

# NGS och Foundation<sup>1</sup>® Liquid CDx

- Med vätskebiopsins hjälp mot individuell cancervård

Susann Brunell

Examensarbete för (YH)-examen inom social- och hälsovård

Utbildning: Bioanalytiker (YH)

Vasa 2021



## EXAMENSARBETE

Författare: Susann Brunell

Utbildning och ort: Bioanalytiker, Vasa

Handledare: Ulla Penttinen

Titel: NGS och Foundation 1®Liquid CDx. - Med vätskebiopsins hjälp mot individuell cancervård

---

Datum 25.10.2021

Sidantal 57

Bilagor 4

---

### Abstrakt

Dagens cancervård utvecklas till en mer individualiserad vård för patienten. Under sjukdomsförloppet sker det förändringar i tumörens molekylära profil och det kan försvåra cancerpatientens diagnostik och behandling. Nya diagnostiska metoder har gjort det möjligt att hitta det rätta läkemedlet för patientens cancer. Idag används olika gentester eller paneler för att upptäcka om tumören är resistent mot eller bildar resistens till läkemedlet under behandlingen.

Sekvensering enligt NGS-metoden (Next-Generation Sequencing) samt vätskebiopsi (cellfritt DNA) är analysmetoder som används inom cancerdiagnostiken. Ibland kan vävnadsbiopsi inte tas och då är det möjligt att med vätskebiopsins hjälp kartlägga situationen hos cancerpatienten. Med hjälp av NGS är det möjligt att upptäcka olika förändringar i tumörens genomiska profil. Vätskebiopsin innebär att med ett blodprov kan det upptäckas genomiska förändringar i tumören.

Mitt examensarbete är delat i tre delar. I teoridelen redogörs för människans DNA, och bakgrunden till att en tumör utvecklas, skillnaden mellan vävnadsbiopsi och standarsbiopsin. I den andra delen redogörs för vätskebiopsi, NGS och vilka faktorer som kan påverka dem. I tredje delen går jag igenom hur Illumina sekvensering fungerar och vad FoundationOne®Liquid CDx testet.

Syftet med mitt examensarbete är att besvara frågorna: Vad handlar FoundationOne®Liquid CDx om, vilka analyseringsmetoder används vid bestämningen, vilka faktorer måste beaktas under processen med vätskebiopsin samt vilka utmaningar har vätskebiopsin och NGS för att kunna ge resultat av hög kvalitet.

---

Språk: Svenska

Nyckelord: CTC, cfDNA BCT, ctDNA BCT, FoundationOne Liquid CDx, Nästa generations sekvensering (NGS), Vätskebiopsi

---

## OPINNÄYTETYÖ

Tekijä: Susann Brunell

Koulutus ja paikkakunta: Bioanalytiikka, Vaasa

Ohjaaja(t): Ulla Penttinen

Nimike: NGS ja Foundation 1 Liquid CDx. - Nestebiopsian avulla kohti yksilöllisempää syövänhoitoa

---

Päivämäärä 25.10 2021

Sivumäärä 57

Liitteet 4

---

### Tiivistelmä

Syöpähoito on kehittymässä potilaalle yksilöllisemmäksi hoidoksi. Taudin aikana kasvaimen molekyyliprofiilissa tapahtuu muutoksia ja se voi vaikeuttaa syöpäpotilaan hoitosuuntia ja lääkitystä. Uudet diagnostiset menetelmät ovat mahdollistaneet oikean lääkkeen löytämisen potilaan syöpään. Nykyään käytetään erilaisia geenitestejä tai paneeleja havaitsemaan, onko kasvain vastustuskykyinen tai muodostaako hoidon aikana resistenssin lääkkeelle.

Uuden sukupolven sekvensointi (NGS) sekä nestebiopsia ovat syöpädiagnostiikassa käytettäviä menetelmiä. Joskus kudosbiopsianäytettä ei voi ottaa. Nestebiopsian avulla on mahdollista kartoittaa syöpäpotilaan tilanne. NGS:n avulla on mahdollista havaita erilaisia muutoksia kasvaimen genomisessa profiilissa. Nestebiopsia tarkoittaa, että verikokeella voidaan havaita, jos kasvaimessa on tapahtunut genomisia muutoksia.

Opinnäytetyö on jaettu kolmeen osaan. Ensimmäisessä osassa selvitetään ihmisen DNA ja sen osuus kasvaimen kehittymisen taustalla sekä kudosbiopsian ja standardibiopsian välinen ero. Toisessa osassa esitetään mitä nestebiopsia ja NGS käytännössä ovat sekä ne tekijät, jotka voivat vaikuttaa testitulokseen. Kolmannessa osassa esitellään Illuminan sekvensointimenetelmän – sekvensointi synteisillä- ja FoundationOne® Liquid CDX -testin.

Tämän työn tarkoituksena on vastata kysymyksiin: Mistä FoundationOne® Liquid CDx kertoo, mitä analyysimenetelmiä käytetään määrittämisessä, mitkä tekijät on otettava huomioon nestebiopsiaprosessin aikana. Lisäksi käyn läpi nestebiopsian ja NGS:n haasteita ja menetelmien laatuun vaikuttavia näkökohtia.

---

Kieli: Ruotsi

Avainsanat: CTC, cfDNA BCT, ctDNA BCT, FoundationOne Liquid CDx, Nestebiopsia, Uuden sukupolven sekvensointi (NGS)

---

## **BACHELOR'S THESIS**

Author: Susann Brunell

Degree Programme: Bachelor of Health Care, Biomedical Laboratory Scientist, Vaasa

Supervisor(s): Ulla Penttinen

Title: NGS och Foundation OneLiquid CDx. – Liquid Biopsy a Tool to Personalized Cancer Care

---

Date 25.10.2021

Number of pages 57

Appendices 4

---

### **Abstract**

Today's cancer care is evolving into a more personalized treatment for the patient. During the course of the disease, there are changes in the molecular profile of the tumor and it can complicate the diagnosis and treatment of the cancer patient. New diagnostic methods have made it possible to find the right drug for the patient's cancer. Today, various gene tests or panels are used to detect whether the tumor is resistant to or forms resistance to the drug during treatment.

Next generation sequencing (NGS) as well as fluid biopsy are methods, used in cancer diagnostics. Sometimes tissue biopsy cannot be taken. Then it is possible, with the help of the fluid biopsy, to map the situation of the cancer patient. The fluid biopsy means, that with a blood test it can be detected if there have been genomic changes in the tumor and the use of NGS it is possible to detect various changes in the genomic profile of the tumor.

My thesis is divided into three parts. The first part describes the human DNA, and the background of developing a tumor, as well as the difference between tissue biopsy and the standard biopsy. The second part sets out what fluid biopsy and NGS are as well as the factors that may affect the test result. The third part presents Illumina's method- sequencing by synthesis - as well as the FoundationOne® Liquid CDX test.

The purpose of my thesis is to answer the questions: What is the FoundationOne® Liquid CDX about, what analyzing methods are used in determining, what factors need to be considered during the fluid biopsy process, and the challenges of fluid biopsy and NGS in order to deliver high quality results.

---

Language: Swedish

Keywords: CTC, cfDNA BCT, ctDNA BCT, FoundationOne®Liquid CDx, Liquid biopsy, Next generation sequencing (NGS)

---

## Innehållsförteckning

1	Inledning.....	1
2	Syfte och frågeställningar .....	2
3	Metod .....	3
3.1	Litteratursökning och urvalsprocessen.....	3
3.2	Inklusions- och exklusionskriterier .....	4
3.3	Etiska principer.....	4
4	Teoretisk bakgrund .....	4
4.1	Människans DNA .....	5
4.1.1	DNA:s uppbyggnad.....	5
4.1.2	Vad är ett kodon?.....	6
4.2	Teoretisk bakgrund om cancer .....	8
4.2.1	Cancertumörens utvecklingsfaser och uppkomst .....	9
4.2.2	Metastasering.....	10
4.2.3	Proto-onkogen, onkogen och Mismatch repair gen .....	10
4.2.4	DNA reparationsgen .....	12
4.3	Tumörsuppressorgen.....	13
4.4	Betydelsen av cancermedicin i vården .....	15
5	Diagnostik – Biomarkör .....	16
5.1	Vad är genetisk testning .....	17
5.2	Biomarkörer och Prediktiv cancerdiagnostik.....	17
5.2.1	CTC - Cirkulerande tumörceller .....	18
5.2.2	cfDNA.....	18
5.2.3	ctDNA.....	19
5.2.4	Vesikler, exosomer .....	20
6	Vätskebiopsi .....	20
6.1	Jämförelse mellan vävnadsbiopsi och vätskebiopsi .....	20
6.2	Fördelar och nackdelar med vätskebiopsin.....	21
7	Provtagningsrör för cfDNA.....	23
7.1	Streck BCT specialrör .....	24
7.2	Roche BCT specialrör.....	24
7.3	Qiagen BCT specialrör .....	24
7.4	Forskningar om kvaliteten av cfDNA rören .....	25
8	Validering.....	26
8.1	Preanalytik.....	27
8.2	Preanalytik för gentester.....	27
8.3	Behov för standarder och SOP (standard operating procedures) .....	28

8.4	Analytisk validitet .....	29
9	Next generation sequencing (NGS) .....	30
9.1	Generellt om NGS .....	30
9.2	Olika sekvenseringsplattformar .....	30
9.3	Skillnaden mellan Sanger sekvensering och NGS .....	31
10	Etiken inom NGS och genetisk testning .....	31
11	Illumina.....	33
11.1	Multiplexing .....	33
11.2	Förberedelse av sekvensering av biblioteket. ....	34
11.3	Beredning av provet i biblioteket.....	35
11.3.1	Flödescellen och Klustergenerationen.....	36
11.3.2	Sekvenseringen.....	37
11.3.3	Data-analysen .....	39
11.3.4	Problem som kan uppstå under processen.....	41
11.3.5	Kvaliteten hos Illumina .....	42
12	Företag: Roche, Foundation Medicine och Illumina inc.....	43
13	FoundationOneLiquid-metoden .....	45
13.1	FoundationOne®Liquid Cdx-testet.....	45
13.2	FoundationOne®Liquid blodprov.....	46
13.3	Validering.....	49
14	Kritisk granskning.....	50
15	Diskussion .....	51
16	Källförteckning .....	53

Bilaga 1 FoundationOne® Liquid CDx tabell över cancergenens tumörorgan

Bilaga 2 FoundationOne®Liquid CDx- Genlista

Bilaga 3 FoundationOne®Liquid CDx- Beslutsstöd

Bilaga 4 FoundationOne®Liquid CDx- Samtycket- kopia av första sidan

## 1 Inledning

Idén till detta arbete kom efter en artikel i Vasabladet om ett projekt som skulle gå som pilot på onkologiska enheten vid Vasa centralsjukhus. I artikeln berättade enhetens överläkare om ett pilotprojekt där FoundationOneCDx liquid skulle användas (Furu, 2018). FoundationOne CDx liquid är en undersökning som används för att utreda patientens tumör.

Cancervården har gått framåt med stormsteg. Utvecklingen och kunskapen har gjort att forskarna och klinikerna kan ägna större uppmärksamhet på människans individuella variation i fråga om läkemedelsutvecklingen och cancerbehandlingen (Jokela, Oja-Leikas & Rova (2017, s. 103). Olika läkemedel som baserar på genkunskap används inom cancerbehandlingen. Dagens behandling baserar sig på individuell cancerbehandling, då till exempel läkemedelseffekten kan variera på grund av en specifik mutation i tumören, en så kallad genmodifiering. För att finna dessa patienter används nya genetiska tester. (Jokela, Oja-Leikas & Rova 2017, 104).

Cell-free DNA (cfDNA) upptäcktes i människans blod för ca 70 år sedan och har sedan dess använts som en diagnostisk biomarkör inom olika forskningsområden. cfDNA upptäcktes först hos patient med SLE (Systematic lupus erythematosus) och efteråt hos cancerpatienter. cfDNA består av ca 160 baspar (bp) och kommer ut i blodomloppet vid olika patologiska tillstånd. cfDNA från nekrotiska eller apoptotiska celler finns i olika kroppsvätskor både hos friska och sjuka personer, bland annat i blod (plasma/serum) och urin. Det cfDNA som kommer ut från tumörer kallas ctDNA (circulating tumor DNA), översatt till svenska, cirkulerande tumör DNA. cfDNA anses vara en lovande biomarkör för cancer i urinsystemet samt andra icke urologiska sjukdomar. Den snabba utvecklingen inom nya molekylära tekniker har gjort att cfDNA är av intresse inom diagnostisering och utveckling inom cancerbehandlingens monitorering. (Casadio och Salvi, 2019, s.3 - 5).

Ännu idag anses vävnadsbiopsi vara den "gyllene standarden" för cancerdiagnosen. Vätskebiopsi anses vara ett lovande tillvägagångssätt för vävnadsbiopsin, som är ett kirurgiskt ingrepp, kan vara för patienten en obehaglig upplevelse och vara riskfylld med potentiella komplikationer. Dessutom kan tumören vara lokaliserat på ett ställe som är svår att nå, biopsin kan vara för begränsad eller att biopsin inte återspeglar intra-tumör heterogeniteten. Under tumörutvecklingen kan det utvecklas subkloner, d.v.s tumören får nya undergrupper med andra egenskaper.

Vätskebiopsin omfattar cirkulerande tumörceller (CTC), cirkulerande extracellulära nukleinsyror medräknat cellfritt DNA, (cfDNA), mRNA och mikroRNA (miRNA), extracellulära vesikler (t.ex. exosomer), nukleosomer samt glykoproteiner, men också antigener t.ex PSA, CEA, CA125, CA19-9, beta HCG, alfafetoprotein . (Kustanovich, Schwartz, Peretz & Grinshpun, 2019, s. 1057).

Utvecklingen idag inom nukleinsyrasekvensering och bioinformatik teknik möjliggör analysering av genomet med användbar diagnostik för att undersöka organismernas molekylärbiologi, biokemi och fysiologi (Wilson & Walkers, 2018, s. 732).

## 2 Syfte och frågeställningar

Syftet med detta arbete är att den skall inhämta kunskap om teorin inom genetiken och molekylärbiologin, uppdatera kunskapen om de nya diagnostiska metoder som har utvecklats och de behov som cancervården har idag för laboratorieverksamheten. Jag kommer i arbetet att tangera molekylbiologi, nästa generations sekvenseringsmetoden (next generation sequencing, i fortsättning används förkortningen NGS) och den betydelse dessa har för vården av cancerpatienten.

Frågeställningar som jag ställer i mitt examensarbete är:

1. Vad handlar FoundationOne®Liquid CDx om?
2. Vilken analyseringsmetod och analysator som används vid bestämningen?
3. Vilka faktorer måste beaktas under processen kring vätskebiopsi?
4. Vilka utmaningar har vätskebiopsin och nästa generations sekvensering (NGS) för att kunna utge resultat av hög kvalitet?

Examensarbetet är uppdelat i tre olika delar:

1. Teoridel
  - som går igenom: dagens cancerbehandlingar och vilka biomarkörer behövs och varför?
  - Vad är vätskebiopsi och vilka pre-analytiska faktorer som måste tas i beaktande?
  - Hur skiljer sig vätskebiopsin från standardbiopsin?
2. Vad avses med vätskebiopsi och med nästa generations sekvensering (NGS)?
3. Vad är FoundationOne®Liquid CDx testet.



### 3 Metod

Examensarbete kan jämföras med en forskningsprocess, för det skall kritiskt granska den litteratur som väljs, använda sig av ett systematiskt tillvägagångssätt, och att problemformuleringen skall besvaras i slutet av arbetet (Forsberg och Wennström, 2015, s. 35 - 36). I enlighet med Forsberg och Wennström (2015, s. 25 – 34, 169) kan en litteraturstudie vara allmän (overview), systematisk (systematic review), metaanalys eller översiktsstudie (scoping review).

Enligt Forsberg och Wennström (2015, 25 – 26, s. 28) är det möjligt att med en allmän litteraturstudie att sammanställa ett underlag för kartläggning och uppdatering av den kunskap inom det område som skall behandlas i studien. I en allmän litteraturstudie fordras inte att studien görs med ett systematiskt arbetssätt, men görs det på ett systematiskt sätt fås ett slutresultat, som minskar på feltolkningar eller felaktig information. (Forsberg m.fl, 2015, s. 25 – 26, 28).

Eftersom mitt examensarbete är samtidigt en komplettering på mina tidigare studier eftersträvar jag i examensarbetet samla det senaste kunskap om cancerbehandling, sekvensering, vätskebiopsi, NGS och den analysmetoden som används i FoundationOne®liquid CDx. Jag följer i mitt arbete kriterierna som Forsberg och Wennström (2015, s. 27) hänvisar till: att ha en klar formulering av frågeställningarna, har tydligt beskrivit kriterier och metoder för sökningen och urval av artiklarna, alla relevanta artiklar är med, artiklarna är referentgranskade. Detta innebär att jag har sökt litteratur med ett semisystematiskt tillvägagångssätt, d.v.s jag har använt mig av sökord för att hitta artiklarna, försökt finna de nyaste referentgranskade forskningsartiklarna, samt använt de nyaste böcker jag fått tag på om de ämnesområden jag behandlar i examensarbetet.

#### 3.1 Litteratursökning och urvalsprocessen

Som grund för litteratursökningen har jag använt mig av böcker, vetenskapliga artiklar och som sökmotorer används Tritonia Finna och Google Scholar. Dessutom har jag använt mig av kedjesökning, efter att jag kontrollerat referenslistorna i intressanta artiklar, för att hitta artiklar som jag annars inte hittat med normal sökning.

I början kartlade jag möjliga sökord genom att söka i artiklar som tangerade de ämnen som jag skulle skriva i mitt examensarbete för att komma underfund vilka sökord som bäst hittar den litteratur som jag önskar använda. I mitt arbete har jag använt mig av följande sökord: DNA (ctDNA, cfDNA och CTC), NGS samt liquid biopsy och FoundationOne och Foundation One liquid Cdx och Illumina. Jag startade skrivandet av examensarbetet 2018 och slutför den nu 2021 och därför varit tvungen att uppdatera med nya artiklar.

### 3.2 Inklusions- och exklusionskriterier

Datainsamlingen skedde under olika tidsperioder mellan 2018–2021. I examensarbetet kommer jag att använda mig av böcker inom området samt vetenskapliga artiklar. Eftersom utvecklingen inom detta område förändras raskt valde jag vid starten att jag skulle använda mig av artiklar som inte är äldre än fem år och böcker som var inte äldre än från år 2013. På grund av att mitt skrivande drog ut på tiden har jag använt mig av artiklar som hade publicerats mellan 2015 - 2021. Andra inklusionskriterier som används: är att artiklarna är skrivna på engelska, finska eller svenska, är referentgranskade och att fulltext finns tillgängligt (open access) för att läsa på nätet. Artiklar eller andra källor skall beröra de utvalda sökorden (se 3.1). Exklusionskriteriet var att artiklarna vars perspektiv gällde andra sekvenseringsmetoder än NGS.

### 3.3 Etiska principer

*” Forskningsetik är de etiska överväganden som görs inför och under genomförandet av ett vetenskapligt arbete”.* Forskningsetiken skall finnas med under hela processen av examensarbetet, från val av ämnet, planering till den slutliga rapporteringen. Studeranden skall vara införstådd i olika normer, värderingar, och principer som finns inom forskarsamhället, riksdagen och staten. (Henricson, 2017, s. 58). Jag har följt forskningsetiska delegationens (TENK) anvisningar om god vetenskaplig forskningspraxis GVP (2012, 17 - 20) om plagiering och stöld av forskningar, artiklar, bilder, och från andra källor. Jag har fått lov av genteknik.se och illustratören Gunilla Elam om att få använda hennes illustrationer samt av Foundation Medicine om att få använda deras bilder och annat material som finns på deras webbsida i mitt examensarbete. Jag har hänvisat inne i texten och nämnt källorna till de bilder som jag använt mig av i mitt arbete.

## 4 Teoretisk bakgrund

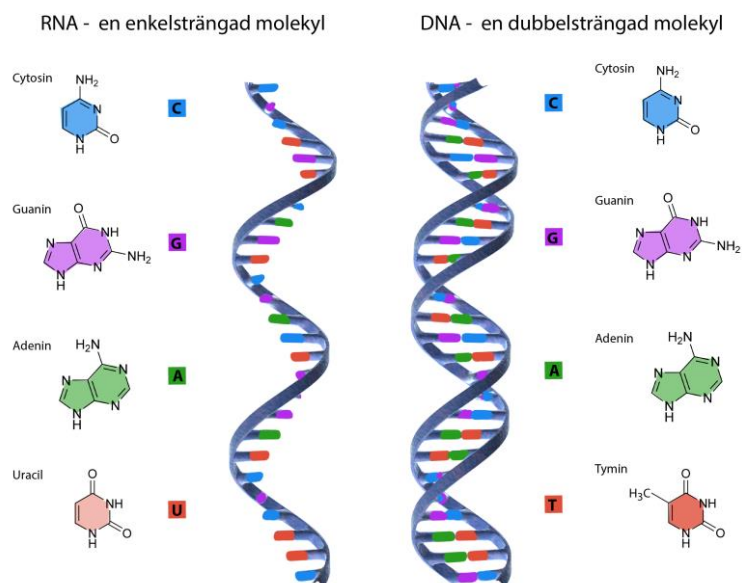
I detta kapitel redogör jag för DNA:s uppbyggnad, tumörens utvecklingsfaser och om prediktiv cancerbehandling, för att ge bakgrundsinformation till FoundationOne Liquid CDx test kittet. Människans hela arvsmassan (DNA), har klargjorts i HUGO (Human Genome organization) - projektet. Människans genom innehåller ca 23 000 gen. Genen kodar för olika proteiner som behövs för kroppens funktion. Genforskningen har visat att enbart en bråkdel av människans DNA ( $3 \times 10^9$  baspar) behövs för att lagra information om olika proteiners aminosyrasekvens. (Heino & Vuento, 2019, s. 187)

## 4.1 Människans DNA

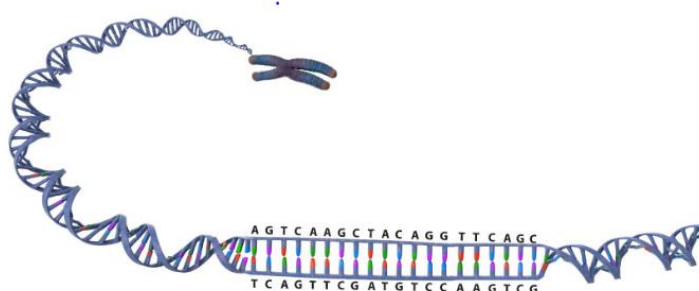
Människans arvsmassa består av gen, som är en kod för ett protein. En gen sitter i ett lokus på en kromosom. Storleken hos en gen varierar från några hundra baspar till över 2 miljoner baspar (förkortning bp kommer att användas i fortsättningen.). Gener regleras av genregulatoriska sekvenser, genom positiv reglering (på engelska/ enhancer) eller negativ reglering (på engelska/ silencer). (Aittomäki m.fl, 2016, s. 30). DNA är förkortning av deoxyribonukleinsyra. Den genetiska informationen om sekvensen av aminosyror finns lagrade i människans DNA. (Heino & Vuento, 2019, s. 73). Vid varje celldelning bildas det en identisk kopia av modercellens DNA. Syntesen av DNA kallas replikation, d.v.s. under denna process kopieras hela cellens genetiska information. mRNA syntetiseras av DNA och processen kallas transkription (avläsning). Under följande steg översätts proteinet enligt mRNA till en sekvens av aminosyror och kallas translation. Den genetiska informationen, som finns i cellen, lagras som DNA i cellkärnan. DNA inrymmer alla proteiner som cellen kan binda. (Erlanson m.fl, 2013, s. 174)

