

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Tumorbilogie

Direktor Prof. Dr. med. Klaus Pantel

Prä-analytische Einflüsse auf die simultane Analyse mehrerer Parameter im Rahmen einer Liquid Biopsy bei Patienten mit malignem Melanom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Lelia Lück
aus Bremen

Hamburg 2021

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 29.09.2021**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**





Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Nina Booken

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher

Inhaltsverzeichnis

1. Promotionsbezogene Publikation	4
2. Zusammenfassende Darstellung	
• 2.1. Einleitung	19
• 2.1.1 Liquid Biopsy	19
• 2.1.2 Malignes Melanom	21
• 2.2. Material und Methoden	22
• 2.2.1 Proben	22
• 2.2.2 Plasma Extraktion	23
• 2.2.3 ctDNA Isolation und Mutationsanalyse	23
• 2.2.4 CTC Analysen	24
• 2.2.5 CTC Färbung	25
• 2.3. Ergebnisse	25
• 2.3.1 ctDNA Mutationsanalyse	25
• 2.3.2 CTC Detektion	26
• 2.4. Diskussion	28
3. Zusammenfassung (eine Seite)	31
4. Abkürzungsverzeichnis	33
5. Literaturverzeichnis	34
6. Erklärung des Eigenanteils	38
7. Danksagung	39
8. Lebenslauf	40
9. Eidesstattliche Erklärung	41

Pre-analytical factors affecting the establishment of a single tube assay for multiparameter liquid biopsy detection in melanoma patients

Svenja Schneegans¹ , Lelia Lück¹, Katharina Besler¹, Leonie Bluhm², Julia-Christina Stadler^{1,3}, Janina Staub³, Rüdiger Greinert², Beate Volkmer² , Mikael Kubista^{4,5}, Christoffer Gebhardt³, Alexander Sartori⁶, Darryl Irwin⁶, Elina Serkkola⁷, Taijaaf Hällström^{7,*}, Evi Lianidou⁸, Markus Sprenger-Haussels^{9,10}, Melanie Hussong^{9,10}, Peter Mohr², Stefan W. Schneider³, Jonathan Shaffer^{9,10}, Klaus Pantel¹  and Harriet Wikman¹ 

1 Department of Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

2 Centre of Dermatology, Elbe Clinics, Buxtehude, Germany

3 Department of Dermatology and Venereology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Germany

4 TATAA Biocenter AB, Gothenburg, Sweden

5 Department of Gene Expression, Institute of Biotechnology, Czech Academy of Sciences, Vestec, Czech Republic

6 Agena Bioscience GmbH, Hamburg, Germany

7 Orion Pharma, Orion Corporation, Espoo, Finland

8 Analysis of Circulating Tumor Cells, Lab of Analytical Chemistry, Department of Chemistry, University of Athens, Greece

9 QIAGEN Inc/GmbH, Frederick, MD, USA

10 QIAGEN Inc/GmbH, Hilden, Germany

Keywords

CTC; ctDNA; EV; liquid biopsy; melanoma; miRNA

Correspondence

H. Wikman, Department of Tumor Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany
 Tel: +49-40-7410 51913
 E-mail: h.wikman@uke.de

Present address

*AstraZeneca, Espoo, Finland
 Institute for Molecular Medicine Finland, University of Helsinki, Finland

Svenja Schneegans and Lelia Lück contributed equally to this article.

(Received 13 December 2019, revised 11 February 2020, accepted 12 March 2020, available online 4 April 2020)

doi:10.1002/1878-0261.12669

The combination of liquid biomarkers from a single blood tube can provide more comprehensive information on tumor development and progression in cancer patients compared to single analysis. Here, we evaluated whether a combined analysis of circulating tumor cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA), and circulating cell-free microRNA (miRNA) in total plasma and extracellular vesicles (EV) from the same blood sample is feasible and how the results are influenced by the choice of different blood tubes. Peripheral blood from 20 stage IV melanoma patients and five healthy donors (HD) was collected in EDTA, Streck, and Transfix tubes. Peripheral blood mononuclear cell fraction was used for CTC analysis, whereas plasma and EV fractions were used for ctDNA mutation and miRNA analysis. Mutations in cell-free circulating DNA were detected in 67% of patients, with no significant difference between the tubes. CTC was detected in only EDTA blood and only in 15% of patients. miRNA NGS (next-generation sequencing) results were highly influenced by the collection tubes and could only be performed from EDTA and Streck tubes due to hemolysis in Transfix tubes. No overlap of significantly differentially expressed miRNA (patients versus HD) could be found between the tubes in total plasma, whereas eight miRNA were commonly differentially regulated in the EV fraction. In summary, high-quality CTCs, ctDNA, and miRNA data from a single blood tube can be obtained.

Abbreviations

cfDNA, cell-free circulating DNA; CTC, circulating tumor cell; ctDNA, circulating tumor DNA; EM, electron microscopy; EV, extracellular vesicle; FC, fold change; HD, healthy donor; miRNA, MicroRNA; MM, metastatic melanoma; NGS, next generation sequencing; NTA, nanoparticle tracking analysis; PBMcs, peripheral blood mononuclear cells; UMI, Unique Molecular Index; VAF, variant allele frequency.

However, the choice of blood collection tubes is a critical pre-analytical variable.

1. Introduction

Liquid biopsy has become an important alternative tool for cancer diagnostics and includes the analysis of circulating tumor cells (CTCs), circulating tumor DNA (ctDNA), extracellular vesicles (EVs), and circulating cell-free microRNA (miRNA) (Alix-Panabieres and Pantel, 2016; Anfossi *et al.*, 2018; Bardelli and Pantel, 2017; Girotti *et al.*, 2015; Zavrudou *et al.*, 2018). The amounts of both CTCs and ctDNA are often very low, and the half-life time of both biomarkers is short (1–2 h) (Diehl *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2004). In contrast, miRNA last up to 24 h in the bloodstream due to their inclusion in EVs or binding to (lipo)proteins (Cheng *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2008; Vickers *et al.*, 2011). However, their normalization and natural variation depend on many factors, which can be a drawback (Schwarzenbach *et al.*, 2015). Therefore, the use of multiple biomarkers found in the blood of patients might give the most comprehensive information to be used for patient monitoring and disease control (Anfossi *et al.*, 2018).

Different studies have shown the superiority of specific blood collection tubes for specific liquid biopsy assays (Alidousty *et al.*, 2017; Bartak *et al.*, 2018; Nikolaev *et al.*, 2018), but a comprehensive analysis of the major liquid biopsy analytes in one single tube is, to the best of our knowledge, still lacking. Since the occurrence, concentration, and stability of these biomarkers are distinct, different analyses might require different blood collection tubes.

The incidence of melanomas has increased dramatically over the past years (Erdmann *et al.*, 2013). Although the introduction of targeted therapies (e.g., against BRAF) and, in particular, immunotherapies have significantly improved the survival rates of some patients, the overall 5-year survival rate is still only 25%. Melanomas show an exceptional high mutation rate and tumor heterogeneity (Gray *et al.*, 2015). Therefore, we chose here melanoma as a tumor entity with a need of a multiparameter liquid biopsy approach. In this study, we report that reliable ctDNA, CTC, and miRNA analysis can be performed from blood samples collected in a single collection tube from melanoma patients. We also show the suitability of a next generation sequencing (NGS)-based total and EV-associated miRNA detection workflow in

melanoma patients and used a specific melanoma-associated ctDNA mutation panel.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection

Peripheral blood was collected from 20 metastatic melanoma (MM; AJCC stage IV) patients with progressive disease. Blood from 11 women and nine men was collected (mean age: 74). Nineteen patients were diagnosed with cutaneous melanoma and one patient with uveal melanoma. The study was approved by the local ethical committee (PV5932), conducted according to the Declarations of Helsinki, and all participants gave their written consent. The samples were collected and analyzed in a blinded manner.

The experimental procedure and used samples are shown in Fig. S1. Blood was collected in parallel in three different blood collection tubes, that is, EDTA (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, US), Streck cell-free circulating DNA (cfDNA) BCT® (Streck, La Vista, NE, US), and Transfix (Cytomark, Buckingham, UK; 7.5 mL each). EDTA was chosen due to its broad applicability, whereas Streck is commonly used in ctDNA analyses and we have recently shown the suitability of Transfix for CTC analysis (Koch *et al.*, 2020). Plasma removal without hemolysis was not possible from Transfix tubes, so these tubes were only used for CTC analyses. The EDTA and Streck tubes were processed within 2–5 h after blood collection, and the Transfix tubes were processed on the next day according to the manufacturer's recommendations. For the miRNA analyses, peripheral blood was collected in Streck and EDTA tubes from five healthy donors (HD) and processed identically with the patients' samples. The HD were sex but not age matched.

2.2. Plasma extraction

Blood from both EDTA and Streck tubes was first centrifuged at 500 *g* for 10 min in order to separate plasma from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).

The supernatant of the plasma fraction was divided over two tubes (1.5–2 mL per tube) and plasma from Streck tubes designated for ctDNA extraction was

centrifuged at 6000 *g* for 10, while EDTA tubes were centrifuged at 2500 *g* for 10 min. These plasma fractions were stored at -80°C until cfDNA extraction. The supernatant of the second plasma fractions designated for miRNA extraction (both EDTA and Streck) was centrifuged at 2500 *g* for 10 min, and their supernatants were centrifuged once more at 2500 *g* for 15 min before the supernatant was stored (-80°C) for EV and miRNA isolation.

2.3. ctDNA isolation

The QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used to isolate cfDNA from 2 mL plasma according to the manufacturer's instructions, and samples were eluted in 25 μL .

The cfDNA concentration was measured using the Qubit Fluorometric Quantitation System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US). Quality measurements were performed with TapeStation (High Sensitivity D5000 ScreenTape; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US). Statistical testing of differences in ctDNA concentrations was assessed using Wilcoxon signed-rank test in R.

2.4. ctDNA mutation analysis

For the identification of 86 hot-spot mutations in 13 genes (Table S1) from the isolated ctDNA, the UltraSEEK™ Melanoma Panel (Agena Bioscience, Hamburg, Germany) was used. The enriched products were transferred onto SpectroCHIP®-96 Arrays and analyzed with matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry-based MassARRAY® System (Agena Bioscience) according to the manufacturer's instructions (Mosko *et al.*, 2016).

2.5. CTC capture and enrichment

The PBMC fraction was processed with the ClearBridge ClearCell® FX1 System (Biolidics Limited, Singapore, Singapore) using program no. 1 (default setting) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the PBMC fraction was treated with red blood cell lysis buffer (Biolidics), and the pellet was resuspended in 4 mL of resuspension buffer before being placed in the ClearCell FX1 System with a CTC Chip™FR1. The solution from the output was then centrifuged (500 *g*, 10 min), and all supernatant except for the last 200 μL was discarded. The cell pellet was resuspended in the remaining 200 μL and transferred to a slide and left for air-drying. In one patient, the blood processing cassettes for EDTA and Streck were

damaged and could not be processed, whereas in one additional patient the Streck blood was coagulated.

2.6. CTC spiking experiments

To analyze whether plasma removal from whole blood has an influence on CTC recoveries, EDTA ($n = 4$) and Streck HD blood ($n = 4$) were spiked with 50 H1975-GFP-positive cells. Plasma was removed and processed with the ClearCell FX1 system (see above). The pellet was transferred into a 96-well plate and screened for GFP-positive cells. Statistical testing of the influence of plasma removal was analyzed using Wilcoxon signed-rank test in R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). The recovery rates after plasma removal combined with our optimized staining protocols (see below) were estimated using 100 SK-MEL-28 cells using both EDTA and Streck tubes ($n = 2$ each).

2.7. CTC staining

Two different staining protocols for CTCs were used in this study. In the first ten samples as well as CTC spiking experiments with SK-MEL-28 cells, the cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 10 min, then a blocking buffer containing $1\times$ PBS, 5% goat serum, 5% v/v FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), and 0.3% Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) to prevent unspecific binding was added for 30 min. Anti-CD45 (D9M81; 1 : 200; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), 1 : 500 goat-anti-rabbit Alexa Fluor 568 as secondary antibody (Thermo Fisher Scientific), and DAPI (1 : 100 00) were used. In a second staining step, melanoma markers were added using directly labeled MCAM (PE) (1 : 100; clone P1H12; EMD Millipore Corp, Burlington, MA, USA) and NG2 (MCSP) (PE) (1 : 50; clone LHM-2; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). In the last ten cases, two additional directly labeled melanoma markers were added, PMEL17 (SILV) Alexa Fluor 488 (1 : 750; clone HMB45; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) and Melan-A (MART-1) Alexa Fluor 488 (1 : 250; clone M2-7C10; Novus Biologicals), and the CD45 fluorophore conjugate was APC (clone REA747; 1 : 50; Miltenyi Biotec).

2.8. Extracellular vesicle isolation

Extracellular vesicles were isolated and prepared for analyses as described in Puhka *et al.* (2017). Plasma samples were diluted with PBS (1 : 2) and filtrated using 0.8 μm Millex AA syringe filters (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). EVs were extracted from

0.8 to 1.45 mL of original plasma volume by ultracentrifugation (100 000 *g*, 2 h, 4 °C) with a TLA-55 fixed angle rotor. EV was suspended in 100 µL of cold PBS and aliquoted for different downstream analysis. Aliquots were stored in PBS at −80 °C.

2.9. Nanoparticle tracking analysis (NTA) and transmission electron microscopy

Nanoparticle tracking analysis (NTA) and electron microscopy (EM) were performed with EVs for quality control. Particle number and size distribution of the EV samples were analyzed with NTA instrument LM14C (NanoSight LTD., London, UK). Videos of 5 × 30 s/sample were recorded at room temperature and analyzed with NANOSIGHT NTA 3.0 software (NanoSight LTD.). Statistical testing of differences in particle concentrations was assessed using Wilcoxon signed-rank test in R after normalization for different starting amounts of plasma. EM was performed with EVs from 0.1 mL of plasma as described in Puhka *et al.* (2017).

2.10. MiRNA extraction and sequencing

Total plasma miRNA of 10 melanoma patients and five HDs was extracted from 200 µL plasma from EDTA and Streck tubes collected samples with miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Qiagen) according to instructions. The choice of the extraction kit was based on the results of the CANCER-ID study ‘Multicenter evaluation of circulating plasma miRNA extraction technologies for the development of clinically feasible RT-qPCR and NGS analytical workflows’. RNA extraction from EVs was performed with miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen). QIAseq miRNA libraries were constructed with QIAseq miRNA Library Kit, and Illumina NextSeq High Output sequencing runs were performed (Illumina NextSeq 550) with 5 µL of miRNA. The 3′ adapter sequences and low-quality bases (Phred score < 10) were trimmed using cutadapt (<http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>), and identical reads were collapsed based on their Unique Molecular Indices (UMIs) sequences. Raw reads below 16 bp and UMI sequences below 10 bp were discarded. The remaining reads were mapped to miRBase using bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>). The FastQ files are available at GEO (accession number GSE143231).

2.11. Differential expression analysis

To assess differential miRNA expression, UMI counts of MM patients were compared to their corresponding

HD sample counts. Raw UMI reads of HD and MM samples were therefore normalized together for the groups EDTA plasma, EDTA EV, Streck plasma, and Streck EV. Statistical testing of differences of UMI count medians between EDTA and Streck samples was assessed using Wilcoxon signed-rank test in R.

To reduce possible bias from the normalization method, normalization was performed using both geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) (GeneGlobe Secondary Data Analysis Tool; Qiagen) and NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) (GenEx7; MultiD Analyses AB, Gothenburg, Sweden) algorithms in two separate analyses. Reference genes for the NormFinder algorithm were only considered if their UMI counts exceeded three reads. Subsequent analysis of differential miRNA expression was assessed by *t*-testing ($P < 0.05$) without correction for multiple testing. A cutoff value of 2 was defined for the fold change (FC) of MM/HD. Only genes with averaged UMI counts > 10 in at least one group were considered in both geNorm and NormFinder analyses.

