berger MF, Cortes J, Reis-Filho JS, Seoane J. Cerebrospinal fluid-derived circulating tumour DNA better represents the genomic alterations of brain tumours than plasma. *Nature communications*. 2015;6:8839.
  45. Diehl F, Schmidt K, Durkee KH, Moore KJ, Goodman SN, Shuber AP, Kinzler KW, Vogelstein B. Analysis of mutations in DNA isolated from plasma and stool of colorectal cancer patients. *Gastroenterology*. 2008;135(2):489-98.
  46. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(6):579-86.
  47. 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 research*. 2001;61(4):1659-65.
  48. Stroun M, Lyautey J, Lederrey C, Olson-Sand A, Anker P. About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2001;313(1-2):139-42.
  49. Hashad D, Sorour A, Ghazal A, Talaat I. Free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2012;26(6):467-72.
  50. Park JL, Kim HJ, Choi BY, Lee HC, Jang HR, Song KS, Noh SM, Kim SY, Han DS, Kim YS. Quantitative analysis of cell-free DNA in the plasma of gastric cancer patients. *Oncology letters*. 2012;3(4):921-6.
  51. Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA, Jr. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature medicine*. 2008;14(9):985-90.
  52. Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA, Jr., Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(45):16368-73.
  53. Holdhoff M, Schmidt K, Donehower R, Diaz LA, Jr. Analysis of circulating tumor DNA to confirm somatic KRAS mutations. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(18):1284-5.
  54. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, Bright IJ, Lucero MY, Hiddessen AL, Legler TC, Kitano TK, Hodel MR, Petersen JF, Wyatt PW, Steenblock ER, Shah PH, Bousse LJ, Troup CB, Mellen JC, Wittmann DK, Erndt NG, Cauley TH, Koehler RT, So AP, Dube S, Rose KA, Montesclaros L, Wang S, Stumbo DP, Hodges SP, Romine S, Milanovich FP, White HE, Regan JF, Karlin-Neumann GA, Hindson CM, Saxonov S, Colston BW. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical chemistry*. 2011;83(22):8604-10.
  55. Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA, Gallichotte EN, Ruf IK, Hindson BJ, Vessella RL, Tewari M. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nature methods*. 2013;10(10):1003-5.
  56. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(16):9236-41.
  57. Denis JA, Patroni A, Guillerme E, Pepin D, Benali-Furet N, Wechsler J, Manceau G, Bernard M, Coulet F, Larsen AK, Karoui M, Lacorte JM. Droplet digital PCR of circulating tumor cells from colorectal cancer patients can predict KRAS mutations before surgery. *Molecular oncology*. 2016;10(8):1221-31.
  58. Vanova B, Kalman M, Jasek K, Kasubova I, Burjanivova T, Farkasova A, Kruzliak P, Busselberg D, Plank L, Lasabova Z. Droplet digital PCR revealed high concordance between primary tumors