### 4.1.1 DNA:s uppbyggnad

Arvsmassan finns i cellkärnan i form av DNA. DNA- molekyl, som är en nukleinsyra med dubbelspiral, är uppbyggd av två nukleotidkedjor. Varje nukleotid består av en molekyl av deoxiribos, en fosfatgrupp samt av en av de fyra kvävebaserna, som förevisas i figur 1 d.v.s. hur DNA-spiralen ser ut och uppbyggnaden av Adenin- (A), Guanin-, (G), Cytosin-, (C) och Tymin - molekylerna (T). Figur 2 åskådliggör hur baserna adenin och tymin (A-T) är bundna till varandra genom en dubbel vätebindning och cytosin och guanin (C-T) binds samman med en trippel vätebindning. DNA - molekyl är en lagringsplats för den genetiska informationen. RNA (ribonukleinsyra) innehåller också 4 baser: Adenin, Guanin, Cytosin, och Uracil (U). Basparen som ses hos RNA är A-U och G-C, d.v.s att i RNA:t finns Uracil i stället för Tymin. RNA har flera uppgifter. En av uppgiften är förflyttningen av information från DNA till ribosomerna mRNA (messenger RNA), som en del i ribosomernas byggnad (ribosomal RNA, rRNA) och i överföringen av aminosyror från cytoplasma till ribosomerna (transfer RNA, tRNA). (Heino & Vuento, 2019, s.67, 69 - 70)



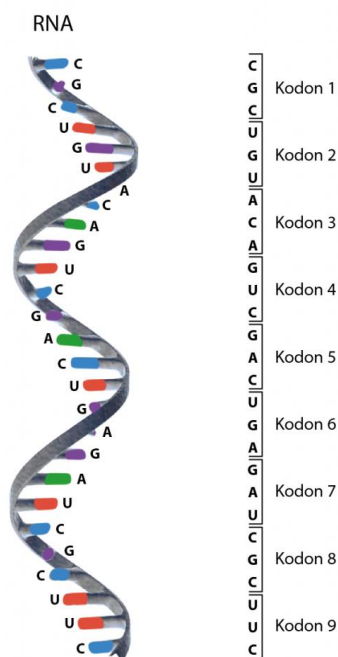
Figur 1. En bild på DNA-spiralen och kvävebaser som ingår i DNA och RNA. Källa: Genteknik (u.å.). Grundläggande molekylärgenetik. <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genetik/fran-gen-till-protein/>. Illustration och copyright: Gunilla Elam [Hämtat 17.6.2021]



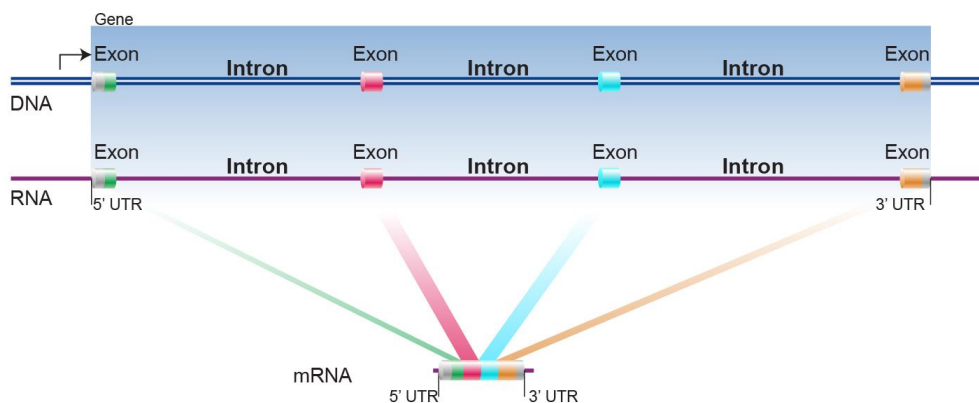
Figur 2. En bild på en DNA med dubbelspiral samt med exempel på hur basparen kopplas ihop. Källa: Genteknik A (u.å.). Grundläggande molekylärgenetik. Illustration och copyright Gunilla Elam [Hämtat 17.6.2021] <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genmodifierade-organismer-gmo/manniska-och-medicin/genetiska-tester/>

#### 4.1.2 Vad är ett kodon?

Den genetiska koden byggs upp av 3 nukleotidbaser till ett kodon, d.v.s till ett "ord". Figuren 3 visar hur kodon läses. Tre av kombinationerna är stopkoder för proteinsyntesen, d.v.s UAA, UAG eller UGA. Den genetiska koden bildas av de fyra olika baserna, Adenin, Cytosin, Guanin eller Tymin (Se figur 1. En bild på DNA-spiralen och figur 2 av ett DNA som har dubbelspiral). Nukleotidsekvensen innehåller introner och exoner. Introner faller bort och endast exoner finns kvar och blir avlästa. (Heino & Vuento., 2019, s.73–74).



Figur 3. Bilden visar RNA-strängen och hur genetiska koden läses Källa: Genteknik A (u.å.). Grundläggande molekylärgenetik. <https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genetik/fran-gen-till-protein/>. Hämtat 17.6.2021.



Figur 4. Bilden visar genen och dess uppdelning i exoner och introner. Källa: National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Intron> [Hämtat 17.6.2021]

Figur 4 förevisar nukleotidsekvensens innehåll av introner (icke kodande del) och exoner (innehåller koder). Intronen faller bort och endast exoner finns kvar och läses. (Heino & Vuento, 2019, s. 73 – 74; Aittomäki m.fl., 2016, s. 30). Under genexpressionen kopieras hela genen med exon och intron till RNA-molekylen. Denna RNA-molekyl omformas till ett budbärar-RNA (mRNA) under transkriptionen (RNA-syntesen), där intron klipps (engl. splicing) bort och exonen binds ihop.

Mängden av exonen och intronen varierar i olika gener. DNA- sekvensen läses alltid från 5` till 3`. I början av DNA- strängen finns en start- och en slutdel, som inte översätts till proteiner. Deras funktion är att markera starten och slutet på DNA -strängen. De benämns också som 5'UTR och 3'UTR. UTR är en förkortning av " Untranslated Region". (Genteknik A (u.å.); Aittomäki m.fl, 2016, s. 100)

Mutationer sker som en mutation i basen genom:

- 1) substitution (som en byte av en bas i en del av DNA)
  - 2) deletion (en del av DNA blir borta i DNA-strängen)
  - 3) insertion (en del av ett DNA ansluter sig till DNA)
  - 4) duplikation (en del av DNA dupliceras i två omgångar)
  - 5) inversion (en del ändrar riktning)
  - 6) translokation (två olika DNA strängar från olika platser byter plats i genomet)
- (Aittomäki m.fl., 2016, s. 100)

Dessa förändringar kan var oansenliga eller allvarliga. Mutationer uppkommer för det mesta under replikationen. Betydelsen av mutationen är beroende av var på DNA-strängen eller aminosyrasekvensen förändringen sker. Vissa mutationer har ingen betydelse för proteinstrukturen, orsaken till det är att det finns flera kodon for samma aminosyra. (Aittomäki m.fl, 2016, s.103)

## 4.2 Teoretisk bakgrund om cancer

En tumör uppkommer då cellerna eller vävnaden får en onormal tillväxt, som är beroende av yttre tillväxtstimulering, och är skadlig för värdsystemet. För cancerprognosen och vården är det viktigt, att redan i tidigt stadium kunna diagnostisera tumören, för redan en liten tumör kan skicka ut metastaser. Därför kan man hitta tumörceller i blodomloppet redan i ett tidigt stadium. (Heino & Vuento, 2019, s. 333). Enligt Heino och Vuento (2019, 334) kan endast 1 /1000 eller 1 /1 000 000 av tumörens celler kan ge upphov till nya tumörer. I människan sker det också cellmutationer, som inte leder till cancer. Cellens reparationsmekanismer har då korrigerat mutationerna i cellen eller mutationen har lett till celledöd före den har blivit en tumörcell. (Kristoferson, 2014, s. 214 - 215.). En tumörcell uppkommer ofta efter en slumpvis mutation under DNA-syntesen. Följande faktorer påverkar uppkomsten av cancer: demografiska aspekter, livsstilsfaktorer, kemikalier, strålning, virus och ärftliga mutationer. I fortsättningen behandlar jag enbart maligna tumörer.

Cellen kan förändras, så att den inte mera är beroende av sin miljö eller andra celler. Utomstående faktorer reglerar cellens verksamhet., d.v.s om celledelningen, - differentieringen och - döden. En okontrollerbar tillväxt av cellen kan leda till en tumör med egna blodkärl, och som kan invadera till

den omkringliggande vävnaden. Cancersjukdomar karakteriseras av att det uppstår lokala tumörer. Den ursprungliga tumören kan skicka ut metastaser till andra platser i kroppen. (Heino & Vuento 2019, s.329–323). Genetiska avvikelser ger cellen tillväxt – och olika överlevnadsfördelar. Mutationer kan vara somatiska (förvärvade) eller nedärvda (Nilbert, 2013, s. 46; Kristofersson, 2014, s. 214).

#### **4.2.1 Cancertumörens utvecklingsfaser och uppkomst**

Tumören upptäcks ofta först när den har uppnått en viss storlek. De kliniska och morfologiska egenskaperna kan fastläggas efter att tumören uppnått en viss mognad. Till tumörens egenskaper hör att: den uppkommer lokalt, växer lokalt, sprider sig lokalt (invasion), tränger in sig i blod- och lymfkärlen (intravasion), färdas i blod – och lymfkärlen, passera genom blodet och lymfkärlen (extravasion) och finner ett nytt ställe att växa med slutresultat att tumören sänder ut metastaser och en sekundär tumör uppstår. (Mäkinen, Carpén, Kosma, Lehto, Paavonen, & Stenbäck, 2012, s. 238–239).

En malign tumör består av normala celler, maligna celler och mikromiljöceller från tumören. Dessa mikromiljöceller frigör cfDNA och ctDNA. ctDNA- fraktionen återspeglar i sin tur omfattningen av muterade DNA fragmenten som finns i varje tumörtyp. Efter behandling av tumören, kan den diagnostiserade muterade DNA- fraktionen ersättas av nya mutationer, som inte fanns i ctDNA fraktionen i blodet, utan den fanns i tumören i mycket små mängder. Tumören upptäcks ofta i slutet av sin livscykel. En tumör på en cm har delat sig 25 - 30 gånger och i den finns det 1000 000 000 cancerceller. Uppkomsten av cancer hos befolkningen påverkas av åldern, kön, etnicitet, livsstil socialklass, miljöexponering mm. (Joensuu m. f., 2013, s. 10–12).

Yttre faktorer reglerar cellens funktion, som påverkar cellens delning, celldifferentiering och död. Cellen kan transformeras och är inte beroende av sin omgivning eller andra celler. Cellen kan växa okontrollerbart, och utvecklas till en tumör, med egna blodkapillärer och kan invadera den omkringliggande cellvävnaden. Cancercellernas celledelning sker snabbare än normala cellens delning och har ett avvikande utseende. (Heino & Vuento, 2019, s.323)

Det behövs följande genförändringar för att en tumör skall utvecklas:

- Cellens frigöring från den normala tillväxtregleringen, sker då proto-onkogenen aktiveras, tumorsuppressorgener ned regleras och telomeras- enzymer aktiveras
- Cellen kan undgå apoptos genom de gener som utlöser apoptosprocessen inaktiveras och att det sker en överproduktion av de faktorer som förhindrar celldöden.
- Angiogenesen startas, d.v.s. aktiveringen av de tillväxtfaktorer som reglerar utvecklingen av blodkärl, så kallade VEGF -gener (vascular endothelial factor).
- Cellinvasionen påbörjas genom förändringar i genen som har hand om adhesionen, (t.ex kadherin och intergrin) och aktiveringen av metalloproteasgenens matrix

(Heino & Vuento, 2019, s. 328)

Det behövs flera än en genförändring för att en tumör skall uppkomma. Enbart proto-onkogens aktivering är inte tillräcklig. Genförändringar sker slumpmässigt och endast några få förändringar leder till att cancer uppstår. Sådana mutationer kallas för drivermutationer. (Heino & Vuento, 2019, s. 329).

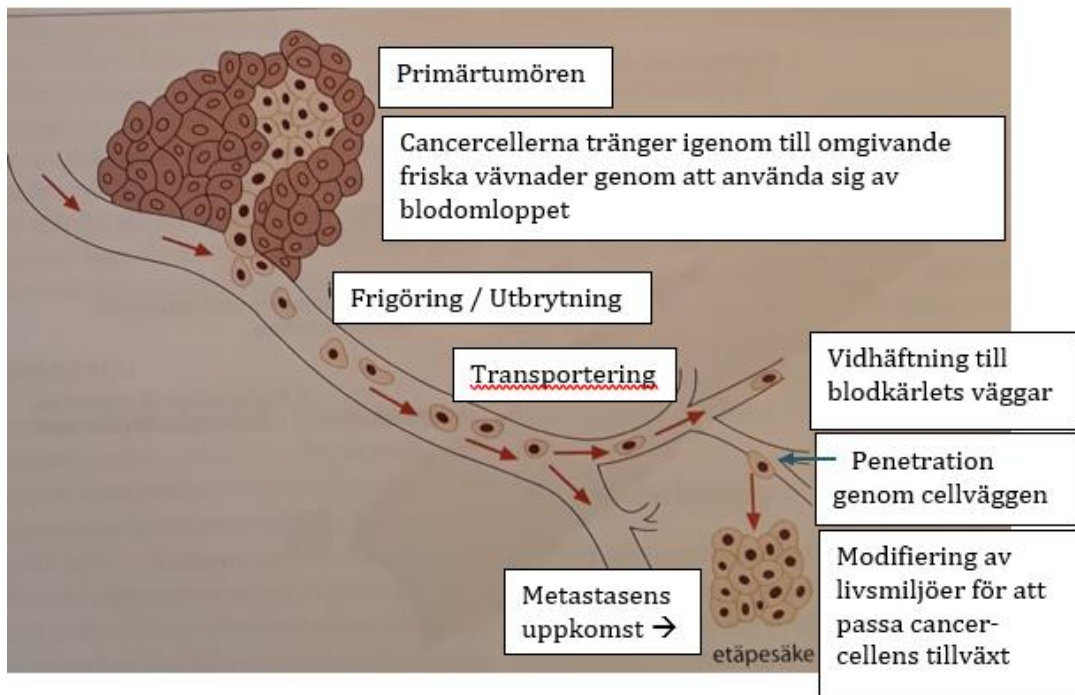
#### 4.2.2 Metastasering

Den farligaste egenskapen för en malign tumör är att den bildar metastaser. Cancercellen skall tränga igenom basala membraner, blodkärl eller lymfkärlens endotelcell-lagren. När tumörcellen kommer in i blodomloppet fästs den till exempel i trombocyterna eller i de granulocyterna (vita blodkropparna) och gömmer sig på detta sätt för kroppens försvarssystem. Figur fem skildrar hur en metastas uppstår. I många studier har det varit möjligt att beräkna sannolikheten för uppkomsten av metastaser genom att studera biomarkörer och deras genuttryck i den primära tumören. Olika forskare anser att det kan förekomma metastaser också hos små cancerformer. Därför anses det finnas cancerceller i blodomloppet redan i tidigt skede. (Heino & Vuento, 2019, s. 332 - 333).

#### 4.2.3 Proto-onkogen, onkogen och Mismatch repair gen

Hos människan finns det olika gener som kontrollerar celledelningen. Det finns två huvudtyper av tillväxtreglerande gener, proto-onkogenen som stimulerar och tumorsuppressorgener som inhiberar celltillväxten. Proto-onkogen finns normalt i cellen. Dess uppgift i cellcykeln är t. ex att reglera celledelningen. Aktiveringen av onkogen, leder till att det ger upphov till egenskaper, som är fördelaktiga för cancercellen. Den cancerframkallande effekten hos tillväxtreglerande genen grundar sig på att de förlorar sin normala funktion och startar att kopiera sig obehärskat eller förändras till felaktigt. Proto-onkogen kallas de gener som normalt deltar i överföringen av uppgiften som främjar uppdelningen i celler, men efter en mutation orsakar uppkomsten av cancer. Den huvudsakliga uppgiften för proto-onkogen är att delta i regleringen av cellens normala tillväxt,





Figur 5. Förevisar processen kring metastasering. Källa: Joensuu m.fl, 2013, 32, kuva 11.

uppgiften som främjar uppdelningen i celler, men efter en mutation orsakar uppkomsten av cancer. Idag kan det identifieras tiotals av proto-onkogen. I olika cancerformer aktiveras proto-onkogen på olika sätt. Som onkogen räknas gener som har en aktiverande effekt, vars mutation leder till att en inaktiv gen aktiveras och leder till celledningar. Mutationen kan leda till förändringar i proteinstrukturen hos den nybildade proteinet, som orsakar en bestående aktivering eller en överaktiv proteinproduktion. (Heino och Vuento, 2019, s. 325). Det finns vissa genmutationer som skall ske för att en cancercell skall uppstå. För att en cell utvecklas till en cancercell behövs det, förutom en aktivering av proto-onkogener, också inaktivering av en gen för tillväxtregleringen. (Heino & Vuento, 2019, 327). För aktiveringen av ett onkogen, behövs det enbart att den ena allelen skadas. (Joensuu m.fl., 2013, s. 25 - 26).

Enligt Kasper, Schneidereith och Lashley (2016, s. 396 – 397) finns det mera än 40 proto-onkogener och det finns många olika mekanismer genom vilket proto-onkogenen omvandlas till onkogener, till exempel:

- Punktmutationer, deletioner eller insertioner
  - som leder till hyperaktiv produktion av genen
  - som kan orsaka i promotor regionen (finns lokaliserat nära startkodon) hos proto-onkogen ökad transkription.
- Gen amplifierings händelser, som orsakar extra "kromosomala " kopior av en proto-onkogen.

- Kromosomala translokationer som:
  - Förflyttar proto-onkogenen till en ny plats i kromosomen
  - Leder till en fusion mellan proto-onkogen och en annan gen, som producerar en fusion med onkogen aktivitet.

(Kasper, Schneidereith & Lashley, 2016, s. 396 – 397).

Tabell 1. Denna tabell förklarar placeringen av proto-onkogen i cellen. (Tillväxtfaktorer, tillväxtfaktorreceptorer och signalförmedling i cytoplasman eller kärnan).

Källa: Viktigaste funktionerna hos proto-onkogenen och deras placering i cellen enligt Joensuu m.fl. (2013, s. 26)							
Cytoplasma						Kärnan	
Tillväxtfaktorer	Tillväxtfaktor receptorer			Signalförmedling		Påverkar DNA	
SIS	ABL	FMS	MET	ras	RAF	myc	JUN
FG1-7	TRK	RET	FMS	ABL	MOS	MYB	SKI
INT-2	BEK	ERBB1 och 2		SRC	FES	FOS	REL
					FGR		

#### 4.2.4 DNA reparationsgen

Det är bara vissa skador som leder till att cancer uppkommer. En skada som uppstått kan också orsaka cellens apoptos. Kroppen har olika korrigeringsmekanismer som upptäcker fel i DNA-strängen och korrigerar felet. En tumör uppstår, då denna korrigeringsmekanism brister i sin uppgift. Det finns två huvudtyper av DNA-skadors reparationsmekanismer: Mismatch repair (MMR) och "nucleotide excision repair". Med MMR repareras och korrigeras felaktigheter i DNA replikationen. Det är vanligen de korta sekvenserna (i så kallade mikrosatelliterna) av DNA korrigeringar som är mottagliga för dessa MMR typ av störningar. (Joensuu m.fl, 2013, s. 23–24). I en gen finns det kategorier som spelar en viktig roll i cancerutvecklingen beroende på deras funktion inom tillväxten, hämningen och i reparationen. Tabell 2 redovisar vilken mutation behövs, vilken eller vilka genmutationer eller kromosomala biomarkörer är med i processen samt vilken cancerform det gäller. Detta leder till en dottercell som bär på mutationen och DNA-skadorna, men också är mer mottaglig för ytterligare skador. Detta betyder, att försämrade DNA-reparationsgener kan ärvas som könsmutationer, hämmas genom epigenetiska mekanismer eller vara ett resultat av förvärvade somatiska förändringar. (Kasper m.fl., 2016, s. 394 – 396).

Mikro RNA (miRNA) profiler kan användas inom cancersjukdomar för diagnostisering, vid prediktiva prognoser för behandlingen och som etiologiska biomarkörer (Guled & Knuutila, 2013, s.1661–

1669). miRNA är korta, 21–23 baspar långa RNA-molekyler. Dessa reglerar genuttrycket och har en roll i cancers utveckling. (Joensuu m.fl., 2013, s. 21). miRNA kodar inte för proteiner, utan till dess uppgift hör att fästa sig i en målgen och reglera meddelande-RNA genom epigenetisk redigering d.v.s onkogenen och tillväxtreglerande-genen. En miRNA kan ha tiotals till hundratals olika målgen. En målgen kan regleras av flera olika miRNA. miRNA aktiviteten påverkar celldifferentieringen och vävnadens specifika genuttryck. Uttrycket av miRNA- molekyler förändrar sig i cancervävnaden. (Isomursu, Kononen & Kuopio, 2015, s. 424 - 432). miRNA finns i DNA:ts intron- och exon- områden. I en tumör kan miRNA reglera felaktigt (Guled & Knuutila, 2013, s. 1661).

Det är bara få skador som leder till cancer. En skada som uppstått kan också orsaka cellens apoptos. Kroppen har olika korrigeringsmekanismer som upptäcker fel i DNA- strängen och korrigerar felet. En tumör uppstår, då denna korrigeringsmekanism brister i sin uppgift. (Joensuu et al, 2013, s. 17).

### 4.3 Tumörsupressorgen

Kasper m.fl. (2016, s. 397) kallar tumörsupressorgen också för anti-onkogen. Enligt Kasper m.fl regleras celltillväxten av tumörsupressorgen, genom att begränsa celldelningen, hjälpa DNA-reparationen och framkalla en programmerad celldöd i sådana celler som annars kunde orsaka skada. Tabell 4 visar olika tillväxtreglerande gen och vilken tumör den hör till. Inaktivering av någon av dessa denna gen leder till en ökning av celldelningen. Tillväxtreglerande gen p53 är den vanligaste som har hittats i nästan alla cancertyper. För att en tumörsupressorgen skall inaktiveras behövs det att båda allelerna inaktiveras. Detta kallas också "Two-hit-teori". Tumörsupressorgen kan indelas i tre grupper enligt deras normala funktion: "Gatekeepers"- gen, "Caretaker – gen " och "Landscape-gen". (Joensuu m.fl.,2013, s. 20)

Gatekeeper-genen påverkar cellen genom att hindra celldelningen eller genom att öka celldöden (apoptosen). Målorganet bestämmer vilken betydelse "gatekeepergenen" kommer att ha, till exempel; en mutation i APC-genen orsakar cancer i tjocktarmen men inte njurcancer. (Joensuu m.fl., 2013, s. 20)

Tabell 2. En tabell som förevisar olika genomiska mutationer och biomarkörer till en specifik cancerdiagnos

<b>Genomiska mutationer som stör cellens differentiering och funktion i cancer</b>		
<b>Typ av förändring</b>	<b>Genmutation och/eller kromosomal biomarkör</b>	<b>Cancer Diagnos</b>
<b>Reparation av DNA</b>	MSH2, MSH6, PMS2, MLH1	Ärftlig tjocktarmscancer
	XPA,XPC	Hudcancer
	ATM	Lymfom, leukemi, bröstcancer
	MRE11	Bröstcancer
	WRN	Sarkom, ändtarms-, hud-, tyreoida, pankeascancer
<b>Kromosomala förändringar</b>	Kromosomerna 9 och 22/ BCR och ABL gene	Kronisk myeloisk leukemi
	Kromosomerna 8 och 14/ MYC och IG gener med "heavy chains"	Burkitt lymfom
<b>Onkogener</b>	ERBB (HER-2)	Bröstcancer
	MYC	Lungcancer
	RAS	Pankreas, ändtarms- och lungcancer
	EGFR	Lungcancer
	MITF	Melanom
	Mutant B-Raf	Melanom
	Cyclin E	Lever cancer
	B-Catenin	Cancer i kolon
	K- rasv	Pancreas cancer
	K-ras	Pancreas cancer
Cyclin D1	Esofageal. Kolon, pankreas, skivepitelcancer och cancer i nasopharynx	
<b>Tumor-suppressorgen</b>	BRCA1, BRCA2	Bröst och äggstockscancer
	RB1	Retinoblastom
	WT1, WT2	Wilms tumör
	CDKN2A	Melanom
	APC	Ändtarmscancer
	VHL	Cancer i njurarana
	NF1, NF2	Tumör i nerverna/ hjärnan
	TP53	Har identifierats i över 50 % av cancer hos människan
<b>Källa:</b> Kasper, C. E., Schneidereith, T. A. & Lashley, F. R. (2016). Lashley's essentials of clinical genetics in nursing practice (2nd ed.). New York, New York: Springer Publishing Company, s. 395-396.		

