Vergleich von quantitativer und digitaler Polymerasekettenreaktion in der Diagnostik von Humanen Papillomavirus-getriebenen Oropharynxkarzinomen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Tran, Thi Thuy Nhu
aus Stuttgart

Gießen (2025)

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde,

Kopf-Hals-Tumorforschung

Betreuer: Prof. Dr. med. habil. Christoph Arens

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Pleschka

Tag der Disputation: 05.08.2026

Meiner Familie

Một điều đáng nhớ đáng quý dành cho gia đình

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Das Oropharynxkarzinom 1
1.1.1 Anatomie des Oropharynx 1
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Oropharynxkarzinoms 2
1.1.3 Diagnostik des Oropharynxkarzinoms 3
1.1.4 Klassifikation des Oropharynxkarzinoms 3
1.1.5 Therapie und Prognose 6

1.2 Die humanen Papillomaviren (HPV) 7
1.2.1 HPV-Infektion und Prävention 7
1.2.2 HPV-Pathophysiologie 8
1.2.3 HPV-induzierte Karzinogenese 9

1.3 Die Liquid Biopsy 10
1.3.1 cfDNA und ctDNA als Biomarker 10
1.3.2 Klinische Anwendungsbereiche des Nachweises von ctDNA 11
1.3.3 Einflussfaktoren auf und Methoden zum Nachweis von ctDNA 12

1.4 Die Polymerase Chain Reaction (PCR) 13
1.4.1 Die quantitative PCR (qPCR) 13
1.4.2 Die digitale PCR (dPCR) 15

1.5 Zielsetzung 17

2. Materialien und Methoden 18

2.1 Materialien 18

2.2 Herstellung eines Kontrollplasmids 21
2.2.1 Plasmid-Isolierung 22
2.2.1.1 Plasmid Mini-Präparation 22
2.2.1.2 Plasmid Midi-Präparation 23
2.2.2 Restriktion und Aufreinigung von Vektor- und Insert-DNA 23
2.2.3 Ligation von Vektor- und Insert-DNA 24
2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien und Elektrotransformation 25
2.2.5 Gelelektrophorese 25
2.2.6 Glyzerin Stocks 26
2.2.7 Herstellung von Verdünnungsreihen des Kontrollplasmids 27
2.2.8 Restriktion des Kontrollplasmids 27

2.3 Zellkultur 27
2.3.1 Kultivierung von Zelllinie UM-SCC-104 27
2.3.2 DNA-Isolierung aus kultivierten Zellen 28
2.3.3 Herstellung von Verdünnungsreihen mit DNA aus kultivierten Zellen 29

2.4 Liquid Biopsy 29
2.4.1 Bearbeitung und Lagerung von Patientenplasma 29
2.4.2 cfDNA Extraktion 29
2.4.3 Umrechnung von qPCR Kopien pro Reaktion in Kopien pro ml Plasma 30
2.4.4 Umrechnung von dPCR Kopien pro Reaktion in Kopien pro ml Plasma 30

2.5 PCR 30
2.5.1 Quantitative PCR (qPCR) 31
2.5.2 Digitale PCR (dPCR) 33

2.6 Statistische Auswertung 36
2.6.1 Lineare Regression nach Passing-Bablok 36
2.6.2 Differenzdiagramm nach Bland-Altman 37

3. Ergebnisse 38

3.1 Etablierung und analytische Evaluation des qPCR Multiplex Assays 38
3.1.1 qPCR Versuche im Monoplex 38
3.1.2 qPCR Versuche im Multiplex 39
3.1.3 Einfluss der Plasmidrestriktion auf die qPCR Quantifizierung 42
3.1.4 Dynamischer Bereich und untere Quantifizierungsgrenze der qPCR 43

3.2 Etablierung und analytische Evaluation des dPCR Multiplex Assays 44
3.2.1 dPCR Versuche im Monoplex 44
3.2.2 dPCR Versuche im Multiplex 46
3.2.3 Einfluss der Plasmidrestriktion auf die dPCR Quantifizierung 48
3.2.4 Dynamischer Bereich und untere Quantifizierungsgrenze der dPCR 50

3.3 qPCR- und dPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 52
3.3.1 qPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 52
3.3.2 dPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 53

3.4 Diagnostische Evaluation des PCR Multiplex Assays mit Liquid Biopsy Proben 54
3.4.1 Ergebnisse der qPCR-Messung von Liquid Biopsy Proben 56
3.4.1.1 qPCR Beurteilung der cfDNA-Extraktion 56
3.4.1.2 qPCR Grenzwertoptimierung für Kopien von E6 und E7 56
3.4.1.3 Virale Kopien in Plasma mittels qPCR in Abhängigkeit von Tumormerkmalen 58
3.4.1.4 Viraler DNA-Anteil der cfDNA-Extraktion mittels qPCR 60
3.4.2 Ergebnisse der dPCR-Messung von Liquid Biopsy Proben 60
3.4.2.1 dPCR Beurteilung der cfDNA-Extraktion 60
3.4.2.2 dPCR Grenzwertoptimierung für Kopien E6 und E7 60
3.4.2.3 Virale Kopien in Plasma mittels dPCR in Abhängigkeit von Tumormerkmalen 62
3.4.2.4 Viraler DNA-Anteil der cfDNA-Extraktion mittels dPCR 64

3.5 Methodenvergleich der Liquid Biopsy Messung mit qPCR und dPCR 64
3.5.1 Vergleich der diagnostischen Validität von qPCR und dPCR 64
3.5.2 Vergleich der gemessenen Kopien E6, E7 und HBB mittels qPCR und dPCR 64
3.5.3 Korrelation von qPCR und dPCR 67
3.5.4 Lineare Regression nach Passing-Bablok von qPCR und dPCR 67
3.5.5 Differenzdiagramm nach Bland-Altman von qPCR und dPCR 70
3.5.6 Zusammenfassung des Methodenvergleichs von qPCR und dPCR 72

4. Diskussion 73

4.1 Analytische Evaluation des qPCR und dPCR Multiplex Assays 73
4.1.1 Analytische Evaluation des qPCR Multiplex Assay 74
4.1.2 Analytische Evaluation des dPCR Multiplex Assay 76

4.2 qPCR- und dPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 79

4.3 Diagnostische Evaluation des PCR Multiplex Assays mit Liquid Biopsy Proben 81
4.3.1 Patienten- und Tumorcharakteristika der untersuchten Stichprobe 81
4.3.2 Diagnostische Validität von E6 und E7 als Biomarker 82

4.3.3 Virale Kopien in Plasma gemessen mit qPCR und dPCR in Abhängigkeit von Tumormerkmalen 83
4.3.4 Viraler DNA-Anteil der cfDNA-Extraktion gemessen mit qPCR und dPCR 84
4.4 Methodenvergleich der Liquid Biopsy Messung mit qPCR und dPCR 86
4.4.1 Vergleich der diagnostischen Validität von qPCR und dPCR 86
4.4.2 Analyse der Übereinstimmung von qPCR und dPCR 88
5. Zusammenfassung und Ausblick 92
6. Summary 93
7. Abbildungsverzeichnis 94
8. Tabellenverzeichnis 96
9. Formelverzeichnis 97
10. Abkürzungsverzeichnis 98
11. Literaturverzeichnis 101
12. Anhang 116
12.1 Basensequenz des synthetischen DNA-Strangs (Insert) 116
12.2 Passing-Bablok Regression 117
12.3 Bland-Altman Analyse 118
13. Ehrenwörtliche Erklärung 119
14. Danksagung 120

1. Einleitung

1.1 Das Oropharynxkarzinom

Unter den Kopf-Hals-Tumoren (KHT) wird eine heterogene Gruppe von Karzinomen zusammengefasst, die sich hinsichtlich der anatomischen Lokalisation, den Risikofaktoren sowie den klinischen Charakteristika unterscheiden. Die Subgruppe der Oropharynxkarzinome (*oropharyngeal squamous cell carcinoma*, OPSCC) wird in dieser Arbeit behandelt und im Folgenden genauer erläutert.

1.1.1 Anatomie des Oropharynx

Der Rachen (Pharynx) wird als fibro-muskulärer Schlauch anhand seiner ventralen Öffnungen in drei Etagen unterteilt. Der Oropharynx (auch Mesopharynx) bildet den mittleren Abschnitt und schließt sich an die Mundhöhle an. Kranial und kaudal davon befinden sich jeweils der Nasopharynx (Epipharynx) und der Laryngopharynx (Hypopharynx). Die anatomische Abgrenzung erfolgt nach kranial durch das Velum palatinum mit der Uvula und nach kaudal durch Obergrenzen der Recessus piriformes und die Larynxkante. Ventral befinden sich der vordere und hintere Gaumenbogen (Arcus palatoglossus und Arcus palatopharyngeus). Dorsal liegt die Pharynxhinterwand der Fascia prevertebralis auf. Der Oropharynx beinhaltet das hintere Drittel der Zunge, die Radix lingulae mit der Tonsilla lingualis, die Fossa tonsillaris mit den paarigen Tonsillae palatinae und die Valleculae epiglotticae. Funktionell stellt der Oropharynx die gemeinsame Schnittstelle der Atem- und Speisewege dar.

Histologisch zeichnet sich der Oropharynx durch eine Dreischichtung aus. In der Tunica mucosa befindet sich ein mehrschichtiges, unverhorntes Plattenepithel. Die Tunica muscularis ist durch quergestreifte Muskulatur gekennzeichnet, woran sich die Tunica adventitia als Bindegewebeschicht anschließt. Die Leitungsbahnen zur Versorgung des Oropharynx beinhalten Äste der Arteria carotis externa und der Vena jugularis interna. Für die Innervation sind der Nervus maxillaris (V_2), Nervus glossopharyngeus (IX), der Nervus vagus (X) sowie der Truncus sympathicus verantwortlich. Der Lymphabfluss erfolgt zu den Lymphknoten im parapharyngealen, retropharyngealen und tiefen Halsbereich.

Die Tonsillen sind als weitere lymphatische Organe im Rachen für eine intakte Immunabwehr essenziell. Die Schleimhaut der Tonsillen ist durch Krypten zur Oberflächenvergrößerung charakterisiert, wodurch eine verbesserten Antigeninteraktion ermöglicht wird. Als Teil des Lymphoepithels findet in den darunterliegenden

Lymphfollikel die Proliferation und Differenzierung von B- und T-Zellen statt. Neben den bereits erwähnten Tonsillen bilden zudem die paarige Tonsillae auditivae, die Seitenstränge sowie die unpaare Tonsilla pharyngealis den sogenannten Waldeyer-Rachenring. Dieser wird übergeordnet zum MALT (*mucosa associated lymphoid tissue*) gezählt (Fossum et al., 2017; Schünke et al., 2015; Strutz & Mann, 2010).

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie des Oropharynxkarzinoms

Das Oropharynxkarzinom verzeichnete im Jahr 2020 eine globale Inzidenz von 0,5% (98.412 Fälle) gemessen an allen malignen Neuerkrankungen (Sung et al., 2021). In Deutschland liegt die geschätzte OPSCC-Inzidenz für Männer bei 4-16/100.000 Einwohner, für Frauen bei 3-7/100.000 Einwohner (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2024). In den letzten Jahrzehnten war die Zahl der Kopf-Hals-Tumore insgesamt konstant oder rückläufig, bei gleichzeitigem Anstieg der Oropharynxkarzinome. Die zunehmende Inzidenz des OPSCC wird auf die steigende Prävalenz von Humanen Papillomaviren (HPV) bedingten OPSCC zurückgeführt (Lechner et al., 2022; Menezes et al., 2021). Diese Entwicklung zeichnet sich sowohl auf regionaler Ebene in Gießen als auch auf nationaler Ebene in Deutschland ab (Wittekindt et al., 2019). International betrachtet lässt sich die steigende Inzidenz von HPV-bedingten OPSCC vor allem in Nordamerika und im Norden Europas nachvollziehen (Gillison et al., 2015).

Bei der Entstehung des HPV-positiven OPSCC spielen die viralen Onkoproteine E6 und E7 eine zentrale Rolle (Abschnitt 1.2.3). Demgegenüber wird bei HPV-negativen OPSCC von einer multifaktoriellen Genese ausgegangen. Zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich werden Tabak und Alkohol gezählt (Blot et al., 1988). Für beide Noxen gilt eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen konsumierter Menge und der Wahrscheinlichkeit einer Tumorentstehung. Aktuell werden von der IARC (*International Agency for Research on Cancer)* 83 Komponenten im Tabak und Tabakrauch als karzinogen eingestuft (Y. Li & Hecht, 2022). Acetaldehyd, ein Metabolit des Trinkalkohols Ethanol, bewirkt auf molekularer Ebene eine funktionelle und strukturelle Veränderung von Nukleinsäuren und Proteinen. Durch Induktion von pro-inflammatorischen Prozessen und Akkumulation von genomischen Mutationen wird dadurch die Krebsentstehung unterstützt (Rumgay et al., 2021; Seitz & Stickel, 2007).

1.1.3 Diagnostik des Oropharynxkarzinoms

Die Diagnostik des Oropharynxkarzinoms beinhaltet zunächst die Anamnese zur Erfassung von Dauer und Art der Beschwerden. Je nach Krankheitsfortschritt sind darunter das Auftreten von Halsschmerzen, Ohrenschmerzen, Odynophagie, Dysphagie, Globusgefühl, blutiger Speichel sowie zervikale Schwellungen zu nennen. Bei der körperlichen Untersuchung werden der Rachen und die benachbarten Strukturen mittels eines flexiblen Endoskops betrachtet und die Lymphknoten am Hals abgetastet. Zur Beurteilung der Tumorausbreitung erfolgt eine Bildgebung. Mittels Sonographie und Schnittbildverfahren wie Computertomographie (CT) und Magnetresonanztomographie (MRT) können die Infiltrationstiefe und angrenzenden Organe evaluiert werden. Dabei sollte die gesamte Region von der Schädelbasis bis zur oberen Thoraxapertur dargestellt werden. Die Stoffwechsellage des Malignoms kann mithilfe eines CTs kombiniert mit einer Positronen-Emissions-Tomographie (PET) visualisiert werden. Durch Injektion eines radioaktiven Pharmakons (^{18}F-2-Fluoro-2-Deoxy-Glukose, ^{18}F-FDG) kann im Rahmen der ^{18}F-FDG PET-CT die Anreicherung des Pharmakons im Gewebe Rückschlüsse auf den Tumormetabolismus geben. Eine Diagnosesicherung erfolgt durch eine Panendoskopie mit histopathologischer Aufarbeitung der entnommenen Biopsie. Die Spiegelung wird in der Regel in Narkose durchgeführt und beinhaltet die Beurteilung des gesamten oberen Luft- und Nahrungsweges (Mundhöhle, Pharynx, Larynx, Ösophagus, Tracheobronchialweg). Die Proben für die Biopsie sollten nach Möglichkeit aus dem Randbereich sowie aus dem Zentrum des Tumors entnommen werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2024; Wittekindt et al. 2018). Der HPV-Status kann mittels Nachweis von p16^{INK4A}, hier im weiteren p16, in der Immunhistologie (Abschnitt 1.2.3) oder von viraler DNA *(deoxyribonucleic acid)* in der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) bestimmt werden (Williams et al., 2022).

1.1.4 Klassifikation des Oropharynxkarzinoms

Die Charakterisierung von soliden Tumoren erfolgt nach der TNM-Klassifikation anhand drei zentraler Kriterien: die Tumorgröße (Tumor, T), die Anzahl befallener Lymphknoten (Nodus, N) und das Vorhandensein von Fernmetastasen (Metastasis, M). Der N- und M-Status lassen sich weiter in klinische (*clinical*, c) oder pathologische (p) Erhebung untergliedern (Tabelle 1 und 2). Die TNM-Klassifikation bildet die Grundlage für die gruppierte Einteilung in UICC *(Union Internationale Contre le Cancer)* Stadien I-IV (Tabelle 3 und 4). Die UICC-Stadien dienen der Stadien-adaptierten Therapie nach Leitlinien-Empfehlungen und ermöglichen prognostische Abschätzungen. Die Unterscheidung zwischen HPV-positiven zu HPV-negativen OPSCC hat aufgrund der

unterschiedlichen Tumorcharakteristika und Prognose der Patienten Einzug in die 8. Version der UICC TNM- und Stadieneinteilung erhalten (Brierley et al., 2016). Als Surrogatmarker für die HPV-getriebene Onkogenese gilt der p16 Status. Bei gleichem TNM-Status wirkt sich ein positiver HPV-Status aufgrund der besseren Prognose (Abschnitt 1.1.5) auf eine niedrigere UICC Stadieneinteilung aus. So entspricht ein T1N1 Tumor bei p16-Positivität einem UICC Stadium I, bei p16-Negativität dagegen einem UICC Stadium III (Wittekindt et al., 2018).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für p16-positive OPSCC nach UICC 8. Auflage

T-/N-/M-Kriterium	Definition
T1	≤ 2 cm
T2	>2 cm, ≤4 cm
T3	>4 cm oder Ausbreitung auf linguale Epiglottis
T4	Infiltration Larynx, äußere Zungenmuskulatur, Lamina medialis/ lateralis Processus pterygoideus, M. pterygoideus lateralis, Schädelbasis, harter Gaumen, Mandibula, Arteria carotis interna, lateraler Nasopharynx
N0	c/pN0: Keine regionären Lymphknoten (LK) Metastasen
N1	cN1: ipsilateral solitär oder multipel ≤6cm
	pN1: ≤4 betroffene LK
N2	cN2: kontralateral oder bilateral ≤ 6 cm
	pN2: > 4 betroffene LK
N3	cN3: Metastasen > 6cm
M0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen
M1	cM1: hohe Evidenz in Bildgebung auf vorhandene Fernmetastasen
	pM1: vorhandene und histologisch gesicherte Fernmetastase

Tabelle 2: TNM-Klassifikation für p16-negative OPSCC nach UICC 8. Auflage

T-/N-/M-Kriterium	Definition
T1	≤ 2 cm
T2	>2, ≤4 cm
T3	>4 cm oder Ausbreitung auf linguale Epiglottis
T4a	Infiltration von Larynx, äußerer Zungenmuskulatur, Lamina medialis Processus pterygoideus, harter Gaumen, Mandibula
T4b	Infiltration von Musculus pterygoideus lateralis, Processus pterygoideus, lateraler Nasopharynx, Schädelbasis; Einhüllung der Arteria carotis communis oder interna
N0	c/pN0: Keine regionären Lymphknoten Metastasen
N1	c/pN1: ipsilateral solitär ≤ 3 cm

N2a	cN2a: ipsilateral solitär > 3–6 cm
	pN2a: ipsilateral solitär, ≤ 3 mit ECS oder ≤ 6 cm ohne ECS
N2b	cN2b: ipsilateral multipel ≤ 6 cm
	pN2b: ipsilateral multipel ≤ 6 cm, ohne ECS
N2c	cN2c: bilateral, kontralateral ≤ 6 cm
	pN2c: bilateral, kontralateral ≤ 6 cm ohne ECS
N3a	cN3a: Metastasen > 6 cm
	pN3a: Metastasen > 6 cm, kein ECS
N3b	cN3b: ECS
	pN3b: Metastasen > 3 cm mit ECS oder kontra-/ bilateral mit ECS
M0	Kein Hinweis auf Fernmetastasen
M1	cM1: hohe Evidenz in Bildgebung auf vorhandene Fernmetastasen
	pM1: vorhandene und histologisch gesicherte Fernmetastasen

ECS = *extracapsular spread,* extranodales Wachstum (Hautinvasion, Infiltration von Muskulatur, Nerven oder Knochen (Wittekindt et al., 2018)).

Tabelle 3: Tumorstadien für p16-positive OPSCC nach UICC 8. Auflage

M0, TcNM	cN0	cN1	cN2	cN3	M0, TpNM	pN0	pN1	pN2
T1	I	I	II	III	T1	I	I	II
T2	I	I	II	III	T2	I	I	II
T3	II	II	II	III	T3	II	II	III
T4	III	III	III	III	T4	II	II	III

M1 und jedes T/N	IV

cN = N-Status durch klinische Erhebung; pN = N-Status durch pathologische Erhebung.
Tabelle adaptiert aus „S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie, Prävention und Nachsorge des Oro- und Hypopharanxkarzinoms“ (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2024).

Tabelle 4: Tumorstadien für p16-negative OPSCC nach UICC 8. Auflage

M0 und	N0	N1	N2	N3
T1	I	III	IVa	IVb
T2	II	III	IVa	IVb
T3	III	III	IVa	IVb
T4a	IVa	IVa	IVa	IVb
T4b	IVb	IVb	IVb	IVb

M1 und jedes T/N	IVc

Tabelle adaptiert aus „S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie, Prävention und Nachsorge des Oro- und Hypopharanxkarzinoms“ (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2024).

1.1.5 Therapie und Prognose

Die Therapie des OPSCC erfolgt in der Regel Stadien-adaptiert, interdisziplinär und multimodal. Zu den Behandlungsmöglichkeiten zählen die chirurgische Resektion, die Radiatio und die Radiochemotherapie. Bei der Auswahl der Therapiestrategien wird nicht zwischen HPV/p16+ und HPV/p16- Karzinomen unterschieden. Grundsätzlich werden alle therapeutischen Optionen international als gleichwertig beurteilt. Im deutschsprachigen Raum besteht eine Präferenz für eine primäre operative Therapie, sofern die Möglichkeit zu einer vollständigen, sogenannten R0-Resektion besteht. Als Zugangsweg für die operative Resektion kann zwischen einem offenen, transzervikalen oder einem minimal-invasiven transoralen Weg gewählt werden. Das Ausmaß der Lymphknotenresektion (*Neck Dissection)* hängt dabei von den Ergebnissen des Stagings ab. Bei der Bestrahlung wird eine intensitätsmodulierte Radiotherapie unter größtmöglicher Schonung von Speicheldrüsen und Schluckwegen als Standard angesehen. Für die simultane Chemotherapie kommen neben Cisplatin auch die Kombination von Carboplatin oder Mitomycin mit 5-Fluoruracil zur Verwendung. Die trimodale Therapie aus transoraler Resektion, *Neck Dissection* und adjuvanter Radio-(Chemo-) Therapie hat bei Tumoren der UICC Stadien I bis II in den letzten 20 Jahren an Bedeutung gewonnen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2024).

Das HPV-assoziierte OPSCC ist mit einem besseren 3-Jahres-Überleben im Vergleich zum HPV-negativem Karzinom assoziiert (Ang et al., 2010). Hierfür gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Epidemiologisch gesehen betrifft das HPV-getriebene Karzinom häufiger eine jüngere Patientengruppe mit weniger Komorbiditäten (Chow, 2020; Deschler et al., 2014; Marur et al., 2010). Dies wird jedoch in der Literatur kontrovers diskutiert, beispielsweise waren bei der untersuchten Kohorte aus Gießen Patienten mit HPV-getriebenen Oropharynxkarzinomen signifikant älter als Patienten mit HPV-negativen Karzinomen (Wagner et al., 2020). Retrospektive Analysen zeigen zudem bei HPV-positiven OPSCC ein besseres Therapieansprechen, sowohl bei Radio-(Chemo-) Therapie als auch bei chirurgischen Ansätzen (Nguyen-Tan et al., 2014; Wagner et al., 2017). Aufgrund der zunehmenden Bedeutung des HPV-positiven OPSCC verbunden mit der besseren Prognose wird in klinischen Studien zur potenziellen Therapiedeeskalation geforscht, um behandlungsassoziierte Langzeitschäden zu minimieren (Palma et al., 2022).

1.2 Die humanen Papillomaviren (HPV)

Humane Papillomaviren (HPV) sind unbehüllte Viren mit einem ikosaedrischem Kapsid von 55 nm Durchmesser. Das virale Genom besteht aus zirkulärer, doppelsträngiger DNA mit einer Größe von etwa 8 Kilobasenpaare (kbp) und lässt sich in drei Abschnitte einteilen. Die E-Region („*early*"; ca. 4 kbp) kodiert für regulatorische E-Proteine, die L-Region („*late*"; ca. 3 kbp) für zwei strukturelle L-Proteine (L1 und L2), die erst zu einem späten Zeitpunkt im Reproduktionszyklus von HPV gebildet werden. Die nichtkodierende Kontrollregion (*noncoding control region*, NCR; ca. 1kbp) enthält Elemente zur Regulation der Virusreplikation und Genexpression (Münger et al., 2004).

Bisher sind über 200 verschiedene HPV-Genotypen bekannt, die anhand ihres onkogenen Potenzials in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Niedrigrisiko-Gruppe, (*low-risk)* ist unter anderem verantwortlich für benigne Warzen und Papillome (Typ 6 und 11). Von der Hochrisiko-Gruppe *(high-risk,* HR*)* geht bei persistierender Infektion ein zunehmendes Risiko für maligne Entartung bis hin zum Tumor aus (Robert Koch Institut, 2018). Neben dem bereits erwähnten Oropharynxkarzinom können HR-HPV zur Krebsentstehung im Bereich von Anus, Penis, Vagina, Vulva und Zervix beitragen (Spence et al., 2016). Hinsichtlich anatomischer Lokalisation macht das Zervixkarzinom weltweit circa 80% der HPV-bedingten Karzinome aus (de Martel et al., 2020). Laut Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organisation*, WHO) wurden zuletzt 12 HPV-Hochrisiko-Typen als sicher karzinogen eingestuft: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 und 59 (International Agency for Research on Cancer, 2007). In der Gruppe der Kopf-Hals-Tumore wird überwiegend der Subtyp HPV16 nachgewiesen und ist somit für über 80% aller HPV-positiven KHT verantwortlich (Bratman et al., 2016).

1.2.1 HPV-Infektion und Prävention

Die HPV-Infektion betrifft Epithelzellen der äußeren Haut (kutanotrop) und der inneren Schleimhaut (mukosotrop). Bei den HPV-assoziierten Karzinomen steht die Übertragung durch Haut-zu-Haut Kontakt beim Geschlechtsverkehr im Vordergrund (Wittekindt et al., 2018). Speziell für das HPV-assoziierte OPSCC zeigte sich eine positive Korrelation zwischen oralen Sexualpraktiken und steigender Inzidenz (D'Souza et al., 2007). Über Mikroläsionen gelangt das Virus zu den undifferenzierten Basalzellen in der Tiefe der Epidermis, die als einzige Zelltypen von HPV infiziert werden können. Im Oropharynx kann das Virus aufgrund des Lymphoepithels mit den charakteristischen Krypten auch ohne das Vorhandensein von Läsionen zu den Basalzellen gelangen (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2024; von Knebel Doeberitz & Prigge, 2019). Im Rahmen des Zellzyklus teilen

sich die Basalzellen und gelangen als differenzierte Epithelzellen an die Oberfläche zur Erneuerung der (Schleim-) Haut. Bei HPV-infizierten Zellen erfolgt ein viraler Replikationszyklus eng gekoppelt mit dem Differenzierungsprozess der Wirtszellen (Abschnitt 1.2.2). In bis zu 90% der Fälle handelt es sich um eine vorübergehende (transiente) Infektion mit HPV. Die Dauer der Viruselimination oder -persistenz ist von zahlreichen Faktoren abhängig, unter anderem von dem viralen Genotyp, der Viruslast, der Immunkompetenz und der anatomischen Stelle der Infektion (Kombe Kombe et al., 2020). Bei einer persistierenden Infektion oder einer Reinfektion wird von einer Latenzzeit von 10-30 Jahren bis zur Entstehung des Oropharynxkarzinom ausgegangen (Gillison et al., 2015).

Eine wirksame Impfung ermöglicht den Schutz vor einer HPV-Infektion und den HPV-assoziierten Folgeerkrankungen. In Deutschland sind dafür zurzeit zwei Totimpfstoffe zugelassen. Der bivalente Impfstoff Cervarix ® schützt vor den HPV Typen 16 und 18, der nonavalente Impfstoff Gardasil ® 9 schützt vor den Typen 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 und 58. Die ständige Impfkommission (STIKO) empfiehlt die Impfung für Jungen und Mädchen im Alter von 9 bis 14 mit einer Nachholmöglichkeit bis 17 Jahre. Optimalerweise sollte der Impfschutz vor der Aufnahme von sexueller Aktivität erfolgen. (Robert Koch Institut, 2018). Die gemeinsame Zielstruktur beider Impfstoffe ist das HPV L1 Protein, wodurch das Eindringen des Virus in die Epithelzellen gehemmt wird (Kombe Kombe et al., 2020).

1.2.2 HPV-Pathophysiologie

Der HPV-Replikationszyklus lässt sich in drei Phasen unterteilen. Zuerst kommt es nach dem Eintritt in die Wirtszelle zu einer begrenzten Genomvermehrung. Die zweite Phase gilt der Erhaltung einer konstanten Kopienzahl des viralen Genoms in proliferierenden Basalzellen. Die letzte Phase findet in differenzierten Plattenepithelzellen statt, wo der Zusammenbau infektiöser Virionen stattfindet (McBride, 2013).

Die regulatorischen E-Proteine werden früh im viralen Replikationszyklus exprimiert. Für die Initiierung der Virusvermehrung ist E1 essenziell. Als Adenosintriphosphat-abhängige DNA-Helikase erkennt E1 den Replikationsursprung (*origin of replication*, ORI) und entwindet an dieser Stelle die zirkuläre HPV-DNA (Hughes & Romanos, 1993). Neben der enzymatischen Funktion beeinflusst E1 auch humane Gene, die für die anti-virale Immunantwort verantwortlich sind (Castro-Muñoz et al., 2019). E2 unterstützt die initiale DNA-Replikation, indem es einen Komplex mit der E1-Helikase bildet und zur spezifischen Bindung an die ORI-Sequenz beiträgt (Sanders & Stenlund, 2000). Zudem

übernimmt E2 die Funktion als zentraler Regulator der viralen Protein-Transkription. Über eine DNA-bindende Domäne interagiert E2 mit der $ACCN_6GGT$ Sequenz in der nicht kodierenden Kontrollregion. Die hemmende oder aktivierende Wirkung ist dabei abhängig von den durch E2 rekrutierten zellulären Faktoren (McBride, 2013). Im Rahmen des Differenzierungsprozesses der Basalzellen zu postmitotischen Plattenepithelzellen kommt es normalerweise zu einem irreversiblen Ausstieg aus dem Zellzyklus. An dieser Stelle greifen E6 und E7 in regulierende Signalwege ein, um eine aktive Vervielfältigung der Wirtszellen und somit des Virus aufrecht zu erhalten (Moody, 2017). Die strukturellen L-Proteine bilden im späteren Verlauf das Kapsid, welches als Teil des infektiösen Virions mit der Ablösung der obersten Plattenepithelzellen in die Umwelt gelangt (Spence et al., 2016). Zudem ist das L1-Protein verantwortlich für die gewebsspezifische Infektion weiterer Epithelzellen durch Bindung an Heparan-Sulfat-Oligosaccharide in den Wirtszellen (Dasgupta et al., 2011; Richards et al., 2013).

1.2.3 HPV-induzierte Karzinogenese

Die onkogene Aktivität der HPV-Proteine E6 und E7 beruht auf einer Dysregulation der Signalwege für den Zellzyklus und der Apoptose. Hierbei interagieren E7 und E6 jeweils mit unterschiedlichen Tumorsuppressoren und anderen regulatorischen Proteinen. Physiologischerweise wird der Zelllzyklus durch die Bindung des Retinoblastom Proteins (Rb) an den humanen Transkriptionsfaktor E2F gehemmt. E7 bindet an das Rb-Protein und bewirkt so die Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, der für den Übergang des Zellzyklus in die Synthese-Phase verantwortlich ist. Zusätzlich bewirkt E7 den Abbau von p107 und p130, zwei weiteren Proteinen aus der Retinoblastom-Familie, welche die E2F Aktivität hemmen. Eine ungebremste Zellteilung ist die Folge der dauerhaften Freisetzung von E2F (Cam & Dynlacht, 2003; Dyson et al., 1989). In gesunden Zellen wirkt p53 jedoch einer ungesteuerten Zellteilung entgegen und kann an dieser Stelle den Zellzyklus unterbrechen und die Apoptose einleiten. Zur Umgehung dieser Kontrolle bildet das virale E6 Protein einen Komplex mit dem E6-assoziierten Protein (E6-AP), welches die Ubiquitinierung von p53 und somit dessen Abbau durch das Proteasom bewirkt (Scheffner et al., 1990). Zusätzlich können E6 und E7 zusammen die Telomeraseaktivität induzieren, welches zur zellulären Immortalisierung beiträgt (Kiyono et al., 1998).

Als Surrogatmarker für HPV-getriebene Karzinome gilt der Nachweis von erhöhtem p16 mittels Immunhistochemie. In seiner Funktion als weiterer Tumorsuppressor wirkt p16 als Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor (*cyclin-dependent kinase inhibitor*, CDKI), wodurch unphosphoryliertes Rb-Protein generiert wird und im Komplex mit E2F

verbleiben würde. Der Zellzyklusarrest und die natürliche Zellalterung sind die Folge (Liggett & Sidransky, 1998). HPV E7 stimuliert die Histon-Demethylasen KDM6A und KDM6B, welches wiederum p16 induziert. Aufgrund des simultanen Abbaus von Rb kann p16 jedoch nicht seine tumorsuppressive Wirkung entfalten und akkumuliert somit in den Zellen mit einer onkogenen Aktivität von HPV (McLaughlin-Drubin et al., 2011).

Bei einer persistierenden HPV-Infektion kann das virale Genom sowohl episomal als auch integriert im humanen Genom vorliegen (De Leo et al., 2020; Olthof et al., 2015). Als Voraussetzung für die virale Integration gilt die Linearisierung der zirkulären HPV-DNA durch (möglicherweise multiple) Bruchstellen innerhalb des viralen Genoms. Eine häufige Lokalisation dieser Bruchstellen betrifft die E2 Sequenz, wodurch dessen regulierende Wirkung auf E6 und E7 entfällt und die Expression beider Onkogene zusätzlich verstärkt wird. Zusammenfassend wird die Krebsentstehung beim HPV-getriebenen Karzinom durch die Aktivität der viralen Onkoproteine vermittelt, während es bei Noxen-induzierten Kopf-Hals-Tumoren zu einer schrittweisen Akkumulation von genetischen Schäden kommt (Akagi et al., 2014; Wittekindt et al., 2018).

1.3 Die *Liquid Biopsy*

Die Flüssigbiopsie (*Liquid Biopsy*) bezeichnet ein minimal-invasives Verfahren zum Nachweis von Biomarkern in Körperflüssigkeiten. Dafür hat sich die Analyse von Blutplasma oder Blutserum weitgehend etabliert. Weitere mögliche Substrate sind unter anderem Urin oder Punktatmaterial (Aszites, Liquor, etc.). Im Gebiet der Onkologie zeichnet sich die *Liquid Biopsy* als vielseitiges Instrument ab. Durch die Möglichkeit zur seriellen Probenentnahme ergibt sich ein breites Spektrum an Einsatzgebieten von der Früherkennung, der Therapiekontrolle bis hin zu der langfristigen Nachsorge von Tumorerkrankungen (Maass et al., 2021; Nikanjam et al., 2022). Als Biomarker können im Blut Tumorzellen selbst (*circulating tumor cells,* CTC) oder zellfreie Nukleinsäuren (*cell-free DNA*, cfDNA) nachgewiesen werden. Von der cfDNA lassen sich weiterhin mitochondriale (mtDNA) und tumorspezifische DNA (*circulating tumor-specific* DNA, ctDNA) abgrenzen. Bei infektionsbedingten Erkrankungen ist zudem erregerspezifische bakterielle oder virale DNA nachweisbar (Kustanovich et al., 2019).

1.3.1 cfDNA und ctDNA als Biomarker

Die erstmalige Entdeckung von zellfreier DNA im Blut erfolgte im Jahr 1948 (Mandel & Metais, 1948). Die klinische Bedeutung an erhöhtem cfDNA konnte zunächst bei Patienten mit systemischen Lupus erythematosus gezeigt werden (Tan et al., 1966). Die

Freisetzung von Nukleinsäuren in die Blutbahn erfolgt beim Zelluntergang (Apoptose, Nekrose) oder durch aktive Sekretion. Aufgrund des erhöhten Zellumsatzes ist daher im Rahmen von malignen Erkrankungen oder systemischen Entzündungsreaktionen die Konzentration von cfDNA bis zu 150-fach höher als bei Gesunden (Jahr et al., 2001; Nesic et al., 2021; Stroun et al., 2001). Bei der Apoptose entstehen charakteristische DNA-Fragmente von 166 Basenpaaren (bp), die um ein Histon gewickelt sind und somit eine Nukleosom-Einheit bilden. Abhängig von der enzymatischen Schnittstelle kann cfDNA im Blut als Mono- oder Polynukleosom vorliegen (Bronkhorst et al., 2019). Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose zur Freisetzung von längeren Abschnitten >10000 bp. Kürzere Fragmente <100 bp weisen auf ctDNA, mtDNA und bakterielle DNA hin (Kustanovich et al., 2019). Die Konzentration von nachweisbarer cfDNA ist von unterschiedlichen Faktoren abhängig. Einmal freigesetzt haben Nukleinsäuren in der Blutbahn eine Halbwertszeit von wenigen Minuten bis hin zu 2,5 Stunden, da sie dem Abbau durch DNasen ausgesetzt sind. Zudem werden die Histone durch Proteasen in der Blutbahn abgebaut, wodurch die Stabilität der Nukleosom-Einheit verringert wird. Neben der enzymatischen Degradation spielen auch hepatische und retikuloendotheliale Prozesse sowie die renale Exkretion eine Rolle (Bronkhorst et al., 2019).

1.3.2 Klinische Anwendungsbereiche des Nachweises von ctDNA

Speziell bei Malignomen ist die Untersuchung von tumorspezifischer DNA als Biomarker von großem Interesse. Der diagnostische Goldstandard bei soliden Tumorerkrankungen ist weiterhin eine invasive Gewebebiopsie mit deren histologischen Aufarbeitung. Je nach Größe und Lage des Tumors kann der Zugangsweg und die Menge an gewonnenem Material beschränkt und die pathologische Diagnostik zeitaufwändig sein. Zur Überwindung dieser Limitationen stellt die *Liquid Biopsy* eine mögliche minimal-invasive Alternative dar. Die ctDNA-Analyse von Mutationen, dem Methylierungsprofil und den Kopienaberration (*copy number variation,* CNV) ermöglicht Aussagen zum Ursprungsgewebe, der Genexpression und der Tumorheterogenität. Die Konzentration von ctDNA erlaubt zudem Rückschlüsse auf die Tumorgröße und dessen Metabolismus (Diaz & Bardelli, 2014). Speziell für das HPV-getriebene OPSCC wird der Nachweis des Surrogatmarkers p16 in der Gewebebiopsie zur Bestimmung des HPV-Status genutzt. Dabei gilt es grundsätzlich zu beachten, dass der p16-Status nicht bei allen OPSCC eindeutig und alleine auf die HPV-getriebene Karzinogenese hinweist. Bei Untersuchung der Gewebebiopsie auf HPV-DNA zeigte sich in bis zu 10% der Fälle eine Diskordanz zwischen den Ergebnissen für p16 und HPV-DNA (p16 positiv und HPV-DNA negativ bzw. p16 negativ und HPV-DNA positiv; Wagner et al. 2020). Der

Nachweis von zellfreier HPV-DNA als Biomarker in *Liquid Biopsy* Proben könnte daher in der Diagnostik komplementär zur Gewebebiopsie genutzt werden (Mazurek et al. 2023; Wuerdemann et al. 2020).

Neben der Diagnostik kann ctDNA auch zur Evaluation von therapeutischen Entscheidungen und zur Prognose des Krankheitsverlaufs genutzt werden. Die dynamischen Veränderungen der Nukleinsäuren können zur Überwachung der Tumorlast genutzt werden. In Studien zum Mammakarzinom (Dawson et al., 2013) sowie zum Melanom (Shinozaki et al., 2007) korrelierte ein Anstieg von ctDNA mit einem Fortschreiten der Krankheit. Gleichzeitig zeigte sich ein entsprechender Abfall nach therapeutischer Intervention. Bei Patienten mit kolorektalem Karzinom wurde ctDNA zur Beurteilung der minimalen Resterkrankung (*minimal residual disease*) nach chirurgischer Resektion eingesetzt. Der postoperative Nachweis von ctDNA korrelierte dabei mit dem Auftreten eines Rezidivs (Diehl et al., 2008). Ebenso konnten unter laufender Behandlung des kolorektalen Karzinoms neu aufgetretene Mutationen in ctDNA nachgewiesen werden, die eine spätere Therapieresistenz zur Folge hatten (Cao et al., 2020; Diaz & Bardelli, 2014). Für das HPV-assoziierte OPSCC korrelierte der postinterventionelle Nachweis der viralen Onkogene E6 und E7 in *Liquid Biopsy* Proben mit einem Tumorrezidiv (Reder et al., 2020).

1.3.3 Einflussfaktoren auf und Methoden zum Nachweis von ctDNA

Beim Nachweis von ctDNA sind limitierende Faktoren zu beachten, welche die Detektion von ctDNA im Blut negativ beeinflussen. Neben der bereits erwähnten kurzen Halbwertszeit von Nukleinsäuren ist zudem die unterschiedliche Menge der DNA-Fraktionen zu berücksichtigen. Der Anteil von tumorspezifischer DNA gemessen an der Gesamtheit zellfreier Nukleinsäuren kann zwischen 0,01% bis über 90% variieren (Diehl et al., 2005; Heitzer et al., 2015). Neben DNA aus gesunden Zellen in der Mikroumgebung des Tumors oder anderen Körperstellen mit vermehrten Zellabbau wird die größte Menge an cfDNA von hämatopoetischen Blutzellen freigesetzt (Lui et al., 2002; Snyder et al., 2016). Vor diesem Hintergrund stellt die genomische DNA eine große Herausforderung bei der Detektion tumorspezifischer DNA da. Zur Minimierung der Leukozyten Lyse und somit der Freisetzung von genomischer DNA sollten Blutproben daher zeitnah bearbeitet werden. Im Falle einer längeren Probeliegezeit kann sich die Verwendung spezieller Entnahmeröhrchen mit Konservierungsstoffen vorteilhaft auf die Stabilisierung der Leukozyten auswirken. Zudem gilt es potenzielle Verluste während des gesamten Arbeitsablaufs von der Entnahme, der Bearbeitung bis zu der Lagerung der Probe zu bedenken (Johansson et al., 2019; Nesic et al., 2021).

Für die Untersuchung von cfDNA und ctDNA stehen unterschiedliche Technologien zur Verfügung. Basierend auf der Hochdurchsatz-Sequenzierung (*next generation sequencing,* NGS) kann entweder das gesamte Genom (*whole genome sequencing*, WGS) oder ein markierter Abschnitt (*tagged-amplicon sequencing*, Tam-Seq) untersucht werden (Nikanjam et al., 2022). Auch wenn Sequenzierungs-basierte Verfahren eine umfassende Typisierung und Analyse von cfDNA ermöglichen, zeichnen sie sich durch einen erheblichen Kosten- und Zeitaufwand aus. Eine einfachere Alternative für die primäre Untersuchung von Nukleinsäuren in *Liquid Biopsy* Proben stellen verschiedene Varianten der klassischen Polymerasekettenreaktion dar, auf die im Folgenden weiter eingegangen wird.

1.4 Die *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

Im Rahmen der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird ein DNA-Abschnittes amplifiziert, wodurch unter anderem eine qualitative Aussage über die An- oder Abwesenheit des Zielmoleküls getroffen werden kann. Die Methode wurde durch Kary B. Mullis entwickelt, wofür er den Nobelpreis der Chemie erhielt (Royal Swedish Academy of Sciences, 1993). Als grundlegende Reagenzien werden dafür freie Nukleotide, eine thermostabile Polymerase und ein Primerpaar benötigt, welches spezifisch an die zu amplifizierende Nukleinsäuren-Sequenz bindet. Im Folgenden werden üblicherweise bis zu 40 Reaktionszyklen durchlaufen, die jeweils durch drei Temperatur-Schritte charakterisiert sind. Beim ersten Schritt kommt es bei einer hohen Temperatur zur Denaturierung der doppelsträngigen DNA, wodurch sich nun im zweiten Schritt bei einer niedrigen Temperatur die Primer an die Zielsequenz anlagern können (*annealing*). Anschließend kommt es zu einer Elongation durch die Polymerase bei einer moderaten Temperatur. Unter idealen Reaktionsbedingungen erfolgt mit jedem Zyklus eine Verdopplung der Substratmenge, was einen exponentiellen Anstieg der Reaktionsprodukte zur Folge hat. Der qualitative Nachweis der entstandenen PCR-Produkte erfolgt bei dieser konventionellen, sogenannten Endpunkt-PCR mittels Gelelektrophorese, wobei das erwartete Amplikon in der Regel durch das korrekte Migrationsverhalten charakterisiert wird (Mülhardt, 2009; Quan et al., 2018).