2.12. Orthogonal validation of differentially expressed miRNA

For validation of the results obtained by NGS analysis, 2 µL of miRNA from EDTA and Streck EV samples was reverse transcribed into cDNA using miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) according to instructions. miRCURY LNA miRNA PCR assays (Qiagen) of hsa-miR-103a-3p and hsa-miR-93-5p served as reference gene assays, whereas hsa-miR-375, hsa-miR-215-5p, and hsa-miR-200c-3p were chosen for orthogonal validation. Reference miRNA were chosen based on geNorm analysis, which identified the 10 most stable genes for NGS normalization, and abundant expression profiles. Assays were performed in triplicates according to the instructions. Analysis was performed with the $\Delta\Delta C_q$ method, with $\Delta C_q = C_q$ [average (hsa-miR-103a-3p + hsa-miR-93-5p)] − C_q (individual assay of each patient or HD) and $\Delta\Delta C_q = \Delta C_q$ (individual patients) − ΔC_q (average of HD) (Madadi *et al.*, 2019).

3. Results

3.1. ctDNA mutation analysis

Plasma extraction without substantial hemolysis from blood collected in Transfix tubes was not possible; therefore, with these tubes only CTC analyses could be performed and cfDNA was only isolated from plasma

collected in EDTA and Streck tubes. The concentration of the isolated ctDNA ranged from 0.1 to 15 ng· μL^{-1} (Fig. 1A), with no significant difference in ctDNA concentration (mean EDTA: 3.3 ng· μL^{-1} \pm 4.6, Streck: 3.0 ng· μL^{-1} \pm 4.7) between the two tubes ($P = 0.96$, Wilcoxon signed-rank test; Fig. 1B).

For the targeted detection of somatic mutations in ctDNA, we used the UltraSEEK® Melanoma Panel covering 86 mutations in 13 key oncogenes (Table S1) implicated in disease progression and therapy response of melanoma in conjunction with the

MassARRAY® System (Agena Bioscience, San Diego, CA, USA). A mutation signal produced using this method can be detected down to 0.1% variant allele frequency (VAF) (Mosko *et al.*, 2016).

The VAF in the present study ranged from 0.2% to 2.6%. In total, mutations were detected in 8/12 (66.7%) cases. In all patients except one, the results were identical between the two tubes and the VAF was comparable for each mutation (Table 1, Table S1, Fig. 1C). The most common mutation was *MAP2K1 N382H* (5/12, 42%), followed by *MAP2K1 I111S* (3/

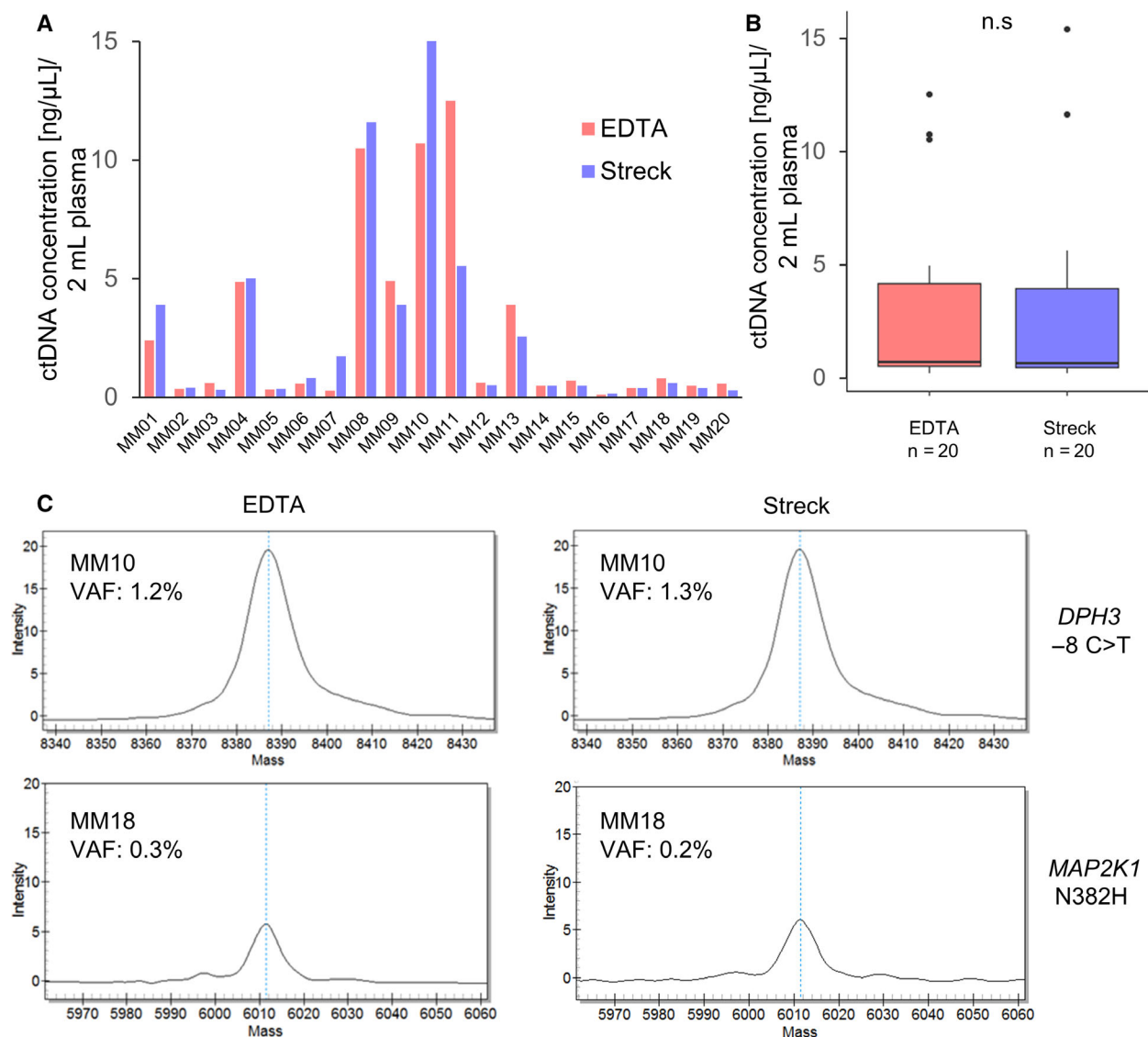


Fig. 1. ctDNA concentrations and mutation detection in plasma samples from MM patients. (A) ctDNA concentration (ng· μL^{-1}) from 2 mL plasma of individual MM patients in EDTA and Streck tubes. (B) Boxplot depicting the dispersion of ctDNA concentration (ng· μL^{-1}) of MM patients ($n = 20$) in EDTA and Streck tubes. No significant difference in ctDNA concentration was found ($P = 0.96$, Wilcoxon signed-rank test). (C) VAF analysis of patients MM10 and MM18 who showed similar frequencies of somatic mutations for *DPH3*-8 C>T and *MAP2K1 N382H* in both EDTA and Streck tubes.

Table 1. Comparison of VAF of all detected mutations in ctDNA isolated from blood collected in EDTA or Streck tubes.

Pat	Mutation	Nucleotide substitution	VAF %	
			EDTA	Streck
MM01	CDKN2A R80X	NM_000077.4:c.238C>T	0.3	0.3
	KIT V559A	NM_000222.2:c.1676T>C	0.9	1.1
MM10	BRAF K601E	NM_004333.6:c.1801A>G	0.4	0.5
	DPH3 -8C>T	NC_000003.12:g.16306504T>C	1.2	1.3
	RPS27 UTR MUT	NC_000001.11:g.153990763C>T	1.4	1.4
MM13	BRAF K601E	NM_004333.6:c.1801A>G	0.5	WT
	MAP2K1 I111S	NM_002755.3:c.332T>G	WT	0.3
MM14	NRAS Q61R	NM_002524.5:c.182A>G	2.4	2.6
	MAP2K1 N382H	NM_006049.4:c.*162T>G	0.4	0.5
MM15	MAP2K1 I111S	NM_002755.3:c.332T>G	0.5	0.4
	MAP2K1 N382H	NM_006049.4:c.*162T>G	0.6	0.6
	KIT V559A	NM_000222.2:c.1676T>C	0.2	0.3
MM17	MAP2K1 I111S	NM_002755.3:c.332T>G	0.4	0.6
	MAP2K1 N382H	NM_006049.4:c.*162T>G	0.7	0.6
	NRAS Q61R	NM_002524.5:c.182A>G	1.4	1.4
MM18	CDKN2A R80X	NM_000077.4:c.238C>T	0.3	0.2
	MAP2K1 N382H	NM_006049.4:c.*162T>G	0.5	0.6
MM19	MAP2K1 I111S	NM_002755.3:c.332T>G	0.5	0.4
	MAP2K1 N382H	NM_006049.4:c.*162T>G	0.5	0.4

12, 25%). *CDKN2A R80X*, *KIT V559A*, *BRAF K601E*, and *NRAS Q61R* were each found in two patients (2/12, 16.7%; Table 1).

The only exception was patient MM13 in which different mutations could be found in the plasma DNA obtained from EDTA and Streck tubes. In this particular case, there was a *BRAF K601E* mutation found only in the EDTA tube (VAF: 0.7%) and a *MAP2K1 I111S* (VAF: 0.3%) mutation only in the DNA from the Streck tube (Table 1). A second blood draw was not available for this patient to verify these results.

3.2. CTC spiking experiments and CTC detection

For CTC enrichment, the ClearCell FX1 System was used. This label-free CTC enrichment is based on a microfluidic chip that makes use of the different characteristics such as size and inertia of CTC in comparison with normal blood cells (Tan *et al.*, 2016). Spiking experiments were performed to validate the performance of the extraction method combined with melanoma-specific staining protocols and the influence of plasma removal prior to CTC isolation with the ClearCell FX1 System.

First, the influence of plasma removal on CTC recovery rates was analyzed. Mean recoveries of spiking 50 H1975 GFP-positive cells into 7.5 mL of EDTA blood ($n = 4$) were $47.0\% \pm 9.3$ without plasma removal. With plasma removal, it was $46.8\% \pm 12.7$ ($P = 0.85$, Wilcoxon signed-rank test). CTC

enrichment from Streck tubes showed a mean recovery of $52\% \pm 13$ after plasma removal. Similar results were obtained when 100 SK-MEL-28 cells were used and stained with the first CTC staining protocol for melanoma samples (see 2.7). Here, the recovery rates for EDTA tubes were $49\% \pm 8.5$ and for Streck $44\% \pm 7.1$ when plasma was removed before analysis. Plasma removal does therefore not influence CTC recoveries when using the ClearCell FX1 System. As plasma could not be removed from Transfix tubes without substantial hemolysis, whole blood was analyzed in these tubes.

In the patient samples, we found in total CTCs in 15% (3/20) of patients: two CTCs in patient MM01 and one CTC in patient MM12 and MM19 each (Fig. 2). All CTCs were found in the EDTA tube, while none were found in the Streck or Transfix tubes.

3.3. Nanoparticle tracking analysis and transmission electron microscopy of EVs

The mean concentrations of EV particles detected in blood obtained in EDTA tubes were $3.33 \times 10^{11} \pm 2.77 \times 10^{11}$ and for Streck $2.84 \times 10^{11} \pm 2.31 \times 10^{11}$ particles·mL⁻¹. The obtained particle concentrations were relatively constant between different plasma types from the same donor, but varied between individuals; however, exceptions could be observed in patients MM02 and HD4 (Fig. 3A). The particle concentrations of HD and patients did not differ

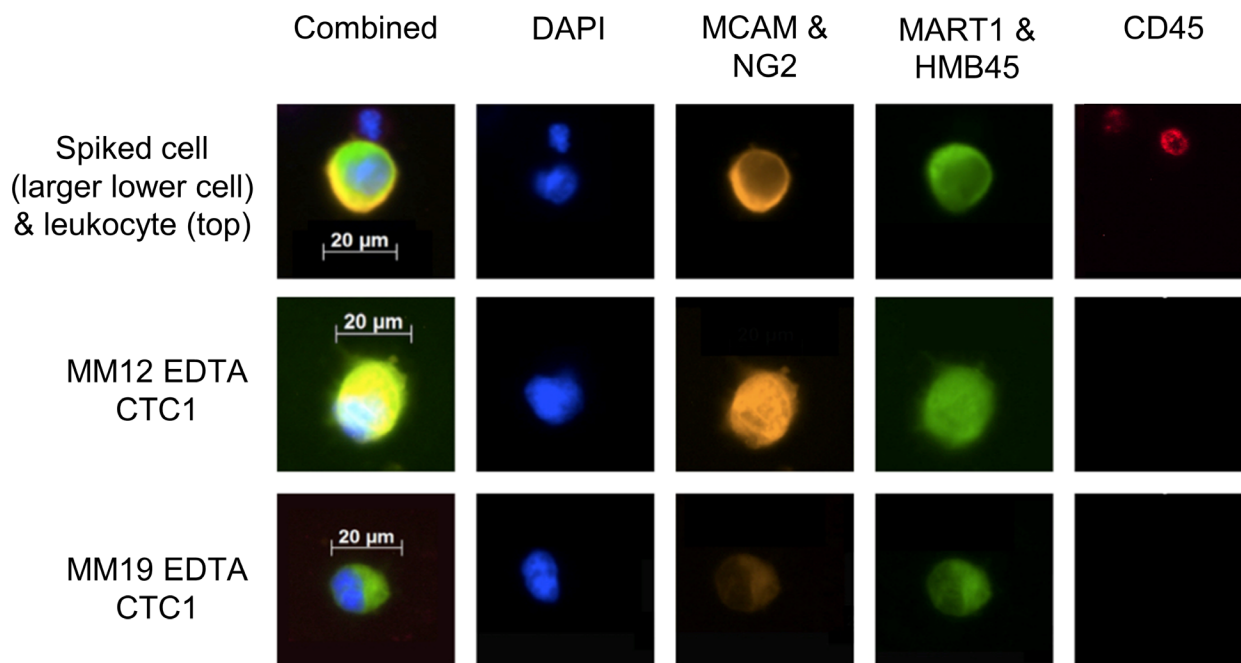


Fig. 2. Images of spiked SK-MEL28 cells in HD blood and CTCs identified in the MM patients using a multicolor immunofluorescence approach. After the isolation with the ClearCell system, the immunofluorescence staining was performed using a combination of four different MM markers (MCAM and NG2 in the PE and MART1 and HMB45 with Alexa 488). As an exclusion marker, CD45 (APC) was used. For nuclear staining, DAPI was used (blue channel). CTCs were positive for the melanoma markers and negative for CD45, while leukocytes were only positive for CD45 and negative for the melanoma markers.

significantly from each other [$P = 0.31$ (HD), $P = 0.92$ (MM); Wilcoxon signed-rank test; Fig. 3B].

Similar to particle concentrations, the particle size distributions were relatively constant between different plasma types from the same donor (exceptions MM2 and MM6 and HD1), but showed again more variation between individuals. The particle size distributions of HD and patients did not differ systematically from each other (Fig. S2A). The EV sizes reached up to 1 μm . There was no obvious difference between EDTA vs. Streck plasma nor healthy vs. patient samples regarding EV morphology, sizes, or sample purity (Fig. 3C).

3.4. NGS analysis of total plasma miRNA

In order to assess possible differences caused by the collection tube on the quality of downstream analysis by NGS, we first analyzed the raw reads and the UMI counts.

The total raw reads of the averaged individual samples were comparable across all plasma samples and range from approximately 13 to 18 million. The UMI reads, however, were mostly higher in the EDTA than in the Streck samples in both HD and MM fractions,

but due to large variance it did not reach significance (paired t -test; Table 2, Fig. S3), with averaged UMI read FC (EDTA/Streck per patient) being 1.8 (range 1.2–2.8, $P = 0.094$) for HDs and 2.6 (range 0.4–4.9, $P = 0.054$) for MM patients.