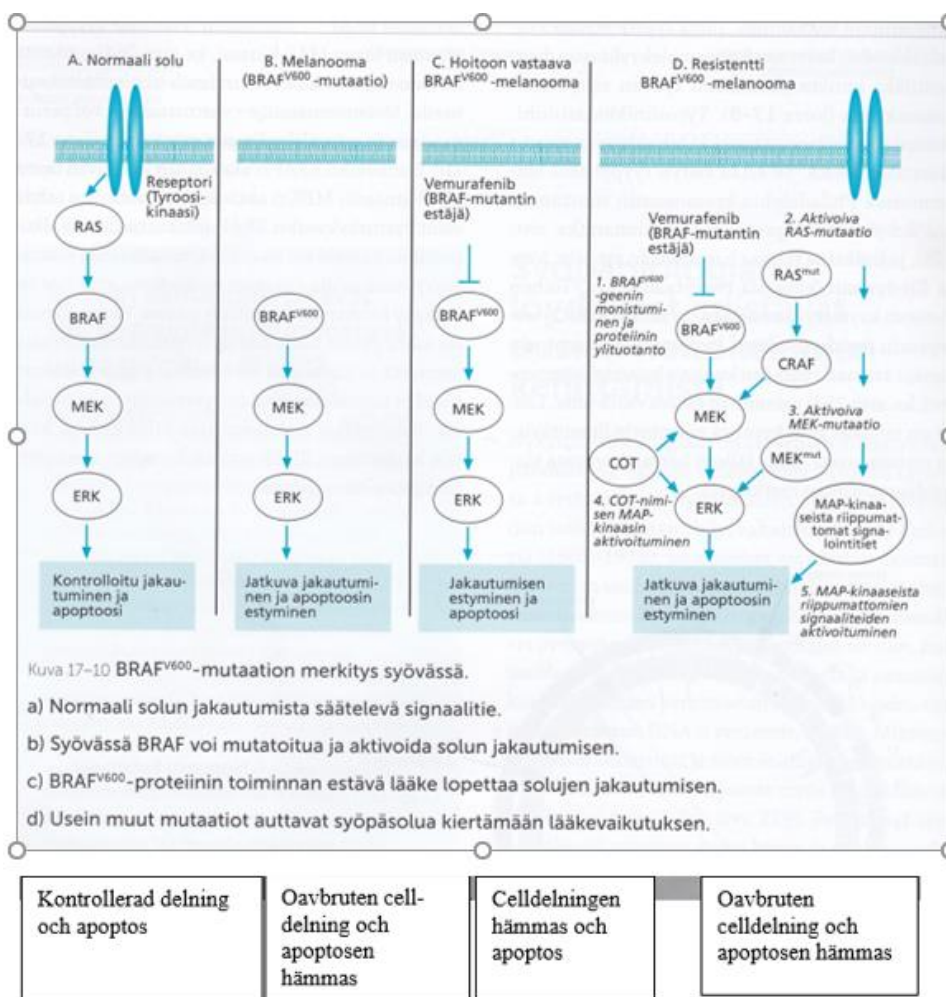
Caretaker-gen involveras i DNA – reparationen med att förhindra uppkomsten av anhopning av mutationer. Ifall de inaktiveras uppkommer det lättare andra mutationer, och deras samverkan leder till cancer. Exempel på caretaker- gen är MLH1, MSH2 som påvisas vid hereditär tjocktarmscancer och BRCA1 och BRCA2 som påvisas vid hereditär bröstcancer. (Joensuu m.fl., 2013, s. 20)

Landscafer-genen skall styra vävnadens tillväxt, på ett sätt så att den förhindrar tumörtillväxt. (Joensuu m.fl., 2013, s. 19 - 20). Cellen kan förändras, så att den inte mera är beroende av sin miljö eller andra celler. Cancersjukdomar karakteriseras av att det uppstår lokala tumörer. Den ursprungliga tumören kan skicka ut metastaser till andra platser i kroppen. En okontrollerbar tillväxt av cellen kan leda till en tumör med egna blodkärl, som kan invadera till den omkringliggande vävnaden.. (Joensuu m.fl., 2013, s. 20)

#### **4.4 Betydelsen av cancermedicin i vården**

De senaste årens snabba utveckling inom cancer samt den utveckling inom molekylärbiologiska tekniker, har utformat den precisionsmedicin och onkologibehandlingen som finns idag. (Fernández- Lázaro, Hernández, García, Córdova, Mielg-Ayuso & Cruz- Herná'ndez, 2020). Inom cancervården indelas vården som prediktiv, preventiv och individualiserad vård. Hos en frisk person kan medicinsk genetik användas inom prediktiv vård som hjälpa till att förutse riskerna för att insjukna i vissa sjukdomar. Med preventiv vård kan man förebygga sjukdomar på basen av olika riskfaktorer. Individualiserad vård är när valet av behandlingar baserar sig hos en person på personens genominformation. (Aittomäki m.fl., 2016, s. 15).

Cancerläkemedlet grundar sig i att hämma DNA-syntesen. Det är inte enbart cancercellerna som påverkas av medicineringen utan alla cellerna hämmas i kroppen. Därför har cancermedicinerna sidoeffekter, som påverkar de celler som har en snabb cellfördelning, till exempel blodproducerande cellerna i benmärgen. Mutationer som främjar cancer finns många och varierar från tumör till tumör. Därför påverkar ett läkemedel bara vissa cancerformer. Därför behövs det molekylär diagnostik för att kunna precisera läkemedlet till de specifika egenskaper hos enskild cancer. En allmänt använd precisionsmedicin, som hindrar tillväxten av ErbB2 (HER2) – receptor och medicinen är effektiv endast i bröstcancer, som uttrycker denna receptor. (Heino & Vuento, 2019, s. 334). Proteinbaserade biomarkörer, såsom human epidermal tillväxtfaktorreceptor 2 (HER2 eller känd som ERBB2) i bröstcancer, fungerar som en markör vid prognos av bröstcancer, liksom en effektiv användning för behandling med trastuzumab, som är en HER2-specifik monoklonal antikropp. Figur 6 beskriver hur en normal cell fungerar och vad BRAF V600 mutationen har för betydelse för vården och patienten. (Heino & Vuento, 2019, s. 336).



Figur 6. BRAF V600- mutationens betydelse i cancer. Förklaringar till bilderna A-D. A) Normal cell, B) I tumören kan BRAF genomgå en mutation och aktiveras i celldelningen, C) En BRAFV600-proteinhämmande läkemedel stoppar celldelningen, D) Andra mutationer kan hjälpa cancercellen att undvika läkemedelseffekten. Bilden är tagen från Heino och Vuento bok Biokemia ja solubiologia, 2019, s. 336.

## 5 Diagnostik – Biomarkör

Ännu idag har den kirurgiska- och strålbehandlingen en viktig roll inom olika användningsområden i behandlingen av cancer. National Cancer Institute (NCI) of the Institutes of Health (NIH) definierar biomarkörer som:

*”En biologisk molekyl som finns i blod, andra kroppsvätskor eller vävnader som är ett tecken på en normal eller abnormal process, eller på ett tillstånd eller sjukdom. En biomarkör kan användas för att se hur väl kroppen reagerar till en behandling för en sjukdom eller ett tillstånd.”*

Enligt NCI, National Cancer Institute, (u.å.) räknas som tumörmarkörer, allt som finns eller produceras av cancerceller, men också andra benigna tillstånd, som ger information om canceren,

t.ex. dess aggressivitet, om den kan behandlas med målinriktad behandling eller om den svarar på behandling. Tidigare betraktades som tumörmarkörer de proteiner som producerats i höga mängder av normala eller/och cancerceller. Tumörceller utsöndrar dessa i högre halter än icke-maligna celler. Dessa ämnen finns i olika sekret hos människan, såsom i blod, urin, avföring, tumörer eller i andra vävnadsvätskor. Tumörmarkörerna uppdelas enligt deras användningsområde inom cancervården, i: cirkulerande tumörmarkörer och tumörvävnadsmarkörer. De cirkulerande markörerna kan upptäckas hos cancerpatienter, i blodet, urinen, avföringen eller andra kroppsvätskor. Dessa markörer används för att få en uppskattning om prognosen, ge information om kvarvarande cancerbördan efter behandlingen eller sannolikt återfall, bedömningen av behandlingsresponsen och för övervakning av resistens mot behandling samt i screeningsyfte. Cirkulerande tumörmarkörer användning kombineras med bland annat biopsier.

## 5.1 Vad är genetisk testning

Inom hälsovården används genetiska tester för att erhålla information om en persons kromosomer och DNA i syfte för att utreda om personens ärftlighet till olika genetiska sjukdomar. Som DNA-källa används oftast blod eller vävnadsprov. Före en gentest behövs DNA sekvenseras. Där kartläggs ordningsföljden av nukleotiderna Adenin, Tymin, Guanin och Cytosin och kallas för sekvensering. I HUGO – projektet finns människans genom kartlagd. Den ligger för grund för den kunskapen om genens ordningsföljd och var de finns. Efter sekvenseringen kopieras provet för att analyseringen skall bli enklare. Sekvenseringen kan göras av enskild gen, hela genomet eller en hel kromosom. (Genteknik B, u.å.). Genetiska tester uppdelas bland annat i prediktiva, diagnostiska och farmakogenomiska tester. Prediktiva tester används för riskbedömning att insjukna i en viss sjukdom (till exempel att insjukna i bröstcancer), diagnostiska tester används då det önskas att utesluta misstanken om en genetisk störning/sjukdom. Farmakogenetisk test ger information om hur personen reagerar på ett läkemedel och hjälper hälsovården att rikta rätt behandling till exempel till cancerpatienten. (Kurreck och Stein, 2016, s.379–380)

## 5.2 Biomarkörer och Prediktiv cancerdiagnostik

I detta avsnitt redogörs för olika vätskebiopsier, såsom cirkulerande tumörceller (CTC), cellfritt DNA (cfDNA), cirkulerade DNA (ctDNA), vesikler och exosomer. Med individualiserad vård avses när valet av behandlingar baserar sig hos en person på personens genominformation. (Aittomäki m.fl, 2016, s. 15). Vätskebiopsin används framför allt inom individuell anpassad cancervård, för att få i realtid en inblick i tumörens utveckling och för att kunna finna rätt behandling (Rossi & Ignatiadis, 2019). Inom cancerdiagnostiken och -forskningen används begreppet vätskebiopsi (engl. liquid biopsy). Vätskebiopsi definieras som: blod, eller annan kroppsvätska, som används som tumörmarkör.

Vätskebiopsin kan förutom från blodet analyseras från likvor, urin, saliv och pleura. (Isomursu, Kononen & Kuopio, 2015). Patienter med olika cancerformer har olika genetiska mutationer och epigenetiska förändringar. Under den tid då cancer utvecklas ökar den intratumoral heterogeniteten, som försvårar behandlingen av tumören. DNA kan påträffas i blodomloppet endast mellan ½ till 2 timmar. Vid maligna tumörer kan DNA upptäckas för det mesta i små mängder ofta under 1 %. (Strumfa & Gardovskis, 2019, s. 1-3)

### **5.2.1 CTC - Cirkulerande tumörceller**

CTC är tumörceller som har lösgjort sig aktivt eller passivt från primärtumören eller från metastasen. Den kan invadera olika organ. Endast en liten del av CTC utvecklas till verkliga metastaser. Det har verifierats att CTC kan vara starkt heterogent också inom samma individ. CTC:s närvaro i blodet ger en bättre bild för individualiserad behandling, då CTC representerar celler både från den primära tumören och från metastasen. (Rifai, 2019, 978 - 979). CTC är ca 8 – 20 µm långa. (Fernández-Lázaro m.fl., 2020, s. 4-5)

### **5.2.2 cfDNA**

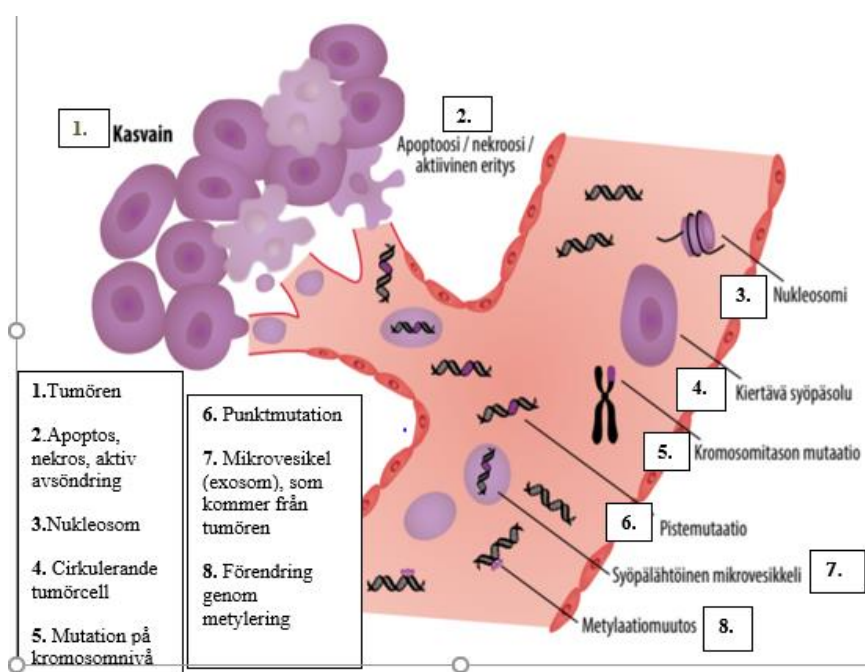
cfDNA kallas också för cellfritt DNA. cfDNA förekommer i all DNA som förekommer i kroppen (organismen), också hos friska personer. Hos patienter med cancer sker en ökning av cfDNA halten i blodet. (Isomursu m.fl., 2015). Alla celler (benigna och maligna tumörer) slungar ut DNA i blodomloppet, som kallas cellfritt DNA (cfDNA). Olika sjukdomar (cancer, njursvikt, myokardinfarkt) kan också orsaka högre mängder av cfDNA i blodomloppet, genom utsöndring av tumörceller som cfDNA eller som cellhärledda vesikler s.k. exosomer. Detta sker genom att fagosyterna äter upp tumörceller, och utsöndrar tumörcellerna, eller genom tumörcelldöden d.v.s genom nekros eller apoptos. cfDNA är extracellulär DNA i blod och andra kroppsvätskor, som frigörs som korta baspar (150-200 bp långa fragment) från både normala och tumörceller genom cell- eller vävnadsdöd. cfDNA nivån är högre hos sjuka än friska personer. Med att analysera cfDNA kan det påvisas en tidig bildning av läkemedelsresistens, möjlig restsjukdom eller återfall. Därför anses analysering av cfDNA som en potentiell screeningmetod för tumördiagnos samt användningen för att upptäcka tumörrelaterade avvikelser i perifert blod. (Huang, Du & Wang, 2019, s. 1). I enlighet med Huang, Du och Wang, i artikel (2019) framgår det att nästa generations sekvensering är användbart för analysering av cfDNA, som upptäcker cancerrelaterade genetiska och epigenetiska förändringar såsom mutationer, CNVs och förändringar i DNA metylering bland bredare genomiska områden i många cancer typer. Att kunna upptäcka cancer med hög specificitet och känslighet är fortfarande en utmaning, framför allt cancer i tidigt stadium. Det finns ännu flera hinder för användning av cfDNA i kliniska tillämpningar, inklusive brist på väl accepterade



provsamlingsprotokoll och känsliga detektionsmetoder. För analyseringen av cfDNA-sekvenseringsdata fordras det specialiserade bioinformatikverktyg för identifiering av starka biomarkörer för klinisk användning. cfDNA elimineras i lever, mjälten och njuren. (Kustanovich m.fl, 2019)

### 5.2.3 ctDNA

ctDNA, cirkulerande tumör DNA härstammar från tumörceller ( Isomursu m.fl., 2015, 424). Hos cancerpatienter har det kunnat mätas en större mängd cirkulerande cell fritt DNA än hos friska individer. Normalt rensas apoptotiska och nekrotiska cellerna bort genom infiltration av fagocyterna. Under tumörens tillväxt ökar cellomsättningen som orsakar en större mängd av apoptotiska och nekrotiska celler. Den ökande celldöden medför en uppsamling av döda celler (cellulär debris) också DNA, som frisätts i blodcirkulationen. Sådan DNA kallas också ct-DNA (cirkulerande tumör DNA). ctDNA kan isoleras från patientens serum eller plasma. ctDNA kan det påvisas olika genetiska förändringar s.k. tumörspecifika mutationer, variationer i antalet kopior, kromosomförändringar. Figur 7 illustrerar hur ctDNA och CTC kommer ut i blodomloppet.



Figur 7 Bilden illustrerar hur ctDNA kommer ut i blodomloppet s. . Tumör = Kasvain, Cirkulerande cancer cell (ctDNA) = kiertävä syöpäsölu. Källa: Isomursu, A., Kononen. J. & Kuopio, T., 2015.

#### 5.2.4 Vesikler, exosomer

Cellerna tar upp signaler från sin omgivning in i cellen genom små membranomslutna blåsor d.v.s. vesikler. Dessa är 30–100 nm stora vesikler som omringar cellmembranen och innehåller bland annat meddelande RNA, mikroRNA, signalproteiner och lipider. Dessa exosomer kan med biomolekyler orsaka förändringar i genuttrycket hos cellen och kan på detta sätt påverka cancercellen. Exosomen är kapabla att transportera läkemedel ut från cellen och kan på detta sätt orsaka att cellen responderar sämre till cancerläkemedel. (Heino & Vuento, 2019, s. 211–2012).

## 6 Vätskebiopsi

National Cancer Institute (NCI) definierar "Liquid Biopsy" som: ett test som upptäcker cirkulerande tumörceller eller bitar av DNA från tumörer i blodet. Vätskebiopsi används i diagnostiken för att upptäcka cancer i ett tidigt skede. Det används också vid planering av behandling eller att ta reda på hur bra behandlingen fungerar eller om cancer har recidiverat. (NCI Dictionary of Cancer Terms, u.å).

Vätskebiopsin representerar ett spektrum av molekylära teknologiska analyser från blodet och andra biologiska vätskor. Vävnadsbiopsin anses inom onkologin vara den gyllene standarden men vätskebiopsi betraktas vara minst lika informativ som vävnadsbiopsin. Vävnadsbiopsier eller kirurgiska ingrepp fångar endast bråkdel av cancercellerna hos patienten i jämförelse med en test som baserar sig på ett blodprov eller så kallad vätskebiopsi. Vätskebiopsi ger en insyn i den fasta tumörens utveckling i realtid, då molekylär information fås ifrån CTC eller ctDNA. Efter att en vävnadsbiopsi har tagits kan det ske förändringar i tumören, som inte kan ses i den vävnadsprobit som tagits i ett tidigare skede. Därför anses vätskebiopsi vara ett ypperligt tillägg, för dessa två biomarkörer anses vara ypperliga för att diagnostisera möjliga förändringar i tumören. Dessa kan också vara till nytta vid identifieringen av terapeutiska läkemedel, eller få information om möjliga resistenta mekanismer och för realtidmonitorering av behandlingens effektivitet. (Strumfa & Gardovskis, 2019, s. 3).

### 6.1 Jämförelse mellan vävnadsbiopsi och vätskebiopsi

Fördelar med vätskebiopsin är att den är lätt att ta på nytt. Under sjukdomens förlopp sker det förändringar i genomet, som kan visa sig påverka till exempel medicineringen och med ett blodprov kan detta verifieras. I tabell 5 beskrivs fördelarna och nackdelarna som vävnadsbiopsin och vätskebiopsin har.

Enligt Strumfa och Gardovskis (2019, s. 1–2) kunde två rör med 7,5 ml blod säkerställa det diagnostiska tröskelvärdet för diagnos med en hög känslighet (85,3%) och specificitet (90,3 %). Vävnadsbaserad analysering med NGS har specifika begränsningar till exempel, en lång genomströmningstid från det att provet mottas till slutliga resultatet, som igen kan försena behandlingen. Under behandlingen av patienten kan också tumören genomgå genomiska förändringar, vilket kan resultera i en förvärvad sekundär resistens, som inte kan påvisas med den tagna vävnadsbiopsin. Upprepade vävnadsbiopsier kan inte alltid utföras p.g.a risken för komplikationer. Dessutom måste man ta i beaktande att vävnadsbiopsin eller vävnadssnittet representerar tumören just i den tid och rum som den tas. Därför är det svårt att kunna upptäcka tumörens intratumorala genetiska heterogenitet, som behövs vid val av behandlingen av tumören. (Nakamura & Shitara, 2020)

Tabell 4. Jämför vävnadsbiopsi och vätskebiopsi med varandra. Källa: Underwood et al, 2020, s.7.

Vävnadsbiopsi	Versus	Vätskebiopsi
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Tas från tumörvävnaden</li> <li>- Minimalt invasiv</li> <li>- Minimala fynd</li> <li>- Hinder som måste genomgås:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Geografiska barriärer (anatomiska?)</li> <li>• Behov av expert vid vävnadsbiopsin (radiolog, tas med ultraljud)</li> </ul> </li> <li>- Risk för komplikationer</li> <li>- Inte möjligt att ta biopsier i flera omgångar hos vissa patientpopulationer</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- Indirekt provtagning av tumörkomponenter såsom CTC, cfDNA, miRNA, exosomer</li> <li>- Icke invasiv</li> <li>- Mindre resurskrävande</li> <li>- Hinder som måste genomgås:               <ul style="list-style-type: none"> <li>• Färre geografiska barriärer, då blodprov kan skickas till regionala center</li> <li>• För provtagningen behövs ingen specialist t.ex. radiolog</li> <li>• Låg risk för komplikationer (endast de som är associerade till blodprovstagningen)</li> <li>• Lämplig för serieprovtagningar</li> </ul> </li> </ul>

## 6.2 Fördelar och nackdelar med vätskebiopsin

cfDNA halveringstid i blodet varierar från några minuter till 1–2 timmar. Den korta halveringstiden är till nytta för analyser i ”realtid”. Halveringstiden för cfDNA beror på flera faktorer t.ex., cfDNA:s förening med molekyllära komplex som förhindrar en snabb nedbrytning, eller i vilket stadium tumören befinner sig eller vilken typ tumören är. (Kustanovich m.fl, 2019).