1.4.1 Die quantitative PCR (qPCR)

Bei der quantitativen *Real-Time* PCR (qPCR) lassen sich die Reaktionszyklen, bzw. die Zunahme der Reaktionsprodukte, durch einen fluoreszenzbasierten Farbstoff in Echtzeit verfolgen. Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung eines interkalierenden Farbstoffes wie beispielsweise *SYBR Green*. Dieser bindet an doppelsträngige DNA und

führt dabei zu einem detektierbaren Anstieg der Fluoreszenzintensität (Dragan et al., 2012; Zipper et al., 2004). Eine weitere Option stellen substratspezifische Sonden dar. Diese bestehen aus einer 5'-Fluoreszenzmarkierung und einem 3'-*Quenching* Molekül. Sie binden innerhalb des Zielbereichs eines Genabschnittes, der durch ein Primer-Paar flankiert wird. Solange die Sonde intakt ist, wird die Lichtemission nach einer Fluoreszenzanregung durch die räumliche Nähe zu dem *Quenching* Molekül unterdrückt. Sobald jedoch die Polymerase im Rahmen der Elongation die Sonde durch ihre 5'→3'-Exonukleaseaktivität abbaut, liegt die Fluoreszenzmarkierung frei in Lösung vor und das nun „ungequenchte" Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals ist dabei direkt proportional zu der Anzahl der entstehenden PCR-Produkte (Mülhardt, 2009; Navarro et al., 2015).

Die charakteristische Amplifikationskurve hat einen sigmoiden Verlauf, der in drei Abschnitte gegliedert wird (Abb. 1). In der Anfangsphase ist die Wahrscheinlichkeit des Zusammenfindens von Ziel-DNA, Polymerase, Primer und Sonde gering. Die Fluoreszenzintensität der Reaktion liegt somit unter dem Schwellenwert (*threshold*) des Hintergrundsignals. Mit jedem weiteren Zyklus kommt es zu einer Substratvermehrung und somit einer Zunahme der Fluoreszenzintensität. Der sogenannte *quantification cycle* (Cq) oder auch *threshold cycle* (Ct) markiert den Zyklus, ab dem ein Übergang von der Anfangsphase zur exponentiellen Amplifikation stattfindet. Gemäß den MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) Empfehlungen wird in dieser Arbeit die Abkürzung Cq verwendet (Bustin et al., 2009). Der anschließende lineare Bereich bis hin zur Plateau Phase entsprechen dem Ende der Reaktion durch den Verbrauch der Reagenzien oder aufgrund einer Selbsthybridisierung der Primer (Mülhardt, 2009).

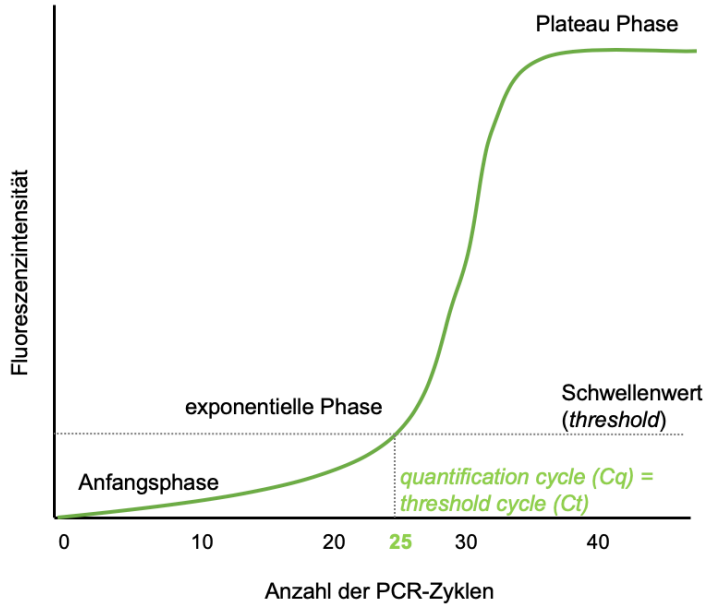


Abbildung 1: Amplifikationskurve der qPCR. Auf der x-Achse ist beispielhaft der Cq-Wert von 25 in grün markiert, welchen den Übergang von der Anfangs- zur exponentiellen Phase darstellt.

Die Quantifizierung eines Zielgens von unbekannter Ausgangskonzentration erfolgt relativ zu den Messwerten einer Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration. Anschließend wird eine Standardkurve generiert, anhand dessen die Quantität des Zielgens berechnet wird (Mülhardt, 2009).

1.4.2 Die digitale PCR (dPCR)

Mithilfe der digitalen PCR (dPCR) kann im Gegensatz zu der qPCR eine absolute und kalibrierungsfreie Quantifizierung der Nukleinsäuren erfolgen. Durch die Partitionierung bei der digitalen PCR entstehen tausende unabhängige Einzelreaktionen im Nanoliter-Bereich, im Vergleich zum Mikroliter-Bereich bei der qPCR. Für die Partitionierung kommen entweder Nanoplatten mit definiertem Volumen (*plate-based digital* PCR, pdPCR) oder die Generierung von Tropfen durch eine Wasser-Öl Emulsion (*droplet digital* PCR, ddPCR) zum Einsatz. In dieser Arbeit wird die Platten-basierte dPCR verwendet (sofern nicht anders vermerkt nachfolgend vereinfacht als dPCR abgekürzt). Die hierfür eingesetzte „26k 24-*Well*" dPCR Nanoplatte unterteilt einen Reaktionsansatz auf insgesamt 26.000 Partitionen. Eine hohe Anzahl an Partitionen verbessert die statistische Präzision bei der Quantifizierung. Nach dem Zufallsprinzip verteilen sich die Zielmoleküle auf die einzelnen Partitionen, sodass jede einzelne Partition entweder viele, wenige, oder keine Moleküle enthalten kann. Ein Produkt kann in der PCR-Reaktion bereits früh, später oder gar nicht erfolgen. Die Detektion der entstandenen Produkte durch fluoreszenzbasierte Farbstoffe (Abschnitt 1.4.1) erfolgt

nach der PCR als Endpunkt-Messung jeder einzelnen Partition. Dabei werden positive („Ja“, Anwesenheit mindestens eines Zielmoleküls) von negativen Signalen („Nein“, Abwesenheit des Zielmoleküls) unterschieden (Abb.2).

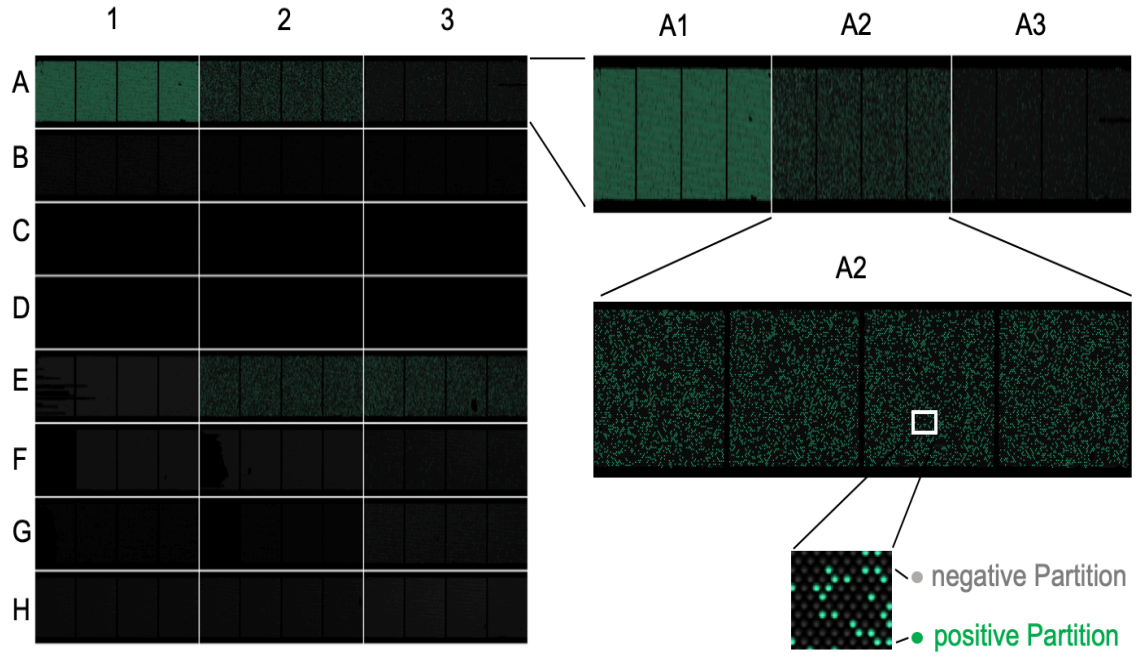


Abbildung 2: Signalübersicht einer in dieser Arbeit verwendeten „26k 24-*Well*“ dPCR Nanoplatte im grünen Fluoreszenzkanal. Links: Plattenübersicht mit allen 24 Reaktionskammern (*Wells*) A1-H3 für 24 Proben. Rechts oben: Vergrößerung der Zeile A. Rechts mittig: Reaktionskammer A2 mit vier Unterteilungen und insgesamt 26.000 Partitionen. Rechts unten: beispielhafte Vergrößerung auf die einzelnen Partitionen. Die negativen Partitionen entsprechen den grauen Punkten, die positiven Partitionen den grünen Punkten.

Die Gesamtheit aller validen, positiven und negativen Partitionen der dPCR-Reaktion bilden die Ausgangspunkte für die absolute Quantifizierung. Dabei werden die positiven Partitionen nicht nach Anzahl der anwesenden Zielmoleküle unterteilt, vielmehr ist das binäre Verhältnis der positiven zu den negativen Partitionen bedeutend. Die statistische Grundlage für die Auswertung und Berechnung der vorhandenen Moleküle erfolgt nach Annahme der Poisson-Verteilung. Unter Berücksichtigung des Partitions- und Probenvolumens lässt sich die Molekülkonzentration bestimmen (Abschnitt 2.5.2). Der Messbereich der dPCR wird somit durch die Anzahl der verfügbaren und validen Partitionen eingeschränkt (Quan et al., 2018; The dMIQE Group et al., 2020). Die kalibrierungsfreie, absolute Quantifizierung mittels dPCR hat das Potenzial zur höheren Präzision im Vergleich zur relativen Quantifizierung mittels qPCR (Bhat & Emslie, 2016).

Bei der Modellierung der Ereigniszahl nach der Poisson-Verteilung gilt es den damit verbundenen Poisson-Fehler zu berücksichtigen. Dieser setzt sich aus zwei Fehlerarten zusammen: der Teilstichproben-Fehler (*subsampling error*) und der Partitionierungs-Fehler (*partitioning error*). Der erste Fehler gilt sowohl für die qPCR als auch für die dPCR, der zweite ist spezifisch für die dPCR. Bei sehr niedrigen Molekülkonzentrationen im Ausgangsmaterial wird die Präzision der Quantifizierung durch das Probenvolumen eingeschränkt. Somit überwiegt in diesem Fall der erstgenannte Fehler aufgrund der limitierten Messung einer Teilstichprobe. Bei sehr hohen Molekülkonzentrationen überwiegt bei der dPCR der Partitionierungs-Fehler aufgrund der begrenzten Anzahl von verfügbaren Partitionen und der damit verbundenen Mehrfachbelegung einer positiven Partition bei der dPCR Messung (Basu, 2017; Tellinghuisen, 2020; Tzonev, 2018). Beide Fehler zusammen grenzen die Präzision der dPCR bei extrem niedrigen und hohen Konzentrationen ein. Der Bereich des minimalen Poisson-Fehlers liegt bei etwa 0,5-3 Kopien pro Partition (Tzonev 2018; *QIAcuity® Application Guide: User Manual Extension*, 2023*).* Zur dPCR Methodenetablierung wird eine Konzentration von circa 0,7 Kopien pro Partition empfohlen, welches in etwa einer äquivalenten Aufteilung von positiven und negativen Partitionen entspricht (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2024; Whale et al., 2016).

1.5 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Etablierung der digitalen PCR und die Untersuchung ihres Nutzens in der Diagnostik von HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen im Vergleich mit der quantitativen PCR. Hierfür soll zunächst für die quantitative und digitale PCR ein Multiplex Assay zum Nachweis der HPV16 Gene E6 und E7 zusammen mit einem humanen Referenzgen etabliert werden. Als Kontroll- und Vergleichsproben sollen DNA eines synthetisierten Kontrollplasmids sowie DNA einer HPV-positiven Zelllinie fungieren. Zur Prüfung des klinischen Nutzens sollen anschließend Blutproben von Patienten mit HPV-positiven sowie HPV-negativen Oropharynxkarzinomen auf die oben genannten Gene untersucht und deren Gehalt mittels qPCR und dPCR quantifiziert werden. Abschließend soll ein Methodenvergleich zwischen der quantitativen und digitalen PCR erfolgen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalie/ Verbrauchsmaterial	Hersteller	Katalognummer
1,5 ml DNA LoBind® Tubes	Eppendorf	0030108051
2 ml DNA LoBind® Tubes	Eppendorf	0030108078
2-log DNA Ladder (0,1-10kb)	New England Biolabs	N3200L
Acrylamid-Lösung (40%)	AppliChem	A4989.0500
Agarose LOW EEO	AppliChem	A2114.0500
Ampicillin	Carl Roth	K029.1
Ammoniumpersulfat (APS)	AppliChem	A2941.0100
Butanol	AppliChem	A3066.0500
C-Chip Disposable Hemocytometer	NanoEntek	DHC-N04
Cell-Free DNA Blood Collection Tube	Streck	230470
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (1x)	Sigma-Aldrich	D8537-500ML
Fetales Bovines Serum (FBS)	Biochrom	S0615
Gel Loading Dye Blue (6x)	New England Biolabs	B7012S
Gentamicin	Sigma-Aldrich	G1272-50ML
HPLC H_2O	Sigma-Aldrich	270733-1L
L-Glutamin	Sigma-Aldrich	59202C-100ML
Luna® Universal qPCR Mastermix	New England Biolabs	M3003S
MicroAmp Fast Optical 96-Well-Reaktionsplatte (PCR)	Applied Biosystem	4346906
Midori Green Advance DNA Stain	Genetics	MG04
Nicht-essenzielle Aminosäuren (100x)	Sigma-Aldrich	M7145-100ML
QIAcuity® 26k 24-Well Nanoplate	QIAGEN	250001
QIAcuity® Probe PCR Kit (5ml)	QIAGEN	250102
QIAcuity® Nanoplate Seal	QIAGEN	250099
QIAcuity® Nanoplate Tray	QIAGEN	250098
rCutSmart™ Puffer (10x)	New England Biolabs	B6004S
RPMI-1640-Medium	Sigma Aldrich	R8758
Standard-I-Nährmedium	Carl Roth	AE92.2
Standard-Nähragar	Carl Roth	AE93.2
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	Thermo Scientific	B69
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck	T92811-25ML
Trisborat-Ethylendiamintetraacetat (TBE) Puffer (10x)	AppliChem	A4348.1000

Die verwendeten Enzyme sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller	Katalognummer
EcoRI	New England Biolabs	R3101S
HindIII	New England Biolabs	R3104S
NdeI	New England Biolabs	R0111S
RNase A	New England Biolabs	T3018L
Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP)	New England Biolabs	M0371S
T4 DNA Ligase	Promega	M1804
TrypLE™ Express Enzyme (1x), no phenol red	Thermo/ Gibco	12604013

Die verwendeten Kits sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller	Katalognummer
DNeasy Blood and Tissue Kit	QIAGEN	69504
Monarch® Spin PCR & DNA Cleanup Kit (5 µg)	New England Biolabs	T1130S
Norgen Plasma/ Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit	Norgen Biotek	55100
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	QIAGEN	12143
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN	27106

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Katalognummer
CellDrop FL Cell Counter	DeNovix	31CDFLXIPAYGW
Centrifuge 5810 R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf	5811000015
ChemiDoc XRS+ (Gelbildgebung)	Bio-Rad	1708299
Heraeus Pico17 Centrifuge (Tischzentrifuge)	Thermo Scientific	75002410
LabDancer (Vortex-Schüttler)	VWR	444-00004
Mini Plate Spinner (MPS) 1000 (Plattenzentrifuge)	Labnet	Z723649
NanoDrop™ 2000c (Spektralphotometer)	Thermo Fisher Scientific Peqlab	ND-2000c
QIAcuity® One, 5plex device, Digital PCR System	QIAGEN	911021
QIAcuity® Roller	QIAGEN	911105
StepOnePlus™ Real Time PCR System	Applied Biosystems	4376600

Die verwendete Software ist in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Liste der verwendeten Software

Software	Version	Software Anbieter
ChemiDoc XRS+ with Image Lab Software	3.0	Bio-Rad
IBM SPSS Statistics	29	IBM
Microsoft Excel	2016	Microsoft
Microsoft Powerpoint	2016	Microsoft
NanoDrop 2000 Software	1.6.198	Thermo Fisher Scientific Peqlab
NEBioCalculator®	1.15.8	New England Biolabs
QIAcuity® Software Suite	2.5.0.1	QIAGEN
StepOnePlus™ Software	2.3	Applied Biosystems

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Merck Millipore) hergestellt. Die Vorrats- und Arbeitslösungen lagen in einer Konzentration von 100 pmol/µl bzw. 10 pmol/µl vor. Die entsprechenden Sequenzen sind in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Sequenzen der für qPCR und dPCR verwendeten Primer und Sonden

Gen	Definition	Sequenz (5´- 3´)	PCR-Produkt	Referenz
HPV16 E6	Primer f	GCACCAAAAGAGAACTGCAATG	81 bp	Reder et al., 2020
	Primer r	GTTTGCAGCTCTGTGCATAACTG		
	Sonde	**[JOE]-**AGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTAC**-[BHQ1]**		
HPV16 E7	Primer f	CAGCTCAGAGGAGGAGGATG	67 bp	Reder et al., 2020
	Primer r	GTAATGGGCTCTGTCCGGT		
	Sonde	**[FAM]-**AGATGGTCCAGCTGGACAAGCAGAACCGG**-[BHQ1]**		
Homo sapiens HBB	Primer f	CAGAAAGTGGTGGCTGGTG	70 bp	Sequenz selbst bestimmt (Wagner, S.)
	Primer r	GGACAGCAAGAAAGCGAGC		
	Sonde 1	**[Atto550]-**AATGCCCTGGCCCACAAGTATCACTAAGC**-[BHQ2]**		
	Sonde 2	**[TX]-**AATGCCCTGGCCCACAAGTATCACTAAGC**-[BHQ2]**		
	Sonde 3	**[Cy5]-**AATGCCCTGGCCCACAAGTATCACTAAGC**-[BHQ2]**		

Homo sapiens RPP30	Primer f	AGATTTGGACCTGCGAGCG	65 bp	Vogels et al., 2020 Zhen & Berry, 2020
	Primer r	GAGCGGCTGTCTCCACAAGT		
	Sonde 1	**[TAMRA]-**TTCTGACCTGAAGGCTC TGCGCG**-[BHQ2]**		
	Sonde 2	**[TX]-**TTCTGACCTGAAGGCTCTGC GCG**-[BHQ2]**		
	Sonde 3	**[Cy5]-**TTCTGACCTGAAGGCTCTG CGCG**-[BHQ2]**		

Atto550 = Rhodamine-6G-Derivat; BHQ = *Black Hole Quencher*; bp = Anzahl der Basenpaare; f = *forward*; FAM = Carboxyfluorescein; HBB = Hämoglobin, Beta-Untereinheit; JOE = 6-Carboxy-40,50-dichloro-20,70-dimethoxyfluorescein; r = *reverse;* RPP30 = Ribonuclease P, p30 Untereinheit; TAMRA = Carboxytetramethylrhodamin; TX (*Texas Red)* = Sulforhodamin-101-sulfonyl-Chlorid.

2.2 Herstellung eines Kontrollplasmids

Bei Plasmiden handelt es sich um zirkuläre doppelstränge DNA, welche frei im Zytoplasma außerhalb des genomischen Erbguts von Bakterien vorliegt. Sie sind durch einen Replikationsursprung (*origin of replication*) und Selektionsmarker wie bestimmte Antibiotikaresistenzen charakterisiert. Im Rahmen der molekularen Klonierung dienen Plasmide als Vektoren, in welches die zu untersuchenden Gene (*genes of interest,* GOI) eingefügt werden (Quail, 2005). Zur Herstellung eines geeigneten Kontrollplasmids für die Versuche in dieser Arbeit (Abb.3) wurde das bereits vorhandene Plasmid pcDNA3.1 mit Ampicillin Resistenz und den Sequenzabschnitten der HPV16 Genen E6 und E7 als Vektor verwendet, in welches Sequenzabschnitte der humanen Referenzgene HBB (Hämoglobin, Beta-Untereinheit) und RPP30 (Ribonuclease P, p30 Untereinheit) inseriert werden sollten. Als Ausgangsmaterial wurde zunächst der Vektor aus der Bakterienkultur isoliert (Abschnitt 2.2.1). Ein synthetischer DNA-Strang mit den zu inserierenden Sequenzabschnitten von HBB und RPP30 (Insert) wurde bei Eurofins Genomics bestellt (Abschnitt 12.1). Anschließend wurden sowohl der Vektor als auch das Insert mit einem Restriktionsenzym verdaut (Abschnitt 2.2.2), um daraufhin miteinander ligiert zu werden (Abschnitt 2.2.3). Im Rahmen der Elektrotransformation erfolgte die Aufnahme und Replikation des synthetisierten Kontrollplasmids durch die Bakterien (Abschnitt 2.2.4). Im Anschluss erfolgte erneut die Isolation und Aufreinigung des hergestellten Kontrollplasmids mittels Plasmid-Präparation (Abschnitt 2.2.1).

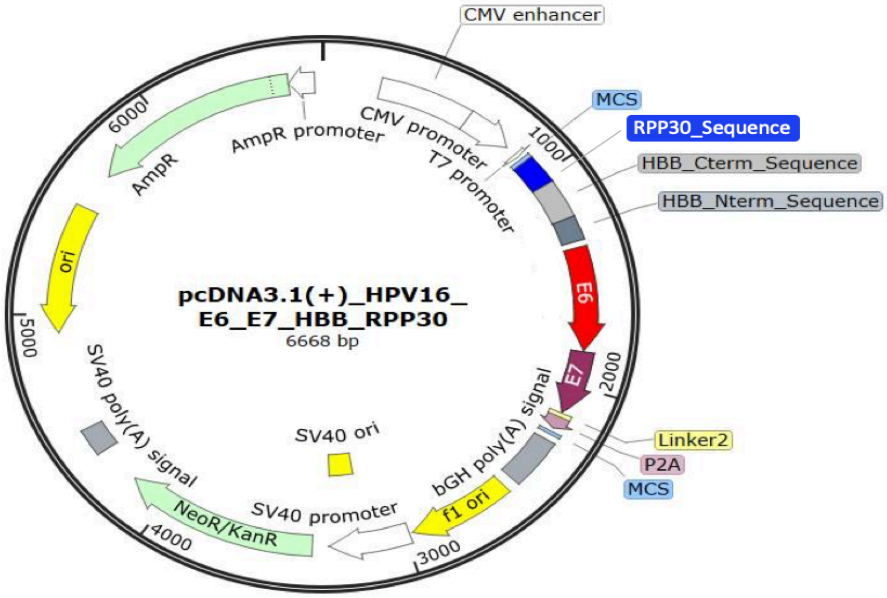


Abbildung 3: Schema des Kontrollplasmids. AmpR = Ampicillin Resistenz; bp = Basenpaare; MCS = *multiple cloning site*; NeoR/ KanR = Neomycin/ Kanamycin Resistenz; ori = *origin of replication*. Abbildung erstellt mit SnapGene.

2.2.1 Plasmid-Isolierung

2.2.1.1 Plasmid Mini-Präparation

Die Gewinnung und Aufreinigung der Plasmide aus der Bakterienkultur erfolgte mit dem *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) nach dem Herstellerprotokoll. Im Folgenden wird der allgemeine Ablauf der Plasmid-Isolierung mit den laborinternen Änderungen erläutert. Pro Ansatz wurden die Bakterien in 3 ml Standard-I-Medium unter Standardbedingungen (37 °C, 180 rpm) über Nacht kultiviert und die Zellen am nächsten Tag durch Zentrifugation geerntet. Zu dem in Puffer resuspendierten Bakterienpellet wurde der Lysepuffer hinzugegeben, wodurch die Zellmembran und -wand zerstört und die Nukleinsäuren in Lösung freigesetzt wurden. Das Lysat wurde nach der Neutralisierung durch einen zusätzlichen Zentrifugationsschritt bei maximaler Geschwindigkeit für 1 Minute geklärt und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun folgte die im Protokoll beschriebene 10-minütige Zentrifugation, bei dem Zelltrümmer und Proteine pelletiert wurden. Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine Säule des Kits (*QIAprep 2.0 Spin Column*) gegeben und somit daran gebunden. An dieser Stelle wurde eine zusätzliche Zentrifugation für 1 Minute bei 300 g durchgeführt bevor mit der im Protokoll angegebenen hohen Geschwindigkeit zentrifugiert wurde. Zur Entfernung weiterer Verunreinigungen fanden 2 Waschschritte gemäß Protokoll statt. Anschließend wurden 40 µl des Elutionspuffers (EB) auf die Säule gegeben, um die Plasmid-DNA von der Säulenmatrix zu lösen. Es folgten eine 2-minütige Standzeit und ein letzter Zentrifugationsschritt zur Gewinnung des Eluates.

2.2.1.2 Plasmid Midi-Präparation

Zur Gewinnung einer größeren Menge an Plasmidmaterial wurde eine Präparation mit dem *Plasmid Midi Kit* (QIAGEN) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei die laborinternen Änderungen des Herstellerprotokolls im Folgenden genauer beschrieben werden. Pro Ansatz wurden die Bakterien in 25 ml Standard-I-Medium mit Ampicillin (c = 100 µg/ml) unter Standardbedingungen über Nacht inkubiert. Das Ernten der Zellen erfolgte durch Zentrifugation bei 1800 g und 6 °C für 10 Minuten. Das Zellpellet wurde anschließend mit den Lysepuffern versetzt und der gesamte Ansatz auf Eis inkubiert. Abweichungen vom Herstellerprotokoll ergaben sich bei den weiteren Schritten durch eine Zentrifugation bei 12000 g und 6 °C anstelle der vorgegebenen >20000 g und 4 °C. Der plasmidhaltige Überstand wurde dann auf eine Säule des Kits (*QIAGEN-tip 100*) gegeben und an die Matrix während des Durchlaufens gebunden. Es folgten 2 Waschvorgänge, bevor die DNA aus der Säule eluiert wurde. Durch Zugabe von Isopropanol und sofortiger Zentrifugation wurden die Nukleinsäuren präzipitiert und zeigten sich als milchiges Pellet. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 70%igen Alkohol gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nach vorsichtigem Abnehmen des Überstandes wurde das DNA-Pellet über Nacht im verschlossenen PCR-Kabinett getrocknet und zuletzt in 300 µl Elutionspuffer EB aufgenommen. Die finale Elution der Plasmid-Präparation diente als Stammlösung zur Herstellung von Verdünnungsreihen (Abschnitt 2.2.7).

2.2.2 Restriktion und Aufreinigung von Vektor- und Insert-DNA

Mithilfe von Restriktionsenzymen lässt sich die zirkuläre (*supercoiled*) Plasmid DNA zerschneiden und somit linearisieren. Für die Klonierung des Kontrollplasmids wurden sowohl der Vektor als auch das Insert mit dem Enzym HindIII verdaut, um für die Einfügung des Inserts geeignete Schnittstellen bzw. Anknüpfpunkte zu schaffen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Restriktionsansatz von Vektor- und Insert-DNA mit HindIII

Komponente	Vol. (µl)
10x *Cut Smart* Puffer	3
HindIII	1
DNA	x
ddH_2O	ad 30

ddH_2O = doppel destilliertes Wasser.

Für die Restriktion wurden 40 ng des Vektors pcDNA3.1 mit den HPV16 Genen E6 und E7 aufbereitet, von dem synthetisierten DNA-Strang mit Sequenzabschnitten für die Gene RPP30 und HBB jeweils 100 ng. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 3 Stunden. Nach einer Stunde wurde der Vektor zusätzlich mit 1 µl Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP; 1000 U/ml) dephosphoryliert, um eine erneute Ausbildung der zirkulären Plasmidstruktur (ohne eingefügtes Insert) zu verhindern. Die Enzyminaktivierung erfolgte anschließend bei 80 °C für 20 Minuten.

Die anschließende Aufreinigung der Restriktionsprodukte diente der Entfernung von Salzen und Enzymresten vor der Ligation der DNA. Dies erfolgte mit dem *Monarch PCR Cleanup Kit* (NEB) nach dem Herstellerprotokoll. Hierfür wurden der Vektor pcDNA3.1 mit den HPV16 Genen E6 und E7 sowie das Insert mit Sequenzabschnitten für die Gene RPP30 und HBB mit einer geeigneten Menge an DNA *Cleanup Binding* Puffer versetzt (Vektor:Puffer 2:1 sowie Insert:Puffer 5:1). Anschließend wurde der Ansatz auf eine Säule des Kits gegeben und zentrifugiert (für alle Schritte stets bei 16000 g und für 1 Minute). Anschließend folgten 2 Waschvorgänge mit 200 µl *DNA Wash Buffer*. Die Nukleinsäuren wurden mit 15 µl Elutionspuffer versetzt und nach 1 Minute Einwirkungszeit durch Zentrifugation eluiert. Als Zusatz zum Herstellerprotokoll wurde der erste Durchlauf der Elution erneut auf die Säule gegeben und zentrifugiert, um die Ausbeute zu erhöhen.

2.2.3 Ligation von Vektor- und Insert-DNA

Für die Ligation von Vektor- und Insert-DNA wurden beide DNA-Fragmente in einem molaren Verhältnis von 3:1 gemischt (nach den Empfehlungen des Herstellers bis 50 ng Vektor-DNA und 37,5 ng Insert-DNA pro 20 µl Reaktion). Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch die T4-Ligase bei Raumtemperatur miteinander verbunden (Tabelle 12). Der Ligationsansatz wurde anschließend mit einer Butanolfällung von Salzen befreit, um eine Elektrotransformation (Abschnitt 2.2.4) zu ermöglichen.

Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Ligation von Vektor- und Insert-DNA mit T4 Ligase

Komponente	Vol. (µl)
T4 10x Puffer	2
T4 Ligase	1
Vektor	3,5
Insert	1,8
ddH_2O	ad 20

ddH_2O = doppel destilliertes Wasser.

2.2.4 Herstellung kompetenter Bakterien und Elektrotransformation

Als Wirtszellen für die Klonierung wurden Bakterien des E. coli Stamms NEB 5-alpha verwendet. Diese wurden unter Standardbedingungen in flüssigem oder auf festem Medium kultiviert. Zur Vorbereitung auf die Elektrotransformation müssen zunächst kompetente Bakterienzellen hergestellt werden, welche Nukleinsäuren aufnehmen können. Dafür wurde 1,5 ml Standard-I-Medium mit 60 µl einer Übernacht-Kultur beimpft und unter Standardbedingungen bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) zwischen 0,6 und 0,8 inkubiert. Diese OD_{600}-Werte gehen mit der exponentiellen Wachstumsphase der Bakterien einher. Es folgten drei Waschvorgänge der Zellen mit jeweils 1ml ddH_2O und einer 2-minütigen Zentrifugation bei 5000 rpm. Für die anschließende Elektrotransformation oder auch Elektroporation wurden die Zellen in 40 µl ddH_2O aufgenommen und mit 1-2 µl Plasmid-DNA versetzt. Nach Überführung in eine Elektrotransformations-Küvette wurde mit dem Programm für E. coli „Ec2“ transformiert und eine Spannung von 2500 V für wenige Millisekunden angelegt. Dadurch wird die Zellwand der Bakterien permeabel und die Plasmid DNA kann in die Zellen eindringen. Die sofortige Hinzugabe von 1 ml Standard-I-Nährmedium zu dem transformierten Ansatz ermöglichte, dass die Bakterien den Schock der osmotischen und elektrischen Behandlung überstehen. Nach einer 1-stündigen Inkubationsphase wurde der Transformationsansatz anschließend auf einer Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert. Hierdurch erfolgte eine gezielte Selektion der Bakterien, die im Rahmen der Elektrotransformation das synthetisierte Kontrollplasmid mit der Ampicillin Resistenz aufgenommen haben. Anschließend erfolgte erneut die Anzucht der Bakterien mit der Isolation und Aufreinigung des synthetisierten Kontrollplasmids durch Plasmid-Präparation (Abschnitt 2.2.1). Zur Überprüfung der Richtigkeit des Kontrollplasmids erfolgte zunächst eine Restriktionsanalyse zur Identifizierung von Klonen bei denen die Gene der Inserts im Plasmid aufgenommen wurden, gefolgt von einer Sequenzierung der Plasmid-DNA zur Verifizierung der Nukleinsäuresequenz.

2.2.5 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ermöglicht unter anderem die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. Hiermit wurde die isolierte und aufgereinigte Plasmid- und später auch die Zellkultur-DNA auf eine mögliche RNA-Kontamination überprüft und der Erfolg einer konventionellen PCR-Messung anhand des korrekten Migrationsverhalten kontrolliert. Üblicherweise wurden 1% Agarose- und 10% Polyacrylamid Gele sowie 1x konzentrierte TBE-Lösung als Puffer verwendet. Die zu untersuchenden Proben wurden mit einem Glyzerin und Bromphenol-/Xylencyanol-enthaltenden Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Als Referenz für die Fragmentgröße wurden 3 µl eines

DNA-Markers mit definierter Basenanzahl aufgetragen. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 100 V wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle durch die Poren des Gels in Richtung Anode. Die Laufweite im Gel ist dabei umgekehrt proportional zu der Größe des DNA-Fragments. Nach dem Gellauf erfolgte eine Färbung der Nukleinsäuren mit Midori Green ©, um die Banden unter UV-Licht zu visualisieren. Die Versuchsbedingungen sind für beide Trägermedien in Tabelle 13 und 14 dargestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung 1% Agarose Gel

Taschenanzahl	Agarose	1x TBE
8	200 mg	20 ml
15	280 mg	28 ml

TBE = Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer.

Tabelle 14: Zusammensetzung 10% Polyacrylamid Gel

Komponente	Vol.
40% Polyacrylamid	5 ml
10x TBE	2 ml
ddH_2O	13 ml
6% APS	160 µl
TEMED	16 µl

APS = Ammoniumpersulfat; ddH_2O = doppel destilliertes Wasser;
TBE = Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat-Puffer; TEMED = Tetramethylethylendiamin.

2.2.6 Glyzerin Stocks

Zur langfristigen Lagerung der Bakterienkulturen mit dem synthetisierten Kontrollplasmid wurden sogenannte „Glyzerin Stocks“ für eine Arbeitskultur sowie zwei Lagerungskulturen hergestellt. Dafür wurden jeweils 3 Mal 2 ml einer Übernacht-Kultur für 10 Minuten bei 2500 g und 8 °C pelletiert. Unter sterilen Bedingungen wurde 250 µl (Arbeitskultur) und 500 µl (Lagerungskultur) 50% Glyzerin in die Kryoröhrchen vorgelegt. Die 3 Zellsedimente wurden anschließend mit 500 µl Standard-I-Medium resuspendiert und mit dem vorgelegten Glyzerin gründlich gemischt. Anschließend wurden alle Kulturen in flüssigem Stickstoff schockgefrostet. Für die langfristige Lagerung wurden 2 Kulturen bei -80 °C aufbewahrt, während die Arbeitskultur für die kurzfristige Verwendung bei -20 °C eingefroren wurde.

2.2.7 Herstellung von Verdünnungsreihen des Kontrollplasmids

Die finale Elution der Plasmid-Präparation diente als Stammlösung für die Herstellung einer 10-fachen Verdünnungsreihe. Hierfür wurde zunächst der DNA-Gehalt der Elution mittels NanoDrop Spektralphotometer bestimmt. Anhand des UV-Absorptionsspektrums wird die Probenqualität beurteilt und die Konzentration der aufgereinigten Nukleinsäuren in ng/µl ermittelt. Das $A_{260/280}$ Reinheitsverhältnis beschreibt die Extinktionswerte bei 260 nm zu 280 nm und sollte als Indikator für die Qualität von DNA-Proben zwischen 1,8 bis 2 liegen. Mithilfe des *NEBioCalculator* wurde anschließend bei bekannter Nukleotidsequenz die mittels Spektralphotometer bestimmte Masse in die Anzahl der DNA-Kopien umgerechnet. Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe wurde die ermittelte Kopienzahl der Elution mit ddH_2O auf ein Endvolumen von 100 µl und einer Konzentration von 10^n (n = 1, 2, 3, etc.) Kopien pro µl verdünnt. Das Eluat wurde in einem 1,5 ml *DNA LoBind* ® Reaktionsgefäß bei -20°C gefroren und die Verdünnungsreihe für Wiederholungen von Experimenten frisch angesetzt.

2.2.8 Restriktion des Kontrollplasmids

Für die PCR-Assay-Optimierung wurde die Auswirkung der Plasmid-Restriktion auf die qPCR und dPCR untersucht. Bei der Wahl der Restriktionsenzyme EcoRI, HindIII und NdeI wurde anhand der Sequenzdaten des Kontrollplasmids sichergestellt, dass die Schnittstellen nahe am Bereich der Zielgene, jedoch außerhalb der Sequenz liegen, die für die Primer-/ Sonden-Hybridisierung und Amplifikation der PCR relevant sind. Die Enzyme lagen als Enzym-Mix im Verhältnis 1:1:1 in einer Konzentration von jeweils 6,7 U/µl vor. Das Kontrollplasmid wurde mit dem Enzym-Mix bei 37 °C für 2 Stunden inkubiert. Anschließend folgte die Enzym-Inaktivierung bei 80 °C für 20 Minuten. Von dem linearisiertem Kontrollplasmid wurde eine 10-fache Verdünnungsreihe hergestellt und diese für Wiederholungen von Experimenten erneut frisch angesetzt.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Kultivierung von Zelllinie UM-SCC-104

Die humane Tumorzelllinie UM-SCC-104 stammte von einem Patienten mit HPV16-positiven Mundhöhlenkarzinom und zeichnet sich durch eine einzige Kopie der HPV16-DNA pro Zelle aus, die in das humane Genom integriert ist (Akagi et al., 2014; Tang et al., 2012). Die Tumorzelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Thomas E. Carey (*University of Michigan, Ann Arbor*, MI) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte mit RPMI-Vollmedium (Tabelle 15) unter Standardbedingungen (5% CO_2, 37 °C) und regelmäßiger mikroskopischer Kontrolle.

Tabelle 15: Zusammensetzung RPMI-Vollmedium

Zusammensetzung (%)	Substanz	Vol. (ml)
87	RPMI-1640-Medium	100
10	Fetales Bovines Serum (FBS)	11,5
1	Gentamicin	1,15
1	Nicht essenzielle Aminosäuren	1,15
1	L-Glutamin	1,15

Die Passage der Zellen erfolgte ab einer Konfluenz von etwa 70%. Hierfür wurde RPMI-Vollmedium auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit DPBS gewaschen und mit einer geeigneten Menge (gemäß Herstellerangaben der verwendeten Kulturgefäße) an Trypsin versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Brutschrank bis zur Trübung und somit Zelllösung vom Kulturgefäß. Die Reaktion wurde mit der 3- bis 4-fachen Menge an RPMI-Vollmedium bezogen auf die Trypsinmenge gestoppt und die Zellsuspension für 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in einer definierten Menge frischem Kulturmedium resuspendiert. Für die Zellzählung wurden anschließend 10 µl der Zellsuspension auf einen C-Chip aufgetragen und mithilfe des *CellDrop FL* ausgelesen oder manuell ausgezählt. Daraufhin wurde die gewünschte Zellzahl errechnet und die entsprechende Menge Zellsuspension mit einem geeigneten Volumen an Kulturmedium für die verwendeten Kulturgefäße verdünnt und neu ausgesät.

2.3.2 DNA-Isolierung aus kultivierten Zellen

Die DNA aus den kultivierten Zellen wurde mit dem *DNeasy Blood and Tissue Kit* (QIAGEN) nach dem Herstellerprotokoll *Purification of Total DNA from Animal Blood or Cells (Spin-Column Protocol)* extrahiert. Im Folgenden wird der Vorgang vereinfacht zusammengefasst. Die mit Trypsin abgelösten Zellen wurden pelletiert und in PBS Puffer resuspendiert. Es folgten die Zugabe von Proteinase K und RNase A (100 mg/ml) und eine 2-minütigen Inkubationszeit. Anschließend kam der Lysepuffer hinzu. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 56 °C wurde 200 µl 100%iges Ethanol hinzu pipettiert und alles gemischt. Der gesamte Ansatz wurde auf eine Säule des Kits (*DNeasy Mini spin column*) gegeben und zentrifugiert. Es folgten 2 weitere Wasch- und Zentrifugationsvorgänge. Zur Elution der gebundenen Nukleinsäuren wurden 200 µl Puffer AE auf die Säule gegeben und nach 1 Minute Ruhezeit für 1 weitere Minute bei 13300 g zentrifugiert. Der Durchfluss mit der ersten DNA-Elution wurde nochmals auf die Säule gegeben und der Elutionsvorgang wiederholt, um die Ausbeute zu erhöhen.

2.3.3 Herstellung von Verdünnungsreihen mit DNA aus kultivierten Zellen

Die finale Elution der DNA-Extraktion diente als Stammlösung für die Herstellung einer Verdünnungsreihe (Faktor 1:2 oder 1:10). Die DNA-Konzentration des Eluats wurde mittels Spektralphotometer bestimmt. Bei bekanntem DNA-Gehalt von etwa 6 pg eines diploiden humanen Genoms wurde die ermittelte Konzentration der Zellkultur-DNA von ng/µl in Kopien/µl umgerechnet. Zur Herstellung einer Verdünnungsreihe (Faktor 1:2 oder 1:10) erfolgte eine sequentielle Verdünnung auf ein Endvolumen von 100 µl. Das Eluat wurde in einem 1,5 ml *DNA LoBind* ® Reaktionsgefäß bei -20°C tiefgefroren und die Verdünnungsreihe für Wiederholungen von Experimenten frisch angesetzt.

2.4 *Liquid Biopsy*

2.4.1 Bearbeitung und Lagerung von Patientenplasma

Die untersuchten *Liquid Biopsy* Proben stammten von Patienten mit HPV-positiven (n = 17) sowie HPV-negativen (n = 14) Oropharynxkarzinomen, welche zwischen 2015 und 2022 am Universitätsklinikum Gießen in der Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde behandelt wurden. Alle in dieser Arbeit behandelten Proben wurden zum Zeitpunkt vor Therapiebeginn entnommen. Die Gewinnung der Blutproben von Patienten mit Oropharynxkarzinomen basierte auf dem Ethikvotum AZ.:95/15 der Sitzung vom 25.06.2015. Eine Aufklärung mit schriftlichem Einverständnis der Patienten wurde vor der Blutentnahme durchgeführt. Für die *Liquid Biopsy* wurden spezielle Plasmaröhrchen (*Cell-Free DNA Blood Collection Tubes*) verwendet. In der Regel wurden die Proben innerhalb von 24 Stunden bearbeitet und dafür bei 16 °C und 515 g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend in Portionen à 2 ml in *DNA LoBind* ® Gefäßen aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Flüssigbiopsien erfolgte nach der Verfügbarkeit von ausreichendem Probenmaterial. Hinsichtlich der Patienten- und Tumorcharakteristika sollte die Auswahl möglichst die gesamte Patientenkohorte in Gießen widerspiegeln (Wagner et al., 2020). Der HPV-Status wurde zuvor anhand der Gewebebiopsie sowohl durch Nachweis von p16 mittels Immunhistochemie als auch durch Nachweis von HPV-DNA mittels PCR bestätigt.

2.4.2 cfDNA Extraktion

Die Extraktion zellfreier Nukleinsäuren aus dem Plasma erfolgte mit dem *Plasma/ Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit* (Norgen) nach den Herstellerangaben. Der Vorgang mit den laborinternen Änderungen wird im Folgenden zusammengefasst. Von jedem Patienten wurden 500 µl Plasma für die nachfolgende Extraktion verwendet. Gefrorene Proben wurden nach dem vollständigen Auftauen für 2 Minuten bei 400 g und

4 °C zentrifugiert. Dann erfolgte die Zugabe von Proteinase K und der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 60°C inkubiert. Anschließend kam 1 ml *Binding Buffer B* hinzu. In 3 Durchläufen wurden jeweils 500 µl des Reaktionsansatzes auf die erste Säule (*Mini Spin Column*) gegeben und zentrifugiert. Dabei wurde die cfDNA an die Säule gebunden. Daran schlossen sich 3 Waschschritte an. Die leere Säule wurde anschließend in ein frisches 1,7 ml Elutionsgefäß überführt. Es folgte eine erste Elution mit 100 µl *Elution Buffer B* nach einer Einwirkzeit von 4 Minuten anstelle der vorgegebenen 2 Minuten. Anschließend folgten 2 Zentrifugationsschritte gemäß Protokoll. Zu der eluierten DNA kamen 300 µl *Binding Buffer B* hinzu und die gesamte 400 µl Lösung wurde anschließend auf die zweite Säule (*Micro Spin Column*) gegeben. Nach 2 weiteren Waschvorgängen wurde die leere Säule wiederum in ein frisches 1,7 ml Elutionsgefäß überführt. Die finale Elution erfolgte mit 34 µl *Elution Buffer B* nach 4 Minuten bei Raumtemperatur anstelle der vorgegebenen 2 Minuten. Die extrahierte cfDNA wurde auf zwei Aliquots à 17 µl aufgeteilt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Umrechnung von qPCR Kopien pro Reaktion in Kopien pro ml Plasma

Die Quantifizierung der cfDNA von Patientenproben mittels qPCR erfolgte relativ zu einer 10-fachen Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration des linearisierten Kontrollplasmids (Abschnitt 2.5.1, Formel 2 und 3). Die ermittelten Kopien pro µl eingesetzter Probe wurden im nächsten Schritt mit dem Volumen des Eluats (34 µl) multipliziert. Da das Eluat aus 0,5 ml Patientenplasma stammt, erfolgte im letzten Schritt die Multiplikation mit 2, um so die Kopien pro ml Plasma zu erhalten.