For the analysis of differential miRNA expression in MM compared to HD, two different normalization methods were used. Using the geNorm normalization method, only one miRNA (hsa-miR-4799-3p) was found differentially upregulated and three (hsa-miR-205-5p, hsa-miR-4529-3p, hsa-miR-141-3p) downregulated in the EDTA plasma samples in MM patients compared to HD. In the corresponding Streck plasma samples, one miRNA (hsa-miR-506-3p) was upregulated and one (hsa-piR-003731) was downregulated. No overlap between significant miRNA could be detected between the two tubes (Table S2, Fig. 3D). Similar results were obtained using NormFinder as a normalization method. Here, six miRNA were found upregulated and two downregulated in EDTA tubes, while three miRNA were up- and two downregulated in Streck tubes (Table S2, Fig. 3D). Both tubes have no miRNA in common, indicating a big influence of the collection tubes on the results.

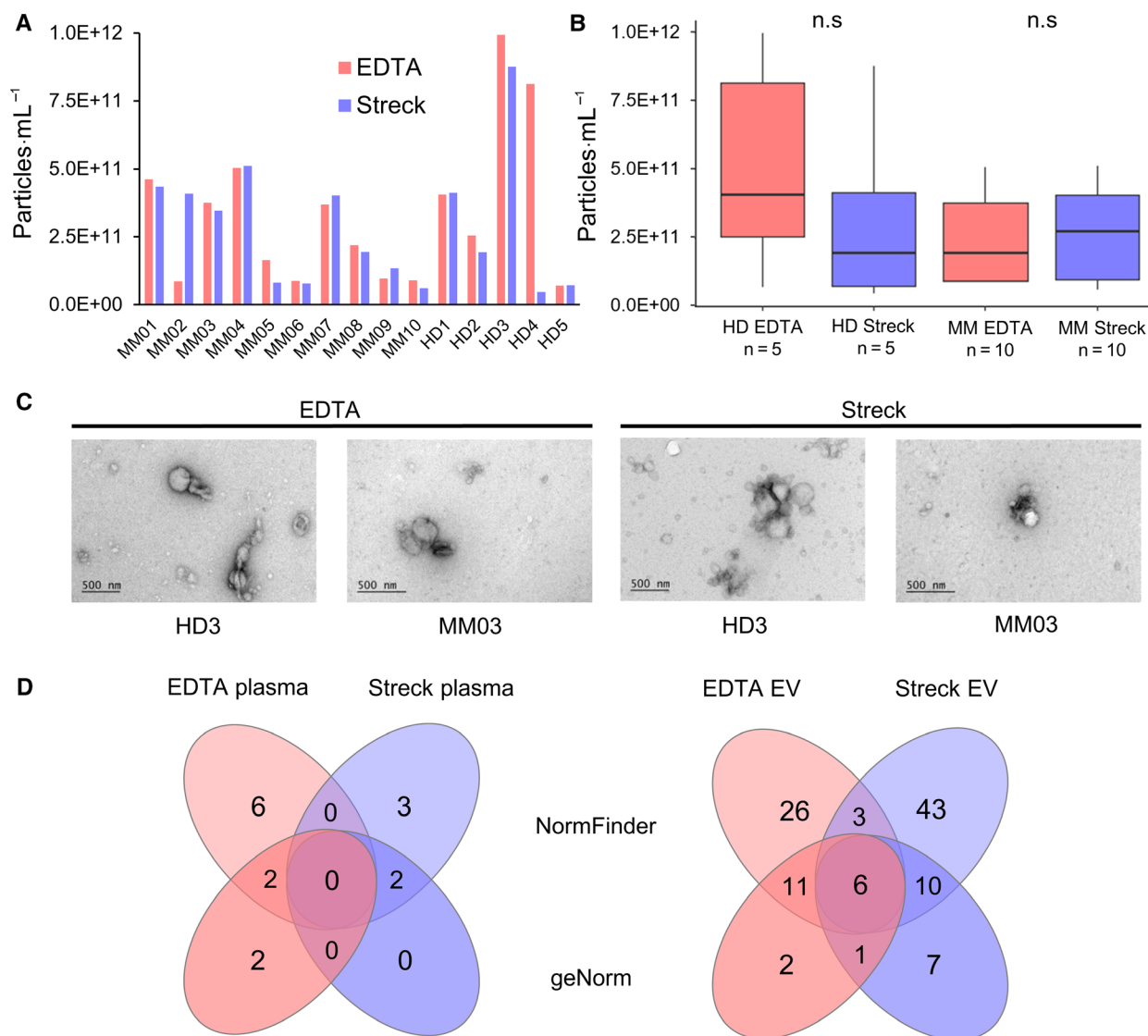


Fig. 3. NTA and transmission EM imaging of EVs (A) EV concentration (particles·mL⁻¹) of individual MM patients and HDs in EDTA and Streck tubes. (B) Boxplots showing the particle concentration per mL of MM patients ($n = 10$) and HDs ($n = 5$). No significant differences were found between blood collected in EDTA and Streck tubes of HD and MM [$P = 0.31$ (HD), $P = 0.92$ (MM); Wilcoxon signed-rank test]. (C) EM imaging of EVs isolated from EDTA and Streck tubes from HD3 and MM03 show similarities regarding morphology, size, and sample purity. (D) Venn diagram depicting the number of differentially regulated miRNA from NormFinder and geNorm analyses analyzed in blood collected in either EDTA or Streck tubes.

3.5. NGS analysis of EV-associated miRNA and orthogonal validation of differentially expressed miRNA

Like in the total plasma samples, the averaged raw counts in the EV fractions were similar between different tubes and HD and MM patients and ranged from approximately 13 million (HD EDTA EV) to 15.5 million (MM Streck EV; Table 2, Fig. S3). However, similar to total plasma the UMI reads of the EDTA

samples were higher than those of the Streck samples (averaged UMI read FC (EDTA/Streck per patient) of 4.0 (range 0.8–6.8, $P = 0.059$) in HD and 6.5 (range 0.1–18.0, $P = 0.271$) in MM patients).

When analyzing for significantly differentially expressed miRNA in MM-EVs compared to HD, we identified eight and 11 miRNA that are upregulated in blood from EDTA and Streck tubes, respectively, when using geNorm. Downregulation of 12 miRNA was detected in EDTA samples and of 13 in Streck

Table 2. miRNA NGS data of total reads of averaged individual HD and MM samples of plasma and EV samples, analyzed in blood collected in either EDTA or Streck tubes.

Read set (average)	EDTA plasma	Streck plasma	EDTA EV	Streck EV
Control				
Total reads	12 918 867	14 473 494	13 627 945	12 763 090
Too short reads	5 230 193	5 869 227	4 405 809	6 672 979
miRNA reads	1 308 356	828 325	7 390 907	3 990 079
miRNA + piRNA UMIs	504 231	288 253	1 399 170	387 321
% UMIs/reads	3.9	2.0	10.3	3.0
Median UMIs	42.5	42.0	5.4	4.0
MM patients				
Total reads	17 902 408	15 079 146	13 323 562	15 583 441
Too short reads	7 157 874	6 205 271	5 231 919	8 248 732
miRNA reads	2 034 688	1 061 176	5 928 317	4 775 402
miRNA + piRNA UMIs	657 612	352 714	1 228 334	615 673
% UMIs/reads	3.7	2.3	9.2	4.0
Median UMIs	45.6	37.0	5.1	4.0

samples. There was an overlap of seven significant miRNA in the EV samples using geNorm normalization (Fig. 3D, Fig. S2B).

NormFinder results showed slightly more differentially expressed miRNA; 18 miRNA were up- and 28 were downregulated in EDTA tubes where 24 were up- and 38 downregulated in Streck tubes (Fig. 4A, Table S2). Using NormFinder, nine miRNA were shared between Streck and EDTA. Of these, six significant miRNA were in common with geNorm: hsa-miR-375, hsa-miR-215-5p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-200a-3p, hsa-miR-200b-3p, and hsa-miR-200c-3p. Hsa-miR-584-5p was only found significant in geNorm analysis, whereas hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-10b-5p, and hsa-miR-155-5p were significantly shared in NormFinder. Notably, none of the identified miRNA was shared between the EV and total plasma fraction.

PCA of these four groups (EDTA plasma, EDTA EV, Streck plasma, and Streck EV) showed a clear separation of the HD samples and the MM patients, indicating that EDTA and Streck tubes were suitable for NGS applications within this setting (Fig. 4B).

To confirm the differential regulation of a subset of the six identified miRNA that were shared by both geNorm and NormFinder analyses, three miRNA (hsa-miR-375, hsa-miR-215-5p, and hsa-miR-200c-3p) were chosen due to high FCs and UMI counts in the NGS data. RT-qPCRs of reversely transcribed miRNA of EDTA and Streck EV samples were performed and normalized against reference miRNA hsa-miR-103a-3p and hsa-miR-93-5p (Table 3). In averaged Streck EV samples, only hsa-miR-200c-3p was found downregulated (1.97-fold) compared to HD, whereas in EDTA tubes both hsa-miR-375 and hsa-

miR-200c-3p were downregulated (2.23-fold and 2.48-fold, respectively). hsa-miR-215-5p could not be validated in either of the tubes that could be due to the low endogenous level of this miRNA.

4. Discussion

In this study of the European CANCER-ID consortium (www.cancer-id.eu), peripheral blood from stage IV melanoma patients was drawn in EDTA, Streck, and Transfix blood collection tubes with the aim to establish a protocol for downstream analysis of ctDNA, CTC, and circulating miRNA from either plasma or EVs from one single blood collection tube. To our knowledge, this is the first study combining all four main liquid biopsy analytes in patients.

Currently, the gold standard for the detection and monitoring of disease progression in melanoma remains tissue biopsy. However, the main sites of melanoma metastases, the brain and lung, can be surgically difficult to access for taking biopsies. Since melanomas harbor an exceptional high tumor heterogeneity and great potential to disseminate to distant organs (Lawrence *et al.*, 2013), being able to establish a multiparameter liquid biopsy approach would be of great advantage for patients (Huang and Hoon, 2016).

Here, ctDNA analysis showed similar concentrations in the blood collected in EDTA and Streck tubes as well as identical mutations when using the highly sensitive MassArray technology (Elazezy and Joosse, 2018). We tested a novel mutation panel consisting of 86 hot-spot mutations in 13 melanoma relevant genes. In 67% of melanoma patients, a mutation could be detected, indicating that already with this rather

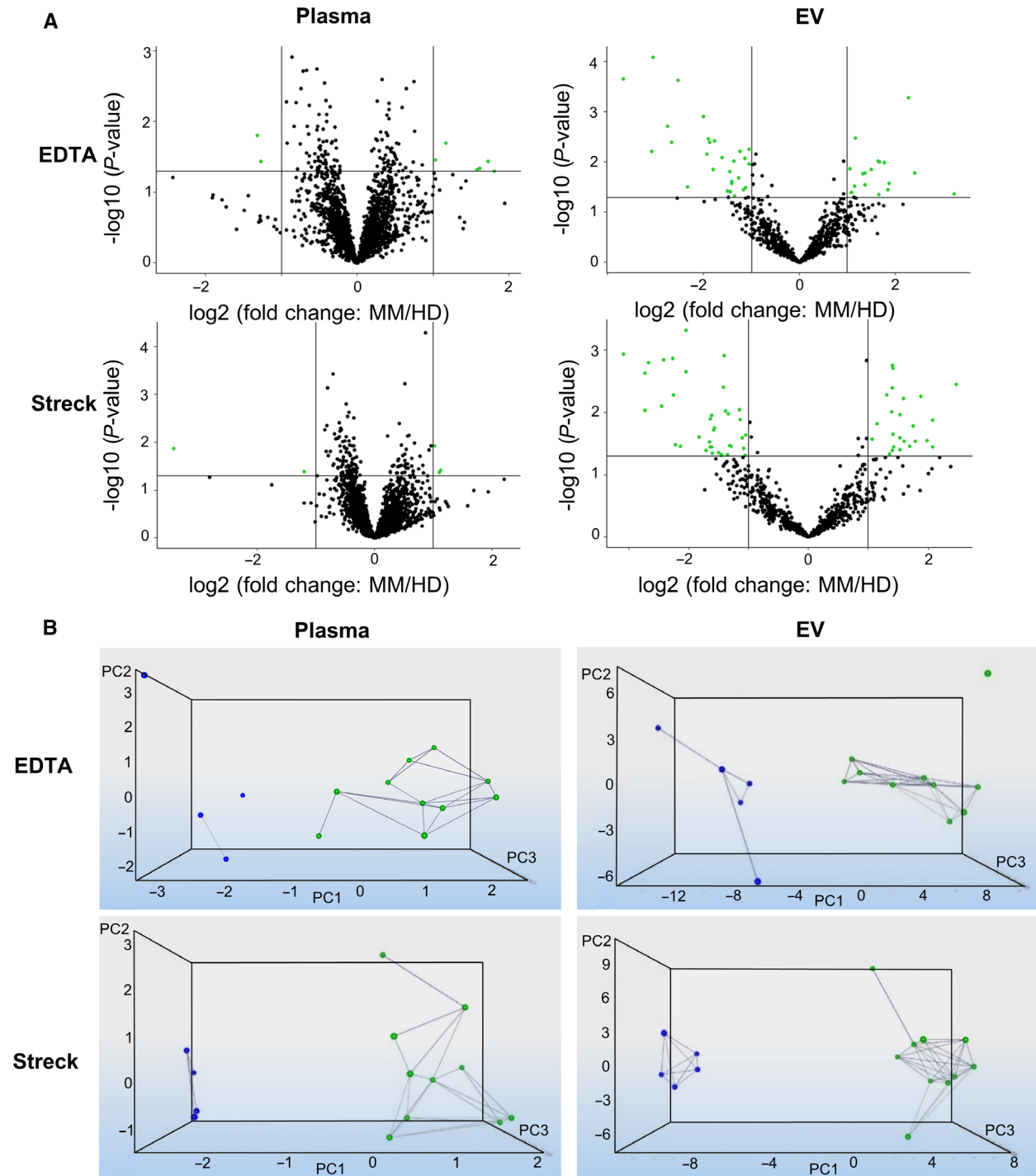


Fig. 4. Results of significantly differentially regulated miRNA in MM patients compared to HD (A) After normalization with NormFinder and application of FC (> 2) and *P*-value (< 0.05) cutoff values, volcano plots illustrate significant differentially expressed genes. Green dots represent statistically significant and differentially regulated miRNA, while miRNA shown as black dots are below these defined thresholds of *P*-value and FC. In EDTA plasma and EV samples, eight and 46 miRNA were identified with significantly different expression levels, while in Streck plasma and EV samples five and 62 significant miRNA are shown, respectively. (B) Dynamic PCA results after applying thresholds of FC (> 2) and *P*-value (< 0.05). Blue dots represent HDs; MM samples are shown with a green dot. Since both groups are spatially isolated, a good separation of HDs and MM patients is achieved in both EDTA and Streck samples.

Table 3. FC values of relative expression of differentially regulated miRNA in HD in comparison with melanoma patients (MM) in either Streck or EDTA EV samples.

	miR-200c-3p	miR-215-5p	miR-375
HD Streck/MM Streck	1.97	0.76	1.05
HD EDTA/MM EDTA	2.48	0.95	2.23

restricted panel relevant information can be obtained in most patients. In one patient, a discrepant finding was observed, and thus, in cases with mutations of low VAF a technical replicate run is perhaps advisable.

