

Integration eines
epigenetischen Nachweises
in eine mikrofluidische Plattform

Dissertation zur Erlangung des Grades
«Doktor der Naturwissenschaften »
an der
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes



**UNIVERSITÄT
DES
SAARLANDES**

Janik Kaercher
Saarbrücken 2023

Tag des Kolloquiums: 21. Juli 2023

Dekan: Prof. Dr. Ludger Santen

Berichterstatter:

Prof. Dr. Jörn Walter

Prof. Dr. Ralf Seemann

Akad. Mitarbeiter: Dr. Jens Neunzig

Vorsitz: Prof. Dr. Uli Müller

Meiner Familie und Freunden

**«Si no escalas la montaña jamás
podrás disfrutar el paisaje «**

Pablo Neruda (1904 - 1973)

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel «*Integration eines epigenetischen Nachweises in eine mikrofluidische Plattform*» selbständig und ohne andere als die angegebenen Hilfsmittel ausgearbeitet habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Neuhausen, 10. Februar 2024

(Janik Kaercher)

Publikationsliste

Im folgenden werden die im Rahmen dieser Doktorarbeit betreuten Abschlussarbeiten aufgeführt, sowie die entstandenen Publikationen und Erfindungsmeldungen mit Anmeldestatus.

Betreute Abschlussarbeiten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden drei Abschlussarbeiten betreut und koordiniert. Diese befassen sich mit Teilarbeitspaketen dieser Doktorarbeit und beruhen auf den Vorarbeiten dieser Doktorarbeit. Ergebnisse aus diesen Abschlussarbeiten werden in dieser schriftlichen Dissertation mit Verweis auf die jeweilige Arbeit gezeigt.

Elisa Schiele, “Evaluierung von Strategien für die Analyse epigenetischer Methylierungsmarker hinsichtlich einer LoC-Integration”, Hochschule für angewandte Wissenschaften Esslingen, 2021.

Denise Brüning, “Etablierung und Optimierung von molekularbiologischen Verfahren für eine Integration in ein *Lab-on-Chip* System“, Hochschule für angewandte Wissenschaften Esslingen, 2021.

Britta Schulze, “Transfer und Optimierung von *unit Operations* für den automatisierten Nachweis von DNA-Methylierungsmarkern in einem mikrofluidischen *Lab-on-Chip*-System“, Hochschule für angewandte Wissenschaften Esslingen, 2021.

Publikationen

Folgende Manuskripte wurden zum Stand der Einreichung der schriftlichen Dissertation eingereicht.

J. Kaercher et al. (2022), “Transfer of blocker-based qPCR reactions for DNA methylation analysis into a microfluidic LoC system using thermal modeling“, *Biomicrofluidics*, Status: eingereicht.

Konferenzen

Während der Zeit als Doktorand erfolgte eine aktive und passive Teilnahme an mehreren Konferenzen.

Aktive Konferenzteilnahme

Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden auf der MicroTAS 2021 Konferenz (Palmsprings) vorgestellt.

J. Kaercher et al., “Bisulfite based analysis of DNA methylation markers in a microfluidic environment with integrated silica matrix purification and PCR readout,” *MicroTAS 2021 Conference Journal*.

Passive Konferenzteilnahme

CMMC Symposium in Köln (26. - 28. September 2021).

Weissenburg Symposium (1.- 4. September 2021).

GRC Cancer Genetics and Epigenetics conference in Lucca, Italien (7. - 12. April 2019).

Inhaltsverzeichnis

1	Theoretischer Hintergrund	1
1.1	Einführung in die Epigenetik	1
1.1.1	Die Methylierung der DNA und ihre Mechanismen	2
1.1.2	Die biologische Rolle der DNA-Methylierung und ihre Assoziation mit Krankheiten	4
1.1.3	Veränderungen der DNA-Methylierung in Krebszellen	4
1.2	DNA-Methylierungsmarker in der <i>Liquid Biopsy</i> und deren Eignung in der Krebsdiagnostik	7
1.2.1	Die Analyse des <i>SEPT9</i> Methylierungsmarkers in der minimalinvasiven Darmkrebsvorsorge	8
1.3	Methoden zur Analyse von DNA-Methylierungen	10
1.3.1	Die Bisulfitkonvertierung als Goldstandard	11
1.3.2	Aufreinigung von bisulfitbehandelter DNA	12
1.3.3	Analyse des Methylierungsstatus mittels qPCR	13
1.4	<i>Lab-on-Chip</i> (LoC) Systeme	15
1.4.1	<i>Lab-on-Chip</i> basierte Ansätze zur Analyse der DNA-Methylierung	15
1.4.2	Das mikrofluidische <i>Lab-on-Chip</i> -System <i>Vivalytic</i> der Robert Bosch GmbH	18
2	Zielsetzung	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Material	22
3.2	Methoden	28
3.2.1	Zellkultivierung und Generierung von Probenmaterial	28
3.2.2	Analyse von Nukleinsäuren mittels Kapillargelelektrophorese	28
3.2.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	29
3.2.4	Bisulfitkonvertierung	29
3.2.5	Qualitätskontrolle bisulfitkonvertierter DNA mittel NGS Amplikonsequenzierung	30
3.2.6	Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA mit Hilfe von Silikamatrices	31
3.2.7	Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA mit Hilfe silikabeschichteter magnetischer Partikel	33
3.2.8	<i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	34
3.2.9	Etablierung fluidischer Abläufe	37
3.2.10	Bildaufnahme, Bildauswertung und Aufnahme vergleichbarer Amplifikationskurven	38
3.2.11	Durchführung von Thermomessungen und Anwendung des Thermomodells	41

4	Ergebnisse	42
4.1	LoC-Transfer der Bisulfitkonvertierung	43
4.1.1	Bisulfitkonvertierung mittels EpiBiS Kit (Epigenomics AG)	44
4.1.2	Bisulfitkonvertierung mittels Premium Bisulfite Kit (Diagenode)	46
4.1.3	Qualitätskontrolle der <i>on-Chip</i> generierten bisDNA mittels NGS Amplikonsequenzierung	49
4.2	LoC-Transfer einer silikamatrixbasierten alkoholhaltigen Aufreinigungsmethode	52
4.2.1	Identifizierung LoC-kompatibler Silikamatrices für die Aufreinigung von bisDNA	52
4.2.2	Integration LoC-kompatibler Silikamatrices in die <i>Vivalytic</i> Kartusche und automatisierte Aufreinigung von bisDNA	55
4.2.3	Verifizierung der silikamatrixbasierten Aufreinigung für den Einsatz im LoC-System	58
4.3	Etablierung einer alkoholfreien Aufreinigungsmethode mittels silikabeschichteter magnetischer Partikel sowie deren Transfer in das LoC-System	60
4.3.1	Vergleich der etablierten alkoholfreien <i>on-</i> und <i>off-Chip</i> Aufreinigungsmethoden mit der alkoholhaltigen Standard <i>off-Chip</i> Methode	61
4.3.2	Etablierung und Optimierung eines mikrofluidischen Ablaufs für die alkoholfreie Aufreinigungsmethode mit silikabeschichteten magnetischen Partikeln	62
4.4	Etablierung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR als Detektionsmethode für die DNA-Methylierungsanalyse	66
4.4.1	Identifizierung eines geeigneten Mastermixes für die Durchführung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	67
4.4.2	Desulfonierung der konvertierten DNA während der initialen Denaturierung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	68
4.4.3	Charakterisierung der etablierten <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	70
4.4.4	Funktionalitätsuntersuchung oberflächengetrockneter Oligonukleotide	73
4.4.5	Optimierung des Lösens lyophilisierter Mastermixe im LoC-System	74
4.4.6	Durchführung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR im LoC-System	75
4.4.7	Simulationsbasierte Optimierung des Thermoprogramms zur Durchführung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR im LoC-System	76
4.4.8	Stabilisierung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	81
4.4.9	Charakterisierung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR im LoC-System	82
4.5	<i>On-Chip</i> Verschaltung von Einzelfunktionen der DNA-Methylierungsanalyse	83
4.5.1	Analyse der <i>on-Chip</i> konvertierten und mittels magnetischen Partikeln aufgereinigten bisDNA mit der <i>off-Chip</i> <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	84
4.5.2	<i>On-Chip</i> Gesamtablauf der DNA-Methylierungsanalyse	84
5	Diskussion	86
5.1	Transfer der Bisulfitkonvertierung in die <i>Vivalytic</i> Kartusche	86
5.1.1	Bisulfitkonvertierung mit dem EpiBiS Kit in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	86
5.1.1.1	Bestimmung der Konvertierungstemperatur in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	86

5.1.1.2	Evaluierung reduzierter <i>off-Chip</i> Konvertierungstemperaturen mit Hilfe des <i>SEPT9</i> Methylierungsmarkers	87
5.1.1.3	Bestimmung der Konvertierungseffizienz in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	88
5.1.2	Bisulfitkonvertierung mit dem Premium Bisulfite Kit in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	89
5.1.2.1	Optimierung der initialen Denaturierungstemperatur in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	89
5.1.2.2	Amplifikation des <i>SEPT9</i> Methylierungsmarkers bei reduzierten <i>off-Chip</i> Konvertierungstemperaturen	90
5.1.2.3	Automatisierte Durchführung der Bisulfitkonvertierung in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	90
5.1.2.4	Qualitätskontrolle der automatisierten Bisulfitkonvertierung mit Hilfe einer NGS-basierten Amplikonsequenzierung	90
5.2	Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA	91
5.2.1	Silikamatrixbasierte Aufreinigung in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	91
5.2.1.1	Identifizierung LoC-kompatibler Silicamatrices	92
5.2.1.2	Automatisierte Aufreinigung in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	93
5.2.1.3	Aufreinigung unterschiedlicher Mengen bisulfitkonvertierter DNA mit dem etablierten Aufreinigungsprotokoll in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	94
5.2.1.4	Einfluss verschiedener Eluatvolumina auf die qPCR	94
5.2.2	Etablierung und Integration einer alkoholfreien Aufreinigungsmethode mit Hilfe magnetischen Partikeln	95
5.2.2.1	Optimierung und Transfer der alkoholfreien Aufreinigungsmethode	96
5.3	qPCR-basierte Detektion des <i>SEPT9</i> Methylierungsmarkers in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	98
5.3.1	Identifizierung lyophilisierter Mastermixe für die Durchführung der qPCR in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	98
5.3.1.1	Durchführbarkeit der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR mit ausgewählten Mastermixen	99
5.3.1.2	Durchführbarkeit der Desulfonierung während der initialen Denaturierungsphase mit ausgewählten Mastermixen	101
5.3.2	<i>Off-chip</i> Charakterisierung der LoC-kompatiblen <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	102
5.3.2.1	Bestimmung der <i>off-Chip</i> Amplifizierungseffizienzen der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	102
5.3.2.2	<i>Off-chip</i> Bestimmung des analytischen Detektionslimits der etablierten <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	103
5.3.2.3	<i>Off-chip</i> Bestimmung des relativen Detektionslimits der etablierten <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR	104
5.3.3	Evaluierung des stabilisierenden Effekts von Trehalose bei der Trocknung von Oligonukleotiden	104
5.3.4	Reduzierte Blasenbildung durch optimiertes Lösen des lyophilisierten Mastermix <i>Beads</i> in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	105

5.3.5	Durchführung des <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	106
5.3.5.1	Identifizierung eines geeigneten Temperaturprogramms für die Durchführung der <i>on-Chip SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR .	106
5.3.5.2	Stabilisierung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR durch Tween80 in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	107
5.3.5.3	Charakterisierung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	107
5.4	Verschaltung der einzelnen Teilschritte zu einem mikrofluidischen Gesamt- ablauf in der <i>Vivalytic</i> Kartusche	109
5.5	Ausblick der automatisierten Analyse der DNA-Methylierung in der <i>Viva- lytic</i> Kartusche	110
	Literaturverzeichnis	111
	6 Abbildungsverzeichnis	132
	7 Tabellenverzeichnis	142
	8 Anhang	144
	9 Danksagung	155

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
α	Glättungsfaktor für exponentielle Glättung
<i>ACTB</i>	β -Aktin
AG	Aktiengesellschaft
Alu	<i>Arthrobacter luteus</i>
<i>Bead</i>	lyophilisierter Mastermix
BHCS	Bosch Health Care Solutions
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i>
BiS	Bisulfit
bisDNA	bisulfitkonvertierte DNA
bp	Basenpaar
BP	Bindepuffer
BK	Bisulfitkontrolle
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CAGR	<i>Compound annual growth rate</i>
CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i> (dt. Cyclin-abhängiger Kinase-Inhibitor 2A)
CE	Communauté Européenne (dt. europäische Gemeinschaft)
cfDNA	<i>Cell-free DNA</i> (dt. zellfreie DNA)
CFF	<i>Cytosine-free fragment</i>
CH ₃	Methylgruppe
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
CRC	<i>Colorectal carcinoma</i> (dt. kolorektales Karzinom)
Ct	<i>Cycle treshold</i> (dt. Schwellenwert)
Δ Ct	Ct-Wert Differenz
CTC	<i>circulating tumor cell</i> (dt. zirkulierende Tumorzelle)
ctDNA	<i>Cell-free tumor DNA</i> (dt. zellfreie Tumor-DNA)
Cy5	Cyanin 5
ddH ₂ O	Wasser für molekularbiologische Anwendungen
Δ Rn	Größenordnung des normalisierten Fluoreszenzsignals
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (dt. Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	<i>Double stranded DNA</i> (dt. doppelsträngige DNA)
E	Amplifizierungseffizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	Elutionspuffer
EtOH	Ethanol
FA	Fragment Analyzer
FAM	6-Carboxyfluorescein
FCS	<i>fetal calf serum</i> (dt. fetales Kälberserum)

FDA	Food and Drug Administration
FIT	Fäkaler immunochemischer Test
FK	Filterkammer
FOBT	Fäkaler okkultur Bluttest
F-Primer	<i>forward primer</i>
FRET	Fluoreszenz Resonanztransfer
g	mittlere Erdbeschleunigung
G	Guanin
gDNA	genomische DNA
GuHCl	Guanidinium Hydrochlorid
h	<i>hour</i> (dt. Stunde)
HCl	Salzsäure
Hpa	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
HM	HeavyMethyl
H3K27me3	Trimethylierung der Aminosäure Lysin an Position 27 am Histon H3
Hz	Hertz
HSO ₃	Bisulfit
IVD	<i>in-vitro diagnostica</i>
kb	Kilobase
LINE	<i>long interspersed nuclear element</i>
LoC	<i>Lab-on-Chip</i>
LOD	<i>Limit of Detection</i> (dt. Detektionslimit)
LOD90	Konzentration welche noch mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % detektiert wird
LOT	Chargenbezeichnung
LTR	<i>long terminal repeat</i>
M	Molarität
MagBeads	magnetische Partikel
MBD	<i>Methyl-CpG-binding domain</i> (dt. Methyl-CpG-Bindedomäne)
MDNA	methylierte DNA
5-mC	5'-Methylcytosin
5-hmC	5'-Hydroxymethylcytosin
5-fC	5'-Formylcytosin
5-caC	5'-Carboxylecytosin
min	Minute
miRNA	microRNA
Mg ²⁺	zweiwertiges Magnesium-Ion
MK	Mischkammer
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MOB	<i>methylation on beads</i>
Msp	<i>Moraxella species</i>
MSP	methylierungsspezifische PCR
n	Anzahl Replikate
N	Normalität
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm

NGS	<i>next generation sequencing</i> (dt. Sequenzierung der nächsten Generation)
NTC	<i>No template control</i> (dt. Kontrolle ohne Templat)
<i>off-Chip</i>	Verfahren außerhalb des LoC-Systems
<i>on-Chip</i>	Verfahren im LoC-System
p	Pearson Korrelationskoeffizient
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (dt. phosphatgepufferte Salzlösung)
P_c	Pneumatischer Druck oder Kontrolldruck
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (dt. Polymerasekettenreaktion)
PDMS	Polydimethylsiloxan
PEG	Polyethylenglykol
pg	Pikogramm
P_h	Hydraulischer Druck
PH	Pumphub
PK	Probenkammer
PoC	<i>Point-of-Care</i>
qPCR	quantitative Echtzeit PCR
R^2	Bestimmtheitsmaß
REF	Referenznummer
RFU	<i>Relative fluorescence unit</i> (dt. relative Fluoreszenzeinheit)
RK	Reaktionskammer
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (dt. Ribonukleinsäure)
ROS	<i>radical oxygen species</i> (dt. radikale Sauerstoffspezies)
ROX	5-Carboxy-X-Rhodamin
R-Primer	<i>reverse primer</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
<i>SEPT9</i>	Septin 9
SiO_2	Silika bzw. Kieselsäure
SO_3^-	Sulfit-Gruppe
ssDNA	<i>single stranded DNA</i> (dt. einzelsträngige DNA)
T	Thymin
T	Temperatur
t_{Bind}	Bindezeit
TDG	<i>thymine DNA glycosylase</i>
$t_{Elution}$	Elutionszeit
TET	<i>ten-eleven-translocation</i>
TP	Thermoprogramm
TPU	Thermoplastisches Polyurethan
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSG	Tumorsuppressorgen
$t_{trocknen}$	Trocknungszeit
U	Uracil
UMDNA	unmethylierte DNA
UV	Ultraviolett
V_{Bind}	Bindevolumen
W	<i>waste</i> (dt. Abfallkammer)

WGA	<i>whole genome amplification</i> (dt. Amplifikation des gesamten Genoms)
WGS	<i>whole genome sequencing</i> (dt. Gesamtgenom Sequenzierung)
WP	Waschpuffer
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
x_i	geglätteter Mittelwert zum Zeitpunkt i
y_i	Messwert zum Zeitpunkt i

Zusammenfassung

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um die am besten beschriebene epigenetische Markierung in Säugetieren. Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster sind mit einer Vielzahl von Krankheiten, wie z. B. Krebs assoziiert. Eine frühe Diagnose ist für den Behandlungserfolg sowie die Überlebenschancen entscheidend. Minimalinvasive Testverfahren sind ein vielversprechender Ansatz um die Akzeptanz der angebotenen Vorsorgeprogramme zu erhöhen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die für die Analyse der DNA-Methylierung benötigten Verfahren in die mikrofluidische *Lab-on-Chip* (LoC) Plattform (*Vivalytic*) integriert, um eine automatisierte Analyse von DNA-Methylierungsmarkern zu ermöglichen. Die Bisulfitkonvertierung in der Reaktionskammer der *Vivalytic* Kartusche lieferte mit einer im Rahmen dieser Arbeit etablierten NGS-basierten Qualitätskontrollmethode Konvertierungseffizienzen unmethylierter Cytosine von $97,3 \% \pm 1,4 \%$. Zudem wurde eine neue Aufreinigungsmethode unter Verwendung silikabeschichteter magnetischer Partikel sowie eines polymerbasierten Waschpuffers (Bosch) entwickelt. Mit dieser Methode konnten bisDNA-Ausbeuten von $63,0 \% \pm 10,9 \%$ in der *Vivalytic* Kartusche erzielt werden. Lyophilisierte Mastermix *Beads* konnten identifiziert werden, mit welchen der Nachweis des *SEPT9* Methylierungsmarkers sowie die Desulfonierungsreaktion während der initialen Denaturierungsphase der qPCR (10 min, 95 °C) möglich war. Die blockerbasierte HeavyMethyl-qPCR (HM-qPCR) wurde durch die Identifizierung eines geeigneten Thermoprogramms, mit Hilfe eines simulationsbasierten Ansatzes erfolgreich in die *Vivalytic* Kartusche integriert. Im Rahmen dieses *proof-of-principle* konnte die Machbarkeit der Analyse von DNA-Methylierungsmarkern mit der *Vivalytic* Plattform gezeigt werden, womit ein wichtiger Schritt für die Anwendung epigenetischer Tests in der *Point-of-Care* (PoC) Diagnostik mit Hilfe von LoC-Systemen geleistet wurde.

Abstract

Aberrations in DNA-methylation patterns are associated with many diseases, e. g. cancer. An early diagnosis is critical for treatment succes and survival chances of cancer patients. Minimally invasive tests are a promising approach to increase the acceptance of cancer pre-screening programs. Within this work the complex operations needed for DNA-methylation analysis have been integrated into the microfluidic *Lab-on-Chip* (LoC) platform (*Vivalytic*) to enable an automated analysis of DNA-methylation markers. The bisulfite conversion within the reaction chamber of the *Vivalytic* cartridge resulted in conversion efficiencies of unmethylated cytosines around $97,3 \% \pm 1,4 \%$ applying a developed NGS-based quality control method. Additionally a purification method, using silica-covered magnetic particles and a polymer-based wash buffer (Bosch) was developed. With this method DNA yields of up to $63,0 \% \pm 10,9 \%$ were achieved in the *Vivalytic* cartridge. Lyophilized mastermix beads could be identified suitable for the detection of the *SEPT9* methylation marker as well as the performance of the desulfonation reaction within the initial denaturation phase (10 min, 95 °C) of the qPCR reaction. The blocker-based HeavyMethyl (HM) qPCR was succuessfully integrated into the *Vivalytic* cartridge using a simulation-based approach for identification of a suitable temperature program. Within this proof-of-principle the feasibility of DNA-methylation analysis with the *Vivalytic* platform could be demonstrated, which was an important step for the application of epigenetic testing in point-of-care (PoC) diagnostics within LoC-systems.

1 Theoretischer Hintergrund und derzeitiger wissenschaftlicher Kenntnisstand

In diesem Abschnitt soll eine kurze theoretische Einführung in die Epigenetik, mit besonderem Fokus auf die Methylierung von DNA, sowie deren Assoziation mit Krankheiten, wie Krebserkrankungen, gegeben werden. Darüber hinaus soll der Einsatz von DNA-Methylierungsmarkern in der Diagnostik mittels Methoden der *Liquid Biopsy* sowie der für dessen Nachweis notwendigen, gängigen Methoden veranschaulicht werden. Des Weiteren werden bisher in der Literatur beschriebene Ansätze zur Analyse von DNA-Methylierungen in *Lab-on-Chip* (LoC) Systemen aufgeführt und das Funktionsprinzip der *Vivalytic* Plattform der Firma Robert Bosch GmbH erläutert.

1.1 Einführung in die Epigenetik

Die Epigenetik ist ein sich rasant entwickelndes Forschungsgebiet mit großer Bedeutung für die Medizin und Diagnostik, sowie für die Biologie und Biotechnologie [1]. Im Gegensatz zur herkömmlichen Genetik, welche sich mit der DNA und deren Sequenz beschäftigt, sind bei regulatorischen Mechanismen der Epigenetik sogenannte epigenetische Markierungen des Chromatins involviert [1]. Dazu zählen die DNA-Methylierung, chemische Aminosäuremodifizierungen der Histonproteine, verschiedene Histonvarianten sowie nicht kodierende RNAs [2]. Diese Markierungen können die Konformität der Erbsubstanz verändern und auf einer der Genetik übergeordneten Ebene die Expression von Genen regulieren [1]. Sie werden von enzymatischen *writern*, *readern* und *erasern* gesetzt, gelesen und entfernt [1]. Da diese epigenetischen Markierungen untereinander wechselwirken ist es wichtig, Informationen über das gesamte Epigenom zu generieren und in Datenbanken einzupflegen [1]. Dies wird zum Beispiel durch die Forschungsprojekte IHEC (*international human epigenome consortium*) und ENCODE (*encyclopedia of DNA elements*) vorangetrieben [1]. Die Epigenetik wird häufig als Schnittstelle zwischen Umwelt und Genetik bezeichnet, da externe Faktoren und Umwelteinflüsse eine Veränderung der epigenetischen Markierungen hervorrufen können [1]. Im Vergleich zu genetischen Veränderungen der DNA-Sequenz sind epigenetische Veränderungen umkehrbar [1, 3]. Dies macht sie für klinische Anwendungen und die Diagnostik, insbesondere die preventive Diagnostik, interessant [1]. Eine Weitergabe der in der epigenetischen Markierungslandschaft festgehaltenen, erworbenen Eigenschaften kann sowohl durch mitotische als auch meiotische Vorgänge erfolgen, dessen genaue Mechanismen noch nicht gänzlich verstanden sind [4, 5]. Aus diesem Grund spricht man besonders bei DNA-Methylierungsmustern auch vom zellulären Gedächtnis [6]. Auf die DNA-Methylierung, deren regulatorische Mechanismen sowie die enzymatische

DNA-Methylierungsmaschinerie wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

1.1.1 Die Methylierung der DNA und ihre Mechanismen

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine der am häufigsten auftretenden und am besten untersuchten epigenetischen Markierungen im Erbgut von Säugern [7, 8]. Die Methylgruppe befindet sich hierbei mit überwiegender Mehrheit kovalent an das 5'-C-Atom von Cytosinen (5-mC) gebunden (Abb. 1) [8], welche sich im Kontext mit Guaninen, in sogenannten Cytosin-Guanin-Dinukleotiden (CpG), befinden [9]. Durch die Methylierung der Cytosinbase wird die Watson-Crick-Paarung der doppelsträngigen DNA nicht beeinflusst, da die Methylgruppe in der großen Furche der DNA-Doppelhelix liegt. Methyliertes Cytosin bindet also genauso wie unmethyliertes Cytosin über drei Wasserstoffbrückenbindungen an Guanin. Die genetische Funktion der DNA wird somit nicht verändert. Ist eine Cytosinbase des CpG Dinukleotids in einem der beiden Stränge methyliert, so ist häufig auch die palindrome Sequenz des Gegenstrangs methyliert [10].

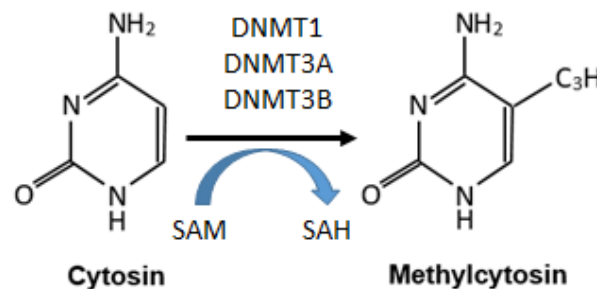


Abbildung 1: Darstellung der Strukturformeln von unmethyliertem Cytosin (links) und methyliertem Cytosin (rechts). Die Methylgruppe wird von sogenannten DNA-methyltransferasen (DNMTs) unter Verwendung von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Methylgruppendonor an das 5'-C Atom des Cytosins angebracht. In Anlehnung an [11, 12].

DNA-Methyltransferasen (DNMT) katalysieren die Übertragung der Methylgruppe an die Cytosinbase des CpG Dinukleotids, wobei S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Methylgruppendonor verwendet wird (Abb. 1) [13, 14]. Das Enzym DNMT1 wird auch als Instandhaltungs-DNMT bezeichnet, da es an der Replikationsgabel lokalisiert, hemimethylierte DNA (Abb. 2) erkennt und Methylgruppen an CpGs im neusynthetisierten DNA Strang anbringt [15]. Trotzdem kann es während des Replikationsvorgangs, zur passiven DNA Demethylierung kommen [12]. Die Enzyme DNMT3A und DNMT3B können in gewissem Ausmaß, durch ihre Affinität zu hemimethylierter DNA, ebenfalls zur Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung beitragen. Ihre Hauptaufgabe besteht allerdings in der Etablierung des DNA-Methylierungsmusters während der Embryogenese [16]. Das Enzym DNMT3L besitzt hingegen selbst keine katalytische Aktivität, unterstützt die Enzyme DNMT3A und DNMT3B hingegen bei ihrer Methylierungsfunktion [12]. Für die aktive oxidative Demethylierungskaskade von 5'-Methylcytosin (5-mC) über 5'-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) und 5'-Formylcytosin (5-fC) hin zu 5'-Carboxylcytosin (5-caC) sind die *ten-eleven-translocation* (TET) Enzyme zuständig (Abb. 2) [17]. Im An-

schluss an die oxidative Kaskade, wird noch das Enzym TDG (*thymine DNA glycosylase*) benötigt, um das 5-caC durch Cytosin zu ersetzen [18].

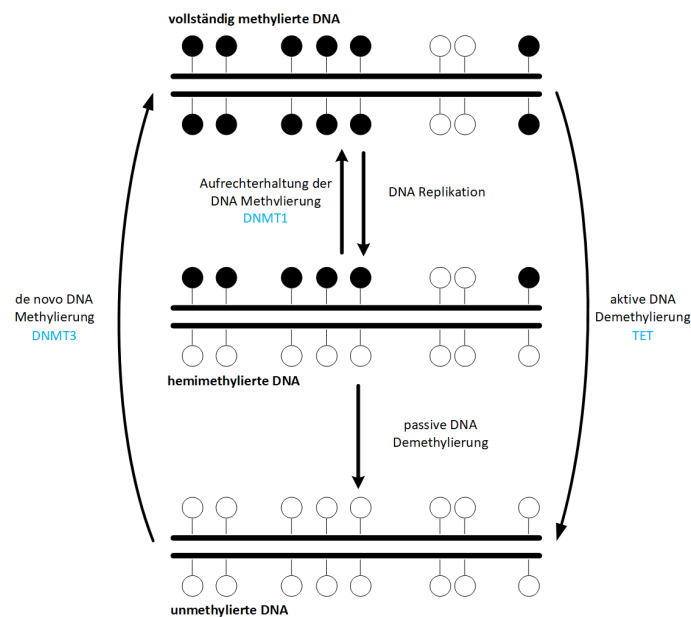


Abbildung 2: Darstellung der Mechanismen der Auf- und Abmethylierung der DNA. Unmethylierte CpG Positionen sind in weiß und methylierte CpG Positionen in schwarz dargestellt. DNMT1 ist an der Replikationsgabel lokalisiert und bringt Methylgruppen am neusynthetisierten DNA-Strang an. Während des Replikationsvorgangs kann es trotzdem zur passiven Demethylierung kommen. DNMT3A und 3B (DNMT3) sind für die *de novo* DNA-Methylierung während der Embryogenese zuständig und tragen darüber hinaus ebenfalls zur Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung bei. Die aktive DNA-Demethylierung findet über eine oxidative Demethylierungskaskade mittels TET Enzymen statt. In Anlehnung an [17].

Die DNA-Methylierungsstruktur in Säugetieren ist in gewissem Maß dynamisch und variabel in Raum und Zeit. Ca. 58 Mio Positionen können im humanen Genom potentiell methyliert sein, wovon etwa 70-80 % aller CpG Dinukleotide methyliert vorliegen [10, 19, 20]. Durch die spontane Deaminierung von 5-mC zu Thymin sind CpG Dinukleotide im Genom von Säugern relativ selten [10, 21]. Durch diese Ausdünnung von CpG Dinukleotiden lassen sich im Genom, neben der oben genannten ungleichmäßigen Verteilung auch bestimmte Muster an CpG Dinukleotiden beobachten. Sogenannte CpG Inseln stellen Anhäufungen dieser CpG Dinukleotide dar. Man geht von etwa 27000 CpG Inseln in nicht-repetitiven Bereichen des menschlichen Genoms aus [10, 22–25]. Diese CpG Inseln reichen von 300 bp bis zu 3 kb Länge und können in Promotorregionen gefunden werden. Von ungefähr 70 % aller menschlichen Gene überlappt die CpG Insel noch das erste Exon. Innerhalb dieser CpG Inseln liegen die CpG Dinukleotide häufig unmethyliert vor. Liegen sie jedoch methyliert vor, so sind sie im Genkörper (erstes Exon) mit einer erhöhten Genexpression und im Promotorbereich mit einer Unterdrückung der Genexpression assoziiert [8]. Auch in wiederholenden Abschnitten des Genoms (engl. *repeats*) und transposablen Elementen wie LINE-1, kommen methylierte CpG Dinukleotide vermehrt

vor, wo sie mit einer Unterdrückung der Genexpression und Mobilität von transposablen Elementen assoziiert sind [10, 26]. Die Methylierung der DNA ist also maßgeblich an der Regulation der Genexpression beteiligt [27]. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den hypermethylierten Promoterbereich, kann zum einen durch die sterische Hinderung der Methylgruppe selbst und zum anderen durch Proteine welche an methylierte CpGs binden verhindert werden [8, 28].

1.1.2 Die biologische Rolle der DNA-Methylierung und ihre Assoziation mit Krankheiten

Die Epigenetik, insbesondere die DNA-Methylierung, ist aufgrund ihrer oben aufgeführten regulatorischen Mechanismen in essentiellen biologischen Prozessen, wie der Zelldifferenzierung, der Embryonalentwicklung, der X-Chromosomeninaktivierung, dem *Imprinting* sowie Alterungsvorgängen involviert [1, 25, 29–32]. Daher liegt es nahe, dass Veränderungen der DNA Methylierungslandschaft eng mit der Entstehung von Krankheiten assoziiert sind. Neben Herz-Kreislaufkrankungen spielt die Veränderung der DNA-Methylierung auch bei Autoimmun- und Infektionskrankheiten eine wichtige Rolle [33–36]. Auch in der Forensik [37, 38], der pränatalen Diagnostik [39, 40], der Reinheitskontrolle beim *Tissue Engineering* [41] und der Stammzelltherapie [42] sowie bei der Immun-*checkpoint-response* [43, 44] bis hin zu psychologischen Erkrankungen wie Schizophrenie und Traumata werden stetig mehr Zusammenhänge mit Veränderungen der DNA-Methylierung beschrieben [45–48]. Mit einem Anteil von 44,8 % am globalen Epigenetikmarkt, nimmt der Sektor der Onkologie allerdings den größten Anteil ein. Bis zum Jahr 2028 wird ein Wachstum mit einer *Compound Annual Growth Rate* (CAGR) von 19,2 % auf bis zu 7,11 Mrd. US \$ vermutet [49]. Darüber hinaus handelt es sich bei Krebserkrankungen inzwischen um die häufigste Todesursache weltweit [50]. Des Weiteren sind epigenetische Mechanismen, welche zur Krebsentstehung beitragen, in der Literatur beschrieben [51, 52]. Im folgenden Abschnitt wird genauer auf die Unterschiede gesunder Zellen im Vergleich zu Krebszellen eingegangen.

1.1.3 Veränderungen der DNA-Methylierung in Krebszellen

Anders als lange Zeit gedacht, trägt nicht nur die Anhäufung genetischer sondern auch epigenetischer Veränderungen zur Krebsentstehung bei (Abb. 3) [53]. Je nach Krebstyp ist der epigenetische oder der genetische Beitrag zur Krebsentstehung unterschiedlich hoch [54]. Besonders interessant ist der Umstand, dass sich epigenetische und genetische Veränderungen des Genoms bzw. Epigenoms gegenseitig beeinflussen und in der onkogenen Transformation sogar zusammenspielen können [51, 55]. Auch wenn schon seit längerer Zeit bekannt ist, dass Krebszellen epigenetische Veränderungen durchlaufen, hat man erst recht spät die Vielzahl an Mutationen in epigenetischen Regulatoren, die damit zusammenhängenden Veränderungen des Epigenoms und die daraus resultierende Veränderung der Genexpression erkannt [2, 55]. Veränderungen in epigenetischen Mechanismen können zu genetischen Mutationen führen und genetische Mutationen in epigenetischen Regulatoren können wiederum zu Veränderungen des Epigenoms führen. Genetische Veränderungen des Epigenoms tragen demnach also genauso zur Krebsentstehung bei, wie epigenetische Prozesse Punktmutationen hervorrufen können, welche z.B. die Funktio-

nen der DNA-Reparatur ausschalten. Während genetische Veränderungen hauptsächlich durch Alterung, mutagene Chemikalien, ultraviolettes (UV) Licht, Radikale Sauerstoffspezies (engl. *radical oxygen species*, ROS) und weitere Faktoren induziert werden, werden epigenetische Veränderungen hauptsächlich durch Alterung und chronische Entzündungen ausgelöst [53, 56–63]. Darüberhinaus können epigenetische Veränderungen auch durch chemische Mutagene des Zigarettenrauchs sowie durch Östrogenbehandlungen hervorgerufen werden [64–66]. Als Hauptfaktoren, welche das Krebsrisiko erhöhen, werden heute allerdings Alterungsprozesse angesehen [67]. Außerdem ist die Gesamtanzahl der Stammzellteilungen stark mit dem Krebsrisiko korreliert [68]. Schon lange bevor es zur Krebsentstehung kommt, sind bereits Veränderungen in Zellen, wie z. B. Veränderungen der DNA-Methylierung, zu erkennen. In normalen Zellen spiegelt die Anhäufung und Struktur von Veränderungen die umweltbedingte Schadstoffexposition und den geführten Lebensstil wieder. Der genetisch bestimmte Weg zur Krebsentstehung verläuft relativ geradlinig. Die Mutation von Tumorsuppressoren oder Onkogenen verursacht entweder einen Verlust oder eine Zunahme der Aktivität des entsprechenden Enzyms sowie eine abnorme Expression.

Der epigenetische Weg zur Krebsentstehung hingegen ist deutlich komplizierter und betrifft alle Ebenen des Epigenoms [2, 69]. Die Methylierung der CpG Positionen außerhalb CpG-reicher Positionen (CpG Inseln) kann in Krebszellen von ca. 80 % auf ungefähr 40 - 60 % abnehmen. Diese Hypomethylierung der DNA führt zu einem der Hauptmerkmale von Krebszellen, nämlich der Genominstabilität [70, 71]. Am stärksten trägt die Demethylierung von sich wiederholenden Sequenzregionen zur globalen Demethylierung bei. Diese Regionen machen bis zu 50 % des Genoms aus. Zu diesen Sequenzen gehören z.B. LINE-1 (engl. *long interspersed nuclear element*) und Alu (*Arthrobacter luteus*) Sequenzen [72–74]. Eine Hypomethylierung kann darüberhinaus aber auch an regulatorischen Elementen der Transkription, wie Promotoren oder Enhancern, auftreten. Dadurch kann die Expression von Genen wie Protoonkogenen, die normalerweise inaktiv sind, aktiviert werden [71, 75].

In Krebszellen sind Promotorbereiche in wichtigen Genen der Zellzykluskontrolle, der DNA Reparatur, Apoptose und Differenzierung häufig hypermethyliert (Abb. 3) [23, 71, 76]. Hierzu zählt zum Beispiel Septin 9 (*SEPT9*) aus der Klasse der Septine [77, 78]. Mit fortschreitender Tumorerkrankung kann sowohl die Anzahl an hypermethylierten Promotoren, sowie die Häufigkeit einer bestimmten Promotorhypermethylierung zunehmen [79], [80], [81], [82]. Durch die Inaktivierung von wichtigen Genen der DNA Reparatur, werden in vielen Tumoren eine Anhäufung genetischer Mutationen begünstigt [71, 83]. Durch bereits vorhandene epigenetische Modifikationen werden die Gene markiert, die später einer Veränderung des DNA-Methylierungszustands unterliegen [84]. Besonders Gene mit hohen Anteilen an H3K27me3 Methylierung, d.h. Trimethylierung der Aminosäure Lysin an Position 27 am Histon H3, sind dabei anfällig für eine veränderte DNA-Methylierung [85–87]. Des Weiteren scheinen Gene, welche eine verringerte RNA-Polymerase II Bindung aufweisen, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit methyliert zu werden [88]. Der H3K27me3 Methylierungszustand sowie die Verteilung der RNA-Polymerase II sind je nach Gewebetyp verschieden. Deren Verteilungen können durch Aussetzung mit verschiedenen Induzierern wie oxidative Schäden und Kolitis, verändert werden [89, 90]. In Leberzellkarzinomen und Leberzirrhose konnten durch eine Infektion mit dem Hepatitis C Virus an mehr als 18000 CpG Stellen Veränderungen der DNA-Methylierung festgestellt werden. Bei einer Infektion mit dem Hepatitis B Virus und durch Alkohol hingegen eine Veränderung an 400

bis 600 CpG Stellen [91, 92]. Ist eine veränderte DNA-Methylierung an spezifischen Genen erst einmal ausgelöst, kann dieses Methylierungsprofil über viele Zellteilungen hinweg beibehalten werden. Der Umfang der Anhäufung epigenetischer Veränderungen spiegelt nicht nur den Induzierer sondern auch die Dauer der Aussetzung gegenüber diesem wieder [93]. Die Hypermethylierung an spezifischen Positionen sowie die globale Hypomethylierung sind verkettete Vorgänge, welche in einer Vielzahl von Tumoren auftreten und zur genomischen Instabilität, fehlerhaften Genexpression und zum Grad der Bösartigkeit beitragen [71, 94, 95]. Aufgrund dieser eindeutigen Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen gesunden und entarteten Zellen bietet deren Verwendung als Biomarker in der Diagnostik enormes Potential.

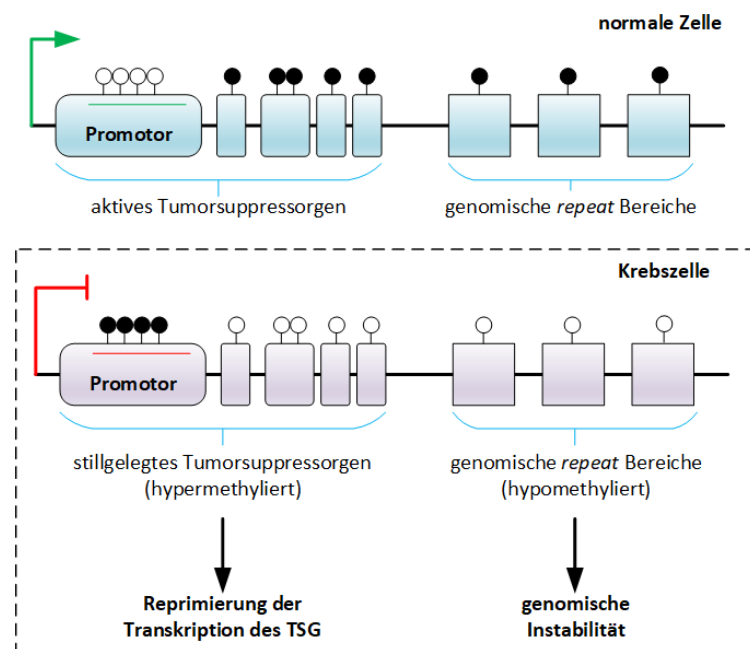


Abbildung 3: Veränderungen der DNA-Methylierung in Tumoren. Weiße Kreise stellen unmethylierte Regionen und schwarze Kreise methylierte Regionen dar. Oben ist der unmethylierte Promotor eines TSG in einer normalen Zelle dargestellt. Unten ist der hypermethylierte Promotor eines TSG in einer Krebszelle dargestellt. Außerdem ist die in Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen abnehmende globale DNA-Methylierung außerhalb regulatoriver Elemente dargestellt. In Anlehnung an [71].

1.2 DNA-Methylierungsmarker in der *Liquid Biopsy* und deren Eignung in der Krebsdiagnostik

Die Verwendung von Körperflüssigkeiten wie Blutplasma, Urin, Speichel und Cerebrospinalflüssigkeit usw. als Probenmaterial wird auch als *Liquid Biopsy* bezeichnet. Daraus können Biomoleküle mit diagnostischem Informationsgehalt wie Zellen, Vesikel wie z. B. Exosomen, Proteine, DNA und RNA isoliert und im Anschluss analysiert werden (Abb. 4). Der Einsatz von *Liquid Biopsy* basierten Methoden zur Überwachung des Fortschreitens von Krebserkrankungen sowie der Wirkung einer therapeutischen Intervention gewinnt zunehmend an Bedeutung [96–99].

DNA Fragmente, welche in diesen Körperflüssigkeiten gefunden werden können, bezeichnet man als zellfreie DNA (engl. *cell free* DNA, cfDNA). Diese cfDNA und besonders die bei Tumorpatienten vorkommende zellfreie Tumor-DNA (ctDNA) stellt ein vielversprechendes Probenmaterial in der Krebsdiagnostik dar (Abb. 4). Über Mechanismen wie aktive Sekretion, Apoptose und Nekrose gelangt die cfDNA in den Blutkreislauf [96, 100–102]. Diese ist stark fragmentiert und weist eine durchschnittliche Länge von ca. 170 bp auf [96, 103–105]. Bei gesunden Personen kommt cfDNA hauptsächlich von Leukozyten. Die Konzentration an cfDNA im Plasma liegt bei gesunden Personen bei bis zu 100 ng/ml und kann bei Tumorpatienten mehr als 1000 ng/ml betragen [106], [79]. Der Anteil der ctDNA im Plasma kann von 0,01 % bis über 50 % reichen [107]. In der Regel nimmt der Anteil der ctDNA mit fortschreitender Tumorerkrankung, bzw. mit der Größe des Tumors zu und ist besonder zu Beginn der Tumorerkrankung äußerst gering [108]. Wie auch gesunde Zellen anhand ihrer zelltypspezifischen DNA-Methylierung unterschieden werden können, so können auch Tumorzellen anhand ihres Methylierungsmusters unterschieden werden [8, 53, 109, 110]. Auch konnte bereits gezeigt werden, dass die Zellsignatur der ursprünglich gesunden Zelle während der Krebsentstehung erkennbar bleibt [111]. Die ctDNA weißt dabei die selbe tumorspezifische DNA-Methylierung und Mutationen wie der Primärtumor und seine Metastasen auf [106, 112, 113]. Die Detektion von DNA-Methylierungsprofilen zellfreier DNA ist ein bedeutender Fortschritt im klinischen Einsatz der *Liquid Biopsy* für die Diagnose, Prognose und Therapieüberwachung [79]. Bereits in Vorläuferläsionen können Veränderungen in der DNA-Methylierung beobachtet werden, was die Analyse von DNA-Methylierungsmarkern zu einem vielversprechenden Ansatz für die Krebsfrüherkennung macht [7, 114–116]. Die Analyse von cfDNA im Blut, gilt im Vergleich zur Analyse von Gewebeprobe, als minimalinvasive Form der Probenentnahme. Diese Form der Probenentnahme zusammen mit der Analyse der DNA-Methylierung könnte also eine breitere Früherkennung von Krebserkrankungen ermöglichen und somit die Chancen einer erfolgreichen Behandlung verbessern sowie die Überlebenschancen erhöhen. Dies ist entscheidend, da einer der Hauptgründe für die hohe Mortalität von Krebserkrankungen deren späte Detektion ist, wodurch in vielen Fällen bereits eine Metastasierung des Tumors erfolgte [25, 71, 117, 118]. Neben dem Potential zur verbesserten Früherkennung von Krebserkrankungen weisen DNA-Methylierungsmarker, gegenüber anderen Markern weitere Vorteile auf. Proteinmarker oder RNA-basierte Marker sind weniger stabil, was sich auf die Probenentnahme, -lagerung und -prozessierung auswirken kann [25, 119, 120]. Mit Hilfe von PCR-basierten Methoden lässt sich durch die Amplifikation der Sequenz des Methylierungsmarkers ein äußerst sensitiver Nachweis ermöglichen [7]. Bei genetischen Biomarkern ist die Anzahl wiederkehrender Mutationen häufig gering. Bei hypermethy-

lierten Promotoren ändern sich häufig mehrere CpGs gleichzeitig, wodurch im Vergleich zu genetischen Biomarkern, eine sensitivere Detektion möglich ist [113, 118]. Trotz vieler Vorteile stellt die Analyse der DNA-Methylierung von cfDNA, aufgrund der limitierten Verfügbarkeit, der starken Fragmentierung sowie aufgrund des großen Hintergrunds an unmethylierten Sequenzen, eine große Herausforderung dar [108, 117]. Nichts desto trotz werden bereits einige Methylierungsmarker in minimalinvasiven, *Liquid Biopsy* basierten IVD Tests verwendet.

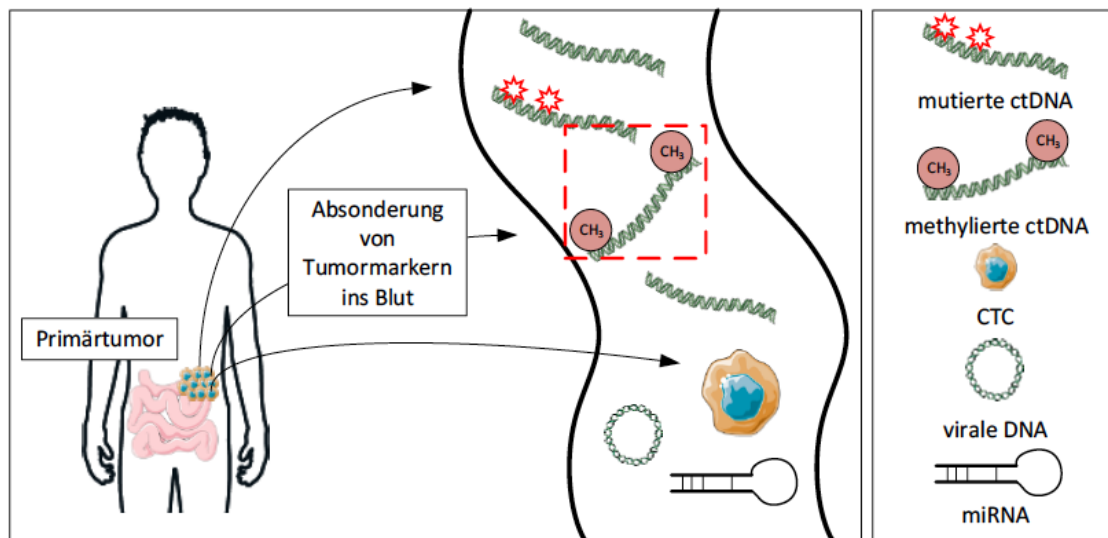


Abbildung 4: Aus Primärtumoren stammende Tumormarker im Blut. Tumorspezifische Veränderungen der DNA-Methylierung sowie genetische Mutationen können in ctDNA detektiert werden. Neben ctDNA und cfDNA aus gesunden Zellen, können auch zirkulierende Tumorzellen (engl. *circulation tumor cells*, CTCs), welche sich aus dem Primärtumor ablösen sowie virale DNA und Mikro RNA (miRNA) im Blut detektiert werden. In Anlehnung an [79]

1.2.1 Die Analyse des *SEPT9* Methylierungsmarkers in der minimalinvasiven Darmkrebsvorsorge

Für das *proof-of-principle* im Rahmen dieser Arbeit wurde der Methylierungsmarker *Septin 9* (*SEPT9*) ausgewählt [121, 122]. Hierbei handelt es sich um einen Marker, welcher ausführlich in der Literatur beschrieben ist und im von der FDA zugelassenen Darmkrebsfrüherkennungstest Epi proColon[®] 2.0 der Firma Epigenomcis AG, Anwendung findet [79, 119, 123–131]. Dieser blutbasierte, diagnostische Test, analysiert lediglich den *SEPT9* Marker. Als Amplifikationskontrolle und somit zur quantitativen Normalisierung dient *ACTB* (Beta-Aktin). Mit Hilfe einer qPCR (siehe Abschnitt 2.4.3), wird hierbei der Methylierungsstatus der v2 Region des *SEPT9* Promotors, nach erfolgter Bisulfitkonvertierung (Abschnitt 2.4.1), untersucht. Die Hypermethylierung der v2 Region des *SEPT9* Promotors ist ein validierter und zugelassener Methylierungsmarker, welcher typisch für kolorektale Karzinome (engl. *colorectal carcinoma*, CRC) ist und bereits in frühen Stadien sowie Vorläuferläsionen wie Adenomen nachgewiesen werden kann [132, 133]. Auch wenn bereits bekannt ist, dass eine frühe Erkennung von Darmkrebs die Behandlungs- und

Überlebenschancen erhöht, fällt die Teilnahme an Darmkrebsvorsorgeprogrammen relativ gering aus [134]. Dies liegt vor allem daran, dass Methoden wie die Koloskopie (Darmspiegelung) und Sigmoidoskopie ("kleine" Darmspiegelung), durch ihre hohe Invasivität, eine geringe Patientencompliance aufweisen [126, 135]. Eine Verbesserung der Patientencompliance konnte auch nicht mit dem fäkalen immunochemischen Test (FIT) oder dem fäkalen okkulten Bluttest (FOBT), erreicht werden. Darüber hinaus weisen diese Methoden eine geringere Sensitivität als die endoskopischen Methoden auf [128, 136]. Durch den Einsatz minimalinvasiver blutbasierter Darmkrebsvorsorgetests erhofft man sich deshalb eine höhere Akzeptanz der Darmkrebsvorsorgeprogramme [119]. Der Epi proColon[®] 2.0 Test wurde in Fall-Kontroll-Studien für die klinische Anwendung zur Detektion von Darmkrebs validiert. Der Anteil der gesunden Probanden mit positivem Test (falsch positiv) wird durch die Spezifität angegeben und der Anteil der erkrankten Probanden mit positivem Test durch die Sensitivität. Mit dem Epi proColon[®] 2.0 Test ließen sich Sensitivitäten zwischen 75 % und 81 % und Spezifitäten zwischen 96 % und 99 % erreichen [128, 137]. Ein zusätzlicher Vergleich des Epi proColon[®] 2.0 Test mit dem FIT Test zeigte eine höhere Sensitivität und gleiche Spezifität als der FIT Test (Sensitivität: 74,8 % (Epi proColon[®] 2.0) und 58,0 % (FIT); Spezifität: 96,3 %)[138]. Im Vergleich zum FOBT Test wurden mit dem Epi proColon[®] 2.0 sowohl für die Sensitivität als auch für die Spezifität höhere Werte erzielt (Sensitivität: 79,3 % (Epi proColon[®] 2.0) und 68,2 % (FOBT); Spezifität: 98,9 % gegenüber 70,6 %) [139]. Die frühen Darmkrebsstadien I und II konnten in den Studien mit mindestens 60 % Sensitivität detektiert werden [138–140]. Das Stadium I konnte in zwei Studien jedoch mit einer geringeren Sensitivität als die Stadien II bis IV detektiert werden [138, 139]. Wie bereits erwähnt, gestalten die in frühen Stadien vorliegenden geringen Mengen an ctDNA, eine Detektion äußerst schwer [136]. Es kann darüber hinaus vorkommen, dass bei Patienten mit Prostata-, Lungen- und Brustkrebs, nicht-rheumatischer Arthritis, chronischer Gastritis und Ösophagitis sowie im Falle einer Schwangerschaft ein positives Testergebnis angezeigt wird [140]. Aus diesem Grund ersetzt der Epi proColon[®] 2.0 Test noch nicht die als Goldstandard geltende Koloskopie und dient somit lediglich als Vorsorgemethode und nicht als Diagnosemethode. Genau wie bei einem positiven FIT und auch FOBT Test, wird auch beim Epi proColon[®] 2.0 Test, eine zusätzliche Koloskopie empfohlen [119, 140]. Da sich der Epi proColon[®] 2.0 Test dennoch als Vorsorgemethode eignet und dadurch eventuell die Akzeptanz der Darmkrebsfrüherkennungsprogramme erhöht werden kann, wurde der Test in der USA als erster blutbasierter Methylierungsbiomarker bereits 2016 von der FDA zugelassen [119, 136]. Inzwischen wird der Epi proColon[®] 2.0 Test, neben dem FOBT Test, auch von chinesischen Behörden empfohlen [141]. Im Folgenden werden die Methoden, welche zur Analyse solcher DNA-Methylierungsmarker verwendet werden, näher erläutert.

1.3 Methoden zur Analyse von DNA-Methylierungen

Aufgrund der essentiellen Rolle epigenetischer Signale im gesunden und erkrankten Zustand ist die Erfassung epigenetischer Markierungen, wie der DNA-Methylierung von großer Bedeutung. In den letzten Jahren wurden eine Vielzahl von Methoden entwickelt, welche die Analyse der DNA-Methylierung an spezifischen Loci aber auch genomweit möglich machen. Heute ist es möglich, das Epigenom bzw. das Methylom mit einer Auflösung auf der Ebene einzelner Basen zu analysieren. Darüber hinaus gibt es Techniken die dazu in der Lage sind, verschiedene Oxidationsformen des Methylcytosin, wie z.B. 5'-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) zu detektieren. Je nach Fragestellung gilt es hierbei auf eine geeignete Methode zurückzugreifen. Da sich 5-mC nicht durch Hybridisierungs-basierte Methoden von unmethyliertem Cytosin unterscheiden lässt und da die Methylgruppe in PCR-basierten Methoden verloren geht, müssen vor PCR-, Array- oder Sequenzierungs-basierten Techniken, Methoden eingesetzt werden, welche eine Differenzierung von methylierten und unmethylierten Cytosinen ermöglichen. Eine dieser Methoden ist der Endonukleaseverdau mittels eines Paares aus methylierungssensitiven (z. B. HpaII) und methylierungsinsensitiven (z. B. MspI) Restriktionsenzymen mit anschließender Fragmentanalyse oder PCR, bei welcher die Primer die Restriktionsschnittstellen abdecken. Diese Methode ist allerdings sehr anfällig für falsch positive Ergebnisse durch unvollständigen Verdau der DNA. Außerdem können nicht alle Sequenzen die als potentielle Biomarker in Frage kommen analysiert werden, aufgrund mangelnder Restriktionsschnittstellen. Neben diesen Methoden kann das Ergebnis des Restriktionsverdaus auch mittels Arrayhybridisierung und Sequenzierung analysiert werden. Eine weitere Methode ist die Affinitätsanreicherung mittels gegen 5-mC gerichteten Antikörpern und MBDs (engl. *methyl-CpG-binding domain*). Anschließend können die angereicherten Sequenzen z.B. an einen Array der auf CpG Inseln ausgelegt ist hybridisiert werden. PCR-basierte Methoden für die Analyse spezifischer Gene der angereicherten DNA Fragmente sind eine weitere Analysemethode. Allerdings können keine Informationen über den Methylierungszustand individueller CpG Dinukleotide erhoben werden, weshalb auch bei der Affinitätsanreicherung vermehrt NGS (engl. *next generation sequencing* Methoden angewendet werden. Außerdem weisen Antikörper und auch Methylbindeproteine eine Kreuzreaktivität auf, wodurch es zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann [142]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die in den 1990er Jahren entwickelte Bisulfitkonvertierung, welche noch heute als Goldstandard in der Untersuchung von 5-mC gilt, für die Analyse der DNA-Methylierung ausgewählt [143–145].

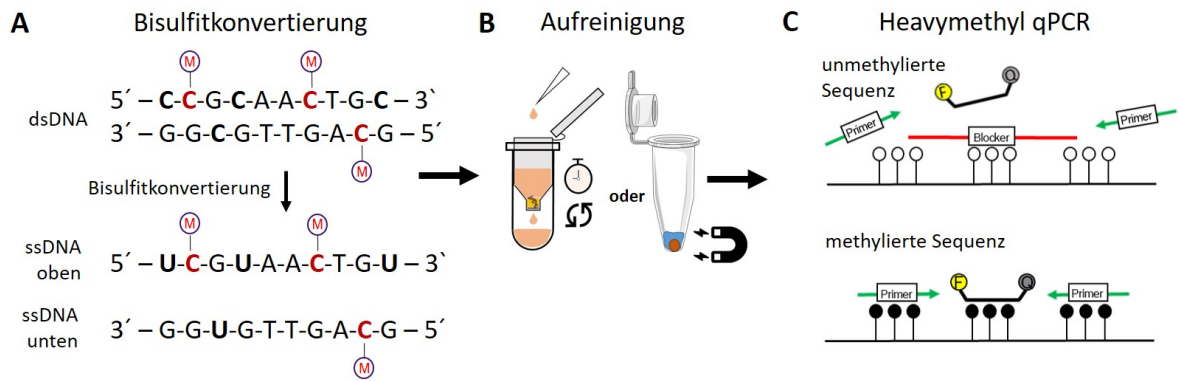


Abbildung 5: Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Methoden für die Analyse der DNA-Methylierung. (A) Bisulfitkonvertierung der Ausgangs DNA (Abschnitt 1.3.1). (B) Aufreinigung mittels in Zentrifugensäulchen verbauten Silikamatrices oder mit Hilfe von silikabeschichteten magnetischen Partikeln (Abschnitt 1.3.2). (C) Detektion des Methylierungsmarkers SEPT9 mit einer *Heavymethyl* (HM) qPCR (Abschnitt 1.3.3). Die Desulfonierung kann während der Aufreinigung mit Desulfonierungspuffern oder während einer verlängerten initialen Denaturierungsphase der qPCR durchgeführt werden. In der qPCR können sowohl flüssige als auch lyophilisierte Mastermixe eingesetzt werden.

1.3.1 Die Bisulfitkonvertierung als Goldstandard

Die Bisulfitkonvertierung ist die Methode der Wahl für die Analyse von DNA-Methylierungsmarker innerhalb diagnostischer IVD Tests. Hierbei wird die epigenetische Information in eine genetische Sequenzinformation umgewandelt. Es wurde beobachtet, dass bei chemischer Behandlung von denaturierter DNA mit hochmolaren Bisulfitsalzen, unmethyliertes Cytosin viel schneller deaminiert als 5-mC (Abb.5). Es ist entscheidend, die DNA entweder chemisch oder durch Anwendung hoher Temperaturen, angemessen zu denaturieren, da die Reaktion der Bisulfitkonvertierung am Einzelstrang abläuft [146]. Des Weiteren ist es wichtig, die Dauer und die Temperatur der Konvertierungsreaktion genau einzustellen, um eine möglichst vollständige Konvertierung aller Cytosine, ohne eine Umwandlung der methylierten Cytosine, zu erreichen [143, 145, 147–149]. Wie in Abb. 6 aufgeführt ist, führt die Inkubation mit Natrium- oder Ammoniumbisulfit zur Sulfonierung unmethylierter Cytosine. Über eine hydrolytische Desaminierung entsteht im Anschluss Uracilsulfonat. In dieser Arbeit wird die nach Inkubation mit den Bisulfitreagenzien unter Temperatureinfluss (Konvertierungstemperatur) generierte DNA als bisulfitkonvertierte DNA bzw. bisDNA bezeichnet. Durch eine Desulfonierungsreaktion im alkalischen Milieu wird die vollständige Konvertierung zu Uracil erreicht. Dieser Schritt erfolgt in der Regel während des Aufreinigungsprotokolls mit Hilfe von sogenannten Desulfonierungspuffern oder während der verlängerten initialen Denaturierungsphase der qPCR. Die SO_3^- -Gruppe wirkt sich negativ auf PCR-basierte Methoden aus, in welchen das Uracil dann zu Thymin umgewandelt wird [150, 151]. Nach der Bisulfitkonvertierung ist das Probenmaterial durch die Konvertierungsreagenzien kontaminiert und liegt in fragmentierter, überwiegend einzelsträngiger Form vor, weshalb es zu Ausbeuteverlusten kommen kann [149]. Deshalb ist

eine angemessene Aufreinigung der konvertierten DNA vor der eigentlichen Detektion des Methylierungsmarker notwendig. Diese wird im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

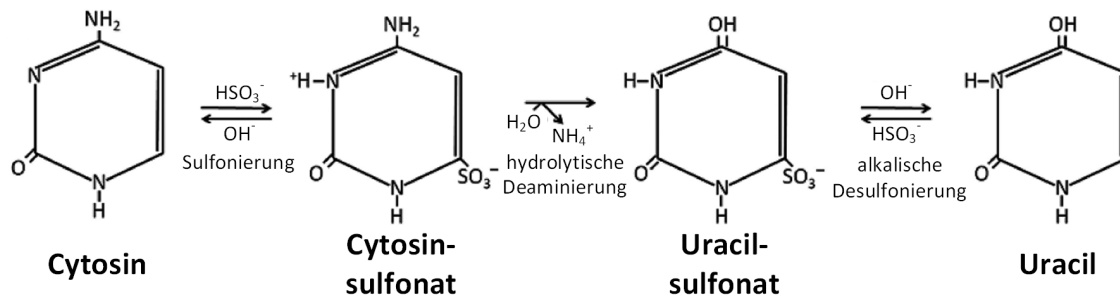


Abbildung 6: Übersicht des Reaktionsmechanismus der Bisulfitkonvertierung. Unmethyliertes Cytosin wird in einer Sulfonierungsreaktion zu Cytosinsulfonat umgewandelt. Im Anschluss entsteht über eine hydrolytische Desaminierung Uracilsulfonat. Die SO₃⁻-Gruppe wird über eine alkalische Desulfonierung, entweder mit Hilfe von Desulfonierungspuffern während der Aufreinigung oder während einer verlängerten initialen Denaturierung der qPCR, durchgeführt. In Anlehnung an [150, 152].

1.3.2 Aufreinigung von bisulfitbehandelter DNA

Die Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA (bisDNA) erfolgt in der Regel mittels magnetischer Partikel oder mittels Zentrifugensäulchen (Abb.5) [130, 145]. Für die magnetischen Partikel wird anstelle einer Zentrifuge ein externer Magnet benötigt, um die Partikel von den verwendeten Puffern abzutrennen. In beiden Fällen macht man sich aber die Eigenschaft der Nukleinsäure, an feste Phasen aus Silikamaterialien (SiO₂) zu binden, zu nutzen. Die magnetischen Partikel aus Magnetit sind dabei silikabeschichtet und in den Zentrifugensäulchen kommen Matrices bzw. Filtermaterialien und Silika bzw. Kieselsäure zum Einsatz [153–159]. Im neutralen Zustand weisen sowohl die Silikaoberfläche als auch die Nukleinsäure negative Ladungen auf. Die Bindung der Nukleinsäure an die Silikaoberfläche über Wasserstoffbrückenbindungen erfolgt unter Anwesenheit chaotroper Salze oder Ethanol sowie verschiedener Kationen, wobei idealerweise ein leicht saurer pH-Wert eingestellt wird, um die negative Ladung der Silikaoberfläche und somit die elektrostatische Abstoßung zwischen dieser und der Nukleinsäure zu reduzieren. Sowohl die chaotropen Salze, als auch Alkohol, haben die Eigenschaft die geordnete Hydrathülle um die Nukleinsäure sowie dem Silikamaterial aufzuheben, um somit eine Interaktion der Bindepartner zu ermöglichen. Nach diesem Bindschritt wird die bisDNA in der Regel mit alkoholhaltigen Waschpuffern gewaschen, um die Verunreinigungen zu entfernen und dabei die Nukleinsäure nicht von der Silikaoberfläche zu lösen. Verunreinigungen, welche eine spätere qPCR negativ beeinflussen können, kommen hierbei vor allem von den Bisulfitreagenzien aus der Bisulfitkonvertierung sowie von den chaotropen Salzen des Bindschritts. Auch polymerhaltige Waschpuffer sind möglich, wobei das Polymer die Nukleinsäure auch ohne Alkohol durch Quervernetzung auf dem Silikamaterial hält. Nach diesem Waschschrift kann die aufgereinigte Nukleinsäure von der Silikaoberfläche eluiert werden. Hierfür reicht in der Regel ddH₂O aus, um die Bindung aufzuheben und die aufgereinigte Nukleinsäure in das gewünschte Volumen ddH₂O aufzunehmen. Durch Temperatureinwirkung sowie höhere

pH-Werte kann der Elutionsvorgang beschleunigt und die Ausbeute verbessert werden [158–165]. Nach der Entfernung potentieller Inhibitoren und Verunreinigungen durch die Aufreinigung kann die Detektion mit Hilfe von PCR-basierten Methoden erfolgen.