2.4.4 Umrechnung von dPCR Kopien pro Reaktion in Kopien pro ml Plasma

Die absolute Quantifizierung der Patientenproben mittels dPCR erfolgte durch die Gerätesoftware auf statistischer Grundlage der Poisson-Verteilung. Die gemessenen Kopien pro µl dPCR Reaktion wurden bei bekanntem Volumen des eingesetzten Reaktionsansatzes und der DNA-Probe entsprechend in Kopien pro µl Probe umgerechnet (Abschnitt 2.5.2, Formel 5 bis 8). Die ermittelten Kopien pro µl eingesetzter Probe wurden im nächsten Schritt mit dem Volumen des Eluats (34 µl) und mit 2 (0,5 ml Patientenplasma) multipliziert, um so die Kopien pro ml Plasma zu erhalten.

2.5 PCR

In Hinsicht auf die Entwicklung eines Multiplex Assays wurde für jedes der nachzuweisenden Gene E6, E7, HBB und RPP30 eine Sonde mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen (nachfolgend vereinfacht Farbstoff genannt) gewählt (Abschnitt 1.4.1). Die qPCR mit dem *StepOnePlus™ Real-Time PCR* Gerät verfügt über

4 verschiedene Farbkanäle (grün, gelb, orange und rot). Da bei der qPCR das Emissionsspektrum des passiven Referenzfarbstoff (ROX) dem roten Kanal entspricht, bleiben somit die übrigen drei Kanäle zur Detektion unterschiedlicher Farbstoffe. Für die dPCR mit dem *QIAcuity® Digital PCR* System sind 5 verschiedene Farbkanäle mit Emissionsspektra im Bereich von grün, gelb, orange, rot und violett verfügbar, sowie ein separater Referenzkanal für ROX. Die verschiedenen Farbkanäle sowie die entsprechenden Farbstoffe der Sonden sind nach ihrer Verfügbarkeit mit dem qPCR- bzw. dPCR-Gerät in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Überblick der verfügbaren Farbkanäle und Farbstoffen mit den entsprechenden Zielgenen

Farbkanal	Farbstoff	Emissions-maximum	Gen(e)	qPCR	dPCR
Grün	FAM	520 nm	E7	ja	ja
Gelb	JOE	548 nm	E6	ja	ja
Orange	Atto550	576 nm	HBB	ja	ja
	TAMRA	576 nm	RPP30	ja	ja
Rot	*Texas Red* (TX)	603 nm	HBB RPP30	nein	ja
Violett	Cy5	670 nm	HBB RPP30	nein	ja

Tabelle adaptiert aus „*Spectra of available Fluorescent Dyes*“ (Eurofins Genomics, 2014).

2.5.1 Quantitative PCR (qPCR)

Das Reaktionsvolumen eines qPCR Ansatzes betrug 15 µl. Jeder Ansatz wurde in drei technischen Replikaten gemessen und bei jeder Messreihe eine positive und negative Kontrolle (*no template control*, NTC) inkludiert. Als positive Kontrolle diente das hergestellte Kontrollplasmid bzw. DNA der Zelllinie UM-SCC-104. Für jeden Versuch wurde ein Mastermix aus 2x Luna *Universal Probe qPCR MM*, Primer, Sonde und HLPC H_2O hergestellt und zur Erstellung der einzelnen Ansätze genutzt. Für jedes Primerpaar wurde eine Arbeitslösung hergestellt aus Vorwärts- (*forward, f)* und Rückwärtsprimer (*reverse, r)* im Verhältnis 1:1 und in einer Konzentration von jeweils 10 µM. Die Sonden lagen ebenso in einer Arbeitskonzentration von 10 µM vor. Vom Nachweis eines einzelnen Zielgens (Monoplex Messung) wurde schrittweise auf einen Multiplex Assay zum simultanen Nachweis mehrerer Zielgene übergegangen. Die finalen Konzentrationen eines Multiplex-Reaktionsansatzes sind in Tabelle 17 aufgeführt.

Tabelle 17: Zusammensetzung eines Standard qPCR Reaktionsansatz

Komponente	Finale Konzentration	Vol. (µl)
2x *Luna Universal Probe* MM	1x	7,5
10 µM Primer 1 f, r (1:1 Mix)	0,4 µM	0,6
10 µM Primer 2 f, r (1:1 Mix)	0,4 µM	0,6
10 µM Primer 3 f, r (1:1 Mix)	0,4 µM	0,6
10 µM Sonde 1	0,2 µM	0,3
10 µM Sonde 2	0,2 µM	0,3
10 µM Sonde 3	0,2 µM	0,3
DNA-Probe		2-5
HLPC H_2O		ad 15

f = *forward. r = reverse.*

2-5 µl der DNA-Probe wurden jeweils in eine 96-*Well* Platte mit 10-13 µl des Mastermix versetzt. Anschließend wurde die Platte versiegelt und zentrifugiert. Die Messungen wurden mit der *StepOnePlus™ Real-Time PCR* unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt (Tabelle 18).

Tabelle 18: qPCR Ablauf

Schritt	Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1 x	95	1:00
Denaturierung	40 x	95	0:15
Hybridisierung und Polymerisation		60	0:30

Zur Optimierung der qPCR wurde zunächst für jedes Primerpaar ein Temperaturgradient durchgeführt, um optimale Hybridisierungstemperaturen für ein Multiplex Assay zu etablieren. Zur Bestimmung der Primer Effizienz wurde eine 10-fache Verdünnungsreihe des Kontrollplasmids gemessen. Durch Auftragen der Cq-Werte auf der y-Achse und der logarithmierten rechnerischen Anzahl der eingesetzten Kopien auf der x-Achse lässt sich graphisch eine Regressionsgerade mit der Funktion y = mx + b (m: Steigung, b: y-Achsenabschnitt) generieren. Bei der Erstellung der Regressionsgerade wurden nur Cq-Mittelwerte (MW) aus einer Triplikat-Messung mit einer Standardabweichung (*standard deviation,* SD) <0,5 berücksichtigt. Mithilfe der linearen Steigung m der Funktionsgleichung berechnet sich die Effizienz der qPCR wie folgt (Formel 1).

Formel 1: Berechnung der qPCR Effizienz (E)

$$\mathrm{E} = (10^{-1/\mathrm{m}} - 1)\, x\, 100\ [\%]$$

Für die relative Quantifizierung eines Gens unbekannter Menge benötigt man Messwerte einer Verdünnungsreihe eines Referenzgens mit bekannter Konzentration. Anhand der Regressionsgerade des Referenzgens lässt sich die Kopienanzahl eines Zielgens pro Reaktion (Formel 2), sowie bei bekannten Volumen der DNA-Probe (2-5 µl) die Konzentration der Kopien pro µl Probe (Formel 3) berechnen.

Formel 2: Bestimmung der Kopienanzahl pro qPCR Reaktion anhand der Regressionsgerade

$$\text{Kopienanzahl pro qPCR Reaktion} = 10^{\frac{Cq-b}{m}} \text{ [Kopien/Reaktion]}$$

Formel 3: Bestimmung der Konzentration von Kopien pro µl Probe in qPCR

$$\text{Konzentration von Kopien pro µl Probe in qPCR} = \frac{\text{Kopienanzahl pro qPCR Reaktion}}{\text{eingesetzes Volumen der DNA-Probe}} \text{ [Kopien/µl]}$$

Die Intra-Assay-Variabilität der qPCR-Messwerte wurde anhand der Standardabweichung der Cq-Werte von drei technischen Replikaten beurteilt. Für jeden Lauf wurde der Cq-Mittelwert (MW) von drei technischen Replikaten als valide bewertet, sofern die Standardabweichung SD <0,5 Zyklen betrug. Wenn innerhalb der drei Replikate zwei Cq-Werte eng beieinander lagen und der dritte >0,5 Zyklen entfernt war, wurde dieser als Ausreißer betrachtet und ein Cq-Mittelwert über die verbleibenden zwei Replikate berechnet (Maussion et al., 2021; Nolan et al., 2006; Ruiz-Villalba et al., 2021). Die Inter-Assay-Variabilität der qPCR-Messwerte wurde anhand der relativen Standardabweichung der gemessenen Kopien (Formel 4) über mehrere Messreihen beurteilt (Bustin et al., 2009).

Formel 4: Relative Standardabweichung (rSD) der gemessenen Kopien

$$\text{rSD} = \frac{\text{Standardabweichung der gemessenen Kopien}}{\text{Mittelwert der gemessenen Kopien}} \; x \; 100 \; [\%]$$

2.5.2 Digitale PCR (dPCR)

Für eine dPCR Messung wurde eine „26k 24-*Well*“ Nanoplatte verwendet. Diese zeichnet sich durch 24 Reaktionskammern mit jeweils 26.000 Partitionen pro Reaktionskammer aus (Abschnitt 1.4.2, Abbildung 2). Das Volumen eines Reaktionsansatzes beträgt 40 µl (Tabelle 19). Jeder Ansatz wurde in mindestens zwei technischen Replikaten gemessen. Vom Nachweis eines einzelnen Zielgens (Monoplex Messung) wurde schrittweise auf einen Multiplex Assay zum gleichzeitigen Nachweis mehrerer Zielgene übergegangen.

Tabelle 19: Zusammensetzung eines Standard dPCR Reaktionsansatz

Komponente	Finale Konzentration	Vol. (µl)
4x *QIAcuity® Probe* MM	1x	10
10 µM Primer 1 f, r (1:1 Mix)	0,8 µM	3,2
10 µM Primer 2 f, r (1:1 Mix)	0,8 µM	3,2
10 µM Primer 3 f, r (1:1 Mix)	0,8 µM	3,2
10 µM Sonde 1	0,4 µM	1,6
10 µM Sonde 2	0,4 µM	1,6
10 µM Sonde 3	0,4 µM	1,6
Ggf. Restriktions-Enzym-Mix	0,25 Units/µl	0,5
DNA-Probe		2-5
RNase free H2O		ad 40

f = *forward.* r = *reverse.* Restriktions-Enzym-Mix = EcoRI, HindIII, NdeI im Verhältnis 1:1:1

2-5 µl der DNA-Probe wurden in eine 96-*Well* Platte mit 35-38 µl Mastermix versetzt. Anschließend wurde die Platte versiegelt und zentrifugiert. Von den 40 µl wurden anschließend 39 µl mittels Mehrkanalpipette auf die „26k 24-*Well*" Nanoplatte übertragen. Das finale apparativ analysierte Volumen der entsprechenden Platte ergibt sich aus dem Volumen einer Partition multipliziert mit der Anzahl der validen Partitionen. Dies beträgt bei der 26k Nanoplatte maximal 21,6 µl. Somit entfallen 45% der ursprünglichen 39 µl auf ein apparatives Totraumvolumen von 17,4 µl (Bussmann et al., 2022). Die Messungen wurden mit dem *QIAcuity® Digital PCR System* unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt (Tabelle 20).

Tabelle 20: dPCR Ablauf

Schritt	Zyklus	Temperatur (°C)	Dauer (min)
Initiale Denaturierung	1 x	95	2:00
Denaturierung	40 x	95	0:15
Hybridiserung und Polymerisation		60	0:30
Bildgebung	1 x		

Die Detektion des Fluoreszenzsignals der entstandenen PCR-Produkte findet als Endpunkt-Messung jeder einzelnen Partition statt. Zur Optimierung der Bildgebungs-Parameter wurden mehrere Messungen durchgeführt und die Parameter für jeden Farbkanal angepasst. Bei übersättigten Signalen erfolgte eine Reduzierung, bei schwachen Signalen entsprechend eine Anhebung der Belichtungszeit und Verstärkung

(*Gain*). Die finalen Bildgebung-Parameter ergaben folgende Werte für die unterschiedlichen Farbkanäle (Tabelle 21).

Tabelle 21: dPCR Bildgebung Parameter

Farbkanal	Belichtungszeit (ms)	Verstärkung
Grün	350	5
Gelb	350	5
Orange	200	4
Rot	200	4
Violett	300	5

Die Analyse der dPCR-Ergebnisse erfolgt nach unterschiedlichen Aspekten im Menü der Gerätesoftware. In der Signalübersicht wird beispielsweise der Füllungsstatus der einzelnen Wells anhand des Hintergrundsignals beurteilt und das Fluoreszenzsignal jeder einzelnen Partition im jeweiligen Farbkanal visualisiert (Abschnitt 1.4.2, Abbildung 2). Hier werden auch eventuelle Luftblasen und unvollständig gefüllte Wells sichtbar. Die *Scatterplot* Darstellung teilt die Fluoreszenzsignale je nach ihrer Intensität und dem Schwellenwert in positive und negative Partitionen ein. In dieser Darstellung können zudem unspezifische Signale mit intermediärer Fluoreszenzintensität visualisiert werden (Abschnitt 3.2, Abb. 8, 9, 11). Nach einer gegebenenfalls notwendigen Anpassung und Festlegung des Schwellenwerts können im nächsten Schritt die Werte der Quantifizierung betrachtet werden. Die Poisson-Verteilung bildet die Grundlage für die absolute Quantifizierung eines Zielgens mittels digitaler PCR (*QIAcuity® User Manual*, 2022; *QIAcuity® Application Guide: User Manual Extension*, 2023). Hierfür werden zwei Bedingungen vorausgesetzt. Erstens: das Partitionsvolumen ist konstant. Bei der hier verwendeten Platten-basierten dPCR ist das Partitionsvolumen der „26k 24-*Well*" Nanoplatte mit 0,91 nl Produktions-bedingt fest vorgegeben. Zweitens: die Verteilung der DNA-Moleküle auf die einzelnen Partitionen erfolgt per Zufall (The dMIQE Group et al., 2020) und bedingt eine Poisson-Verteilung der Signalintensitäten über alle Partitionen. Die mittlere Kopienanzahl pro Partition (λ) wird berechnet unter Verwendung der Anzahl der negativen (w), positiven (k) und validen Partitionen (n) (Formel 5).

Formel 5: Berechnung der mittleren Kopienanzahl pro Partition (λ)

$$\lambda = -\ln\left(\frac{w}{n}\right) = -\ln\left(1 - \frac{k}{n}\right)$$

Die mittlere Kopienanzahl pro Partition wird im nächsten Schritt mit dem Volumen einer einzelnen Partition verrechnet, um die Konzentration pro µl (λ_{volume}) zu erhalten (Formel 6).

Formel 6: Bestimmung der Konzentration von Kopien pro µl (λ_{volume})

$$\lambda_{volume} = \frac{\lambda}{0{,}91} \text{ x } 1000 \text{ [Kopien/µl]}$$

Bei bekanntem eingesetztem Reaktionsvolumen (39 µl) und eingesetzter Menge an DNA-Probe (2-5 µl) lassen sich zwei weitere Werte bestimmen: die gesamte Kopienanzahl der Reaktion und die Konzentration der Kopienanzahl pro µl Probe (Formel 7 und 8).

Formel 7: Bestimmung der Kopienanzahl pro dPCR Reaktion

$$\text{Kopienanzahl pro dPCR Reaktion} = \lambda_{volume} \text{ x eingesetztes Reaktionsvolumen } [\text{Kopien/Reaktion}]$$

Formel 8: Bestimmung der Konzentration von Kopien pro µl Probe in dPCR

$$\text{Konzentration der Kopien pro µl Probe in dPCR} = \frac{\text{Kopienanzahl pro dPCR Reaktion}}{\text{eingesetzes Volumen der DNA-Probe}} \text{ [Kopien/µl]}$$

Die Intra-Assay und Inter-Assay Variabilität der dPCR-Messungen wurde anhand der relativen Standardabweichung über die Replikate innerhalb einer Messreihe bzw. über mehrere Messreihen hinweg beurteilt (s. Formel 4).

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit IBM SPSS 29. Das Signifikanzniveau entspricht einem p-Wert ≤ 0,05. Die Überprüfung auf Normalverteilung der Daten wurde mit dem Shapiro-Wilk Test durchgeführt. Die Patienten- und Tumorcharakteristika der HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC wurden mithilfe des exakten Tests nach Fisher verglichen. Die Auswertung der gemessenen Kopien E6, E7 und HBB in Abhängigkeit von Tumormerkmalen erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben und Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben. Für die Untersuchung der qPCR- und dPCR-Messung auf einen linearen Zusammenhang wurde der Pearson Korrelationskoeffizient r bestimmt. Zur Überprüfung der qPCR- und dPCR-Messung auf Übereinstimmung wurde mittels Microsoft Excel 2016 die lineare Regressionanalyse nach Passing-Bablok durchgeführt und das Differenzdiagramm nach Bland-Altman erstellt.

2.6.1 Lineare Regression nach Passing-Bablok

Die lineare Regression nach Passing-Bablok gehört zu den nicht-parametrischen Verfahren zum Vergleich von zwei Messmethoden. Zu den Vorteilen des Verfahrens gehört die Robustheit gegenüber Ausreißern sowie die Anwendbarkeit bei nicht-normalverteilten Daten (Abschnitte 3.5.4 und 12.2). Für die lineare

Regressionsgleichung nach Passing-Bablok wird der gewichtete Median der Steigung und des y-Achsenabschnitts verwendet, sowie für beide Regressionsparameter das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall bestimmt (Bablok & Passing, 1985; Bilić-Zulle, 2011; NCSS Statistical Software, 2020; Passing & Bablok, 1983, 1984; Zaiontz, 2024).

2.6.2 Differenzdiagramm nach Bland-Altman

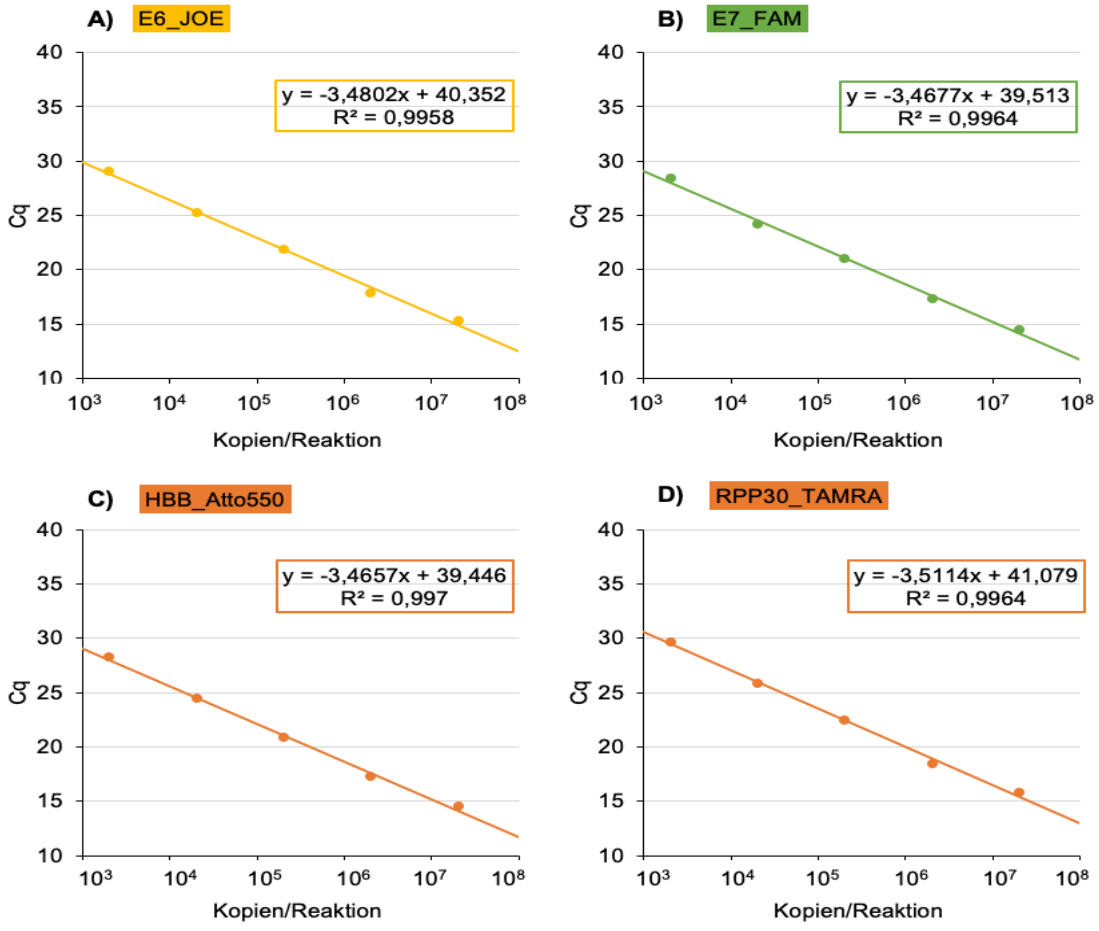
Das Differenzdiagramm nach Bland-Altman stellt die Streuung und die Verzerrung der einzelnen Messwertpaare von zwei Methoden dar (Abschnitte 3.5.5 und 12.3). Auf der x-Achse wird die Streuung der Daten durch den Mittelwert aus beiden Messmethoden dargestellt. Auf der y-Achse wird die Verzerrung durch die Differenzen der Messwerte aus beiden Methoden gezeigt. Die Voraussetzung für den Methodenvergleich nach Bland-Altman ist eine Normalverteilung dieser Differenzen. Dies wurde für alle Proben mittels Shapiro-Wilk Test überprüft und eine Normalverteilung für $p > 0,05$ angenommen (Bland & Altman, 1986, 1999; Giavarina, 2015; Grouven et al., 2007; Shapiro & Wilk, 1965).

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung und analytische Evaluation des qPCR Multiplex Assays

3.1.1 qPCR Versuche im Monoplex

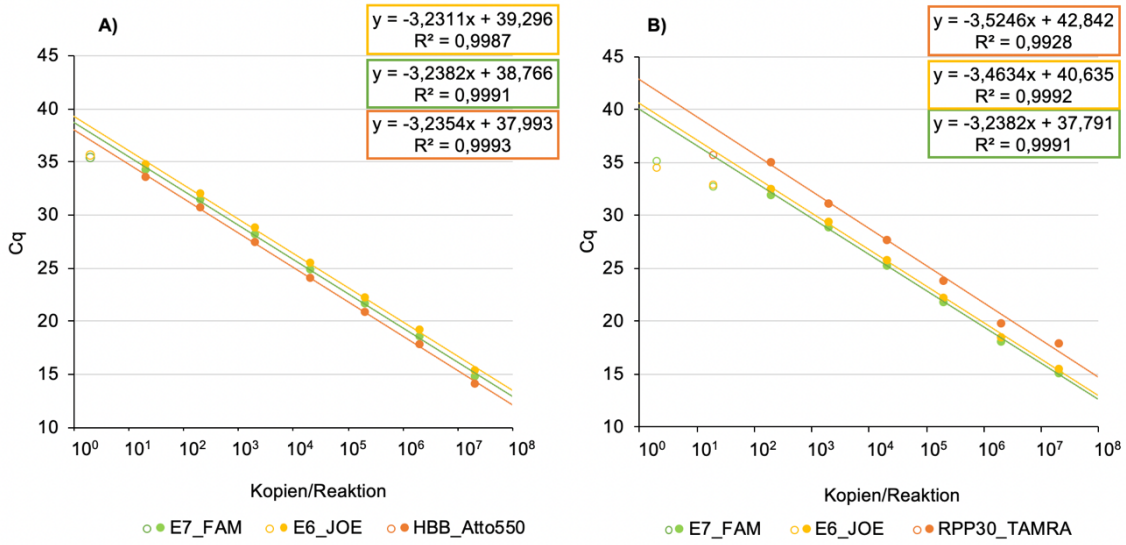
Mittels qPCR Monoplex Assays wurde zunächst die Spezifität und Amplifikations-Effizienz aller Primer- und Sonden-Paare überprüft. Eine Optimierung der PCR-Parameter erfolgte mit dem Ziel eine Effizienz zwischen 90-110% zu erreichen, welches einer Steigung der Regressionsgleichung zwischen -3,6 und -3,1 entspricht. Als Substrat wurde Plasmid-DNA mit den HPV16 Genen E6 und E7 sowie Sequenzabschnitten der humanen Referenzgene HBB und RPP30 (im Folgenden als Kontrollplasmid bezeichnet) verwendet. Beispielhafte Ergebnisse der unterschiedlichen Monoplex Assays zum Nachweis aller vier Gene sind in Abbildung 4 dargestellt. Es wurde jeweils eine 10-fache Verdünnungsreihe des Kontrollplasmids über fünf Konzentrationsstufen gemessen. Die Effizienz der Gene E6, E7, HBB und RPP30 im Monoplex Assay lag bei jeweils 93%, 94%, 94% und 93%.



<u>Abbildung 4:</u> qPCR Messwerte für Kontrollplasmid im Monoplex Assay für E6 (A), E7 (B), HBB (C) und RPP30 (D) mit Regressionsanalyse. Der Cq-Mittelwert von einer Messreihe mit je drei technischen Replikaten wurde für die Regressionsanalyse verwendet. Ausgefüllte Kreise: gültige Messungen (SD<0,5, zwischen 0,01-0,35). Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals des verwendeten Farbstoffs JOE (gelb), FAM (grün), Atto550 (orange) und TAMRA (orange).

3.1.2 qPCR Versuche im Multiplex

Die qPCR-Messung im Monoplex Assay wurde anschließend auf einen Multiplex Assay zum simultanen Nachweis mehrerer Gene erweitert. Für die Etablierung eines Triplex Assays zum Nachweis der HPV16 Gene E6 und E7 zusammen mit einem der humanen Referenzgene HBB oder RPP30 wurden beide Kombinationen getestet. Das Kontrollplasmid wurde in einer 10-fachen Verdünnungsreihe über 8 Konzentrationsstufen ($2x10^7$ bis $2x10^0$) im Triplex Assay gemessen. Für die Kombination aus E6, E7 und HBB zeigte sich eine Effizienz von circa 104% für alle drei Gene. Die Cq-Werte für E6, E7, und HBB lagen im Mittel lediglich <1,5 Zyklen auseinander (Abb. 5A). Bei der Kombination von E6, E7 und RPP30 zeigte sich eine Effizienz von etwa 95% für E6 und E7 sowie von 92% für RPP30. Die Cq-Werte für E6 und E7 lagen sehr eng zusammen, jedoch zu RPP30 im Mittel >2 Cq-Zyklen entfernt (Abb. 5B).



<u>Abbildung 5:</u> qPCR Messwerte für Kontrollplasmid im Triplex Assay für E6, E7 und HBB (A) bzw. E6, E7 und RPP30 (B) mit Regressionsanalyse. Der Cq-Mittelwert von einer Messreihe mit je drei technischen Replikaten wurde für die Regressionsanalyse verwendet. Ausgefüllte Kreise: gültige Messungen (SD<0,5, zwischen 0,03-0,43); offene Kreise: ungültige Messungen (SD>0,5), die nicht in die Regressionsanalyse mit einbezogen wurden. Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffe FAM (grün), JOE (gelb) und Atto550 bzw. TAMRA (orange).

Bei weiteren qPCR-Wiederholungen blieben die Messwerte für E6, E7 und HBB im gemeinsamen Triplex Assay relativ stabil. Für die Kombination von E6, E7 und RPP30 zeigte sich jedoch eine erhöhte Intra-Assay Variabilität von RPP30, welches beispielhaft für die rechnerische Konzentrationsstufe von 20.000 Kopien pro Reaktion dargestellt wird (Tabelle 22). Die Cq-Werte für RPP30 wiesen innerhalb der drei technischen Replikate häufiger Ausreißer mit einer Standardabweichung >0,5 auf oder es konnte kein Messwert für RPP30 ermittelt werden (nicht bestimmbar, n.b.; *undetermined*) (s. Tabelle 22 Messung 1 und 2). Die Messwerte für E6 und E7 hingegen blieben innerhalb eines Laufs unabhängig von Messung mit HBB oder RPP30 relativ stabil mit einer Standardabweichung <0,5 über drei Replikate. Über insgesamt 3 Messwiederholungen zeigte sich für die Kombination aus E6, E7 und RPP30 eine höhere Standardabweichung der Cq-Werte und somit Intra-Assay Variabilität für RPP30. Zusammenfassend zeigte sich das Triplex Assay aus E6, E7 und HBB als robuster hinsichtlich der Intra-Assay Wiederholbarkeit gegenüber dem Assay mit RPP30 anstelle von HBB.

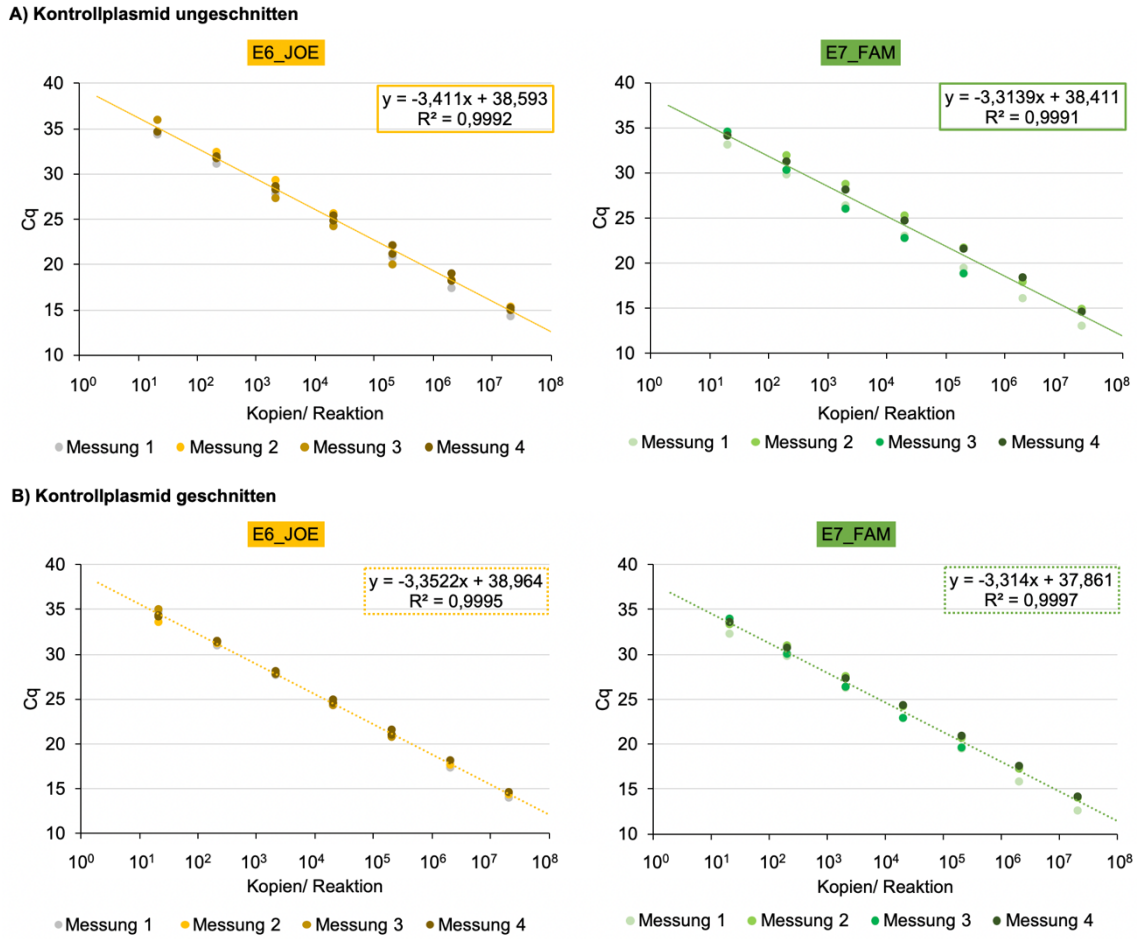
Tabelle 22: Intra-Assay Variabilität der Cq-Werte für Triplex Assay aus E6, E7 und HBB bzw. E6, E7 und RPP30

Triplex Assay	Gen	Replikat Nummer	Messung 1			Messung 2			Messung 3		
			Cq Wert	Cq MW	Cq SD	Cq Wert	Cq MW	Cq SD	Cq Wert	Cq MW	Cq SD
E6, E7, HBB	E6	1	25,52	25,50	0,02	25,24	25,02	0,20	24,05	24,03	0,02
		2	25,51			24,94			24,03		
		3	25,48			24,87			24,00		
	E7	1	24,92	24,89	0,04	24,57	24,37	0,17	24,09	24,05	0,03
		2	24,90			24,27			24,03		
		3	24,84			24,27			24,04		
	HBB	1	23,98	24,08	0,13	24,08	23,90	0,16	23,87	23,85	0,03
		2	24,23			23,82			23,81		
		3	24,04			23,80			23,87		
E6, E7, RPP30	E6	1	25,80	25,82	0,05	24,66	24,67	0,10	24,45	24,39	0,05
		2	25,87			24,77			24,35		
		3	25,77			24,57			24,37		
	E7	1	25,36	25,34	0,03	24,40	24,40	0,00	23,16	23,14	0,02
		2	25,33			24,40			23,13		
		3	25,31			24,41			23,12		
	RPP30	1	***28,70***	27,75	**0,82**	**n.b.**	**n.b.**	**n.b.**	28,38	28,04	0,37
		2	27,26			**n.b.**			27,65		
		3	27,29			**n.b.**			28,09		

Hier nicht dargestellt für Messung 2 ist die Positivkontrolle für RPP30 mit derselben Substratkonzentration im Monoplex und Duplex Assay, welche gültige Messwerte lieferten. SD >0,5 ist fett gedruckt. Cq-Ausreißer innerhalb der Replikate ist fett und kursiv gedruckt. n.b. = nicht bestimmbar. MW = Mittelwert. SD = Standardabweichung.

3.1.3 Einfluss der Plasmidrestriktion auf die qPCR Quantifizierung

Angesichts der engen räumlichen Nähe aller Gensequenzen und der stark gewundenen (*supercoiled*) Plasmid-Konformation wurde eine mögliche Assay Optimierung durch die Restriktion des Plasmids untersucht. Bei der Wahl der Restriktionsenzyme EcoRI, HindIII und NdeI wurde anhand der Sequenzdaten des Plasmids sichergestellt, dass die Schnittstellen außerhalb der Bereiche der Zielgene liegen (Abschnitt 2.2.8). Eine 10-fache Verdünnungsreihe des Plasmids wurde im Teilversuch A) ohne Restriktion und im Teilversuch B) nach einem Restriktionsverdau im Multiplex Assay gemessen und eine vergleichende Regressionsanalyse für die HPV16 Gene E6 und E7 erstellt (Abb. 6).



<u>Abbildung 6</u>: qPCR Messwerte des Kontrollplasmids ohne (A) und nach Restriktionsverdau (B) für die HPV16 Gene E6 und E7 mit Regressionsanalyse. Der Cq-Mittelwert von vier Messreihen mit je drei technischen Replikaten wurde für die Regressionsanalyse verwendet. Die Standardabweichung (basierend auf dem Mittelwert einer Messreihe) entspricht der Inter-Assay Variabilität und lag für die Versuche ohne Restriktionsverdau (A) zwischen 0,51-1,03 (E6) bzw. 0,77-1,23 (E7), für die Versuche mit Restriktionsverdau (B) zwischen 0,28-0,53 (E6) bzw. 0,47-67 (E7). Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffe FAM (grün) und JOE (gelb).

Die gemittelte Amplifikations-Effizienz blieb für E7 sowohl für das Plasmid ohne und nach Restriktionsverdau unverändert bei 100%. Für E6 betrug die Effizienz für

ungeschnittene und geschnittene Plasmid-DNA jeweils 96% bzw. 99%. Im Vergleich zum ungeschnittenen war für das geschnittene Kontrollplasmid die mittlere relative Standardabweichung der gemessenen Kopien pro Reaktion über vier Messungen geringer (Tabelle 23). Dies zeigt sich in Abbildung 6 durch eine geringere Streuung der Messwerte um die Regressionsgerade.

Tabelle 23: Inter-Assay Variabilität der gemessenen Kopien pro Reaktion für E6 und E7 anhand der relativen Standardabweichung (rSD) über vier Messreihen

Substrat	E6	E7
Kontrollplasmid ungeschnitten	rSD = 13,5%	rSD = 13,6%
Kontrollplasmid geschnitten	rSD = 7,4%	rSD = 8,7%

Zusammenfassend blieb die Effizienz der PCR für E6 und E7 unabhängig vom Restriktionsverdau stabil, es konnte jedoch eine geringere Inter-Assay Variabilität für das geschnittene Kontrollplasmid gezeigt werden.

3.1.4 Dynamischer Bereich und untere Quantifizierungsgrenze der qPCR

Als dynamischer Bereich der PCR wird der Konzentrationsbereich bezeichnet, „innerhalb dessen die Methode eine ausreichende Linearität, Richtigkeit und Präzision besitzt“ (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2024). Die untere Quantifizierungsgrenze (*lower limit of quantification*, LLOQ) entspricht der niedrigsten Konzentration, die mit einer vorgegebenen Präzision durch eine Methode nachgewiesen werden kann. Um diesen Bereich für die qPCR zu ermitteln, erfolgte die Messung des geschnittenen Kontrollplasmids im Triplex Assay aus E6, E7 und HBB in einer 10-fachen Verdünnungsreihe über neun Konzentrationsstufen ($2x10^7$ bis $2x10^{-1}$ Kopien pro Reaktion). Für jede Messung wurde der gemittelte Cq-Wert als gültig bewertet, sofern die Standardabweichung der Cq-Werte <0,5 innerhalb der technischen Replikate lag (Intra-Assay Präzision). Die Inter-Assay Variabilität wurde anhand der relativen Standardabweichung der Kopien pro Reaktion über vier Messreihen beurteilt. Die Regressionsanalyse erfolgte über den Cq-Mittelwert der vier Messwiederholungen (Abb. 7). Die Effizienz betrug für E6, E7 und HBB jeweils 97%, 98% und 97%. Eine abnehmende Kopienanzahl in der qPCR-Reaktion geht mit einer zunehmenden Standardabweichung der Cq-Werte einher. Graphisch liegen ungültige Cq-Werte außerhalb des linearen Regressionsbereich. Bis zur untersten Konzentrationsstufe von 25 (E6) bzw. 26 (E7, HBB) Kopien pro Reaktion zeigte sich eine Inter-Assay Präzision mit einer relativen Standardabweichung ≤35% und entspricht somit der unteren Quantifizierungsgrenze für E6, E7 und HBB mittels qPCR.

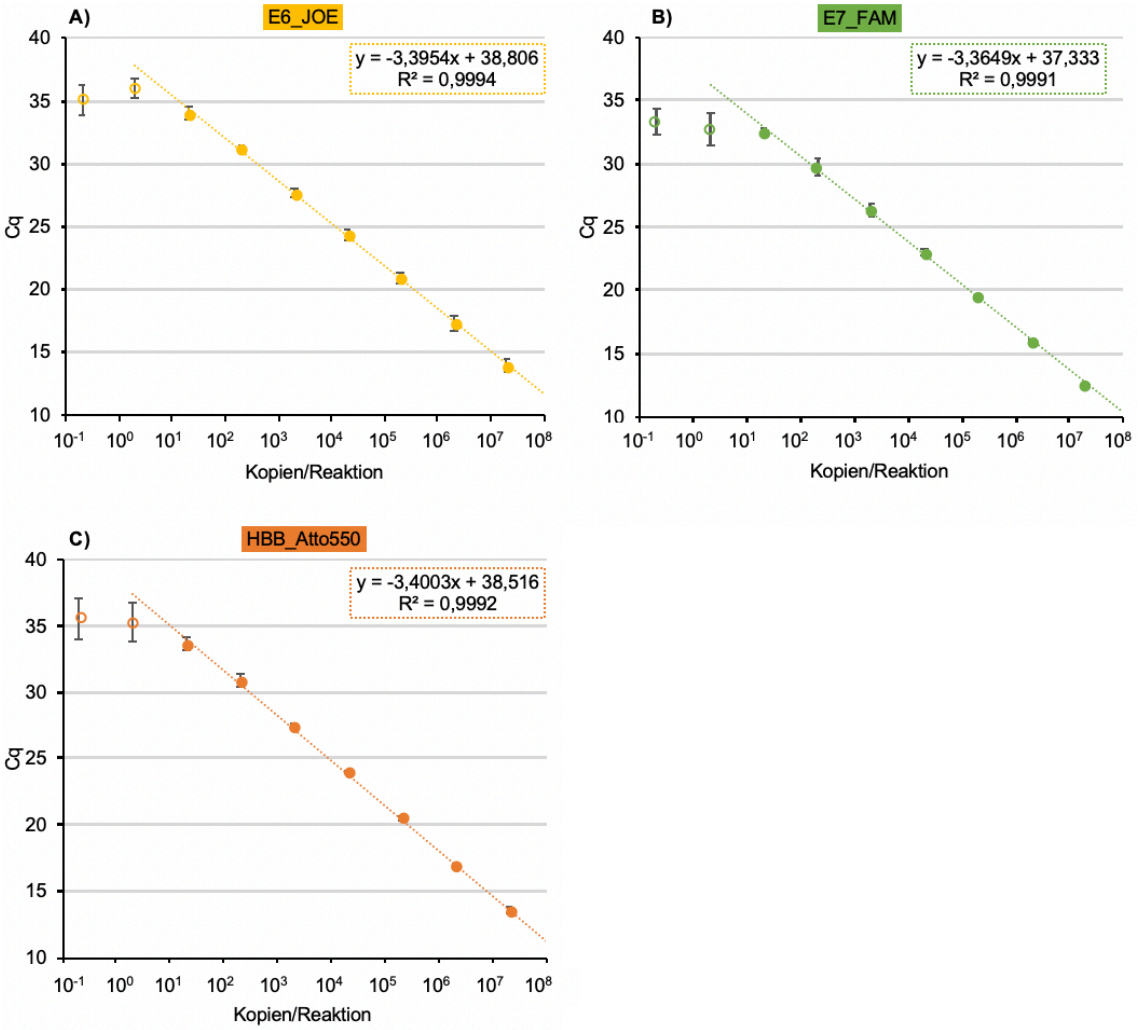


Abbildung 7: Dynamischer Bereich und untere Quantifizierungsgrenze der qPCR für die Gene E6 (A), E7 (B) und HBB (C) im Triplex Assay. Es wurden für jede Konzentrationsstufe die Cq-Mittelwerte aus vier Messreihen mit jeweils drei technischen Replikaten aufgetragen. Die Standardabweichung (basierend auf dem Mittelwert einer Messreihe) ist als vertikaler Fehlerbalken abgebildet und entspricht hier der Inter-Assay Variabilität. Ausgefüllte Kreise: gültige Messwerte; offene Kreise: ungültige Messwerte (SD >0,5), die nicht in die Regressionsanalyse mit einbezogen wurden. Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffe JOE (gelb), FAM (grün) und Atto550 (orange).

3.2 Etablierung und analytische Evaluation des dPCR Multiplex Assays

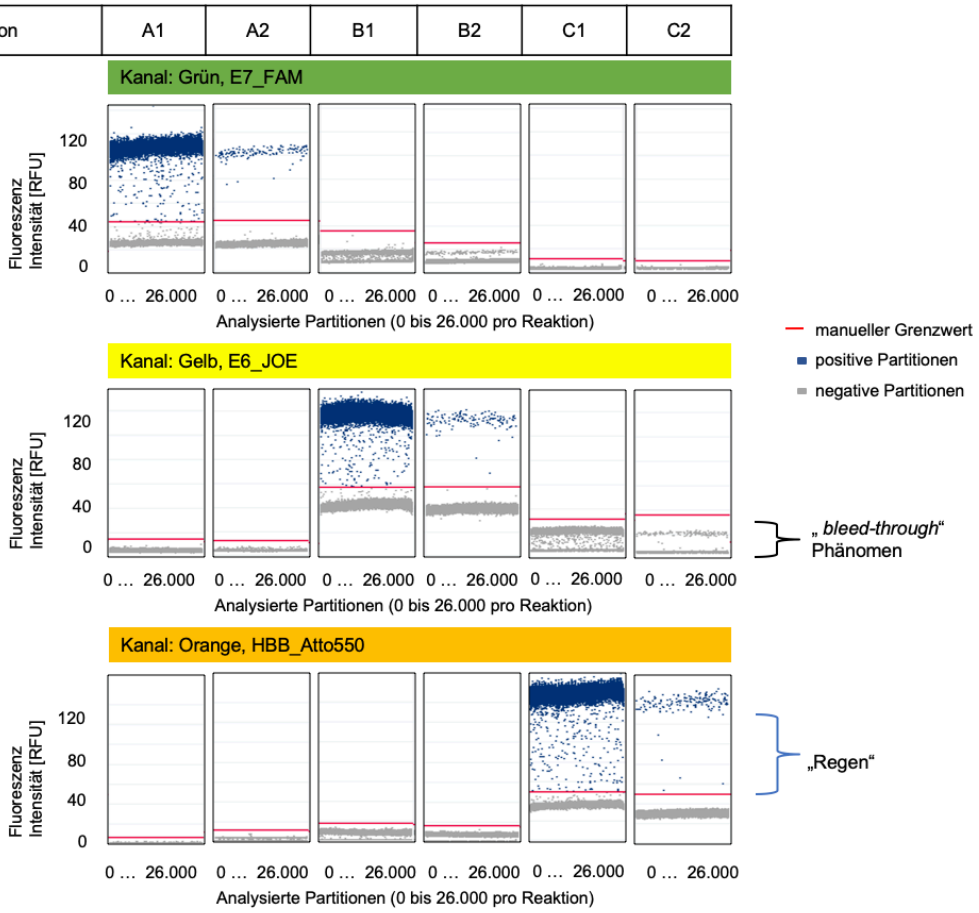
3.2.1 dPCR Versuche im Monoplex

Die in der qPCR etablierten Primer- und Sonden-Paare für E6, E7 und HBB, sowie das zuvor bereits verwendete Kontrollplasmid wurden im nächsten Schritt ebenfalls für die dPCR verwendet. Vom Kontrollplasmid wurden zunächst zwei Konzentrationsstufen eingesetzt (50.000 und 500 Kopien pro Reaktion, mittels Spektralphotometer bestimmt und entsprechend berechnet) und jedes Gen im Monoplex Assay mit dPCR gemessen (Abb. 8).