- and lymph node metastases in multiplex screening of KRAS mutations in colorectal cancer. *Clinical and experimental medicine*. 2019;19(2):219-24.
59. Lodrini M, Sprussel A, Astrahantseff K, Tiburtius D, Korschak R, Lode HN, Fischer M, Keilholz U, Eggert A, Deubzer HE. Using droplet digital PCR to analyze MYCN and ALK copy number in plasma from patients with neuroblastoma. *Oncotarget*. 2017;8(49):85234-51.
  60. Combaret V, Iacono I, Bellini A, Brejon S, Bernard V, Marabelle A, Coze C, Pierron G, Lapouble E, Schleiermacher G, Blay JY. Detection of tumor ALK status in neuroblastoma patients using peripheral blood. *Cancer medicine*. 2015;4(4):540-50.
  61. Hughesman CB, Lu XJ, Liu KY, Zhu Y, Poh CF, Haynes C. A Robust Protocol for Using Multiplexed Droplet Digital PCR to Quantify Somatic Copy Number Alterations in Clinical Tissue Specimens. *PLoS one*. 2016;11(8):e0161274.
  62. Whale AS, Huggett JF, Tzonev S. Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular detection and quantification*. 2016;10:15-23.
  63. Alcaide M, Yu S, Bushell K, Fornika D, Nielsen JS, Nelson BH, Mann KK, Assouline S, Johnson NA, Morin RD. Multiplex Droplet Digital PCR Quantification of Recurrent Somatic Mutations in Diffuse Large B-Cell and Follicular Lymphoma. *Clinical chemistry*. 2016;62(9):1238-47.
  64. Dobnik D, Stebih D, Blejec A, Morisset D, Zel J. Multiplex quantification of four DNA targets in one reaction with Bio-Rad droplet digital PCR system for GMO detection. *Scientific reports*. 2016;6:35451.
  65. Castro F, Dirks WG, Fahrnich S, Hotz-Wagenblatt A, Pawlita M, Schmitt M. High-throughput SNP-based authentication of human cell lines. *International journal of cancer*. 2013;132(2):308-14.
  66. Peitz C, Sprüssel A, Linke RB, Astrahantseff K, Grimaldi M, Schmelz K, Toedling J, Schulte JH, Fischer M, Messerschmidt C, Beule D, Keilholz U, Eggert A, Deubzer HE, Lodrini M. Multiplexed Quantification of Four Neuroblastoma DNA Targets in a Single Droplet Digital PCR Reaction. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2020.
  67. Schmitt M, Pawlita M. High-throughput detection and multiplex identification of cell contaminations. *Nucleic acids research*. 2009;37(18):e119.
  68. Oude Luttikhuis MEM, Iyer VK, Dyer S, Ramani P, McConville CM. Detection of MYCN Amplification in Neuroblastoma using Competitive PCR Quantitation. *Laboratory Investigation*. 2000;80(2):271-3.
  69. Muth D, Ghazaryan S, Eckerle I, Beckett E, Pöhler C, Batzler J, Beisel C, Gogolin S, Fischer M, Henrich KO, Ehemann V, Gillespie P, Schwab M, Westermann F. Transcriptional repression of SKP2 is impaired in MYCN-amplified neuroblastoma. *Cancer research*. 2010;70(9):3791-802.
  70. McDermott U, Iafrate AJ, Gray NS, Shioda T, Classon M, Maheswaran S, Zhou W, Choi HG, Smith SL, Dowell L, Ulkus LE, Kuhlmann G, Greninger P, Christensen JG, Haber DA, Settleman J. Genomic alterations of anaplastic lymphoma kinase may sensitize tumors to anaplastic lymphoma kinase inhibitors. *Cancer research*. 2008;68(9):3389-95.
  71. Kumps C, Fieuw A, Mestdagh P, Menten B, Lefever S, Pattyn F, De Brouwer S, Sante T, Schulte JH, Schramm A, Van Roy N, Van Maerken T, Noguera R, Combaret V, Devalck C, Westermann F, Laureys G, Eggert A, Vandesompele J, De Preter K, Speleman F. Focal DNA copy number changes in neuroblastoma target MYCN regulated genes. *PLoS one*. 2013;8(1):e52321.
  72. Amler LC, Schwab M. Amplified N-myc in human neuroblastoma cells is often arranged as clustered tandem repeats of differently recombined DNA. *Molecular and Cellular Biology*. 1989;9(11):4903-13.
  73. Hachitanda Y, Saito M, Mori T, Hamazaki M. Application of fluorescence in situ hybridization to detect N-myc (MYCN) gene amplification on paraffin-embedded tissue sections of neuroblastomas. *Medical and pediatric oncology*. 1997;29(2):135-8.
  74. Osajima-Hakomori Y, Miyake I, Ohira M, Nakagawara A, Nakagawa A, Sakai R. Biological role of anaplastic lymphoma kinase in neuroblastoma. *The American journal of pathology*. 2005;167(1):213-22.
  75. De Brouwer S, De Preter K, Kumps C, Zabrocki P, Porcu M, Westerhout EM, Lakeman A, Vandesompele J, Hoebeeck J, Van Maerken T, De Paepe A, Laureys G, Schulte JH, Schramm A, Van Den Broecke C, Vermeulen J, Van Roy N, Beiske K, Renard M, Noguera R, Delattre O, Janoueix-Lerosey I, Kogner P, Martinsson T, Nakagawara A, Ohira M, Caron H, Eggert A, Cools

