

Aus dem Institut für Klinische Chemie
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Michael Neumaier)

Über die Proteinbindung frei zirkulierender DNA (cfDNA)

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Maximilian Strauß

aus
Northeim
2023

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Neumaier

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	3
1.1 Desoxyribonukleinsäure	3
1.2 Dynamische Nukleosomenorganisation.....	4
1.3 Zirkulierende Nukleinsäuren in Plasma und Serum	5
1.4 Zellfreie DNA	6
1.4.1 Vorkommen und Struktur	6
1.4.2 Herkunft	7
1.4.3 Funktion	9
1.4.4 Abbau	10
1.4.5 Mitochondriale cfDNA	11
1.4.6 cfDNA bei verschiedenen Krankheitszuständen	11
1.4.7 cfDNA in der Schwangerschaft.....	14
1.4.8 Technische Aspekte bei der Analyse von cfDNA.....	15
1.4.9 Zusammenfassung	16
1.5 Interaktionen der cfDNA mit Plasmaproteinen	16
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Geräte.....	19
2.1.2 Kits.....	20
2.1.3 Enzyme.....	20
2.1.4 Reagenzien.....	21
2.1.5 Puffer	22
2.1.6 Primer	23
2.1.7 Antikörper	23

2.1.8	Software.....	23
2.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	24
2.1.10	Plasmaproben.....	24
2.1.11	Zelllinien.....	24
2.2	Methoden.....	25
2.2.1	Zellkultur	25
2.3	Molekularbiologische Methoden	26
2.3.1	Isolierung von genomischer DNA	26
2.3.2	Messung der DNA-Konzentration	27
2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
2.3.4	DNA-Aufreinigung.....	30
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.3.6	Chromatinextraktion.....	31
2.4	Biochemische Methoden.....	32
2.4.1	Enzymatische Methylierung.....	32
2.4.2	Methylierungssensitiver Restriktionsverdau.....	32
2.4.3	Pull-down-Assay aus Blutplasma.....	33
2.4.4	Quantifizierung der Fibronectinbindung mittels markierter Antikörper	36
2.4.5	Fibronectin-Bindungs-Assay.....	36
2.4.6	ELISA zum Nachweis nukleosomengebundenen Fibronectins.....	37
2.5	Massenspektrometrie	38
3	ERGEBNISSE.....	40
3.1	Herstellung von Amplikons	40
3.1.1	DNA-Isolierung	40
3.1.2	PCR.....	40
3.1.3	Enzymatische Methylierung.....	41
3.2	Identifikation von Fibronectin als cfDNA-bindendes Protein	45
3.2.1	Bindung der Amplikons an magnetische Beads.....	45
3.2.2	Abspaltung der DNA nach Inkubation im Plasma	45
3.2.3	Unspezifische Bindung abundanter Plasmaproteine	47
3.2.4	Identifikation von cfDNA-bindenden Proteinen	53
3.3	Sequenz- und Methylierungsspezifität der Bindung von Fibronectin	56
3.3.1	Quantifizierung mittels Pull-down-Assay.....	57
3.3.2	Quantifizierung durch abgewandelten ELISA	60

3.3.3	Fazit.....	63
3.4	Bindung von Fibronektin an Nukleosomen	63
3.4.1	Isolierung von Nukleosomen.....	63
3.4.2	Fibronektin Bindungs-Assay	64
4	DISKUSSION	66
4.1	Nachweis cfDNA-bindender Proteine im Blutplasma	66
4.1.1	Auswahl von Genabschnitten und Zelllinien	66
4.1.2	Pull-down-Assay zur Identifikation DNA-bindender Proteine im Blutplasma.....	67
4.1.3	Untersuchung der Interaktion von Fibronektin mit histongebundener DNA	69
4.2	Eine neue Rolle von Plasma-Fibronektin?	69
4.2.1	Die Bedeutung von Fibronektin im menschlichen Blutplasma	70
4.2.2	Fibronektin als cfDNA-bindendes Protein	72
4.2.3	Auswirkungen einer Bindung von cfDNA durch Fibronektin.....	74
4.2.4	Ausblick	76
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	78
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	79
7	TABELLARISCHER ANHANG	100
7.1	Tabellenverzeichnis	100
7.2	Abbildungsverzeichnis	103
	LEBENS LAUF.....	105
	DANKSAGUNG	107

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter, Mikroliter
µM	Mikromolar
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
CNAPS	Zirkulierende Nukleinsäuren in Plasma und Serum (<i>Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum</i>)
cfDNA	Zirkulierende freie DNA (<i>circulating free DNA</i>)
ctDNA	Zirkulierende Tumor-DNA (<i>circulating tumor DNA</i>)
D	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
gDNA	Genomische DNA
GN	Gene Name
h	Stunde(n)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
kDA	Kilodalton
M	Molar
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
N	Normal
NFR	Nucleosome-free region

ng	Nanogramm, Nanogramm
nm	Nanometer, Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
OS	Organism species
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Protein existence
POD	Peroxidase
ppm	Parts per million
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SV	Sequence version
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt

1 EINLEITUNG

1.1 Desoxyribonukleinsäure

Der Schweizer Chemiker Friedrich Miescher identifizierte 1869 erstmals „Nuclein“ aus Leukozyten – eine bis dahin unbekannte Substanz, deren Entdeckung jedoch den Grundstein für die heutige molekulargenetische Forschung legte.¹ Die Funktion dieser – heute als Desoxyribonukleinsäure (DNS, engl. DNA) bezeichneten – Substanz als Träger des Erbguts wurde jedoch erst 1944 entdeckt.² Die grundlegende Struktur der DNA besteht aus einer Doppelhelix mit zueinander komplementären Basenpaaren (bp).³ DNA liegt im Zellkern jedoch nicht als bloße Doppelhelix vor, sondern in einem komplex geordneten Gebilde mit assoziierten Proteinen, das als Chromatin bezeichnet wird.⁴ Die grundlegende Einheit des Chromatins besteht aus dem Nukleosom, einem DNA-Abschnitt von 147bp, der um ein Oktamer (gen. *Core*-Partikel) aus Histonproteinen gewickelt ist.⁵ Im Chromatin wiederholt sich diese Struktureinheit immer wieder und stellt so die erste Stufe der Organisation der DNA dar. Einzelne Nukleosomen werden von üblicherweise 10 bis 90bp *Linker*-DNA verbunden.^{5,6} Die Entdeckung dieser Struktur gelang u. a. durch den enzymatischen Abbau von isolierter DNA durch eine DNase, bei dem als Endprodukt Fragmente mit spezifischen Längen resultierten.⁶ Diese entsprachen jeweils der Länge eines Nukleosoms bzw. eines Vielfachen hiervon. Bereits bei dieser Entdeckung wurden als Ursache für dieses Phänomen DNA-bindende Proteine vermutet, die später als die genannten Histone identifiziert werden konnten.⁷ Des Weiteren ließ sich bereits damit ein wichtiger Hinweis auf eine Funktion von Chromatin-assoziierten Proteinen gewinnen, nämlich die Stabilisierung der DNA und der Schutz vor enzymatischem Abbau.

Die einzelnen Nukleosomen, die wie „Perlen an einer Schnur“ nacheinander aufgereiht sind, werden im Chromatin durch weitere Proteine miteinander verbunden und sind in übergeordneten Strukturen organisiert.⁸ *In vitro* wurde eine 30 nm durchmessende, aus „zusammengepackten“ Nukleosomen bestehende Faser identifiziert, die daher lange als vorherrschende Struktureinheit der DNA angenommen wurde.⁸ Elektronenmikroskopische Studien *in situ* zeigten jedoch abweichende Ergebnisse und konnten neben der 30nm-Faser auch noch andere DNA-Organisationsformen nachweisen.⁹⁻¹¹ Die genaue Struktur des Chromatins im Nukleus bleibt daher weiterhin der Gegenstand aktueller Forschung.

1.2 Dynamische Nukleosomenorganisation

Die Organisation des Chromatins in Nukleosomen ist nicht statisch, sondern wird durch sämtliche Prozesse an der DNA wie Transkription oder Replikation beeinflusst.¹² Umgekehrt spielt jedoch auch die Sekundär- und Tertiärstruktur der DNA eine wichtige Rolle in epigenetischen Regulationsmechanismen. Den Nukleosomen als grundlegendes Strukturelement und den Histonen kommt hierbei eine besondere Bedeutsamkeit zu. Binden die Histone eines *Core*-Partikels an die DNA und leiten so die Bildung eines Nukleosomen ein, ist der entsprechende Abschnitt der DNA für den Transkriptionsapparat nicht mehr zugänglich und epigenetisch inaktiviert.^{13,14} Regulatorische Bereiche der DNA, die für die Bindung von Transkriptionsfaktoren zugänglich sind, sind daher im Allgemeinen weniger dicht mit Nukleosomen besetzt als kodierende DNA-Abschnitte, die einen dichteren Nukleosomenbesatz aufweisen.¹⁴ Insbesondere in dem Promotorbereich zahlreicher Gene lassen sich so nukleosomfreie Regionen (*Nucleosome-free regions*, NFRs) nachweisen.¹⁵ Promotoren von aktiv exprimierten Genen weisen dabei einen besonders geringen Besatz mit Nukleosomen auf.¹⁶ Die Positionen der Nukleosomen werden sowohl von der DNA-Sequenz des entsprechenden Abschnitts als auch von remodelierenden Enzymen dynamisch bestimmt.¹⁷ Somit sind die genauen Nukleosomenpositionen jeder Zelle abhängig von der jeweiligen Genexpression und damit auch von dem jeweiligen Zelltyp oder der Gewebeart.

Bei der Untersuchung von Nukleosomenpositionen auf der DNA wird häufig der Umstand genutzt, dass Nukleosomen nicht nur den Zugang von Transkriptionsfaktoren, sondern auch von DNA-spaltenden Enzymen beeinflussen. Die DNA wird hierbei durch eine Endonuklease wie DNase I oder Mikrokokkale Nuklease (MNase) verdaut, welche die DNA bevorzugt zwischen den Nukleosomen bzw. in nukleosomenfreien Regionen spalten. Die DNA-Sequenzierung der entstandenen Fragmente ergibt anschließend ein Abbild der Nukleosomenpositionen, welche die DNA vor Verdauung schützen.¹⁸ Eine ähnliche Spaltung geschieht auch *in vivo* bei der Apoptose von Zellen, die einen wesentlichen Beitrag zu der Freisetzung von zellfreier DNA (cfDNA) im Blutplasma hat (s. 2.4.2.1). Die Proteinbindung der DNA und hier insbesondere die Nukleosomenstruktur hat also auch einen unmittelbaren Einfluss auf die cfDNA, wie im Folgenden weiter ausgeführt wird.

1.3 Zirkulierende Nukleinsäuren in Plasma und Serum

Im Blutplasma zirkulierende Nukleinsäuren (*Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum*; CNAPS) wurden erstmals 1948 von Mandel et al. beschrieben, die DNA im Blutplasma von gesunden Probanden nachweisen konnten.¹⁹ Genauere Angaben zur Struktur oder Herkunft konnten jedoch seinerzeit noch nicht gemacht werden. Wesentliche Fortschritte auf diesem Gebiet wurden erst ca. 30 Jahre nach der ursprünglichen Entdeckung mit der Erfindung der DNA-Sequenzierung gemacht. Bis heute konnten neben DNA auch weitere Nukleinsäuren im Blut nachgewiesen werden.^{20,21} Im Blut zirkulierende DNA, als zirkulierende freie DNA (*circulating free DNA*; cfDNA) bezeichnet, ist unter den CNAPS am längsten und besten erforscht. Erst deutlich später als zirkulierende DNA wurde 1987 erstmals zirkulierende RNA im Blut nachgewiesen.²² Eine Sonderform der DNA stellt die ebenfalls im Blutplasma nachzuweisende mitochondriale DNA dar.^{20,23}

Eine wichtige Funktion bei den zirkulierenden Nukleinsäuren nehmen extrazelluläre Vesikel ein, die im Blutplasma zu finden sind und sowohl DNA als auch RNA enthalten können.²⁴ Unterschieden werden Exosomen, Mikrovesikel und apoptotische Körperchen.

Exosomen sind kleine (30 – 100nm Durchmesser), von verschiedensten Zellen aktiv freigesetzte extrazelluläre Vesikel, die u. a. im Blut nachgewiesen werden konnten.²⁵ Exosomen können sowohl DNA als auch RNA enthalten und quantitativ scheint sogar der überwiegende Anteil der gesamten RNA und DNA im Blutplasma in Exosomen lokalisiert zu sein.^{26,27} Exosomen entstehen im endosomalen System und werden anschließend durch Fusion der Endosomen mit der Zellmembran durch Exozytose freigesetzt.²⁸

Neben den Exosomen existieren noch weitere extrazelluläre Vesikel, wie Mikrovesikel und apoptotische Körperchen, die ebenfalls Nukleinsäuren enthalten können.²⁴ Mikrovesikel unterscheiden sich von den Exosomen hinsichtlich des Freisetzungsmechanismus, da diese Vesikel direkt aus Ausstülpungen der Zellmembran selbst entstehen.²⁸ Als apoptotische Körperchen werden im Rahmen der Apoptose aus einer Zelle entstehende, umschlossene Vesikel u. a. mit Resten von Cytoplasma oder Zellorganellen bezeichnet.²⁸ Eine besondere Herausforderung bei der Untersuchung von extrazellulären Vesikeln und ihren Inhalten liegt in der Separation der unterschiedlichen Vesikel voneinander um eine differenzierte Analyse dieser funktionell sehr verschiedenen Entitäten zu ermöglichen.²⁹

1.4 Zellfreie DNA

Als zellfreie DNA (circulating free DNA; cfDNA) wird freie, außerhalb von Zellen vorkommende DNA bezeichnet. Im engeren Sinne wird mit dieser Bezeichnung auf die im Blutplasma zirkulierende cfDNA Bezug genommen. Zellfreie DNA findet sich jedoch auch in anderen Körperflüssigkeiten wie Urin oder Liquor. Die vorliegende Arbeit bezieht sich im Wesentlichen auf die erstgenannte, im Blutplasma zu findende cfDNA.

1.4.1 Vorkommen und Struktur

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass die im Blutplasma von gesunden Menschen vorkommende cfDNA doppelsträngig und hauptsächlich in Fragmenten von etwa 160 – 180 bp auftritt,^{20,23,30-34} was ungefähr der Länge der DNA in einem Nukleosom bzw. einem Chromosom entspricht. Daneben kommen auch in geringerer Menge Fragmente mit einer Länge vor, die einem Vielfachen dieser Zahl entspricht. Die durchschnittliche Menge an cfDNA bei gesunden Menschen liegt bei 10 – 15 ng pro Milliliter.^{20,35} Diese Gesamtkonzentration unterliegt jedoch individuellen Schwankungen und kann durch verschiedene Krankheitszustände beeinflusst werden, worauf noch in Abschnitt 1.4.6 eingegangen wird.

Zumindest ein Teil der gesamten cfDNA liegt, wie bereits die Fragmentverteilung vermuten lässt, an Histone gebunden – also in Form von Nukleosomen oder Chromosomen – im Plasma vor.³⁶ Da die Nukleosomenpositionen in Zellen nicht zufällig, sondern genau determiniert sind (s. 1.2), entsprechen die Fragmente der cfDNA einem Abbild dieser Positionen, was Rückschlüsse auf das Ursprungsgewebe und dessen Zustand ermöglicht.³⁴ Eine genaue Quantifizierung, zu welchem Teil cfDNA an Nukleosomen gebunden oder frei vorliegt, steht jedoch noch aus. Weiterhin unbekannt bleiben auch Details hinsichtlich der Interaktion der cfDNA bzw. des cfDNA-Nukleosomen-Komplexes mit Plasmabestandteilen nach ihrer Freisetzung.

Ein weiterer Aspekt bei der Untersuchung von cfDNA ergibt sich aus der wachsenden Bedeutung von zirkulierenden Exosomen und deren Inhalt. Eine Analyse der in Exosomen enthaltenen cfDNA hat wie bereits erwähnt ergeben, dass eventuell sogar ein Großteil der im Plasma vorhandenen cfDNA – in der vorliegenden Studie ca. 90 % – Bestandteil von Exosomen ist.²⁶ Bei der spezifisch aus Exosomen isolierten DNA ließ sich weiterhin kein Unterschied hinsichtlich der schon

beschriebenen Fragmentverteilung im Vergleich zu der frei vorliegenden cfDNA feststellen.³⁷ Hierdurch ergeben sich Fragen hinsichtlich der Herkunft bzw. des Freisetzungsmechanismus der cfDNA, wie im folgenden Abschnitt weiter diskutiert wird.

1.4.2 Herkunft

Die genaue Herkunft der cfDNA und die Kinetik der Freisetzung sind noch nicht im Detail geklärt und werden teils kontrovers diskutiert. In den folgenden Ausführungen werden die wichtigsten möglichen Freisetzungsmechanismen einschließlich ihrer Evidenz dargestellt.

1.4.2.1 Apoptose und Nekrose

Die vorherrschende Meinung ist, dass ein Großteil der bei gesunden Personen im Blut vorkommenden cfDNA im Rahmen apoptotischer Vorgänge freigesetzt wird.²³ Ein entscheidender Hinweis hierauf findet sich in der bereits beschriebenen Fragmentierung der cfDNA, die der entspricht, die im Rahmen der Apoptose bei der Spaltung der DNA zwischen den Nukleosomen durch eine DNase entsteht. Die in Nukleosomen enthaltene DNA von jeweils ca. 147 bp¹² ist, wie schon dargestellt, vor dem Abbau durch DNasen geschützt⁶, während die Linker-DNA von ca. 80 bp³⁸ gespalten werden kann. Durch eine Spaltung der Linker-DNA an jeweils geringfügig unterschiedlichen Positionen erklären sich auch die weiterhin beobachteten Abweichungen bei den Fragmentlängen, die sich um ca. 160 bp als Mittelwert gruppieren.³³ Eine genauere Analyse der auftretenden Fragmentlängen zeigte des Weiteren, dass diese sich mit einer Periodizität von 10bp um den genannten Mittelwert gruppieren, was dem beobachteten Muster bei dem Verdau der DNA durch eine DNase im Rahmen der Apoptose entspricht.³³ Modellhaft konnte so auch bewiesen werden, dass humane Zellen – im vorliegenden Fall T-Zellen – bei der Apoptose DNA in ebensolchen löslichen Fragmenten freisetzen.³⁰

Der Großteil der cfDNA bei gesunden Probanden stammt aus Zellen der hämatopoietischen Reihe, was erstmals bei Untersuchungen der cfDNA bei knochenmarkstransplantierten Patienten deutlich wurde, in denen gezeigt werden konnte, dass ein Großteil der cfDNA bei diesen Patienten aus Spenderzellen stammte.³⁹ Später konnte darüber hinaus anhand des schon beschriebenen Nukleosomen-*Footprints* auf der cfDNA, der einem Abbild der epigenetischen

Regulation in der freisetzenden Zelle gleichkommt, die Herkunft aus Zellen der lymphatischen und myeloischen Reihe für den Großteil der cfDNA bestätigt werden.³⁴

Im Gegensatz zu der beschriebenen Spaltung der DNA während des apoptotischen Zelltods findet bei der Nekrose eine zufällige Spaltung der DNA statt, die zu einer kontinuierlichen Fragmentverteilung der freigesetzten DNA und insgesamt längeren DNA-Fragmenten von ca. 10.000bp führt.^{30,40} Zellfreie DNA-Fragmente dieser Länge sind bei gesunden Personen selten zu finden,^{23,30} weshalb davon auszugehen ist, dass der nekrotische Zelltod bei gesunden Personen wenig zur Freisetzung von cfDNA beiträgt. Für Patienten mit Tumorerkrankungen konnte jedoch gezeigt werden, dass bei ihnen auch ebensolche längeren Fragmente zu finden sind. Es kann deshalb angenommen werden, dass auch die Freisetzung von DNA beim nekrotischen Untergang von Zellen eine Bedeutung hat, möglicherweise im Rahmen von durch die jeweilige Grunderkrankung bedingtem Gewebeuntergang.^{30,41} Bei solchen Personen konnte des Weiteren auch anhand des schon erwähnten Nukleosomen-Footprinting³⁴ der Beitrag weiterer Gewebe neben der Hämatopoese zu der cfDNA beschrieben werden.

1.4.2.2 Aktive Freisetzung

Als zusätzlicher bzw. alternativer Freisetzungsmechanismus wird eine aktive Sekretion von DNA durch viable Zellen vorgeschlagen.⁴² Ein Hinweis hierauf ergab sich aus der Beobachtung, dass das Kulturmedium bestimmter humaner viabler Zellen eine DNA-Fraktion mit einer Länge von etwa 2000bp enthielt, die sich nicht durch Zelluntergang erklären ließ.^{43,44} Des Weiteren zeigten Untersuchungen von Tumorzelllinien, dass die Menge der in den Überstand freigesetzten DNA nicht mit der Anzahl apoptotischer Zellen korreliert, sondern mit dem Anteil der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus.^{44,45} Dies widerspricht einer Freisetzung von cfDNA hauptsächlich aus untergehenden Zellen. Dementsprechend sehen die genannten *In-vitro*-Studien die aktive Freisetzung als Hauptursprung für die cfDNA, wobei postuliert wird, dass diese teils in Exosomen und teils frei erfolgt.⁴⁵ In Bezug auf den Freisetzungsmechanismus konnten Experimente, in denen verschiedene Inhibitoren des zellulären Proteintransports verwendet und die freigesetzte DNA-Menge unter deren Einfluss bestimmt wurden, die Hypothese der aktiven Freisetzung bestätigen und außerdem belegen, dass hieran ein vesikulärer Transportmechanismus beteiligt ist.⁴⁶ Mit der jüngeren Erkenntnis, dass, wie schon beschrieben, ein Großteil der

cfDNA in Exosomen enthalten ist,^{26,37} ergibt sich ein weiterer Beleg für die aktive Freisetzung – insbesondere in Exosomen – als wichtigen, wenn nicht sogar hauptsächlichen Freisetzungsmechanismus. Interessanterweise bleibt dennoch die Fragmentierung der DNA in die schon genannten Nukleosomen entsprechenden Fragmente im Wesentlichen unumstritten.²⁶ Der genaue Mechanismus der Transition von DNA in Exosomen bleibt bislang weitestgehend ebenso unbekannt wie der Organbezug der in Exosomen freigesetzten DNA.

1.4.2.3 Fetale cfDNA

Als besonderer Mechanismus bei der Herkunft von cfDNA soll an dieser Stelle noch fetale DNA im Blut schwangerer Frauen erwähnt werden, die erstmals 1997 entdeckt wurde.⁴⁷ Der Anteil fetaler cfDNA an der gesamten mütterlichen cfDNA lässt sich in Abhängigkeit von dem Schwangerschafts-Trimenon mit rund 10 – 20 % bestimmen.⁴⁸ Fetale cfDNA weist eine Fragmentierung in kurze ca. 143 bp lange Fragmente auf. Entsprechend wird angenommen, dass auch in diesem Fall der apoptotische Zelluntergang eine wichtige Funktion einnimmt.⁴⁹

1.4.3 Funktion

Insbesondere vor dem Hintergrund, dass cfDNA auch aktiv freigesetzt wird und nicht nur ein Nebenprodukt des Zelluntergangs ist, ergeben sich Fragen nach ihrer Funktion. Hier scheint vor allem eine Bedeutung als interzellulärer Botenstoff wahrscheinlich zu sein. Hinweise hierauf finden sich z. B. in dem „Bystander-Effekt“, bei dem DNA aus dem Überstand von Zellen, in denen durch Bestrahlung Chromatinveränderungen ausgelöst wurden, bei Zugabe zu unbestrahlten Zellen ähnliche Veränderungen auch in diesen auslöst.⁵⁰ Ebenso konnte gezeigt werden, dass die DNA aus dem Überstand von Mammakarzinomzellen eine gesteigerte Teilungsrate in anderen Zelllinien induzieren konnte.⁴⁵ Auch das Plasma von Patienten mit kolorektalem Karzinom konnte in kultivierten Zellen eine onkogene Transformation auslösen.⁵¹ Umgekehrt lässt sich darstellen, dass freigesetzte DNA nicht teilungsfähiger HUVEC-Zellen die Teilungsrate von Zellen eines kolorektalen Karzinoms in Kultur senken.⁵² Im Einklang mit diesen Ergebnissen wird aktuell eine wichtige Funktion der cfDNA und anderer CNAPS bei der Entstehung von Metastasen vermutet.^{21,53} Ein indirekter Hinweis hierauf ergibt sich aus der Tatsache, dass das Fortschreiten und auch die Metastasierung einer Tumorerkrankung direkt mit der Menge der cfDNA korreliert.⁵⁴⁻⁵⁶ Eine besondere Bedeutung kommt hierbei

zirkulierenden Exosomen zu, die an der Entstehung der „Prä-Metastatischen Nische“ maßgeblich beteiligt sein sollen.⁵⁷ Tumoren zeigen eine deutlich erhöhte Freisetzung von Exosomen, die des Weiteren ebenfalls mit der Malignität korreliert.⁵⁷ Von Tumoren freigesetzte Exosomen lösen in den Zielgeweben vielfältige Effekte aus, die über eine erhöhte Vaskularisation, Veränderungen der Stromazellen oder Immunsuppression ein Eindringen und eine Einnistung von Tumorzellen erleichtern.^{58,59}

1.4.4 Abbau

Details hinsichtlich des Abbaus und der Stabilität der cfDNA im Blutplasma sind weitgehend noch ungeklärt. Untersuchungen mithilfe massiver paralleler Sequenzierung (Next Generation Sequencing) fetaler DNA im mütterlichen Blutplasma ergaben eine Eliminierung der cfDNA in zwei Phasen: einer schnellen Phase mit einer Halbwertszeit von ca. 2 Stunden und einer nachfolgenden langsamen Phase mit einer Halbwertszeit von ca. 13 Stunden. Endgültig nicht mehr nachweisbar war die fetale cfDNA nach ein bis zwei Tagen.⁶⁰ Des Weiteren konnte fetale DNA auch im mütterlichen Urin nachgewiesen werden. Aufgrund der erheblichen molekularen Massen von CNAPS wird daher eine renale Komponente bei der Ausscheidung von cfDNA vermutet.^{60,61} Die fetale cfDNA lag im Vergleich zu der cfDNA im Plasma in deutlich kleineren Fragmenten vor, was einen Hinweis auf einen enzymatischen Abbau darstellt.⁶¹ Untersuchungen mit markierten Mononukleosomen im Mausmodell konnten jedoch zeigen, dass diese zu mehr als 70 % hepatisch und nur zu einem sehr geringen Teil renal eliminiert wurden.⁶²

Im Blutplasma selbst konnte bereits vor 80 Jahren DNase-Aktivität insbesondere von DNase I, die ca. 90 % der Gesamt-Enzymaktivität ausmacht, nachgewiesen werden.^{63,64} In jüngeren Untersuchungen ließ sich auch zeigen, dass individuell unterschiedliche DNase-Aktivitäten durch verschiedene Krankheitszustände beeinflusst werden können und negativ mit der messbaren cfDNA-Konzentration korrelierten.^{65,66} Dies legt die Beteiligung der genannten DNase am Abbau von cfDNA nahe und ist außerdem ein Hinweis darauf, dass die cfDNA im Blutplasma in einem Gleichgewicht aus kontinuierlicher Freisetzung und gleichzeitigem Abbau vorliegt.

1.4.5 Mitochondriale cfDNA

Eine besondere Fraktion der cfDNA stellt zirkulierende mitochondriale DNA dar. Diese konnte erstmals nachgewiesen werden, als Zhong et al. eine mit Diabetes Mellitus Typ 2 assoziierte Mutation der mitochondrialen DNA in der cfDNA nachweisen konnten.⁶⁷ Im Gegensatz zur nukleären cfDNA liegt mitochondriale cfDNA in noch kleineren Fragmenten von ca. 30 – 60bp vor. Dies ist vermutlich dem Fehlen von Histonen und damit dem fehlenden Schutz dieser DNA vor dem Abbau durch DNasen geschuldet.⁶⁸ Es konnte auch gezeigt werden, dass die Konzentration der mitochondrialen cfDNA nicht immer mit der nukleären cfDNA korreliert,^{69,70} im Gegenteil: Bei Patientinnen mit Mammakarzinom konnte ein Abfall der mitochondrialen cfDNA im Vergleich zu gesunden Vergleichspersonen gezeigt werden, während bei der nukleären cfDNA ein Anstieg zu verzeichnen war. Diese Veränderung war in beiden Fällen hochsignifikant.⁷⁰ Bei Patienten mit einem Prostatakarzinom waren hingegen sowohl die nukleäre als auch die mitochondriale cfDNA gleichermaßen erhöht, wobei beide Fraktionen eine prognostische Vorhersagekraft für das *Outcome* des Patienten besitzen.⁶⁹ Dieses teilweise gegenläufige Verhältnis mit der cfDNA legt nahe, dass für mitochondriale cfDNA noch eigene, von der nukleären DNA unabhängige Freisetzungsmechanismen existieren könnten, die allerdings noch unzureichend verstanden sind.

Mitochondriale cfDNA ließ sich bei Krankheitszuständen, wie z. B. beim Myokardinfarkt⁷¹ oder bei Sepsis⁷², als potentieller Biomarker identifizieren. Bei der Sepsis erschien die mitochondriale cfDNA der nukleären cfDNA überlegen und stellte als Biomarker für schwere Zellschäden einen unabhängigen Prädiktor der Überlebensrate dar.

Insgesamt ist mitochondriale cfDNA ein verhältnismäßig unerforschtes Gebiet mit einigen vielversprechenden und teilweise von der nukleären cfDNA abweichenden Anwendungen. In vorliegender Arbeit wird sich jedoch im Wesentlichen auf die bislang besser erforschte nukleäre cfDNA konzentriert.

1.4.6 cfDNA bei verschiedenen Krankheitszuständen

1.4.6.1 cfDNA-Konzentration als Marker für Zelluntergang und Krankheitsschwere

Die Plasmakonzentration von cfDNA ist bei gesunden Personen interindividuell sehr variabel. Es lassen sich jedoch auch bei zahlreichen Erkrankungen Veränderungen in der cfDNA-Konzentration feststellen, die zumeist positiv mit der Ausprägung oder

der Schwere einer Erkrankung zu korrelieren scheinen. Die erhöhte Konzentration der cfDNA ist hier Ausdruck eines vermehrten Zelluntergangs. Am besten sind Veränderungen der Plasmakonzentration bei Tumorerkrankungen erforscht. Erhöhte Konzentrationen der cfDNA bei Tumorpatienten im Vergleich zu gesunden Personen wurden erstmals von Leon et al. beschrieben.³⁵ Im weiteren Verlauf konnten für viele verschiedene Tumorentitäten erhöhte cfDNA-Konzentrationen und auch ein Zusammenhang zwischen Tumorstadium oder Größe des Tumors und der gemessenen cfDNA-Konzentration nachgewiesen werden.^{35,73-75} Ebenfalls zeigten sich nach Strahlentherapie oder Resektion von Tumoren rückläufige cfDNA-Konzentrationen, was eine potentielle Nutzung der cfDNA-Konzentration sowohl als prognostischer Marker als auch zum Therapiemonitoring nahelegt.

Erhöhte cfDNA-Konzentrationen ließen sich weiterhin auch in Zusammenhang mit systemischen Entzündungsreaktionen bei sowohl infektiöser als auch autoimmuner Ursache im Körper nachweisen.^{72,76-78} Hohe cfDNA-Konzentration war bei septischen Patienten ein hochsignifikanter prognostischer Parameter und mit einer höheren Mortalität vergesellschaftet.⁷⁹ Umgekehrt konnte eine geringe cfDNA-Konzentration im Plasma eine infektiöse Ursache eines Fiebers fast vollständig ausschließen.⁸⁰

Auch nach kardiovaskulären Ereignissen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall ließen sich erhöhte Konzentrationen an cfDNA nachweisen, die quantitativ mit der Schwere der Erkrankung bzw. der Gewebeerstörung korrelierten.^{32,71,81-86} Im Falle des Herzinfarktes bleibt diese jedoch hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft hinter den etablierten kardialen Biomarkern zurück.^{81,82} Beim Schlaganfall zeigte sich eine gute prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Mortalität und der Schwere einer residualen neurologischen Symptomatik.^{84,85}

Insgesamt zeigt sich für verschiedene Krankheitszustände eine Korrelation der cfDNA mit dem Ausmaß der Gewebeerstörung oder der Schwere/Ausprägung, die quantitativ betrachtet Rückschlüsse auf klinische Parameter wie die Prognose oder ein Therapieansprechen erlaubt. Eine diagnostische Anwendung dieses Zusammenhangs ist jedoch unwahrscheinlich, da es bereits zahlreiche andere validierte Aktivitätsparameter gibt, die zum Teil auch deutlich einfacher bestimmbar sind als die cfDNA-Konzentrationen.