A)

Reaktion		A1	A2	B1	B2	C1	C2
Kontrollplasmid Kopien/ Reaktion		50.000	500	50.000	500	50.000	500
Gen	E7	+	+	-	-	-	-
	E6	-	-	+	+	-	-
	HBB	-	-	-	-	+	+

B)



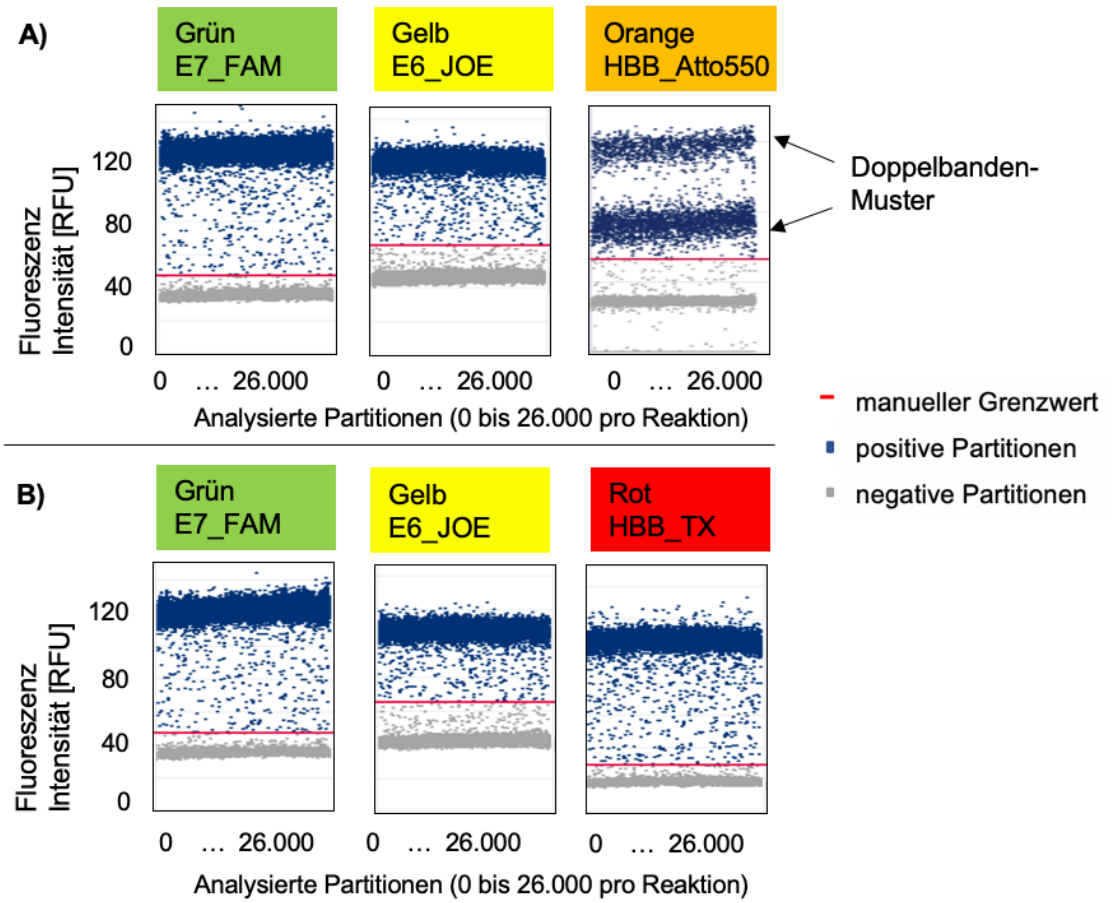
<u>Abbildung 8:</u> Darstellung des dPCR Versuchs mit Kontrollplasmid und den Primer-/ Sonden-Paaren für E6, E7 und HBB im Monoplex Assay. A) Aufteilung der dPCR-Platte mit den nachzuweisenden Genen und eingesetzten Plasmid-Mengen (50.000 Kopien/ Reaktion entsprechen 0,33 ng/ml, 500 Kopien/ Reaktion entsprechen 0,0033 ng/ml). B) *Scatterplot* Darstellung der positiven und negativen Signalwolken für die entsprechenden Farbkanäle. *„bleed-through* Phänomen“ = doppelte Banden innerhalb einer Signalwolke. „Regen“ = unspezifische Signale zwischen positiver und negativer Signalwolke. RFU = *relative fluorescence unit.*

In der *Scatterplot* Darstellung wird eine Trennung der positiven (blauen) und negativen (grauen) Signalwolke deutlich. Für die höhere Konzentrationsstufe von 50.000 Kopien pro Reaktion zeigen sich mehr unspezifische (auch als „Regen“ bezeichnete) Signale zwischen der positiven und negativen Signalwolke (Abschnitt 3.2.3). Innerhalb einer Signalwolke weisen doppelte Banden auf eine Signaldetektion aus einem benachbarten Farbkanal hin (sogenanntes „*bleed-through* Phänomen“). Dies ist in Abbildung 8 für die

negativen Partitionen der Reaktionen B1 und B2 im grünen Kanal sowie der Reaktionen C1 und C2 im gelben Kanal sichtbar (hier beispielhaft markiert).

3.2.2 dPCR Versuche im Multiplex

Im nächsten Schritt erfolgte die Testung des Triplex Assay aus E6, E7 und HBB in der dPCR. Als Substrat diente erneut das Kontrollplasmid mit einer rechnerischen Konzentration von 50.000 Kopien pro Reaktion (basierend auf der spektralphotometrischen Messung). Allerdings zeigten sich hier Schwierigkeiten bei der Verwendung der mittels qPCR etablierten Sonde HBB_Atto550. Beim Übergang vom Monoplex zum Triplex Assay zeigten sich für HBB_Atto550 in der *Scatterplot* Darstellung drei diskrete Signalwolken (Abb. 9A). Nach Festlegung des Grenzwertes anhand der Fluoreszenzintensität ergibt sich ein Doppelbanden-Muster für die positiven Partitionen. Mehrere Signalwolken erschweren die Festlegung eines geeigneten Grenzwertes zur Unterscheidung von positiven und negativen Partitionen und beeinträchtigen somit die Präzision bei der Quantifizierung. Generell sind gerätespezifische Filtereinstellungen der Farbkanäle sowie potenziell überlappende Emissionsspektra der verwendeten Sonden („*bleed-through* Phänomen“) zu berücksichtigen. Es erfolgte zunächst eine Anpassung der PCR Zyklus- und Beleuchtungsparameter ohne wesentliche Verbesserung der Ergebnisse. Daraufhin wurde der Farbstoff Atto550 (orangener Farbkanal) ersetzt. In einem gemeinsamen Triplex Assay mit E6 und E7 wurden der zusätzliche Farbkanal der dPCR und der Farbstoff *Texas Red* (TX, roter Farbkanal) für den Nachweis von HBB genutzt. Für diesen Farbstoff zeigte sich im entsprechenden Kanal kein Doppelbanden-Muster. Das Phänomen der unspezifischen „Regen“ Signale blieb hiervon jedoch weiterhin unberührt (Abb. 9B).



<u>Abbildung 9:</u> *Scatterplot* Darstellung der dPCR mit Kontrollplasmid im Triplex Assay für E6, E7 und HBB mit den Farbstoffen Atto550 (A) und *Texas Red* (B). Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffe FAM (grün), JOE (gelb), Atto550 (orange) und *Texas Red* (TX, rot) RFU = *relative fluorescence unit.*

In der absoluten Quantifizierung zeigen sich die Messwerte von E6, E7 und HBB sowohl im Monoplex als auch im Triplex Assay relativ stabil (Abb. 10). Die mittlere Kopienzahl pro Partition lag für alle drei Gene im Monoplex und Triplex Assay bei jeweils 0,71 und 0,73. Dies liegt im Bereich des minimalen Poisson-Fehlers von 0,5-3 Kopien pro Partition (Abschnitt 1.4.2). Über zwei Messungen wurden im Monoplex Assay für E6, E7 und HBB durchschnittlich etwa 39.000 Kopien pro Reaktion, im Triplex Assay circa 41.000 Kopien pro Reaktion nachgewiesen. Dies entspricht jeweils 78% (Monoplex Assay) bzw. 82% (Triplex Assay) der erwarteten 50.000 Kopien. Die Inter-Assay Variabilität betrug im Monoplex Assay 4,9%, im Triplex Assay 4,5%.

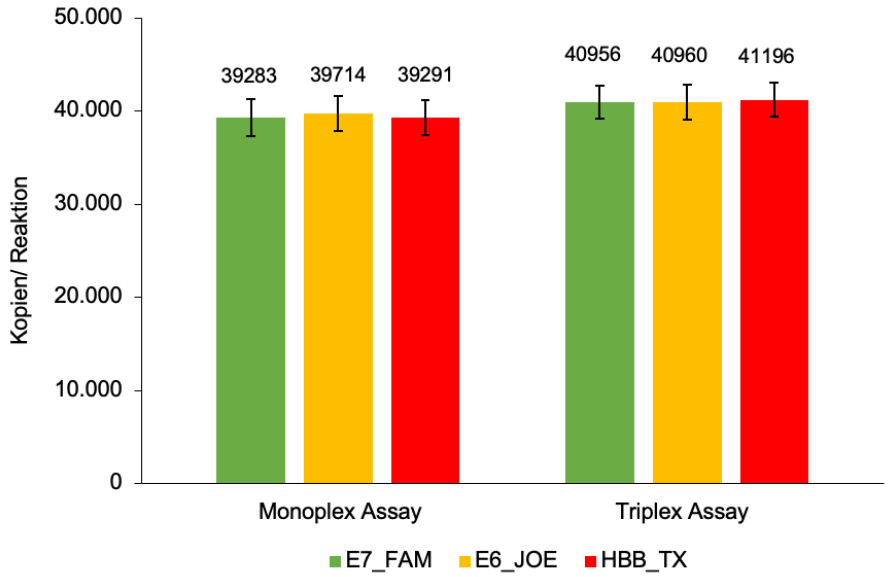
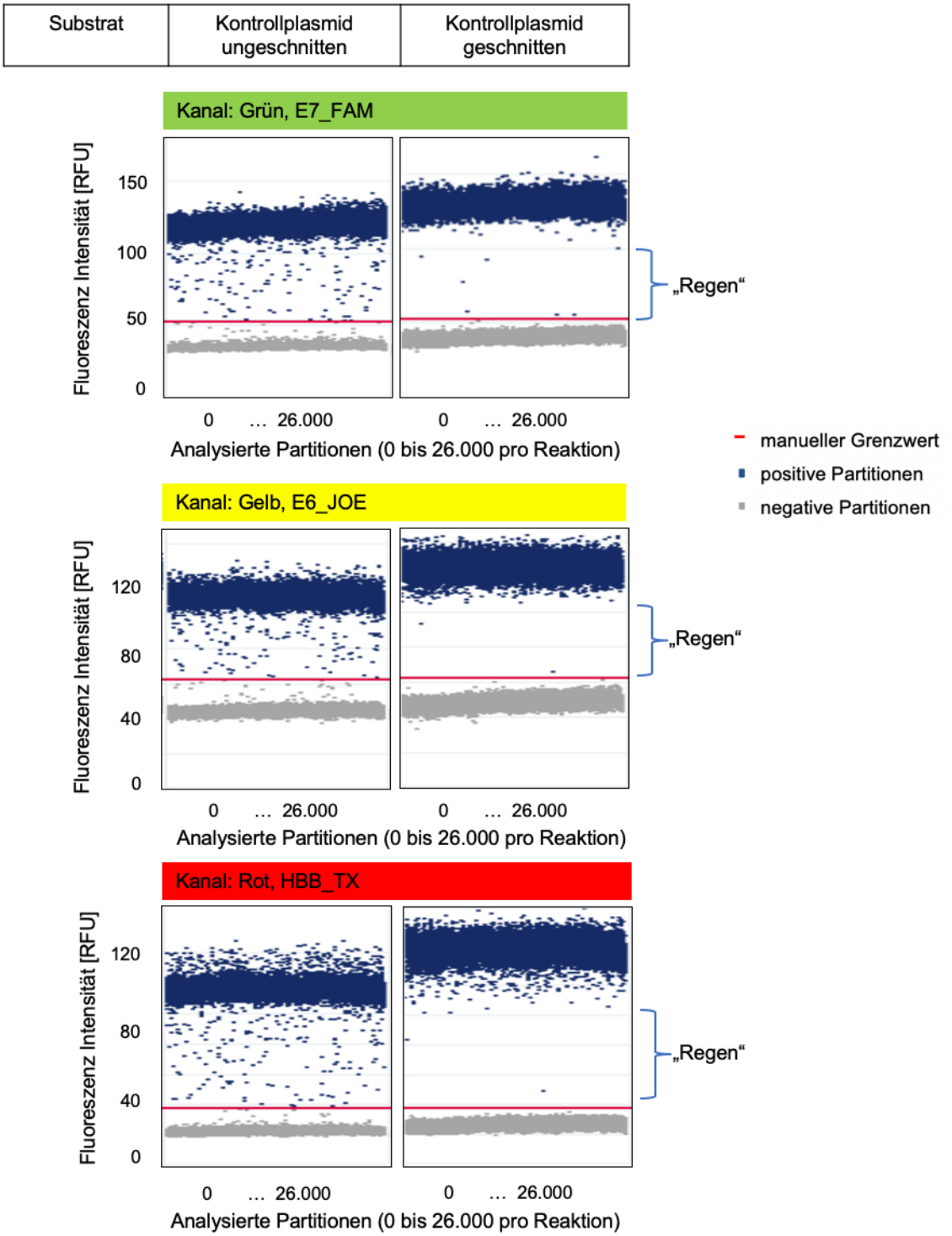


Abbildung 10: dPCR Messwerte der Gene E6, E7 und HBB mit Kontrollplasmid im Monoplex und Triplex Assay. Die Standardabweichung über zwei Messreihen ist als vertikaler Fehlerbalken dargestellt (Inter-Assay Variabilität). Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffe FAM (grün), JOE (gelb) und *Texas Red* (TX, rot).

3.2.3 Einfluss der Plasmidrestriktion auf die dPCR Quantifizierung

Analog zur qPCR wurde der Effekt der Plasmidrestriktion auf die dPCR in einem Monoplex und Triplex Assay für die Gene E6, E7 und HBB mit dem Farbstoff *Texas Red* untersucht. Es wurde eine rechnerische Plasmid Konzentration von 50.000 Kopien pro Reaktion eingesetzt (basierend auf der spektralphotometrischen Messung) und eine vergleichende Messung mit und ohne Restriktion durchgeführt (Abschnitt 2.5.2). Die Auswertung für die jeweiligen Farbkanäle in der *Scatterplot* Darstellung zeigte für alle Gene eine deutlichere Auftrennung von positiver und negativer Signalwolke für geschnittene DNA. Die Plasmidrestriktion bewirkte eine offensichtliche Verringerung der unspezifischen Signale zwischen den positiven und negativen Signalen („Regen“) (Abb. 11).



<u>Abbildung 11:</u> *Scatterplot* Darstellung der dPCR für Kontrollplasmid ohne (links) und nach Restriktionsverdau (rechts) im Triplex Assay. Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffe FAM (grün), JOE (gelb) und *Texas Red* (TX, rot). RFU = *relative fluorescence unit.*

Bei der Auswertung der absoluten Quantifizierung betrug die mittlere Kopienanzahl pro Partition für die Gene E6, E7 und HBB beim Plasmid ohne Restriktionsverdau 0,78, beim Plasmid mit Restriktionsverdau 0,83. Die gemessene Kopienanzahl aller drei Gene blieb für das ungeschnittene Plasmid relativ konstant bei etwa 42.000, für das geschnittene

Plasmid bei circa 44.000 Kopien pro Reaktion (Abb. 12). Dies entspricht für das Plasmid mit Restriktion einer Erhöhung von 3-5% mehr Kopien pro Reaktion. Die mittels dPCR gemessenen Kopien entsprechen für das Plasmid ohne und mit Restriktionsverdau einem Anteil von 85 bzw. 88% der erwarteten 50.000 eingesetzten Kopien. Insgesamt zeigten die Ergebnisse der dPCR Messwerte eine hohe Übereinstimmung mit der berechneten Kopienzahl basierend auf den Messwerten des Spektralphotometer. Die Intra-Assay Variabilität lag beim ungeschnittenem Plasmid für alle drei Gene im Mittel bei 0,7% (E6: 1,0%, E7: 0,3%, HBB: 0,9%), beim geschnittenen Plasmid für alle drei Gene im Mittel bei 1,2% (E6: 0,5%, E7: 0,4%, HBB: 2,6%).

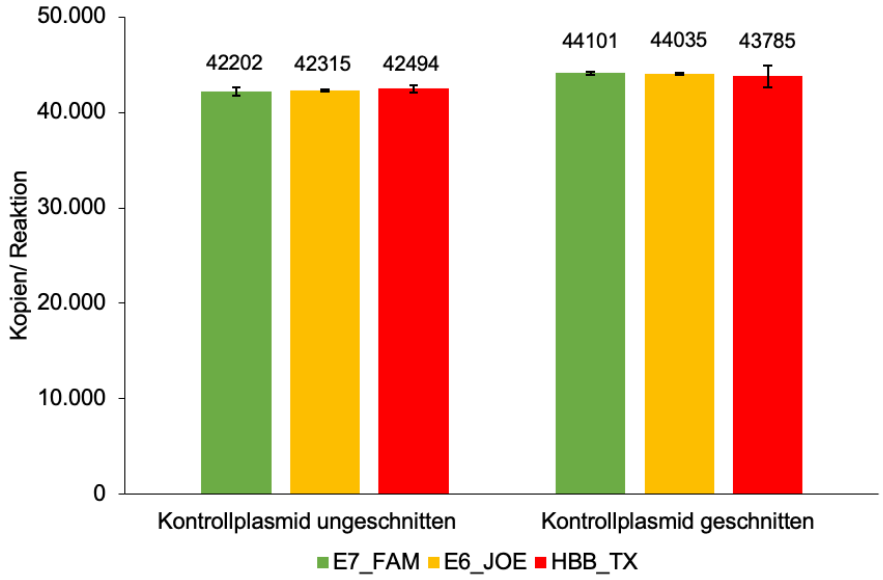


Abbildung 12: dPCR Messwerte des Kontrollplasmids ohne (links) und nach Restriktionsverdau (rechts). Die Standardabweichung über zwei technische Replikate ist als vertikaler Fehlerbalken abgebildet (Intra-Assay Variabilität). Die Farblegende entspricht dem Kanal für das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Sonden FAM (grün), JOE (gelb) und *Texas Red* (TX, rot).

Zusammenfassend kann durch den enzymatischen Verdau eine deutlichere Auftrennung der positiven und negativen Partitionen und eine Reduktion von unspezifischen Signalen erreicht werden.

3.2.4 Dynamischer Bereich und untere Quantifizierungsgrenze der dPCR

Analog zur qPCR wurde ebenso der dynamische Messbereich der dPCR ermittelt. Die maximale Substratkonzentration ist bei der verwendeten „26k 24-*Well*“ Nanoplatte aufgrund der begrenzten Anzahl an verfügbaren Partitionen mit 217.000 Kopien pro dPCR Reaktion vorgegeben (*QIAcuity® User Manual*, 2022; *QIAcuity® Application Guide: User Manual Extension*, 2023). Davon ausgehend wurde das geschnittene Kontrollplasmid in einer Verdünnungsreihe von rechnerisch 100.000 bis zu 25 Kopien

E6, E7 und HBB pro Reaktion im Triplex Assay gemessenen (Abb. 13). Jede Konzentrationsstufe lag in drei technischen Replikaten vor. Mit abnehmender Konzentration zeigte sich eine zunehmende Abweichung zwischen den gemessenen Kopien mittels dPCR und der aus den Messwerten des Spektralphotometer berechneten theoretischen Kopienzahl. Insgesamt zeigt sich an der Verschiebung der Punkte rechts zur Bezugslinie (erwartete Werte bei idealer Übereinstimmung zwischen rechnerischen und gemessenen Kopien), dass in der dPCR grundsätzlich niedrigere Werte gemessen werden als aufgrund der Messwerte des Spektralphotometer erwartet. Zudem kam es im Triplex Assay bei niedrigen Konzentrationen zu einer zunehmenden Diskrepanz der Messwerte für alle drei Zielegene von der idealen Bezugslinie.

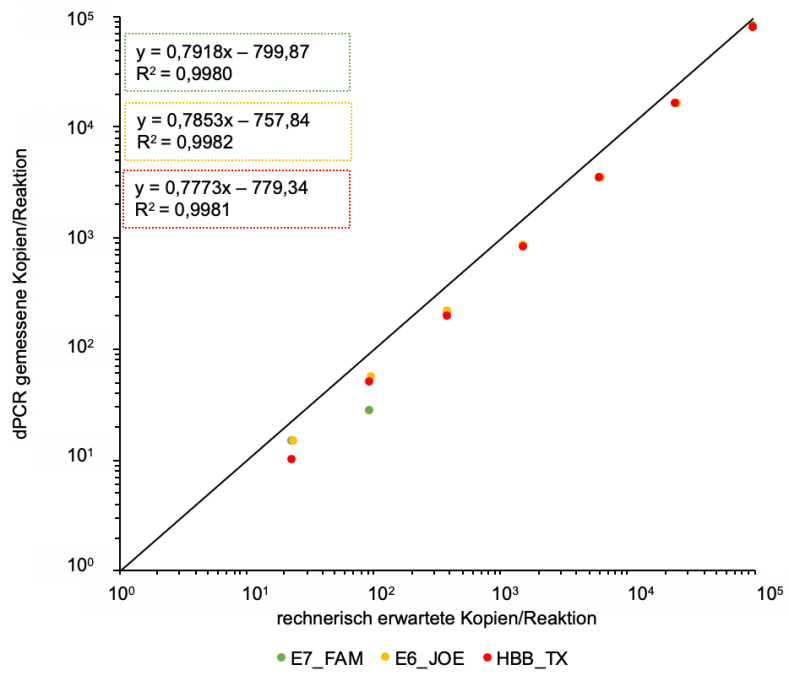
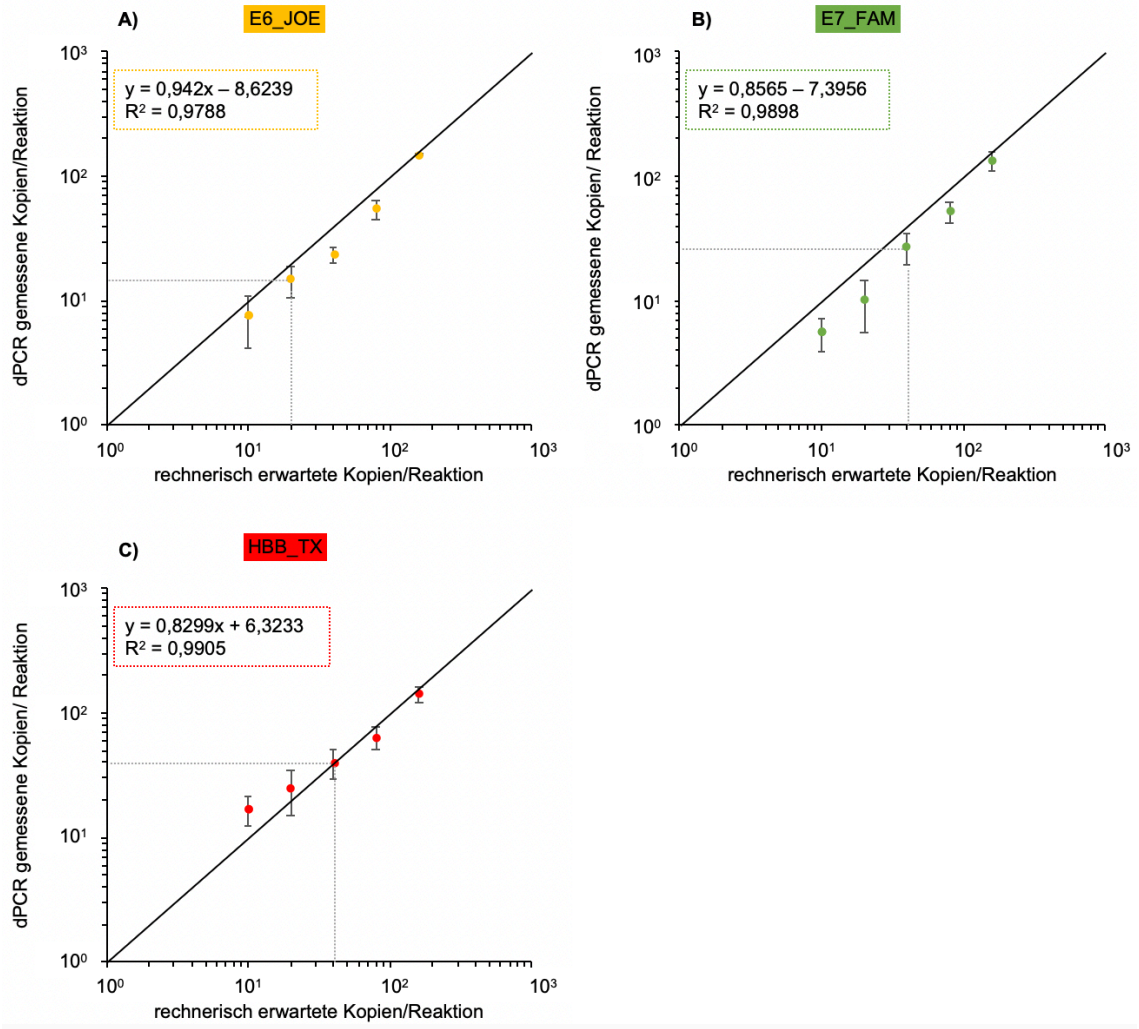


Abbildung 13: Dynamischer Bereich der dPCR. Die Bezugslinie markiert die erwarteten Werte bei vollkommener Übereinstimmung zwischen rechnerisch und per dPCR ermittelten Kopien. Die eingetragenen Punkte entsprechen den realen dPCR Messwerten. Die Farblegende entspricht dem Kanal für das Fluoreszenzsignal der jeweiligen Sonden FAM (grün), JOE (gelb) und *Texas Red* (TX, rot).

Zur Präzisierung der unteren Quantifizierungsgrenze erfolgte die Messung des geschnittenen Kontrollplasmids im Triplex Assay in fünf Konzentrationsstufen (10, 20, 40, 60 und 120 Kopien pro Reaktion) zu je vier Replikaten (Abb. 14). Analog zur qPCR entsprach die untere Quantifizierungsgrenze der niedrigsten Konzentrationsstufe, die mit einer relativen Standardabweichung ≤35% über die Replikate gemessen wurde. Somit ergaben sich für die untere Quantifizierungsgrenze der dPCR für E6, E7 und HBB jeweils 15, 27 bzw. 40 Kopien pro Reaktion.



<u>Abbildung 14:</u> Untere Quantifizierungsgrenze der dPCR für die Gene E6 (A), E7 (B) und HBB (C) im Triplex Assay. Die Bezugslinie markiert die erwarteten Werte bei vollkommener Übereinstimmung zwischen rechnerisch und per dPCR ermittelten Kopien. Die eingetragenen Punkte entsprechen den realen dPCR Messwerten. Die grauen Linien markieren die Werten der unteren Bestimmungsgrenze. Die Standardabweichung ist als vertikaler Fehlerbalken abgebildet. Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffe JOE (gelb), FAM (grün) und *Texas Red* (TX, rot).

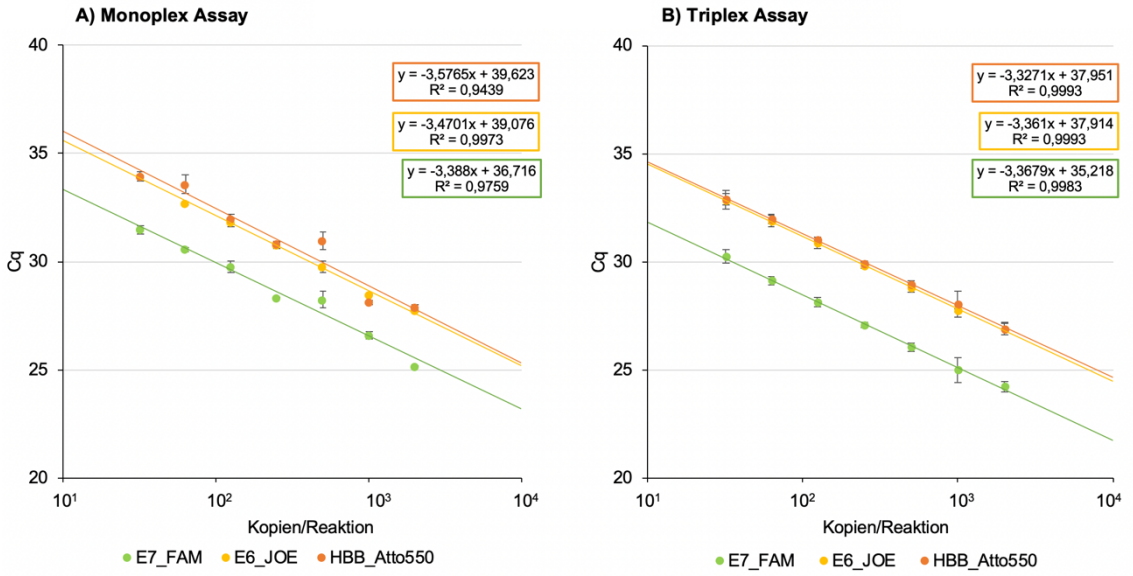
3.3 qPCR- und dPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104

Zur Annäherung an die Untersuchung von cfDNA aus Patientenplasma wurde zunächst eine vergleichende qPCR- und dPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 durchgeführt. Diese stammte von einem Patienten mit HPV16-positiven Mundhöhlenkarzinom und zeichnet sich aus durch eine Kopie HPV16-DNA pro Zelle, die in das humane Genom integriert ist (Akagi et al., 2014; Tang et al., 2012).

3.3.1 qPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104

Für die qPCR Messung wurde von der extrahierten chromosomalen DNA der Zelllinie UM-SCC-104 eine Verdünnungsreihe (Verdünnungsfaktor 1:2, ausgehend von 2000,

1000, 500, 250 bis hin zu 31 Kopien pro Reaktion) in einem Monoplex und Triplex Assay für E6, E7 und HBB gemessen (Abb. 14). Die Effizienz im Monoplex Assay betrug 94 % (E6), 97% (E7) und 90% (HBB). Die Cq-Werte von E6 und HBB lagen für den untersuchten Konzentrationsbereich eng beieinander, abgesehen von zwei Ausreißern für HBB (bei 500 und 63 eingesetzten Kopien pro Reaktion). Im Vergleich zu E7 wiesen beide jedoch einen mittleren Unterschied von 2,6 Cq-Zyklen auf (Abb. 15A). Für das Triplex Assay betrug die durchschnittliche Effizienz 98% (E6, E7) und 100% (HBB). Wie schon für die Messung im Monoplex Assay zeigten sich auch im Triplex Assay annähernd identische Cq-Werte für E6 und HBB, während beide einen mittleren Unterschied von 2,7 höheren Cq-Zyklen zu E7 aufwiesen (Abb. 15B).



<u>Abbildung 15:</u> qPCR Messwerte von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 für die Gene E6, E7 und HBB im Monoplex (A) und Triplex Assay (B) mit Regressionsanalyse. Die Standardabweichung (SD) ist als vertikaler Fehlerbalken abgebildet. Für das Monoplex Assay erfolgte eine Messreihe mit jeweils drei technischen Replikaten. Die abgebildete SD entspricht hier der Intra-Assay Variabilität. Für das Triplex Assay wurden drei Messreihen mit jeweils drei technischen Replikaten durchgeführt. Die abgebildete SD (basierend auf dem Mittelwert einer Messreihe) entspricht somit hier der Inter-Assay Variabilität. Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffe FAM (grün), JOE (gelb) und Atto550 (orange).

3.3.2 dPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104

Auf die qPCR-Messung folgte die dPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104. Die Gene E6, E7 und HBB wurden sowohl im Monoplex und als auch im Triplex Assay gemessen (Abb. 16). Es wurden 5000 Kopien pro Reaktion eingesetzt, was anhand der mittels Spektralphotometer bestimmten Konzentrationen errechnet wurde (s. Abschnitt 2.3.3). Im Monoplex Assay betrug die mittlere Kopienanzahl pro Partition für die viralen Gene E6 und E7 jeweils 0,27 und 0,31 sowie für HBB 0,11. Im Triplex Assay betrug die

mittlere Kopienanzahl pro Partition für E6, E7 und HBB jeweils 0,29, 0,29 und 0,13. Die Quantifizierung der dPCR-Messungen zeigt für die einzelnen Gene relativ stabile Ergebnisse, unabhängig von der Messung im Monoplex oder Triplex Assay. Bei beiden Teilversuchen wurde eine Diskrepanz zwischen nachgewiesenen HPV16 Genen zu den humanen Referenzgenen ersichtlich. Im Durchschnitt lag das Verhältnis der viralen Gene (E6, E7) zum humanen Referenzgenen (HBB) bei 2,3:1.

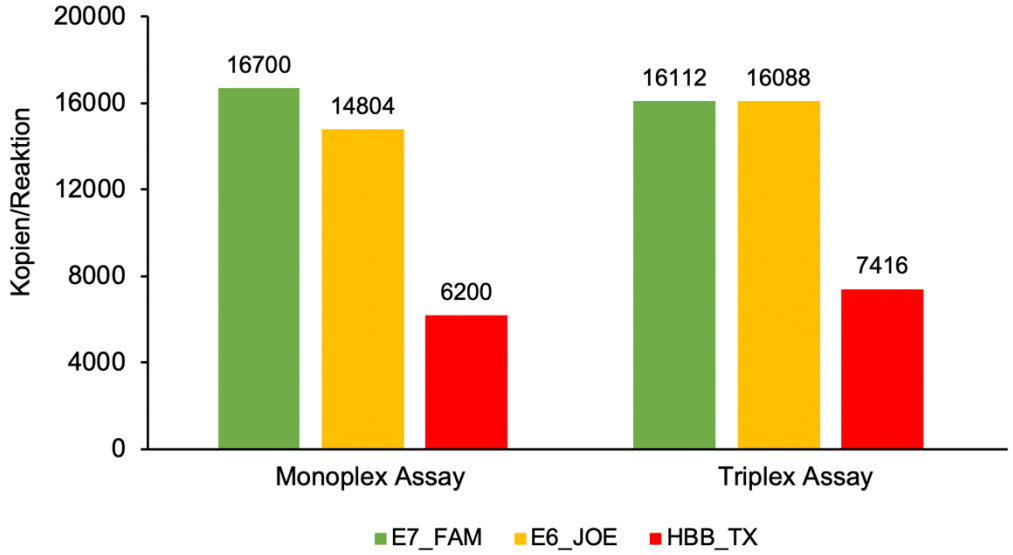


Abbildung 16: dPCR Messwerte von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 für die Gene E6, E7 und HBB im Monoplex und Triplex Assay. Die Farblegende entspricht dem Kanal des Fluoreszenzsignals der jeweiligen Farbstoffe FAM (grün), JOE (gelb), orange (TAMRA) und *Texas Red* (TX, rot).

Zusammenfassend lieferte die qPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 für E7 um 2,6 Zyklen (Monoplex Assay) bzw. 2,7 Zyklen (Triplex Assay) frühere Cq-Werte als für E6 und HBB. Interessanterweise zeigten die dPCR-Messwerte sowohl für E7 als auch für E6 eine erhöhte Zahl von Kopien im Vergleich zu HBB mit einem Verhältnis von 2,3:1.

3.4 Diagnostische Evaluation des PCR Multiplex Assays mit *Liquid Biopsy* Proben

In Zusammenschau der bisher gezeigten Ergebnisse zur analytischen Evaluation zeigte sich das Triplex Assay aus E6, E7 und HBB mit dem Farbstoff Atto550 (qPCR) bzw. *Texas Red* (dPCR) als robust hinsichtlich der Intra- und Inter-Assay Präzision. Für die diagnostische Evaluation des Triplex Assays wurden fortan die qPCR- und dPCR-Messung der *Liquid Biopsy* Proben von Patienten mit HPV-positiven und negativen OPSCC durchgeführt (Abschnitt 2.4.1). Als Positivkontrolle für beide PCR-Methoden und als Referenz für die qPCR Quantifizierung diente wie bisher das Kontrollplasmid mit Restriktionsverdau.

Einen Überblick über die Patienten- und Tumorcharakteristika der untersuchten Flüssigbiopsien zeigt Tabelle 24.

Tabelle 24: Patienten- und Tumorcharakteristika der untersuchten OPSCC (n = 31) in Hinblick auf den HPV-Status

Patienten-/ Tumor-charakteristika	HPV-positive OPSCC (n = 17)		HPV-negative OPSCC (n = 14)		p-Wert
	n	%	n	%	
Alter (Jahre)					
<60	8	*47,1*	3	*21,4*	0,258
≥ 60	9	*52,9*	11	*78,6*	
Median	60,1		61,8		
Mittelwert	61,4		65,1		0,221 *
Maximum	71,4		80,7		
Minimum	50,1		53,3		
Geschlecht					
Männlich	13	*76,5*	9	*64,3*	0,693
Weiblich	4	*23,5*	5	*35,7*	
T-Status					
T1	4	*23,5*	2	*14,3*	0,431
T2	7	*41,2*	5	*35,7*	
T3	5	*29,4*	3	*21,4*	
T4	1	*5,9*	4	*28,6*	
N-Status					
N0	2	*11,8*	5	*35,7*	0,272
N1	9	*52,9*	4	*28,6*	
N2	5	*29,4*	5	*35,7*	
N3	1	*5,9*	0	*0*	
M-Status					
M0	13	*76,5*	13	*92,9*	0,344
M1	4	*23,5*	1	*7,1*	
UICC8 Stadium					
1	6	*35,3*	1	*7,1*	0,109
2	6	*35,3*	3	*21,4*	
3	1	*5,9*	2	*14,4*	
4	4	*23,5*	8	*57,1*	

p-Werte wurden mit dem exakten Test nach Fisher berechnet (exakte Signifikanz, zweiseitig).
* p-Wert wurde mit dem t-Test berechnet. Signifikanz für p-Werte ≤ 0,05.

Aufgrund der begrenzten Patientenanzahl lassen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den HPV-positiven und HPV-negativen OPSCC hinsichtlich der klinischen Charakteristika zeigen. Dennoch lässt sich in der vorliegenden Stichprobe die Tendenz eines niedrigeren Erkrankungsalters bei HPV-getriebenen Karzinomen beobachten.

3.4.1 Ergebnisse der qPCR-Messung von *Liquid Biopsy* Proben

3.4.1.1 qPCR Beurteilung der cfDNA-Extraktion

Die Beurteilung der cfDNA-Extraktion erfolgte anhand der Messung von HBB in der qPCR. Bei der Methodenetablierung entsprach die untere Quantifizierungsgrenze der qPCR für das Referenzgen HBB 26 Kopien pro Reaktion (Abschnitt 3.1.4). Alle Proben der cfDNA-Extraktionen aus den Patienten Plasma erreichten für HBB Werte über 26 Kopien pro qPCR Reaktion (Median: 215 Kopien pro qPCR Reaktion) und wurden somit als valide cfDNA-Extraktionen angesehen. Aufgrund des limitierten Probenmaterials wurde auf eine zusätzliche Untersuchung mittels Spektralphotometer verzichtet.

3.4.1.2 qPCR Grenzwertoptimierung für Kopien von E6 und E7

Für die qPCR-Messwerte der *Liquid Biopsy* Proben zum Zeitpunkt vor der Behandlung (T0) wurde eine ROC-Analyse (*receiver operating characteristic)* zur Grenzwertoptimierung von HPV E6- und E7-Kopien pro ml Plasma durchgeführt (Abb. 17). Der maximale Youden-Index entsprach einem Schwellenwert von > 372 (E6) und > 566 (E7) Kopien pro ml Plasma für HPV-positive OPSCC. Von den HPV-positiven Proben wurden mittels qPCR bei 14/17 Proben für E6 und E7 Messwerte oberhalb des Schwellenwertes nachgewiesen, bei den HPV-negativen Proben für E6 bei 3/14 bzw. für E7 bei 2/14. Daraus ergibt sich für den Nachweis von E6 und E7 mittels qPCR eine Sensitivität von jeweils 82,4% und eine falsch-positive Rate von 21,4% für E6 bzw. 14,3% für E7.

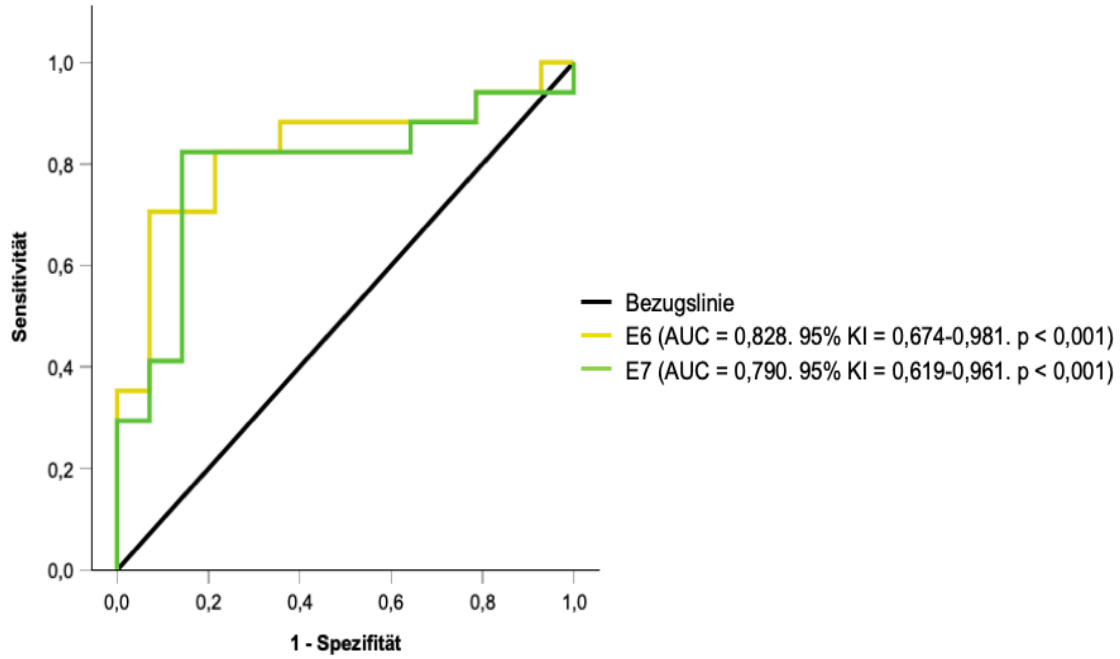


Abbildung 17: ROC-Analyse zur Grenzwertoptimierung der Kopien pro ml Plasma für HPV Gene E6 und E7 mittels qPCR. AUC = *area under the curve*. KI = Konfidenzintervall.

Die in der qPCR gemessenen Kopien E6 und E7 wurden anschließend hinsichtlich des HPV-Status der *Liquid Biopsy Proben* stratifiziert. Der Median betrug bei den HPV-positiven Proben 993 (E6) und 1062 (E7) Kopien pro ml Plasma, bei den HPV-negativen Proben jeweils 156 (E6) bzw. 264 (E7) Kopien pro ml Plasma (E6: p = 0,001 und E7: p= 0,005) (Abb. 18).