- J, Versteeg R, Speleman F. Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(17):4353-62.
76. Kohl NE, Kanda N, Schreck RR, Bruns G, Latt SA, Gilbert F, Alt FW. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*. 1983;35(2, Part 1):359-67.
  77. Duijkers FAM, Gaal J, Meijerink JPP, Admiraal P, Pieters R, de Krijger RR, van Noesel MM. Anaplastic lymphoma kinase (ALK) inhibitor response in neuroblastoma is highly correlated with ALK mutation status, ALK mRNA and protein levels. *Cellular Oncology*. 2011;34(5):409-17.
  78. Corvi R, Amler LC, Savelyeva L, Gehring M, Schwab M. MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(12):5523-7.
  79. Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Maris JM. Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene*. 1999;18(35):4948-57.
  80. Krishna A, Biryukov M, Trefois C, Antony PMA, Hussong R, Lin J, Heinäniemi M, Glusman G, Köglberger S, Boyd O, van den Berg BHJ, Linke D, Huang D, Wang K, Hood L, Tholey A, Schneider R, Galas DJ, Balling R, May P. Systems genomics evaluation of the SH-SY5Y neuroblastoma cell line as a model for Parkinson's disease. *BMC Genomics*. 2014;15(1):1154.
  81. Izumi H, Kaneko Y. Evidence of asymmetric cell division and centrosome inheritance in human neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(44):18048-53.
  82. Yusuf M, Leung K, Morris KJ, Volpi EV. Comprehensive cytogenomic profile of the in vitro neuronal model SH-SY5Y. *neurogenetics*. 2013;14(1):63-70.
  83. Kim G-J, Park S-Y, Kim H, Chun Y-H, Park S-H. Chromosomal aberrations in neuroblastoma cell lines identified by cross species color banding and chromosome painting. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2001;129(1):10-6.
  84. Corvi R, Savelyeva L, Schwab M. Duplication of N-MYC at its resident site 2p24 may be a mechanism of activation alternative to amplification in human neuroblastoma cells. *Cancer research*. 1995;55(16):3471-4.
  85. Thiele C. *Neuroblastoma Cell Lines*. J Human Cell Culture Lancaster, UK: Kluwer Academic Publishers. 1998;1:21-53.
  86. Van Roy N, Van Limbergen H, Vandesomepele J, Van Gele M, Poppe B, Laureys G, De Paepe A, Speleman F. Chromosome 2 short arm translocations revealed by M-FISH analysis of neuroblastoma cell lines. *Medical and pediatric oncology*. 2000;35(6):538-40.
  87. Kryh H, Carén H, Erichsen J, Sjöberg R-M, Abrahamsson J, Kogner P, Martinsson T. Comprehensive SNP array study of frequently used neuroblastoma cell lines; copy neutral loss of heterozygosity is common in the cell lines but uncommon in primary tumors. *BMC Genomics*. 2011;12(1):443.
  88. Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2000;132:365-86.
  89. Gotoh T, Hosoi H, Iehara T, Kuwahara Y, Osone S, Tsuchiya K, Ohira M, Nakagawara A, Kuroda H, Sugimoto T. Prediction of MYCN amplification in neuroblastoma using serum DNA and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(22):5205-10.
  90. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist Reviews*. 2008;29 Suppl 1:S49-52.
  91. Andrews S. *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. 2010 [Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>].
  92. Li H. Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *ArXiv*. 2013;1303.
  93. Faust GG, Hall IM. SAMBLASTER: fast duplicate marking and structural variant read extraction. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2014;30(17):2503-5.
  94. Talevich E, Shain AH, Botton T, Bastian BC. CNVkit: Genome-Wide Copy Number Detection and Visualization from Targeted DNA Sequencing. *PLoS computational biology*. 2016;12(4):e1004873.

95. Yu Q, Huang F, Zhang M, Ji H, Wu S, Zhao Y, Zhang C, Wu J, Wang B, Pan B, Zhang X, Guo W. Multiplex picoliter-droplet digital PCR for quantitative assessment of EGFR mutations in circulating cell-free DNA derived from advanced non-small cell lung cancer patients. *Molecular medicine reports*. 2017;16(2):1157-66.
96. Vannitamby A, Hendry S, Irving L, Steinfors D, Bozinovski S. Novel multiplex droplet digital PCR assay for scoring PD-L1 in non-small cell lung cancer biopsy specimens. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2019;134:233-7.
97. Shaw JA, Guttery DS, Hills A, Fernandez-Garcia D, Page K, Rosales BM, Goddard KS, Hastings RK, Luo J, Ogle O, Woodley L, Ali S, Stebbing J, Coombes RC. Mutation Analysis of Cell-Free DNA and Single Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer Patients with High Circulating Tumor Cell Counts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2017;23(1):88-96.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Constantin Peitz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Die simultane Detektion von vier Neuroblastom-DNA-Targets in zellfreier DNA mittels droplet digital PCR / Simultaneous detection of four neuroblastoma DNA targets in cell-free DNA from liquid biopsies via droplet digital PCR** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Constantin Peitz hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

**Publikation 1:** Peitz C, Sprüssel A, Linke RB, Astrahantseff K, Grimaldi M, Schmelz K, Toedling J, Schulte JH, Fischer M, Messerschmidt C, Beule D, Keilholz U, Eggert A, Deubzer HE, Lodrini M. *Multiplexed Quantification of Four Neuroblastoma DNA Targets in a Single Droplet Digital PCR Reaction*. J Mol Diagn. 2020 Aug 26:S1525-1578(20)30446-3. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.07.006. Epub ahead of print. PMID: 32858250.

Beitrag im Einzelnen:

Ich habe in Rücksprache mit Dr. phil. nat. Marco Lodrini die Etablierungsschritte der beiden Quadruplex-ddPCR-Protokolle geplant. Die Durchführung und anschließende Auswertung der ddPCR-Experimente erfolgte durch mich.

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte durch Jasmin Wünschel und Daniela Tiburtius. Die Aufbereitung der Patientenproben und Extraktion der cfDNA erfolgte durch mich und Daniela Tiburtius.

Nachfolgende Testungen der neu etablierten ddPCR-Protokolle an Zelllinien und Patientenproben erfolgten ebenfalls durch mich. Die Duplex-ddPCR Daten der *ALK*-Mutationen zur Bestimmung des *Limit of detection* und der *False positive rate* sowie einzelne Werte bzgl. der *mutant allele fractions* wurden durch Dr. Annika Sprüssel bereitgestellt. Clemens Messerschmidt hat die Analyse der WES-Daten übernommen.

Die Abbildungen und Tabellen in dieser Arbeit sowie der Publikation wurden, sofern nicht anders gekennzeichnet, durch mich erstellt. In Zusammenarbeit mit Dr. phil. nat. Marco Lodrini und PD Dr. med. Hedwig Deubzer entstand das Manuskript.

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## Auszug aus der Journal Summary List (ISI Web of Knowledge)