1.3.3 Analyse des Methylierungsstatus mittels qPCR

Mittels sogenannter gerichteter Methoden kann der Methylierungsstatus einzelner Methylierungsmarker gezielt analysiert werden [166]. Anders als mit ungerichteten Methoden, zu welchen zum Beispiel die Sequenzierung des gesamten Genoms (*whole genome sequencing*, WGS) zählt und welche bis zu 5 - 10 % ctDNA in der Probe benötigen, werden für den klinischen Einsatz als Routine-Diagnosemethode gerichtete Ansätze bevorzugt [79, 108, 167]. Um klinisch relevante DNA-Methylierungsmarker schnell und effektiv zu untersuchen, bietet sich vor allem die Detektion mit Hilfe von quantitativen PCR Reaktionen (qPCR) an [79, 108]. Durch die Fluoreszenzsonde ist eine Echtzeitmessung des Fluoreszenzsignals, sowohl qualitativ als auch quantitativ, in jedem Zyklus möglich [163, 168, 169]. Hierbei kommen in der Regel zwei Arten von Sonden zum Einsatz. Bei FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer) Sonden, kommt es nur bei ausreichender Nähe des Donor- und Akzeptorfluorophor zum Energietransfer und somit zur Generierung eines Fluoreszenzsignals [163, 169]. Bei Hydrolysesonden hingegen befindet sich an einem Ende der Sonde das Fluorophor und am anderen Ende ein Quencher, welcher das Fluoreszenzsignal unterdrückt. Während der Synthese des neuen Strangs wird der Quencher durch die DNA-Polymerase abgespalten, wodurch das Fluorophor sein Fluoreszenzsignal abgibt [146, 163, 170]. Durch die Reduzierung der Komplexität der DNA Sequenz durch die Bisulfitbehandlung auf drei statt vier Basen (A,T,G) in unmethylierten DNA Abschnitten, wird die Anwendung von hybridisierungsbasierten Methoden erschwert [142]. Außerdem erschwert der hohe Hintergrund an unmethylierten Sequenzen die Detektion der methylierten Sequenzen. Für die Analyse des Methylierungsstatus bestimmter Loci wurden verschiedene Techniken entwickelt. Eads et al. (2000) entwickelten die *MethyLight* Methode [171], welche sowohl methylierungsspezifische Primer wie auch eine methylierungsspezifische Sonde verwendet. Mit dieser sensitiven und spezifischen Methode, konnte ein relatives Detektionslimit von 1:10000 erreicht werden [171]. Eine weitere Methode namens *HeavyMethyl* (HM-qPCR) wurde 2004 von Cottrell et al. entwickelt [152, 172]. Hierbei werden im Gegensatz zur *MethyLight* Methode, methylierungsunspezifische Primer verwendet. Durch den Einsatz eines methylierungsspezifischen Blockers sowie einer methylierungsspezifischen Sonde, wird eine spezifische und sensitive Detektion von Methylierungsmarkern erreicht (Abb.5). Hierbei werden unmethylierte Primerbindestellen, durch den Blocker besetzt und somit eine Amplifikation unmethylierter Sequenzen, mit erhöhter analytischer Sensitivität, erreicht (Abb. 7), [152, 172]. Bei der Bestimmung des relativen Detektionslimits konnten mit dieser Methode noch 30 pg methylierte DNA, was einem relativen LOD von 1:8000 entspricht, detektiert werden [172]. Durch den Blocker wird eine Spezifität für methylierte Sequenzen erreicht, welche in jedem Zyklus der qPCR gleich bleibt. Arbeitet man lediglich mit methylierungsspezifischen Primern, können diese durchaus an unmethylierte Sequenzen binden, welche dann in jedem qPCR Zyklus weiter vermehrt werden [172]. Um die Amplifikation unvollständig konvertierter oder gar un behandelter DNA zu vermeiden, ist es von Vorteil, wenn die Primer Cytosine abdecken, welche nicht im CpG Kontext stehen (Abb. 7). Durch den Einsatz eines methylierungsspezifischen Blockers werden aber generell weniger methylierte CpGs in den Bereichen,

welche die Primer und die Sonde abdecken, benötigt [25]. Durch den Einsatz von Sonden mit unterschiedlichen Fluorophoren, können mit unterschiedlichen Fluoreszenzkanälen, verschiedene Zielgene (Multiplex) detektiert werden [173]. Die in dieser Arbeit eingesetzte qPCR basiert auf dem Prinzip der *HeavyMethyl* Technologie. Das hier generierte Amplikon der v2 Region des *SEPT9* Promotors ist mit 65 bp recht kurz. Dies wurde durch den Einsatz von sich überlappenden Oligonukleotiden erreicht (Abb. 7). Von der Detektion eines kurzen Amplikons erhofft man sich eine Steigerung der Sensitivität, da ctDNA, welche durch die Bisulfitkonvertierung weiter fragmentiert wurde, als Templat verwendet wird [130]. Im epi proColon[®] Test wird darüber hinaus noch das Referenzgen *ACTB* mit amplifiziert. In dieser Duplexreaktion konnte für das *SEPT9* Amplikon ein relatives Detektionslimit von 1:5000 erreicht werden, wobei noch 9,4 pg methylierte DNA in 50 ng Hintergrund DNA detektiert werden konnten [130, 140]. Dies veranschaulicht die hohe Sensitivität der Detektionsmethode, welche allerdings auch sehr empfindlich gegenüber Inhibitoren ist. Chaotrope Salze, welche z. B. in Bindepuffern verwendet werden oder Ethanol aus Waschpuffern, können die verwendeten DNA-Polymerasen inhibieren und beeinträchtigen. Auch EDTA, welches zum Teil in Puffern vorhanden ist, wirkt sich nachteilig auf die qPCR aus [162, 168, 174]. Des Weiteren kann sich eine Kontamination mit DNase oder anderen Nukleinsäuren negativ auf die qPCR auswirken [168]. Auch die in der qPCR eingesetzten Oligonukleotide können miteinander interagieren und durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen und Primerdimeren eine Amplifikation der eigentlichen Zielgene verhindern [163, 168, 175]. Eine häufige Ursache hierfür ist eine falsche Annealingtemperatur, welche maßgeblich die Hybridisierungskinetik beeinflusst. Eine zu niedrige Annealingtemperatur führt in der Regel zu unspezifischen Amplifikaten, wobei eine zu hohe Annealingtemperatur hingegen die Hybridisierung der Oligonukleotide mit dem Templat verhindert und somit zu einer geringeren Amplifikationseffizienz führt. Ein weiterer Grund für Oligonukleotidinteraktionen sind zu starke Komplementaritäten der verwendeten Oligonukleotide [163, 174, 176]. Außerdem gibt es Substanzen, welche die Hybridisierung der Fluoreszenzsonde verhindern oder das Fluoreszenzsignal durch einen *Quenching*-Effekt reduzieren [174, 176]. Neben diesen, sich negativ auf die qPCR auswirkenden Substanzen und Effekten, kann die qPCR allerdings auch optimiert werden. Mg²⁺ Kationen werden von Polymerasen als Cofaktoren benötigt. Durch eine Optimierung der Mg²⁺ Konzentration, lässt sich die Aktivität der Polymerase durch deren Stabilisierung erhöhen [163, 168, 174]. Außerdem sollte der qPCR Ansatz idealerweise einen pH Wert zwischen 8,0 und 8,5 aufweisen [163]. Aus der Literatur bekannte Stabilisatoren sind unter anderem Polyethylenglykol (PEG), Dimethylsulfoxid (DMSO), Polysorbat 80 und Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumine*, BSA). Diesen Substanzen wird ein positiver, stabilisierender Effekt für die Amplifikation GC-reicher Sequenzen zugeschrieben, sowie ein positiver Effekt auf die Sensitivität und die Spezifität der qPCR Reaktion [173, 176]. Das Design der Oligonukleotide sowie deren eingesetzte Konzentrationen sind ebenfalls äußerst wichtig für eine zuverlässige Amplifikationsreaktion. Eine zu hohe Konzentration der Oligonukleotide kann allerdings auch zu vermehrten Oligonukleotidinteraktionen führen [163, 168]. Die Hybridisierung der Primer an das Templat wird maßgeblich von der Annealingtemperatur beeinflusst. In der Regel sollte die Annealingtemperatur 5 °C bis 10 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen, welche wiederum von der Sequenz der Primer abhängt. Bei der Verwendung von zusätzlichen Sonden und Blockern sollten deren Schmelztemperaturen idealerweise 7 °C bis 10 °C über denen der Primer liegen, um eine Bindung der Sonde vor den Primern zu gewährleisten [163, 168]. Bei dieser Vielzahl

an optimierbaren Parametern für eine sensitive und robuste qPCR liegt es nahe, dass die Etablierung einer qPCR mit steigendem Multiplexgrad an Komplexität zunimmt.

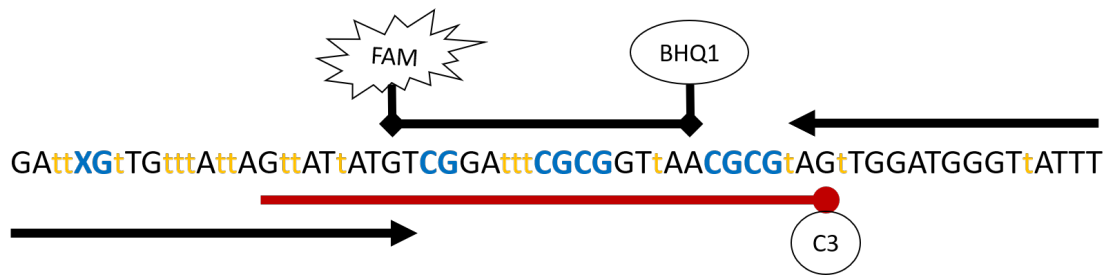


Abbildung 7: Überblick der *SEPT9* Sequenz und HeavyMethyl (HM) qPCR Komponenten. CpG Dinukleotide sind in blau dargestellt. Ein kleines t (gelb) stellt ein durch die Bisulfitkonvertierung konvertiertes Cytosin dar. Die schwarzen Pfeile stellen sowohl den *reverse* als auch den *forward* Primer dar, welche in Regionen ohne CG Dinukleotide binden und somit methylierungsunabhängig sind. Der *reverse* Primer fügt eine abasische Stelle ein, welche als X dargestellt ist. In rot ist der Blocker mit seinem C3 *Spacer* am 3' Ende dargestellt, welcher eine Elongation des Blockers verhindert. Die Bindestellen der Primer sowie des Blockers überlappen sich. Die *SEPT9* Hydrolysesonde mit FAM als Fluorophor und BHQ1 als Quencher ist in schwarz dargestellt. In Anlehnung an [130, 177].

1.4 Lab-on-Chip (LoC) Systeme

Wie bereits unter 1.1.2 aufgeführt, gibt es ein immenses Anwendungsgebiet für diagnostische Testverfahren zur Bestimmung veränderter DNA-Methylierungsmuster. Diese erfordern auf der einen Seite ökonomische und auf der anderen Seite robuste und zuverlässige Nachweismethoden mit hoher Sensitivität und Spezifität. Ein Ansatz diesen Anforderungen gerecht zu werden bieten miniaturisierte, mikrofluidische *Lab-on-Chip* (LoC) Systeme mit welchen komplexe Laborvorgänge kompakt in einem einzigen Gerät realisiert werden können [178, 179]. Dadurch könnte die Analyse der DNA-Methylierung schon bald in der *point-of-care* (PoC) Diagnostik, also direkt am Patienten und ohne lange Wege zu entfernten spezialisierten Laboren, ermöglicht werden. Zusätzlich ist durch den hohen Automatisierungsgrad dieser Systeme eine Entlastung der Testkapazität durch Wegfallen arbeits- und zeitintensiver Abläufe, für welche bisher gut geschultes Personal benötigt wurde, möglich. Besonders die Analyse der DNA-Methylierung ist sehr zeitintensiv und setzt sich aus einer Vielzahl komplexer Schritte zusammen. In der Literatur werden bereits erste Ansätze zu deren Analyse mit Hilfe von mikrofluidischen LoC-Systemen aufgeführt.

1.4.1 Lab-on-Chip basierte Ansätze zur Analyse der DNA-Methylierung

Im folgenden werden die vielversprechendsten Ansätze der Bisulfit-basierten Analyse der DNA-Methylierung mit Hilfe von LoC-Systemen aufgeführt. Die Arbeiten von Zhang et

al. (2009) beschreiben ein System, in welchem PCR Ansätze von einer Ölphase kompartimentiert werden, um darin methylierungsspezifische PCRs durchzuführen [180]. Die DNA Extraktion sowie die Behandlung mit Bisulfitreagenzien und die anschließende Desulfonierung und Aufreinigung finden nicht im System statt. Durch die Vorlagerung verschiedener Primerpaare im System, kann ein hoher Multiplexgrad in den neun schneeflockenförmigen Funktionseinheiten aus jeweils zwölf Reaktionskammern erreicht werden. Es können bis zu neun verschiedene Proben in 108 verschiedenen PCR Reaktionen untersucht werden. Allerdings stehen die offenen Reaktionskammern im Kontakt zur Umgebung, weshalb äußerst vorsichtig gearbeitet werden muss, um die PCR Reaktionen nicht zu kontaminieren. Außerdem werden hier Ansätze für die Vorlagerung von Primern untersucht, um eine spätere Lagerung zu ermöglichen. Der Boden der Reaktionskammer wurde dafür mit 0,1 % BSA beschichtet, um eine Adsorption der Polymerasen zu verhindern und um die Effizienz der PCR zu verbessern. Die Primer wurden vordosiert und die Flüssigkeit der Primerlösung verdunstet. Die mikrofluidischen Systeme werden bei 4 °C gelagert [180]. Da hier lediglich die PCR im LoC-System durchgeführt wird, ist man noch weit von einer vollautomatisierten Lösung entfernt. Darüber hinaus ist die Durchführung mit einem erheblichen Vorbereitungsaufwand verbunden und es wird keine qPCR und auch keine *HeavyMethyl* qPCR mit Blockern durchgeführt, welche für eine spätere diagnostische Anwendung entscheidend wären.

Mae et al. (2018) beschreiben ein mikrofluidisches System, welches auf einem diffusionsgetriebenem Reagenzienaustausch basiert [181]. Mittels pneumatisch gesteuerter Ventile kann die Verbindung zwischen einer zentralen Reaktionskammer und zwei Beladungskammern hergestellt und unterbrochen werden. Mit diesem System ist es möglich eine Bisulfitkonvertierung durchzuführen, sowie Teile der anschließenden Desulfonierung und Aufreinigung der konvertierten DNA automatisiert durchzuführen. Hierbei wird das unterschiedliche Diffusionsverhalten von DNA und den Salzen aus den Reagenzien der Bisulfitkonvertierung ausgenutzt. Allerdings wird angemerkt, dass es bei kleinen DNA Fragmenten wie cfNDA, welche gerade für die blutbasierte Diagnostik interessant sind, zu Problemen kommen kann. Auch die mit TRIS-EDTA Puffer aus dem System eluierte DNA muss anschließend noch einer weiteren Ethanolpräzipitation unterzogen werden [181]. Da dieses Verfahren eigentlich zur Vorbereitung für die Sequenzierung von bisDNA etabliert wurde, ist anzunehmen, dass auch für eine anschließende Methylierungsanalyse mittels qPCR, eine weitere Aufreinigung benötigt wird. Auch dieses System eignet sich nicht für den breiten Einsatz in der Routinediagnostik, da man in der Etablierung eines Gesamtablaufs durch die mangelnde Aufreinigungseffizienz, sowie das Fehlen einer Optik zur Durchführung einer qPCR, stark eingeschränkt ist.

Bereits Jahre zuvor haben Shin et al. (2013) eine in sich geschlossene, magnetisch betriebene Tröpfchenkartusche für die Bisulfitbehandlung von genomischer DNA entwickelt [182]. Hierbei kommt auch die von Bailey et al. (2010) entwickelte „*methylation on beads*“ (MOB) Methode zum Einsatz [183]. Mit dieser Methode kann DNA aus Zelllysaten oder Patientenproben in chaotroper Lösung (Guanidiniumhydrochlorid in Zitronensäurepuffer) an silikabeschichtete, paramagnetische sphärische Partikel gebunden werden. An diese Partikel gebunden, durchläuft die DNA die Bisulfitkonvertierung und Aufreinigung. Mittels eines PCR-Puffers, wird die DNA anschließend von den magnetischen Partikeln eluiert, wodurch eine Amplifikation des Zielgens in einer anschließenden spezifischen qPCR direkt durchgeführt werden kann. Somit sind alle Schritte in einem einzelnen Gefäß möglich. Es wird eine Durchführungsdauer von 9 h sowie eine DNA Ausbeute, die das

6,61-fache über den Ausbeuten des Standardprotokolls liegt, beschrieben. Der Methylierungsmarker des CDKN2A Promotors konnte mit dieser Methode laut Bailey et al. (2010) [183] bei 74 % der Lungenkrebspatienten detektiert werden und zuvor, mit den herkömmlichen Methoden ohne LoC-System, nur bei 45 % der Patienten [183]. Shin et al. (2013) verwenden diese Methode in ihrer Tröpfchenkartusche um die Partikel mit der daran gebundenen DNA von Kammer zu Kammer zu bewegen [182]. In diesen zylindrischen Kammern, die über 1 mm breite Kanäle miteinander verbunden sind, müssen die benötigten Reagenzien aufwendig vorgelagert werden. Die Bewegung der magnetischen Partikel erfolgt über einen von außen händisch bewegten Magneten. Durch die verengten Auslässe der Kammern soll eine minimale Verschleppung der Reagenzien gewährleistet werden. Bei der Wahl der Bisulfitreagenzien, ist man mit diesem System allerdings stark eingeschränkt. Da eine Mischung von Reagenzien bzw. deren definierte Beförderung mittels pneumatisch ansteuerbarer Ventile und Pumpkammern nicht möglich ist, ist man auf Bisulfitreagenzien beschränkt, welche lediglich aus einer Komponente bestehen. Zudem kann noch kein PCR-basiertes Nachweisverfahren integriert werden. Es wurde ein Temperaturgradient für die Bisulfitkonvertierung gefahren und im Anschluss die Durchführbarkeit der qPCR getestet um die Temperatur der Konvertierung auf ein akzeptierbares Minimum von 83 °C herunter zu setzen. Die qPCR scheint hier auf bisulfitbehandelter DNA, die im mikrofluidischen System behandelt wurde, zwei Zyklen früher als auf herkömmlich behandelter DNA detektierbar zu sein. Stark et al. (2018) haben dieses System weiterentwickelt, um von der Probeneingabe bis zum Ergebnis nach der Analyse mittels qPCR Detektion, alle Schritte innerhalb von 4,5 h durchführen zu können [184]. Allerdings ist weiterhin kein Mischen von Reagenzien möglich, weshalb die qPCR Reagenzien außerhalb des Systems gemischt werden müssen. Die benötigten Reagenzien müssen aufwendig vorgelagert werden und auch mit diesem System ist eine definierte Bewegung der Reagenzien nicht möglich. Anstelle dessen werden erneut silikabeschichtete magnetische Partikel eingesetzt. Als Probe werden Zellen aufgetragen, aus welchen mittels eines Bisulfit-Lyse Reagenz DNA isoliert und zudem bisulfitkonvertiert wird. Weitere LoC-Ansätze zur Analyse von DNA-Methylierungen wurden bereits in Review Artikeln publiziert [178, 179, 185–187]. Bisher beschriebene LoC-basierte Ansätze für die Analyse einer veränderten DNA-Methylierung, erfordern zum Teil noch händisch durchgeführte Schritte, lange Vorbereitungszeiten und sind somit nur beschränkt automatisiert durchführbar. Eine definierte Bewegung kleinster Volumina ist aufgrund fehlender, pneumatisch gesteuerter Ventile nicht möglich. Ein Transfer von Gesamtabläufen aus Bisulfitkonvertierung, Aufreinigung der bisulfitbehandelten DNA sowie anschließender qPCR-basierter Detektion von Methylierungsmarkern ist nur selten möglich. Eine sichere und kontaminationsfreie Prozessierung von Proben ist darüber hinaus in vielen Systemen nicht gewährleistet, da es sich nicht um geschlossene mikrofluidische Systeme handelt. Ein weiterer Punkt ist, dass viele dieser Systeme nicht für den breiten Einsatz in der PoC-Diagnostik geeignet sind, da eine serienmäßige Massenfertigung über gängige Verfahren, wie dem Spritzguss, nicht möglich sind. Darüber hinaus sind für die in der Literatur beschriebenen Systeme keine universellen Analysegeräte vorhanden (siehe unter 1.4.2). In den gefundenen Veröffentlichungen werden außerdem Aspekte zur Langzeitlagerung sowie zu den Lagerbedingungen häufig außer Acht gelassen, welche für einen späteren Einsatz in der klinischen Diagnostik unabdingbar sind.

1.4.2 Das mikrofluidische *Lab-on-Chip*-System *Vivalytic* der Robert Bosch GmbH

Mit der Entwicklung der *Vivalytic* Plattform hat die Firma Bosch einen großen Schritt in Richtung PoC-Diagnostik mittels LoC-Systemen geleistet. Hierbei handelt es sich um eine universelle Plattform für die molekulare Diagnostik. Das System besteht aus einer Prozessiereinheit (Analyzer), welche alle mechanischen Bauteile wie Heizer, Druckluft- und Vakuuman Anschlüsse, die Optikeinheit zur Analyse von Fluoreszenzintensitäten und Aufnahme von Bildern, Ultraschall usw. enthält (Abb. 8), sowie einer mikrofluidischen *Vivalytic* Kartusche (Abb. 9).

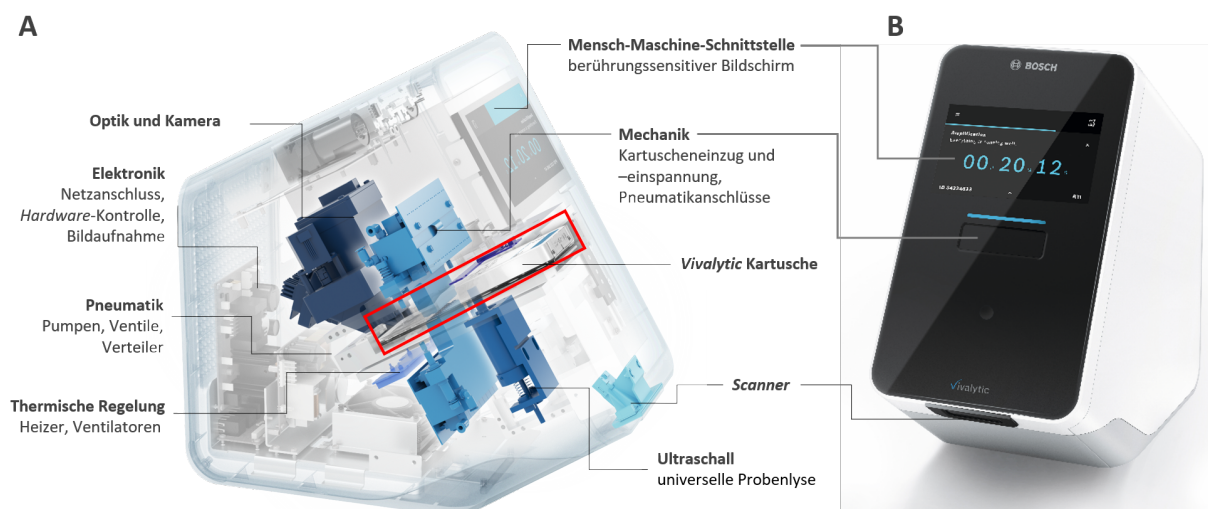


Abbildung 8: Der *Vivalytic* Analyzer als Prozessiereinheit für die mikrofluidischen *Vivalytic* Kartuschen. (A) Innenansicht der wichtigsten Komponenten des *Vivalytic* Analyzers. (B) Außenansicht des *Vivalytic* Analyzers. In Anlehnung an [170].

Bei der *Vivalytic* Kartusche handelt es sich um eine Einwegkartusche auf welcher alle, für den molekularbiologischen Test benötigten Reagenzien, vorgelagert sind. Somit muss lediglich der für die diagnostische Fragestellung geeignete Test ausgewählt werden und der auf der Kartusche vorhandene QR-Code am Analyzer gescannt werden, um den geeigneten Ablauf für den jeweiligen Test zu starten. Nach dem Eingeben der Probe in die Probenkammer, kann die Kartusche in den Analyzer gegeben werden, wo diese vollautomatisiert prozessiert wird. Die Kartusche besteht aus zwei spritzgussgefertigten Polycarbonatteilen, welche über einen Laserschweißprozess mit einer thermoplastischen Polyurethanmembran (TPU) miteinander verbunden sind (Abb. 9 (links)). Eine Übersicht beider im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kartuschartypen ist in Abb. 9 (rechts) dargestellt. Für die Reagenzienvorlagerung stehen in beiden Kartuschartypen neun Kammern zur Verfügung. Darüber hinaus gibt es jeweils eine Probenkammer für die Eingabe der Probe sowie 32 pneumatikgesteuerte Ventile und zwei Pumpkammer, welche für das Öffnen und Verschließen definierter mikrofluidischer Wege benötigt werden. Des Weiteren gibt es eine

Reaktions- und Mischkammer. Im Kartuscentyp 1 gibt es zwei Kammern für die Vorlagerung lyophilisierter qPCR Mastermixe und im Kartuscentyp 2 drei Kammern. Aus Platzgründen ist im Kartuscentyp 2 deshalb nur ein PCR Strang, bestehend aus drei mikrofluidischen Kammern, anstelle von zwei PCR Strängen vorhanden. Anders als in PCR Thermocyclern wird die Temperatur nicht wie in statischen Reaktionsgefäßen geheizt und gekühlt, sondern ein Flüssigkeitsplug wird zwischen den drei PCR-Kammern, in welchen die jeweils benötigte Temperatur eingestellt wird, hin und her bewegt. Somit können die für die PCR benötigten Schritte, bestehend aus Denaturierung, Annealing und Elongation realisiert werden und im Falle einer qPCR der Anstieg der Fluoreszenzintensität mittels Optikeinheit detektiert werden. Silikabasierte Matrices können flexibel in die Filterkammer integriert werden, um Nukleinsäuren aufzureinigen. Die vom Filter eluierte Probe kann im Anschluss direkt zum Lösen des lyophilisierten Mastermixes verwendet werden und in den gewünschten PCR-Strang überführt werden. Alle Schritte sind automatisiert über ein zuvor generiertes und optimiertes fluidisches Ablaufprotokoll durchführbar.

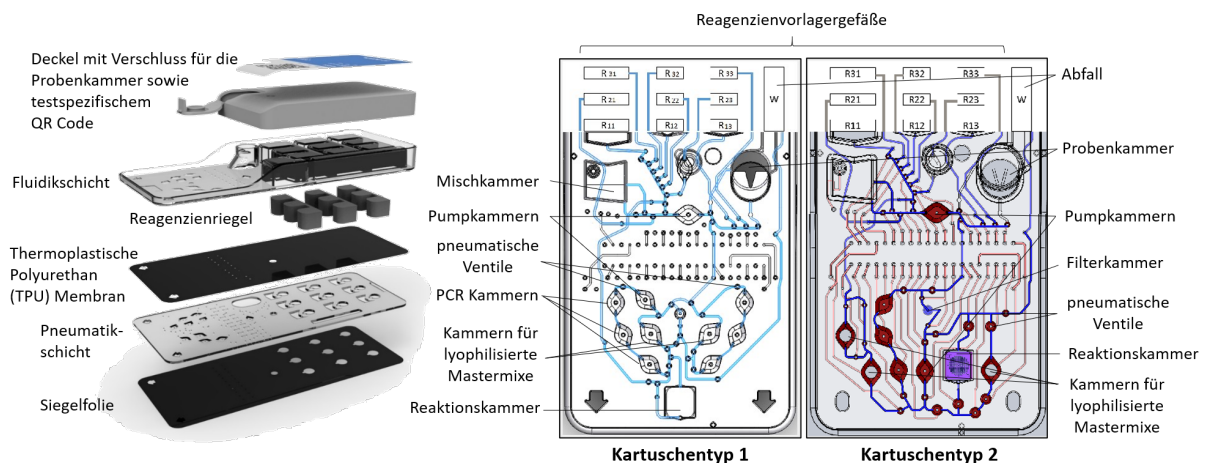


Abbildung 9: Darstellung des Aufbaus der *Vivalytic* Kartusche (links) und Vergleich des Kartuscentyp 1 und 2 (rechts). Kompartimente mit der selben Bezeichnung, übernehmen in beiden Kartuscentypen die selben Aufgaben. In Anlehnung an [170].

In Abb. 10 ist ein Querschnitt eines Ventils der *Vivalytic* Kartusche dargestellt, um das Prinzip der definierten Flüssigkeitsbewegung durch das mikrofluidische System zu veranschaulichen. In der Mitte befindet sich die auslenkbare TPU Membran. Die Membran wird von zwei Polycarbonatschichten umgeben, wodurch sich eine Fluidikschicht (oben) sowie eine Pneumatikschicht (unten) ergibt. An der Pneumatikschicht wird über die Steuereinheit des Analyzers ein Kontrolldruck P_c angelegt. In der Fluidikschicht liegt ein hydraulischer Druck P_h vor. Durch eine Druckdifferenz zwischen P_h und P_c wird ein Öffnen und Verschließen der Ventile erreicht. Mit Hilfe dieses pneumatikgesteuerten mikrofluidischen Systems, ist es möglich, verschiedenste molekulardiagnostische Abläufe und Tests auf die *Vivalytic* Plattform zu transferieren. Die Zielsetzung der hier durchgeführten Arbeit wird im folgenden Abschnitt erläutert.

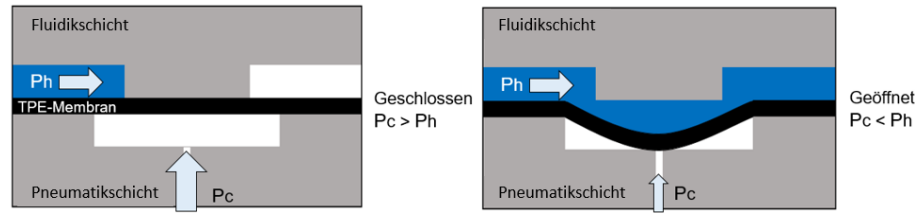


Abbildung 10: Darstellung des Prinzips der definierten Beförderung von Flüssigkeiten in der *Vivalytic* Kartusche mittels pneumatikgesteuerter Ventile. In Anlehnung an [188, 189].

2 Zielsetzung

Auch wenn inzwischen DNA-Methylierungsmarker für eine Vielzahl von Erkrankungen bekannt sind, findet deren Analyse bisher kaum Einsatz in der Routinediagnostik. Ein Grund hierfür sind die zeit- und arbeitsintensiven Protokolle für die Analyse solcher Marker. Im Rahmen dieser Arbeit sollen deshalb die für die Analyse notwendigen Schritte auf eine mikrofluidische LoC-Kartusche transferiert werden. Damit wären erste Schritte in Richtung eines automatisierten Nachweises von DNA-Methylierungsmarkern ohne geschultes Personal sowie komplexe Laborinfrastruktur, direkt an Ort und Stelle, getan. Beginnend mit der Bislufitkonvertierung, gefolgt von der Aufreinigung und Desulfonierung sowie einer blockerbasierten qPCR, sollen alle Schritte in die *Vivalytic* Kartusche integriert und optimiert werden. Es soll anhand eines *proof-of-principle* mit dem *SEPT9* Methylierungsmarker gezeigt werden, dass die *Vivalytic* Plattform, auch für den Nachweis epigenetischer Marker geeignet und mit den dafür benötigten Methoden und Reagenzien kompatibel ist. Mit der erfolgreichen Durchführung des *proof-of-principle*, könnte gezeigt werden, dass die universelle Analyse jedes beliebigen Methylierungsmarkers möglich ist, was ein immenses Anwendungsgebiet für diagnostische Nachweisverfahren mit sich bringt. In Anbetracht eines erwarteten Wachstums des globalen Epigenetikmarktes, mit einem CAGR von 15,2 %, und 4,17 Mrd. US \$ (2021) auf 12,51 Mrd. US \$ (2028), weißt diese Gebiet ein enormes Potential für die LoC-basierte PoC Diagnostik auf [49].

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 1: Verwendete Kits mit Herstellerangabe sowie REF- oder LOT-Nummer

Bezeichnung	Hersteller	REF/LOT
Blood & Cell Culture DNA Midi Kit	QIAGEN GmbH	13343
EpiBiS Kit	Epigenomics AG	M7-01-001
EZ DNA Methylation Lightning®	Zymo Research Corp.	D5030
Genomic DNA 50 kb Kit	Agilent Technologies,	DNF-467-0500
HS NGS Fragment Analysis Kit (1-6000 bp)	Agilent Technologies, Inc.	DNF-474-0500
Premium Bisulfite Kit	Diagenode SA	C02030030
QIAamp® DNA Mini Kit	QIAGEN GmbH	51304
Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Q33231
Qubit™ ssDNA Assay Kit	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	Q10212

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien mit Herstellerangabe sowie REF- oder LOT-Nummer

Bezeichnung	Hersteller	REF/LOT
D-(+)-Trehalosedihydrat > 99 %	Sigma Aldrich	T0167-1004 / #SLDH0477V
Tween80	Carl Roth GmbH und Co.KG	/
PEG 6000	Sigma-Aldrich, Inc.	/
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	/
Fluoresceindiacetat	Acros Organics B.V.B.A.	A0404012
Guanidinium Hydrochlorid	Sigma Aldrich, Inc.	G3272-500G
Lebensmittelfarbe	Brauns Heitmann GmbH & Co. KG	/
ddH ₂ O	G-Biosciences	786-292C
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Inc.	S2889-250G
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Inc.	0001443365
PBS 1X pH 7.0	Gibco	12549079
Oligonukleotide	biomers.net GmbH	/
qPCR ProbesMaster Lyophilisate	Jena Bioscience GmbH	PCR-156S / 117.254
MM <i>Beads</i>	Evik Diagnostics	/
20 x TE Puffer	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)	P11496
5 x Hot FIRE POL [®] Multiplex qPCR Mix	Solis BioDyne	08-01-0000S
5 x Hot FIRE POL [®] Probe Universal qPCR Mix	Solis BioDyne	08-17-0000S
CIRRUS [™] Strips DNA PCR Master Mix	Fluorogenics LTD	CIR-DNA-S-1000-01 20181015A
illustra [™] Hot Start Mix RTG [™] 0.2 mL, 96 RXN	GE Healthcare	28900653 1708562
SolisFAST [™] SolisGreen [®] qPCR Mix (no ROX), 5x	Solis BioDyne	28-41-0000S
STAT-NAT [®] DNA-Mix	SENTINEL CH. SpA	1N001 / 00698
Trypan Blue Solution 0,4% Gibco [™]	Gibco (Thermo Fisher Scientific)	11538886
1X Trypsin - EDTA Solution (0.25% Trypsin and 0.02% EDTA)	Biochrom GmbH	L 2163
DMEM (1X)	Gibco	42430025

Tabelle 3: Verwendete Geräte mit Modell- und Herstellerangabe sowie REF- oder LOT-Nummer

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Automatischer Zelläher	Cell Counter model R1	Olympus
Bioruptor®	Pico	Diagenode SA
Bohrer	Dremel 4200	Dremel
3D-Drucker	Fortus 450mc	Stratasys Ltd.
Fluorometer	Qubit 4® Fluorometer	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
CNC-Fräsmaschine	EVO	KERN Microtechnik GmbH
Kapillarelektrophorese	Fragment Analyzer 5200®	Agilent Technologies Inc.
Kühlrack 1,5 und 2 mL Tubes	CoolRack® M15	CORNING, Inc.
Kühlrack 96-Well-Platte	Isofreeze Rack	Deltalab
Kühlzentrifuge	Zentrifuge 5425 R	Eppendorf AG
Lab-on-Chip Prozessiereinheit	Processing Station 1/2/3	Robert Bosch GmbH
Lötkolben	/	Weller
Mehrfachdispenser	HandyStep® touch	BRAND GmbH & Co.KG
Magnete	Neodym 2 x 10 mm 2 x 10 mm	Magnetversand
Temperaturmessmodul	NI-Karte	National Instruments
pH Meter	FiveEasy™	Mettler Toledo
Pipettensatz	Eppendorf Reference® 2	Eppendorf AG
Pipettensatz	PIPETMAN, P2L, P10L, P20L, P200L, P1000L	Gilson AG
Plattenzentrifuge	PlateFuge Microplate Micro Centrifuge	Benchmark Scientific
qPCR-Cycler	7500 Fast Real-Time PCR Instrument	Applied Biosystems
Stanze	3.2 mm und 3.4 mm Stanze	Gedore Werkzeugfabrik
Sterile Werkbank	Sicherheitswerkbank	Berner

	Claire® XL	International GmbH
Thermocycler	Thermo Mixer C	Eppendorf AG
Thermocycler	Veriti 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems
Widerstands- temperaturfühler	/	Labfacility Limited
Tischzentrifuge	MYSPIN 6	Thermo Fisher Scientific
Tischzentrifuge	Mini Star	VWR
Tischzentrifuge	CD1008 CD1008	Phoenix Instrument
Ultraschallgerät	Bioruptor® Pico	Diagenode SA
UV-Bench	DNA/RNA UV-Cleaner UVT-S-AR	Kisker Biotech GmbH & Co. KG
<i>Vivalytic</i> Analyzer	<i>Vivalytic</i> <i>One</i>	Robert Bosch GmbH
Vortexer	Analog Vortex Mixer	VWR
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Waage	Excellence	Mettler Toledo
Zentrifuge	MiniSpin® plus	Eppendorf AG
Zentrifuge (15 ml und 50 ml Tubes)	Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG

Tabelle 4: Verwendete Software- und Computerprogramme mit Hersteller- und Verwendungsangabe.

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
BiQ Analyzer HT	https://biq.mpi-inf.mpg.de/ Max Planck Institute for Informatics	Auswertung der Bisulfitsequenzierdaten
BiSearch Web Server	bisearch.enzim.hu Institute of Enzymology	Bisulfite Primer Design
Dfam Database	https://www.dfam.org/home NHGRI ISB	Identifizierung bisulfitunabhängiger repetitiver Primerbindestellen
Cell counter model R1	Olympus	Automatische Zellzählung
LabVIEW	National Instruments	Durchführung fluidischer Abläufe (<i>Processing Station</i>)
Fluculator	Robert Bosch GmbH	Erstellen fluidischer Abläufe
Fragment Analyzer Version 1.2.0.11	Advanced Analytical Technologies, Inc.	Durchführung Fragment Analyse
MatLab	MatLab v80, v91, v93	MathWorks
PROSize 3.0 Version 3.0.1.6	Advanced Analytical Technologies, Inc.	Auswertung Fragment Analyzer
VPhotoStar	Robert Bosch GmbH	Durchführung fluidischer Abläufe (<i>Vivalytic Analyzer</i>)
7500 Software v2.0.5	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)	Durchführung und Auswertung von qPCR Experimenten
Wärmeleitmodell	Robert Bosch GmbH	Durchführung von Temperatursimulationen

Tabelle 5: Verwendete Einwegmaterialien mit Herstellerangabe.

Bezeichnung	Hersteller
Adhesive PCR Sealing Foil Sheets	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)
Bioruptor [®] Mikrogefäße	Diagenode SA
Cell culture flask, red filter screw cap Falcons (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH VWR
Filtermembran (Filter F)	Kooperationspartner
Filtermembran (Filter B)	Kooperationspartner
Filtermembran aus BiS Kit nicht mehr vertrieben	rBiopharm
Filtermembran aus BiS Kit nicht mehr vertrieben	Analytik Jena
Fisherbrand [™] DeepWell [™] Polypropylen-Mikrotiterplatten, 96-Well	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)
Frittenmaterial	Kooperationspartner
MicroAmp [™] Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)
MicroAmp [™] Optical Adhesive Film	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific)
Mikrogefäß LoBind (1.5 mL; 2 mL)	Eppendorf AG
Multiply [®] -µStrip Pro 8er-Kette	Sarstedt AG & Co.KG
Peelable adhesive PCR film	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)
pH-Indikatorstäbchen, pH 7.5 – 14, Alkalit [®]	Merck KGaA
Precision Dispenser Tip (500 µL; 1.25 ml)	BRAND GmbH & Co.KG
Qubit [™] assay tubes Qubit [™] assay tubes	Thermo Scientific (Thermo Fisher Scientific)
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Twin.tec PCR Plate 96 LoBind, semi-skirted	Eppendorf AG
Vivalytic Kartuschen	Robert Bosch GmbH
Zellkulturflaschen (25 cm ³)	Carl Roth GmbH & Co. KG

Tabelle 6: Verwendetes Probenmaterial mit Bezeichnung und Herstellerangabe.

Bezeichnung	Hersteller
HCT116	DSMZ (ACC 581)
PBL Human Genomics DNA	Roche Diagnostics GmbH
methylierte DNA (MDNA)	Zymo Research
unemthylierte DNA (UMDNA)	Zymo Research
UMDNA WGA	Zymo Research
Bisulfite Converted Universal Methylated Human DNA Standard	Zymo Research

Tabelle 7: Verwendete selbstangesezte Puffer für die Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA

Bezeichnung	Zusammensetzung
Waschpuffer (WP)	30% Polymere Zusätzliche Komponenten pH 5,6-8
Elutionspuffer (EP)	Detergenz pH 7

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung und Generierung von Probenmaterial

Als Probenmaterial diente die humane Darmkrebszelllinie HCT116. Diese wurde mit DMEM Medium (15 ml) in T25 Zellkulturflaschen kultiviert. Für die Zellernte wurden die adhärennten Zellen mit 3 ml PBS gewaschen und mit 2,5 ml Trypsin EDTA von Zellkulturflasche gelöst und mit 5 ml DMEM Medium abgestoppt. Das Waschen in PBS erfolgte in 15 ml Falcons bei 150 x g für 3 min bei 4 °C. Zellen in PBS wurden mit dem *Cell Counter* gezählt, je $5 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und erneut in PBS gewaschen. Die Zellen wurden entweder bei -80 °C gelagert oder mit dem QIAamp DNA Mini Kit bzw. QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) lysiert und die genomische HCT116 DNA isoliert (30 µl Elutionsvolumen). Genomische DNA (gDNA) wurde mit ddH₂O auf 100 - 300 ng/µL in 100 µl verdünnt (0,65 mL Bioruptor™ Mikrogefäß) und bei 4 °C mit dem Bioruptor™ Pico (Diagenode) für 10 Zyklen mittels Ultraschall auf ca. 200 bp geschert. Optional können die Proben vor der Ultraschallbehandlung für 10 min auf Eis gestellt werden.

3.2.2 Analyse von Nukleinsäuren mittels Kapillargelelektrophorese

Die Qualitätskontrolle von Nukleinsäuren wie gDNA, gescherter DNA und Amplikons erfolgte entsprechend den Herstellerprotokollen mit dem 5200 Fragment Analyzer (Agilent Technologies Inc.) sowie dem DNF-474 High Sensitivity NGS Fragment Analysis Kit sowie dem DNA-468-0500 HS Genomic DNA 50 kb Kit.

3.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte mit dem Qubit 4TMFluorometer (Invitrogen), entweder mit dem QubitTM1xdsDNA HS Assay Kit für doppelsträngige DNA (dsDNA) oder dem QubitTMssDNA Assay Kit für bisulfitkonvertierte DNA (bisDNA). Für besonders niedrig konzentrierte Proben wurde der CFF Assay nach Devos et al. (2009) verwendet [130]. Da die Aufreinigungen bisulfitkonvertierter DNA, wenn nicht explizit beschrieben, ohne Desulfonierungsschritt durchgeführt wurden, war es notwendig, die mittels Qubit Fluorometer gemessenen Werte, um einen zuvor ermittelten Korrekturfaktor von $1,81 \pm 0,11$ zu korrigieren. Dieser Korrekturfaktor wurde anhand der Konzentrationsunterschiede zwischen sulfonierter und desulfonierter DNA in Triplikaten mit dem Qubit bestimmt. Die ohne Desulfonierung vorhandene SO_3^- -Gruppe wirkt sich negativ auf die fluoreszenzbasierte Messung mit dem Qubit Fluorometer aus.

3.2.4 Bisulfitkonvertierung

In dieser Arbeit wird die nach Inkubation mit den Bisulfitreagenzien unter Temperatureinfluss (Konvertierungstemperatur) generierte DNA als bisulfitkonvertierte DNA bzw. bisDNA bezeichnet. Die nachfolgende Desulfonierung, erfolgt entweder während der Aufreinigung, mit Hilfe eines alkalischen Desulfonierungspuffers oder in einer verlängerten initialen Denaturierungsphase, zu Beginn der qPCR. Für die Bisulfitkontrolle, wurde die DNA-Lösung, durch ddH₂O ersetzt.

off-Chip

Für die Generierung von bisDNA wurden das Premium Bisulfite Kit (Diagenode), das EpiBiS Kit (Epigenomics) sowie das Zymo Lightning Kit (Zymo Research) nach Herstellerangaben verwendet.

on-Chip

In der *Vivalytic* Kartusche wurden bei Verwendung des EpiBiS Kit, die Reagenzien bereits außerhalb der Kartusche mit der DNA gemischt und in der Mischkammer (MK) vorgelegt. Die Konvertierung erfolgte in der Reaktionskammer einer Prototypen *Vivalytic* Kartusche, mit einem Fassungsvermögen von 243 μl . Die für die Konvertierungsreaktion benötigten 80 °C können in der Reaktionskammer der *Vivalytic* Kartusche ohne Probleme erreicht werden. Bei der Verwendung des Bisulfite Premium Kit (Diagenode) wurde das Bisulfitreagenz (350 μl) in R22 vorgelagert, wobei die Lösung der gescherten HCT116 DNA (40 μl) in der gewünschten Konzentration in der Probenkammer vorgelagert wurde (siehe 4.1.2, Abb. 17). Mittels 17 Pumphüben wurde das Bisulfitreagenz in die Probenkammer gepumpt und dort durch öffnen und schließen der Pumpkammer (30 x) mit der DNA Lösung gemischt. Im Anschluss wurde die Probe für die Bisulfitkonvertierung mit 8 Pumphüben in die Reaktionskammer gepumpt. Die initialen 98 °C (8 min) können in der Reaktionskammer der *Vivalytic* Kartusche nicht erreicht werden. In Thermomessungen wurde eine maximale Temperatur von ca. 83 °C in der Reaktionskammer gemessen, welche anstelle der eigentlichen 98 °C angelegt wurden.

3.2.5 Qualitätskontrolle bisulfitkonvertierter DNA mittel NGS Amplikonsequenzierung

Für die Qualitätskontrolle wurde gescherte methylierte DNA (MDNA) sowie unmethylierte DNA (UMDNA) sowohl *off-Chip* als auch *on-Chip* mit dem Premium Bisulfite Kit (Diagenode) konvertiert. Mit der aufgereinigten bisulfitkonvertierten DNA wurden die Amplikons LTR5 Amplikon 1 und LTR5 Amplikon 2 aus genomischen *repeat* Bereichen generiert (siehe Tab. 8 - 10).

Tabelle 8: Ansatzschema (1 x) für die LTR5 Amplikon 1 und Amplikon 2 singleplex PCR.

Reagenz	Volumen [μ l]
Q5U Mastermix (2x)	12,5
F-Primer (10 μ M)	0,5
R-Primer (10 μ M)	0,5
ddH2O	6,5
bisDNA	5
Gesamtvolumen	25

Tabelle 9: Temperaturprofil der LTR5 Amplikon 1 und Amplikon 2 singleplex PCR.

Zeit [s]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zyklenzahl
30	98	1
10	98	40
30	60	40
30	65	40
300	65	1

Tabelle 10: Oligonukleotidsequenzen für die LTR5 Amplikon 1 und Amplikon 2 singleplex PCR. Die Sequenzbereiche der Sequenzieradaptoren sind *kursiv* abgebildet. F: *forward*; R: *reverse*.

Oligonukleotidbezeichnung	Oligonukleotidsequenz
F-Primer LTR5 Amplikon 1	<i>TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</i> TGTGTAGAAAGAAGTAGA
R-Primer LTR5 Amplikon 1	<i>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</i> CCCTTAATCCATTTAACTCT
F-Primer LTR5 Amplikon 2	<i>TCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT</i> TGAGGAGGATTAGTAAAAGAGG
R-Primer LTR5 Amplikon 2	<i>GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT</i> CATACACATAAACATCTC

Die generierten bisulfitkonvertierten Amplikons wurden mit dem MiSeq (Illumina) nach dem NGS basierten lokalen Amplikonsequenzierungsverfahren von Gries et al. (2013) sequenziert [190]. Dieses Verfahren basiert auf der *sequencing-by-synthesis* Technologie. Es wurde das MiSeq Reagent Kit v3 verwendet und folgende Einstellungen, 600-cycle, 2 x

300 bp *paired-end*, mit dem Ziel 10.000 *Reads* pro Amplikon zu erzeugen. Nachdem die Sequenzierdaten durch eine R basierte Pipeline prozessiert wurden, wurden die Daten der Bisulfitsequenzierung mit Hilfe des BiQ Analyzer HT ausgewertet (<https://biq.mpi-inf.mpg.de/>) [191]. Es wurden die Filterkriterien *maximum fraction of unrecognized sites* = 0,1 und *Minimal Sequence Identity* > 0,9 verwendet. Die Matrices des Sequenzierexperiments sind im Anhang (Tab. 19 -25) dargestellt.

3.2.6 Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA mit Hilfe von Silikamatrices

off-Chip

Die *off-Chip* Aufreinigung der bisulfitkonvertierten DNA mit Hilfe von Silikamatrices, erfolgte nach Herstellerangaben des Premium Bisulfite (Diagenode) und Lightning (Zymo Research) Kit sowie mit den Puffern aus diesen Kits. Um mögliche Abweichungen des Probenmaterials zu reduzieren, wurden die einzelnen Bisulfitansätze vor der Aufreinigung gepoolt. Für den Aufbau der Filter F und Filter B Filtersäulchen, wurden die Silicamatrices aus den Macherey-Nagel Filtersäulchen ausgebaut und die gestanzten Silicamatrices in der gewünschten Anzahl an Lagen (max. drei), mit Fritte in das Zentrifugensäulchen eingebaut. Als Elutionspuffer wurden 20 - 30 µl ddH₂O verwendet. Erfolgte eine Aufreinigung ohne Desulfonierung, wurde der entsprechende Waschschritt vom Protokoll gestrichen. In diesem Fall wurde die Ausbeute an an bisulfitkonvertierter DNA durch einen zuvor ermittelten Faktor korrigiert (siehe Ergebnisteil 4.2.1).

Im Ergebnisteil 4.2.3 wurde die *off-Chip* Aufreinigung unter *on-Chip* Bedingungen durchgeführt und die Eluate anschließend mit einer *off-Chip* durchgeführten *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR analysiert. In Tab. 11 sind die Ansatzschemata dargestellt. Es wurde stets eine konstante Menge von 2 ng konvertierter und gescherter HCT116 bisDNA in die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR eingesetzt. Es wurden unterschiedliche Volumina an Eluat in der qPCR eingesetzt. Anhand des eingesetzten Eluatvolumens, wurde die für die Konvertierung benötigte Menge an gescherter HCT116 DNA berechnet. Die Elution erfolgte in 40 µl ddH₂O.

Tabelle 11: Übersicht Versuchsdurchführung zur Verifizierung der LoC-Kompatibilität der silikamatrixbasierten Aufreinigung von bisDNA. In Anlehnung an [177].

Eluatvolumen (qPCR)	20 µl	16 µl	12 µl	8 µl	4 µl	2 µl
Finale Menge HCT bisDNA [ng]	2	2	2	2	2	2
Erforderliche Eluatkonz. [ng/µl]	0,1	0,125	0,167	0,25	0,5	1
Für die Bisulfitkonvertierung benötigte HCT116 DNA [ng]	4	5	6,7	10	20	40

on-Chip

Die Filterkammer der *Vivalytic* Kartusche wurde mit Hilfe einer Mikrofräse auf 1,4 mm vertieft um den manuellen Einbau von drei Lagen des Filter F mit Durchmesser 3,4 mm zu ermöglichen. Eine Fritte wurde nicht verbaut.

Für eine Aufreinigung *on-Chip* wurde zunächst die Pumpkammer mit Bindepuffer (Diagenode) aus R31 gespült (Abb. 11 A) und im Anschluss die verbaute Silicamatrix mit Bindepuffer konditioniert (Abb. 11 B). Im Anschluss wurde der in der Mischkammer vorgelegte Bindepuffer-Bisulfitansatz über die Silicamatrix gepumpt (Abb. 11 C). Es folgte ein Waschschriff mit einem alkoholhaltigen Waschpuffer aus R21 (Abb. 11 D). Im Anschluss wurden Pufferreste mit Luft (R32) aus dem Filter und dem mikrofluidischen System entfernt (Abb. 11 E, F) und mit Hilfe eines Pumpschritts Luft über den Filter gepumpt (Abb. 11 G). Um weitere Kontaminationen zu entfernen, wurde das mikrofluidische System mit Elutionspuffer aus R11 gespült (Abb. 11 H - O). Schritt I ist dabei optional, da hier bereits Elutionspuffer über den Filter bewegt wird. Das Verwerfen erster Elutionsfraktionen kann hier die Pufferverschleppung und Eintragung möglicher inhibierender Substanzen reduzieren, geht allerdings auch mit einem Ausbeuteverlust und somit einer Reduzierung der Sensitivität einher. Nach den Spülschritten werden die Heizer der PCR Kammern für den Elutionsvorgang auf 60 °C erwärmt und zwei *Plugs* an frischem Elutionspuffer fünf mal über den Filter bewegt (Abb. 11 P, Q).

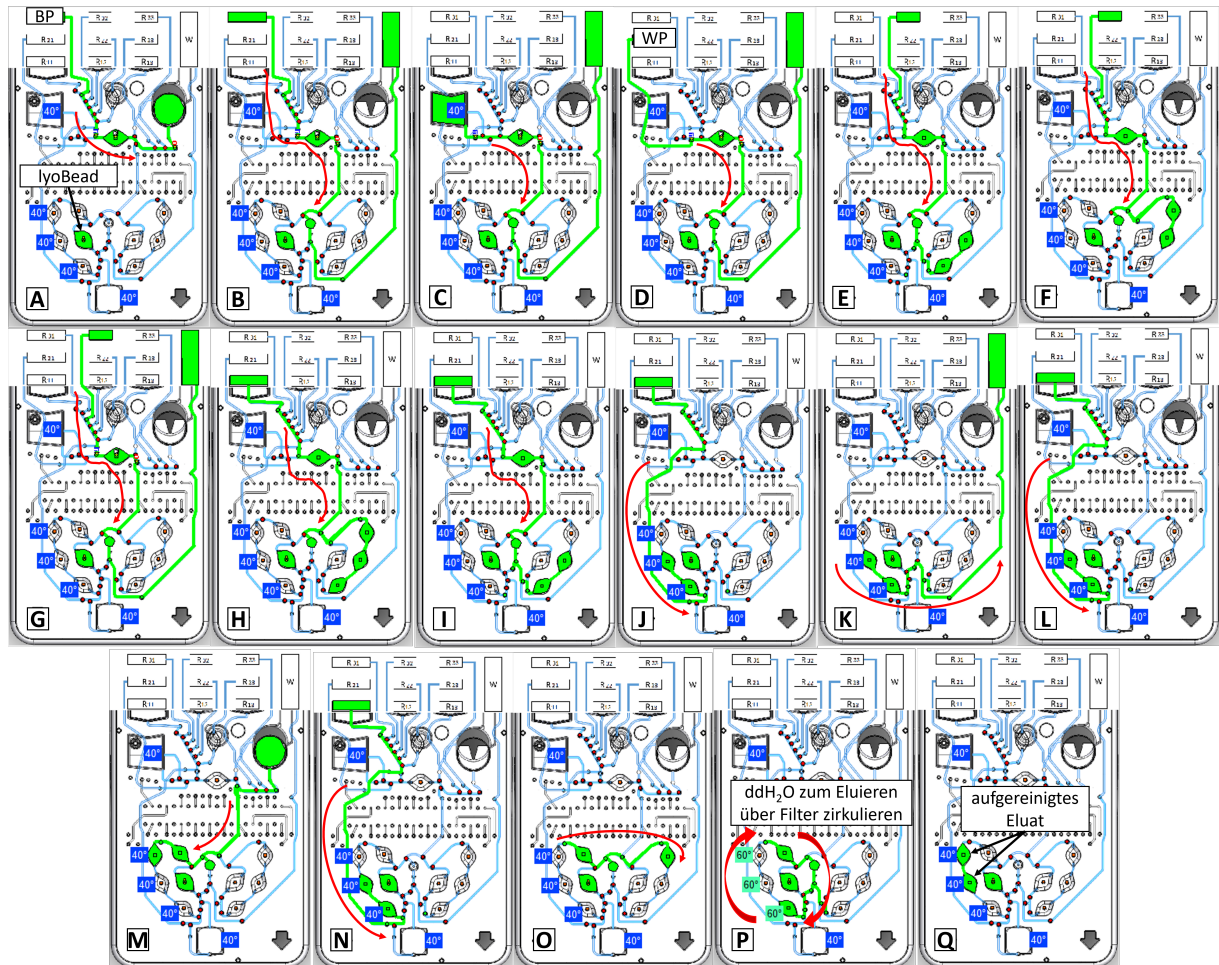


Abbildung 11: Fluidischer Ablauf der Silicamatrix-basierten Aufreinigung mit alkoholischen Waschpuffer im Vivalytk Kartuschentyp 1. (A) Spülen der Pumpkammer mit Bindepuffer (Diagenode). (B) Konditionieren der Silicamatrix mit BP. (C) Bindepuffer-Bisulfit-Mischung über Silicamatrix pumpen. (D) Spülschritt mit einem alkoholhaltigen Waschpuffer (Diagenode). (E, F) Pufferreste mit Luft aus Filter und rechtem PCR Strang entfernen. (G) Weitere Luft über Filter pumpen. (H - O) System mit Elutionspuffer spülen. (I) Optional Elutionspuffer über Silicamatrix pumpen. (P, Q) Temperieren der Heizer und Elution der aufgereinigten bisDNA von der Silicamatrix durch fünf maliges Zirkulieren des EB über den Filter.

3.2.7 Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA mit Hilfe silikabeschichteter magnetischer Partikel

off-Chip

Es wurden magnetische Partikel der Firma Epigenomics verwendet und die Aufreinigung in 2 ml Reaktionsgefäßen (Aufreinigung nach Epigenomicsprotokoll) oder 1,5 ml Reaktionsgefäßen (alle abgeänderten Aufreinigungen) durchgeführt. Die verwendeten Kits für die Bisulfitkonvertierung sowie die Aufreinigung und die entsprechenden Volumina und In-

Tabelle 12: Alkohlfreie Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA (Diagenode) mit Hilfe von silikabeschichteten magnetischen Partikeln in der *Vivalytic* Kartusche. Siehe Ergebnisteil Abbildung 31 - 34.

V_{MagBeads}	30 μl
V_{Bind} (Diagenode)	1020 μl
t_{Bind}	18,2 min
t_{trocken}	-
V_{WP} (Bosch)	652 μl
t_{waschen}	1 min
$V_{\text{ddH}_2\text{O}}$	652 μl
t_{waschen}	1 min
$V_{\text{ddH}_2\text{O}}$	652 μl
t_{Elution}	2,9 min
V_{EP}	beliebige Füllung der AK mit EP möglich

kubationszeiten sind im Ergebnisteil 4.3.1, Abb. 31 dargestellt. Für den Bindschritt wurden die Bisulfitansätze (150 μl , 1000 ng gescherte HCT116 DNA) mit 600 μl Bindepuffer (Diagenode) durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt und für die angegebene Dauer inkubiert Abb. 31. Mit Hilfe eines externen Magnetständers wurden die magnetischen Partikel an der Innenwand des Reaktionsgefäßes abgeschieden (2 min) und der Überstand abpipettiert. Der Waschschriff erfolgte mit 400 μl alkoholfreiem Waschpuffer auf Polymerbasis auf dem Magnetständer. Nach 30 s wurde der Waschpuffer vollständig abpipettiert und die aufgereinigte bisulfitkonvertierte DNA in 30 μl ddH₂O von den magnetischen Partikeln eluiert. Die magnetischen Partikel wurden durch pipettieren oder vortexen in Abwesenheit des Magneten resuspendiert. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min wurde erneut für 2 min auf dem Magnetständer inkubiert und im Anschluss die aufgereinigte bisDNA in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

on-Chip

Die fluidischen Abläufe der Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA sind im Ergebnisteil Abschnitt 4.3.2 dargestellt. Die verwendeten Volumina und Bindezeiten aller Aufreinigungen mittels magnetischer Partikel sind im Ergebnisteil Abschnitt 4.3.1 (Abb. 31) sowie in Tab. 12 dargestellt .

3.2.8 SEPT9/ACTB-HM-qPCR

off-Chip:

Der Pipettieransatz der *off-Chip* qPCR für die Durchführung in 96-*well* Platten mit Hilfe des 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Applied Biosystems), ist in Tabelle 13 dargestellt. Für die NTC (engl. *no template control*) wurden 2 μl ddH₂O als Templat eingesetzt und für die Bisulfitkontrolle, 2 μl des Bisulfitkontrollansatz (Bisulitreagenzien und dd₂O ohne DNA). Da die Desulfonierung, die bei einem standardmäßigen *off-Chip* Ablauf im Rahmen der Aufreinigung stattfindet, hier während der initialen Denaturierung durchgeführt wird, wurde das Thermoprogramm entsprechend abgeändert Tab. 14.

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR mit lyophilisierten Mastermix (Jena Bioscience). Bei lyophilisierten Mastermixen mit 25 µl Reaktionsvolumen (Evik Diagnostics) wurden entsprechend 1,5 µl je Oligonukleotid eingesetzt. Die Eluatmenge kann durch Reduzierung der Menge des ddH₂O sowie durch Eintrocknen von Oligonukleotiden erhöht werden. Die singleplex-qPCR wurde entsprechend nur mit den *ACTB* oder den *SEPT9* Oligonukleotiden durchgeführt.

Komponente	Konz. Stammlsg.	Vol. Stammlsg.	Endkonz.
<i>SEPT9</i> F-Primer	6,67 µM	1,2 µL	0,4 µM
<i>SEPT9</i> R-Primer	6,67 µM	1,2 µL	0,4 µM
<i>SEPT9</i> FAM-Sonde	5 µM	1,2 µL	0,3 µM
<i>SEPT9</i> Blocker	12,5 µM	1,2 µL	0,75 µM
<i>ACTB</i> F-Primer	3,75 µM	1,2 µL	0,225 µM
<i>ACTB</i> R-Primer	3,75 µM	1,2 µL	0,225 µM
<i>ACTB</i> Cy5-Sonde	5 µM	1,2 µL	0,3 µM
lyophilisiertes Mastermix <i>Bead</i>	2 x	lyophilisiert	1 x
ddH ₂ O	-	-	9,6 µl
Templat	variabel	variabel	variabel

Tabelle 14: Thermoprogramm der *off-Chip SEPT9/ACTB*-HM-qPCR mit lyophilisierten Mastermixen (Jena Bioscience und Evik Diagnostics)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	15 s	50
Annealing	56 °C	30 s	50
Elongation	65 °C	30 s	50
Abkühlung	40 °C	30 s	1

on-Chip:

Für die Durchführung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR wurden 1200 µl Elutionspuffer in die Reagenzienkammer R11 pipettiert. In die Probenkammer wurden 200 µl Probe mit der gewünschten Konzentration an bisDNA pipettiert. Da die Probe dem Eluat entsprechen soll, wurden 0,2 % Tween80 zugegeben. Die benötigten Oligonukleotide wurden in der Beadkammer eingetrocknet und ein lyophilisierter Mastermix (siehe Abb. 9) mit eingebaut (permanent geöffnete Kammer (grün dargestellt)) . In der *off-Chip* qPCR werden 20 µl der Probe eingesetzt. Zunächst wurde das mikrofluidische System mit dem Elutionspuffer (Abb. 12 A - F) sowie mit der Probenlösung (Abb. 12 G - I) gespült. Im Anschluss werden die lyophilisierten qPCR Reagenzien sowie die eingetrockneten Oligonukleotide mit der Probenlösung, über einen peristaltischen Pumpschritt gelöst (Abb. 12 J). Die Probenlösung welche nicht zum Lösen der qPCR Reagenzien verwendet wurde, wurde in die Abfallkammer verworfen (Abb. 12 K), werden die Heizer aktiviert und der qPCR Ansatz für die initiale Denaturierung in die obere PCR Kammer (PCR21) befördert. Im Anschluss wird der Ansatz zwischen den drei unterschiedlich temperierten PCR Kammern in bis zu 50 Zyklen, hin und her bewegt. Der qPCR Ansatz lässt sich durch Anbohren der Kartusche für weitere Analysen entnehmen.

Für die *on-Chip* Etablierung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR wurden die lyophiliserten Mastermixe zunächst zu Beginn im Probenansatz gelöst und die entsprechende Menge an Oligonukleotiden hinzugegeben. Bei diesen Experimenten ist der fluidische Ablauf bis auf das peristaltische Befüllen der Beadkammer, identisch. Der linke PCR Strang wurde nach dem Spülschritt direkt mit dem qPCR Ansatz befüllt.

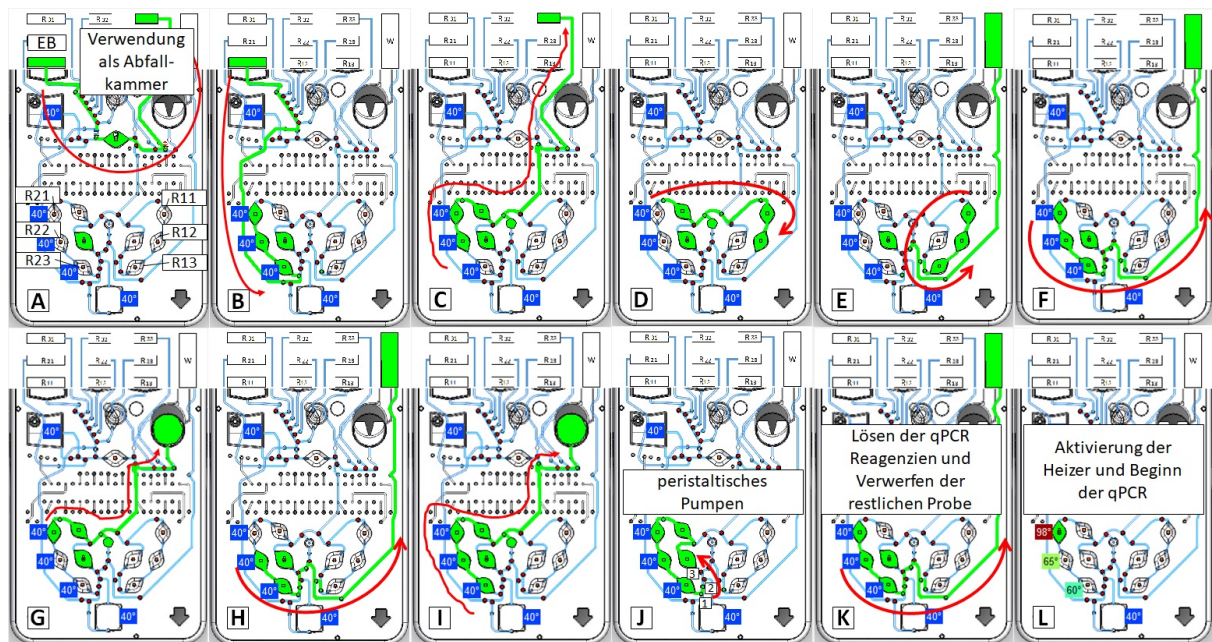


Abbildung 12: Fluidischer Ablauf der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR im Vivalytk Kartuschentyp 1. (A) Spülen der Pumpkammer mit Elutionspuffer. (B, C) Spülen des linken PCR Strangs. (D, E) Spülen des linken und rechten PCR Strangs. (F) Spülen des linken PCR Strangs sowie des unteren fluidischen Pfades. (G, I) Spülen des linken PCR Strangs mit Probe (bisDNA in Elutionspuffer). (J) Lösen der qPCR Reagenzien und Oligonukleotide mit Hilfe eines peristaltischen Pumpschritts. (K) Verwerfen der restlichen Probe. (L) Temperierung der PCR Kammern auf die benötigten Temperaturen und Beförderung des qPCR Ansatz in die obere PCR Kammer (PCR21) zur Durchführung der initialen Denaturierung. Im Anschluss erfolgt die qPCR durch hin- und herbewegen des qPCR Ansatzes in den unterschiedlich temperierten PCR Kammern.