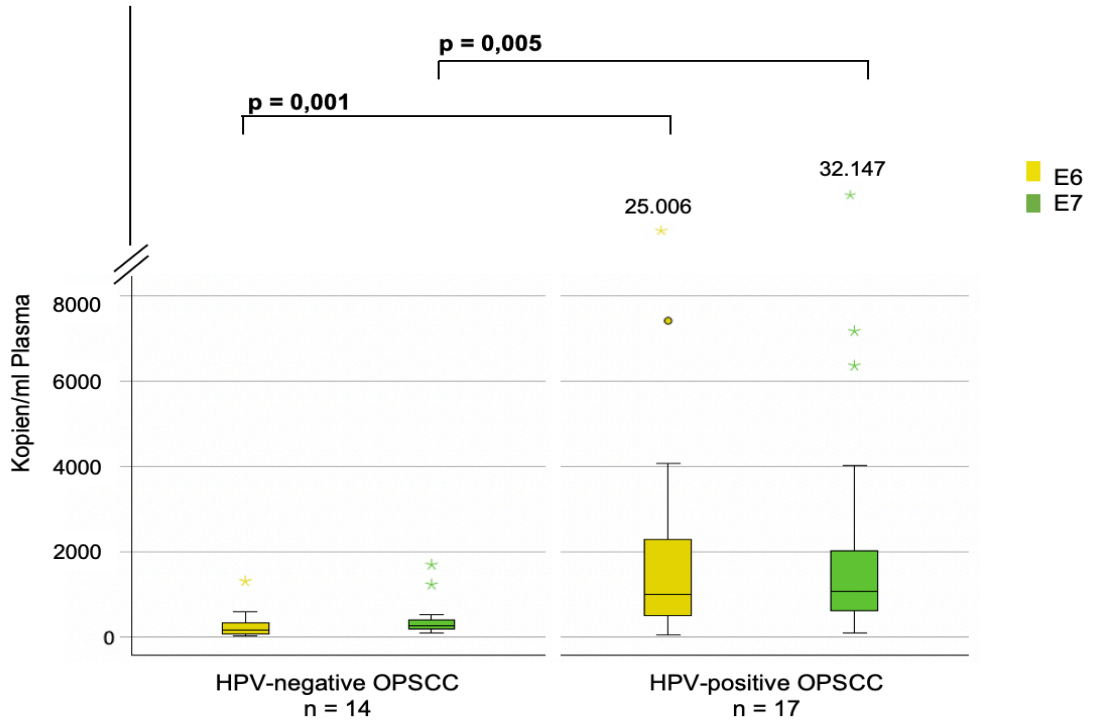
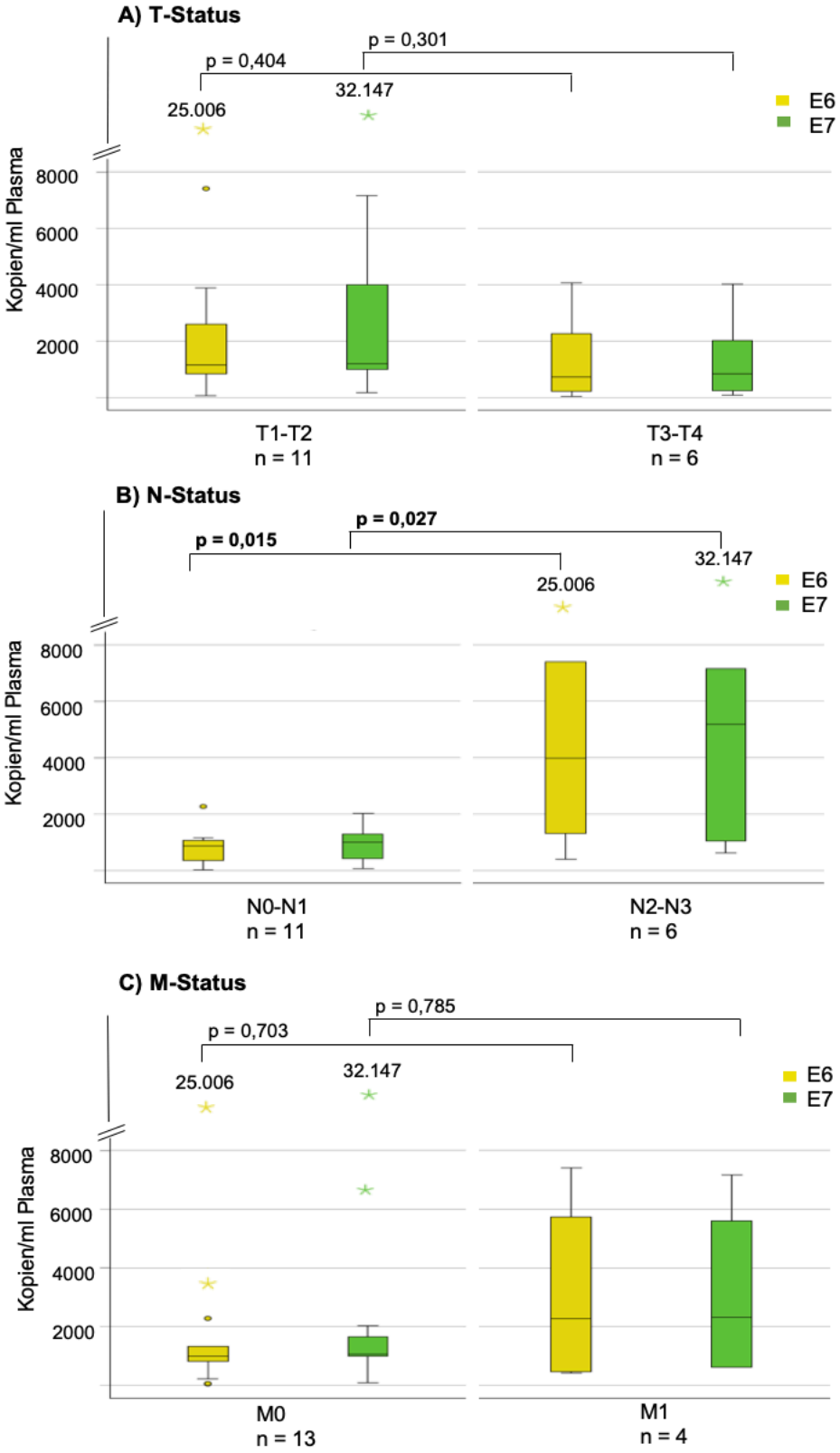


Abbildung 18: Vergleich der mit qPCR gemessenen Kopien E6 und E7 bei HPV-negativen und HPV-positiven OPSCC. Die Box spiegelt das 25. bis 75. Perzentil des Messbereichs wider. Ausreißer innerhalb des 1,5-fachen Abstands zur Box sind als Kreis, über des 1,5-fachen Abstandes als Stern markiert. p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben berechnet. Signifikante p-Werte ≤ 0,05 sind fett gedruckt.

3.4.1.3 Virale Kopien in Plasma mittels qPCR in Abhängigkeit von Tumormerkmalen

Für die HPV-positiven OPSCC wurden die gemessenen Kopien E6 und E7 pro ml Plasma weiterhin in Bezug auf den TNM-Status untersucht (Abb. 19). Für die Tumorgröße T1-T2 (≤ 4 cm) zeigte sich ein höherer Median an Kopien E6 und E7 im Vergleich zu T3-T4 (>4 cm), allerdings ohne statistische Signifikanz (E6: 1152 vs. 749, p = 0,404; E7: 1199 vs. 835, p = 0,301). Beim Lymphknotenstatus N2-N3 (bilateraler Befall oder > 6 cm) wurde eine signifikant höhere Anzahl an HPV-Kopien gemessen als bei N0-N1 (ipsilateraler Befall oder ≤ 6 cm) (E6: 870 vs. 3982, p = 0,015; E7: 1017 vs. 5188, p = 0,027). Das Vorhandensein von Fernmetastasen (M1) ging mit einem höheren Median an gemessenen Kopien E6 und E7 einher, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (E6: 993 vs. 2277, p = 0,703; E7: 1062 vs. 2319, p = 0,785).



<u>Abbildung 19:</u> Vergleich der mit qPCR gemessenen Kopien E6 und E7 bei HPV-positiven OPSCC in Bezug auf A) die Tumorgröße (T-Status), B) den Lymphknotenbefall (N-Status) und C) die Fernmetastasierung (M-Status). Die Box spiegelt das 25. bis 75. Perzentil des Messbereichs wider. Ausreißer mit ≤1,5-fachen Abstandes zur Box sind als Kreis, mit >1,5-fachen Abstandes als Stern markiert. p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben berechnet. Signifikante p-Werte ≤ 0,05 sind fett gedruckt.

3.4.1.4 Viraler DNA-Anteil der cfDNA-Extraktion mittels qPCR

Der virale DNA-Anteil aus der cfDNA-Extraktion von HPV-positiven Proben wurde als Verhältnis von gemessenen Kopien E6 bzw. E7 bezogen auf das humane Referenzgen HBB ausgedrückt. Für E6 lag der Anteil zwischen 0,01-33,16 (Median: 0,27) und für E7 zwischen 0,03-42,62 (Median: 0,35). Bei 4/17 (23,5%) der HPV-positiven OPSCC Proben (Nummer 2, 10, 11, 12) wurden mehr virale Kopien E6 und E7 als HBB gemessen. Bei 1/14 (7,1%) der HPV-negativen OPSCC Proben (Nummer 14) wurde ebenfalls mehr Kopien an E6 als HBB gemessen.

3.4.2 Ergebnisse der dPCR-Messung von *Liquid Biopsy* Proben

3.4.2.1 dPCR Beurteilung der cfDNA-Extraktion

Bei der dPCR Methodenetablierung entsprach die untere Quantifizierungsgrenze für das Referenzgen HBB 40 Kopien pro Reaktion (Abschnitt 3.2.4). Alle gemessenen *Liquid Biopsy* Proben erreichten für HBB Werte über 40 Kopien pro dPCR Reaktion (Median: 103 Kopien pro dPCR Reaktion) und wurden als valide cfDNA-Extraktionen angesehen.

3.4.2.2 dPCR Grenzwertoptimierung für Kopien E6 und E7

Analog zur qPCR wurde auch für die dPCR zur Grenzwertoptimierung eine ROC-Analyse von HPV E6- und E7-Kopien pro ml Plasma durchgeführt (Abb. 20). Der maximale Youden-Index entsprach einem Schwellenwert von >181 (E6) und >151 (E7) Kopien von pro ml Plasma für HPV-positive OPSCC. Von den HPV-positiven Proben wurde bei 14/17 für E6 und E7 Werte oberhalb des Schwellenwertes ermittelt, bei den HPV-negativen Proben für E6 bei 2/14 und für E7 bei 1/14 Proben. Daraus ergibt sich beim Nachweis von E6 und E7 mittels dPCR eine Sensitivität von 82,4% und eine falsch-positive Rate von 14,3% (E6) bzw. 7,1% (E7).

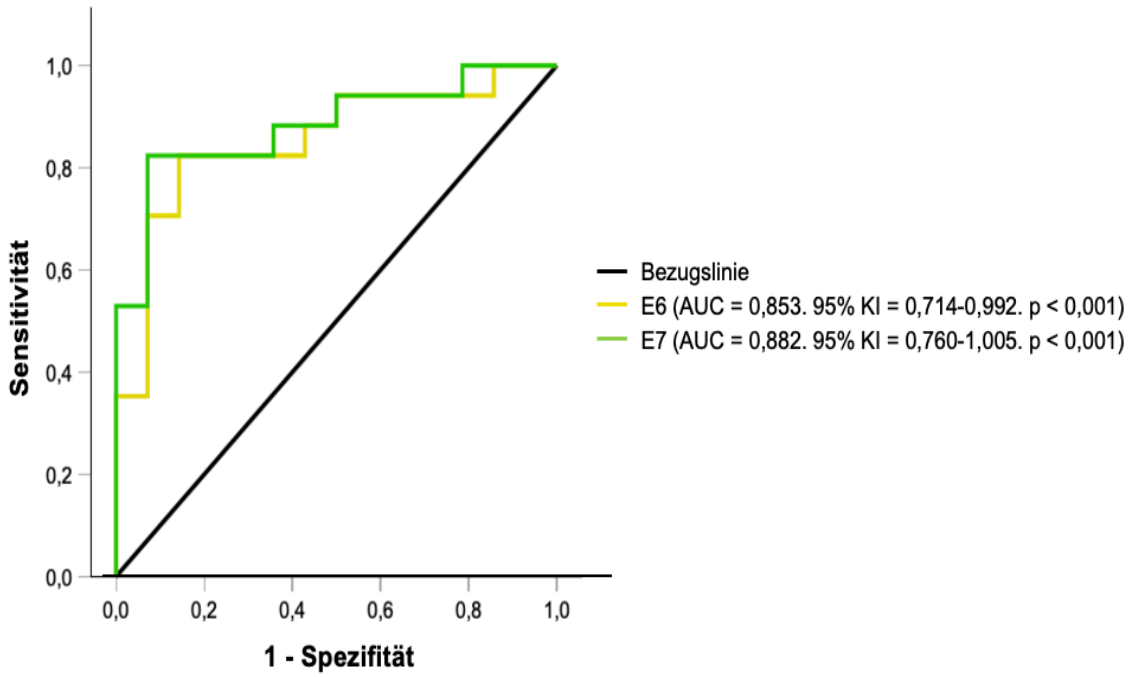


Abbildung 20: ROC-Analyse zur Grenzwertoptimierung der Kopien pro ml Plasma für HPV Gene E6 und E7 mittels dPCR. AUC = *area under the curve*. KI = Konfidenzintervall.

Die in der dPCR gemessenen Kopien E6 und E7 wurden anschließend hinsichtlich des HPV-Status der *Liquid Biopsy Proben* stratifiziert. Der Median betrug bei den HPV-positiven Proben jeweils 519 (E6) und 637 (E7) Kopien pro ml Plasma, bei den HPV-negativen Proben jeweils 102 (E6) bzw. 81 (E7) Kopien pro ml Plasma (E6 und E7: p = 0,001) (Abb. 21).

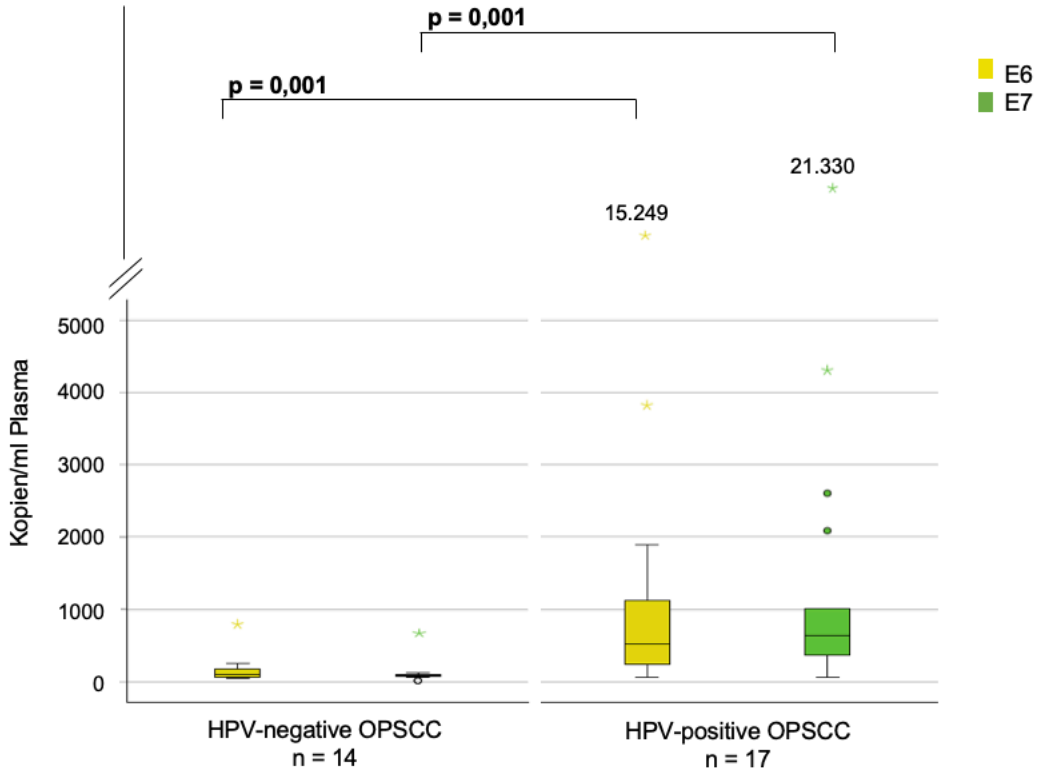
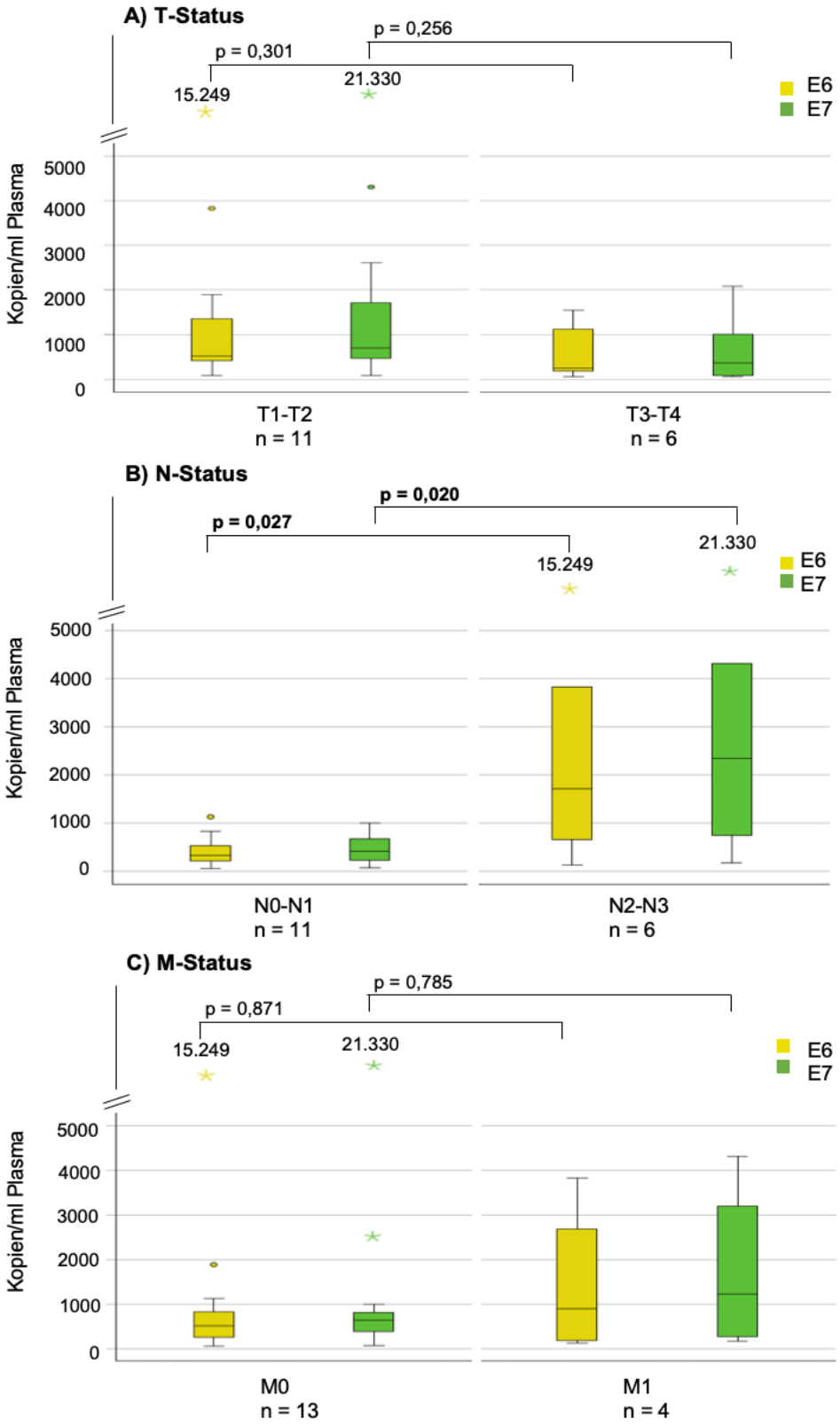


Abbildung 21: Vergleich der mit dPCR gemessenen Kopien E6 und E7 bei HPV-negativen und HPV-positiven OPSCC. Die Box spiegelt das 25. bis 75. Perzentil des Messbereichs wider. Ausreißer innerhalb des 1,5-fachen Abstands zur Box sind als Kreis, über des 1,5-fachen Abstandes als Stern markiert. p-Werte berechnet mit Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben. Signifikante p-Werte ≤ 0,05 sind fett gedruckt.

3.4.2.3 Virale Kopien in Plasma mittels dPCR in Abhängigkeit von Tumormerkmalen

Bei den HPV-positiven OPSCC wurden die gemessenen Kopien E6 und E7 pro ml Plasma weiterhin in Bezug auf den TNM-Status untersucht (Abb. 22). Für die Tumorgröße T1-T2 (≤ 4 cm) zeigte sich ein höherer Median an Kopien E6 und E7 als bei T3-T4 (> 4 cm), allerdings ohne statistische Signifikanz (E6: 528 vs. 250, p = 0,301; E7: 701 vs. 375, p = 0,256). Beim Lymphknotenstatus N2-N3 (bilateraler Befall oder > 6 cm) wurde eine signifikant höhere Anzahl an viralen Kopien gemessen als bei N1-N2 (ipsilateraler Befall oder ≤ 6 cm) (E6: 330 vs. 1718, p = 0,027; E7: 407 vs. 2344, p = 0,020). Das Vorhandensein von Fernmetastasen (M1) ging mit einem höheren Median an gemessenen Kopien E6 und E7 einher, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen (E6: 519 vs. 893, p = 0,871; E7: 637 vs. 1228, p = 0,785).



<u>Abbildung 22:</u> Vergleich der mit dPCR gemessenen Kopien E6 und E7 bei HPV-positiven OPSCC in Bezug auf A) die Tumorgröße (T-Status), B) den Lymphknotenbefall (N-Status) und C) die Fernmetastasierung (M-Status). Die Box spiegelt das 25. bis 75. Perzentil des Messbereichs wider. Ausreißer mit ≤1,5-fachen Abstandes zur Box sind als Kreis, mit >1,5-fachen Abstandes als Stern markiert. p-Werte wurden mit dem Mann-Whitney-U Test für unabhängige Stichproben berechnet. Signifikante p-Werte ≤ 0,05 sind fett gedruckt.

3.4.2.4 Viraler DNA-Anteil der cfDNA-Extraktion mittels dPCR

Analog zur qPCR wurde der virale DNA-Anteil der cfDNA-Extraktion von HPV-positiven OPSCC als Verhältnis von Kopien E6 bzw. E7 bezogen auf das humane Referenzgen HBB berechnet. Für die gemessenen Kopien E6/HBB zeigte sich eine Spannweite von 0,03-7,99 (Median: 0,42), für E7/HBB eine Spannweite von 0,04-11,18 (Median: 0,39). Bei 3/17 (17,6%) der HPV-positiven Proben (Nummer 10, 11, 12) wurden mehr virale Kopien als HBB nachgewiesen.

3.5 Methodenvergleich der *Liquid Biopsy* Messung mit qPCR und dPCR

3.5.1 Vergleich der diagnostischen Validität von qPCR und dPCR

Die diagnostische Validität der qPCR- und dPCR-Messung der Flüssigbiopsien für den Nachweis von E6 und E7 lieferte für beide Methoden eine Sensitivität von 82,4%. Beim Vergleich beider PCR-Methoden zeigt sich für die dPCR eine höhere Spezifität für Nachweis von HPV-DNA als bei der qPCR. Bei den falsch-positiven Messungen der HPV-negativen Kontrollproben wurden bei einer einzigen Probe (Nummer 23) sowohl in der qPCR als auch dPCR für E6 und E7 eine Kopienzahl deutlich oberhalb des Grenzwertes ermittelt. Beim Vergleich der viralen Onkogene zeigte sich für den Nachweis von E7 eine höhere Spezifität als für E6 (Tabelle 25).

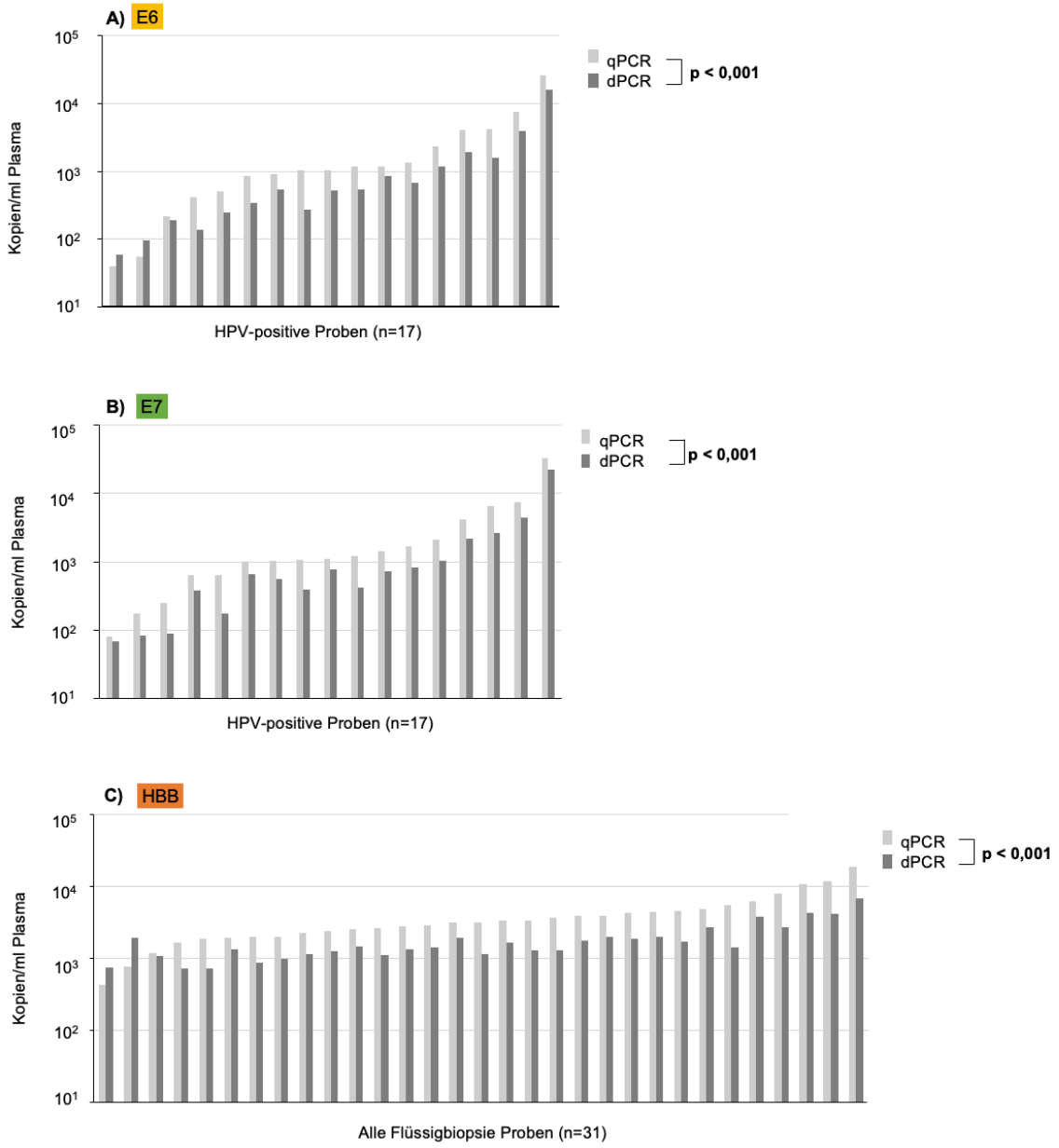
Tabelle 25: Diagnostische Validität der qPCR- und dPCR-Messung für den Nachweis der HPV16 Gene E6 und E7

Methode	HPV-DNA	HPV+ OPSCC (n = 17)	HPV- OPSCC (n = 14)	Sensitivität in %	MW	Spezifität in %	MW
qPCR	E6, positiv/negativ	14/3	3/11	82,4	82,4	78,6	82,2
	E7, positiv/negativ	14/3	2/12	82,4		85,7	
dPCR	E6, positiv/negativ	14/3	2/12	82,4	82,4	85,7	89,3
	E7, positiv/negativ	14/3	1/13	82,4		92,9	

MW = Mittelwert.

3.5.2 Vergleich der gemessenen Kopien E6, E7 und HBB mittels qPCR und dPCR

Für die absolute Zahl an gemessenen Kopien E6, E7 und HBB zeigte sich eine signifikant höhere Quantifizierung in der qPCR als in der dPCR. Das Verhältnis der Messwerte von qPCR/dPCR betrug im Mittel für E6, E7 und HBB jeweils 2,1, 3,9 und 2,2 ($p < 0,001$) (Abb. 23). Der virale Anteil der Kopien E6 und E7 relativ zu HBB aus der cfDNA-Extraktion von HPV-positiven OPSCC wies hingegen keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden PCR-Messungen auf (E6: $p = 0,606$ und E7: $p = 0,555$) (Abb. 24).



<u>Abbildung 23:</u> Vergleich der qPCR- und dPCR-Messung von Kopien E6 (A) und E7 (B) bei HPV-positiven Proben sowie von HBB (C) bei allen Proben. Die Kopien pro ml Plasma sind in aufsteigender Reihenfolge dargestellt. p-Werte wurden mit dem Wilcoxon Test für abhängige Stichproben berechnet. Signifikante p-Werte ≤ 0,05 sind fett gedruckt.

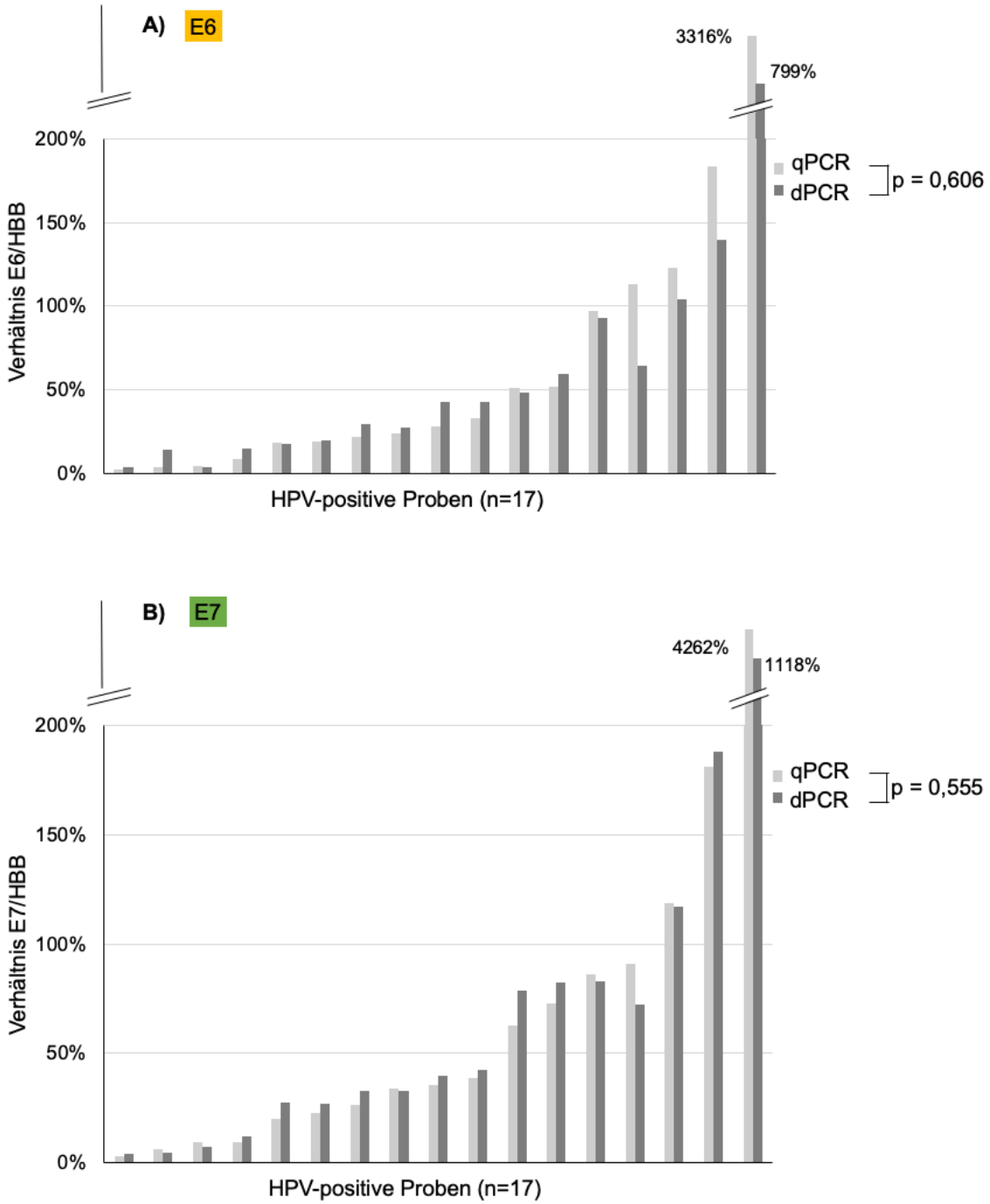


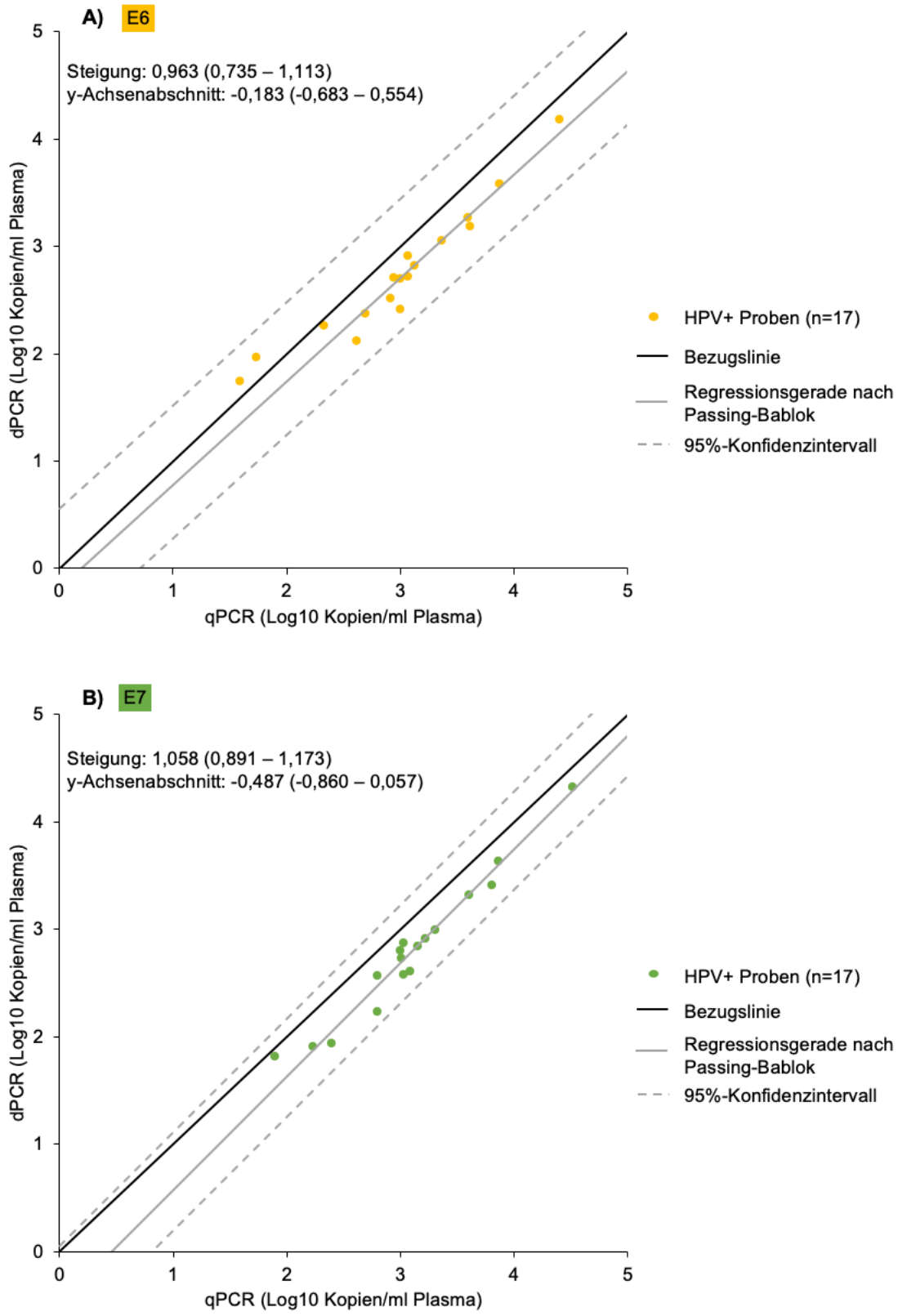
Abbildung 24: Vergleich der qPCR- und dPCR-Messung von Kopien E6 (A) und E7 (B) relativ zu HBB aus der cfDNA-Extraktion bei HPV-positiven Proben. Die Kopien E6 bzw. E7 relativ zu HBB sind in aufsteigender Reihenfolge dargestellt. p-Werte wurden mit dem Wilcoxon Test für abhängige Stichproben berechnet.

3.5.3 Korrelation von qPCR und dPCR

Beim Vergleich von zwei verschiedenen Messmethoden stellt sich die Frage nach dem Zusammenhang und der Übereinstimmung beider Methoden. Für die weitere statistische Auswertung und zur gleichförmigeren Darstellung des gesamten Messwertbereiches wurden die ermittelten Kopien pro ml Plasma zur Basis 10 logarithmiert. Zur Untersuchung der Ausprägung und der Richtung eines linearen Zusammenhangs zwischen qPCR- und dPCR-Messung wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson bestimmt. Für die Gruppe der HPV-positiven OPSCC ergeben sich für Pearson's r jeweils 0,961 (E6) und 0,981 (E7) ($p < 0,001$). Für die Messung von HBB mittels qPCR und dPCR bei allen *Liquid Biopsy* Proben betrug $r = 0,807$ ($p < 0,001$). Es zeigt sich insgesamt eine hohe positive und lineare Korrelation – erwartungsgemäß, da beide PCR-Methoden dieselben Parameter untersuchen. Der Korrelationskoeffizient liefert jedoch keine Aussage in Bezug auf die Übereinstimmung zweier Messverfahren.

3.5.4 Lineare Regression nach Passing-Bablok von qPCR und dPCR

Für die Betrachtung der Übereinstimmung von qPCR und dPCR wurden im nächsten Schritt beide Methoden mittels Passing-Bablok Regression verglichen (Abschnitte 2.6.1 und 12.2). Die lineare Regression nach Passing-Bablok ist ein nicht-parametrisches Verfahren zur Untersuchung von zwei Messmethoden auf einen konstanten oder proportionalen Messfehler. Dabei wird eine kontinuierliche Verteilung der Variablen sowie eine lineare Beziehung zwischen beiden Messmethoden vorausgesetzt. Dies wird für den Nachweis von E6 und E7 innerhalb der Gruppe der HPV-positiven OPSCC sowie für den Nachweis von HBB bei allen *Liquid Biopsy* Proben angenommen. Für die gleichförmigere Darstellung des gesamten Messwertbereiches wurden die ermittelten Kopien pro ml Plasma zur Basis 10 logarithmiert. Die Ergebnisse von qPCR-Messung (x-Achse) und dPCR-Messung (y-Achse) wurden gegeneinander aufgetragen und für jeden der Messwertpaare die Steigung ermittelt. Für die Regressionsgerade nach Passing-Bablok ($y = mx + b$) wird der gewichtete Median des y-Achsenabschnitts (b) und der Steigung (m) verwendet sowie das 95%-Konfidenzintervall (KI) beider Regressionsparameter berechnet (Abb. 25). Die Bezugslinie stellt die ideale Übereinstimmung von zwei Messmethoden dar mit einem y-Achsenabschnitt von $b = 0$ und einer Steigung von $m = 1$. Mithilfe der Konfidenzintervalle der Regressionsparameter lassen sich zwei Fehlerarten unterscheiden. Ein konstanter Fehler ergibt sich, wenn im 95%-KI des y-Achsenabschnitts $b = 0$ nicht enthalten ist. Ein proportionaler Fehler liegt vor, wenn im 95%-KI der Steigung $m = 1$ nicht enthalten ist (Bilić-Zulle, 2011; Hilgers et al., 2019; Passing & Bablok, 1983, 1984).


A)
E6
Steigung: 0,963 (0,735 – 1,113)
y-Achsenabschnitt: -0,183 (-0,683 – 0,554)
dPCR (Log10 Kopien/ml Plasma)
qPCR (Log10 Kopien/ml Plasma)
HPV+ Proben (n=17)
Bezugslinie
Regressionsgerade nach Passing-Bablok
95%-Konfidenzintervall
B)
E7
Steigung: 1,058 (0,891 – 1,173)
y-Achsenabschnitt: -0,487 (-0,860 – 0,057)
dPCR (Log10 Kopien/ml Plasma)
qPCR (Log10 Kopien/ml Plasma)
HPV+ Proben (n=17)
Bezugslinie
Regressionsgerade nach Passing-Bablok
95%-Konfidenzintervall

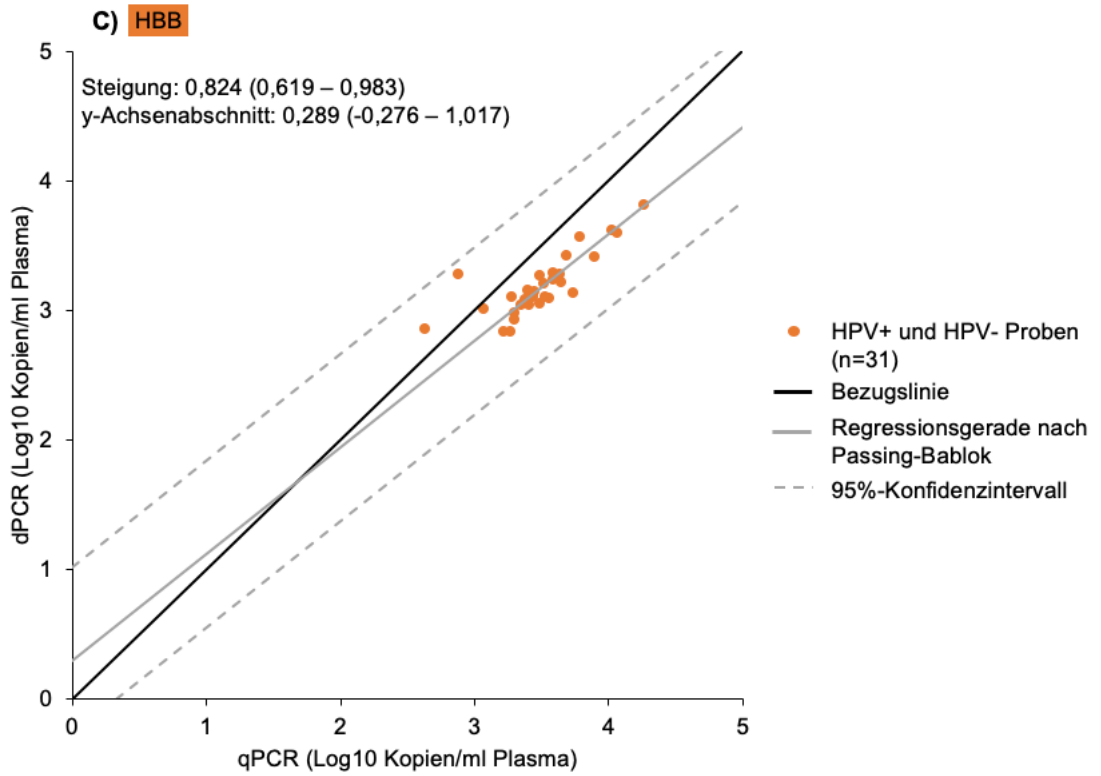


Abbildung 25: Passing-Bablok Regression für die qPCR- und dPCR-Messung von E6 (A) und E7 (B) bei HPV-positiven Proben sowie von HBB (C) bei allen Proben. Die Bezugslinie markiert die erwarteten Werte bei vollkommener Übereinstimmung zwischen per qPCR und per dPCR ermittelten Kopien. Die Regressionsparameter sowie das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall ist für den Nachweis aller Gene angegeben.

Für den Nachweis von E6 und E7 bei den HPV-positiven OPSCC liegt weder ein proportionaler noch ein konstanter Fehler vor (m = 1 und b = 0 im 95%-KI enthalten). Hier zeigt sich eine Steigung von 0,963 (E6) und 1,058 (E7) und beide Regressionsgeraden verlaufen annähernd parallel zur Bezugslinie. Anhand des negativen y-Achsenabschnittes von -0,183 (E6) und -0,487 (E7) ist zu erkennen, dass eine Unterschätzung der dPCR im Vergleich zur qPCR vorliegt (Abb. 25A und 25B). Dagegen zeigt sich für den Nachweis von HBB bei allen *Liquid Biopsy* Proben eine Steigung von 0,824 mit einem 95%-Konfidenzintervall zwischen 0,619-0,983 ($m \neq 1$). Somit liegt für die vergleichende Messung mittels qPCR und dPCR ein proportionaler Fehler für den Nachweis von HBB vor (Abb. 25C). Insgesamt wird für den Nachweis von E6, E7 und HBB eine Verschiebung der Regressionsgerade nach rechts im Vergleich zur Bezugslinie deutlich.