The analysis of CTCs based on a microfluidic device revealed positive tumor cells in only 15% of patients, and CTCs could only be detected in blood collected in EDTA tubes. The detection of melanoma CTCs has been shown in general to be challenging, mainly due to their large molecular heterogeneity in marker expression. The CTC detection frequency in this study was, however, lower than in most previously published papers on MM patients (Aya-Bonilla *et al.*, 2017; Koyanagi *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2014; Mocellin *et al.*, 2004). We have recently shown that by using a combined a marker-dependent (CSPG4 and CD146MACS microbeads) and marker-independent (Parsortix, Angle plc) detection method, 32% of patients were CTC-positive with an increase in CTC-positivity with increased tumor staging (Gorges *et al.*, 2019). However, due to the long processing time of this approach, in this study we decided to test a faster approach enabling the establishment of a clinically relevant multi-analyte liquid biopsy assay.

Despite the fact that a combination of different markers has shown to lead to a higher number of detected CTCs than the use of a single marker (Freeman *et al.*, 2012; Po *et al.*, 2019), the combination of four markers (MCAM, NG2, MART-1, and HMB45) did not lead to an increase in CTC detection compared to only MCAM and NG2 in our study. Interestingly, there is also evidence that the markers on CTCs do not always correlate with the markers expressed on the primary tumor, which leads to the conclusion that CTCs could derive from a rare subpopulation of tumor cells (Aya-Bonilla *et al.*, 2019; Gorges *et al.*, 2019; Gray *et al.*, 2015), making the choice of right detection marker even harder. Therefore, due to the obviously large heterogeneity of melanoma CTCs and their marker expression, it is important to establish unbiased and marker-independent detection methods and to focus on physical qualities such as cell size, morphology, and/or rigidity (Marsavela *et al.*, 2018).

Therefore, methods such as the ClearCell device could be the right choice of enrichment but would need to be combined with an optimized staining protocol or other detection methods such as mRNA or mutation/CNA detection.

Extracellular vesicles have attracted increasing attention as liquid biopsy markers that also influence tumor biology (Anfossi *et al.*, 2018; Cheng *et al.*, 2014; Hoshino *et al.*, 2015). Here, we tested an NGS-based miRNA detection and quantification workflow for both total plasma miRNA and EV-associated miRNA. This is, to the best of our knowledge, the first unbiased pre-analytical liquid biopsy study investigating the melanoma miRNome of whole plasma and EVs by NGS. EV concentrations and size distributions as well as morphology, size, and sample purity did not differ significantly between EDTA and Streck tubes. The NGS results using Streck tubes showed fewer UMI counts compared to EDTA tubes especially in EVs. In EDTA samples, on average 4.0 (HD) and 6.5 (MM) times more UMIs were detected compared to Streck samples, indicating that the sensitivity of miRNA detection is diminished in Streck tubes compared to EDTA tubes.

Surprisingly, more significantly differentially expressed miRNA were detected in the EV fraction compared to the total plasma. Furthermore, differential miRNA expression analysis revealed no overlap between EDTA and Streck tubes in the total plasma samples, whereas an overlap of six miRNA in EV samples between the tubes was found. Therefore, in plasma the total miRNome stability seems to be more heavily influenced by the blood collection tube than in the EVs-associated miRNome. Differential expression of hsa-miR-200c-3p and hsa-miR-375 could be confirmed in an orthogonal validation approach by qPCR in EV samples. Downregulation of hsa-miR-215-5p in patients, however, could not be verified. These EV results are validated by the fact that we detected miRNA changes relevant in MM development and progression such as deregulation of miR-141-3p and the miR-200 family (Feng *et al.*, 2014; van Kempen *et al.*, 2012; Verrando *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2012).

Since differences in library size or sequencing depth can influence the differential expression analysis, appropriate normalization of the data is indispensable (Dillies *et al.*, 2013). In order to avoid bias from normalization methods, we analyzed the samples using two different normalization algorithms: geNorm and NormFinder. Although significant results were obtained with both algorithms, only a small number of differentially regulated miRNA were overlapping, indicating that miRNA analyses are dependent on both

normalization method and choice of blood collection tubes. Overall, it is important to note that instead of identifying novel melanoma markers here, the main aim of this study was to identify a workflow for multi-parameter liquid biopsy assessment. In order to find new markers, a much larger study cohort would be needed, as well as the confirmation through an independent data set.

5. Conclusion

The present study indicates that the described NGS workflow is well suited for miRNA identification and that both EDTA and Streck tubes are suitable for this analysis. Although in both total and EV plasma fractions fewer NGS reads of miRNA could be obtained in Streck tubes, significant results could nevertheless be obtained. Therefore, miRNA results obtained largely depend on the blood collection tubes and normalization method. Interestingly, circulating miRNA found in the total plasma or EVs are different, which can be explained by the fact that total plasma contains circulating EV-free miRNA bound to proteins in addition to EVs, indicating a clinical benefit of assays of both compartments.

If samples can be processed rapidly after blood draw, EDTA tubes show a superior efficiency of CTC detection and are well suited for evaluation of all three analytes. ctDNA quantity and quality as well as VAF analysis, however, remain largely unaffected by the choice of tube if processed immediately. Nonetheless, in a clinical setting quick processing is not always possible; therefore, Streck tubes represent a good alternative as these tubes have been shown to conserve ctDNA, CTCs, and miRNA over longer time periods compared to EDTA tubes (Alidousty *et al.*, 2017; Diaz *et al.*, 2016; Qin *et al.*, 2014; Ward Gahlawat *et al.*, 2019). Taken together, ctDNA, CTC, and miRNA can be analyzed from a single blood collection tube, but the choice of the tube affects the outcome of the analysis, underlining the importance of pre-analytical factors.

Acknowledgements

EV isolation, NTA, EM, and EV-RNA isolation were performed by the EV Core, University of Helsinki. We thank Jolanthe Kropidowski for excellent technical assistance. The authors are supported by CANCER-ID, an Innovative Medicines Initiative Joint Undertaking (grant agreement no. 115749), resources of which are composed of financial contribution from the European Union's Seventh Framework Programme and EFPIA companies' in kind contribution.

Conflict of interest

Mikael Kubista is an employee of TATAA Biocenter AB. Alexander Sartori and Darryl Irwin are employees of Agena Bioscience GmbH. Elina Serkkola and Taija af Hällström are employees of Orion Pharma. Markus Sprenger-Haussels, Melanie Hussong, and Jonathan Shaffer are employees of QIAGEN Inc/GmbH.

Author contributions

SS, ES, TaH, MS-H, EL, KP, and HW performed the study concept and design of the study (complete Cancer-ID team). SS, LL, MK, MH, AS, JS, DI, and HW analyzed the data. JS, L-BS, JS, CG, SWS involved in the patient sample collection. SS, LL, KB, RG, BV, MH, and JH performed experiments. SS, LL, EL, MS-H, JS, and HW involved in the data interpretation. SS, LL, KP, and HW drafted the manuscript. All authors approved final manuscript.

References

- Alidousty C, Brandes D, Heydt C, Wagener S, Wittersheim M, Schafer SC, Holz B, Merkelbach-Bruse S, Buttner R, Fassunke J *et al.* (2017) Comparison of blood collection tubes from three different manufacturers for the collection of cell-free DNA for liquid biopsy mutation testing. *J Mol Diagn* **19**, 801–804.
- Alix-Panabieres C and Pantel K (2016) Clinical applications of circulating tumor cells and circulating tumor DNA as liquid biopsy. *Cancer Discov* **6**, 479–491.
- Andersen CL, Jensen JL and Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**, 5245–5250.
- Anfossi S, Babayan A, Pantel K and Calin GA (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs—an update. *Nat Rev Clin Oncol* **15**, 541–563.
- Aya-Bonilla C, Gray ES, Manikandan J, Freeman JB, Zaenker P, Reid AL, Khattak MA, Frank MH, Millward M and Ziman M (2019) Immunomagnetic-enriched subpopulations of melanoma circulating tumour cells (CTCs) exhibit distinct transcriptome profiles. *Cancers* **11**, 157.
- Aya-Bonilla CA, Marsavela G, Freeman JB, Lomma C, Frank MH, Khattak MA, Meniawy TM, Millward M, Warkiani ME, Gray ES *et al.* (2017) Isolation and detection of circulating tumour cells from metastatic melanoma patients using a slanted spiral microfluidic device. *Oncotarget* **8**, 67355–67368.

- Bardelli A and Pantel K (2017) Liquid biopsies, what we do not know (Yet). *Cancer Cell* **31**, 172–179.
- Bartak BK, Kalmar A, Galamb O, Wichmann B, Nagy ZB, Tulassay Z, Dank M, Igaz P and Molnar B (2018) Blood collection and cell-free DNA isolation methods influence the sensitivity of liquid biopsy analysis for colorectal cancer detection. *Pathol Oncol Res* **25**, 915–923.
- Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ and Hill AF (2014) Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles* **3**, 23743.
- Diaz IM, Nocon A, Mehnert DH, Fredebohm J, Diehl F and Holtrup F (2016) Performance of Streck cfDNA blood collection tubes for liquid biopsy testing. *PLoS ONE* **11**, e0166354.
- Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA *et al.* (2008) Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* **14**, 985–990.
- Dillies M-A, Rau A, Aubert J, Hennequet-Antier C, Jeanmougin M, Servant N, Keime C, Marot G, Castel D, Estelle J *et al.* (2013) A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis. *Brief Bioinform* **14**, 671–683.
- Elazezy M and Joosse SA (2018) Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management. *Comput Struct Biotechnol J* **16**, 370–378.
- Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schuz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW and Bray F (2013) International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer* **132**, 385–400.
- Feng X, Wang Z, Fillmore R and Xi Y (2014) MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett* **344**, 166–173.
- Freeman JB, Gray ES, Millward M, Pearce R and Ziman M (2012) Evaluation of a multi-marker immunomagnetic enrichment assay for the quantification of circulating melanoma cells. *J Transl Med* **10**, 192.
- Girrotti MR, Gremel G, Lee R, Galvani E, Rothwell D, Viros A, Mandal AK, Lim KHJ, Saturno G, Furney SJ *et al.* (2015) Application of sequencing, liquid biopsies and patient-derived xenografts for personalized medicine in melanoma. *Cancer Discov* **6**, 286–299.
- Gorges K, Wiltfang L, Gorges TM, Sartori A, Hildebrandt L, Keller L, Volkmer B, Peine S, Babayan A, Moll I *et al.* (2019) Intra-patient heterogeneity of circulating tumor cells and circulating tumor DNA in blood of melanoma patients. *Cancers* **11**, 1685.
- Gray ES, Reid AL, Bowyer S, Calapre L, Siew K, Pearce R, Cowell L, Frank MH, Millward M and Ziman M (2015) Circulating melanoma cell subpopulations: their heterogeneity and differential responses to treatment. *J Invest Dermatol* **135**, 2040–2048.
- Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T-L, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S *et al.* (2015) Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329.
- Huang SK and Hoon DS (2016) Liquid biopsy utility for the surveillance of cutaneous malignant melanoma patients. *Mol Oncol* **10**, 450–463.
- Koch C, Joosse S, Schneegans S, Wilken O, Janning M, Loreth D, Müller V, Prieske K, Banys-Paluchowski M, Horst L *et al.* (2020) Pre-analytical and analytical variables of label-independent enrichment and automated detection of circulating tumor Cells in cancer patients. *Cancers* **12**, 442.
- Koyanagi K, O'Day SJ, Boasberg P, Atkins MB, Wang HJ, Gonzalez R, Lewis K, Thompson JA, Anderson CM, Lutzky J *et al.* (2010) Serial monitoring of circulating tumor cells predicts outcome of induction biochemotherapy plus maintenance biotherapy for metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* **16**, 2402–2408.
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA *et al.* (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499**, 214–218.
- Luo X, Mitra D, Sullivan RJ, Wittner BS, Kimura AM, Pan S, Hoang MP, Brannigan BW, Lawrence DP and Flaherty KT (2014) Isolation and molecular characterization of circulating melanoma cells. *Cell Rep* **7**, 645–653.
- Madadi S, Schwarzenbach H, Lorenzen J and Soleimani M (2019) MicroRNA expression studies: challenge of selecting reliable reference controls for data normalization. *Cell Mol Life Sci* **76**, 3497–3514.
- Marsavela G, Aya-Bonilla CA, Warkiani M, Gray E and Ziman M (2018) Melanoma circulating tumor cells: benefits and challenges required for clinical application. *Cancer Lett* **424**, 1–8.
- Meng S, Tripathy D, Frenkel EP, Shete S, Naftalis EZ, Huth JF, Beitsch PD, Leitch M, Hoover S, Euhus D *et al.* (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res* **10**, 8152–8162.
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A *et al.* (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 10513–10518.
- Mocellin S, Del Fiore P, Guarnieri L, Scalerta R, Foletto M, Chiarion V, Pilati P, Nitti D, Lise M and Rossi CR

- (2004) Molecular detection of circulating tumor cells is an independent prognostic factor in patients with high-risk cutaneous melanoma. *Int J Cancer* **111**, 741–745.
- Mosko MJ, Nakorchevsky AA, Flores E, Metzler H, Ehrich M, van den Boom DJ, Sherwood JL and Nygren AO (2016) Ultrasensitive detection of multiplexed somatic mutations using MALDI-TOF mass spectrometry. *J Mol Diagn* **18**, 23–31.
- Nikolaev S, Lemmens L, Koessler T, Blouin JL and Nospikel T (2018) Circulating tumoral DNA: preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory. *Anal Biochem* **542**, 34–39.
- Po JW, Ma Y, Balakrishna B, Brungs D, Azimi F, de Souza P and Becker TM (2019) Immunomagnetic isolation of circulating melanoma cells and detection of PD-L1 status. *PLoS ONE* **14**, e0211866.
- Puhka M, Nordberg M, Valkonen S, Rannikko A, Kallioniemi O, Siljander P and Af Hällström T (2017) KeepEX, a simple dilution protocol for improving extracellular vesicle yields from urine. *Eur J Pharm Sci* **98**, 30–39.
- Qin J, Alt JR, Hunsley BA, Williams TL and Fernando MR (2014) Stabilization of circulating tumor cells in blood using a collection device with a preservative reagent. *Cancer Cell Int* **14**, 23.
- Schwarzenbach H, da Silva AM, Calin G and Pantel K (2015) Data Normalization Strategies for MicroRNA Quantification. *Clin Chem* **61**, 1333–1342.
- Tan CL, Lim TH, Lim T, Tan DS, Chua YW, Ang MK, Pang B, Lim CT, Takano A, Lim AS *et al.* (2016) Concordance of anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene rearrangements between circulating tumor cells and tumor in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* **7**, 23251–23262.
- van Kempen LC, van den Hurk K, Lazar V, Michiels S, Winnepenninckx V, Stas M, Spatz A and van den Oord JJ (2012) Loss of microRNA-200a and c, and microRNA-203 expression at the invasive front of primary cutaneous melanoma is associated with increased thickness and disease progression. *Virchows Arch* **461**, 441–448.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A and Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034.
- Verrando P, Capovilla M and Rahmani R (2016) Trans-nachlor decreases miR-141-3p levels in human melanocytes *s* promoting melanoma cell characteristics and shows a multigenerational impact on miR-8 levels in *Drosophila*. *Toxicology* **368–369**, 129–141.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD and Remaley AT (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* **13**, 423.
- Ward Gahlawat A, Lenhardt J, Witte T, Keitel D, Kaufhold A, Maass KK, Pajtler KW, Sohn C and Schott S (2019) Evaluation of storage tubes for combined analysis of circulating nucleic acids in liquid biopsies. *Int J Mol Sci* **20**, 704.
- Xu Y, Brenn T, Brown ER, Doherty V and Melton DW (2012) Differential expression of microRNAs during melanoma progression: miR-200c, miR-205 and miR-211 are downregulated in melanoma and act as tumour suppressors. *Br J Cancer* **106**, 553–561.
- Zavridou M, Mastoraki S, Strati A, Tzanikou E, Chimonidou M and Lianidou E (2018) Evaluation of preanalytical conditions and implementation of quality control steps for reliable gene expression and DNA methylation analyses in liquid biopsies. *Clin Chem* **2018**, 292318.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Fig. S1. Overview of the experimental procedure. Blood (7.5 mL) was collected from 20 melanoma patients and five healthy in EDTA, Streck and Transfix tubes and PBMC fraction was separated from plasma by centrifugation (500 g, 10 min). CTC isolation from the PBMC fraction was performed by the ClearCell device (Biolidics Limited). CTCs were identified by immunofluorescence staining. After further centrifugation of the plasma fraction (EDTA: 2500 g, 10 min; Streck: 6000 g, 10 min), ctDNA was extracted with QIAamp MinElute ccfDNA Midi Kit (QIAGEN) from Streck and EDTA plasma samples (1.5–2 mL) before analyzing 86 hot-spot mutations in 13 genes by the UltraSEEK chemistry (Agena Bioscience). After two additional centrifugation steps of the plasma fraction (2500 g, 10 min and 2500 g for 15) miRNAs were extracted with miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit and miRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN) from total plasma and from EVs, respectively. EVs were isolated by ultracentrifugation. QIAseq miRNA libraries were produced and sequenced (Illumina NextSeq 550). The reads were mapped to miRBase and identical reads were collapsed based on their UMIs sequences. The data was normalized using NormFinder and geNorm. *ctDNA concentration measured from $n = 20$; mutation analysis assessed from $n = 12$.