Enligt artikeln som Rossi och Ignatiadis har skrivit (2019) finns det olika förväntningar och svårigheter i att använda vätskebiopsi inom precision medicin. Deras artikel tar fram olika preanalytiska faktorer och analytisk validitet som borde uppmärksammas vid användningen av

analyser som använder vätskebiopsi. CTC och ctDNA finns i låga koncentrationer i blodet och sätter gränser för användningen av vätskebiopsin speciellt för en cancer i tidigt stadium. Att ta större mängd blod kan vara svårt att utföra. (Rossi m.fl, 2019)

Den största utmaningen när det gäller ctDNA analys är, frisättningen av genomiskt DNA (gDNA) från leukocyterna och nedbrytningen av dem under transporten och provbearbetningen samt av ctDNA fraktionen kan spädas ut av den frisättningen av DNA från friska celler. Detta kan orsaka att analyskänsligheten och -kvantifieringen försämras. Speciellt i de fall då koncentrationen av ctDNA är lågt. Därför rekommenderas specialrör för ctDNA, för att dessa innehåller stabiliserande ämnen för leukocyterna. (Gerber m.fl, 2020).

Gerber m.fl (2020) gjorde en studie där det jämfördes olika preanalytiska faktorer, bland annat lagrings- och transporttiden, temperaturens påverkan för olika provtagningsrör och olika blodprovsmaterial (serum och plasma) samt om det är möjligt att använda "rör från rutinhematologin" ifall det tas i beaktande preanalytik gällande tid och temperaturgränser. Deras studie visade bland annat att:

- Det är möjligt att använda sig av rutin – EDTA-blodprovsvrör ifall de provbehandlingen sker inom godkända tidsintervall och temperaturgränser. ctDNA är hållbar i edta rör då de lagras för maximum 4 timmar i +24 C eller upp till 24 timmar i +4 timmar.
- Ifall ctDNA prov skall skickas till analyseringslaboratoriet som finns längre borta, borde stabiliserande specialrör användas.
- Som material är plasma att föredra framför serum, men heparin föredras inte att användas för den kan interfereras med PCR.
- För cfDNA i, men det är bra att komma ihåg följande aspekter: Roche cfDNArör och PAXgene ccfDNA rören är gjorda av plast. Streck BCT rör är av glass. Plaströren är säkrare att använda vid provbearbetning och provförsändelse. Användning av glaströr kan vara ett säkerhetsproblem.

I artikeln till Huang, Du, och Wang, (2019) tas det upp specifika utmaningar i känslighet (specificiteten) för att upptäcka genetiska avvikelser. För det mesta innehåller cfDNA endast en liten fraktion ctDNA för en stor del av cfDNA härstammar från andra celler än cancerceller. Hos cancerpatienter i tidigt stadium kan ctDNA vara lägre än 0,1 %. Enligt Huang uppnås vid analysering av cfDNA med nästa generations sekvensering en hög specificitet och sensitivitet. Utmaningar som framkom i artikeln var att det behövs mera kunskap om de målinriktade genen, analysen täcker inte hela mångfalden av mutationerna i specifika genen och kan orsaka att det inte upptäcks viktiga/ relevanta mutationer i provet. Det behövs en känslig bioinformatik för att igenkänna förändringar som uppkommer vid cancer.

Enligt Nakamura & Shitara (2020) finns det andra orsaker till frisättningen av cfDNA och önskar forskning där preanalytiska variablernas uppmärksammas. Dessutom påminner de att ctDNA koncentrationen varierar mellan olika tumörtyper. Vävnadsbaserad analysering med NGS har specifika begränsningar så som, en lång genomströmningstid från mottagandet av provet till slutliga resultatet, som igen kan försena behandlingen. Under cancerbehandlingen kan också tumören genomgå genomiska förändringar, vilket kan resultera i en förvärvad sekundär resistens, som inte kan påvisas med en vävnadsbiopsi. Upprepade vävnadsbiopsier kan inte alltid utföras p.g.a risken för komplikationer. Dessutom måste man ta i beaktande att vävnadsbiopsin eller vävnadssnittet representerar tumören just i den tid och rum som den tas. Därför är det svårt att kunna upptäcka tumörens intratumoral genetiska heterogenitet, som behövs vid val av behandlingen av tumören.

Det är flera forskare som hänvisar till att det finns behov för standardiserade anvisningar och processer samt valideringar om provtagning, protokoll av analysförfarandet (Neumann, Bender, Krahn & Schlange, 2018). Neumann m.fl (2019) ser ett behov av integrerade arbetsflöden, som skulle täcka kraven, d.v.s. standardiserade anvisningar för alla faser inom laboratorieprocessen från provtagning, analysering och resultattolkning inklusive bioinformatik analysen. Blodprovstagningen borde ske med certifierade specialrör med stabilisator, som är lämpad för ifrågavarande analys. Dessutom borde finnas anvisningar om provhanteringen, lagringen och transporten av blodprovet samt centrifugeringen. Beroende på om analysen är CTC, ctDNA eller miRNA och liknande finns det behov av att använda speciella metoder för extrahering, isolering och kvantifiering. Genomförandet av en optimerad validerings anvisning för beredningen av varje analys, som skall dokumenteras för utvärdering av resultatet. Det utkommit till marknaden många olika tekniker, finns det brist på analyser som kan erbjuda reproducerbara, robusta, kostnadseffektiva och lättanvända arbetsprocesser.

## **7 Provtagningsrör för cfDNA**

För att provet vid analyseringen skall innehålla den information som fanns i blodet vid provtagningen är det viktigt att det följs de anvisningar för pre-analytiska och analytiska faktorer. I detta kapitel skall jag redovisa för de tre oftast förekommande provtagningsrör som tas upp i olika artiklar vid användningen inom cfDNA. Jag redovisar också för jämförelsestudier för olika cfDNA rör. För provtagningsrör från olika leverantörer cfDNA BCT är provtagningsordningen olika. Därför är det alltid viktigt att kontrollera hur provtagningen skall ske för att det inte skall ske överföring mellan rören eller och patienten. I rutinarbete är det viktigt att kunna använda tillförlitliga och mycket sensitiva rör för blodprovstagning, då det önskas upptäcka låga koncentrationer av ctDNA.

## 7.1 Streck BCT specialrör

Streck är ett företag i USA som levererar cf- DNA BCT rör för kliniskt bruk och rör för forskningsbruk. Dessa 10 ml provtagningsrör innehåller stabiliserande lösning som säkrar hållbarheten för cellfria DNA i blodet genom att förhindra kärnförsedda celler att förstöras. I Streck cellfritt DNA BCT® RUO & CE rör är CTC (cirkulerande tumörceller) hållbara i 7 dagar i en temperatur mellan 15° C till 30 ° och cf-DNA i 14 dagar i temperaturer mellan 6 ° C till 37 ° C. Provtagningsföljden skall följas enligt CLSI standardanvisningar "CLSI Document GP4". Streck's cfDNA BCT kan tas som enda röret, men ifall andra rör under provtagningen, skall BCT röret tas efter Edta rör och före fluoridoxalatröret. Streck rekommenderar att ta ett z-rör (utan tillsatser) eller edta som ett "waste"- rör (jfr i Sverige används slaskrör) efter heparinrör. Det är viktigt att använda en hållare eller nålstorlek som Streck rekommenderar att använda. Vid användning av en för liten nålstorlek, fylls röret långsammare. Ifall en fjärilsnål används skall det alltid användas ett z-rör eller Edtarör för att eliminera att röret inte fylls tillräckligt. Det är viktigt att försäkra om att patientens arm är i nedsatt läge för att undvika tillbakaflöde från provtagningsröret till blodådern. Röret skall sättas in i hållaren på det sättet att nålen går igenom rörets hatt ordentligt. Provtagaren skall vänta att blodet slutar att rinna i röret innan röret avlägsnas för röret saknar märke för att blodmängden är tillräckligt. Efter provtagningen skall röret blanda i 10 ggr (1 ggr är en vridning på 180° och tillbaka). Följ Streck's centrifuganvisningar för röret i fråga. På Streck's websida finns anvisningar om provtagning och centrifugering av cf-DNA BCT rör samt datasäkerhetsinformation. (Streck, u.å.)

## 7.2 Roche BCT specialrör

Roche cfDNA provtagningsrör är gjorda av plast (hållbarare och säkrare i användning), har en volym på 8,5 ml vätska, och med K3Edta som koagulationshämmare. Konserveringsmedlet för cfDNA skyddar kärnförsedda celler att gå sönder och ger en bättre stabilitet för provet under transporten inom olika temperaturer. Dessutom är röret tillverkat av plast, som gör den tryggare för användaren. cfDNA BCT rör finns både i forskningssyfte (RUO format) och till klinisk användning (CE-IVD format). Produceras enligt ISO 9001 och ISO 12485. (Roche, u.å.a).

## 7.3 Qiagen BCT specialrör

Qiagen PAXgene blodprovtagningsrör för ccfDNA innehåller stabilisator för cirkulerande cfDNA (ccfDNA) och provvolym är 10 ml och är ämnat för forskare. Provtransporten och lagringen rekommenderas upp till 10 dagar. Qiagen rekommenderar en standardiserat preanalytiskt blodprovstagning och rekommenderar att provtagningsordningen följs CLSI GP41 7:de versionen för Provtagningen av diagnostiska blodprov från ven. Under provtagningen med Qiagen Paxgene

rör skall det undvikas att blodet sugts tillbaka till venen. BCT röret skall tas till sist för att undvika av överföring av tillsats till andra rör. Rörets stabilisator reagentet skall minimera att cellerna förstörs, specialröret minskar skillnaderna som kan orsakas av transport- och lagringsbetingelser och har en direkt koppling till ccfDNA reningsinstrumentet. (Qiagen, u.å.)

#### 7.4 Forskningar om kvaliteten av cfDNA rören

Utvecklingen inom molekyl diagnostiken har möjliggjort användningen av olika tekniker som modifierar, amplifierar, påvisar närvaron av, separerar samt sekvenserar nukleinsyror. Diagnostiken har blivit snabbare, bättre och billigare. Den teknik som används inom molekylär diagnostik måste kunna registrera extremt låga koncentrationer av nukleinsyramängder med komplexa genomiska strukturer. För att provet vid analyseringen skall ge den information som fanns i blodet vid provtagningen, är det viktigt att det följs anvisningar för preanalytiska och analytiska faktorer och hur de inverkar på slutliga resultatet. För att säkerställa resultatets riktighet vid mycket låga ctDNA koncentrationer, är det viktigt att i rutinarbete kunna använda tillförlitliga rör med stabilisatorer vid blodprovstagningen. Vätskebiopsin innehåller cirkulerande tumörceller (CTC), cirkulerande tumör-DNA (ctDNA), exosomer och miRNA. Vätskebiopsi används inom onkologin för diagnostisering och behandling av cancer såsom screening, bedömning av tumörheterogenitet, läkemedelsresistens och prognos. ctDNA kan användas för att övervaka den terapeutiska effekten. Orsaken till att ctDNA är svår att upptäcka beror på att cirkulerade DNA-molekyler finns i blodet i mindre mängder än icke- cancerrelaterade DNA fragmenten. (Bai & Zhao, 2018)

För att ctDNA kvaliteten och kvantiteten skall vara jämna och att resultatet är jämförbart och reproducerbart behövs det standardisering av preanalytiska faktorer för uppsamlingen och isoleringen av DNA. (Gerber et al, 2020, 1071; Grözl, Hauch, Schlumpberger, Guenther, Voss, Sprenger-Haussels & Oelmüller,2018).

I en artikel från år 2018 jämfördes det 9 olika provtagningsrör för cfDNA, CTC och ctDNA från följande leverantörer (Leverantör, land/ provtagningsrörets namn): Streck (USA) / Cell-Free DNA BCT, PreAnalytix (Switzerland) / PAXgene® Blood ccfDNA Tube, Roche Diagnostics (Schweiz) / ccfD Tube, Biomatrix (USA) / LBGard™21-ccfDNA Tube, Mabio Genomics Inc (USA) / Blood Stasis™21-ccfDNA Tube, Norgen Biotek (Canada) / cf-DNA Preservative Tube, EONE – DIAGNOMICS (Korea) / Nice® Check cfDNA Tube, CFGenome LLC (USA) / Blood Exo DNA ProTeck® och Improve Medical Instruments Co (China) / ImproGene Cell Free DNA Tube. Rörens blodvolym gick från 3,0 ml – 10,0 ml. En leverantör uppgav rörets blodvolym i ml (CFGenome LLC). I artikeln beskrevs det också vilka pre-analytiska faktorer som möjligen har en inverkan på resultatet av ccfDNA. Följande

preanalytiska steg har en påverkan på analysresultatet: provtagningsröret, tiden mellan provtagningen och avskiljningen, anvisningen för processen av plasma, plasmats lagring, DNA reningsmetod, DNA kvantifieringen och lagringen av DNA:t. Europeiska standardiseringskommitteen, CEN, och SPIDIA har startat med evidensbaserat standarddokument som skall täcka alla preanalytiska arbetsprocessen för molekylära in vitro diagnostiken. (Grözl m.fl, 2018).

Alidousty, Brandes, Heydt, Wagener, Wittersheim, Schäfer, Schultheis (2017) har gjort en studie där de jämfört och utvärderat användningen av tre tillverkares rör för uppsamling av blod (cfDNA och ctDNA) och uppbevaring av plasma för isolering av ctDNA för rutinmässig molekylär diagnostik. Enligt studien kan alla tre från Streck, Roche Diagnostics och Qiagen tillverkarnas rör användas för en längre lagringstid för cfDNA blodprov. Med provtagningsrör från Roche och Qiagen var det möjligt att upptäcka mutationer även vid låga koncentrationer av ctDNA i blodet. Rörhanteringen och transporten fungerar bättre med Roches och QiaGENs rör då de har skruvkork och gjort av plast. Dessa leverantörers rör kan användas under samma omständigheter då det gäller långtidsförvaring av blodprover som innehåller. Andra studier har kommit till liknande resultat (Parackal, Zou, Day, Black, & Guilford, 2019; Gerber, Taschner – Mandl, Saloberger-Sindhöringer, Popitsch, Heitzer, Witt, „...” & Ambros 2020, Risberg, Tsui, Biggs, Ruiz-Valdepenas Martin de Almagro, Dawson, Hodgkin, . . . & Gale, 2018; Grözl, Hauch, Schlumpberger, Guenther, Voss, Sprenger-Haussels & Oelmüller, 2018)

Fördelar att använda specialrör är: att den förlänger processen mellan provtagning och centrifugering i jämförelse med Edta-rör utan stabiliseringsmedel, där centrifugering och avskiljning skall göras inom en kortare tidsram, ger möjlighet till lagring i rumstemperatur före sändning till analyslaboratoriet.

## 8 Validering

Också inom laboratorieprocessen, behövs preanalytiska faktorerna följas upp vid provtagningen av vätskebiopsin, d.v.s identifieringen av patienten och provmärkningen med patientens ID, kontrollering av att patienten har följt anvisningarna inför blodprovet, provtagaren väljer rätt material (nålstorlek eller butterflynål) för provtagningen och speciellt vid val av provtagningsröret för vätskebiopsiprovtagningen samt att sista användningsdatum är i kraft. Stasen skall användas enligt anvisningen från EFLM. Provtagningsföljden följs också som de olika leverantörerna har anvisat. Rören blandas efter speciell anvisning. (Simundic, Bölenius, Cadamuro, Church, Cornes, Dongen-Lases, . . . & Vermeersch, (2018). Förutom dessa preanalytiska faktorer vid provtagningen finns det också andra faktorer att ta i beaktande.



## 8.1 Preanalytik

Följande pre-analytiska faktorer som kan påverka analysresultatet är: valet av blodprovsröret, tiden mellan provtagning och avskiljningen av plasma, provmaterialet plasma eller serum, anvisningar om avskiljningen av plasma/serum, lagringen av plasmat, metoden för DNA rengöringen (purification), DNA kvantifieringen (quantification) samt lagringen av DNA med upprepade upptiningar (thawing) (Grölz m.fl., 2018).

I sin artikel tar Zhao, Li, Chen, Li, Luo och Xia upp (2019) om betydelsen av hur viktigt det är att minimera kontamineringen av gDNA på grund av att leukocyternas nedbrytning, för att uppnå ett tillförlitligt och exakt cfDNA nivå. Deras studie visar att komplexiteten och kvaliteten av NGS biblioteket är viktiga faktorer och påverkar bias i NGS resultatet, som orsakats av cfDNA. Enligt Zhao m.fl (2019) visar biblioteket komplexiteten hos NGS så att den återspeglar provets molekylära tillstånd vid provtagningstillfället. Deras studie visade att NGS bibliotekets kvalitet visade sig vara lika kvalitativt i rören från Roche, Qiagen och Streck efter 3 dagars lagring som kontrollgruppens. Det fanns ingen skillnad mellan de två rören. Studiet visade några begränsningar som borde tas i beaktande vida val av lämpliga BCT rör för studier. Roches BCT rör visade sig ha höga OD- värden (optical density) vid avläsningen (vid 414 nm) på dag 0 och dag 3. Till skillnad till K2-EDTA rören som var lägre än hos Roches eller Streck BCT rör. Detta torde bero på konserveringsmedlet i Roches BCT- i rör. Därför har det stor betydelse att standardisera provtagningsprocessen och välja lämpligaste rör för att uppnå tillförlitliga resultat som är i slutändan värdefull för patienten.

Enligt Qiagens anvisning (u.å.) om "Pre- analytical considerations Successful biomarker profiling from cell-free DNA " påverkar följande faktorer cfDNA analysen. Halveringstiden för cfDNA i blodet varierar mellan 15 minuter till 2,5 timmar och härstammar från ctDNA. Under reningsprocessen skall bland annat följande faktorer uppmärksammas: att använda rätt blodprovtagningrör, minimera tiden mellan provtagningen och centrifugeringen, rätt lagrings- och transportkoncept, screening för hemolys borde användas.

## 8.2 Preanalytik för gentester

Biomarkören skall återspegla provgivarens genetiska uttryck för undersökningen. Detta kräver av analysen och metoden förutom en hög grad av analytisk kvalitet, men också att den skall kunna uppfylla alla de preanalytiska kraven som behövs för att bevara stabiliteten och förhindra en oönskad nedbrytning av det genetiska materialet och undvika falska resultat. Lippi och Simundic, (2019) tar upp i sin artikel om preanalytiken för genetiska tester. Nya genetiska tekniker med snabb genomströmning kräver nya synsätt att se på preanalytisk kvalitet speciellt inom genteknologi och dess metoder. Det är viktigt att följa de vanliga preanalytiska faktorerna, såsom provtagning av fel

patient, förekomst av störande ämnen, provtagning i inkorrekt rör, minimal förorening från människa till människa för annars kan det genetiska analysresultatet påverkas katastrofalt och möjligen följa patienten i hans livstid. Lippi och Simundic pekar på att genetiskt provmaterial påverkas också av val av rör/matrix, centrifugeringen och filtreringen samt DNA-isoleringen, tillsatssämnen, provtransporten och lagringen, föroreningen från människa till människa. Användningen av DNA-material som är ca 150–200 baspar långa skall kunna användas tillförlitligt. Det behövs standardiserade provtagnings anvisningar med anvisningar för centrifugering, filtrering, och DNA isolering. Det anses att preanalytiska variablerna är ännu känsligare för genetiska tester.

I flera artiklar beskrivs hur viktigt det är att följa anvisningarna och följa de verifierade och validerade processerna för att resultaten anses vara tillförlitliga vid avgörelsen för slutliga beslutet för valet av behandling. Grözl m.fl. (2018) framför i sin artikel om att trots att flera forskares studier visat att det är möjligt att använda EDTA- rör, finns det många pre-analytiska faktorer som kan vid användningen av den påverka blodprovet på ett sätt att provets molekylära profil förändras.

### **8.3 Behov för standarder och SOP (standard operating procedures)**

Flera forskare bland annat Greytak, Engel, Parpart-Li, Murtaza, Bronkhorst, Pertile och Moore (2021) har tagit upp i sina artiklar om det behov för standardiserade anvisningar, som täcker hela preanalytiska fasen för cfDNA biomarkören och minskar på ojämnheten i preanalytiken. Enligt artikeln finns det brister på samordningen av metoden för cfDNA extrahering. Dessa svårigheter kan undvikas med provkvalificering och analytisk validering. Det är viktigt att efter extrahering göra en utvärdering av cfDNA för att säkerställa att den är ren från gDNA kontaminering och PCR-inhibitorer. Det har utgetts riktlinjer till hjälp för planeringen av forskning inom analytisk validering för förståelse för noggrannhet, precision, känslighet och specificitet.

2019 utkom en ISO- standard, *ISO 20186-3: 2019 Molecular in vitro diagnostic examinations – Specifications for pre- examination processes for venous whole blood – Part 3: isolated cell free DNA from plasma* “. Dokumentet skall ge information om de rekommendationer och krav på hanteringen, lagringen, bearbetningen och dokumentationen av venösa helblodprov, som är avsedda för cirkulerande cfDNA undersökning under dess process, före ett analytiskt test har utförts. Dokumentet är ämnat att tillämpas på alla ” molekylära in- vitro diagnostiska undersökningar, som utförs av medicinska laboratorier. Den är också ämnad att användas av utvecklare och tillverkare av invitrodiagnostik, biobanker kommersiella organisationer som utför medicinsk forskning samt tillsynsmyndigheter.”

FDA (Food and Drug ) i USA har utgett tre publikationer till vägledning, till industrin och sponsorer i utvecklingen av olika produkter inom CDx:

- Guidance for Industry: In Vitro Companion Diagnostic Devices, (<https://www.fda.gov/media/81309/download> )
- "Principles for Code development of an In Vitro Companion Diagnostic Device with a Therapeutic Product" (<https://www.fda.gov/media/99030/download> )
- "Developing and Labeling In Vitro Companion Diagnostic Devices for a Specific Group or Class of Oncology Therapeutic Products" (<https://www.fda.gov/media/120340/download>). Anvisningen är ämnat för företag, för att de kan i tidigt skede i läkemedelsutvecklingsprocessen identifiera behovet av ett CDx test. Slutliga målet av utkastet är att stimulera ett tidigt samarbete, som skall resultera i att patienten kan nå snabbare nya behandlingar. Slutliga målet av utkastet är att stimulera ett tidigt samarbete, som skall resultera i att patienten kan nå snabbare nya behandlingar.

#### 8.4 Analytisk validitet

Weber, Spiegl, Perakis, Uz, Abuja, Kashofe, ... och Heitzer (2020) skriver i sin artikel om att det inte finns tillräckligt med bevis om cfDNA analysernas validitet eller kliniska nyttan. I deras studie testade de användningen av kommersiella referensmaterial, som designats för ctDNA testning samt plasma som tagits för att jämföra laboratoriets inter och intra- assay och samt till jämförelse av intra och inter mellan olika laboratorier. I deras artikel framkommer att valet av en optimal panel är krävande och valet beror på bland annat följande faktorer: tumörtyp, förväntat resultat, effekten hos tekniken och storlek. Deras studie visar att vissa kommersiella mutationsanalyser som används för vätskeprofilering har problem med noggrannheten och precisionen. Därför borde testet vara validerat för LOD- värdet och prestationen av testet. Användningen av patientmaterial anses vara användbart men kräver en kontrollering enligt EQA:s direktiv. Det finns inte evidens om vem som skall beställa provet och i vilket skede.

PCR kan kontaminera reagens, pipetter, och glasvaror. Därför är det viktigt att undvika kontamination från med att använda skilda arbetsställen för pre- och postamplikations stegen, pipettspetar med barriär-filter för att minimera aerosolkontaminationen och under prepareringen och lagringen av individuella eller kombinerade reaktionskomponenter i mindre avskiljningsrör. Att också ha provet i ett slutet rör. Det viktigaste är att använda sig av en negativ kontroll eller en blank reaktion. För att få en tillförlitlig (reliable) amplifikation används ofta en rengöring av nukleinsyran i någon form (Rifai, Horvath, & Wittwer, 2019, 941)

Trots att analyseringen av cirkulerande ctDNA (tumörDNA) ser ut att vara en lovande biomarkör för cancerdiagnostiken finns det ändå utmaningar, som behövs lösas för att kunna vara säker på att få kvalitativa resultat.

## 9 Next generation sequencing (NGS)

I detta kapitel kommer jag att ta upp NGS, som metod och allmänt om de olika stegen vid sekvenseringen. Med DNA-sekvensering avses en process med vars hjälp bestäms sekvensen av baserna i en DNA-sektion. Den första DNA-sekvensering som kom ut på marknaden var Sangersekvensering (Wilson m.fl, 2018, s. 733). Sangersekvensering anses vara den gyllene standarden (gold standard) inom sekvenseringsteknologin, för att den har en hög noggrannhet, lång läsförmåga och är anpassbar, d.v.s stöder en mängd olika tillämpningar/applikationer inom olika forskningsområden. (Thermo Fisher, u.å.)

### 9.1 Generellt om NGS

Sekvenseringen indelas i "whole genom shotgun" och "hierarchical shotgun". För sekvenseringen av hela genomet används hela DNA inför delningen, som med datorprogram sammanställs till ett utkast av genomet. I "hierarchical shotgun" delas genomet in i segment/fragment, som genom kloning byggs upp till ett bibliotek (Wilson m.fl, 2018, s. 732-733). NGS baserar sig på massiv parallellsekvensering. Det betyder att det är möjligt att analysera flera prov på samma gång med miljontals sekvensfragment. Detta försnabbar patientdiagnostiken och gör analysen förmånligare än t.ex Sangersekvensering eller PCR-teknik. NGS används inom diagnostiken och forskningen. NGS metoder används t.ex inom cancerdiagnostiken, patologilaboratoriet och i genetiklaboratorier som har specialiserat sig att identifiera ärftliga sjukdomar. Valet av applikation och provmaterial är beroende av vad som man vill att man skall hitta samt programmet påverkar valet av sekvenseringsprotokollet. (Immuno Diagnostics, u.å)

### 9.2 Olika sekvenseringsplattformar

Första NGS teknologiska analysatorn introducerades av Roche Diagnostics (454 Life Sciences). I tabell 5 finns det uppräknat olika NGS analysatorer, deras princip, som används idag. (Kurreck & Stein 2016). Den mest använda sekvenseringsplattform är Illuminas analysatorer. Sekvenseringsplattformen, som jag kommer att gå igenom i detta arbete är Illumina (tidigare Solexa).

Tabellen 5. Ger information om olika NGS tillverkare samt vilken princip som används i sekvenseringen. Källa: Kurreck & Stein (2016). Molecular Medicine: An Introduction, sida 110.

Företag	Princip/metod	Längden av avläsningen av basen	Slutliga datamängd i Gb	Analyseringstid
Roche /454	Pyrosekvensering	700	0,7	24 timmar
Illumina/ Solexa	Reversibel terminator	100	600	3–10 dagar
Life Technologies	Sekvensering med oligoligation detektion SOLiD	Max. 400	120	7–14 dagar
Ion Torrent / Life Technologies	Semikonduktor	max 400	1	2 timmar

### 9.3 Skillnaden mellan Sanger sekvensering och NGS

Sanger sekvensering behöver miljarder av DNA- fragment. Ett av stegen i analysering med Sanger tekniken är att plocka ut DNA-kolonier för vidareodling. I NGS- tekniken finns det inte mera behov att plocka ut DNA-fragment. Med nuvarande NGS-sekvenseringstekniker kan sekvenseringen ske på två olika sätt: med DNA-mallar, vilka har genom amplifiering klonats till tusental kopior i varje kanal i flödescellen (hos Illumina sekvenseringsapparater) eller med miljontals kopior på pärlor (454 och SOLiD analysatorer), på t.ex. objektsglas, flowcell eller beads(pärlor) på ett sätt som hittar varje signal i NGS-reaktionerna. Noggrannheten är densamme i Sangersekvenseringen som i NGS. Med NGS kan användas kortare sekvenslängd. Utgifterna är lägre med NGS. (Chiu, 2015, s. 26–27). Det finns två olika typer av sekvenseringsmetoder: sekvensering genom syntes, som använder sig av DNAPolymeras eller genom ligering som använder DNAligas. Sekvensering genom syntetisering används av Illumina´s Solexa analysatorer. De använder sig av flerkanaliga flödesceller, som klonal amplifiering, klusteramplifiering, broamplifiering eller solidförstärkning. (Chiu, 2015, s. 26,28)

## 10 Etiken inom NGS och genetisk testning

I samband med genetiska tester används i Sverige följande etiska grundprinciper för etiskt tänkandet: patienten skall var informerad om varje handling samt att veta vilka beslut som hen kan vara med att göra beslut om, åtgärd som vidtas får inte skada patienten och skall vara till nytta för patienten samt att alla skall ha samma möjligheter till vård och behandling (Smear, u.å.). Dessutom skall patienten ha möjlighet att välja om hen inte vill veta om möjliga bifynd eller inte. För att försäkra om att tolkningen och de åtgärder som gentestets resultat visar är de rätta skall gentestets utlåtande alltid genomgåås tillsammans med den vårdande läkaren (Docrates, u.å.).

Martinez- Martin och Magnus (2019) tar upp tar upp i sin artikel om olika utmaningar som tester och nästa generations sekvensering för med sig. En av utmaningar är sekretess och dataskydd. Trots att personens data har pseudonymiserats kan hen identifieras genom genomiska data. För att minska på risken har man försökt hitta en balans mellan utdelningen av det genomiska data till exempel genom att statistiskt försämla uppgifterna. Artikelförfattarna tar upp frågan om hur informera patienten om de integritetsriskerna som kan uppstå vid re- identifiering av data och utbyte av kliniska genomiska data för forskningsändamål. Vid genetisk testning skall ett informerat samtycke ge information till patienten om risker och fördelar med testningen, vilka konsekvenser uppkommer av positiva eller negativa resultat, begränsningar, alternativ, datasekretess skydd samt framtida användning av uppgifter och uppföljning av provet. Ett samtycke för NGS test borde innehålla information om allvarlighetsgraden, intervallet för genuttrycket och för säkerhet och frekvensen för uppskattningen av falska positiva resultat. Författarna anser att det borde tas upp i det informerade samtycket vilken typ av information som patienten önskar mottaga. De redovisar i artikeln om vad integritet och etiska utmaningar innebär i nästa generations sekvensering vid användningen av Big data - metoder. Etiska skyldigheter (t.ex samtyckeinformationen) och standarder kan ses på olika sätt inom forskningen och kliniska kontext och därför anse det vara en grå zon inom NGS. Institutioner måste ha lämpliga standarder för säkerhet och lagring av datauppsättningar som NGS skapar. Martinez-Martin är oroad för att efterfrågan på genomiskdata kan innebära att vissa forskningsdata kan komma ut i inom onkologin/kliniska vården utan att ha blivit ordentligt validerat eller att kvaliteten kontrollerats. Detta kan ge upphov till falska positiva eller negativa resultat. Patienten kan i samtycket ge tillåtelse att informera om genanalyseringen visar nya genförändringar.

Trots att NGS har blivit billigare att använda, är den ännu dyr och ger inte lika möjligheter för alla patienter till gentestning eller – behandlingar. Artikelförfattarna anser att det borde upprättas en nationell modell för användning av genetisk testning, tolkning av resultat, behandling samt för registrering av insamlade data. (Alanne, Joensuu & Elenius, 2021)

Tenk (2019, 4–24), tar upp i Forskningsetiska publikationen om forskningsdeltagarens rättigheter såsom frivillighet att delta eller vägra och att få tillräcklig information om testet eller forskningen, hur personuppgifterna skall behandlas och förvaringen av de insamlade material skall förvaras, informationen skall ges på personens modersmål i skriftlig eller elektronisk form och hen skall få tillräckligt med betänketid för hen ger sitt beslut. Enligt Europeiska kommissionens regler för "Rättsliga grunder för behandling av uppgifter" skall ett samtycke för att anse vara giltigt skall den vara frivilligt inlämnat, information, för ett specifikt ändamål, alla orsakerna skall tydligt anges, samtycket anges tydligt, till exempel genom att kryssa i, med klart språk och synlig information att

samtycket kan tas tillbaka. Det finns tydliga kriterier om det som skall finnas i informationsblanketten.

På Sveriges Statens Medicinsk-Etiska rådets webbsida kommer det upp frågor kring etiken vid användningen av genetiska analyser. Vilka risker för en spridning av känslig information under förvaringen eller överföringen av data? Kan resultatet feltolkas av provgivaren eller av den som utför resultatet? Skall genetiska sjukdomsanlag informeras till bärare i släkten? Hur skydda rätten att inte veta av sjukdomar som inte går att behandla? (Smer u.å.)

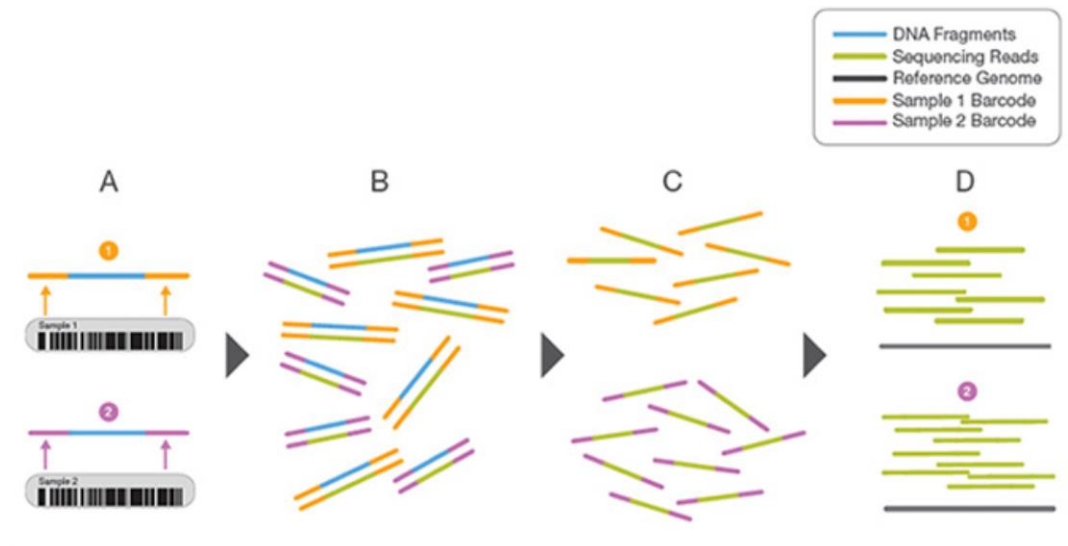
## 11 Illumina

Den teknologi som används av Illumina kallas sekvensering genom syntes och baserar sig på nästa generations sekvensering, NGS (Illumina- NGS, u.å.). Illuminas olika sekvenseringsanalyser baserar sig på 4 olika delar: provpreparation (sample preparation), klustergeneration (clustergeneration), sekvensering (sequencing) och analyseringen av data. Ett annat namn för NGS är massiv parallell sekvensering. Bearbetningen sker genom att ändra materialet till rätt storlek och tillsätta anslutningsdon (adapter) samt olika index, som fungerar som referenspunkter under SBS - processen i platserna i flödescellen samt sekvenserar primärbindningen. Målet med klustergeneration är att fästa DNA-biblioteket till flödescellen och amplifiera varje DNA bibliotek till ett kluster. Bilder, som tas under sekvenseringen, analyseras under dataanalys processen. Sekvenseringen kan ske genom att läsa från ena änden av ett fragment till den andra änden så kallade enkla "read" (SR). Dubbla "reads" (PE) körningar läses från ena änden till den andra änden, och sedan starta en annan omgång av läsning från motsatt ände. PE sekvensering gör det lättare att upptäcka olika förändringar i genomet, om-arrangemang, repetitiva sekvenser samt genfusioner och nya transkripter. PE ger också en exaktare läsning, som ger en möjlighet att upptäcka indel-varianter. Alla Illumina NGS – system klarar av PE sekvensering. (Illumina A, u.å.)

### 11.1 Multiplexing

Multiplexing möjliggör att flera bibliotek kan sekvenseras samtidigt. Under beredningen av biblioteket tillsätts unika indexsekvenser till varje DNA-fragment, som möjliggör att varje läsning kan identifieras och sorteras före slutliga dataanalysen (demultiplexing). Multiplexingen och PE - sekvenseringen har medfört att tidsanvändningen minskat för att erhålla data samt tidigare problem med index-hopping, som orsakas av att indexen blir delade felaktigt till ett annat index i polen och resulterar i felaktiga sekvenseringsresultat. Multiplexing kan användas då man skall arbeta med specifika genom regioner eller mindre genom. Dessa streckkoder, eller indexadapter, är

kan följa en av två huvudsakliga indexeringsstrategier beroende på bibliotekets prep-kit och program. Fördelar med multiplexing: flera prov kan sekvenseras samtidigt, kostnadseffektiv d.v.s. minskar tidsanvändningen och sparar reagens samt förenklar analyseringen. Figur 9 förevisar vad som sker under multiplexing. Multiplexingen sker på flödescellen. Flödescellen rymmer niottiosex prov och kan skapa kluster som innehåller 500–1000 klonade kopior. (Illumina. An introduction, 2017)



Figur 9. Exempel på olika steg (A-D) i multiplexing. Källa: Illumina. Sample Multiplexing Overview.

Hämtat 1.9.2021 [Sample Multiplexing | Multiplex sequencing with indexes \(illumina.com\)](https://www.illumina.com/genomics/next-generation-sequencing/next-generation-sequencing-with-indexes.html)

A. Två olika prov som representerar var sitt DNA-fragment. Proven tilldelas egna specifika barkod-sekvens, som visar till vilket prov ett fragment hör.

B. Biblioteket för vart prov får en egen pool som sekvenseras samtidigt. Varje ny läsning innehåller både DNA- fragmentet och det lästa sekvenseringen.

C. Barkod sekvenset åtskiljer proven från varandra under de- multiplexingen.

D. Varje uppsättning av "Reads" ställs upp mot referenssekvensen.

## 11.2 Förberedelse av sekvensering av biblioteket.

Före biblioteket påbörjas skall nukleinsyror DNA isoleras och renas. Vissa DNA extraheringsmetoder använder sig av inhibitorer, som kan påverka negativt den enzymatiska reaktionen (Chiu, 2015).

Det behövs nanogram till mikrogram av DNA, för att bereda ett bibliotek. För att uppnå bästa resultatet används en extraktions-protokoll, som är avsedd för det provmaterial som används. Efter extrahering fordras det ofta att använda en kvalitetskontroll som påvisar nukleinsyrans renhet och kvantifiering i provet. För kontroll av renhet kan användas en UV spektrofotometer eller för kontroll av renheten med en metod som baserar på fluorescensmätning. Nyckeln till en lyckad sekvenseringsanalys är en noggrann kvantifiering och rätt kvalitetskontroll av NGS biblioteket. För



kvalitetskontrollen och kvantifieringen finns olika metoder beroende på vilket bibliotekskit som används. Förberedelsen för biblioteket är en viktig del hur NGS arbetsflöde lyckas

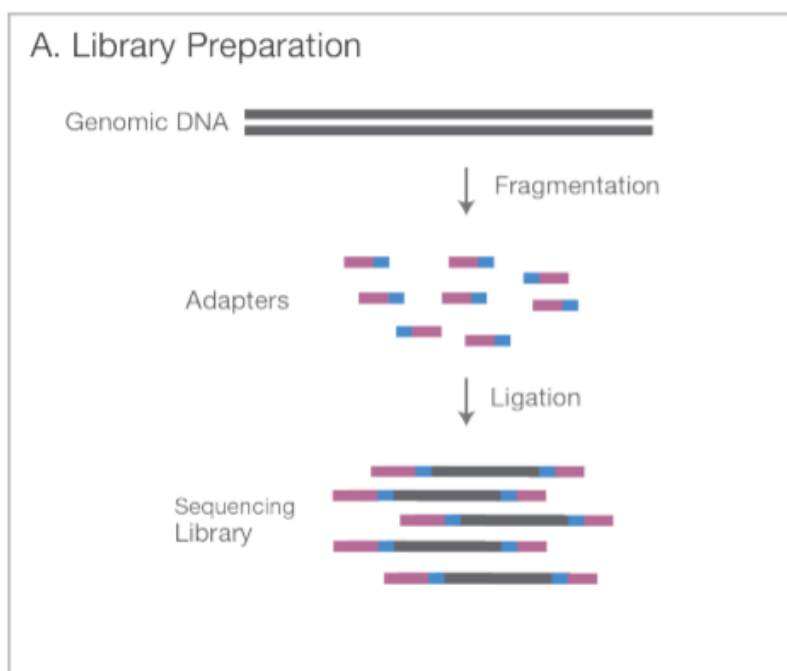
Sekvenseringsbiblioteket uppstår när DNA sönderdelas till mindre fragment och specialiserade adaptrar tillsätts i båda ändarna. Adaptrarna i Illumina sekvenseringsapparat innehåller kompletterade sekvenser, för att DNA-fragmenten kan bindas till flödescellen. Dessa fragment förstärks och renas. Flera bibliotek kan sammanslås och sekvenseras på sammagång, s.k. multiplexing. Under adapt-ligerings skedet byggs biblioteket upp med unika indexsekvenser eller streckkoder. Streckkodens uppgift är att skilja mellan olika biblioteken under dataanalysen.

Bibliotekets förberedelse är avgörande för att NGS-arbetsflödet ska lyckas. Detta steg förbereder DNA- eller RNA-prover för att vara kompatibla med en sekvensering. Sekvenseringsbibliotek skapas vanligtvis genom att fragmentera DNA och lägga till specialiserade adaptrar i båda ändarna. I Illumina-sekvenseringsarbetsflödet innehåller dessa adaptrar kompletterande sekvenser som gör att DNA-fragmenten kan binda till flödescellen.

För att spara resurser kan flera bibliotek sammanföras och sekvenseras i samma körning — en process som kallas multiplexing. Under adapter/ligering läggs unika indexsekvenser eller streckkoder till i varje bibliotek. Dessa streckkoder används för att skilja mellan biblioteken under dataanalys. (Illumina B, u.å.).

### **11.3 Beredning av provet i biblioteket**

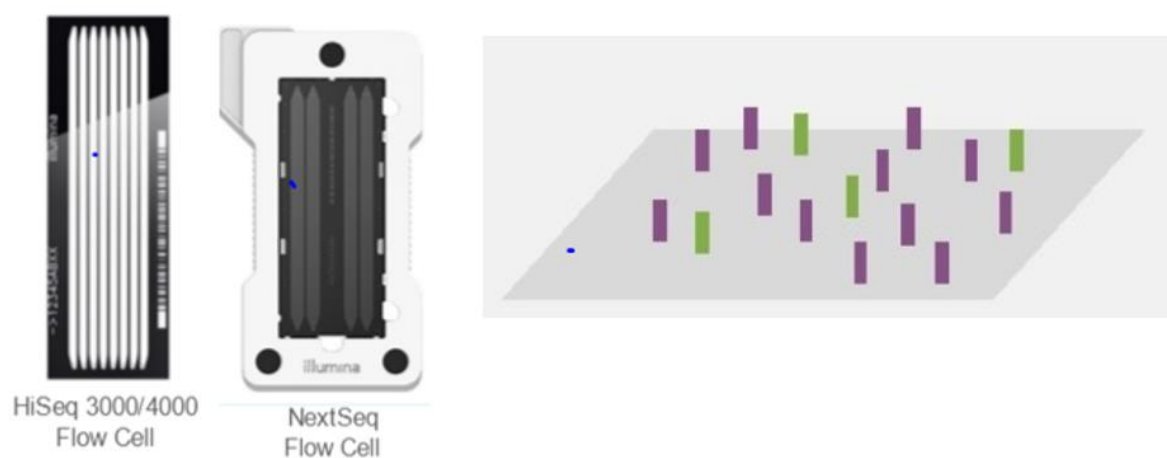
Ett passande kit för beredning av den valda applikationen väljs. Det är viktigt att följa kit anvisningarna till protokollets referensguide. Beredningen av biblioteket utgör en kritisk del i processen, för att kunna uppnå en kvalitativ sekvensering. För framställning av ett bibliotek behövs det DNA eller RNA, som kvantifieras. Sedan bryts DNA i mindre fragment. Därefter tillsätts adaptrar till fragmentens 5' och 3' ändor och efter kan sekvenseringen av biblioteket ske. (Se figur 10). (Illumina B, u.å.)



Figur 10. Visar kort hur ett bibliotek kommer till. Illumina C, u.å. **Källa:** Bilden är taget från Illuminas webbsida: A introduction to Next-Generation Sequencing Technology, u.å.

### 11.3.1 Flödescellen och Klustergenerationen

Klustergenereringen sker på flödescellen. En flödescell är en glasskiva som består av vätskekanaler eller linjer var sekvenseringen sker. I figur 11 till vänster finns två olika flödesceller. Varje sekvenseringsinstrument har ett unikt flödescell., t.ex Illumina's analysatorer HiSeq 2500, MSeq, miniSeq har slumpmässigt placerade kluster och kluster som placerats enligt mönster såsom med definierat storlek och fördelning. I arbetsprocessens sekvenseringssteg sker inläsningen av biblioteket in en flödescell, som sedan placeras på sekvenseringsanalysatorn.



Figur 11 Här till vänster finns flödesceller från två olika Illuminas apparater och till höger visar oligon som är fäst på flödescellens yta. **Källa:** Bilden är tagna från Illumina websida: A introduction to Next-Generation Sequencing Technology.u.å.

Biblioteket laddas upp på en flödescell. Fragmenten fångas upp på en glasyta, där oligon (små "taggar på glasytan") är bundna till flödescellens yta (se figur 11 bilden på högra sidan), vilka kompletterar bibliotekets adaptrar. Det finns två olika flödescell modeller där HiSeq 3000/4000 har en flowcell med mönster där storleken och avståndet är bestämt och NextSeq flödescellen där kluster är slumpmässigt placerade. Varje fragment förstärks till klonade kluster genom bro-amplifiering. Klustergenerationen är en process där varje enskilt fragment i biblioteket klonas till tusentals av identiska kopior genom en så kallad broamplifiering (amplification = förstärkning). Figur 12 visar hur biblioteket fästs till flödescellen och genom bro-förstärkning (amplification). Efter att klustergenereringen är klar kan sekvenseringen börja.

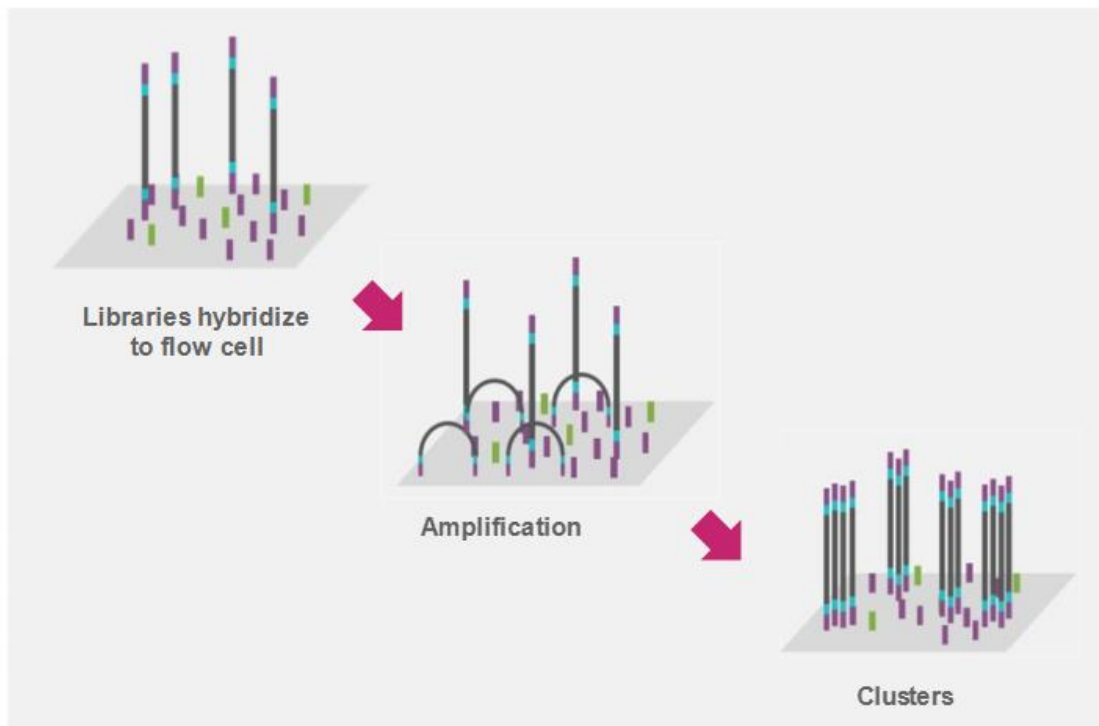
(Illumina B, u.å.)

### 11.3.2 Sekvenseringen

Illumina använder sig av sekvenseringsteknologin sekvensering genom syntes (sequencing by synthesis, SBS). Sekvenseringen sker på Illumina analysatorerna. Under SBS tillsätts reagensen som behövs för sekvenseringen, och fluorescensmärkta nukleotiderna. Under fluorcellens avbildning avger varje bas en intensitet av en unik våglängd, som gör att den kan upptäckas/mätas.

I figur 13 förevisas olika klusterbildningar där C är den bästa möjliga, och där B och D visar ha en sämre klusterdensitet. Därför skall en kvantifiering av biblioteket utföras för sekvenseringen. Beroende av sekvenserings analysatorns storlek, sker sekvenseringen med två eller fyra kanaler. Både figur 14 och 15 förevisar sekvenseringen och hur bildningen av färgklustren sker.

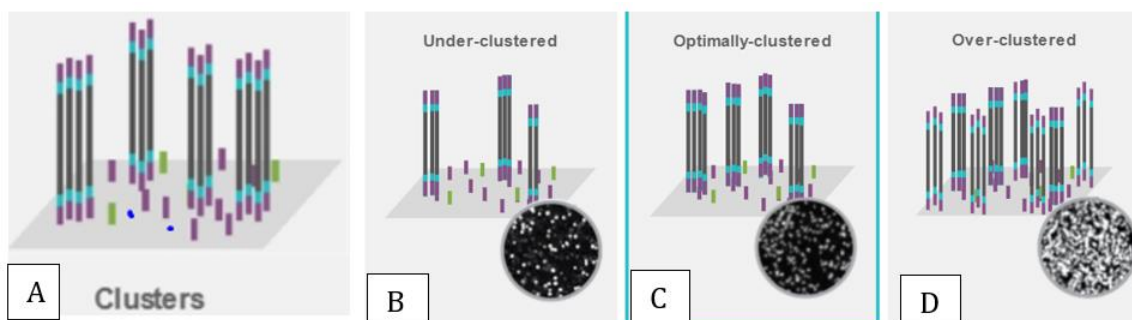
Illuminas sekvenserings teknologi använder sig av en egenutvecklad reversibel terminator som baserar på identifiering av enskilda baser då de har införlivats i mallsträngarna. De fyra reversibla dNTP är närvarande under varje sekvenseringscykel, och minskar på bias och minimerar grova fel. Som resultat av klustergenereringen finns det tusentals kopior av varje DNA-fragment. Det tillsätts primrar och modifierade nukleotider. Nukleotiderna har reversibla 3`blockerare, vars uppgift är att tvinga polymeraset att tillsätta endast en nukleotid fluorescerande taggar åt gången. Efter varje syntes tas det en bild av chipet med en inbyggd kamera. Efter varje omgång sköljs icke-förenade molekylerna bort. Ett kemiskt avblockerings- steg används för att avlägsna 3`- terminalblockerin. Resultatet är mycket exakt bas till bas-sekvensering, som eliminerar sekvens-specifika fel. Biblioteket hybridiseras till flödescellen.



Figur 12. Föreförklar klusterbildningen. **Källa:** Illumina D. u.å.

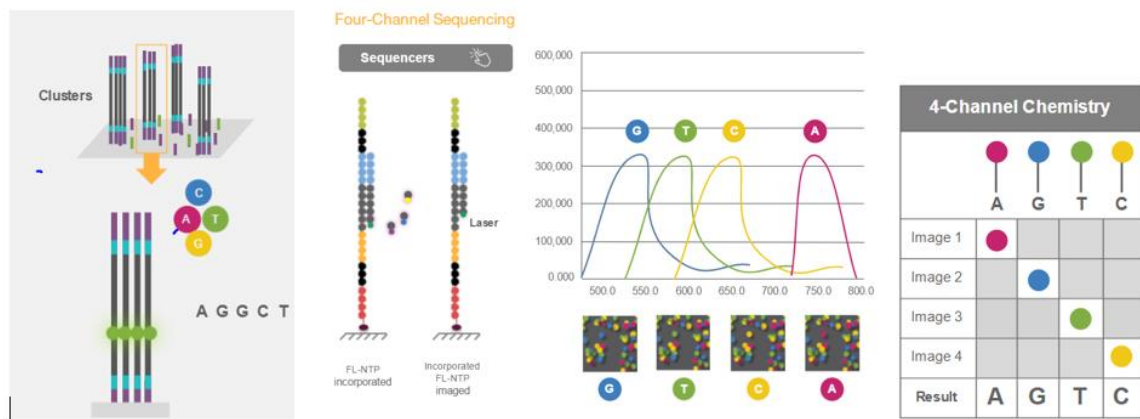
([https://support.illumina.com/content/dam/illumina/support/courses/Sequencing\\_Illumina\\_Technology/story\\_html5.html?iframe](https://support.illumina.com/content/dam/illumina/support/courses/Sequencing_Illumina_Technology/story_html5.html?iframe)) Hämtat 15.9.2021

Two-channel instruments are MiniSeq, NextSeq and NovaSeq. These use two different fluorescent dyes, red and green. The surface of the flow cell is coated with "oligos", which are attached to the library adapters. Cluster generation is a process where each individual fragment in the library is cloned into hundreds of identical copies through a process called bridge amplification. The surface of the flow cell is coated with "oligos", which are attached to the library adapters. The library is hybridized to the flow cell.



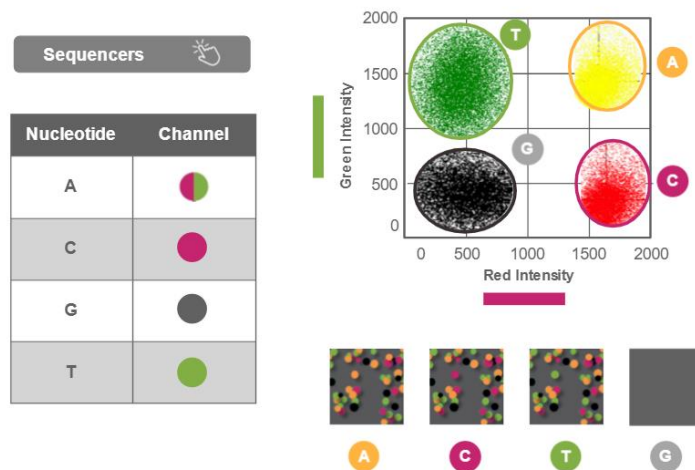
Figur13 A. visar hurdan en optimerad flödescell ser ut. Optimerad flödescell klusterbildning fastställer kvaliteten av datan. För att uppnå optimal klusterdensitet utförs en data kvantifiering före

sekvenseringen. B. visar ur ett kluster som har för lite klusterbildningar. Figur C visar en optimal flödescell med klusterbildning. Figur D. är överrepresenterat med kluster. Källa: Illumina D, u.å.



Figur 14 Illumina använder sig av 3 olika kemityper (chemistry type) på sina instrument och kan förekomma som 4-, 2- eller 1 kanaliga. MiSeq- och HiSeq serie är instrument, som använder sig av 4-kanaler vis sekvenseringen. HiSeq X serien 4-kanaliga använder sig av fyra olika fluorescerande färger, en för varje bas och 4 profiler/avbilder per sekvenseringscykel. Källa: Illumina ,u.å.

#### Two-Channel Sequencing



Figur 15. I två kanaliga instrument används två fluoriserande färger. Adenin är 50 %rör och 50 % grön, Cyanin fluoriserar 100 % rött och Tymin 100 % grönt. Intensiteten ses i scattergram som röd intensitet versus grön intensitet. Källa: Illumina ,u.å.

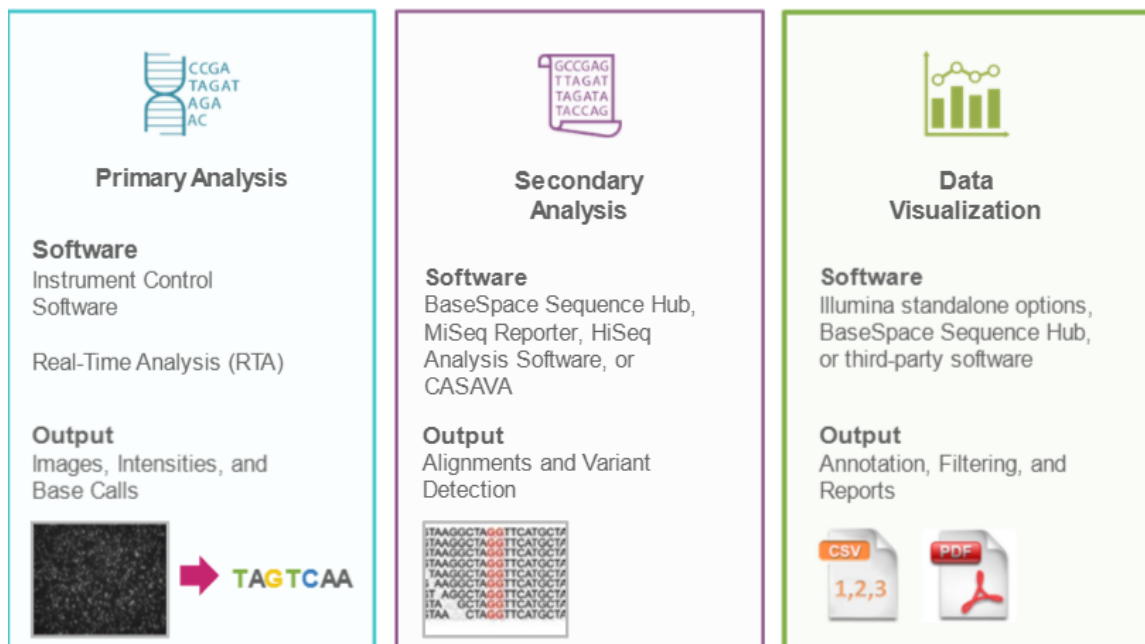
### 11.3.3 Data-analysen

Illumina dataanalys sker i tre olika omgångar: Primär analys, sekundär analys och Datavisualisering



Figur 15. Visar hur olika "reads" placerar sig och på vilket sätt uppkommer referensgenomet. Källa: Illumina ,u.å.

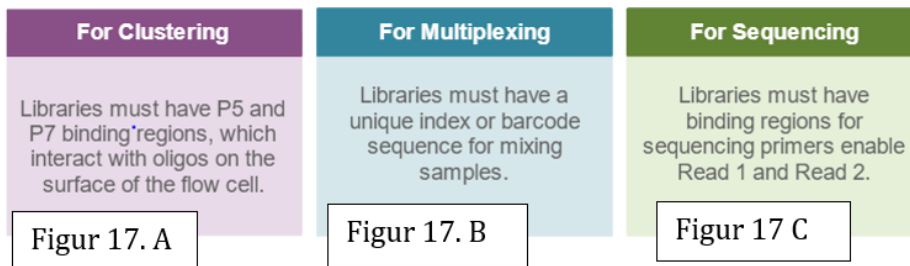
Primär analys: Detta sker på sekvenseringsinstrumentet, som har ett dataprogram som använder sig av analysering i realtid (RTA, Real-Time Analysis) och producerar bilder, intensitet och baslinjer. Baslinjer används vid sekundär analysen. Sekundär analys: Sekundär analys sker med olika program som resulterar i anpassningar (alignments) och detektering av varianter i provet.



Figur 16. Bilden förevisar vad primär-, sekundäranalys och data visualisering innehåller. Hämtat 1.9.2021.

Datavisualisering: Datat ges ut som anteckningar och rapporter. I Figur 16 förevisas vad detta innebär i praktiken.

Oavsett vilken applikation som väljs, kommer alla bibliotek i slutet att se ut å samma sätt med adaptrar, vilka är fästa i fragmentens ändor.



Figur 17. I denna figur visas vilka olika A. För beredningen av kluster behövs det att P5 och P7 har bindningsregioner som har en växelverkan med oligos på flödescellens yta. B. För att inte blanda olika prov med varandra behövs det Index 1 och Index 2 . C. Därför måste biblioteket ha bindningsområden för sekvenseringsprimers aktivera Read 1 och Read 2. Källa: Illumina D,u.å.

Figur 17. I denna figur visas vilka olika A. För beredningen av kluster behövs det att P5 och P7 har bindningsregioner som har en växelverkan med oligos på flödescellens yta. B. För att inte blanda olika prov med varandra behövs det Index 1 och Index 2 . C. Därför måste biblioteket ha bindningsområden för sekvenseringsprimers aktivera Read 1 och Read 2. Källa: Illumina ,u.å.

#### 11.3.4 Problem som kan uppstå under processen.

Under olika skeden i processen kan det uppstå kontamination av DNA:t. Kontaminationen kan orsakas av : provmaterialet från ett annat prov överförs eller att amplifierat material överförs till följande provsats (carryover) och kan orsaka bakgrunds störningar i Data, som vidare kan medföra falska resultat. (Illumina u.å.). (Illumina u.å.).

För att undvika detta är det bra att hantera proven på olika arbetsbänk eller olika rum för arbetsbearbetning för pre-PCR och andra för post-PCR. Ifall detta inte är möjligt skall olika områden ordnas till arbetet och arbetet skall ske på ett sätt att kontaminering inte sker mellan arbetsställen. Dessa skall inte heller dela på arbetsredskap såsom, pipetter, pipettspetsar, rör, centrifuger, kylskåp, frysboxar eller frysskåp, eller annat som behövs för arbetspunkten, också handskar, laboratorieskyddsrockar eller skyddsglasögon. Arbetsflödet borde gå från pre- PCR till post-PCR. Pipettspetsar med filter skall användas och bänken rengöras ofta. (Illumina u.å.).

Under arbetets gång skall det observeras att byta pipettspets mellan varje prov och rad när indexadaptrar skall tillsättas. För att undvika att indexadaptrars korkar blandas öppna endast en indexadapter åt gången. En ny ren kork skall användas när röret stängs. Använda indexadaptrar flyttas bort från arbetsområdet genast när de inte behövs. Anvisningarna som finns i Illumina referensguiden följs noggrant: till exempel för att undvika korsreaktion byt pipettspetsen mellan varje prov under tillsättning eller överföring av provmaterial. Ett rum som är fri från amplicon kontaminering skall användas. Skivan med 96 hål förseglas med en film före följande steg i

protokollet, till exempel steg vid: blandning med vortex, centrifugering eller vid temperaturcykler. För kontroll av kontaminering rekommenderas det att använda No template control, som identifierar kontamination av prov reagens i laboratoriemiljö. (Illumina u.å.).

### 11.3.5 Kvaliteten hos Illumina

För kontrollering av kvaliteten på reningen av DNA, använder Illumina mest vanlig mäta lösningen i 260/280 och 260/230 ratio med UV spektrofotometer där rent DNA i absorbans på 280

Tabell 6 Kontrollering av renheten hos provet, Illumina sekvenseringsapparat.

Källa: <https://emea.support.illumina.com/bulletins/2016/05/dnarna-isolationconsiderations-when-using-truseq-library-prep-kits.html> . Hämtat 15.9.2021

Substance	Absorbance (nm)	260/280 Ratio Values	260/230 Ratio Values
Pure DNA	280 nm	~1.8	2.0–2.2
Pure RNA	280 nm	~2.0	2.0–2.2
EDTA, Carbohydrates, Phenol	230 nm	< 1.5	< 2.0
Guanidine HCL	230 nm	< 1.5	< 2.0

Illuminas SBS visar en hög precision i sekvensering, genom användning av en enda basförlängning och tillsats av nukleotider som tävlar inbördes. Under NGS- analysering skall kvaliteten på data uppsättningen säkras. Illumina använder sig av kvalitetsmått för att försäkra precisionen under varje steg i analyseringen: biblioteket, prepareringen, basanhopningen, riktningen av "läsningen" (basecall) och variantbestämning .

Illumina använder sig av Phred sekvenseringskvalitetspoäng (Q-poäng) för att mäta sannolikheten för att en bas tyds felaktigt. Sekvensering genom syntes (SBS) utnyttjar liknande algoritm (liknar Phred) som användes med Sanger sekvenseringsundersökningar, d.v.s varje bas i en läsning får kvalitetspoäng. Bestämningen av Q - "score" av en förutbestämd bas, Q, räknas ut med följande ekvation:  $Q = -10\log_{10}(e)$  och " e ", är den sannolikhet för att fel bas har "inkallats". Ett högre Q - värde pekar på att det finns en mindre sannolikhet för fel och ett lägre Q - värde medföra att en stor del av läsningarna är oanvändbara. Ett lägre värde kan ge upphov till en ökning av falskt positiva varianter (variant calls), som kan leda till felaktiga slutsatser.



Tabell 7. Tabellen visar förhållandet mellan sekvenseringen av kvalitetsresultat och noggrannhet för bas "calling".

Quality Score	Probability of Incorrect Base Call	Inferred Base Call Accuracy
10 (Q10)	1 in 10	90%
20 (Q20)	1 in 100	99%
30 (Q30)	1 in 1000	99.9%

Källa: Illumina E, u.å.. <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html?langsel=/fi/>

Illumina sekvensering med syntes (SBS) teknik visar ge den högsta procenten av felfria läsningar, där de flesta av baserna har kvalitetsresultat över Q30 eller t.o.m. upp till Q40. Med SBS-tekniken sekvenseras på ytan av flödescellen parallellt från fyra fluorescent märkta nukleotider till miljarder kluster. Under varje sekvenseringscykel tillfogas en enkel märkt deoxirukleoidfosfat (dNTP) till nukleinkedjan, och som följd avsluts polymeriseringen med följden att det avbildas ett fluorescerande färgämne som påvisar "basen". Slutligen klyvs den för att uppta nästa nukleotid. Slutresultatet visas som exakta bas-bassekvenseringar, som rensar bort sekvenskontext- specifika fel. (Illumina, Quality scores)

## 12 Företag: Roche, Foundation Medicine och Illumina inc.

Roche, Foundation Medicine och Illumina inc. har ingått ett 15 årigt samarbetsavtal inom genomisk testning den 13 januari 2020 (Roche u.å.)

Roche grundades av Fritz Hoffmann- la Roche år 1968. Från år 1986 har Roche varit en av världsledande företagen inom in-vitro diagnostiken. År 2009 integrerades Genentech till Roche. Roche har sedan dess också gjort andra förvärv inom lifescience-forskning genomsekvensering och vävnadsdiagnostiken. Genom dessa förvärv är företaget ett ledande företag inom läkemedel och diagnostik. Roche hör till världens största bioteknologiföretag, som producerar mediciner till behandlingen av cancer-, immunologiska-, och inflammationssjukdomar. Roche är föregångare inom vården av cancers vävnadsdiagnostik och diabetes. (Roche, u.å.)

Foundation Medicine grundades år 2010 av Broad Institutets forskare, Levi Garraway och Matthew Meyerson. De utvecklade en idé om att förenkla cancergenomets komplexa natur, framföra banbrytande forskning och teknologi till dagens cancervård. Foundation Medicine har sitt huvudkvarter i Cambridge, Massachusetts, USA. Idag är Foundation Medicine Inc ett dotterföretag till F. Hoffmann – La Roche Ltd och är en leverantör av molekylära informationsprodukter och cancerforskningsprogram. Med en kombination av Roches expertis

inom onkologi och med Foundation Medicine:s teknologi kan de förverkliga precisionsmedicin och individ anpassad behandling samt bland annat öka förståelsen av tumörsjukdomar och förbättra patientvården. Deras produkter är FoundationOne för solida tumörer och Foundation Heme för cancer i blodet och hematologiska maligniteter (såsom, leukemi, lymfom och sarkom), FoundationOneLiquid (tidigare Foundation Act) en test som är blodbaserat för cirkulerande tumörDNA (ctDNA) för solida tumörer samt FoundationOne CDx en diagnostisk analytestest för solida tumörer. (Foundation Medicine Inc., u. å.)

Företagets tjänster inkluderar en omfattande genomisk profileringskit (CGP) för identifiering av molekylära förändringar i patienters cancer samt sätta ihop den information med relevanta mål, terapier, immunoterapier och kliniska studier. Profileringskitet ger information om fem olika tumörtyper: Ovarie-, lung-, bröst- och kolorektalcancer samt melanom (Se Bilaga 1). På några år har idén utvecklats till första klassiga produkter och tjänster, som hjälper till att förstärka läkarnas arbete inom forskning, forskare och alla andra i hela världen, som är med i kampen mot cancer. (Foundation Medicine A). År 2012 kom det första kommersiella testet, FoundationOne ut på marknaden med "comprehensive genomic profiling (CGP) test" (Foundation Medicine, u.å.).

År 2013 lanserade FoundationOne Heme och 2016 första testet med vätskebiopsi. År 2018 blir varumärket FoundationOne®Liquid CDx.

Till Foundation Medicine´s tjänster hör FoundationOne CDx, FoundationOne Liquid CDx och Foundation Heme. De är validerade och har CE-IVD godkända beslutsstöd för solida tumörer. USA´s Food and Drug Administration (FDA) godkände FoundationOne CDx (F1CDx) som den första in vitro diagnostiska (IVD) testet, som baserar på NGS in vitro diagnostik. Testet kan upptäcka genetiska mutationer i 324 gener och två genomiska signaturer (genomic signatures) i fasta tumörer. Skillnaden till andra Companion Diagnostics-test, som FDA har godkänt tidigare, är att F1CDx är ett mera omfattande test som ger information om olika genetiska mutationer, som kan hjälpa till i den klinisk behandling av cancerpatienter. Denna test kan identifiera, vilka patienter som har någon av de 5 tumörtyperna kunde få hjälp av de 15 olika behandlingsalternativen som FDA har godkänt. Sjukvårdspersonalen och patienten får resultatet i form av ett beslutsstöd (Se bilaga 3). F1CDx ger cancerpatienten och hälsovårdspersonalen bättre behandlingsalternativ utan större invasiva ingrepp för att kunna ge behandla patienten eller ge patienten möjlighet att delta i kliniska forskning. Foundation Medicine tjänster är byggd på kliniska bevis och har gett ut över 200 artiklar sedan Foundation Medicine startades. (Foundation Medicine, Liquid CDx, u.å.)