3.5.5 Differenzdiagramm nach Bland-Altman von qPCR und dPCR

Das Differenzdiagramm nach Bland-Altman stellt die Streuung und die Verzerrung der einzelnen Messwertpaare von zwei Methoden dar (Abschnitte 2.6.2 und 12.3). Für die gleichförmigere Darstellung des gesamten Messwertbereiches wurden die ermittelten Kopien pro ml Plasma wiederum zur Basis 10 logarithmiert. Auf der x-Achse ist für jede Probe der Mittelwert aus qPCR- und dPCR-Messung aufgetragen. Dies spiegelt die Streuung des untersuchten Messbereichs wider. Auf der y-Achse ist die Differenz der Messwerte aus beiden Methoden (qPCR-dPCR) aufgetragen, welches der Verzerrung der Messwertpaare entspricht (Abb. 26). Die Voraussetzung für den Methodenvergleich nach Bland-Altman ist eine Normalverteilung dieser Differenzen. Dies wurde für alle Proben mittels Shapiro-Wilk Test überprüft. Eine Normalverteilung der Differenzen wurde bei $p > 0,05$ für E6 und E7 in der Gruppe der HPV-positiven Proben angenommen, wohingegen für HBB bei allen *Liquid Biopsy* Proben keine Normalverteilung der Differenzen vorlag (E6: $p = 0,059$, E7: $p = 0,902$, HBB: $p < 0,001$). Die mittlere Differenz beschreibt die Ausprägung und Richtung der Verzerrung (auch Bias genannt). Das 95%-Konfidenzintervall ergibt sich aus der mittleren Differenz ± der 1,96-fachen Standardabweichung der Differenzen. Dies entspricht der oberen und unteren Übereinstimmungsgrenze (*limits of agreement*) von zwei Messmethoden. Bei idealer Übereinstimmung von zwei Methoden beträgt die mittlere Differenz 0 (Bezugslinie). (Bland & Altman, 1986, 1999; Giavarina, 2015; Grouven et al., 2007; Shapiro & Wilk, 1965).

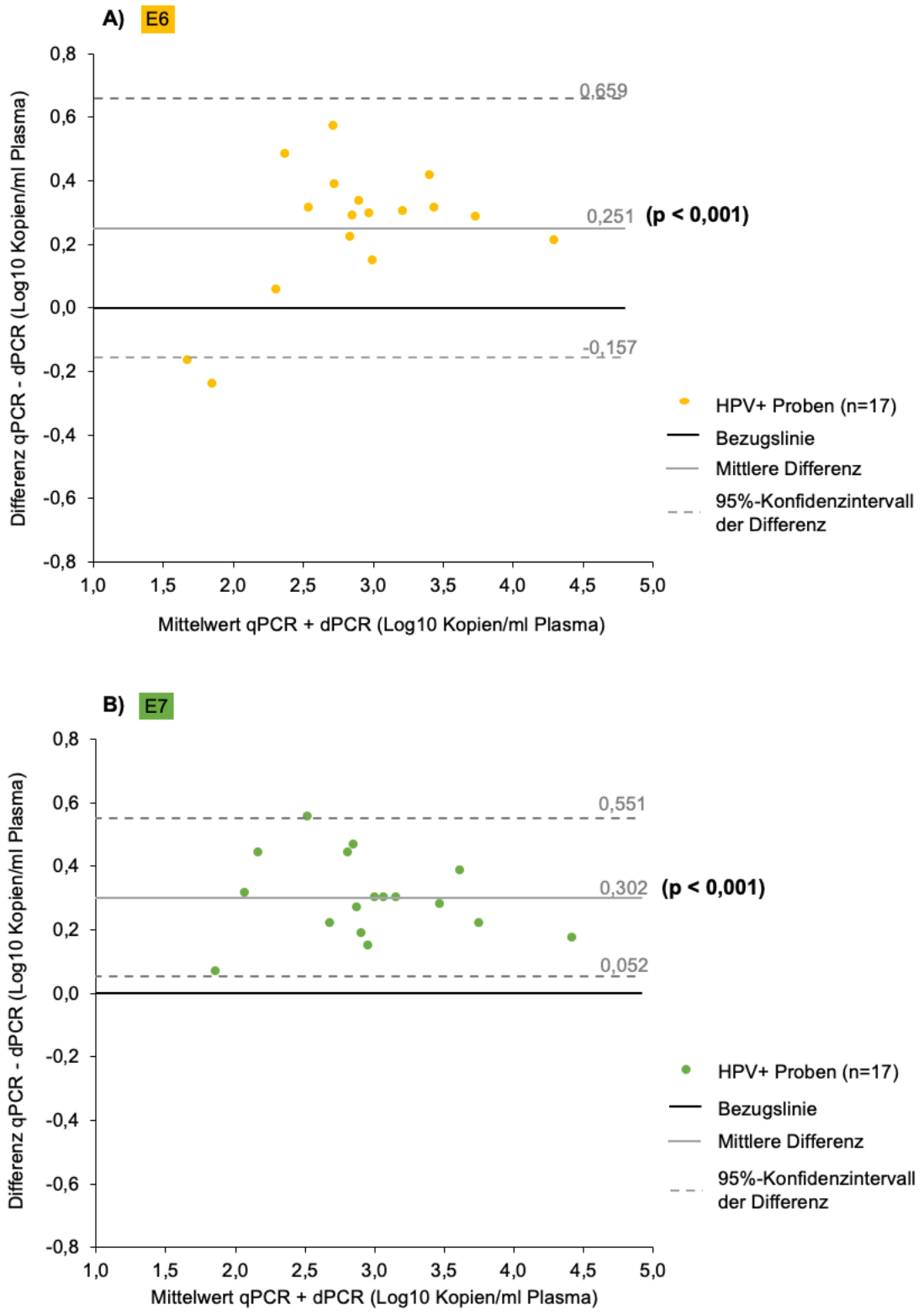


Abbildung 26: Bland-Altman-Differenzdiagramm für die qPCR- und dPCR-Messung von E6 (A) und E7 (B) bei HPV-positiven Proben. Die Bezugslinie markiert die erwartete Differenz von 0 bei vollkommener Übereinstimmung zwischen per qPCR und per dPCR ermittelten Kopien. Die Werte der mittleren Differenz sowie das dazugehörige 95%-Konfidenzintervall sind angegeben. p-Werte wurden mit dem t-Test berechnet. Signifikante p-Werte < 0,05 sind fett gedruckt.

Für den Nachweis beider viralen Onkogene zeigt sich auf der logarithmischen Skala ein signifikantes positives Bias für E6 von 0,251 (SD = 0,208) und für E7 von 0,302 (SD = 0,127) ($p < 0,001$). Die Rücktransformation der Werte auf die Originalskala ergeben einen dimensionslosen Quotienten von 1,78 (E6) und 2,00 (E7). Dies entspricht einer durchschnittlichen höheren Quantifizierung von 78% (E6) bzw. 100% (E7) in der qPCR als in der dPCR. Da die Bezugslinie für die qPCR- und dPCR-Messung von E7 außerhalb des 95%-Konfidenzintervalls liegt, handelt es sich hiermit um eine systematische höhere Quantifizierung von E7 in der qPCR gegenüber der dPCR (Abb. 26B).

3.5.6 Zusammenfassung des Methodenvergleichs von qPCR und dPCR

Für die vergleichende Messung von HPV-positiven *Liquid Biopsy* Proben mittels qPCR und dPCR zeigte sich zunächst für den Nachweis von E6 und E7 eine hohe positive Korrelation. Beim Vergleich beider PCR-Methoden mittels Passing-Bablok Regression lag weder ein signifikanter proportionaler noch konstanter Fehler vor. Allerdings wurde anhand des negativen y-Achsenabschnittes der Regressionsgeraden eine Unterschätzung der dPCR gegenüber der qPCR für den Nachweis von E6 und E7 deutlich. Dies wurde ebenso im Bland-Altman-Differenzdiagramm bestätigt, wo ein positives Bias einer Überschätzung der qPCR gegenüber der dPCR entspricht. Für die vergleichende qPCR- und dPCR-Messung von HBB bei allen *Liquid Biopsy* Proben zeigte sich eine geringere Korrelation als für E6 und E7, sowie ein signifikanter proportionaler Fehler in der Passing-Bablok Regression. Die Ergebnisse des Methodenvergleichs von qPCR und dPCR zum Nachweis von E6, E7 und HBB in *Liquid Biopsy* Proben werden in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26: Zusammenfassung des Methodenvergleichs von qPCR und dPCR für den Nachweis der Gene E6, E7 und HBB

	Gen		
Parameter	**E6 (HPV+ Proben)**	**E7 (HPV+ Proben)**	**HBB (alle Proben)**
r	0,961	0,981	0,807
Steigung 95%-Konfidenzintervall	0,963 (0,735 – 1,113)	1,058 (0,891 – 1,173)	0,824 (0,619 – 0,983)
y-Achsenabschnitt 95%-Konfidenzintervall	-0,183 (-0,683 – 0,554)	-0,487 (-0,860 – 0,057)	0,293 (-0,276 – 1,017)
Bias (Log10 Kopien/ml) 95%-Konfidenzintervall	0,251 (-0,157 – 0,659)	0,302 (0,052 – 0,551)	/

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson. Steigung und y-Achsenabschnitt aus der Regressionsgerade nach Passing-Bablok. Bias aus dem Differenzdiagramm nach Bland-Altman.

4. Diskussion

Die steigende Inzidenz des HPV-positiven Oropharynxkarzinoms unterstreicht die zentrale Bedeutung des HPV-Status bei der Diagnose, da dieser als positiver Prädiktor für das Therapieansprechen und die Gesamtprognose gilt. In klinischen Studien wird daher zur potenziellen Therapiedeeskalation geforscht, um die behandlungsassoziierte Toxizität zu minimieren (Palma et al., 2022). Dennoch entwickeln 10-25% der Patienten mit HPV-positiven OPSCC innerhalb von 2-5 Jahren ein Rezidiv, welches es in der Tumornachsorge frühzeitig zu erkennen gilt (Lechner et al., 2022). Molekularbiologisch spielen die viralen Onkogene E6 und E7 bei der Karzinogenese des HPV-positiven OPSCC eine essenzielle Rolle. Vor diesem Hintergrund zeichnet sich die *Liquid Biopsy* zur Analyse von zellfreier HPV-DNA in Blutproben als vielversprechendes Instrument ab. Gegenüber der Gewebebiopsie handelt es sich bei der *Liquid Biopsy* um ein minimal-invasives Verfahren zum Nachweis von Biomarkern in Körperflüssigkeiten. Durch die Möglichkeit zur seriellen Probenentnahme können die dynamischen Veränderungen von tumorspezifischer DNA im Blut sowohl in der Diagnostik als auch in der Nachsorge von Tumorerkrankungen genutzt werden. In diesem Zusammenhang zeigte sich, dass bei Patienten mit HPV-getriebenen Oropharynxkarzinom der postinterventionelle Anstieg der viralen Onkogene E6 und E7 in Blutproben mit einem Krankheitsrezidiv korrelierte (Chera et al., 2020; Paolini et al., 2023; Reder et al., 2020). Für den Nachweis von HPV-DNA stellen die quantitative und digitale PCR zwei unterschiedliche PCR Varianten dar, die in einer vergleichenden Messung von *Liquid Biopsy* Proben in dieser Arbeit angewandt wurden.

4.1 Analytische Evaluation des qPCR und dPCR Multiplex Assays

Ein Ziel der Arbeit war es, einen PCR Triplex Assay zum Nachweis der viralen Gene E6 und E7 gemeinsam mit einem der humanen Referenzgene HBB oder RPP30 zu etablieren. Besonders bei limitierten Probenmaterial ist ein Multiplex Assay vorteilhaft, da mehrere Genabschnitte parallel im gleichen Reaktionsansatz nachgewiesen werden können. Dabei ist als Herausforderung eines Multiplex Assays die erhöhte Reaktionskomplexität zu beachten, welche zu Inhibition und unspezifischen Interaktionen zwischen den verwendeten Primer- und Sonden-Paaren führen kann (Bustin et al., 2009). Dagegen entfallen Unterschiede zwischen Ziel- und Referenzgen, die bei einzelnen Reaktionsansätzen leicht aus der Ungenauigkeit des Pipettierens resultieren können.

4.1.1 Analytische Evaluation des qPCR Multiplex Assay

Bei der qPCR-Methodenetablierung wurde vom Nachweis eines einzelnen Zielgens zunächst im Monoplex Assay (Abschnitt 3.1.1) schrittweise auf ein Multiplex Assay übergegangen (Abschnitt 3.1.2). Für die Etablierung eines Triplex Assays zum Nachweis der viralen Gene E6 und E7 mit einem der humanen Referenzgenen HBB oder RPP30 wurden beide Kombinationen mit dem Kontrollplasmid als PCR-Substrat getestet. Während sich die Kombination von E6, E7 und HBB als stabil erwies, zeigten sich dagegen für RPP30 im Triplex Assay höhere Cq-Werte, die >2 Zyklen von E6 und E7 entfernt waren, sowie eine erhöhte Intra-Assay Variabilität (Abschnitt 3.1.2, Abbildung 5B und Tabelle 22). Somit wurde die Kombination der Assays für RPP30 mit E6 und E7 als weniger kompatibel gewertet und fortan HBB als humanes Referenzgen verwendet. Weiterhin lag die Amplifikations-Effizienz für alle nachzuweisenden Gene bei den Versuchen sowohl im Monoplex als auch im Multiplex Assay in einem „gutem Bereich“ zwischen 90-110% (Ma et al., 2021; Rogers-Broadway & Karteris, 2015). Effizienzen über 100% können auf die Präsenz von PCR-Inhibitoren, Pipettierfehler sowie unspezifische Primer-Dimere hinweisen (Nybo, 2011), gewisse Schwankungen der Effizienz werden jedoch bis 110% toleriert. In dieser Arbeit zeigte sich lediglich einmalig eine Effizienz von 104% für E6, E7 und HBB im Triplex Assay mit dem Kontrollplasmid (Abschnitt 3.1.2).

Zur weiteren Assay-Optimierung wurde die Auswirkung einer Plasmidrestriktion auf die Sensitivität der qPCR untersucht. Hier konnte für das geschnittene und somit linearisierte Kontrollplasmid eine geringere Inter-Assay Variabilität als beim ungeschnittenen, zirkulären Kontrollplasmid gezeigt werden (E6: rSD = 7,4% vs. 13,5%; E7: rSD = 8,7% vs. 13,6%; Abschnitt 3.1.3, Tabelle 23). Die Amplifikations-Effizienz blieb für beide Gene unabhängig vom Restriktionsverdau hoch (zwischen 96-100%). Lin et al. untersuchten die Auswirkung verschiedener Plasmid Strukturen auf die qPCR und fanden ebenso keinen signifikanten Unterschied der Amplifikations-Effizienz zwischen linearisierter und zirkulärer (*supercoiled*) Plasmid-DNA (Lin et al., 2011). Dementgegen wurden in weiteren Arbeiten eine bessere Effizienz sowie eine erhöhte Sensitivität für ein geschnittenes Plasmid als Substrat gegenüber ungeschnittener Plasmid-DNA beschrieben. Als mögliche Erklärung wurde hier eine verbesserte Zugänglichkeit der Primer und der DNA-Polymerase zum linearisierten Plasmid genannt (J. Chen et al., 2007; Hou et al., 2010). Für eine relative Quantifizierung mittels qPCR sollten allerdings die DNA-Konformationen des Kalibrierungs-Standards (hier Plasmid-DNA) und der zu untersuchenden Probe (hier cfDNA aus Plasma) möglichst ähnlich sein, um grundsätzliche Unterschiede zu vermeiden und vergleichbare Amplifikations-Effizienzen

zu erreichen (Ma et al., 2021). In Zusammenschau mit den eigenen Ergebnissen zur geringeren Inter-Assay Variabilität wurde in Hinblick auf die *Liquid Biopsy* Messung das geschnittene Kontrollplasmid verwendet, da dies am ehesten mit der fragmentierten cfDNA aus Flüssigbiopsien vergleichbar ist.

Auf die Assay-Optimierung mittels Plasmidrestriktion folgte die Untersuchung des dynamischen Konzentrationsbereiches, „innerhalb dessen die Methode eine ausreichende Linearität, Richtigkeit und Präzision besitzt“ (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2024). Das etablierte qPCR Triplex Assay mit dem geschnittenen Kontrollplasmid zeigte für E6, E7 und HBB eine hohe Linearität (R^2 > 0,999) über 7 Log10 Konzentrationsstufen, sowie eine Effizienz von 97-98% (Abschnitt 3.1.4, Abbildung 7). Dies ist im Einklang mit den MIQE (*Minimal Information for Publication of quantitative Real-Time PCR Experiments*) Empfehlungen eines linearen Bereichs über mindestens 5 Log10 Konzentrationsstufen (Bustin et al., 2009). Interessanterweise wurden bei der niedrigsten Verdünnungsstufe von rechnerisch $2x10^{-1}$=0,2 Kopien pro Reaktion für E6, E7 und HBB technisch valide Cq-Werte gemessen. Diese wiesen jedoch über alle Messreihen hinweg (n = 4) eine geringe Intra- und Inter-Assay-Wiederholbarkeit auf (hohe Standardabweichung von > 0,5 Zyklen sowie eine relative Standardabweichung >35%). Zudem lagen diese Cq-Werte deutlich außerhalb des linearen Messbereichs. Da für diese Konzentrationsstufe keine regelrechte Amplifikation erwartet wurde, könnte eine mögliche Erklärung für die gemessenen Cq-Werte eine unspezifische Kreuzreaktion der Primer- und Sonden-Paare sein.

Die untere Quantifizierungsgrenze einer Methode entspricht der niedrigsten Konzentrationsstufe, die mit einer vorgegebenen Präzision (angegeben als relative Standardabweichung) nachgewiesen werden kann. Für den Grenzwert der tolerablen, relativen Standardabweichung gibt es in der Literatur verschiedene Angaben zwischen 20-35% (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2024; Forootan et al., 2017; Tzonev, 2018). Die akzeptable, relative Standardabweichung ist dabei von der Fragestellung sowie der Komplexität der Proben abhängig. In Hinblick auf die klinische Relevanz der eigenen Arbeit für die Tumordiagnostik gilt es, möglichst viele HPV-positive Proben mit potenziell niedrigen, viralen Kopien als valide Messungen zu bewerten. Unter Berücksichtigung der höheren Reaktionskomplexität eines Multiplex Assays wurde daher eine relative Standardabweichung bis zu 35% in dieser Arbeit toleriert (Forootan et al., 2017). Hiermit lag die untere Quantifizierungsgrenze für das Triplex Assay aus E6, E7 und HBB bei 25 (E6) bzw. 26 (E7, HBB) Kopien pro Reaktion

(Abschnitt 3.1.4). In den Leitlinien zur Methodenverifizierung mittels dPCR wird eine Grenze ≤ 50 Kopien (rSD ≤ 25%) bei einem quantitativen Assay empfohlen (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2024). Diese Vorgabe wird somit auch für das vorliegende qPCR Assay erfüllt. Die hier bestimmte Quantifizierungsgrenze liegt in einem Bereich, der auch von anderen Autoren bestätigt wird. In einer anderen Arbeit wurde humane DNA mittels qPCR untersucht und hierbei eine untere Quantifizierungsgrenze von 16 Kopien pro Reaktion (rSD ≤ 35%) ermittelt (Forootan et al., 2017). Pavšič et al. etablierten einen qPCR Assay zum Nachweis des humanen Cytomegalievirus mit einer unteren Quantifizierungsgrenze von 11-22 Kopien pro Reaktion (rSD ≤ 25%) (Pavšič et al., 2016). Insgesamt liegen die Ergebnisse dieser Arbeit also innerhalb der Spannweite der beschriebenen unteren Quantifizierungsgrenzen der qPCR.

4.1.2 Analytische Evaluation des dPCR Multiplex Assay

Im Gegensatz zur relativen Quantifizierung in der qPCR wird bei der absoluten Quantifizierung mittels dPCR kein Kalibrierungsstandard benötigt. Während bei der qPCR die exponentielle Fluoreszenzzunahme die Grundlage für den Cq-Wert darstellt, erfolgt bei der dPCR eine digitale Signalaufteilung in positive und negative Partitionen. Aufgrund der Endpunkt-Messung wird die dPCR als weniger anfällig hinsichtlich unterschiedlicher Amplifikations-Effizienzen sowie Reaktions-Inhibitoren im Vergleich zur qPCR beschrieben. Daher zeichnet sich die dPCR mit dem Potenzial zur präziseren und reproduzierbaren Quantifizierung von Nukleinsäuren aus (L. Pinheiro & Emslie, 2018).

Zur analytischen Evaluation der dPCR wurden zunächst die in der qPCR etablierten Primer- und Sonden-Paare ebenfalls in der dPCR im Monoplex und Triplex Assay überprüft (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Hier zeigte sich für HBB im Triplex Assay mit dem Farbstoff *Texas Red* (roter Farbkanal) eine bessere Auflösung zwischen positiven und negativen Reaktionspartitionen als mit dem Farbstoff Atto550 (oranger Farbkanal), welches ein Doppelbanden-Muster innerhalb der positiven Signalwolke erzeugte (Abbildung 9). Grundsätzlich sind sowohl auf molekularer als auch auf technischer Ebene verschiedene Ursachen für unspezifische Signalwolken denkbar. Analog zur qPCR kann es auch bei der dPCR in einem Multiplex Ansatz zu einer Kreuz-Hybridisierung (*cross mismatch hybridisation*) der unterschiedlichen Primer und Sonden und somit zu Signalen mit intermediärer Fluoreszenz zwischen klar positiver und negativer Signalintensität kommen (Whale et al., 2016). Speziell für das dPCR-Gerät kann ein Fluoreszenzsignal auch in einem benachbarten Farbkanal registriert werden,

welches als „*bleed through*" Phänomen bezeichnet wird (The dMIQE Group et al., 2020). Da die Änderung der dPCR Zyklus- und Belichtungsparameter in dieser Arbeit keine wesentliche Verbesserung herbeiführte, scheint es sich im vorliegenden Fall um eine überlappende Fluoreszenzdetektion zu handeln. Die verbesserte Signalauftrennung für HBB beim Farbstoffwechsel von Atto550 zu *Texas Red* bestätigte die Annahme einer überlappenden Fluoreszenzdetektion zwischen dem gelben und orangenen Farbkanal im Triplex Assay. Auch wenn die dPCR aufgrund der Partitionierung und Endpunkt-Messung als weniger anfällig für Kreuzreaktionen als die qPCR angesehen wird, unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit die Bedeutung der Assay-Optimierung bei allen Multiplex Versuchen (L. Pinheiro & Emslie, 2018).

Analog zur qPCR wurde ebenfalls der Effekt der Plasmidrestriktion auf die dPCR untersucht. Durch Verwendung des linearisierten Kontrollplasmids konnte eine Reduktion unspezifischer „Regen" Signale erreicht sowie eine höhere Quantifizierung von 3-5% mehr Kopien E6, E7 und HBB gezeigt werden (Abschnitt 3.2.3, Abbildung 11und Abbildung 12). Der Anteil von „Regen" Signalen ist unter anderem von der Qualität der DNA-Probe und der PCR-Inhibition abhängig. Eine linearisierte DNA-Konformation bzw. eine Restriktion in kürzere Fragmente kann sich besonders bei zirkulären Plasmiden sowie bei längeren Nukleinsäuresequenzen genomischer DNA positiv auf die Signalaufteilung auswirken (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2024; The dMIQE Group et al., 2020). Da die absolute Quantifizierung der dPCR auf der Annahme einer Poisson-Verteilung beruht, ist eine zufällige Distribution der Zielmoleküle über alle Reaktionspartitionen der Nanoplatte hinweg eine wichtige präanalytische Voraussetzung. Die verbesserte Signalauflösung durch die Restriktion könnte durch eine gleichförmige Verteilung des geschnittenen Plasmids über alle Partitionen sowie eine verbesserte Zugänglichkeit der DNA-Polymerase zum Substrat erklärbar sein (Bhat et al., 2009; Hindson et al., 2011). Dies bestätigen auch die eigenen Ergebnisse zur Plasmidrestriktion in der dPCR.

Der dynamische Bereich des in dieser Arbeit entwickelten dPCR Assays deckt 5 Log10 Konzentrationsstufen ab (Abschnitt 3.2.4, Abbildung 13). Insgesamt zeigte sich für diesen Bereich eine hohe Linearität mit einem Bestimmtheitsmaß $R^2 \geq 0{,}998$. Bei der Regressionsanalyse zwischen gemessenen und theoretisch erwarteten Kopien lag die ermittelte Steigung von 0,77 (HBB), 0,78 (E6) und 0,79 (E7) im akzeptablen Bereich von 1± 0,25 (European Commission: Joint Research Centre. et al., 2023), wenn auch an dessen unteren Grenze. Erwartungsgemäß unterliegt die dPCR hinsichtlich des dynamischen Bereichs der qPCR (L. Pinheiro & Emslie, 2018; Quan et al., 2018),

welches sich auch für das dPCR Assay im Vergleich mit dem qPCR Assay in dieser Arbeit zeigt. Dabei wird der dynamische Bereich der digitalen PCR durch die Anzahl und das Volumen der Partitionen von der jeweiligen Plattform begrenzt. Die eingesetzte Nanoplatte mit 26.000 Partitionen entspricht der größtmöglichen Anzahl beim verwendeten *QIAcuity*® System. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Präzision im linearen Bereich ist die Voraussetzung eines konstanten Volumens aller Partitionen. Dieses wird bei der verwendeten „26k 24-*Well*" Nanoplatte mit 0,91 nl pro Partition vorgegeben (*QIAcuity® Application Guide: User Manual Extension*, 2023). Zudem werden produktionstechnische Schwankungen der Partitionsgröße bei jedem Lauf anhand der Chargennummer der jeweiligen Nanoplatte mithilfe des *Volume Precision Factors* (VPF) der Software bei der Berechnung der Kopienzahl berücksichtigt (*QIAcuity® User Manual*, 2022). Die Bedeutung eines konstanten Partitionsvolumens auf die Präzision der Quantifizierung wird nicht nur für die hier verwendete Platten-basierte dPCR, sondern auch für die *droplet* dPCR beschrieben. Aufgrund von Schwankungen des Tröpfchen-Volumens kann es folglich zu einer Über- oder Unterschätzung der gemessene Kopienzahl kommen (Corbisier et al., 2015; Emslie et al., 2019; Košir et al., 2017; Pavšič et al., 2016; Vynck et al., 2016).

In dieser Arbeit entspricht die untere Quantifizierungsgrenze der dPCR für das Triplex Assay aus E6, E7 und HBB 15, 27 bzw. 40 Kopien pro Reaktion (rSD ≤ 35%; Abschnitt 3.2.4, Abbildung 14). Dabei liegt die Quantifizierungsgrenze für das humane Referenzgen HBB deutlich über den Werten für E6 und E7. Diese Abweichung für das humane Referenzgen HBB könnte durch eine höhere Anfälligkeit der dPCR für Kontamination erklärbar sein. Da menschliche DNA ubiquitär und auch in Nicht-Reinraum Laboren wie dem unsrigen vorkommt, könnte eine mögliche unspezifische Amplifikation den höheren Grenzwert erklären. Eine weitere Studie beschrieb für den Nachweis des humanen Cytomegalievirus eine Quantifizierungsgrenze mittels *droplet* dPCR (Bio-Rad, QX100) und Platten-basierter dPCR (Biomark, 37K *Array*) von 30 bzw. 14 Kopien pro Reaktion (rSD ≤ 25%) (Pavšič et al., 2016). Ebenfalls für die Platten-basierte dPCR (Applied Biosystems, *Quant Studio* 3D) wurden für drei verschiedene Assays zum Nachweis bakterieller DNA eine Quantifizierungsgrenze von 73-167 Kopien pro Reaktion (rSD ≤ 25%) ermittelt (Ricchi et al., 2017). Wie im vorherigen Abschnitt dargestellt, ist für die Modellierung bzw. Errechnung der Kopienzahl nach der Poisson-Verteilung die Anzahl und das Volumen der Partitionen essenziell. Da sich die beschriebenen dPCR-Plattformen hinsichtlich dieser Aspekte grundlegend unterscheiden, ist der direkte Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur nur eingeschränkt möglich. Dennoch liegen die Ergebnisse

dieser Arbeit zur unteren Quantifizierungsgrenze innerhalb der beschriebenen Spannweite und die Empfehlung einer Quantifizierungsgrenze ≤ 50 Kopien (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), 2024) wird für das quantitative Triplex Assay für E6, E7 und HBB ebenfalls erreicht. Somit zeigen die eigenen Versuche zur Methodenetablierung der quantitativen und digitalen PCR für das Triplex Assay aus für E6, E7 und HBB insgesamt betrachtet eine gute analytische Leistungsfähigkeit.

4.2 qPCR- und dPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104

Im Anschluss an die Etablierung des Triplex Assays mit dem Kontrollplasmid erfolgte zur Annäherung an die Messung von *Liquid Biopsy* Proben eine vergleichende qPCR- und dPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104. Diese stammte von einem Patienten mit HPV16-positivem Mundhöhlenkarzinom und zeichnet sich durch eine einzelne Kopie HPV16-DNA pro Zelle aus, die in das humane Genom integriert vorliegt (Akagi et al., 2014; Tang et al., 2012). Da diese Zellen klonal sind, kann über die relativ einfache und genau bestimmbare Zellzahl einer Probe auch die Anzahl dieser HPV-Gene bestimmt werden. Die qPCR-Messung von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 lieferte interessanterweise für E7 sowohl in der Messung im Monoplex als auch im Triplex Assay um 2,6 bzw. 2,7 Zyklen niedrigere Cq-Werte im Vergleich zu HBB (Abschnitt 3.3.1, Abbildung 15). Unter der Voraussetzung einer idealen Substratverdopplung bei jedem Zyklus würde dies einer 6,1 bis 6,5-fache Kopienzahl von E7 zu HBB entsprechen und entgegen einem 1:1 Verhältnis bei einer Kopie eines integrierten HPV-Genoms pro Zelle stehen. Im Gegensatz dazu waren die Cq-Werte für E6 annähernd identisch mit denen von HBB, welches die Erwartung einer HPV-Kopie in der Zelllinie UM-SCC-104 stützt. Erstaunlicherweise wurden hingegen in der dPCR-Messung sowohl für E6 als auch für E7 eine höhere Kopienzahl ermittelt. Hier lag das Verhältnis beider viraler Gene zum humanen Referenzgen HBB bei 2,3:1. Dies zeigte sich sowohl für den Nachweis der Gene im Monoplex als auch im gemeinsamen Triplex Assay (Abschnitt 3.3.2, Abbildung 16). Die divergierenden Ergebnisse für E6 mittels qPCR und dPCR könnten auf die unterschiedlichen DNA-Polymerasen in den Reaktionsmixen zurückzuführen sein. Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit eine erhöhte Zahl an viralen Genen sowohl in der qPCR als auch in der dPCR nachgewiesen, womit die eigenen Ergebnisse von der Erwartung einer HPV-Kopie in der Zelllinie UM-SCC-104 abweichen.

Im Einklang mit den eigenen Ergebnissen zur erhöhten Zahl an HPV-Genen wiesen Walline et al. bei der Zelllinie UM-SCC-104 mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung im Durchschnitt 1,6 HPV-Kopien pro Zelle nach (Walline et al., 2017). In der Arbeit von

Akagi et al. wurde die gleiche Zelllinie mittels qPCR und Sequenzierung untersucht und hierbei unterschiedliche Ergebnisse für die virale Kopienzahl aufgezeigt. Einerseits fanden die Autoren mittels qPCR ebenfalls eine erhöhte Kopienanzahl von E6 bezogen auf das Referenzgen ERV3 (endogenes Retrovirus Gruppe 3) mit einem Verhältnis von 2,86:1. Andererseits ergab das Ergebnis der Sequenzierung eine virale Kopienzahl von 1,1 (Akagi et al, 2014). Weiterhin wurde von Olthof et al. mittels qPCR eine virale Kopienzahl von 1 beim Vergleich eines nicht-spezifizierten Genabschnittes von HPV16 mit HBB beschrieben (Olthof et al., 2015). Die verschiedenen Studien zur Untersuchung der Zelllinie UM-SCC-104 sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 27: Zusammenfassung der Studien zur Untersuchung der HPV-Kopienzahl der Zelllinie UM-SCC-104

Methode	Parameter	Ergebnis	Referenz
WGS	Virale Kopienzahl	1,1	Akagi et al., 2014
qPCR	Virale Kopienzahl von HPV16 E6 bezogen auf Referenzgen ERV3	2,86	
qPCR	Virale Kopienzahl von HPV16 DNA bezogen auf Referenzgen HBB	1	Olthof et al., 2015
FISH	HPV Kopie pro Zelle	1,6	Walline et al., 2017
dPCR	Virale Kopienzahl von HPV16 E6 und E7 bezogen auf Referenzgen HBB	2,3	**eigene Arbeit**
qPCR	Virale Kopienzahl von HPV16 E6 bezogen auf Referenzgen HBB	1	
	Virale Kopienzahl von HPV16 E7 bezogen auf Referenzgen HBB	6,1-6,5	

ERV3 = Endogenes Retrovirus Gruppe 3; FISH = Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung; HBB = Hämoglobin, Beta-Untereinheit; WGS = *whole genome sequencing*.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich HPV-DNA als Substrat untersucht. Auch wenn im Regelfall die Polymerase der PCR ohne eine reverse Transkription nicht mit RNA als Substrat arbeiten kann, galt es das Risiko einer möglichen RNA-Kontamination durch die stark-transkribierten HPV-Onkogene vor der PCR Quantifizierung zu minimieren. Dafür erfolgte die Hinzugabe von RNase A bei der DNA-Extraktion aus der Zellkultur. Die Qualität der DNA-Präparation wurde zudem mittels Agarosegel geprüft und eine Kontamination durch die Abwesenheit RNA-typischer Banden ausgeschlossen.

Eine mögliche Erklärung für die eigenen Ergebnisse zur erhöhten Kopienzahl von HPV-DNA in der Zelllinie UM-SCC-104 sind möglicherweise die verschiedenen Formen,

in welcher die viralen Gene vorliegen können. Zum einen können sie in das humane Genom integriert sein, zum anderen können sie als Episome bestehen (Olthof et al., 2015; Walline et al., 2017). Da Episome nicht an die mitotische Zellteilung gebunden sind, könnte aufgrund einer unabhängigen DNA-Replikation eine höhere Anzahl an viralen im Vergleich zu den chromosomalen Genen vorliegen (De Leo et al., 2020; Liao et al., 2020). Zudem besteht durch die virale Integration in das Zellgenom eine erhöhte chromosomale Instabilität, wodurch variierende Kopienzahlen (*copy number variations*) der einzelnen Gene entstehen können (L. Chen et al., 2015; Wittekindt et al., 2018). Dies könnte einen weiteren Erklärungsansatz für die geringere Kopienzahl vom humanen Referenzgen HBB relativ zu E6 und E7 in dieser Arbeit darstellen. Zuletzt können durch sporadische Mutationen der Zelllinie UM-SCC-104 abweichende Kopienzahlen von E6, E7 und HBB vorliegen. Um diese Hypothesen zu untersuchen, könnte eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridiserung mit spezifischen Sonden zur Visualisierung der verschiedenen Genabschnitte in der Zelllinie durchgeführt werden.

4.3 Diagnostische Evaluation des PCR Multiplex Assays mit *Liquid Biopsy* Proben

Zur diagnostischen Evaluation des Triplex Assays aus E6, E7 und HBB erfolgte die qPCR- und dPCR-Messung von *Liquid Biopsy* Proben. Die untersuchten Plasma Proben, welche vor Therapiebeginn zwischen 2015 und 2022 am Universitätsklinikum Gießen in der Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde entnommen wurden, stammen von Patienten mit HPV-positiven (n = 17) sowie HPV-negativen (n = 14) Oropharynxkarzinomen. Die Auswahl der bearbeiteten Flüssigbiopsien erfolgte nach der Verfügbarkeit von ausreichendem Probenmaterial.

4.3.1 Patienten- und Tumorcharakteristika der untersuchten Stichprobe

In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe wurden insgesamt 620 Patienten mit Oropharynxkarzinomen aus Gießen systematisch untersucht. Dabei wiesen die HPV-getriebenen OPSCC (n = 184) signifikant häufiger kleinere Tumore (T1-T2) sowie niedrigere UICC8-Stadien (I-III) auf im Vergleich zu den HPV-negativen OPSCC (n = 436; Wagner et al., 2020). In dieser Arbeit lagen für die untersuchte Stichprobe keine signifikanten Unterschiede zwischen dem HPV-Status der OPSCC und der klinischen Charakteristika vor (Abschnitt 3.4, Tabelle 24). Allerdings handelt es sich hier um eine retrospektive Pilotstudie mit einer kleinen Stichprobe, die sich dennoch durch eine ähnliche Zusammensetzung der Patienten- und Tumorcharakteristika mit der publizierten Kohorte in Gießen auszeichnet.

Die Unterscheidung zwischen HPV-positiven zu HPV-negativen OPSCC hat Einzug in die hier angewandte 8. Version der UICC TNM- und Stadieneinteilung erhalten, welche zum 01.11.2016 veröffentlicht wurde (Brierley et al., 2016). Die geänderten Einteilungskriterien zwischen der 7. und 8. Auflage können zu einer gewissen Unsicherheit bei den entnommenen Proben vor dem 01.11.2016 führen, allerdings waren dies lediglich n = 3. So entsprach beispielsweise das Stadium N1 nach UICC 7 einer ipsilateralen solitären Lymphknotenmetastase ≤ 3 cm, welches nach UICC 8 weiterhin für HPV-negative OPSCC gilt. Dementgegen entspricht für HPV/p16-positive OPSCC nach UICC 8 das Stadium N1 nun einer ipsilateralen solitären Lymphknotenmetastase oder multiplen Lymphknotenmetastasen ≤ 6 cm (Wittekindt et al., 2019). Des Weiteren wirkt sich die HPV/p16-Positivität bei gleichem TNM-Status auf eine niedrigere UICC Stadieneinteilung als bei p16-negativen OPSCC aus (Abschnitt 1.1.4). Dieses sogenannte „*Downstaging*“ nach UICC 8 spiegelt somit die prognostische Bedeutung des HPV-Status wider, auch wenn weitere Faktoren wie Patientencharakteristika und molekulare Tumormerkmale noch nicht bei der aktuellen Klassifikation berücksichtigt werden (Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF), 2024; Sharma et al., 2018; Wuerdemann et al., 2017). Der globale Trend einer steigenden Inzidenz von HPV-getriebenen OPSCC untermauert den intensivierten Forschungsbedarf mit Ausweitung der Stichprobengröße (Menezes et al., 2021).

4.3.2 Diagnostische Validität von E6 und E7 als Biomarker

Die Auswahl spezifischer Biomarker ist für die Analyse der *Liquid Biopsy* Proben essenziell. In dieser Arbeit wurden die HPV16-Onkogene E6 und E7 im Plasma nachgewiesen und zur Grenzwertoptimierung der gemessenen Kopien eine ROC-Analyse durchgeführt (Abschnitt 3.4.1.2, Abbildung 17 und 3.4.2.2, Abbildung 20). Die Flächen der ROC-Kurven (*area under the curve,* AUC) lagen zwischen 0,790-0,882 und entsprechen somit einer akzeptablen bis hohen Trennfähigkeit des Modells (Nahm, 2022). Mit dem maximalen Youden-Index wurde eine Sensitivität für E6 und E7 von 82,4% bei beiden PCR-Messungen ermittelt. Die Spezifität war für E7 (qPCR: 85,7% und dPCR: 92,9%) höher als für E6 (qPCR: 78,6% und dPCR: 85,7%). Dieser Unterschied ist jedoch lediglich auf eine zusätzliche falsch-positive Messung für E6 im Vergleich zu E7 in der HPV-negativen Kontrollgruppe zurückzuführen (falsch-positiv Rate E6: 3/14 (qPCR) bzw. 2/14 (dPCR) vs. falsch-positiv Rate E7: 2/14 (qPCR) bzw. 1/14 (dPCR); Abschnitt 4.4.1).

Die diagnostische Validität von HPV-DNA als Biomarker in Flüssigbiopsien wurde zuletzt in zwei Metaanalysen untersucht. Wuerdemann et al. analysierten insgesamt 10 Studien zum Nachweis von cfHPV-DNA bei Erstdiagnose und ermittelten eine gepoolte Sensitivität und Spezifität von jeweils 81% und 98% (Wuerdemann et al., 2020). Damit zeigen die eigenen Ergebnisse zur Sensitivität von 82,4% für E6 und E7 eine hohe Übereinstimmung mit der in der Metaanalyse beschriebenen Sensitivität. In einer weiteren Arbeit von Paolini et al. wurden insgesamt 13 Studien zum cfHPV-DNA Nachweis mittels *droplet* dPCR analysiert und eine gepoolte Sensitivität und Spezifität von jeweils 90% und 95% bestimmt. Beim Vergleich der verschiedenen PCR-Assays fanden die Autoren keinen signifikanten Unterschied der Sensitivität und Spezifität bezogen auf den alleinigen oder gemeinsamen Nachweis von E6 und E7 (Paolini et al., 2023). Insgesamt zeichnet sich der Nachweis von cfHPV-DNA als stabiler und spezifischer Biomarker bei virusgetriebenen OPSCC aus (Keller et al., 2021; Paolini et al., 2023; Wuerdemann et al., 2020). Weitere Studien konnten darüber hinaus für die Kinetik von HPV-DNA auch eine prognostische Relevanz hinsichtlich eines Tumorrezidivs und des Gesamtüberlebens der Patienten zeigen (Campo et al., 2024; Hashida et al., 2021; Reder et al., 2020). Da die Krebsentstehung beim HPV-getriebenen Karzinom von der onkogenen Aktivität von E6 und E7 abhängt, verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit das Potenzial von E6 und E7 als diagnostische Biomarker in der klinischen Routine bei HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen.

4.3.3 Virale Kopien in Plasma gemessen mit qPCR und dPCR in Abhängigkeit von Tumormerkmalen

Einer der zentralen Entstehungsmechanismen von zellfreier DNA stellt der apoptotische bzw. nekrotische Zelluntergang dar (Abschnitt 1.3.1). So wird bei zunehmender Tumorgröße auch ein gesteigerter Zellumsatz und somit eine vermehrte Freisetzung von zellfreier DNA, sowie im Falle von HPV-getriebenen OPSCC eine erhöhte Zahl an viralen Kopien im Blut erwartet (Diaz & Bardelli, 2014; Jahr et al., 2001; Stroun et al., 2001). Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, wurden bei den HPV-positiven OPSCC Proben die gemessenen Kopien E6 und E7 in Bezug auf den TNM-Status untersucht (Abschnitt 3.4.1.3, Abbildung 19 und Abschnitt 3.4.2.3, Abbildung 22). In der qPCR- und dPCR-Messung wurde für die Tumorgröße T1-T2 ein höherer Median an Kopien E6 und E7 nachgewiesen als bei T3-T4, allerdings ohne statistische Signifikanz. Beim Lymphknotenstatus N2-N3 zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an viralen Kopien als bei N0-N1. Ebenso ging das Vorhandensein von Fernmetastasen M1 mit einem höheren Median an gemessenen Kopien E6 und E7 einher, jedoch ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Der Zusammenhang zwischen der Viruslast im Blut (*blood viral load*; Einheit Kopien pro ml) und den Tumormerkmalen des Oropharynxkarzinoms ist Gegenstand der aktuellen Forschung (Mazurek & Rutkowski, 2023). Reder et al. zeigten im Gegensatz zu den eigenen Ergebnissen für die Tumorgröße T3-T4 im Vergleich zu T1-T2 eine signifikant höhere Zahl an viralen Kopien E6 und E7 (Reder et al., 2020). Chera et al. fanden ebenso eine höherer Viruslast für T2 Tumore im Vergleich zu T0-T1 Tumoren. Interessanterweise beschrieben die Autoren weiterhin eine signifikant niedrigere Viruslast bei Patienten mit T3-T4 Tumoren im Vergleich zu T2 Tumoren (Chera et al., 2019). Drei weitere Studien fanden im Einklang mit den eigenen Ergebnissen eine signifikante Assoziation zwischen höheren N-Status und einer zunehmenden Kopienzahl an HPV-DNA im Plasma bzw. Serum (Cao et al., 2012; Dahlstrom et al., 2015; Mazurek et al., 2024). Bezüglich der gesamten Tumorlast (*total tumor burden*) unterschieden Hanna et al. zwischen einer lokalen, pulmonalen und extra-pulmonalen Ausbreitung des Oropharynxkarzinoms. Mittels *droplet* dPCR wurde so eine signifikant höhere Zahl an viralen Kopien E7 bei zunehmender Metastasierung nachgewiesen (Hanna et al., 2018). Allgemein wird bei einer zunehmenden Tumormasse von einer höheren viralen Kopienzahl im Tumor und somit auch im Blut ausgegangen. Allerdings zeigt sich bei Betrachtung der eigenen Ergebnisse im Vergleich zu der Literatur für die alleinige Untersuchung des T- oder N-Status keine eindeutige Korrelation zur Viruslast im Blut. In dieser Arbeit konnte die initiale Erwartung einer höheren Menge an HPV-DNA bei fortgeschrittenen T-Status nicht bestätigt werden. Zum einen könnte der Zellumsatz auch bei kleineren Tumoren erhöht sein, zum anderen könnte es ebenso größere Tumoren mit niedrigen Zellumsatz geben. Für die virale Kopienzahl scheint vielmehr das Gesamtstadium der Erkrankung von Bedeutung zu sein (Mazurek & Rutkowski, 2023) und die Ergebnisse dieser Arbeit stehen dieser Annahme nicht entgegen.