Fig. S2. Particle size distributions of EVs and geNorm results of significantly differentially regulated miRNAs in MM patients compared to HD. (A) Particle size distributions of HD and patients, assessed by NTA. (B) After normalization with geNorm and application of

fold-change (> 2) and P -value (< 0.05) cutoff values, volcano plots illustrate significant differentially expressed genes. Green dots represent statistically significant and differentially regulated miRNAs while miRNAs shown as black dots are below these defined thresholds of P -value and FC.

Fig. S3. Analysis of UMIs. Density distributions of raw averaged (left) and exemplary single (right) HD UMI counts in plasma and EV samples, analyzed in blood collected in either EDTA (red) or Streck (blue) tubes.

Table S1. Detailed summary of the UltraSEEK™ Melanoma Panel The panel (Agena Bioscience) covers 86 hot-spot mutations in 13 genes including nucleotide change, amino acid change and COSMIC ID.

Table S2. Detailed summary of differentially regulated miRNAs Table of miRNAs differentially regulated in plasma and EV samples, analyzed in blood collected in either EDTA or Streck tubes using normalization algorithms NormFinder or geNorm and applying fold-change (> 2) and P -value (< 0.05) cut-off values.

2. Zusammenfassende Darstellung

2.1. Einleitung

2.1.1 Liquid Biopsy

Maligne Tumorerkrankungen zeichnen sich dadurch aus, dass Tumorzellen in das umliegende Gewebe eindringen oder sich über die Blutbahn oder das Lymphsystem im Körper ausbreiten können (Kaatsch et al., 2019). Dabei zirkulieren Tumorzellen oder Bestandteile von Tumorzellen in der Blutbahn und können mit Hilfe einer Flüssigbiopsie, oder auch Liquid Biopsy genannt, direkt aus dem Blut nachgewiesen werden (Pantel and Alix-Panabieres, 2016).

Der Goldstandard zur Diagnosesicherung bei vieler Tumorerkrankungen bleibt immer noch die direkte Gewebebiopsie, allerdings sind diese oft invasiv oder teilweise nicht durchführbar, wenn Metastasen ungünstig gelegen sind. Außerdem besteht bei vielen Tumorentitäten eine hohe Heterogenität auch innerhalb eines Tumors, so kann es sein, dass wichtige Informationen, welche auch einen Beitrag zur Therapiefindung leisten könnten, unentdeckt bleiben (Bardelli and Pantel, 2017, Schwarzenbach and Pantel, 2015). Bei der Liquid Biopsy hingegen kann man mittels einer einfachen venösen Blutentnahme eine Vielzahl an wichtigen Informationen über den Tumor, sowie alle im sich im Blut befindlichen Subklone erhalten. Die Liquid Biopsy ist außerdem zu jedem Zeitpunkt im Krankheitsverlauf wiederholbar, während Gewebebiopsien oft nur einmalig durchgeführt werden und somit nur den Ist-Zustand zu einem bestimmten Zeitpunkt widerspiegeln (Mader and Pantel, 2017).

Bereits 1869 fand Thomas Ashworth, ein australischer Arzt, im Blut eines metastasierten Tumorpatienten Tumorzellen, welche identisch mit den Zellen des ursprünglichen Primärtumors waren (Miller et al., 2010). Heutzutage wissen wir, dass im Blut zirkulierende Tumorzellen, im folgenden CTCs (circulating tumor cells) genannt, dabei vom Primärtumor selbst oder von Metastasen in die Blutbahn freigesetzt werden können (Castro-Giner and Aceto, 2020). Mittels einer Liquid Biopsy kann man also sowohl Informationen über den Primärtumor, als auch über die Metastasen gewinnen (Bardelli and Pantel, 2017). In vorrausgehenden Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass CTCs sowohl eine Metastasierung initiieren können (Bacelli et al., 2013), als auch einen Hinweis für ein Rezidiv der Tumorerkrankung liefern können (Alix-Panabieres and Pantel, 2016). Insgesamt sind CTCs im Blut mit einem verkürzten krankheitsfreiem Überleben sowie einem verkürztem Gesamtüberleben assoziiert (Gray et al., 2015). Bei vielen Tumorentitäten mit epitheliale Ursprung kann das Vorhandensein von EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) zu Nutze gemacht werden, welche eine hohe Spezifität aufweisen (Polioudaki et al., 2015, Joosse et al., 2012, Pantel et al., 2008). Bei Melanomzellen hingegen handelt es sich um Zellen mesenchymalen Ursprungs, so dass

es zu keine Ausbildung von EpCAM oder Keratin kommt. (Went et al., 2004). Des Weiteren zeigen sich Melanom CTCs generell sehr heterogen bei der Expressierung von Oberflächenmarkern, was eine weitere Erschwerung bei der Isolierung darstellt (Gray et al., 2015).

Eine weitere Säule der Liquid Biopsy stellt die Analyse der zirkulierende Tumor-DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) dar. Zu beachten gilt jedoch, dass nicht nur maligne Zellen DNA in die Blutbahn freisetzen, sondern auch andere gutartige Körperzellen, beispielsweise die des hämatopoetischen Systems, zirkulierende freie DNA (circulating free DNA, cfDNA) freisetzen (Schwarzenbach et al., 2011, Todenhöfer et al., 2018). ctDNA wird durch apoptotische oder nekrotische Tumorzellen in die Blutbahn freigesetzt, die Länge der ctDNA variiert dabei von 20 bis 500 Basenpaaren, mit einer durchschnittlichen Länge von 140 Basenpaaren. Die genetischen Mutationen innerhalb der ctDNA entsprechen dabei den selben Mutationen der Tumorzelle aus der sie hervorgeht (Bardelli and Pantel, 2017). Da bei vielen Tumorentitäten das Vorhandensein bestimmter Mutationen eine Rolle zur Therapiefindung im Sinne einer „Targeted Therapy“ spielt, kann die Bestimmung der ctDNA relevante Hinweise über mögliche Ansprechraten der Tumorerkrankung gegenüber einer bestimmten Therapie liefern. Auch im Krankheitsverlauf könnte eine sich entwickelnde Therapieresistenz durch weitere Mutationen des Tumors frühzeitig durch die Analyse der ctDNA erkannt werden (Huang and Hoon, 2016). Ebenso könnte ein erhöhter Spiegel an zellfreier Tumor-DNA nach Beendigung der Therapie ein Hinweis auf residuelle Tumorzellen sein und sollte in Zukunft zum post-therapeutischem Monitoring der Erkrankung genutzt werden (Christensen et al., 2019).

Insgesamt lässt sich also sagen, dass man durch die verschiedenen Analysen von CTCs, ctDNA, aber zum Beispiel auch durch die Analyse von miRNA (microRNA), Mikrovesikeln und Blutplättchen verschiedene, wertvolle Informationen über die individuelle Tumorerkrankung gewinnen kann (Mazumder et al., 2019, Torrano et al., 2016, Ono et al., 2015, Joosse and Pantel, 2015, Fernández-Lázaro et al., 2020). Eine Kombination der drei Parameter würde also die meisten Informationen liefern. Unser Ziel in dieser Studie ist es, eine gleichwertige Analyse oben genannter Parameter aus einem einzigen Blutröhrchen zu etablieren. Generell handelt es sich bei der Liquid Biopsy noch um ein relativ neues Feld der Wissenschaft, so dass oftmals standardisierte Analyseverfahren fehlen. Wir haben es uns zur Aufgabe gemacht, den Einfluss der Wahl des Blutröhrchens auf die simultane Analyse von CTCs, ctDNA und miRNA beim Melanom genauer zu erforschen.

2.1.2 Malignes Melanom

In den letzten Jahren hat die Inzidenz an malignen Melanomen stark zugenommen und ist gerade in fortgeschrittenen Tumorstadien ein häufiger Grund für Malignom-assoziierte Todesfälle (Godar, 2011, Rigel, 2010). In Deutschland liegt bei Männern und Frauen das Melanom auf dem fünfhäufigsten Platz der soliden Tumoren. Im Jahr 2016 betrug die Anzahl der Neuerkrankten circa 23.200 Menschen. Für das Jahr 2020 werden 25.100 Neuerkrankungen prognostiziert (Kaatsch et al., 2019). Insgesamt hat sich die Inzidenz seit den 1970ern mehr als verfünffacht bei beiden Geschlechtern. Der wichtigste Risikofaktor für die Entstehung eines Melanoms ist die UV-Strahlung, dazu gehören sowohl natürliches Sonnenlicht, als auch künstliches UV-Licht, welches beispielsweise durch Solarien erzeugt wird und die mit der Exposition einhergehenden Sonnenbrände. Weitere Risikofaktoren sind die Anzahl der angeborenen und im Laufe des Lebens erworbenen Pigmentmale sowie das Vorliegen eines hellen Hauttyps. Auch Menschen mit Verwandten ersten Grades, die an einem Melanom erkrankt sind, haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko. Dies kann insbesondere auf eine familiäre genetische Mutation zurückzuführen zu sein (Kaatsch et al., 2019, Leitlinienprogramm-Onkologie, 2020).

Da auch relativ dünne Tumoren ein Metastasierungspotenzial haben, ist es wichtig in jedem Tumorstadium einen möglichen Progress der Erkrankung frühzeitig erkennen zu können. Im klinischen Alltag sind neben dem histopathologischen Ergebnis die Tumordicke nach Breslow, die Mitoserate und das Vorhandensein von Ulzerationen wichtige Prognoseparameter. Dennoch kommt es auch nach kompletter Exzision des Primärtumors im Krankheitsverlauf oftmals zur Metastasierung (Abbas et al., 2014). Für alle histologischen Subtypen gilt, dass die Dicke des Tumor mit einer verkürzten Überlebensrate einher geht (Brunssen et al., 2019).

Während es im Stadium I keine Einschränkungen der Lebenserwartung im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung gibt, beträgt die relative 10-Jahres-Überlebensrate im Stadium IV unter 20% (Friedrich and Kraywinkel, 2018), obwohl sich die Prognose der Patienten durch die Einführung von neuen therapeutischen Möglichkeiten wie Immuncheckpoint-Inhibitoren (PD-1 und CTLA-4 Antikörper) oder Signaltransduktions-Inhibitoren (BRAF und MEK-Inhibitoren) gebessert hat (Terheyden et al., 2019).

Dies verdeutlicht nochmals, dass eine Früherkennung eines möglichen Progresses bei einem Patienten von entscheidender Rolle ist und sich ein Fortschreiten der Erkrankung drastisch auf die individuelle Lebenserwartung auswirken kann. Somit sollten neue diagnostische Möglichkeiten, wie etwa die Liquid Biopsy Bestandteil zukünftiger Forschung sein (Alix-Panabieres and Pantel, 2016).

In dieser Studie war das Ziel ein Protokoll für eine simultane Analyse von CTCs, ctDNA mit Mutationsanalyse und miRNA Analyse aus einem Blutröhrchen zu etablieren. Dabei sollte gezeigt werden, ob die Wahl des Blutröhrchens einen Einfluss auf die verschiedenen obengenannten Parameter hat.

2.2. Material und Methoden

2.2.1 Proben

Zur Untersuchung wurde das Blut von 20 Patienten mit malignem Melanom im Stadium IV mit Krankheitsprogress gesammelt. Unter den Patienten fanden sich elf Frauen und neuen Männer. Pro Patient erfolgte die Analyse von jeweils 7,5ml aus vier Blutröhrchen, zwei EDTA Röhrchen (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, US), einem Streck Röhrchen Streck (cell- free circulating DNA (cfDNA) BCT, Streck, La Vista, NE, US) und einem Transfix Röhrchen (Cytomark, Buckingham, UK). EDTA Röhrchen gehören zum klinisch Standard und sind in den meisten Kliniken verfügbar. Streck Röhrchen werden häufig für ctDNA Analysen genutzt (Parackal et al., 2019) und Transfix Röhrchen konnten in vorherigen Studien zur Analyse von CTCs mit hohen Recovery Raten genutzt werden (Koch et al., 2020).

Ein EDTA Röhrchen wurde dabei zur Isolierung von CTCs analog zum Protokoll, welches von Gorges et.al kürzlich beschrieben wurde, (Gorges et al., 2019) verwendet. Die anderen drei Röhrchen wurden zur Analyse der CTCs mittels ClearCell™, ctDNA und miRNA Analyse genutzt.

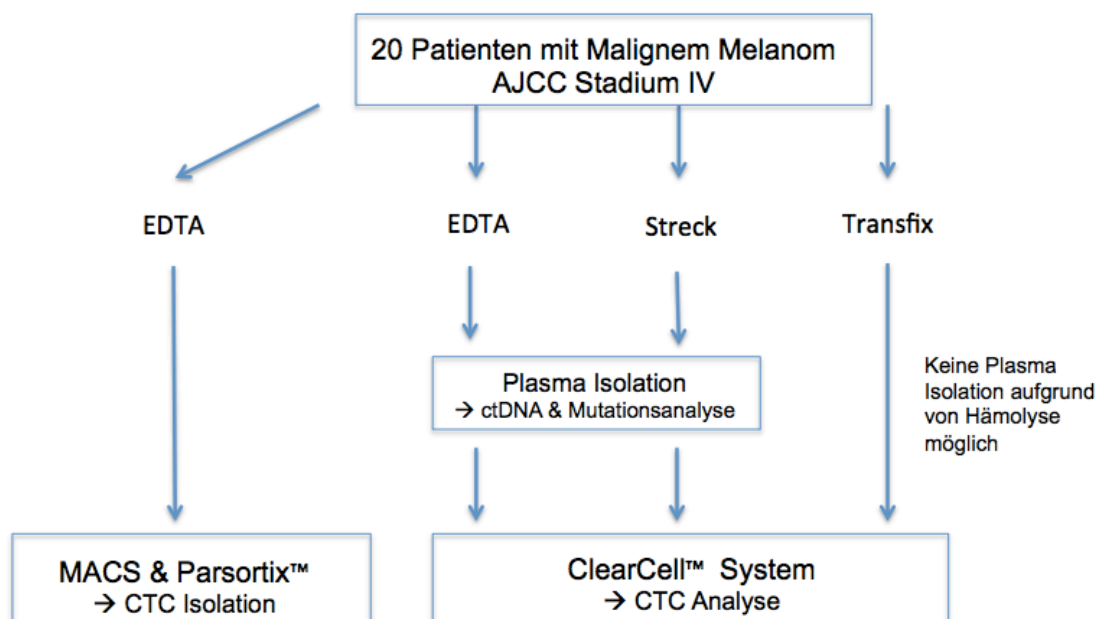


Abbildung 1: Workflow

2.2.2 Plasma Extraktion

Zur Gewinnung des Blutplasmas fand zunächst ein Zentrifugierungsschritt mit 500g für 10 min statt. Dieser Schritt fand nur bei den drei Blutröhrchen statt, die in nachfolgenden Schritten mit dem ClearCell™ System verarbeitet worden sind. Das Abzentrifugieren des Plasmas war allerdings nur bei EDTA und Streck Röhrchen möglich, da es bei Transfix Röhrchen zu einer Hämolyse innerhalb des Röhrchens kam und somit eine klare Trennung zwischen Plasma und dem Rest nicht möglich war. Danach wurde das Plasma in jeweils zwei Tubes aufgeteilt, ein Tube zur ctDNA Analyse und ein Tube zur miRNA Analyse.