1.4.6.2 cfDNA als „Liquid Biopsy“ bei Tumorerkrankungen

Neben der Konzentration der cfDNA, die, wie schon dargelegt, eine eher unspezifische Korrelation mit Gewebeerstörung zeigt, lassen sich anhand der

Inhalte der cfDNA spezifischere Informationen über Krankheitsprozesse im Körper gewinnen. Insbesondere stehen Veränderungen der cfDNA in Zusammenhang mit Tumorerkrankungen im Vordergrund. Das Potential der cfDNA als diagnostisches Mittel wurde vor allem mit der Erkenntnis deutlich, dass die im Plasma von Tumorpatienten nachgewiesene DNA Eigenschaften hinsichtlich Struktur und Stabilität mit der DNA aus dem Tumor selbst teilt. Dies wurde als erster Hinweis darauf gewertet, dass zumindest ein Teil der cfDNA aus den Tumorzellen selbst stammt.⁸⁷ Diese aus Tumorzellen stammende cfDNA wird als „circulating tumor“-DNA, kurz ctDNA bezeichnet. Der Anteil der ctDNA an der gesamten cfDNA im Blut unterliegt großen Schwankungen im Bereich von weniger als 10% und mehr als 80%.^{88,89} Bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen konnte auch eine Änderung der Fragmentverteilung der cfDNA nachgewiesen werden. So wurden bei Tumorpatienten auch vermehrt längere Fragmente von 180 – 400 bp angetroffen, die bei gesunden Personen nur in sehr geringer Menge vorkommen. Der Anteil dieser Fragmente korrelierte mit der jeweiligen Tumorlast, was einen Hinweis auf zusätzliche Freisetzungsmechanismen von cfDNA bei Tumorpatienten neben der bei Gesunden vorherrschenden Freisetzung im Rahmen der Apoptose darstellt.^{90,91} Die ersten Untersuchungen zum möglichen klinischen Nutzen der cfDNA waren – wie bereits in Kapitel 1.4.6.1. – beschrieben auf quantitative Analysen der cfDNA in Relation zu Krankheitsstadium, Tumorgröße oder Ansprechen auf verschiedene Therapien konzentriert.

Für zahlreiche Tumoren konnten des Weiteren Übereinstimmungen zwischen Mutationen des Primärtumors und Mutationen in der cfDNA festgestellt werden.^{89,92-96} Dies stellt einerseits einen weiteren Beleg für die Herkunft der cfDNA aus Tumorzellen dar und bietet außerdem einen Ansatz für eine Genotypisierung des Tumors ohne invasive und mit potentiellen Komplikationen verbundene Biopsiemaßnahmen (i. e. liquid biopsy oder liquid profiling).⁹⁷ Darüber hinaus ergibt sich durch die Bestimmung der Kopienzahl tumorspezifischer Mutationen und somit indirekt der ctDNA ein zusätzlicher quantitativer Aspekt, der herkömmlichen Biopsien unzugänglich bleibt.

Beispielsweise konnte für einige tumorspezifische Mutationen gezeigt werden, dass bei quantitativer Bestimmung der Kopienzahl ein Rückschluss auf das klinische *Outcome* möglich ist.^{93,94,98} Ebenso korreliert die Kopienzahl tumorspezifischer Allele mit der Tumorgröße, wie am Beispiel mutierter EGFR-Allele des nicht kleinzelligen

Lungenkarzinoms gezeigt werden konnte.⁹⁵ Durch wiederholte Bestimmung der Kopienzahl mutierter Allele im Krankheitsverlauf und Abbildung ihrer Dynamik kann so z. B. ein Therapieansprechen durch einen Abfall der Kopienzahl kontrolliert und umgekehrt Rezidive oder Therapieversager frühzeitig erkannt werden.^{94,98}

Neben dem Nachweis tumorspezifischer Mutationen lässt sich auch eine Hypermethylierung bestimmter Genabschnitte in der cfDNA mit dem Auftreten von verschiedenen Tumoren in Verbindung bringen.⁹⁹⁻¹⁰³ Zumeist handelt es sich bei den methylierten Genabschnitten um den Promotor von Tumorsuppressorgenen. Das Ausmaß der Hypermethylierung verschiedener Promotoren korrelierte dabei mit dem Fortschreiten der Tumorerkrankung.¹⁰³ Des Weiteren gibt es auch Hinweise auf die mögliche Nutzung von ctDNA als prädiktivem Marker, z. B. beim Adenokarzinom des Pankreas, bei dem die Anzahl der hypermethylierten Genabschnitte eine Vorhersage der Überlebensdauer erlaubte.¹⁰⁴

Im Gegensatz zu den beschriebenen Mutationen auf der cfDNA, die vor allem bei fortgeschrittenen Krankheitsstadien nachweisbar waren,⁹⁶ konnten diese Hypermethylierungen auch bei Tumoren in frühen Krankheitsstadien nachgewiesen werden,¹⁰⁵ weshalb für diese auch eine Bedeutung als Screeningparameter möglich erscheint.¹⁰²

1.4.7 cfDNA in der Schwangerschaft

Mit dem Nachweis Y-chromosomaler DNA im Blutplasma von Müttern mit einem männlichen Fetus wurde erstmals gezeigt, dass während einer Schwangerschaft ein Teil der im mütterlichen Blut zirkulierenden DNA fetalen Ursprungs ist.⁴⁷ Zirkulierende fetale DNA kann ab ca. der siebten Schwangerschaftswoche nachgewiesen werden und steigt mit Fortschreiten der Schwangerschaft an.¹⁰⁶ Die aktuell vorherrschende Auffassung ist, dass die fetale cfDNA bei der Apoptose von Zellen des Zytotrophoblasten in das mütterliche Blutplasma freigesetzt wird,^{107,108} wobei grundsätzlich das gesamte fetale Genom im Blutplasma der Mutter abgebildet wird.⁴⁹

Ausgehend von diesen Erkenntnissen scheint eine Nutzung der cfDNA in der pränatalen Diagnostik nur logisch zu sein und tatsächlich gibt es verschiedene vielversprechende Ansätze, die sich zum Teil auch bereits in der klinischen Anwendung befinden. Ein häufig untersuchtes Thema ist die nicht invasive Detektion fetaler Aneuploidien, insbesondere bei Trisomie 21, 18 und 13,^{109,110} bei denen eine hohe Übereinstimmung der Ergebnisse eines cfDNA-Screenings mit dem jeweiligen

Goldstandard (Chorionzottenbiopsie bzw. Triple-Test) gezeigt werden konnte. Im Falle der Trisomie 21 war die Methode des cfDNA-Screenings sogar überlegen.¹⁰⁹ Besonders vielversprechend erscheint die genomweite Sequenzierung der fetalen cfDNA, mit der eine höhere Sensitivität als mit traditionellen Microarray-basierten Tests erreicht werden konnte.¹¹¹

Ein weiteres Anwendungsgebiet der Analyse fetaler cfDNA in der Pränataldiagnostik sind monogen vererbte Erkrankungen, wie z. B. β -Thalassämie oder Mukoviszidose. Auch hierfür gibt es Ansätze zum Nachweis der jeweiligen Erkrankung mithilfe fetaler cfDNA, z. B. durch Sequenzierung des betroffenen Gens¹¹² oder durch spezifische PCR-Methoden.¹¹³ Diesbezüglich lassen sich jedoch noch keine definitiven Aussagen zur klinischen Nutzbarkeit treffen.

1.4.8 Technische Aspekte bei der Analyse von cfDNA

Da cfDNA in einer variablen und verhältnismäßig geringen Konzentration im Plasma vorliegt, ergeben sich besondere Herausforderungen bei deren Analyse. Insbesondere gilt das für die Untersuchung von ctDNA, die wiederum nur einen unter Umständen sehr geringen Teil der Gesamt-cfDNA im Plasma ausmacht. Dementsprechend konnte auch gezeigt werden, dass unterschiedliche Isolierungs- bzw. Extraktionsmethoden einen nicht unerheblichen Einfluss auf die Ausbeute an cfDNA haben.¹¹⁴

Eine weitere Schwierigkeit stellt die mögliche Verunreinigung der cfDNA durch genomische DNA aus in der präanalytischen Phase lysierten Leukozyten dar. Diese wird u. a. während der Gerinnung einer Blutprobe verstärkt freigesetzt, weshalb dieser Effekt vor allem bei Serumproben und weniger in Plasmaproben beobachtet wird.^{115,116} Aber auch bei Isolierung der cfDNA aus einer EDTA-Plasmaprobe konnte wie bei Serumproben, allerdings in geringerem Ausmaß, mit der Zeit eine Zunahme der genomischen DNA festgestellt werden.¹¹⁷ Um eine Kontaminierung der cfDNA durch genomische DNA aus lysierten Zellen zu verhindern, ist also eine möglichst zeitnahe Zentrifugation der Probe zur Abtrennung der zellulären Bestandteile notwendig. Außerdem sollten ausreichend hohe G-Zahlen bei der Zentrifugation verwendet werden, um ein Verbleiben von Zellen im Überstand zu verhindern.¹¹⁸ Eine längere Aufbewahrung der Blutprobe, auch bei -20°C , sollte nicht erfolgen, da die Integrität der cfDNA durch Einfrieren und Auftauen beeinträchtigt werden kann, wohingegen eine Aufbewahrung der cfDNA nach der Isolation problemlos möglich zu sein scheint.¹¹⁵ Bei Lagerung einer Probe für längere Zeit bei Raumtemperatur kann

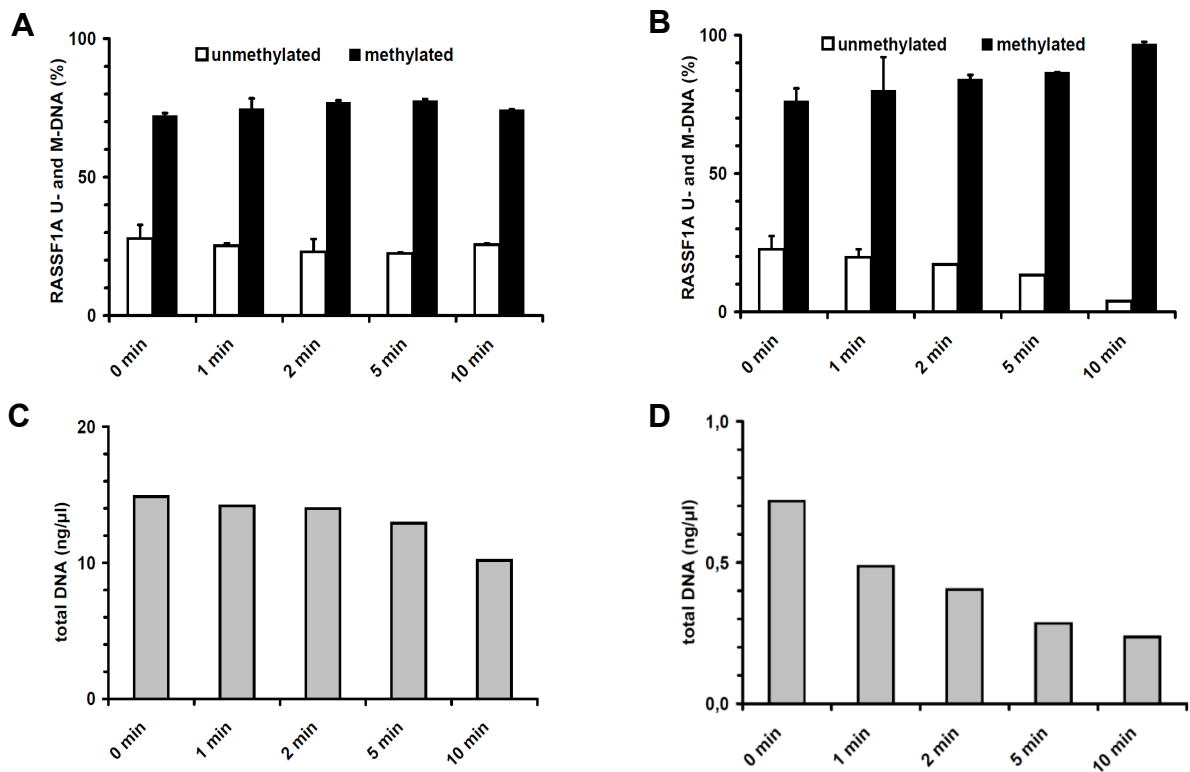
des Weiteren die Abnahme in ein Spezialröhrchen mit enthaltenem Zusatzstoff zur Stabilisierung der Blutzellen eine Freisetzung von gDNA aus diesen verhindern.¹¹⁷

1.4.9 Zusammenfassung

Wie in den vorangegangenen Ausführungen dargelegt, gibt es zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten für die cfDNA-Analyse als Biomarker bei sehr verschiedenen Krankheitszuständen. Diese befinden sich zum Teil auch bereits in der klinischen Erprobungs- bzw. Routinephase. Der Erforschung dieser zum Teil hochspeziellen Anwendungsmöglichkeiten auf der einen Seite steht auf der anderen Seite ein oft nur geringes Verständnis der zugrundeliegenden biologischen Mechanismen gegenüber. Insbesondere sind Details hinsichtlich des Abbaus der cfDNA und der Interaktion mit weiteren Plasmabestandteilen noch ungeklärt.

1.5 Interaktionen der cfDNA mit Plasmaproteinen

Es finden sich nur wenige Daten zur Stabilität der cfDNA und möglicher Faktoren, die diese beeinflussen können. In unpublizierten Vorarbeiten wurde an unserem Institut diesbezüglich untersucht, ob die Methylierung der cfDNA einen Einfluss auf deren Stabilität im Blutplasma hat. In diesen Versuchen wurden Amplikons aus dem Promotorbereich verschiedener Gene hergestellt, für die eine Hypermethylierung bei Patienten mit malignem Melanom nachgewiesen werden konnte. Diese Amplikons wurden anschließend in das Blutplasma gesunder Spender oder einen Puffer hinzugegeben und die Abnahme der Konzentration der Amplikons im Zeitverlauf durch eine quantitative PCR bestimmt. Ein Teil der Amplikons wurde zuvor durch eine Methyltransferase enzymatisch methyliert. Dadurch konnte in der Tat gezeigt werden, dass methylierte DNA-Fragmente nach Zugabe ins Blutplasma signifikant länger nachweisbar waren als dieselben Fragmente im unmethylierten Zustand (s. Abbildung 1).¹¹⁹ Diese Vorarbeit steht dabei im Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, in denen im Mausmodell ähnliche Stabilitätsunterschiede in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus injizierter DNA nachgewiesen wurden.¹²⁰ Da dieser Effekt nur im Blutplasma und nicht bei Zugabe der DNA-Fragmente in eine Pufferlösung nachzuweisen war, wurde ausgehend von diesen Ergebnissen die Hypothese aufgestellt, dass dafür die methylierungsabhängige Bindung eines Plasmaproteins an die DNA verantwortlich sein könnte.



1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Interaktion von cfDNA mit Plasmaproteinen könnte erheblichen Einfluss auf die Nutzbarkeit der cfDNA als Biomarker in verschiedenen klinischen Anwendungsbereichen haben. So ist es z. B. denkbar, dass durch Bindung bestimmter DNA-Fragmente an ein Plasmaprotein diese vor Degradation durch DNasen im Blutplasma geschützt werden und damit länger oder in höherer Konzentration nachweisbar sind; umgekehrt könnte ungebundene cfDNA eher einem Abbau im Blut unterliegen. Weiterhin ist es möglich, dass die Bindung an ein Protein Einfluss auf die analytische Zugänglichkeit der cfDNA hat bzw. Messungen durch diese beeinflusst werden. Dies könnte neue Aspekte bei der Interpretation von cfDNA-Analysen ermöglichen, wenn die Konzentration des entsprechenden Proteins selbst beispielsweise auch Schwankungen unterliegt, welche die messbare Konzentration der cfDNA beeinflussen. Ein Einfluss der Methylierung der cfDNA auf diese Bindung könnte einen Einfluss auf deren Nutzbarkeit als Biomarker haben. Zuletzt scheinen Kenntnisse über die Proteinbindung von cfDNA und deren Einfluss auf die Stabilität derselben auch von einem präanalytischen Standpunkt aus nützlich zu sein. Da cfDNA üblicherweise nur in sehr geringen Konzentrationen im Blutplasma

vorliegt, könnte eine Bindung an ein Plasmaprotein zur Aufreinigung genutzt werden. Ziel dieser Arbeit ist es deshalb, cfDNA-bindende Proteine im Blutplasma nachzuweisen und ggf. eine Abhängigkeit vom Methylierungsstatus zu zeigen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bioanalyzer	2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Feinwaage	isoCAL	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Geldokumentation	ChemiDoc XRS+	Bio-Rad, München, Deutschland
Gelkammern	Midi-large (120 Volt)	Harnischmacher, Schauenburg, Deutschland
HPLC-Gerät	RSLCnano	Thermo Scientific, Waltham, USA
HPLC-Säulen	Acclaim 120 C18	Thermo Scientific, Waltham, USA
Ionenquelle	Triversa Automate	Advion, Ithaca, USA
Kühlschrank		Siemens, München, Deutschland
Kühltruhe, -20°C		Siemens, München, Deutschland
Kühltruhe, -80°C	HeraFreeze	Thermo Scientific, Waltham, USA
Magnet	DynaMag-2 Magnet	Thermo Scientific, Waltham, USA
Massenspektrometer	LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikroskop	IX70	Olympus
NanoDrop	ND-1000	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
PCR-Cycler	MyCycler Thermal Cycler	Bio-Rad, München, Deutschland
Plattenlesegerät	Victor 3 Multilabel Counter	PerkinElmer, Waltham, USA
	Tecan M1000 infinite	Tecan Group AG, Männedorf, Schweiz
pH-Meter	InoLab Level 1	Xylem Analytics, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Research Plus, Research Plus 8-Kanal, Multipette Plus	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
DNA-Fluorometer	Qubit 2	Thermo Scientific, Waltham, USA
Sterilwerkbank	HeraSafe	Heraeus
Thermomixer	Thermomixer R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Ultraschall-Homogenisator	SonoLab Single	Covaris, Woburn, USA
Vortexer	Neolab 7-2020	NeoLab, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge Fresco Multifuge 3S	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Kits

Tabelle 2: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Agilent HS DNA Kit	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Ampure XP PCR-Aufreinigungssystem	Beckman Coulter, Brea, USA
Cell Death Detection ELISA Plus	Merck, Darmstadt, Deutschland
Qubit™ dsDNA HS Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Wizard Genomic DNA Purification Kit	Promega, Mannheim, Deutschland

2.1.3 Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
Bbs I	New England Biolabs, Ipswich, USA
Bfa I	New England Biolabs, Ipswich, USA
CpG-Methyltransferase (M. SssI)	New England Biolabs, Ipswich, USA
DNase I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hha I	New England Biolabs, Ipswich, USA
Hpa II	New England Biolabs, Ipswich, USA
Msp I	New England Biolabs, Ipswich, USA
Trypsin (porcine pancreas)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.4 Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien

Reagenzien	Hersteller
Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Borsäure	
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BSA (Bovines Serum Albumin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
CaCl ₂	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol	Applichem Biochemia, Darmstadt, Deutschland
Dynabeads M-280 Streptavidin	Thermo Scientific, Waltham, USA
Dynabeads MyOne Streptavidin C1	Thermo Scientific, Waltham, USA
dNTP-Mix	Bioron, Ludwigshafen, Deutschland
Dulbecco's PBS 1x	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
FCS	Merck, Darmstadt, Deutschland
Fibronektin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Gel Red	Biotium, Fremont, USA
Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus	Fermentas, Ontario, Kanada
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O, PCR-rein	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HRP-Substrat	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Iodacedamid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
KCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	Sucofin
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NP-40 Substitute	Thermo Scientific, Waltham, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Pierce High Sensitivity Streptavidin-HRP	Thermo Scientific, Waltham, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Sucrose	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TE Low EDTA	Applichem Biochemia, Darmstadt, Deutschland
Tris	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.5 Puffer

Tabelle 5: Verwendete Puffer

Puffer	Bestandteile
BS/THES-Puffer	22 mM Tris-HCL (pH 7,5) 62 mM NaCl 50 mM KCl 10 mM HEPES 5 mM CaCl ₂ 4,4 mM EDTA 12 % Glycerol 8,9 % (Masse/Volumen) Sucrose
BS/THES 2-Puffer	22 mM Tris-HCL (pH 7,5) 62 mM NaCl 50 mM KCl 10 mM HEPES 5 mM CaCl ₂ 4 mM EDTA
B/W-Puffer 2x	10 mM Tris-HCL (pH 7,5) 2 M NaCl 1mM EDTA
5x DNA-Ladepuffer	5 ml Glycerol 5 ml 5xTBE 25 mg Bromphenolblau 25 mg XylenCyanol F
Lyse-Puffer	10mM HEPES (pH 7,4) 10mM KCl 1 % Protease Inhibitor Cocktail 0,05 % NP-40

2.1.6 Primer

Tabelle 6: Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Primer

Name	Sequenz (5' -> 3')
Rassf_forward	ACAGCTCCCGAGGACTAGGT
Rassf_reverse	GCTGCGTGCCATATTTTAGCA
Rassf_intron_forward	GGAAGACAAGCCCTGCAAAA
Rassf_intron_reverse	TCACACAAGCTAGGACTGGG
Rarb_forward	GGATATGACTGGAGCCGACT
Rarb_reverse	TCCCTAAAAGTAGCCGCTCC
Col1a2_forward	TAGAGAAAAGCTGGACGGGG
Col1a2_reverse	GGACGTGGACACTTTTGAGG
Cyp1b1_forward	GGATATGACTGGAGCCGACT
Cyp1b1_reverse	TCCCTAAAAGTAGCCGCTCC

2.1.7 Antikörper

Tabelle 7: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-Fibronectin FITC	Southern Biotech, Birmingham, USA

2.1.8 Software

Tabelle 8: Verwendete Software

Software	Hersteller
Image Lab	Bio-Rad, München, Deutschland
Peaks Studio	Bioinformatic Solutions, Waterloo, Kanada
Uniprot Datenbank	European Bioinformatics Institute

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Modell	Hersteller
96 Well-Platten	PP-Microplate, 96 well	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Combitips	Combitips advanced	Eppendorf SE, Hamburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen	15mL 50mL	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Monovetten	EDTA	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße		Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Pipetten	5 ml 10 ml 25 ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Pipettenspitzen	10 µl 200 µl 1000 µl Tip One Graduated Filter	Starlab International, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße	0,5 ml 1,5 ml 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkulturflaschen	T-25 T-75 T-150	Greiner bio-one, Kremsmünster, Österreich
Zentrifugationsfilter 5 kDa	Vivaspin 500, 5 kDa	Merck, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugationsfilter 50 kDa	Amicon Ultra-4, 50 kDa	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.10 Plasmaproben

Die Plasmaproben zur Identifikation von cfDNA-bindenden Proteinen stammten von freiwilligen und gesunden Spendern des Instituts für klinische Chemie.

2.1.11 Zelllinien

Als Zelllinien für die Isolation genomischer DNA wurden zwei Zelllinien ausgewählt: MaMe11 und MaMe154a, bei denen es sich um Primärkulturen metastasierter Melanomzellen von Patienten im Stadium 4 handelt. Beide Zelllinien stammen von

Prof. Dr. med. Dirk Schadendorf, ehemals Klinik für Dermatologie, Universitätsmedizin Mannheim.

Tabelle 10: Verwendete Zelllinien

Name	Lokalisation	Entnahmedatum	Histologie	Stadium
MaMel 11	Mediastinum	14.07.1998	Amelanotisches Melanom	IV
MaMel 54a	Becken	15.10.1996	Oberflächlich Spreitendes Melanom	IV

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Beide Zelllinien wurden in RPMI-1640 mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin in T75- oder T25-Zellkulturflaschen für adhärenente Zellen kultiviert. Für T75-Flaschen wurden 12 ml und für die T25-Flaschen 5 ml Medium eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 95% Luftfeuchte und Begasung mit 5% CO₂ bebrütet. Das Ansetzen des Kulturmediums erfolgte aus bei -20°C eingefrorenen Aliquots der genannten Zusätze unter sterilen Bedingungen. Das angesetzte Medium wurde bei 4 °C aufbewahrt und vor der Verwendung im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Nach jeweils 2 – 3 Tagen in Kultur wurde das Medium in den Zellkulturen gewechselt. Die Zellen entstammten kryokonservierten Seed-Lots und wurden vor der Verwendung bzw. DNA-Isolierung zwei- bis dreimal passagiert.

2.2.1.2 Reaktivierung von kryokonservierten Zellen

Zunächst wurden die kryokonservierten Zellen im Wasserbad erwärmt, bis alle Eiskristalle verschwunden waren. Anschließend wurden die Zellen in ein Reaktionsgefäß mit vorgelegtem Medium überführt und bei 1200 g für 8 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer T75-Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.1.3 Passagieren von Zellen

Um eine ungehinderte Vermehrung der Zellen zu ermöglichen, wurden diese passagiert, sobald eine Konfluenz von etwa 90% in der Zellkulturflasche erreicht war.

Hierzu wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen einmal mit vorgewärmtem PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trypsin in eine T75- bzw. 0,5 ml Trypsin in eine T25-Flasche hinzugegeben und die Flasche für ca. 5 min im Brutschrank inkubiert. Hiernach wurde die Ablösung der Zellen mikroskopisch kontrolliert und ggf. durch leichtes Schütteln und Klopfen unterstützt, um sie möglichst vollständig abzulösen. Durch Zugabe von Kulturmedium im Verhältnis von etwa 3:1 wurde die Enzymreaktion gestoppt, die abgelösten Zellen aufgenommen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Um das Trypsin zu entfernen, wurden die Zellen bei 1200 x g für 8 min zentrifugiert und das Zellpellet im Anschluss in frischem Medium resuspendiert. Im letzten Schritt wurde das Medium in die zu verwendenden Zellkulturflaschen vorgelegt und die gewünschte Anzahl bzw. Fraktion an Zellen ausgesät. Typische Splitratios waren ca. 1:10 bei MaMel11 und 1:20 bis 1:30 bei MaMel54a.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Um die verwendeten Zelllinien über längere Zeiträume aufbewahren zu können, wurden diese mit DMSO als Gefrierschutzmittel bei -180 °C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierzu wurden zunächst die Zellen aus einer T75-Flasche mit Trypsin abgelöst und zentrifugiert (wie 2.2.1.3) und das entstandene Zellpellet in 1,5 ml FKS mit 10% DMSO aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Anschließend wurde das Röhrchen stufenweise heruntergekühlt, indem es zunächst in einer Isopropanolbox bei -80 °C aufbewahrt und am Folgetag in die -180°C-Tiefkühltruhe überführt wurde.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von genomischer DNA

Um Ausgangsmaterial für die spätere Herstellung von Amplikons zu gewinnen, wurde zunächst aus den genannten Zellkulturen genomische DNA isoliert. Dies erfolgte unter Verwendung des Wizard® Genomic DNA Purification Kits (Promega), indem zunächst die Zellen aus einer T75-Flasche mithilfe von Trypsin, wie zuvor beschrieben, abgelöst und anschließend zentrifugiert wurden. Das Zellpellet wurde anschließend in 1,5 ml PBS aufgenommen und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach gründlichem Vortexen wurden 600 µl Nuclei Lysis Solution hinzugegeben sowie auf- und abpipettiert, bis keine sichtbaren Klumpen mehr vorhanden waren. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 µl RNase Solution und eine Inkubation für

30 min bei 37 °C. Nach Abschluss der Inkubation kühlte die Probe 5 min bei Raumtemperatur ab, bevor 200 µl Protein Precipitation Solution hinzugegeben und die Probe 20 Sekunden auf dem Vortexer durchmischt wurde. Anschließend wurde die Probe für 5 min auf Eis gestellt und dann 4 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Das Pellet mit dem gefällten Protein wurde verworfen und der Überstand in ein neues Eppendorf-Röhrchen mit 600 µl Isopropanol überführt und vorsichtig gemischt, bis weiße DNA-Stränge sichtbar wurden. Nach einer erneuten Zentrifugation für 4 min bei 16.000 x g wurde einmalig mit 600 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und das Pellet für ca. 15 min luftgetrocknet. Im letzten Schritt wurden 100µl DNA Rehydration Solution hinzugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert, um eine möglichst hohe Ausbeute an DNA zu erreichen. Die so isolierte genomische DNA wurde in Aliquots von 100 µl bei -20°C aufbewahrt.

2.3.2 Messung der DNA-Konzentration

Nach der Aufreinigung wurden Konzentration und Reinheit der isolierten DNA photometrisch überprüft. Hierzu wurden ein NanoDrop-1000-Spektrophotometer und 2 µl der Probe verwendet. Um eine höhere Genauigkeit zu erreichen, wurden die Messungen dreifach durchgeführt und die Messwerte gemittelt.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.3.3.1 *Primer und Sequenzen*

Eine Auflistung der verwendeten Primer findet sich in 2.1.6.

Um in den folgenden Schritten eine Kopplung bzw. Detektion der Amplikons zu ermöglichen, wurde jeweils ein am 5'-Ende biotinylierter Primer verwendet.

2.3.3.2 *Reaktionsbedingungen*

Die Parameter der Polymerase-Kettenreaktion wurden für jedes der genannten Primerpaare optimiert, um eine möglichst hohe Ausbeute an Amplikons mit möglichst wenig Nebenprodukten zu erhalten. Ausgehend von den Empfehlungen des Herstellers für das verwendete PCR-Kit wurden für jedes der Amplikons

- die optimale Primerkonzentration durch Titration in Schritten von 0,05 µM zwischen 0,2 µM und 0,5 µM,
- die optimale Mg-Konzentration durch Titration und
- die optimale Annealing-Temperatur durch eine Gradienten-PCR zwischen 53 °C und 61 °C

ermittelt. Die Ergebnisse der PCR wurden jeweils durch Agarose-Gelelektrophoresen (s. 2.3.5) überprüft.

Die verwendeten, optimierten Reaktionsbedingungen für die einzelnen Amplikons sind beispielhaft für eine Reaktion mit 100 µl Gesamtvolumen in Tabelle 11 bis Tabelle 13 dargestellt. Wegen des vergleichsweise hohen GC-Gehalts der Amplikons *CYP1B1* und *RARB* wurde bei diesen – wie vom Hersteller empfohlen – zusätzlich Q-Solution aus dem verwendeten Kit eingesetzt, da sich hierdurch eine deutlich höhere Ausbeute an Amplikons erzielen ließ.

Tabelle 11: PCR-Ansatz für das Amplikon aus dem *RASSF1A*-Promotor

Bestandteil	Menge/Reaktion(100µl)	Konzentration
10X PCR Buffer	10 µl	1x
dNTP-Mix	2 µl	200 µM je dNTP
Forward Primer	16 µl	0,2 µM
Reverse Primer	16 µl	0,2 µM
Magnesium (zusätzlich zum bereits im PCR-Puffer enthaltenen)	2 µl	3 µM
Taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 Units/Reaktion
H ₂ O	variabel	
Aufgereinigte DNA	je nach gemessener Konzentration ca. 450ng	
Total	100 µl	

Tabelle 12: PCR-Ansatz für das Amplikon sowohl aus dem *RASSF1A*-Intron als auch aus dem *COL1A2*-Promotor

Bestandteil	Menge/Reaktion(100µl)	Konzentration
10x PCR Buffer	10 µl	1x
dNTP-Mix	2 µl	200 µM je dNTP
Forward Primer	20 µl	0,25 µM
Reverse Primer	20 µl	0,25 µM
Magnesium (zusätzlich zum bereits im PCR-Puffer enthaltenen)	0 µl	2,5 µM
Taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 Units/Reaktion
H ₂ O	variabel	
Aufgereinigte DNA	je nach gemessener Konzentration ca. 450 ng	
Total	100 µl	

Tabelle 13: PCR-Ansatz für das Amplikon aus dem *CYP1B1* Promotor

Bestandteil	Menge/Reaktion(100µl)	Konzentration
10x PCR Buffer	10 µl	1x
5x Q-Solution	20 µl	1x
dNTP-Mix	2 µl	200 µM je dNTP
Forward Primer	36 µl	0,45 µM
Reverse Primer	36 µl	0,45 µM
Magnesium (zusätzlich zum bereits im PCR-Puffer enthaltenen)	0 µl	2,5 µM
Taq-Polymerase	0,5 µl	2,5 Units/Reaktion
H ₂ O	Variabel	
Aufgereinigte DNA	je nach gemessener Konzentration ca. 450 ng	
Total	100 µl	

Für jede PCR-Reaktion wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, die keine DNA enthielt, um Verunreinigungen durch Fremd-DNA auszuschließen (Wasserprobe). Nach dem Ansetzen der PCR wurden diese in einen auf 94°C vorgeheizten Thermocycler gestellt und das folgende Programm gestartet.

Tabelle 14: Programm am Thermocycler

Schritt		Zeit	Temperatur
Erste Denaturation		3 min	94 °C
35 Zyklen:	Denaturation	30 sek	94 °C
	Annealing	<i>RASSF1A</i> -Promotor, <i>RASSF1A</i> -Intron u. <i>COL1A2</i> : 30sek <i>CYP1B1</i> u. <i>RARB</i> : 45sek	<i>RASSF1</i> -Promotor, <i>RASSF1A</i> -Intron u. <i>COL1A2</i> : 58°C <i>CYP1B1</i> u. <i>RARB</i> : 60sek
	Extension	1 min	72 °C
	Finale Extension	10 min	72 °C

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben bis zur Weiterverwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.3.4 DNA-Aufreinigung

Im Anschluss an die PCR wurden die erzeugten Amplikons aufgereinigt, um Primerreste und den PCR-Puffer zu entfernen und eine höhere Konzentration der Amplikons zu erreichen, wofür das Ampure-XP-PCR-Aufreinigungssystem (Beckmann Coulter) verwendet wurde. Je zwei 100 µl PCR-Reaktionen wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen zusammengeführt und anschließend den Empfehlungen des Herstellers bzgl. der Durchführung gefolgt. Das eingesetzte Volumen an Ampure-Beads entsprach dabei dem 1,8-Fachen des Probenvolumens. Da sich zunächst nach der Aufreinigung eine Verunreinigung der Probe mit Ethanol aus den Waschschritten zeigte, wurden die Proben vor der Elution 5 min mit offenem Deckel bei Raumtemperatur stehen gelassen, damit sich dieser verflüchtigte.

Eluiert wurde am Ende mit TE low EDTA (Appllichem) und einem Fünftel des ursprünglichen Probenvolumens. Um auch bei diesem geringen Volumen (typischerweise dann 40 µl pro Röhrchen) eine effiziente Elution zu gewährleisten, wurde der Elutionspuffer direkt auf die Beads pipettiert und ca. zehnmal auf- und abpipettiert.

Nach der Aufreinigung wurden DNA-Konzentration und Reinheit der Probe photometrisch bestimmt (s. 2.3.2).

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese.

Nach der PCR und anschließender Aufreinigung der Amplikons wurde kontrolliert, ob das gewünschte Produkt erhalten wurde und ob ggf. noch Verunreinigungen mit Primern oder Nebenprodukten bestanden. Hierzu wurden 1 µl der Probe mit 5 µl Loading Dye vermischt und auf ein 2% Agarose Gel in 0,6% TBE und 5 µl GelRed aufgetragen. Anschließend wurde das Gel bei 150 V für 45 min aufgetrennt und anschließend mithilfe eines Gel-Doc XR+ ausgewertet.

2.3.6 Chromatinextraktion

Um histongebundene DNA für die nachfolgenden Experimente zu gewinnen, wurde ausgehend von MaMe154a-Zellkulturen zunächst eine Chromatinextraktion durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen aus einer T75-Zellkulturflasche mithilfe von Trypsin abgelöst und einmal mit 5 ml PBS gewaschen (s. 2.2.1). Anschließend wurden das Zellpellet in 1,5 ml Lyse-Puffer hinzugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Dann wurde bei 14.000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde einmal mit 500 µl Lyse-Puffer gewaschen und erneut wie beschrieben zentrifugiert. Das dann entstandene Pellet wurde in 100 µl 2N HCL resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert, bis erneut wie beschrieben zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet verworfen und die Säure durch Zugabe von 100 µl 1M Tris-HCl (pH 8) neutralisiert. Die so entstandenen Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt. Vor der Verwendung in Folgeexperimenten wurde der gewonnene Chromatinextrakt sonifiziert, um Mono- und Oligonukleosomen zu erhalten. Hierzu wurde ein Covaris SonoLab Single Ultraschall-Homogenisator mit den folgenden Einstellungen verwendet.

Tabelle 15: Vorgenommene Einstellungen am Ultraschall-Homogenisator

Parameter	Wert
Duty Cycle	5 %
Intensity	3
Cycles/Burst	200
Mode	Frequency Sweeping
Anzahl Zyklen	2
Zeit pro Zyklus	1 min

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Enzymatische Methylierung

Um in den folgenden Versuchen ein eventuell unterschiedliches Bindungsverhalten methylierter und nicht methylierter DNA untersuchen zu können, wurde jeweils eine Fraktion der wie beschrieben hergestellten Amplikons mithilfe einer CpG-Methyltransferase methyliert. Im Folgenden wird der angewandte Ansatz dargestellt.

Tabelle 16: Ansatz für die enzymatische Methylierung von aufgereinigten Amplikons

Bestandteil	Menge/Reaktion	Konzentration
Aufgereinigtes PCR-Produkt	20 µl	variabel
10x New England Buffer 2	8 µl	1x
SAM 32mM	12,8 µl	640 µM
CpG-Methyltransferase	2 µl	8 units/Reaktion
H ₂ O	46,5 µl	
Total	80 µl	

Es schloss sich eine 4-stündige Inkubation bei 37 °C im Thermocycler und eine Hitzeinaktivierung bei 65 °C für 20 min an. Zuletzt wurde der Erfolg der Methylierungsreaktion kontrolliert.

2.4.2 Methylierungssensitiver Restriktionsverdau

Um den Erfolg der vorangegangenen enzymatischen Methylierung zu kontrollieren, erfolgte ein Verdau mit methylierungssensitiven Restriktionsenzymen. Bei dem Amplikon aus dem *RASSF1A*-Promotor wurde Hha I verwendet, das bei einer CpG-Methylierung in der Erkennungssequenz die DNA nicht spalten kann. Bei den anderen Amplikons wurden Hpa II und Msp I eingesetzt. Hpa II wird wie Hha I durch CpG-Methylierung blockiert, Msp I jedoch nicht, sodass es als Positivkontrolle für den Enzymverdau fungieren kann. Wie vom Hersteller empfohlen wurde dabei folgender Ansatz angewandt (s. Tabelle 17).

Tabelle 17: Ansatz für den methylierungssensitiven Restriktionsverdau

Bestandteil	Menge/Reaktion	Konzentration
Probe	1 μ l	
Enzym	0,2 μ l	Hpa II: 2 units/Reaktion Hha I/Msp I: 4 units/Reaktion
Cut Smart Buffer	1,5 μ l	1x
H ₂ O	12,3 μ l	
Total	15 μ l	

Inkubiert wurde für 1,5 h bei 37 °C, gefolgt von 20 min Hitzeinaktivierung bei 80 °C. Die Überprüfung der Restriktionen erfolgte per 2% Agarosegel-Elektrophorese (s. 3.3.5).

Um die Restriktionsfragmente mit einer höheren Auflösung darstellen zu können und die Effizienz der Methylierung besser semiquantitativ beurteilen zu können, wurden zusätzlich zu der Darstellung auf dem Agarose-Gel exemplarisch die Produkte eines Verdau auf einen Agilent High Sensitivity DNA-Chip aufgetragen und nach den Empfehlungen des Herstellers mithilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzers untersucht.

2.4.3 Pull-down-Assay aus Blutplasma

2.4.3.1 Bindung der Amplikons an magnetische Beads

Zunächst wurden die hergestellten Amplikons an magnetische Streptavidin-Beads gekoppelt, wobei zwei verschiedene Beads – Dynabeads MyOne Streptavidin C1 und Dynabeads M-280 Streptavidin – getestet wurden. Verwendet wurden jeweils 10 μ l Beads pro 20 μ l Amplikons. Um bei den unterschiedlichen Amplikons Vergleichbarkeit und semiquantitative Auswertungen zu ermöglichen, wurden deren Konzentrationen vorher photometrisch bestimmt (s. 2.3.2) und bei Bedarf durch Verdünnung mit PBS angeglichen. Die Beads wurden vor der Bindung gemäß den Empfehlungen des Herstellers zunächst dreimal mit 1x B/W-Puffer gewaschen. Danach wurden die Beads in dem doppelten Volumen 2x B/W-Puffer aufgenommen und mit den konzentrationsangeglichenen Amplikons vermischt.

Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Überkopfmischer wurden die Beads mit dem Magneten vom Überstand getrennt, letzterer verworfen und die Beads mit den gebundenen Amplikons in den folgenden Schritten weiterverwendet.

Als Kontrolle für die korrekte Bindung der Amplikons an die Beads wurde zusätzlich zu der Konzentration vor der Inkubation auch exemplarisch die Konzentration der verbleibenden Amplikons im Überstand nach der Inkubation gemessen und aus der Differenz die gebundene Menge an Amplikons ermittelt. Die Messung der DNA-Konzentrationen erfolgte in diesem Fall durch das Kit Qubit HS DNA gemäß den Empfehlungen des Herstellers.

2.4.3.2 Gewinnung und Vorbereitung des Blutplasmas

Für die folgenden Versuche wurde Blutplasma eines gesunden Spenders verwendet. Dieses wurde in eine EDTA-Kalium-Monovette abgenommen und direkt nach der Abnahme bei 2500 x g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das gewonnene Blutplasma direkt verwendet oder aliquotiert bei -20°C aufbewahrt. Um unspezifische Bindungen an die Beads und/oder Amplikons durch abundante Proteine im Plasma zu reduzieren sowie eine Bindung von im Plasma vorhandenem freiem Biotin oder biotinylierten Proteinen an ggf. noch freie Bindungsstellen der Streptavidin-Beads zu verhindern, wurden mehrere Methoden zur Vorbehandlung des Plasmas vor Zugabe der Amplikons getestet:

- Dreimalige Filtration des Plasmas mit einem Zentrifugationsfilter mit einem MWCO von 5 kDa und Verwerfen des Filtrats, um freies Biotin in der Probe abzureichern.
- Filtration des Plasmas mit einem Filter mit einem MWCO von 50kDa und Verwendung des Filtrats, wodurch größere Proteine, insbesondere Albumin (Molekulargewicht ca. 66 kDa) und Immunglobuline, abgereichert werden sollten.
- Inkubation des Plasmas mit einem Überschuss an leeren Streptavidin-Beads, um Biotin, biotinylierte Proteine und ggf. weitere Proteine, die unspezifisch an die Beads binden, abzureichern.
- Mehrstufige Verdünnung des Plasmas in PBS, um ein optimales Verhältnis zwischen Amplikons und Plasmaproteinen zu erreichen und gleichzeitig ggf. konzentrationsabhängige Affinitätsunterschiede zwischen den Amplikons aufzudecken.

2.4.3.3 Inkubation der Amplikons im Plasma

Nach der Gewinnung und ggf. Vorbereitung des Plasmas wurden die an Beads gekoppelten Amplikons in 50 µl des Plasmas resuspendiert und für eine Stunde bei 37 °C und 700 rpm in einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden die Beads

mit dem Magneten wieder aus dem Plasma entfernt und dreimal mit 50 µl BS/THES-Puffer (s. 2.1.5) gewaschen.

Nach den Waschschritten waren die Amplikons inklusive der eventuell gebundenen Plasmaproteine wieder von den Beads zu lösen. Hierfür wurden erneut mehrere Möglichkeiten getestet:

- Verdau mit DNase: Zugabe von 0,5 µl DNase zu den Proben und Inkubation für 2 h bei 25 °C. Anschließend Entfernen der Beads mit dem Magneten.
- Kurzfristiges Erhitzen der Proben für 2 min auf 90 °C, um die Biotin-Streptavidin-Bindung aufzubrechen.
- Restriktionsverdau: Restriktion des jeweiligen Amplikons durch ein kurz hinter der Biotin-Bindungsstelle schneidendes Restriktionsenzym. Hierzu wurden die Beads nach Entfernung aus dem Plasma und den Waschschritten direkt im Puffer mit dem entsprechenden Enzym resuspendiert (s. Tabelle 18). Nach dem Verdau wurde der Erfolg der Restriktion nach Entfernen der Beads im Agarosegel (s. 2.3.5) überprüft.

Tabelle 18: Ansatz für Abspaltung der Amplikons von den Beads

Bestandteil	Menge/Reaktion	Konzentration
H ₂ O	44,5µl	
<u>Puffer:</u> CutSmart o. NEBuffer 2.1 (New England Biolabs) Je nach eingesetztem Enzym	5	1x
<u>Enzym:</u> <i>RASSF1A</i> -Promotor: Bfal <i>RASSF1A</i> -Intron: BbsI	0,5µl	5units/Reaktion
Total	50µl	

Nach jedem der genannten Trennschritte wurden Beads und Überstand magnetisch voneinander getrennt und die so entstandenen Bead- bzw. Amplikonfraktionen den folgenden Analyseschritten getrennt zugeführt.

2.4.4 Quantifizierung der Fibronectinbindung mittels markierter Antikörper

Zur Quantifizierung der Bindung von Plasma-Fibronectin an die beadgebundenen Amplikons wurde ein FITC-markierter Anti-Fibronectin-Antikörper verwendet. Es erfolgte zunächst die Kopplung der Amplikons an die Beads und die Inkubation im Plasma wie vorbeschrieben (s. 2.4.3). Nach der Entnahme der Beads aus dem Plasma und den üblichen Waschschritten erfolgte die Resuspension des Beads-Amplikon-Komplexes in 100 µl BS/THES 2 mit 1:100 verdünntem Anti-Fibronectin-FITC. Danach wurde für eine Stunde bei 25 °C im Thermomixer inkubiert und anschließend dreimal mit BS/THES 2 gewaschen, bevor der Restriktionsverdau mit Bfal bzw. BbsI durchgeführt wurde (s. 2.4.3.3), um Beads und Amplikons wieder voneinander zu trennen. Der Überstand mit den Amplikons wurde in eine schwarze ELISA-Platte überführt und mit einem Tecan infinite 200 Platten-Reader ausgewertet (Einstellungen s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Am Tecan 2 Platten-Reader vorgenommene Einstellungen

Parameter	Wert
Exzitationswellenlänge	490 nm
Emissionswellenlänge	525 nm
Exzitationsbandbreite	9 nm
Emissionsbandbreite	20 nm
Verstärkung	134 Optimal (100 %)
Anzahl der Blitze	10
Integrationszeit	20 µs

2.4.5 Fibronectin-Bindungs-Assay

Die Bindung der Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotorbereich (methyliert und unmethyliert) und des Amplikons aus dem Intron von *RASSF1A* an Fibronectin wurde im Folgenden relativ quantifiziert und über ein größeres Spektrum an Konzentrationsverhältnissen titriert. Zunächst wurde Fibronectin in verschiedenen Verdünnungen von 5 ng/ml bis 5000 ng/ml mit PBS auf eine 96-Well-ELISA-Platte aufgetragen. Dabei wurden 100 µl der jeweiligen Verdünnung in die Wells pipettiert und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells mit 200 µl 5 % Milchpulver in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und

anschließend dreimal mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Amplikons in der gewünschten Verdünnung und mit einem Volumen von 100 µl pro Well sowie eine erneute Inkubation über eine Stunde bei 37 °C auf einem Shaker. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit BS/THES 2 und Zugabe von 100 µl Pierce High Sensitivity Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von 1:200 wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Shaker inkubiert. Nach drei weiteren Waschrritten mit BS/THES 2 wurden 100 µl HRP-Substrat hinzugegeben, welches gemäß den Herstellerempfehlungen vorher als 1:1-Mischung aus den beiden mitgelieferten Reagenzien frisch hergestellt worden war. Es wurde nun für ca. 15 min oder bis zum Auftreten einer erkennbaren Farbreaktion bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl 2M Schwefelsäure gestoppt.

Zuletzt wurde mit einem Victor 3 Multilabel-Reader die Absorption bei 450 nm bestimmt und so die Menge des an das Fibronectin gebundenen Amplikons bestimmt. Um eine unspezifische Bindung der Amplikons an die Wells auszuschließen, wurde eine Negativkontrolle ohne Fibronectin mitgeführt. Um zusätzlich auszuschließen, dass unspezifische Bindungen des Antikörpers an Fibronectin stattfinden, wurde eine zweite Negativkontrolle mit Fibronectin allerdings ohne Amplikons benutzt.

2.4.6 ELISA zum Nachweis nukleosomengebundenen Fibronectins

Für diesen Versuch wurde der Cell Death Detection ELISA Plus in einer abgewandelten Form verwendet. Es wurde zunächst der biotinylierte Anti-Histon-Antikörper 1:20 mit Inkubationspuffer verdünnt und in die zu verwendenden Wells gegeben. Nach einer Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur wurde die Platte dreimal mit 200 µl Washing Solution gewaschen. Anschließend wurden je 100 µl pro Well sowohl von dem isolierten und sonifizierten Chromatinextrakt (s. 2.3.6) als auch von den mitgelieferten Positivkontrollen hinzugegeben und 90 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit 200 µl Washing Buffer gewaschen.

Bei einem Teil der Proben wurde schon nach diesem Schritt der mitgelieferte Anti-DNA-POD Antikörper 1:20 verdünnt mit Inkubationspuffer hinzugegeben und erneut für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmals drei Waschrritten mit Washing Buffer wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers das ABTS-Substrat

hinzugegeben und die Absorption bei 450 nm mit einem Victor 3 Multilabel-Reader gemessen (s. Tabelle 20).

Tabelle 20: Einstellungen am Victor 3 Multilabel-Reader bei der Messung der Absorption

Parameter	Wert
Label	Photometry
Filter	A450
Messdauer	1 s

Bei einem anderen Teil der Proben erfolgte die Zugabe von 2,5 µg Fibronectin, verdünnt in 100 µl BS/THES 2 pro Well und eine Inkubation über eine Stunde bei 37 °C. Hiernach wurde dreimal mit 200 µl BS/THES 2 gewaschen und 100 µl 1:100 verdünnter Anti-Fibronectin-FITC-Antikörper hinzugegeben. Nach einer letzten Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur und drei Waschschritten mit BS/THES 2 wurde mit dem Victor 3 Multilabel-Reader die Fluoreszenz gemessen (s. Tabelle 21).

Tabelle 21: Einstellungen am Victor 3 Multilabel-Reader bei Messung von FITC

Parameter	Wert
Exzitationswellenlänge	490nm
Emissionswellenlänge	525nm
Messzeit	1 s
Messhöhe	3 mm

2.5 Massenspektrometrie

Zunächst wurden die in Kapitel 2.4.3 generierten Proben, bestehend aus Amplikons und ggf. Beads nach Inkubation im Blutplasma, reduziert und alkyliert, um die enthaltenen Proteine einer Analyse im Massenspektrometer zugänglich zu machen. Dabei wurden die Beads direkt in 50 mM NH_4HCO_3 resuspendiert. Nachdem zunächst Dithiothreitol 100 mM in einer Verdünnung von 1:10 zu den Proben hinzugegeben und diese für 30 min bei 56 °C inkubiert wurden, erfolgte ebenfalls im Verhältnis von 1:10 die Hinzugabe von Iodacedamid 50 mM und eine weitere Inkubation bei 25 °C für 30 min. Danach wurde auch in den Proben mit den Amplikons durch Zugabe von 250 mM NH_4HCO_3 eine Gesamtkonzentration von

50 mM NH_4HCO_3 erreicht, anschließend 0,4 μg Trypsin in alle Proben hinzugegeben und diese über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurde die Probe nach der Inkubation mit Trifluoressigsäure angesäuert (Endkonzentration 0,5 %).

Die Proben wurden anschließend mit einem RSLCnano HPLC Systems auf eine C18-Vorsäule geladen. Die enthaltenen Peptide wurden mit einem wässrig-organischen Gradienten über eine C18-Säule aufgetrennt, wobei eine Flussrate von 300 nl/min verwendet wurde. Eine Triversa-Automate-Ionenquelle wurde genutzt, um die aufgetrennten Peptide in ein LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer zu sprühen. Im Folgenden wurde in jedem Scan-Vorgang eine Fourier-Transformations-Massenspektrometrie über das gesamte Spektrum und bis zu sieben Ionenfallen-basierte MS/MS-Scans der Ionen mit der höchsten Intensität durchgeführt. Dynamische Exklusion (30 s), Massenbreite (10 ppm) und monoisotope Vorläuferauswahl waren aktiviert und alle Analysen wurden im positiven Ionenmodus durchgeführt. Die gewonnenen MS/MS-Spektren wurden über die PEAKS-Suchmaschine mit der Uniprot/Swissprot-Datenbank abgeglichen. Häufige Modifikationen sowie eine nicht erfolgte Spaltung durch Trypsin an einer Spaltstelle wurden bei dem Abgleich akzeptiert. Die Toleranz für Peptide wurde auf 10 ppm, die für MS/MS-Spektren auf 0,5 D festgesetzt. Für die vergleichende Analyse der Peptidanzahl zwischen den Proben für einzelne Proteine wurden jeweils alle identifizierten Isoformen berücksichtigt und die höchste erkannte Peptidanzahl für den Vergleich verwendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Herstellung von Amplikons

Um Ausgangsmaterial für die Verwendung in den Hauptversuchen zu gewinnen, erfolgte zunächst die Herstellung von Amplikons aus den zuvor beschriebenen Genabschnitten und Zelllinien. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine DNA-Isolierung sowie anschließend eine Amplifikation und eine enzymatische Methylierung durchgeführt.

3.1.1 DNA-Isolierung

Die Isolierung von genomischer DNA aus einer T75-Zellkulturflasche mit typischerweise ca. $4,8 \times 10^6$ Zellen ergab bei MaMel 54a eine Konzentration von 200 bis 500 ng/ μ l nach der Rehydrierung in 100 μ l TE low Puffer. Für MaMel11 war die Zellzahl bei ca. $4,5 \times 10^6$ Zellen etwas geringer, die Konzentration der isolierten DNA lag hier bei 100 bis 300 ng/ μ l. Die Ratio 260 nm/280 nm betrug für alle Proben über 1,8.

3.1.2 PCR

Die ausgewählten Genabschnitte wurden anschließend wie beschrieben durch eine PCR amplifiziert und das Produkt zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen. Im Folgenden sind beispielhaft die Ergebnisse jeweils einer Reaktion dargestellt (s. Abbildung 2). Es zeigte sich nach Optimierung der Reaktionsbedingungen bei allen verwendeten Amplikons das Produkt mit der erwarteten Länge ohne relevante Nebenprodukte.

Nach anschließender Aufreinigung der Amplikons mit dem Ampure-XP-PCR-Aufreinigungssystem (Beckmann Coulter) ergaben sich Konzentrationen von ca. 30 bis 90 ng/ μ l je nach verwendetem Amplikon.

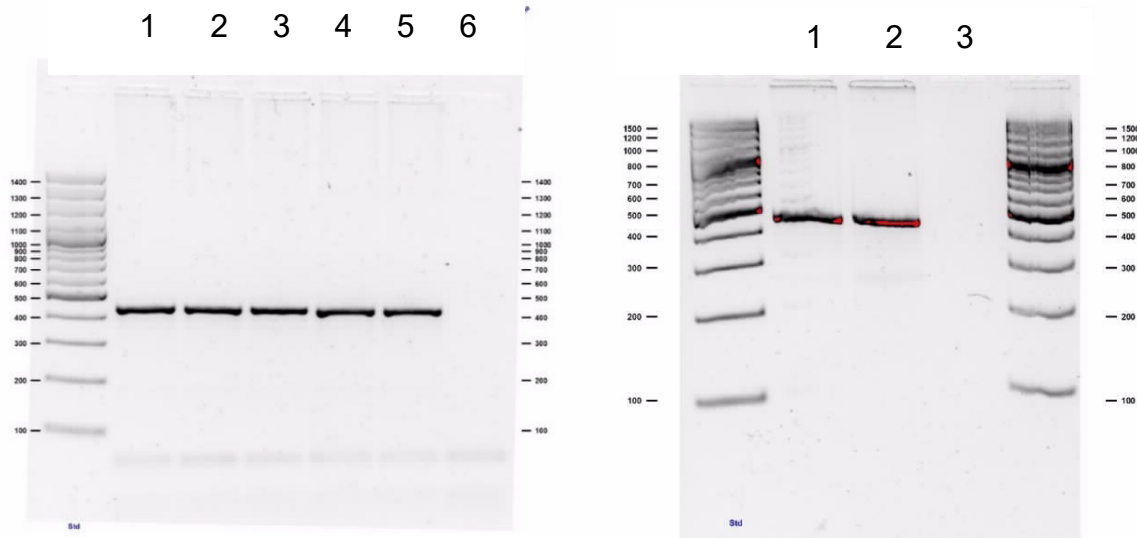


Abbildung 2: Agarosegel zur Kontrolle der PCR-Reaktion

Das Produkt aus der Amplifikation zweier Genabschnitte, links: *RASSF1A*-Promotor, rechts: *RASSF1A*-Intron, wurde nach der PCR-Reaktion mithilfe von Agarosegelen (2%) aufgetrennt. Erwartete Produktgröße: ~400 bp.

Links: Spuren 1-5 Amplikon, Spur 6 Negativkontrolle

Rechts: Spuren 1-2 Amplikon, Spur 3 Negativkontrolle

3.1.3 Enzymatische Methylierung

Die hergestellten Amplikons wurden durch eine Methyltransferase enzymatisch methyliert, wobei der Erfolg dieser Reaktion durch einen methylierungssensitiven Restriktionsverdau kontrolliert wurde. Die Ergebnisse des Verdau wurden einerseits durch ein Agarosegel und andererseits mit einem Agilent-Bioanalyser-Elektrophoresesystem dargestellt.

Auf den Agarosegelen zeigte sich ein deutlich geringerer Verdau der methylierten Amplikons durch die methylierungssensitiven Restriktionsenzyme (HhaI und HpaII, s. Abbildung 3).

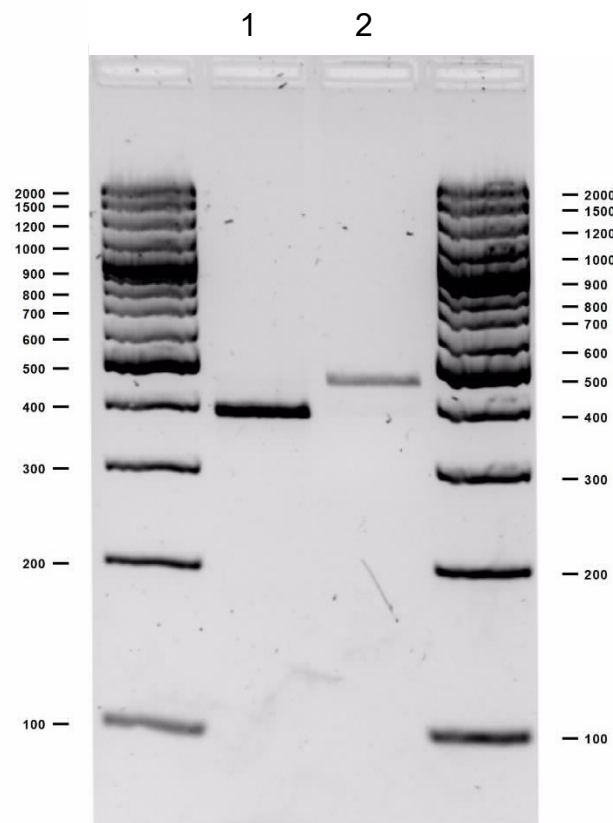


Abbildung 3: Kontrolle der Methylierung des Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor mithilfe eines methylierungssensitiven Restriktionsverdau (Hha1)

Spur 1: Unmethyliertes Amplikon, Spur 2: Methyliertes Amplikon. Das genannte Amplikon wurde nach der enzymatischen Methylierung mit einem methylierungssensitiven Restriktionsenzym verdaut (Hha1) und das Ergebnis auf einem Agarosegel (2 %) dargestellt. Zum Vergleich wurde das gleiche Amplikon ohne vorherige Methylierung verwendet.

Als zusätzliche Kontrolle wurde des Weiteren ein Restriktionsenzym verwendet, das DNA unabhängig von einer CpG-Methylierung in der Erkennungssequenz spalten kann (MspI). Bei diesem zeigte sich ein nahezu vollständiger Verdau von sowohl den methylierten als auch den unmethylierten Amplikons unter den verwendeten Reaktionsbedingungen. Unmethylierte Amplikons konnten ebenfalls durch alle methylierungssensitiven wie auch -insensitiven Restriktionsenzyme vollständig verdaut werden (s. Abbildung 4).

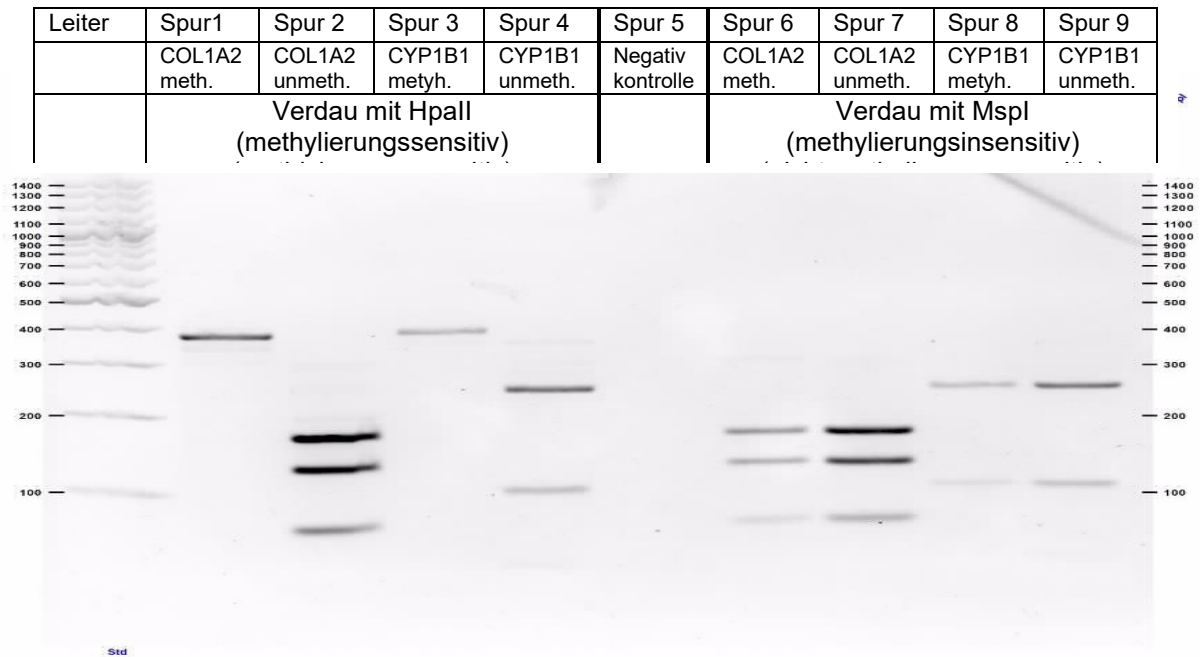
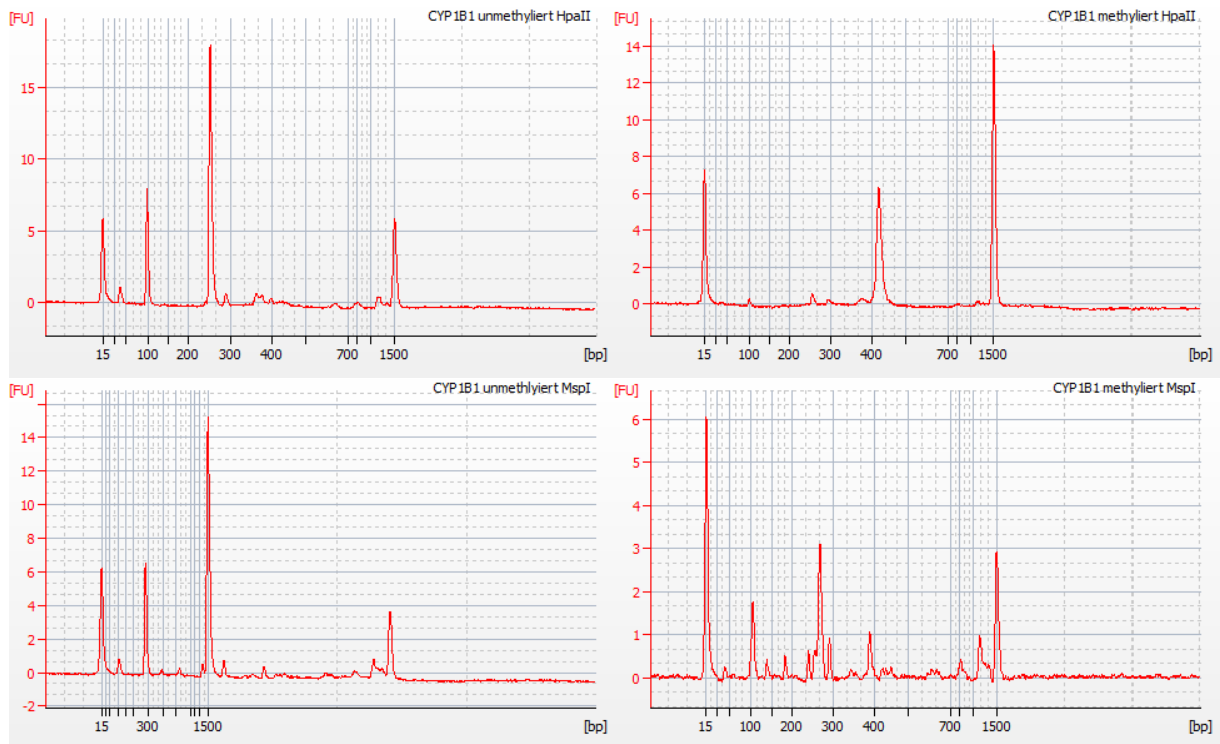


Abbildung 4: Kontrolle der Methylierung der Amplikons *COL1A2* und *CYP1B1* mithilfe eines methylierungssensitiven Restriktionsverdau

Die genannten Amplikons wurden nach der enzymatischen Methylierung mit einer methylierungssensitiven (*HpaII*, links) und einer methylierungsinsensitiven (*MspI*, rechts) Isoform eines Restriktionsenzym verdaut und das Ergebnis auf einem Agarosegel (2%) dargestellt. Als Vergleich wurden dieselben Amplikons ohne vorherige Methylierung verwendet. Meth.: Methylierte Amplikons, Unmeth.: Unmethylierte Amplikons

Die exemplarische Darstellung eines Restriktionsverdau nach Methylierung mithilfe des Bioanalyzers ergab ein ähnliches Bild (s. Abbildung 5). Beim Verdau der methylierten Amplikons mit *Hpa II* (methylierungssensitiv) waren so gut wie keine Spaltprodukte nachweisbar. In allen anderen Proben, also beim Verdau der unmethylierten Amplikons mit *Hpa II* sowie beim Verdau aller Amplikons mit *Msp I* (nicht methylierungssensitiv) zeigte sich ein fast vollständiger Verdau des jeweiligen Amplikons in die erwarteten Spaltprodukte. So konnte gezeigt werden, dass die Methylierungsreaktion unter den erprobten Bedingungen eine nahezu vollständige Methylierung des jeweiligen Amplikons erreichen konnte.

CYP1B1-Promoter



RARB-Promoter

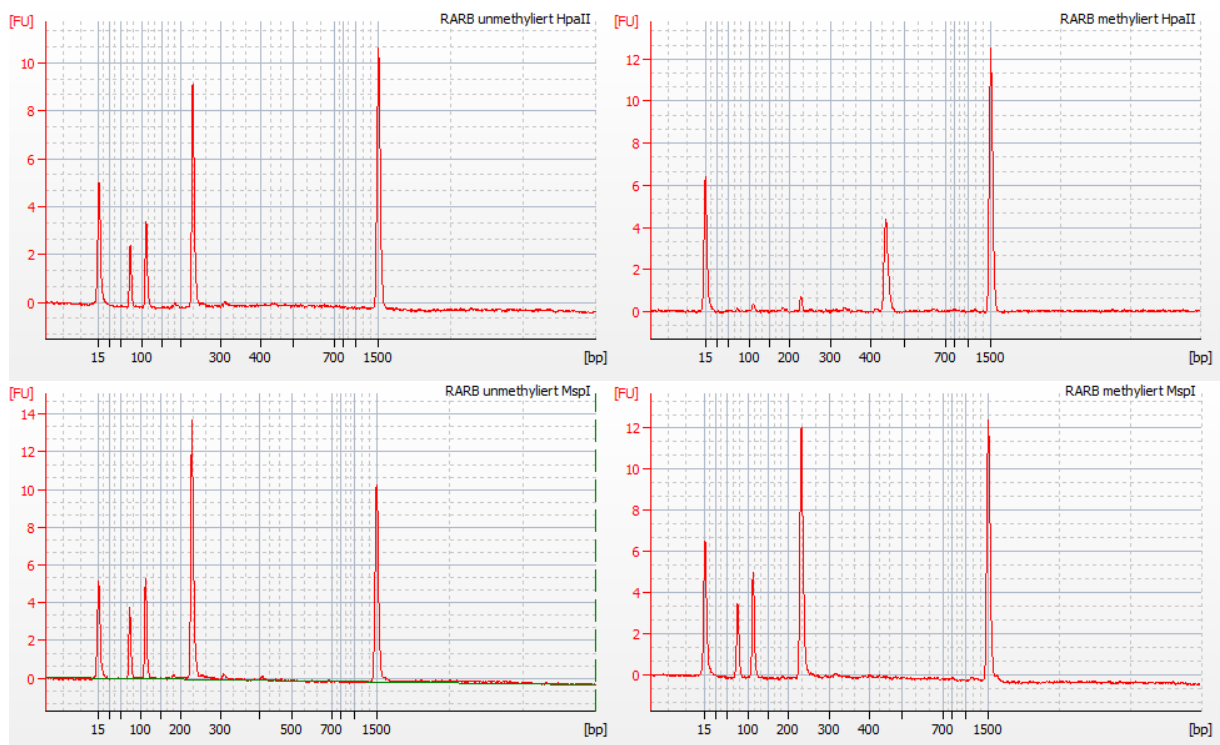


Abbildung 5: Kontrolle der Methylierung der Amplikons aus dem *CYP1B1*- und *RARB*-Promotor mithilfe eines methylierungssensitiven Restriktionsverdau am Bioanalyzer

Das genannte Amplikon wurde nach der enzymatischen Methylierung mit einer methylierungssensitiven (HpaII, oben) und einer methylierungsinsensitiven (MspI, unten) Isoform eines Restriktionsenzym verdaut. Das Ergebnis des Verdau wurde mithilfe eines Agilent-Bioanalyzers dargestellt. Zum Vergleich wurde dasselbe Amplikon ohne vorherige Methylierung verwendet.

3.2 Identifikation von Fibronektin als cfDNA-bindendes Protein

3.2.1 Bindung der Amplikons an magnetische Beads

Die hergestellten methylierten und unmethylierten Amplikons aus dem Promotor- und Intronbereich von *RASSF1A* wurden an magnetische Beads gekoppelt und in Blutplasma inkubiert. Diese Bindung wurde über eine Messung der DNA-Konzentration vor Zugabe der Beads und im Überstand nach Bindung der Beads kontrolliert.

Bei Zugabe von 10 µl Amplikon (*RASSF1A*-Promotor, Konzentration von 93 ng/µl) zu 10 µl 1:2 verdünnten Beads (Streptavidin MyOne) zeigte sich im Überstand nach Inkubation und Entfernung der beladenen Beads eine verbleibende Amplikonkonzentration von 21,5 ng/µl. Unter Berücksichtigung der Verdünnung durch die Zugabe der Beads ließ sich so bestimmen, dass ca. 54 % der ursprünglich eingesetzten Amplikons an die Beads gebunden haben (s. Tabelle 22).

Tabelle 22: Berechnung des Anteils an gebundenen Beads durch Messung der Amplikonkonzentration (*RASSF1A*-Promotor) vor und nach Inkubation von Streptavidin Beads

Konzentration vor Inkubation von Beads	Konzentration nach Inkubation von Beads	An Beads gebunden (Differenz)
10µl Amplikon x 93ng/µl = 930 ng Amplikon	10 µl Amplikons + 10 µl Beads = 20µl x 21,5 ng/µl Amplikons (gemessen) = 430 ng Amplikon	930 ng – 430 ng = 500 ng entspricht 53,76 % der Ausgangsmenge

3.2.2 Abspaltung der DNA nach Inkubation im Plasma

Nach Inkubation der Beads im Plasma erfolgte eine Abspaltung der gebundenen Amplikons mithilfe eines Restriktionsenzym, wobei jeweils ein Enzym gewählt wurde, das in dem jeweiligen Amplikon nur eine Spaltstelle möglichst nah am biotinylierten Primer besitzt (s. Abbildung 7). Nach diesem Verdau wurden die Beads magnetisch entfernt und aus einem Aliquot des verbleibenden Überstandes ein Agarosegel zur Kontrolle des Enzymverdaus angefertigt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass durch den Restriktionsverdau auch nach der Inkubation im Plasma die zu erwartenden Fragmente abgespalten werden konnten und anschließend im Überstand zu finden waren (s. Abbildung 6). Ein Großteil der gebundenen Amplikons

konnte so also wieder von den Beads getrennt werden. In den Kontrollen mit Beads ohne gebundene Amplikons zeigte sich erwartungsgemäß auch keine DNA.

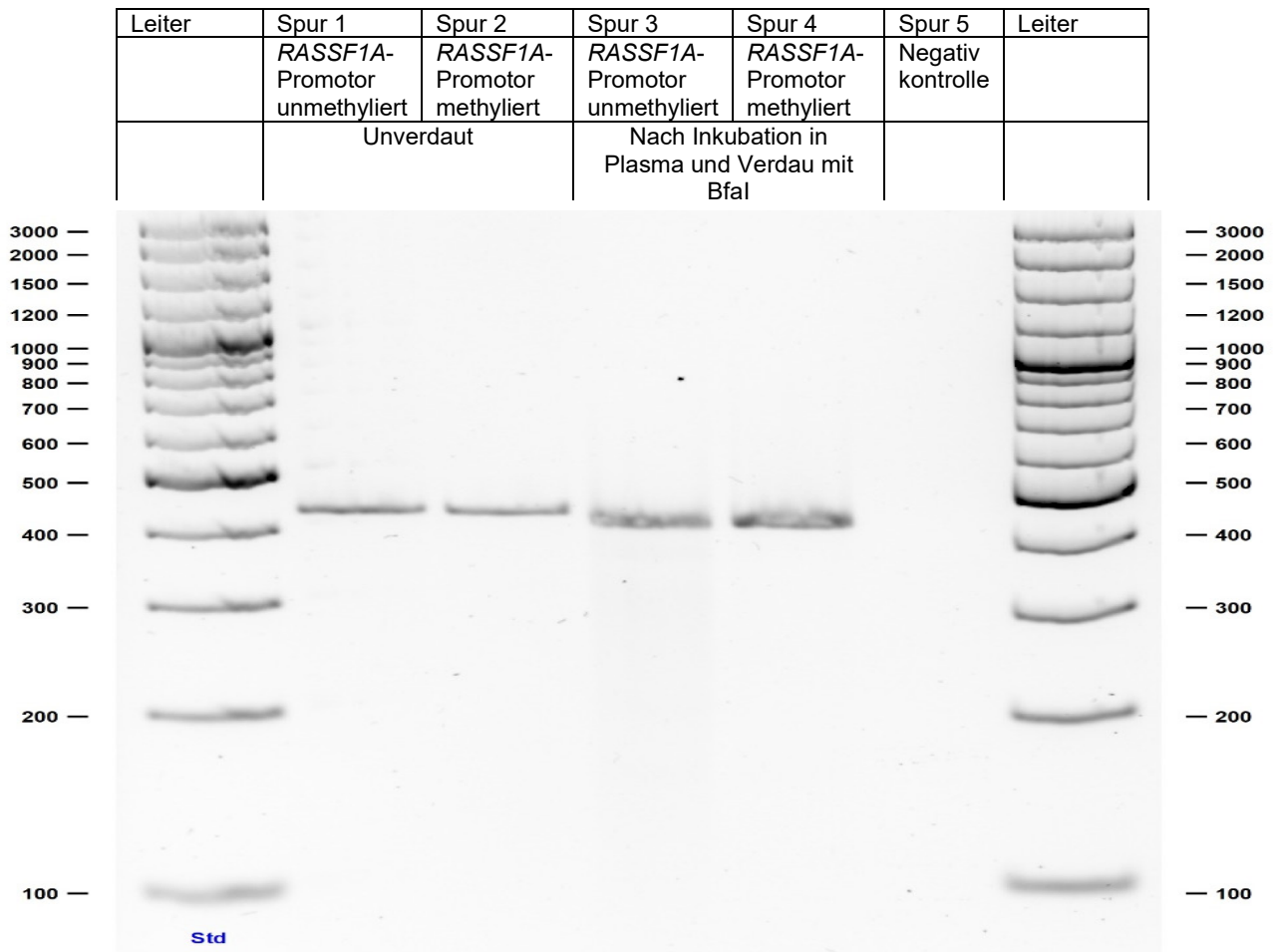


Abbildung 6: Abspaltung der Amplikons von den Beads nach Inkubation im Plasma

Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor wurden an magnetische Streptavidin-Beads gekoppelt und im Plasma inkubiert. Danach wurden die Amplikons mithilfe eines Restriktionsenzym (Bfal) an den Beads verdaut und der Überstand auf ein Agarosegel (2%) aufgetragen.

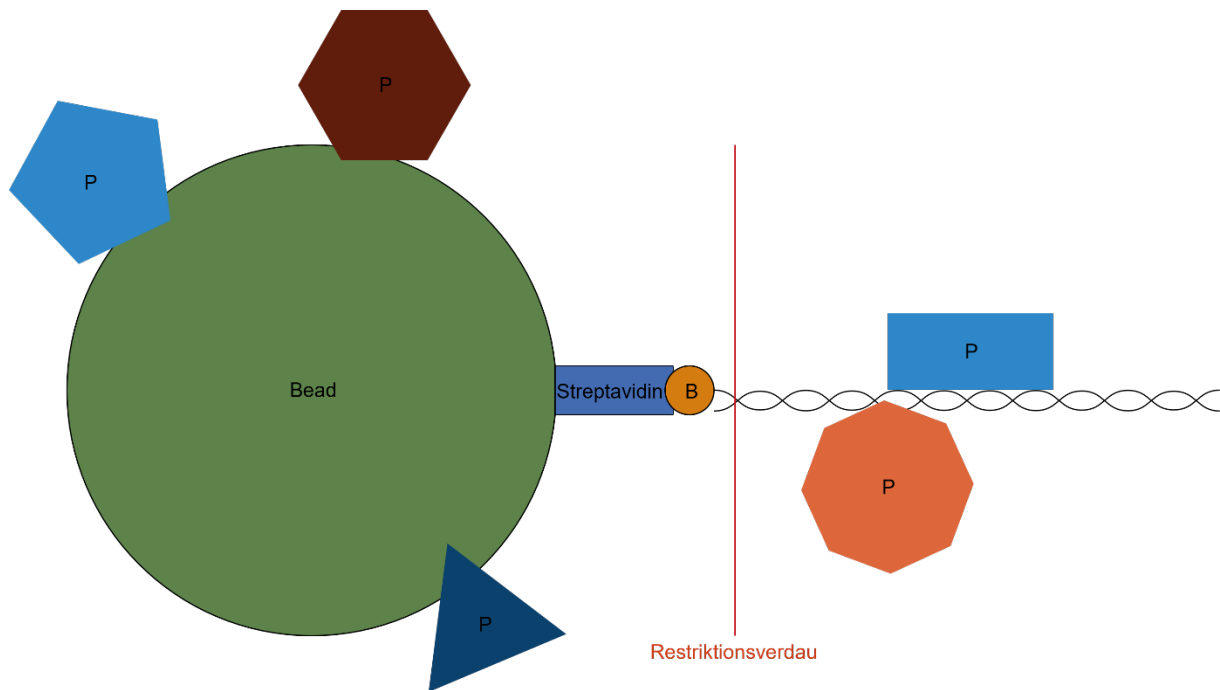


Abbildung 7: Methode zur Trennung von Beads und Amplikons

Differenzierung der Proteinbindung im Beads-Assay: Nach Inkubation des Bead-Amplikon-Komplexes im Blutplasma erfolgte ein Verdau mit einem Restriktionsenzym mit einer Erkennungssequenz kurz hinter dem biotinylierten Ende des Amplikons (rote Linie). Dadurch wurde eine Trennung von an die Amplikons und ggf. unspezifisch an die Beads gebundenen Plasmaproteinen erreicht. B: Biotin, P: Plasmaproteine.

3.2.3 Unspezifische Bindung abundanter Plasmaproteine

Im nächsten Schritt erfolgte eine Analyse des nach Inkubation im Plasma und Entfernung der Beads verbleibenden Überstandes mit Amplikons und gebundenen Plasmaproteinen. Bei der massenspektrometrischen Identifikation der gebundenen Proteine wurde schnell eine hohe Bindung hochabundanter Plasmaproteine wie Albumin, Immunglobulin, Transferrin, Fibrinogen und Apolipoproteinen deutlich. Diese Proteine fanden sich in allen Proben inklusive der Negativkontrollen und in der Fraktion sowohl mit den abgespaltenen Amplikons als auch mit den verbleibenden Beads (s. Tabelle 23 - Tabelle 26).

Um diese unspezifischen Bindungen von Plasmaproteinen zu reduzieren, wurden, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, unterschiedliche Methoden zur Vorbehandlung des Plasmas vor der Inkubation der Amplikons getestet. Zu diesem Zweck wurden eine Filtrierung mit einem MWCO von 5 kDa oder 50 kDa, verschiedene Verdünnungen des Plasmas oder eine vorherige Inkubation mit einem Überschuss unkonjugierter Streptavidin-Beads durchgeführt. Anschließend wurden jeweils Beads mit gebundenen unmethylierten oder methylierten Amplikons aus dem *RASSF1A*-

Promotor sowie unkonjugierten Beads mit dem entsprechend vorbehandelten Plasma inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte ggf. eine Trennung der Beads von den Amplikons durch ein Restriktionsenzym und anschließend eine massenspektrometrische Identifikation der in dem Überstand enthaltenen Proteine. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Tests mit den jeweiligen massenspektrometrisch identifizierten Proteinen nach Inkubation im Plasma finden sich in Tabelle 23 bis 26. In diesen Versuchen ergaben eine vorherige Zugabe eines Überschusses unkonjugierter Streptavidin-Beads zur Abreicherung von Biotin und biotinylierten Proteinen sowie eine Filtrierung mit einem MWCO von 5 kDa keinen wesentlichen Unterschied hinsichtlich der identifizierten Proteine im Vergleich zu unbehandeltem Plasma. Hieraus wurde geschlossen, dass die Bindung von Biotin oder biotinylierten Proteinen aus dem Blutplasma an unbesetzte Bindungsstellen an den Beads keinen größeren Einfluss auf die beschriebenen unspezifischen Bindungen im vorliegenden Versuch hat. Bei einer Filtrierung mit einem MWCO von 50 kDa zeigte sich erwartungsgemäß eine deutlich reduzierte Bindung großer Proteine, vor allem von Albumin oder Immunglobulinen (s. Tabelle 16). Dieser Ansatz wurde jedoch verworfen, da anzunehmen war, dass durch die Filtrierung auch mögliche cfDNA-bindende Proteine entfernt werden würden. Dementsprechend wurde für die Hauptversuche natives, lediglich mit Puffer verdünntes Plasma eingesetzt, um unter möglichst physiologischen Bedingungen zu arbeiten.

Tabelle 23: Auflistung der 10 abundantesten Proteine nach Inkubation von unmethylierten Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor. Das verwendete Plasma wurde zuvor mit einem MWCO von 5 kDa filtriert. OS: Originating species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence

Accession	Anzahl Peptide	Beschreibung
tr A0A024R462 A0A024R462_HUMAN	114	Fibronectin 1 isoform CRA_n OS = Homo sapiens GN = FN1 PE = 4 SV = 1
P02751-8 FINC_HUMAN	113	Isoform 8 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1
P02751 FINC_HUMAN	113	Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1 PE = 1 SV = 4
P02768 ALBU_HUMAN	80	Serum Albumin OS = Homo sapiens GN = ALB PE = 1 SV = 2
tr B4DTK1 B4DTK1_HUMAN	57	cDNA FLJ53292 highly similar to Homo sapiens fibronectin 1 (FN1) transcript variant 5 mRNA OS = Homo sapiens PE = 2 SV = 1
P01023 A2MG_HUMAN	21	Alpha-2-macroglobulin OS = Homo sapiens GN = A2M PE = 1 SV = 3
tr Q53H26 Q53H26_HUMAN	19	Transferrin variant (Fragment) OS = Homo sapiens PE = 2 SV = 1
tr Q06AH7 Q06AH7_HUMAN	19	Transferrin OS = Homo sapiens GN = TF PE = 2 SV = 1
P02787 TRFE_HUMAN	19	Serotransferrin OS = Homo sapiens GN = TF PE = 1 SV = 3
P02647 APOA1_HUMAN	9	Apolipoprotein A-I OS = Homo sapiens GN = APOA1 PE = 1 SV = 1

Tabelle 24: Auflistung der 10 abundantesten Proteine nach Inkubation von unmethylierten Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor. Das verwendete Plasma wurde zuvor mit einem MWCO von 5 kDa filtriert und mit unkonjugierten Beads inkubiert. OS: Organism species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence

Accession	Anzahl Peptide	Beschreibung
tr A0A024R462 A0A024R462_HUMAN	50	Fibronectin 1 isoform CRA_n OS = Homo sapiens GN = FN1 PE = 4 SV = 1
tr F6KPG5 F6KPG5_HUMAN	40	Albumin (Fragment) OS = Homo sapiens PE = 2 SV = 1
P02768 ALBU_HUMAN	40	Serum Albumin OS = Homo sapiens GN = ALB PE = 1 SV = 2
tr Q53H26 Q53H26_HUMAN	18	Transferrin variant (Fragment) OS = Homo sapiens PE = 2 SV = 1
P01023 A2MG_HUMAN	21	Alpha-2-macroglobulin OS = Homo sapiens GN = A2M PE = 1 SV = 3
P02647 APOA1_HUMAN	10	Apolipoprotein A-I OS = Homo sapiens GN = APOA1 PE = 1 SV = 1
tr A0A024R3E3 A0A024R3E3_HUMAN	10	Apolipoprotein A-I isoform CRA_a OS = Homo sapiens GN = APOA1 PE = 4 SV = 1
tr A0A0G2JRN3 A0A0G2JRN3_HUMAN	8	Alpha-1-antitrypsin OS = Homo sapiens GN = SERPINA1 PE = 4 SV = 1
tr A0A024R6I7 A0A024R6I7_HUMAN	8	Alpha-1-antitrypsin OS = Homo sapiens GN = SERPINA1 PE = 3 SV = 1
tr B2R8I2 B2R8I2_HUMAN	5	cDNA FLJ93914 highly similar to Homo sapiens histidine-rich glycoprotein (HRG) mRNA OS = Homo sapiens PE = 2 SV = 1

Tabelle 25: Auflistung der 10 abundantesten Proteine nach Inkubation von unmethylierten Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor. Das verwendete Plasma wurde zuvor mit einem MWCO von 5 kDa und anschließend erneut mit einem MWCO von 50 kDa filtriert. OS: Organism species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence

Accession	Anzahl Peptide	Beschreibung
tr H6VRG2 H6VRG2_ HUMAN	21	Keratin 1 OS = Homo sapiens GN = KRT1 PE = 3 SV = 1
tr H6VRG0 H6VRG0_ HUMAN	21	Keratin 1 OS = Homo sapiens GN = KRT1 PE = 3 SV = 1
P04264 K2C1_HUMA N	21	Keratin type II cytoskeletal 1 OS = Homo sapiens GN = KRT1 PE = 1 SV = 6
tr H6VRG3 H6VRG3_ HUMAN	21	Keratin 1 OS = Homo sapiens GN = KRT1 PE = 3 SV = 1
tr H6VRF8 H6VRF8_H UMAN	21	Keratin 1 OS = Homo sapiens GN = KRT1 PE = 3 SV = 1
tr H6VRG1 H6VRG1_ HUMAN	21	Keratin 1 OS = Homo sapiens GN = KRT1 PE = 3 SV = 1
P35527 K1C9_HUMA N	18	Keratin type I cytoskeletal 9 OS = Homo sapiens GN = KRT9 PE = 1 SV = 3
P13645 K1C10_HUM AN	20	Keratin type I cytoskeletal 10 OS = Homo sapiens GN = KRT10 PE = 1 SV = 6
P35908 K22E_HUMA N	14	Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal OS = Homo sapiens GN = KRT2 PE = 1 SV = 2
P13647 K2C5_HUMA N	11	Keratin type II cytoskeletal 5 OS = Homo sapiens GN = KRT5 PE = 1 SV = 3

Tabelle 26: Auflistung der 10 abundantesten Proteine nach Inkubation von unmethylierten Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor. Eingesetzt wurde nicht filtriertes oder anderweitig vorbehandeltes Plasma. OS: Organism species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence

Accession	Anzahl Peptide	Beschreibung
P02768 ALBU_HUMAN	6	Serum Albumin OS = Homo sapiens GN = ALB PE = 1 SV = 2
P02751-4 FINC_HUMAN	3	Isoform 4 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1
P02751-10 FINC_HUMAN	3	Isoform 10 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1
P02751-6 FINC_HUMAN	3	Isoform 6 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1
P02751-5 FINC_HUMAN	3	Isoform 5 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1
P02751-9 FINC_HUMAN	3	Isoform 9 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1
P02751-14 FINC_HUMAN	3	Isoform 14 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1
P02751-8 FINC_HUMAN	3	Isoform 8 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1
P02751-17 FINC_HUMAN	3	Isoform 17 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1
P02751-3 FINC_HUMAN	3	Isoform 3 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1

3.2.4 Identifikation von cfDNA-bindenden Proteinen

Es erfolgte eine Auswertung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine mit dem Ziel, Proteine mit einer präferierten Bindung an die DNA-Amplikons zu erkennen. Hierzu wurden die gemittelten Peptidzahlen für die jeweiligen Proteine zwischen den Proben mit Amplikons und den Negativkontrollen verglichen. Ein ungepaarter T-Test wurde verwendet, um die Differenz der Mittelwerte auf Signifikanz zu testen. Fibronectin konnte dabei als einziges Protein identifiziert werden, für das sich eine signifikante Differenz zwischen den Proben und den Kontrollen zeigte. Für Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor wurde mit einem p-Wert von $p < 0,05$ eine statistisch signifikante Bindung nachgewiesen (s. Tabelle 27). Im Falle des Amplikons aus dem Intronbereich ergab sich ein Trend mit einem p-Wert knapp oberhalb des Signifikanzniveaus. In keiner der durchgeführten Negativkontrollen ließ sich dagegen Fibronectin nachweisen.

Tabelle 27: Statistische Signifikanz der Bindung von Fibronectin bei Verwendung der angegebenen Amplikons und Inkubation in unverdünntem Plasma. Angegeben ist der Mittelwert der Peptidzahl der jeweiligen Probe und Kontrolle sowie der p-Wert bei Vergleich der Werte im ungepaarten T-Test.

Amplikon	Peptidzahl Probe (Mittelwert)	Peptidzahl Negativkontrolle (Mittelwert)	p-Wert
<i>RASSF1A</i> -Promotor unmethyliert	3,33	0	0.004926229
<i>RASSF1A</i> -Promotor methyliert	2,67	0	0.047089186
<i>RASSF1A</i> -Intron	2	0	0.09175171

Bei allen anderen identifizierten Proteinen zeigte sich für keines der methylierten oder unmethylierten Amplikons ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollen. (s. Tabelle 28).

Tabelle 28: In der Überstandfraktion von Beads mit unmethylierten Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor identifizierte Proteine. Sortierung nach absteigendem p-Wert im ungepaarten T-Test im Vergleich zu den Kontrollen. Dargestellt sind die 20 Proteine mit dem niedrigsten p-Wert. OS: Organism species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence

Accession	Bezeichnung	p-Wert
P02751-4 FINC_HUMAN	Isoform 4 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1	0.00492623
P02751-10 FINC_HUMAN	Isoform 10 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1	0.00492623
P02751-6 FINC_HUMAN	Isoform 6 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1	0.00492623
P02751-5 FINC_HUMAN	Isoform 5 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1	0.00492623
P02751-9 FINC_HUMAN	Isoform 9 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1	0.00492623
P02751-14 FINC_HUMAN	Isoform 14 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1	0.00492623
P02751-8 FINC_HUMAN	Isoform 8 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1	0.00492623
P02751-17 FINC_HUMAN	Isoform 17 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1	0.00492623
P02751-3 FINC_HUMAN	Isoform 3 of Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1	0.00492623
P02751 FINC_HUMAN	Fibronectin OS = Homo sapiens GN = FN1 PE = 1 SV = 4	0.00492623
P04196 HRG_HUMAN	Histidine-rich glycoprotein OS = Homo sapiens GN = HRG PE = 1 SV = 1	0.13694638
P02647 APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I OS = Homo sapiens GN = APOA1 PE = 1 SV = 1	0.1629543
P02787 TRFE_HUMAN	Serotransferrin OS = Homo sapiens GN = TF PE = 1 SV = 3	0.19813127

P02768 ALBU_HUMAN	Serum Albumin OS = Homo sapiens GN = ALB PE = 1 SV = 2	0.20805962
P13645 K1C10_HUMAN	Keratin type I cytoskeletal 10 OS = Homo sapiens GN = KRT10 PE = 1 SV = 6	0.21132487
P35908 K22E_HUMAN	Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal OS = Homo sapiens GN = KRT2 PE = 1 SV = 2	0.21132487
P02790 HEMO_HUMAN	Hemopexin OS = Homo sapiens GN = HPX PE = 1 SV = 2	0.21132487
P01009-3 A1AT_HUMAN	Isoform 3 of Alpha-1-antitrypsin OS = Homo sapiens GN = SERPINA1	0.21132487
P01009 A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin OS = Homo sapiens GN = SERPINA1 PE = 1 SV = 3	0.21132487
P00738-2 HPT_HUMAN	Isoform 2 of Haptoglobin OS = Homo sapiens GN = HP	0.21132487

Es konnte also nach massenspektrometrischer Bestimmung Fibronectin als einziges cfDNA-bindendes Protein identifiziert werden. Um zusätzlich nachzuweisen, ob eine mögliche unspezifische Bindung von Fibronectin an die verwendeten Beads einen Einfluss auf dieses Ergebnis haben könnte, erfolgte eine zusätzliche massenspektrometrische Auswertung der an die Beads gebundenen Proteine. Hierzu wurden nach Inkubation der Amplikons im Plasma und Abspaltung der Beads durch das Restriktionsenzym sowohl die Amplikons als auch die verbleibende Beadfraktion der massenspektrometrischen Analyse zugeführt (s. Abbildung 8). In den Überständen mit dem abgespaltenen Amplikon war eine hohe Anzahl von zu Fibronectin zugehörigen Peptiden nachweisbar. Dies weist analog auf eine ebenfalls hohe Menge an Fibronectin selbst in diesen Proben hin. In den Kontrollen ohne Amplikons konnte kein Fibronectin nachgewiesen werden.

In der Beadfraktion ließ sich in den Proben mit Amplikons ebenfalls Fibronectin nachweisen, jedoch in deutlich geringerer Menge. In den Kontrollen ohne Amplikons

wurde eine nochmals geringere Menge nachgewiesen. Dies spricht dafür, dass eine allenfalls nur sehr geringe unspezifische Bindung von Fibronectin an die Beads vorlag und dieser Störfaktor durch die Trennung von Amplikons und Beads nach der Inkubation deutlich verbessert werden konnte.

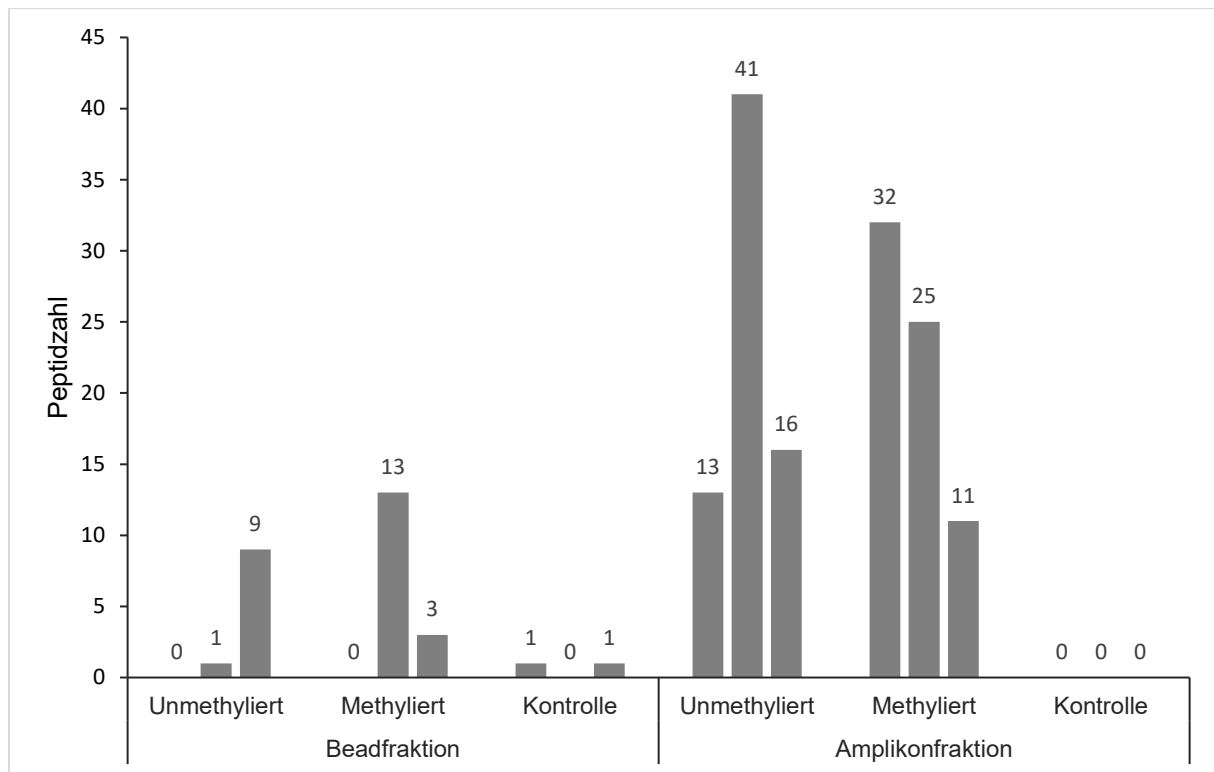


Abbildung 8: Vergleich der massenspektrometrisch identifizierten Peptidzahl für Fibronectin in der Bead- bzw. Amplikonfraktion

Methylierte und unmethylierte Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor wurden an magnetische Beads gekoppelt und mit Blutplasma inkubiert. Anschließend wurden die Amplikons durch ein Restriktionsenzym wieder von den Beads abgespalten. Die Beads wurden entfernt und separat resuspendiert. Anschließend wurden die in beiden Fraktionen enthaltenen Proteine massenspektrometrisch identifiziert. Die Nummerierung über den Säulen repräsentiert die Zahl der identifizierten Fibronectinpeptide als Absolutwert jeweils in Triplikaten. Kontrolle: leere Beads ohne Amplikons

3.3 Sequenz- und Methylierungsspezifität der Bindung von Fibronectin

Nach dem erfolgten Nachweis der Bindung von Fibronectin an die Amplikons (s. 3.2) sollte im nächsten Schritt diese Bindung für verschiedene Amplikons in Relation quantifiziert werden, um erste Hinweise auf Affinitätsunterschiede z. B. in Abhängigkeit von Methylierungsgrad oder Amplikonsequenz zu erhalten. Hierzu wurden die schon beschriebenen methylierten und unmethylierten Amplikons aus

einer GC-reichen Region des *RASSF1A*-Promotors sowie zusätzlich ein Amplikon aus einem Intron desselben Genes verwendet.

3.3.1 Quantifizierung mittels Pull-down-Assay

Zunächst wurde die Menge des gebundenen Fibronektins über die Anzahl der massenspektrometrisch identifizierten Peptide untersucht. Verglichen wurde zwischen methylierten und unmethylierten Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor sowie einem Amplikon aus dem Intronbereich von *RASSF1A*. Um konzentrationsabhängige Affinitätsunterschiede zwischen den verschiedenen Amplikons aufzudecken, wurde dazu der in 3.2.4 beschriebene Ansatz noch um eine Verdünnungsreihe des Blutplasmas mit BS/THES-Puffer erweitert. In diesem Verdünnungsexperiment (s. Abbildung 9) zeigte sich erneut eine spezifische Bindung von Fibronektin an die verwendeten Amplikons. Ein signifikanter Affinitätsunterschied zwischen methylierten und unmethylierten Amplikons ließ sich jedoch nicht feststellen, was auch darin begründet ist, dass es innerhalb der jeweiligen biologischen Replikate sehr große Unterschiede bei der identifizierten Peptidzahl gab. In Bezug auf die Amplikons aus dem Intronbereich zeigte sich jedoch eine leichtere Verdünnbarkeit der Bindung im Vergleich zu den Amplikons aus dem Promotorbereich. So war bei einer 1:2-Verdünnung bei den Proben mit dem Amplikon aus dem Intronbereich bereits keine Fibronektinbindung mehr nachweisbar, wohingegen bei den beiden Amplikons aus dem Promotorbereich auch bei einer 1:5-Verdünnung noch einzelne Peptide von Fibronektin zu finden waren. Dies wurde als Hinweis auf eine geringere Affinität des Fibronektins im Plasma zu den Amplikons aus dem Intronbereich interpretiert und daher weiter untersucht.

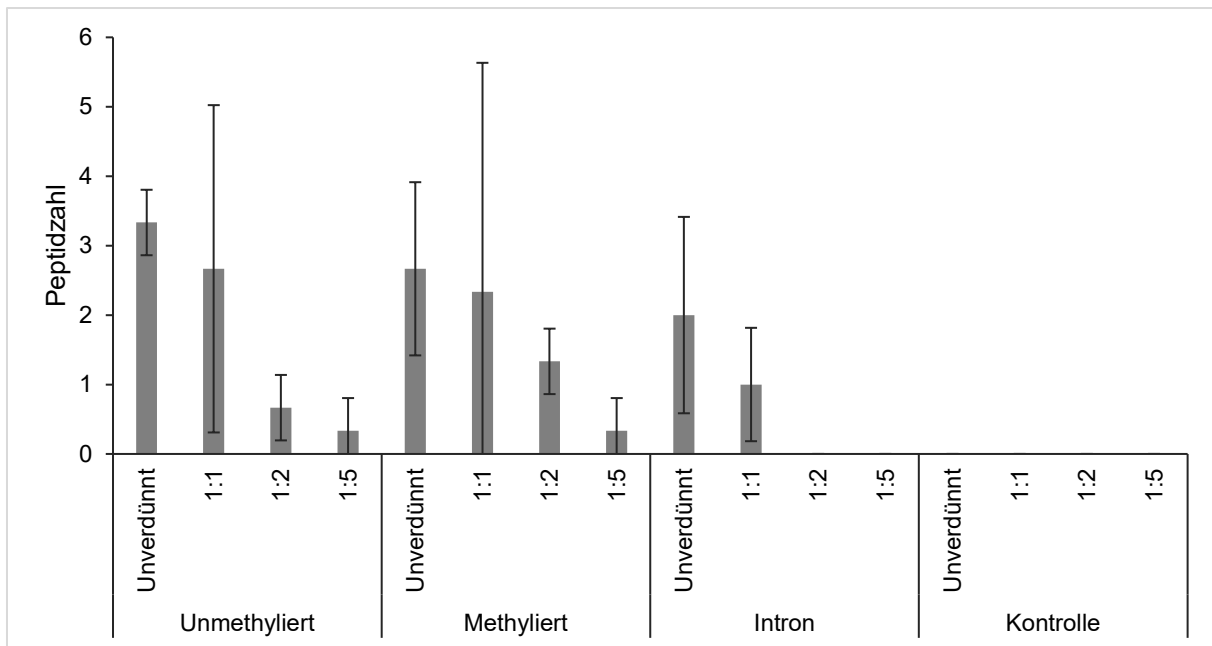


Abbildung 9: Anzahl massenspektrometrisch identifizierter Peptide für Fibronectin bei Inkubation unterschiedlicher Amplikons in wie angegeben verdünntem Blutplasma

Methylierte und unmethylierte Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor sowie ein Amplikon aus einem Intron von *RASSF1A* wurden an magnetische Beads gekoppelt und in stufenweise verdünntem Blutplasma inkubiert. Anschließend wurden die Amplikons durch ein Restriktionsenzym wieder von den Beads abgespalten. Die nach der Abspaltung im Überstand mit den Amplikons enthaltenen Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert. Dargestellt ist die identifizierte Peptidzahl für Fibronectin. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt, angegeben sind die Mittelwerte mit dem 95%-Konfidenzintervall als Fehlerindikator. Kontrolle: leere Beads ohne gebundene Amplikons ebenfalls in stufenweise verdünntem Blutplasma inkubiert.

Um auszuschließen, dass die hohen Schwankungen innerhalb der Replikate einzelner Proben durch Inter-Assay-Varianzen des Massenspektrometers bedingt waren, wurden stichprobenartig ausgewählte Proben mehrfach hintereinander, jeweils unterbrochen durch einen Spülgang, gemessen (s. Abbildung 10). Dabei zeigte sich, dass die durch das Massenspektrometer bestimmte Peptidzahl mit einer maximalen Streubreite von drei Peptiden für die einzelnen Proben ausreichend präzise war. Dementsprechend wurden als Ursprung der zuvor beschriebenen großen Streubreite der Werte in den biologischen Replikaten andere Faktoren, wie z. B. Inhomogenitäten im Plasma oder bei der Vermischung von Plasma und Beads während der Inkubation, vermutet.

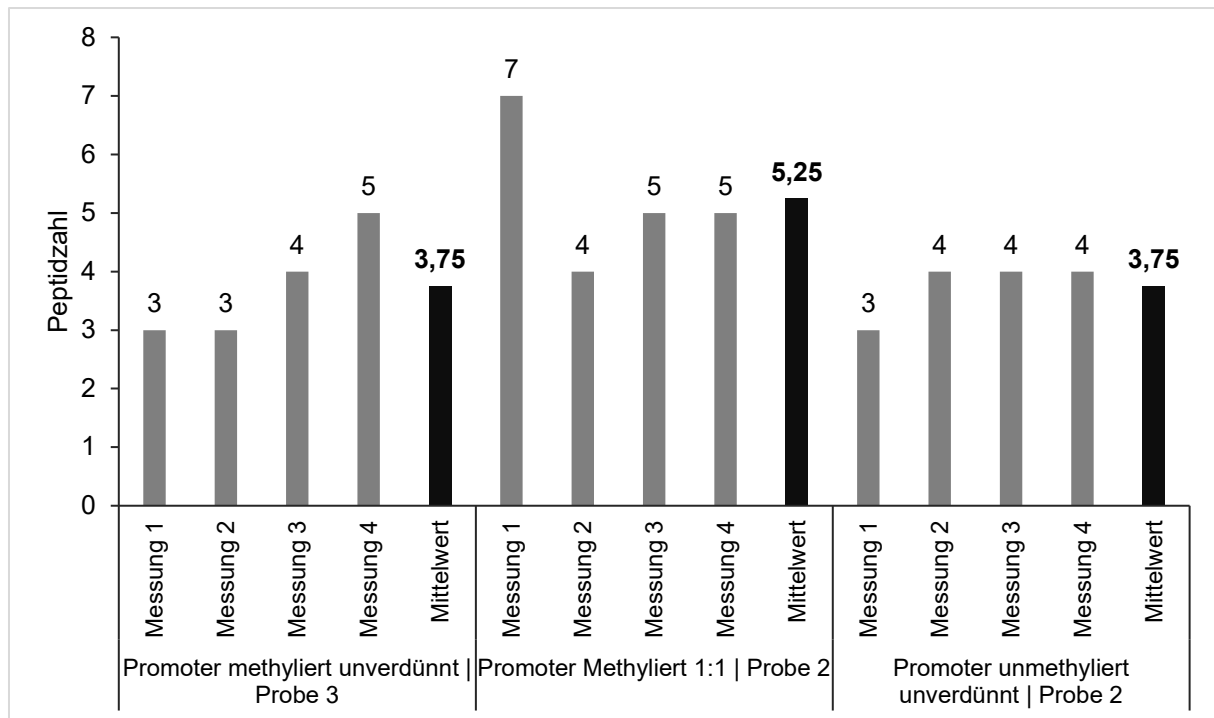


Abbildung 10: Peptidzahl für Fibronectin in technischen Replikaten drei ausgewählter Proben

Methylierte und unmethylierte Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor sowie ein Amplikon aus einem Intron von *RASSF1A* wurden an magnetische Beads gekoppelt und in stufenweise verdünntem Blutplasma inkubiert. Anschließend wurden die Amplikons mithilfe eines Restriktionsenzym wieder von den Beads abgespalten. Die nach der Abspaltung im Überstand mit den Amplikons enthaltenen Proteine wurden massenspektrometrisch identifiziert. Darstellung sowohl der ermittelten Peptidzahl für Fibronectin in wiederholten Messungen derselben ausgewählten Probe am Massenspektrometer als auch der Mittelwerte der jeweiligen Probenserie.

Zusätzlich zu den dargestellten massenspektrometrischen Messungen wurde das in demselben Pull-down-Assay gebundene Fibronectin durch einen FITC-markierten monoklonalen Antikörper bestimmt. Dieses unabhängige zweite Messverfahren bestätigte eine Bindung zwischen Fibronectin und den Amplikons (s. Abbildung 11). Ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Amplikons ließ sich auch hier aufgrund erheblicher Schwankungen der Werte innerhalb der jeweiligen Replikate nicht nachweisen und zeigt die Limitationen des Pull-down-Assays für eine präzise Quantifizierung der Proteinbindung.

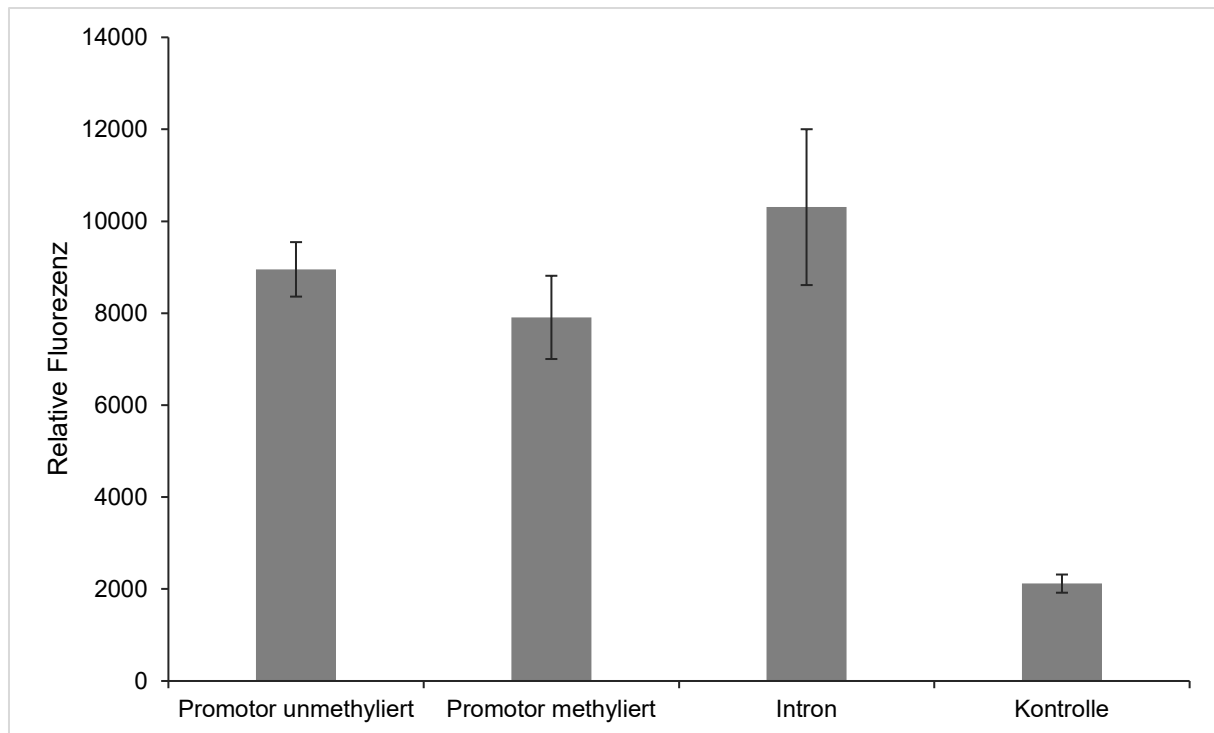


Abbildung 11: Bindung von Fibronektin an unterschiedliche Amplikons

Methylierte und unmethylierte Amplikons des *RASSF1A*-Promotors sowie ein Amplikon aus einem Intron von *RASSF1A* wurden an magnetische Beads gekoppelt und in Blutplasma inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein FITC-markierter anti-Fibronektin Antikörper hinzugegeben, erneut inkubiert und anschließend gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine Abspaltung der Amplikons von den Beads. Letztere wurden entfernt und die an die Amplikons gebundene Menge an Fibronektin im Überstand fluorimetrisch bestimmt. Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit dem 95%-Konfidenzintervall. Kontrolle: leere Beads ohne gebundene Amplikons.

3.3.2 Quantifizierung durch abgewandelten ELISA

Aufgrund der erheblichen Schwankungen in den Messungen der Peptidzahl von Fibronektin im Pull-down-Assay wurde eine zweite Methode zur Bestätigung und genaueren Quantifizierung der Bindung angewandt, indem die Wells einer ELISA-Platte mit Fibronektin beschichtet und Amplikons einer logarithmischen Verdünnungsreihe hinzugegeben wurden. Anschließend wurde die Menge an gebundenen Amplikons durch Streptavidin/HRP photometrisch bestimmt (s. Abbildung 12). Amplikons aus dem Intronbereich zeigten im Vergleich zu denen aus dem Promotorbereich eine signifikant geringere Bindung an das immobilisierte Fibronektin über den gesamten Bereich eingesetzter Amplikonkonzentrationen. Des Weiteren ließ sich bei zwei Verdünnungen (500 ng/ml und 5 ng/ml Amplikon) eine signifikant geringere Bindung der methylierten Amplikons im Vergleich zu den unmethylierten zeigen. Bei allen anderen Verdünnungen war jedoch kein signifikanter Unterschied feststellbar. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die

Menge von 500 ng/ml im Verhältnis zum Fibronectin im dynamischen Bereich dieses Assays lag, wohingegen oberhalb dieses Wertes eine Sättigung des Fibronectins erreicht wurde und unterhalb die Konzentration der Amplikons zu gering war. Letztendlich lässt sich anhand dieser Daten jedoch keine methylierungsabhängige Affinitätsdifferenz des Fibronectins nachweisen. Vielmehr scheint die Fibronectinbindung sequenzabhängig zu sein, wie sich anhand des signifikanten und konzentrationsunabhängigen Unterschiedes in der Bindung zwischen Intron- und Promotorsequenz belegen lässt.

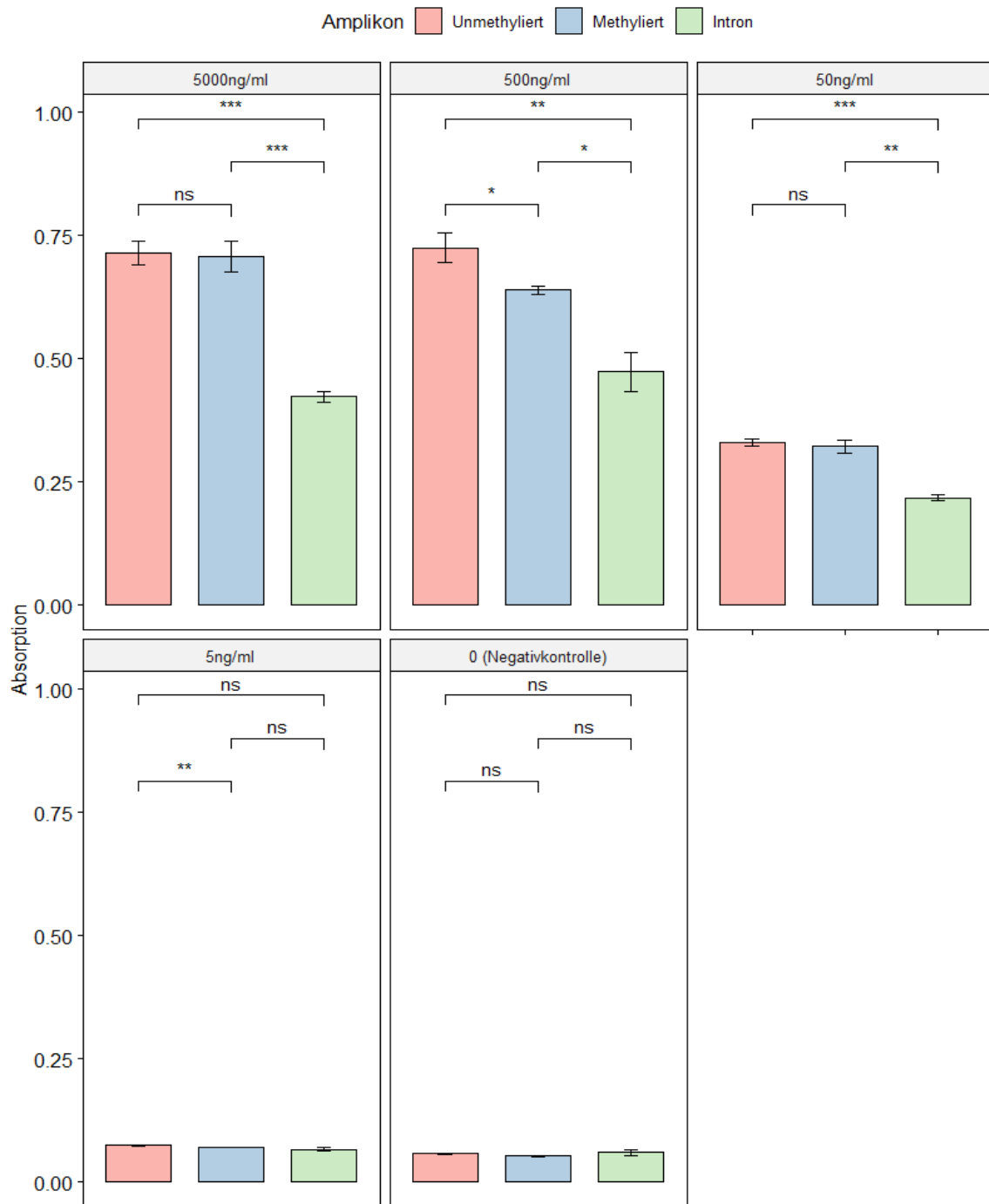


Abbildung 12: Bindung verschiedener Amplikons an eine mit Fibronectin beschichtete Platte

Die Wells einer ELISA-Platte wurden mit Fibronectin beschichtet (1 µg pro Well). Anschließend wurden methylierte und unmethylierte Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor sowie aus einem Intron von *RASSF1A* in der angegebenen Konzentration hinzugegeben. Alle Amplikons enthielten jeweils einen biotinylierten Primer. Nach einer Inkubation und mehreren Waschschrinen wurde die gebundene Menge Amplikons durch Zugabe von Streptavidin-HRP und anschließende photometrische Messung bestimmt.

Unmethyliert: Promotor unmethyliert, Methyliert: Promotor methyliert, Intron: Intron.

Durchgeführt in Triplikaten dargestellt als Mittelwerte mit Standardfehler. Ein ungepaarter T-Test wurde genutzt, um die jeweiligen Differenzen auf Signifikanz zu testen. Signifikanzniveaus: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,005$, *** = $p < 0,0005$, ns = keine Signifikanz.

3.3.3 Fazit

In den durchgeführten Untersuchungen konnte durch Einsatz verschiedener Methoden und unter physiologischen Bedingungen mehrfach der Nachweis einer Bindung von Fibronektin an DNA-Amplikons mit einer Länge der üblich beobachteten cfDNA nachgewiesen werden. Es handelt sich nach den Ergebnissen um eine direkte Interaktion des Fibronektins mit der DNA. Diese Bindung ist von weiteren Proteinen oder Cofaktoren unabhängig, da sich die Bindung auch mit aufgereinigtem Fibronektin in einer Pufferlösung nachweisen lässt. Die Ergebnisse belegen nicht, dass DNA-Methylierung einen Einfluss auf die Bindung von Fibronektin besitzt. Ein signifikanter Affinitätsunterschied ließ sich jedoch bei der Bindung verschiedener DNA-Abschnitte mit unterschiedlichem CpG-Gehalt bzw. unterschiedlichen Sequenzen beobachten. Die wenig CpG-reiche Sequenz des Intronbereichs wurde schlechter gebunden als die CpG-reichen Amplikons des Promotorbereichs. Die Bindung von Fibronektin an cfDNA kann also anhand dieser Ergebnisse als sequenz- jedoch eher nicht als methylierungsabhängig beschrieben werden.

3.4 Bindung von Fibronektin an Nukleosomen

3.4.1 Isolierung von Nukleosomen

Wie beschrieben wurden Chromatinextraktionen aus zwei Melanomzelllinien durchgeführt und die gewonnene Chromatinfraction anschließend sonifiziert, um Mono- bzw. Oligonukleosomen zu gewinnen. Um den Erfolg dieser Extraktion nachzuweisen, wurden die isolierten Nukleosomen mithilfe des Cell Death Detection ELISA Plus nachgewiesen (s. Abbildung 13). Dieser Nachweis beruhte auf dem gleichzeitigen Binden eines Anti-Histon und eines Anti-dsDNA-Antikörpers nach dem Sandwich-ELISA-Prinzip. So konnte gezeigt werden, dass tatsächlich histongebundene DNA in den isolierten und sonifizierten Chromatinextrakten enthalten war.

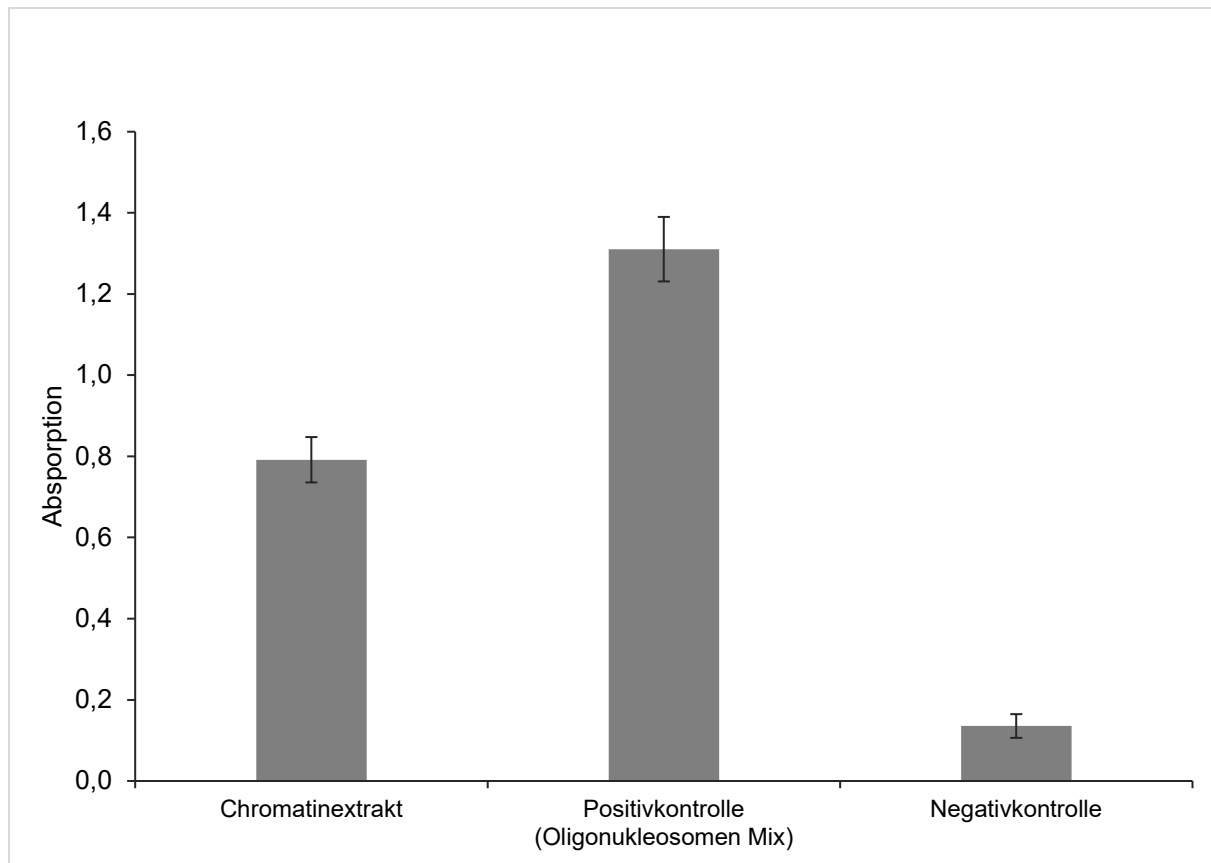


Abbildung 13: Nachweis von isolierten Oligonukleosomen mithilfe des Cell Death Detection ELISA Plus

Die jeweiligen Proben wurden auf eine mit Anti-Histon-Antikörpern beschichtete Platte gegeben und anschließend ein DAB-markierter anti-dsDNA Antikörper hinzugegeben. Dargestellt ist die Absorption nach Reaktion mit dem DAB-Substrat. Als Positivkontrolle wurde der vom Hersteller zu diesem Zweck mitgelieferte Oligonukleosomenmix verwendet. Durchgeführt in Triplikaten, dargestellt als Mittelwerte mit 95%-Konfidenzintervall. Negativkontrolle: nur Puffer.

3.4.2 Fibronectin Bindungs-Assay

Anschließend wurde für die histongebundene DNA der Chromatinextrakte überprüft, ob eine Fibronectinbindung an diese und/oder den im Kit enthaltenen Oligonukleosomen-Mix zu verzeichnen war. Hierzu wurden die jeweiligen Proben in einer mit Anti-Histon-Antikörpern beschichteten Platte inkubiert und anschließend Fibronectin hinzugegeben. Das gebundene Fibronectin wurde dann durch den bereits in den Vorexperimenten charakterisierten FITC-markierten Anti-Fibronectin-Antikörper nachgewiesen. Es zeigte sich jedoch weder in den Proben mit den Chromatinextrakten noch in den Proben mit dem Oligonukleosomen-Mix eine Bindung von Fibronectin (s. Abbildung 14).

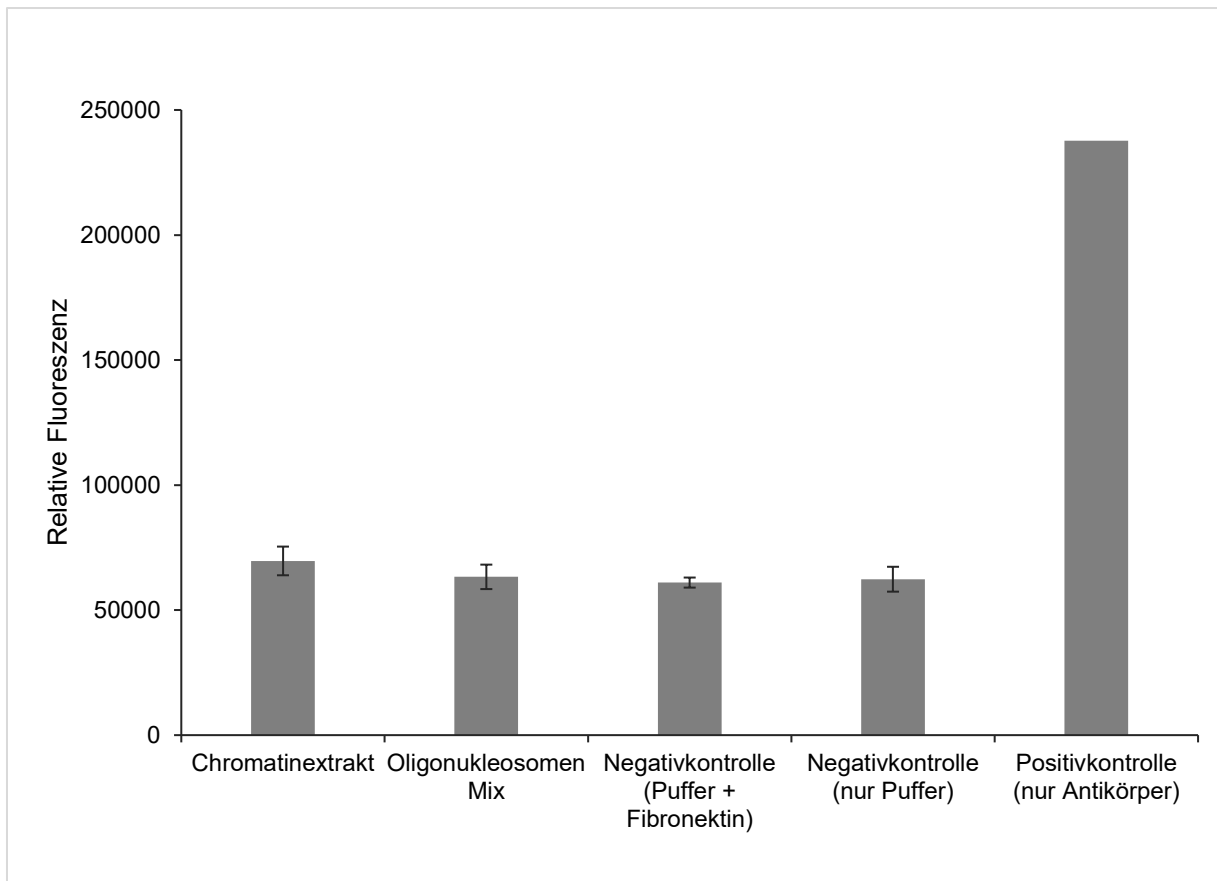


Abbildung 14: Fibronectin Bindungs-Assay

Histongebundene DNA aus sonifizierten Chromatinextrakten oder einem kommerziellen Oligonukleosomen-Mix wurde über eine mit Anti-Histon-Antikörpern besetzte Platte gegeben. Hierdurch wurden diese Oligonukleosomen ebenfalls an die Platte gekoppelt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Fibronectin. Nach einer Inkubation wurde die gebundene Menge an Fibronectin durch Zugabe eines FITC-markierten Anti-Fibronectin-Antikörpers bestimmt. Durchgeführt in Triplikaten, dargestellt als Mittelwerte mit Standardabweichung.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals systematisch eine direkte Interaktion zwischen Fibronectin und DNA-Molekülen unter physiologischen Bedingungen im Blutplasma nachgewiesen werden. Dafür wurde eine neuartige Methode entwickelt, mit der die Bindung von Plasmaproteinen an DNA im Blutplasma selbst untersucht werden kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Fibronectin an DNA im Blutplasma sequenz-, jedoch nicht methylierungsabhängig ist.

DNA-bindende Eigenschaften des Fibronectins konnten bereits vor mehr als 40 Jahren erstmals nachgewiesen werden, ausgehend von der Erkenntnis, dass Antikörper gegen Chromatin in Fibroblasten mit einem Plasmaprotein kreuzreaktiv waren.¹²¹ Dieses Protein konnte später als Fibronectin identifiziert werden. Bei der späteren Untersuchung von DNA-bindenden Proteinen im Blutplasma konnten ebenfalls Hinweise auf eine Bindung von Fibronectin gewonnen werden.¹²² Diese Ergebnisse beruhen jedoch zumeist auf *In-vitro*-Ansätzen in verschiedenen Pufferlösungen. Eine Bindung von Fibronectin und DNA unter physiologischen Bedingungen wurde zwischenzeitlich aufgrund der Bindungseigenschaften in Gegenwart bivalenter Kationen auch bezweifelt.¹²³ In den im Rahmen der Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch ein Nachweis einer Bindung in nativem Blutplasma selbst erbracht werden.

4.1 Nachweis cfDNA-bindender Proteine im Blutplasma

4.1.1 Auswahl von Genabschnitten und Zelllinien

In den ersten Versuchen dieser Arbeit wurden Amplikons aus definierten Genabschnitten mit Blutplasma inkubiert. Diese der Größe nach „simulierten“ cfDNA-Fragmente standen den Plasmaproteinen als Bindungspartner zur Verfügung. Ausgangspunkt für die Hypothese einer Proteinbindung von cfDNA im Blutplasma war ein in mehreren Studien belegter Stabilitätsunterschied zwischen methylierter und unmethylierter DNA, für den eine Interaktion mit einem Plasmaprotein als ursächlich vermutet wurde.^{119,120} Dementsprechend erfolgten die Untersuchungen in dieser Arbeit unter besonderer Berücksichtigung der Methylierung und jeweils mit methylierten und unmethylierten Amplikons. Für die Herstellung der Amplikons wurden daher auch CpG-reiche Regionen aus den Promotorbereichen der Gene

RASSF1A, *COL1A2*, *CYP2A3* und *RARB* ausgewählt, die bereits für die genannten Stabilitätsuntersuchungen verwendet wurden¹¹⁹ und bei denen es sich um Genbereiche handelt, für die in mehreren Studien und im Rahmen von Vorarbeiten aus unserem Labor eine Hypermethylierung bei Melanompatienten nachgewiesen werden konnte.¹²⁴⁻¹²⁶ Von diesen vier Genen wurde letztendlich *RASSF1A* bevorzugt, da sich bei diesem die umfangreichste Evidenz für eine differenzielle Methylierung im Rahmen von verschiedenen Tumorerkrankungen finden lässt.¹²⁷ Weiterhin zeigten sich bei dem entsprechenden Amplikon günstige Eigenschaften hinsichtlich der für den experimentellen Ablauf notwendigen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme mit Restriktionssequenzen für methylierungsabhängige Enzyme und einer Restriktionsstelle proximal am biotinylierten Primer zur Abspaltung der Beads. Um die Bindung an DNA in unterschiedlichen Sequenzkontexten untersuchen zu können, wurde zusätzlich ein CpG-arter Abschnitt aus einem Intron von *RASSF1A* ausgewählt.

Die Länge der Amplikons wurde mit jeweils ca. 400 bp bewusst länger als der Großteil der physiologisch vorkommenden cfDNA gewählt, fällt jedoch noch in das beobachtete Spektrum an Fragmentlängen.⁸⁸ Damit sollte einerseits verhindert werden, dass in den folgenden experimentellen Schritten (z. B. Bindung an Beads oder Bindung von Plasmaproteinen) sterische Hinderungen auftreten. Außerdem wurde so eine Fragmentlänge gewählt, die nicht nur der apoptotisch generierten, sondern z. B. auch der im Rahmen von nekrotischen Prozessen freigesetzten cfDNA entspricht.¹²⁸

4.1.2 Pull-down-Assay zur Identifikation DNA-bindender Proteine im Blutplasma

Diese Arbeit etabliert eine einfache Labormethode zur Identifikation DNA-bindender Proteine im Blutplasma. Zu diesem Zweck wurde ein vorbeschriebenes Protokoll zum Nachweis DNA-bindender Proteine aus Chromatinextrakt¹²⁹ für die Verwendung im Blutplasma angepasst. Dabei wurden die gewählten Amplikons an magnetische Beads gekoppelt, im Blutplasma inkubiert, wieder aus dem Plasma entfernt und die gebundenen Proteine massenspektrometrisch identifiziert. Wie sich in den entsprechenden Vorversuchen zeigte, war zur Verbesserung der Ergebnisqualität die Reduktion unspezifischer Interaktionen zwischen Plasmaproteinen und den verwendeten Beads entscheidend. Diese Bindungen waren in allen Proben inklusive der Negativkontrollen zu finden und erschwerten so eine Identifikation von Proteinen mit spezifischer Bindung an die gekoppelten Amplikons. Diese Bindungen ließen sich

auch durch Blockieren des Streptavidins an der Bead-Oberfläche durch Biotin nicht reduzieren. Es ist damit am ehesten davon auszugehen, dass es sich um zusätzliche unspezifische Interaktionen handelt, die nicht mit der Biotin-Streptavidin-Interaktion des Systems zusammenhängen. Keine der beschriebenen Methoden, wie z. B. Filtration des Plasmas oder vorherige Zugabe eines Überschusses an Beads, führte zu einer Reduktion der unspezifischen Bindungen, sodass letztendlich eine Abtrennung der Amplikons von den Beads durch ein Restriktionsenzym erfolgte. Dieser zusätzliche Protokollschritt erlaubte die Trennung der unspezifisch an die Beads gebundenen von den tatsächlich an die DNA gebundenen Proteinen. Dabei wird jedoch vorausgesetzt, dass die Interaktion der Proteine mit der DNA stabil genug ist, um über den Trennungsschritt hinaus erhalten zu bleiben. Aus diesem Grund wurde auch der Restriktionsverdau gegenüber den weiteren getesteten Methoden zur Trennung der Beads und Amplikons bevorzugt, da bei diesem die schonendsten Reaktionsbedingungen unter physiologischen Salz- und Temperaturbedingungen möglich waren. Auf diese Weise konnten die Beads als Träger unspezifischer Bindungen aus den nachfolgenden Analysen der Amplikons eliminiert und so der Hintergrund unspezifischer Proteine deutlich reduziert werden. Die noch vorhandenen deutlich geringeren Mengen unspezifisch gebundener Proteine sind ggf. darauf zurückzuführen, dass während des Restriktionsverbaus unspezifisch gebundene Proteine in den Überstand mit den Amplikons gelangten. Eine geringgradige und unspezifische Bindung der Proteine an die Amplikons selbst kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die massenspektrometrische Methode zeigte deutliche Schwankungen in der Anzahl identifizierter Peptide, die auch auf Mengenschwankungen der adsorbierten Proteine hinweisen können und am ehesten auf unspezifische Interaktionen mit Plasmaproteinen oder Inhomogenitäten im Blutplasma zurückzuführen sind. Letztendlich lässt sich anhand der gewonnenen Daten jedoch eine deutliche und statistisch signifikante Bindung von Fibronectin an die verwendeten Amplikons nachweisen. Insbesondere vor dem Hintergrund der verhältnismäßig niedrigen Konzentration von Fibronectin (ca. 250 – 500 µg/ml)^{130,131} im Blutplasma verglichen mit den abundanteren Proteinen wie Albumin und Immunglobulinen ist eine spezifische Interaktion wahrscheinlich. Mit dieser speziellen Nachweismethode lässt sich jedoch keine eindeutige Aussage darüber treffen, ob die identifizierten Proteine tatsächlich direkt an die verwendeten Amplikons gebunden haben oder diese

Bindung durch andere Proteine vermittelt wurde bzw. das Protein lediglich Teil eines an die DNA gebundenen Komplexes war. In dieser Arbeit wurde deswegen der Nachweis einer direkten Bindung unter Zuhilfenahme einer weiteren Methode erbracht, mit der gleichzeitig auch eine genauere Quantifizierung der Bindung erfolgte. Abschließend lässt sich aber festhalten, dass der verwendete Pull-down-Assay mit anschließender Massenspektrometrie eine geeignete Methode zur Identifikation von Kandidatenproteinen sein kann, dessen Interaktion mit der jeweiligen Zielstruktur jedoch noch durch weitere Methoden bestätigt werden sollte.

4.1.3 Untersuchung der Interaktion von Fibronectin mit histongebundener DNA

Die Untersuchung einer Bindung an histongebundene DNA erfolgte unter Verwendung des Cell Death Detection ELISA Plus. Die eingesetzten Nukleosomen wurden aus der Sonifikation von Chromatinextrakt aus einer der auch schon für die vorherigen Versuche verwandten Zelllinien gewonnen und im ELISA verifiziert. Allerdings ließ sich im nächsten Schritt weder eine Bindung von Fibronectin an die gewonnene histongebundene DNA noch an die vom Hersteller des Kits mitgelieferten Oligonukleosomen als Positivkontrolle für den Nachweis von histongebundener DNA feststellen, woraus sich schlussfolgern lässt, dass an Nukleosomen gebundene DNA nicht für eine Bindung an Fibronectin zugänglich ist und somit keine Bindung an den DNA-Histon-Komplex erfolgt. Jedoch ist eine Limitation des verwendeten ELISA zu beachten, da dieser zwar durch zwei Antikörper das Vorhandensein von DNA und Histonen nachweist, aber nicht zwangsläufig das Vorhandensein strukturell intakter Nukleosomen belegt. Daher scheint ggf. eine Wiederholung des Versuches und Ergänzung eines zusätzlichen Nachweises der Histonproteine, z. B. durch eine SDS-PAGE, sinnvoll.

4.2 Eine neue Rolle von Plasma-Fibronectin?

Mit dem direkten Nachweis einer – möglicherweise sequenzabhängigen – Interaktion von Plasma-Fibronectin und cfDNA ergeben sich Fragen hinsichtlich eines möglichen Einflusses dieser Bindung auf deren Analysen. Fibronectin ist ein vielseitiges Protein, sodass zahlreiche Überschneidungen mit weiteren physiologischen Prozessen möglich erscheinen. Zunächst soll daher ein Überblick über bereits bekannte Details zu Struktur und Funktion von Plasma-Fibronectin gegeben werden.

4.2.1 Die Bedeutung von Fibronectin im menschlichen Blutplasma

Fibronectin ist ein Glykoprotein und liegt üblicherweise als Dimer aus zwei Untereinheiten mit einer Größe von jeweils ca. 250 kDa vor.¹³² Fibronectin kommt in zahlreichen Isoformen im menschlichen Körper vor, die sich im Wesentlichen in zwei funktional verschiedene Hauptgruppen einteilen lassen: Einerseits das zelluläre Fibronectin als Bestandteil der extrazellulären Matrix und andererseits Fibronectin im Blutplasma.¹³³ Im Plasma liegt es in einer Konzentration von ca. 250 – 500 µg/ml vor und scheint mit dem Alter der Versuchspersonen anzusteigen.^{130,131} Die beiden Formen zeigen Konformationsunterschiede, wobei das Fibronectin im Plasma unter physiologischen Bedingungen in einer kompakteren Quartärstruktur vorliegt als das zelluläre Fibronectin.¹³⁴ Die Variationen zwischen den verschiedenen Isoformen und auch zwischen zellulärem und plasmatischem Fibronectin entstehen durch alternatives Spleißen derselben Prä-mRNA in drei verschiedenen Genregionen (EDA, EDB und IIICS), wobei bei der plasmatischen Form des Fibronectins die EDA- und EDB-Exons immer durch Exon-Skipping entfernt werden.¹³³ Diese Form des Fibronectins, die auch im Plasma zu finden ist, wird vornehmlich in Hepatozyten produziert,¹³⁵ während das Fibronectin in der extrazellulären Matrix auch durch die lokalen Parenchym- und Bindegewebszellen produziert wird.¹³³ Zwischen dem Fibronectin im Plasma und dem der extrazellulären Matrix herrscht dabei ein Gleichgewicht und es werden kontinuierlich Teile des Plasma-Fibronectins in die extrazelluläre Matrix der verschiedenen Gewebe aufgenommen.^{136,137}

Für das Fibronectin in der extrazellulären Matrix konnten neben der Beteiligung an ihrem strukturellen Aufbau auch wichtige Funktionen bei der Adhäsion und Invasion von Zellen gezeigt werden, vermittelt vor allem durch Bindung von Integrinen an der Zelloberfläche.^{138,139} Plasma-Fibronectin hat ebenfalls vielfältige Eigenschaften. Im Vordergrund scheint eine Beteiligung an der Blutgerinnung zu stehen. So wurde nachgewiesen, dass bei der Verletzung eines Gefäßes eine schnelle Ablagerung von Fibronectin am Ort der Verletzung noch vor der Adhäsion von Thrombozyten stattfindet, die klassischerweise den Beginn der Blutgerinnung darstellt.¹⁴⁰ In Abwesenheit von Fibronectin ist, wie in einem entsprechenden Modell gezeigt werden konnte, die Adhäsion von Thrombozyten gestört.¹⁴¹ Zudem ist Fibronectin direkt auch an der nachfolgenden Aggregation von Thrombozyten und der Ausbildung eines Thrombus beteiligt, wobei die die Funktion von Fibronectin wesentlich von dem Vorhandensein von Fibrin beeinflusst wird.¹⁴² Während

Fibronectin in Gegenwart von Fibrin die Ausbildung und mechanische Stabilität eines Thrombus und die Adhäsion von Thrombozyten fördert, wird in Abwesenheit von Fibrin dieser Prozess durch Fibronectin inhibiert.¹⁴⁰ Fibronectin im Plasma besitzt also vermutlich auch eine regulatorische Funktion. Durch Bindung des Fibronectins an Fibrinfasern wird außerdem deren Durchmesser moduliert, sodass es zur Ausbildung dickerer und mechanisch resistenterer Fasern kommt. Der Effekt dieser Interaktion zwischen Fibronectin und Fibrin konnte modellhaft bei der Aggregation von Thrombozyten an Fibrin und Fibronectinmatrizen sowie einer Matrix mit einer Kombination aus beidem gezeigt werden. Hierbei kam es an der Fibrin-Fibronectin-Matrix zu einer wesentlich stärkeren Adhäsion und Thrombusbildung als bei den anderen Matrizen mit jeweils nur einem der Bestandteile.¹⁴³

Eine weitere Funktion von Plasma-Fibronectin liegt in der Opsonisierung von Bakterien und anderen Mikropartikeln.¹⁴⁴⁻¹⁴⁹ Durch die Fibronectinbindung kommt es zu einer vermehrten Phagozytose durch Makrophagen und Zellen des retikuloendothelialen Systems. Aber auch über die Opsonisierung hinaus ist Fibronectin an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Für bestimmte Subeinheiten des Fibronectins konnte so, bei deren Freisetzung aus der extrazellulären Matrix, eine pro-inflammatorische Signalwirkung über TLR4-Rezeptoren nachgewiesen werden.¹³⁷ Inwiefern auch Plasma-Fibronectin einen Einfluss auf diesen Signalweg hat, ist allerdings nicht bekannt. Nachgewiesen ist jedoch, dass Fibronectin vermehrt aus dem Blutplasma in inflammatorisches Gewebe aufgenommen und dort in die extrazelluläre Matrix integriert wird.¹⁵⁰ Bei einer systemischen Infektionsreaktion im Rahmen einer Sepsis konnte sogar ein kurzfristiger Abfall der Fibronectinkonzentration im Plasma nachgewiesen werden.¹⁵⁰ Hierdurch ergab sich auch ein möglicher Therapieansatz in Form einer Fibronectinsubstitution bei septischen Patienten, der jedoch in klinischen Studien keinen Überlebensvorteil zeigen konnte.¹⁵¹

Aufgrund der genannten Beteiligung von Fibronectin an der Thrombogenese finden sich verschiedene Untersuchungen, in denen die Rolle von Fibronectin im Plasma bei der koronaren Herzkrankheit untersucht wurde – mit unterschiedlichen Ergebnissen. Der Großteil der Studien konnte eine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Erkrankung und einer erhöhten Fibronectinkonzentration im Plasma nachweisen,¹⁵²⁻¹⁵⁵ während zwei andere Studien entweder keine Assoziation¹⁵⁶ oder

gar eine gegenläufige Beziehung von Fibronektinkonzentration und koronarer Herzkrankheit¹⁵⁷ festgestellt haben.

Erhöhte Werte von Fibronektin wurden des Weiteren auch bei Tumorerkrankungen wie dem Mammakarzinom, dem Ovarialkarzinom, dem Magenkarzinom oder dem Nierenzellkarzinom gefunden,¹⁵⁸⁻¹⁶² weshalb über die Nutzbarkeit von Fibronektin als Biomarker für Tumorerkrankungen spekuliert wurde. Im Falle des Nierenzellkarzinoms schien die Konzentration von Fibronektin auch tatsächlich mit dem Fortschreiten der Krankheit zu korrelieren,¹⁵⁸ allerdings konnte bei Mamma- und Ovarialkarzinom^{160,161} sowie Magenkarzinom¹⁶² keine solche Verbindung hergestellt werden. Zudem ließ sich auch ein Ansteigen des Fibronektins bei nicht malignen Erkrankungen feststellen, sodass die Nutzbarkeit von Fibronektin als Tumormarker eher infrage steht.

Neben erhöhten Werten von Plasma-Fibronektin können auch verringerte Konzentrationen in Zusammenhang mit verschiedenen Krankheitszuständen auftreten. Die häufigste Ursache einer verminderten Fibronektinkonzentration findet sich in einer verringerten Synthese bei einer Leberzellschädigung, z. B. im Rahmen einer chronischen Hepatitis.¹⁶³

Des Weiteren ließ sich zeigen, dass nicht nur die Gesamtkonzentration des Fibronektins, sondern auch die Freisetzung der verschiedenen Isoformen variabel ist, sodass z. B. bei einer Sepsis eine signifikant veränderte Freisetzung der Isoformen beobachtet werden konnte, ohne dass sich die Gesamtkonzentration an Fibronektin im Blutplasma änderte.¹⁶⁴ Insgesamt ist Plasma-Fibronektin also ein sehr vielseitiges Protein, das an zahlreichen Prozessen im menschlichen Körper beteiligt ist bzw. durch diese beeinflusst wird.

4.2.2 Fibronektin als cfDNA-bindendes Protein

Zusätzlich zu den zahlreichen bereits entdeckten Funktionen des Fibronektins im menschlichen Blutplasma konnte in vorliegender Arbeit eine neue Funktion des Fibronektins als Bindungspartner für cfDNA nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Affinität von Fibronektin zu den verschiedenen eingesetzten Amplikons. Die Sequenzen dieser Amplikons und einige Charakteristika sind in Abbildung 15 dargestellt. Wie darin zu erkennen ist, unterscheiden sich die verwendeten Amplikons im Wesentlichen hinsichtlich ihres CpG-Gehalts und ihrer Sequenz.

ACAGCTCCCGAGGACTAGGTCGGTTACTTTGCCCCATCGCTGAAGAGTGC GCGGAAAATGGTTTATCCCTTGTCCG
 CACTCCACTCGTATCTGGGCCACAGATGAGCAGAGGTGGCTGCTTATATGTAAAAATACCGCTGATTTTAAGTT
 TCTTATCTTTAAAATGCCTTGGCCCTTCTTGAGAAAGGGTTTTGTGCCTACTGTCCCTCGGAGTCCATCTTCCCAGG
 CTTGCCTCTTCTCAAACACTCATGACCCCTCCAGAACCTTTAGGGTGAAGGGAAAATTACCACCTATGGGAGGGA
 GCCTGGAAAATTTAGAACCTTTGGTGGGCCCTGCAAGCAGGAGTTTTGTTGAGTCTTTATTTAGCAAAACACC
 CTTTTCTGACCCAGTGAATCAGATGCTAAAATATGCA CGCAGC

Länge: 416bp, GC-Gehalt 48 %

GGAAGACAAGCCCTGCAAAACAGTTCCAGGAGTGTATAGGCATTGTAAGTAAAGCAAAGGCTTCCAGACCACTCA
 TGCCAAAGCCTAGGGTTGTCCCAAGAAGCCAGGAAGAATTGCCTTGGTGTCTTTGATCTTTCTGGTGTGGAAAAT
 CTTCTGGAGATGCAGGAGTCCATCTAATGACATGAGGAGGCCCTTCCAGACTTTTTACCTGGAAGCTTTCTGGC
 TCCAAGGTATTAGGCCTGTGGAGTGAATTAGACTCAGAATATGCCTGACCTGTCCACAGGTAATTGGGGAACAT
 CTGACTTGGTTGTCTCAGTAAGGTGACCGTTTTGTAGGGCCCATCTTCCATACAAACTGCTGTCAGGGATCCTAC
 CAGAGATCATTAGCCAAGAGCCTGACATCAGAAAGCCAGTCTTAGCTTGTGTGA

Länge: 431bp, GC-Gehalt: 48 %

Abbildung 15: Amplifizierte Sequenzen aus dem *RASSF1A*-Promotor (oben) und einem Intron desselben Genes (unten). CpG-Dinukleotide in beiden Sequenzen sind hervorgehoben.

Das CpG-reiche Amplikon aus dem Promotorbereich wurde mit einer signifikant höheren Affinität gebunden als das Amplikon aus dem Intron. Dieser Affinitätsunterschied konnte sowohl in der massenspektrometrischen Analyse aus dem Pull-down-Assay als auch immunchemisch gezeigt werden und bestätigte sich in der Nachweisbarkeit DNA-gebundener Peptide im Titrationsverfahren. So zeigte sich eine deutliche Fibronectinbindung bei den Promotoramplikons noch bei Verdünnungsstufen des Plasmas, in denen eine Bindung an das Amplikon aus dem Intronbereich nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Die Fibronectinbindung im Blutplasma wird also unter physiologischen Bedingungen offensichtlich wesentlich durch molekulare Eigenschaften der DNA-Sequenz beeinflusst. Diese Erkenntnis ist im Einklang mit diversen Vorarbeiten, in denen im Modell eine sequenzspezifische Bindung von Fibronectin an DNA gezeigt werden konnte.^{121,165,166} In einem der genannten Experimente wurde ebenfalls eine höhere Affinität zu DNA-Sequenzen aus dem Promotorbereich des Fibronectin-Genes selbst dargestellt und über eine selbstregulierende Wirkung des Fibronectins auf die Expression des eigenen Genes spekuliert.¹⁶⁶

Im Zusammenhang mit den vorliegenden Ergebnissen lässt sich eher schlussfolgern, dass Fibronectin eine erhöhte Affinität zu bestimmten Sequenzmotiven hat, wie sie innerhalb von Promotoren vorkommen, und z. B. Transkriptionsfaktorbindungsstellen oder Ähnliches darstellen. Hierzu zählen u. a. CpG-Inseln, die in einem Großteil der Promotoren im menschlichen Genom anzutreffen sind und durch deren Methylierung der Zugang zu den Promotorsequenzen reguliert wird.¹⁶⁷ Wie dargestellt – und auch bei der Amplikonauswahl beabsichtigt – unterscheiden sich die gewählten

Amplikonsequenzen deutlich in ihrem CpG-Gehalt, sodass dieser als möglicher Einflussfaktor auf die Fibronectinbindung plausibel erscheint. Letztlich sind die vorliegenden Daten jedoch nicht ausreichend, um einen solchen Zusammenhang zu belegen.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern die Methylierung eines bestimmten CpG-reichen Amplikons Einfluss auf dessen Bindung an Fibronectin haben kann. In den durchgeführten Untersuchungen finden sich möglicherweise Hinweise darauf, dass methylierte DNA-Sequenzen mit einer geringeren Affinität als unmethylierte gebunden werden (s. Abbildung 12). Dieser Unterschied scheint jedoch wesentlich geringer ausgeprägt zu sein als der Unterschied zwischen Amplikons unterschiedlicher Sequenzen und zeigte sich nur bei einem spezifischen Konzentrationsverhältnis zwischen Fibronectin und DNA. Zur endgültigen Bestätigung oder Widerlegung einer Methylierungsabhängigkeit der Fibronectinbindung sind daher noch weitere Untersuchungen notwendig.

4.2.3 Auswirkungen einer Bindung von cfDNA durch Fibronectin

Ausgehend vom Nachweis einer Bindung von Fibronectin an cfDNA, wie in dieser Arbeit belegt, stellt sich die Frage nach der Funktion dieser Interaktion und einem möglichen Einfluss auf die Nutzbarkeit der cfDNA als Biomarker. Am naheliegendsten scheint zunächst eine Funktion bei der Stabilisierung der cfDNA zu sein. Es wird angenommen, dass die Elimination von cfDNA aus der Zirkulation hauptsächlich auf dem Abbau durch Nukleasen beruht.⁶⁵ Da eine Proteinbindung an die DNA diese generell vor dem Abbau schützt, wie dies für andere Proteine gezeigt werden konnte,¹⁶⁸ ist die Annahme plausibel, dass die Bindung der cfDNA an Fibronectin einen ähnlichen Einfluss hat. Da die Konzentration von Fibronectin im Blutplasma ebenfalls Schwankungen unterliegt,^{153,156,159,162,164,169-172} könnte auf diese Art auch die Konzentration der cfDNA beeinflusst werden, was insbesondere bei einer sequenzabhängigen Bindung von großer Bedeutsamkeit sein könnte. Entsprechende Ergebnisse für einen solchen Effekt des Fibronectins liegen bisher jedoch noch nicht vor. Der in Vorversuchen beobachtete Effekt einer höheren Stabilität methylierter DNA im Blutplasma lässt sich nicht auf die Fibronectinbindung zurückführen, da in den durchgeführten Versuchen kein Affinitätsunterschied zwischen methylierter und unmethylierter DNA festgestellt werden konnte.

Zusätzlich stellt sich die Frage, wie die Funktion des Fibronectins als bekanntes, opsonisierendes und unter bestimmten Umständen immunstimulierendes Protein mit

der zusätzlichen Funktion als DNA-bindendes Protein in Einklang steht. Extrazelluläre DNA für sich genommen besitzt ebenfalls immunstimulatorische Effekte.¹⁷³ Diese Stimulation fällt unterschiedlich aus, je nachdem, ob es sich um histon- oder nukleosomengebundene oder um „nackte“ DNA handelt oder ob die DNA körpereigenen oder z. B. bakteriellen Ursprungs ist.¹⁷³ Isolierte ungebundene Säugetier-DNA hat in Modellen im Gegensatz zu bakterieller DNA für sich allein genommen keinen proinflammatorischen Effekt.¹⁷⁴ Erst durch die zusätzlichen Effekte DNA-bindender Proteine wie Anti-DNA-Antikörpern als Oponine und Komplementfaktoren kommt es zu einer Aktivierung proinflammatorischer Signalwege.^{175,176} Angesichts der bekannten immunstimulierenden Funktion von Fibronectin scheint eine Beteiligung an einer durch freigesetzte DNA ausgelösten Inflammationsreaktion möglich zu sein. Hierfür spricht zusätzlich, dass für Plasma-Fibronectin im Tiermodell eine Anreicherung in inflammatorischem Gewebe beobachtet werden konnte.¹⁵⁰ Ein entsprechender Nachweis konnte jedoch bisher nicht erbracht werden. Besonders bedeutsam könnte der aufgezeigte Befund sein, dass Fibronectin präferiert, wenn nicht sogar ausschließlich, mit der ungebundenen DNA interagiert, welche für sich genommen keine inflammatorische Reaktion auslöst. Während apoptotisch freigesetzte DNA größtenteils in Form von Nukleosomen vorliegt und nicht durch Fibronectin gebunden werden kann, kommt es während nekrotischer Prozesse zu einer zufälligen Spaltung der DNA in größere Fragmente und einem proteolytischen Verdau der Histone.¹²⁸ Die so freigesetzte DNA ist also potentiell für eine Interaktion mit Fibronectin zugänglicher. Insbesondere bei nekrotischen Prozessen im Rahmen eines inflammatorischen Gewebeschadens könnte Fibronectin daher gemeinsam mit der freigesetzten nekrotischen DNA eine immunstimulierende Funktion haben. Durch Fibronectin als opsonisierenden Faktor für cfDNA könnte sich auch ein möglicher stabilisierender Effekt relativieren, da durch die Bindung von Fibronectin eventuell sogar ein schnellerer Abbau durch Immunzellen stattfindet.

Um die Funktion von Fibronectin im Zusammenspiel mit der cfDNA zu verstehen, sind also noch zahlreiche weitere Untersuchungen notwendig. Es gibt allerdings einige Aspekte, die Nachforschungen erschweren, darunter die Tatsache, dass die Interaktion von Fibronectin und DNA, wie bereits diskutiert, nur für ungebundene DNA nachgewiesen werden konnte. Da ein Großteil der im Plasma vorliegenden cfDNA entweder an Nukleosomen gebunden³⁶ oder in Exosomen²⁶ vorliegt, bleibt

unklar, inwiefern relevante cfDNA-Mengen durch Fibronectin gebunden und stabilisiert werden können. Ebenso bleibt zunächst unklar, inwiefern eine Sequenzabhängigkeit der Fibronectinbindung unter physiologischen Bedingungen einen messbaren Einfluss hat. Aufgrund des großen Konzentrationsgefälles zwischen Fibronectin mit ca. 250 – 500 µg pro Milliliter^{130,131} und cfDNA mit ca. 15 ng pro Milliliter^{20,35} scheint es wahrscheinlich zu sein, dass der große Überschuss an Fibronectin eine vollständige Bindung der vorhandenen cfDNA auch unabhängig von der Sequenz erzeugt. Dies erklärt auch, warum in den Pull-down-Assays (s. 3.3.1) aus dem Blutplasma ohne Verdünnung kein Unterschied zwischen den verschiedenen Amplikons gezeigt werden konnte. Zwar wurde mit max. 10 µg Amplikon pro Milliliter eine im Vergleich zur natürlich vorkommenden cfDNA recht hohe Konzentration eingesetzt, diese liegt allerdings immer noch deutlich unter der Fibronectinkonzentration im Blutplasma. Umgekehrt zeigte sich im Fibronectin-ELISA (s. 3.3.2), in dem die Menge der Amplikons mit bis zu 500 ng pro Well im Vergleich zum immobilisierten Fibronectin (1µg pro Well) deutlich höher war, ein Affinitätsunterschied zwischen den verschiedenen Amplikons.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Interaktion von Fibronectin und cfDNA insbesondere vor dem Hintergrund einer hoch variablen Abundanz von Fibronectin im Blut sowie der möglichen Sequenzspezifität einen Einfluss auf die Nutzung von cfDNA als Biomarker bei verschiedenen Krankheiten haben könnte. Die Eigenschaften dieser Bindung hinsichtlich ihrer Auswirkungen oder spezifischer Bindungssequenzen bleiben jedoch im Detail noch ungeklärt.

4.2.4 Ausblick

Die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit erfolgten im Wesentlichen mit zwei unterschiedlichen Amplikons. Diese wurden zwar aufgrund ihrer Bedeutung bei Tumorerkrankungen und verschiedenen Eigenschaften ausgewählt, allerdings wäre es sicherlich sinnvoll, die Bindung an Fibronectin und deren Methylierungs- und Sequenzspezifität noch an weiteren Genabschnitten zu überprüfen.

Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwiefern unter physiologischen Bedingungen, also ohne externe Zugabe von Amplikons cfDNA an Fibronectin gebunden ist und ob sich diese an Fibronectin gebundene DNA von dem Rest der cfDNA unterscheidet. Hier würde sich dann z. B. ein Ansatz unter Zuhilfenahme von Next-Generation-Sequencing anbieten, durch den die an Fibronectin gebundene DNA, sofern diese auch unter physiologischen Bedingungen vorliegt, genauer

charakterisiert werden kann. Auf diese Art könnte auch die Frage beantwortet werden, ob die Fibronectinbindung genutzt werden kann, um cfDNA oder eine spezifische Fraktion dieser zu isolieren und weiteren Analysen zuzuführen.

Zuletzt ist auch eine funktionelle Charakterisierung der Interaktion von cfDNA und Fibronectin hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Stabilität der cfDNA notwendig. Insbesondere in Bezug auf die gezeigte Sequenzspezifität und den Zusammenhang mit Fibronectin als immunmodulatorisches Protein könnten sich hier ein Einfluss auf die cfDNA als Biomarker sowie interessante Möglichkeiten für weiterführende Projekte ergeben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern Proteine aus dem Blutplasma an cfDNA binden und ob die Methylierung der DNA einen Einfluss auf diese Bindungen hat. Hierzu wurde eine neue Methode etabliert, mit der im Format eines Pull-down-Assays die Interaktion von Plasmaproteinen mit unterschiedlichen DNA-Fragmenten analysiert werden kann. Dies erfolgte anhand von enzymatisch methylierten und unmethylierten Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor sowie einen Amplikon aus einem Intron des *RASSF1A*-Genes. Es zeigte sich eine Bindung von Plasma-Fibronectin an sämtliche eingesetzten Amplikons. In weiteren Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass die Amplikons aus dem Promotorbereich mit einer signifikant höheren Affinität gebunden werden als die Amplikons aus dem Intronbereich. Ein Unterschied zwischen den methylierten und unmethylierten Amplikons ließ sich jedoch nicht feststellen. Zudem zeigte sich, dass histongebundene DNA-Fragmente bzw. Oligonukleosomen kein Fibronectin binden, was darauf hindeutet, dass die für die Interaktion erforderlichen Sequenzen verdeckt sind oder es zu einer sterischen Behinderung der Bindung kommt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass lediglich ungebundene cfDNA mit Fibronectin interagiert und dass diese Interaktion vermutlich in einem Sequenzzusammenhang steht und nicht von der Cytosin-Methylierung abhängt. Gleichzeitig legen die unterschiedlichen Bindungsergebnisse in Promotor- und Intronabschnitten nahe, dass eventuell Sequenzen mit den Eigenschaften eines Promotors bevorzugt werden könnten. Für eine solche Aussage sind jedoch deutlich umfangreichere Untersuchungen zu Sequenzmotiven erforderlich. Eine spezifische Bindung weiterer Plasmaproteine an die Amplikons konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Frage möglicher Auswirkungen der gezeigten Interaktion auf die Biomarkerfunktion der cfDNA bleibt ebenso offen wie die Frage, welchen Einfluss die unterschiedliche Affinität zu verschiedenen Sequenzen unter physiologischen Bedingungen hat. Die pleiotropen Eigenschaften und Funktionen von Plasma-Fibronectin legen jedoch nahe, dass sich bei der Interaktion mit cfDNA womöglich vielfältige Zusammenhänge mit physiologischen und pathophysiologischen Prozessen ergeben könnten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Dahm, R: Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet*, 122: 565-581, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00439-007-0433-0>
2. Avery, OT, MacLeod, CM, McCarty, M: Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *Journal of experimental medicine*, 79: 137-158, 1944.
3. Watson, JD, Crick, FH: The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 18: 123-131, 1953. <https://doi.org/10.1101/sqb.1953.018.01.020>
4. Li, G, Zhu, P: Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS Lett*, 589: 2893-2904, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.04.023>
5. Kornberg, RD: Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 184: 868-871, 1974. <https://doi.org/10.1126/science.184.4139.868>
6. Hewish, DR, Burgoyne, LA: Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun*, 52: 504-510, 1973.
7. Richmond, TJ, Finch, JT, Rushton, B, Rhodes, D, Klug, A: Structure of the nucleosome core particle at 7 Å resolution. *Nature*, 311: 532-537, 1984. <https://doi.org/10.1038/311532a0>
8. Widom, J, Klug, A: Structure of the 3000Å chromatin filament: X-ray diffraction from oriented samples. *Cell*, 43: 207-213, 1985. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90025-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90025-X)
9. Joti, Y, Hikima, T, Nishino, Y, Kamada, F, Hihara, S, Takata, H, Ishikawa, T, Maeshima, K: Chromosomes without a 30-nm chromatin fiber. *Nucleus*, 3: 404-410, 2012. <https://doi.org/10.4161/nucl.21222>
10. Eltsov, M, MacLellan, KM, Maeshima, K, Frangakis, AS, Dubochet, J: Analysis of cryo-electron microscopy images does not support the existence of 30-nm chromatin fibers in mitotic chromosomes in situ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105: 19732-19737, 2008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810057105>

11. Boopathi, R, Dimitrov, S, Hamiche, A, Petosa, C, Bednar, J: Cryo-electron microscopy of the chromatin fiber. *Curr Opin Struct Biol*, 64: 97-103, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.016>
12. MacAlpine, DM, Almouzni, G: Chromatin and DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5: a010207, 2013. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010207>
13. Svaren, J, Klebanow, E, Sealy, L, Chalkley, R: Analysis of the competition between nucleosome formation and transcription factor binding. *The Journal of biological chemistry*, 269: 9335-9344, 1994.
14. Bai, L, Morozov, AV: Gene regulation by nucleosome positioning. *Trends Genet*, 26: 476-483, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.08.003>
15. Mavrich, TN, Ioshikhes, IP, Venters, BJ, Jiang, C, Tomsho, LP, Qi, J, Schuster, SC, Albert, I, Pugh, BF: A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Research*, 18: 1073-1083, 2008. <https://doi.org/10.1101/gr.078261.108>
16. Nocetti, N, Whitehouse, I: Nucleosome repositioning underlies dynamic gene expression. *Genes & Development*, 30: 660-672, 2016. <https://doi.org/10.1101/gad.274910.115>
17. Hughes, L, Amanda, Jin, Y, Rando, J, Oliver, Struhl, K: A Functional Evolutionary Approach to Identify Determinants of Nucleosome Positioning: A Unifying Model for Establishing the Genome-wide Pattern. *Molecular Cell*, 48: 5-15, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.003>
18. Klein, DC, Hainer, SJ: Genomic methods in profiling DNA accessibility and factor localization. *Chromosome Res*, 28: 69-85, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10577-019-09619-9>
19. Mandel P, MP: Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. *C R Seances Soc Biol Fil*: 241-243, 1948.
20. Fleischhacker, M, Schmidt, B: Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer--a survey. *Biochim Biophys Acta*, 1775: 181-232, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2006.10.001>
21. García-Olmo, D, González-Masiá, García-Olmo, D: Circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS): applications in oncology. *OncoTargets and Therapy*: 819, 2013. <https://doi.org/10.2147/ott.s44668>
22. Wiczorek, AJ, Sitaramam, V, Machleidt, W, Rhyner, K, Perruchoud, AP, Block, LH: Diagnostic and prognostic value of RNA-proteolipid in sera of patients with

- malignant disorders following therapy: first clinical evaluation of a novel tumor marker. *Cancer research*, 47: 6407-6412, 1987.
23. Aucamp, J, Bronkhorst, AJ, Badenhorst, CPS, Pretorius, PJ: The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 93: 1649-1683, 2018. <https://doi.org/10.1111/brv.12413>
24. Elzanowska, J, Semira, C, Costa-Silva, B: DNA in extracellular vesicles: biological and clinical aspects. *Molecular oncology*, 15: 1701-1714, 2021. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12777>
25. Thery, C, Zitvogel, L, Amigorena, S: Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature reviews Immunology*, 2: 569-579, 2002. <https://doi.org/10.1038/nri855>
26. Fernando, MR, Jiang, C, Krzyzanowski, GD, Ryan, WL: New evidence that a large proportion of human blood plasma cell-free DNA is localized in exosomes. *PloS one*, 12: e0183915, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183915>
27. El-Hefnawy, T, Raja, S, Kelly, L, Bigbee, WL, Kirkwood, JM, Luketich, JD, Godfrey, TE: Characterization of Amplifiable, Circulating RNA in Plasma and Its Potential as a Tool for Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 50: 564-573, 2004. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2003.028506>
28. Akers, JC, Gonda, D, Kim, R, Carter, BS, Chen, CC: Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J Neurooncol*, 113: 1-11, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
29. Théry, C, Witwer, KW, Aikawa, E, Alcaraz, MJ, Anderson, JD, Andriantsitohaina, R, Antoniou, A, Arab, T, Archer, F, Atkin-Smith, GK, Ayre, DC, Bach, J-M, Bachurski, D, Baharvand, H, Balaj, L, Baldacchino, S, Bauer, NN, Baxter, AA, Bebawy, M, Beckham, C, Bedina Zavec, A, Benmoussa, A, Berardi, AC, Bergese, P, Bielska, E, Blenkiron, C, Bobis-Wozowicz, S, Boilard, E, Boireau, W, Bongiovanni, A, Borràs, FE, Bosch, S, Boulanger, CM, Breakefield, X, Breglio, AM, Brennan, MÁ, Brigstock, DR, Brisson, A, Broekman, ML, Bromberg, JF, Bryl-Górecka, P, Buch, S, Buck, AH, Burger, D, Busatto, S, Buschmann, D, Bussolati, B, Buzás, EI, Byrd, JB, Camussi, G, Carter, DR, Caruso, S, Chamley, LW, Chang, Y-T, Chen, C, Chen, S, Cheng, L, Chin, AR,

Clayton, A, Clerici, SP, Cocks, A, Cocucci, E, Coffey, RJ, Cordeiro-Da-Silva, A, Couch, Y, Coumans, FA, Coyle, B, Crescitelli, R, Criado, MF, D'Souza-Schorey, C, Das, S, Datta Chaudhuri, A, De Candia, P, De Santana, EF, De Wever, O, Del Portillo, HA, Demaret, T, Deville, S, Devitt, A, Dhondt, B, Di Vizio, D, Dieterich, LC, Dolo, V, Dominguez Rubio, AP, Dominici, M, Dourado, MR, Driedonks, TA, Duarte, FV, Duncan, HM, Eichenberger, RM, Ekström, K, El Andaloussi, S, Elie-Caille, C, Erdbrügger, U, Falcón-Pérez, JM, Fatima, F, Fish, JE, Flores-Bellver, M, Försonits, A, Frelet-Barrand, A, Fricke, F, Fuhrmann, G, Gabrielsson, S, Gámez-Valero, A, Gardiner, C, Gärtner, K, Gaudin, R, Gho, YS, Giebel, B, Gilbert, C, Gimona, M, Giusti, I, Goberdhan, DC, Görgens, A, Gorski, SM, Greening, DW, Gross, JC, Gualerzi, A, Gupta, GN, Gustafson, D, Handberg, A, Haraszti, RA, Harrison, P, Hegyesi, H, Hendrix, A, Hill, AF, Hochberg, FH, Hoffmann, KF, Holder, B, Holthofer, H, Hosseinkhani, B, Hu, G, Huang, Y, Huber, V, Hunt, S, Ibrahim, AG-E, Ikezu, T, Inal, JM, Isin, M, Ivanova, A, Jackson, HK, Jacobsen, S, Jay, SM, Jayachandran, M, Jenster, G, Jiang, L, Johnson, SM, Jones, JC, Jong, A, Jovanovic-Talisman, T, Jung, S, Kalluri, R, Kano, S-I, Kaur, S, Kawamura, Y, Keller, ET, Khamari, D, Khomyakova, E, Khvorova, A, Kierulf, P, Kim, KP, Kislinger, T, Klingeborn, M, Klinker, DJ, Kornek, M, Kosanović, MM, Kovács, ÁF, Krämer-Albers, E-M, Krasemann, S, Krause, M, Kurochkin, IV, Kusuma, GD, Kuypers, S, Laitinen, S, Langevin, SM, Languino, LR, Lannigan, J, Lässer, C, Laurent, LC, Lavieu, G, Lázaro-Ibáñez, E, Le Lay, S, Lee, M-S, Lee, YXF, Lemos, DS, Lenassi, M, Leszczynska, A, Li, IT, Liao, K, Libregts, SF, Ligeti, E, Lim, R, Lim, SK, Linē, A, Linnemannstöns, K, Llorente, A, Lombard, CA, Lorenowicz, MJ, Lörincz, ÁM, Lötvall, J, Lovett, J, Lowry, MC, Loyer, X, Lu, Q, Lukomska, B, Lunavat, TR, Maas, SL, Malhi, H, Marcilla, A, Mariani, J, Mariscal, J, Martens-Uzunova, ES, Martin-Jaular, L, Martinez, MC, Martins, VR, Mathieu, M, Mathivanan, S, Maugeri, M, Mcginnis, LK, Mcvey, MJ, Meckes, DG, Meehan, KL, Mertens, I, Minciocchi, VR, Möller, A, Møller Jørgensen, M, Morales-Kastresana, A, Morhayim, J, Mullier, F, Muraca, M, Musante, L, Mussack, V, Muth, DC, Myburgh, KH, Najrana, T, Nawaz, M, Nazarenko, I, Nejsun, P, Neri, C, Neri, T, Nieuwland, R, Nimrichter, L, Nolan, JP, Nolte-'T Hoen, EN, Noren Hooten, N, O'Driscoll, L, O'Grady, T, O'Loghlen, A, Ochiya, T, Olivier, M, Ortiz, A, Ortiz, LA, Osteikoetxea, X, Østergaard, O,

- Ostrowski, M, Park, J, Pegtel, DM, Peinado, H, Perut, F, Pfaffl, MW, Phinney, DG, Pieters, BC, Pink, RC, Pisetsky, DS, Pogge Von Strandmann, E, Polakovicova, I, Poon, IK, Powell, BH, Prada, I, Pulliam, L, Quesenberry, P, Radeghieri, A, Raffai, RL, Raimondo, S, Rak, J, Ramirez, MI, Raposo, G, Rayyan, MS, Regev-Rudzki, N, Ricklefs, FL, Robbins, PD, Roberts, DD, Rodrigues, SC, Rohde, E, Rome, S, Rouschop, KM, Rughetti, A, Russell, AE, Saá, P, Sahoo, S, Salas-Huenuleo, E, Sánchez, C, Saugstad, JA, Saul, MJ, Schiffelers, RM, Schneider, R, Schøyen, TH, Scott, A, Shahaj, E, Sharma, S, Shatnyeva, O, Shekari, F, Shelke, GV, Shetty, AK, Shiba, K, Siljander, PR-M, Silva, AM, Skowronek, A, Snyder, OL, Soares, RP, Sódar, BW, Soekmadji, C, Sotillo, J, Stahl, PD, Stoorvogel, W, Stott, SL, Strasser, EF, Swift, S, Tahara, H, Tewari, M, Timms, K, Tiwari, S, Tixeira, R, Tkach, M, Toh, WS, Tomasini, R, Torrecilhas, AC, Tosar, JP, Toxavidis, V, Urbanelli, L, Vader, P, Van Balkom, BW, Van Der Grein, SG, Van Deun, J, Van Herwijnen, MJ, Van Keuren-Jensen, K, Van Niel, G, Van Royen, ME, Van Wijnen, AJ, Vasconcelos, MH, Vechetti, IJ, Veit, TD, Vella, LJ, Velot, É, Verweij, FJ, Vestad, B, Viñas, JL, Visnovitz, T, Vukman, KV, Wahlgren, J, Watson, DC, Wauben, MH, Weaver, A, Webber, JP, Weber, V, Wehman, AM, Weiss, DJ, Welsh, JA, Wendt, S, Wheelock, AM, Wiener, Z, Witte, L, Wolfram, J, Xagorari, A, Xander, P, Xu, J, Yan, X, Yáñez-Mó, M, Yin, H, Yuana, Y, Zappulli, V, Zarubova, J, Žekas, V, Zhang, J-Y, Zhao, Z, Zheng, L, Zheutlin, AR, Zickler, AM, Zimmermann, P, Zivkovic, AM, Zocco, D, Zuba-Surma, EK: Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7: 1535750, 2018. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
30. 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*, 61: 1659-1665, 2001.
31. Giacona, MB, Ruben, GC, Iczkowski, KA, Roos, TB, Porter, DM, Sorenson, GD: Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls. *Pancreas*, 17: 89-97, 1998.

32. Geiger, S, Holdenrieder, S, Stieber, P, Hamann, GF, Bruening, R, Ma, J, Nagel, D, Seidel, D: Nucleosomes in serum of patients with early cerebral stroke. *Cerebrovasc Dis*, 21: 32-37, 2006. <https://doi.org/10.1159/000089591>
33. Ivanov, M, Baranova, A, Butler, T, Spellman, P, Mileyko, V: Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation. *BMC Genomics*, 16 Suppl 13: S1, 2015. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S13-S1>
34. Snyder, MW, Kircher, M, Hill, AJ, Daza, RM, Shendure, J: Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*, 164: 57-68, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.050>
35. Leon, SA, Shapiro, B, Sklaroff, DM, Yaros, MJ: Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer research*, 37: 646-650, 1977.
36. Holdenrieder, S, Stieber, P, Chan, LY, Geiger, S, Kremer, A, Nagel, D, Lo, YM: Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem*, 51: 1544-1546, 2005. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.049320>
37. Fernando, MR, Jiang, C, Krzyzanowski, GD, Ryan, WL: Analysis of human blood plasma cell-free DNA fragment size distribution using EvaGreen chemistry based droplet digital PCR assays. *Clinica Chimica Acta*, 483: 39-47, 2018. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.04.017>
38. Szerlong, HJ, Hansen, JC: Nucleosome distribution and linker DNA: connecting nuclear function to dynamic chromatin structure. *Biochem Cell Biol*, 89: 24-34, 2011. <https://doi.org/10.1139/O10-139>
39. Lui, YY, Chik, KW, Chiu, RW, Ho, CY, Lam, CW, Lo, YM: Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*, 48: 421-427, 2002.
40. Gerschenson, LE, Rotello, RJ: Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB J*, 6: 2450-2455, 1992.
41. Delgado, PO, Alves, BC, Gehrke Fde, S, Kuniyoshi, RK, Wroclavski, ML, Del Giglio, A, Fonseca, FL: Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 34: 983-986, 2013. <https://doi.org/10.1007/s13277-012-0634-6>

42. Stroun, M, Lyautey, J, Lederrey, C, Mulcahy, HE, Anker, P: Alu repeat sequences are present in increased proportions compared to a unique gene in plasma/serum DNA: evidence for a preferential release from viable cells? *Ann N Y Acad Sci*, 945: 258-264, 2001.
43. Aucamp, J, Bronkhorst, AJ, Peters, DL, Van Dyk, HC, Van der Westhuizen, FH, Pretorius, PJ: Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro. *Cell Mol Life Sci*, 74: 2689-2707, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2495-z>
44. Bronkhorst, AJ, Wentzel, JF, Aucamp, J, van Dyk, E, du Plessis, L, Pretorius, PJ: Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim Biophys Acta*, 1863: 157-165, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.022>
45. Wang, W, Kong, P, Ma, G, Li, L, Zhu, J, Xia, T, Xie, H, Zhou, W, Wang, S: Characterization of the release and biological significance of cell-free DNA from breast cancer cell lines. *Oncotarget*, 8: 43180-43191, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17858>
46. Morozkin, ES, Babochkina, TI, Vlassov, VV, Laktionov, PP: The effect of protein transport inhibitors on the production of extracellular DNA. *Ann N Y Acad Sci*, 1137: 31-35, 2008. <https://doi.org/10.1196/annals.1448.026>
47. Lo, YM, Corbetta, N, Chamberlain, PF, Rai, V, Sargent, IL, Redman, CW, Wainscoat, JS: Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*, 350: 485-487, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)02174-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02174-0)
48. Lun, FM, Chiu, RW, Chan, KC, Leung, TY, Lau, TK, Lo, YM: Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma. *Clin Chem*, 54: 1664-1672, 2008. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.111385>
49. Lo, YM, Chan, KC, Sun, H, Chen, EZ, Jiang, P, Lun, FM, Zheng, YW, Leung, TY, Lau, TK, Cantor, CR, Chiu, RW: Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*, 2: 61ra91, 2010. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001720>
50. Ermakov, AV, Kostyuk, SV, Konkova, MS, Egolina, NA, Malinovskaya, EM, Veiko, NN: Extracellular DNA fragments. *Ann N Y Acad Sci*, 1137: 41-46, 2008. <https://doi.org/10.1196/annals.1448.024>

51. García-Olmo, DC, Domínguez, C, García-Arranz, M, Anker, P, Stroun, M, García-Verdugo, JM, García-Olmo, D: Cell-Free Nucleic Acids Circulating in the Plasma of Colorectal Cancer Patients Induce the Oncogenic Transformation of Susceptible Cultured Cells. *Cancer research*, 70: 560-567, 2010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-3513>
52. Garcia-Arranz, M, Garcia-Olmo, D, Vega-Clemente, L, Stroun, M: A Preliminary Study of the Action of Vitosomes from Non-dividing Cells on Tumour Cell Replication in vitro and in vivo. *Anticancer Agents Med Chem*, 17: 1401-1410, 2017. <https://doi.org/10.2174/1871520617666170213110536>
53. García-Olmo, D, García-Olmo, DC: Functionality of circulating DNA: the hypothesis of genomestasis. *Ann N Y Acad Sci*, 945: 265-275, 2001. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03895.x>
54. Klotten, V, Rüchel, N, Bröchle, NO, Gasthaus, J, Freudenmacher, N, Steib, F, Mijnes, J, Eschenbruch, J, Binnebösel, M, Knüchel, R, Dahl, E: Liquid biopsy in colon cancer: comparison of different circulating DNA extraction systems following absolute quantification of *KRAS* mutations using Intplex allele-specific PCR. *Oncotarget*, 8: 86253-86263, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21134>
55. Tomochika, S, Iizuka, N, Watanabe, Y, Tsutsui, M, Takeda, S, Yoshino, S, Ichihara, K, Oka, M: Increased serum cell-free DNA levels in relation to inflammation are predictive of distant metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 1: 89-92, 2010. https://doi.org/10.3892/etm_00000016
56. Roth, C, Pantel, K, Müller, V, Rack, B, Kasimir-Bauer, S, Janni, W, Schwarzenbach, H: Apoptosis-related deregulation of proteolytic activities and high serum levels of circulating nucleosomes and DNA in blood correlate with breast cancer progression. *BMC Cancer*, 11: 4, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-4>
57. Sceneay, J, Smyth, MJ, Moller, A: The pre-metastatic niche: finding common ground. *Cancer metastasis reviews*, 32: 449-464, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9420-1>
58. Feng, W, Dean, DC, Hornicek, FJ, Shi, H, Duan, Z: Exosomes promote pre-metastatic niche formation in ovarian cancer. *Mol Cancer*, 18: 124, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1049-4>

59. Gao, J, Li, S, Xu, Q, Zhang, X, Huang, M, Dai, X, Liu, L: Exosomes Promote Pre-Metastatic Niche Formation in Gastric Cancer. *Front Oncol*, 11: 652378, 2021. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.652378>
60. Yu, SC, Lee, SW, Jiang, P, Leung, TY, Chan, KC, Chiu, RW, Lo, YM: High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin Chem*, 59: 1228-1237, 2013. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.203679>
61. Tsui, NB, Jiang, P, Chow, KC, Su, X, Leung, TY, Sun, H, Chan, KC, Chiu, RW, Lo, YM: High resolution size analysis of fetal DNA in the urine of pregnant women by paired-end massively parallel sequencing. *PloS one*, 7: e48319, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048319>
62. Gauthier, VJ, Tyler, LN, Mannik, M: Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 156: 1151-1156, 1996.
63. Wroblewski, F, Bodansky, O: Presence of desoxyribonuclease activity in human serum. *Proc Soc Exp Biol Med*, 74: 443-445, 1950.
64. Nadano, D, Yasuda, T, Kishi, K: Measurement of deoxyribonuclease I activity in human tissues and body fluids by a single radial enzyme-diffusion method. *Clin Chem*, 39: 448-452, 1993.
65. Tamkovich, SN, Cherepanova, AV, Kolesnikova, EV, Rykova, EY, Pyshnyi, DV, Vlassov, VV, Laktionov, PP: Circulating DNA and DNase activity in human blood. *Ann N Y Acad Sci*, 1075: 191-196, 2006. <https://doi.org/10.1196/annals.1368.026>
66. Cherepanova, AV, Tamkovich, SN, Bryzgunova, OE, Vlassov, VV, Laktionov, PP: Deoxyribonuclease activity and circulating DNA concentration in blood plasma of patients with prostate tumors. *Ann N Y Acad Sci*, 1137: 218-221, 2008. <https://doi.org/10.1196/annals.1448.016>
67. Zhong, S, Ng, MC, Lo, YM, Chan, JC, Johnson, PJ: Presence of mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) A to G 3243 mutation in DNA extracted from serum and plasma of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Clin Pathol*, 53: 466-469, 2000. <https://doi.org/10.1136/jcp.53.6.466>
68. Zhang, R, Nakahira, K, Guo, X, Choi, AM, Gu, Z: Very Short Mitochondrial DNA Fragments and Heteroplasmy in Human Plasma. *Sci Rep*, 6: 36097, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep36097>

69. Mehra, N, Penning, M, Maas, J, van Daal, N, Giles, RH, Voest, EE: Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13: 421-426, 2007. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1087>
70. Kohler, C, Radpour, R, Barekati, Z, Asadollahi, R, Bitzer, J, Wight, E, Burki, N, Diesch, C, Holzgreve, W, Zhong, XY: Levels of plasma circulating cell free nuclear and mitochondrial DNA as potential biomarkers for breast tumors. *Mol Cancer*, 8: 105, 2009. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-105>
71. Wang, L, Xie, L, Zhang, Q, Cai, X, Tang, Y, Wang, L, Hang, T, Liu, J, Gong, J: Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in acute myocardial infarction patients. *Coron Artery Dis*, 26: 296-300, 2015. <https://doi.org/10.1097/MCA.0000000000000231>
72. Kung, CT, Hsiao, SY, Tsai, TC, Su, CM, Chang, WN, Huang, CR, Wang, HC, Lin, WC, Chang, HW, Lin, YJ, Cheng, BC, Su, BY, Tsai, NW, Lu, CH: Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels as predictors of outcome in severe sepsis patients in the emergency room. *Journal of translational medicine*, 10: 130, 2012. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-130>
73. Shapiro, B, Chakrabarty, M, Cohn, EM, Leon, SA: Determination of circulating DNA levels in patients with benign or malignant gastrointestinal disease. *Cancer*, 51: 2116-2120, 1983.
74. Gray, ES, Rizos, H, Reid, AL, Boyd, SC, Pereira, MR, Lo, J, Tembe, V, Freeman, J, Lee, JH, Scolyer, RA, Siew, K, Lomma, C, Cooper, A, Khatkhat, MA, Meniawy, TM, Long, GV, Carlino, MS, Millward, M, Ziman, M: Circulating tumor DNA to monitor treatment response and detect acquired resistance in patients with metastatic melanoma. *Oncotarget*, 2015. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5788>
75. Kim, K, Shin, DG, Park, MK, Baik, SH, Kim, TH, Kim, S, Lee, S: Circulating cell-free DNA as a promising biomarker in patients with gastric cancer: diagnostic validity and significant reduction of cfDNA after surgical resection. *Ann Surg Treat Res*, 86: 136-142, 2014. <https://doi.org/10.4174/astr.2014.86.3.136>
76. Clementi, A, Virzi, GM, Brocca, A, Pastori, S, de Cal, M, Marcante, S, Granata, A, Ronco, C: The Role of Cell-Free Plasma DNA in Critically Ill Patients with Sepsis. *Blood Purif*, 41: 34-40, 2016. <https://doi.org/10.1159/000440975>

77. Zeerleder, S, Zwart, B, Wuillemin, WA, Aarden, LA, Groeneveld, AB, Caliezi, C, van Nieuwenhuijze, AE, van Mierlo, GJ, Eerenberg, AJ, Lammle, B, Hack, CE: Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med*, 31: 1947-1951, 2003. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000074719.40109.95>
78. Tug, S, Helmig, S, Menke, J, Zahn, D, Kubiak, T, Schwarting, A, Simon, P: Correlation between cell free DNA levels and medical evaluation of disease progression in systemic lupus erythematosus patients. *Cell Immunol*, 292: 32-39, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.08.002>
79. Huttunen, R, Kuparinen, T, Jylhava, J, Aittoniemi, J, Vuento, R, Huhtala, H, Laine, J, Syrjanen, J, Hurme, M: Fatal outcome in bacteremia is characterized by high plasma cell free DNA concentration and apoptotic DNA fragmentation: a prospective cohort study. *PloS one*, 6: e21700, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021700>
80. Moreira, VG, Prieto, B, Rodriguez, JS, Alvarez, FV: Usefulness of cell-free plasma DNA, procalcitonin and C-reactive protein as markers of infection in febrile patients. *Ann Clin Biochem*, 47: 253-258, 2010. <https://doi.org/10.1258/acb.2010.009173>
81. Chang, CP, Chia, RH, Wu, TL, Tsao, KC, Sun, CF, Wu, JT: Elevated cell-free serum DNA detected in patients with myocardial infarction. *Clin Chim Acta*, 327: 95-101, 2003.
82. Xie, J, Yang, J, Hu, P: Correlations of Circulating Cell-Free DNA With Clinical Manifestations in Acute Myocardial Infarction. *Am J Med Sci*, 356: 121-129, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.04.007>
83. Rainer, TH, Wong, LK, Lam, W, Yuen, E, Lam, NY, Metreweli, C, Lo, YM: Prognostic use of circulating plasma nucleic acid concentrations in patients with acute stroke. *Clin Chem*, 49: 562-569, 2003.
84. Geiger, S, Holdenrieder, S, Stieber, P, Hamann, GF, Bruening, R, Ma, J, Nagel, D, Seidel, D: Nucleosomes as a new prognostic marker in early cerebral stroke. *J Neurol*, 254: 617-623, 2007. <https://doi.org/10.1007/s00415-006-0407-5>
85. Rainer, TH, Wong, KS, Lam, W, Lam, NY, Graham, CA, Lo, YM: Comparison of plasma beta-globin DNA and S-100 protein concentrations in acute stroke. *Clin Chim Acta*, 376: 190-196, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.08.025>

86. Tsai, NW, Lin, TK, Chen, SD, Chang, WN, Wang, HC, Yang, TM, Lin, YJ, Jan, CR, Huang, CR, Liou, CW, Lu, CH: The value of serial plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in patients with acute ischemic stroke. *Clin Chim Acta*, 412: 476-479, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.11.036>
87. Stroun, M, Anker, P, Maurice, P, Lyautey, J, Lederrey, C, Beljanski, M: Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*, 46: 318-322, 1989.
88. Heitzer, E, Ulz, P, Geigl, JB: Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clin Chem*, 61: 112-123, 2015. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.222679>
89. Wyatt, AW, Annala, M, Aggarwal, R, Beja, K, Feng, F, Youngren, J, Foye, A, Lloyd, P, Nykter, M, Beer, TM, Alumkal, JJ, Thomas, GV, Reiter, RE, Rettig, MB, Evans, CP, Gao, AC, Chi, KN, Small, EJ, Gleave, ME: Concordance of Circulating Tumor DNA and Matched Metastatic Tissue Biopsy in Prostate Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 109, 2017. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx118>
90. Heitzer, E, Auer, M, Hoffmann, EM, Pichler, M, Gasch, C, Ulz, P, Lax, S, Waldispuehl-Geigl, J, Mauermann, O, Mohan, S, Pristauz, G, Lackner, C, Hofler, G, Eisner, F, Petru, E, Sill, H, Samonigg, H, Pantel, K, Riethdorf, S, Bauernhofer, T, Geigl, JB, Speicher, MR: Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 133: 346-356, 2013. <https://doi.org/10.1002/ijc.28030>
91. Yoruker, EE, Ozgur, E, Keskin, M, Dalay, N, Holdenrieder, S, Gezer, U: Assessment of circulating serum DNA integrity in colorectal cancer patients. *Anticancer research*, 35: 2435-2440, 2015.
92. Daniotti, M, Vallacchi, V, Rivoltini, L, Patuzzo, R, Santinami, M, Arienti, F, Cutolo, G, Pierotti, MA, Parmiani, G, Rodolfo, M: Detection of mutated BRAFV600E variant in circulating DNA of stage III-IV melanoma patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 120: 2439-2444, 2007. <https://doi.org/10.1002/ijc.22598>
93. Sanmamed, MF, Fernandez-Landazuri, S, Rodriguez, C, Zarate, R, Lozano, MD, Zubiri, L, Perez-Gracia, JL, Martin-Algarra, S, Gonzalez, A: Quantitative cell-free circulating BRAFV600E mutation analysis by use of droplet digital PCR in the follow-up of patients with melanoma being treated with BRAF inhibitors. *Clin Chem*, 61: 297-304, 2015. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.230235>

94. Mok, T, Wu, YL, Lee, JS, Yu, CJ, Sriuranpong, V, Sandoval-Tan, J, Ladrera, G, Thongprasert, S, Srimuninnimit, V, Liao, M, Zhu, Y, Zhou, C, Fuerte, F, Margono, B, Wen, W, Tsai, J, Truman, M, Klughammer, B, Shames, DS, Wu, L: Detection and Dynamic Changes of EGFR Mutations from Circulating Tumor DNA as a Predictor of Survival Outcomes in NSCLC Patients Treated with First-line Intercalated Erlotinib and Chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21: 3196-3203, 2015. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2594>
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. *Mol Med Rep*, 16: 1157-1166, 2017. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6712>
96. Guo, K, Zhang, Z, Han, L, Han, J, Wang, J, Zhou, Y, Liu, H, Tong, L, Li, X, Yan, X: Detection of epidermal growth factor receptor mutation in plasma as a biomarker in Chinese patients with early-stage non-small cell lung cancer. *Onco Targets Ther*, 8: 3289-3296, 2015. <https://doi.org/10.2147/OTT.S94297>
97. Shyamala, K, Girish, HC, Murgod, S: Risk of tumor cell seeding through biopsy and aspiration cytology. *J Int Soc Prev Community Dent*, 4: 5-11, 2014. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.129446>
98. Yang, X, Zhuo, M, Ye, X, Bai, H, Wang, Z, Sun, Y, Zhao, J, An, T, Duan, J, Wu, M, Wang, J: Quantification of mutant alleles in circulating tumor DNA can predict survival in lung cancer. *Oncotarget*, 7: 20810-20824, 2016. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8021>
99. Esteller, M, Sanchez-Cespedes, M, Rosell, R, Sidransky, D, Baylin, SB, Herman, JG: Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer research*, 59: 67-70, 1999.
100. An, Q, Liu, Y, Gao, Y, Huang, J, Fong, X, Li, L, Zhang, D, Cheng, S: Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Lett*, 188: 109-114, 2002.
101. Dulaimi, E, Hillinck, J, Ibanez de Caceres, I, Al-Saleem, T, Cairns, P: Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American*

- Association for Cancer Research*, 10: 6189-6193, 2004.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0597>
102. Hulbert, A, Jusue-Torres, I, Stark, A, Chen, C, Rodgers, K, Lee, B, Griffin, C, Yang, A, Huang, P, Wrangle, J, Belinsky, SA, Wang, TH, Yang, SC, Baylin, SB, Brock, MV, Herman, JG: Early Detection of Lung Cancer Using DNA Promoter Hypermethylation in Plasma and Sputum. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23: 1998-2005, 2017. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1371>
103. Roupert, M, Hupertan, V, Catto, JW, Yates, DR, Rehman, I, Proctor, LM, Phillips, J, Meuth, M, Cussenot, O, Hamdy, FC: Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression. *International journal of cancer Journal international du cancer*, 122: 952-956, 2008. <https://doi.org/10.1002/ijc.23196>
104. Henriksen, SD, Madsen, PH, Larsen, AC, Johansen, MB, Pedersen, IS, Krarup, H, Thorlacius-Ussing, O: Cell-free DNA promoter hypermethylation in plasma as a predictive marker for survival of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Oncotarget*, 8: 93942-93956, 2017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21397>
105. Danese, E, Minicozzi, AM, Benati, M, Montagnana, M, Paviati, E, Salvagno, GL, Lima-Oliveira, G, Gusella, M, Pasini, F, Lippi, G, Guidi, GC: Comparison of genetic and epigenetic alterations of primary tumors and matched plasma samples in patients with colorectal cancer. *PloS one*, 10: e0126417, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126417>
106. Lo, YM, Tein, MS, Lau, TK, Haines, CJ, Leung, TN, Poon, PM, Wainscoat, JS, Johnson, PJ, Chang, AM, Hjelm, NM: Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Am J Hum Genet*, 62: 768-775, 1998. <https://doi.org/10.1086/301800>
107. Bianchi, DW: Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review. *Placenta*, 25 Suppl A: S93-S101, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2004.01.005>
108. Hochstenbach, R, Nikkels, PG, Elferink, MG, Oudijk, MA, van Oppen, C, van Zon, P, van Harsseel, J, Schuring-Blom, H, Page-Christiaens, GC: Cell-free fetal DNA in the maternal circulation originates from the cytotrophoblast: proof from an unique case. *Clin Case Rep*, 3: 489-491, 2015. <https://doi.org/10.1002/ccr3.285>

109. Norton, ME, Jacobsson, B, Swamy, GK, Laurent, LC, Ranzini, AC, Brar, H, Tomlinson, MW, Pereira, L, Spitz, JL, Hollemon, D, Cuckle, H, Musci, TJ, Wapner, RJ: Cell-free DNA analysis for noninvasive examination of trisomy. *N Engl J Med*, 372: 1589-1597, 2015. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407349>
110. Bianchi, DW, Platt, LD, Goldberg, JD, Abuhamad, AZ, Sehnert, AJ, Rava, RP, Maternal, BISStAdfaSG: Genome-wide fetal aneuploidy detection by maternal plasma DNA sequencing. *Obstet Gynecol*, 119: 890-901, 2012. <https://doi.org/10.1097/AOG.0b013e31824fb482>
111. Ehrich, M, Tynan, J, Mazloom, A, Almasri, E, McCullough, R, Boomer, T, Grosu, D, Chibuk, J: Genome-wide cfDNA screening: clinical laboratory experience with the first 10,000 cases. *Genet Med*, 19: 1332-1337, 2017. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.56>
112. Lam, KW, Jiang, P, Liao, GJ, Chan, KC, Leung, TY, Chiu, RW, Lo, YM: Noninvasive prenatal diagnosis of monogenic diseases by targeted massively parallel sequencing of maternal plasma: application to beta-thalassemia. *Clin Chem*, 58: 1467-1475, 2012. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.189589>
113. Camunas-Soler, J, Lee, H, Hudgins, L, Hintz, SR, Blumenfeld, YJ, El-Sayed, YY, Quake, SR: Noninvasive Prenatal Diagnosis of Single-Gene Disorders by Use of Droplet Digital PCR. *Clin Chem*, 64: 336-345, 2018. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2017.278101>
114. Sorber, L, Zwaenepoel, K, Deschoolmeester, V, Roeyen, G, Lardon, F, Rolfo, C, Pauwels, P: A Comparison of Cell-Free DNA Isolation Kits: Isolation and Quantification of Cell-Free DNA in Plasma. *J Mol Diagn*, 19: 162-168, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.09.009>
115. Chan, KC, Yeung, SW, Lui, WB, Rainer, TH, Lo, YM: Effects of preanalytical factors on the molecular size of cell-free DNA in blood. *Clin Chem*, 51: 781-784, 2005. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.046219>
116. Lee, TH, Montalvo, L, Chrebtow, V, Busch, MP: Quantitation of genomic DNA in plasma and serum samples: higher concentrations of genomic DNA found in serum than in plasma. *Transfusion*, 41: 276-282, 2001.
117. Norton, SE, Lechner, JM, Williams, T, Fernando, MR: A stabilizing reagent prevents cell-free DNA contamination by cellular DNA in plasma during blood sample storage and shipping as determined by digital PCR. *Clin Biochem*, 46: 1561-1565, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.06.002>

118. Chiu, RW, Poon, LL, Lau, TK, Leung, TN, Wong, EM, Lo, YM: Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. *Clin Chem*, 47: 1607-1613, 2001.
119. Müller, M, Böckeler, K, Neumaier, M: Preanalytical stability of epigenetic biomarkers. Institut für klinische Chemie, Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg, 2015.
120. Skvortsova, T, Bryzgunova, O, Lebedeva, A, Mak, V, Vlassov, V, Laktionov, P: Methylated cell-free DNA in vitro and in vivo. In, 2011, S. 185-194.
121. Zardi, L, Siri, A, Carnemolla, B, Santi, L, Gardner, WD, Hoch, SO: Fibronectin: a chromatin-associated protein? *Cell*, 18: 649-657, 1979.
122. Parsons, RG, Aldenderfer, PH, Kowal, R: Detection of a Human Serum DNA-Binding Protein Associated With Malignant Disease2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 63: 43-47, 1979. <https://doi.org/10.1093/jnci/63.1.43>
123. Hayashi, M, Yamada, KM: Divalent cation modulation of fibronectin binding to heparin and to DNA. *The Journal of biological chemistry*, 257: 5263-5267, 1982.
124. Liu, S, Ren, S, Howell, P, Fodstad, O, Riker, AI: Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. *Pigment cell & melanoma research*, 21: 545-558, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00484.x>
125. Muthusamy, V, Duraisamy, S, Bradbury, CM, Hobbs, C, Curley, DP, Nelson, B, Bosenberg, M: Epigenetic silencing of novel tumor suppressors in malignant melanoma. *Cancer research*, 66: 11187-11193, 2006. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-06-1274>
126. Shao, C, Dai, W, Li, H, Tang, W, Jia, S, Wu, X, Luo, Y: The relationship between RASSF1A gene promoter methylation and the susceptibility and prognosis of melanoma: A meta-analysis and bioinformatics. *PloS one*, 12: e0171676, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171676>
127. Donninger, H, Vos, MD, Clark, GJ: The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of cell science*, 120: 3163-3172, 2007. <https://doi.org/10.1242/jcs.010389>
128. Napirei, M, Wulf, S, Mannherz, HG: Chromatin breakdown during necrosis by serum Dnase1 and the plasminogen system. *Arthritis & Rheumatism*, 50: 1873-1883, 2004. <https://doi.org/10.1002/art.20267>

129. Jutras, BL, Verma, A, Stevenson, B: Identification of novel DNA-binding proteins using DNA-affinity chromatography/pull down. *Current protocols in microbiology*, Chapter 1: Unit1F.1, 2012. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01f01s24>
130. Mosesson, MW, Umfleet, RA: The cold-insoluble globulin of human plasma. I. Purification, primary characterization, and relationship to fibrinogen and other cold-insoluble fraction components. *The Journal of biological chemistry*, 245: 5728-5736, 1970.
131. Eriksen, HO, Clemmensen, I, Hansen, MS, Ibsen, KK: Plasma fibronectin concentration in normal subjects. *Scand J Clin Lab Invest*, 42: 291-295, 1982. <https://doi.org/10.1080/00365518209168088>
132. Mosesson, MW, Chen, AB, Huseby, RM: The cold-insoluble globulin of human plasma: studies of its essential structural features. *Biochim Biophys Acta*, 386: 509-524, 1975. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(75\)90294-9](https://doi.org/10.1016/0005-2795(75)90294-9)
133. Pankov, R, Yamada, KM: Fibronectin at a glance. *Journal of cell science*, 115: 3861-3863, 2002. <https://doi.org/10.1242/jcs.00059>
134. Williams, EC, Janmey, PA, Ferry, JD, Mosher, DF: Conformational states of fibronectin. Effects of pH, ionic strength, and collagen binding. *The Journal of biological chemistry*, 257: 14973-14978, 1982.
135. Tamkun, JW, Hynes, RO: Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *The Journal of biological chemistry*, 258: 4641-4647, 1983.
136. Moretti, FA, Chauhan, AK, Iaconcig, A, Porro, F, Baralle, FE, Muro, AF: A major fraction of fibronectin present in the extracellular matrix of tissues is plasma-derived. *The Journal of biological chemistry*, 282: 28057-28062, 2007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611315200>
137. Kelsh, R, You, R, Horzempa, C, Zheng, M, McKeown-Longo, PJ: Regulation of the innate immune response by fibronectin: synergism between the III-1 and EDA domains. *PLoS one*, 9: e102974, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102974>
138. Miyamoto, S, Katz, BZ, Lafrenie, RM, Yamada, KM: Fibronectin and integrins in cell adhesion, signaling, and morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci*, 857: 119-129, 1998. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10112.x>
139. Zollinger, AJ, Smith, ML: Fibronectin, the extracellular glue. *Matrix Biol*, 60-61: 27-37, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.07.011>

140. Wang, Y, Reheman, A, Spring, CM, Kalantari, J, Marshall, AH, Wolberg, AS, Gross, PL, Weitz, JI, Rand, ML, Mosher, DF, Freedman, J, Ni, H: Plasma fibronectin supports hemostasis and regulates thrombosis. *The Journal of clinical investigation*, 124: 4281-4293, 2014. <https://doi.org/10.1172/JCI74630>
141. Bastida, E, Escolar, G, Ordinas, A, Sixma, JJ: Fibronectin is required for platelet adhesion and for thrombus formation on subendothelium and collagen surfaces. *Blood*, 70: 1437-1442, 1987.
142. Ni, H, Yuen, PS, Papalia, JM, Trevithick, JE, Sakai, T, Fassler, R, Hynes, RO, Wagner, DD: Plasma fibronectin promotes thrombus growth and stability in injured arterioles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100: 2415-2419, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.2628067100>
143. Cho, J, Mosher, DF: Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin cross-linked to fibrin and assembled in platelet thrombi. *Blood*, 107: 3555-3563, 2006. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-10-4168>
144. Van de Water, L, Destree, AT, Hynes, RO: Fibronectin binds to some bacteria but does not promote their uptake by phagocytic cells. *Science*, 220: 201-204, 1983. <https://doi.org/10.1126/science.6338594>
145. Imai, S, Okahashi, N, Koga, T, Nisizawa, T, Hamada, S: Ability of various oral bacteria to bind human plasma fibronectin. *Microbiol Immunol*, 28: 863-871, 1984.
146. Butler, KM, Baker, CJ, Edwards, MS: Interaction of soluble fibronectin with group B streptococci. *Infect Immun*, 55: 2404-2408, 1987.
147. Eriksen, HO, Espersen, F, Clemmensen, I: Opsonic activity of fibronectin in the phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Clin Microbiol*, 3: 108-112, 1984.
148. Simpson, AW, Boughton, BJ: Fibronectin as an opsonic regulator of monocyte phagocytosis. *J Clin Pathol*, 37: 787-789, 1984. <https://doi.org/10.1136/jcp.37.7.787>
149. Saba, TM, Jaffe, E: Plasma fibronectin (opsonic glycoprotein): its synthesis by vascular endothelial cells and role in cardiopulmonary integrity after trauma as related to reticuloendothelial function. *Am J Med*, 68: 577-594, 1980. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(80\)90310-1](https://doi.org/10.1016/0002-9343(80)90310-1)

150. Charash, WE, Vincent, PA, Saba, TM, Minnear, FL, McKeown-Longo, PJ, Migliozi, JA, Lewis, MA, Lewis, E, Guinta, C: Immunofluorescent analysis of plasma fibronectin incorporation into the lung during acute inflammatory vascular injury. *Am Rev Respir Dis*, 148: 467-476, 1993. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/148.2.467>
151. Grossman, JE: Plasma fibronectin and fibronectin therapy in sepsis and critical illness. *Rev Infect Dis*, 9 Suppl 4: S420-430, 1987. https://doi.org/10.1093/clinids/9.supplement_4.s420
152. Ulutin, T, Sonmez, H, Ucisik, N, Suer, S, Bayram, C, Kokoglu, E, Sultuybek, G: The molecular markers of hemostatic activation on coronary artery disease. *Thromb Res*, 88: 329-332, 1997.
153. Song, KS, Kim, HK, Shim, W, Jee, SH: Plasma fibronectin levels in ischemic heart disease. *Atherosclerosis*, 154: 449-453, 2001.
154. Orem, C, Durmus, I, Kilinc, K, Baykan, M, Gokce, M, Orem, A, Topbas, M: Plasma fibronectin level and its association with coronary artery disease and carotid intima-media thickness. *Coron Artery Dis*, 14: 219-224, 2003. <https://doi.org/10.1097/01.mca.0000066454.28270.fb>
155. Ekmekci, H, Ekmekci, OB, Sonmez, H, Ozturk, Z, Domanic, N, Kokoglu, E: Evaluation of fibronectin, vitronectin, and leptin levels in coronary artery disease: impacts on thrombosis and thrombolysis. *Clin Appl Thromb Hemost*, 11: 63-70, 2005.
156. Vavalle, JP, Wu, SS, Hughey, R, Madamanchi, NR, Stouffer, GA: Plasma fibronectin levels and coronary artery disease. *J Thromb Haemost*, 5: 864-866, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02420.x>
157. Zhang, Y, Zhou, X, Krepinsky, JC, Wang, C, Segbo, J, Zheng, F: Association study between fibronectin and coronary heart disease. *Clin Chem Lab Med*, 44: 37-42, 2006. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.008>
158. Hegele, A, Heidenreich, A, Kropf, J, von Knobloch, R, Varga, Z, Hofmann, R, Olbert, P: Plasma levels of cellular fibronectin in patients with localized and metastatic renal cell carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 25: 111-116, 2004. <https://doi.org/10.1159/000079142>

159. Grammatikakis, IE, Botsis, DC, Grigoriou, OV, Dalamanga, AN, Creatsas, GC: Fibronectin plasma levels in gynecological cancers. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*, 15: 122-126, 2010.
160. Ruelland, A, Kerbrat, P, Clerc, C, Legras, B, Cloarec, L: Level of plasma fibronectin in patients with breast cancer. *Clin Chim Acta*, 178: 283-287, 1988. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(88\)90236-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(88)90236-7)
161. Eijan, AM, Puricelli, L, Bal de Kier Joffe, E, Entin, D, Vuoto, D, Orlando, E, Sacerdote de Lustig, E: Serial analysis of fibronectin concentration in plasma of patients with benign and malignant breast diseases. *Cancer*, 57: 1345-1349, 1986. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19860401\)57:7<1345::aid-cncr2820570717>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19860401)57:7<1345::aid-cncr2820570717>3.0.co;2-r)
162. Tas, F, Bilgin, E, Karabulut, S, Tastekin, D, Duranyildiz, D: Levels of serum fibronectin as a biomarker in gastric cancer patients: Correlation with clinical diagnosis and outcome. *Molecular and clinical oncology*, 4: 655-659, 2016. <https://doi.org/10.3892/mco.2016.759>
163. Erturk, A, Cure, E, Ozkurt, Z, Parlak, E, Cure, MC: Serum fibronectin levels in acute and chronic viral hepatitis patients. *The Malaysian journal of medical sciences : MJMS*, 21: 29-36, 2014.
164. Peters, JH, Grote, MN, Lane, NE, Maunder, RJ: Changes in plasma fibronectin isoform levels predict distinct clinical outcomes in critically ill patients. *Biomarker insights*, 6: 59-68, 2011. <https://doi.org/10.4137/bmi.S7204>
165. McMaster, GK, Zardi, L: DNA-binding domains of human fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun*, 107: 609-617, 1982. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(82\)91535-2](https://doi.org/10.1016/0006-291x(82)91535-2)
166. Siddiqi, A, Ayad, SR, Dickinson, P: The interaction between fibronectin and DNA. *Anticancer research*, 9: 373-381, 1989.
167. Deaton, AM, Bird, A: CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25: 1010-1022, 2011. <https://doi.org/10.1101/gad.2037511>
168. Hampshire, AJ, Rusling, DA, Broughton-Head, VJ, Fox, KR: Footprinting: a method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. *Methods (San Diego, Calif)*, 42: 128-140, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2007.01.002>
169. Bazan-Socha, S, Kuczia, P, Potaczek, DP, Mastalerz, L, Cybulska, A, Zareba, L, Kremers, R, Hemker, C, Undas, A: Increased blood levels of cellular

- fibronectin in asthma: Relation to the asthma severity, inflammation, and prothrombotic blood alterations. *Respiratory medicine*, 141: 64-71, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2018.06.023>
170. Fucikova, A, Lenco, J, Tambor, V, Rehulkova, H, Pudil, R, Stulik, J: Plasma concentration of fibronectin is decreased in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Clin Chim Acta*, 463: 62-66, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.09.024>
171. Tas, F, Karabulut, S, Bilgin, E, Tastekin, D, Duranyildiz, D: Clinical significance of serum fibronectin and vitronectin levels in melanoma patients. *Melanoma Res*, 24: 475-479, 2014. <https://doi.org/10.1097/cmr.000000000000107>
172. Pecheniuk, NM, Elias, DJ, Deguchi, H, Averell, PM, Griffin, JH: Elevated plasma fibronectin levels associated with venous thromboembolism. *Thromb Haemost*, 100: 224-228, 2008.
173. Marsman, G, Zeerleder, S, Luken, BM: Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation. *Cell Death Dis*, 7: e2518, 2016. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.410>
174. Pisetsky, DS: The origin and properties of extracellular DNA: from PAMP to DAMP. *Clin Immunol*, 144: 32-40, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2012.04.006>
175. Gaip, US, Beyer, TD, Heyder, P, Kuenkele, S, Böttcher, A, Voll, RE, Kalden, JR, Herrmann, M: Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis Rheum*, 50: 640-649, 2004. <https://doi.org/10.1002/art.20034>
176. Ben Chetrit, E, Dunsky, EH, Wollner, S, Eilat, D: In vivo clearance and tissue uptake of an anti-DNA monoclonal antibody and its complexes with DNA. *Clin Exp Immunol*, 60: 159-168, 1985.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Strauß, M, Hedtke, M, Costina, V, Neumaier, M: Human Plasma Fibronectin as a DNA-Binding Protein[Abstract]. In: *German Congress of Laboratory Medicine: 15th Annual Congress of the DGKL (German Society of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) and the 3rd Symposium on Biomedical Analysis*. Journal of Laboratory Medicine, 2018, S. eA1-eA78.

7 TABELLARISCHER ANHANG

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	19
Tabelle 2: Verwendete Kits.....	20
Tabelle 3: Verwendete Enzyme.....	20
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien.....	21
Tabelle 5: Verwendete Puffer	22
Tabelle 6: Sequenzen und Bezeichnungen der verwendeten Primer.....	23
Tabelle 7: Verwendete Antikörper	23
Tabelle 8: Verwendete Software.....	23
Tabelle 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 10: Verwendete Zelllinien.....	25
Tabelle 11: PCR-Ansatz für das Amplikon aus dem <i>RASSF1A</i> -Promotor.....	28
Tabelle 12: PCR-Ansatz für das Amplikon sowohl aus dem <i>RASSF1A</i> -Intron als auch aus dem <i>COL1A2</i> -Promotor	29
Tabelle 13: PCR-Ansatz für das Amplikon aus dem <i>CYP1B1</i> Promotor	29
Tabelle 14: Programm am Thermocycler.....	30
Tabelle 15: Vorgenommene Einstellungen am Ultraschall-Homogenisator.....	31
Tabelle 16: Ansatz für die enzymatische Methylierung von aufgereinigten Amplikons	32
Tabelle 17: Ansatz für den methylierungssensitiven Restriktionsverdau	33
Tabelle 18: Ansatz für Abspaltung der Amplikons von den Beads	35

Tabelle 19: Am Tecan 2 Platten-Reader vorgenommene Einstellungen	36
Tabelle 20: Einstellungen am Victor 3 Multilabel-Reader bei der Messung der Absorption	38
Tabelle 21: Einstellungen am Victor 3 Multilabel-Reader bei Messung von FITC	38
Tabelle 22: Berechnung des Anteils an gebundenen Beads durch Messung der Amplikonkonzentration (<i>RASSF1A</i> -Promotor) vor und nach Inkubation von Streptavidin Beads	45
Tabelle 23: Auflistung der 10 abundantesten Proteine nach Inkubation von unmethylierten Amplikons aus dem <i>RASSF1A</i> -Promotor. Das verwendete Plasma wurde zuvor mit einem MWCO von 5 kDa filtriert. OS: Originating species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence	49
Tabelle 24: Auflistung der 10 abundantesten Proteine nach Inkubation von unmethylierten Amplikons aus dem <i>RASSF1A</i> -Promotor. Das verwendete Plasma wurde zuvor mit einem MWCO von 5 kDa filtriert und mit unkonjugierten Beads inkubiert. OS: Organism species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence	50
Tabelle 25: Auflistung der 10 abundantesten Proteine nach Inkubation von unmethylierten Amplikons aus dem <i>RASSF1A</i> -Promotor. Das verwendete Plasma wurde zuvor mit einem MWCO von 5 kDa und anschließend erneut mit einem MWCO von 50 kDa filtriert. OS: Organism species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence	51
Tabelle 26: Auflistung der 10 abundantesten Proteine nach Inkubation von unmethylierten Amplikons aus dem <i>RASSF1A</i> -Promotor. Eingesetzt wurde nicht filtriertes oder anderweitig vorbehandeltes Plasma. OS: Organism species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence	52
Tabelle 27: Statistische Signifikanz der Bindung von Fibronectin bei Verwendung der angegebenen Amplikons und Inkubation in unverdünntem Plasma. Angegeben ist der Mittelwert der Peptidzahl der jeweiligen Probe und Kontrolle sowie der p-Wert bei Vergleich der Werte im ungepaarten T-Test.....	53

Tabelle 28: In der Überstandfraktion von Beads mit unmethylierten Amplikons aus dem *RASSF1A*-Promotor identifizierte Proteine. Sortierung nach absteigendem p-Wert im ungepaarten T-Test im Vergleich zu den Kontrollen. Dargestellt sind die 20 Proteine mit dem niedrigsten p-Wert. OS: Organism species, GN: Gene name, SV: Sequence version, PE: Protein existence..... 54

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konzentrationsverhältnis im Zeitverlauf über 10 min von methylierten und unmethylierten Amplikons aus dem RASSF1A-Promotor sowie Gesamtkonzentration an DNA bei Zugabe ins Blutplasma (B u. D) bzw. eine Pufferlösung (A u. C) ¹¹⁹	17
Abbildung 2: Agarosegel zur Kontrolle der PCR-Reaktion.....	41
Abbildung 3: Kontrolle der Methylierung des Amplikons aus dem <i>RASSF1A</i> -Promotor mithilfe eines methylierungssensitiven Restriktionsverdau (Hha1)	42
Abbildung 4: Kontrolle der Methylierung der Amplikons <i>COL1A2</i> und <i>CYP1B1</i> mithilfe eines methylierungssensitiven Restriktionsverdau	43
Abbildung 5: Kontrolle der Methylierung der Amplikons aus dem <i>CYP1B1</i> - und <i>RARB</i> -Promotor mithilfe eines methylierungssensitiven Restriktionsverdau am Bioanalyzer.....	44
Abbildung 6: Abspaltung der Amplikons von den Beads nach Inkubation im Plasma	46
Abbildung 7: Methode zur Trennung von Beads und Amplikons	47
Abbildung 8: Vergleich der massenspektrometrisch identifizierten Peptidzahl für Fibronectin in der Bead- bzw. Amplikonfraktion.....	56
Abbildung 9: Anzahl massenspektrometrisch identifizierter Peptide für Fibronectin bei Inkubation unterschiedlicher Amplikons in wie angegeben verdünntem Blutplasma	58
Abbildung 10: Peptidzahl für Fibronectin in technischen Replikaten drei ausgewählter Proben	59
Abbildung 11: Bindung von Fibronectin an unterschiedliche Amplikons	60
Abbildung 12: Bindung verschiedener Amplikons an eine mit Fibronectin beschichtete Platte	62
Abbildung 13: Nachweis von isolierten Oligonukleosomen mithilfe des Cell Death Detection ELISA Plus	64

Abbildung 14: Fibronectin Bindungs-Assay 65

Abbildung 15: Amplifizierte Sequenzen aus dem *RASSF1A*-Promotor (oben) und einem Intron desselben Genes (unten). CpG-Dinukleotide in beiden Sequenzen sind hervorgehoben. 73

LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name: Maximilian Yannick Strauß
Geburtsdatum: 12.12.1991
Geburtsort: Northeim
Familienstand: ledig
Vater: Gerald Strauß, geb. 25.01.1958
Mutter: Ursula Strauß, geb. 27.12.1954

SCHULISCHER WERDEGANG

2003 – 2006 Gymnasium Osterholz-Scharmbeck
16.06.2010 Abitur, Note: 1,0

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2011/12 Beginn des Studiums Medizin
Universität Heidelberg, Medizinische Fakultät Mannheim
03.09.2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1), Note: 1
12.10.2017 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2), Note: 2
06.12.2018 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3), Note: 2

2014 – 2020 Masterstudiengang Translational Medical Research
 Universität Heidelberg

19.03.2020 Prüfung zum Master of Science in Translational Medical
 Research, Note: 1,5
 Thema der Masterarbeit: *CoaRad: A Visualization Tool for
 Complex Coagulation Diagnostics*

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank geht an

- Herrn Prof. Dr. Michael Neumaier für die Bereitstellung dieses Themas und die ausgezeichneten Möglichkeiten zur Bearbeitung am Institut für Klinische Chemie sowie für die uneingeschränkte Unterstützung über den gesamten Verlauf dieser Arbeit
- Frau Dr. Maren Hedtke für die angenehme Betreuung und die Hilfe bei der Durchführung des Projektes sowie die Durchsicht dieser Arbeit
- Herrn Victor Costina für die zahlreichen praktischen Hilfestellungen sowie die Unterstützung bei den massenspektrometrischen Messungen
- Frau Dr. Stefanie Nittka für die vielen Ratschläge bei kleinen und großen Problemen sowie anregende Diskussionen
- alle Mitarbeiter am Institut für Klinische Chemie für die angenehme Zusammenarbeit
- meine Familie, die mich über die gesamte Dauer des Projektes und bei der Anfertigung dieser Arbeit bedingungslos unterstützt hat