4.3.4 Viraler DNA-Anteil der cfDNA-Extraktion gemessen mit qPCR und dPCR

Zu den Herausforderungen der PCR-Messung von Flüssigbiopsien zählt der eindeutige Nachweis von tumorspezifischer DNA in der Anwesenheit von reichlich vorhandener „Hintergrund“ DNA gesunder Zellen (Abschnitt 1.3.3). Auf molekularer Ebene wird die PCR-Sensitivität durch die Fehlerrate der DNA-Polymerase begrenzt, die in der Regel mit 0,0001 angegeben wird. Somit sollte eine Probe bei einem tumorspezifischen DNA-Anteil von < 0,0001 als negativ für ctDNA angesehen werden (Diaz & Bardelli, 2014; Diehl et al., 2005; M. Li et al., 2006). Bezüglich des Verhältnisses an HPV-DNA aus der gesamten cfDNA-Extraktion (E6/HBB bzw. E7/HBB) konnte für E6 ein Anteil von 0,01-33,16 (qPCR) bzw. 0,03-7,99 (dPCR) und für E7 ein Anteil von 0,03-42,62 (qPCR)

bzw. 0,04-11,18 (dPCR) nachgewiesen werden (Abschnitte 3.4.1.4, 3.4.2.4 und 3.5.2, Abbildung 24). Somit liegt in dieser Arbeit der virale DNA-Anteil aus der cfDNA-Extraktion insgesamt in dem Bereich der Replikation durch die DNA-Polymerase, der als valide angesehen wird. Interessanterweise wurden zudem bei 4 (qPCR) bzw. 3 (dPCR) Proben mehr virale Kopien als humanes Referenzgen HBB nachgewiesen. Neben der im vorherigen Abschnitt dargestellten tumorspezifischen Einflussfaktoren, gibt es auch auf molekularer Ebene unterschiedliche Erklärungsansätze für die virale Kopienzahl. Eine starke Erhöhung von E6 und E7 könnte auf eine aktive Virusreplikation zum Zeitpunkt der Probenentnahme hinweisen, während eine niedrige Zahl an viraler Kopien Zeichen einer Viruspersistenz oder einer HPV-Integration in das Genom sein könnte (Bordigoni et al., 2021). Gegen ersteres spricht allerdings, dass HPV-assoziierte OPSCC keine produktiven HPV-Infektionen darstellen.

Weiterhin ist bei der Betrachtung des viralen DNA-Anteils aus der cfDNA-Extraktion zu beachten, dass die Menge an Hintergrund-DNA in der Flüssigbiopsie Probe von verschiedenen Faktoren abhängt. Neben DNA aus gesunden Zellen in der Mikroumgebung des Tumors oder anderen Körperstellen mit vermehrten Zellabbau wird die größte Menge an cfDNA bei der (unspezifischen) Lyse von Leukozyten während der Probengewinnung/-bearbeitung freigesetzt (Lui et al., 2002; Snyder et al., 2016). Je nach Zeitpunkt der Blutentnahme und Probenbearbeitung kann der Anteil an genomischer Hintergrund-DNA stark variieren und das Verhältnis der tumorspezifischen Gene bezogen auf das Referenzgen potenziell verzerren. Dies gilt vor allem bei niedrigen Konzentrationen an tumorspezifischer DNA im Ausgangsmaterial (Johansson et al., 2019; Prigge et al., 2017). Eine möglichst geringe Liegezeit der *Liquid Biopsy* Proben könnte daher zur Verringerung der Menge an Hintergrund-DNA beitragen (Maass et al., 2021; Nesic et al., 2021). Für diese Arbeit wurden die Blutproben in der Regel innerhalb von 24 Stunden aufgereinigt. Allerdings ließ sich eine gewisse Inkonsistenz beim Zeitpunkt der Probenbearbeitung aufgrund klinischer Arbeitsabläufe nicht immer vermeiden. Daher wurden in dieser Arbeit spezielle Blutentnahmeröhrchen mit Konservierungsstoffen verwendet. Diese tragen zur Stabilisierung von Leukozyten und cfDNA bei und ermöglichen eine Lagerung der Proben von bis zu 7 Tagen bei Raumtemperatur vor der Plasmaextraktion (Streck, 2024). Als weitere präanalytische Einflussfaktoren auf die Ausbeute an messbarer DNA gelten unter anderem die Art des untersuchten Probenmaterials (Plasma oder Serum), die Abläufe für die DNA-Isolierung und die Lagerungsbedingungen. Zu den Stärken dieser Arbeit gehörte die Analyse von Plasma anstelle von Serum. In der Metaanalyse von Wuerdemann et al. zum Nachweis von cfHPV-DNA bei OPSCC ergab die Stratifizierung der analysierten Studien nach der

Art des Probenmaterials eine höhere Sensitivität von 85% für Plasma gegenüber von 73% für Serum (Johansson et al., 2019; Maass et al., 2021; Wuerdemann et al., 2020). Weiterhin wurden die aufgereinigten Plasmaproben in dieser Arbeit optimal und unter Temperaturüberwachung bei -80 °C gelagert Zuletzt gilt es auch methodenspezifische Faktoren bei der DNA-Quantifizierung zu berücksichtigen, die für die vergleichende qPCR- und dPCR-Messung in den folgenden Abschnitten erläutert werden.

4.4 Methodenvergleich der *Liquid Biopsy* Messung mit qPCR und dPCR

4.4.1 Vergleich der diagnostischen Validität von qPCR und dPCR

Zur Evaluation des klinischen Nutzens der qPCR- und dPCR-Messung von *Liquid Biopsy* Proben wurden beide Methoden hinsichtlich der diagnostischen Validität verglichen. Hier zeigte sich für den Nachweis von HPV-DNA bei beiden PCR-Messungen eine Sensitivität von 82,4%. Dabei wies die dPCR eine höhere gemittelte Spezifität von 89,3% gegenüber 82,2% in der qPCR auf (Abschnitt 3.5.1, Tabelle 25). Überraschenderweise zeigt die genauere Betrachtung der HPV-negativen Kontrollproben (n = 14) bei allen untersuchten Fällen sowohl mittels qPCR als auch dPCR Signale für E6 und E7, die von „Null“ abweichen. Allerdings lagen die qPCR-Messwerte bei 13/14 der HPV-negativen Proben entweder unterhalb der unteren Quantifizierungsgrenze und/oder sie zeichneten sich durch eine hohe Standardabweichung > 1 Zyklus über die Replikate aus. Ebenso lagen die Messwerte der dPCR in insgesamt 13/14 Fällen außerhalb des dynamischen Messbereiches und/ oder wiesen eine relative Standardabweichung über die Replikate ≥ 35% auf. Diese Werte wurden als unspezifische Signale und somit technisch als falsch-positiv gewertet. Bei einer einzigen Probe (Nummer 23) wurden sowohl in der qPCR als auch dPCR für E6 und E7 eine Kopienzahl deutlich oberhalb des Grenzwertes ermittelt. Somit weichen in diesem Fall die eigenen Ergebnisse der *Liquid Biopsy* Messung von dem HPV-Status der Gewebebiopsie ab (p16 und HPV-DNA negativ). Da HPV-DNA im Blut nicht spezifisch für die anatomische Infektionsstelle ist, könnten die Messwerte für E6 und E7 möglicherweise bei dieser Probe auf einen sekundären HPV-bedingten Tumor aus dem anogenitalen Bereich hinweisen (Alemany et al., 2015; Damerla et al., 2019; Gu et al., 2020; Wuerdemann et al., 2020). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Gewebebiopsie für den HPV-Test kein Tumormaterial enthielt.

Die Sensitivität und Spezifität von qPCR und dPCR wurde ebenfalls in anderen Studien gegenübergestellt. Für den Nachweis von HPV-DNA im Plasma von OPSCC-Patienten beschrieben Mattox et al. eine signifikant höhere Sensitivität von 69,8% mittels *droplet* dPCR im Vergleich zu lediglich 20,6% mittels qPCR. Als mögliche Erklärung für die auffallend niedrigere Sensitivität der qPCR wird von den Autoren der Studie die

Verwendung des interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs *SYBR Green* aufgeführt. Dieser bindet unspezifisch an doppelsträngige DNA und zeichnet sich durch ein höheres Hintergrundsignal als die substratspezifischen und in dieser Arbeit verwendeten Sonden aus (Abschnitt 1.4.1). Vor allem im Bereich niedriger HPV-Kopien könnte bei der Verwendung von *SYBR Green* in der qPCR eine Unterscheidung zwischen falsch-positiven Signalen durch Primer-Dimere und richtig-positiven Signalen erschwert sein, während sich das Hintergrundsignal bei der dPCR aufgrund der Partitionierung in geringerem Ausmaß die Sensitivität auswirkt (Mattox et al., 2022). In der Metaanalyse von Wuerdemann et al. zum Nachweis von cfHPV-DNA bei Erstdiagnose wurde ebenfalls eine höhere gepoolte Sensitivität der *droplet* dPCR von 92% gegenüber 65% in der qPCR beschrieben. Beide Methoden wiesen jedoch eine ähnlich hohe gepoolte Spezifität von 100% (qPCR) bzw. 98% (dPCR) auf (Wuerdemann et al., 2020). Eine weitere Arbeit verglich die Leistung der qPCR und ddPCR für die Quantifizierung von Hepatitis-B-DNA aus Blutproben im Bereich einer niedrigen viralen Last (< 20 *International Units* pro ml). Für diesen Konzentrationsbereich zeigte sich eine höhere Sensitivität der qPCR von 72,4% gegenüber der *droplet* dPCR 48,3% (Boizeau et al., 2014).

In der Zusammenfassung mit den eigenen Ergebnissen lässt sich hinsichtlich der Sensitivität keine abschließende Überlegenheit der qPCR oder dPCR zeigen. Vielmehr zeigen beide Methoden für den Nachweis von HPV-DNA, auch im Vergleich zur entsprechenden Literatur, in dieser Arbeit eine gute Sensitivität von 82,4%. Die geringere Spezifität der qPCR in dieser Arbeit könnte durch eine höhere Anfälligkeit für Kreuzreaktionen und Inhibitionen in der Multiplex-PCR sein (Miller et al., 2023; L. Pinheiro & Emslie, 2018), welches sich auch schon in der Methodenetablierung der qPCR zeigte (Abschnitt 4.1.1). Insgesamt wird in dieser Arbeit bei beiden PCR-Methoden die technische Herausforderung beim Umgang mit falsch-positiven Signalen deutlich, sodass für beide PCR-Assays als potenziell alleinige HPV-Nachweismethode von *Liquid Biopsy* Proben noch Optimierungsbedarf besteht. Zur Absicherung der Diagnostik bei unklarem HPV-Status in der PCR könnte eine DNA-Sequenzierung der Plasmaproben durchgeführt werden. Hierbei könnten noch zusätzliche Aussagen über weitere Tumormutationen sowie das episomale oder integrierte Vorliegen des HPV-Genoms getroffen werden. Aufgrund der höheren Kosten und des größeren zeitlichen Aufwands der Sequenzierung spricht jedoch einiges dafür, die PCR weiterhin in der primären Diagnostik von Flüssigbiopsien einzusetzen (Lee et al., 2017; Mattox et al., 2022; Mazurek & Rutkowski, 2023).

4.4.2 Analyse der Übereinstimmung von qPCR und dPCR

Da aktuell für die quantitative Untersuchung von *Liquid Biopsy* Proben kein Goldstandard existiert, wurden qPCR und dPCR auf ihren Zusammenhang geprüft und eine deskriptive Beschreibung ihrer Übereinstimmung durchgeführt. Hierfür wurden der Korrelationskoeffizient nach Pearson bestimmt sowie die Regressionsgerade nach Passing-Bablok und das Differenzdiagramm nach Bland-Altman erstellt (zusammengefasst in Abschnitt 3.5.6, Tabelle 26).

Beim Nachweis von E6 und E7 konnte erwartungsgemäß ein hoher positiver und linearer Zusammenhang für die qPCR- und dPCR-Messung gezeigt werden (Pearson's r = 0,961 (E6) und 0,981 (E7)). Mithilfe der Regressionsparameter nach Passing-Bablok wurde die vergleichende qPCR- und dPCR-Messung auf einen proportionalen und/oder konstanten Fehler untersucht. Keiner der Fehlerarten lag für den Nachweis von E6 und E7 mittels qPCR und dPCR vor (Steigung m = 1 und y-Achsenabschnitt b = 0 im 95%-Konfidenzintervall enthalten). Die Regressionsgeraden für E6 (m = 0,963) und E7 (m = 1,058) verlaufen annähernd parallel zur Bezugslinie (m = 1). Anhand des negativen y-Achsenabschnitts (E6: b = -0,183 und E7: b = -0,487) wird jedoch eine Unterschätzung der dPCR gegenüber der qPCR deutlich. Dies zeigt sich auch an der Rechtsverschiebung der Regressionsgerade zur Seite der qPCR im Vergleich zur Bezugslinie (Abschnitt 3.5.4, Abbildung 25A und 25B). Weiterhin wurde durch das Auftragen der Differenzen von qPCR-dPCR im Bland-Altman-Diagramm ein signifikant positives Bias von 0,251 (E6) bzw. 0,302 (E7) Log10 Kopien/ml Plasma festgestellt. Somit ergibt sich bei der Rücktransformation der Werte auf die Originalskala eine höhere Quantifizierung von 78% für E6 und eine systematische höhere Quantifizierung von 100% für E7 in der qPCR gegenüber der dPCR (Abschnitt 3.5.5, Abbildung 26). Insgesamt zeigt sich sowohl in der Passing-Bablok Regression als auch in der Bland-Altman Analyse eine relative Unterschätzung der viralen Kopien mittels dPCR bzw. eine Überschätzung mittels qPCR.

Für die vergleichende Messung von HBB bei allen Liquid Biopsy Proben zeigte sich hingegen ein signifikanter proportionaler Fehler (m = 0,824; 95%-KI 0,619-0,983 und somit $m \neq 1$; Abbildung 25C). Hier ist allerdings zu beachten, dass die Voraussetzungen für die Passing-Bablok Regression ein linearer Zusammenhang zwischen beiden Messmethoden sowie eine kontinuierliche Verteilung der Variablen sind (Bablok & Passing, 1985). Beide Bedingungen sind bei der Messung von HBB im Vergleich zu E6 und E7 geringer ausgeprägt. Zum einen zeigt sich anhand von Pearsons r = 0,807 eine geringere lineare Korrelation für HBB im Vergleich zu den viralen Genen. Zum anderen

deckte der Messbereich für HBB lediglich 2 Log10 Konzentrationsstufen ab, während sich die Werte für E6 und E7 über 4 Log10 Konzentrationsstufen erstreckten. Zur weiteren Assay Optimierung für die vergleichende PCR-Messung von *Liquid Biopsy* Proben könnten weitere Versuche mit einem anderen Primer-Paar zum Nachweis von HBB oder von einem weiteren humanen Referenzgen durchgeführt werden.

Eine vergleichende qPCR- und dPCR-Messung zum Nachweis pathogener DNA wurde ebenso in bereits publizierten Arbeiten durchgeführt. In Analogie zum HPV-assoziierten Oropharynxkarzinom wird der Nachweis von Epstein-Barr-Virus (EBV) DNA beim endemischen Nasopharynxkarzinom als diagnostischer Biomarker bei der Früherkennung sowie als negativer Prädiktor in der Tumornachsorge genutzt (Chan et al., 2017; Su et al., 2023). Hinsichtlich der verschiedenen Nachweismethoden für EBV-DNA führten Miller et al. eine vergleichende Studie zur qPCR, *droplet* dPCR und Platten-basierten dPCR durch. Dabei wurde für die pdPCR die geringste Übereinstimmung mit qPCR und ddPCR berichtet. Zudem zeigte sich für die pdPCR ein proportionaler und systematischer Fehler, der weder in der qPCR noch in der ddPCR vorhanden war (Miller et al., 2023). Im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beschrieben Ricchi et al. für den Nachweis von bakterieller DNA ebenfalls eine signifikante Überschätzung der qPCR im Vergleich zur Platten-basierten dPCR und *droplet* dPCR. Für die Quantifizierung des Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis zeigte sich ein signifikantes positives Bias (qPCR-pdPCR) von 0,310 Log10 Zellen/µl. Die Überschätzung der qPCR zeigte sich ebenso im Vergleich mit der *droplet* dPCR für den Nachweis von Francisella tularensis mit einem signifikanten Bias (qPCR-ddPCR) von 0,30 Log10 Zellen/µl (Ricchi et al., 2017). Dies entspricht bei Rücktransformation einer erhöhten Quantifizierung der qPCR von 100-104% gegenüber beiden dPCR-Plattformen und somit von einem ähnlichen Ausmaß wie in der vorliegenden Arbeit. Bei der vergleichenden Beurteilung der Humanen-Immundefizienz-Virus (HIV) Last in Patientenproben wurde ebenfalls eine relative Unterschätzung der Platten-basierten dPCR im Vergleich zur qPCR beschrieben. Die Differenz im Bland-Altman-Diagramm (aufgetragen als pdPCR-qPCR) betrug -0,35 Log10 Kopien/10^6 PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) und entspricht einer erniedrigten Quantifizierung der pdPCR von 55% (Renault et al., 2022). Eine andere Studie beschrieb weiterhin eine relative Unterschätzung der *droplet* dPCR im Vergleich zur qPCR beim Nachweis des humanen Cytomegalievirus in Patientenplasma. In der einfachen linearen Regression zeigte sich dies durch einen negativen y-Achsenabschnitt von -0,43 bei einer Steigung von 1,06. Im Bland-Altman-Diagramm wurde die Differenz von ddPCR-qPCR aufgetragen und ein mittleres Bias von -0,247 Log10 Kopien/ml Plasma festgestellt. Dies

entspricht einer erniedrigten Quantifizierung von 43% in der ddPCR gegenüber der qPCR (Hayden et al., 2013).

Die aufwendige Kalibrierungsarbeit bei der relativen Quantifizierung mittels qPCR stellt eine mögliche Erklärung für die Überschätzung der Kopienzahl im Vergleich zur dPCR dar. Bei der qPCR erfolgte in dieser Arbeit die Ermittlung der Kopienzahl für die *Liquid Biopsy* Proben mit unbekannter Konzentration relativ zu den Cq-Messwerten der Verdünnungsreihe des geschnittenen Kontrollplasmids mit bekannter Konzentration. Dabei stellten die Messwerte des Spektralphotometers die Grundlage für die Berechnung der Kopienzahl des Kontrollplasmids und die darauffolgende Erstellung der Standardkurve dar. In den eigenen Versuchen zur Methodenetablierung der digitalen PCR konnte jedoch gezeigt werden, dass niedrigere Konzentrationen des Kontrollplasmids in der dPCR gemessen wurden als anhand der Werte des Spektralphotometers erwartet war (Abschnitt 3.2.4). Andere Arbeiten beschrieben für die relativen Quantifizierung der HIV-Last mittels qPCR ebenso abweichende Kopienzahlen der etablierten Kalibrierungsstandards, sodass die qPCR-Messung eine geringere Reproduzierbarkeit als die dPCR-Messung aufwiesen (Berger et al., 2020; Renault et al., 2022). Die geringe Präzision bei der relativen Quantifizierung mittels qPCR zeigte sich auch für den Nachweis von SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrom coronavirus type* 2). Hier betrug für denselben Cq-Wert die Schwankungsbreite der bestimmten Kopienzahl zwischen verschiedenen Laboren (*interlaboratory variation*) mehr als das 1000-fache an Kopien/ml (Evans et al., 2021). Als weiterer Einflussfaktor auf die Präzision der qPCR sind neben der variablen Kalibrierung auch unterschiedliche Amplifikations-Effizienzen der verschiedenen Primer- und Sondenpaare zu nennen (Ruiz-Villalba et al., 2021), welches sich in dieser Arbeit jedoch nicht beobachten lies.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Unterschätzung der Platten-basierten dPCR gegenüber der qPCR stellt das apparative Totraumvolumen der dPCR (entspricht 45% des eingesetzten Reaktionsvolumens) dar (Abschnitt 2.5.2). Vor allem im klinisch relevanten Bereich besonders niedriger cfDNA-Konzentrationen besteht zusätzlich zu dem statistischen Poisson-Fehler (Abschnitt 1.4.2) ein gewisses Risiko, dass sehr wenige vorhandene DNA-Moleküle bei der zufälligen Verteilung vollständig auf das Totraumvolumen entfallen und somit nicht detektiert werden könnten (Bussmann et al., 2022; Tellinghuisen, 2020; Tzonev, 2018). Analog zur Platten-basierten dPCR wird auch für die *droplet* PCR eine variable Anzahl an validen Tröpfchen ausgewertet, sodass der Anteil von tatsächlich gemessenen Tröpfchen zwischen 60-75% der initial generierten Menge beträgt (Pavšič et al., 2016; L. B. Pinheiro et al., 2012). Dementgegen wird bei

der qPCR das gesamte Reaktionsvolumen eingesetzt und analysiert. Hierbei sind die optischen Elemente des qPCR-Geräts entscheidend, wieviel des Probenvolumens letztendlich tatsächlich gemessen wird. Abgesehen vom Totraumvolumen der dPCR-Reaktion wird die Präzision der Quantifizierung im Allgemeinen durch zwei weitere Volumina begrenzt: zum einen das Volumen der entnommenen Blutprobe, zum anderen das Volumen der eingesetzten Probenmenge in die PCR-Reaktion. Daher könnte vor allem bei niedrigen DNA-Konzentrationen im Ausgangsmaterial eine DNA-Extraktion aus einer größeren Blutmenge sowie eine höheres Volumen der eingesetzten Probe in die PCR-Reaktion die Präzision der Quantifizierung verbessern (Bussmann et al., 2022; Cao et al., 2020; Hayden et al., 2013). Allerdings ist das Volumen bei einer Blutentnahme grundsätzlich beschränkt, zudem steigt mit einem höheren eingesetzten Probenvolumen auch das Risiko für mehr potenzielle Inhibitoren in der PCR-Reaktion. Unter Berücksichtigung der Methoden-spezifischen Limitationen hat die digitale PCR dennoch das Potenzial zur standardisierten Quantifizierung der viralen Last in *Liquid Biopsy* Proben von Patienten mit HPV-positiven Oropharynxkarzinomen.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Humane Papillomavirus (HPV) - getriebene Oropharynxkarzinom (OPSCC) verzeichnete zuletzt im globalen Norden eine steigende Inzidenz. Zur verbesserten Diagnostik von HPV-positiven OPSCC wurde in dieser Arbeit der Einsatz der minimal-invasiven *Liquid Biopsy* zum Nachweis der viralen Onkogene E6 und E7 als Biomarker in Plasmaproben untersucht. Für die Untersuchung von HPV-DNA wurden sowohl die quantitative als auch die digitale PCR angewandt und hinsichtlich ihrer analytischen und diagnostischen Leistung miteinander verglichen.

Im Rahmen der Methodenetablierung eines Triplex Assays zum simultanen Nachweis von E6, E7 zusammen mit einem humanen Referenzgen für qPCR und dPCR wurde die analytische Leistungsfähigkeit evaluiert. Mit dem synthetisierten Kontrollplasmid als Substrat konnte für beide PCR-Methoden eine hohe Linearität ($R^2 \geq 0,99$) innerhalb des dynamischen Messbereiches (qPCR: 7 Log10 bzw. dPCR: 5 Log10 Konzentrationsstufen) erreicht werden. Zur Assay-Optimierung erfolgte eine Plasmidrestriktion, die zu einer geringeren Inter-Assay-Variabilität der qPCR sowie einer verbesserten Signalauftrennung der dPCR führte.

Die diagnostische Validität des entwickelten Triplex Assays wurde bei der Messung von *Liquid Biopsy* Proben von Patienten mit HPV-positiven (n = 17) und HPV-negativen (n = 14) OPSCC geprüft. Sowohl mittels qPCR als auch dPCR konnte für den Nachweis von HPV-DNA im Plasma eine gute Sensitivität von 82,4%, sowie eine Spezifität von 82,2% in der qPCR und 89,3% in der dPCR erreicht werden. Bei der Betrachtung der viralen Kopien E6 und E7 in Abhängigkeit des TNM-Status wurde eine signifikant höhere Zahl an HPV-DNA bei fortgeschrittenen Lymphknotenbefall (N2-N3) nachgewiesen. Die Analyse des Zusammenhangs sowie der Übereinstimmung beider Methoden für die Quantifizierung von HPV-DNA zeigte eine hohe lineare Korrelation sowie eine relative Unterschätzung der Kopienzahl mittels dPCR bzw. eine Überschätzung mittels qPCR.

Insgesamt zeichnen sich die viralen Onkogene E6 und E7 als stabile Biomarker beim HPV-getriebenen OPSCC aus. Sowohl für qPCR als auch dPCR konnte der Nutzen in der Tumordiagnostik und perspektivisch auch in der Tumornachsorge verdeutlicht werden. Aufgrund der kalibrierungsfreien Messung kann die dPCR zur Standardisierung und höheren Präzision bei der Quantifizierung von zellfreier Tumor-DNA beitragen. Trotz der vielversprechenden Ergebnisse dieser Arbeit sind für die zukünftige Anwendung der dPCR bei *Liquid Biopsy* Proben in der klinischen Routine weitere Studien nötig, um einheitliche Arbeitsabläufe festzulegen und diagnostische Grenzwerte zu bestimmen.

6. Summary

Human papillomavirus (HPV) - driven oropharyngeal squamous cell cancer (OPSCC) has recently recorded an increasing incidence in the global North. In order to improve the diagnosis of HPV-positive OPSCC, this study investigated the use of minimally invasive liquid biopsies to detect the viral oncogenes E6 and E7 as biomarkers in plasma samples. Both quantitative and digital PCR were used to analyse HPV DNA and compared with each other in terms of analytical and diagnostic performance.

The analytical performance of a triplex assay for the detection of E6, E7 and a human reference gene for qPCR and dPCR was evaluated using a synthesised plasmid as the template. A high linearity ($R^2 \geq 0.99$) was achieved for both PCR methods within the dynamic measurement range (qPCR: 7 Log10 and dPCR: 5 Log10 concentrations). Plasmid restriction was used for assay optimisation, which resulted in lower inter-assay variability of qPCR and improved signal resolution of dPCR in the testing setup.

The diagnostic performance of the developed triplex assay was assessed by measuring liquid biopsy samples from patients with HPV-positive (n = 17) and HPV-negative (n = 14) OPSCC. Both qPCR and dPCR demonstrated a good sensitivity of 82.4% as well as a specificity of 82.2% (qPCR) and 89.3% (dPCR) for the detection of HPV DNA in plasma. Regarding the number of viral E6 and E7 copies in relation to tumour characteristics, a significantly higher amount of HPV DNA was detected in samples with advanced lymph node involvement (N2-N3). The analysis of correlation and agreement between the two methods showed a high linear correlation as well as a relative underestimation of the copy number using dPCR and an overestimation using qPCR.

Overall, the viral oncogenes E6 and E7 can be characterised as stable biomarkers in HPV-driven OPSCC. The benefits of both qPCR and dPCR for tumour diagnostics and, in the long term, for tumour surveillance were demonstrated in this study. Due to the calibration-free measurement, dPCR can contribute to standardisation and higher precision of quantifying cell-free tumor DNA. Despite promising results, the future use of dPCR for liquid biopsy measurement in clinical routine requires the establishment of standardised workflows and the definition of diagnostic threshold values.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Amplifikationskurve der qPCR 15
Abbildung 2: Signalübersicht einer in dieser Arbeit verwendeten 26k 24-Well dPCR Nanoplatte im grünen Fluoreszenzkanal 16
Abbildung 3: Schema des Kontrollplasmids 22
Abbildung 4: qPCR Messwerte für Kontrollplasmid im Monoplex Assay für E6, E7, HBB und RPP30 mit Regressionsanalyse 38
Abbildung 5: qPCR Messwerte für Kontrollplasmid im Triplex Assay für E6, E7 und HBB bzw. E6, E7 und RPP30 mit Regressionsanalyse 39
Abbildung 6: qPCR Messwerte des Kontrollplasmids ohne und nach Restriktionsverdau für die HPV16 Gene E6 und E7 mit Regressionsanalyse 42
Abbildung 7: Dynamischer Bereich und untere Quantifizierungsgrenze der qPCR für die Gene E6, E7 und HBB im Triplex Assay 44
Abbildung 8: Darstellung des dPCR Versuchs mit Kontrollplasmid und den Primer-/Sonden-Paaren für E6, E7 und HBB im Monoplex Assay 45
Abbildung 9: *Scatterplot* Darstellung der dPCR mit Kontrollplasmid im Triplex Assay für E6, E7 und HBB mit den Farbstoffen Atto550 und *Texas Red* 47
Abbildung 10: dPCR Messwerte der Gene E6, E7 und HBB mit Kontrollplasmid im Monoplex und Triplex Assay 48
Abbildung 11: *Scatterplot* Darstellung der dPCR für Kontrollplasmid ohne und nach Restriktionsverdau im Triplex Assay 49
Abbildung 12: dPCR Messwerte des Kontrollplasmids ohne und nach Restriktionsverdau 50
Abbildung 13: Dynamischer Bereich der dPCR 51
Abbildung 14: Untere Quantifizierungsgrenze der dPCR für die Gene E6, E7 und HBB im Triplex Assay 52
Abbildung 15: qPCR Messwerte von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 für die Gene E6, E7 und HBB im Monoplex und Triplex Assay mit Regressionsanalyse 53
Abbildung 16: dPCR Messwerte von DNA der Zelllinie UM-SCC-104 für die Gene E6, E7 und HBB im Monoplex und Triplex Assay 54
Abbildung 17: ROC-Analyse zur Grenzwertoptimierung der Kopien pro ml Plasma für HPV Gene E6 und E7 mittels qPCR 57
Abbildung 18: Vergleich der mit qPCR gemessenen Kopien E6 und E7 bei HPV-negativen und HPV-positiven OPSCC 58

Abbildung 19: Vergleich der mit qPCR gemessenen Kopien E6 und E7 bei HPV-positiven OPSCC in Bezug auf die Tumorgröße (T-Status), den Lymphknotenbefall (N-Status) und die Fernmetastasierung (M-Status) 59
Abbildung 20: ROC-Analyse zur Grenzwertoptimierung der Kopien pro ml Plasma für HPV Gene E6 und E7 mittels dPCR..... 61
Abbildung 21: Vergleich der mit dPCR gemessenen Kopien E6 und E7 bei HPV-negativen und HPV-positiven OPSCC 62
Abbildung 22: Vergleich der mit dPCR gemessenen Kopien E6 und E7 bei HPV-positiven OPSCC in Bezug auf die Tumorgröße (T-Status), den Lymphknotenbefall (N-Status) und die Fernmetastasierung (M-Status) 63
Abbildung 23: Vergleich der qPCR- und dPCR-Messung von Kopien E6 und E7 bei HPV-positiven Proben sowie von HBB bei allen Proben 65
Abbildung 24: Vergleich der qPCR- und dPCR-Messung von Kopien E6 und E7 relativ zu HBB aus der cfDNA-Extraktion bei HPV-positiven Proben. 66
Abbildung 25: Passing-Bablok Regression für die qPCR- und dPCR-Messung von E6 und E7 bei HPV-positiven Proben sowie von HBB bei allen Proben 69
Abbildung 26: Bland-Altman-Differenzdiagramm für die qPCR- und dPCR-Messung von E6 und E7 bei HPV-positiven Proben 71

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation für p16-positive OPSCC nach UICC 8. Auflage 4
Tabelle 2: TNM-Klassifikation für p16-negative OPSCC nach UICC 8. Auflage 4
Tabelle 3: Tumorstadien für p16-positive OPSCC nach UICC 8. Auflage 5
Tabelle 4: Tumorstadien für p16-negative OPSCC nach UICC 8. Auflage 5
Tabelle 5: Liste der verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 18
Tabelle 6: Liste der verwendeten Enzyme 19
Tabelle 7: Liste der verwendeten Kits 19
Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte 19
Tabelle 9: Liste der verwendeten Software 20
Tabelle 10: Sequenzen der für qPCR und dPCR verwendeten Primer und Sonden 20
Tabelle 11: Restriktionsansatz von Vektor- und Insert-DNA mit HindIII 23
Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Ligation von Vektor- und Insert-DNA mit T4 Ligase 24
Tabelle 13: Zusammensetzung 1% Agarose Gel 26
Tabelle 14: Zusammensetzung 10% Polyacrylamid Gel 26
Tabelle 15: Zusammensetzung RPMI-Vollmedium 28
Tabelle 16: Überblick der verfügbaren Farbkanäle und Farbstoffen mit den entsprechenden Zielgenen 31
Tabelle 17: Zusammensetzung eines Standard qPCR Reaktionsansatz 32
Tabelle 18: qPCR Ablauf 32
Tabelle 19: Zusammensetzung eines Standard dPCR Reaktionsansatz 34
Tabelle 20: dPCR Ablauf 34
Tabelle 21: dPCR Bildgebung Parameter 35
Tabelle 22: Intra-Assay Variabilität der Cq-Werte für Triplex Assay aus E6, E7 und HBB bzw. E6, E7 und RPP30 41
Tabelle 23: Inter-Assay Variabilität der gemessenen Kopien pro Reaktion für E6 und E7 anhand der relativen Standardabweichung (rSD) über vier Messreihen 43
Tabelle 24: Patienten- und Tumorcharakteristika der untersuchten OPSCC (n = 31) in Hinblick auf den HPV-Status 55
Tabelle 25: Diagnostische Validität der qPCR- und dPCR-Messung für den Nachweis der HPV16 Gene E6 und E7 64
Tabelle 26: Zusammenfassung des Methodenvergleichs von qPCR und dPCR für den Nachweis der Gene E6, E7 und HBB 72
Tabelle 27: Zusammenfassung der Studien zur Untersuchung der HPV-Kopienzahl der Zelllinie UM-SCC-104 80

9. Formelverzeichnis

Formel 1: Berechnung der qPCR Effizienz (E)..... 32
Formel 2: Bestimmung der Kopienanzahl pro qPCR Reaktion anhand der Regressionsgerade..... 33
Formel 3: Bestimmung der Konzentration von Kopien pro µl Probe in qPCR..... 33
Formel 4: Relative Standardabweichung (rSD) der gemessenen Kopien..... 33
Formel 5: Berechnung der mittleren Kopienanzahl pro Partition ($\boldsymbol{\lambda}$)..... 35
Formel 6: Bestimmung der Konzentration von Kopien pro µl ($\boldsymbol{\lambda volume}$)..... 36
Formel 7: Bestimmung der Kopienanzahl pro dPCR Reaktion..... 36
Formel 8: Bestimmung der Konzentration von Kopien pro µl Probe in dPCR..... 36

10. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
^{18}F-FDG	^{18}F-2-Fluoro-2-Deoxy-Glukose
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
Atto550	Rhodamine-6G-Derivat (Fluoreszenzmarkierung)
AUC	*area under the curve,* Fläche unter der ROC-Kurve
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
b	y-Achsenabschnitt einer linearen Gleichung
BHQ	*black hole quencher*
bp	Basenpaare
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
bzw.	beziehungsweise
c	*concentration*
CDKI	*cyclin-dependent kinase inhibitor*
cfDNA	*cell-free DNA*
Cq/ Ct	*quantification cycle/ threshold cycle*
CT	Computertomographie
CTC	*circulating tumor cells*
ctDNA	*circulating tumor-specific DNA*
ddH_2O	doppel destilliertes Wasser
ddPCR	*droplet digital polymerase chain reaction*
DNA	*deoxyribonucleic acid,* Desoxyribunukleinsäure
DPBS	*Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*
dPCR	*digital polymerase chain reaction*
E	Amplifikations-Effizienz der qPCR-Reaktion
E6	HPV16 E6
E7	HPV16 E7
EBV	Epstein-Barr Virus
ECS	*extracapsular spread,* extranodales Wachstum bei Lymphknotenmetastasen
E-Proteine	*early* Proteine
E-Region	*early* Region
ERV3	Endogenes Retrovirus Gruppe 3
f	*forward*
FAM	Carboxyfluorescein (Fluoreszenzmarkierung)
FBS	Fetales Bovines Serum

FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gravitationskonstante
GOI	*gene of interest*
HBB	Humanes Hämoglobin, Beta-Untereinheit
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPV	Humane Papillomaviren
HR	*high risk*
JOE	6-Carboxy-40,50-dichloro-20,70-dimethoxyfluorescein (Fluoreszenzmarkierung)
k	Anzahl positiver Partitionen einer dPCR Reaktion
kbp	Kilo Basenpaare
KI	Konfidenzintervall
KHT	Kopf-Hals-Tumore
LK	Lymphknoten
LLOQ	*lower limit of quantification*
L-Proteine	*late* Proteine
L-Region	*late* Region
M	Metastasis, M-Status (Fernmetastasen)
m	Steigung einer linearen Gleichung
mg	Milligramm
MIQE	*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-time PCR Experiments*
min	Minuten
ml	Milliliter
MM	Master Mix
MRT	Magnetresonanztomographie
ms	Millisekunden
MW	Mittelwert
N	Nodus, N-Status (Lymphknotenmetastasen)
n	Natürliche Zahl, Anzahl
NCR	*noncoding control region*
NGS	*next generation sequencing*
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
NTC	*no template control*
OPSCC	*oropharyngeal squamous cell carcinoma*
ORI, ori	*origin of replication*
PCR	*polymerase chain reaction*

pdPCR	*plate-based digital polymerase chain reaction*
pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
qPCR	*quantitative polymerase chain reaction*
r	*reverse*
Rb-Protein	Retinoblastom-Protein
RFU	*relative fluorescence unit*
ROC	*receiver operating characteristic*
RPP30	Ribonuclease P, p30 Untereinheit
rpm	*rotation per minute*
rSD	*relative standard deviation,* relative Standardabweichung
SARS-CoV-2	*severe acute respiratory syndrom coronavirus type 2*
SD	*standard deviation,* Standardabweichung
STIKO	Ständige Impfkommission
T	Tumor, T-Status (Tumorgröße)
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamin (Fluoreszenzmarkierung)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TBE	Tris-Borat-Ethylendiamintetraacetat
TX	*Texas Red,* Sulforhodamin-101-sulfonyl-Chlorid (Fluoreszenzmarkierung)
U	*unit*
UICC	*Union Internationale Contre le Cancer*
V	Volt
Vol.	Volumen
w	Anzahl negativer Partitionen einer dPCR Reaktion
WGS	*whole genome sequencing*
WHO	*World Health Organization*
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

11. Literaturverzeichnis

Akagi, K., Li, J., Broutian, T. R., Padilla-Nash, H., Xiao, W., Jiang, B., Rocco, J. W., Teknos, T. N., Kumar, B., Wangsa, D., He, D., Ried, T., Symer, D. E., & Gillison, M. L. (2014). Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Research*, *24*(2), 185–199. https://doi.org/10.1101/gr.164806.113

Alemany, L., Saunier, M., Alvarado-Cabrero, I., Quirós, B., Salmeron, J., Shin, H.-R., Pirog, E. C., Guimerà, N., Hernandez-Suarez, G., Felix, A., Clavero, O., Lloveras, B., Kasamatsu, E., Goodman, M. T., Hernandez, B. Y., Laco, J., Tinoco, L., Geraets, D. T., Lynch, C. F., … HPV VVAP Study Group. (2015). Human papillomavirus DNA prevalence and type distribution in anal carcinomas worldwide. *International Journal of Cancer*, *136*(1), 98–107. https://doi.org/10.1002/ijc.28963

Ang, K. K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D. I., Nguyen-Tân, P. F., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Lu, C., Kim, H., Axelrod, R., Silverman, C. C., Redmond, K. P., & Gillison, M. L. (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England Journal of Medicine*, *363*(1), 24–35. https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217

Bablok, W., & Passing, H. (1985). Application of statistical procedures in analytical instrument testing. *The Journal of Automatic Chemistry*, *7*(2), 74–79. https://doi.org/10.1155/S1463924685000177

Basu, A. S. (2017). Digital Assays Part I: Partitioning Statistics and Digital PCR. *SLAS Technology*, *22*(4), 369–386. https://doi.org/10.1177/2472630317705680

Berger, A., Muenchhoff, M., Hourfar, K., Kortenbusch, M., Ambiel, I., Stegmann, L., Heim, A., Sarrazin, C., Ehret, R., Daniel, V., Wasner, M., Plantier, J.-C., Eberle, J., Gürtler, L., Haberl, A. E., Stürmer, M., & Keppler, O. T. (2020). Severe underquantification of HIV-1 group O isolates by major commercial PCR-based assays. *Clinical Microbiology and Infection*, *26*(12), 1688.e1-1688.e7. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.03.004

Bhat, S., & Emslie, K. R. (2016). Digital polymerase chain reaction for characterisation of DNA reference materials. *Biomolecular Detection and Quantification*, *10*, 47–49. https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.04.001

Bhat, S., Herrmann, J., Armishaw, P., Corbisier, P., & Emslie, K. R. (2009). Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *394*(2), 457–467. https://doi.org/10.1007/s00216-009-2729-5

Bilić-Zulle, L. (2011). Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia Medica*, *21*(1), 49–52. https://doi.org/10.11613/bm.2011.010

Bland, J. M., & Altman, D. G. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet (London, England)*, *1*(8476), 307–310.

Bland, J. M., & Altman, D. G. (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*, *8*(2), 135–160. https://doi.org/10.1177/096228029900800204

Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Winn, D. M., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., Bernstein, L., Schoenberg, J. B., Stemhagen, A., & Fraumeni, J. F. (1988). Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research*, *48*(11), 3282–3287.

Boizeau, L., Laperche, S., Désiré, N., Jourdain, C., Thibault, V., & Servant-Delmas, A. (2014). Could droplet digital PCR be used instead of real-time PCR for quantitative detection of the hepatitis B virus genome in plasma? *Journal of Clinical Microbiology*, *52*(9), 3497–3498. https://doi.org/10.1128/JCM.01306-14

Bordigoni, A., Motte, A., Tissot-Dupont, H., Colson, P., & Desnues, C. (2021). Development and validation of a multiplex qPCR assay for detection and relative quantification of HPV16 and HPV18 E6 and E7 oncogenes. *Scientific Reports*, *11*(1), 4039. https://doi.org/10.1038/s41598-021-83489-2

Bratman, S. V., Bruce, J. P., O'Sullivan, B., Pugh, T. J., Xu, W., Yip, K. W., & Liu, F.-F. (2016). Human Papillomavirus Genotype Association With Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Oncology*, *2*(6), 823–826. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.6587

Brierley, J., Gospodarowicz, M. K., Wittekind, C., & Brierley, J. (2016). *TNM Classification of Malignant Tumours* (8th ed). John Wiley & Sons, Incorporated.