Für die ctDNA Analyse wurde das Plasma aus EDTA Röhrchen wurde nochmals für 10 min bei 2500g zentrifugiert, das Plasma aus Streck Röhrchen für 10 min bei 6000g. Anschließend wurden der Überstand bis zur Analyse der ctDNA bei -80 Grad Celsius gelagert.

2.2.3 ctDNA Isolation und Mutationsanalysen

Zur Analyse der ctDNA nutzen wir das QIAamp MinElute ccfDNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) gemäß der Anleitung des Herstellers mit jeweils 2ml Plasma. Zur Bestimmung der Konzentration des Zellfreien DNA verwendeten wir das Qubit Fluorometric Quantitation System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US) Die Qualitätsanalyse erfolgte mittels TapeStation (High Sensitivity D5000 ScreenTape; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US). Statistische Untersuchungen erfolgten mit dem „Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test“.

Das von uns ausgewählte Ultra-SEEK™ Verfahren hingegen kann multiple Mutationen in einer Reaktion nachweisen. Außerdem benötigt man weniger Equipment als beim Next Generation Sequencing. Ein Nachteil jedoch ist, dass der Anwender vorher wissen sollte, auf welche Mutationen getestet werden soll.

Aus der zuvor isolierten ctDNA erfolgte die Analyse von 86 hot-spot Mutationen innerhalb von 13 Genen mit dem Ultra-SEEK™ Melanoma Panel (Agena Bioscience, Hamburg, Germany) in Kombinationen mit dem SpectroCHIP-96 Array und dem auf dem MALDI-TOF Verfahren (matrix assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometry) basierendem MassARRAY® System (Agena Bioscience).

Das Ultra-SEEK™ Verfahren basiert auf der Amplifikation der mutierten Allelen, während die Wildtyp Allelen aussortiert werden. Dies gelingt mittels Biotin-markierten spezifischen an die mutierten Allelen bindenden terminierenden Nukleotiden (Mosko et al., 2016, Belloum et al., 2020) Die Durchführung der Analyse erfolgte gemäß Anleitung des Herstellers von Jolanthe Kropidlowski.

2.2.4 CTC Analysen

Zur Isolierung von Melanom CTCs gibt es heutzutage viele unterschiedliche Herangehensweisen, die auf verschiedenen Prinzipien beruhen. Auf der einen Seite gibt es Verfahren, die auf den Oberflächenmarkern der CTCs basieren, anderen nutzen den zum Beispiel den Größenunterschied zwischen Tumorzellen und Blutzellen (Khoja et al., 2015). Bei den Verfahren, die sich die verschiedenen Oberflächenmarker der Zellen zunutze machen, ist eine wichtige Einschränkung natürlich, dass nur CTCs nachgewiesen werden können, welche die spezifischen Oberflächenmarker exprimieren (Khoja et al., 2014, Rao, 2011). Dem gegenüber stehen Verfahren bei denen CTCs aufgrund ihrer Größe von kleineren Blutzellen isoliert werden können (De Giorgi et al., 2010). Der Vorteil ist, dass dieses Verfahren unabhängig von Oberflächenmarkern ist, der Nachteil ist, dass eventuell kleinere Tumorzellen übersehen werden können.

Wir haben uns für das Clear-Bridge ClearCell™ FX1 System (Biolidics Limited, Singapore, Singapore) entschieden. Das ClearCell™ System basiert auf einer Kassette mit integriertem Mikrofluid Chip, welcher sich die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften, wie Größe, Gewicht und Dichte von größeren Melanomtumorzellen im Vergleich zu kleineren peripheren Blutzellen zu Nutze macht. Aufgrund der sogenannten Dean Flow Fractionation werden größere Tumorzelle zur inneren Wand des Systems gedrückt und kleinere Blutzellen zur äußeren und somit von einander getrennt (Lee et al., 2018). Dies wurde gemäß der Anleitung des Herstellers durchgeführt (Programm 1). Nach der Plasma Extraktion erfolgte die Weiterverarbeitung der Fraktion der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cells). Dies beinhaltet zunächst eine Lyse der roten Blutkörperchen mit einem Lysepuffer (Biolidics), einen Zentrifugationsschritt und anschließend noch eine Resuspension mit einem Puffer. Nach der Verarbeitung durch das ClearCell™ System wurde verbleibende Lösung nochmals bei 500g für 10 min zentrifugiert und der Überstand bis auf die letzten verbleibenden 200µl verworfen. Dieser wurde dann erneut resuspendiert und zur Lufttrocknung auf einen Objektträger aufgetragen.

Ein weiteres EDTA Röhrchen wurde verwendet, um eine CTC Isolation mittels einer Kombination aus MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) und dem Parsortix™ System (Angle Plc, Guilford, UK) durchzuführen. Die Proben wurden gemäß dem von Gorges et. al etablierten Protokoll verarbeitet (Gorges et al., 2019). Zunächst wurde eine Zentrifugation nach Dichtegrad bei 800g für 100min mittels Leucosep Röhrchen™ (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) und Ficoll-Paque™ (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) zur Isolation der peripheren mononukleären Zellen durchgeführt. Anschließend fanden weitere Fixierungsschritte statt, sowie die Inkubation mit magnetgebundenen Antikörpern (20 µL

anti-CD146 MicroBeads, FcR Blocking Reagenz, 20 µL Anti-Melanom (CSPG4) MicroBeads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Die Anreicherung der an die magnetischen Antikörper gebundenen Zellen erfolgte mittels einer von einem Magnetfeld umgebenen Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Dabei sollen die von magnetischen Antikörpern gebundenen Zellen in der Säule verbleiben, während die restlichen Zellen ausgewaschen werden, die Spülflüssigkeit wurde gesammelt. Abschließend wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt, die angereicherten Zellen wurden zur Immunofluoreszenzfärbung direkt auf Objektträgern gesammelt und die Spülflüssigkeit wurde zusätzlich noch durch das Parsortix System™ verarbeitet.

2.2.5 CTC Färbung

Zur Detektion der CTCs mittels fluoreszierender Antikörper wurden zwei verschiedene Färbeprotokolle verwendet. Für die ersten 10 Patientenproben verwendeten wir zwei verschiedene Melanom-spezifische Antikörper, bei den letzten 10 ergänzten wir dies um zwei weitere, also insgesamt vier spezifische Antikörper.

Zunächst wurden die Zellen mittels 3,7% Formaldehyd fixiert, blockiert (5% goat serum, 5% v/v FcR blocking Reagenz (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) und permeabilisiert (0.3% Triton™ X-100 Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA). Danach wurden Anti-CD45 Antikörper (D9M81; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) sowie goat-anti-rabbit Alexa Fluor 568 als Sekundärantikörper (Thermo Fisher Scientific) und DAPI zur Zellkernfärbung hinzugegeben. Anschließend wurden direkt markierte Antikörper hinzugeführt. Für die ersten zehn Proben waren dies MCAM (PE) (P1H12; EMD Millipore Corp, Burlington, MA, USA) und NG2 (MCSP) (PE) (LHM-2; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Für die letzten zehn Proben kamen zusätzlich noch PMEL17 (SILV) Alexa Fluor 488 (HMB45; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) and Melan-A (MART-1) Alexa Fluor 488 (M2-7C10; Novus Biologicals) hinzu. Zur Leukozyten Darstellung verwendeten wir für diese letzten 10 Proben CD45- Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff APC (Allophycocyanin) (cREA747; 1 : 50; Miltenyi Biotec).

2.3. Ergebnisse

2.3.1 ctDNA Mutationsanalyse

Eine große Herausforderung bei der Isolierung und Analyse von zirkulierender DNA ist die geringe Gesamtmenge im Blut, dabei spielt es keine Rolle, ob sie von normalen Zellen oder Tumorzellen freigesetzt wird. (Nikolaev et al., 2018). Ein weiteres wichtiges Problem besteht darin, dass durch Zelllyse in der Zeit zwischen dem Gewinn von Blutproben bis zur Weiterverarbeitung im Labor mehr und mehr DNA aus zerfallenden Zellen freigesetzt

wird und die ohnehin schon geringe Konzentration an Tumor-DNA im Blut noch weiter herabgesetzt wird. (Nikolaev et al., 2018, Molnár et al., 2019).

Zur Mutationsanalyse aus ctDNA verwendeten wir das Plasma, welche aus einem der beiden EDTA Röhren und dem Streck Röhren abzentrifugiert werden konnte. In unseren Messungen variierte die Konzentration der ctDNA zwischen 0,1 bis 15 ng/µl. Zwischen den EDTA- und Streck Röhren gab es jedoch keinen signifikanten Unterschied ($P=0,96$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Der Mittelwert in der Konzentration bei EDTA Röhren betrug $3,3 \text{ ng/}\mu\text{l} \pm 4,6$ und bei Streck Röhren $3,0 \text{ ng/}\mu\text{l} \pm 4,7$.

Bezüglich der Mutationsanalysen testeten wir 13 verschiedene Onkogene, die mit einer Krankheitsentstehung einhergehen können. Die „Variant Allele Frequency“ (VAF), also der Anteil der mutierten ctDNA Sequenzen im Verhältnis zur gesamten untersuchten cfDNA einer Probe (Strom, 2016), betrug zwischen 0,2 bis 2,6%.

Insgesamt fanden wir bei 8 von 12 Patienten (66,7%) Mutationen in der ctDNA. Bei sieben der acht Patienten konnten jeweils die selben Mutationen in der EDTA und in der Streck Probe nachgewiesen werden. Die häufigste Mutation war MAP2K1 N382H (in 5 von 12 Fällen, 42%), an zweiter Stelle MAP2K1 I111S (3 von 12 Fälle, 25%). Ebenfalls fanden wir Mutation für CDKN2A R80X, KIT V559A, BRAF K601E und NRAS Q61R bei jeweils zwei Patienten (16%).

Lediglich eine Ausnahme fand sich bei Patient MM13, dort wurde jeweils eine andere Mutation im EDTA und im Streck Röhren gefunden. Im EDTA Röhren fand sich eine Mutation im BRAF K601E Gen mit einer VAF 0.7% und im Streck Röhren zeigte sich eine Mutation MAP2K1 I111S Gen (VAF: 0.3%).

2.3.2 CTC Detektion

Unter Verwendung des ClearCell™ Systems konnten insgesamt in 3 von 20 Fällen (15%) CTCs nachgewiesen werden. Bei Patient MM01 fanden sich zwei CTCs und jeweils eine CTC bei Patient MM12 und MM19. Alle nachgewiesenen CTCs stammten aus EDTA Röhren. In Streck Röhren konnten keine CTCs gefunden werden.

Im Rahmen dieser Studie wurde von denselben Patienten zusätzlich ein weiteres EDTA-Röhren verwendet, um CTCs mittels magnetischer Antikörper (MACS) und der Parsortix™ Methode zu isolieren, analog zum Vorgehen wie es bereits durch Gorges et al. beschrieben wurde (Gorges et al., 2019). Hier konnten bei 6 von 19 Patienten (32%) zwischen einer und 30 CTCs pro 7,5ml Blut nachgewiesen werden (1 Probe koaguliert). Im Vergleich zur ClearCell™ Methode sind die Detektionsraten bei diesem kombinierten Marker-abhängigen Verfahren also in etwa doppelt so hoch. Nur bei einem Patienten konnten sowohl mittels ClearCell™ als auch mit der Kombination aus MACS und

Parsortix™ CTCs gefunden werden. Ein deutlicher Nachteil dieses Verfahren gegenüber ist der ClearCell™ ist jedoch, dass eine vorrausgehende Isolation der Plasmas für weitere Analysen nicht möglich ist. Somit beschränkt sich dieses Verfahren auf die Analyse der CTCs. Des Weiteren ist das MACS/Parsortix™ Verfahren mit einem deutlich höheren Zeitaufwand verbunden als das ClearCell™ System.

Patienten Nummer	ClearCell EDTA	ClearCell STRECK	ClearCell Transfix	MACS & Parsortix
MM01	2	0	0	30
MM02	0	0	0	0
MM03	0	0	0	0
MM04	0	0	0	2
MM05	0	0	0	0
MM06	0	0	0	0
MM07	0	0	0	0
MM08	0	0	0	3
MM09	0	0	0	0
MM10	0	0	0	1
MM11	0	0	0	0
MM12	1	0	0	-
MM13	0	0	-	0
MM14	0	0	-	0
MM15	0	0	-	0
MM16	0	0	-	2
MM17	0	0	-	0
MM18	0	0	-	0
MM19	1	0	-	0
MM20	0	0	-	1

Abbildung 2: Ergebnisse der CTC Detektion der jeweiligen Blutröhrchen. Bei der Probe MM12 kam es zu einer Koagulation innerhalb eines der EDTA Röhrchen, so dass eine Analyse mit dem MACS bzw. Parsortix System nicht möglich war. Ab der Probe MM13 entschieden wir uns die Analyse des Transfix Röhrchens nicht weiterdurchzuführen aufgrund des bisherigen schlechten Ergebnisse bei der CTC Detektion, sowie der Tatsache, dass eine Plasma Isolation und somit eine Analyse der ctDNA und Mutation hier nicht möglich war.

2.4 Diskussion

Eine Liquid Biopsy beschreibt die Analyse verschiedener im Blut zirkulierender Marker, welche von Tumoren ausgehen. Jedoch gibt es bei allen Markern Vor- und Nachteile. CTCs und ctDNA zeigen oftmals auch in bereits metastasierten Situationen einen relativ geringen Anteil im Blut wodurch ein Nachweis erschwert wird. Außerdem haben sie mit ein bis zwei Stunden eine vergleichsweise geringe Halbwertszeit im Blut (Meng et al., 2004, Alix-Panabieres and Pantel, 2016). Im Vergleich dazu kann die miRNA bis zu 24 Stunden im Blut persistieren aufgrund ihrer Bindung an Lipidpartikel, Exosome oder Proteine (Mumford et al., 2018). Jedoch ist die Normalization und Natural Variation von vielen Faktoren abhängig (Schwarzenbach and Pantel, 2015).

Von daher würde eine Analyse all dieser Marker gleichzeitig die meisten Informationen liefern. Prä-analytisch gibt es jedoch viele Faktoren, die eine Rolle spielen, wie etwa die Wahl des Blutröhrchens und die Verarbeitungszeit von der Blutentnahme bis zur Analyse im Labor. Gerade im klinischen Alltag spielt die Zeit eine wichtige Rolle, da eine sofortige Weiterverarbeitung des Blutes ohne längere Lagerungszeiten nicht immer gewährleistet ist. Die Wahl des richtigen Blutröhrchens zur Stabilisierung der wertvollen Marker ist daher von wichtiger Bedeutung (Molnár et al., 2019).

In vorausgehenden Studien konnte gezeigt werden, dass bestimmte Blutröhrchen sich für bestimmte Analysen besser eignen als andere (Nikolaev et al., 2018, Koch et al., 2020, Grözl et al., 2018). Im Umkehrschluss würde dies jedoch wieder bedeuten, dass man für jeden Marker ein separates Blutröhrchen abnehmen müsste. Das Ziel dieser Studie war rauszufinden, ob es möglich ist CTCs, ctDNA und miRNA gleichermaßen aus den selben Blutröhrchen zu analysieren.