Illumina grundades 1998 av David Walt, Larry Bock, John Stuelpnaget, Anthony Czarnik och Mark Chee. Headquarters är beläget i San Diego, Kalifornien i USA. Illuminas produkter är olika analysatorer för NGS. (Wikipedia, Illumina Inc, u.å.) (Wikipedia, Illumina Inc., u.å.) Illumina är idag

en internationell ledare inom DNA-sekvensering och "microarray"-baserade lösningar. Deras mission är att förbättra människors hälsa genom att frigöra resursen i genomet. (Illumina, u.å.)

## 13 FoundationOneLiquid-metoden

FoundationOne Medicine erbjuder tjänster, som kartlägger och analyserar genetiska förändringar i solida tumörer med nästa generations sekvenseringsteknologi (NGS). Testet kan identifiera fyra olika grupper(klasser) av genomiska förändringar: basparbyten, insertioner, deletioner, kopior och translokationer samt mäta molekyllära signaturer (TMB och MSI). Dessutom ges en rapport med kliniskt beslutsstöd (finns att ses i bilaga 3) för den behandlande läkaren. I detta beslutsstöd finns information om tumörens molekyllära profil i relation till möjliga läkemedelsbehandlingar, immunterapi och väsentliga kliniska studier som kunde vara användbara för patienten. För att kunna eliminera ineffektiva behandlingar, anges det också i beslutsstödet om eventuella molekyllära förändringar som kan förknippas med terapiresistens. Terapierna som föreslås i beslutsstödet är godkända inom EU. Resultatet/beslutsstödet presenteras i en rapport där alla förändringar som upptäcks presenteras, d.v.s beroende av testkittet kan det identifieras mellan 70 - 400 relevanta cancergener, redogöra för tumörmutationsbördan (TMB) och mikrosatellitinstabilitet (MSI). Läkaren kan använda rapporten som hjälpmedel vid bestämning av vilken behandling skulle vara bäst för patienten. (FoundationMedicine, Liquid Biopsy, u.å.)

I Foundation medicine's databas finns information om mer än 300 000 data från analyserade tumörer av över 150 tumörtyper. Datan tolkas med hjälp av avancerade algoritmer av bionformatiker eller genetiker. Det sker en ständig utveckling av testerna för att upptäcka kliniskt relevanta molekyllära förändringar för att ha uppdaterad information för klinikerna till deras beslutsstöd för olika behandlingsalternativ. (Foundation Medicine, u.å.)

### 13.1 FoundationOne®Liquid Cdx-testet

FoundationOne Liquid testet kan användas i situationer då det inte är möjligt att ta vävnadsbiopsi, då vävnaden är alltför liten för att kunna användas eller när det misstänks att sjukdomen är i progressionsfas. Dessutom kan testet användas då man önskar få reda på förvärvad resistens mot behandlingen eller kontrollera möjliga förändringar som möjliga immunohistokemiska (IHC) testen inte upptäckt. (FoundationOne®Liquid. Open up opportunities with a single blood draw. FoundationOne®Liquid, s. 3 – 4). Testet använder en hybrid-capture NGS testmetod i kombination med dataalgoritmer, som möjliggör precisa "variantläsningar" genom att urskilja artefakter i sekvenseringen mutationer.

Cdx (Companion Diagnostics) är en medicinskteknisk produkt, som ger information om produkten är säker att använda och hjälper hälsovårdspersonal att avgöra om en eventuell terapeutisk produkt uppväger möjliga biverkningar eller risker för en viss terapeutisk produkt. En Cdx test kan hjälpa att matcha patient till en viss medicin eller behandling. Den kan identifiera om patientens tumör har en specifik gen förändring eller biomarkör som kan ha betydelse vid val av medicin. Dessutom kan den hjälpa att få reda på ifall möjliga farliga biverkningar kan uppstå under behandlingen. "U.S. Food and Drug Administration" har utgivit 2 anvisningar om användningen av Cdx: Developing an Labeling In vitro Companion Diagnostic Devices for a Specific Group of oncology Therapeutic Products (FDA-2018-D-3380). Dessutom finns det en lista över vilka Cdx produkter som är godkända av FDA, FoundationOne Cdx och Foundation Liquid Cdx finns på denna lista (FDA). FDA har validerat testets olika processer och gett sekvenseringsplattformen en analytisk och klinisk validering. (FoundationMedicine- LiquidCDx u.å; OnkologiSverige, u.å.)

FoundationOne Liquid CDx testet kan upptäcka över 300 gen och analyserar alla typerna av genförändringar: basparbyten, insertioner och deletioner, kopior och fusioner/ translokationer/ rearrangemang. Dessutom ger den information om Mikrosatellitinstabilitet (MSI), tumörmutationsbördan i blodet (bTMB) och rapporterar tumörfraktionen, som är procentmått av tumörrelaterat cellfritt DNA i blodet. Tumörfraktionen bestämmer sannolikheten för att det finns genomiska förändringar i en blodbiopsi. (Foundation Medicine, u.å.) Den har för tillfället det enda testet av en så stor mängd genmarkörer. Den har FDA:s godkännande och är den enda på marknaden med en så bred genmarkör. I tillägg hör till servicen att analysvaret tillkommer med professionellt omfattande beslutsstöd, som skall ge kliniska beslutsfattare information om tumörens molekylära profil i relation till olika behandlingar (läkemedels eller immunterapi) och kliniska studier. (FoundationMedicine Sverige, u.å.). I bilaga 3 finns ett exempel på hur ett beslutsstöd kan se ut. Kliniska forskningar visar att patienter reagerar olika på samma medicin, t.ex. 75 % av cancerpatienter svarar inte på behandling. (AABME, u.å.)

## 13.2 FoundationOne®Liquid blodprov

På Foundation Medicine hemsida finns det egen plats för material som kan nerladdas. FoundationOne Liquid testkittet beställs genom ett orderformulär som går att fylla i elektroniskt eller manuellt på det utskrivna orderformuläret, som finns på Foundation Medicine hemsida. Läkaren som fattar beslut om patientens behandling fyller orderformuläret och beställer testkittet. Ett testkit kostar idag i Sverige ca 20 229 SEK. Läkaren skall också säkerställa med att kryssa i rutan där han garanterar att han har informerat hur patientens personliga data hanteras och i rutan om patienten tillåter att hans data används i forskningar. Ett informerat samtycke nerladdas för signering av patienten. Patientinformation som diagnos, kön, möjliga transplantationer samt typ av

transplantation, diagnos och stadium och planeringsdatum för vätskebiopsin (blodprovet). Läkaren får en sammanställning av beställningen. Testet betalas av kliniken eller av patienten. Till sist skriver läkaren ut "Test Requisition Form, TRF", signerar den och skickar den tillsammans med provet till Foundation Medicines laboratoriet. Roche Foundation Medicine sköter om upphämtningen till samma dag som provtagningen. Foundation Medicine upplyser att beslutsunderlaget är klart inom 7 till 10 dagar efter att provet mottagits. Beslutsunderlaget laddas upp på läkarens konto. I Sverige är det möjligt att blodprovet tas i patientens hem (utan extra kostnad) av en legitimerad sjukskötare från Adxto. Denna service ordnas via Roche med kliniken. (Foundation Medicine, Sverige, u.å.).

Det finns det också att nedladda: orderformulär, provberedningsanvisningar, samtyckesdokument, valideringsstudie, informationstext att skriva ut, information om hur tolka beslutsunderlaget, sammanfattning och validering av summeringen för FoundationOne Liquid CDx, Genlista för Foundation One liquid CDx, exempel på rapport, teknisk information och testdata, packningsinstruktioner, patientbroschyr och en broschyr om Foundation One Liquid CDx. Finska websidans innehåll är mindre. Kittet innehåller: 2 stk Roche cfDNA- rör, 2 etiketter, provtagningsanvisningar, samt leveransinstruktioner.

På FoundationOne Liquids sida finns olika dokument för nerladdning (se figur 22). För provtagningen av FoundationOne Liquid tas endast med ett blodprov. Beslutsstödet skickas 14 dagar efter att provet mottagits på FoundationOne laboratoriet. Testkittet kan upptäcka molekylära förändringar hos mer än 300 olika gener på DNA -nivå. Förändringarna som upptäcks är olika gener vars baser är (ersatta, infogade, raderade, duplicerade, felplacerade, utbytta eller som har gått sönder) är basparbyten, insertioner och deletioner, kopior/duplikater, translokationer och fusioner rapportera om mikrosatellit instabilitet (MSI).



Figur 21. FoundationOne Liquid provtagnings-kit. Hämtat 19.9.2021. Källa: <https://www.syovangeenit.fi/foundationoneliqid/>, u.å.

I bilaga 2 finns genlistan för de olika gen som uppvisar olika förändringar. Resultatet kommer i rapportform till hjälp för kliniskt beslutsfattande om behandling och misstänkt sjukdomsprognos. (Foundation Medicin- Liquid, u.å.)

I beslutsstödet informeras (Se Bilaga 3):

- 1) information om; molekyllära signaturen TMB och MSI, för att ge information i beslutet kring immunterapibehandlingen
  - 2) genförändringar som är kliniskt relevanta för cancer
  - 3) kliniska studier som är baserade på patientens molekyllära profil och geografiska läge som patienten kan delta i
  - 4) godkända, potentiella och effektiva läkemedelsbehandlingar och immunterapier utgått från patientens molekyllära förändringar och biomarkörer.
- (Jfr med beslutsrapport om FoundationOne CDx, u.å.)

Roche Cell-Fritt provtagningsrör är ett vakumrör av PET (polyethylene terephthalate) material med konserveringsmedel, som skall förhindra att celler gör sönder. Den är säker används av över 1 million användare i världen. Provet hålls stabilt på grund av K3EDTA, som antikoagulation och konserveringsmedel för nukleära celler och cfDNA. Användningen av detta rör ger en pålitlig och säker transport inom olika temperaturskillnader (lagringstemperatur 18° C -25 °C och transport temperatur från 15° C - 30° C , rör tillverkningen har skett i enlighet med ISO 9001 och EN ISO 13485.

På Foundation Medicin`s sidor finns det instruktioner om provtagningen och provbehandlingen, som hänvisar till att använda endast de provtagningsrör som finns i FoundationOne Liquid blodprovstagings- och försändelsekittet, att inga andra provtagningsrör godkänns. I anvisningarna hänvisas att kontrollera att vätskan i provtagningsröret är klart och inte grumligt. Kittet innehåller etiketter, som skall föras med provtagningsdatum och med patientens födelsetid och beställningsnummer, som är patientens identifikation.

På grund av att rören innehåller tillsatts ämnen, som är en hälsorisk för patienten, skall tillbakaflöde till patienten undvikas. Roches säkerhetsblad om rören informerar om hälsorisk med varningsmärket GHS07 (symbol: utropstecken). Dessutom informerar Roche i informationsbladet till Roche cell-free DNA provtagningsrör om att vid provtagning skall det observeras att patientens arm skall vara placerat i nedåtriktad position och försäkra om att rörets innehåll inte kommer i kontakt med provtagningshållarens stopper i början eller i slutet av provtagningen. Anvisningen hänvisar till CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) standard H3-A6 i det som berör provtagningen. För att undvika hemolys skall rören blandas försiktigt åtta till tio gånger, genom att vända rörer enligt bild 23, för att blanda tillsattsämnet med blodet.

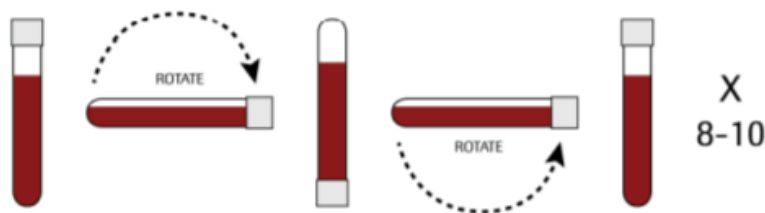


Bild 23. Bilden visar hur blandningen av Roches cfDNA rör skall ske. Källa: <https://pim-eservices.roche.com/eLD/api/downloads/e7f7a59b-cb2d-e911-a49d-00215a9b3428?countryIsoCode=pi> Hämtat 18.9.2020

Blodprovet skall lagras och blandas enligt rekommenderade anvisningar. Extrahering av DNA sker genom att separera plasma enligt metodbeskrivningar eller standard laboratorieprotokoll. Centrifugerings hastighet och tiden 1600 x g i 10–15 minuter, rcf (relativ centrifugal force), skall inte överskridas.



#### Andra varningsinformationer

Provet skall inte överföras med nål och spruta till cfDNA röret. Roche cfDNA provtagningsrör skall fyllas till max märket på röret. Ifall röret fylls över det märkta strecket kan det orsaka felaktiga provresultat.

Patientinformations och samtyckesbehandling, som hör till F1Liquid, indelas i 4 avsnitt. I bilaga 4 finns en kopia av samtyckets första sida samt en link till hela samtyckeblanketten.

### 13.3 Validering

Analytisk och klinisk validering förklaras närmare i figur 20. Woodhouse, Li, Hughes, Delfosse, Skoletsky, Ma,...& Dennis (2020) skildrar i sin artikel om FoundationOne®Liquid CDx testets kliniska och analytiska validerings resultat. Resultatet visade att FoundationOne®Liquid CDx påvisar noggrant och reproducerbart närvaron av de viktigaste typerna av genomiska förändringar samt komplexa biomarkörer såsom MSI, bTMB och tumörfraktion. Analytisk variation testade LoD (Limit of Detection). Resultat visade att testet har 95 % sannolikhet att upptäcka medianvariantens allelfrekvens, tumörfraktion samt instabila lokus. Som LoB i sekvenseringen (Limit of Blanc) användes friska donatorer för evaluering av genvarianter. 1735 unika genvarianter togs med i beräkningen med totalt 137 065 datapunkter. Hela 18 falska positiva värden upptäcktes. LoB ansågs vara 0% för re- arrangemang och CNA. Frekvensen av falska positiva, var 0 % för re-arrangemangen och CNA samt 0,013% (~ 1 av 8000) för korta varianter (substitutioner och indels)

	 <b>Analytisk validering</b>	 <b>Klinisk validering</b>
<b>Vad det betyder</b>	Förmåga att upptäcka och mäta närvaron av en intressant biomarkör; exakt, reproducerbart och pålitligt <sup>31,32</sup>	Att kliniskt bevisa utfall mellan två eller flera grupper i en population, ex skillnad i respons <sup>31,32</sup>
<b>Exempel för FoundationOne CDx för genen ALK i NSCLC</b>	Förmåga att exakt kunna identifiera alla typer av förändringar på ALK, inklusive korta insertioner/deletioner och fusioner <sup>1,2</sup>	Att kliniskt identifiera patienter med NSCLC som är ALK+ och där målinriktad behandling för ALK är angiven <sup>190</sup>

Figur 20. Tabellen förklarar skillnaden mellan analytisk och klinisk validering. Källa: Foundation Medicins Svenska websida. ([www.foundationmedicine.se/tjanster/cdx.html](https://www.foundationmedicine.com/test/foundationone-liquid-cdx))  
<https://www.foundationmedicine.com/test/foundationone-liquid-cdx>

Testet anses vara tillförlitligt och användbar för läkare som önskar ge ut genomiska profilerings resultat för sina patienter samt kan användas som ett tilläggs redskap av läkarna för användning till terapeutisk behandlingen av cancerpatienter.

FoundationOne<sup>®</sup> som är föregångare till FoundationOne<sup>®</sup>CDx, (FoundationOne. Technical Information, u.å.), FoundationOne<sup>®</sup> Liquid och FoundationOne<sup>®</sup>HEME, har validerats och publicerats i artiklar och som en teknisk information om testet. FoundationOneLiquid har hög överensstämmelse med FoundationOne CDx och har validerats för flera solida tumörer såsom i lungcancer, bröstcancer, mag- och tarmcancer. (FoundationOne<sup>®</sup>Cdx. Broad clinical utility on extensive validation. Clinical summury, u.å.)

## 14 Kritisk granskning

Jag startade med examensarbetet redan år 2018. Skrivandet har varit en längre process än jag hade tänkt. Detta har gjort att jag ha varit tvungen att kontrollera uppgifterna flera gånger på nytt samt att försöka hitta den röda tråden i arbetet. Jag har försökt få med all det väsentliga inom detta område. Då jag startade med forskningsplanen, visste jag inte hur bred det slutliga examensarbetet skulle bli. Som utgångspunkt i starten var FoundationOne liquid testets genpanel och nästa generations sekvensering. Jag tittade på den genlista som fanns på Foundation One medicines sida kändes det att jag måste gå djupare i den teoretiska bakgrunden och söka mer kunskap om DNA, tumörens utveckling, vad är vätskebiopsi, finns det specialrör, vad sker vid nästa generationssekvensering och slutligen FoundationOne Liquid Biopsy CDx. Det har varit svårt att följa sidorna till Roche, FoundationMedicine, FoundationOne<sup>®</sup> Liquid CDx sidorna, för de har uppdaterats flera gånger under min examensskrivning mellan åren 2018-2021.



I starten tyckte jag att det var svårt att hitta artiklar om vätskebiopsi och Foundation Medicine. Efteråt tycker jag att det har skrivits många artiklar om vätskebiopsi. Speciellt de två sista åren ser det ut att forskare har sett behov att skriva om detta ämne. Speciellt många artiklar om jämförelse mellan olika leverantörer samt EDTA- rören i hänseende till de pre-analytiska faktorerna samt med tanke på om validering samt få gjort standardiserade anvisningar som gäller för alla forskningar och till klinisk användning.

Nu efteråt märkte jag att det skulle ha varit en fördel att göra systematiska sök för: provtagningsrör och jämförelse och pre-analytiska faktorerna, nästa generations sekvensering och validering samt Liquid biopsy och CTC och cfDNA och ctDNA. Artiklarna skulle ha lätt hittats i sökprocesstabellerna. Det skulle kanske ha hjälpt att hitta den röda tråden efter de olika pauserna under min skrivandeprocess. Jag har fått läsa och tänka om flera gånger med den engelska texten, så att jag inte skriver något felaktigt. Av de artiklar jag tagit upp har det visat sig att studierna har visat samma brister eller fördelar i hänseende till användningen av specialrör, behov för generaliserade anvisningar till vätskebiopsi provtagning, transport, processen vid plasma/avskiljning, användning av lika forskningsupplägg och liknande.

Vid val av litteratur till min examen tyckte jag att det fanns dåligt med nyare litteratur om de ämnen jag skriver om. Detta ses i det att jag har med en bok om onkologi, som är skrivet på finska från år 2013. Jag valde ändå att ha med denna bok, för den är med i samma årgång som kurslitteratur för läkarstuderande i Oppiortti, som Duodecim sällskapet upprätthåller. En ny bok i Onkologi på finska skall utges under år 2022.

## 15 Diskussion

Mitt syfte med examensarbetet var att jag skulle komplettera min kunskap inom molekylbiologin, nästa generations sekvensering, cancerbehandlingen samt få en inblick i vad nya vätskebiopsi är. Dessutom skulle jag ta reda på vad FoundationOne® Liquid biopsy är. Jag tycker att jag har nått mitt mål och gett svar på de frågor som jag hade i metod delen. Att skriva detta arbete har varit en lång process, där många "aha"- upplevelser, som kommit i olika skeden av arbetet har hjälpt mig vidare. Men jag har ännu mycket att lära mig inom ämnet.

Det kom också fram under examensskrivandet att vätskebiopsin är bra för de gånger det är svårt att få ett vävnadsbiopsi taget eller att vävnadsbiten är så liten att ett tillförlitligt svar inte kan fås eller om det behövs tas en kontroll av behandlingen i de fall det önskas följa upp patientens respons på terapibehandlingen av ett målstyrt läkemedel. Det har också diskuterats att det inte alltid behövs

en hel paneluppsättning av gentester, men man kanske vinner tid och provtagningar samt kostnaderna blir inte större ifall det ändå till slut måste användas flera olika singel testkit.

Vätskebiopsin intresserar forskarna, då den anses vara en potentiell biomarkör att använda för bedömning av cancerbehandlingen. Den ses som ett lovande diagnostiskt redskap för att kunna upptäcka tumören i ett tidigt skede. Den ger samtidigt en mer komplett bild av tumörgenomet och kan också användas som övervakning av tumörutvecklingen under sjukdomsförloppet. Fleischhacker och Schmidt, (2020) diskuterar i sin artikel om att ordet vätskebiopsi inte skulle vara den rätta benämningen för att användas, utan i stället vid analyseringen av cell fria nukleinsyror skulle används "liquid profiling" (på svenska ~ vätskeprofilering).

Vätskebiopsin är ännu mest använt inom forskningen. Men flera forskningar har återgett betydelsen av att ha standardiserade anvisningar genom hela processen från provtagningen, sekvenseringen och till resultatet. Dessutom diskuterades också huruvida edta-rör skall användas och hur kan kvaliteten och anvisningarna kring centrifugering, lagring och transport ske för att resultatet skall visa det skede som patienten har vid provtagningen.

För att ctDNA kvaliteten och kvantiteten skall vara jämna och att resultatet är jämförbart och reproducerbart i olika laboratorier, behövs det standardisering av preanalytiska faktorer för uppsamlingen och isoleringen av DNA. (Gerber et al, 2020, 1071; Grölz, Hauch, Schlumpberger, Guenther, Voss, Sprenger-Haussels & Oelmüller,2018). I en artikel av Saarenheimo, Andersen, Eigeliene och Jekunen (2021) tar upp sin artikel om problemet att få provet behandlat inom tidsramen och att tiden från provtagning till resultat tog över två veckor.

FoundationOne®Liquid test kittet är dyrt, i Sverige kostar kittet omkring 23 000 kr. På Docrates cancersjukhus i Finland finns testkittet med som en av deras genprofileringstester. Här finns ett etiskt dilemma för alla patienter ge inte möjlighet att kunna använda sig av testet, då vården kanske skall betalas av patienten själv.

Det har också kommit upp frågor kring forskningar om vätskebiopsi och provets kvalitet under transport för i studierna användes friska personer. Men i verkligheten tas proven från cancerpatienter och man kan undra på vilket sätt påverkar transporten deras prov, för cellerna hos cancerpatienter kan vara lättare att gå sönder.

Vidare studier eller examensarbete kunde innehålla en studie om vilka genpaneler som används inom onkologin idag, jämföra t. ex två eller flera NGS sekvenseringsreagenser/ apparater eller göra en kartläggning av hur processen med genpaneler ordnas hos laboratorier i Finland som analyserar gentest.

## 16 Källförteckning

AABME (Alliance of Advanced BioMedical Engineering), Companion Diagnostics CDx [Online] <https://aabme.asme.org/posts/companion-diagnostics-for-oncology> [Hämtat 26.06.2020]

Aittomäki, K., Moilanen, J., Perola, M., Aarnisalo, A. A. & Ripatti, T., 2016. *Läketieteellinen genetiikka* (1. painos.). Helsinki: Duodecim.

Alanne E., Joensuu H. & Elenius K. (2021). Geenidiagnostiikkaan perustuva syövän hoito – ovatko odotukset toteutuneet? Teema: Geeniohjatus syövän hoidon työryhmä. *Duodecim* 2021, (137), 1457–64. Hämtat 23.10.2021. [duo16315.pdf \(duodecimlehti.fi\)](https://duodecimlehti.fi/duo16315.pdf)

Alidousty, C., Brandes, D., Heydt, C., Wagener, S., Wittersheim, M., Schäfer, S. C., 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: JMD*, 19(5), pp. 801-804. Hämtat 3.10.2021 doi:10.1016/j.jmoldx.2017.06.004

Bai, Y. & Zhao, H., 2018. Liquid biopsy in tumors: opportunities and challenges. *Annals of Translational Medicine*, 6, s. 1- 4.1 .  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6291575/pdf/atm-06-S1-S89.pdf>

Casadio, V. & Salvi, S. (editors), 2019. *Cell-free DNA as Diagnostic Markers. Methods and Protocols*. New York: Humana Press.

Chiu, K.P., 2015. *Next-Generation Sequencing and Sequence Data Analysis*. Sharjah, U.A.E. Bentham Science Publishers Ltd.

Dakubo, G.D., 2016. *Cancer Biomarkers in Body Fluids*. Switzerland: Springer International Publishing AG. ]

Docrates, Genprofilering av cancerbehandlingar, u.å. Hämtat 1.9.2021.  
<https://www.docrates.com/sv/cancervard/avbildning-av-cancer-och-diagnos/genprofilering/>

EMBL-EBI-a, Next Generation Sequencing Practical Course. Train online: What is Next-Generation DNA Sequencing? [Online] <https://www.ebi.ac.uk/training/online/course/ebi-next-generation-sequencing-practical-course/what-you-will-learn/what-next-generation-dna-> [Hämtat 29.6.2020]

Erlanson-Albertsson, C. (2013). *Cellbiologi* (1. uppl.). Studentlitteratur.

FDA, Companion Diagnostics, u.å. Hämtat 22.7.2021 <https://www.fda.gov/medical-devices/vitro-diagnostics/companion-diagnostics>

FDA; FoundationOne CDx Tumor profiling <https://www.fda.gov/medical-devices/vitro-diagnostics/nucleic-acid-based-tests>

Fernández-Lázaro, D., García Hernández, J. L., García, A. C., Córdova Martínez, A., Mielg-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 (Basel)*, 10(4), p. 215. Hämtat 3.10.2021. doi:10.3390/diagnostics10040215

Fleischhacker M. & Schmidt, B., 2020. Pre- analytical issues in liquid biopsy- where do we stand? *Journal of Laboratory Medicine*, 44 (3), s. 117–142.

Forsberg, C. & Wengström, Y. (2015). *Att göra systematiska litteraturstudier: Värdering, analys och presentation av omvårdnadsforskning* (Fjärde utgåvan.). Natur & Kultur

Foundation Medicin, Sverige. (u.å.). Användarguide för Online Ordering. FoundationOne Liquid CDx. Hämtat 16.10.2021 [PowerPoint Presentation \(foundationmedicine.se\)](https://www.foundationmedicine.se)

Foundation Medicine Liquid. Hämtat 19.9.2021 .  
<https://www.foundationmedicine.se/tjanster/liquid.html>

Foundation Medicine, LiquidCDx, u.å. Hämtat 24.10.2021.  
<https://www.foundationmedicine.se/tjanster/liquid.html>

FoundationOne CDx. Technical information. Hämtat 23.8.2020.  
[[https://www.foundationmedicine.se/content/dam/rfm/se\\_v2-sv\\_se/documents/foundation-one-cdx-technical-information.pdf](https://www.foundationmedicine.se/content/dam/rfm/se_v2-sv_se/documents/foundation-one-cdx-technical-information.pdf)]

FoundationOne®CDx, Broad clinical utility built on extensive validation. Clinical summary, u.å. Hämtat 22.9.2021. [786209793-006\\_clinical\\_summary\\_brochure\\_cc14.indd](https://www.foundationmedicine.se/786209793-006_clinical_summary_brochure_cc14.indd) ([foundationmedicine.se](https://www.foundationmedicine.se))

Foundation Findings: Publication Summary. Clinical and analytical Validation of FoundationOneLiquid CDx. (u.å.). Hämtat 22.9.2021 [FoundationOneLiquid\\_CDx\\_Validation\\_Summary.pdf \(ctfassets.net\)](https://www.ctfassets.net/FoundationOneLiquid_CDx_Validation_Summary.pdf)

Furu, A., VCS först ut i Finland med nya cancertestet. *Vasabladet*. 21.9.2018, s. 2

Gerber, T., Taschner – Mandl, S., Saloberger-Sindhöringer, L., Popitsch, N., Heitzer, E., Witt, V., Geyeregger, R., Hutter, C., Schwentner, R., Ambros, I. M., & Ambros, P.F., 2020. Assesment of Pre-Analytical Sample Handling Conditions for Comprehensive Liquid Biopsy Analysis. *The Journal of Molecular Diagnostics*. Hämtat 3.10.2021 <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.05.006>

Genteknik, (u.å.) Grundläggande molekyärgenetik. Hämtat 19.9.2021.  
<https://www.genteknik.se/genetik-och-genteknik/genmodifierade-organismer-gmo/manniska-och-medicin/genetiska-tester/>

Greytak, S. R., Engel, K. B., Parpart-Li, S., Murtaza, M., Bronkhorst, A. J., Pertile, M. D. & Moore, H. M. (2020). Harmonizing Cell-Free DNA Collection and Processing Practices through Evidence-Based Guidance. *Clinical cancer research*, 26(13), 3104-3109. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-3015>

Grölz, D., Hauch, S., Schlumpberger, M., Guenther, K., Voss, T., Sprenger-Haussels, M. & Oelmüller, U., 2018. Liquid Biopsy Preservation Solutions for Standardized Pre-Analytical Workflows—Venous Whole Blood and Plasma. *Current pathobiology reports*, 6(4), s. 275 - 286. [Online] doi:10.1007/s40139-018-0180-z <https://doi.org/10.1007/s40139-018-0180-z> [Hämtat 19.9.2021]

Guled, M. & Knuutila, S., 2013. Mikro-RNA ja syöpä. *Duodecim*, 129, s. 1661–1669

Heino, J., Vuento, M. & Heino, J. (2019). *Biokemia ja solubiologia* (1. painos.). Sanoma Pro Oy.

Henricson, M. (2017). *Vetenskaplig teori och metod: Från idé till examination inom omvårdnad* (Upplaga 2:1.). Studentlitteratur AB.

- Huang, C., Du, M. & Wang, L. (2019). Bioinformatics Analysis for Circulating Cell-Free DNA in Cancer. *Cancers*, 11(6), 805. <https://doi.org/10.3390/cancers11060805>
- Illumina A, u.å. Hämtat 23.10.2021 <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/paired-end-vs-single-read.html>
- Illumina B, u.å. <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/ngs-workflow.html>
- Illumina C. u.å. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. Hämtat 23.10.2021. [https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://emea.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf)
- Illumina D, u.å. [https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/Sequencing\\_Illumina\\_Technology/story\\_html5.html?iframe](https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/courses/Sequencing_Illumina_Technology/story_html5.html?iframe)
- Illumina, E, Measuring sequencing accuracy, u.å. Hämtat 1.10.2021 <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/quality-scores.html?langsel=/fi/>
- Immuno Diagnostics u.å.a, NGS- perusteet osa 1. Hämtat 18.9.2021 <https://www.immunodiagnostic.fi/ngs-perusteet/>
- ISO 20186-3/2019 Molecular in vitro diagnostic examinations - Specifications for pre-examination process or venous whole blood - Part 3: Isolated circulating cell free DNA from plasma (Publication date 2019/9) Hämtat 19.9.2021 <https://www.iso.org/standard/69800.html>
- Isomursu, A., Kononen, J. & Kuopio, T., 2015. Verenkierron solunulkoinen DNA syövän merkkiaineena. *Duodecim*; 131, s. 424–432
- Joensuu, H., Roberts, P.J, Kellokumpu-Lehtinen, P-L., Jyrkkö, S., Kouri, M. & Lyly, T. (red.), 2013, Syöpätaudit. Helsingfors: Duodecim.
- Jokela, M., Oja-Leikas, M., & Rova, M. (toim.), 2017. *Kiehtovat geenit. Mihin geenitietoa käytetään?* Helsinki: Kustannus Oy Duodecim
- Kasper, C. E., Schneidereith, T. A. & Lashley, F. R., 2016. *Lashley's essentials of clinical genetics in nursing practice* (2nd ed.). New York, New York: Springer Publishing Company.
- Kurreck, J. & Stein, C. A. (2016). *Molecular medicine: An introduction*. Wiley-VCH.
- Kustanovich, A., Schwartz, R., Peretz, T. & Grinshpun, A., 2019. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology Therapy*, 20, (8), s. 1057 - 1067
- Lippi, G & Simunic A-M, (editorial), 2019. The preanalytical phase in the era of high-throughput genetic testing. What the future holds. *Diagnosis*, 6(1): 73-74 Hämtat 19.9.2021. doi: 10.1515/dx-2018-0022
- Martinez-Martin, N. & Magnus, D. (2019). Privacy and ethical challenges in next-generation sequencing. *Expert review of precision medicine and drug development*, 4(2), 95-104. Hämtat 11.10.2020doi:10.1080/23808993.2019.1599685[Online] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7413244/>

- Mäkinen, M, Carpén, O., Kosma, V-M., Lehto, P., Paavonen, T. & Stenbäck F. (toim), 2012, *Patologia*. Hämeenlinna: Kariston Kirjapaino Oy/Duodecim
- Nakamura, Y. & Shitara, K. (2020). Development of circulating tumour DNA analysis for gastrointestinal cancers. Hämtat 19.9.2021.  
*ESMO open*, 5(Suppl 1), e000600. <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2019-000600>
- National Cancer Institute a, (NIH), (u.å.) Hämtat 20.6.2021. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Intron>
- Neumann, M. H., Bender, S., Krahn, T. & Schlange, T. (2018). ctDNA and CTCs in Liquid Biopsy – Current Status and Where We Need to Progress. *Computational and structural biotechnology journal*, 16, 190-195. Hämtat 3.10.2021. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2018.05.002>
- Nilbert M., 2013. *Klinisk Onkologi*. Lund, Sweden: Studentlitteratur.
- Parackal, S., Zou, D., Day, R., Black, M. & Guilford, P. (2019). Comparison of Roche Cell-Free DNA collection Tubes® to Streck Cell-Free DNA BCT®s for sample stability using healthy volunteers. *Practical laboratory medicine*, 16, e00125. Hämtat 3.10.2021. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2019.e00125>
- Qiagen PAXgene, u.å. Hämtat 3.10.2021 <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/sample-collection-stabilization/dna/paxgene-blood-ccfdna-tube/>
- Rifai, N., Horvath, A. R. & Wittwer, C. T. (2019). *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics* (Eighth edition.). Elsevier.
- Risberg, B., Tsui, D., Biggs, H., Ruiz-Valdepenas Martin de Almagro, A., Dawson, S., Hodgkin, C., Jones, L., Parkinson, C., Piskorz, A., Marass, F., Chandrananda, D., Moore, E., Morris, J., E., Plagnol, V., Rosenfeld, N., Caldas, C., Brenton, J.D. & Gale, D. (2018). *Effects of Collection and Processing Procedures on Plasma Circulating Cell-Free DNA from Cancer Patients*. Hämtat 3.10.2021 <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2018.07.005>
- Roche u.å. Hämtat 3.10.2021. <https://diagnostics.roche.com/global/en/products/params/cell-free-dna-collection-tube.html>
- Roche- Biomarkers u.å.. Hämtat 21.6.2021. [https://www.roche.com/research\\_and\\_development/what\\_we\\_are\\_working\\_on/research\\_technologies/translational\\_technologies/biomarkers.htm](https://www.roche.com/research_and_development/what_we_are_working_on/research_technologies/translational_technologies/biomarkers.htm)
- Roche Foundation Medicine Hämtat 18.7.2020. <https://www.rochefoundationmedicine.com/cancertesting.html>
- Rossi, G. & Ignatiadis, M., 2019. Promises and Pitfalls of Using Liquid Biopsy for Precision Medicine. *Cancer research (Chicago, Ill.)*, 79(11), s. 2798–2804. Hämtat 18.8.2020. doi: 10.1158/0008-5472.can-18-3402. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/79/11/2798.long>
- Saarenheimo, J., Andersen, H., Eigeliene, N. & Jekunen A.,(2021). Current challenges in applying gene-driven therapies in clinical lung cancer practice. *World journal of clinical oncology*, 12(8), 656-663. <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i8.656>
- Simundic, A., Bölenius, K., Cadamuro, J., Church, S., Cornes, M. P., van Dongen-Lases, E. C., Vermeersch, P. (2018). Joint EFLM-COLABIOCLI Recommendation for venous blood sampling. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 56(12), 2015 - 2038.

Smear. Statens Medicinsk-Etiska råd, u.å. Hämtat 1.10.2021. <https://smer.se/teman/genetiska-analyser/>

Streck cell-free DNA BCT. U.å. Hämtat 30.9.2021  
<https://www.streck.com/products/stabilization/cell-free-dna-bct-ivd/> [

Strumfa, I. (editor) & Gardovskis, J., 2019. *Liquid Biopsy. Introductory Chapter: Liquid Biopsy- A Promising Technology of the Future.* IntechOpen, E-Book: <https://www.intechopen.com/books/liquid-biopsy> [TritoniaFinna 28.7.2020]

TENK, God vetenskaplig praxis och handläggning av misstankar om avvikelser från den i Finland. Forskningsetiska delegationens anvisningar, 2012. Hämtat 1.9.2021  
[https://tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK\\_ohje\\_2012.pdf](https://tenk.fi/sites/tenk.fi/files/HTK_ohje_2012.pdf)

TENK, Etiska principer för humanforskning och etikprovning inom humanvetenskaperna i Finland. Forskningsetiska delegationens anvisningar 2019, s. 1–28.  
[https://tenk.fi/sites/default/files/202101/Etikprovning\\_inom\\_humanvetenskaperna\\_2020.pdf](https://tenk.fi/sites/default/files/202101/Etikprovning_inom_humanvetenskaperna_2020.pdf)

Thermo Fisher Scientific, Sanger Sequencing Applications Hämtat 26.6.2020 Rifai ctDNA.  
[https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/applications.html?gclid=EAlaIqobChMI4pWP6rmc6gIVwkkYCh1logb1EAAYASAAEgJvevD\\_BwE&ef\\_id=EAlaIqobChMI4pWP6rmc6gIVwkkYCh1logb1EAAYASAAEgJvevD\\_BwE:G:s&s\\_kwcid=AL!3652!3!386495439524!b!g!!](https://www.thermofisher.com/fi/en/home/life-science/sequencing/sanger-sequencing/applications.html?gclid=EAlaIqobChMI4pWP6rmc6gIVwkkYCh1logb1EAAYASAAEgJvevD_BwE&ef_id=EAlaIqobChMI4pWP6rmc6gIVwkkYCh1logb1EAAYASAAEgJvevD_BwE:G:s&s_kwcid=AL!3652!3!386495439524!b!g!!)

Weber, S., Spiegl, B., Perakis, S. O., Ulz, C. M., Abuja, P. M., Kashofer, K., . . . Heitzer, E. (2020). Technical Evaluation of Commercial Mutation Analysis Platforms and Reference Materials for Liquid Biopsy Profiling. *Cancers*, 12(6), p. 1588. Hämtat 13.9.2020  
doi:10.3390/cancers12061588  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7352370/pdf/cancers-12-01588.pdf>





Wikipedia, Illumina Inc, u.å. Hämtat 1.10.2021. [https://en.wikipedia.org/wiki/Illumina,\\_Inc.](https://en.wikipedia.org/wiki/Illumina,_Inc.)

Wilson, K., Walker, J., M., Hofmann, A. & Clokie, S. (2018). *Wilson and Walker's principles and techniques of biochemistry and molecular biology* (Eight edition.). Cambridge University Press.

Woodhouse, R., Li, M., Hughes, J., Delfosse, D., Skoletsky, J., Ma, P., . . . Dennis, L., 2020. Clinical and analytical validation of FoundationOne Liquid CDx, a novel 324-Gene cfDNA-based comprehensive genomic profiling assay for cancers of solid tumor origin. *PloS one*, 15(9), p. e0237802. Hämtat 19.10.2020. doi:10.1371/journal.pone.0237802  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7518588/pdf/pone.0237802.pdf>

Zhao, Y., Li, Y., Chen, P., Li, S., Luo, J. & Xia, H. (2019). Performance comparison of blood collection tubes as liquid biopsy storage system for minimizing cfDNA contamination from genomic DNA. *Journal of clinical laboratory analysis*, 33(2), pp. e22670-n/a. Hämtat 3.10.2021  
doi:10.1002/jcla.22670

FoundationOneLiquid testet kan användas till att testa alla solida tumörer. I denna tabell finns alla olika cancergenen inpassat mot tumörorgan.

			
NSCLC	BRÖST	PROSTATA	OVARIAL
EGFR	HER2 (ERBB2)	BRCA1	BRCA1
BRAF	ESR1	BRCA2	BRCA2
ALK	NTRK1/2/3	ATM	RAD51
ROS1	BRCA1	CHEK2	BRIP1
HER2 (ERBB2)	BRCA2	MSH2/6	PALB2
MET	PIK3CA	PALB2	MSH2/6
RET	MSI	MLH1	PMS2
NTRK1/2/3		PMS2	MSI
MSI		RAD51D	
TMB		CDK12	
		FANCA	
		MSI	



FoundationOne Liquid CDx - Genlista

<b>DNA gene list: entire coding sequence for the detection of base substitutions, insertion/deletions, and copy number alterations</b>									
APC	AR	ATM	BRC1A1	BRC1A2	CND1	CD274 (PD-1)	CDH1	CDK4	
CDK6	CDK2	CDKN2A	CHEK2	CRKL	EGR	ERBB2	ERRFI1	FGFR1	
FGFR2	FOXO2	KRAS	MDM2	MET	MYC	MYCN	NF1	PALB2	
PDCC1G2 (PD-L2)	PTEN	PTPN11	RBI	SMO	STK11	TP53	VEGFA		
<b>DNA gene list: select exonic sequence of the detection of base substitutions, insertions/deletions, and copy number alterations</b>									
ABL1 Exons 4-9	AKT1 Exon 3	ALK Exons 20-29	ARAF Exons 4, 5, 7, 11, 13, 15, 16	BRAF Exons 11-18	BTK Exons 2, 15	CTNMB1 Exon 3	DDR2 Exons 5, 17, 18	ESR1 Exons 4-8	
EZH2 Exons 4, 16, 18	FGFR3 Exons 7, 9, 14	FLT3 Exons 14, 15, 20	GNAI1 Exons 4, 5	GNAQ Exons 4, 5	GNAS Exon 1, 8	HRAS Exons 2, 3	IDH1 Exon 4	IDH2 Exon 4	
JAK2 Exon 14	JAK3 Exons 5, 11-15, 15, 16	KIT Exons 8, 9, 11-13, 17	MAP2K1 (MEK1) Exons 2, 3	MAP2K2 (MEK2) Exons 2-4, 6, 7	MPL Exon 10	MTOR Exons 19, 30, 39, 40, 43-45, 47, 48, 53, 56	MYD88 Exon 4	NPM1 Exons 4-6, 8, 10	
NRAS Exons 2, 3	PDGFRA Exons 12, 18	PDGFRB Exons 12-21, 23	PIK3CA Exons 2, 3, 5-9, 10, 14, 19, 21	RAFI Exons 3-7, 10, 14, 15, 17	RET Exons 11, 13-16	ROSI Exons 36-38, 40	TERT (Promoter only)		
<b>DNA gene list: for the detection of select rearrangements</b>									
ALK	EGFR	FGFR2	FGFR3	PDGFRA	RET	ROSI			
<b>Additional assays: for the detection of select cancer biomarkers</b>									
Microsatellite Instability (MSI)									

Genlista för FoundationOneLiquid. Källa:

[https://www.foundationmedicine.se/content/dam/rfm/se\\_v2sv\\_se/documents/information\\_och\\_material/M-SE-0000428-Technical-Specifications-FoundationOne-Liquid-CDx.pdf](https://www.foundationmedicine.se/content/dam/rfm/se_v2sv_se/documents/information_och_material/M-SE-0000428-Technical-Specifications-FoundationOne-Liquid-CDx.pdf)

eller Tekniska specifikationer med genlista från Finlands FoundationMedicine websida:

[https://www.foundationmedicine.fi/content/dam/rfm/fi\\_v2-fi\\_fi/F1L%20Technical%20Specifications\\_v03\\_zinc2.pdf](https://www.foundationmedicine.fi/content/dam/rfm/fi_v2-fi_fi/F1L%20Technical%20Specifications_v03_zinc2.pdf)

**FoundationOne®Liquid CDx – Beslutsstöd.**

Källa: [https://www.foundationmedicine.se/content/dam/rfm/se\\_v2-sv\\_se/documents/information\\_och\\_material/next-generation-test-improved-report-liquid-cdx.pdf](https://www.foundationmedicine.se/content/dam/rfm/se_v2-sv_se/documents/information_och_material/next-generation-test-improved-report-liquid-cdx.pdf)



- 1 Patientens id-nummer och provdetaljer
- 2 Summering av alla fynd; förändringar, biomarkörer samt antalet terapier och kliniska studier
- 3 Genomiska förändringar, kliniskt relevant målriktade terapier och kliniska studier/prövningar före resp förändring
- 4 bTMB och MSI vilket kan förutsäga respons på immunterapi
- 5 Alfabetiskt rangordnade behandlingar inom NCCNs guidelines\*\*
- 6 "Tumör fraktion", graden av tumör-DNA i blodbiopsin, vilket anger ett mått för sannolikheten att hitta genomiska förändringar
- 7 Genförändringar utan terapi- eller studieförslag



- 8 Variant allele frequency (VAF%) för basparutbyten och deletioner

## Samtyckeblankett för tjänsten FoundationOne®CDx, FoundationOne®Heme och FoundationOne®LiquidCDx

Samtycke - blanketten innehåller 12 sidor. Här är kopierat första sidans översikt. Detta samtycke är taget från Foundation Medicine Sverige och kan ha olikheter till den som används i Finland. Hittar ingen liknande från finska webbsidan.

Källa:

[https://www.foundationmedicine.se/content/dam/rfm/se\\_v2sv\\_se/documents/information\\_och\\_material/M-SE-00000617\\_Consent\\_Form\\_FMI\\_services\\_Sweden\\_July\\_2021.pdf](https://www.foundationmedicine.se/content/dam/rfm/se_v2sv_se/documents/information_och_material/M-SE-00000617_Consent_Form_FMI_services_Sweden_July_2021.pdf)

<https://www.foundationmedicine.fi/> Hämtat 25.10.2021



## SAMTYCKE

### Tjänst (markera beställd Tjänst)

 FOUNDATIONONE®CDx   FOUNDATIONONE®HEME   FOUNDATIONONE®LIQUID CDx

### Patientinformation och samtycke till behandling av personuppgifter

#### Översikt

Denna patientinformations- och samtyckeshandling är indelad i fyra avsnitt. Nedan finner du en översikt över innehållet i de olika delarna:

- Avsnitt 1 - Innehåller information om behandlingen av dina personuppgifter för att tillhandahålla Tjänsten (enligt definitionen i avsnitt 1 nedan). Avsnittet avslutas med att du ges möjlighet att samtycka till den personuppgiftsbehandling som beskrivs i avsnittet.
- Avsnitt 2 - Innehåller information om behandlingen av dina personuppgifter inom ramen för tjänsten Peer2Peer som är en form av expertsupport till behandlande läkare. Avsnittet avslutas med att du ges möjlighet att samtycka till den personuppgiftsbehandling som beskrivs i avsnittet. Ditt samtycke i denna del är helt frivilligt och du kan avstå från att samtycka och ändå ta del av Tjänsten (enligt definitionen i avsnitt 1 nedan).
- Avsnitt 3 - Innehåller information om behandling av dina personuppgifter för vetenskapliga forskningsändamål. Avsnittet avslutas med att du ges möjlighet att samtycka till den personuppgiftsbehandling som beskrivs i avsnittet. Ditt samtycke i denna del är helt frivilligt och du kan avstå från att samtycka och ändå ta del av Tjänsten (enligt definitionen i avsnitt 1 nedan).
- Avsnitt 4 - Innehåller allmän information om behandlingen av dina personuppgifter av relevans för samtliga övriga avsnitt.