Bronkhorst, A. J., Ungerer, V., & Holdenrieder, S. (2019). The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management. *Biomolecular Detection and Quantification*, *17*, 100087. https://doi.org/10.1016/j.bdq.2019.100087

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL). (2024). *Leitlinien zur Verifizierung von Methoden mittels digitaler PCR. Arbeitsgruppe § 64 LFGB „GVO-Nachweis"*. https://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/07_Untersuchungen/Leitlinien_Verifizierung_Methoden_digitale_PCR.pdf?__blob=publicationFile&v=7

Bussmann, M., Hesse, M., Karalay, O., Nash, R., & Missel, R. (2022). *Impact of template addition volume and analyzed volume on digital PCR sensitivity. QIAGEN Application note.*

Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611–622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

Cam, H., & Dynlacht, B. D. (2003). Emerging roles for E2F: Beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell*, *3*(4), 311–316. https://doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00080-1

Campo, F., Iocca, O., Paolini, F., Manciocco, V., Moretto, S., De Virgilio, A., Moretti, C., Vidiri, A., Venuti, A., Bossi, P., Blandino, G., & Pellini, R. (2024). The landscape of circulating tumor HPV DNA and TTMV-HPVDNA for surveillance of HPV-oropharyngeal carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, *43*(1), 215. https://doi.org/10.1186/s13046-024-03137-1

Cao, H., Banh, A., Kwok, S., Shi, X., Wu, S., Krakow, T., Khong, B., Bavan, B., Bala, R., Pinsky, B. A., Colevas, D., Pourmand, N., Koong, A. C., Kong, C. S., & Le, Q.-T. (2012). Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, *82*(3), e351-358. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2011.05.061

Cao, H., Liu, X., Chen, Y., Yang, P., Huang, T., Song, L., & Xu, R. (2020). Circulating Tumor DNA Is Capable of Monitoring the Therapeutic Response and Resistance in Advanced Colorectal Cancer Patients Undergoing Combined Target and Chemotherapy. *Frontiers in Oncology*, *10*, 466. https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00466

Castro-Muñoz, L. J., Manzo-Merino, J., Muñoz-Bello, J. O., Olmedo-Nieva, L., Cedro-Tanda, A., Alfaro-Ruiz, L. A., Hidalgo-Miranda, A., Madrid-Marina, V., & Lizano, M. (2019). The Human Papillomavirus (HPV) E1 protein regulates the expression of cellular genes involved in immune response. *Scientific Reports*, *9*(1), 13620. https://doi.org/10.1038/s41598-019-49886-4

Chan, K. C. A., Woo, J. K. S., King, A., Zee, B. C. Y., Lam, W. K. J., Chan, S. L., Chu, S. W. I., Mak, C., Tse, I. O. L., Leung, S. Y. M., Chan, G., Hui, E. P., Ma, B. B. Y., Chiu, R. W. K., Leung, S.-F., van Hasselt, A. C., Chan, A. T. C., & Lo, Y. M. D. (2017). Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *377*(6), 513–522. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1701717

Chen, J., Kadlubar, F. F., & Chen, J. Z. (2007). DNA supercoiling suppresses real-time PCR: A new approach to the quantification of mitochondrial DNA damage and repair. *Nucleic Acids Research*, *35*(4), 1377–1388. https://doi.org/10.1093/nar/gkm010

Chen, L., Zhou, W., Zhang, C., Lupski, J. R., Jin, L., & Zhang, F. (2015). CNV instability associated with DNA replication dynamics: Evidence for replicative mechanisms in CNV mutagenesis. *Human Molecular Genetics*, *24*(6), 1574–1583. https://doi.org/10.1093/hmg/ddu572

Chera, B. S., Kumar, S., Beaty, B. T., Marron, D., Jefferys, S., Green, R., Goldman, E. C., Amdur, R., Sheets, N., Dagan, R., Hayes, D. N., Weiss, J., Grilley-Olson, J. E., Zanation, A., Hackman, T., Blumberg, J. M., Patel, S., Weissler, M., Tan, X. M., … Gupta, G. P. (2019). Rapid Clearance Profile of Plasma Circulating Tumor HPV Type 16 DNA during Chemoradiotherapy Correlates with Disease Control in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Clinical Cancer Research*, *25*(15), 4682–4690. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-0211

Chera, B. S., Kumar, S., Shen, C., Amdur, R., Dagan, R., Green, R., Goldman, E., Weiss, J., Grilley-Olson, J., Patel, S., Zanation, A., Hackman, T., Blumberg, J., Patel, S., Thorp, B., Weissler, M., Yarbrough, W., Sheets, N., Mendenhall, W., … Gupta, G. P. (2020). Plasma Circulating Tumor HPV DNA for the Surveillance of Cancer Recurrence in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *38*(10), 1050–1058. https://doi.org/10.1200/JCO.19.02444

Chow, L. Q. M. (2020). Head and Neck Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *382*(1), 60–72. https://doi.org/10.1056/NEJMra1715715

Corbisier, P., Pinheiro, L., Mazoua, S., Kortekaas, A.-M., Chung, P. Y. J., Gerganova, T., Roebben, G., Emons, H., & Emslie, K. (2015). DNA copy number concentration measured by digital and droplet digital quantitative PCR using certified reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *407*(7), 1831–1840. https://doi.org/10.1007/s00216-015-8458-z

Dahlstrom, K. R., Li, G., Hussey, C. S., Vo, J. T., Wei, Q., Zhao, C., & Sturgis, E. M. (2015). Circulating human papillomavirus DNA as a marker for disease extent and recurrence among patients with oropharyngeal cancer. *Cancer*, *121*(19), 3455–3464. https://doi.org/10.1002/cncr.29538

Damerla, R. R., Lee, N. Y., You, D., Soni, R., Shah, R., Reyngold, M., Katabi, N., Wu, V., McBride, S. M., Tsai, C. J., Riaz, N., Powell, S. N., Babady, N. E., Viale, A., & Higginson, D. S. (2019). Detection of Early Human Papillomavirus-Associated Cancers by Liquid Biopsy. *JCO Precision Oncology*, *3*, PO.18.00276. https://doi.org/10.1200/PO.18.00276

Dasgupta, J., Bienkowska-Haba, M., Ortega, M. E., Patel, H. D., Bodevin, S., Spillmann, D., Bishop, B., Sapp, M., & Chen, X. S. (2011). Structural basis of oligosaccharide receptor recognition by human papillomavirus. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(4), 2617–2624. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160184

Dawson, S.-J., Tsui, D. W. Y., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O. M., Chin, S.-F., Dunning, M. J., Gale, D., Forshew, T., Mahler-Araujo, B., Rajan, S., Humphray, S., Becq, J., Halsall, D., Wallis, M., Bentley, D., Caldas, C., & Rosenfeld, N. (2013). Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, *368*(13), 1199–1209. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1213261

De Leo, A., Calderon, A., & Lieberman, P. M. (2020). Control of Viral Latency by Episome Maintenance Proteins. *Trends in Microbiology*, *28*(2), 150–162. https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.09.002

de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: A worldwide incidence analysis. *The Lancet. Global Health*, *8*(2), e180–e190. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7

Deschler, D. G., Richmon, J. D., Khariwala, S. S., Ferris, R. L., & Wang, M. B. (2014). The „new“ head and neck cancer patient-young, nonsmoker, nondrinker, and HPV positive: Evaluation. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery: Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, *151*(3), 375–380. https://doi.org/10.1177/0194599814538605

Diaz, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *32*(6), 579–586. https://doi.org/10.1200/JCO.2012.45.2011

Diehl, F., Li, M., Dressman, D., He, Y., Shen, D., Szabo, S., Diaz, L. A., Goodman, S. N., David, K. A., Juhl, H., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (2005). Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(45), 16368–16373. https://doi.org/10.1073/pnas.0507904102

Diehl, F., Schmidt, K., Choti, M. A., Romans, K., Goodman, S., Li, M., Thornton, K., Agrawal, N., Sokoll, L., Szabo, S. A., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Diaz, L. A. (2008). Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nature Medicine*, *14*(9), 985–990. https://doi.org/10.1038/nm.1789

Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., Schenerman, M. A., & Geddes, C. D. (2012). SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, *22*(4), 1189–1199. https://doi.org/10.1007/s10895-012-1059-8

D'Souza, G., Kreimer, A. R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W. M., Westra, W. H., & Gillison, M. L. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England Journal of Medicine*, *356*(19), 1944–1956. https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497

Dyson, N., Howley, P. M., Münger, K., & Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science (New York, N.Y.)*, *243*(4893), 934–937. https://doi.org/10.1126/science.2537532

Emslie, K. R., H McLaughlin, J. L., Griffiths, K., Forbes-Smith, M., Pinheiro, L. B., & Burke, D. G. (2019). Droplet Volume Variability and Impact on Digital PCR Copy Number Concentration Measurements. *Analytical Chemistry*, *91*(6), 4124–4131. https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05828

Eurofins Genomics. (2014, Dezember 18). *Spectra of available Fluorescent Dyes*. https://eurofinsgenomics.com/media/801938/spectra_available_fluorescent_dyes.pdf

European Commission: Joint Research Centre., Gatto, F., Savini, C., Baillie, C., & Broothaerts, W. (2023). *Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing.Part 2, European network of GMO laboratories: European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed* . Publications Office. https://data.europa.eu/doi/10.2760/63656

Evans, D., Cowen, S., Kammel, M., O'Sullivan, D. M., Stewart, G., Grunert, H.-P., Moran-Gilad, J., Verwilt, J., In, J., Vandesompele, J., Harris, K., Hong, K. H., Storey, N., Hingley-Wilson, S., Dühring, U., Bae, Y.-K., Foy, C. A., Braybrook, J., Zeichhardt, H., & Huggett, J. F. (2021). The Dangers of Using Cq to Quantify Nucleic Acid in Biological Samples: A Lesson From COVID-19. *Clinical Chemistry*, *68*(1), 153–162. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab219

Forootan, A., Sjöback, R., Björkman, J., Sjögreen, B., Linz, L., & Kubista, M. (2017). Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR). *Biomolecular Detection and Quantification*, *12*, 1–6. https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.04.001

Fossum, C. C., Chintakuntlawar, A. V., Price, D. L., & Garcia, J. J. (2017). Characterization of the oropharynx: Anatomy, histology, immunology, squamous cell carcinoma and surgical resection. *Histopathology*, *70*(7), 1021–1029. https://doi.org/10.1111/his.13140

Giavarina, D. (2015). Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*, *25*(2), 141–151. https://doi.org/10.11613/BM.2015.015

Gillison, M. L., Chaturvedi, A. K., Anderson, W. F., & Fakhry, C. (2015). Epidemiology of Human Papillomavirus-Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *33*(29), 3235–3242. https://doi.org/10.1200/JCO.2015.61.6995

Grouven, U., Bender, R., Ziegler, A., & Lange, S. (2007). Vergleich von Messmethoden. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, *132*(S 01), e69–e73. https://doi.org/10.1055/s-2007-959047

Gu, Y., Wan, C., Qiu, J., Cui, Y., Jiang, T., & Zhuang, Z. (2020). Circulating HPV cDNA in the blood as a reliable biomarker for cervical cancer: A meta-analysis. *PLOS ONE*, *15*(2), e0224001. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224001

Hanna, G. J., Supplee, J. G., Kuang, Y., Mahmood, U., Lau, C. J., Haddad, R. I., Jänne, P. A., & Paweletz, C. P. (2018). Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, *29*(9), 1980–1986. https://doi.org/10.1093/annonc/mdy251

Hashida, Y., Higuchi, T., Matsumoto, S., Iguchi, M., Murakami, I., Hyodo, M., & Daibata, M. (2021). Prognostic significance of human papillomavirus 16 viral load level in patients with oropharyngeal cancer. *Cancer Science*, *112*(10), 4404–4417. https://doi.org/10.1111/cas.15105

Hayden, R. T., Gu, Z., Ingersoll, J., Abdul-Ali, D., Shi, L., Pounds, S., & Caliendo, A. M. (2013). Comparison of droplet digital PCR to real-time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus. *Journal of Clinical Microbiology*, *51*(2), 540–546. https://doi.org/10.1128/JCM.02620-12

Heitzer, E., Ulz, P., & Geigl, J. B. (2015). Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. *Clinical Chemistry*, *61*(1), 112–123. https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.222679

Hilgers, R.-D., Heussen, N., & Stanzel, S. (2019). Regression nach Passing-Bablok. In A. M. Gressner & T. Arndt (Hrsg.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (S. 2049–2049). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_2659

Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., … Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, *83*(22), 8604–8610. https://doi.org/10.1021/ac202028g

Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L., & Lin, S. (2010). Serious Overestimation in Quantitative PCR by Circular (Supercoiled) Plasmid Standard: Microalgal pcna as the Model Gene. *PLoS ONE*, *5*(3), e9545. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009545

Hughes, F. J., & Romanos, M. A. (1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Research*, *21*(25), 5817–5823. https://doi.org/10.1093/nar/21.25.5817

International Agency for Research on Cancer (Hrsg.). (2007). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 90, Human Papillomaviruses: Volume 90*.

Jahr, S., Hentze, H., Englisch, S., Hardt, D., Fackelmayer, F. O., Hesch, R. D., & Knippers, R. (2001). 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.

Johansson, G., Andersson, D., Filges, S., Li, J., Muth, A., Godfrey, T. E., & Ståhlberg, A. (2019). Considerations and quality controls when analyzing cell-free tumor DNA. *Biomolecular Detection and Quantification*, *17*, 100078. https://doi.org/10.1016/j.bdq.2018.12.003

Keller, L., Belloum, Y., Wikman, H., & Pantel, K. (2021). Clinical relevance of blood-based ctDNA analysis: Mutation detection and beyond. *British Journal of Cancer*, *124*(2), 345–358. https://doi.org/10.1038/s41416-020-01047-5

Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J. I., McDougall, J. K., Galloway, D. A., & Klingelhutz, A. J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, *396*(6706), 84–88. https://doi.org/10.1038/23962

Kombe Kombe, A. J., Li, B., Zahid, A., Mengist, H. M., Bounda, G.-A., Zhou, Y., & Jin, T. (2020). Epidemiology and Burden of Human Papillomavirus and Related Diseases, Molecular Pathogenesis, and Vaccine Evaluation. *Frontiers in Public Health*, *8*, 552028. https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.552028

Košir, A. B., Divieto, C., Pavšič, J., Pavarelli, S., Dobnik, D., Dreo, T., Bellotti, R., Sassi, M. P., & Žel, J. (2017). Droplet volume variability as a critical factor for accuracy of absolute quantification using droplet digital PCR. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *409*(28), 6689–6697. https://doi.org/10.1007/s00216-017-0625-y

Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T., & Grinshpun, A. (2019). Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy*, *20*(8), 1057–1067. https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1598759

Lechner, M., Liu, J., Masterson, L., & Fenton, T. R. (2022). HPV-associated oropharyngeal cancer: Epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *19*(5), 306–327. https://doi.org/10.1038/s41571-022-00603-7

Lee, J. Y., Garcia-Murillas, I., Cutts, R. J., De Castro, D. G., Grove, L., Hurley, T., Wang, F., Nutting, C., Newbold, K., Harrington, K., Turner, N., & Bhide, S. (2017). Predicting response to radical (chemo)radiotherapy with circulating HPV DNA in locally advanced head and neck squamous carcinoma. *British Journal of Cancer*, *117*(6), 876–883. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.258

Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF). (2024). *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie, Prävention und Nachsorge des Oro- und Hypopharynxkarzinoms, Langversion 1.0, 2024, AWMF-Registernummer:017-082OL*. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/oro-und-hypopharynxkarzinom

Li, M., Diehl, F., Dressman, D., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2006). BEAMing up for detection and quantification of rare sequence variants. *Nature Methods*, *3*(2), 95–97. https://doi.org/10.1038/nmeth850

Li, Y., & Hecht, S. S. (2022). Carcinogenic components of tobacco and tobacco smoke: A 2022 update. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *165*, 113179. https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113179

Liao, Z., Jiang, W., Ye, L., Li, T., Yu, X., & Liu, L. (2020). Classification of extrachromosomal circular DNA with a focus on the role of extrachromosomal DNA (ecDNA) in tumor heterogeneity and progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, *1874*(1), 188392. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2020.188392

Liggett, W. H., & Sidransky, D. (1998). Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *16*(3), 1197–1206. https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.3.1197

Lin, C.-H., Chen, Y.-C., & Pan, T.-M. (2011). Quantification Bias Caused by Plasmid DNA Conformation in Quantitative Real-Time PCR Assay. *PLoS ONE*, *6*(12), e29101. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029101

Lui, Y. Y. N., Chik, K.-W., Chiu, R. W. K., Ho, C.-Y., Lam, C. W. K., & Lo, Y. M. D. (2002). Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clinical Chemistry*, *48*(3), 421–427.

Ma, H., Bell, K. N., & Loker, R. N. (2021). qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, *20*, 152–168. https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.11.007

Maass, K. K., Schad, P. S., Finster, A. M. E., Puranachot, P., Rosing, F., Wedig, T., Schwarz, N., Stumpf, N., Pfister, S. M., & Pajtler, K. W. (2021). From Sampling to Sequencing: A Liquid Biopsy Pre-Analytic Workflow to Maximize Multi-Layer Genomic Information from a Single Tube. *Cancers*, *13*(12), 3002. https://doi.org/10.3390/cancers13123002

Mandel, P., & Metais, P. (1948). [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*, *142*(3–4), 241–243.

Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., & Forastiere, A. A. (2010). HPV-associated head and neck cancer: A virus-related cancer epidemic. *The Lancet. Oncology*, *11*(8), 781–789. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70017-6

Mattox, A. K., D'Souza, G., Khan, Z., Allen, H., Henson, S., Seiwert, T. Y., Koch, W., Pardoll, D. M., & Fakhry, C. (2022). Comparison of next generation sequencing, droplet digital PCR, and quantitative real-time PCR for the earlier detection and quantification of HPV in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, *128*, 105805. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2022.105805

Maussion, G., Thomas, R. A., Demirova, I., Gu, G., Cai, E., Chen, C. X.-Q., Abdian, N., Strauss, T. J. P., Kelaï, S., Nauleau-Javaudin, A., Beitel, L. K., Ramoz, N., Gorwood, P., & Durcan, T. M. (2021). Auto-qPCR; a python-based web app for automated and reproducible analysis of qPCR data. *Scientific Reports*, *11*(1), 21293. https://doi.org/10.1038/s41598-021-99727-6

Mazurek, A. M., Jabłońska, I., Kentnowski, M., Kacorzyk, U., Śnietura, M., & Rutkowski, T. W. (2024). Pretreatment Circulating HPV16 DNA Viral Load Predicts Risk of Distant Metastasis in Patients with HPV16-Positive Oropharyngeal Cancer. *Cancers*, *16*(6), 1163. https://doi.org/10.3390/cancers16061163

Mazurek, A. M., & Rutkowski, T. W. (2023). Practical Application of Circulating Tumor-Related DNA of Human Papillomavirus in Liquid Biopsy to Evaluate the Molecular Response in Patients with Oropharyngeal Cancer. *Cancers*, *15*(4), 1047. https://doi.org/10.3390/cancers15041047

McBride, A. A. (2013). The papillomavirus E2 proteins. *Virology*, *445*(1–2), 57–79. https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.006

McLaughlin-Drubin, M. E., Crum, C. P., & Münger, K. (2011). Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(5), 2130–2135. https://doi.org/10.1073/pnas.1009933108

Menezes, F. D. S., Fernandes, G. A., Antunes, J. L. F., Villa, L. L., & Toporcov, T. N. (2021). Global incidence trends in head and neck cancer for HPV-related and -unrelated subsites: A systematic review of population-based studies. *Oral Oncology*, *115*, 105177. https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.105177

Miller, J. A., Huang, C., Yamamoto, F., Sahoo, M. K., Le, Q.-T., & Pinsky, B. A. (2023). Comparison of Real-Time PCR and Digital PCR for Detection of Plasma Epstein-Barr Virus DNA in Nasopharyngeal Carcinoma. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, *25*(7), 490–501. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2023.03.007

Moody, C. (2017). Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes. *Viruses*, *9*(9), 261. https://doi.org/10.3390/v9090261

Mülhardt, C. (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics* (6. Aufl.). Spektrum Akademischer Verlag.

Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M., & Huh, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of Virology*, *78*(21), 11451–11460. https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004

Nahm, F. S. (2022). Receiver operating characteristic curve: Overview and practical use for clinicians. *Korean Journal of Anesthesiology*, *75*(1), 25–36. https://doi.org/10.4097/kja.21209

Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *439*, 231–250. https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017

NCSS Statistical Software. (2020). *Passing-Bablok Regression for Method Comparison. NCSS.* https://www.ncss.com/wp-content/themes/ncss/pdf/Procedures/NCSS/Passing-Bablok_Regression_for_Method_Comparison.pdf

Nesic, M., Bødker, J. S., Terp, S. K., & Dybkær, K. (2021). Optimization of Preanalytical Variables for cfDNA Processing and Detection of ctDNA in Archival Plasma Samples. *BioMed Research International*, *2021*, 5585148. https://doi.org/10.1155/2021/5585148

Nguyen-Tan, P. F., Zhang, Q., Ang, K. K., Weber, R. S., Rosenthal, D. I., Soulieres, D., Kim, H., Silverman, C., Raben, A., Galloway, T. J., Fortin, A., Gore, E., Westra, W. H., Chung, C. H., Jordan, R. C., Gillison, M. L., List, M., & Le, Q.-T. (2014). Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: Long-term report of efficacy and toxicity. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *32*(34), 3858–3866. https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.3925

Nikanjam, M., Kato, S., & Kurzrock, R. (2022). Liquid biopsy: Current technology and clinical applications. *Journal of Hematology & Oncology*, *15*(1), 131. https://doi.org/10.1186/s13045-022-01351-y

Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. A. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, *1*(3), 1559–1582. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.236

Nybo, K. (2011). qPCR Efficiency Calculations. *BioTechniques*, *51*(6), 401–402. https://doi.org/10.2144/000113776

Olthof, N. C., Huebbers, C. U., Kolligs, J., Henfling, M., Ramaekers, F. C. S., Cornet, I., van Lent-Albrechts, J. A., Stegmann, A. P. A., Silling, S., Wieland, U., Carey, T. E., Walline, H. M., Gollin, S. M., Hoffmann, T. K., de Winter, J., Kremer, B., Klussmann, J. P., & Speel, E.-J. M. (2015). Viral load, gene expression and mapping of viral integration sites in HPV16-associated HNSCC cell lines: HPV Integration in HNSCC Cell Lines. *International Journal of Cancer*, *136*(5), E207–E218. https://doi.org/10.1002/ijc.29112

Palma, D. A., Prisman, E., Berthelet, E., Tran, E., Hamilton, S., Wu, J., Eskander, A., Higgins, K., Karam, I., Poon, I., Husain, Z., Enepekides, D., Hier, M., Sultanem, K., Richardson, K., Mlynarek, A., Johnson-Obaseki, S., Odell, M., Bayley, A., … Nichols, A. C. (2022). Assessment of Toxic Effects and Survival in Treatment Deescalation With Radiotherapy vs Transoral Surgery for HPV-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: The ORATOR2 Phase 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology*, *8*(6), 1–7. https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.0615

Paolini, F., Campo, F., Iocca, O., Manciocco, V., De Virgilio, A., De Pascale, V., Moretto, S., Dalfino, G., Vidiri, A., Blandino, G., Pimpinelli, F., Venuti, A., & Pellini, R. (2023). It is time to improve the diagnostic workup of oropharyngeal cancer with circulating tumor HPV DNA: Systematic review and meta-analysis. *Head & Neck*, *45*(11), 2945–2954. https://doi.org/10.1002/hed.27515

Passing, H., & Bablok, W. (1983). A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. Zeitschrift Fur Klinische Chemie Und Klinische Biochemie*, *21*(11), 709–720. https://doi.org/10.1515/cclm.1983.21.11.709

Passing, H., & Bablok, W. (1984). Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part II. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry. Zeitschrift Fur Klinische Chemie Und Klinische Biochemie*, *22*(6), 431–445. https://doi.org/10.1515/cclm.1984.22.6.431

Pavšič, J., Žel, J., & Milavec, M. (2016). Assessment of the real-time PCR and different digital PCR platforms for DNA quantification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *408*(1), 107–121. https://doi.org/10.1007/s00216-015-9107-2

Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S., & Emslie, K. R. (2012). Evaluation of a Droplet Digital Polymerase Chain Reaction Format for DNA Copy Number Quantification. *Analytical Chemistry*, *84*(2), 1003–1011. https://doi.org/10.1021/ac202578x

Pinheiro, L., & Emslie, K. R. (2018). Basic Concepts and Validation of Digital PCR Measurements. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1768*, 11–24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7778-9_2

Prigge, E.-S., Arbyn, M., von Knebel Doeberitz, M., & Reuschenbach, M. (2017). Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer*, *140*(5), 1186–1198. https://doi.org/10.1002/ijc.30516

Quail, M. A. (2005). DNA Cloning. In Wiley, *Encyclopedia of Life Sciences* (1. Aufl.). Wiley. https://doi.org/10.1038/npg.els.0005344

Quan, P.-L., Sauzade, M., & Brouzes, E. (2018). dPCR: A Technology Review. *Sensors (Basel, Switzerland)*, *18*(4), E1271. https://doi.org/10.3390/s18041271

Reder, H., Taferner, V. F., Wittekindt, C., Bräuninger, A., Speel, E.-J. M., Gattenlöhner, S., Wolf, G., Klussmann, J. P., Wuerdemann, N., & Wagner, S. (2020). Plasma Cell-Free Human Papillomavirus Oncogene E6 and E7 DNA Predicts Outcome in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *The Journal of Molecular Diagnostics: JMD*, *22*(11), 1333–1343. https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.08.002

Renault, C., Bolloré, K., Pisoni, A., Motto-Ros, C., Van de Perre, P., Reynes, J., & Tuaillon, E. (2022). Accuracy of real-time PCR and digital PCR for the monitoring of total HIV DNA under prolonged antiretroviral therapy. *Scientific Reports*, *12*(1), 9323. https://doi.org/10.1038/s41598-022-13581-8

Ricchi, M., Bertasio, C., Boniotti, M. B., Vicari, N., Russo, S., Tilola, M., Bellotti, M. A., & Bertasi, B. (2017). Comparison among the Quantification of Bacterial Pathogens by qPCR, dPCR, and Cultural Methods. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1174. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01174

Richards, K. F., Bienkowska-Haba, M., Dasgupta, J., Chen, X. S., & Sapp, M. (2013). Multiple heparan sulfate binding site engagements are required for the infectious entry of human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*, *87*(21), 11426–11437. https://doi.org/10.1128/JVI.01721-13

Robert Koch Institut. (2018). *RKI-Ratgeber Humane Papillomviren*. *Epidemiologisches Bulletin*, (27). https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/27_18.pdf?__blob=publicationFile

Rogers-Broadway, K.-R., & Karteris, E. (2015). Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *10*(4), 1261–1264. https://doi.org/10.3892/etm.2015.2712

Royal Swedish Academy of Sciences. (1993). *The Nobel Prize in Chemistry 1993*. https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/summary/

Ruiz-Villalba, A., Ruijter, J. M., & van den Hoff, M. J. B. (2021). Use and Misuse of Cq in qPCR Data Analysis and Reporting. *Life (Basel, Switzerland)*, *11*(6), 496. https://doi.org/10.3390/life11060496

Rumgay, H., Murphy, N., Ferrari, P., & Soerjomataram, I. (2021). Alcohol and Cancer: Epidemiology and Biological Mechanisms. *Nutrients*, *13*(9), 3173. https://doi.org/10.3390/nu13093173

Sanders, C. M., & Stenlund, A. (2000). Transcription factor-dependent loading of the E1 initiator reveals modular assembly of the papillomavirus origin melting complex. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(5), 3522–3534. https://doi.org/10.1074/jbc.275.5.3522

Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., & Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*, *63*(6), 1129–1136. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90409-8

Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., & Wesker, K. (2015). *Prometheus: LernAtlas der Anatomie. Teil: Kopf, Hals und Neuroanatomie* (4. Aufl.). Thieme.

Seitz, H. K., & Stickel, F. (2007). Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, *7*(8), 599–612. https://doi.org/10.1038/nrc2191

Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, *52*(3–4), 591–611. https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591

Sharma, S. J., Wagner, S., Reder, H. S. F., Kroll, T., Wuerdemann, N., Klussmann, J. P., & Wittekindt, C. (2018). The 8th edition AJCC/UICC TNM staging for p16-positive oropharyngeal carcinoma: Is there space for improvement? *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology: Official Journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*, *275*(12), 3087–3091. https://doi.org/10.1007/s00405-018-5156-4

Shinozaki, M., O'Day, S. J., Kitago, M., Amersi, F., Kuo, C., Kim, J., Wang, H.-J., & Hoon, D. S. B. (2007). Utility of circulating B-RAF DNA mutation in serum for monitoring melanoma patients receiving biochemotherapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(7), 2068–2074. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2120

Snyder, M. W., Kircher, M., Hill, A. J., Daza, R. M., & Shendure, J. (2016). Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*, *164*(1–2), 57–68. https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.050

Spence, T., Bruce, J., Yip, K. W., & Liu, F.-F. (2016). HPV Associated Head and Neck Cancer. *Cancers*, *8*(8), E75. https://doi.org/10.3390/cancers8080075

Streck. (2024). *Cell-Free DNA BCT.* Streck. https://www.streck.com/wp-content/uploads/sync/Stabilization/Cell-Free_DNA_BCT/02_Product_Information/01_Cell-Free_DNA_BCT_Brochure.pdf

Stroun, M., Lyautey, J., Lederrey, C., Olson-Sand, A., & Anker, P. (2001). About the possible origin and mechanism of circulating DNA apoptosis and active DNA release. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *313*(1–2), 139–142. https://doi.org/10.1016/s0009-8981(01)00665-9

Strutz, J., & Mann, W. (2010). *Praxis der HNO-Heilkunde, Kopf- und Halschirurgie* (2. Aufl.). Thieme.

Su, Z. Y., Siak, P. Y., Leong, C.-O., & Cheah, S.-C. (2023). The role of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1116143. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1116143

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(3), 209–249. https://doi.org/10.3322/caac.21660

Tan, E. M., Schur, P. H., Carr, R. I., & Kunkel, H. G. (1966). Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of Clinical Investigation*, *45*(11), 1732–1740. https://doi.org/10.1172/JCI105479

Tang, A. L., Hauff, S. J., Owen, J. H., Graham, M. P., Czerwinski, M. J., Park, J. J., Walline, H., Papagerakis, S., Stoerker, J., McHugh, J. B., Chepeha, D. B., Bradford, C. R., Carey, T. E., & Prince, M. E. (2012). UM-SCC-104: A New human papillomavirus-16-positive cancer stem cell-containing head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Head & Neck*, *34*(10), 1480–1491. https://doi.org/10.1002/hed.21962

Tellinghuisen, J. (2020). dPCR vs. qPCR: The role of Poisson statistics at low concentrations. *Analytical Biochemistry*, *611*, 113946. https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113946

The dMIQE Group, Whale, A. S., De Spiegelaere, W., Trypsteen, W., Nour, A. A., Bae, Y.-K., Benes, V., Burke, D., Cleveland, M., Corbisier, P., Devonshire, A. S., Dong, L., Drandi, D., Foy, C. A., Garson, J. A., He, H.-J., Hellemans, J., Kubista, M., Lievens, A., … Huggett, J. F. (2020). The Digital MIQE Guidelines Update: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments for 2020. *Clinical Chemistry*, *66*(8), 1012–1029. https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa125

Tzonev, S. (2018). Fundamentals of Counting Statistics in Digital PCR: I Just Measured Two Target Copies-What Does It Mean? *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1768*, 25–43. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7778-9_3

Vogels, C. B. F., Watkins, A. E., Harden, C. A., Brackney, D. E., Shafer, J., Wang, J., Caraballo, C., Kalinich, C. C., Ott, I. M., Fauver, J. R., Kudo, E., Lu, P., Venkataraman, A., Tokuyama, M., Moore, A. J., Muenker, M. C., Casanovas-Massana, A., Fournier, J., Bermejo, S., … Grubaugh, N. D. (2020). *SalivaDirect: A simplified and flexible platform to enhance SARS-CoV-2 testing capacity*. https://doi.org/10.1101/2020.08.03.20167791

von Knebel Doeberitz, M., & Prigge, E.-S. (2019). Role of DNA methylation in HPV associated lesions. *Papillomavirus Research (Amsterdam, Netherlands)*, *7*, 180–183. https://doi.org/10.1016/j.pvr.2019.03.005

Vynck, M., Trypsteen, W., Thas, O., Vandekerckhove, L., & De Spiegelaere, W. (2016). The Future of Digital Polymerase Chain Reaction in Virology. *Molecular Diagnosis & Therapy*, *20*(5), 437–447. https://doi.org/10.1007/s40291-016-0224-1

Wagner, S., Prigge, E.-S., Wuerdemann, N., Reder, H., Bushnak, A., Sharma, S. J., Obermueller, T., von Knebel Doeberitz, M., Dreyer, T., Gattenlöhner, S., Wolf, G., Pons-Kühnemann, J., Wittekindt, C., & Klussmann, J. P. (2020). Evaluation of p16INK4a expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation. *British Journal of Cancer*, *123*(7), 1114–1122. https://doi.org/10.1038/s41416-020-0964-x

Wagner, S., Wittekindt, C., Sharma, S. J., Wuerdemann, N., Jüttner, T., Reuschenbach, M., Prigge, E.-S., von Knebel Doeberitz, M., Gattenlöhner, S., Burkhardt, E., Pons-Kühnemann, J., & Klussmann, J. P. (2017). Human papillomavirus association is the most important predictor for surgically treated patients with oropharyngeal cancer. *British Journal of Cancer*, *116*(12), 1604–1611. https://doi.org/10.1038/bjc.2017.132

Walline, H. M., Goudsmit, C. M., McHugh, J. B., Tang, A. L., Owen, J. H., Teh, B. T., McKean, E., Glover, T. W., Graham, M. P., Prince, M. E., Chepeha, D. B., Chinn, S. B., Ferris, R. L., Gollin, S. M., Hoffmann, T. K., Bier, H., Brakenhoff, R., Bradford, C. R., Carey, T. E., & University of Michigan Head and Neck Specialized Program of Research Excellence (SPORE) Program. (2017). Integration of high-risk human papillomavirus into cellular cancer-related genes in head and neck cancer cell lines. *Head & Neck*, *39*(5), 840–852. https://doi.org/10.1002/hed.24729

Whale, A. S., Huggett, J. F., & Tzonev, S. (2016). Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomolecular Detection and Quantification*, *10*, 15–23. https://doi.org/10.1016/j.bdq.2016.05.002

Williams, J., Kostiuk, M., & Biron, V. L. (2022). Molecular Detection Methods in HPV-Related Cancers. *Frontiers in Oncology*, *12*, 864820. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.864820

Wittekindt, C., Wagner, S., Bushnak, A., Prigge, E.-S., von Knebel Doeberitz, M., Würdemann, N., Bernhardt, K., Pons-Kühnemann, J., Maulbecker-Armstrong, C., & Klussmann, J. P. (2019). Increasing Incidence rates of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Germany and Significance of Disease Burden Attributed to Human Papillomavirus. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, *12*(6), 375–382. https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0098

Wittekindt, C., Wagner, S., Sharma, S. J., Würdemann, N., Knuth, J., Reder, H., & Klußmann, J. P. (2018). [HPV - A different view on Head and Neck Cancer]. *Laryngo- Rhino- Otologie*, *97*(S 01), S48–S113. https://doi.org/10.1055/s-0043-121596

Wuerdemann, N., Jain, R., Adams, A., Speel, E.-J. M., Wagner, S., Joosse, S. A., & Klussmann, J. P. (2020). Cell-Free HPV-DNA as a Biomarker for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma-A Step Towards Personalized Medicine? *Cancers*, *12*(10), 2997. https://doi.org/10.3390/cancers12102997

Wuerdemann, N., Wagner, S., Sharma, S. J., Prigge, E.-S., Reuschenbach, M., Gattenlöhner, S., Klussmann, J. P., & Wittekindt, C. (2017). Prognostic Impact of AJCC/UICC 8th Edition New Staging Rules in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, *7*, 129. https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00129

Zaiontz. (2024, Dezember 29). *Real Statistics Using Excel*. https://real-statistics.com/regression/passing-bablok-regression/passing-bablok-regression-basic-concepts/

Zhen, W., & Berry, G. J. (2020). *Design of a Novel Multiplex Real Time RT-PCR Assay for SARS-CoV-2 Detection*. https://doi.org/10.1101/2020.06.04.135608

Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., & Vitzthum, F. (2004). Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research*, *32*(12), e103. https://doi.org/10.1093/nar/gnh101

12. Anhang

12.1 Basensequenz des synthetischen DNA-Strangs (Insert)

Für die Klonierung des Kontrollplasmids wurde ein synthetischer DNA-Strang als Insert mit Sequenzabschnitten der Gene HBB und RPP30 bei Eurofins Genomics bestellt. Die Basensequenz des synthetischen DNA-Strangs lautet wie folgt:

GTCCGAAAAG TGCCACCTGC CAAGCTTATG GGACTTCAGC ATGGCGGTGT

TTGCAGATTT GGACCTGCGA GCGGGTTCTG ACCTGAAGGC TCTGCGCGGA

CTTGTGGAGA CAGCCGCTCA CCGTGAGTTG CCCCGGCTTC GCGCCTGGCC

AACCTCATGC CCACATGCCC AGTTTCTATT GGTCTCCTTA AACCTGTCTT

GTAACCTTGA TACCAACCTG CCCAGGGCCT CACCACCAAC TTCATCCACG

TTCACCTTGC CCCACAGGGC AGTAACGGCA GACTTCTCCT CAGGAGTCAG

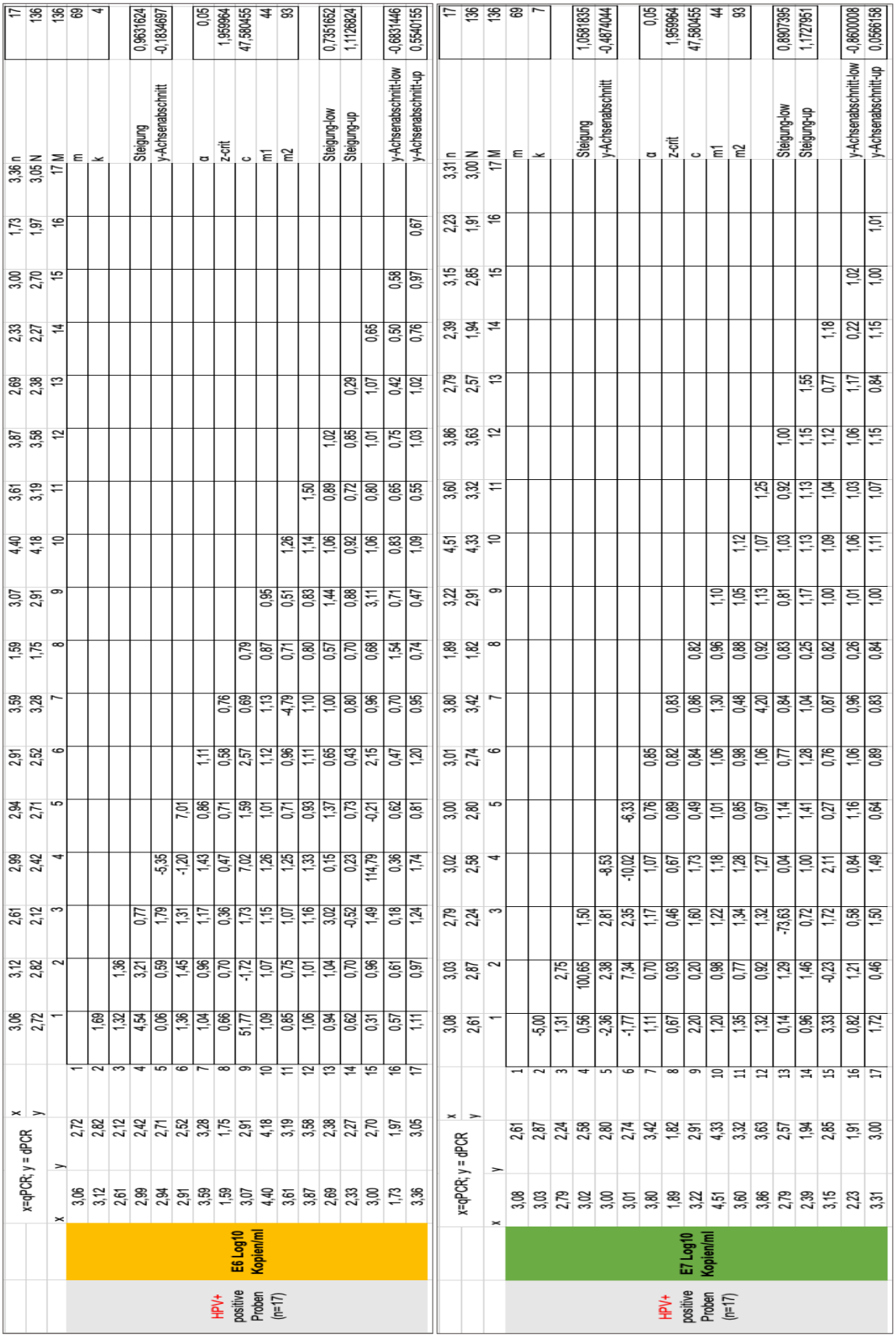
ATGCACCATG GTGTCTGTTT GAGGTTGCTA GTGGGAACCT TTAATAGAAA

TTGGACAGCA AGAAAGCGAG CTTAGTGATA CTTGTGGGCC AGGGCATTAG

CCACACCAGC CACCACTTTC TGATAGGCAG CCTGCACTGG TGGGAAGCTT

GGCCAGTAAT GACCTCAGAA CTG

12.2 Passing-Bablok Regression



12.3 Bland-Altman Analyse

	Proben-Nummer	Gen	qPCR Kopien/ml	dPCR Kopien/ml	Log10 qPCR Kopien/ml	Log10 dPCR Kopien/ml	Log10 Mittelwert (qPCR+dPCR)/2 Kopien/ml	Log10 Differenz (qPCR-dPCR) Kopien/ml
HPV+ positive Proben (n=17)	1	E6	1151,94	528,28	**3,06**	**2,72**	2,89	0,34
	2		1316,90	662,47	**3,12**	**2,82**	2,97	0,30
	3		405,59	132,78	**2,61**	**2,12**	2,37	0,48
	4		987,62	262,81	**2,99**	**2,42**	2,71	0,57
	5		869,71	518,73	**2,94**	**2,71**	2,83	0,22
	6		815,55	330,44	**2,91**	**2,52**	2,72	0,39
	7		3901,25	1885,57	**3,59**	**3,28**	3,43	0,32
	8		38,67	56,40	**1,59**	**1,75**	1,67	-0,16
	9		1161,80	821,32	**3,07**	**2,91**	2,99	0,15
	10		25005,98	15249,00	**4,40**	**4,18**	4,29	0,21
	11		4063,84	1550,36	**3,61**	**3,19**	3,40	0,42
	12		7414,45	3825,78	**3,87**	**3,58**	3,73	0,29
	13		491,64	237,27	**2,69**	**2,38**	2,53	0,32
	14		213,11	185,82	**2,33**	**2,27**	2,30	0,06
	15		993,25	504,68	**3,00**	**2,70**	2,85	0,29
	16		53,26	92,29	**1,73**	**1,97**	1,85	-0,24
	17		2276,23	1128,16	**3,36**	**3,05**	3,20	0,30
							MW Differenz	0,251
							SD Differenz	0,208
							obere Linie	0,659
							untere Linie	-0,157

	Proben-Nummer	Gen	qPCR Kopien/ml	dPCR Kopien/ml	Log10 qPCR Kopien/ml	Log10 dPCR Kopien/ml	Log10 Mittelwert (qPCR+dPCR)/2 Kopien/ml	Log10 Differenz (qPCR-dPCR) Kopien/ml
HPV+ positive Proben (n=17)	1	E7	1199,43	407,35	**3,08**	**2,61**	2,84	0,47
	2		1062,00	748,39	**3,03**	**2,87**	2,95	0,15
	3		622,53	172,03	**2,79**	**2,24**	2,51	0,56
	4		1054,84	378,97	**3,02**	**2,58**	2,80	0,44
	5		992,57	637,01	**3,00**	**2,80**	2,90	0,19
	6		1017,19	545,52	**3,01**	**2,74**	2,87	0,27
	7		6360,41	2602,94	**3,80**	**3,42**	3,61	0,39
	8		78,04	66,12	**1,89**	**1,82**	1,86	0,07
	9		1644,80	816,29	**3,22**	**2,91**	3,06	0,30
	10		32146,78	21330,04	**4,51**	**4,33**	4,42	0,18
	11		4015,31	2086,86	**3,60**	**3,32**	3,46	0,28
	12		7171,62	4308,97	**3,86**	**3,63**	3,74	0,22
	13		616,09	370,04	**2,79**	**2,57**	2,68	0,22
	14		243,17	87,52	**2,39**	**1,94**	2,16	0,44
	15		1411,91	700,92	**3,15**	**2,85**	3,00	0,30
	16		168,33	80,80	**2,23**	**1,91**	2,07	0,32
	17		2026,07	1004,58	**3,31**	**3,00**	3,15	0,30
							MW Differenz	0,302
							SD Differenz	0,127
							obere Linie	0,551
							untere Linie	0,052

13. Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

_____ _____

Ort/Datum **Unterschrift**

14. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, die mich fortwährend unterstützt und zu dieser Dissertation beigetragen haben.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. habil. Christoph Arens bedanken für das entgegengebrachte Vertrauen und die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat. Steffen Wagner. Vielen Dank für die Betreuung und Zusammenarbeit von der Versuchsplanung bis hin zur Durchführung der Experimente im Labor. Des Weiteren möchte ich mich für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen beim Verfassen der Arbeit und das Korrekturlesen bedanken.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Eugen Domann und bei Silke Zechel-Gran am Institut für Hygiene, Umweltmedizin und Mikrobiologie für die Ermöglichung der Experimente an der digitalen PCR und die technische Einarbeitung bedanken.

An dieser Stelle geht ein herzliches Dankeschön an Jessica Diehl für die technische Unterstützung. Deine Erfahrung im Labor und deine konstruktiven Ideen haben maßgeblich zum Erfolg der Experimente beigetragen, vielen Dank.

Meinen Freunden danke ich zutiefst für die aufbauenden Worte und die Begleitung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Bei Eva Schmid und Olivia Shelton bedanke ich mich für die Durchsicht der Arbeit, die Einführung in SPSS und die wertvollen Vorschläge.

Zuallerletzt möchte ich mich bei meiner ganzen Familie, meinen Eltern und meinem Bruder bedanken für ihre bedingungslose Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg. *Cám ơn Ân, Ba và Mẹ.*