Bei der Detektion von CTCs konnte in unserer Studie mit Hilfe des ClearCell™ Systems eine Rate von 15% (n=20) erzielt werden. Andere Studien, die ebenfalls markerunabhängige Methoden zum Nachweis zirkulierender Melanomzellen aus Patientenblut anwendeten erzielten höhere Detektionsraten. Unter Verwendung der ISET-Plattform konnte bei 62,5% der Patienten (n=8, AJCC Stadium IV) CTCs gefunden werden (De Giorgi et al., 2010). Aya-Bonilla et al. konnten mittels ihres „slanted spiral microfluidic device“ in 3 von 7 Blutproben (43%) von Patienten mit metastasiertem malignem Melanom zwischen 1 und 4 CTCs nachweisen (Aya-Bonilla et al., 2017). Auch im Vergleich zum Nachweis mittels dem markerabhängigen MACS Protocol in unserer Studie (Detektionsrate von 32%) schnitt das ClearCell™ System schlechter ab. Bisher gibt es keine vergleichbaren Studien bei denen CTCs von Melanompatienten mittels ClearCell™ System isoliert wurden. In Studien mit anderen Tumorentitäten konnten Detektionsraten von 75,9% beim Mamma-Karzinom (Yap et al., 2019), 47,8% bei

Kopf-Hals-Tumoren, sowie 51,5% beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (Kulasinghe et al., 2018) erzielt werden.

Bei der Isolierung von Melanom Tumorzellen werden in der Literatur verschiedene Schwierigkeiten beschrieben. Häufig wird argumentiert, dass Melanomzellen sehr heterogen sind, was auch die Expression von Oberflächenmarkern betrifft. Dies erschwert den Nachweis von Melanom CTCs, wenn bei in einem Analyseverfahren nur eine bestimmte Auswahl an Markern genutzt werden können (Aya-Bonilla et al., 2017). Eine Limitation bei in unserer Studie ist die Tatsache, dass die Anreicherung der CTCs zwar Marker unabhängig erfolgt, jedoch die anschließende Immunofluoreszenzfärbung jedoch wieder auf der Expression von Oberflächenmarkern der Melanomzelle abhängt. Um dieses Risiko zu minimieren, haben wir für die letzten zehn Patientenproben zwei weitere Melanommarker hinzugezogen, dies erbrachte jedoch keinen Vorteil. Ein weiterer Nachteil des ClearCell™ Verfahrens ist auch die Tatsache, dass es unklar bleibt, ob eventuell kleinere Tumorzellen in der Probe vorgelegen hätten, die sich jedoch physikalisch wie kleine Blutzellen verhalten haben und somit durch das System aussortiert wurden. Außerdem wurde in anderen Studien bereits beschrieben, dass die Anzahl an Melanom CTCs im Blut relativ gering sein können und sich pro Blutröhrchen oft nur im einstelligen Bereich befinden (Aya-Bonilla et al., 2017, Gray et al., 2015, Khoja et al., 2014, Klinac et al., 2014). In Zukunft könnte eventuell noch einmal eine Studie mit einer größeren Kohorte durchgeführt werden bei der anschließend an das Enrichment zum Beispiel durch das ClearCell™ System ein optimiertes Immunofluoreszenz Färbeprotokoll oder eine ganz anderen Detektionsmethode angeschlossen wird.

Des Weiteren besteht im Vergleich des ClearCell™ System zum MACS Protokoll trotz geringerer Nachweisrate ein wesentlicher Vorteil darin, dass beim ClearCell™ System die Zellen lebensfähig bleiben und so für weitere Zellkultur- oder Mausmodelle genutzt werden könnten (Lee et al., 2018). In Zukunft könnten somit aus dem Patientenblut lebende Tumorzellen gewonnen werden, die für weiterführende Analysen genutzt werden können. Abschließend lässt sich noch sagen, dass in unserer Studie alle CTCs, die mit Hilfe des ClearCell™ Systems gefunden wurde, aus EDTA Röhrchen stammten. Somit waren diese Röhrchen zumindest in dieser Analyse den Streck Röhrchen überlegen.

Bezüglich der ctDNA Ergebnisse war die Konzentration der Gesamtmenge an ctDNA in den jeweiligen Proben der einzelnen Patienten etwa vergleichbar hoch und auch die Variant Allele Frequency der jeweiligen Mutationen war im Plasma aus beiden Röhrchen ungefähr gleich. Während EDTA Röhrchen zum Standard in den meisten Kliniken gehören und meistens verfügbar sind, wurden Streck Röhrchen speziell dafür konzipiert die zellfreie DNA zu stabilisieren und könnte somit einen wichtigen Vorteil in der bei der

Analyse der ctDNA liefern. (Alidousty et al., 2017). In dieser Studie gab es also keinen signifikanten Unterschied zwischen herkömmlichen EDTA- und spezialisierten Streck Röhrrchen im Hinblick auf die ctDNA Konzentration. Jedoch wurde das Plasma innerhalb von vier Stunden isoliert, so dass die stabilisierende Funktion des Streck Röhrrchens nicht ausreichend getestet werden konnte.

Zur Mutationsanalyse der ctDNA testeten wir ein neuartiges Melanom Panel des Ultra-SEEK™ Verfahrens mit dem 86-hotspot Mutationen in 13 für das Melanom relevanten Genen nachgewiesen werden konnten. Hiermit konnten bei 66,7% der getesteten Proben (n=12) Mutationen nachgewiesen werden. Bei 11 von 12 Proben (91,7%) konnten pro Patient jeweils die selben Mutationen im EDTA und im Streck Röhrrchen gefunden werden.

Somit eigneten sich EDTA und Streck Röhrrchen gleichermaßen für die Analyse der ctDNA im Rahmen dieser Studie.

In Zusammenschau der Ergebnisse waren die EDTA Röhrrchen den Streck Röhrrchen den Transfix Röhrrchen deutlich überlegen, da sich in den Transfix Röhrrchen weder CTCs finden ließen, noch war eine Isolierung des Plasmas für weitere Analysen möglich. Im direkten Vergleich zwischen EDTA und Streck-Röhrrchen waren die Ergebnisse im Hinblick auf ctDNA und Mutationsanalyse gleich, bei den CTCs schnitten die EDTA Röhrrchen etwas besser ab. Für den klinischen Alltag mit kurzen Transport wegen wären daher EDTA Röhrrchen zu empfehlen, da sich in den meisten Kliniken vorhanden sind und gute Ergebnisse lieferten. Bei weiteren Transportwegen wo eine Stabilisierung der verschiedenen Parameter erforderlich ist, sollten Streck Röhrrchen verwendet werden. Heutzutage werden zum Monitoring des Krankheitsprogresses bei Melanompatienten Laborparameter wie S100 und Laktatdehydrogenase (LDH) genutzt. Dabei sind erhöhte Werte mit einem mit einem geringeren Gesamtüberleben assoziiert. (Balch et al., 2009, Buerl et al., 1997) . Jedoch ist auch wichtig dabei zu erwähnen, dass diese Marker nicht Melanom-spezifisch sind und auch im Rahmen von anderen Erkrankungen erhöht sein können (Wroblewski and Gregory, 1961, Bresnick et al., 2015, Gorges et al., 2019).

Gerade im Rahmen der antikörperbasierten Therapie kann ein Monitoring des Mutationsstatus von entscheidender Rolle sein, um das Ansprechen einer Therapie zu überprüfen und eine Resistenz frühzeitig zu erkennen. (Chang-Hao Tsao et al., 2015). Als Ausblick für die Zukunft könnte irgendwann auch im klinischen Alltag statt unspezifischen Laborparameter oder invasiver Gewebebiopsien eine Liquidbiopsie zur Verlaufskontrolle beim Melanom genutzt werden. Somit wäre es möglich regelmäßig präzise Informationen über den Ist-Zustand einer Erkrankung zu erlangen und dadurch Therapieentscheidungen zu treffen, um im Idealfall das Überleben des Patienten zu verlängern.

3. Zusammenfassung

In dieser Arbeit untersuchten wir den Einfluss des Blutröhrchens auf die Analyse von CTCs (circulating tumor cells) und ctDNA (circulating Tumor DNA). Dabei sollte ebenfalls festgestellt werden, ob es möglich ist beide Parameter gleichermaßen aus einem Röhrchen zu analysieren. Hierzu verwendeten wir Blutproben von 20 Patienten mit metastasiertem Melanom (AJCC Stadium IV) und drei verschiedene Blutröhrchen. Gleichzeitig verglichen wir die Isolation der CTCs durch das ClearCell System mit der Isolation durch einen kombinierten Ansatz aus MACS/Parsortix System.

Die Blutröhrchen die wir verwendeten waren EDTA-, Streck- und Transfix Röhrchen. Hierbei stellten wir fest, dass eine simultane, gleichwertige Analyse von CTCs und ctDNA nur bei EDTA und Streck Röhrchen möglich war. Bei Transfix Röhrchen war dies nicht möglich aufgrund einer starken Hämolyse, welche die Plasma Analyse verhinderte, konnte hier lediglich eine Analyse der CTCs durchgeführt werden.

Im Hinblick auf die CTC Analyse mittels ClearCell System schnitten die EDTA Röhrchen besser als die anderen beiden ab. Bei der ctDNA Analyse gab es zwischen EDTA und Streck Röhrchen keinen signifikanten Unterschied.

Im Vergleich des ClearCell Systems mit der Kombinationsmethode war das ClearCell System unterlegen.

Zusammenfassend war es uns möglich eine Multiparamenter Liquid Biopsy aus einem einzigen Blutröhrchen durchzuführen. Die klinische Relevanz sollte in Zukunft durch größere klinische Studien ermittelt werden.

In this study we analyzed the impact of the blood collection tube on the analysis of CTCs (circulating tumor cells) and ctDNA (circulating tumor DNA). Our aim was to find out whether it was possible to analyze both parameters equally from the same tube.

Therefore, we collected blood from 20 patients with stage IV (AJCC) malignant melanoma in three different blood collection tubes. The blood tube we used were EDTA-, Streck- and Transfix tubes.

In parallel, we compared the isolation of CTCs with Clearcell System to the isolation with a combined approach of MACS/Parsortix system.

We found out that a simultaneous, equal analysis of CTCs and ctDNA is possible with EDTA and Streck tubes. As far as Transfix tubes are concerned, due to a strong hemolysis hampering the plasma based assays, it was only possible to isolate the CTCs. Regarding the analysis of ctDNA there was no significant difference between EDTA and Streck tubes.

For CTC analysis using the ClearCell System the EDTA tubes seemed to work best. Still, the comparison of the ClearCell System and the combined method showed that the ClearCell System was inferior to the combination of MACS/Parsortix. In summary we showed it was possible to establish an assay for liquid biopsy where multiple parameter could be analyzed equally from one single blood collection tube. The clinical relevance should be proven in larger clinical studies in the future.

4. Abkürzungsverzeichnis

AJCC – American Joint Committee on Cancer

APC – Allophycocyanin

CD – cluster of differentiation

cfDNA – circulating free DNA, zirkulierende freie Desoxyribonukleinsäure

CTCs – circulating tumor cells, zirkulierende Tumorzellen

ctDNA – circulating tumor DNA, zirkulierende Tumor Desoxyribonukleinsäure

CSPG4 – Chondroitin sulfate proteoglycan 4

CTLA4 – cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4

DAPI – 4',6-Diamidin-2-phenylindol

EDTA – Ethylendiamintetraazetat

EPCAM – epithelial cell adhesion molecule

fcR – FC-Rezeptor

HMB-45 – Human Melanoma Black 45

LDH – Laktatdehydrogenase

MALDI-TOF – Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation, time of flight

MART1 – melanoma antigen recognized by T cells 1

MCAM – melanoma cell adhesion molecule

MCSP – melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan

MM – Malignes Melanom

ng – Nanogramm

NG2 – neuron-glia antigen 2

ml – Milliliter

PBMC – peripheral blood mononuclear cell, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes

PD1 – programmed cell death protein 1

PE – Phycoerythrin

PMEL17– premelanosome protein 17

SILV – silver locus protein homolog

VAF – variant allele frequency

v/v – volume per volume

µl – Mikroliter

5. Literaturverzeichnis

- ABBAS, O., MILLER, D. D. & BHAWAN, J. 2014. Cutaneous Malignant Melanoma: Update on Diagnostic and Prognostic Biomarkers, *The American Journal of Dermatopathology*, 36, 363-379.
- ALIDOUSTY, C., BRANDES, D., HEYDT, C., WAGENER, S., WITTERSHEIM, M., SCHÄFER, S. C., HOLZ, B., MERKELBACH-BRUSE, S., BÜTTNER, R., FASSUNKE, J. & SCHULTHEIS, A. M. 2017. Comparison of Blood Collection Tubes from Three Different Manufacturers for the Collection of Cell-Free DNA for Liquid Biopsy Mutation Testing. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 19, 801-804.
- ALIX-PANABIÈRES, C. & PANTEL, K. 2016. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov*, 6, 479-91.
- AYA-BONILLA, C., MARSAVELA, G., FREEMAN, J. B., LOMMA, C., FRANK, M. H., KHATTAK, M. A., MENIAWY, T. M., MILLWARD, M., WARKIANI, M. E., GRAY, E. S. & ZIMAN, M. 2017. Isolation and detection of circulating tumour cells from metastatic melanoma patients using a slanted spiral microfluidic device. *Oncotarget*, 8, 67355-67368.
- BACCELLI, I., SCHNEEWEISS, A., RIETHDORF, S., STENZINGER, A., SCHILLERT, A., VOGEL, V., KLEIN, C., SAINI, M., BAUERLE, T., WALLWIENER, M., HOLLAND-LETZ, T., HOFNER, T., SPRICK, M., SCHARPFF, M., MARME, F., SINN, H. P., PANTEL, K., WEICHERT, W. & TRUMPP, A. 2013. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay. *Nat Biotechnol*, 31, 539-44.
- BALCH, C. M., GERSHENWALD, J. E., SOONG, S.-J., THOMPSON, J. F., ATKINS, M. B., BYRD, D. R., BUZAID, A. C., COCHRAN, A. J., COIT, D. G., DING, S., EGGERMONT, A. M., FLAHERTY, K. T., GIMOTTY, P. A., KIRKWOOD, J. M., MCMASTERS, K. M., MIHM, M. C., MORTON, D. L., ROSS, M. I., SOBER, A. J. & SONDAK, V. K. 2009. Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification. *Journal of Clinical Oncology*, 27, 6199-6206.
- BARDELLI, A. & PANTEL, K. 2017. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell*, 31, 172-179.
- BELLOUM, Y., JANNING, M., MOHME, M., SIMON, R., KROPIDLOWSKI, J., SARTORI, A., IRWIN, D., WESTPHAL, M., LAMSZUS, K., LOGES, S., RIETHDORF, S., PANTEL, K. & WIKMAN, H. 2020. Discovery of Targetable Genetic Alterations in NSCLC Patients with Different Metastatic Patterns Using a MassARRAY-Based Circulating Tumor DNA Assay. *Cells*, 9, 2337.
- BRESNICK, A. R., WEBER, D. J. & ZIMMER, D. B. 2015. S100 proteins in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 15, 96-109.
- BRUNSEN, A., JANSEN, L., EISEMANN, N., WALDMANN, A., WEBERPALS, J., KRAYWINKEL, K., EBERLE, A., HOLLECZEK, B., ZEISSIG, S. R., BRENNER, H., KATALINIC, A. & GROUP, G. C. S. W. 2019. A population-based registry study on relative survival from melanoma in Germany stratified by tumor thickness for each histologic subtype. *J Am Acad Dermatol*, 80, 938-946.
- BUERL, J., PROBST, M., FRANZKE, A., DUENSING, S., HAINDL, J., VOLKENANDT, M., WITKE, F., HOFFMANN, R., GANSER, A. & ATZPODIEN, J. 1997. Elevated serum levels of S100 and survival in metastatic malignant melanoma. *British Journal of Cancer*, 75, 1373-1376.
- CASTRO-GINER, F. & ACETO, N. 2020. Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis. *Genome Med*, 12, 31.
- CHANG-HAO TSAO, S., WEISS, J., HUDSON, C., CHRISTOPHI, C., CEBON, J., BEHREN, A. & DOBROVIC, A. 2015. Monitoring response to therapy in melanoma by quantifying circulating tumour DNA with droplet digital PCR for BRAF and NRAS mutations. *Scientific Reports*, 5.