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **'PATHOLOGY'** Selected Category Scheme: WoS **Gesamtanzahl: 76**  
**Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	ACTA NEUROPATHOLOGICA	20,206	18.174	0.041640
2	Annual Review of Pathology-Mechanisms of Disease	4,585	13.833	0.008460
3	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,876	6.878	0.006420
4	Seminars in Immunopathology	3,337	6.804	0.007880
5	MODERN PATHOLOGY	13,735	6.365	0.021560
6	BRAIN PATHOLOGY	5,263	6.352	0.007880
7	AMERICAN JOURNAL OF SURGICAL PATHOLOGY	21,132	6.155	0.023420
8	JOURNAL OF PATHOLOGY	15,994	5.942	0.021030
9	CELLULAR ONCOLOGY	1,382	5.020	0.001950
10	JOURNAL OF MOLECULAR DIAGNOSTICS	3,673	4.426	0.008880
11	CANCER CYTOPATHOLOGY	2,863	4.425	0.005450
12	ARCHIVES OF PATHOLOGY & LABORATORY MEDICINE	10,039	4.151	0.012630
13	Disease Models & Mechanisms	5,133	4.028	0.013930
14	AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY	38,051	3.762	0.026180
15	LABORATORY INVESTIGATION	10,025	3.684	0.009110
16	ADVANCES IN ANATOMIC PATHOLOGY	1,518	3.530	0.002250
17	Brain Tumor Pathology	739	3.509	0.001470
18	JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY	9,205	3.460	0.007510
19	ENDOCRINE PATHOLOGY	1,263	3.366	0.001910
20	HISTOPATHOLOGY	9,584	3.294	0.011870

## Ausgewählte Publikation

Peitz C, Sprüssel A, Linke RB, Astrahantseff K, Grimaldi M, Schmelz K, Toedling J, Schulte JH, Fischer M, Messerschmidt C, Beule D, Keilholz U, Eggert A, Deubzer HE, Lodrini M. *Multiplexed Quantification of Four Neuroblastoma DNA Targets in a Single Droplet Digital PCR Reaction*. J Mol Diagn. 2020 Aug 26:S1525-1578(20)30446-3. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.07.006. Epub ahead of print. PMID: 32858250.

<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.07.006>

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

# Komplette Publikationsliste

## Publikationen:

- 26.08.2020 **Peitz C**, Sprüssel A, Linke RB, Astrahantseff K, Grimaldi M, Schmelz K, Toedling J, Schulte JH, Fischer M, Messerschmidt C, Beule D, Keilholz U, Eggert A, Deubzer HE, Lodrini M. *Multiplexed Quantification of Four Neuroblastoma DNA Targets in a Single Droplet Digital PCR Reaction*. J Mol Diagn. 2020 Aug 26:S1525-1578(20)30446-3. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.07.006. Epub ahead of print. PMID: 32858250.  
Impact Factor: 5.553 (2019)

## Präsentationen:

### Vorträge

- 19.11.2019 **Peitz C**, Sprüssel A, Linke RB, Astrahantseff K, Grimaldi M, Schmelz K, Toedling J, Schulte JH, Fischer M, Messerschmidt C, Beule D, Keilholz U, Eggert A, Deubzer HE, Lodrini M. *Multiplexed Quantification of Four Neuroblastoma DNA Targets in a Single Droplet Digital PCR Reaction*.  
Joint SIOPEN Biology and Liquid Biopsy Meeting, Wien, Österreich

### Poster

- 25.01.2021 **Peitz C**, Sprüssel A, Linke RB, Astrahantseff K, Grimaldi M, Schmelz K, Toedling J, Schulte JH, Fischer M, Messerschmidt C, Beule D, Keilholz U, Eggert A, Deubzer HE, Lodrini M. *Multiplexed Quantification of Four DNA Targets in a Single Droplet Digital PCR Reaction*.  
Akzeptiert für Poster-Präsentation beim Advances in Neuroblastoma Research 2021 Meeting vom 25.01 – 27.01.2021

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau PD Dr. med. Hedwig Deubzer bedanken, die mir dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat und bei Fragen jederzeit ansprechbar war.

Außerdem möchte ich ganz herzlich Herrn Dr. phil. nat. Marco Lodrini für seinen steten Rat bei Fragen oder Problemen während der Experimente und Auswertungen danken. Der gesamten Arbeitsgruppe Deubzer danke ich für die schöne Zeit und gegenseitige Unterstützung im Labor.

Besonders danke ich auch meiner Familie, meiner Freundin und meinen Freunden für ihr stets offenes Ohr und aufmunternden Gespräche, wenn es im Rahmen dieser Arbeit zu besonderen Herausforderungen kam.