3.2.9 Etablierung fluidischer Abläufe

Die fluidischen Abläufe werden mit Hilfe der Fluculator Software generiert, bei welcher es sich um eine Bosch eigene, matlabbasierte Software handelt. Diese besitzt eine Benutzeroberfläche, welche das Erstellen von fluidischen Abläufen durch Visualisierung, erleichtert (Abb. 13). Alle verwendeten Funktionen der *on-Chip* Probenprozessierung werden in Tabelle 15 aufgeführt. Bei Schaltschritten, lässt sich das gewünschte Ventil oder die gewünschte Kammer auswählen und die Dauer des Schaltschritts einstellen. Bei Pumpschritten muss eine Pumpkammer sowie ein Ein- und Auslassventil definiert werden, welche sich beim Pumpschritt abwechselnd öffnen und schließen um einen Fluidstrom zu erzeugen. Pumpschritte benötigen mindestens einen vorgeschalteten Schaltschritt, bei dem alle weiteren Ventile und Kammern entlang des fluidischen Pfades geöffnet werden. Die gewünschte Pumpfrequenz sowie die Anzahl der Zyklen, kann nach Bedarf angepasst werden, wobei vom Programm das theoretisch bewegte Fluidvolumen ausgegeben wird. Bei der *Loop* Funktion handelt es sich um hintereinander geschaltete Schaltschritte, welche beliebig oft

wiederholt werden können, wie z.B. PCR-Zyklen oder peristaltische Pumpschritte. Der *Take-Pic* Befehl kann z. B. während der Annealingphase der qPCR eingebaut werden, um eine automatisierte Bildaufnahme in jedem Zyklus der qPCR zu erreichen. Mit dem Pausen Befehl, wird der fluidische Ablauf an einer gewünschten Stelle unterbrochen, bis die Pause durch weiter klicken oder nach einer festgelegten Zeitdauer aufgehoben wird. Dies ist besonders für die Etablierung und Optimierung von fluidischen Abläufen entscheidend, da somit genug Zeit zur optischen Bewertung der fluidischen Einzelfunktionen bleibt. Außerdem lassen sich die Temperatureinstellungen der einzelnen Heizer vornehmen.

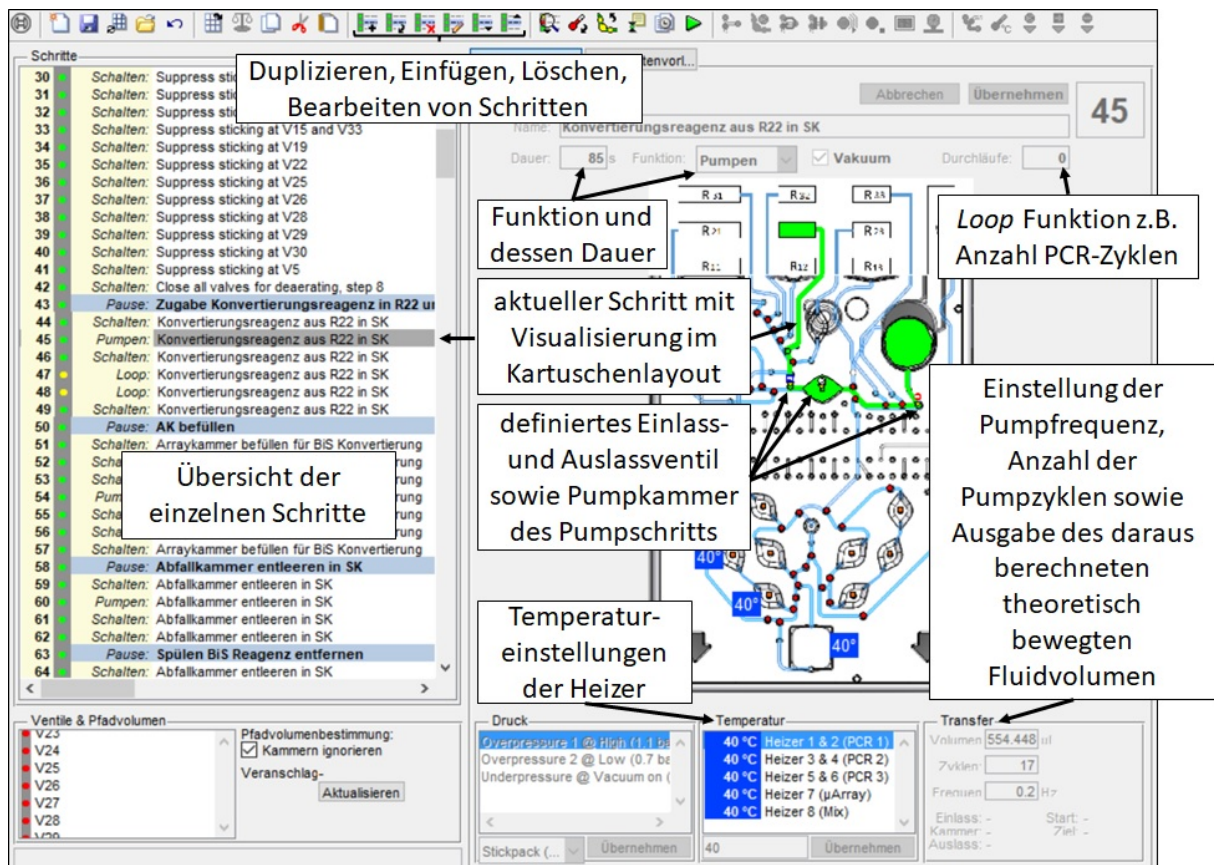


Abbildung 13: Benutzeroberfläche der von Bosch entwickelten Fluculator Software. Mit Hilfe dieser Software ist die visuelle Generierung von fluidischen Abläufen möglich. Das generierte Programm wird als Exceldatei ausgegeben, welche in das zur Prozessierung benötigte Programm VPhotoStar (Abb. 14) importiert werden kann. In Anlehnung an [177].

3.2.10 Bildaufnahme, Bildauswertung und Aufnahme vergleichbarer Amplifikationskurven

Auch für die Aufnahme und Auswertung von Bilder mit der *Vivalytic* Plattform, wurde die Bosch eigene Software (VPhotoStar) verwendet (Abb. 14). Unter *sample insert* kann das System für einen Lauf vorbereitet werden, sowie die Kartusche in den Analyzer geben und eingespannt werden. Nachdem Versuch lässt sich die Kartusche darüber auch

Tabelle 15: Beschreibung der einzelnen Funktionen zur Etablierung von fluidischen Abläufen. In Anlehnung an [177].

Funktion	Beschreibung	Dauer
Schalten	öffnen und schließen von Ventilen und Kammern	Kammern öffnen 2 s, schließen 1 s; Ventile 0,3 s
<i>Loop</i>	Wiederholungsschleife von Schaltschritte z. B. PCR Zyklen	abhängig von Anzahl und Dauer der Schritte sowie der Wiederholungen
Pumpen	Pumpen mittels definierter Pumpkammer sowie Einlass- und Auslassventil	abhängig von Zyklenzahl und Frequenz
<i>Take Pic</i>	Bildaufnahme	abhängig von Bildgröße
Pause	Pausierung des fluidischen Ablaufs	endlos oder zeitlich definiert

wieder auswerfen. Unter *MiniSequencer* kann der zuvor mit der Fluculator Software generierte Ablauf in Form einer Exceltabelle importiert gestartet und gestoppt werden. Mit der Funktion *PictureTools* können die an die jeweilige qPCR Reaktion angepassten Aufnahmeeinstellungen vorgenommen werden und automatisch Bilder aufgenommen werden. Unter *ImageAnalysis* kann ein Bildbereich für die Auswertung der Fluoreszenzintensität ausgewählt werden, um die Rohdaten für die Generierung der Amplifikationskurven zu erzeugen. Das System gibt keine Ct-Werte aus, weshalb diese anhand der Rohdaten in Excel ermittelt werden müssen. Für die Definition des *Threshold* wurde die 10-fache Standardabweichung der ersten 20 Zyklen, zum Mittelwert der ersten 20 Zyklen addiert. Im Anschluss lässt sich der Wert, welcher erstmals den *Threshold* überschreitet, extrahieren und als eine Art Ct-Wert in Betracht ziehen.

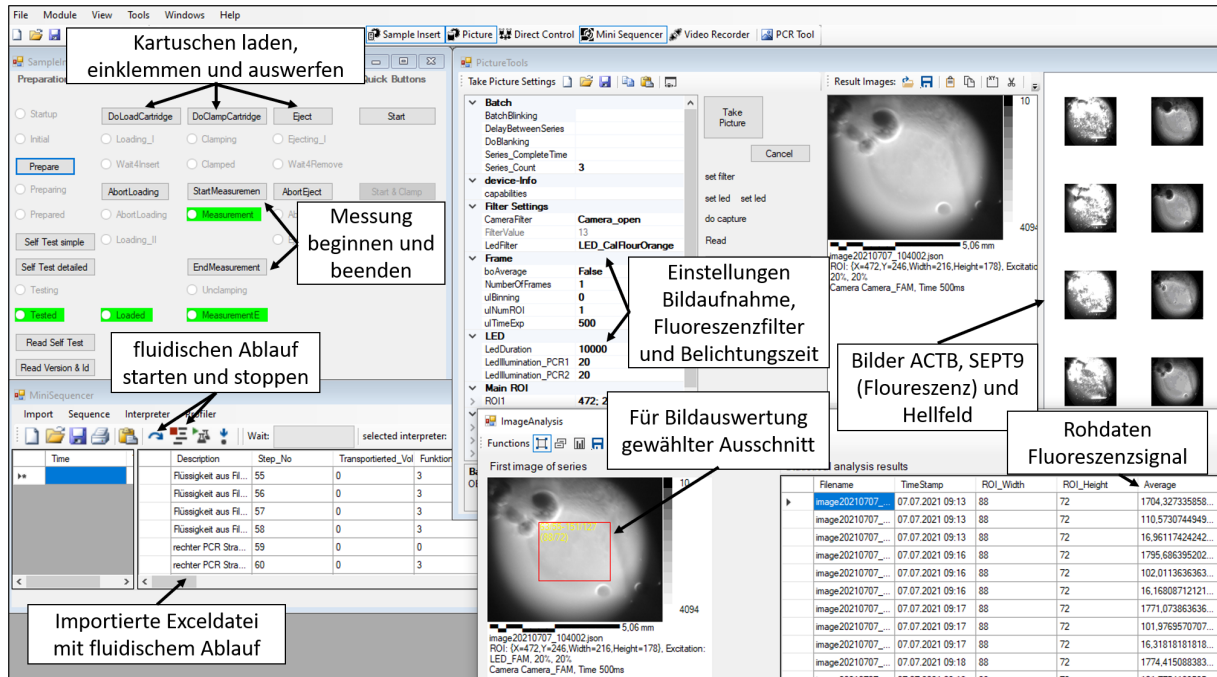


Abbildung 14: Benutzeroberfläche der Bosch eigenen VPhotoStar Software. Mit dieser Software, können die fluidischen Abläufe und automatischen Bildaufnahmen sowie deren Auswertung, durchgeführt werden. In Anlehnung an [177].

Die Optik, welche das Bild aufnimmt, wird auf die Kammer PCR23 fokussiert. Der manuelle Aufbau der Kartuschen sowie die Entstehung von Blasen in der Kartusche während deren Prozessierung, führen zu Abweichungen in den Fluoreszenzintensitäten. Trotz der manuellen Auswahl des auszuwertenden Bildausschnitts, verlaufen die Kurven nicht durch den selben Ursprung (Abb. 15 A). Aus diesem Grund ist eine Normierung der Kurven notwendig, um einen Vergleich der Kurven untereinander zu ermöglichen. Damit alle Kurven um Ursprung 0 beginnen, wird der Ct-Wert jedes Zyklus mit dem des ersten Zyklus subtrahiert (Abb. 15 B). Durch eine exponentielle Glättung mit Glättungsfaktor $\alpha = 0,5$ (Formel 3.1) wurden die durch die Blasen verrauschten Kurven, geglättet (Abb. 15 C). Hierbei entspricht x_i dem geglätteten Mittelwert zum Zeitpunkt i und y_i dem Messwert zum Zeitpunkt i .

$$x_i = \alpha * y_i + (1 - \alpha) * x_{i-1} \quad (3.1)$$

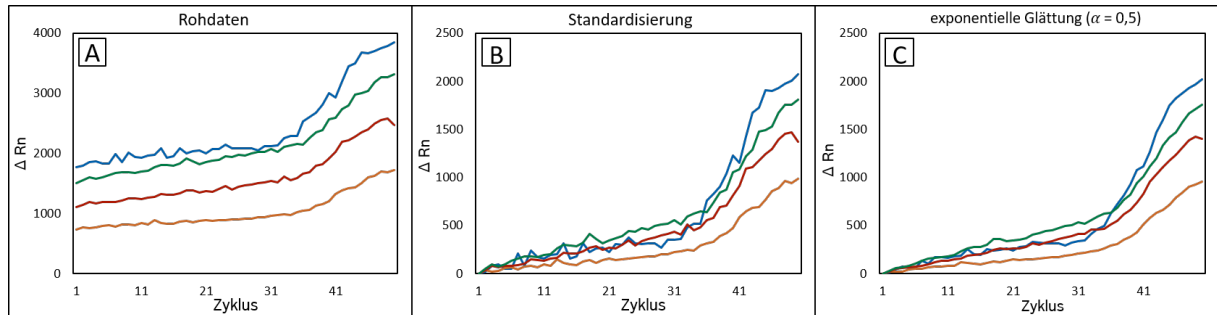


Abbildung 15: Normierung und exponentielle Glättung von Amplifikationskurven. Es wurden vier Kartuschen mit je 1,25 ng/ μ l bisDNA (gescherte HCT116 DNA) prozessiert. Jede Amplifikationskurve entspricht einer prozessierten Kartusche. Die Rohdaten wurden in Excel ausgewertet und die Amplifikationskurven generiert. (A) Amplifikationskurven der Rohdaten. (B) Amplifikationskurven nach Normierung. (C) Amplifikationskurven nach Normierung und exponentieller Glättung mit einem Glättungsfaktor von $\alpha=0,5$. In Anlehnung an [177].

3.2.11 Durchführung von Thermomessungen und Anwendung des Thermomodells

Um die in den Kompartimenten vorherrschende Temperatur zu bestimmen, wurden beim Aufbau der *Vivalytic* Kartusche, Thermoelemente in der Reaktionskammer oder den PCR Kammern verbaut (siehe Abb. 16). Diese Thermokartuschen wurden mit ddH₂O befüllt und die entsprechenden mikrofluidischen Abläufe durchgeführt. Um die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR auf die *Vivalytic* Kartusche zu transferieren, wurde ein simulationsbasierter Ansatz mit Hilfe eines Bosch internen Wärmeleitmodells der *Vivalytic* Kartusche verwendet. Das Modell sowie die Versuchsbeschreibungen wurden als Publikation (J. Kärcher et al. (2022), “Transfer of blocker-based qPCR reactions for DNA methylation analysis into a microfluidic LoC system using thermal modeling“, *Biomicrofluidics* (BMF)) eingereicht.

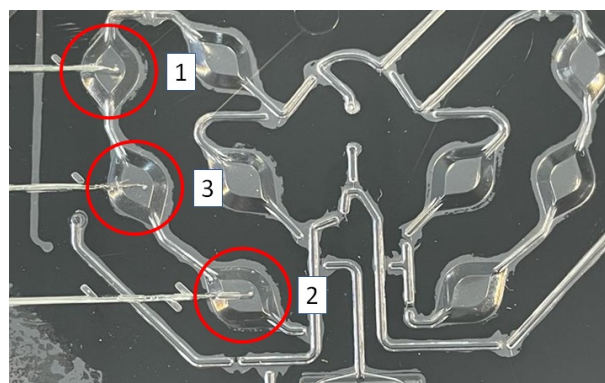


Abbildung 16: Thermokartusche mit Thermoelementen in den PCR Kammern. Mit Hilfe dieser Thermoelemente lässt sich die dort vorherrschende Temperatur überprüfen. (1) Denaturierungskammer, (2) Annealingkammer, (3) Elongationskammer.

4 Ergebnisse

Für die Analyse der DNA-Methylierung, muss die epigenetische Information in eine genetische Sequenzinformation umgewandelt werden. Daher beginnt der Ablauf der DNA-Methylierungsanalyse mit der Bisulfitkonvertierung, um eine Unterscheidung von methylierten und unmethylierten Cytosinen zu ermöglichen. In dieser Arbeit wird die nach Inkubation mit den Bisulfitreagenzien unter Temperatureinfluss (Konvertierungstemperatur) generierte DNA als bisulfitkonvertierte DNA bzw. bisDNA bezeichnet. In der Literatur findet man auch häufig die Bezeichnung sulfonierte DNA, da die Probe bis dahin noch keiner Desulfonierung ausgesetzt wurde. Im Anschluss an die Bisulfitkonvertierung muss die bisulfitkonvertierte DNA (bisDNA) entweder mit Hilfe von Silikamatrices oder silikabeschichteten magnetischen Partikeln aufgereinigt werden, um eine Detektion des gesuchten Methylierungsmarkers mit Hilfe PCR-basierter Methoden, zu ermöglichen (Abb. 5). Für die Integration dieser komplexen Abläufe in die *Vivalytic* Kartusche, sind daher zunächst Anpassungen und Optimierungen außerhalb der Kartusche notwendig. Für die Integration der *off-Chip* optimierten Einzelfunktionen, Bisulfitkonvertierung, Aufreinigung und qPCR, mussten zudem fluidische Abläufe und Funktionen etabliert und optimiert werden. Außerdem war in einigen Fällen eine aufwendige Prototypisierung der *Vivalytic* Kartusche notwendig. Sind die einzelnen Arbeitsschritte in der *Vivalytic* Kartusche durchführbar, bedarf es für deren Verschaltung meist weitere Optimierungsiterationen und Anpassungen der fluidischen Abläufe. Im folgenden werden die Ergebnisse der Etablierung und Optimierung der einzelnen Prozessschritte, sowie deren Verschaltung zu einem Gesamtablauf, für die automatisierte Durchführung der DNA-Methylierungsanalyse in der *Vivalytic* Kartusche dargestellt (Abb. 17).

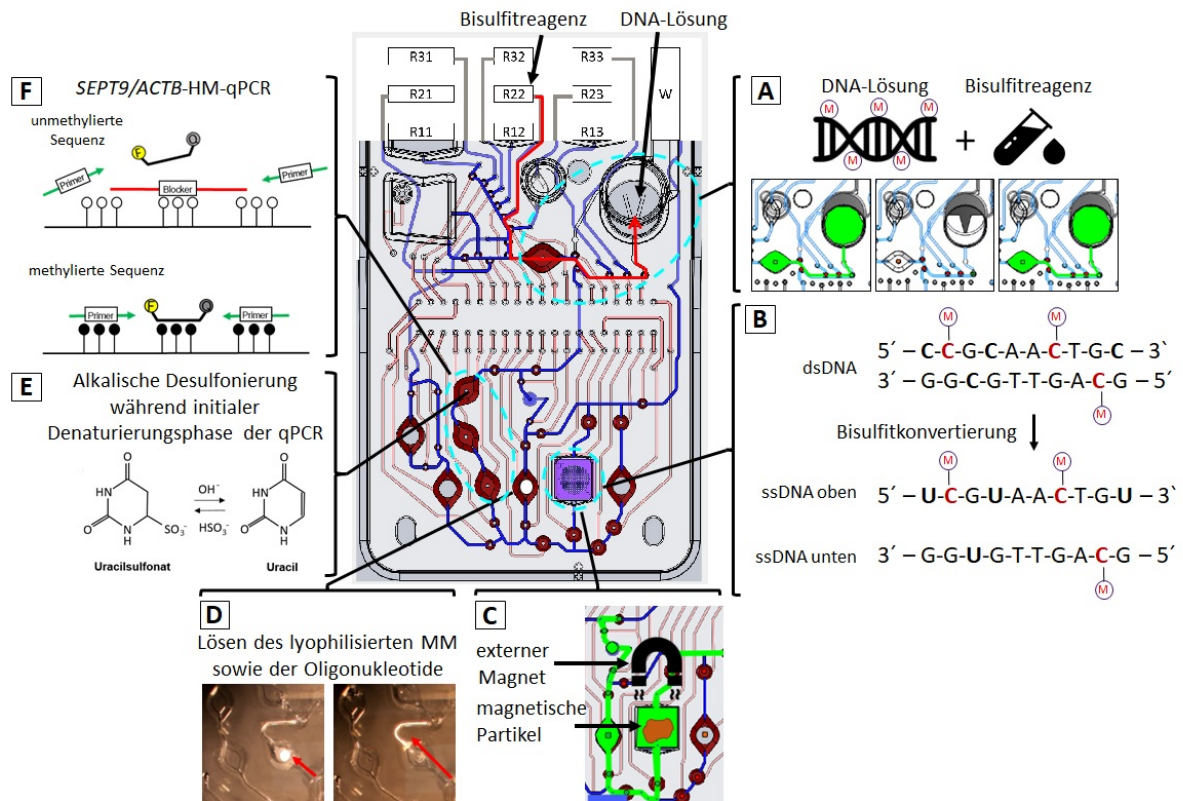


Abbildung 17: Übersicht des automatisierten, mikrofluidischen Ablaufs für die Detektion von DNA-Methylierungsmarkern in der *Vivalytic* Kartusche. (A) Definiertes mikrofluidisches Zusammenführen und Mischen der DNA-Probe mit den Bisulfitreagenzien. (B) Bisulfitkonvertierung unmethylierter Cytosine in der temperierbaren Reaktionskammer. (C) Aufreinigung der konvertierten Probe über ein alkoholfreies, polymerbasiertes Aufreinigungsprotokoll mit Hilfe von magnetischen Partikeln in der Reaktionskammer. (D) Peristaltisches Lösen der eingetrockneten Oligonukleotide sowie des lyophilisierten Mastermix mit dem aufgereinigten Eluat. (E) Desulfonierung der Probe während der initialen Denaturierungsphase (10 min). (F) Amplifikation des *SEPT9* Methylierungsmarkers mit Hilfe einer HM-qPCR.

4.1 LoC-Transfer der Bisulfitkonvertierung

Das Prinzip der Bisulfitkonvertierung wurde bereits im Abschnitt 1.3.1 erläutert. Für eine zuverlässige Bisulfitkonvertierung, ist das Erreichen und Halten vorgegebener Temperaturen während der Konvertierung entscheidend. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Epi BiSKit der Firma Epigenomics, sowie das Premium Bisulfite Kit der Firma Diagenode für die Bisulfitkonvertierung ausgewählt (siehe Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2). Standardmäßig werden Bisulfitkonvertierungen entweder in PCR Reaktionsgefäßen mit Hilfe von PCR Cyclern (Diagenode) oder in Eppendorfreaktionsgefäßen mit Hilfe von Heizinkubatoren (Epigenomics) durchgeführt. In LoC-Systemen kann das Aufheizen größerer Flüssigkeitsvolumina, bzw. großer Reaktionskammern, aufgrund der unzureichenden Heizleistung, ein

Problem darstellen. In PCR Kammern (20 μl) ist das Erreichen von 98 °C ohne weiteres möglich. Darüber hinaus befinden sich hier Heizer über und unter den entsprechenden Kammern. Die Reaktionskammer (Abb. 9) welche standardmäßig 90 μl fasst und nur über einen Heizer verfügt, ist in der Heizleistung limitiert (siehe Abb. 18, 20). Da man aber ein großes Fassungsvermögen benötigt, um einen Bisulfitansatz (Minimum 150 μl) oder zumindest einen stöchiometrischen Anteil eines Bisulfitansatzes zu fassen, bietet sich die Reaktionskammer an. Diese kann mit einem im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Prototypisierungsverfahren (siehe Material und Methoden) auf ein Fassungsvermögen von 150 μl und sogar bis zu 243 μl vergrößert werden. Bei noch größeren Volumina, kann ein zuverlässiges Verschweißen der Kartusche im Aufbauprozess nicht mehr gewährleistet werden. Die Reaktionskammer verfügt im Gegensatz zur ebenfalls temperierbaren Mischkammer (Abb. 9) über kein Entlüftungssystem. Bei Inkubationszeiten zwischen 45 min und 68 min, bei gleichzeitigem Wärmeeintrag, kommt es zu Verdunstungseffekten, was zu einer Veränderung der Reaktionsbedingungen bis hin zum Aussalzen der Bisulfitreagenzien führt. Dies kann zum Verblocken des mikrofluidischen Systems führen. Da die Mischkammer ein noch größeres Volumen fasst und über einen großen Kopfraum verfügt, ist die Heizleistung geringer als in der Reaktionskammer. In LoC-Systemen kann es bei hohen Temperaturen, welche für längere Zeiten aufrechterhalten werden, zu Undichtigkeiten und Beeinträchtigungen der TPU und somit der pneumatischen Ventile kommen. Insbesondere im Zusammenspiel mit Alkoholen, Lösemitteln sowie den Bisulfitreagenzien. In der Reaktionskammer ist die TPU ausgespart, da dieses Kompartiment keine pneumatische Funktion erfüllt, sondern über Pumpkammern oder peristaltisch über hintereinander geschaltete Ventilbewegungen, befüllt wird.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse des LoC-Transfers der Bisulfitkonvertierung in der Reaktionskammer, mit dem EpiBiS Kit (Epigenomics) sowie mit dem Premium Bisulfit Kit (Diagenode) aufgeführt. Das EpiBiS Kit wurde aufgrund seiner geringen Konvertierungstemperatur (80 °C) ausgewählt. Das Premium Bisulfit Kit wurde ausgewählt, da hier für die Bisulfitkonvertierung nur ein Reagenz benötigt wird.

4.1.1 Bisulfitkonvertierung mittels EpiBiS Kit (Epigenomics AG)

Zunächst sollte die Durchführbarkeit der Bisulfitkonvertierung in der Reaktionskammer der *Vivalytic* Kartusche mit Hilfe einer Thermomessung verifiziert werden. Hierfür wurde der Temperatur-Zeitverlauf, mittels eines in der Reaktionskammer (243 μl maximales Volumen) verbauten Thermofühlers, ermittelt (Abb. 18). Die benötigte Temperatur von 80 °C konnte erreicht und für die benötigte Zeit gehalten werden. Hierfür mussten die Heizer der Reaktionskammer auf die maximale Temperatur von 105 °C eingestellt werden. Für eine zusätzliche Heizleistung sorgten die Heizer der benachbarten PCR Kammer, welche auf 60 °C gestellt wurden (Abb. 18).

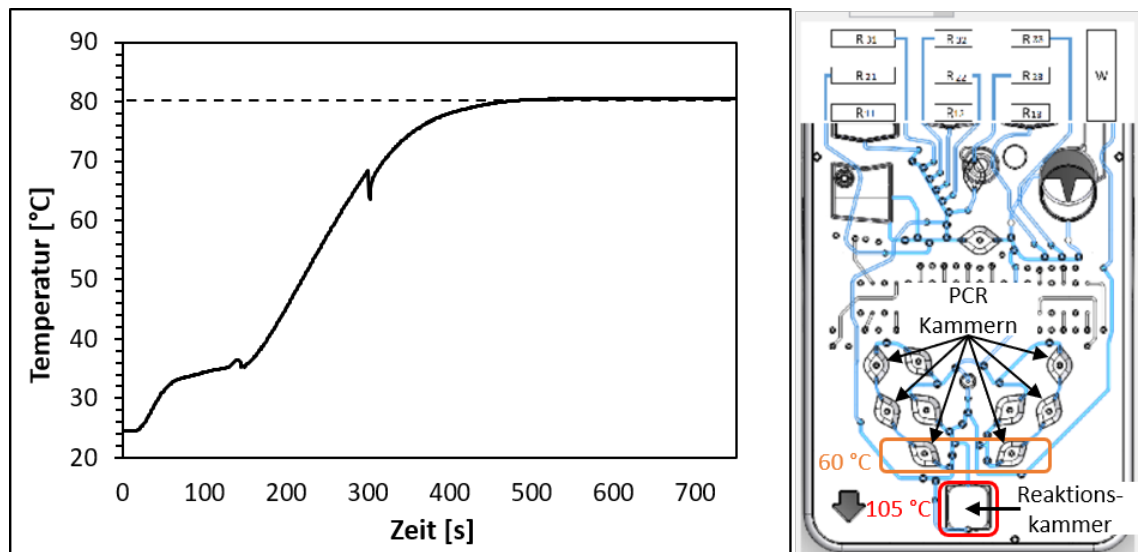


Abbildung 18: Temperatur-Zeitverlauf der Bisulfitkonvertierung in der Reaktionskammer. In der Reaktionskammer werden die benötigten 80 °C erreicht und aufrechterhalten. $T = 105$ °C (Heizer Reaktionskammer, rot), $T = 60$ °C (Heizer PCR Kammer, gelb). Die Temperatur wurde mit Hilfe eines in der Kammer verbauten Temperaturfühlers gemessen. Die Messung wurde in einem offenen Versuchsanalyser durchgeführt.

Trotz des Erreichens der benötigten 80 °C, wurde ein Gradient der Konvertierungstemperatur von 80 °C bis 65 °C, mit je 300 ng gescherter HCT116 DNA, *off-Chip* durchgeführt (Abb. 19). Dadurch lässt sich zeigen, dass die Bisulfitkonvertierung, bei Unterbindung der Verdunstungseffekte, auch in Kompartimenten mit geringerer Heizleistung, wie z.B. der Mischkammer, durchführbar ist. Mit den *off-Chip* aufgereinigten bisDNAs, wurde im Anschluss eine *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass auch mit niedrigeren Konvertierungstemperaturen von 75 °C und 70 °C, eine vergleichbare Amplifikation des *SEPT9* Methylierungsmarkers erreicht wird, wie bei der Standardtemperatur von 80 °C. Lediglich bei 65 °C, nimmt die Amplifikation ab. Das Referenzgen *ACTB* wird unabhängig von der Konvertierungstemperatur, stabil auf allen Templaten amplifiziert.

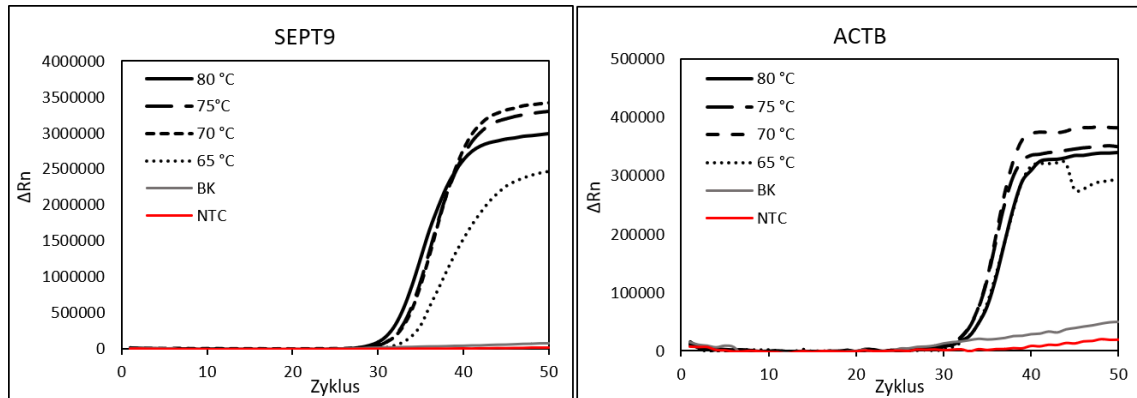


Abbildung 19: Temperaturgradient der Bisulfitkonvertierung mit dem Kit der Firma Epigenomics. $T_{\text{Stand}} = 80\text{ °C}$, $T_{1\text{Gradient}} = 75\text{ °C}$, $T_{2\text{Gradient}} = 70\text{ °C}$, $T_{3\text{Gradient}} = 65\text{ °C}$. Es wurden je 300 ng gescherte HCT116 DNA eingesetzt. 2 μl bisDNA wurde in jeder *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR eingesetzt. Die NTC (*no template control*) und BK (Bisulfitkontrolle) zeigen keine Amplifikation.

Trotz der erfolgreichen Amplifikation des *SEPT9* Methylierungsmarkers, auch bei niedrigeren Temperaturen, wurde die Konvertierungseffizienz in der *Vivalytic* Kartusche, mit Hilfe einer Amplikonsequenzierung bestimmt. Hierfür wurde ein *off-Chip* gemischter Bisulfitansatz (275 μl) in die Mischkammer pipettiert und im Anschluss in die Reaktionskammer (243 μl) gepumpt. Insgesamt wurden 750 ng an Leukozyten gDNA eingesetzt, also ca. 663 ng Leukozyten gDNA in der 243 μl Reaktionskammer konvertiert. Es konnte eine gemittelte Konvertierungseffizienz aller 65 Cytosine des *HSPA5up* Amplikons von $99,22\% \pm 0,53\%$ und aller 70 Cytosine des *MLH1up* Amplikons von $99,17\% \pm 0,61\%$ bestimmt werden (Abb. 51 im Anhang). Trotz der vielversprechenden Ergebnisse, stellt die stabile Langzeitlagerung des sauerstoffsensitiven *Protection Buffers* eine Herausforderung dar. Außerdem müssen hiervon weit mehr als die benötigten 25 μl vorgelagert werden, um Totvolumina und Rückstände im Vorlagerkammer auszugleichen. Darüber hinaus sind aufwendige fluidische Optimierungen für das Zusammenführen und Mischen der DNA-Probe mit dem *Protection Buffers* und dem Bisulfitreagenz notwendig. Deshalb wird im nächsten Abschnitt das Premium Bisulfite Kit der Firma Diagenode auf die *Vivalytic* Kartusche transferiert.

4.1.2 Bisulfitkonvertierung mittels Premium Bisulfite Kit (Diagenode)

Beim Premium Bisulfite Kit der Firma Diagenode, handelt es sich um ein Kit, welches lediglich ein Reagenz für die Bisulfitkonvertierung benötigt. Dadurch wird die Vorlagerung sowie das mikrofluidische Zusammenführen und Mischen der Reaktionskomponenten erleichtert. Bei diesem Kit wird zu Beginn der Konvertierung, eine höhere Temperatur von 98 °C für 8 min vorgeschrieben (Denaturierung der DNA) und im Anschluss für 60 min bei 54 °C konvertiert. Da für dieses Protokoll laut Herstellangaben höhere Temperaturen benötigt werden, wurde ein weiterer Temperatur-Zeitverlauf gemessen, wobei an den Heizern der PCR-Kammer 80 °C angelegt wurden. Die Messung wurde sowohl in einem

offenen Versuchsanalyzer, sowie im *Vivalytic* Analyzer durchgeführt (Abb. 20). Wie der Temperaturgradient (Abb. 21) zeigt, reicht die maximal erreichbare Temperatur von 83 °C (Abb. 20) in der Reaktionskammer aus, um den *SEPT9* Methylierungsmarker, nach erfolgter Bisulfitkonvertierung zu amplifizieren. Wie anhand der Kurvensteigung zu erkennen ist, läuft das Aufheizen und Abkühlen im *Vivalytic* Analyzer schneller ab als im offenen Versuchsanalyzer. Die Abkühlung auf 54 °C, wird sowohl im *Vivalytic* Analyzer, als auch im offenen Versuchsanalyzer, erreicht.

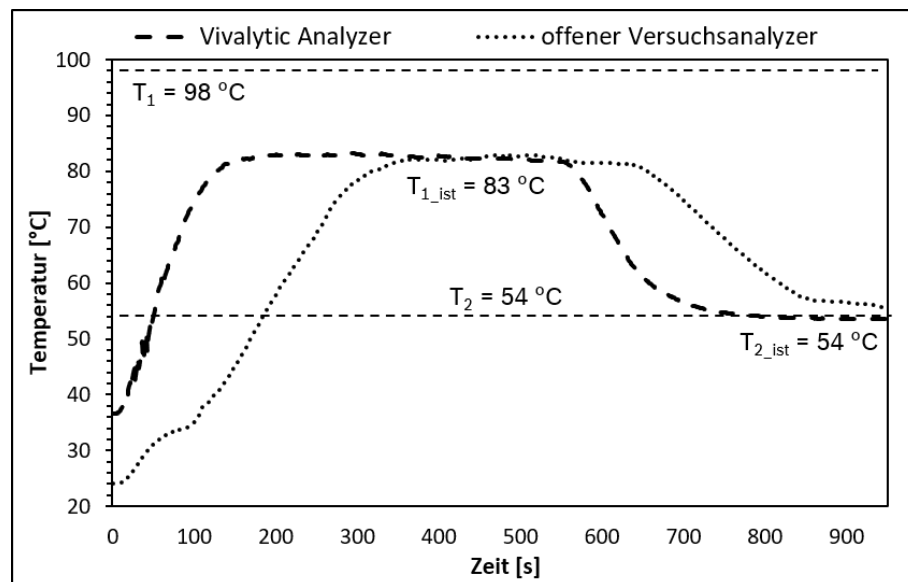


Abbildung 20: Temperatur-Zeitverlauf in der Reaktionskammer während der Bisulfitkonvertierung im *Vivalytic* Analyzer sowie an einem offenen Versuchsanalyzer. Bei einer Einstellung des Heizers der Reaktionskammer auf 105 °C sowie einer Einstellung der Heizer der benachbarten PCR Kammer auf 80 °C wird eine maximale Temperatur T_{1_ist} von 83 °C erreicht. Die im Anschluss benötigten 54 °C werden in beiden Fällen erreicht. T_1 : Standardtemperatur der Denaturierungsphase; T_2 : Standardtemperatur der Konvertierungsphase. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines in der Reaktionskammer verbauten Temperaturfühlers gemessen.

Für eine Einschätzung der Durchführbarkeit dieses Konvertierungsprotokolls in der *Vivalytic* Kartusche, wurde auch hier ein Temperaturgradient für die Denaturierungsphase (8 min) des Protokolls durchgeführt (Abb. 21). Im Anschluss wurde für 60 min bei 54 °C konvertiert. Die Amplifikation der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR funktioniert auch in diesem Fall bei deutlich geringeren Temperaturen von 85 °C und 80 °C. Erst ab einer Temperatur von 75 °C ist eine Verschiebung zu höheren Ct-Werten im Vergleich zur Standardtemperatur von 98 °C zu erkennen. Die Amplifikation des Referenzgens *ACT* ist unabhängig von der Konvertierungstemperatur.

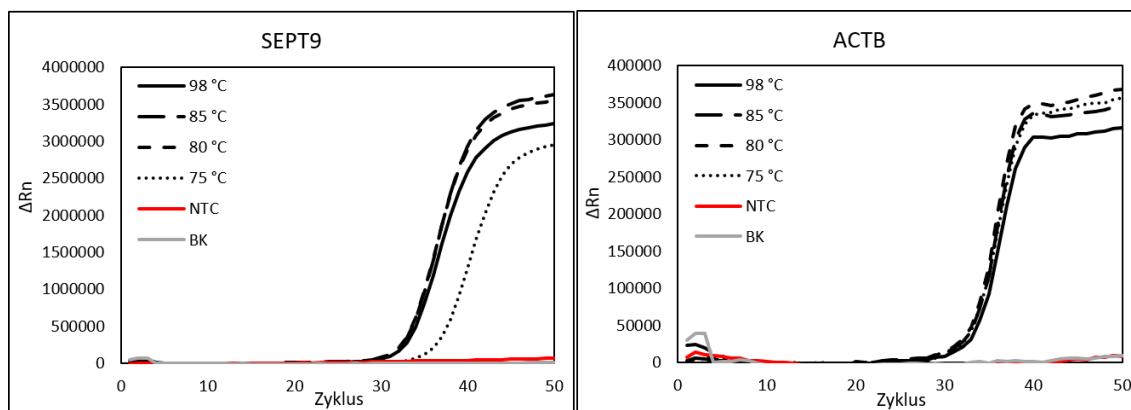


Abbildung 21: Temperaturgradient der Bisulfitkonvertierung mit dem Kit der Firma Epigenomics. $T_{\text{Stand}} = 98 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{1\text{Gradient}} = 85 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{2\text{Gradient}} = 80 \text{ }^\circ\text{C}$, $T_{3\text{Gradient}} = 75 \text{ }^\circ\text{C}$. Es wurden je 300 ng gescherte HCT116 DNA eingesetzt. 2 μl bisDNA wurde in jeder *SEPT9*/*ACTB*-HM-qPCR eingesetzt. Die NTC und BK zeigen keine Amplifikation.

Für eine vollautomatisierte Durchführung der Bisulfitkonvertierung in der *Vivalytic* Kartusche ist es wichtig, das Bisulfitreagenz auf der Kartusche vorzulagern und dieses mit den exakten Volumenverhältnissen mit der DNA-Probe zu mischen (Abb. 22). Hierfür werden 350 μl des Bisulfitreagenz in die Vorlagerkammer R22 gegeben sowie 40 μl DNA-Probe in die Probenkammer (PK). Mit 17 Pumphüben (0,2 Hz) werden 260 μl Bisulfitreagenz in die Probenkammer pipettiert. Durch dreißigfaches Schließen und Öffnen der Pumpkammer, wird eine Durchmischung des Bisulfitreagenz mit der DNA-Probe erreicht. Dieser gemischte Reaktionsansatz wird anschließend durch 8 Pumphübe (0,5 Hz) in die Reaktionskammer gepumpt, wo dieser für 8 min bei $T_{\text{max}} = 83 \text{ }^\circ\text{C}$ und anschließen für 60 min bei $54 \text{ }^\circ\text{C}$ konvertiert wird. Dieser Ablauf kann sowohl für den Kartuscentyp 1 sowie für den Kartuscentyp 2 verwendet werden und lässt sich durch Erhöhung der Pumphübe, in Richtung Reaktionskammer, für verschiedene Ansatzvolumina verwenden. Wichtig ist, dass die verwendeten Kanäle, während des Hochheizen der Reaktionskammer, ausreichend mit H_2O gespült werden, um eine Kontamination des mikrofluidischen Systems mit dem Bisulfitansatz zu reduzieren.

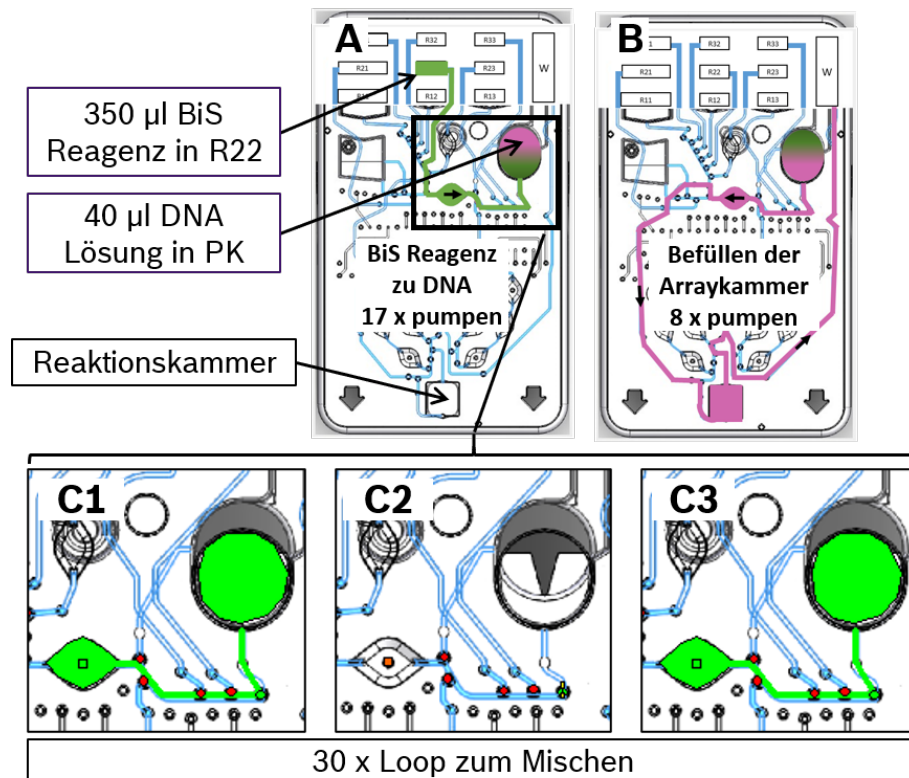


Abbildung 22: Feinjustierung der Mikrofluidik für die Durchführung der Bisulfitkonvertierung in der *Vivalytic* Kartusche. Das BiS Reagenz wird in R22 vorgelegt (350 µl) und die zu konvertierende DNA-Probe (40 µl) wird in die Probenkammer (PK) pipettiert. 260 µl des Bisulfitreagenz werden mit 17 Pumphüben in die Probenkammer gepumpt und dort durch 30 maliges Öffnen und Schließen der Pumpkammer, mit der DNA-Probe gemischt. Im Anschluss wird die Reaktionskammer durch 8 Pumphübe mit dem Reaktionsansatz gefüllt.

Für eine umfangreichere Verifizierung der automatisierten Bisulfitkonvertierung in der *Vivalytic* Kartusche, wurde eine Qualitätskontrolle mittels Amplikonsequenzierung etabliert und durchgeführt.

4.1.3 Qualitätskontrolle der *on-Chip* generierten bisDNA mittels NGS Amplikonsequenzierung

Da bei der Analyse der DNA-Methylierung, die epigenetische Information in eine genetische Sequenzinformation umgewandelt wird, liegt es nahe, dass man die bestmögliche Qualitätskontrolle der Bisulfitkonvertierung, über die Sequenzierung der konvertierten DNA, erzielen kann. Da eine Sequenzierung des gesamten Genoms für eine Qualitätskontrolle der Bisulfitkonvertierung zu teuer und aufwendig ist, wurden PCR Reaktionen für genomische *Repeat* Bereiche etabliert (Abschnitt 3.2.5 Tab. 8 - 10). Somit kann mit einer einfachen Amplikonsequenzierung ein größerer genomischer Bereich, als es bei Einzelgenabschnitten der Fall ist, abgedeckt werden. Es konnten PCR Reaktionen für zwei Amplikons aus dem *LTR5* Bereich, *LTR5* Amplikon 1 und *LTR5* Amplikon 2, erfolgreich

etabliert werden (Abb. 23). Diese Amplikons werden bisulfitunabhängig amplifiziert, um ein *Bias* durch Amplifizierung ausschließlich erfolgreich konvertierter Sequenzen zu vermeiden. Die generierten Amplifikate tragen bereits die für die Sequenzierung benötigten Sequenzieradapter. Für die eigentliche Qualitätskontrolle wurde vollständig methylierte DNA (MDNA) sowie *whole genome* amplifizierte (WGA) unmethylierte DNA (UMDNA) sowohl nach dem Standardverfahren (*off-Chip*) als auch vollständig automatisiert in der *Vivalytic* Kartusche (*on-Chip*) bisulfitkonvertiert. Dadurch lässt sich sowohl die Konvertierungseffizienz von Cytosinen sowie die ungewollte Konvertierung von methylierten Cytosinen im CpG Kontext, bestimmen. Dies ist entscheidend, da eine unvollständige Umwandlung von Cytosinen zu falsch positiven Ergebnissen und eine Umwandlung von methylierten Cytosinen zu falsch negativen Ergebnissen führen kann.

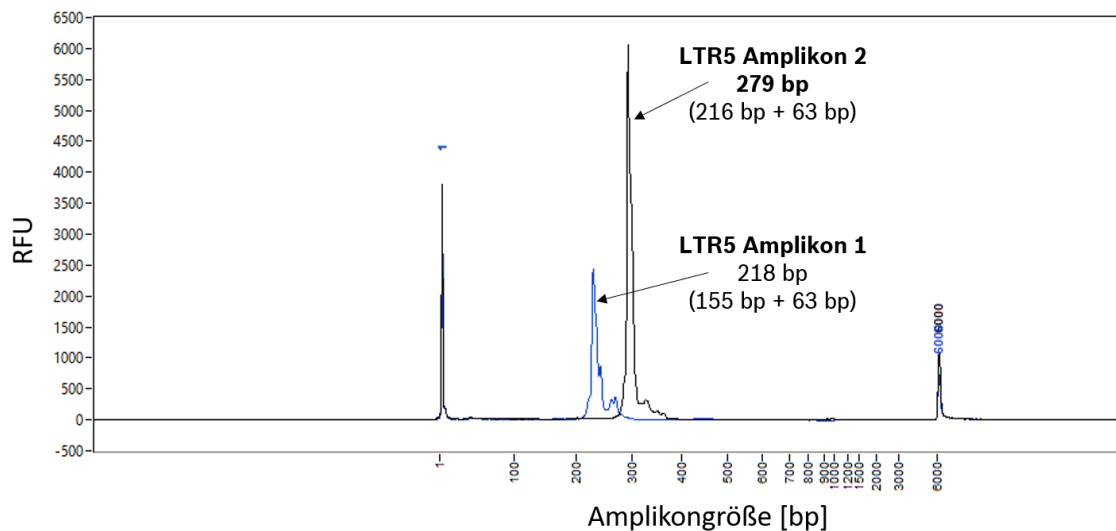


Abbildung 23: Etablierung von bisulfitunabhängigen PCR Reaktionen genomischer *Repeat* Bereiche für die Qualitätskontrolle der Bisulfitkonvertierung mittels NGS Amplikonsequenzierung. Es wurden zwei PCR Reaktionen für *LTR5* Bereich (*LTR5* Amplikon1 und *LTR5* Amplikon2) etabliert. Die Primer tragen bereits Sequenzieradapter von insgesamt 63 bp Länge.

Für den Vergleich der Konvertierungseffizienz der Standardmethode (*off-Chip*) mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten automatisierten Methode, wurde sowohl MDNA als auch UMDNA mit beiden Methoden konvertiert und *off-Chip* aufgereinigt. Je Konvertierungsansatz wurde gescherte Ausgangs-DNA mit einer Konzentration von 20 ng/ μ l eingesetzt. Auf dieser bisulfitkonvertierten DNA, wurden dann die beiden bisulfitunabhängigen Amplikons *LTR5* Amplikon 1 sowie *LTR5* Amplikon 2 amplifiziert und mit Hilfe einer NGS Amplikonsequenzierung analysiert. Es wurden alle Daten beider Amplikons der beiden Methoden im Rahmen eines t-Tests miteinander verglichen. Die Konvertierungseffizienz der *off-Chip* Methode ist mit (99,2 % \pm 0,6 %) im Vergleich zur *on-Chip* Methode (97,3 % \pm 1,4 %) signifikant unterschiedlich ($p = 0,006$) (Abb. 24).

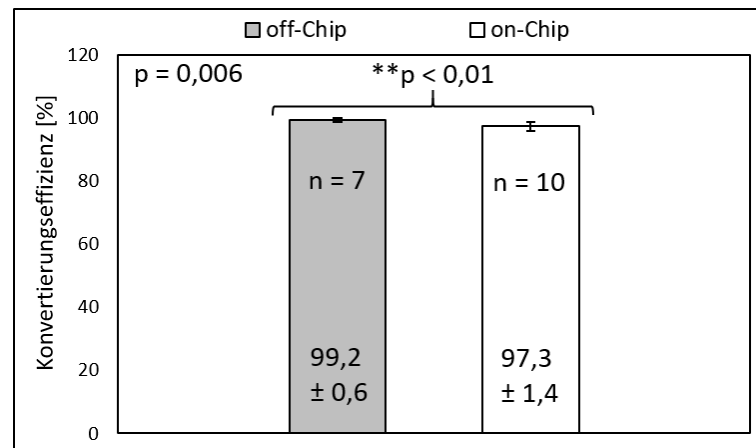


Abbildung 24: Vergleich der Konvertierungseffizienzen der *off-Chip* und *on-Chip* Methode. Es wurde ein zweiseitiger t-Test vom Typ 2 in Excel mit den Werten aller Cytosine der beiden *LTR5* Amplikons durchgeführt. Der Unterschied in der Konvertierungseffizienz zwischen *off-Chip* (99,2 % ± 0,6 %) und *on-Chip* (97,3 % ± 1,4 %) ist nach dem t-Test (p=0,006) signifikant.

Für den Vergleich der ungewollten Konvertierung von methylierten Cytosinen, wurden die 5 CpG Positionen des auf MDNA amplifizierten *LTR5* Amplikon 2 herangezogen. Da bei enzymatisch aufmethylierter MDNA der Methylierungsgrad nicht genau bestimmbar ist und dieser offenbar je nach CpG Position, stark unterschiedlich ist, wurden die einzelnen CpG Positionen beider Methoden miteinander verglichen (Abb. 25). Für das CpG13 wurden mit 67,5 % ± 1,0 % (*off-Chip*) und 67,2 % ± 0,3 % (*on-Chip*) im Rahmen der Messgenauigkeit identische prozentuale Methylierungswerte ermittelt. Beim CpG22 wurden mit 21,4 % ± 0,8 % *off-Chip* etwas höhere Werte gemessen als mit der *on-Chip* Methode mit 20,0 % ± 0,1 %. Für das CpG23 wurden mit 92,9 % ± 0,2 % (*off-Chip*) sowie mit 92,5 % ± 0,5 % *on-Chip* im Rahmen der Messgenauigkeit, identische Werte ermittelt. Sowohl beim CpG29 als auch beim CpG34 lagen die *off-Chip* Werte mit 34,4 % ± 0,6 % bzw. 44,2 % ± 0,8 % leicht über denen der *on-Chip* Werte mit 33,2 % ± 0,4 % bzw. 42,4 % ± 0,5 %. Mit Hilfe der NGS-basierten Amplikonsequenzierung konnten für die standardmäßige *off-Chip* Bisulfitkonvertierung sowie für die im Rahmen dieser Arbeit etablierte automatisierte *on-Chip* Bisulfitmethode nahezu vollständig übereinstimmende prozentuale CpG Methylierungswerte ermittelt werden.

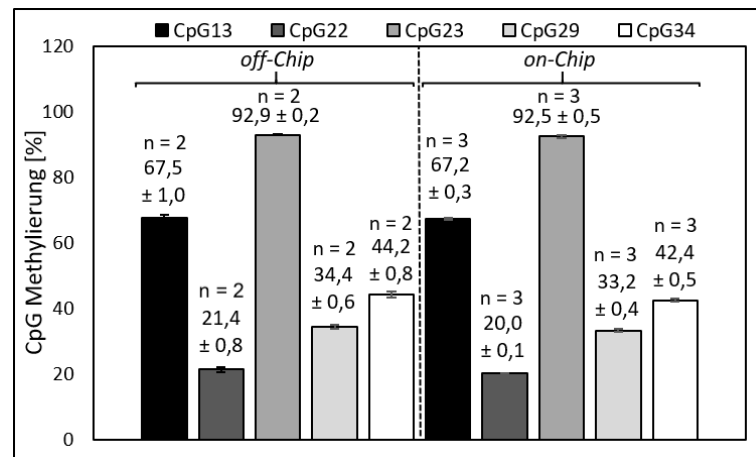


Abbildung 25: Vergleich der CpG Methylierung nach der Bisulfitkonvertierung mit der *off-Chip* und *on-Chip* Methode. Für die Bisulfitkonvertierung wurden ca. 243 ng MDNA verwendet. Die Methylierungswerte der einzelnen CpG Stellen des *LTR5* Amplikon 2 wurden nach der Konvertierung mit der *off-Chip* und *on-Chip* Methode verglichen, um eine ungewollte Konvertierung von methylierten Cytosinen durch die etablierte Methode zu demonstrieren. n: Anzahl der durchgeführten *off-Chip* bzw. *on-Chip* Konvertierungen.

Mindestens genauso essentiell wie eine zuverlässige Bisulfitkonvertierung ist die darauf folgende Aufreinigung der bisDNA. Dieser Schritt ist für die Detektion von DNA-Methylierungsmarkern mittels PCR-basierter Methoden unabdingbar. Die Aufreinigung von bisDNA erfolgt in der Regel mit Hilfe von Silikamatrices oder mit silikabeschichteten magnetischen Partikeln. Im folgenden werden die Ergebnisse des LoC-Transfers für beide Ansätze dargestellt.

4.2 LoC-Transfer einer silikamatrixbasierten alkoholhaltigen Aufreinigungsmethode

Die Aufreinigung von bisDNA ist besonders herausfordernd, da es sich um stark fragmentierte und hauptsächlich einzelsträngige DNA (ssDNA) handelt, welche zusätzlich durch die Reagenzien der Bisulfitkonvertierung, wie z.B. hochmolare Bisulfitsalze, kontaminiert ist. Die Etablierung der silikamatrixbasierten Aufreinigung mit alkoholhaltigen Waschpuffern, wurde im Rahmen der Abschlussarbeit von Denise Brünig [11] bearbeitet.

4.2.1 Identifizierung LoC-kompatibler Silikamatrices für die Aufreinigung von bisDNA

Zunächst galt es, ein geeignetes Material für die Aufreinigung von bisDNA in der *Vivalytic* Kartusche zu identifizieren. Daher wurden verschiedene Filtersäulchen aus kommerziell erhältlichen Bisulfitkonvertierungs Kits sowie Rohmaterial, welches ausgestanzt und in Macherey Nagel Filtersäulchen verbaut wurde, *off-Chip* auf ihre DNA-Ausbeute untersucht (Abb. 26). Hierfür wurden die Konvertierungs- und Aufreinigungsreagenzien des Premium

Bisulfite Kit (Diagenode) sowie des Lightning Kit (Zymo Research) verwendet. Für die Bisulfitkonvertierung wurde zwischen 300 ng und 1000 ng gescherte HCT116 DNA als Referenzmaterial eingesetzt. Diese DNA-Menge entspricht der vom Hersteller angegebenen Menge und gleichzeitig befindet man sich noch über der Detektionsgrenze des Qubit Fluorometers. Abb. 53 im Anhang, veranschaulicht, dass die eingesetzte DNA-Menge, keinen nennenswerten Einfluss auf die Ausbeute nach der Aufreinigung hat. Über den jeweiligen Balkendiagrammen in Abb. 26, sind die Aufbauschemata der verschiedenen Filtersäulchen dargestellt. Bei den ersten beiden Filtersäulchen handelte es sich um die Standardfiltersäulchen aus den verwendeten Bisulfit Kits. Diese werden industriell gefertigt und zeigten mit $73,90 \% \pm 8,34 \%$ (Diagenode) sowie $58,20 \% \pm 15,69 \%$ die höchste Ausbeute. Die silikamatrixbasierten Filter F und Filter B konnten als Rohmaterial bezogen werden. Daraus wurden mit einer Stanze, 3,4 mm große Filterscheibchen ausgestanzt und in die Filtersäulchenrohlinge von Macherey-Nagel in drei Lagen verbaut. Der Filter F zeigte mit $19,01 \% \pm 4,89 \%$ (Diagenode) und $11,36 \% \pm 5,18 \%$ (Zymo Research) eine etwas bessere DNA-Ausbeute als der Filter B mit $8,07 \% \pm 0,66 \%$ (Diagenode) und $6,56 \% \pm 0,66 \%$ (Zymo Research). Des Weiteren wurden die industriell gefertigten Filtersäulchen von r-Biopharm $50,00 \% \pm 1,54 \%$ sowie Analytik Jena $45,90 \% \pm 1,41 \%$ mit dem Diagenode Kit getestet. Trotz der hohen Ausbeuten und der geringen Standardabweichung, wurden keine weiteren Versuche mit dem Zymo Research Kit durchgeführt, da sich die Filter der r-Biopharm und Analytik Jena Filtersäulchen nicht ohne Beschädigung des Filtermaterials ausbauen ließen. Somit standen diese für eine spätere Integration in die *Vivalytic* Kartusche, nicht zur Verfügung. Neben hohen DNA-Ausbeuten, ist es entscheidend, dass sich die Silikamatrices bündig in die Kartusche integrieren lassen. Im Folgenden wurde deshalb mit den Silikamatrices von Diagenode sowie dem Filter F weitergearbeitet (Abb. 26, grüne Umrandung). Für die Konvertierung und Aufreinigung wurden die Reagenzien von Diagenode verwendet.

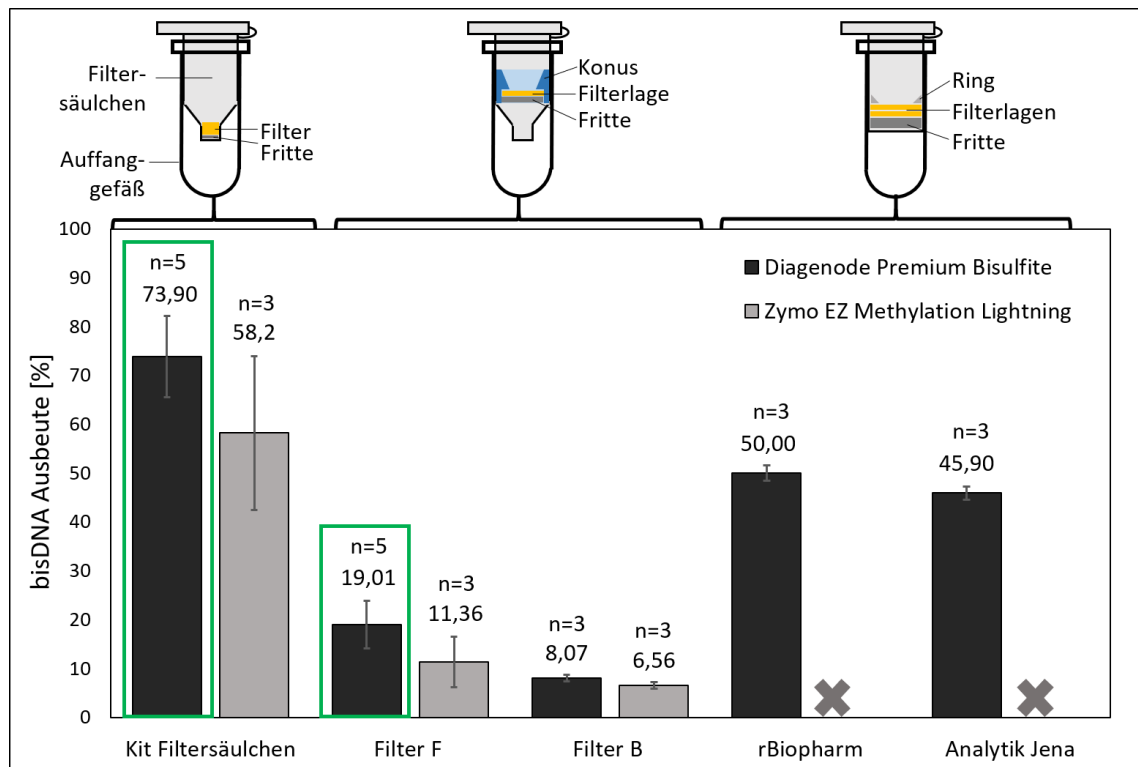


Abbildung 26: Identifizierung geeigneter LoC-kompatibler Silikamatrices für die Aufreinigung von bisDNA. Es wurden die Konvertierungs- und Aufreinigungsreaktionen des Diagenode Premium Bisulfite Kits (schwarz) sowie des Zymo EZ Methylation Lightning Kits (grau) verwendet. Neben den Filtersäulchen aus den beiden Kits, wurden noch die Filtersäulchen von rBiopharm sowie von Analytik Jena verwendet. Darüber hinaus wurden die Filter F und Filter B, welche als Rohmaterial beziehbar sind, ausgestanzt (3,4 mm Durchmesser) und mit je drei Lagen in Macherey-Nagel Filtersäulchen verbaut. Die Filtersäulchen von rBiopharm und Analytik Jena wurden lediglich mit den Reagenzien von Diagenode getestet, da sich die Filter nicht ohne Beschädigung aus den Filtersäulchen, ausbauen ließen. Grüne Rahmen heben die Filtermaterialien hervor, welche für *on-Chip* Versuche in die *Vivalytic* Kartusche integriert wurden. In Anlehnung an [11].

Auffällig war, dass alle kommerziell erhältlichen Silikamatrices, welche für die Aufreinigung von bisDNA standardmäßig verwendet werden, besonders dick sind. Die Dicke der Filter stellt eine Herausforderung bei deren Integration in die *Vivalytic* Kartusche dar, da zum Einen ein hoher Druck aufgebracht werden muss, damit die Reagenzien die Filter passieren können und zum Anderen sind die Filter zum Teil deutlich höher, als die Filterkammer der *Vivalytic* Kartusche. Trotz des Aufpräßen der Filterkammer, wodurch die Höhe der Filterkammer in Prototypen, von 0,8 mm auf 1,4 mm erhöht werden konnte, musste die Silikamatrix von Diagenode noch gekürzt werden. Der Durchmesser der Standardfilterkammer beträgt 3,2 mm. Beim Filter F handelt es sich nicht explizit um eine Silikamatrix für die Aufreinigung von bisDNA. Allerdings konnte auch hier gezeigt werden, dass mehrere Lagen an ausgestanzten Filterscheibchen, eine bessere DNA-Ausbeute lieferten (Abb. 27).

Standardmäßig werden für die Aufreinigung von bisDNA, alkoholhaltige Waschpuffer verwendet. Da Alkohol, je nach Kontaktdauer, die TPU beschädigen kann und da Alkoholdämpfe im mikrofluidischen System, zur Inhibierung oder Beeinträchtigung von Polymerasen führen können, wurden verschiedenen Alternativen an polymerhaltigen Waschpuffern getestet und optimiert. Die hohe Viskosität dieser Waschpuffer, erschwert zusätzlich das Durchdringen der dicken Silikamatrices. Außerdem wurde die gebundene bisDNA von der Silikamatrix gewaschen, was zu hohen Ausbeuteverlusten führte (Daten nicht gezeigt) [11]. Aus diesen Gründen, wurden diese Ansätze nicht weiter verfolgt.

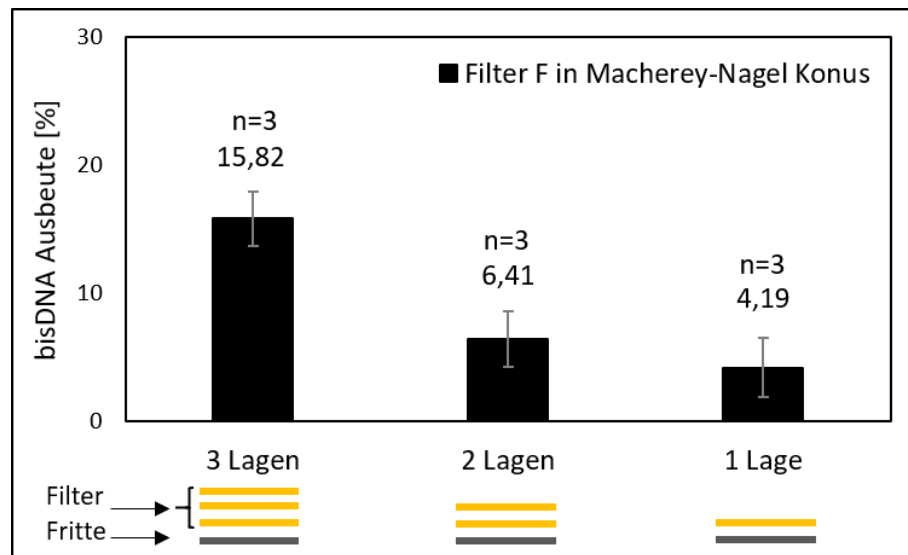


Abbildung 27: *Off-Chip* Aufreinigung von bisDNA mittels unterschiedlicher Lagen an Silikamatrices. Die ausgestanzten Filterscheibchen des Filter F mit 3,4 mm Durchmesser, wurden als einfache, zweifache und dreifache Lage im Macherey Nagel Konus verbaut. Für die Bisulfitkonvertierung mittels Premium Bisulfit Kit (Diagenode) wurden 500 ng an gescherter HCT116 DNA eingesetzt. Die konvertierte DNA wurde mit den Reagenzien des Premium Bisulfit Kits (Diagenode) konvertiert. In Anlehnung an [11].

Anders als der Filter F, welcher als Rohmaterial bezogen und mit Hilfe einer Stanze auf die richtige Größe gebracht werden konnte, mussten für die bündige Integration der Diagenode Filter in die Filterkammer der *Vivalytic* Kartusche, verschiedene Ansätze entwickelt werden, welche im Folgenden veranschaulicht werden.

4.2.2 Integration LoC-kompatibler Silikamatrices in die *Vivalytic* Kartusche und automatisierte Aufreinigung von bisDNA

Einige Filtermaterialien sind nicht als Rohmaterial, sondern nur in Filtersäulchen verbaut beziehbar, was eine Integration in mikrofluidische Systeme, erschwert. Häufig lassen sich diese Filtermaterialien nicht ohne dessen Beschädigung ausbauen. Außerdem sind die Durchmesser der Filtermaterialien im Filtersäulchen zu klein oder die Filtermaterialie zu dick für eine bündige Integration in die *Vivalytic* Kartusche. Um solche Filtermaterialien trotzdem in der *Vivalytic* Kartusche einsetzen zu können, wurden zwei Ansätze für die

bündige Integration von Filtermaterialien aus den Filtersäulchen entwickelt (siehe Abb. 28). In Ansatz A wurde mit einer Mikrofräse, der Plastikonus der Filtersäulchens von außen abgetragen, so dass der Durchmesser des Filtersäulchens mit Silikamatrix, genau 3,2 mm betrug. Außerdem wurden zwei Einkerbungen mit 1,4 mm Abstand gesetzt, wodurch der Filter in der Plastikummantelung, mit einem Skalpell sauber durchtrennt werden konnte und die Fritte sowie die untere Plastikstützstruktur abgetrennt werden konnten. Am oberen Rand des Plastikrings wurde mit der Fräse zusätzlich eine Vertiefung angebracht, um die Mikrofluidik durch den integrierten Plastikring nicht zu blockieren. Mit diesem Baukastenprinzip, lassen sich die Filter ohne den Einsatz von Klebstoff, bündig in die Filterkammer der *Vivalytic* Kartusche integrieren.

Im Ansatz B wird ein 3D gedruckter Ring gefertigt, welcher dem gefrästen Plastikring des Filtersäulchens aus Ansatz A entspricht. Plastikstützstruktur, Fritte und überschüssiger Filter werden durch ein Skalpell an der Einkerbung abgetrennt. Somit beträgt die Höhe des Filters im Filtersäulchen noch 1,4 mm. Setzt man das Filtersäulchen auf den 3D gedruckten Ring, kann man den Filter aus dem Säulchen in den Ring überführen und diesen bündig in die Kartusche einbauen. Für beide Ansätze, wurde die Filterkammer mit einer Mikrofräse auf eine Tiefe von 1,4 mm vergrößert. Beim Einbau des Filter F wurde zusätzlich zur Tiefe, zum Teil auch noch der Standarddurchmesser der Filterkammer von 3,2 mm auf 3,8 mm und 4,5 mm vergrößert. Für die Aufreinigung von bisDNA mit diesen verbauten Silikamatrices, wurde ein fluidischer Ablauf etabliert und optimiert (siehe Abschnitt 3.2.6). Dabei wurden alkoholische Waschpuffer eingesetzt. Der Diagenode Filter zeigt sowohl mit dem Integrationsansatz A $5,43 \% \pm 1,44 \%$ als auch mit Ansatz B $6,64 \% \pm 4,30 \%$ deutlich geringere DNA-Ausbeuten als mit der *off-Chip* Methode (Abb. 28). Bei Filter F hingegen konnten Ausbeuten von bis zu $14,48 \% \pm 3,51 \%$ bei einem Durchmesser der Filterscheibchen von 3,4 mm und dem Standardfilterkammerdurchmesser von 3,2 mm erreicht werden. Aus diesem Grund und da sich der Filter F deutlich einfacher in die Filterkammer integrieren lässt, wurden alle Folgeversuche mit diesem Filter durchgeführt.

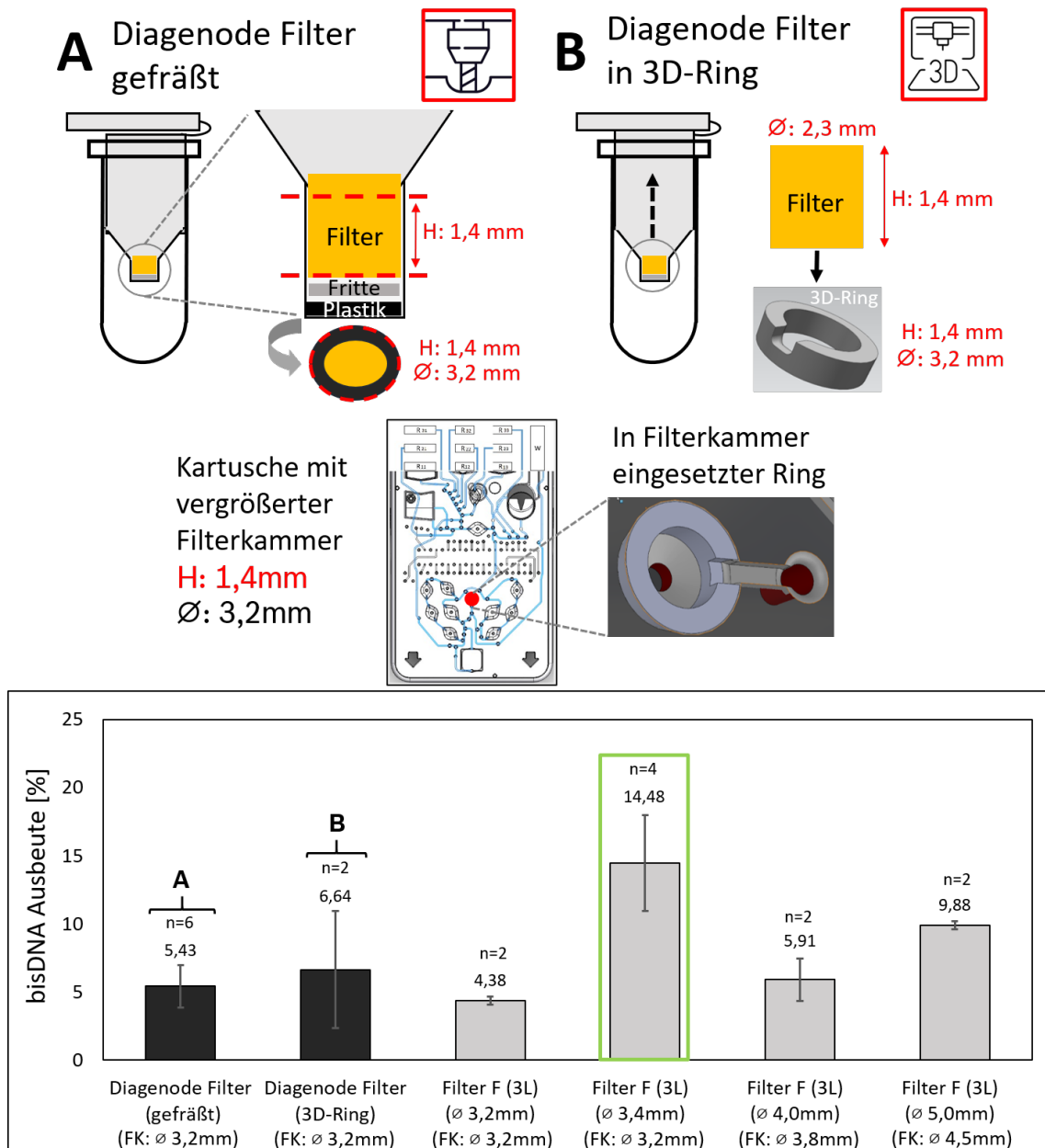


Abbildung 28: Integration von Silikamatrixen in die *Vivalytic* Kartusche. (A) Anpassung der Filtersäulchen (Diagenode) mit Hilfe einer Mikrofräse. (B) Überführung des Filters (Diagenode) in einen passgenauen 3D gedruckten Kunststoffring. Außerdem wurden gestanzte Filterscheibchen des Filter F mit verschiedenen Durchmessern in Filterkammern mit unterschiedlichem Durchmesser integriert. Die Höhe der Filterkammer betrug in allen Fällen 1,4 mm. Es wurden 700 ng an gescherter HCT116 DNA *off-Chip* mit dem Diagenode Kit konvertiert und in der Kartusche aufgereinigt. Der grüne Rahmen markiert den Ansatz, der die größte Ausbeute lieferte und mit welchem in den Folgeversuchen weitergearbeitet wurde. In Anlehnung an [11].

Im Folgenden wurden ausschließlich drei Lagen des Filter F mit 3,4 mm Durchmesser in eine 1,4 mm tiefe Filterkammer mit 3,2 mm Durchmesser, verbaut. Für die Aufreinigung in der Kartusche wurde der optimierte fluidische Ablauf (siehe Abschnitt 3.2.5) mit alkoholischen Waschpuffern verwendet. Um die Eignung der etablierten Aufreinigungsmethode sowohl für präparative als auch diagnostische Anwendungen zu demonstrieren, wurden 500 ng, 50 ng, 5 ng und 0,5 ng an gescherter HCT116 DNA in Triplikaten *off-Chip* konvertiert und *on-Chip* aufgereinigt (Abb. 29). Die Quantifizierung der aufgereinigten bisDNA erfolgte mit Hilfe des CFF Assay nach [130], aufgrund der niedrigeren Nachweisgrenze dieser Methode. Wenn auch mit hohen Standardabweichungen, konnten alle DNA-Mengen in der Kartusche aufgereinigt werden, was die Eignung des Verfahrens sowohl für präparative Anwendungen als auch für diagnostische Anwendungen, veranschaulicht. Im Rahmen der Messgenauigkeit, lagen die DNA-Ausbeuten bei allen eingesetzten DNA-Mengen im selben Bereich. Beim Ansatz mit 500 ng gescherter HCT116 DNA konnten $9,27\% \pm 3,18\%$ der eingesetzten DNA mit der geringsten Standardabweichung wiedergewonnen werden. Auch der 5 ng Ansatz zeigte mit $10,48\% \pm 4,48\%$ eine ähnliche Ausbeute und Standardabweichung. Die 50 ng sowie die 0,5 ng Ansätze wiesen mit $21,51\% \pm 13,14\%$ sowie $20,26\% \pm 14,74\%$ die größten Standardabweichungen auf.

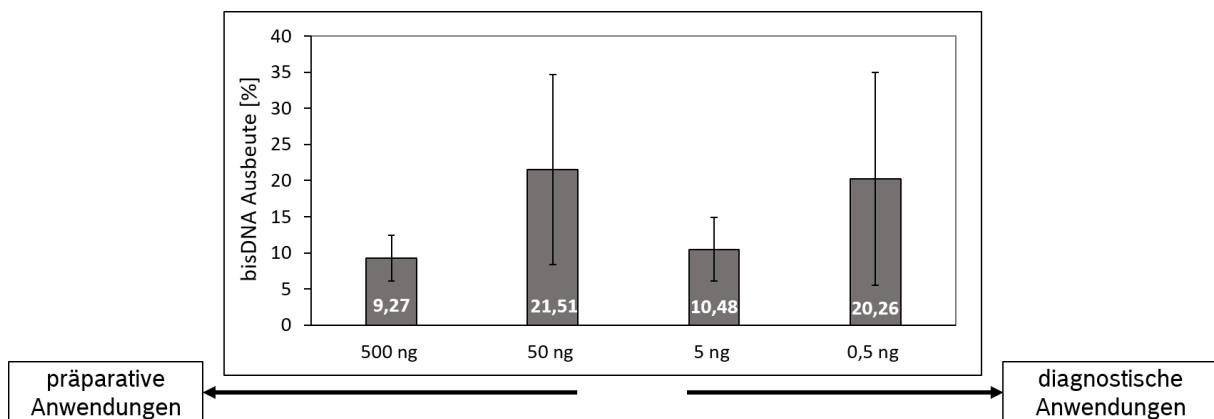


Abbildung 29: *On-Chip* Aufreinigung verschiedener DNA Mengen in der *Vivalytic* Kartusche. Es wurden 500 ng, 50 ng, 5 ng und 0,5 ng in Triplikaten ($n = 3$) mit dem etablierten Aufreinigerungsverfahren mit verbautem Filter F aufgereinigt [192]. Die Quantifizierung der aufgereinigten bisDNA erfolgt mit dem CFF Assay nach [130]

4.2.3 Verifizierung der silikamatrixbasierten Aufreinigung für den Einsatz im LoC-System

Wie bereits erwähnt, ist die Aufreinigung von bisDNA, aufgrund der starken Kontamination mit den Bisulfitreagenzien, besonders herausfordernd, da auch noch nach der Aufreinigung, Verunreinigungen vorhanden sein können, welche PCR-basierte Methoden inhibieren können. In qPCR Reaktionen mit flüssigen Mastermix Komponenten, werden in der Regel 2 bis 5 μl an aufgereinigter DNA-Lösung eingesetzt. In mikrofluidischen Systemen werden stattdessen lyophilisierte Mastermixe verwendet, welche nur ein sehr

geringes Eigenvolumen aufweisen und eine Lagerung bei RT ermöglichen, was für eine LoC-basierte PoC Diagnostik unabdingbar ist. Daher können bis zu 20 μl Eluat in qPCR Reaktionen eingesetzt werden. Dies ist besonders bei diagnostischen Anwendungen mit limitiertem Probenmaterial von Vorteil, da somit die Sensitivität der Detektion gesteigert werden kann. Dies stellt besondere Anforderungen an das vorgeschaltete Aufreinigungsverfahren, da mehr potenzielle Verunreinigungen mit inhibierenden Eigenschaften in die qPCR Reaktion eingebracht werden können. Aus diesem Grund wurde das Standard *off-Chip* Aufreinigungsverfahren (Diagenode) so durchgeführt, dass in der nachfolgenden *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR trotz unterschiedlicher Eluatvolumina im Reaktionsansatz, stets die selbe DNA-Menge eingesetzt wurde, um einen möglichen inhibierenden Effekt auch tatsächlich auf Verunreinigungen im Eluat und nicht auf unterschiedliche Templatmengen zurück zu führen (Tab. 11).

Bei der Elution der bisDNA von der Kartusche, erhält man zwei *Plugs* mit jeweils 20 μl Volumen, wobei der erste *Plug* in der Regel verworfen wird, da die verwendeten lyophilisierten Mastermix *Beads* i.d.R. für 20 μl ausgelegt sind, was dem Fassungsvermögen einer PCR Kammer entspricht. Außerdem beinhaltet der erste *Plug* mehr Blasen, was die qPCR, insbesondere die Aufnahme des Fluoreszenzsignals, stören kann. Im hier durchgeführten Experiment wurden neben 20 μl Eluat, 16 μl , 12 μl , 8 μl , 4 μl und 2 μl eingesetzt und jeweils mit ddH₂O auf 20 μl aufgefüllt. Durch die konstante Amplifikation von *ACTB* (Abb. 30), lässt sich erkennen, dass in allen Verdünnungen, die selbe DNA-Menge vorhanden war. Für den *SEPT9* Marker konnten lediglich bis zu 4 μl Eluat, was einer 1:5 Verdünnung entspricht, saubere qPCR Kurven generiert werden. Bei 8 μl Eluat (1:2,5), erhöhte sich der Ct-Wert bereits auf $39,5 \pm 2,1$, wobei noch 3/3 Kurven detektiert werden konnten. Beim Einsatz von 12 μl , 16 μl und 20 μl Eluat, konnten keine geeigneten Kurven mehr generiert werden und in allen Fällen lagen die Ct-Werte bei über 40. Bereits mit der Standard *off-Chip* Aufreinigungsmethode, konnte ein deutlicher inhibierender Effekt beim Einsatz größerer Eluatvolumina gezeigt werden.

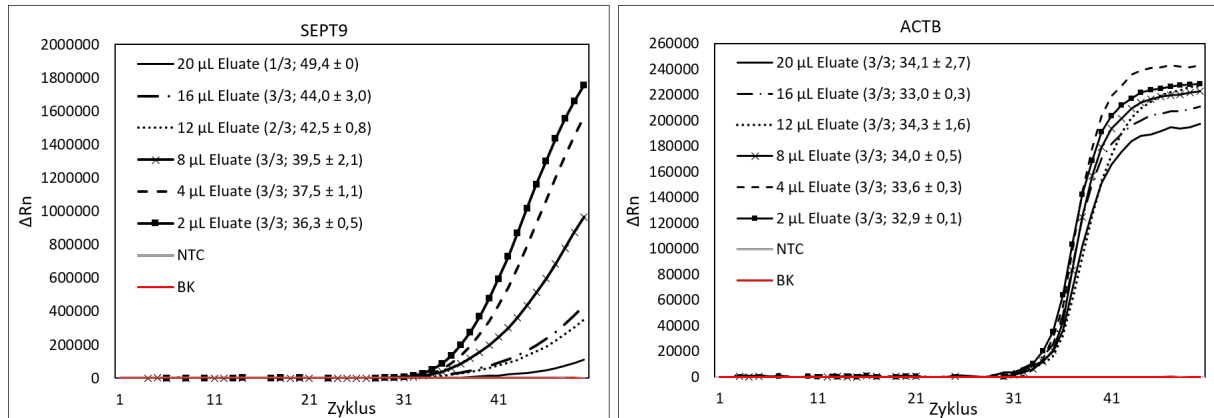


Abbildung 30: Kompatibilitätsuntersuchungen der Standard *off-Chip* Aufreinigungsmethode mit der etablierten LoC-kompatiblen *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR Methode. Es wurden konstant 2 ng an gescherter HCT116 DNA in der Bisulfitkonvertierung eingesetzt und von 2 µl, 4 µl, 8 µl, 12 µl, 16 µl sowie 20 µl Eluat in der qPCR eingesetzt. Links sind die gemittelten Kurven der *SEPT9* Amplifikation und rechts der *ACTB* Amplifikation abgebildet (n = 3). Des Weiteren wird die Anzahl der erfolgreich Amplifikationen sowie der gemittelte Ct-Wert mit Standardabweichung angegeben. Die qPCR wurde mit dem lyophilisierten Mastermix von Jena Bioscience durchgeführt und die Oligonukleotide auf der qPCR Platte vorgetrocknet. In Anlehnung an [177].

Das gewonnene Eluat, lässt sich in den PCR Strängen nur schlecht weiter verdünnen, um die Konzentration an möglichen Inhibitoren herab zu setzen. Außerdem lassen die geringen Ausbeuten an bisDNA eine weitere Verdünnung nahezu nicht zu. Aufgrund der ungenügenden Aufreinigungseffizienz dieser Methode, sowie der Notwendigkeit der Verwendung von alkoholischen Waschpuffern, wurde eine weitere alkoholfreie Aufreinigungsmethode, unter Verwendung silikabeschichteter magnetischer Partikel, entwickelt.

4.3 Etablierung einer alkoholfreien Aufreinigungsmethode mittels silikabeschichteter magnetischer Partikel sowie deren Transfer in das LoC-System

Da die Prozessiereinheiten für die *Vivalytic* Kartusche, sowie der Analyzer noch keine Magneten aufweisen, musste für die Etablierung und den Transfer der Aufreinigungsmethode, mit einem externen Magneten gearbeitet werden. Für die Verwendung magnetischer Partikel, musste kein aufwendiger Prototypenbau betrieben werden, da die Suspension mit den magnetischen Partikeln einfach an der gewünschten Stelle in die Kartusche gegeben werden kann. Die Suspension lässt sich dann mit Hilfe von Pumpschritten durch das mikrofluidische System befördern. Es wurden der Kartuschentyp 2 (siehe Abschnitt 1.4.2, Abb. 9) für alle Experimente mit magnetischen Partikeln, verwendet. Aufgrund ähnlicher Bedingungen *off-Chip* und *on-Chip*, lassen sich die *off-Chip* etablierten und optimierten

Protokolle der Aufreinigung mit magnetischen Partikeln leichter in die *Vivalytic* Kartusche integrieren, als es bei den Protokollen mit Silikamatrix der Fall ist. Außerdem können bei der Aufreinigung mit magnetischen Partikeln, hochviskose Puffer und Reagenzien wie alkoholfreie, Polymer-basierte Waschpuffer verwendet werden, ohne dass es zum Blockieren von Filtern kommt.

4.3.1 Vergleich der etablierten alkoholfreien *on-* und *off-Chip* Aufreinigungsmethoden mit der alkoholhaltigen Standard *off-Chip* Methode

Da das Standardprotokoll (Epigenomics) neben alkoholhaltigen Waschpuffer auch alkoholfreie Waschpuffer einsetzt, wurde zunächst ein alkoholfreies *off-Chip* Protokoll mit geeigneten magnetischen Partikeln (Epigenomics) etabliert (siehe Abschnitt 3.2.7). Auch hier wurde während der Aufreinigung keine Desulfonierung durchgeführt, weshalb die mittels Qubit Fluorometer bestimmten Werte, mit dem zuvor ermittelten Korrekturfaktor korrigiert wurden. Auch hier wurde gescherte HCT116 DNA eingesetzt. Als Referenzmethode wurde die Standard Konvertierungs- und Aufreinigungsmethode von Epigenomics (Epi Std *off-Chip*) verwendet (Abb. 31). Mit dieser alkoholhaltigen Methode konnte $78,9 \% \pm 2,3 \%$ der eingesetzten DNA wiedergewonnen werden. Im nächsten Schritt wurden die mittels Epigenomics Kit konvertierten Ansätze mit der in dieser Arbeit etablierten Methode (Epi *Off-Chip*), ohne alkoholhaltige Waschpuffer und mit hochmolarem GuHCl Bindepuffer (Diagenode), aufgereinigt (Abb. 31). Mit dieser Methode konnten Ausbeuten von $62,9 \% \pm 8,5 \%$ erzielt werden. Da für den Gesamtablauf das Premium Bisulfite Kit (Diagenode) verwendet werden soll, wurde die gescherte HCT116 DNA nun mit diesem Kit konvertiert und im Anschluss mit der neuen alkoholfreien Methode aufgereinigt (Diag *off-Chip*). Hier konnten ähnlich hohe Ausbeuten von $56,2 \% \pm 3,3 \%$, wie bei der Aufreinigung mit der Silikamatrix, erreicht werden (Abb. 26). Die etablierte Aufreinigungsmethode in der *Vivalytic* Kartusche (*on-Chip*) zeigte im Rahmen der Messgenauigkeit, vergleichbare Ausbeuten wie die *off-Chip* Methode. In der Tabelle unter der Abbildung (Abb. 31) werden darüber hinaus die Bindezeiten (t_{Bind}), Trocknungszeiten (t_{trocknen}) und Elutionszeiten (t_{Elution}) sowie die Volumina des Bindschritts (V_{Bind}) der verschiedenen Methoden aufgeführt. Durch die Optimierung des Protokolls kann nicht nur ein alkoholfreier Puffer eingesetzt werden sondern auch eine deutliche Zeitreduktion erzielt werden. Außerdem wird kein Trocknungsschritt zum Verdunsten des Alkohols benötigt.

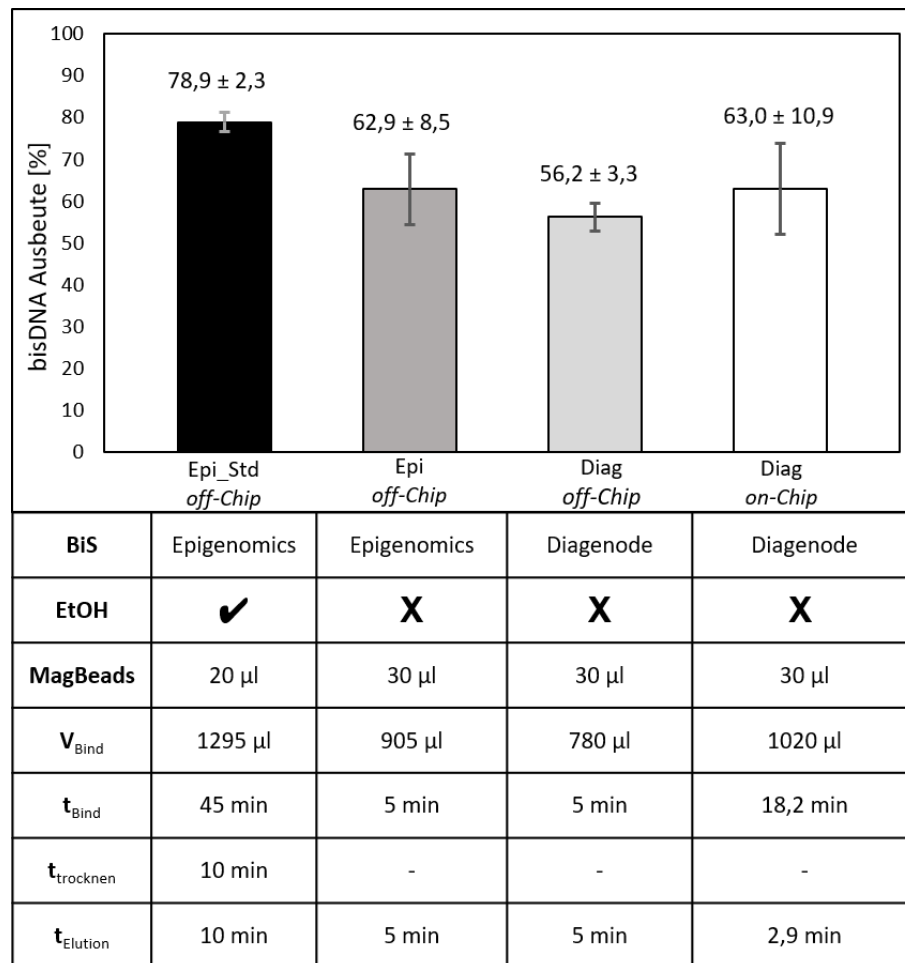


Abbildung 31: Aufreinigung von bisDNA mit Hilfe von silikabeschichteten magnetischen Partikeln. *Epi_Std off-Chip*: Epigenomics Standardprotokoll mit alkoholhaltigen Puffern (schwarzer Balken). *Epi off-Chip*: Epigenomics Bisulfitkonvertierung, Aufreinigung mit alkoholfreien Puffern (dunkelgrauer Balken). *Diag off-Chip*: Diagenode Bisulfitkonvertierung, *off-Chip* Aufreinigung mit alkoholfreien Puffern (hellgrauer Balken). *Diag on-Chip*: Diagenode Konvertierung, *on-Chip* Aufreinigung mit alkoholfreien Puffern (weißer Balken). Die Tabelle zeigt das verwendete Bisulfit Kit (BiS), das Vorhandensein von EtOH, die Bindevolumina (V_{Bind}), Bindezeiten (t_{Bind}), Trocknungszeiten (t_{trocknen}) und Elutionszeiten (t_{Elution}). Es wurden 1000 ng gescherte HCT116 DNA je Bisulfitkonvertierungsreaktion eingesetzt.

4.3.2 Etablierung und Optimierung eines mikrofluidischen Ablaufs für die alkoholfreie Aufreinigungsmethode mit silikabeschichteten magnetischen Partikeln

Für die Durchführung der automatisierten Aufreinigung mit Hilfe von magnetischen Partikeln in der *Vivalytic* Kartusche, musste zunächst ein mikrofluidischer Ablauf generiert und optimiert werden. Bei der Aufreinigung mit magnetischen Partikeln in mikrofluidischen Systemen, können die magnetischen Partikel leicht durch die großen Kräfte die

bei den Pumpschritten entstehen, aus dem System ausgetrieben werden. Dies würde zu Verlusten der an die Partikel gebundenen bisDNA führen. Durch peristaltisches Pumpen mit Hilfe dreier hintereinander geschalteter Ventile, lassen sich zwar die erzeugten Kräfte durch Generierung eines annähernd laminaren Flusses reduzieren, allerdings können somit die großen Volumina an Puffern und Wasser nicht schnell genug transportiert werden. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Aufreinigungsprotokoll etabliert, welches die Reaktionskammer und die rechts davon gelegene Pumpkammer und Ventile des Kartuschentyp 2 verwendet (siehe Abschnitt 1.4.2, Abb. 9). Die Reaktionskammer eignet sich durch ihre Geometrie ideal für die Aufreinigung mit magnetischen Partikeln, da somit die Magnetkraft des händisch aufgelegten Magneten ausreicht, um die mit jedem Pumpschritt in die Kammer beförderten magnetischen Partikel abzufangen und auch am Magneten zu halten. Somit lassen sich große Volumina schnell und reproduzierbar prozessieren und der Verlust von magnetischen Partikeln auf ein Minimum reduzieren. Die Dauer des Bineschritts beträgt *on-Chip* 18,2 min (Abb. 31), da zunächst Bindepuffer (BP) zu den magnetischen Partikeln in die Mischkammer (MK) gepumpt und anschließend der Bisulfitanatz aus der Reaktionskammer dazu gepumpt wird. Die Reaktionskammer wird dreimal mit frischem Bindepuffer gespült, um eine möglichst große Ausbeute an bisDNA zu erreichen. Um die magnetischen Partikel mit dem Bindepuffer sowie dem Bisulfitanatz zu mischen, werden diese 50 mal im Kreis gepumpt und im Anschluss für 2 min inkubiert (Abb. 32). Für die Durchführung der Aufreinigung wurde ein Volumen von 30 μ l an magnetischen Partikel verwendet. Diese Menge an magnetischen Partikeln ließ sich noch ohne Probleme im fluidischen System prozessieren und zeigte bereits im *off-Chip* Protokoll eine schnelle Bindung der bisDNA an die Partikel (Abb. 32). Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte *off-Chip* Methode, welche die gleichen Reagenzien verwendet wie die *on-Chip* Methode, ist mit 5 min Bindezeit sogar noch schneller. Die 18,2 min der *on-Chip* Methode ergeben sich also hauptsächlich durch die mikrofluidische Prozessierung der Reagenzien. Weitere Optimierungen könnten hier zu einer weiteren Zeitersparnis führen, da die Inkubations- und Mischschritte sowie die Entleerung der Reaktionskammer mit dreifachen Nachspülung mit frischem Bindepuffer, recht großzügig gewählt wurden. In beiden Fällen, sowohl *on-Chip* als auch *off-Chip*, ist der Bineschritt in der im Rahmen dieser Arbeit etablierten und optimierten Methode schneller, als die Standardmethode mit alkoholhaltigen Reagenzien.

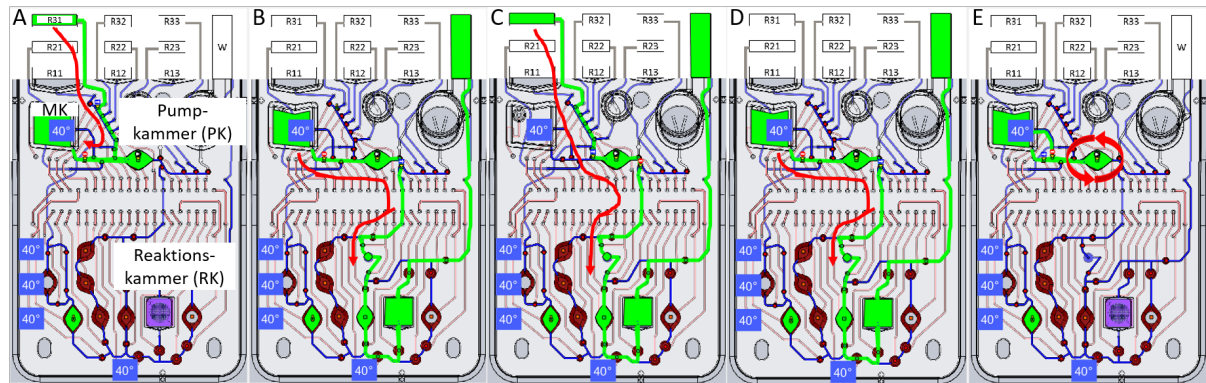


Abbildung 32: Mikrofluidischer Ablauf des Bineschritts. (A) 3 Pumphübe (PHs) BP (Diagenode) aus R31 in PK verwerfen (nicht gezeigt). BP zu magnetischen Partikeln (30 μ l) in MK (10 PHs). (B) Bisulfitansatz von der Reaktionskammer (RK) in die MK (12 PHs). (C, D) Frischer BP in RK pumpen, dann in die MK (3 x wiederholen). (E) Magnetische Partikel, BP und Bisulfitansatz im Kreis zirkulieren (50 PHs), anschließend 2 min Inkubation (MK).

Nach dem Bineschritt, in welchem die bisDNA unter chaotropen Bedingungen an die silikabeschichteten magnetischen Partikel gebunden wurde, wird die Suspension über die Reaktionskammer in Richtung Abfallgefäß gepumpt mit 50 PHs (0,3 Hz) gepumpt (Abb. 33). Durch Anlegen eines externen Magneten an die Reaktionskammer können die magnetischen Partikel effizient abgefangen werden und somit deren Austreibung aus dem System, verhindert werden. Der Waschschrift wird *on-Chip* wie auch *off-Chip* mit einem polymerhaltigen Waschpuffer durchgeführt, welcher über das vom Magneten gehaltene Pellet aus magnetischen Partikeln mit gebundener bisDNA, gepumpt wird. Optional kann das Pellet im Waschpuffer, wie beim Elutionsschritt (Abb. 34, Schritt A-C), durch ein zirkulierendes Pumpen, resuspendiert und im Anschluss durch erneutes Anlegen des Magneten, wieder abgeschieden werden. Durch die eckige Form der Reaktionskammer, ist es von Vorteil, zunächst den Großteil des Inhalts durch Verwendung der benachbarten Pumpkammer, zu entfernen. Durch einen peristaltischen Pumpschritt mit Hilfe von drei hintereinander geschalteten Ventilen, lässt sich der Füllstand der Reaktionskammer gleichmäßig senken und sich diese nahezu rückstandslos entleeren. Im Anschluss werden die Waschschriftte noch einmal mit ddH₂O wiederholt, um den polymerhaltigen Waschpuffer möglichst rückstandslos aus dem mikrofluidischen System zu entfernen. Um weitere Verschleppungen von Reagenzien zu vermeiden, ist es entscheidend, das mikrofluidische System stets ausreichend mit ddH₂O zu spülen (nicht gezeigt). In der Regel wird auch das ddH₂O wieder mit Luft aus dem mikrofluidischen System verdrängt. Vor dem Elutionsschritt, wird das System mit Elutionspuffer anstatt mit ddH₂O gespült.

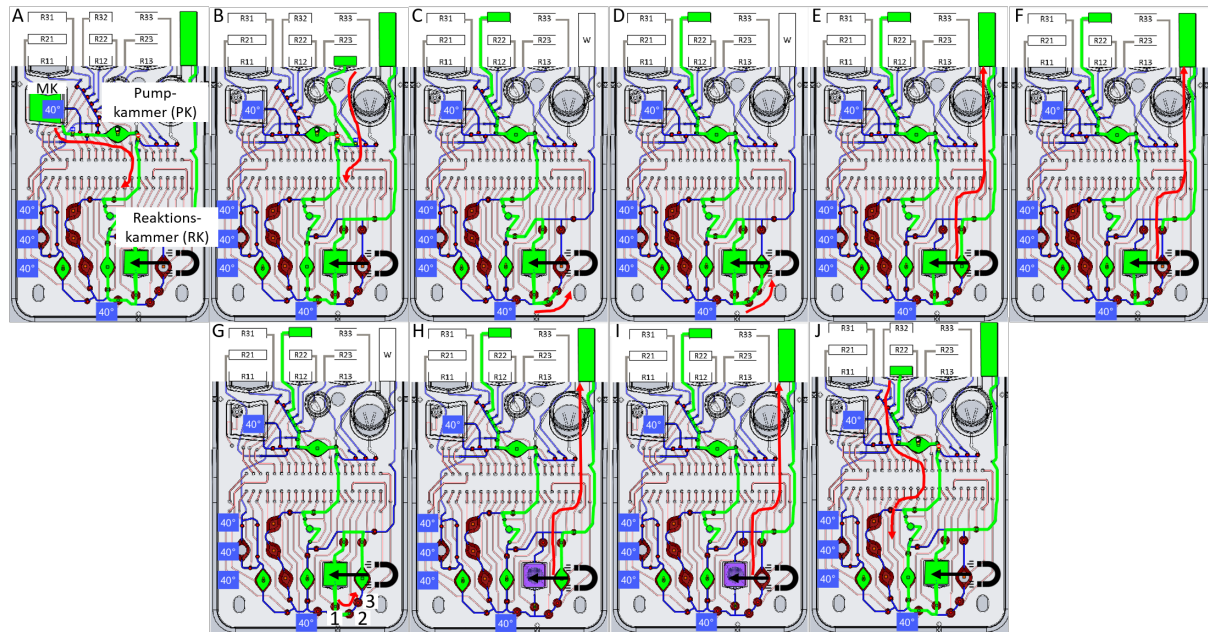


Abbildung 33: Mikrofluidischer Ablauf des Waschschriffs. (A) Abscheiden der magnetischen Partikel mit Hilfe eines externen Magneten in der Reaktionskammer (50 Phs, 0,3 Hz). (B) Spülen des Pellets an magnetischen Partikeln mit einem polymerhaltigen Waschlösung (20 PHs, 0,5 Hz). (C - F) Entleerung der Reaktionskammer durch Befüllen und Ausdrücken der nebenliegenden Pumpkammer (2-4 Mal). (G - I) Restliche Entleerung der Reaktionskammer mit Hilfe eines peristaltischen Pumpschritts (Reihenfolge der benötigten Ventile ist durchnummeriert). (J) Wiederholung der vorherigen Schritte mit ddH₂O zur Entfernung von Polymerresten des Waschlösungspuffers.

Für die Elution der bisDNA von den magnetischen Partikeln wird die Reaktionskammer über das bereits mit Elutionspuffer vorgespülte mikrofluidische System mit vier Pumpeinheiten mit Elutionspuffer befüllt (Abb. 34). Für die Elution können je nach gewünschtem Verdünnungsgrad, zwischen zwei und vier Pumpeinheiten an Elutionspuffer in die Reaktionskammer gepumpt werden. Auch eine weitere Feinjustierung des Volumens an Elutionspuffer ist mittels peristaltischer Pumpen möglich. Die Verdünnung des Eluats ist durch die Verwendung der Reaktionskammer für die Aufreinigung, deutlich einfacher als es in den PCR Kammern bei der silikamatrixbasierten Aufreinigung der Fall ist. Der Elutionsvorgang benötigt bei der im Rahmen dieser Arbeit entwickelten automatisierten *on-Chip* Aufreinigung lediglich 2,9 min (Abb. 31). Durch die Verwendung der Pumpkammer rechts neben der Reaktionskammer, kann das Pellet an magnetischen Partikeln durch zirkulierendes Pumpen im Kreis, resuspendiert werden. Hierbei wurden 80 PHs (0,5 Hz) gewählt, um die bisDNA schnell von den magnetischen Partikeln abzulösen. Darüber hinaus kann durch den Heizer der Reaktionskammer eine Temperatur von 60 °C angelegt werden, was sich ebenfalls positiv auf den Elutionsvorgang auswirkt. Durch ein erneutes im Kreis pumpen (30 PHs), mit aufgelegtem Magneten, können die magnetischen Partikel in der RK abgeschieden werden. Um ein maximales Eluatvolumen in der Reaktionskammer zu erhalten, kann das Eluat aus dem mikrofluidischen Kanal sowie den Ventilen und der

Pumpkammer des Kreislaufs, durch peristaltisches Pumpen in die Reaktionskammer befördert werden. Die Reihenfolge der hierfür verwendeten Ventile sind in Abb. 34, Schritt D dargestellt. Das Eluat kann an dieser Stelle durch Anbohren der Reaktionskammer, aus der *Vivalytic* Kartusche entfernt werden und für *off-Chip* qPCR Reaktionen verwendet werden oder nach weiterem Spülen des mikrofluidischen Systems mit ddH₂O, zum Lösen des vorgelagerten lyophilisierten Mastermix und der vorgetrockneten Oligonukleotide, verwendet werden. Hierfür wird die entsprechende Kammer mit 25 peristaltischen Pumpzyklen befüllt. Während sich der Mastermix und die Oligonukleotide lösen, werden die benötigten PCR Kammern bereits mit Elutionspuffer und im Anschluss mit Luft gespült. Außerdem werden bereits die Heizer der PCR Kammern vorgeheizt. Die Etablierung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR sowie deren Transfer auf die *Vivalytic* Kartusche wird im nachfolgenden Kapitel behandelt.

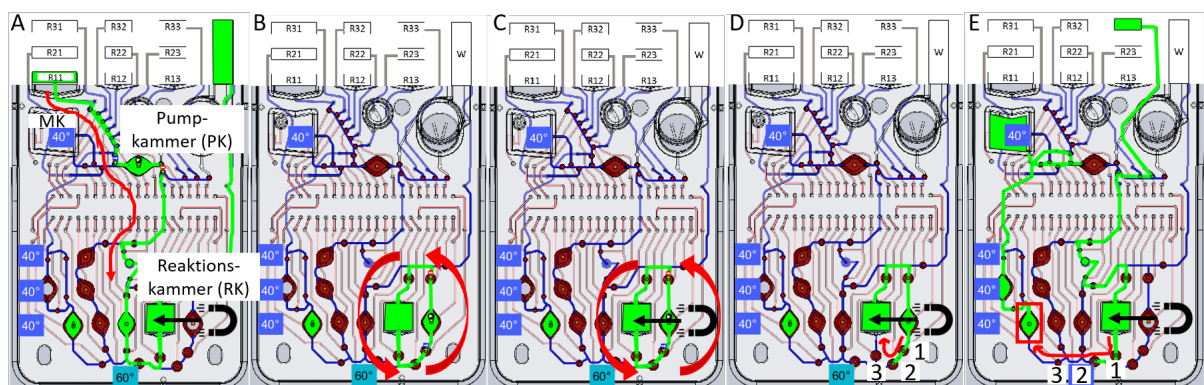


Abbildung 34: Mikrofluidischer Ablauf des Elutionsschritts. (A) Befüllung der Mischkammer mit vier PHs an Elutionspuffer und Anlegung von 60 °C an den Heizern der Reaktionskammer. (B) Resuspendierung der magentischen Partikel durch zirkuläres Pumpen im Kreis mit 80 PHs. (C) Erneutes Abscheiden der magnetischen Partikel durch zirkuläres Pumpen im Kreis mit 30 PHs. (D) Maximale Gewinnung des Eluats durch Entleerung des mikrofluidischen Kanals sowie der Ventile und der Pumpkammer mittels peristaltischem Pumpen. Die Reihenfolge der verwendeten Ventile ist durch Zahlen markiert. (E) Die Kammer mit dem lyophilisierten Mastermix sowie den vorgetrockneten Oligonukleotiden wird mit 25 peristaltischen Pumpzyklen an Eluat befüllt. Die Reihenfolge der verwendeten Ventile ist durchnummeriert.

4.4 Etablierung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR als Detektionsmethode für die DNA-Methylierungsanalyse

Nach dem die epigenetische Information mit Hilfe der Bisulfitkonvertierung in genetische Sequenzinformation überführt wurde und die generierte bisDNA durch die im Rahmen dieser Arbeit etablierte alkoholfreie Aufreinigungsmethode mittels magnetischer Partikel,

in aufgereinigter Form vorliegt, kann die eigentliche Detektion des Methylierungsmarker, durchgeführt werden. Für das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte *proof-of-principle* zur Bestimmung von DNA-Methylierungsmarkern, wurde die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR ausgewählt. Beim *SEPT9* Methylierungsmarker, handelt es sich um einen Darmkrebsmethylierungsmarker, welcher gut beschrieben ist und im FDA zugelassenen epi proColon[®] Test der Firma Epigenomics analysiert wird. Für die Integration in die *Vivalytic* Kartusche, wurde der qPCR Assay mit den Sequenzen wie von Devos et al. (2009) beschrieben aufgebaut und an die Durchführung in der *Vivalytic* Kartusche angepasst [130]. In einem Temperaturgradient von 50 °C bis 60 °C in 2 °C Schritten, wurde eine Annealingtemperatur von 56 °C als ideale Temperatur für die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR ermittelt [189]. Für die *ACTB* Sonde, wurde Cy5 als Fluorophor und BHQ2 als Quencher verwendet um eine bessere Auslesung in den Fluoreszenzkanälen des *Vivalytic* Analyser zu ermöglichen. Die Etablierung der qPCR wurde im Rahmen der Abschlussarbeit von Elisa Schiele bearbeitet [189].

4.4.1 Identifizierung eines geeigneten Mastermixes für die Durchführung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR

Für die Durchführung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR, wurden zunächst mehrere Flüssigmastermixe sowie lyophilisierte Mastermixe auf ihre Eignung in der Duplexreaktion sowie zur Desulfonierung während der initialen Denaturierungsphase der qPCR, untersucht (Abb. 35). Eine Desulfonierung während einer verlängerten initialen Denaturierungsphase bietet mehrere Vorteile für den Einsatz in LoC-Systemen. Zum einen muss kein zusätzlicher Desulfonierungspuffer vorgelagert werden zum anderen entfallen die nach der Desulfonierung notwendigen Spülschritte. Desulfonierungspuffer beinhalten in der Regel Ethanol, Propanol sowie NaOH, was zu Materialinkompatibilitäten mit dem LoC-System führen kann. Da *off-Chip* standardmäßig flüssige Mastermixe verwendet werden, wurden zunächst verschiedene flüssige Mastermixe untersucht. Parallel dazu wurden lyophilisierte Mastermixe getestet, um später einen möglichst produktnahen Gesamttablauf (siehe Abschnitt 4, Abb. 9) auf die *Vivalytic* Kartusche zu transferieren. Lyophilisierte Mastermixe bieten neben der Lagerbarkeit bei Raumtemperatur (RT), weitere Vorteile. Durch das geringe Eigenvolumen der lyophilisierten Mastermixe, können große Eluatvolumina eingesetzt werden, was die Sensitivität steigern kann. Außerdem können die lyophilisierten qPCR Reagenzien direkt neben den PCR Kammern vorgelagert werden.

Alle flüssigen Mastermixe von Solis Biodyne (HOTFirePol[®] Multiplex, HOTFirePol[®] Probe Universal, SloisFast[®] SolisGreen[®]) eignen sich sowohl für die Durchführung der Duplexreaktion als auch für die Desulfonierung während der initialen Denaturierung (Abb. 35). Lyophilisierte Mastermixe wie die Illustra[™] *Beads* (Illustra[™] Hot Start Mix RTG[™]) und die STAT-NAT *Beads* (STAT-NAT[®] DNA-Mix) (Abb. 35), mit welchen keine Duplexreaktion möglich war, wurden auch nicht auf ihr Potenzial zur Durchführung der Desulfonierung getestet. Mit den Cirrus *Beads* (Cirrus[™] Strips PCR Master Mix 8 wells) konnte zwar die Duplexreaktion durchgeführt werden, aber nicht die Desulfonierung (Abb. 35). Mit den ProbesMaster *Beads* (qPCR ProbesMaster Lyophilisate) konnte sowohl die Duplexreaktion als auch die Desulfonierung durchgeführt werden (Abb. 35). Aus diesem Grund wurde für den Transfer sowie die Charakterisierung der qPCR dieser lyophilisierte Mastermix verwendet (siehe Abschnitt 3.4.3). Aufgrund von Chargenschwankungen war

eine robuste Reproduzierung der qPCR nicht möglich. Für die *on-Chip* Verschaltung der Einzelschritte wurden daher die Evik MM *Beads* verwendet. Sowohl mit den ProbesMaster *Beads* (Abb. 37) sowie den Evik MM *Beads* war eine Desulfonierung möglich. Die Daten der Untersuchung der einzelnen Mastermixe sind in der Abschlussarbeit von Elisa Schiele (2021) aufgeführt ([189]).

	flüssig			lyophilisiert				
	HOTFirePol Multiplex MM	HOTFirePol Universal MM	SolisFast SolisGreen MM	Illustra <i>Beads</i>	Cirrus <i>Beads</i>	STAT-NAT <i>Beads</i>	qPCR ProbesMaster <i>Beads</i>	Evik MM <i>Beads</i>
Duplex qPCR	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✓
Desulfonierung	✓	✓	✓	-	✗	-	✓	✓

Abbildung 35: Funktionalitätsuntersuchung flüssiger sowie lyophilisierter qPCR Mastermixe im Zusammenhang mit der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR. Es wurden stets 2 ng bisDNA (5 µl) pro qPCR Reaktion eingesetzt. Untersuchte Flüssigmastermixe: HOTFirePol® Multiplex, HOTFirePol® Probe Universal, SolisFast® SolisGreen®. Untersuchte lyophilisierte Mastermixe: Illustra™, Cirrus™, STAT-NAT® (Sentinel Diagnostics), ProbesMaster *Beads* (Jena Bioscience), Evik MM (Evik Diagnostics). Grüner Rahmen: für die Charakterisierung der *SEPT9/ACTB* und den LoC-Transfer verwendete Mastermixe. Grüner Haken: erfolgreiche Durchführung; Oranger Haken: erfolgreiche Durchführung abhängig von Charge; rotes Kreuz: keine erfolgreiche Durchführung. In Anlehnung an [189].

4.4.2 Desulfonierung der konvertierten DNA während der initialen Denaturierung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der Desulfonierungsexperimente für die ProbesMaster *Beads* (Jena Bioscience) dargestellt (Abb. 37). Da Mastermixe in der Regel einen leicht alkalischen pH-Wert (i.d.R. pH 8,2 bis pH 9) aufweisen [193], wurde die Desulfonierung während einer verlängerten initialen Denaturierungsphase der qPCR durchgeführt. Auch im epi proColon® Test findet die Desulfonierung nicht während der Aufreinigung mit Hilfe von Denaturierungspuffern, sondern während der initialen Denaturierung der qPCR statt [194]. Somit lässt sich die Anzahl der benötigten Reagenzien reduzieren und auch die nach dem Desulfonierungsschritt zusätzlich notwendigen Waschschritte umgehen. Außerdem kann auf harsche Desulfonierungspuffer verzichtet werden und somit Materialinkompatibilitäten mit der TPU ausgeschlossen werden.

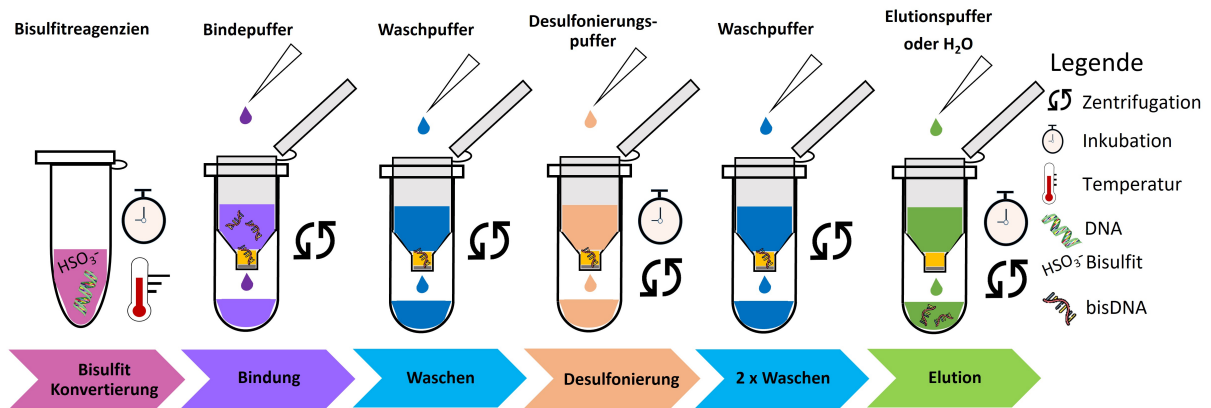


Abbildung 36: Standardmäßig durchgeführte *off-Chip* Bisulfitkonvertierung und Aufreinigung. Der Desulfonierungsschritt findet auf der Silikamatrix mit Hilfe von Desulfonierungspuffern statt (Premium Bisulfite Kit). In Anlehnung an [11].

Die initiale Denaturierungsphase wurde für 2 min, 10 min und 15 min in der Duplexreaktion durchgeführt und mit dem Standardprotokoll (Abb. 36) verglichen. Die standardmäßig verwendeten initialen Denaturierungszeiten reichen von 10 s CirrusTM bis zwei Minuten bei den restlichen Mastermixen. Für die Amplifikation des *SEPT9* Gens, konnten mit Inkubationszeiten von 10 min und 15 min, Amplifikationskurven generiert werden, die nahezu identisch zum Standard verlaufen. Lediglich bei 2 min Inkubationszeit, konnte keine geeignete Amplifikation erreicht werden. Beim *ACTB* Gen, bei welchem die Primer bisulfitunabhängig binden, war zwischen 10 min und 15 min Inkubationszeit mit Ct Werten von 28,47, kein Unterschied zu erkennen. Hier wurde mit dem Standardprotokoll (Abb. 36) mit einem Ct Werte von 26,95 eine etwas bessere Amplifikationskurve generiert. Auch hier waren 2 min Inkubationszeit nicht ausreichend für die Erzeugung geeigneter Amplifikationskurven. In den folgenden Versuchen wurde daher mit einer initialen Denaturierungsdauer von 10 min weiter gearbeitet.

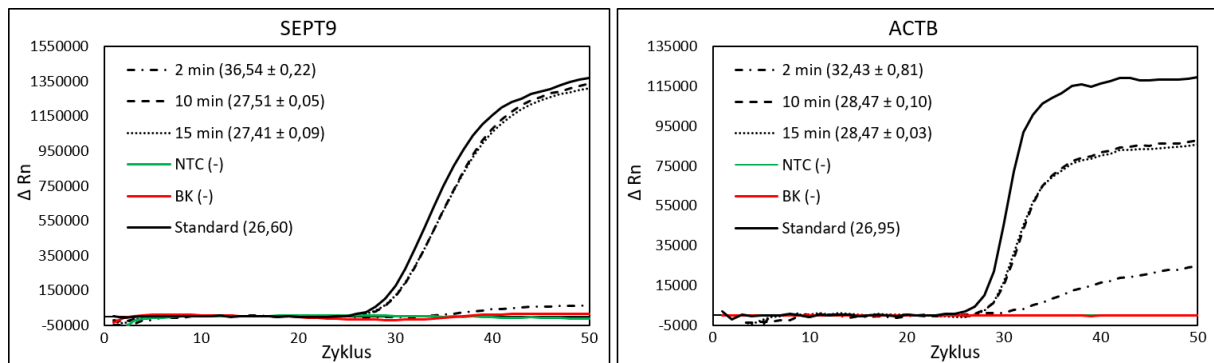


Abbildung 37: Einfluss verschiedener initialer Denaturierungszeiten auf die Desulfonierung. Die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR wurde mit unterschiedlichen initialen Denaturierungszeiten (2 min, 10 min, 15 min) durchgeführt und die Ct-Werte mit denen der Standardmethode (Abb. 36) verglichen. Es wurden die qPCR Probes Master *Beads* (Jena Bioscience) verwendet und die qPCR Reaktionen in Triplikaten mit 2 ng bisDNA durchgeführt. Die BK sowie die NTC waren negativ. In Anlehnung an [189].

4.4.3 Charakterisierung der etablierten *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR

Die im Rahmen dieser Arbeit für den Einsatz in der *Vivalytic* Kartusche angepasste *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR wird im folgenden auf ihre Amplifizierungseffizienz sowie das analytische sowie relative Detektionslimit charakterisiert. Dies wurde durchgeführt, da nur eine qPCR, welche auch *off-Chip* zuverlässig funktioniert, in die Kartusche integriert werden kann. Für alle Versuche wurde mit den lyophilisierten qPCR ProbesMaster *Beads* gearbeitet und gescherte HCT116 DNA, welche zuvor mit dem Premium Bisulfite Kit (Diagenode) konvertiert wurde, als Probenmaterial verwendet. Wie in Abb. 38 gezeigt, konnten sowohl für *SEPT9* mit 102,06 % als auch für *ACTB* mit 95,29 % gute Amplifizierungseffizienzen erreicht werden. Die etablierte qPCR weist eine geringe Abweichung zwischen den einzelnen Messpunkten der Triplikate auf ($R^2 > 0,99$).

Tabelle 16: Erfolgreich amplifizierte qPCR Reaktionen für *SEPT9* und *ACTB*. Die qPCR wurde als Duplexreaktion mit 100 pg, 50 pg, 25 pg, 12,5 pg, 6,25 pg, 3,125 pg und 0 pg an bisDNA durchgeführt. Es wurden jeweils 10 Replikate durchgeführt. In Anlehnung an [177].

bisDNA [pg]	100	50	25	12,5	6,25	3,125	0
positive <i>SEPT9</i> Kurven	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	5/10	0/10
positive <i>ACTB</i> Kurven	10/10	10/10	10/10	6/10	5/10	2/10	0/10

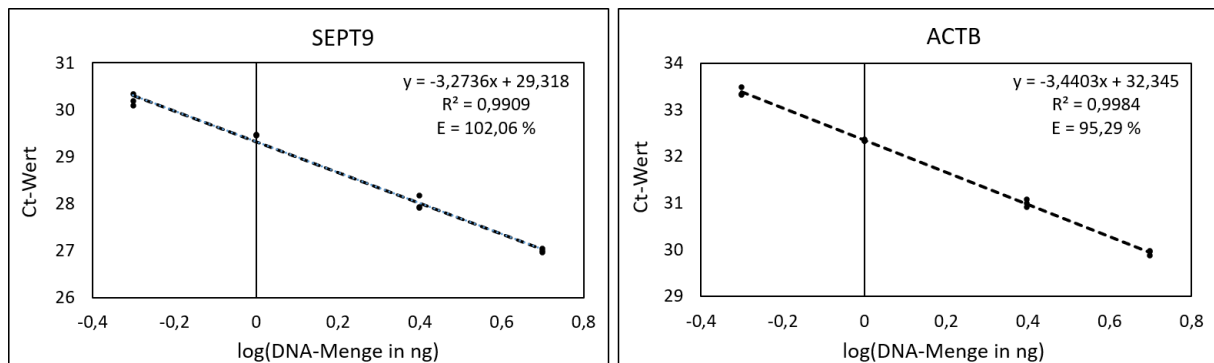


Abbildung 38: Bestimmung der Amplifizierungseffizienz von *SEPT9* und *ACTB* in der Duplexreaktion. Es wurden Standardkurven mit 5 ng, 2,5 ng, 1 ng und 0,5 ng an gescherter und konvertierter HCT116 DNA in Triplikaten generiert. E: Amplifizierungseffizienz; R^2 : Bestimmtheitsmaß. In Anlehnung an [189].

Für die Bestimmung der analytischen Sensitivität, bzw. des LOD90, wurde gescherte HCT116 DNA bisulfitkonvertiert, quantifiziert und anhand dieser Quantifizierung, die Berechnung der eingesetzten bisDNA-Mengen, in den qPCR Reaktionen, vorgenommen. Es wurden 100 pg, 50 pg, 25 pg, 12,5 pg, 6,25 pg, 3,125 pg, 0 pg in jeweils 10 Replikation eingesetzt. Unabhängig des Ct-Werts, wurde jedes Replikat gezählt, welches eine Amplifikationskurve lieferte (Tab. 16). Mit Hilfe des Statistik Program R, wurde das LOD90 sowie Detektionswahrscheinlichkeitskurven über ein logistisches Regressionsmodell, ermittelt. Für *SEPT9* konnte ein LOD90 von $5,7 \text{ pg} \pm 1,0 \text{ pg}$ und für *ACTB* von $17,3 \text{ pg} \pm 3,3 \text{ pg}$ erreicht werden (Abb. 39).

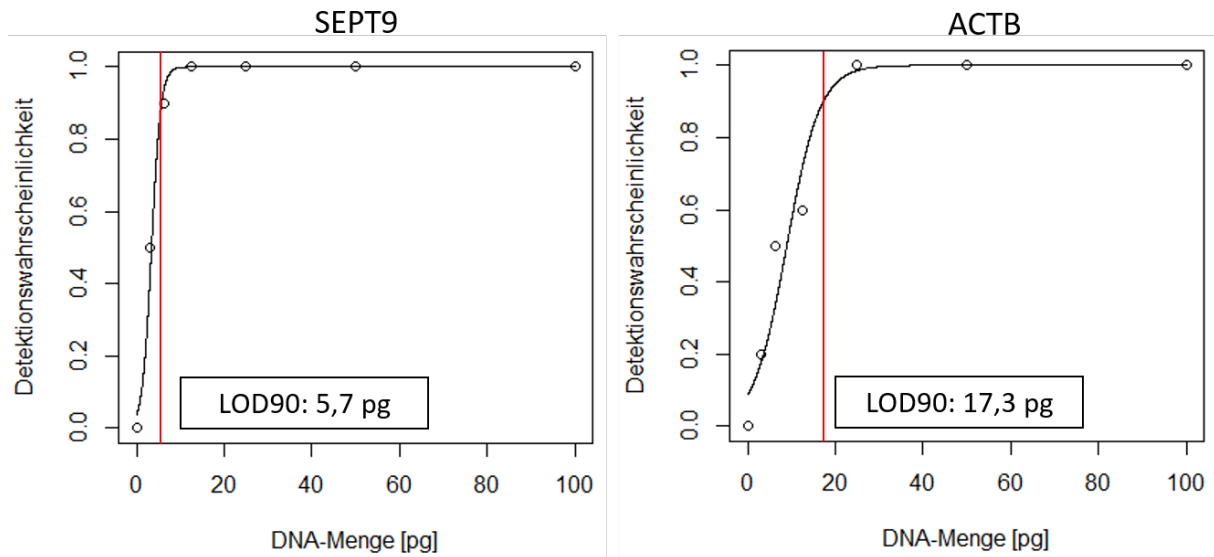


Abbildung 39: Detektionswahrscheinlichkeitskurven und LOD90 für *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR. Die Kurven wurden mittels einer logistischen Regression mit Hilfe des Statistik Programm R bestimmt. Es wurden 200 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg, 12,5 pg, 6,25 pg und 0 pg bisDNA in der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR eingesetzt (n=10). In Anlehnung an [189].

Für die Bestimmung des relativen Detektionslimits, wurde gescherte HCT116 DNA quantifiziert und davon 1600 pg, 800 pg, 400 pg, 200 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg, 12,5 pg und 0 pg zu 50 ng Leukozyten DNA dazu gegeben. Diese Mischungen wurden dann bisulfitkonvertiert, aufgereinigt (Diagenode Kit) und jeweils 2 µl davon in der Duplexreaktion mit und ohne *SEPT9* Blocker eingesetzt (Abb. 40). Es ist deutlich zu erkennen, dass ohne Blocker, nur bis 800 pg, noch alle drei *SEPT9* Amplifikationskurven generiert wurden und bereits ab 200 pg keine einzige Amplifikationskurve mehr generiert wird. Mit Blocker werden hingegen noch bei 25 pg alle drei Amplifikationskurven und sogar bei 12,5 pg noch zwei von drei Amplifikationskurven generiert. Somit liegt das relative Detektionslimit mit *SEPT9* Blocker bei 1:2000. Ohne *SEPT9* Blocker hingegen lediglich bei 1:62,5. Bei 0 pg HCT116 DNA in 50 ng Leukozyten DNA, wurde kein *ACTB* und kein *SEPT9* mehr amplifiziert.

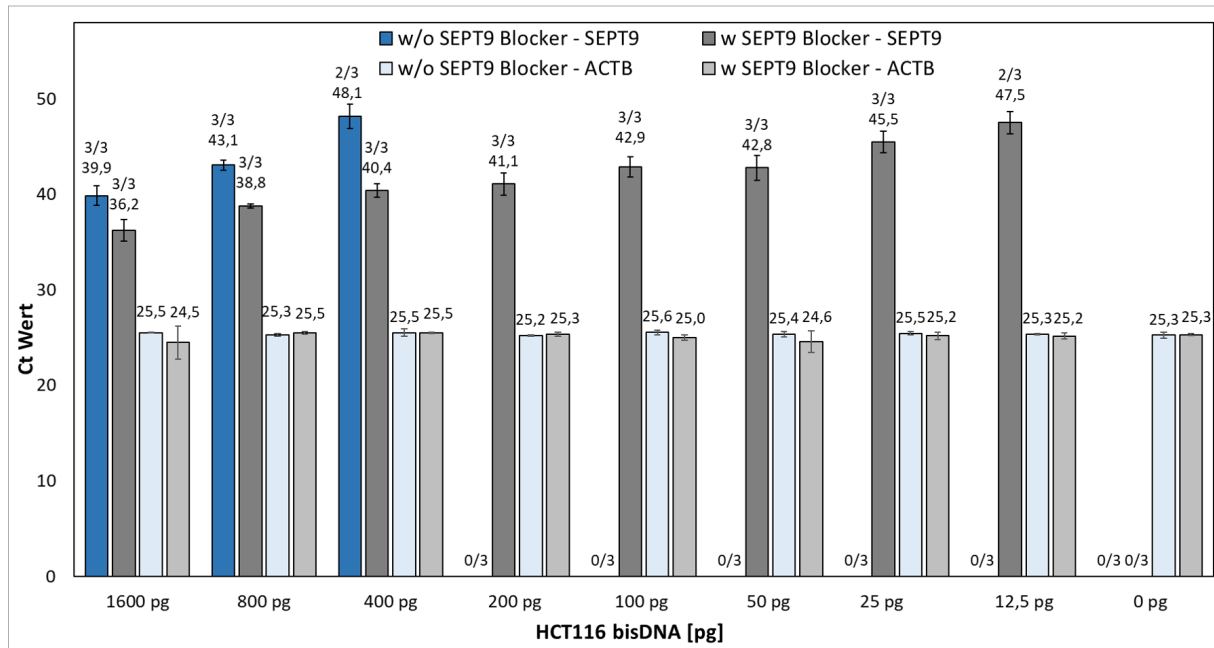


Abbildung 40: Vergleich der Ct-Werte sowie der Anzahl positiver Amplifikationen für *SEPT9* und *ACTB*, mit und ohne *SEPT9* Blocker. Es wurden verschiedene Mengen gescherte HCT116 DNA mit Leukozyten DNA gemischt, so dass durch den Einsatz von 2 μ l Eluat, theoretisch 1600 pg, 800 pg, 400 pg, 200 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg, 12,5 pg und 0 pg konvertierte HCT 116 DNA und 50 ng konvertierte Leukozyten DNA in der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR eingesetzt wurden (n=3). In Anlehnung an [177].

4.4.4 Funktionalitätsuntersuchung oberflächengetrockneter Oligonukleotide

Um ein lyophilisiertes Mastermix *Bead* zu simulieren, welches wie im späteren Endprodukt, neben den qPCR Reagenzien auch die benötigten Oligonukleotide enthält, wurden die Oligonukleotide auf der Kartuschenoberfläche der Kammer in welcher ein universelles Mastermix *Bead* vorgelagert wird, eingetrocknet. Die Eintrocknung erfolgte mit Trehalose (56 mM) als Stabilisator sowie ohne Stabilisator. Ihre Funktion wurde in der etablierten *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR untersucht. Aus den Ct-Werten wurde die Differenz (Δ Ct) aus eingetrockneten Oligovarianten und frischen flüssigen Oligovarianten gebildet (Abb. 41). Beim *SEPT9* Gen ist der Δ Ct-Wert nach einem Tag sowie nach einer Woche, ohne Trehalose, tendenziell etwas geringer als mit Trehalose. Nach einem Monat und zwei Monaten hingegen ist der Δ Ct-Wert mit Trehalose deutlich geringer als ohne Trehalose. Beim *ACTB* Gen hingegen scheint es nach einem Tag sowie einer Woche, bei beiden Eintrocknungsvarianten noch keinen Unterschied zu den frischen, flüssigen Mastermixen zu geben. Mit Trehalose lässt sich beim *ACTB* auch nach einem und zwei Monaten mit Δ Ct-Werten von 0,270 und 0,037 eine nahezu gleichbleibende Funktionalität der Oligonukleotide beobachten. Ohne Trehalose hingegen, wurden Δ Ct-Werte von 1,45 und 1,88 ermittelt. Da die aufgebauten Kartuschen in der Regel direkt verwendet werden, wurden trotz vielversprechender Ergebnisse der Trehalose Übersichtung, die Protoy-

penkartuschen ohne Trehalose-überschichtete Oligonukleotide aufgebaut. Trehalose kann aber durchaus zur Stabilisierung der Oligonukleotide beitragen und deren Funktionalität auch bei Lagerzeiten von mindestens 2 Monaten bei RT aufrechterhalten.

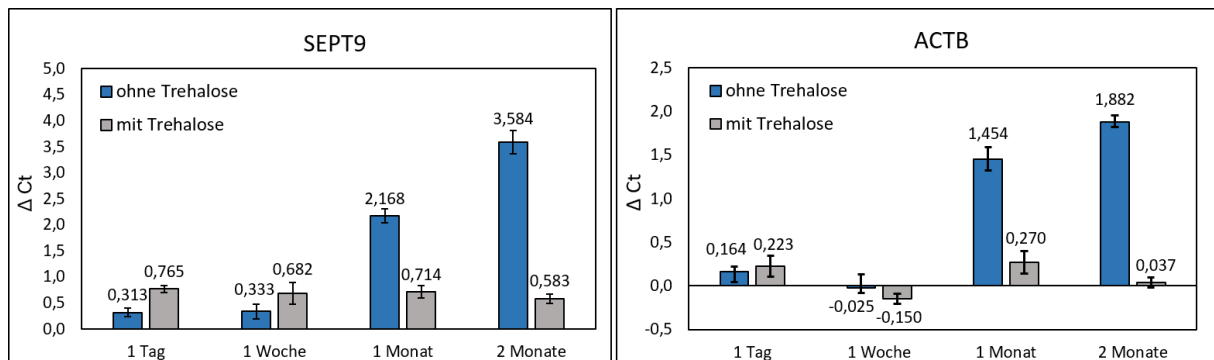


Abbildung 41: Funktionalitätsuntersuchung oberflächengetrockneter Oligonukleotide bei RT Lagerung mit und ohne Verwendung von Trehalose. Die ΔC_t -Werte stellen die Differenzen der auf einer qPCR Platte eingetrockneten Oligonukleotide im Vergleich zu flüssigen Oligonukleotiden dar. Es wurde der Einfluss von Trehalose (56 mM) auf die Funktionalität der eingetrockneten Oligonukleotide nach einem Tag, einer Woche, einem Monat sowie zwei Monaten Lagerzeit untersucht. Die Funktionalitätsuntersuchung erfolgte mit der etablierten *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR (n=3). In Anlehnung an [189].

4.4.5 Optimierung des Lösen lyophilisierter Mastermixe im LoC-System

Nach der erfolgreichen Etablierung der LoC-kompatiblen *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR ist es entscheidend, das lyophilisierte Mastermix *Bead* in der *Vivalytic* Kartusche vollständig zu lösen und den qPCR Ansatz unter minimaler Blasenbildung in den PCR Strang (siehe Abschnitt 1.4.2, Abb. 9) zu befördern. Da die aufgebauten Prototypenkartuschen kurze Zeit nach dem Zusammenbau genutzt wurden, wurde beim Eintrocknen auf eine Zugabe der Trehalose zu den Oligonukleotiden verzichtet.

Mittels peristaltischem Pumpen wurde das Eluat in die linke Beadkammer gepumpt, um ein Austragen der qPCR Reagenzien zu vermeiden und um ein sauberes Befüllen und Lösen des lyophilisierten Mastermix ohne Schaumbildung zu gewährleisten. Beim Peristaltischen Pumpen, werden drei hintereinandergeschaltete Ventile abwechselnd geöffnet und geschlossen um einen quasi laminaren Fluidstrom zu erzeugen. Die Befüllung der Beadkammer mit den qPCR Reagenzien ist entscheidend für die Blasenbildung in den PCR Kammer, in welche der Fluidplug mit den gelösten qPCR Reagenzien befördert wird. Wie in Abb. 42 dargestellt, konnte mit 90 Zyklen dieser hintereinander geschalteten Ventilbewegungen (peristaltisches Pumpen), eine geringe Blasenbildung erreicht werden. Mit 100 Zyklen scheint die Blasenbildung zwar noch geringer zu sein, allerdings verlässt dadurch bereits zu viel Fluid wieder die Kammer und somit kommt es eventuell zum Verlust von qPCR Reagenzien. Daher wurden für die folgenden *on-Chip* Versuche 90 Zyklen zum Befüllen der Beadkammer mit den qPCR Reagenzien verwendet. Diese Einstellung gilt für

den Kartuschentyp 1 (siehe Abschnitt 1.4.2, Abb. 9). Im Kartuschentyp 2 (siehe Abschnitt 1.4.2, Abb. 9) werden aufgrund größerer Ventile, lediglich 16 peristaltische Pumpzyklen, für ein angemessenes Lösen des lyophilisierten Mastermix benötigt.

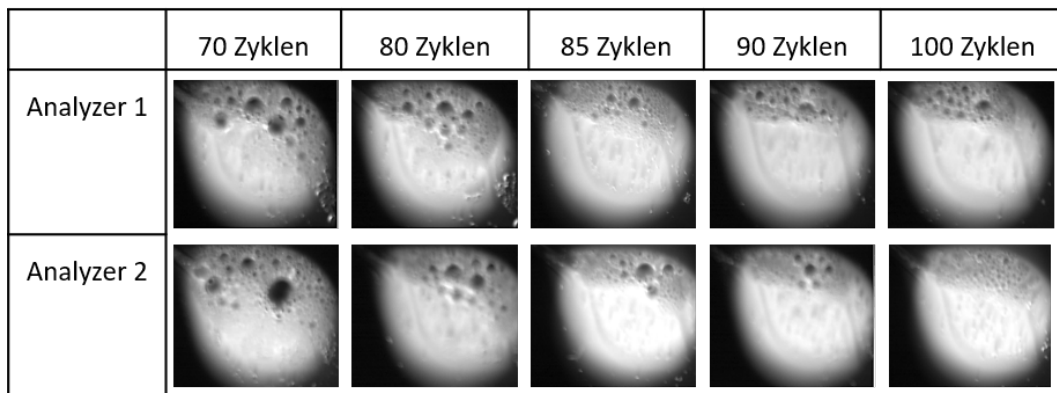


Abbildung 42: Fluidische Optimierung des Lösens lyophilisierter qPCR Reagenzien. Beurteilung der Blasenbildung nach dem Lösen des Mastermix *Beads* mit unterschiedlichen peristaltischen Pumpzyklen und dessen Transfer in den PCR Strang (Kartuschentyp 1, siehe Abschnitt 1.4.2, Abb. 9) mit Hilfe von im Analyzer aufgenommenen Hellfeldbildern in der Annealingkammer (PCR 23). Die Aufnahme erfolgte in zwei verschiedenen Analyzern. In Anlehnung an [177].

4.4.6 Durchführung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR im LoC-System

Für die Durchführung der LoC-kompatiblen *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR in der *Vivalytic* Kartusche, wurde ein fluidischer Ablauf etabliert und optimiert (siehe Material und Methoden 3.2.8). Da sich der Einsatz von Tween80 in *on-Chip* durchgeführten qPCR Experimenten als vorteilhaft erwiesen hatte, wurde auch hier standardmäßig 0,2 % Tween80 zugegeben [170, 189]. Der Transfer einer qPCR Reaktion, in die *Vivalytic* Kartusche, stellt aufgrund zahlreicher Unterschiede im Vergleich zur Durchführung mittels qPCR *Cyclern*, eine große Herausforderung dar. Im Vergleich zum qPCR *Cycler*, wird der Reaktionsmix nicht statisch aufgeheizt und abgekühlt, sondern zwischen drei Kammern mit definierten Temperaturen hin und her bewegt. Außerdem weisen LoC-Systeme zum Teil andere Heiz- und Kühlraten auf, als es bei qPCR *Cyclern* der Fall ist. Aufgrund dieser Unterschiede, müssen die ursprünglichen qPCR Programme, für die Durchführung im LoC-System angepasst werden. Die Experimente des LoC-Transfers der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR, wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Britta Schulze [177] durchgeführt und sind zum Teil mit der Publikation [195] eingereicht. Bei der *on-Chip* Durchführung der *off-Chip* etablierten qPCR Detektionsmethode, konnten zunächst keine Fluoreszenzsignale generiert werden. Wie in Abb. 43 dargestellt, kommt es beim Einsatz aller Oligonucleotide der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR, zu Oligointeraktionen, wodurch eine Amplifikation des *SEPT9* sowie des *ACTB* Gens verhindert wird. Verzichtet man in der qPCR auf den *SEPT9* Blocker oder die *SEPT9* Sonde, kommt es zur Amplifikation von *SEPT9* und *ACTB*. Jedoch kann Weder auf die Fluoreszenzsonde noch auf den Blocker (Abb. 40) verzichtet werden, soll diese für diagnostische Zwecke verwendet werden. Alle qPCR Ansätze für mit Hilfe des Fragment Analyzer (FA) untersucht (Abb. 43). Im nachfolgen-

den Abschnitt soll das Problem der Oligonukleotidinteraktionen durch eine Optimierung des Thermoprogramms der qPCR mit Hilfe eines simulationsbasierten Ansatzes behoben werden.

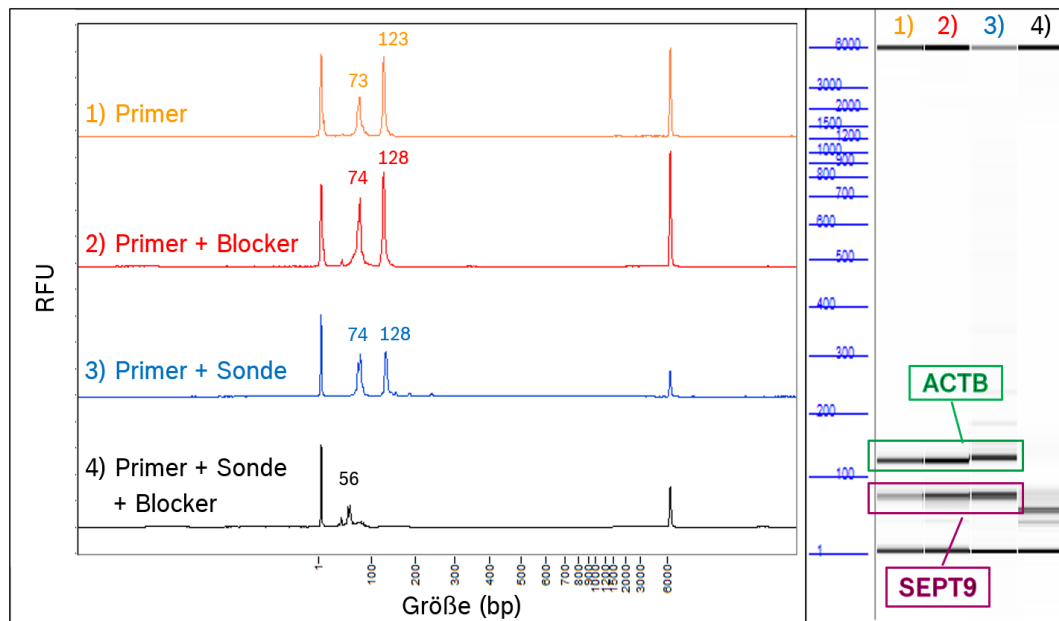


Abbildung 43: Untersuchung von Oligonukleotidinteraktionen bei der *on-Chip* *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR. Dargestellt sind die Ergebnisse des Elektropherogramms der Fragmentanalyse mittels FA (links) sowie der Gelbilder der Kapillargelelektrophorese mittels FA (rechts). Als Templat wurden 10 ng gescherte und bisulfitkonvertierte HCT116 DNA verwendet (*on-Chip*). Als Stabilisator wurden 0,2 % Tween80 zugegeben. Es wurden stets alle Oligonukleotide für die Detektion von *ACTB* (Primer und Sonde) verwendet und lediglich die Zusammensetzung der *SEPT9* Oligonuklotide variiert. 1) *SEPT9* Primer, 2) *SEPT9* Primer und Blocker, 3) *SEPT9* Primer und Sonde, 4) *SEPT9* Primer, Sonde und Blocker. Der Peak für *SEPT9* wird bei 65 bp und der von *ACTB* bei 130 bp erwartet. In Anlehnung an [177].

4.4.7 Simulationsbasierte Optimierung des Thermoprogramms zur Durchführung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR im LoC-System

Um die Oligointeraktionen zu verhindern, wurden Versuche unternommen, um das Temperaturprofil der qPCR, insbesondere des Annealingschritts sowie der Abkühlung vom Denaturierungsschritt zum Annealingschritt, zu optimieren. Hierfür wurde ein Bosch internes mathematisches Wärmeleitmodell verwendet, um die bei bestimmten Heizertemperaturen vorliegenden Temperaturen in den PCR Kammern sowie im Fluidplug, zu simulieren [195]. Somit kann der experimentelle Versuchsaufwand deutlich reduziert werden, da durch die Simulation eine Ergänzung der möglichen Temperaturprofile erfolgen kann. Dies ist besonders bei LoC-Experimenten, in welchen aufwendige einweg Prototypen verwendet werden sowie teure Reagenzien, von Vorteil. Die qPCR ist in eine Denaturierungs-, An-

Tabelle 17: Temperatureinstellungen für die Simulation der ersten Phase des Annealingschritts. In Anlehnung an [177].

	<i>undershoot</i> -Temperatur	<i>undershoot</i> -Zeit
Simulation 1	20 °C	10 s
Simulation 2	25 °C	10 s
Simulation 3	30 °C	10 s
Simulation 4	35 °C	10 s
Simulation 5	40 °C	10 s
Simulation 6	20 °C	7 s
Simulation 7	25 °C	7 s
Simulation 8	30 °C	7 s
Simulation 9	35 °C	7 s
Simulation 10	40 °C	7 s

nealing und Elongationsphase aufgeteilt. Für die Hybridisierung der Oligonukleotide ist allerdings der Annealingschritt besonders relevant [196], [173]. Aus diesem Grund, wurde ausschließlich der Annealingschritt mit Hilfe des Simulation optimiert. Hierfür wurde der Annealingschritt in zwei Phasen aufgeteilt. In der ersten Phase wurde mit einem sogenannten *undershoot* versucht, eine möglichst schnelle Abkühlung und somit Reduzierung der Oligonukleotidinteraktionen zu erreichen. Hierbei wurden verschiedene Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C) unter der eigentlichen Zieltemperatur gewählt (Tab. 17). Die erste Phase wird für 7 s bzw. 10 s durchgeführt (Tab. 17). In der zweiten Phase, welche für 23 s bzw. 20 s durchgeführt wird, wird die eigentliche Zieltemperatur (56 °C), analog zur *off-Chip* Methode, vorgegeben. Von den generierten Simulationsdaten, wurden verschiedene Thermoprogramme abgeleitet (Tab. 18). Diese wurden mit sogenannten Thermokartuschen, welche in die PCR Kammern integrierte Temperaturfühler aufweisen, verifiziert. Die Verifizierung der Thermoprogramme erfolgte mit Wasser, welches anstelle der qPCR Reagenzien, durch den PCR Strang bewegt wurde. Für die Messungen wurde die Anzahl von 50 PCR Zyklen, auf 10 PCR Zyklen reduziert. Durch *undershoot* Temperaturen, welche mit 30 °C, 25 °C und sogar 20 °C, deutlich unter der Zieltemperatur liegen, lassen sich die Kühlraten in der ersten Phase des Annealingschritts, verstärken. Dadurch lassen sich im zweiten Schritt der Annealingphase, länger konstante Temperaturen einstellen. Neben der *undershoot* Temperatur, wirkt sich die Dauer dieses Schrittes (7 s oder 10 s), auf die minimal erreichbare Temperatur aus. Während mit der Simulation 5 (40 °C, 10 s) eine minimale Temperatur von 51,5 °C erreichen lässt, konnte mit den Simulationen 2 (25 °C, 10 s) und 3 (30 °C, 10 s), Temperaturen zwischen 50 °C und 51 °C, erreicht werden. Mit der Simulation 1 ließen sich Temperaturen unter 50 °C erreichen (siehe Anhang, Abb. 56). Durch die starke Temperaturabnahme, muss in der zweiten Phase der qPCR, der Flüssigkeitsplug wieder erhitzt werden. Bei Haltezeiten von 7 s der *undershoot* Temperaturen, lassen sich ähnliche Ergebnisse erkennen, lediglich mit etwas höheren Temperaturen. *Undershoot* Temperaturen von 35 °C (Simulation 9) und 40 °C (Simulation 10), welche für 7 s angelegt werden, resultieren in geringeren Kühlraten. Da somit zu Beginn der zweiten Phase des Annealingschritts, die Zieltemperatur noch nicht erreicht wird, nimmt auch in dieser Phase die Temperatur weiterhin ab, anstatt sich bei einem konstanten Wert zu halten (siehe Anhang, Abb. 56). Die Zieltemperatur von 56 °C lässt sich in allen Simulationen nur annähernd erreichen und halten.

Tabelle 18: Optimierung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR durch Anpassung der Temperatureinstellungen der Annealingphase auf Basis der ermittelten Simulationsergebnisse. Als Zieltemperatur wird die Temperatur bezeichnet, welche vor und nach der Annealingphase angelegt wird. Zusätzlich sind die Temperaturen des *undershoot* sowie die Dauer der *undershoot* Phase (Haltezeit *undershoot*) angegeben (TP: Thermogramm). In Anlehnung an [177].

	TP1	TP2	TP3	TP4	TP5	TP6	TP7	TP8
Zieltemperatur	56 °C	56 °C	25 °C	40 °C	60 °C	60 °C	40 °C	40 °C
Temperatur <i>undershoot</i>	25 °C	25 °C	60 °C	40 °C	20 °C	20 °C	64 °C	74 °C
Haltezeit <i>undershoot</i>	10 s	7 s	30 s	30 s	7 s	10 s	30 s	30 s

Aufgrund der hohen Kühlraten der Simulation 2 (25 °C, 10 s) und Simulation 7 (25 °C, 7 s) wurden diese für die ersten Thermomessungen mittels Thermokartuschen verwendet. Diese werden nun entsprechend als Thermogramm 1 und 2 bzw. TP1 und TP2 bezeichnet. Auf Basis dieser ersten Messungen dieser Messungen wurden weitere Thermogramme etabliert und ebenfalls mit Hilfe von Thermomessungen verifiziert. Alle praktisch verifizierten Thermogramme sind in Tab. 18 aufgeführt. Als Zieltemperatur wird in diesem Fall die Temperatur bezeichnet, welche vor und nach dem Annealingsschritt in der unteren PCR Kammer, PCR23 (Abb. 9) angelegt wird. Diese kann wie in TP4 identisch sein wie die *undershoot* Temperatur, welche ebenfalls in Tab. 18 aufgeführt wird. Da die Annealingphase stets 30 s beträgt, ist die zeitliche Differenz zur *undershoot* Haltezeit, die restliche Haltezeit der Annealingphase. Wie in TP3, TP4, TP7 und TP8 zu erkennen ist, besteht in diesen Thermogrammen, die Annealingtemperatur nur aus einer Phase, weshalb dort für 30 s eine konstante Temperatur angelegt wird. In Abb. 44 C werden die Temperatur-Zeit-Kurven der verschiedenen Thermogramme während der Annealingphase aufgeführt. Neben der Annealingphase Abb. 44 C, sind in Abb. 44 A die Temperatur-Zeit-Verläufe während der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase für die PCR Kammern PCR21, PCR22 und PCR23, beispielhaft dargestellt. In Abb. 44 B sind die Temperatur-Zeit-Verläufe aller untersuchten Thermogramme für die PCR Kammer PCR 23 abgebildet, in welcher der Annealingsschritt stattfindet. Wie sich in Abb. 44 A erkennen lässt, weisen die Thermogramme TP1, TP2 und TP5, im Gegensatz zu den restlichen Thermogrammen, eher eine lineare Temperaturabnahme auf. Die niedrigsten erreichten Temperaturen weisen mit $45,6\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ und $45,2\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ die Thermogramme TP3 und TP4 auf. Wobei die niedrigste Temperatur beim TP3 sogar bei 43 °C lag. Das Thermogramm TP5 zeigte hingegen mit $68,2\text{ °C} \pm 1,6\text{ °C}$ und $54,9\text{ °C} \pm 0,1\text{ °C}$ die höchsten Start- und Endtemperaturen. Die Thermogramme TP6, TP7 und TP8 verlaufen die ersten 12 s recht ähnlich und beginnen auch bei ähnlichen Temperaturen $64,1\text{ °C} \pm 2,7\text{ °C}$, $65,1\text{ °C} \pm 1,2\text{ °C}$ sowie $63,6\text{ °C} \pm 0,9\text{ °C}$ (Tab. 19). Da die Thermogramme zu unterschiedlichen Zeitpunkten in den linearen Verlauf übergehen, weisen sie recht unterschiedliche Endtemperaturen von $49,8\text{ °C} \pm 1,5\text{ °C}$, $52,1\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ bzw. $54,8\text{ °C} \pm 1,1\text{ °C}$ auf (Tab. 19). Beim TP8 lässt sich ein erneuter Anstieg der Temperatur gegen Ende erkennen, weshalb die minimale Temperatur bei ca. 53 °C liegt. Beim Thermogramm TP6 wurden die *undershoot* Temperatur von 20 °C bereits 3 s vor dem Befördern des qPCR Ansatz in PCR23, angelegt.

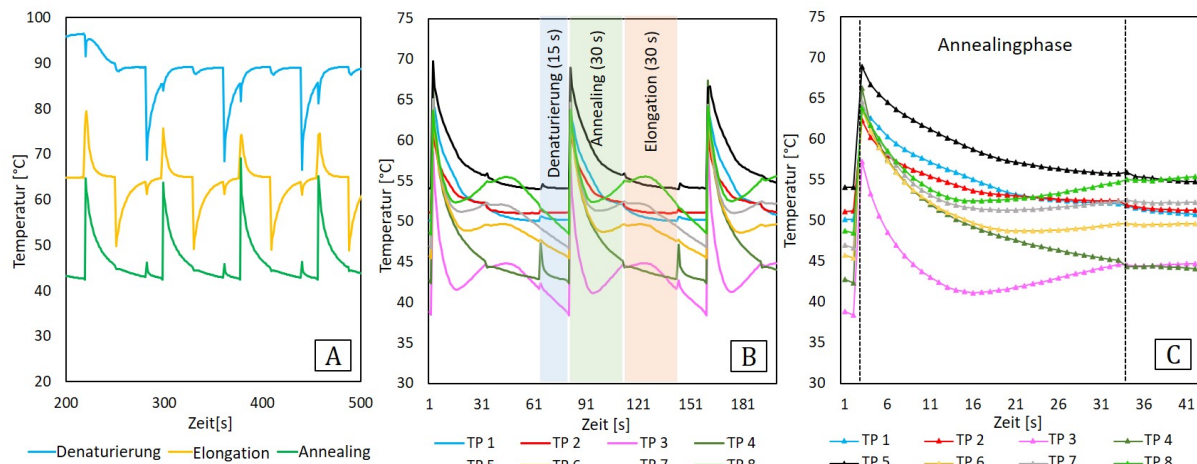


Abbildung 44: Temperatur-Zeit-Verläufe der mittels Thermomessungen verifizierten Thermoprogramme (TP). (A) Beispielhafte Darstellung der Temperatur-Zeit-Verläufe während der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase für die PCR Kammern PCR21 (blau), PCR22 (gelb) und PCR23 (grün). (B) Temperatur-Zeit-Verläufe der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase (TP1 - TP8) für die PCR Kammer PCR23. (C) Temperatur-Zeit-Kurven (TP1 - TP8) während der Annealingphase in der PCR Kammer PCR23. In Anlehnung an [177].

Die gemessenen Anfangs- und Endtemperaturen der Annealingphase sind in Tab. 19 abgebildet. Des Weiteren wird in dieser Tabelle die Zeitdifferenz (Δt) bis zum Erreichen von 60 °C bzw. 56 °C dargestellt. Aus diesen Werten wurden die Kühlraten und Haltezeiten aus Abb. 45 ermittelt. Aufgrund der großen Standardabweichungen der Replikate, ist es schwer, eine Aussage über die unterschiedlichen Kühlraten zu treffen (siehe Abb. 45). Das Thermoprogramm TP4 weist im Rahmen der Messgenauigkeit die höchsten Kühlraten auf. Hierbei werden sowohl 60 °C mit $3,1 \text{ °C/s} \pm 0,9 \text{ °C/s}$ als auch 56 °C mit $2,5 \text{ °C/s} \pm 0,5 \text{ °C/s}$ am schnellsten erreicht. Bei diesem Thermoprogramm wurde mit $25,9 \text{ s} \pm 0,3 \text{ s}$ eine der längsten Haltezeiten für Temperaturen unter 56 °C erreicht. Bis auf das Thermoprogramm TP3, scheint die Kühlrate zum Erreichen von 60 °C tendenziell größer zu sein, als die zum Erreichen von 56 °C. Beim Thermoprogramm TP3 liegt zu Beginn der Annealingphase mit $58,9 \text{ °C} \pm 2,0 \text{ °C}$ die niedrigste Temperatur vor (siehe Anhang Tab. 19).

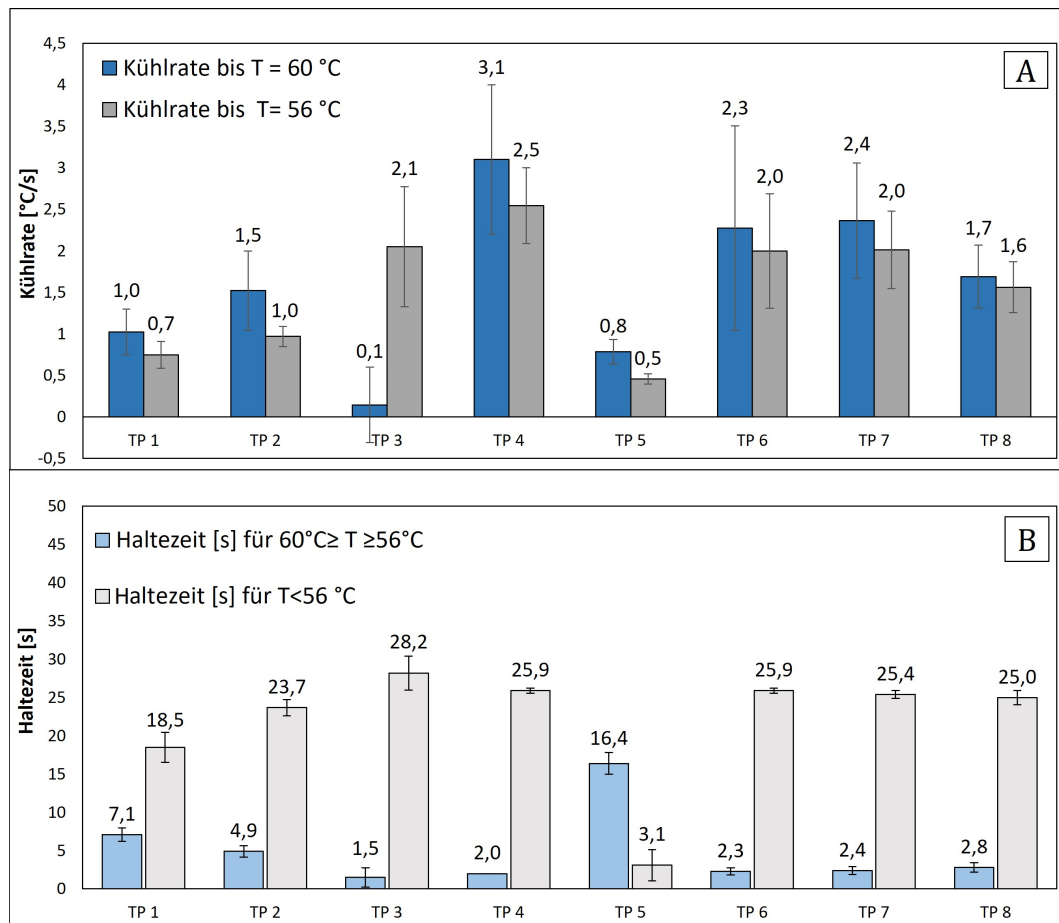


Abbildung 45: Aus den Thermomessungen ermittelte Kühlraten und Haltezeiten der verschiedenen Thermoprogramme. (A) Kühlraten welche bis zum Erreichen von 60 °C (blau) sowie bis zum Erreichen von 56 °C (grau) vorliegen. (B) Haltezeiten für den Temperaturbereich von 60 °C bis 56 °C (hellblau) sowie Temperaturen unter 56 °C (hellgrau). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Messwerten der zehn analysierten Zyklen gebildet. In Anlehnung an [177].

Die Thermoprogramme TP2, T4, TP7 und TP8 wurden in *on-Chip* qPCR Versuchen verifiziert (Abb. 46). TP2 wurde ausgewählt, da es eine höhere Kühlrate als TP1 und TP5 aufweist. Außerdem wird der Temperaturbereich zwischen 56 °C und 60 °C lange gehalten. TP4 wurde lediglich aufgrund der hohen Kühlrate ausgewählt (Abb. 45). TP7 und TP8 wurden aufgrund der hohen Kühlraten und langen Haltezeiten ausgewählt. Mit allen Thermoprogrammen, konnte *ACTB* in der Duplexreaktion, in allen Replikation amplifiziert werden. Es lässt sich aber erkennen, dass die Kurven der Replikate recht unterschiedlich verlaufen. Mit dem simulationsbasierten Ansatz konnte jedoch ein Thermoprogramm, nämlich TP4 identifiziert werden, mit dem sowohl für *SEPT9*, als auch für *ACTB*, Amplifizierungskurven generiert werden konnten. Bei einem der Replikate ist nur ein leichter Anstieg der *SEPT9* Amplifizierungskurve zu erkennen. Auch *ACTB* wird in dieser Kartusche schlechter amplifiziert, als beim anderen Replikat. Beim TP8 ist bei einem Replikat, eine leichte Amplifizierung des *SEPT9* erkennen.

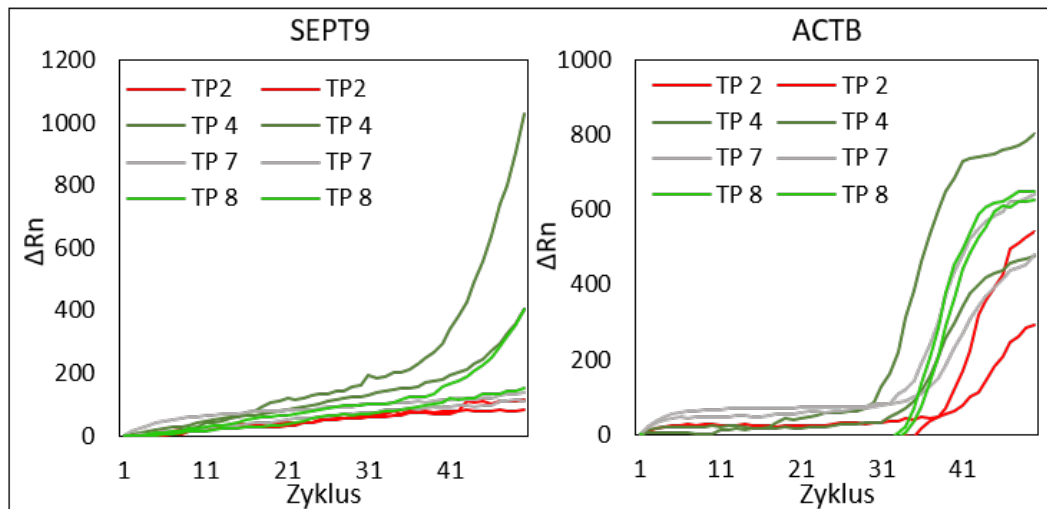


Abbildung 46: Verifizierung der Thermoprogramme mit der *on-Chip SEPT9/ACTB*-HM-qPCR. Es wurden jeweils zwei Kartuschen mit dem Thermoprogramm TP2, TP4, TP7 und TP8 durchgeführt. Es wurde gescherte und bisulfitekonierte HCT116 DNA mit einer theoretischen Menge von jeweils 100 ng *on-Chip* in der qPCR eingesetzt. In Anlehnung an [177].

4.4.8 Stabilisierung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR

Um die *on-chip* qPCR weiter zu optimieren, wurden neben der standardmäßig verwendeten 0,2 % Tween80, weitere Konzentrationen an Tween80 sowie an PEG6000 eingesetzt und deren Wirkung auf die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR untersucht. Es wurde gescherte HCT116 DNA konvertiert und 200 μ l dieser bisDNA-Lösung mit 5 ng/ μ l in die Probenkammer gegeben. Da die Stabilisatoren später *on-Chip* im Elutionspuffer enthalten sind, wurden die entsprechenden Konzentrationen an Stabilisator in den 200 μ l Probe bereits integriert. Darüber hinaus wurden 1200 μ l an H₂O mit den entsprechenden Stabilisatoren versetzt und als Elutionspuffer in R11, zum Spülen des mikrofluidischen Systems vor der qPCR, vorgelagert. Neben der bisher verwendeten Konzentration von 0,2 % Tween80, sollten mit 0,1 % und 0,4 % Tween80 noch eine niedrigere und eine höhere Konzentration getestet werden (Abb. 47). Lediglich mit Tween80 in finalen Konzentrationen von 0,2 % und 0,4 %, konnten Amplifikationskurven erzeugt werden, wobei die Amplifikation mit 0,4 % Tween80, schlechter funktionierte. Mit den Konzentrationen von 0,5 %, 1 % und 2 % an PEG6000, konnten keine positiven Effekte auf die Amplifikation, beobachtet werden (Abb. 47). Zur Kontrolle wurden zwei Kartuschen ohne Stabilisator prozessiert, bei welchen keine Amplifikation beobachtet werden konnte.

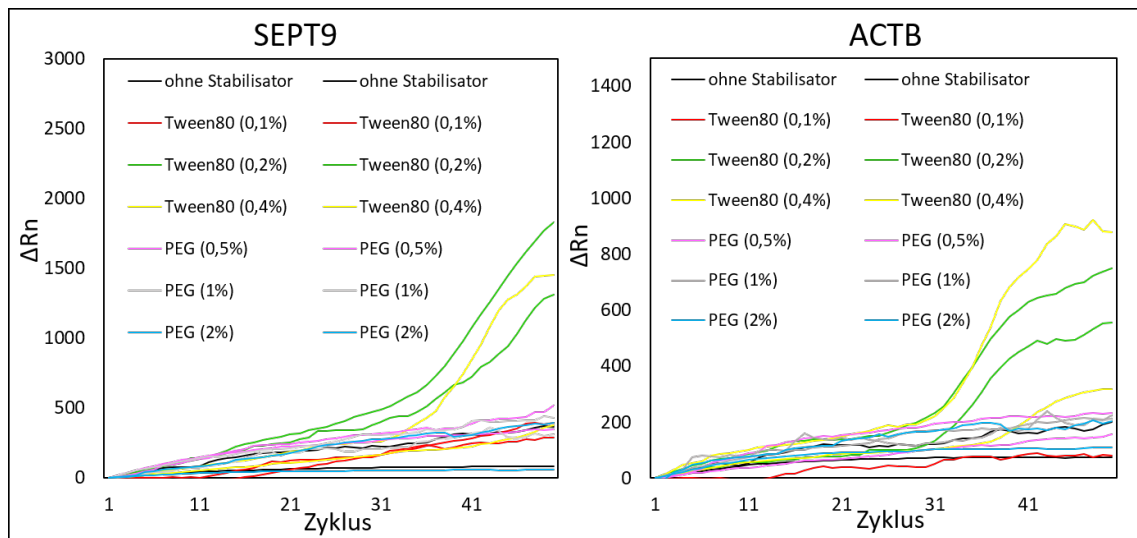


Abbildung 47: Untersuchung des Effekts von Stabilisatoren auf die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR. Es wurde gescherte HCT116 DNA so angesetzt und konvertiert, dass eine theoretische Menge bisDNA von jeweils je 100 ng *on-Chip* in der qPCR eingesetzt wurde (n=2). Der Stabilisator Tween80 wurde mit Konzentrationen von 0,1 %, 0,2 % sowie 0,4 % und der Stabilisator PEG6000 mit Konzentrationen von 0,5 %, 1 % und 2 % eingesetzt. Als Kontrolle wurden Kartuschen ohne Stabilisator prozessiert. In Anlehnung an [177].

4.4.9 Charakterisierung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR im LoC-System

Nachdem ein geeignetes Temperaturprofil etabliert und der Einsatz von 0,2 % Tween80 in der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR verifiziert wurde, wurde die analytische Sensitivität dieser Detektionsmethode in der *Vivalytic* Kartusche bestimmt. Hierfür wurden 200 ng, 100 ng, 50 ng, 25 ng, 12,5 ng, 6,25 ng und 3,125 ng an geschserter HCT116 DNA in Triplikaten Bisulfit-konvertiert und aufgereinigt. Die Eluate wurden dann in der *on-chip* qPCR mit den ProbesMaster *Beads* (Jena Bioscience) eingesetzt. Die Ct-Werte wurden aus Balkendiagramme für *SEPT9* und *ACTB* mit Angabe der Anzahl erfolgreich generierter Amplifizierungskurven aufgetragen (Abb. 48, A). Mit 12,5 ng bisDNA konnten alle drei qPCR Kurven sowohl für *SEPT9* mit einem Ct-Wert von 42,3, als auch für *ACTB* mit einem Ct-Wert von 35,7 generiert werden. Mit 3,125 ng bisDNA zeigten zwei von drei Ansätze ein positives Signal für *SEPT9*, mit einem Ct-Wert von 42,0 sowie von *ACTB* mit einem Ct-Wert von 33,5. Die gemittelten Amplifizierungskurven sind in Abb. 48 (B, C) dargestellt. Trotz der deutlichen Reduzierung der Templatmenge in der *on-Chip* qPCR, befindet man sich noch ca. drei Größenordnungen über der Templatmenge der *off-Chip* durchgeführten qPCR (siehe Abschnitt 3.4.3).

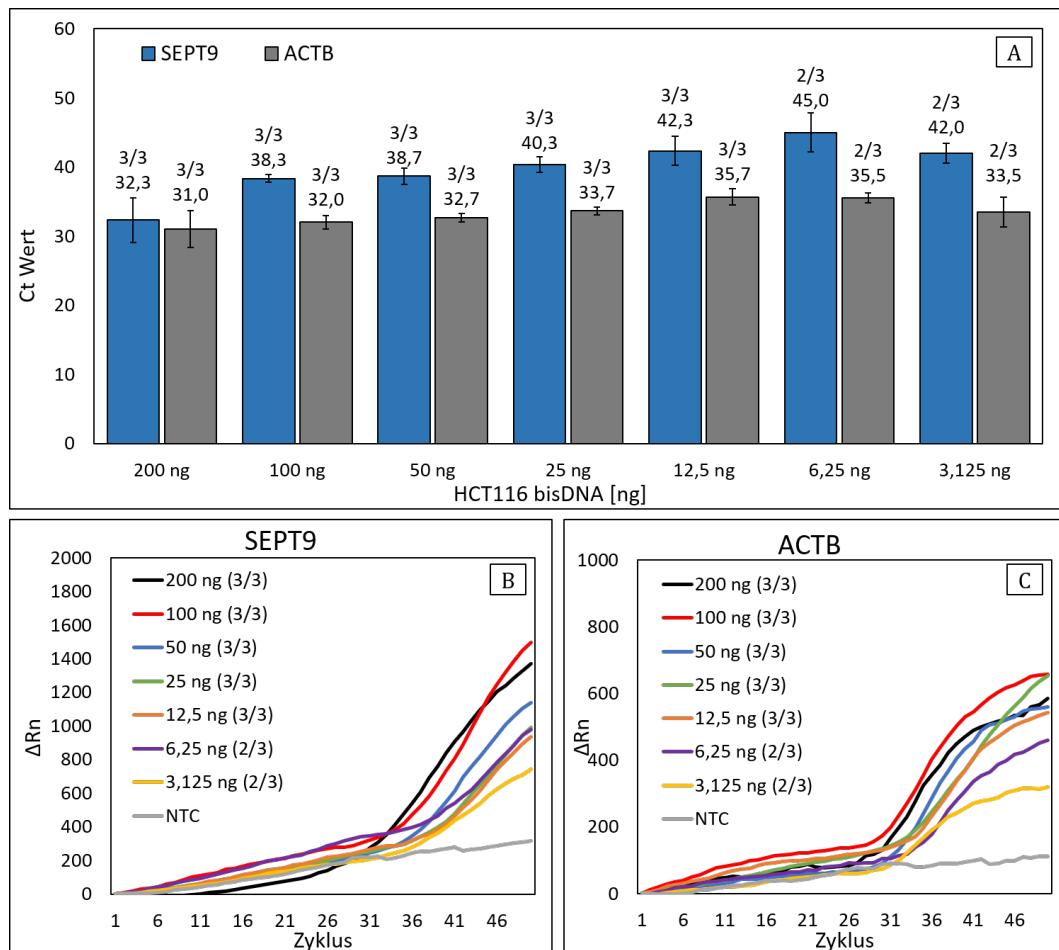


Abbildung 48: Bestimmung des analytischen Detektionslimit. (A) Balkendiagramme mit gemittelt Ct-Werten sowie der Anzahl erfolgreich amplifizierter Replika-te für *SEPT9* (blau) und *ACTB* (grau), n=3. (B) Gemittelte Amplifikationskurven mit Anzahl erfolgreich amplifizierter Replika-te für *SEPT9*. (C) Analog für *ACTB*. Für die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR wurden 200 ng, 100 ng, 50 ng, 12,5 ng, 6,25 ng und 3,125 ng an bisDNA eingesetzt. In Anlehnung an [177].

4.5 On-Chip Verschaltung von Einzelfunktionen der DNA-Methylierungsanalyse

Nachdem alle Einzelfunktionen erfolgreich auf die *Vivalytic* Kartusche transferiert worden sind, wurde die Verschaltung der einzelnen Schritte vorgenommen. Hierfür wurde der Kartuscentyp 2 verwendet (Abschnitt 1.4.2, Abb. 9). Zunächst wurde die Bisulfitkonvertierung (siehe Abschnitt 4.2) zusammen mit der Aufreinigung mit Hilfe silikabeschichteter magnetischer Partikel (siehe Abschnitt 4.5) *on-Chip* verschaltet. Die Sauberkeit der *on-Chip* aufgereinigten Eluate wurde im Anschluss mit der etablierten *off-Chip SEPT9/ACTB*-HM-qPCR verifiziert (Abschnitt 4.7.1). Im letzten Schritt des *proof-of-concept* wurden alle Schritte der DNA-Methylierungsanalyse, die Bisulfitkonvertierung, die Aufreinigung mit silikabeschichteten magnetischen Partikeln sowie die *SEPT9/ACTB*-

HM-qPCR als Gesamtablauf in einer einzigen *Vivalytic* Kartusche durchgeführt (Abschnitt 4.7.2).

4.5.1 Analyse der *on-Chip* konvertierten und mittels magnetischen Partikeln aufgereinigten bisDNA mit der *off-Chip* *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR

Um die Kompatibilität der *on-Chip* durchgeführten Bisulfitkonvertierung und Aufreinigung mittels magnetischer Partikel mit der qPCR-basierten Detektionsmethode zu untersuchen, wurden die *on-Chip* generierten Eluate zunächst mit der etablierten *off-Chip* *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR analysiert. Hierfür wurden die benötigten Oligonukleotide in einer 96-*well* Platte vorgetrocknet. Als qPCR Mastermix wurde das lyophilisierte *Bead* der Firma Evik Diagnostics verwendet. Dadurch konnten 20 μ l Eluat je qPCR verwendet werden. Es wurden 263 ng gescherte HCT116 DNA in der Reaktionskammer (90 μ l) konvertiert. Durch die Möglichkeit zur einfachen Verdünnung des Eluats in der Reaktionskammer sowie durch eine nahezu vollständige Rückgewinnung des Eluats aus dem mikrofluidischen System, mit Hilfe eines peristaltischen Pumpschritts, konnte ausreichend Eluat für die *off-Chip* qPCR (Triplikat) gewonnen werden.

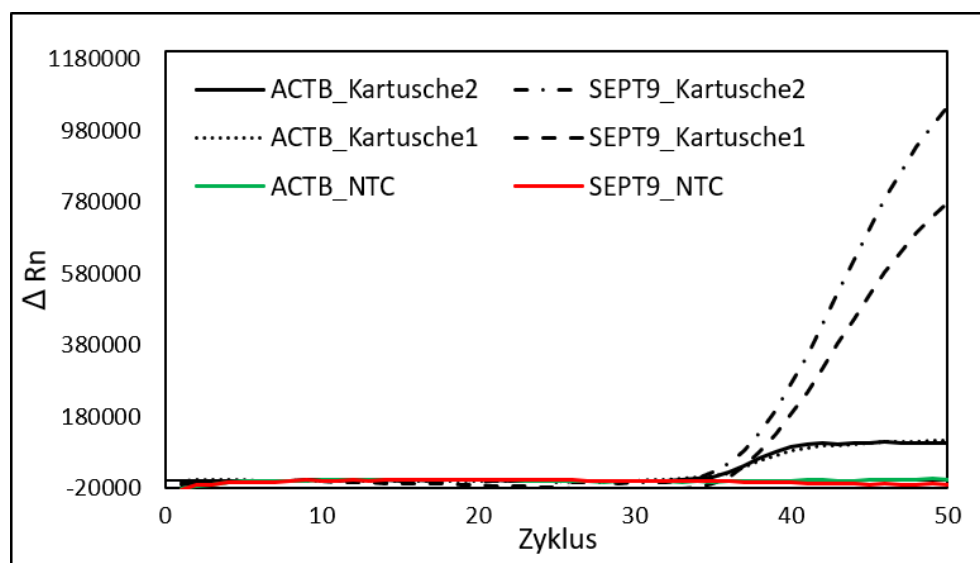


Abbildung 49: *Off-Chip* *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR Analyse der *on-Chip* konvertierten und aufgereinigten bisDNA. In der Standardreaktionskammer des Kartuschentyp 2 (90 μ l) wurden 263 ng gescherte HCT116 DNA Bisulfitkonvertiert und im Anschluss mit Hilfe silikabeschichteter magnetischer Partikel aufgereinigt (n=2). Für die *off-Chip* *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR wurden die Evik MM *Beads* (Evik Diagnostics) verwendet (n=3).

4.5.2 *On-Chip* Gesamtablauf der DNA-Methylierungsanalyse

Für die Analyse von DNA-Methylierungsmarkern mit der *Vivalytic* Kartusche, wurde im letzten Schritt, neben der Bisulfitkonvertierung und der Aufreinigung der bisDNA mit magnetischen Partikeln auch noch der letzte Schritt, die qPCR-basierte Detektion des *SEPT9*

Methylierungsmarkern, auf die *Vivalytic* Kartusche transferiert. Wie in Abb. 50 A sind alle im Kartuschentyp 2 vorgelagerten Reagenzien, welche für den Gesamtprozess benötigt werden, dargestellt. Auch die Reagenzienvorlagergefäße, von denen aus Luft durch das System gepumpt wird, um Fluide aus dem System zu entfernen, sind abgebildet. Für den Gesamtprozess wurden 444 ng an gescherter HCT116 DNA in der Standardarraykammer des Kartuschentyp 2 konvertiert und anschließend mit magnetischen Partikeln aufgereinigt. Das aufgereinigte Eluat wurde dann zum Lösen des lyophilisierten Mastermix *Bead* und für die qPCR Reaktion verwendet. Da aufgrund von Chargenschwankungen, das lyophilisierte Mastermix *Bead* gewechselt werden musste, wurden Kartuschen mit dem neuen Evik MM *Bead* (Evik Diagnostics), lediglich mit eingetrockneten *SEPT9* Oligonukleotiden aufgebaut. Da bei der Durchführung der Aufreinigung mit Hilfe magnetischer Partikel, ein externer Magnet an die Kartusche angelegt werden muss, ist eine Detektion des Fluoreszenzsignals während der qPCR nicht möglich. Die Durchführbarkeit einer automatisierten *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR mit Detektion des Fluoreszenzsignals, wurde bereits in den vorherigen Abschnitten demonstriert (Abschnitt 4.6.8, Abb. 46). Hier wurde lediglich ein Nachweis des *SEPT9* Amplikons mit Hilfe des Fragment Analyzers durchgeführt. In beiden Kartuschen konnte das *SEPT9* Amplikon erfolgreich amplifiziert werden (Abb. 50 B). Lediglich in der Kartusche 1 ist noch ein leichter Nebenpeak sichtbar, welcher durch Verunreinigungen aus dem Prototypenbau verursacht worden sein könnte.

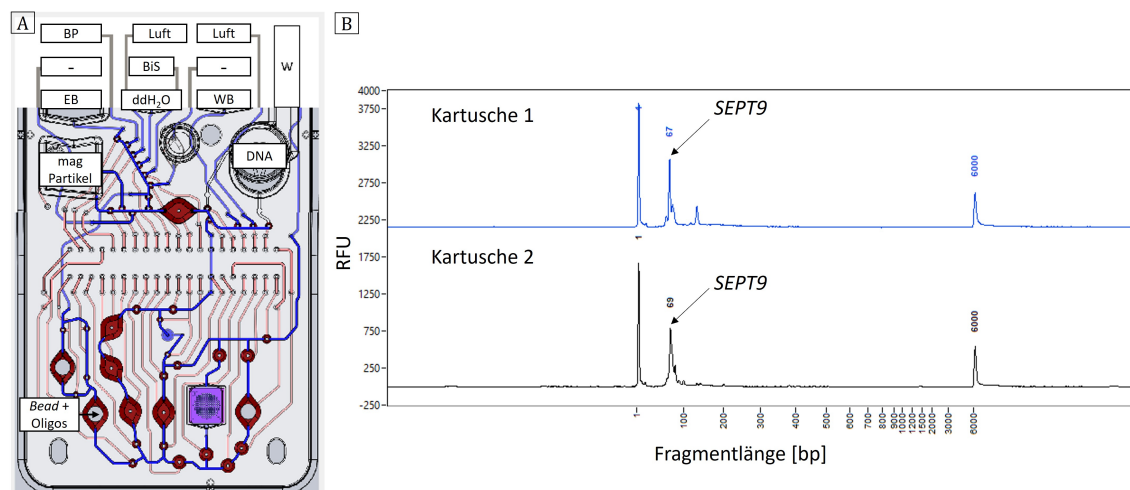


Abbildung 50: Gesamtprozess der DNA-Methylierungsanalyse. (A) Kartuschenbelegung der für den Gesamtprozess benötigten Reagenzien. (B) Fragment Analyse des *on-Chip* amplifizierten DNA-Methylierungsmarker *SEPT9*. Es wurden 444 ng gescherter HCT116 DNA in der *on-Chip* Bisulfitkonvertierung eingesetzt. Die generierte bisDNA wurde *on-Chip* mit Hilfe von magnetischen Partikeln aufgereinigt. Der Gesamtprozess erfolgte in einer *Vivalytic* Kartusche ($n=2$).

5 Diskussion

5.1 Transfer der Bisulfitkonvertierung in die *Vivalytic* Kartusche

Als erster Teilschritt in der Analyse der DNA-Methylierung, wurde die Bisulfitkonvertierung zur Unterscheidung von methylierten und unmethylierten Cytosinen, als Methode der Wahl ausgewählt. Für den Transfer der Bisulfitkonvertierung in die *Vivalytic* Kartusche, mussten zunächst geeignete Bisulfit Kits identifiziert werden. Für die Durchführung in LoC-Systemen sind neben den in der Literatur bereits untersuchten Aspekten wie der Konvertierungseffizienz sowie der Fragmentierung der Ausgangs-DNA durch den sauren pH-Wert und die hohen Temperaturen der Bisulfitkonvertierung, weitere Aspekte entscheidend [197–200]. Hierzu zählen vor allem die benötigten Temperaturen für die Denaturierung und Konvertierung sowie die Dauer der Konvertierungsreaktion. Außerdem ist es aus Platz- und Handhabungsgründen entscheidend, so wenig Reagenzien wie möglich zu verwenden. Aus diesen Gründen, wurden das EpiBiS Kit (Epigenomics), bestehend aus einem Bisulfit Reagenz und einem *Protection* Puffer und das Premium Bisulfite Kit (Diagenode) mit nur einem Konvertierungsreagenz ausgewählt. Die maximale Temperatur des EpiBiS Kits liegt bei lediglich 80 °C (45 min) und die des Premium Bisulfite Kit bei 98 °C (8 min) gefolgt von 54 °C (60 min). Neben dem Erreichen ausreichender Temperaturen, ist darüber hinaus die Kompatibilität des LoC-Systems mit den verwendeten Reagenzien entscheidend. Im folgenden werden die Ergebnisse des Transfers der Bisulfitkonvertierung in der *Vivalytic* Kartusche, sowie der Qualitätskontrolle der Bisulfitkonvertierung diskutiert.

5.1.1 Bisulfitkonvertierung mit dem EpiBiS Kit in der *Vivalytic* Kartusche

Es wurde zunächst das EpiBiS Kit ausgewählt (siehe Abschnitt 4.1.1), da es sich hierbei um die Bisulfitkonvertierung handelt, wie sie auch im FDA zugelassenen Epi proColon[®] Test verwendet wird. Außerdem wurden in einer Testreihe mit verschiedenen, kommerziell erhältlichen Bisulfitkonvertierungskits von Tierling et al. (2018) mit dieser Methode, bereits gute Konvertierungseffizienzen unmethylierter Cytosine (ca. 99 %) bei gleichzeitig geringer Fragmentierung erzielt [197].

5.1.1.1 Bestimmung der Konvertierungstemperatur in der *Vivalytic* Kartusche

Trotz der Verwendung einer Reaktionskammer mit einem maximalen Volumen von 243 µl (275 µl Ansatzvolumen für *off-Chip* Konvertierungsreaktion), konnte die gewünschte

Temperatur von 80 °C erreicht und gehalten werden (Abb. 18). Um ein Fassungsvermögen von 243 µl zu erreichen, musste die Reaktionskammer in der die Konvertierung stattfand mit Hilfe einer Microfräse vergrößert werden. Dadurch ist weniger Kunststoff zwischen dem Konvertierungsansatz und den Heizern, was vermutlich zu einer besseren Heizleistung beiträgt. In Abb. 18 ist zu erkennen, dass sich die Temperatur zunächst einem Wert < 40 °C annähert, was auf die Betriebstemperatur des Analyser von ca. 40 °C zurück zu führen ist. Erst nachdem aktiv geheizt wird, steigt die Temperatur steil an, da nun Temperaturen von 60 °C an den Heizern der unteren PCR Kammer und von 105 °C an den Heizern der Reaktionskammer angelegt werden. Mit diesen Temperatureinstellungen konnte die Zieltemperatur von 80 °C innerhalb weniger Minuten in der Reaktionskammer erreicht werden. Durch die Distanz der aktiven Heizer zur Kammer, in welcher ein lyophilisierter Mastermix vorgelagert werden kann, ist eine Vorlagerung ohne thermische Beeinträchtigung des Mastermix möglich (Abb. 9). Dies ist entscheidend für die Etablierung eines mikrofluidischen Gesamtablaufs (Abb. 17). Es bleibt zu beachten, dass Thermomessungen mit Hilfe von verbauten Temperaturfühlern, fehlerbehaftet sein können. Zum einen können diese nach mehrmaligem Gebrauch beschädigt sein, zum anderen gibt es Unterschiede zwischen verwendeten Thermofühlern, wie dem verwendeten Material und der Materialdicke sowie dem Widerstand. Durch ein verbautes Thermoelement wird wiederum Wärme abgeführt und das zu beheizende Kompartiment ist weniger dicht. Außerdem können Fertigungsabweichungen der Kartuschen zu Abweichungen in der Kontaktierung der Kartusche mit den Heizern führen und somit zu einer veränderten Wärmeübertragung. Des Weiteren ist zu beachten, dass Thermomessungen im Rahmen dieser Arbeit stets mit ddH₂O durchgeführt wurden, anstatt mit der hochmolaren Bisulfitlösung. Beim Aufheizen von Flüssigkeiten in der Kartusche, lässt sich darüber hinaus häufig die Bildung kleiner Bläschen beobachten, welche den Wärmeübergang sowie die eigentliche Messung durch Anlagerung am Temperaturfühler, beeinflussen können. Außerdem können auch die Temperaturregelung im LoC-System (PID-Regler) sowie die NI-Karte, welche als Messsystem verwendet wird, fehlerhaft sein und somit zu Messabweichungen führen. All diese Aspekte machen eine weitere Qualitätskontrolle der Bisulfitkonvertierung notwendig und veranschaulichen, dass eine Thermomessung mit Hilfe von Temperaturfühlern lediglich als grober Anhaltspunkt der tatsächlich erreichten Temperaturen dient. Bei Stark et al. (2018) wurde eine Abnahme der Temperatur im LoC-System über die Zeit beobachtet, da sich das Polydimethylsiloxan (PDMS) bog und somit der Kontakt zum Heizer abnimmt. Da die in der Literatur beschriebenen Systeme auf einfache Protokolle und Bisulfit Kits beschränkt sind, wurde hier in der Regel das Zymo Lightning Kit verwendet [184, 201]. Eine weitere Qualitätskontrolle der bisDNA erfolgte aber in keinem der in der Literatur beschriebenen Ansätze.

5.1.1.2 Evaluierung reduzierter *off-Chip* Konvertierungstemperaturen mit Hilfe des *SEPT9* Methylierungsmarkers

Im folgenden Schritt wurde ein Gradient der Konvertierungstemperatur *off-Chip* durchgeführt, um die Machbarkeit der Bisulfitkonvertierung bei niedrigeren Temperaturen und somit in anderen Kompartimenten der *Vivalytic* Kartusche mit geringerer Heizleistung, wie z. B. der Mischkammer (MK), zu demonstrieren (Abb. 19). Für diese Arbeit wurde die Reaktionskammer als Ort der Bisulfitkonvertierung festgelegt. Eine Analyse der bei niedrigeren Temperaturen konvertierten bisDNA, erfolgte mit der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR,

da der Methylierungsmarker *SEPT9* nur auf erfolgreich konvertierter, ursprünglich methylierter DNA, amplifiziert wird (Abb. 19). Es konnte gezeigt werden, dass *off-Chip* sowohl mit den Standardkonvertierungsbedingungen von 80 °C sowie mit reduzierten Temperaturen von 75 °C und 70 °C eine vergleichbare Amplifikation des *SEPT9* Methylierungsmarkers erreicht werden konnte. Da in diesem Versuch gescherte HCT116 DNA verwendet wurde, könnte dies eine Erklärung für die erfolgreiche Amplifikation sein, da kleinere DNA Fragmente, leichter denaturiert werden [202–204]. Da die Bisulfitkonvertierung am Einzelstrang statt findet, ist die Denaturierung der DNA für den Erfolg der Bisulfitkonvertierung entscheidend [146]. Es wurde schon mehrfach in der Literatur beschrieben, dass die Bisulfitkonvertierung zu starken Verlusten an DNA durch deren Degradierung, hauptsächlich durch Depurinierung, führt [147, 205–207]. Dies kann sich auch auf die Ausbeute der Aufreinigung sowie auf die Anzahl intakter Primerbindestellen auswirken, wodurch es zu Sensitivitätsverlusten kommen kann [205, 206, 208, 209]. Kleine Fragmente, wie z. B. cfDNA, werden durch die Bisulfitkonvertierung, verhältnismäßig weniger stark weiter degradiert, wie große Fragmente (z. B. gDNA) [101, 205, 208, 210]. Da beim EpiBiS Kit mit einer Standardtemperaturen von lediglich 80 °C gearbeitet wird und auch schon Tierling et al. (2018), eine geringe Degradierung durch dieses Kit nachgewiesen haben, ist die Amplifikation auch bei geringeren Konvertierungstemperaturen, wohl eher auf die Verwendung von gescherter HCT116 DNA, welche sich leichter denaturieren lässt, zurück zu führen [197]. Ein Grund für die geringe Degradierung, könnte der separate und dadurch vermutlich wirksamere *Protection* Puffer sein, welcher den Radikalfänger Trolox, ein Vitamin E Derivat, enthält und somit vor Degradierung durch Abfangen radikaler Sauerstoffspezies (engl. *radical oxygen species*, ROS) schützt [211]. Die Standardtemperatur von 80 °C ist im Vergleich zu anderen Kits (z. B. Premium Bisulfite, Zymo Lightning), welche zumindest zu Beginn Temperaturen von 98 °C verwenden, recht gering. In manchen Protokollen werden sogar sogenannte Thermospikes eingesetzt, um durch wiederholtes Aufheizen auf Temperaturen von bis zu 99 °C, die vollständige Denaturierung und somit Konvertierung von Cytosinen zu gewährleisten [197]. Andere Kits (z. B. CpGenome™ Turbo Bisulfite Modification Kit, Merck) wiederum wählen den Ansatz einer chemischen Denaturierung der DNA, bei welcher die eigentliche Konvertierung der DNA bei lediglich 70 °C liegt. Hier wird mit 3 M NaOH denaturiert, weshalb im Anschluss, für die Bisulfitkonvertierung im sauren Bereich um pH 5, mit 12 N HCl angesäuert werden muss. Sowohl der Einsatz hoher Temperaturen als auch die Verwendung starker Säuren und Basen, sind für LoC-Systeme kritisch. Das EpiBiS Kit stellt daher einen guten Kompromiss dar und vermutlich auch eine Mischung aus beiden Denaturierungsmethoden. Aus dem Sicherheitsdatenblatt und der Literatur lässt sich entnehmen, dass Tetrahydrofurfurylalkohol im *Protection* Puffer enthalten ist [145]. In der Literatur wird auch DMSO, DME und 1,4-Dioxan eine denaturierende Wirkung zugeschrieben, welche im Bisulfitreagenz enthalten sein können [130, 197, 211, 212].

5.1.1.3 Bestimmung der Konvertierungseffizienz in der *Vivalytic* Kartusche

Für eine Qualitätskontrolle der Bisulfitkonvertierung, wurde Leukozyten gDNA (ca. 663 ng) in der Kartusche bei 80 °C konvertiert und anschließend *off-Chip* aufgereinigt. Auf diesem Material wurden *HSPA5up* sowie *MLH1up* amplifiziert. Die ermittelten Konvertierungseffizienzen des *HSPA5up* Amplikons (Abb. 51 im Anhang) mit 99,22 % ± 0,53 % (65 Cytosine) sowie des *MLH1up* Amplikons (Abb. 52 im Anhang) mit 99,17 % ±

0,61 % (70 Cytosine) liegen in Bereichen, wie sie auch von Tierling et al. (2018) in *off-Chip* Experimenten mit einem anderen Amplikon (15 Cytosine) ermittelt wurden [197]. Für die Probengenerierung der Qualitätskontrolle wurde eine Kartusche prozessiert. Die Standardabweichung ergibt sich aus der Schwankung der Konvertierungseffizienzen der einzelnen Cytosine jedes Amplikons. Es wurden trotz des Einsatzes von gDNA, hohe Konvertierungseffizienzen erzielt, welche aber in weiteren Prototypenkartuschen reproduziert werden sollten. Die Mischung des Bisulfitansatzes erfolgte *off-Chip*. Der Ansatz wurde in die Mischkammer pipettiert und in die Reaktionskammer gepumpt. Mögliche negative Effekte durch Abweichungen in den Volumenverhältnissen oder durch unzureichendes Mischen der Komponenten in der Kartusche sind somit nicht mit abgebildet. Bei den verwendeten PCR Reaktionen handelt es sich um bisulfitabhängige PCR Reaktionen, weshalb es zur bevorzugten Amplifikation, zuverlässig konvertierter Sequenzbereiche kommen kann. Dadurch kann die Konvertierungseffizienz überschätzt werden. Für einen vollständig automatisierten Ablauf müsste das Konvertierungsreagenz sowie der *Protection* Puffer auf der Kartusche vorgelagert werden und mit einem entsprechenden fluidischen Ablauf in den richtigen Verhältnissen mit der zu konvertierenden DNA Probe gemischt werden. Besonders die geringen Mengen des *Protection* Puffer (25 μ l), sowie dessen Sensibilität gegenüber Sauerstoff, stellen bei der Vorlagerung und dem mikrofluidischen Zusammenführen, eine Herausforderung dar. Beim EpiBis Kit handelt es sich trotzdem um ein LoC-kompatibles Kit, welches sich mit einem geeigneten fluidischen Ablauf vollautomatisiert in der *Vivalytic* Kartusche durchführen lässt. Im Gegensatz zu den in der Literatur aufgeführten Systemen hat man mit der *Vivalytic* Kartusche die Möglichkeit Mischvorgänge durchzuführen und mit Hilfe der pneumatisch angesteuerten Ventile und Pumpkammern, definierte Fluidvolumina durch das mikrofluidische System zu bewegen. Somit ist man flexibel dazu in der Lage, auch komplexe Protokolle auf die *Vivalytic* Kartusche zu integrieren, wie sie bei der Bisulfitkonvertierung der Fall ist [181, 182, 184, 188, 201]. Die deutliche Amplifikation des *SEPT9* Methylierungsmarkers bei reduzierten Konvertierungstemperaturen gab Anlass, das Premium Bisulfite Kit (Diagenode), welches eine noch höhere anfängliche Denaturierungstemperatur (98 °C) benötigt, auf die Kartusche zu integrieren.

5.1.2 Bisulfitkonvertierung mit dem Premium Bisulfite Kit in der *Vivalytic* Kartusche

Für das Premium Bisulfite Kit (Diagenode) wird nur ein Reagenz für die Konvertierung der Probe benötigt, was für die Vorlagerung in miniaturisierten LoC-Systemen ideal ist. Außerdem schnitt dieses Kit bei der *off-Chip* Validierung von Leontiou et al. (2015) bezüglich Konvertierungseffizienz und DNA Fragmentierung am zweitbesten ab [199]. Das Protokoll dieser Konvertierungsreaktion besteht aus einer Denaturierungsphase (98 °C, 8 min) sowie einer Konvertierungsphase (54 °C, 60 min).

5.1.2.1 Optimierung der initialen Denaturierungstemperatur in der *Vivalytic* Kartusche

Für den Transfer des Premium Bisulfite Kit wurde eine Standardreaktionskammer mit 90 μ l Fassungsvermögen verwendet, um den aufwändigen Prototypenbau zu umgehen. Das

Ansatzvolumen des *off-Chip* Protokolls beträgt bei diesem Kit 150 μ l. An den Heizern der unteren PCR Kammer wurden 80 °C und am Heizer der Reaktionskammer wurden 105 °C angelegt. Dadurch konnte in der Reaktionskammer eine maximale Temperatur von ca. 83 °C erreicht werden (Abb. 20). Im *Vivalytic* Analyzer geht das Aufheizen und Abkühlen schneller, da es sich um ein geschlossenes Gerät handelt, welches darüber hinaus über ein Peltier-Element sowie eine Lüftung verfügt.

5.1.2.2 Amplifikation des *SEPT9* Methylierungsmarkers bei reduzierten *off-Chip* Konvertierungstemperaturen

Auch mit dem Premium Bisulfite Kit (Diagenode) wurde ein Temperaturgradient der initialen Denaturierung (8 min) durchgeführt und im Anschluss bei 54 °C konvertiert (siehe Abb. 21, Abschnitt 4.1.2). Bereits Shin et al. (2013) führten mit einem Bisulfit Kit, welches dasselbe Temperaturprofil aufweist (Zymo Research Lightning Kit), einen solchen Temperaturgradienten mit 100 ng unmethylierter humaner gDNA durch. Mit einer minimalen Temperatur von 83 °C war eine Amplifikation der untersuchten Amplikons möglich [182]. In der hier durchgeführten Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Amplifikation des *SEPT9* Methylierungsmarkers *off-Chip* auch noch mit 80 °C verlässlich funktionierte (Abb. 21). Mit Denaturierungstemperaturen von 80 °C und 85 °C werden sogar bessere Amplifikationskurven generiert wie mit der Denaturierungstemperatur von 98 °C aus dem Standardprotokoll. Dies ist vermutlich auf die geringere Fragmentierung der DNA bei niedrigeren Temperaturen zurück zu führen, welche aber aufgrund des Einsatzes kurzer DNA Fragmente für eine zuverlässige Denaturierung ausreicht.

5.1.2.3 Automatisierte Durchführung der Bisulfitkonvertierung in der *Vivalytic* Kartusche

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse des *off-Chip* Temperaturgradienten wurde ein fludischer Ablauf für die vollautomatisierte Durchführung der Bisulfitkonvertierung etabliert und optimiert (Abb. 20). Hierbei ist es möglich, eine homogene Mischung des vorgelagerten Bisulfitreagenz mit der DNA Probe zu erreichen und diesen Reaktionsansatz für die Bisulfitkonvertierung definiert in die Reaktionskammer zu pumpen. Andere in der Literatur beschriebene LoC-Systeme benötigen aufwendige Vorbereitungen des LoC-Systems, wobei die verwendeten Protokolle nur bedingt automatisiert durchführbar sind [181, 182, 184, 201]. Um die Zuverlässigkeit dieser automatisierten Methode zu verifizieren, ist eine Qualitätskontrolle, der mit Hilfe des automatisierten Ablaufs generierten bisDNA notwendig. Diese wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

5.1.2.4 Qualitätskontrolle der automatisierten Bisulfitkonvertierung mit Hilfe einer NGS-basierten Amplikonsequenzierung

Für die Qualitätskontrolle der *on-Chip* generierten bisDNA mittels NGS Amplikonsequenzierung, wurden zwei bisulfitunabhängige PCR Reaktionen genomischer *repeat* Bereiche (*LTR5*) etabliert und mit Hilfe eines NGS basierten Ansatzes sequenziert. Die Durchführung eines t-Test ergab, dass es sich mit 99,2 % \pm 0,6 % (*off-Chip*) und 97,3 % \pm 1,4 % (*on-Chip*), um einen signifikanten Unterschied der Konvertierungseffizienzen beider Verfahren

handelt. Die maximal erreichbare Temperatur von 83 °C war zwar, wie beim Temperaturgradient gezeigt, für eine Amplifikation des Methylierungsmarkers ausreichend, eventuell aber nicht für eine vollständige Konvertierung aller Cytosine. Außerdem könnte eine weitere Optimierung der Durchmischung sowie der Einhaltung der Volumenverhältnisse der Komponenten, z. B. durch peristaltisches Pumpen, dazu beitragen, die Konvertierungseffizienz zu steigern. Nach der Bisulfitkonvertierung wurde der Bisulfitansatz durch Anbohren der Reaktionskammer aus der Kartusche entnommen. Hierbei kann es passieren, dass unkonvertierte Probe aus den mikrofluidischen Kanälen nachläuft und somit in die Probe gelangt. Durch die bisulfitunabhängige PCR werden auch schlecht bzw. nicht konvertierte Sequenzen amplifiziert, was zu einer Reduzierung der Konvertierungseffizienz führen kann. Für zukünftige Versuche sollten die Kanäle, welche die Reaktionskammer umgeben, ausgiebig gespült und entleert werden. Außerdem ist darauf zu achten, dass der Inhalt der Reaktionskammer nicht vollständig entleert wird. Shin et al. (2013) und auch andere in der Literatur beschriebene Ansätze zur Bisulfitkonvertierung in LoC-Systemen, haben keine Qualitätskontrolle mittels NGS Sequenzierung durchgeführt [182, 184, 212, 213]. Mit anderen *off-Chip* Kits wurden allerdings ebenfalls niedrige Konvertierungseffizienzen erzielt. Beim Zymo Lightning Kit werden von bis zu 23 % unkonvertierter Cytosine berichtet [197] und auch weitere Kits erreichen lediglich 93,2 % \pm 9,3 % (Imprint[®] DNA Modification Kit (Sigma-Aldrich, MOD50)), 98,0 % \pm 2,2 % (Epitect[®] Fast DNA Bisulfite Kit (Qiagen, 59824)), 98,3 % \pm 0,7 % (Epitect[®] Bisulfite Kit (Qiagen, 59110)) sowie 97,7 % \pm 2,0 % (Methyleasy[™] Xceed (Human Genetic Signatures, ME001)) [148]. Durch weitere Reproduzierungsversuche sowie Optimierungsarbeiten der automatisierten *on-Chip* Bisulfitkonvertierung sowie der anschließenden Probennahme, sollte gezeigt werden, dass mit der *Vivalytic* Kartusche vergleichbare Konvertierungseffizienzen wie mit der *off-Chip* Methode erreicht werden können.

5.2 Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA

Die Aufreinigung Bisulfit-konvertierter DNA (bisDNA) gilt aufgrund der starken Fragmentierung und des vorwiegend einzelsträngigen Charakters als besonders herausfordernd. Zudem ist die bisDNA durch die Bisulfitkonvertierung mit hochmolaren Bisulfitsalzen und anderen Reagenzien verunreinigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ansätze und Abläufe für die automatisierte Aufreinigung von bisDNA in der *Vivalytic* Kartusche erarbeitet. Ein Ansatz beruht auf der Verwendung von Silikamatrices in Kombination mit alkoholhaltigen Waschpuffern, ein weiterer auf der Verwendung von silikabeschichteten magnetischen Partikeln, wobei der alkoholhaltige Waschpuffer durch einen alternativen, polymerhaltigen Waschpuffer ausgetauscht werden konnte. Die Ergebnisse der LoC-Integration dieser Verfahren werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.2.1 Silikamatrixbasierte Aufreinigung in der *Vivalytic* Kartusche

Beim Transfer einer silikamatrixbasierten Aufreinigungsmethode in die *Vivalytic* Kartusche ist zu beachten, dass es sich beim Standard *off-Chip* Verfahren, um eine Methode handelt, welche auf Zentrifugalkräften beruht. In der *Vivalytic* Kartusche hingegen, werden Bisulfitansatz und Puffer, pneumatisch über den Filter bewegt. Zunächst wurde ein

möglichst LoC-kompatibles *off-Chip* Protokoll, etabliert und optimiert. Auffallend ist zudem, dass für die *off-Chip* Aufreinigung von bisDNA, dicke Filter verwendet werden, welche aufgrund des limitierten Platzes in der Kartusche nicht vollständig integriert werden können. Der Einsatz polymerbasierter Waschpuffer war somit nicht möglich, da diese hochviskosen Puffer *on-Chip* nicht pneumatisch über die 1,4 mm dicken Silikamatrices bewegt werden konnten. Die Anpassung und Integration der silikamatrixbasierten Aufreinigung wird in den folgenden Abschnitten diskutiert.

5.2.1.1 Identifizierung LoC-kompatibler Silikamatrices

Zunächst wurden verschiedene kommerzielle Silikamatrices in *off-Chip* Aufreinigungsexperimenten getestet, wobei die Machbarkeit der Integration dieser Silikamatrices in die *Vivalytic* Kartusche, stets im Vordergrund stand. Hierbei wurde bisDNA, welche mit dem Lighting Kit (Zymo Research) und dem Premium Bisulfite Kit (Diagenode) konvertiert wurde, mit den Aufreinigungspuffern dieser Kits, unter Verwendung verschiedener Silikamatrices, aufgereinigt (siehe Abschnitt 4.2.1). Für die Konvertierung wurden zwei verschiedene Kits verwendet, da sich die Bisulfitreagenzien in ihrer Zusammensetzung häufig unterscheiden und dementsprechend auch die Aufreinigung eigens auf den jeweiligen Bisulfitansatz abgestimmt ist. Beide Kits weisen, was die Temperaturen und Inkubationszeiten, sowie die Anzahl der verwendeten Reagenzien angeht, identische Protokolle auf, weshalb es sich auch beim Kit von Zymo Research um einen potentiellen Kandidaten für eine LoC-Integration handelt. Außerdem wird dieses Kit häufig auch bei den in der Literatur aufgeführten LoC-Systemen eingesetzt [181, 184, 201]. Wie in Abb. 26 zu erkennen ist, konnten mit dem Diagenode Kit, tendenziell bessere Ausbeuten erzielt werden, weshalb auch weiterhin mit diesem Kit gearbeitet wurde. Unterschiedliche DNA Ausbeuten von ungefähr 75 % (Diagenode) und 60 % (Zymo), wurden in der Literatur auch von Kint et al. (2018) beschrieben und auf die unterschiedliche Puffer- und Reagenzienzusammensetzungen zurück geführt [148]. Ein Großteil des Ausbeuteverlustes ist jedoch bereits auf die hohen Temperaturen und den niedrigen pH-Wert (ca. pH 5) während der Bisulfitkonvertierung zurück zu führen [147, 148, 206]. Außerdem kann die unterschiedlich starke Degradierung der Ausgangs DNA durch die verschiedenen Bisulfitkonvertierungsreagenzien, zu unterschiedlichen Ausbeuten führen [197, 199, 214]. Beim Vergleich von Ausbeuten an bisDNA, ist es darüber hinaus entscheidend, die verwendete Quantifizierungsmethode zu betrachten, da es hier deutliche Unterschiede gibt [214]. Durch die Mischung aus einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA nach der Bisulfitkonvertierung, sowie die unterschiedlich starke Fragmentierung und somit unterschiedliche Verfügbarkeit von Primerbindestellen, kann es z. B. zu starken Schwankungen zwischen qPCR-basierten Detektionsmethoden und fluoreszenzbasierten Methoden wie dem Qubit[®] kommen [215]. Die vorhandenen doppelsträngigen Sequenzen sind in der Regel auf eine unvollständige Denaturierung, auf Sequenzen in welchen keine Konvertierung statt gefunden hat sowie auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen in der einzelsträngigen DNA zurückzuführen [215]. Mit den Filtersäulchen aus dem Diagenode und dem Zymo Kit konnten die besten Ausbeuten erzielt werden (73,90 % \pm 8,34 % bzw. 58,20 % \pm 15,69 %). Hierbei handelt es sich um industriell gefertigte Filtersäulchen mit bündig integrierten, watteartigen Silikamatrices. Auch mit den Filtersäulchen von r-Biopharm und Analytic Jena, welche aus mehreren Schichten an Silikamatrix aufgebaut sind, konnten Ausbeuten von 50,00 % \pm 1,54 % bzw. 45,90 % \pm 1,41 % erzielt werden. Die etwas geringeren Ausbeuten können

daher kommen, dass diese Filtersäulchen nicht für die Konvertierungs- und Aufreinigungsreagenzien von Diagenode optimiert wurden. Eine Aufreinigung mit den Reagenzien des Zymo Kit wurde hier nicht durchgeführt, da sich die Filter nicht ohne Beschädigung aus den Filtersäulchen ausbauen ließen und somit ein Einbau in die *Vivalytic* Kartusche, nicht möglich war. Lediglich die Filter F und B, konnten als Rohmaterial bezogen werden. Der Unterschied zwischen dem Filter F und dem Filter B könnte auf eine unterschiedliche Beschaffenheit des Materials, wie der Dichte der Fasern sowie der Struktur der Fasern selbst zurück zu führen sein. Durch die unterschiedliche Materialbeschaffenheit, sind die Filter auch unterschiedlich sensitiv gegenüber deren Bearbeitung und Einbau in die Filtersäulchen. Ausgestanzte Filterscheiben wurden in Macherey-Nagel Rohlinge eingebaut (drei Lagen). Ein Grund für die geringen Ausbeuten könnte eben dieser manuelle Zusammenbau sein, da die Silikamatrix deutlich weniger kompakt verbaut ist und somit leichter umströmt werden kann. Trotzdem bietet der Filter F, mit welchem knapp 20 % Ausbeute erzielt werden konnte, einen entscheidenden Vorteil, da dieser für dessen Integration in die *Vivalytic* Kartusche, nicht erst aus einen Filtersäulchen ausgebaut werden muss. Auch hier konnte gezeigt werden, dass es von Vorteil ist, mehrere Lagen der ausgestanzten Filterscheibchen, zu verwenden (Abb. 27). Aufgrund dieser Daten wurden daher Ansätze entwickelt, um sowohl den Filter F, als auch den Diagenode Filter, in die Kartusche zu integrieren.

5.2.1.2 Automatisierte Aufreinigung in der *Vivalytic* Kartusche

Nachdem ein geeignetes mikrofluidisches Protokoll etabliert wurde (siehe 3.2.6, Abb. 11), wurden *on-Chip* Versuche mit den integrierten Filtern durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2.2, Abb. 28). Da *on-Chip* keine Zentrifugalkräfte wirken, wurde aus Platzgründen keine Fritte in die *Vivalytic* Kartusche eingebaut. Da für die Aufreinigung von bisDNA dicke Filter verwendet werden, wurde die Höhe der Filterkammer mit Hilfe einer Mikrofräse auf 1,4 mm vergrößert. Außerdem war es mit dieser Methode möglich, Kartuschen mit Filterkammern zu fertigen, welche verschiedene Durchmesser aufweisen. Trotz der Vergrößerung der Höhe der Filterkammer, musste der Diagenode Filter für dessen Einbau gekürzt werden. Die Verwendung eines gekürzten Filters kann zu Ausbeuteverlusten führen. Vermutlich wird gerade beim Aufreinigen von stark fragmentierter DNA, ein ausreichend dicker Filter benötigt, um eine effektive Aufreinigung durch Abfangen kleiner Fragmente, zu ermöglichen. Eventuell kann auch die Bearbeitung des Filtersäulchens, zu Beeinträchtigungen des Filtermaterials, z. B. durch entstehenden Frässtaub, führen. Außerdem kann das Abschneiden des Filters dessen Oberfläche verändern und somit die Ausbeute reduzieren. Bei beiden Einbaumethoden (Abb. 28, (A, B)), lassen sich die Kunststoffringe zwar passgenau, ohne den Einsatz von Klebstoff in die Filterkammer integrieren, jedoch ist auch hier nicht auszuschließen, dass das Filtermaterial zum Teil umströmt wird. Beim Transfer des Diagenode Filters aus dem Filtersäulchen in den 3D gedruckten Ring, sind Beschädigungen und Beeinträchtigungen des Filters möglich. Außerdem kann es sein, dass besonders bei den dicken, watteartigen Filtern von Diagenode, Zentrifugalkräfte für ein tiefes Eindringen der bisDNA in den Filter benötigt werden, damit diese dort unter den geeigneten Bindebedingungen (pH-Wert, Salzkonzentrationen) mit der Silikaoberfläche wechselwirken kann. Experimente mit veränderten Pumpfrequenzen führten zu keiner Veränderung in der Ausbeute (Daten nicht gezeigt). In der *Vivalytic* Kartusche liegt ein anderes Oberfläche-Volumen-Verhältnis als in den Zentrifugensäulchen vor, was zum Ver-

lust an Probe durch dessen Interaktionen mit der Oberfläche des mikrofluidischen Systems führen kann [216]. Die *Vivalytic* Kartusche weist ein größeres Totvolumen als ein Zentrifugensäulchen auf. Durch die fehlende Zentrifugalkraft, kommt es zu vermehrten Rückständen an Probe und Reagenzien im mikrofluidischen System. Auffällig war, dass gerade mit dem Diagenode Filter, welcher in den *off-Chip* Experimenten, Ausbeuten von bis zu $73,90 \% \pm 8,34 \%$ lieferte, mit beiden Einbaumethoden (siehe Material und Methoden 3.2.6) in den *on-Chip* Experimenten, deutlich geringere Ausbeuten von ca. 5 % erzielt wurden. Beim Filter F konnten bei der Wahl des richtigen Durchmessers der Filterscheibchen sowie der Filterkammer, Ausbeuten von bis zu $14,48 \% \pm 3,51 \%$ erreicht werden. Im Rahmen der Schwankungsbreite, waren die Ausbeuten damit nur tendenziell schlechter wie mit den *off-Chip* Experimenten. Durch die Wahl von Filterscheibchen ($\varnothing 3,4$ mm), welche etwas größer sind als die Filterkammer ($\varnothing 3,2$ mm), konnten die besten Ergebnisse erzielt werden. Vermutlich wird dadurch eine geringere Umströmung des Filters sowie ein geringerer Verlust an Probenmaterial erreicht. Größere Filterkammern bereiten beim Verschweißen der Kartuschen Probleme und erhöhen zudem das Totvolumen. In den folgenden Experimenten wurde daher mit Filterkammern mit einem Durchmesser von 3,2 mm weitergearbeitet. Da beim Filter F, sowohl *off-Chip* als auch *on-Chip*, ein manueller Zusammenbau erfolgte, könnten die mangelnde Kompaktheit und Integrität des Filters im Filtersäulchen sowie in der Kartusche, für die niedrigen Ausbeuten verantwortlich sein. Das würde auch den enormen Unterschied zwischen den industriell gefertigten Diagenode Filtersäulchen und deren manuellen Einbau in der *Vivalytic* Kartusche erklären. Mit einem geeigneten industriellen Fertigungsverfahren, könnten somit eventuell die Ausbeuten sowie die Reproduzierbarkeit gesteigert werden.

5.2.1.3 Aufreinigung unterschiedlicher Mengen bisulfitkonvertierter DNA mit dem etablierten Aufreinigungsprotokoll in der *Vivalytic* Kartusche

Im nächsten Schritt wurden mit dem Filter F *on-Chip* verschiedene DNA Mengen (500 ng, 50 ng, 5 ng und 0,5 ng) aufgereinigt (Abb. 29). Aufgrund der geringen DNA Mengen, wurde die Quantifizierung mit Hilfe des CFF Assay durchgeführt. Da es sich auch hier um manuell aufgebaute Prototypen handelte, lässt sich eine starke Standardabweichung, besonders bei 50 ng und 0,5 ng erkennen. Im Rahmen der Standardabweichung wurden für alle aufgereinigten DNA Mengen, ungefähr die selben Ausbeuten erzielt ($9,27 \% \pm 3,18 \%$, $21,51 \% \pm 13,14 \%$, $10,48 \% \pm 4,48 \%$, $20,26 \% \pm 14,74 \%$). Da zuvor sogar 700 ng mit ähnlichen Ausbeuten aufgereinigt wurden (Abb. 28), ist hier nicht von einer Übersättigung der Bindekapazität auszugehen. Die Ergebnisse zeigen, dass man mit diesem System, sowohl größere Mengen für präparative Anwendungen, als auch geringe Mengen an bisDNA für diagnostische Anwendungen, aufreinigen kann.

5.2.1.4 Einfluss verschiedener Eluatvolumina auf die qPCR

Ein wichtiger Unterschied zwischen *off-Chip* und *on-Chip* Abläufen, wird im Abschnitt 4.2.3 aufgezeigt. In *off-Chip* Experimenten werden in der Regel 2 - 5 μ l Eluat in qPCR Reaktionen eingesetzt, wohingegen in *on-Chip* Experimenten zum Lösen der lyophilisierten und getrockneten qPCR Komponenten, 20 μ l eingesetzt werden. Dadurch kann zum einen eine sensitivere Detektion durch mehr Probenmaterial erreicht werden, allerdings werden dadurch auch mehr potentielle Inhibitoren in die qPCR Reaktion eingebracht.

Dabei handelt es sich um ein Problem, mit welchem man sich in *off-Chip* Experimenten (2 - 5 μ l Eluat) nicht befassen muss, weshalb auch in der Literatur kein Einsatz größerer Eluatvolumina beschrieben ist. Besonders bei der Aufreinigung von bisDNA, welche durch die Bisulfitkonvertierung stark kontaminiert ist, ist der Einsatz größerer Eluatvolumina kritisch. Wie in Abb. 30 dargestellt, kommt es bereits beim Einsatz von 8 μ l Eluat zu einer deutlichen Abnahme der Amplifikation von *SEPT9*. Bei 12 μ l, 16 μ l und 20 μ l wird kaum noch eine Amplifikation erreicht. Eine Möglichkeit diesen Effekt zu reduzieren, wäre die Verdünnung des Eluats vor der qPCR mit ddH₂O. Dies gestaltet sich bei der Aufreinigung mit Silikamatrices allerdings als schwierig, außerdem können durch die bereits durch die Bisulfitreagenzien kontaminierten mikrofluidischen Kanäle, weitere Inhibitoren eingeschleppt werden. Die Amplifikation von *ACTB* erfolgt weiterhin ohne Beeinträchtigung. Dies könnte daran liegen, dass Loci des *ACTB* Gen, auch in Form von Pseudogenen, auf dem Templat vorhanden sind, weshalb es die Polymerase, trotz Inhibierung statistisch gesehen leichter hat, dieses Amplikon zu amplifizieren. Außerdem haben es Polymerasen umso schwerer, je mehr Uracile, bzw. umgewandelte Cytosine, vorhanden sind. Eine geringere Menge konvertierter Cytosine auf dem *ACTB* Templat, könnte also zu einer besseren Amplifikation führen. Kommt es zudem zu einer ungenügenden Desulfonierung dieser konvertierten Cytosine, wird die Amplifikation zusätzlich erschwert. Auch die Länge und Anzahl von sogenannten Homopolymer-*stretches* in der Sequenz des längeren *ACTB* Amplikons, könnten die Amplifikation beeinflussen. Es konnte zwar ein fluidischer Ablauf sowie eine Methode zur Aufreinigung von bisDNA in die Kartusche integriert werden, für dessen Verschaltung mit der qPCR ist allerdings noch weitere Optimierungsarbeit zu leisten. Aufgrund der Verschleppung von Inhibitoren, sowie der limitierten Möglichkeit zum Verdünnen des Eluats, wurde der Fokus im Folgenden auf die Etablierung einer alternativen Aufreinigungsmethode mit Hilfe von silikabeschichteten magnetischen Partikeln gelegt. Auch der Einsatz von alkoholhaltigen Waschpuffern in der Kartusche ist aufgrund der Sensitivität der TPU gegenüber Alkoholen und Lösungsmitteln, kritisch. Darüber hinaus kann es durch Rückstände und Alkoholdämpfe, zur Inhibierung von Polymerasen kommen [217]. Um die Limitierungen der Aufreinigung mit silikamatrixbasierten Filtern zu umgehen, wurde parallel an einer alkoholfreien Aufreinigungsmethode mit silikabeschichteten magnetischen Partikeln gearbeitet. Die Ergebnisse der Etablierung und Optimierung dieser Methode sowie deren Transfers in die *Vivalytic* Kartusche werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.2.2 Etablierung und Integrierung einer alkoholfreien Aufreinigungsmethode mit Hilfe magnetischen Partikeln

Der Einsatz von magnetischen Partikeln bietet mehrere Vorteile in mikrofluidischen Systemen. Diese können leicht vorgelagert werden, die Probe kann gebunden an die magnetischen Partikel durch das System befördert werden, die Prozesse sind beliebig skalierbar und es müssen keine technischen Lösungen für deren bündige Integration sowie zur Verhinderung des Verblockens, wie es bei Filtern der Fall ist, ausgearbeitet werden [153, 218–220]. Die Verwendung von magnetischen Partikeln ermöglicht den Einsatz hochviskoser polymerbasierter Waschpuffer sowie eine bessere Übertragung *off-Chip* etablierter Protokolle in das LoC-System. Es handelt sich hier zwischen der *on-* und *off-Chip* Methode nicht um grundlegend verschiedene Verfahren, wie es bei der Aufreinigung mit Hilfe von

Silikamatrices der Fall ist. Die Mobilität der magnetischen Partikel in der Kartusche ermöglicht zudem eine flexible Elution und Verdünnung des Eluats in der Kartusche. Magnetische Partikel können leicht regeneriert werden, um somit umfangreiche Protokolle mit mehreren Aufreinigungsschritten in mikrofluidischen Systemen mit limitiertem Platz durchführen zu können. Ein weiterer wichtiger Aspekt für den Einsatz in massengefertigten Einwegkartuschen, sind die niedrigen Kosten, welche mit der Aufreinigung mit Hilfe von magnetischen Partikeln verbunden sind [153]. Da die aktuelle *Vivalytic* Plattform noch keinen integrierten Magneten besitzt, wurden zwei Patente angemeldet um den späteren Einsatz magnetischer Partikel im *Vivalytic* System zu schützen (siehe Publikationsliste). Für die *on-Chip* Experimente musste manuell ein externer Magnet auf die *Vivalytic* Kartusche angelegt werden. Eine gleichzeitige Nutzung der Optikeinheit zur Detektion von Fluoreszenzsignalen war daher nicht möglich. Die in der Literatur aufgeführten LoC-Systeme für die Analyse der DNA-Methylierung beruhen ebenfalls auf dem Einsatz magnetischer Partikel [182, 184, 201].

5.2.2.1 Optimierung und Transfer der alkoholfreien Aufreinigungsmethode

Für die Etablierung der Aufreinigungsmethode, wurden beim Standardprotokoll (*Epi_Std off-Chip*) zunächst die alkoholhaltigen Puffer gegen einen chaotropen Bindepuffer (Diagenode) sowie einen polymerbasierten Waschpuffer (Bosch) ausgetauscht (*Epi off-Chip*) und das Volumen der eingesetzten magnetischen Partikel erhöht (Abb. 31). Mit der Erhöhung des Volumens auf 30 μl war eine schnelle Bindung der bisDNA an die Partikel möglich, wobei noch eine gute Handhabung in der *Vivalytic* Kartusche möglich war. Im Anschluss wurden die Bisulfitreagenzien des EpiBiS Kit gegen die des Diagenode Kit ausgetauscht (*Diag off-Chip*) und das optimierte *off-Chip* Protokoll nach der Etablierung und Optimierung eines fluidischen Ablaufs, auf die *Vivalytic* Kartusche transferiert (*Diag on-Chip*). Die Standard *off-Chip* Methode von Epigenomics (magnetische Partikel) zeigte mit Ausbeuten von $78,9 \% \pm 2,3 \%$ (Abb. 31) ähnliche Ausbeuten wie die Standard *off-Chip* Methode von Diagenode (Silikamatrix) mit $73,9 \% \pm 8,3 \%$ (Abb. 26). Auch bei der Verwendung des chaotropen Bindepuffers (Diagenode) sowie des polymerbasierten Waschpuffers (Bosch) konnten Ausbeuten von $62,9 \% \pm 8,5 \%$ erzielt werden (Abb. 31). Da geringere Puffervolumina sowie der hochmolekulare chaotrope GuHCl Bindepuffer (Diagenode) verwendet wurden, konnte außerdem das Volumen von 1295 μl auf 905 μl reduziert werden. Zusammen mit der Erhöhung des zugegebenen Volumens magnetischer Partikel, konnte die Bindezeit von 45 min auf 5 min reduziert werden. Dadurch läuft die Bindekinetik statistisch gesehen schneller ab. Außerdem liegt eine höhere finale Konzentration chaotroper Ionen vor. Um hier genauere Aussagen treffen zu können, ist eine exakte Analyse der Puffer und Reagenzien notwendig. Zudem könnte untersucht werden, wie sich die Ausbeute beim Standardverfahren (45 min) ändert, wenn man die Bindezeit verkürzt, da sich eventuell auch hier, ohne merkliche Ausbeuteverluste, Zeit einsparen ließe. Außerdem entfällt der Trocknungsschritt, welcher für das Verdampfen des Ethanolhaltiger Puffer benötigt wird. Auch die Elutionszeit konnte *on-Chip* auf 5 min halbiert werden. Da die verwendeten magnetischen Partikel aus dem EpiBiS Kit (Epigenomics) stammen und die Aufreinigung auf diese Konvertierungsmethode angepasst ist, wurde im nächsten Schritt die Konvertierungsmethode gegen die des Premium Bisulfite Kit (Diagenode) ausgetauscht. Die Volumenreduzierung auf 780 μl resultiert hier aus dem geringeren Volumen des Bisulfitansatzes. Trotz der Verwendung des Konvertierungsansatzes der Firma

Diagenode mit den Aufreinigungsreagenzien der Firma Epigenomics konnten Ausbeuten von $56,2\% \pm 3,3\%$ erreicht werden. Mit dem etablierten mikrofluidischen Protokoll (siehe Abschnitt 4.3.2, Abb. 32) konnten in der *Vivalytic* Kartusche Ausbeuten von $63,0\% \pm 10,9\%$ erreicht werden. Diese sind im Rahmen der Schwankungsbreite mit den Ausbeuten des entsprechenden *off-Chip* Protokolls vergleichbar (Abb. 31). Die verkürzte Elutionsdauer von 2,9 min (Abb. 31) ist auf das Anlegen von $60\text{ }^\circ\text{C}$ zurück zu führen sowie auf die hohen Kräfte, welche im mikrofluidischen System beim Zirkulieren der Suspension wirken [221] (siehe Abschnitt 4.3.2, Abb. 34). Shui et al. (2011) berichten von einem mikrofluidischen System zum hydrodynamischen Scheren von gDNA in Fragmente von ca. 5 kb Länge unter Verwendung hydraulischer Drücke von ungefähr einem Bar. Auch wenn beim Zirkulieren des Eluats in der Kartusche hohe Kräfte wirken, ist eine weitere Fragmentierung der ohnehin schon stark fragmentieren einzelsträngigen DNA nicht zu erwarten. Die langen Bindezeiten von 18,2 min sind auf das ausführliche fluidische Protokoll zurück zu führen (Abschnitt 4.3.2, Abb. 32). Bei weiterer Optimierungsarbeit, liese sich der Ablauf weiter beschleunigen, da die Entleerung der Reaktionskammer und auch Spülschritte verkürzt werden könnten. Wie bereits erwähnt, konnten keine LoC-Systeme in der Literatur gefunden werden, welche Silikamatrices zur Aufreinigung von bisDNA verwenden. Ma et al. (2018) beschreiben das einzige LoC-System, welches ebenfalls pneumatisch gesteuerte Ventile einsetzt [181]. Allerdings werden damit keine Fluide definiert durch das System bewegt, sondern lediglich der Kontakt zwischen verschiedenen Reagenzien unterbrochen und hergestellt. Die Aufreinigung geschieht hier rein diffusionsgetrieben, was die Anwendung für kleine DNA Fragment wie z.B. cfDNA, schwierig gestaltet und auch die Aufreinigung vom Faktor Zeit sowie den vorhandenen Konzentrationsgradienten abhängig macht. Es lassen sich zwar sehr geringe Probenmengen mit diesem System prozessieren, allerdings muss die Probe für weitere Anwendungen noch einmal zusätzlich *off-Chip* aufgereinigt werde [181]. Die vielversprechendsten Ansätze zur Analyse von DNA-Methylierungen in LoC-Systemen aus der Literatur, verwenden ebenfalls magnetische Partikel [182, 184, 201, 212, 212, 212]. Hier wird die von Bailey et al. (2013) entwickelte *methylation on beads* (MOB) Methode verwendet, bei welcher ebenfalls silikabeschichtete magnetische Partikel verwendet werden. Die Bisulfitkonvertierung findet hierbei an der an die Partikel gebundene DNA statt. Die Bindung erfolgt ebenfalls über chaotrope Guanidiniumhydrochlorit Puffer, ohne Alkohol. Lediglich die Waschlösung enthalten Alkohol. Über Ausbeuten der Aufreinigungsmethode werden keine Angaben gemacht. Da es im *Vivalytic* System möglich ist, Fluide definiert zu mischen und zu bewegen, ist man nicht auf einen Transport der an magnetische Partikel gebundenen bisDNA, von einem Reagenz zum anderen angewiesen. Dadurch ist die Etablierung universeller fluidischer Abläufe im *Vivalytic* System möglich. Der Einsatz magnetischer Partikel in der Kartusche, erlaubt darüber hinaus den Einsatz viskoser, polymerbasierter Waschlösung, da kein Filter mehr passiert werden muss. Die Eigenschaft von Polyethylenglykol DNA zu präzipitieren, ist schon seit längerer Zeit bekannt [222, 223]. Da in der Regel in *off-Chip* Anwendungen, der Einsatz von alkoholhaltigen Puffern ohne weiteres möglich ist, konnten keine Ansätze zur Aufreinigung von bisDNA oder sonstiger Nukleinsäuren, ohne Alkohol in der Literatur gefunden werden. Die hohen Ausbeuten trotz des Einsatz von polymerbasierten Waschlösungen, lassen sich vermutlich durch die gute Quervernetzung der bisDNA mit Hilfe des Polyethylenglykols auf der großen Oberfläche der magnetischen Partikel erklären. Der fluidische Ablauf des Waschschritts ist in Abschnitt 4.3.2 (Abb. 33) dargestellt. Da die magnetischen Partikel durch den externen Magneten, während

des Waschschritts, in einem kompakten Pellet gehalten werden, verhindert dies vermutlich zusätzlich den Verlust von bisDNA, während der Puffer durch die Reaktionskammer gepumpt wird. Der letzte Schritt in der Analyse der DNA-Methylierung, stellt deren Detektion mit Hilfe qPCR-basierter Verfahren dar. Die Ergebnisse des Transfers der qPCR Detektionsmethode in die *Vivalytic* Kartusche, werden im nächsten Abschnitt diskutiert.

5.3 qPCR-basierte Detektion des *SEPT9* Methylierungsmarkers in der *Vivalytic* Kartusche

Für die Durchführung einer qPCR-basierten Detektion von Methylierungsmarkern in der *Vivalytic* Kartusche, mussten eine Reihe von Optimierungen und Abänderungen der *off-Chip* Protokolle durchgeführt werden. Es wurden die Oligonukleotide wie sie von Devos et al. (2009) beschrieben werden verwendet. Lediglich das Fluorophor der *ACTB* Sonde wurde auf Cy5 und der *Quencher* auf BHQ2 abgeändert, um eine bessere Detektion der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR mit den Fluoreszenzkanälen des *Vivalytic* Analyzers zu ermöglichen. Die Oligonukleotidkonzentrationen wurden von Dietrich et al. (2013) übernommen [123]. Eine Übersicht der Zusammensetzung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR ist unter Abschnitt 3.2.8 (Abb. 12) dargestellt. Da die Kartuschen als Produkt bei Raumtemperatur (RT) lagerbar sein sollen, musste zunächst ein geeigneter lyophilisierter Mastermix identifiziert werden, mit dem sowohl die Desulfonierung während einer verlängerten initialen Denaturierungsphase, sowie die eigentliche *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR durchführbar sind. Nach der Charakterisierung der *off-Chip* qPCR wurde diese, beginnend mit dem Lösen des lyophilisierten Mastermix sowie der eingetrockneten Oligonukleotide, sukzessive unter Optimierung des fluidischen Ablaufs, in die *Vivalytic* Kartusche transferiert. Besonders herausfordernd ist die Anpassung des Temperaturprofils, da thermische Einflussgrößen wie Kühlraten in LoC-Systemen stark von denen eines qPCR Cyclers abweichen. Die Verwendung eines zusätzlichen Blocker Oligonukleotids zur Unterdrückung der Amplifikation des unmethylierten Hintergrunds, stellt aufgrund von sich ausbildenden Oligonukleotidinteraktionen, eine weitere Herausforderung dar. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Transfers der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR in die *Vivalytic* Kartusche diskutiert.

5.3.1 Identifizierung lyophilisierter Mastermixe für die Durchführung der qPCR in der *Vivalytic* Kartusche

Neben der oben erwähnten Lagerung der Kartuschen bei RT, bringt die Verwendung lyophilisierter Mastermixe weitere Vorteile. Zum einen ist die Vorlagerung der Reagenzien in den dafür vorgesehenen Kammern, direkt neben den PCR Strängen vorteilhaft, um eine Kontaminationen mit anderen auf der Kartusche genutzten Reagenzien zu vermeiden. Zum anderen ist die Verwendung eines lyophilisierten Mastermix für die Etablierung eines möglichst produktnahen Gesamtablaufs unabdingbar. Durch das geringe Eigenvolumen lyophilisierter Mastermixe, ist der Einsatz großer Eluatvolumina möglich, was die Sensitivität des Nachweisverfahrens steigern kann, dafür aber auch hohe Ansprüche an die Sauberkeit des Eluats bzw. an das verwendete Aufreinigungsverfahren stellt. Zu dieser frühen Entwicklungsphase wurde auf kommerziell erhältliche, lyophilisierte Mastermixe zurückgegriffen. Deshalb mussten die verwendeten Oligonukleotide zusätzlich in der Kammer

des Mastermix *Beads* eingetrocknet werden und waren nicht im lyophilisierten Mastermix enthalten (siehe Abschnitt 4.4.4, Abb. 41). Eine Optimierung der Oligonukleotidkonzentrationen mit den verschiedenen Mastermixen erfolgte nicht, sondern wurde wie von Devos et al. (2009) beschrieben eingesetzt [130]. Für eine finale Produktentwicklung, ist die Entwicklung eines optimierten lyophilisierten Mastermix *Beads* allerdings unerlässlich. Zu Beginn wurden mehrere gängige Flüssigmastermixe der Firma Solis Biodyne getestet, um einen verlässlichen und kostengünstigen Mastermix zu identifizieren (siehe Abschnitt 4.4.1, Abb. 35). Dies ist entscheidend, da bei der Verwendung eines flüssigen Mastermix für den LoC-Transfer große Mengen an Mastermix benötigt werden, um das System angemessen zu spülen und zu befüllen. Außerdem besteht die Chance, diese flüssigen Mastermixe in der Zukunft ebenfalls in lyophilisierter Form zu beziehen, bzw. über einen geeigneten Lyophilisierungsprozess selbst zu lyophilisieren. Sowohl die flüssigen, als auch die lyophilisierten Mastermixe, wurden auf die Funktionalität der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR sowie auf die Durchführbarkeit der Desulfonierung während der initialen Denaturierung untersucht. Der Fokus dieser Diskussion liegt allerdings auf den Ergebnissen der lyophilisierten Mastermixen, da diese zielführend für die Integration in die LoC-Kartusche sind.

5.3.1.1 Durchführbarkeit der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR mit ausgewählten Mastermixen

Bereits die Etablierung und Durchführung einer duplex-qPCR kann Herausforderungen mit sich bringen. Durch die Erhöhung der Anzahl der verwendeten Oligonukleotide, kann sich die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Oligonukleotidinteraktionen erhöhen [224]. Die Amplifikation mit Hilfe von Standardpolymerasen kann durch das vermehrte Auftreten von Uracil, bzw. AT, wie es bei bisDNA der Fall ist, erschwert werden [225]. Aufgrund des hohen AT-Gehalts, welcher auch beim Primerdesign berücksichtigt werden muss, kann es zudem zur verstärkten Interaktion von Primern, bzw. der Ausbildung von Primerdimeren, kommen [225]. Die Wahrscheinlichkeit solcher unspezifischer Amplifikationen, kann durch sogenannte Hot-Start Polymerasen, welche erst bei hohen Temperaturen aktiviert werden, reduziert werden. Diese sind in allen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mastermixen eingesetzt. Lediglich bei den ProbesMaster *Beads* und den Evik MM *Beads* werden keine näheren Angaben zum Polymerasetyp gemacht. Außerdem kann es bei der Amplifikation mehrerer Zielgene zur Limitierung verschiedener Komponenten des Mastermix kommen. Besonders bei Amplikons, welche unterschiedlich häufig im Genom vorkommen, kann es somit zu Unausgewogenheiten in der Amplifikation kommen. Eine Konzentrationsoptimierung von KCl und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ kann z. B. zur spezifischen Primerbindung während des Annealingschritts beitragen [226]. Auch die Verwendung sogenannter *Enhancer*, kann die Interaktion verschiedener Reaktionskomponenten untereinander unterbinden und die lokale Konzentration der Oligonukleotide am Templat sowie die daran gebundenen Oligonukleotide und deren Elongation stabilisieren [227–230]. Besonders auffällig ist, dass sich alle untersuchten flüssigen Mastermixe für die Durchführung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR eignen (Abb. 35). Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass vor allem die in der Lyophilisierung eingesetzten Stabilisatoren entscheidend sind, sowie der Lyophilisierungsprozess selbst, wodurch es zu negativen Beeinträchtigungen der Komponenten, insbesondere der Funktionalität der Polymerasen kommen kann. In der Literatur werden häufig Stabilisatoren wie PEG und Trehalose aufgeführt sowie verschiedene Ansätze zur Lyophilisierung der Reagenzien beschrieben [231–234]. Die tatsächlich verwendeten

Substanzen und Stabilisatoren sowie deren Konzentrationen lassen sich i.d.R. nicht aus den Datenblättern entnehmen und können nur unter erheblichem analytischem Aufwand abgeschätzt werden. Es handelt sich bei den auf dem Markt verfügbaren lyophilisierten Mastermixen um universelle Mastermixe, was ein vorheriges *Screening* von Mastermixen, für den jeweiligen Test notwendig macht. Xu et al. (2020) setzen in der Entwicklung eines lyophilisierten Mastermixes für einen reverse Transkriptase Covid 19 qPCR Test, 10 % (w/v) Trehalose, 1,25 % (w/v) Mannitol, 0,002 % (w/v) BSA sowie 0,075 % (w/v) PEG 20000 ein [235]. Besonders bei PEG handelt es sich um eine Substanz, welche je nach eingesetzter Konzentration, auch eine inhibierende Wirkung auf DNA-Polymerasen haben kann. Wie im Abschnitt 4.4.8 (Abb. 47) dargestellt wurde, konnte nach Zugabe verschiedener Mengen an PEG 6000, keine erfolgreiche Amplifikation mehr durchgeführt werden. Die niedrigste, im Rahmen dieser Arbeit getestete Konzentration, lag bei 0,1 % PEG 6000, welche etwas höher als die von Xu et al. (2020) verwendeten PEG 20000 Konzentration ist [235]. In der Literatur werden aber auch Zugaben zu Flüssigmastermixen zwischen 5 und 15 % PEG beschrieben [173]. Yang et al. (2022) verwenden neben Trehalose noch neun weitere Stabilisatoren für ihren lyophilisierten Mastermix, wie Glukose, Sorbitol, Raffinose, PVP, Dextran, Ficoll-400, Gelatine und BSA in Konzentrationen von 0,5 bis 15 % (w/v) [232]. Dies verdeutlicht, wie komplex die Entwicklung eines geeigneten lyophilisierten Mastermixes ist. Im qPCR ProbesMaster *Beads* Mastermix (Jena Bioscience), mit welchem die Amplifikation erfolgreich durchgeführt werden konnte, sind laut Herstellerangaben die Salze KCl als auch $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enthalten (Abb. 35). Dies könnte neben der Verwendung geeigneter Stabilisatoren, die erfolgreiche Amplifikation erklären, da K^+ zusammen mit anderen Kationen spezifisch gebundene Primer stabilisiert und NH_4^+ unspezifisch gebundene Primer destabilisiert. Des Weiteren war eine erfolgreiche duplex-qPCR mit den Evik MM *Beads* (Evik Diagnostics) möglich (Abb. 35). Aufgrund von Chargenschwankungen war eine erfolgreiche duplex-qPCR allerdings nicht mit allen Chargen möglich. Hierfür sind in erster Linie Chargenschwankungen der verwendeten Stabilisatoren und sonstiger Mastermixkomponenten verantwortlich. Durch Lieferengpässe von Chemikalien während der Coronapandemie, kam es bei einigen Herstellern zu Lieferantenwechseln, was sich auf die Qualität ausgewirkt haben könnte. Außerdem sind Schwankungen der Umgebungsbedingungen wie z. B. der Anteil der Luftfeuchtigkeit für die Funktionalität entscheidend. Xu et al. (2020) beschreiben eine Restfeuchtigkeit des lyophilisierten Mastermix von 1,2 % als ideal [235]. Dies verdeutlicht, dass es bei veränderten Produktionsbedingungen, zu veränderten Funktionalitäten der lyophilisierten Mastermixe kommen kann. Bei der Lyophilisierung geht man einen Kompromiss aus bestmöglicher Stabilisierung der Polymerase bei gleichzeitig minimaler Inhibierung der PCR-basierten Verfahren durch eben diese Stabilisatoren ein. Im wesentlichen wirken sich der pH-Wert, die ungewollte Bildung von Eis sowie Trocknungsstress während des Lyophilisierungsprozesses, negativ auf die Mastermixkomponenten, insbesondere die Funktionalität der Polymerase aus und sind zusätzliche schwer beherrschbare Faktoren, die zu ungewollt großen Chargenschwankungen führen können [232, 236, 237].

Für die Anwendung von lyophilisierten *Beads* in LoC-Systemen ist es entscheidend, dass sich diese schnell, vollständig und ohne starke Schaumbildung lösen [232, 238]. Die bisher in der Literatur beschriebenen und auf dem Markt erhältlichen Tests, welche lyophilisierte Mastermixe verwenden, sind nahezu ausschließlich für die Diagnostik von Infektionskrankheiten vorgesehen. Besonders bei viralen Erkrankungen liegen in der Regel ausreichend große Probenmengen vor, wobei die Detektion mit lyophilisierten Mastermixen auch mit

teilweise geringeren Sensivitäten als mit flüssigen Mastermixen, erfolgreich durchgeführt werden kann [232, 239–241]. Für die Anwendung epigenetischer Tests in LoC-Systemen, ist die zur Verfügung stehende Probenmenge meistens deutlich geringer. Daher ist es wichtig, diese lyophilisierten Mastermixe, für die epigenetische Diagnostik weiter zu optimieren. Die für die qPCR zur Verfügung stehende DNA Menge wird darüber hinaus durch die Bisulfitkonvertierung sowie die danach erforderliche Aufreinigung, weiter reduziert. Da die Desulfonierung der bisulfitkonvertierten DNA während einer verlängerten initialen Denaturierungsphase erfolgt, ist zudem eine hohe Stabilität des lyophilisierten Mastermix gefragt. Die Evaluierungsergebnisse der Desulfonierung mit verschiedenen lyophilisierten Mastermixen werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.3.1.2 Durchführbarkeit der Desulfonierung während der initialen Denaturierungsphase mit ausgewählten Mastermixen

Die Desulfonierung war sowohl mit dem ProbesMaster (Jena Bioscience) sowie mit dem Evik MM (Evik Diagnostics) Mastermix während der initialen Denaturierung möglich (Abb. 36). Ist bereits die Desulfonierung ungenügend, kann sich dies auf die Effizienz der qPCR auswirken, da Uracilsulfonat die DNA-Polymerasen inhibieren kann [242]. Die Desulfonierung während der initialen Denaturierungsphase stellt einen Kompromiss aus einer möglichst vollständigen Desulfonierung und einer möglichst geringen Inaktivierung der Polymerase durch eine zu lange Inkubationszeit bei hohen Temperaturen von bis zu 95 °C dar. Ein entscheidender Faktor für die erfolgreiche Desulfonierung mit Hilfe von Mastermixen, während der initialen Denaturierung, ist deren pH-Wert. Mastermixe sind in der Regel leicht alkalisch [150, 193]. Mit dem lyophilisierten Cirrus Mastermix, lässt sich die duplex-qPCR durchführen, verwendet man bereits desulfonierte DNA. Wird die Desulfonierung während der verlängerten initialen Denaturierung durchgeführt, so ist im Anschluss keine Amplifikation mehr möglich. Der Hersteller gibt hier eine initiale Denaturierung von lediglich 10 s an, weshalb es nahe liegt, dass die hier verwendete Polymerase hitzeinstabil ist. Eine unterschiedliche Thermostabilität der eingesetzten Polymerasen, kann also durchaus einen Einfluss auf den Erfolg der Amplifikation nach einer verlängerten Denaturierung haben. Mit dem lyophilisierten STAT-NAT Mastermix ist weder die duplex-qPCR noch die Desulfonierung möglich. Wie in Abb. 37 zu erkennen, scheint eine initiale Denaturierung von 10 min mit dem qPCR ProbesMaster *Beads* Mastermix (Jena Bioscience) zu einer nahezu identischen Amplifizierung wie mit der Desulfonierung mit Hilfe des Diagenode Desulfonierungspuffers zu führen. Eine initiale Denaturierung von 15 min zeigte identische Ergebnisse und scheint die Desulfonierung aber auch die Enzymaktivität nicht weiter negativ zu beeinflussen. Trotz der vom Hersteller (Jena Bioscience) angegebenen initialen Denaturierungsdauer von 2 min, scheint die Polymerase auch stabil gegenüber längeren Inkubationszeiten bei hohen Temperaturen zu sein. Anhand der Amplifikationskurven lässt sich nicht erkennen, ob ein positiver Effekt auf eine vollständigere Desulfonierung oder auf eine intaktere DNA-Polymerase zurückzuführen ist. Auch kürzere Inkubationszeiten könnten noch getestet werden, wobei nach 2 min bei 95 °C bereits keine Amplifikation mehr erfolgt und somit die Vermutung nahe liegt, dass kürzere Inkubationszeiten zur Abnahme der Amplifikationseffizienz, aufgrund einer unvollständigen Desulfonierung, führen. In den meisten Bisulfitkits, welche einen Desulfonierungspuffer für die Desulfonierung verwenden, erfolgt diese bei RT für 15 - 20 min. Eine quantitative Analyse der Bestandteile der lyophilisierten Mastermixe zusammen mit den hier gewonnenen

Erkenntnissen, kann die Entwicklung eines spezifischen lyophilisierten Mastermixes erleichtern. Keines der bisher in der Literatur beschriebenen Systeme für die qPCR-basierte Analyse der DNA-Methylierung, setzt lyophilisierte Mastermixe ein [182, 184, 201, 212]. Des Weiteren wird in keinem System die Desulfonierung während der initialen Denaturierungsphase der qPCR durchgeführt, sondern stets während der Aufreinigung mit einem Desulfonierungspuffer [181, 182, 184, 201, 212, 213]. Auch wenn diese Systeme wichtige erste Schritte in Richtung LoC-basierter Analysen der DNA-Methylierung darstellen, handelt es sich hierbei um keine produktnahe Entwicklung. Eine Desulfonierung mit Hilfe von leicht alkalischen Mastermixen während der initialen Denaturierung spart Platz bei der Vorlagerung von Reagenzien, was einen wichtigen Aspekt in miniaturisierten LoC-Systemen darstellt. Wird auf den Einsatz des Denaturierungspuffers verzichtet, so werden auch weniger Waschschrte benötigt. Außerdem beinhaltet der Desulfonierungspuffer neben Ethanol häufig noch Isopropanol sowie NaOH, was zu Materialinkompatibilitäten mit dem LoC-System sowie durch Rückstände in Kanälen der Kartusche zur späteren Inhibierung der DNA-Polymerase während der qPCR führen kann [243].

5.3.2 *Off-chip* Charakterisierung der LoC-kompatiblen *SEPT9/ACTB-HM-qPCR*

Die von de Vos et al. (2009) beschriebenen qPCR Reaktionen für *SEPT9* und *ACTB* wurden für eine Durchführung in der *Vivalytic* Kartusche angepasst. Die Annealingtemperatur wurde auf 56 °C angepasst, um eine duplex-qPCR zu ermöglichen. Außerdem wurde anstelle eines flüssigen Mastermixes, ein lyophilisierter Mastermix (Jena Bioscience) verwendet und die Desulfonierung während der initialen Denaturierung (10 min, 95 °C) durchgeführt (siehe Abschnitt 5.3.1). Vor einer Integration dieser LoC-kompatiblen duplex-qPCR, wurde diese in *off-Chip* Experimenten durch die Ermittlung von Kenngrößen wie der Amplifizierungseffizienz, der analytischen Sensitivität (LOD90) sowie der relativen Sensitivität, charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Charakterisierung werden im folgenden Abschnitt diskutiert.

5.3.2.1 Bestimmung der *off-Chip* Amplifizierungseffizienzen der *SEPT9/ACTB-HM-qPCR*

Sowohl für *SEPT9* als auch *ACTB* konnten hohe Amplifizierungseffizienzen von 102,06 % bzw. 95,29 % erreicht werden (siehe Abschnitt 4.4.3, Abb. 38). Die erzielten Werte liegen im Bereich zwischen 90 % und 110 %, was eine gute qPCR charakterisiert [244]. Auch für das Bestimmtheitsmaß R^2 konnten Werte größer 0,99 erzielt werden. Mit dem standardmäßig verwendeten Flüssigmastermix QuantiText® Multiplex Mastermix wurden Werte von 96,86 % für *SEPT9* und 101,35 % für *ACTB* sowie 0,99 für R^2 erreicht (siehe Abschlussarbeit Elisa Schiele) [189]. Neben der hohen Amplifizierungseffizienzen, lässt sich auch eine ausreichende Reproduzierbarkeit der Replikate mit beiden Mastermixen erreichen [244]. Der Referenzfarbstoff ROX ist im Gegensatz zum QuantiText® Multiplex Mastermix, in den lyophilisierten Mastermixen nicht enthalten. Effizienzen größer 100 % sind häufig ein Anzeichen auf Inhibitoren, welche auch noch nach der Aufreinigung vorhanden sind. Chaotrope Salze aus der Aufreinigung, Verunreinigungen aus der Bisulfidkonvertierung sowie eine unvollständige Desulfonierung können hier die Ursachen sein.

Aus der Inhibierung resultiert eine abgeflachte Standardkurve, welche zu Effizienzen $> 100\%$ führt [242, 244]. Sind die Reagenzienkonzentrationen nicht optimal eingestellt und die verwendeten Primer nicht optimal designt, kann es zu reduzierten Amplifizierungseffizienzen ($< 100\%$) kommen. Auch die Konkurrenz um qPCR Reagenzien bei duplex- und multiplex-qPCR Reaktionen sowie die Ausbildung von Sekundärstrukturen und Oligonukleotidinteraktionen, kann die Amplifizierungseffizienz reduzieren. Zu lange Amplikons sind ebenfalls unvorteilhaft, was für *SEPT9* (65 bp) und *ACTB* (130 bp) nicht der Fall ist [224, 244]. Möchte man die Signifikanz der Bestimmung der Amplifizierungseffizienz erhöhen, bietet es sich an die Anzahl der Replikate sowie die Anzahl der verwendeten Verdünnungen weiter zu erhöhen.

5.3.2.2 Off-chip Bestimmung des analytischen Detektionslimits der etablierten *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR

Da die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR in der Literatur gut beschrieben ist, wurde mit der etablierten LoC-kompatiblen qPCR das analytische Detektionslimit bestimmt, um einen Vergleich mit der in der Literatur beschriebenen Methode zu ermöglichen. Die geringste DNA Menge, welche mit einer Wahrscheinlichkeit von 90 % detektiert werden kann, wird als LOD90 (*limit of detection*) bezeichnet. Für *SEPT9* konnte ein LOD90 von $5,7 \text{ pg} \pm 1,0 \text{ pg}$ und für *ACTB* von $17,3 \text{ pg} \pm 3,3 \text{ pg}$ ermittelt werden (Abschnitt 4.4.3, Abb. 39). De Vos et al. (2009) berichten von einem LOD90 von 9,4 pg für die *SEPT9* singleplex qPCR [130]. Auch wenn das LOD90 somit mit der im Rahmen dieser Arbeit etablierten LoC-kompatiblen duplex-qPCR Methode besser zu sein scheint, hängen die Ergebnisse solcher Experimente von mehreren Faktoren ab. Den größten Einfluss hat hierbei vermutlich die Quantifizierungsmethode. In der Publikation von de Vos et al. (2009) wurde die Quantifizierung mit dem qPCR-basierten CFF Assay durchgeführt [130]. Innerhalb dieser Arbeiten wurde die eingesetzte DNA Menge mit dem Qubit 4[®] Fluorometer quantifiziert. Mit der qPCR-basierten Methode, fiel die gemessene Konzentration in der Regel 1,8 Mal größer aus wie mit dem Qubit 4[®]. Deshalb kann es sein, dass die eingesetzte DNA Menge in den hier durchgeführten Experimenten unterschätzt wurde. Korrigiert man die eingesetzten DNA Mengen mit einem Faktor von 1,8 liegt das LOD90 bei 10,3 pg und ist somit im Rahmen der Messgenauigkeit mit dem Wert aus der Literatur vergleichbar [130]. Da die Oligonukleotidkonzentrationen wie von Dietrich et al. (2013) beschrieben eingesetzt wurden, könnte auch eine höhere Primer- und Sondenkonzentration zum besseren LOD90 beigetragen haben. Das LOD90 von *ACTB* ist allerdings auch ohne Korrektur der Messwerte, mit $17,3 \text{ pg} \pm 3,3 \text{ pg}$ schlechter als der in der Literatur beschriebene Wert von 9,7 pg [130]. Als Gründe könnten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte duplex-qPCR sein, welche die Sensitivität im Vergleich zur singleplex-qPCR reduziert. Die Konzentration der *ACTB* Primer lag im hier gewählten Ansatz nach Dietrich et al. (2013) deutlich unter denen von de Vos et al. (2009). Dies könnte zusammen mit der veränderten Fluorophor-*Quencher*-Kombination ein weiterer Grund für die geringere Sensitivität sein. Auch die Desulfonierung während der initialen Denaturierungsphase, kann sich beim längeren *ACTB* Amplikon negativ auf die Sensitivität auswirken. Wie in Abschnitt 4.4.2 (Abb. 37) dargestellt, erfolgte die Amplifikation des *ACTB* Amplikon nach zehnmündiger initialer Denaturierung weniger effektiv als mit der Standarddesulfonierung mit Hilfe eines Desulfonierungspuffers (Abb. 36). Die Werte des analytischen Detektionslimits liegen egal ob mit oder ohne Korrektur der Messwerte, im gleichen Größenbereich, wie die in der

Literatur beschriebenen Werte. Da in realen Blutproben von Krebspatienten allerdings überwiegend unmethylierte DNA vorhanden ist, interessiert für diagnostische Anwendungen vor allem das relative Detektionslimit, welches im nächsten Abschnitt diskutiert wird.

5.3.2.3 *Off-chip* Bestimmung des relativen Detektionslimits der etablierten *SEPT9/ACTB-HM-qPCR*

Bei der hier verwendeten qPCR Methode handelt es sich um eine sogenannte HeavyMethyl-qPCR (HM-qPCR), welche mit Hilfe eines zusätzlichen *SEPT9* Blockers, die Amplifikation unmethylierter Sequenzen verhindert. Aus diesem Grund wurde das relative Detektionslimit in Ansätzen sowohl mit als auch ohne Blocker analysiert, um den Nutzen dieses zusätzlichen Oligonukleotids zu veranschaulichen (Abschnitt 4.4.3, Abb. 40). Das Referenzgen *ACTB* zeigte wie erwartet bei allen Untersuchungen eine konstante Amplifikation mit geringen Abweichungen des Ct-Werts, da dessen Amplifikation methylierungsunabhängig sowohl auf HCT116 als auch auf Leukozyten DNA erfolgt. Beim *SEPT9* Methylierungsmarker hingegen ist eine Zunahme des Ct-Werts mit abnehmender HCT116 bisDNA sowohl mit als auch ohne Blocker zu erkennen. Der positive Effekt des *SEPT9* Blockers zeigte sich eindeutig anhand des relativen Detektionslimits (1:2000) im Vergleich zur Reaktion ohne Blocker (1:62,5). Dies entspricht einem Anteil von 0,05 % methylierter DNA in der Probe, die vom restlichen unmethylierten Hintergrund mit Hilfe des Blockers unterschieden werden kann. Da die in der Literatur angegebenen Anteile der ctDNA im Blutplasma stark variieren und vom Krebsstadium des Patienten sowie weiterer Faktoren abhängt, müsste der etablierte LoC-kompatible *off-Chip* Test mit Patientenproben validiert werden. So reicht der Anteil der ctDNA von 0,01 % - 50 % [107] und im ersten Stadium von 0,01 % - 0,045 % [107, 245]. De Vos et al. (2009) konnten ein relatives Detektionslimit von 1:5000 mit Blocker bestimmen [130]. Eventuell sind auch hier die nach Dietrich et al. (2013) abgeänderten Oligonukleotidkonzentrationen und die von 1 µM auf 0,75 µM reduzierte Blockerkonzentration der Grund [123]. Jedoch muss auch hier beachtet werden, dass de Vos et al. (2009) lediglich eine singleplex-qPCR durchführten [130]. Möchte man also die *SEPT9/ACTB-HM-qPCR* für diagnostische Zwecke anwenden, ist der Einsatz des Blockeroligonukleotids unabdingbar. Durch weitere Optimierungsarbeiten sowie die Verwendung eines auf die etablierte qPCR zugeschnittenen lyophilisierten Mastermix *Beads*, besteht die Möglichkeit, die Sensitivität des Verfahrens noch weiter zu verbessern.

5.3.3 Evaluierung des stabilisierenden Effekts von Trehalose bei der Trocknung von Oligonukleotiden

Durch Eintrocknen von Oligonukleotiden in der *Bead* Kammer der *Vivalytic* Kartusche, zusammen mit einem kommerziellen *Bead* (Jena Bioscience, Evik Diagnostics) ein *customized Bead* simuliert werden. Ohne Trehalose war eine Lagerung im Dunkeln bei RT bis zu einer Woche möglich (Abschnitt 4.4.4, Abb. 41). Nach einem Monat wurden sowohl für *ACTB* als auch für *SEPT9* deutlich höhere Ct-Werte im Vergleich zur Verwendung flüssiger Oligonukleotide als Referenz beobachtet. Durch die Zugabe von 56 mM Trehalose zur Oligomischung vor dem Eintrocknen, konnte die Funktionalität (bestimmt durch Ct-Werte aus der qPCR) der eingetrockneten Oligonukleotide in der *SEPT9/ACTB-HM-*

qPCR für beide Amplikons nach einer Lagerung von zwei Monaten auf einem konstanten Wert gehalten werden. Ein positiver Effekt von Trehalose bei der Eintrocknung von Oligonukleotiden wurde in weiteren Publikationen bereits angeführt [246, 247]. Es wird vermutet, dass die Trehalose durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen, Wassermoleküle welche die Nukleinsäure umgeben, ersetzt und durch diesen dehydrierenden Effekt die Oligonukleotide während der Eintrocknung stabilisiert. Man spricht hier auch von der *water replacement* Theorie [248]. Auch die mögliche Ausbildung eines amorphen Materials durch die Anwesenheit von Trehalose im getrockneten Zustand wird in der Vitrifizierungstheorie diskutiert. Durch die Vitrifizierung soll die Mobilität von Molekülen verringert und Nukleinsäuren durch die daraus resultierenden verringerten Reaktionsraten geschützt werden [249]. Die hier gewonnenen Erkenntnisse sind für späteres Produkt entscheidend. Da die im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten Kartuschen zeitnah verwendet werden, war eine Zugabe von Trehalose in weiteren Experimenten nicht notwendig.

5.3.4 Reduzierte Blasenbildung durch optimiertes Lösen des lyophilisierten Mastermix *Beads* in der *Vivalytic* Kartusche

Die Vermeidung der Blasenbildung in mikrofluidischen LoC-Systemen stellt eine enorme Herausforderung dar [250–252]. Viele in der Literatur beschriebene LoC-Systeme haben mit der Bildung von Blasen im System zu kämpfen [253]. Es wird beschrieben, dass raue Oberflächen sowie Oberflächenspannungen der transportierten Fluide, in mikrofluidischen Systemen zur Blasenbildung beitragen [254]. So kann z. B. die Oberfläche der TPU Membran solch eine raue Oberfläche darstellen. Außerdem kann beim Pipettieren und Befüllen der Kartusche, Sauerstoff in die Reagenzien eingeschlossen werden, welcher dann im System aufgrund von Oberflächeneffekten oder durch Temperaturveränderung ausgasen kann [254, 255]. Die Sauerstoffdurchlässigkeit der flexiblen TPU Membran könnte ein weiterer Grund für die Blasenbildung sein. Während der qPCR Reaktion wird der Flüssigkeitsplug in dem die qPCR Reaktion stattfindet, zwischen den drei PCR Kammern hin und her bewegt. Diese Bewegung über die engen mikrofluidischen Verbindungskanäle zwischen den Kammern, kann das Ausgasen sowie eine Schaumbildung verstärken. Durch Blasen im mikrofluidischen System, kann es zu abweichenden Wärmeübergängen beim Heizen von Kammern kommen. Eine genaue Einhaltung des Thermoprogramms der qPCR ist für eine erfolgreiche Amplifikation jedoch entscheidend. Durch die Bildung von Blasen kann es somit zur Beeinträchtigung der Amplifizierungseffizienz kommen [254]. Die Bildaufnahme sowie die optische Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der qPCR Reaktion wird ebenfalls durch eine Blasenbildung gestört [256, 257]. Für einen Vergleich der aufgenommenen Amplifikationskurven, mussten diese vorab geglättet und normiert werden (siehe Material und Methoden 3.2.10). Des Weiteren kann die Enzymaktivität z. B. der DNA-Polymerasen durch Blasen reduziert werden und somit auch die Amplifizierungseffizienz der qPCR Reaktion [244]. Eine zu starke Blasenbildung kann den Reagenzientransport im mikrofluidischen System beeinträchtigen oder sogar ganz zum Erliegen bringen [258]. Dies ist besonders beim peristaltischen Pumpen der Fall, bei dem kleinen Ventile anstelle von großen Pumpkammern für den Flüssigkeitstransport verwendet werden. Durch Spülvorgänge mit ddH₂O sowie dem Elutionspuffer, konnte die Blasenbildung in der *Vivalytic* Kartusche reduziert werden. Die Optimierung des Lösungsvorgangs des lyophilisierten Mastermix *Beads* war für die Reduzierung der Blasenbildung ebenfalls entscheidend. Ein

langsameres und gleichmäßigeres Befüllen der *Bead* Kammer mit Hilfe eines peristaltischen Pumpschritts führte zum vollständigen Lösen des lyophilisierten Mastermix *Beads* im Elutionspuffer. Außerdem muss es wichtig sein, die *Bead* Kammer komplett zu befüllen (siehe Abschnitt 4.4.5, Abb. 42). Dies ist entscheidend, da ansonsten beim Überführen des qPCR Ansatzes in den PCR Strang, Luft mit befördert wird. Eine zu starke Befüllung der *Bead* Kammer führt hingegen zum Verlust von qPCR Reagenzien, da der qPCR Ansatz aus der *Bead* Kammer ausgetragen wird. Durch eine geeignete Oberflächenbenetzung des mikrofluidischen Systems, kann der Blasenbildung entgegen gewirkt werden [259]. Lyophilisierte Mastermixe enthalten Additive, welche die Oberflächenbenetzung fördern und somit eine Blasenbildung reduzieren können.

Diese Vielzahl von Effekten und Einflussgrößen wirkt sich auf die Reproduzierbarkeit von Abläufen in mikrofluidischen Systemen aus und bietet daher viele Ansatzpunkte für weiterführende Optimierungsarbeiten.

5.3.5 Durchführung des *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR in der *Vivalytic* Kartusche

Aufgrund technischer Unterschiede zwischen LoC-Systemen und qPCR Cyclern, ist die Übertragung einer *off-Chip* etablierten qPCR Reaktion mit mehreren Herausforderungen verbunden. Auch wenn die qPCR Reaktion wie in Abschnitt 5.3 bereits diskutiert, auf die Durchführung im LoC-System angepasst wurde, ist vor allem die Identifizierung eines geeigneten Temperaturprogramms für die erfolgreiche Durchführung der *on-Chip* qPCR entscheidend. Wie in Abschnitt 1.3.3 (Abb. 7) dargestellt, handelt es sich bei der *SEPT9* qPCR um eine *HeavyMethyl*-qPCR mit einem zusätzlichen Blockeroligonukleotid. Bei der Durchführung der etablierten *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR in der *Vivalytic* Kartusche kommt es zu Oligonukleotidinteraktionen (Abschnitt 4.4.6, Abb. 43), welche die Amplifikation der Zielgene *SEPT9* und *ACTB* verhindern. Da solche Interaktionen maßgeblich vom gewählten Temperaturprogramm beeinflusst werden, wurden die Temperatureinstellungen des Annealingschritts optimiert. Hierfür wurde ein simulationsbasierter Ansatz mit Hilfe eines mathematischen Wärmeleitmodells zur Identifizierung eines geeigneten Temperaturprogramms gewählt. Aus den Simulationsergebnissen wurden verschiedene Temperaturprogramme abgeleitet, welche mit Hilfe von Thermomessungen verifiziert wurden. Mit den vielversprechendsten Temperaturprogrammen wurde die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR in der *Vivalytic* Kartusche durchgeführt [195].

5.3.5.1 Identifizierung eines geeigneten Temperaturprogramms für die Durchführung der *on-Chip SEPT9/ACTB*-HM-qPCR

Wie bereits in Abschnitt 5.1.1.1 diskutiert, kann die Identifizierung eines geeigneten Thermoprogramms mit Hilfe von Thermomessungen fehlerbehaftet und mit wesentlichem Aufwand verbunden sein. Durch einen simulationsbasierten Ansatz, kann die Anzahl an Experimenten reduziert werden sowie der Einsatz teurer Reagenzien und aufwendig gefertigter Prototypen Kartuschen verringert werden [195]. Simulationsbasierte Ansätze in der Entwicklung von LoC-Systemen und LoC-Methoden sind bereits vielfach in der Literatur beschrieben [260, 261].

Eine schnelle Abkühlung vom Denaturierungsschritt zur Annealingphase ist entscheidend

für eine erfolgreiche qPCR, da dadurch mögliche Interaktionen zwischen Oligonukleotiden vermieden werden. Da die Kühlleistung des *Vivalytic* Analyzers begrenzt ist, wurden so genannte *undershoot* Temperatureinstellungen simuliert (Tab. 17), bei welchen die eigentliche Zieltemperatur der Annealingphase kurzfristig unterschritten wird, um die Kühlleistung zu erhöhen. Wie erwartet führten niedrigere *undershoot* Temperaturen zu einer schnelleren Abkühlung, wobei die minimal erreichbare Temperatur von der Dauer des *undershoots* abhängt. Ein großer Vorteil des simulationsbasierten Ansatzes ist die Ableitung mehrere potentiell geeigneter Temperaturprofile anhand der Simulationsergebnisse (Tab. 18). Dies ist entscheidend, da die zuvor für die *off-Chip* qPCR optimierten Temperaturprofile, nicht direkt auf die Durchführung der qPCR in der LoC-Kartusche übertragbar sind. Das Thermoprogramm (TP4) mit $T = 40\text{ °C}$ für die gesamte Annealingphase (Tab. 18) führte zur erfolgreichen Amplifikation des *SEPT9* und *ACTB* Amplikons (Abschnitt 4.4.6, Abb. 46). Die Amplifikation lässt sich vermutlich durch die hohe Kühlrate erklären (Abschnitt 4.4.6, Abb. 44, 45). Es wurde eine minimale Temperatur von $45,6\text{ °C} \pm 2,5\text{ °C}$ zum Ende der Annealingphase erreicht, welche deutlich unter den optimierten *off-Chip* Bedingungen von 56 °C lag. Innerhalb dieser Versuchsreihe wurde zur Etablierung, ddH₂O an Stelle der qPCR Reagenzien verwendet. In einem der Replikate mit dem Thermoprogramm TP4 wurde sowohl für *SEPT9* als auch für *ACTB* eine geringere Amplifikation beobachtet (Abb. 46). Dies ist vermutlich auf den manuellen Aufbau der Kartuschen sowie die manuelle Integration der lyophilisierten Mastermix *Beads* und das Eintrocknen der Oligonukleotide zurück zu führen. Die Integration der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR in die *Vivalytic* Kartusche ermöglicht nun die qPCR Reaktion an verschiedenen Stellen zu optimieren. Hierzu zählen unter anderem die Optimierung der Oligonukleotidkonzentrationen, sowie des lyophilisierten qPCR Mastermixes und des Temperaturprogramms.

5.3.5.2 Stabilisierung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR durch Tween80 in der *Vivalytic* Kartusche

In den *on-Chip* Versuchen wurden stets 0,2 % Tween 80 in den qPCR Reaktionen eingesetzt (Abschnitt 4.4.8, Abb. 46). Eine höhere Konzentration an Tween80 (0,4 %) führte zu keinem zusätzlichen positiven Effekt bei der Amplifikation von *SEPT9* und *ACTB* (Abschnitt 4.4.8, Abb. 47). Mit einer geringeren Konzentration (0,1 %) war keine erfolgreiche Amplifikation möglich. Dies verdeutlicht, dass der positive Effekt stabilisierender Substanzen häufig auf kleine Konzentrationsbereiche beschränkt ist [173]. Der Einsatz von Detergenzien wie Tween20 und Triton X-100 sind schon mehrfach in der Literatur beschrieben [262–267]. Auch die Zugabe von Tween80 ist bereits bekannt [170]. Durch diese Substanzen wird die Hybridisierung der Oligonukleotide an ihre Zielsequenz unterstützt. Als weitere Substanz wurde PEG6000 in den Konzentrationen 0,5 %, 1 % sowie 2 % zugegeben (Abschnitt 4.4.8, Abb. 47).

5.3.5.3 Charakterisierung der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR in der *Vivalytic* Kartusche

Wie in Abschnitt 4.4.9 beschrieben, lag das analytische Detektionslimit in der *Vivalytic* Kartusche sowohl für *SEPT9* (Ct-Wert 42,3) als auch für *ACTB* (Ct-Wert 35,7) bei 12,5 ng. Bei geringeren bisDNA Mengen, wurden nur noch zwei der drei Replikate erfolgreich amplifiziert. Um auszuschließen, dass es sich um fehlerhafte Kartuschen handelt,

sollten die Versuche mit einer höheren Anzahl an Replikaten wiederholt und der untersuchte Konzentrationsbereich weiter reduziert werden. Sowohl mit 6,25 ng als auch mit 3,125 ng ist zu beobachten, dass die Ct-Werte sowohl für *SEPT9* als auch für *ACTB* abnehmen anstatt anzusteigen. Dies ist vermutlich auch auf die durch den manuellen Prototypenaufbau beeinträchtigte Reproduzierbarkeit sowie die erschwerte optische Auslesung des Fluoreszenzsignals durch Blasenbildung zurück zu führen. Eine Bestimmung der Amplifizierungseffizienzen war somit nicht möglich. Das hier ermittelte analytische Detektionslimit liegt mit 12,5 ng drei Größenordnungen über dem der etablierten *off-Chip* Methode mit 5,7 pg für *SEPT9* bzw. 17,3 pg für *ACTB* (Abschnitt 4.4.3, Abb. 39). Dieser deutliche Unterschied zwischen der *off-Chip* und der *on-Chip* Methode könnte durch Polymerisationsrückstände der TPU (z. B. Polyole, Polyisocyanate), welche die qPCR Reaktion inhibieren, verursacht werden [268]. Diese könnten bei Inkubationen mit hohen Temperaturen über lange Zeiträume hinweg aus der TPU heraus gelöst werden und als freie Alkohole und Isocyanate in den qPCR Reaktionsansatz gelangen. Allerdings können im *Vivalytic* System verschiedene diagnostische Tests, welche ebenfalls auf qPCR Reaktionen basieren, erfolgreich durchgeführt werden. Schwankungen beim Lösungsvorgang der lyophilisierten Mastermixe sowie der eingetrockneten Oligonukleotide können die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ebenfalls beeinflussen. Da die Beadkammer mit Hilfe eines peristaltischen Pumpschritts befüllt wird, kann es sein, dass nicht alle getrockneten Oligonukleotide von der Kartuschenoberfläche in Lösung gehen und somit nicht für die qPCR Reaktion zur Verfügung stehen. Ein verändertes Befüllen oder gar Mischen ist in dieser Kammer nicht möglich, da es dadurch zum Verlust von qPCR Reagenzien sowie zur verstärkten Blasenbildung kommen würde. Ein zugeschnittenes lyophilisiertes Mastermix *Bead*, welches bereits die benötigten Oligonukleotide enthält, sowie eine Anpassung der Oligonukleotidkonzentrationen könnte zu reproduzierbaren Ergebnissen führen. Nucleinsäuren können an Polymeroberflächen, wie z. B. der TPU Membran oder dem Polycarbonat des mikrofluidischen Systems adsorbieren [174]. Dies könnte zu einem Verlust an bisDNA im LoC-System im Vergleich zur *off-Chip* Methode führen und somit zu schlechteren Sensitivitäten. Es ist wahrscheinlich, dass bisDNA aufgrund ihres überwiegend einzelsträngigen Charakters, verstärkt an Oberflächen adsorbiert. In Aufreinigungsversuchen mit Silicamatrices von Denise Brünig, wurde versucht die bisDNA im Eluat sowie in den Wasch- und Bindepufferfraktionen und auf der Silicamatrix wiederzufinden [11]. Hier konnten nur Anteile der eingesetzten bisDNA nachgewiesen werden, was vermutlich auf einen Verlust aufgrund von Adsorptionsvorgängen zurück zu führen ist. In weiteren Experimenten sollte daher untersucht werden, ob eine zusätzliche biokompatible aber passivierende Beschichtung des LoC-Systems wie z. B. mit Teflon, zu einer Ausbeutesteigerung führen kann [182, 184]. Gegen Adsorptionsvorgänge in der *Vivalytic* Kartusche sprechen hingegen die Ergebnisse der Aufreinigung mit Hilfe von magnetischen Partikeln (Abschnitt 4.3.1). Mit dieser Methode wurden *on-* und *off-Chip* vergleichbare Ausbeuten erzielt. Die in der Literatur beschriebenen LoC-Systeme verwenden weder lyophilisierte Mastermix *Beads* noch eine blockerbasierte HeavyMethyl-qPCR. Weder von Stark et al. (2018) noch von Zhang et al. (2009) werden genaue Angaben zur eingesetzten bisDNA Menge bzw. zum Detektionslimit gemacht [180, 184]. Wenn auch mit geringeren Sensitivitäten, konnte eine funktionelle duplex-qPCR in die Kartusche integriert werden und die eingesetzte bisDNA Menge deutlich reduziert werden. Auf Basis dieser Ergebnisse kann eine Verschaltung der einzelnen Teilschritte vorgenommen und die Abläufe sowie die qPCR optimiert werden.

5.4 Verschaltung der einzelnen Teilschritte zu einem mikrofluidischen Gesamtablauf in der *Vivalytic* Kartusche

Bereits bei der Etablierung der Einzelschritte wurde für die fluidischen Abläufen sowie die Vorlagerung der Reagenzien eine spätere Verschaltung mit berücksichtigt. Trotzdem stellt die Verschaltung einzelner Schritte eine Herausforderung dar, da alle Abläufe auf kleinstem Raum in der miniaturisierten *Vivalytic* Kartusche ablaufen. In molekularbiologischen Laboren stehen hierfür mehrere Geräte und Methoden zur Verfügung, welche getrennt voneinander angewendet werden. Vor jedem neuen Teilschritt muss das LoC-System daher ausgiebig gespült und von den Reagenzien des vorherigen Schritts befreit werden. Außerdem ist darauf zu achten, dass die Vorlagerung der Reagenzien und auch die Reihenfolge in welcher bestimmte mikrofluidische Kanäle benutzte werden, sinnvoll gewählt wird. Trotzdem erfordert die Verschaltung der einzelnen Teilschritte meistens weitere Anpassungen der Einzelfunktionen, bevor diese zusammenhängend in der *Vivalytic* Kartusche durchgeführt werden können. Zunächst wurde die Bisulfitkonvertierung mit der Aufreinigung mit Hilfe magnetischer Partikel verschaltet. Im Anschluss wurde für den Gesamtablauf noch die qPCR basierte Detektion des *SEPT9* Methylierungsmarkers ergänzt. Die Ergebnisse dieser *on-Chip* Verschaltung in der *Vivalytic* Kartusche werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

Mit den Reagenzien der Bisulfitkonvertierung sowie mit dem Bindepuffer der Aufreinigungsmethode können mögliche Inhibitoren (u. a. chaotrope Salze und Bisulfitsalze) in die qPCR Reaktion eingetragen werden. Die *on-Chip* konvertierte und aufgereinigte bisDNA wurde daher zunächst unter *on-Chip* Bedingungen (20 µl Eluat) in 96 well Platten *off-Chip* mit der *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR analysiert (Abschnitt 4.5.1). Dadurch war es leichter, die Auswirkungen der Optimierungssiterationen der *on-Chip* Aufreinigungsmethode zu erfassen. Mit den verschalteten Abläufen war es möglich sowohl *SEPT9* als auch *ACTB* mit 20 µl Eluat in der qPCR Reaktion erfolgreich zu amplifizieren. Da wie bereits erwähnt in der Literatur keine Ansätze mit lyophilisierten Mastermixen beschrieben sind, werden dort lediglich die für Flüssigmastermixe gängigen Eluatvolumina (2 - 5 µl) eingesetzt [180, 184]. Aus diesem Grund spielt die Anforderung an ein hoch reines Eluat, bei diesen Anwendungen keine Rolle. Stark et al. (2018) berichten bei ihrer *sample-to-answer on-Chip* Methode von vergleichbaren Ct-Werten und von qPCR Reaktionen die mit denen ihrer etablierten *off-Chip* Methode vergleichbar seien. Über genaue Ausbeuten sowie die eingesetzten DNA Mengen wird keine Aussage gemacht. Außerdem wird nicht ersichtlich, ob jede Einzelfunktion für sich funktioniert oder ob es sich tatsächlich um einen funktionellen Gesamtablauf handelt. Als Probenmaterial werden hier Zellen verwendet, welche in einem initialen Schritt lysiert und im gleichen Ansatz auch bisulfitkonvertiert werden. Stark et al. berichten durch diese Zusammenfassung von Einzelfunktionen von einer früheren Detektion (2 Zyklen) als mit getrennt von einander durchgeführten Einzelfunktionen. Bei diesem Ansatz wird sowohl ein Desulfonierungspuffer, als auch ein alkoholhaltiger Waschpuffer verwendet. Fraglich ist, ob die reine Inkubation der magnetischen Partikel im Elutionspuffer für eine vollständige Elution der daran gebundenen bisDNA ausreicht. In unseren Versuchen, war ein wiederholtes Zirkulieren der magnetischen Partikel im mikrofluidischen System unter Temperatureinwirkung von Vorteil.

Nachdem die *off-Chip SEPT9/ACTB*-HM-qPCR verlässlich funktionierte, wurde im fi-

nenen Schritt die qPCR Detektionsmethode zum Nachweis des *SEPT9* Methylierungsmarkers, zum Gesamttablauf hinzugefügt (Abschnitt 4.5.2). Durch optimierte Spülvorgänge sowie ein nahezu rückstandsloses Entleeren der Reaktionskammer mit Hilfe peristaltischer Pumpschritte wurde eine effiziente Aufreinigung mit magnetischen Partikeln ermöglicht. Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass alle für die Analyse von DNA-Methylierungsmarkern benötigten Abläufe in die *Vivalytic* Kartusche integrierbar und durchführbar sind.

5.5 Ausblick der automatisierten Analyse der DNA-Methylierung in der *Vivalytic* Kartusche

Mit dem im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *proof-of-principle*, wurden erste Schritte in Richtung eines automatisierten Nachweises von DNA-Methylierungsmarkern erbracht. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse und diskutierten Optimierungsiterationen, können aufbauend auf dieser Arbeit, weitere Entwicklungsprojekte hin zu einem marktreifen automatisierten epigenetischen Test getätigt werden. Wie in Abbildung 50 dargestellt, sind noch Kompartimente zur Reagenzienvorlagerung frei. Dies ist entscheidend, möchte man zusätzlich zur Bisulfitkonvertierung, der Aufreinigung der bisDNA sowie zur qPCR Detektion des Methylierungsmarkers, noch eine Extraktionsmethode zur Isolierung von DNA aus Zellen oder Körperflüssigkeiten wie Blutplasma etablieren. In der Literatur konnten zwar LoC-basierte Ansätze für die Analyse der DNA-Methylierung gefunden werden, jedoch wurde keine dieser Ansätze in einem System durchgeführt, welches bereits in großen Stückzahlen wirtschaftlich und mit hoher Fertigungsgenauigkeit hergestellt werden kann, wie es mit der *Vivalytic* Plattform der Fall ist [178–187]. Solch ein automatisiertes System, mit welchem die zeit- und arbeitsintensiven Prozesse der DNA-Methylierungsanalyse ohne professionelles Personal und spezialisierte Laborinfrastruktur durchführbar sind, könnten die Etablierung epigenetischer Tests in der Routinediagnostik attraktiv machen. Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte *SEPT9* Tumormarker ist nur ein exemplarischer DNA-Methylierungsmarker. Inzwischen sind für eine Vielzahl von Erkrankungen und Anwendungen DNA-Methylierungsmarker bekannt, weshalb deren Nachweis ein enormes Anwendungsgebiet bietet [33–36]. Eine Integration weiterer epigenetischer IVD Tests, auch mit höherem Multiplexgrad, wäre denkbar. Für Forschungszwecke ist es darüber hinaus interessant aus Zellen oder DNA Proben möglichst große Mengen an aufgereinigter bisDNA zu generieren, welche dann *off-Chip* mit weiteren molekularbiologischen Analysen, wie z. B. in Sequenzierexperimenten oder *Array*-basierten Methoden verwendet werden kann. Bereits die *on-Chip* Durchführung der zeit- und arbeitsintensiven *off-Chip* Bisulfitkonvertierung wäre für eine weitere Produktentwicklung interessant. Dadurch lassen sich Ressourcen in Forschungseinrichtungen einsparen und den Durchsatz erhöhen. Die Analyse der DNA-Methylierung bzw. von DNA-Methylierungsmarkern mit der *Vivalytic* Plattform könnte den Weg für ein breiteres Anwendungsfeld epigenetischer Methoden darstellen.

Literaturverzeichnis

- [1] Jörn Erik Walter and Anja Hümpel. *Epigenetik: Implikationen für die Lebens- und Geisteswissenschaften*. Nomos, 2017.
- [2] Jueng Soo You and Peter A Jones. Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin? *Cancer cell*, 22(1):9–20, 2012.
- [3] Amber V Majnik and Robert H Lane. Epigenetics: where environment, society and genetics meet. *Epigenomics*, 6(1):1–4, 2014.
- [4] Cyrus Martin and Yi Zhang. Mechanisms of epigenetic inheritance. *Current opinion in cell biology*, 19(3):266–272, 2007.
- [5] Ksenia Skvortsova, Nicola Iovino, and Ozren Bogdanović. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature reviews Molecular cell biology*, 19(12):774–790, 2018.
- [6] Mirang Kim and Joseph Costello. Dna methylation: an epigenetic mark of cellular memory. *Experimental & molecular medicine*, 49(4):e322–e322, 2017.
- [7] Manel Esteller. Cancer epigenomics: Dna methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews genetics*, 8(4):286–298, 2007.
- [8] Partha M Das and Rakesh Singal. Dna methylation and cancer. *Journal of clinical oncology*, 22(22):4632–4642, 2004.
- [9] Clare Stirzaker, Douglas S Millar, Cheryl L Paul, Peter M Warnecke, Janet Harrison, Paul C Vincent, Marianne Frommer, and Susan J Clark. Extensive dna methylation spanning the rb promoter in retinoblastoma tumors. *Cancer research*, 57(11):2229–2237, 1997.
- [10] Mark Morris. The dna methylation machinery. In *Clinical Epigenetics*, pages 47–64. Springer, 2019.
- [11] Denise Bruenig. Etablierung und optimierung von molekularbiologischen verfahren für eine integration in ein lab-on-chip system. 2021.
- [12] Anna Sadakierska-Chudy, Richard M Kostrzewa, and Małgorzata Filip. A comprehensive view of the epigenetic landscape part i: Dna methylation, passive and active dna demethylation pathways and histone variants. *Neurotoxicity research*, 27(1):84–97, 2015.
- [13] Frank Lyko. The dna methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews Genetics*, 19(2):81, 2018.

- [14] Quan Du, Zhen Wang, and Vern L Schramm. Human dnmt1 transition state structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(11):2916–2921, 2016.
- [15] En Li, Timothy H Bestor, and Rudolf Jaenisch. Targeted mutation of the dna methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6):915–926, 1992.
- [16] Masaki Okano, Daphne W Bell, Daniel A Haber, and En Li. Dna methyltransferases dnmt3a and dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99(3):247–257, 1999.
- [17] Albert Jeltsch and Renata Z Jurkowska. New concepts in dna methylation. *Trends in biochemical sciences*, 39(7):310–318, 2014.
- [18] Rahul M Kohli and Yi Zhang. Tet enzymes, tgd and the dynamics of dna demethylation. *Nature*, 502(7472):472–479, 2013.
- [19] Adrian Bird. Dna methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development*, 16(1):6–21, 2002.
- [20] Melanie Ehrlich, Miguel A Gama-Sosa, Lan-Hsiang Huang, Rose Marie Midgett, Kenneth C Kuo, Roy A McCune, and Charles Gehrke. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human dna from different types of tissues or cells. *Nucleic acids research*, 10(8):2709–2721, 1982.
- [21] Eric S Lander, Lauren M Linton, Bruce Birren, Chad Nusbaum, Michael C Zody, Jennifer Baldwin, Keri Devon, Ken Dewar, Michael Doyle, William Fitzhugh, et al. Erratum: Initial sequencing and analysis of the human genome: International human genome sequencing consortium (nature (2001) 409 (860-921)). *Nature*, 412(6846):565–566, 2001.
- [22] Robert A Rollins, Fatemeh Haghghi, John R Edwards, Rajdeep Das, Michael Q Zhang, Jingyue Ju, and Timothy H Bestor. Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome research*, 16(2):157–163, 2006.
- [23] Serge Saxonov, Paul Berg, and Douglas L Brutlag. A genome-wide analysis of cpg dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(5):1412–1417, 2006.
- [24] Aimée M Deaton and Adrian Bird. Cpg islands and the regulation of transcription. *Genes & development*, 25(10):1010–1022, 2011.
- [25] Peter W Laird. The power and the promise of dna methylation markers. *Nature Reviews Cancer*, 3(4):253–266, 2003.
- [26] WA Schulz, Christine Steinhoff, and AR Florl. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. In *DNA Methylation: Development, Genetic Disease and Cancer*, pages 211–250. Springer, 2006.
- [27] Peter A Jones and Daiya Takai. The role of dna methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293(5532):1068–1070, 2001.

- [28] Yimeng Yin, Ekaterina Morgunova, Arttu Jolma, Eevi Kaasinen, Biswajyoti Sahu, Syed Khund-Sayeed, Pratyush K Das, Teemu Kivioja, Kashyap Dave, Fan Zhong, et al. Impact of cytosine methylation on dna binding specificities of human transcription factors. *Science*, 356(6337), 2017.
- [29] Keith D Robertson. Dna methylation and human disease. *Nature Reviews Genetics*, 6(8):597–610, 2005.
- [30] Lisa D Moore, Thuc Le, and Guoping Fan. Dna methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1):23–38, 2013.
- [31] François Fuks. Dna methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Current opinion in genetics & development*, 15(5):490–495, 2005.
- [32] Michael Klutstein, Deborah Nejman, Razi Greenfield, and Howard Cedar. Dna methylation in cancer and aging. *Cancer research*, 76(12):3446–3450, 2016.
- [33] José M Ordovás and Caren E Smith. Epigenetics and cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 7(9):510, 2010.
- [34] Francesca Meda, Marco Folci, Andrea Baccarelli, and Carlo Selmi. The epigenetics of autoimmunity. *Cellular & molecular immunology*, 8(3):226–236, 2011.
- [35] María Berdasco and Manel Esteller. Clinical epigenetics: seizing opportunities for translation. *Nature Reviews Genetics*, 20(2):109–127, 2019.
- [36] KL Seib and MP Jennings. Epigenetics of infectious diseases. In *Medical Epigenetics*, pages 443–458. Elsevier, 2016.
- [37] Sophia Forat. Methylierungsmarker zur identifizierung von körperflüssigkeiten und gewebe aus forensischem spurenmaterial. 2015.
- [38] Athina Vidaki and Manfred Kayser. Recent progress, methods and perspectives in forensic epigenetics. *Forensic Science International: Genetics*, 37:180–195, 2018.
- [39] YM Dennis Lo. Fetal dna in maternal plasma: progress through epigenetics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1075(1):74–80, 2006.
- [40] Robert W Old, Francesco Crea, William Puszyk, and Maj Anita Hultén. Candidate epigenetic biomarkers for non-invasive prenatal diagnosis of down syndrome. *Reproductive biomedicine online*, 15(2):227–235, 2007.
- [41] Stephen Rapko, Udo Baron, Ulrich Hoffmüller, Fabian Model, Leslie Wolfe, and Sven Olek. Dna methylation analysis as novel tool for quality control in regenerative medicine. *Tissue engineering*, 13(9):2271–2280, 2007.
- [42] Wolfgang Wagner, Joana Frobels, and Roman Goetzke. Epigenetic quality check—how good are your mesenchymal stromal cells?, 2016.
- [43] Pramod Darvin, Salman M Toor, Varun Sasidharan Nair, and Eyad Elkord. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Experimental & molecular medicine*, 50(12):1–11, 2018.

- [44] Qingyang Xiao, André Nobre, Pilar Piñeiro, Miguel-Ángel Berciano-Guerrero, Emilio Alba, Manuel Cobo, Volker M Lauschke, and Isabel Barragán. Genetic and epigenetic biomarkers of immune checkpoint blockade response. *Journal of clinical medicine*, 9(1):286, 2020.
- [45] Farzeen Kader, Meenu Ghai, and Leah Maharaj. The effects of dna methylation on human psychology. *Behavioural brain research*, 346:47–65, 2018.
- [46] Tania L Roth, Farah D Lubin, Monsheel Sodhi, and Joel E Kleinman. Epigenetic mechanisms in schizizophrenia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(9):869–877, 2009.
- [47] Joanne Ryan, Isabelle Chaudieu, Marie-Laure Ancelin, and Richard Saffery. Biological underpinnings of trauma and post-traumatic stress disorder: focusing on genetics and epigenetics. *Epigenomics*, 8(11):1553–1569, 2016.
- [48] Stanley Krippner and Deirdre Barrett. Transgenerational trauma: The role of epigenetics. *Journal of Mind & Behavior*, 40(1), 2019.
- [49] Data Bridge Market Research. Global epigenetics diagnostic market -industry trends and forecast to 2028. 2020.
- [50] World Health Organization. fact-sheets cancer, year = 2021, url = <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>, urldate = 2021-06-13.
- [51] Douglas Hanahan and Robert A Weinberg. Hallmarks of cancer: the next generation. *cell*, 144(5):646–674, 2011.
- [52] Juan Sandoval and Manel Esteller. Cancer epigenomics: beyond genomics. *Current opinion in genetics & development*, 22(1):50–55, 2012.
- [53] Hideyuki Takeshima and Toshikazu Ushijima. Accumulation of genetic and epigenetic alterations in normal cells and cancer risk. *NPJ Precision Oncology*, 3(1):1–8, 2019.
- [54] Satoshi Yamashita, Takayoshi Kishino, Takamasa Takahashi, Taichi Shimazu, Hadrien Charvat, Yasuo Kakugawa, Takeshi Nakajima, Yi-Chia Lee, Naoko Iida, Masahiro Maeda, et al. Genetic and epigenetic alterations in normal tissues have differential impacts on cancer risk among tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(6):1328–1333, 2018.
- [55] Hui Shen and Peter W Laird. Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*, 153(1):38–55, 2013.
- [56] Vincent James Coglianò, Robert Baan, Kurt Straif, Yann Grosse, Béatrice Lauby-Secretan, Fatiha El Ghissassi, Véronique Bouvard, Lamia Benbrahim-Tallaa, Neela Guha, Crystal Freeman, et al. Preventable exposures associated with human cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 103(24):1827–1839, 2011.
- [57] Vladimir J Bykov and Kari Hemminki. Assay of different photoproducts after uva, b and c irradiation of dna and human skin explants. *Carcinogenesis*, 17(9):1949–1955, 1996.

- [58] Joyce T Reardon, Tadayoshi Bessho, Hsiang Chuan Kung, Philip H Bolton, and Aziz Sancar. In vitro repair of oxidative dna damage by human nucleotide excision repair system: possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(17):9463–9468, 1997.
- [59] Jean-Pierre J Issa, Yvonne L Ottaviano, Paul Celano, Stanley R Hamilton, Nancy E Davidson, and Stephen B Baylin. Methylation of the oestrogen receptor cpg island links ageing and neoplasia in human colon. *Nature genetics*, 7(4):536–540, 1994.
- [60] Jean-Pierre J Issa, Nita Ahuja, Minoru Toyota, Mary P Bronner, and Teresa A Brentnall. Accelerated age-related cpg island methylation in ulcerative colitis. *Cancer research*, 61(9):3573–3577, 2001.
- [61] Takao Maekita, Kazuyuki Nakazawa, Mami Mihara, Takeshi Nakajima, Kimihiko Yanaoka, Mikitaka Iguchi, Kenji Arii, Atsushi Kaneda, Tetsuya Tsukamoto, Masae Tatematsu, et al. High levels of aberrant dna methylation in helicobacter pylori-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk. *Clinical Cancer Research*, 12(3):989–995, 2006.
- [62] Tohru Niwa, Tetsuya Tsukamoto, Takeshi Toyoda, Akiko Mori, Harunari Tanaka, Takao Maekita, Masao Ichinose, Masae Tatematsu, and Toshikazu Ushijima. Inflammatory processes triggered by helicobacter pylori infection cause aberrant dna methylation in gastric epithelial cells. *Cancer research*, 70(4):1430–1440, 2010.
- [63] Naoshi Nishida, Takeshi Nagasaka, Takafumi Nishimura, Iwao Ikai, C Richard Bolland, and Ajay Goel. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 47(3):908–918, 2008.
- [64] F Liu, JK Killian, M Yang, RL Walker, JA Hong, M Zhang, Sean Davis, Y Zhang, M Hussain, S Xi, et al. Epigenomic alterations and gene expression profiles in respiratory epithelia exposed to cigarette smoke condensate. *Oncogene*, 29(25):3650–3664, 2010.
- [65] Daiji Oka, Satoshi Yamashita, Tadashi Tomioka, Yukihiro Nakanishi, Hoichi Kato, Michio Kaminishi, and Toshikazu Ushijima. The presence of aberrant dna methylation in noncancerous esophageal mucosae in association with smoking history: a target for risk diagnosis and prevention of esophageal cancers. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 115(15):3412–3426, 2009.
- [66] Alfred SL Cheng, Aedín C Culhane, Michael WY Chan, Chinnambally R Venkataramu, Mathias Ehrich, Aejaz Nasir, Benjamin AT Rodriguez, Joseph Liu, Pearly S Yan, John Quackenbush, et al. Epithelial progeny of estrogen-exposed breast progenitor cells display a cancer-like methylome. *Cancer research*, 68(6):1786–1796, 2008.
- [67] Andrii I Rozhok and James DeGregori. The evolution of lifespan and age-dependent cancer risk. *Trends in cancer*, 2(10):552–560, 2016.

- [68] Cristian Tomasetti and Bert Vogelstein. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science*, 347(6217):78–81, 2015.
- [69] Shikhar Sharma, Theresa K Kelly, and Peter A Jones. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1):27–36, 2010.
- [70] Stephen B Baylin and Peter A Jones. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 8(9):a019505, 2016.
- [71] Vibha Patil and Zdenko Herceg. Dna methylation and carcinogenesis: Current and future perspectives. In *Clinical Epigenetics*, pages 153–171. Springer, 2019.
- [72] Melanie Ehrlich. Dna hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics*, 1(2):239–259, 2009.
- [73] So Yeon Park, An Na Seo, Hae Yoen Jung, Jae Moon Gwak, Namhee Jung, Nam-Yun Cho, and Gyeong Hoon Kang. Alu and line-1 hypomethylation is associated with her2 enriched subtype of breast cancer. *PloS one*, 9(6), 2014.
- [74] Lu Xiao-Jie, Xue Hui-Ying, Xiaolong Qi, Xu Jiang, and Ma Shi-Jie. Line-1 in cancer: multifaceted functions and potential clinical implications. *Genetics in Medicine*, 18(5):431–439, 2016.
- [75] Pouya Pakneshan, Bernard Têtu, and Shafaat A Rabbani. Demethylation of urokinase promoter as a prognostic marker in patients with breast carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 10(9):3035–3041, 2004.
- [76] Dan Zhou, Weiwei Tang, Guoqiang Su, Mingquan Cai, Han-Xiang An, and Yun Zhang. Pcdh18 is frequently inactivated by promoter methylation in colorectal cancer. *Scientific reports*, 7(1):1–12, 2017.
- [77] Diana Connolly, Ines Abdesselam, Pascal Verdier-Pinard, and Cristina Montagna. Septin roles in tumorigenesis. 2011.
- [78] Mathew P Estey, Caterina Di Ciano-Oliveira, Carol D Froese, Margaret T Bejide, and William S Trimble. Distinct roles of septins in cytokinesis: Sept9 mediates midbody abscission. *Journal of cell biology*, 191(4):741–749, 2010.
- [79] Ruth Pidsley and Clare Stirzaker. Cancer methylation biomarkers in circulating cell-free dna. In *Clinical Epigenetics*, pages 217–245. Springer, 2019.
- [80] Gerard J Nuovo, Todd W Plaia, Steven A Belinsky, Stephen B Baylin, and James G Herman. In situ detection of the hypermethylation-induced inactivation of the p16 gene as an early event in oncogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22):12754–12759, 1999.
- [81] Steven A Belinsky, Kristen J Nikula, William A Palmisano, Ruth Michels, Geno Saccomanno, Edward Gabrielson, Stephen B Baylin, and James G Herman. Aberrant methylation of p16ink4a is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20):11891–11896, 1998.

- [82] Mario F Fraga, Michel Herranz, Jesús Espada, Esteban Ballestar, Maria F Paz, Santiago Ropero, Emel Erkek, Onder Bozdogan, Héctor Peinado, Alain Niveleau, et al. A mouse skin multistage carcinogenesis model reflects the aberrant dna methylation patterns of human tumors. *Cancer research*, 64(16):5527–5534, 2004.
- [83] Ludmil B Alexandrov, Serena Nik-Zainal, David C Wedge, Samuel AJR Aparicio, Sam Behjati, Andrew V Biankin, Graham R Bignell, Niccolo Bolli, Ake Borg, Anne-Lise Børresen-Dale, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 500(7463):415–421, 2013.
- [84] Hideyuki Takeshima and Toshikazu Ushijima. Methylation destiny: Moira takes account of histones and rna polymerase ii. *Epigenetics*, 5(2):89–95, 2010.
- [85] Joyce E Ohm, Kelly M McGarvey, Xiaobing Yu, Linzhao Cheng, Kornel E Schuebel, Leslie Cope, Helai P Mohammad, Wei Chen, Vincent C Daniel, Wayne Yu, et al. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to dna hypermethylation and heritable silencing. *Nature genetics*, 39(2):237–242, 2007.
- [86] Yeshayahu Schlesinger, Ravid Straussman, Ilana Keshet, Shlomit Farkash, Merav Hecht, Joseph Zimmerman, Eran Eden, Zohar Yakhini, Etti Ben-Shushan, Benjamin E Reubinoff, et al. Polycomb-mediated methylation on lys27 of histone h3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nature genetics*, 39(2):232–236, 2007.
- [87] Martin Widschwendter, Heidi Fiegl, Daniel Egle, Elisabeth Mueller-Holzner, Gilbert Spizzo, Christian Marth, Daniel J Weisenberger, Mihaela Campan, Joanne Young, Ian Jacobs, et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nature genetics*, 39(2):157–158, 2007.
- [88] Hideyuki Takeshima, Satoshi Yamashita, Taichi Shimazu, Tohru Niwa, and Toshikazu Ushijima. The presence of rna polymerase ii, active or stalled, predicts epigenetic fate of promoter cpg islands. *Genome research*, 19(11):1974–1982, 2009.
- [89] Heather M O’Hagan, Wei Wang, Subhojit Sen, Christina DeStefano Shields, Stella S Lee, Yang W Zhang, Eriko G Clements, Yi Cai, Leander Van Neste, Hariharan Easwaran, et al. Oxidative damage targets complexes containing dna methyltransferases, sirt1, and polycomb members to promoter cpg islands. *Cancer cell*, 20(5):606–619, 2011.
- [90] Hideyuki Takeshima, Daigo Ikegami, Mika Wakabayashi, Tohru Niwa, Young-Joon Kim, and Toshikazu Ushijima. Induction of aberrant trimethylation of histone h3 lysine 27 by inflammation in mouse colonic epithelial cells. *Carcinogenesis*, 33(12):2384–2390, 2012.
- [91] Ryan A Hlady, Rochelle L Tiedemann, William Puszyk, Ivan Zendejas, Lewis R Roberts, Jeong-Hyeon Choi, Chen Liu, and Keith D Robertson. Epigenetic signatures of alcohol abuse and hepatitis infection during human hepatocarcinogenesis. *Oncotarget*, 5(19):9425, 2014.

- [92] Marie-Pierre Lambert, Anupam Paliwal, Thomas Vaissière, Isabelle Chemin, Fabien Zoulim, Massimo Tommasino, Pierre Hainaut, Bakary Sylla, Jean-Yves Scoazec, Jörg Tost, et al. Aberrant dna methylation distinguishes hepatocellular carcinoma associated with hbv and hcv infection and alcohol intake. *Journal of hepatology*, 54(4):705–715, 2011.
- [93] Hideyuki Takeshima, Tohru Niwa, Takeshi Toyoda, Mika Wakabayashi, Satoshi Yamashita, and Toshikazu Ushijima. Degree of methylation burden is determined by the exposure period to carcinogenic factors. *Cancer science*, 108(3):316–321, 2017.
- [94] Atsushi Kaneda, Tetsuya Tsukamoto, Takeji Takamura-Enya, Naoko Watanabe, Michio Kaminishi, Takashi Sugimura, Masae Tatematsu, and Toshikazu Ushijima. Frequent hypomethylation in multiple promoter cpg islands is associated with global hypomethylation, but not with frequent promoter hypermethylation. *Cancer science*, 95(1):58–64, 2004.
- [95] AR Florl, C Steinhoff, M Müller, HH Seifert, C Hader, R Engers, R Ackermann, and WA Schulz. Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes line-1 hypomethylation. *British journal of cancer*, 91(5):985–994, 2004.
- [96] Russell J Diefenbach, Jenny H Lee, Richard F Kefford, and Helen Rizos. Evaluation of commercial kits for purification of circulating free dna. *Cancer genetics*, 228:21–27, 2018.
- [97] Wei Zhang, Wenjie Xia, Zhengye Lv, Yin Xin, Chao Ni, and Liu Yang. Liquid biopsy for cancer: circulating tumor cells, circulating free dna or exosomes? *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(2):755–768, 2017.
- [98] Giulia Siravegna, Silvia Marsoni, Salvatore Siena, and Alberto Bardelli. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nature reviews Clinical oncology*, 14(9):531, 2017.
- [99] Samantha Perakis and Michael R Speicher. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC medicine*, 15(1):75, 2017.
- [100] AR Thierry, S El Messaoudi, PB Gahan, P Anker, and M Stroun. Origins, structures, and functions of circulating dna in oncology. *Cancer and metastasis reviews*, 35(3):347–376, 2016.
- [101] Sabine Jahr, Hannes Hentze, Sabine Englisch, Dieter Hardt, Frank O Fackelmayer, Rolf-Dieter Hesch, and Rolf Knippers. Dna fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer research*, 61(4):1659–1665, 2001.
- [102] M Stroun, J Lyautey, C Lederrey, A Olson-Sand, and P Anker. About the possible origin and mechanism of circulating dna: Apoptosis and active dna release. *Clinica chimica acta*, 313(1-2):139–142, 2001.
- [103] Hunter R Underhill, Jacob O Kitzman, Sabine Hellwig, Noah C Welker, Riza Daza, Daniel N Baker, Keith M Gligorich, Robert C Rostomily, Mary P Bronner, and Jay Shendure. Fragment length of circulating tumor dna. *PLoS genetics*, 12(7), 2016.

- [104] Alain R Thierry, Florent Mouliere, Celine Gongora, Jeremy Ollier, Bruno Robert, Marc Ychou, Maguy Del Rio, and Franck Molina. Origin and quantification of circulating dna in mice with human colorectal cancer xenografts. *Nucleic acids research*, 38(18):6159–6175, 2010.
- [105] YM Dennis Lo, KC Allen Chan, Hao Sun, Eric Z Chen, Peiyong Jiang, Fiona MF Lun, Yama W Zheng, Tak Y Leung, Tze K Lau, Charles R Cantor, et al. Maternal plasma dna sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Science translational medicine*, 2(61):61ra91–61ra91, 2010.
- [106] Heidi Schwarzenbach, Dave SB Hoon, and Klaus Pantel. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nature Reviews Cancer*, 11(6):426–437, 2011.
- [107] Frank Diehl, Kerstin Schmidt, Michael A Choti, Katharine Romans, Steven Goodman, Meng Li, Katherine Thornton, Nishant Agrawal, Lori Sokoll, Steve A Szabo, et al. Circulating mutant dna to assess tumor dynamics. *Nature medicine*, 14(9):985, 2008.
- [108] Luca Sigalotti, Alessia Covre, Francesca Colizzi, and Elisabetta Fratta. Quantitative methylation-specific pcr: a simple method for studying epigenetic modifications of cell-free dna. In *Cell-free DNA as Diagnostic Markers*, pages 137–162. Springer, 2019.
- [109] Joseph F Costello, Michael C Frühwald, Dominic J Smiraglia, Laura J Rush, Gavin P Robertson, Xin Gao, Fred A Wright, Jamison D Feramisco, Päivi Peltomäki, James C Lang, et al. Aberrant cpg-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nature genetics*, 24(2):132–138, 2000.
- [110] Manel Esteller, Paul G Corn, Stephen B Baylin, and James G Herman. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research*, 61(8):3225–3229, 2001.
- [111] Felix Bormann, Manuel Rodríguez-Paredes, Felix Lasitschka, Dominic Edelmann, Tanja Musch, Axel Benner, Yehudit Bergman, Sebastian M Dieter, Claudia R Ball, Hanno Glimm, et al. Cell-of-origin dna methylation signatures are maintained during colorectal carcinogenesis. *Cell reports*, 23(11):3407–3418, 2018.
- [112] Muhammed Murtaza, Sarah-Jane Dawson, Katherine Pogrebniak, Oscar M Rueda, Elena Provenzano, John Grant, Suet-Feung Chin, Dana WY Tsui, Francesco Marrass, Davina Gale, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour dna in a case of metastatic breast cancer. *Nature communications*, 6(1):1–6, 2015.
- [113] Shu Yi Shen, Rajat Singhania, Gordon Fehringer, Ankur Chakravarthy, Michael HA Roehrl, Dianne Chadwick, Philip C Zuzarte, Ayelet Borgida, Ting Ting Wang, Tiantian Li, et al. Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free dna methylomes. *Nature*, 563(7732):579–583, 2018.
- [114] Keith D Robertson. Dna methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, 20(24):3139–3155, 2001.

- [115] Peter A Jones and Peter W Laird. Cancer-epigenetics comes of age. *Nature genetics*, 21(2):163–167, 1999.
- [116] Annie On-On Chan, Russell R Broaddus, Patrick S Houlihan, Jean-Pierre J Issa, Stanley R Hamilton, and Asif Rashid. CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *The American journal of pathology*, 160(5):1823–1830, 2002.
- [117] José Marrugo-Ramírez, Mònica Mir, and Josep Samitier. Blood-based cancer biomarkers in liquid biopsy: a promising non-invasive alternative to tissue biopsy. *International journal of molecular sciences*, 19(10):2877, 2018.
- [118] Dhruvajyoti Roy and Maarit Tiirikainen. Diagnostic power of dna methylation classifiers for early detection of cancer. *Trends in cancer*, 6(2):78–81, 2020.
- [119] Jesús Beltrán-García, Rebeca Osca-Verdegal, Salva Mena-Mollá, and José Luis García-Giménez. Epigenetic ivd tests for personalized precision medicine in cancer. *Frontiers in genetics*, 10:621, 2019.
- [120] Jean-Pierre Issa. Dna methylation as a clinical marker in oncology. *Journal of clinical oncology*, 30(20):2566–2568, 2012.
- [121] Anna Portela and Manel Esteller. Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology*, 28(10):1057–1068, 2010.
- [122] CHOO Kong-Bung. Epigenetics in disease and cancer. 2011.
- [123] Dimo Dietrich, Maria Jung, Svenja Puetzer, Annette Leisse, Emily Eva Holmes, Sebastian Meller, Barbara Uhl, Philipp Schatz, Claudia Ivascu, and Glen Kristiansen. Diagnostic and prognostic value of shox2 and sept9 dna methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions. *PLoS One*, 8(12):e84225, 2013.
- [124] Nicholas T Potter, Patrick Hurban, Mary N White, Kara D Whitlock, Catherine E Lofton-Day, Reimo Tetzner, Thomas Koenig, Neil B Quigley, and Gunter Weiss. Validation of a real-time pcr-based qualitative assay for the detection of methylated sept9 dna in human plasma. *Clinical chemistry*, 60(9):1183–1191, 2014.
- [125] Rohit Hariharan and Mark Jenkins. Utility of the methylated sept9 test for the early detection of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *BMJ open gastroenterology*, 7(1), 2020.
- [126] Robert Grützmann, Bela Molnar, Christian Pilarsky, Jens K Habermann, Peter M Schlag, Hans D Saeger, Stephan Miehke, Thomas Stolz, Fabian Model, Uwe J Roblick, et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 dna methylation assay. *PloS one*, 3(11):e3759, 2008.
- [127] T DeVos and B Molnar. Screening for colorectal cancer based on the promoter methylation status of the septin 9 gene in plasma cell free dna. *J Clin Epigenetics*, 3:1–6, 2017.
- [128] Yvette N Lamb and Sohita Dhillon. Epi procolon® 2.0 ce: a blood-based screening test for colorectal cancer. *Molecular diagnosis & therapy*, 21(2):225–232, 2017.

- [129] Dylan Rutledge, Jordan Riojas, Carissa Best, Marcia Eisenberg, and Lauren Kam-Morgan. Epi procolon®: Use of a non-invasive sept9 gene methylation blood test for colorectal cancer screening: A national laboratory experience. *Journal of Clinical Epigenetics*, 4(1):7, 2018.
- [130] Theo Devos, Reimo Tetzner, Fabian Model, Gunter Weiss, Matthias Schuster, Jürgen Distler, Kathryn V Steiger, Robert Gruetzmann, Christian Pilarsky, Jens K Habermann, et al. Circulating methylated sept9 dna in plasma is a biomarker for colorectal cancer. *Clinical chemistry*, 55(7):1337–1346, 2009.
- [131] Béla Molnár, Kinga Tóth, Barbara Kinga Barták, and Zsolt Tulassay. Plasma methylated septin 9: a colorectal cancer screening marker. *Expert review of molecular diagnostics*, 15(2):171–184, 2015.
- [132] L Song and Y Li. Methylated sept9 gene is a sensitive biomarker for all stages of colorectal cancer. *Colorec Cancer*, 1:1–7, 2015.
- [133] Marc Tänzer, Benjamin Balluff, Jürgen Distler, Kari Hale, Andreas Leodolter, Christoph Röcken, Bela Molnar, Roland Schmid, Catherine Lofton-Day, Tibor Schuster, et al. Performance of epigenetic markers sept9 and alx4 in plasma for detection of colorectal precancerous lesions. *PloS one*, 5(2):e9061, 2010.
- [134] Andreas Adler, Sebastian Geiger, Anne Keil, Harald Bias, Philipp Schatz, Theo de Vos, Jens Dhein, Mathias Zimmermann, Rudolf Tauber, and Bertram Wiedenmann. Improving compliance to colorectal cancer screening using blood and stool based tests in patients refusing screening colonoscopy in germany. *BMC gastroenterology*, 14(1):1–8, 2014.
- [135] Fouad J Moawad, Corinne L Maydonovitch, Priscilla A Cullen, Duncan S Barlow, Donald W Jenson, and Brooks D Cash. Ct colonography may improve colorectal cancer screening compliance. *American Journal of Roentgenology*, 195(5):1118–1123, 2010.
- [136] Mai-Britt Worm Ørntoft. Review of blood-based colorectal cancer screening: how far are circulating cell-free dna methylation markers from clinical implementation? *Clinical colorectal cancer*, 17(2):e415–e433, 2018.
- [137] José Luis García-Giménez, Marta Seco-Cervera, Trygve O Tollefsbol, Carlos Romá-Mateo, Lorena Peiró-Chova, Pablo Lapunzina, and Federico V Pallardó. Epigenetic biomarkers: current strategies and future challenges for their use in the clinical laboratory. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 54(7-8):529–550, 2017.
- [138] Peng Jin, Qian Kang, Xin Wang, Lang Yang, Yang Yu, Na Li, Yu-qi He, Xiaoliang Han, Jie Hang, Jing Zhang, et al. Performance of a second-generation methylated sept9 test in detecting colorectal neoplasm. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 30(5):830–833, 2015.
- [139] Kinga Toth, Ferenc Sipos, Alexandra Kalmar, Arpad V Patai, Barnabas Wichmann, Robert Stoehr, Henriette Golcher, Vera Schellerer, Zsolt Tulassay, and Bela Molnar. Detection of methylated sept9 in plasma is a reliable screening method for both left- and right-sided colon cancers. 2012.

- [140] Epigenomics AG. Epi procolon[®] 2.0 ce gebrauchsanleitung. 2015.
- [141] Epigenomics AG. Epigenomics and biochain announce the inclusion of their proprietary blood-based septin9 test in the chinese screening guideline for colorectal cancer. 2018.
- [142] Peter W Laird. Principles and challenges of genome-wide dna methylation analysis. *Nature Reviews Genetics*, 11(3):191–203, 2010.
- [143] Marianne Frommer, Louise E McDonald, Douglas S Millar, Christina M Collis, Fujiko Watt, Geoffrey W Grigg, Peter L Molloy, and Cheryl L Paul. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual dna strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5):1827–1831, 1992.
- [144] Susan J Clark, Aaron Statham, Clare Stirzaker, Peter L Molloy, and Marianne Frommer. Dna methylation: bisulphite modification and analysis. *Nature protocols*, 1(5):2353–2364, 2006.
- [145] Sandeep K Rajput, Sandeep Kumar, Vivek P Dave, Ankita Rajput, Haushila P Pandey, and Tirtha K Datta. An improved method of bisulfite treatment and purification to study precise dna methylation from as little as 10 pg dna. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168(4):797–804, 2012.
- [146] Mario F Fraga and Manel Esteller. Dna methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques*, 33(3):632–649, 2002.
- [147] Christoph Grunau, SJ Clark, and André Rosenthal. Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic acids research*, 29(13):e65–e65, 2001.
- [148] Sam Kint, Ward De Spiegelare, Jonas De Kesel, Linos Vandekerckhove, and Wim Van Criekinge. Evaluation of bisulfite kits for dna methylation profiling in terms of dna fragmentation and dna recovery using digital pcr. *PloS one*, 13(6):e0199091, 2018.
- [149] Maria Jung, Glen Kristiansen, and Dimo Dietrich. Dna methylation analysis of free-circulating dna in body fluids. In *DNA Methylation Protocols*, pages 621–641. Springer, 2018.
- [150] Hikoya Hayatsu. Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for dna methylation analysis—a personal account. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 84(8):321–330, 2008.
- [151] Robert Shapiro, Robert E Servis, and Marvin Welcher. Reactions of uracil and cytosine derivatives with sodium bisulfite. *Journal of the American Chemical Society*, 92(2):422–424, 1970.
- [152] Lasse Sommer Kristensen and Lise Lotte Hansen. Pcr-based methods for detecting single-locus dna methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clinical chemistry*, 55(8):1471–1483, 2009.

- [153] Phil Oberacker, Peter Stepper, Donna M Bond, Sven Höhn, Jule Focken, Vivien Meyer, Luca Schelle, Victoria J Sugrue, Gert-Jan Jeunen, Tim Moser, et al. Bio-on-magnetic-beads (bomb): Open platform for high-throughput nucleic acid extraction and manipulation. *PLoS biology*, 17(1):e3000107, 2019.
- [154] Robert E Farrell Jr. *RNA Methodologies: laboratory guide for isolation and characterization*. Academic Press, 2009.
- [155] Lei Xu, Jun Lv, Liefeng Ling, Peng Wang, Ping Song, Ruirui Su, and Guoping Zhu. Altered nucleic acid partitioning during phenol extraction or silica adsorption by guanidinium and potassium salts. *Analytical biochemistry*, 419(2):309–316, 2011.
- [156] RCJA Boom, CJ Sol, MM Salimans, CL Jansen, PM Wertheim-van Dillen, and JPME Van der Noordaa. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*, 28(3):495–503, 1990.
- [157] Sonja Berensmeier. Magnetic particles for the separation and purification of nucleic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 73(3):495–504, 2006.
- [158] Ximeng Liu and Shuko Harada. Dna isolation from mammalian samples. *Current protocols in molecular biology*, 102(1):2–14, 2013.
- [159] Angela Karp, Peter G Isaac, and David S Ingram. Isolation of nucleic acids using silica-gel based membranes: methods based on the use of qiaamp spin columns. In *Molecular Tools for Screening Biodiversity*, pages 59–63. Springer, 1998.
- [160] Shuji Ogino, Takako Kawasaki, Mohan Brahmandam, Mami Cantor, Gregory J Kirkner, Donna Spiegelman, G Mike Makrigiorgos, Daniel J Weisenberger, Peter W Laird, Massimo Loda, et al. Precision and performance characteristics of bisulfite conversion and real-time pcr (methyLight) for quantitative dna methylation analysis. *The Journal of molecular diagnostics*, 8(2):209–217, 2006.
- [161] Stephanie A Thatcher. Dna/rna preparation for molecular detection. *Clinical chemistry*, 61(1):89–99, 2015.
- [162] Peter E Vandeventer, Jessica S Lin, Theodore J Zwang, Ali Nadim, Malkiat S Johal, and Angelika Niemz. Multiphasic dna adsorption to silica surfaces under varying buffer, ph, and ionic strength conditions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(19):5661–5670, 2012.
- [163] Monika Jansohn and Sophie Rothhämel. *Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Springer, 2012.
- [164] Kathryn A Melzak, Chris S Sherwood, Robin FB Turner, and Charles A Haynes. Driving forces for dna adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal of colloid and interface science*, 181(2):635–644, 1996.
- [165] Ahmad Bitar, Nasir M Ahmad, Hatem Fessi, and Abdelhamid Elaissari. Silica-based nanoparticles for biomedical applications. *Drug discovery today*, 17(19-20):1147–1154, 2012.

- [166] Sergey Kurdyukov and Martyn Bullock. Dna methylation analysis: choosing the right method. *Biology*, 5(1):3, 2016.
- [167] Yi Chang, Bhairavi Tolani, Xiuhong Nie, Xiuyi Zhi, Mu Hu, and Biao He. Review of the clinical applications and technological advances of circulating tumor dna in cancer monitoring. *Therapeutics and clinical risk management*, 13:1363, 2017.
- [168] Anders Bergkvist, Malcolm Burns, Rebecca Sanders, Nicholas Redshaw, and Tim Wilkes. Good practice guide for the application of quantitative pcr (qpcr).
- [169] Bianca Holzapfel and Lucia Wickert. Die quantitative real-time-pcr (qrt-pcr). methoden und anwendungsgebiete. *Biologie in unserer Zeit*, 37(2):120–126, 2007.
- [170] Stefanie Fischer. Entwicklung eines molekularbiologischen assays zum nachweis von tumormarkern und dessen integration in ein mikrofluidisches system. 2019.
- [171] Cindy A Eads, Kathleen D Danenberg, Kazuyuki Kawakami, Leonard B Saltz, Corey Blake, Darryl Shibata, Peter V Danenberg, and Peter W Laird. Methy-light: a high-throughput assay to measure dna methylation. *Nucleic acids research*, 28(8):e32–00, 2000.
- [172] Susan E Cottrell, Jürgen Distler, Nancy S Goodman, Suzanne H Mooney, Antje Kluth, Alexander Olek, Ina Schwope, Reimo Tetzner, Heike Ziebarth, and Kurt Berlin. A real-time pcr assay for dna-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic acids research*, 32(1):e10–e10, 2004.
- [173] Cornel Mulhardt. *Molecular biology and genomics*. Elsevier, 2010.
- [174] Maja Sidstedt, Peter Rådström, and Johannes Hedman. Pcr inhibition in qpcr, dpcr and mps—mechanisms and solutions. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 412(9):2009–2023, 2020.
- [175] A. Nordheim and R. Knippers. "Épigenetische Mechanismen", in *Molekulare Genetik*, volume 1. 2001.
- [176] C Schrader, A Schielke, L Ellerbroek, and R Johne. Pcr inhibitors—occurrence, properties and removal. *Journal of applied microbiology*, 113(5):1014–1026, 2012.
- [177] Britta Schulze. Transfer und optimierung von unit operations für den automatisierten nachweis von dna-methylierungsmarkern in einem mikrofluidischen lab-on-chip system. 2021.
- [178] Ryoji Kurita and Osamu Niwa. Microfluidic platforms for dna methylation analysis. *Lab on a Chip*, 16(19):3631–3644, 2016.
- [179] Abu Ali Ibn Sina, Laura G Carrascosa, and Matt Trau. Dna methylation-based point-of-care cancer detection: challenges and possibilities. *Trends in molecular medicine*, 25(11):955–966, 2019.
- [180] Yi Zhang, Vasudev Bailey, Christopher M Puleo, Hariharan Easwaran, Elizabeth Griffiths, James G Herman, Stephen B Baylin, and Tza-Huei Wang. Dna methylation analysis on a droplet-in-oil pcr array. *Lab on a Chip*, 9(8):1059–1064, 2009.

- [181] Sai Ma, Mario de la Fuente Revenga, Zhixiong Sun, Chen Sun, Travis W Murphy, Hehuang Xie, Javier González-Maeso, and Chang Lu. Cell-type-specific brain methylomes profiled via ultralow-input microfluidics. *Nature biomedical engineering*, 2(3):183–194, 2018.
- [182] DJ Shin, A Stark, and TH Wang. Droplet bisulfite conversion platform for epigenetic cancer biomarker detection. In *2013 Transducers & Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXVII)*, pages 2181–2184. IEEE, 2013.
- [183] Vasudev J Bailey, Yi Zhang, Brian P Keeley, Chao Yin, Kristen L Pelosky, Malcolm Brock, Stephen B Baylin, James G Herman, and Tza-Huei Wang. Single-tube analysis of dna methylation with silica superparamagnetic beads. *Clinical chemistry*, 56(6):1022–1025, 2010.
- [184] Alejandro Stark, Dong Jin Shin, and Tza-Huei Wang. A sample-to-answer droplet magnetofluidic assay platform for quantitative methylation-specific pcr. *Biomedical microdevices*, 20(2):1–8, 2018.
- [185] Harikrishnan Jayamohan, Valentin Romanov, Huizhong Li, Jiyoung Son, Raheel Samuel, John Nelson, and Bruce K Gale. Advances in microfluidics and lab-on-a-chip technologies. *Molecular Diagnostics*, pages 197–217, 2017.
- [186] Chengyu Deng, Lynette B Naler, and Chang Lu. Microfluidic epigenomic mapping technologies for precision medicine. *Lab on a Chip*, 19(16):2630–2650, 2019.
- [187] Mina Adampourezare, Gholamreza Dehghan, Mohammad Hasanzadeh, and Mohammad-Ali Hosseinpoure Feizi. Application of lateral flow and microfluidic bioassay and biosensing towards identification of dna-methylation and cancer detection: Recent progress and challenges in biomedicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 141:111845, 2021.
- [188] Jochen Rupp, Manuela Schmidt, Susanne Münch, Markus Cavalari, Ulf Steller, Jürgen Steigert, Michael Stumber, Christian Dorrer, Peter Rothacher, Roland Zengerle, et al. Rapid microarray processing using a disposable hybridization chamber with an integrated micropump. *Lab on a Chip*, 12(7):1384–1388, 2012.
- [189] Elisa Schiele. Evaluierung von strategien für die analyse epigenetischer methylierungsmarker hinsichtlich einer loc-integration. 2017.
- [190] Jasmin Gries, Dirk Schumacher, Julia Arand, Pavlo Lutsik, Maria Rivera Markelova, Iduna Fichtner, Jörn Walter, Christine Sers, and Sascha Tierling. Bi-prof: bisulfite profiling of target regions using 454 gs flx titanium technology. *Epigenetics*, 8(7):765–771, 2013.
- [191] Pavlo Lutsik, Lars Feuerbach, Julia Arand, Thomas Lengauer, Jörn Walter, and Christoph Bock. Biq analyzer ht: locus-specific analysis of dna methylation by high-throughput bisulfite sequencing. *Nucleic acids research*, 39(suppl_2):W551–W556, 2011.

- [192] Janik Kärcher, Denise Brünig, Britta Schulze, Yvonne Beyl, Anke Detzer, Christian Grumaz, Eva Weimer, Franz Lärmer, Sascha Tierling, and Jörn Walter. Bisulfite based analysis of DNA methylation markers in amicrofluidic environment with integrated silica matrix purification and PCRreadout. In *μTAS Conference Journal*, volume 25, pages 41–43. μTAS, 2021.
- [193] Paulina Odlander. Optimisation and validation of pcr method for hla gene expression to enable pcr system transfer and master mix change, 2020.
- [194] Mkt 0062 laborbroschüre en.
- [195] Janik Kärcher, Britta Schulze, Aaron Doerr, Sascha Tierling, and Jörn Walter. Transfer of blocker-based qpcr reactions for dna-methylation analysis into a microfluidic loc system ap-plying thermal modelling for identification of adequatetemperature profiles. *Biomicrofluidics*, 2022.
- [196] Friedrich Lottspeich and Joachim W Engels. *Bioanalytics: Analytical Methods and Concepts in Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley & Sons, 2018.
- [197] Sascha Tierling, Beate Schmitt, and Jörn Walter. Comprehensive evaluation of commercial bisulfite-based dna methylation kits and development of an alternative protocol with improved conversion performance. *Genetics & epigenetics*, 10:1179237X18766097, 2018.
- [198] Mai-Britt Worm Ørntoft, Sarah Østrup Jensen, Thomas Birkballe Hansen, Jesper Bertram Bramsen, and Claus Lindbjerg Andersen. Comparative analysis of 12 different kits for bisulfite conversion of circulating cell-free dna. *Epigenetics*, 12(8):626–636, 2017.
- [199] Chrysanthia A Leontiou, Michael D Hadjidaniel, Petros Mina, Pavlos Antoniou, Marios Ioannides, and Philippos C Patsalis. Bisulfite conversion of dna: performance comparison of different kits and methylation quantitation of epigenetic biomarkers that have the potential to be used in non-invasive prenatal testing. *PloS one*, 10(8):e0135058, 2015.
- [200] Benedetta Izzi, Alexandra M Binder, and Karin B Michels. Pyrosequencing evaluation of widely available bisulfite conversion methods: considerations for application. *Medical epigenetics*, 2(1):28–36, 2014.
- [201] Alejandro Stark, Dong Jin Shin, Thomas Pisanic, Kuangwen Hsieh, and Tza-Huei Wang. A parallelized microfluidic dna bisulfite conversion module for streamlined methylation analysis. *Biomedical microdevices*, 18(1):5, 2016.
- [202] Roger M Wartell and Albert S Benight. Thermal denaturation of dna molecules: a comparison of theory with experiment. *Physics Reports*, 126(2):67–107, 1985.
- [203] Karen Drukker, Guosheng Wu, and George C Schatz. Model simulations of dna denaturation dynamics. *The Journal of Chemical Physics*, 114(1):579–590, 2001.
- [204] René Thomas. The denaturation of dna. *Gene*, 135(1-2):77–79, 1993.

- [205] Shaohua Yi, Fei Long, Juanbo Cheng, and Daixin Huang. An optimized rapid bisulfite conversion method with high recovery of cell-free dna. *BMC molecular biology*, 18(1):1–8, 2017.
- [206] Kazuo Tanaka and Akimitsu Okamoto. Degradation of dna by bisulfite treatment. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 17(7):1912–1915, 2007.
- [207] Jonathan Mill and Arturas Petronis. Profiling dna methylation from small amounts of genomic dna starting material: efficient sodium bisulfite conversion and subsequent whole-genome amplification. In *DNA Methylation*, pages 371–391. Springer, 2009.
- [208] Kristofer Munson, Jarrod Clark, Katarzyna Lamparska-Kupsik, and Steven S Smith. Recovery of bisulfite-converted genomic sequences in the methylation-sensitive qpcr. *Nucleic acids research*, 35(9):2893–2903, 2007.
- [209] Inge Søkilde Pedersen, Henrik Bygum Krarup, Ole Thorlacius-Ussing, and Poul Henning Madsen. High recovery of cell-free methylated dna based on a rapid bisulfite-treatment protocol. *BMC molecular biology*, 13(1):1–8, 2012.
- [210] Bonnita Werner, Nicole Laurencia Yuwono, Claire Henry, Kate Gunther, Robert William Rapkins, Caroline Elizabeth Ford, and Kristina Warton. Circulating cell-free dna from plasma undergoes less fragmentation during bisulfite treatment than genomic dna due to low molecular weight. *PloS one*, 14(10):e0224338, 2019.
- [211] Axel Schumacher. Schumacher’s guide for: Bisulfite conversion of dna for methylation fine-mapping. *Schumacher’s Guide*, 1:1–6, 2007.
- [212] Xiaofang Wang, Hyun Jeong Lim, and Ahjeong Son. Characterization of denaturation and renaturation of dna for dna hybridization. *Environmental health and toxicology*, 29, 2014.
- [213] Jaeyun Yoon, Mi Kyoung Park, Tae Yoon Lee, Yong-Jin Yoon, and Yong Shin. Loma-b: a simple and versatile lab-on-a-chip system based on single-channel bisulfite conversion for dna methylation analysis. *Lab on a Chip*, 15(17):3530–3539, 2015.
- [214] Emily Eva Holmes, Maria Jung, Sebastian Meller, Annette Leisse, Verena Sailer, Julie Zech, Martina Mengdehl, Leif-Alexander Garbe, Barbara Uhl, Glen Kristiansen, et al. Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of dna from tissues, cell lines, ffpe tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum, and urine. *PloS one*, 9(4):e93933, 2014.
- [215] Yuki Nakayama, Hiromi Yamaguchi, Naoki Einaga, and Mariko Esumi. Pitfalls of dna quantification using dna-binding fluorescent dyes and suggested solutions. *PloS one*, 11(3):e0150528, 2016.
- [216] Vladimir Gubala, Jonathan Siegrist, Ruairi Monaghan, Brian O’Reilly, Ram Prasad Gandhiraman, Stephen Daniels, David E Williams, and Jens Ducreé. Simple approach to study biomolecule adsorption in polymeric microfluidic channels. *Analytica chimica acta*, 760:75–82, 2013.

- [217] Tigst Demeke and G Ronald Jenkins. Influence of dna extraction methods, pcr inhibitors and quantification methods on real-time pcr assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6):1977–1990, 2010.
- [218] Trevor L Hawkins, Tarra O’Connor-Morin, Aparna Roy, and Cynthia Santillan. Dna purification and isolation using a solid-phase. *Nucleic acids research*, 22(21):4543, 1994.
- [219] Matthias Meyer and Martin Kircher. Illumina sequencing library preparation for highly multiplexed target capture and sequencing. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6):pdb–prot5448, 2010.
- [220] Christian Carøe, Shyam Gopalakrishnan, Lasse Vinner, Sarah ST Mak, Mikkel Holger S Sinding, José A Samaniego, Nathan Wales, Thomas Sicheritz-Pontén, and M Thomas P Gilbert. Single-tube library preparation for degraded dna. *Methods in Ecology and Evolution*, 9(2):410–419, 2018.
- [221] Samantha Byrnes, Andy Fan, Jacob Trueb, Francis Jareczek, Mark Mazzochette, Andre Sharon, Alexis F Sauer-Budge, and Catherine M Klapperich. A portable, pressure driven, room temperature nucleic acid extraction and storage system for point of care molecular diagnostics. *Analytical Methods*, 5(13):3177–3184, 2013.
- [222] KR Paithankar and KS333871 Prasad. Precipitation of dna by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic acids research*, 19(6):1346, 1991.
- [223] Axel Schmitz and Detlev Riesner. Purification of nucleic acids by selective precipitation with polyethylene glycol 6000. *Analytical biochemistry*, 354(2):311–313, 2006.
- [224] M Tefvik Dorak. Real-time pcr. *Taylor y Francis Group*, 2006.
- [225] Gabor E Tusnady, Istvan Simon, Andras Varadi, and Tamas Aranyi. Bisearch: primer-design and search tool for pcr on bisulfite-treated genomes. *Nucleic acids research*, 33(1):e9–e9, 2005.
- [226] Martina Kovárová and Petr Dráber. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. *Nucleic Acids Research*, 28(13):e70–e70, 2000.
- [227] Markus Ralser, Robert Querfurth, Hans-Jörg Warnatz, Hans Lehrach, Marie-Laure Yaspo, and Sylvia Krobitsch. An efficient and economic enhancer mix for pcr. *Biochemical and biophysical research communications*, 347(3):747–751, 2006.
- [228] Susan Frackman, Gary Kobs, Dan Simpson, Doug Storts, et al. Betaine and dmsc: enhancing agents for pcr. *Promega notes*, 65(27-29):27–29, 1998.
- [229] Zhizhou Zhang, Xia Yang, Liangyu Meng, Fang Liu, Cenchao Shen, and Wenjuan Yang. Enhanced amplification of gc-rich dna with two organic reagents. *Biotechniques*, 47(3):775–779, 2009.
- [230] Masazumi Nagai, Akihida Yoshida, and Nobuko Sato. Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol and glycerol on pcr. *IUBMB Life*, 44(1):157–163, 1998.

- [231] Pallavi Deol, Sukdeb Nandi, Vishal Chander, Chandan Prakash, Sonalika Mahajan, Safoora Kashafi, Ashwini R Chaple, Saima M Ganie, Karam Pal Singh, and Gaurav Kumar Sharma. Development of freeze-dried reagents based multiplex pcr assay for the detection of common and emerging abortion-causing pathogens. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 15(3):1371–1379, 2021.
- [232] Siyu Yang and Weijia Wen. Lyophilized ready-to-use mix for the real-time polymerase chain reaction diagnosis. *ACS Applied Bio Materials*, 4(5):4354–4360, 2021.
- [233] Paul R Klatser, Sjoukje Kuijper, Cor W van Ingen, and Arend HJ Kolk. Stabilized, freeze-dried pcr mix for detection of mycobacteria. *Journal of clinical microbiology*, 36(6):1798–1800, 1998.
- [234] Raghavendra D Kulkarni, Mukti Nath Mishra, Jeevanandam Mohanraj, Arun Chandrasekhar, G S Ajantha, Sheetal Kulkani, and Shama Bhat. Development of a dry-reagent mix-based polymerase chain reaction as a novel tool for the identification of acinetobacter species and its comparison with conventional polymerase chain reaction. *Journal of laboratory physicians*, 10(01):068–072, 2018.
- [235] Jiasu Xu, Jin Wang, Zecheng Zhong, Xiaosong Su, Kunyu Yang, Zhongfu Chen, Dongxu Zhang, Tingdong Li, Yingbin Wang, Shiyin Zhang, et al. Room-temperature-storable pcr mixes for sars-cov-2 detection. *Clinical biochemistry*, 84:73–78, 2020.
- [236] Kai Griebenow and Alexander M Klivanov. Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24):10969–10976, 1995.
- [237] Arno TP Skrabanja, André LJ De Meere, Rien A De Ruiter, and Piet JM Van Den Oetelaar. Lyophilization of biotechnology products. *PDA journal of Pharmaceutical science and technology*, 48(6):311–317, 1994.
- [238] RD Rahane and Punit R Rachh. A review on fast dissolving tablet. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(5):50–55, 2018.
- [239] Laurence Thirion, Audrey Dubot-Peres, Laura Pezzi, Iban Corcostegui, Mhammed Touinssi, Xavier de Lamballerie, and Remi N Charrel. Lyophilized matrix containing ready-to-use primers and probe solution for standardization of real-time pcr and rt-qpcr diagnostics in virology. *Viruses*, 12(2):159, 2020.
- [240] A Moiana, LJ Turner, L Ventura, and M Gramegna. A new self-containing lyophilized pcr mix for rna amplification. *Clinical Biochemistry*, 46(12):1156, 2013.
- [241] SV Lee, ES Tai, AR Mutalib, S Khairani-Bejo, AR Bahaman, et al. Rapid detection of pathogenic leptospire by lyophilized reagent-based polymerase chain reaction. *Trop Biomed*, 28(3):497–505, 2011.
- [242] Doug Millar, Yonka Christova, and Philipp Holliger. A polymerase engineered for bisulfite sequencing. *Nucleic acids research*, 43(22):e155–e155, 2015.

- [243] Nasir Ali, Rita de Cássia Pontello Rampazzo, Alexandre Dias Tavares Costa, and Marco Aurelio Krieger. Current nucleic acid extraction methods and their implications to point-of-care diagnostics. *BioMed research international*, 2017, 2017.
- [244] Thermo Fisher Scientific. Real-time pcr handbook. *New York, USA: Thermofisher-Scientific*, 2014.
- [245] Chetan Bettegowda, Mark Sausen, Rebecca J Leary, Isaac Kinde, Yuxuan Wang, Nishant Agrawal, Bjarne R Bartlett, Hao Wang, Brandon Lubber, Rhoda M Alani, et al. Detection of circulating tumor dna in early-and late-stage human malignancies. *Science translational medicine*, 6(224):224ra24–224ra24, 2014.
- [246] Markus Rombach, Dominique Kosse, Bernd Faltin, Simon Wadle, Günter Roth, Roland Zengerle, and Felix von Stetten. Real-time stability testing of air-dried primers and fluorogenic hydrolysis probes stabilized by trehalose and xanthan. *BioTechniques*, 57(3):151–155, 2014.
- [247] Jutta Zagon, Sylvia Kurth, Anke Ehlers, Bettina Linke, Alfonso Lampen, and Hermann Broll. Preservation of primer and probes on “ready-to-use” 96-well microtiter plates: A step forward towards enhancing throughput and harmonization of real-time pcr applications in food and feed control. *Food Control*, 25(2):709–716, 2012.
- [248] John H Crowe, James S Clegg, and Lois M Crowe. Anhydrobiosis: the water replacement hypothesis. *The properties of water in foods ISOPOW 6*, pages 440–455, 1998.
- [249] John H Crowe, John F Carpenter, and Lois M Crowe. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 60(1):73–103, 1998.
- [250] Jens Ducreé. Efficient development of integrated lab-on-a-chip systems featuring operational robustness and manufacturability. *Micromachines*, 10(12):886, 2019.
- [251] Alison M Skelley and Joel Voldman. An active bubble trap and debubbler for microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 8(10):1733–1737, 2008.
- [252] Yinuo Cheng, Yue Wang, Zengshuai Ma, Wenhui Wang, and Xiongying Ye. A bubble-and clogging-free microfluidic particle separation platform with multi-filtration. *Lab on a Chip*, 16(23):4517–4526, 2016.
- [253] Cornelia Gaertig, Katja Niemann, Jana Berthold, Lisa Giel, Nadine Leitschuh, Christoph Boehm, Liudmila Roussak, Katja Vetter, and Dirk Kuhlmeier. Development of a point-of-care-device for fast detection of periodontal pathogens. *BMC Oral Health*, 15(1):1–8, 2015.
- [254] Anja Gulliksen. Microchips for isothermal amplification of rna: Development of microsystems for analysis of bacteria, virii and cells. 2007.
- [255] Frank Goldschmidtboeing, Martin Rabold, and Peter Woias. Strategies for void-free liquid filling of micro cavities. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 16(7):1321, 2006.

- [256] Sabo Wada Dutse and Nor Azah Yusof. Microfluidics-based lab-on-chip systems in dna-based biosensing: An overview. *Sensors*, 11(6):5754–5768, 2011.
- [257] Clarissa Lui, Nathaniel C Cady, and Carl A Batt. Nucleic acid-based detection of bacterial pathogens using integrated microfluidic platform systems. *Sensors*, 9(5):3713–3744, 2009.
- [258] Andreas E Guber, Mathias Hecke, Dirk Herrmann, Alban Muslija, Volker Saile, Lutz Eichhorn, Thomas Gietzelt, Werner Hoffmann, Peter C Hauser, Jatisai Tanyanyiwa, et al. Microfluidic lab-on-a-chip systems based on polymers—fabrication and application. *Chemical Engineering Journal*, 101(1-3):447–453, 2004.
- [259] Stefanie Demming. *Disposable lab-on-chip systems for biotechnological screening*. Shaker Aachen, 2011.
- [260] David Erickson. Towards numerical prototyping of labs-on-chip: modeling for integrated microfluidic devices. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1(4):301–318, 2005.
- [261] Chunsun Zhang and Da Xing. Miniaturized pcr chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends. *Nucleic acids research*, 35(13):4223–4237, 2007.
- [262] Barbara Bachmann, Wolfgang Lüke, and Gerhard Hunsmann. Improvement of pcr amplified dna sequencing with the aid of detergents. *Nucleic acids research*, 18(5):1309, 1990.
- [263] Peter Rådström, Rickard Knutsson, Petra Wolffs, Maria Lövenklev, and Charlotta Lofström. Pre-pcr processing. *Molecular biotechnology*, 26(2):133–146, 2004.
- [264] Tigst Demeke and Robert P Adams. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on pcr. *Biotechniques*, 12(3):332–334, 1992.
- [265] Zhanguo Xin, Jeff P Velten, Melvin J Oliver, and John J Burke. High-throughput dna extraction method suitable for pcr. *Biotechniques*, 34(4):820–826, 2003.
- [266] Kulandaiappan Varadaraj and Dorothy M Skinner. Denaturants or cosolvents improve the specificity of pcr amplification of a g+ c-rich dna using genetically engineered dna polymerases. *Gene*, 140(1):1–5, 1994.
- [267] Ivonne Schneegaß, Reiner Bräutigam, and Johann Michael Köhler. Miniaturized flow-through pcr with different template types in a silicon chip thermocycler. *Lab on a Chip*, 1(1):42–49, 2001.
- [268] Qi-Wei Lu and Christopher W Macosko. Comparing the compatibility of various functionalized polypropylenes with thermoplastic polyurethane (tpu). *Polymer*, 45(6):1981–1991, 2004.

6 Abbildungsverzeichnis

1	Darstellung der Strukturformeln von unmethyliertem Cytosin (links) und methyliertem Cytosin (rechts). Die Methylgruppe wird von sogenannten DNA-methyltransferasen (DNMTs) unter Verwendung von S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Methylgruppendonor an das 5'-C Atom des Cytosins angebracht. In Anlehnung an [11, 12].	2
2	Darstellung der Mechanismen der Auf- und Abmethylierung der DNA. Unmethylierte CpG Positionen sind in weiß und methylierte CpG Positionen in schwarz dargestellt. DNMT1 ist an der Replikationsgabel lokalisiert und bringt Methylgruppen am neusynthetisierten DNA-Strang an. Während des Replikationsvorgangs kann es trotzdem zur passiven Demethylierung kommen. DNMT3A und 3B (DNMT3) sind für die <i>de novo</i> DNA-Methylierung während der Embryogenese zuständig und tragen darüber hinaus ebenfalls zur Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung bei. Die aktive DNA-Demethylierung findet über eine oxidative Demethylierungskaskade mittels TET Enzymen statt. In Anlehnung an [17].	3
3	Veränderungen der DNA-Methylierung in Tumoren. Weiße Kreise stellen unmethylierte Regionen und schwarze Kreise methylierte Regionen dar. Oben ist der unmethylierte Promotor eines TSG in einer normalen Zelle dargestellt. Unten ist der hypermethylierte Promotor eines TSG in einer Krebszelle dargestellt. Außerdem ist die in Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen abnehmende globale DNA-Methylierung außerhalb regulativer Elemente dargestellt. In Anlehnung an [71].	6
4	Aus Primärtumoren stammende Tumormarker im Blut. Tumorspezifische Veränderungen der DNA-Methylierung sowie genetische Mutationen können in ctDNA detektiert werden. Neben ctDNA und cfDNA aus gesunden Zellen, können auch zirkulierende Tumorzellen (engl. <i>circulation tumor cells</i> , CTCs), welche sich aus dem Primärtumor ablösen sowie virale DNA und Mikro RNA (miRNA) im Blut detektiert werden. In Anlehnung an [79]	8
5	Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten Methoden für die Analyse der DNA-Methylierung. (A) Bisulfitkonvertierung der Ausgangs DNA (Abschnitt 1.3.1). (B) Aufreinigung mittels in Zentrifugensäulchen verbauten Silikamatrices oder mit Hilfe von silikabeschichteten magnetischen Partikeln (Abschnitt 1.3.2). (C) Detektion des Methylierungsmarkers SEPT9 mit einer <i>Heavymethyl</i> (HM) qPCR (Abschnitt 1.3.3). Die Desulfonierung kann während der Aufreinigung mit Desulfonierungspuffern oder während einer verlängerten initialen Denaturierungsphase der qPCR durchgeführt werden. In der qPCR können sowohl flüssige als auch lyophilisierte Mastermixe eingesetzt werden.	11

6	Übersicht des Reaktionsmechanismus der Bisulfitkonvertierung. Unmethyliertes Cytosin wird in einer Sulfonierungsreaktion zu Cytosinsulfonat umgewandelt. Im Anschluss entsteht über eine hydrolytische Desaminierung Uracilsulfonat. Die SO_3^- -Gruppe wird über eine alkalische Desulfonierung, entweder mit Hilfe von Desulfonierungspuffern während der Aufreinigung oder während einer verlängerten initialen Denaturierung der qPCR, durchgeführt. In Anlehnung an [150, 152].	12
7	Überblick der <i>SEPT9</i> Sequenz und HeavyMethyl (HM) qPCR Komponenten. CpG Dinukleotide sind in blau dargestellt. Ein kleines t (gelb) stellt ein durch die Bisulfitkonvertierung konvertiertes Cytosin dar. Die schwarzen Pfeile stellen sowohl den <i>reverse</i> als auch den <i>forward</i> Primer dar, welche in Regionen ohne CG Dinukleotide binden und somit methylierungsunabhängig sind. Der <i>reverse</i> Primer fügt eine abasische Stelle ein, welche als X dargestellt ist. In rot ist der Blocker mit seinem C3 <i>Spacer</i> am 3' Ende dargestellt, welcher eine Elongation des Blockers verhindert. Die Bindestellen der Primer sowie des Blockers überlappen sich. Die <i>SEPT9</i> Hydrolysesonde mit FAM als Fluorophor und BHQ1 als Quencher ist in schwarz dargestellt. In Anlehnung an [130, 177].	15
8	Der <i>Vivalytic</i> Analyzer als Prozessiereinheit für die mikrofluidischen <i>Vivalytic</i> Kartuschen. (A) Innenansicht der wichtigsten Komponenten des <i>Vivalytic</i> Analyzers. (B) Außenansicht des <i>Vivalytic</i> Analyzers. In Anlehnung an [170].	18
9	Darstellung des Aufbaus der <i>Vivalytic</i> Kartusche (links) und Vergleich des Kartuschentyp 1 und 2 (rechts). Kompartimente mit der selben Bezeichnung, übernehmen in beiden Kartuschentypen die selben Aufgaben. In Anlehnung an [170].	19
10	Darstellung des Prinzips der definierten Beförderung von Flüssigkeiten in der <i>Vivalytic</i> Kartusche mittels pneumatikgesteuerter Ventile. In Anlehnung an [188, 189].	20
11	Fluidischer Ablauf der Silicamatrix-basierten Aufreinigung mit alkoholischem Waschpuffer im <i>Vivalytic</i> Kartuschentyp 1. (A) Spülen der Pumpkammer mit Bindepuffer (Diagenode). (B) Konditionieren der Silicamatrix mit BP. (C) Bindepuffer-Bisulfit-Mischung über Silicamatrix pumpen. (D) Spülschritt mit einem alkoholhaltigen Waschpuffer (Diagenode). (E, F) Puffereste mit Luft aus Filter und rechtem PCR Strang entfernen. (G) Weitere Luft über Filter pumpen. (H - O) System mit Elutionspuffer spülen. (I) Optional Elutionspuffer über Silicamatrix pumpen. (P, Q) Temperieren der Heizer und Elution der aufgereinigten bisDNA von der Silicamatrix durch fünf maliges Zirkulieren des EB über den Filter.	33

12	Fluidischer Ablauf der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR im Vivalytk Kartuschen- typ 1. (A) Spülen der Pumpkammer mit Elutionspuffer. (B, C) Spülen des linken PCR Strangs. (D, E) Spülen des linken und rechten PCR Strangs. (F) Spülen des linken PCR Strangs sowie des unteren fluidischen Pfades. (G, I) Spülen des linken PCR Strangs mit Probe (bisDNA in Elutions- puffer). (J) Lösen der qPCR Reagenzien und Oligonukleotide mit Hilfe ei- nes peristaltischen Pumpschritts. (K) Verwerfen der restlichen Probe. (L) Temperierung der PCR Kammern auf die benötigten Temperaturen und Beförderung des qPCR Ansatz in die obere PCR Kammer (PCR21) zur Durchführung der initialen Denaturierung. Im Anschluss erfolgt die qP- CR durch hin- und herbewegen des qPCR Ansatzes in den unterschiedlich temperierten PCR Kammern.	37
13	Benutzeroberfläche der von Bosch entwickelten Fluculator Software. Mit Hilfe dieser Software ist die visuelle Generierung von fluidischen Abläufen möglich. Das generierte Programm wird als Exceldatei ausgegeben, wel- che in das zur Prozessierung benötigte Programm VPhotoStar (Abb. 14) importiert werden kann. In Anlehnung an [177].	38
14	Benutzeroberfläche der Bosch eigenen VPhotoStar Software. Mit dieser Software, können die fluidischen Abläufe und automatischen Bildaufnah- men sowie deren Auswertung, durchgeführt werden. In Anlehnung an [177].	40
15	Normierung und exponentielle Glättung von Amplifikationskurven. Es wur- den vier Kartuschen mit je 1,25 ng/ μ l bisDNA (gescherte HCT116 DNA) prozessiert. Jede Amplifikationskurve entspricht einer prozessierten Kartu- sche. Die Rohdaten wurden in Excel ausgewertet und die Amplifikations- kurven generiert. (A) Amplifikationskurven der Rohdaten. (B) Amplifika- tionskurven nach Normierung. (C) Amplifikationskurven nach Normierung und exponentieller Glättung mit einem Glättungsfaktor von $\alpha = 0,5$. In Anlehnung an [177].	41
16	Thermokartusche mit Thermoelementen in den PCR Kammern. Mit Hil- fe dieser Thermoelemente lässt sich die dort vorherrschende Temperatur überprüfen. (1) Denaturierungskammer, (2) Annealingkammer, (3) Elon- gationskammer.	41
17	Übersicht des automatisierten, mikrofluidischen Ablaufs für die Detektion von DNA-Methylierungsmarker in der <i>Vivalytic</i> Kartusche. (A) Definiertes mikrofluidisches Zusammenführen und Mischen der DNA-Probe mit den Bisulfitreagenzien. (B) Bisulfitkonvertierung unmethylierter Cytosine in der temperierbaren Reaktionskammer. (C) Aufreinigung der konvertier- ten Probe über ein alkoholfreies, polymerbasiertes Aufreinigungsprotokoll mit Hilfe von magnetischen Partikeln in der Reaktionskammer. (D) Peris- taltisches Lösen der eingetrockneten Oligonukleotide sowie des lyophilisier- ten Mastermix mit dem aufgereinigten Eluat. (E) Desulfonierung der Probe während der initialen Denaturierungsphase (10 min). (F) Amplifikation des <i>SEPT9</i> Methylierungsmarkers mit Hilfe einer HM-qPCR.	43

- 18 Temperatur-Zeitverlauf der Bisulfitkonvertierung in der Reaktionskammer. In der Reaktionskammer werden die benötigten 80 °C erreicht und aufrechterhalten. $T = 105$ °C (Heizer Reaktionskammer, rot), $T = 60$ °C (Heizer PCR Kammer, gelb). Die Temperatur wurde mit Hilfe eines in der Kammer verbauten Temperaturfühlers gemessen. Die Messung wurde in einem offenen Versuchsanalyser durchgeführt. 45
- 19 Temperaturgradient der Bisulfitkonvertierung mit dem Kit der Firma Epigenomics. $T_{\text{Stand}} = 80$ °C, $T_{1\text{Gradient}} = 75$ °C, $T_{2\text{Gradient}} = 70$ °C, $T_{3\text{Gradient}} = 65$ °C. Es wurden je 300 ng gescherte HCT116 DNA eingesetzt. 2 µl bisDNA wurde in jeder *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR eingesetzt. Die NTC (*no template control*) und BK (Bisulfitkontrolle) zeigen keine Amplifikation. 46
- 20 Temperatur-Zeitverlauf in der Reaktionskammer während der Bisulfitkonvertierung im *Vivalytic* Analyser sowie an einem offenen Versuchsanalyser. Bei einer Einstellung des Heizers der Reaktionskammer auf 105 °C sowie einer Einstellung der Heizer der benachbarten PCR Kammer auf 80 °C wird eine maximale Temperatur $T_{1\text{ist}}$ von 83 °C erreicht. Die im Anschluss benötigten 54 °C werden in beiden Fällen erreicht. T_1 : Standardtemperatur der Denaturierungsphase; T_2 : Standardtemperatur der Konvertierungsphase. Die Temperatur wurde mit Hilfe eines in der Reaktionskammer verbauten Temperaturfühlers gemessen. 47
- 21 Temperaturgradient der Bisulfitkonvertierung mit dem Kit der Firma Epigenomics. $T_{\text{Stand}} = 98$ °C, $T_{1\text{Gradient}} = 85$ °C, $T_{2\text{Gradient}} = 80$ °C, $T_{3\text{Gradient}} = 75$ °C. Es wurden je 300 ng gescherte HCT116 DNA eingesetzt. 2 µl bisDNA wurde in jeder *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR eingesetzt. Die NTC und BK zeigen keine Amplifikation. 48
- 22 Feinjustierung der Mikrofluidik für die Durchführung der Bisulfitkonvertierung in der *Vivalytic* Kartusche. Das BiS Reagenz wird in R22 vorgelagert (350 µl) und die zu konvertierende DNA-Probe (40 µl) wird in die Probenkammer (PK) pipettiert. 260 µl des Bisulfitreagenz werden mit 17 Pumphüben in die Probenkammer gepumpt und dort durch 30 maliges Öffnen und Schließen der Pumpkammer, mit der DNA-Probe gemischt. Im Anschluss wird die Reaktionskammer durch 8 Pumphübe mit dem Reaktionsansatz gefüllt. 49
- 23 Etablierung von bisulfitunabhängigen PCR Reaktionen genomischer *Repeat* Bereiche für die Qualitätskontrolle der Bisulfitkonvertierung mittels NGS Amplikonsequenzierung. Es wurden zwei PCR Reaktionen für *LTR5* Bereich (*LTR5* Amplikon1 und *LTR5* Amplikon2) etabliert. Die Primer tragen bereits Sequenzieradapter von insgesamt 63 bp Länge. 50
- 24 Vergleich der Konvertierungseffizienzen der *off-Chip* und *on-Chip* Methode. Es wurde ein zweiseitiger t-Test vom Typ 2 in Excel mit den Werten aller Cytosine der beiden *LTR5* Amplikons durchgeführt. Der Unterschied in der Konvertierungseffizienz zwischen *off-Chip* (99,2 % ± 0,6 %) und *on-Chip* (97,3 % ± 1,4 %) ist nach dem t-Test ($p=0,006$) signifikant. 51

25	Vergleich der CpG Methylierung nach der Bisulfitkonvertierung mit der <i>off-Chip</i> und <i>on-Chip</i> Methode. Für die Bisulfitkonvertierung wurden ca. 243 ng MDNA verwendet. Die Methylierungswerte der einzelnen CpG Stellen des <i>LTR5</i> Amplikon 2 wurden nach der Konvertierung mit der <i>off-Chip</i> und <i>on-Chip</i> Methode verglichen, um eine ungewollte Konvertierung von methylierten Cytosinen durch die etablierte Methode zu demonstrieren. n: Anzahl der durchgeführten <i>off-Chip</i> bzw. <i>on-Chip</i> Konvertierungen.	52
26	Identifizierung geeigneter LoC-kompatibler Silikamatrices für die Aufreinigung von bisDNA. Es wurden die Konvertierungs- und Aufreinigungsreagenzien des Diagenode Premium Bisulfite Kits (schwarz) sowie des Zymo EZ Methylation Lightning Kits (grau) verwendet. Neben den Filtersäulchen aus den beiden Kits, wurden noch die Filtersäulchen von rBiopharm sowie von Analytic Jena verwendet. Darüber hinaus wurden die Filter F und Filter B, welche als Rohmaterial beziehbar sind, ausgestanzt (3,4 mm Durchmesser) und mit je drei Lagen in Macherey-Nagel Filtersäulchen verbaut. Die Filtersäulchen von rBiopharm und Analytic Jena wurden lediglich mit den Reagenzien von Diagenode getestet, da sich die Filter nicht ohne Beschädigung aus den Filtersäulchen, ausbauen lassen. Grüne Rahmen heben die Filtermaterialien hervor, welche für <i>on-Chip</i> Versuche in die <i>Vivalytic</i> Kartusche integriert wurden. In Anlehnung an [11].	54
27	<i>Off-Chip</i> Aufreinigung von bisDNA mittels unterschiedlicher Lagen an Silikamatrices. Die ausgestanzten Filterscheibchen des Filter F mit 3,4 mm Durchmesser, wurden als einfache, zweifache und dreifache Lage im Macherey Nagel Konus verbaut. Für die Bisulfitkonvertierung mittels Premium Bisulfite Kit (Diagenode) wurden 500 ng an gescherter HCT116 DNA eingesetzt. Die konvertierte DNA wurde mit den Reagenzien des Premium Bisulfite Kits (Diagenode) konvertiert. In Anlehnung an [11].	55
28	Integration von Silikamatrices in die <i>Vivalytic</i> Kartusche. (A) Anpassung der Filtersäulchen (Diagenode) mit Hilfe einer Mikrofräse. (B) Überführung des Filters (Diagenode) in einen passgenauen 3D gedruckten Kunststoffring. Außerdem wurden gestanzte Filterscheibchen des Filter F mit verschiedenen Durchmessern in Filterkammern mit unterschiedlichem Durchmesser integriert. Die Höhe der Filterkammer betrug in allen Fällen 1,4 mm. Es wurden 700 ng an gescherter HCT116 DNA <i>off-Chip</i> mit dem Diagenode Kit konvertiert und in der Kartusche aufgereinigt. Der grüne Rahmen markiert den Ansatz, der die größte Ausbeute lieferte und mit welchem in den Folgeversuchen weitergearbeitet wurde. In Anlehnung an [11].	57
29	<i>On-Chip</i> Aufreinigung verschiedener DNA Mengen in der <i>Vivalytic</i> Kartusche. Es wurden 500 ng, 50 ng, 5 ng und 0,5 ng in Triplikaten (n = 3) mit dem etablierten Aufreinigungsverfahren mit verbautem Filter F aufgereinigt [192]. Die Quantifizierung der aufgereinigten bisDNA erfolgt mit dem CFF Assay nach [130]	58

- 30 Kompatibilitätsuntersuchungen der Standard *off-Chip* Aufreinigungsmethode mit der etablierten LoC-kompatiblen *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR Methode. Es wurden konstant 2 ng an gescherter HCT116 DNA in der Bisulfitkonvertierung eingesetzt und von 2 μ l, 4 μ l, 8 μ l, 12 μ l, 16 μ l sowie 20 μ l Eluat in der qPCR eingesetzt. Links sind die gemittelten Kurven der *SEPT9* Amplifikation und rechts der *ACTB* Amplifikation abgebildet (n = 3). Des Weiteren wird die Anzahl der erfolgreich Amplifikationen sowie der gemittelte Ct-Wert mit Standardabweichung angegeben. Die qPCR wurde mit dem lyophilisierten Mastermix von Jena Bioscience durchgeführt und die Oligonukleotide auf der qPCR Platte vorgetrocknet. In Anlehnung an [177]. 60
- 31 Aufreinigung von bisDNA mit Hilfe von silikabeschichteten magnetischen Partikeln. Epi_Std *off-Chip*: Epigenomics Standardprotokoll mit alkoholhaltigen Puffern (schwarzer Balken). Epi *off-Chip*: Epigenomics Bisulfitkonvertierung, Aufreinigung mit alkoholfreien Puffern (dunkelgrauer Balken). Diag *off-Chip*: Diagenode Bisulfitkonvertierung, *off-Chip* Aufreinigung mit alkoholfreien Puffern (hellgrauer Balken). Diag *on-Chip*: Diagenode Konvertierung, *on-Chip* Aufreinigung mit alkoholfreien Puffern (weißer Balken). Die Tabelle zeigt das verwendete Bisulfit Kit (BiS), das Vorhandensein von EtOH, die Bindevolumina (V_{Bind}), Bindezeiten (t_{Bind}), Trocknungszeiten (t_{trocknen}) und Elutionszeiten (t_{Elution}). Es wurden 1000 ng gescherte HCT116 DNA je Bisulfitkonvertierungsreaktion eingesetzt. 62
- 32 Mikrofluidischer Ablauf des Bindschritts. (A) 3 Pumphübe (PHs) BP (Diagenode) aus R31 in PK werfen (nicht gezeigt). BP zu magnetischen Partikeln (30 μ l) in MK (10 PHs). (B) Bisulfitansatz von der Reaktionskammer (RK) in die MK (12 PHs). (C, D) Frischer BP in RK pumpen, dann in die MK (3 x wiederholen). (E) Magnetische Partikel, BP und Bisulfitansatz im Kreis zirkulieren (50 PHs), anschließend 2 min Inkubation (MK). 64
- 33 Mikrofluidischer Ablauf des Waschschriffs. (A) Abscheiden der magnetischen Partikel mit Hilfe eines externen Magneten in der Reaktionskammer (50 Phs, 0,3 Hz). (B) Spülen des Pellets an magnetischen Partikeln mit einem polymerhaltigen Waschpuffer (20 PHs, 0,5 Hz). (C - F) Entleerung der Reaktionskammer durch Befüllen und Ausdrücken der nebenliegenden Pumpkammer (2-4 Mal). (G - I) Restliche Entleerung der Reaktionskammer mit Hilfe eines peristaltischen Pumpschritts (Reihenfolge der benötigten Ventile ist durchnummeriert). (J) Wiederholung der vorherigen Schritte mit ddH₂O zur Entfernung von Polymerrückstände des Waschpuffers. 65

34	Mikrofluidischer Ablauf des Elutionsschritts. (A) Befüllung der Mischkammer mit vier PHs an Elutionspuffer und Anlegung von 60 °C an den Heizern der Reaktionskammer. (B) Resuspendierung der magentischen Partikel durch zirkuläres Pumpen im Kreis mit 80 PHs. (C) Erneutes Abscheiden der magnetischen Partikel durch zirkuläres Pumpen im Kreis mit 30 PHs. (D) Maximale Gewinnung des Eluats durch Entleerung des mikrofluidischen Kanals sowie der Ventile und der Pumpkammer mittels peristaltischem Pumpen. Die Reihenfolge der verwendeten Ventile ist durch Zahlen markiert. (E) Die Kammer mit dem lyophilisierten Mastermix sowie den vorgetrockneten Oligonukleotiden wird mit 25 peristaltischen Pumpzyklen an Eluat befüllt. Die Reihenfolge der verwendeten Ventile ist durchnummeriert.	66
35	Funktionalitätsuntersuchung flüssiger sowie lyophilisierter qPCR Mastermixe im Zusammenhang mit der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR. Es wurden stets 2 ng bisDNA (5 µl) pro qPCR Reaktion eingesetzt. Untersuchte Flüssigmastermixe: HOTFirePol® Multiplex, HOTFirePol® Probe Universal, SolisFast® SolisGreen®. Untersuchte lyophilisierte Mastermixe: Illustra™, Cirrus™, STAT-NAT® (Sentinel Diagnostics), ProbesMaster <i>Beads</i> (Jena Bioscience), Evik MM (Evik Diagnostics). Grüner Rahmen: für die Charakterisierung der <i>SEPT9/ACTB</i> und den LoC-Transfer verwendete Mastermixe. Grüner Haken: erfolgreiche Durchführung; Oranger Haken: erfolgreiche Durchführung abhängig von Charge; rotes Kreuz: keine erfolgreiche Durchführung. In Anlehnung an [189].	68
36	Standardmäßig durchgeführte <i>off-Chip</i> Bisulfitkonvertierung und Aufreinigung. Der Desulfonierungsschritt findet auf der Silikamatrix mit Hilfe von Desulfonierungspuffern statt (Premium Bisulfite Kit). In Anlehnung an [11].	69
37	Einfluss verschiedener initialer Denaturierungszeiten auf die Desulfonierung. Die <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR wurde mit unterschiedlichen initialen Denaturierungszeiten (2 min, 10 min, 15 min) durchgeführt und die Ct-Werte mit denen der Standardmethode (Abb. 36 verglichen. Es wurden die qPCR Probes Master <i>Beads</i> (Jena Bioscience) verwendet und die qPCR Reaktionen in Triplikaten mit 2 ng bisDNA durchgeführt. Die BK sowie die NTC waren negativ. In Anlehnung an [189].	70
38	Bestimmung der Amplifizierungseffizienz von <i>SEPT9</i> und <i>ACTB</i> in der Duplexreaktion. Es wurden Standardkurven mit 5 ng, 2,5 ng, 1 ng und 0,5 ng an gescherter und konvertierter HCT116 DNA in Triplikaten generiert. E: Amplifizierungseffizienz; R ² : Bestimmtheitsmaß. In Anlehnung an [189].	71
39	Detektionswahrscheinlichkeitskurven und LOD90 für <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR. Die Kurven wurden mittels einer logistischen Regression mit Hilfe des Statistik Programm R bestimmt. Es wurden 200 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg, 12,5 pg, 6,25 pg und 0 pg bisDNA in der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR eingesetzt (n=10). In Anlehnung an [189].	72

40	Vergleich der Ct-Werte sowie der Anzahl positiver Amplifikationen für <i>SEPT9</i> und <i>ACTB</i> , mit und ohne <i>SEPT9</i> Blocker. Es wurden verschiedene Mengen gescherte HCT116 DNA mit Leukozyten DNA gemischt, so dass durch den Einsatz von 2 µl Eluat, theoretisch 1600 pg, 800 pg, 400 pg, 200 pg, 100 pg, 50 pg, 25 pg, 12,5 pg und 0 pg konvertierte HCT 116 DNA und 50 ng konvertierte Leukozyten DNA in der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR eingesetzt wurden (n=3). In Anlehnung an [177].	73
41	Funktionalitätsuntersuchung oberflächengetrockneter Oligonukleotide bei RT Lagerung mit und ohne Verwendung von Trehalose. Die Δ Ct-Werte stellen die Differenzen der auf einer qPCR Platte eingetrockneten Oligonukleotide im Vergleich zu flüssigen Oligonukleotiden dar. Es wurde der Einfluss von Trehalose (56 mM) auf die Funktionalität der eingetrockneten Oligonukleotide nach einem Tag, einer Woche, einem Monat sowie zwei Monaten Lagerzeit untersucht. Die Funktionalitätsuntersuchung erfolgte mit der etablierten <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR (n=3). In Anlehnung an [189].	74
42	Fluidische Optimierung des Lösens lyophilisierter qPCR Reagenzien. Beurteilung der Blasenbildung nach dem Lösen des Mastermix <i>Beads</i> mit unterschiedlichen peristaltischen Pumpzyklen und dessen Transfer in den PCR Strang (Kartuschentyp 1, siehe Abschnitt 1.4.2, Abb. 9) mit Hilfe von im Analyzer aufgenommenen Hellfeldbildern in der Annealingkammer (PCR 23). Die Aufnahme erfolgte in zwei verschiedenen Analyzern. In Anlehnung an [177].	75
43	Untersuchung von Oligonukleotidinteraktionen bei der <i>on-Chip SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR. Dargestellt sind die Ergebnisse des Elektropherogramms der Fragmentanalyse mittels FA (links) sowie der Gelbilder der Kapillargel-elektrophorese mittels FA (rechts). Als Templat wurden 10 ng gescherte und bisulfitkonvertierte HCT116 DNA verwendet (<i>on-Chip</i>). Als Stabilisator wurden 0,2 % Tween80 zugegeben. Es wurden stets alle Oligonukleotide für die Detektion von <i>ACTB</i> (Primer und Sonde) verwendet und lediglich die Zusammensetzung der <i>SEPT9</i> Oligonuklotide variiert. 1) <i>SEPT9</i> Primer, 2) <i>SEPT9</i> Primer und Blocker, 3) <i>SEPT9</i> Primer und Sonde, 4) <i>SEPT9</i> Primer, Sonde und Blocker. Der Peak für <i>SEPT9</i> wird bei 65 bp und der von <i>ACTB</i> bei 130 bp erwartet. In Anlehnung an [177].	76
44	Temperatur-Zeit-Verläufe der mittels Thermomessungen verifizierten Thermoprogramme (TP). (A) Beispielhafte Darstellung der Temperatur-Zeit-Verläufe während der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase für die PCR Kammern PCR21 (blau), PCR22 (gelb) und PCR23 (grün). (B) Temperatur-Zeit-Verläufe der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphase (TP1 - TP8) für die PCR Kammer PCR23. (C) Temperatur-Zeit-Kurven (TP1 - TP8) während der Annealingphase in der PCR Kammer PCR23. In Anlehnung an [177].	79

45	Aus den Thermomessungen ermittelte Kühlraten und Haltezeiten der verschiedenen Thermoprogramme. (A) Kühlraten welche bis zum Erreichen von 60 °C (blau) sowie bis zum Erreichen von 56 °C (grau) vorliegen. (B) Haltezeiten für den Temperaturbereich von 60 °C bis 56 °C (hellblau) sowie Temperaturen unter 56 °C (hellgrau). Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus den Messwerten der zehn analysierten Zyklen gebildet. In Anlehnung an [177].	80
46	Verifizierung der Thermoprogramme mit der <i>on-Chip SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR. Es wurden jeweils zwei Kartuschen mit dem Thermoprogramm TP2, TP4, TP7 und TP8 durchgeführt. Es wurde gescherte und bisulfitkonvertierte HCT116 DNA mit einer theoretischen Menge von jeweils 100 ng <i>on-Chip</i> in der qPCR eingesetzt. In Anlehnung an [177].	81
47	Untersuchung des Effekts von Stabilisatoren auf die <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR. Es wurde gescherte HCT116 DNA so angesetzt und konvertiert, dass eine theoretische Menge bisDNA von jeweils je 100 ng <i>on-Chip</i> in der qPCR eingesetzt wurde (n=2). Der Stabilisator Tween80 wurde mit Konzentrationen von 0,1 %, 0,2 % sowie 0,4 % und der Stabilisator PEG6000 mit Konzentrationen von 0,5 %, 1 % und 2 % eingesetzt. Als Kontrolle wurden Kartuschen ohne Stabilisator prozessiert. In Anlehnung an [177].	82
48	Bestimmung des analytischen Detektionslimit. (A) Balkendiagramme mit gemitteltel Ct-Werten sowie der Anzahl erfolgreich amplifizierter Replikate für <i>SEPT9</i> (blau) und <i>ACTB</i> (grau), n=3. (B) Gemittelte Amplifikationskurven mit Anzahl erfolgreich amplifizierter Replikate für <i>SEPT9</i> . (C) Analog für <i>ACTB</i> . Für die <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR wurden 200 ng, 100 ng, 50 ng, 12,5 ng, 6,25 ng und 3,125 ng an bisDNA eingesetzt. In Anlehnung an [177].	83
49	<i>Off-Chip SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR Analyse der <i>on-Chip</i> konvertierten und aufgereinigten bisDNA. In der Standardreaktionskammer des Kartuschentyp 2 (90 µl) wurden 263 ng gescherte HCT116 DNA Bisulfit-konvertiert und im Anschluss mit Hilfe silikabeschichteter magnetischer Partikel aufgereinigt (n=2). Für die <i>off-Chip SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR wurden die Evik MM <i>Beads</i> (Evik Diagnostics) verwendet (n=3).	84
50	Gesamtablauf der DNA-Methylierungsanalyse. (A) Kartuschenbelegung der für den Gesamtablauf benötigten Reagenzien. (B) Fragment Analyse des <i>on-Chip</i> amplifizierten DNA-Methylierungsmarker <i>SEPT9</i> . Es wurden 444 ng gescherte HCT116 DNA in der <i>on-Chip</i> Bisulfitkonvertierung eingesetzt. Die generierte bisDNA wurde <i>on-Chip</i> mit Hilfe von magnetischen Partikeln aufgereinigt. Der Gesamtablauf erfolgte in einer <i>Vivalytic</i> Kartusche (n=2).	85
51	Bestimmung der Konvertierungseffizienz mittels NGS Amplikonsequenzierung des <i>HSPA5up</i> Amplikons. Die durchschnittliche Konvertierungseffizienz aller 65 Cytosine lag bei 99,22 % ± 0,53 %. Für die <i>on-Chip</i> Konvertierungsreaktion wurden 750 ng an Leukozyten gDNA eingesetzt und <i>off-Chip</i> aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.6). Aufgrund des aufwendigen Prototypenbaus wurde dieses <i>proof-of-principle</i> mit nur einer Kartusche (n = 1) durchgeführt.	144

52	Bestimmung der Konvertierungseffizienz mittels NGS Amplikonsequenzierung des <i>MLH1up</i> Amplikons. Die durchschnittliche Konvertierungseffizienz aller 70 Cytosine des <i>MLH1up</i> Amplikons von $99,17\% \pm 0,61\%$. Für die <i>on-Chip</i> Konvertierungsreaktion wurden 750 ng an Leukozyten gDNA eingesetzt und <i>off-Chip</i> aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.6). Aufgrund des aufwendigen Prototypenbaus wurde dieses <i>proof-of-principle</i> mit nur einer Kartusche ($n = 1$) durchgeführt.	145
53	DNA Ausbeuten bei unterschiedlichen Mengen eingesetzter gescherter HCT116 DNA. Es wurden 1000 ng, 500 ng und 300 ng mit Hilfe des Diagenode Premium Bisulfite Kit (Diagenode) konvertiert und aufgereinigt.	145
54	Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur für die <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR mittels qPCR ProbesMaster <i>Beads</i> . Untersucht wurden Annealingtemperaturen von 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C und 60 °C unter Einsatz von 2 ng desulfonierter bisulfitbehandelter MDNA in Triplikaten sowie die NTC. Eine Annealingtemperatur von 56 °C (roter Kasten) wurde für weitere Experimente gewählt. In Anlehnung an [189].	146
55	Amplifikationskurven der <i>on-Chip SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR zur Ermittlung des analytischen Detektionslimit. Dargestellt sind die gemittelten Amplifikationskurven von <i>SEPT9</i> (links) und <i>ACTB</i> (rechts). Es wurde gescherterte und bisulfitkonvertierte HCT116 DNA in der qPCR eingesetzt ($n = 3$). 200 ng (blau), 100 ng (gelb), 50 ng (grün), 25 ng (rot), 12,5 ng (rosa), 6,25 ng (hellblau), 3,125 ng (grau) und 0 ng als NTC (hellgrau). In Anlehnung an [177].	147
56	Simulationen verschiedener <i>Undershoot</i> Einstellungen. Dargestellt sind die in Tabelle 13 beschriebenen Simulationen 1-10. Die Diagramme zeigen die Temperatur [°C] aufgetragen gegen die Zeit [s]. Es werden die simulierten Temperaturen der Thermoelemente für die PCR21 Kammer (blau), PCR22 Kammer (gelb) und PCR23 Kammer (grün) dargestellt. Der simulierte Temperaturverlauf des Fluides ist in Rot dargestellt. In Anlehnung an [177]	148

7 Tabellenverzeichnis

1	Verwendete Kits mit Herstellerangabe sowie REF- oder LOT-Nummer . . .	22
2	Verwendete Reagenzien mit Herstellerangabe sowie REF- oder LOT-Nummer	23
3	Verwendete Geräte mit Modell- und Herstellerangabe sowie REF- oder LOT-Nummer	24
4	Verwendete Software- und Computerprogramme mit Hersteller- und Verwendungsangabe.	26
5	Verwendete Einwegmaterialien mit Herstellerangabe.	27
6	Verwendetes Probenmaterial mit Bezeichnung und Herstellerangabe. . . .	28
7	Verwendete selbstangesezte Puffer für die Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA	28
8	Ansatzschema (1 x) für die LTR5 Amplikon 1 und Amplikon 2 singleplex PCR.	30
9	Temperaturprofil der LTR5 Amplikon 1 und Amplikon 2 singleplex PCR. .	30
10	Oligonukleotidsequenzen für die LTR5 Amplikon 1 und Amplikon 2 singleplex PCR. Die Sequenzbereiche der Sequenzieradaptoren sind <i>kursiv</i> abgebildet. F: <i>forward</i> ; R: <i>reverse</i>	30
11	Übersicht Versuchsdurchführung zur Verifizierung der LoC-Kompatibilität der silikamatrixbasierten Aufreinigung von bisDNA. In Anlehnung an [177].	31
12	Alkohlfreie Aufreinigung bisulfitkonvertierter DNA (Diagenode) mit Hilfe von silikabeschichteten magnetischen Partikeln in der <i>Vivalytic</i> Kartusche. Siehe Ergebnisteil Abbildung 31 - 34.	34
13	Reaktionsansatz für die <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR mit lyophilisierten Mastermix (Jena Bioscience). Bei lyophilisierten Mastermixen mit 25 µl Reaktionsvolumen (Evik Diagnostics) wurden entsprechend 1,5 µl je Oligonukleotid eingesetzt. Die Eluatmenge kann durch Reduzierung der Menge des ddH ₂ O sowie durch Eintrocknen von Oligonukleotiden erhöht werden. Die singleplex-qPCR wurde entsprechend nur mit den <i>ACTB</i> oder den <i>SEPT9</i> Oligonukleotiden durchgeführt.	35
14	Thermoprogramm der <i>off-Chip SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR mit lyophilisierten Mastermixen (Jena Bioscience und Evik Diagnostics)	35
15	Beschreibung der einzelnen Funktionen zur Etablierung von fluidischen Abläufen. In Anlehnung an [177].	39
16	Erfolgreich amplifizierte qPCR Reaktionen für <i>SEPT9</i> und <i>ACTB</i> . Die qPCR wurde als Duplexreaktion mit 100 pg, 50 pg, 25 pg, 12,5 pg, 6,25 pg, 3,125 pg und 0 pg an bisDNA durchgeführt. Es wurden jeweils 10 Replikate durchgeführt. In Anlehnung an [177].	71
17	Temperatureinstellungen für die Simulation der ersten Phase des Annealingschritts. In Anlehnung an [177].	77

18	Optimierung der <i>SEPT9/ACTB</i> -HM-qPCR durch Anpassung der Temperatureinstellungen der Annealingphase auf Basis der ermittelten Simulationsergebnisse. Als Zieltemperatur wird die Temperatur bezeichnet, welche vor und nach der Annealingphase angelegt wird. Zusätzlich sind die Temperaturen des <i>undershoot</i> sowie die Dauer der <i>undershoot</i> Phase (Haltezeit <i>undershoot</i>) angegeben (TP: Thermogramm). In Anlehnung an [177].	78
19	Parameter für die Annealingphase der Thermoprogramme TP 1- TP 8. Die Thermoprogramme wurden in Thermomessungen mit Hilfe von Thermokartuschen evaluiert. Es wurden jeweils 10 qPCR Zyklen gemessen und der Mittelwert daraus gebildet. Angegeben sind die Temperatur zu Beginn und zum Ende der Annealingphase sowie die Dauer zum Erreichen der 60 °C und 56 °C. In Anlehnung an [177].	147
20	<i>Coverage</i> und Methylierung der 65 Cytosine sowie der 8 Cytosine in CpG Position für das HSPA5up Amplikon.	149
21	<i>Coverage</i> und Methylierung der 70 Cytosine sowie des einem Cytosins in CpG Position für das MLH1up Amplikon.	150
22	<i>Coverage</i> der Cytosine C1 - C29 für das LTR5 Amplikon 1.	151
23	Methylierung der Cytosine C1 - C29 für das LTR5 Amplikon 1.	152
24	<i>Coverage</i> der Cytosine C1 - C39 für das LTR5 Amplikon 2.	153
25	Methylierung der Cytosine C1 - C39 für das LTR5 Amplikon 2.	154

8 Anhang

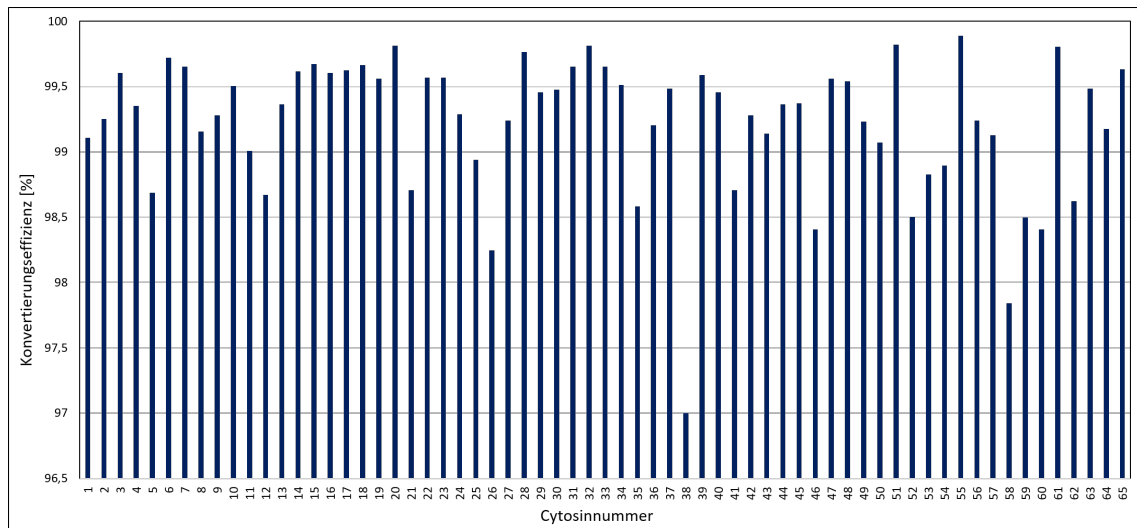


Abbildung 51: Bestimmung der Konvertierungseffizienz mittels NGS Amplikonsequenzierung des *HSPA5up* Amplikons. Die durchschnittliche Konvertierungseffizienz aller 65 Cytosine lag bei $99,22 \% \pm 0,53 \%$. Für die *on-Chip* Konvertierungsreaktion wurden 750 ng an Leukozyten gDNA eingesetzt und *off-Chip* aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.6). Aufgrund des aufwendigen Prototypenbaus wurde dieses *proof-of-principle* mit nur einer Kartusche ($n = 1$) durchgeführt.

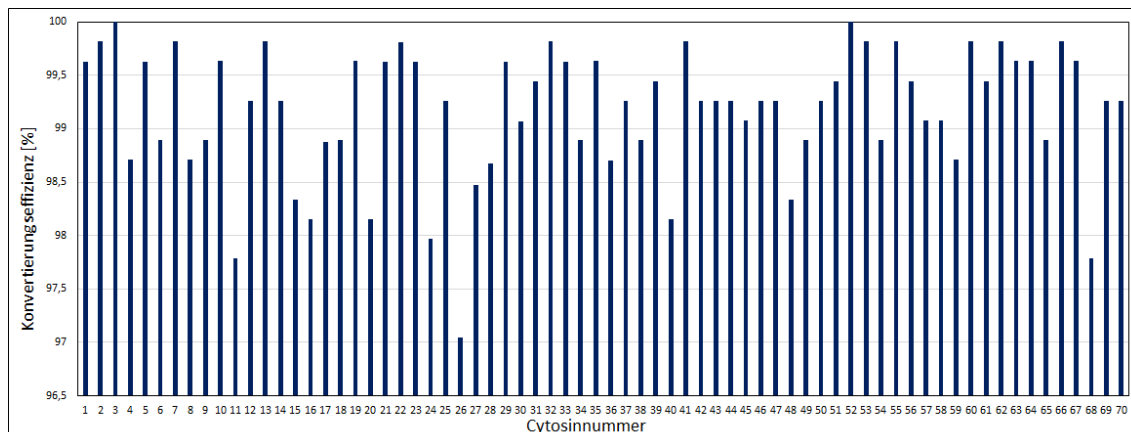


Abbildung 52: Bestimmung der Konvertierungseffizienz mittels NGS Amplikonsequenzierung des *MLH1up* Amplikons. Die durchschnittliche Konvertierungseffizienz aller 70 Cytosine des *MLH1up* Amplikons von $99,17\% \pm 0,61\%$. Für die *on-Chip* Konvertierungsreaktion wurden 750 ng an Leukozyten gDNA eingesetzt und *off-Chip* aufgereinigt (siehe Abschnitt 3.2.6). Aufgrund des aufwendigen Prototypenbaus wurde dieses *proof-of-principle* mit nur einer Kartusche ($n = 1$) durchgeführt.

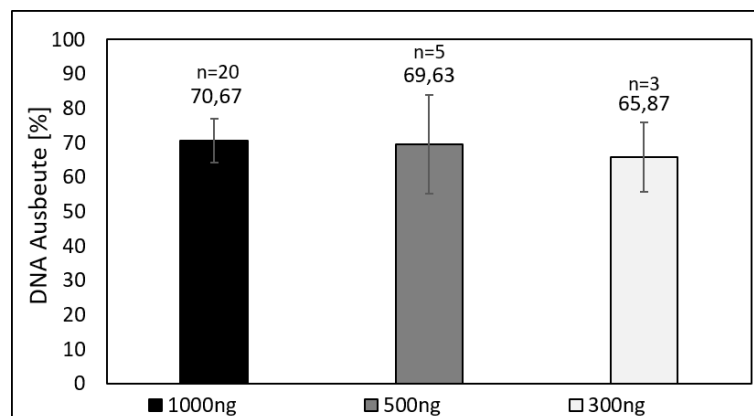


Abbildung 53: DNA Ausbeuten bei unterschiedlichen Mengen eingesetzter gescherter HCT116 DNA. Es wurden 1000 ng, 500 ng und 300 ng mit Hilfe des Diagenode Premium Bisulfite Kit (Diagenode) konvertiert und aufgereinigt.

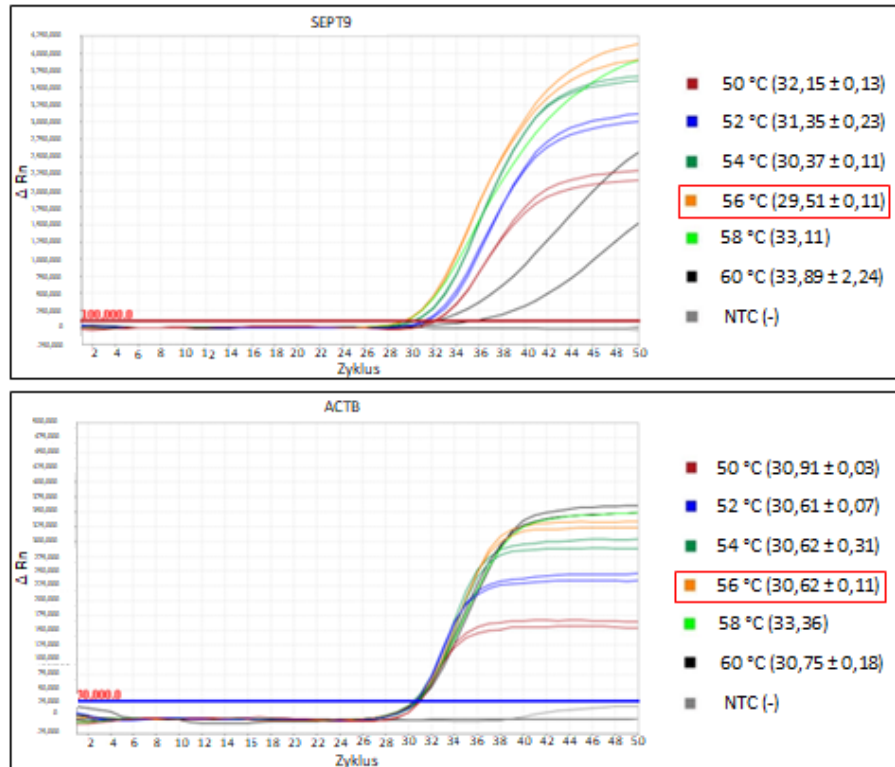


Abbildung 54: Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur für die *SEPT9/ACTB*-HM-qPCR mittels qPCR ProbesMaster *Beads*. Untersucht wurden Annealingtemperaturen von 50 °C, 52 °C, 54 °C, 56 °C, 58 °C und 60 °C unter Einsatz von 2 ng desulfonierter bisulfitbehandelter MDNA in Triplikaten sowie die NTC. Eine Annealingtemperatur von 56 °C (roter Kasten) wurde für weitere Experimente gewählt. In Anlehnung an [189].

Tabelle 19: Parameter für die Annealingphase der Thermoprogramme TP 1- TP 8. Die Thermoprogramme wurden in Thermomessungen mit Hilfe von Thermokartuschen evaluiert. Es wurden jeweils 10 qPCR Zyklen gemessen und der Mittelwert daraus gebildet. Angegeben sind die Temperatur zu Beginn und zum Ende der Annealingphase sowie die Dauer zum Erreichen der 60 °C und 56 °C. In Anlehnung an [177].

	TP1	TP2	TP3	TP4	TP5	TP6	TP7	TP8
T [°C]	64,6	62,0	58,9	66,4	68,2	64,1	65,1	63,6
Start Anneal.	± 2,8	± 0,5	± 2,0	± 1,6	± 1,6	± 2,7	± 1,2	± 0,9
[°C]	52,1	52,3	45,6	45,2	54,9	49,8	52,1	54,8
Ende Anneal.	± 0,4	± 0,2	± 2,5	± 0,1	± 0,1	± 1,5	± 0,5	± 1,1
Δt [s] bis	4,4	1,4	0,3	2,1	10,5	1,8	2,2	2,2
T_{60 °C}	± 1,5	± 0,5	± 0,9	± 0,3	± 1,0	± 0,4	± 0,6	
Δt [s] bis	11,5	6,3	1,8	4,1	26,9	4,1	4,6	5,0
T_{60 °C}	± 2	± 1,1	± 2,2	± 0,3	± 2,0	± 0,3	± 0,5	± 0,9

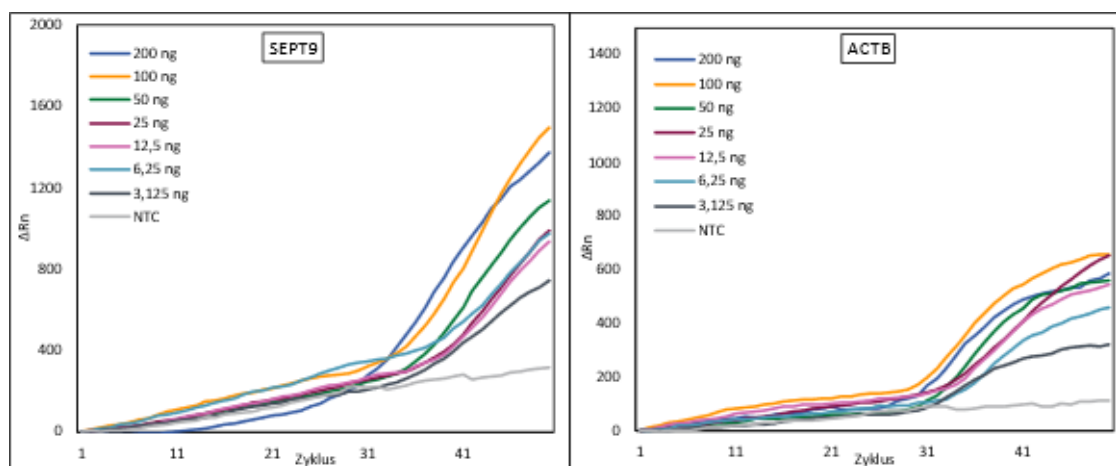


Abbildung 55: Amplifikationskurven der *on-Chip SEPT9/ACTB*-HM-qPCR zur Ermittlung des analytischen Detektionslimit. Dargestellt sind die gemittelten Amplifikationskurven von *SEPT9* (links) und *ACTB* (rechts). Es wurde gescherte und bisulfitkonvertierte HCT116 DNA in der qPCR eingesetzt ($n = 3$). 200 ng (blau), 100 ng (gelb), 50 ng (grün), 25 ng (rot), 12,5 ng (rosa), 6,25 ng (hellblau), 3,125 ng (grau) und 0 ng als NTC (hellgrau). In Anlehnung an [177].

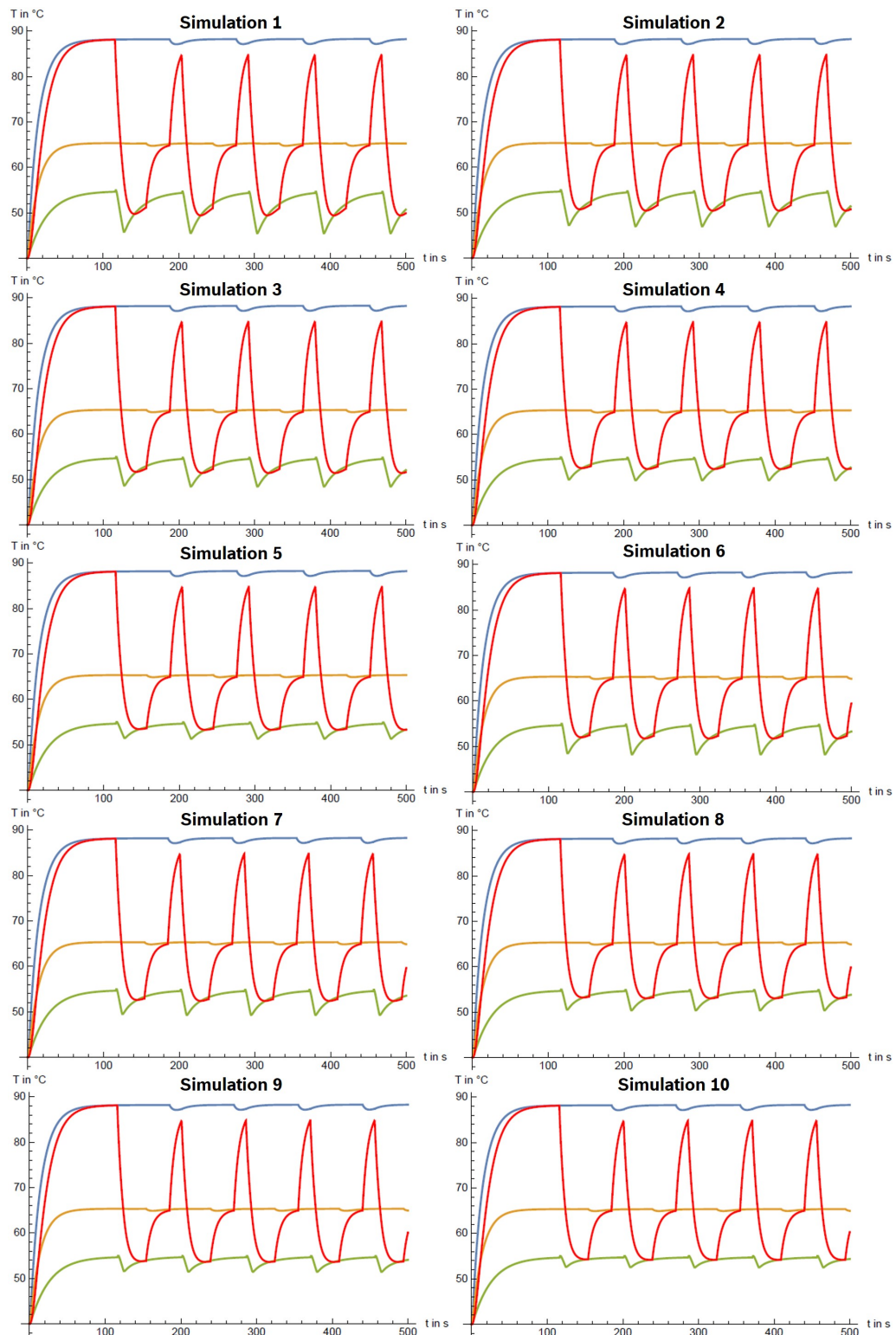


Abbildung 56: Simulationen verschiedener *Undershoot* Einstellungen. Dargestellt sind die in Tabelle 13 beschriebenen Simulationen 1-10. Die Diagramme zeigen die Temperatur [°C] aufgetragen gegen die Zeit [s]. Es werden die simulierten Temperaturen der Thermoelemente für die PCR21 Kammer (blau), PCR22 Kammer (gelb) und PCR23 Kammer (grün) dargestellt. Der simulierte Temperaturverlauf des Fluides ist in Rot dargestellt. In Anlehnung an [177]

Tabelle 20: Coverage und Methylierung der 65 Cytosine sowie der 8 Cytosine in CpG Position für das HSPA5up Amplikon.

Coverage																
def	C.1 10666	C.2 10669	CpG.3 10665	C.4 10667	CpG.5 10666	C.6 10668	C.7 10672	C.8 10662	C.9 10671	C.10 10672	C.11 10668	C.12 10674	C.13 10671	C.14 10673	C.15 9914	
Leukozyten gDNA																
def	C.16 10652	C.17 10663	C.18 10668	C.19 10668	C.20 10671	C.21 10672	C.22 10671	C.23 10670	C.24 10662	C.25 10656	C.26 10666	C.27 10664	C.28 10599	C.29 10673	C.30 10628	
Leukozyten gDNA																
def	C.31 10646	C.32 10656	C.33 10652	CpG.34 10628	C.35 10671	C.36 10670	C.37 10659	C.38 10669	C.39 10659	C.40 10671	C.41 10667	C.42 10671	C.43 10664	C.44 10660	CpG.45 10580	
Leukozyten gDNA																
def	C.46 10672	C.47 10670	C.48 10674	C.49 10670	C.50 10659	CpG.51 10598	C.52 10668	CpG.53 10506	C.54 10673	C.55 10674	C.56 10672	C.57 10672	C.58 10672	C.59 10672	C.60 10671	
Leukozyten gDNA																
def	C.61 10670	C.62 10669	CpG.63 10671	C.64 10659	C.65 10663	CpG.66 10651	C.67 10670	C.68 10669	C.69 10667	C.70 10669	C.71 10672	C.72 10658	C.73 10665			
Leukozyten gDNA																
Methylierung																
def	C.1 0,0089	C.2 0,0075	CpG.3 0,8391	C.4 0,0039	CpG.5 0,8911	C.6 0,0065	C.7 0,0131	C.8 0,0028	C.9 0,0035	C.10 0,0084	C.11 0,0072	C.12 0,0050	C.13 0,0099	C.14 0,0133	C.15 0,0064	
Leukozyten gDNA																
def	C.16 0,0038	C.17 0,0033	C.18 0,0039	C.19 0,0037	C.20 0,0034	C.21 0,0044	C.22 0,0019	C.23 0,0129	C.24 0,0043	C.25 0,0043	C.26 0,0071	C.27 0,0106	C.28 0,0175	C.29 0,0076	C.30 0,0024	
Leukozyten gDNA																
def	C.31 0,0054	C.32 0,0047	C.33 0,0035	CpG.34 0,6299	C.35 0,0019	C.36 0,0035	C.37 0,0049	C.38 0,0142	C.39 0,0080	C.40 0,0052	C.41 0,0300	C.42 0,0041	C.43 0,0054	C.44 0,0129	CpG.45 0,8095	
Leukozyten gDNA																
def	C.46 0,0072	C.47 0,0086	C.48 0,0064	C.49 0,0063	C.50 0,0159	CpG.51 0,8201	C.52 0,0044	CpG.53 0,7941	C.54 0,0046	C.55 0,0077	C.56 0,0093	C.57 0,0018	C.58 0,0150	C.59 0,0117	C.60 0,0111	
Leukozyten gDNA																
def	C.61 0,0011	C.62 0,0076	CpG.63 0,8471	C.64 0,0087	C.65 0,0216	CpG.66 0,8145	C.67 0,0150	C.68 0,0159	C.69 0,0020	C.70 0,0138	C.71 0,0052	C.72 0,0083	C.73 0,0037			
Leukozyten gDNA																

9 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Jörn Walter für die Übernahme der Rolle des Erstgutachters meiner Dissertation sowie für die konstruktiven Rücksprachen bedanken.

Mein Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sascha Tierling für die wissenschaftliche Betreuung sowie die Möglichkeit zum steten Austausch.

Dem gesamten Institut für Genetik und Epigenetik danke ich für die Hilfsbereitschaft und freundliche Aufnahme bei meinen Besuchen in Saarbrücken.

Herrn Prof. Dr. Ralf Seemann danke ich für die Übernahme der Rolle des Zweitgutachters meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Uli Müller danke ich für die Übernahme der Rolle der wissenschaftlichen Begleitperson sowie für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Ich bedanke mich bei der Firma Robert Bosch GmbH für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit am Forschungscampus in Renningen sowie die Bereitstellung aller benötigten Ressourcen.

Meinem Mentor Roger Eleutheri danke ich für die Möglichkeit über den Tellerrand hinauszuschauen und für die spannenden Einblicke in die Tätigkeiten von Bosch in Mexiko.

Meiner Kollegin Karin Lemuth möchte ich für die stetigen Rücksprachen sowie die Initiierung einer Doktorarbeit im Bereich der Epigenetik danken.

Bei meinen Betreuern Eva Weimer und Yvonne Beyl bedanke ich mich ganz herzlich für die Möglichkeit der Rücksprachen, Diskussionen sowie die Unterstützung.

Bei meinen Kollegen Christian Grumaz und Anke Detzer bedanke ich mich ebenfalls für die Unterstützung und die vielen konstruktiven Gespräche.

Bei meinen Kollegen Jochen Feichtinger, Jochen Hoffmann und Kathrin Luckert möchte ich mich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit im *Lab-on-Chip* Projekt durchführen zu dürfen sowie die Bereitstellung der Ressourcen bedanken.

Für die Unterstützung beim Aufbau der Kartuschen sowie dem Aufbau der Prototypen möchte ich mich bei Julian Kassel, Marcus Liebler und Joachim Bartel bedanken.

Für die Arbeit an der gemeinsamen Publikation sowie für die Etablierung des Thermo-modells möchte ich mich bei meinem Kollegen Aaron Dörr bedanken.

Bei Franz Lärmer bedanke ich mich für die regelmäßigen Rücksprachen und fachlichen Diskussionen sowie für die Unterstützung bei der Anmeldung unserer gemeinsamen Patente.

Bei Heidrun Heidebreck möchte ich mich für die Unterstützung bei den vielen Bosch internen Abläufen bedanken sowie für die Unterstützung bei der Anmeldung unserer Patente.

Für die schöne gemeinsame Zeit als Doktoranden, die Aktivitäten neben der Doktorarbeit sowie die vielen netten Gespräche bedanke ich mich bei meinen Kollegen Astrid Lux, Anne Hoffmann und Manuel Loskyll.

Für die vielen Abende beim Döner, die Nacht und Nebel Aktionen im Reinraum sowie für die gemeinsame Anmeldung unseres Patents möchte ich mich bei Samir Kadic bedanken.

Für die Unterstützung sowie die gute Freundschaft möchte ich mich bei Riccardo Cipolletti bedanken.

Meinen Freunden Basti und Leon sowie allen anderen aus dem Freundeskreis danke ich für die vielen schönen Momente und die Ablenkung von der Doktorarbeit sowie die stetige Unterstützung.

Meiner Familie danke ich für die Unterstützung und ihr Verständnis.