- CHRISTENSEN, E., BIRKENKAMP-DEMTRO, K., SETHI, H., SHCHEGROVA, S., SALARI, R., NORDENTOFT, I., WU H-T., KNUDSEN, M., LAMY, P., VIBORG LINDSKROG, S., TABER, A., BALCIOGLU, M., VANG, S., ASSAF, Z., SHARMA, S., TIN, A. S., SRINIVASAN, R., HAFEZ, D., REINERT, T., NAVARRO, S., OLSON, A., RAM, R., DASHNER, S., RABINOWITZ, M., BILLINGS, P., SIGURJONSSON, S., LINDBJERG ANDERSEN, C., SWENERTON, R., ALESHIN, A., ZIMMERMANN, B., AGERBÆK, M., LIN, C.-H. J., BJERGGAARD JENSEN, J. & DYRSKJØT, L. 2019. Early Detection of Metastatic Relapse and Monitoring of Therapeutic Efficacy by Ultra-Deep Sequencing of Plasma Cell-Free DNA in Patients With Urothelial Bladder Carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 37, 1547-1558.
- DE GIORGI, V., PINZANI, P., SALVIANTI, F., PANELOS, J., PAGLIERANI, M., JANOWSKA, A., GRAZZINI, M., WECHSLER, J., ORLANDO, C., SANTUCCI, M., LOTTI, T., PAZZAGLI, M. & MASSI, D. 2010. Application of a Filtration- and Isolation-by-Size Technique for the Detection of Circulating Tumor Cells in Cutaneous Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 130, 2440-2447.
- FERNÁNDEZ-LÁZARO, D., GARCÍA HERNÁNDEZ, J. L., GARCÍA, A. C., CÓRDOVA MARTÍNEZ, A., MIELGO-AYUSO, J. & CRUZ-HERNÁNDEZ, J. J. 2020. Liquid Biopsy as Novel Tool in Precision Medicine: Origins, Properties, Identification and Clinical Perspective of Cancer's Biomarkers. *Diagnostics*, 10, 215.
- FRIEDRICH, S. & KRAYWINKEL, K. 2018. Faktenblatt: Epidemiologie des malignen Melanoms in Deutschland. *Der Onkologe*, 24, 447-452.
- GODAR, D. E. 2011. Worldwide Increasing Incidences of Cutaneous Malignant Melanoma. *Journal of Skin Cancer*, 2011, 1-6.
- GORGES, K., WILTFANG, L., GORGES, T. M., SARTORI, A., HILDEBRANDT, L., KELLER, L., VOLKMER, B., PEINE, S., BABAYAN, A., MOLL, I., SCHNEIDER, S. W., TWAROCK, S., MOHR, P., FISCHER, J. W. & PANTEL, K. 2019. Intra-Patient Heterogeneity of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA in Blood of Melanoma Patients. *Cancers (Basel)*, 11.
- GRAY, E. S., REID, A. L., BOWYER, S., CALAPRE, L., SIEW, K., PEARCE, R., COWELL, L., FRANK, M. H., MILLWARD, M. & ZIMAN, M. 2015. Circulating Melanoma Cell Subpopulations: Their Heterogeneity and Differential Responses to Treatment. *J Invest Dermatol*, 135, 2040-2048.
- GRÖLZ, D., HAUCH, S., SCHLUMPBERGER, M., GUENTHER, K., VOSS, T., SPRENGER-HAUSSSELS, M. & OELMÜLLER, U. 2018. Liquid Biopsy Preservation Solutions for Standardized Pre-Analytical Workflows—Venous Whole Blood and Plasma. *Current Pathobiology Reports*, 6, 275-286.
- HUANG, S. K. & HOON, D. S. 2016. Liquid biopsy utility for the surveillance of cutaneous malignant melanoma patients. *Mol Oncol*, 10, 450-63.
- JOOSSE, S. A., HANNEMANN, J., SPOTTER, J., BAUCHE, A., ANDREAS, A., MULLER, V. & PANTEL, K. 2012. Changes in Keratin Expression during Metastatic Progression of Breast Cancer: Impact on the Detection of Circulating Tumor Cells. *Clinical Cancer Research*, 18, 993-1003.
- JOOSSE, SIMON A. & PANTEL, K. 2015. Tumor-Educated Platelets as Liquid Biopsy in Cancer Patients. *Cancer Cell*, 28, 552-554.
- KAATSCH, P., SPIX, C., KATALINIC, A., LUTTERMANN, S., WALDEYER-SAUERLAND, M. & WALDMANN, A. 2019. Krebs in Deutschland für 2015/2016. *Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg)*, 12. Ausgabe.
- KHOJA, L., LORIGAN, P., DIVE, C., KEILHOLZ, U. & FUSI, A. 2015. Circulating tumour cells as tumour biomarkers in melanoma: detection methods and clinical relevance. *Annals of Oncology*, 26, 33-39.
- KHOJA, L., SHENJERE, P., HODGSON, C., HODGETTS, J., CLACK, G., HUGHES, A., LORIGAN, P. & DIVE, C. 2014. Prevalence and heterogeneity of circulating tumour cells in metastatic cutaneous melanoma. *Melanoma Research*, 24, 40-46.

- KLINAC, D., GRAY, E. S., FREEMAN, J. B., REID, A., BOWYER, S., MILLWARD, M. & ZIMAN, M. 2014. Monitoring changes in circulating tumour cells as a prognostic indicator of overall survival and treatment response in patients with metastatic melanoma. *BMC Cancer*, 14.
- KOCH, C., JOOSSE, S. A., SCHNEEGANS, S., WILKEN, O. J. W., JANNING, M., LORETH, D., MULLER, V., PRIESKE, K., BANYS-PALUCHOWSKI, M., HORST, L. J., LOGES, S., PEINE, S., WIKMAN, H., GORGES, T. M. & PANTEL, K. 2020. Pre-Analytical and Analytical Variables of Label-Independent Enrichment and Automated Detection of Circulating Tumor Cells in Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, 12.
- KULASINGHE, A., KAPELERIS, J., KIMBERLEY, R., MATTAROLLO, S., THOMPSON, E. W., THIERY, J.-P., KENNY, L., O'BYRNE, K. & PUNYADEERA, C. 2018. The prognostic significance of circulating tumor cells in head and neck and non - small - cell lung cancer. *Cancer Medicine*, 7, 5910–5919.
- LEE, Y., GUAN, G. & BHAGAT, A. A. 2018. ClearCell(R) FX, a label-free microfluidics technology for enrichment of viable circulating tumor cells. *Cytometry A*, 93, 1251-1254.
- LEITLINIENPROGRAMM-ONKOLOGIE 2020. Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 3.3, 2020,AWMF Registernummer: 032/024OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/melanom/> (abgerufen am: 20.08.2020).
- MADER, S. & PANTEL, K. 2017. Liquid Biopsy: Current Status and Future Perspectives. *Oncol Res Treat*, 40, 404-408.
- MAZUMDER, S., DATTA, S., RAY, J. G., CHAUDHURI, K. & CHATTERJEE, R. 2019. Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer. *Cancer Epidemiology*, 58, 137-145.
- MENG, S., TRIPATHY, D., FRENKEL, E., SHETE, S., NAFTALIS, E., HUTH, J., BEITSCH, P., LEITCH, M., HOOVER, S., EUHUS, D., HALEY, B., MORRISON, L., FLEMING, T., HERLYN, D., TERSTAPPEN, L., FEHM, T., TUCKER, T., LANE, N., WANG, J. & UHR, J. 2004. Circulating Tumor Cells in Patients with Breast Cancer Dormancy. *Clinical Cancer Research*, 10, 8152–8162.
- MILLER, M. C., DOYLE, G. V. & TERSTAPPEN, L. W. 2010. Significance of Circulating Tumor Cells Detected by the CellSearch System in Patients with Metastatic Breast Colorectal and Prostate Cancer. *J Oncol*, 2010, 617421.
- MOLNÁR, B., GALAMB, O., KALMÁR, A., BARTÁK, B. K., NAGY, Z. B., TÓTH, K., TULASSAY, Z., IGAZ, P. & DANK, M. 2019. Circulating cell-free nucleic acids as biomarkers in colorectal cancer screening and diagnosis - an update. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 19, 477-498.
- MOSKO, M. J., NAKORCHEVSKY, A. A., FLORES, E., METZLER, H., EHRICH, M., VAN DEN BOOM, D. J., SHERWOOD, J. L. & NYGREN, A. O. 2016. Ultrasensitive Detection of Multiplexed Somatic Mutations Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J Mol Diagn*, 18, 23-31.
- MUMFORD, S. L., TOWLER, B. P., PASHLER, A. L., GILLEARD, O., MARTIN, Y. & NEWBURY, S. F. 2018. Circulating MicroRNA Biomarkers in Melanoma: Tools and Challenges in Personalised Medicine. *Biomolecules*, 8.
- NIKOLAEV, S., LEMMENS, L., KOESSLER, T., BLOUIN, J.-L. & NOUSPIKEL, T. 2018. Circulating tumoral DNA: Preanalytical validation and quality control in a diagnostic laboratory. *Analytical Biochemistry*, 542, 34-39.
- ONO, S., LAM, S., NAGAHARA, M. & HOON, D. 2015. Circulating microRNA Biomarkers as Liquid Biopsy for Cancer Patients: Pros and Cons of Current Assays. *Journal of Clinical Medicine*, 4, 1890-1907.
- PANTEL, K. & ALIX-PANABIÈRES, C. 2016. Liquid biopsy: Potential and challenges. *Molecular Oncology*, 10, 371-373.

- PANTEL, K., BRAKENHOFF, R. H. & BRANDT, B. 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer*, 8, 329-340.
- PARACKAL, S., ZOU, D., DAY, R., BLACK, M. & GUILFORD, P. 2019. Comparison of Roche Cell-Free DNA collection Tubes ((R)) to Streck Cell-Free DNA BCT ((R)) s for sample stability using healthy volunteers. *Pract Lab Med*, 16, e00125.
- POLIOUDAKI, H., AGELAKI, S., CHIOTAKI, R., POLITAKI, E., MAVROUDIS, D., MATIKAS, A., GEORGOULIAS, V. & THEODOROPOULOS, P. A. 2015. Variable expression levels of keratin and vimentin reveal differential EMT status of circulating tumor cells and correlation with clinical characteristics and outcome of patients with metastatic breast cancer. *BMC Cancer*, 15.
- RAO, C. B., T; CONNELLY, M; , DOYLE, I; I. KARYDIS, M.R. MIDDLETON, G. CLACK, M. MALONE, F.A.W. COUMANS AND L.W.M.M. TERSTAPPEN 2011. Circulating melanoma cells and survival in metastatic melanoma. *International Journal of Oncology*, 38.
- RIGEL, D. S. 2010. Epidemiology of Melanoma. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 29, 204-209.
- SCHWARZENBACH, H., HOON, D. S. & PANTEL, K. 2011. Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients. *Nat Rev Cancer*, 11, 426-37.
- SCHWARZENBACH, H. & PANTEL, K. 2015. Circulating DNA as biomarker in breast cancer. *Breast Cancer Res*, 17, 136.
- STROM, S. P. 2016. Current practices and guidelines for clinical next-generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med*, 13, 3-11.
- TERHEYDEN, P., KRACKHARDT, A. & EIGENTLER, T. 2019. The Systemic Treatment of Melanoma. *Dtsch Arztebl Int*, 116, 497-504.
- TODENHÖFER, T., STRUSS, W. J., SEILER, R., WYATT, A. W. & BLACK, P. C. 2018. Liquid Biopsy-Analysis of Circulating Tumor DNA (ctDNA) in Bladder Cancer. *Bladder Cancer*, 4, 19-29.
- TORRANO, V., ROYO, F., PEINADO, H., LOIZAGA-IRIARTE, A., UNDA, M., FALCÓN-PÉREZ, J. M. & CARRACEDO, A. 2016. Vesicle-MaNiA: extracellular vesicles in liquid biopsy and cancer. *Current Opinion in Pharmacology*, 29, 47-53.
- WENT, P. T., LUGLI, A., MEIER, S., BUNDI, M., MIRLACHER, M., SAUTER, G. & DIRNHOFER, S. 2004. Frequent EpCam protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol*, 35, 122-8.
- WROBLEWSKI, F. & GREGORY, K. F. 1961. Lactic Dehydrogenase isoenzymes and their distribution in normal tissues and plasma and in disease states. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 94, 912-932.
- YAP, Y.-S., LEONG, M. C., CHUA, Y. W., LOH, K. W. J., LEE, G. E., LIM, E. H., DENT, R., NG, R. C. H., LIM, J. H.-C., SINGH, G., TAN, A., GUAN, G., WU, A., LEE, Y. F., BHAGAT, A. A. S. & LIM, D. W.-T. 2019. Detection and prognostic relevance of circulating tumour cells (CTCs) in Asian breast cancers using a label-free microfluidic platform. *Plos One*, 14, e0221305.

6. Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit erfolgte am Institut für Tumorbiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, unter der Betreuung von Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher.

Die Studie wurde in geteilter Erstautorenschaft mit Svenja Schneegangs publiziert. Dabei lag mein Fokus thematisch auf der Analyse der CTCs und der ctDNA, während Frau Schneegangs für die Analyse der miRNA zuständig war.

Dabei führte ich eigenständig die Experimente der Plasma Extraktion, der ctDNA Isolation, der CTC Analyse sowie deren Färbungen durch. Bei der ctDNA Mutationsanalyse erhielt ich Unterstützung durch Jolanthe Kropidlowski (medizinisch-technische Angestellte). Die Spiking Experimente für die CTC Analysen im Vorfeld der Studie erfolgte durch Svenja Schneegangs und Katharina Besler. Ebenso war ich führte ich die Datenanalyse, die Interpretation der Daten und die Erstellung des Manuskripts durch, hier jeweils wie oben erwähnt inhaltlich bezogen auf die Analyse der CTCs und ctDNA. Das Studienkonzept und Studiendesign erfolgte durch Svenja Schneegangs, Elina Serkkola, Taija af Hällström, Markus Sprenger-Haussels, Evi Lianidou, Prof. Dr. Klaus Pantel und Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher (Cancer-ID Team).

Die Auswahl der Studienpatienten und Gewinnung der Proben erfolgte durch Dr. Janina Staub, Dr. Leonie Bluhm, Dr. Julia Stadler, Prof. Dr. Christoffer Gebhardt und Prof. Dr. Stefan W. Schneider sowie Dr. Rüdiger Greinert und Dr. Beate Volkmer.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Harriet Wikman-Kocher für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie wie der allzeit sehr guten Betreuung während des gesamten Promotionsprozesses.

Außerdem geht ein großer Dank ebenso an Svenja Schneegans für die gute Zusammenarbeit während der Datenerhebung und der Erstellung des Manuskripts sowie allen anderen Ko-Autoren, die an dieser Arbeit beteiligt waren.

Abschließend danke ich noch meinen Eltern, welche mir das Medizinstudium und somit diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben und mich zu jedem Zeitpunkt dabei unterstütz haben meine selbstgesteckten Ziele zu erreichen.

8. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

9. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: