

# Cellefritt tumor-DNA i blod, et nytt verktøy for diagnostikk og monitorering av kreftpasienter?

Av **BENTE RISBERG**, bioingeniør, MSc<sup>1,2</sup>;  
**HELEN VÅLERHAUGEN**, bioingeniør, MSc<sup>1,2</sup>  
 og **HEGE G. RUSSNES**, lege, patologi<sup>1,2,3</sup>  
 Epost: Hege.Russnes@rr-research.no

Allerede i 1948 ble det påvist cellefritt DNA (cfDNA) i varierende mengde i blod, men først flere tiår senere oppdaget man at cfDNA i blodplasma også kunne stamme fra solide svulster. Mengden av cellefritt tumor-DNA (ctDNA) er ofte svært liten og det er i tillegg fragmentert, noe som har vanskeliggjort deteksjon. De siste tiårenes inntog av sensitive molekylære metoder, som massiv parallell sekvensering (MPS) og digital PCR (dPCR), har ført til en økende interesse for analysering av ctDNA. Vi gir her en oversikt over kunnskap innen feltet og diskuterer mulighetene for at måling av ctDNA i perifert blod kan benyttes som en klinisk-diagnostisk test hos pasienter med solide svulster.

Utvikling av kreft skyldes en rekke faktorer. Man antar at utgangspunktet er at en celle får vekstfordeler og er opphav til mange celler som etter hvert danner en svulst. Noen av disse cellene kan få genetiske endringer som gir dem evne til å

1) Avd. for Patologi, Klinikk for diagnostikk og intervensjon, Oslo Universitetssykehus

2) Avd. for Genetikk, Institutt for kreftforskning, Klinikk for kreft, kirurgi og transplantasjon, Oslo Universitetssykehus

3) K. G. Jebsen senter for brystkreftforskning, Institutt for klinisk medisin, Det medisinske fakultet, Universitetet i Oslo.

■ Bioingeniøren er godkjent som vitenskapelig tidsskrift. Denne artikkelen er fagfelle-vurdert og godkjent etter Bioingeniørens retningslinjer.

## Hovedbudskap

Kreftbehandling går i retning av en mer målrettet terapi. Det betyr at laboratoriene må identifisere mutasjoner som kan ha betydning for valg av behandling. De må også etablere nye sensitive metoder for å måle behandlingseffekt. På grunn av heterogenitet i tumor og eventuelle metastaser, kan det være utfordrende å vite om vevsundersøkelser er representative. Analysering av cellefritt tumor-DNA i blodet kan bli et nyttig verktøy i dette arbeidet.

## Sammendrag og nøkkelord

**Bakgrunn:** Allerede i 1948 ble det påvist cellefritt DNA (cfDNA) i varierende mengde i blod, men først flere tiår senere oppdaget man at cfDNA i blodplasma også kunne stamme fra solide svulster og metastaser. Mengden cellefritt tumor-DNA (ctDNA) er ofte svært liten og det er i tillegg fragmentert, noe som har vanskeliggjort deteksjon. De siste tiårenes inntog av sensitive molekylære metoder, som massiv parallell sekvensering (MPS) og digital PCR (dPCR), har bidratt til en økende interesse for analysering av ctDNA.

**Materiale og metoder:** Artikkelen er basert på publikasjoner funnet ved søk i PubMed (søkeord: liquid biopsy, ctDNA, cfDNA, cancer), med siste søk i mai 2015. Vi har også inkludert egne erfaringer.

**Resultater/Diskusjon:** I moderne kreftbehandling ser man at behandling i større grad tilpasses krefttype og dens molekylære endringer. Påvisning av ctDNA i blod kan bli et viktig verktøy for å monitorere behandlingsrespons og tidligere oppdage sykdomsprogresjon. En utfordring ved deteksjon av ctDNA er at de mest sensitive metodene, slik som digital PCR (dPCR), krever at man vet hvilke mutasjoner man leter etter. Utviklingen innen massiv parallell sekvensering (MPS) går raskt, og muligheten til å gjøre sekvensering av mange selekterte gener med lite startmateriale og med høy sensitivitet, er tilstede. En annen utfordring ved deteksjon av ctDNA er presis kvantitering. Ettersom en økning av ctDNA ser ut til å være informativ, må protokoller være standardiserte slik at variasjonen mellom prøver fra ulike tidspunkt er minimale. Kombinering av økt fokus på standardisering av prøvetakning og målemetoder, og at flere klinisk studier velger å inkludere ctDNA-målinger, vil på sikt gi svar på om ctDNA-analyser skal inn som standardanalyse for oppfølging av kreftpasienter.

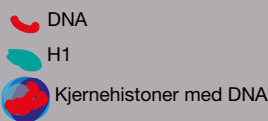
**Nøkkelord:** Cellefritt DNA, sirkulerende tumor-DNA, sekvensering, kreft, monitorering av terapi

*Les engelsk sammendrag i nettutgaven.*

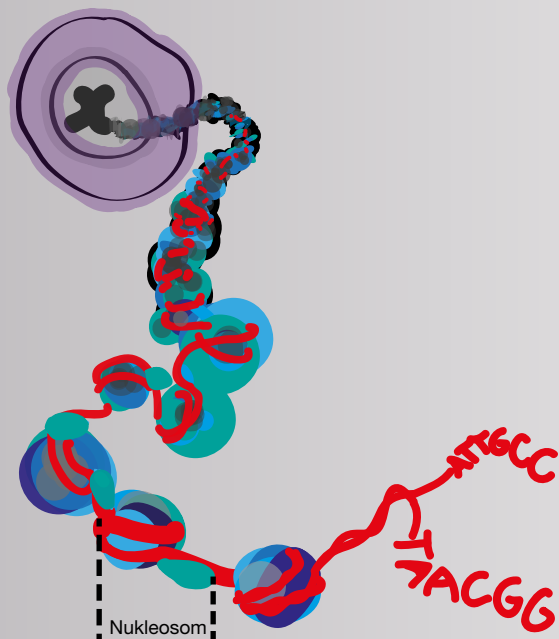
migrere og invadere omkringliggende vev. Dette gjør at en svulst blir malign, men i tillegg kan kreftcellene få egenskaper som gjør at de kan trenge inn i blod eller lymfekanaler og metastasere til andre steder i kroppen. Cellegift og stråling, i tillegg

til kirurgi, er fortsatt primærbehandling for de aller fleste kreftformer, men veien går mot en mer persontilpasset kreftbehandling med medikamenter rettet mot signalveier som har betydning for kreftcellenes overlevelse og vekst. Mål-

A



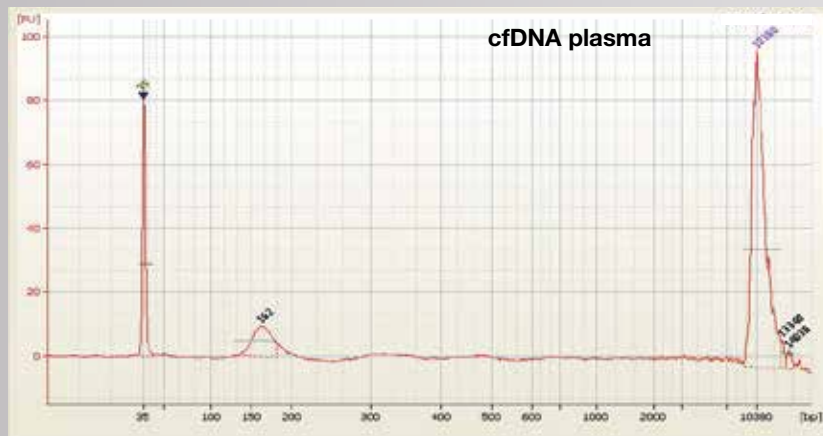
Celle



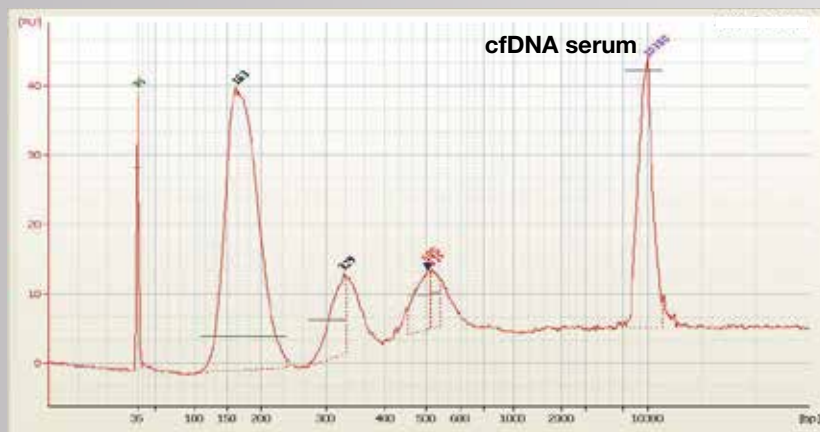
I cellekjernen er DNA bundet til proteiner og danner kromatin. Nukleosomet, den primære bestanddelen, består av en histonkjerne som DNA-heliksen er kveilet to ganger rundt, tilsvarende 146 bp, samt en liten «linkertråd» på mellom 15-100 bp. Histon H1 er med på å stabilisere og pakke nukleosomene. Det er i linker-regionen DNA er mest tilgjengelig og utsatt for degradering av nukleaser. Ved apoptose pakkes kromatinet, og endonukleaser kløyver DNA slik at det dannes DNA-fragmenter tilsvarende ett eller flere nukleosomer. Dette vil skape et mønster som kalles apoptotisk stige. Ved nekrose er ikke DNA like tett pakket slik at fragmenter av mer varierende lengder dannes.

B

Konsentrasjon av cfDNA målt med Agilent High Sensitivity DNA Kit. X-aksen angir fragmentenes bp-størrelse og Y-aksen viser mengden cfDNA målt i forhold til øvre markør (10380 bp) og er oppgitt som fluoressensenheter (FU). En øvre og nedre (35 bp) markør ses i hvert elektroferogram.



cfDNA fra blodgiver målt i EDTA-plasma.



cfDNA fra blodgiver målt i serum.

I serum kan man tydelig se en apoptotisk stige med DNA-fragmenter tilsvarende ett, to og tre nukleosomer. Det er ca. 8-10 ganger høyere nivå av cfDNA i serum enn i EDTA-plasma, og dette stammer fra leukocytter som lyses under koaguleringsprosessen.

### FIGUR 1.

rettet behandling er kostbar og kan være forbundet med betydelige bivirkninger, så når dette tilbys er det viktig å ha gode verktøy for seleksjon av pasienter, for deretter å måle om behandlingen er effektiv.

### Materiale og metode

Artikkelen er basert på publikasjoner funnet ved søk i PubMed (søkeord: liquid biopsi, ctDNA, cfDNA, cancer), med siste søk i mai 2015. Vi har også inkludert egne erfaringer.

### Cellefritt DNA (cfDNA)

Cellefritt DNA er segmenter av DNA som befinner seg utenfor celler. Man har i hovedsak studert cfDNA i blod, men det forekommer også i andre kroppsvæsker. Hovedvekten av cfDNA i blod stammer fra blodets egne celler, men også DNA fra andre celler entrer sirkulasjonen. Ved infeksjoner kan DNA fra patogener også være tilstede (1, 2). Opphavet til cfDNA antas i hovedsak å være celledød, både ved apoptose og nekrose, men det er også

mulig at celler aktivt frigir DNA.

Ved nekrose sprekker cellene, celleres-tene fordøyes av makrofager og det dannes DNA-fragmenter av varierende størrelser. Apoptose er en kontrollert prosess, styrt av cellens egne signaler. Cellen vil krympe, kromatinet kondenseres og kuttes til nukleosomale enheter, som består av 146 basepar (bp) DNA snurret rundt en histonkjerne. Ved apoptose får man DNA-fragmenter tilsvarende ett, to eller flere nukleosomer (figur 1A og 1B) (3).

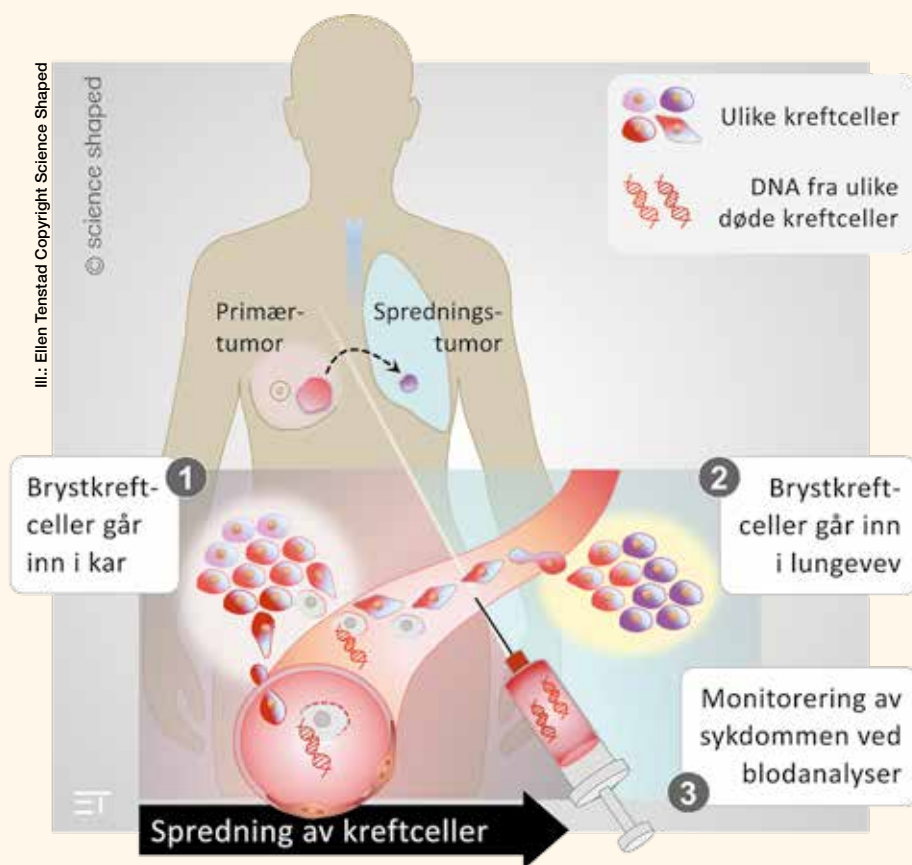
En rekke tilstander, som betennelser, traumer, graviditet (føtal DNA i mors blod), autoimmune sykdommer og fysisk belastning, fører til en økning av cfDNA. Vanligvis vil makrofager infiltrere vevet og fjerne de apoptotiske og nekrotiske cellerestene, men når systemet overbelastes, slippes cfDNA ut i sirkulasjonen (4). I blodbanen er cfDNA oftest bundet til proteiner, lipider og cellemembraner eller innkapslet i vesikler (5), og halveringstiden er kort (15 – 120 minutter) (6, 7).

### Totalmengde cfDNA i blod hos kreftpasienter

Allerede i en studie fra 1977 ble det undersøkt om totalmengde cfDNA i serum var høyere hos kreftpasienter enn hos friske individer. Selv om det i snitt ble påvist et betydelig forhøyet nivå hos kreftpasienter, fant de også store forskjeller mellom de ulike kreftformene. Halvparten av pasientene hadde normalt nivå, men det kunne skyldes at pasientene allerede var behandlet med kirurgi eller kjemoterapi (8). Senere studier har støttet disse funnene, og generelt finner man økt mengde cfDNA hos kreftpasienter sammenliknet med friske, og nivået henger ofte sammen med tumormasse (9), men variasjonen er stor og ofte overlappende med benigne tilstander.

Flere har også undersøkt om fragmentstørrelsen til cfDNA kan skille mellom friske, benigne og maligne tilstander. I en studie ble det påvist en sammenheng både mellom økt nivå og økt fragmentering av cfDNA hos pasienter med kolorektalkreft, sammenliknet med friske individer. Tilsvarende så man en tendens til økt mengde og mindre intakt cfDNA ved metastatisk bryst- og kolorektalkreft, sammenliknet med friske og pasienter med lokalisert sykdom (10, 11). Andre studier har kommet til motsatt konklusjon og påvist økt andel lange fragmenter hos kreftpasienter, sammenliknet med friske. En av teoriene var at lange fragmenter skyldtes nekrotisk tumorvev (12 -14). Det foreligger også studier hvor slike sammenhenger ikke ble påvist (15).

Det er derfor fortsatt uavklart om fragmentering og totalmengde cfDNA er informativt. En stor utfordring er mangel på standardiserte metoder, noe som bør etableres for å kunne avklare om mengde



**FIGUR 2:** Celler fra primærtumor kan invadere blodkar og etablere metastaser i andre organer. Cellefritt DNA i blod kan stamme fra døde normalceller, primærtumorceller, metastaseceller eller fra sirkulerende tumorceller.

og lengde av cfDNA kan benyttes som markører ved kreftsykdom.

### Cellefritt tumor-DNA (ctDNA)

Ettersom en rekke benigne tilstander fører til økt cfDNA, er deteksjon av somatiske mutasjoner en metode for å påvise ctDNA.

Over tid akkumulerer kreftcellene en rekke mutasjoner, de fleste vil være «passasjermutasjoner» som ikke er involvert i kreftutviklingen, mens en liten andel vil være aktive pådrivere av sykdommen, såkalte «sjåførmutasjoner». Når man leter etter ctDNA bør man velge «sjåførmutasjoner», som har oppstått tidlig og finnes i alle cellene. Men man må være oppmerksomme på at det kan finnes subkloner med andre mutasjoner som kan dominere senere i sykdommen.

Flere store forskningssamarbeid, for

eksempel The Cancer Genome Atlas (TCGA) og International Cancer Genome Consortium (ICGC) har kartlagt og offentliggjort mutasjonsspektrene for en rekke kreftformer. Denne informasjonen kan brukes til valg av markører. Ved noen typer kreft, som kolorektalkreft, oppstår mutasjoner i hotspotregioner. Det er da tilstrekkelig å lete etter mutasjoner i et fåtall gener med tanke på behandling. Ved andre typer kreft, som for eksempel brystkreft, er bildet mer heterogent, og det er bare noen få gener som er oftere mutert enn andre. Dermed er det ikke nødvendigvis tilstrekkelig å etablere en screeningtest basert på noen få gener for hele pasientgruppen. I tillegg er noen kreftsykdommer mer dominert av koptallsforandringer enn andre, noe som krever en egen tilnærming (16).

Svulster er i utgangspunktet klonale,

det vil si at de utgår fra én celle, men når svulsten vokser kan det oppstå subkloner av celler med andre mutasjoner. Både under kreftutvikling og ved behandling, er det en risiko for at det oppstår subkloner som gjør kreftceller motstandsdyktige og/eller gir celler evne til å spre seg. Derfor vil én enkelt biopsi av en svulst ikke nødvendigvis være representativ for alle subkloner. I tillegg er det ikke mulig å ta biopsier fra alle metastaser, slik at muligheten for å kartlegge heterogenitet er begrenset. En løsning kan være deteksjon av ctDNA i blod. Dersom tumor-DNA fra alle kloner kommer ut i blodbanen, kan analyse av ctDNA i blodprøve gi et bedre helhetsinntrykk av hvilke mutasjoner som er tilstede (figur 2). En slik tilnærming vil både spare pasienten for smertefulle inngrep og helsevesenet for avansert prøvetakning og kostbar radiologi. Samtidig kan det gi legene mulighet til tidlig endring av behandlingsregime.

### Metoder for deteksjon av ctDNA i blod

Detaljer om prøvetaking og metodebeskrivelser for massiv parallell sekvensering (MPS) og digital PCR (dPCR) er presentert i egne faktabokser.

Plasma foretrekkes fremfor serum for isolasjon av cfDNA, fordi leukocytter lyseres og frigjør DNA under koagulasjonsprosessen (figur 1B) (17). Siden mengden ctDNA ofte er lav i forhold til mengden fritt normalt DNA, må man benytte sensitive teknikker, men valg av metode avhenger også av hvilken krefttype som skal undersøkes. MPS er egnet til å screene et stort antall gener for mutasjoner, mens dPCR kun analyserer et fåtall gener samtidig. En forskningsgruppe benyttet dråpebasert dPCR (ddPCR) og analyserte de syv vanligste KRAS-mutasjonene i plasma-DNA fra 50 pasienter med metastatisk kolorektalkreft. Resultatene viste god korrelasjon, både når mutasjonstestene ble analysert hver for seg og samlet i en multipleksanalyse, men multiplestesten hadde noe lavere sensitivitet (18). En ulempe med dPCR er at man på forhånd må vite hvilke mutasjoner man vil detektere, eventuelt må man bestemme seg for å detektere bare hyppig forekommende forandringer. Men dPCR er enkel å utføre og har god sensitivitet, med mulighet til å

detektere < 0,01 % mutert DNA.

MPS er per i dag ikke like sensitiv som dPCR, men fordelene er at man kan sekvensere opp til flere tusen genregioner parallelt, og screene mange prøver samtidig, selv om pasientgruppen er heterogen. I en studie (19) ble det valgt ut 500 gener for målrettet sekvensering av cfDNA fra pasienter med ikke-småcellet lungekreft. Analysen ble først utført på primærtumor for identifisering av hvilke mutasjoner som var til stede hos hver av pasientene, deretter ble analysen utført på cfDNA for deteksjon av ctDNA. I snitt ble seks mutasjoner detektert i tumor hos hver pasient. Deteksjongrensen gikk helt ned mot 0,02 % i plasma når man visste hvilke mutasjoner det skulle letes etter. Ved analyse av ctDNA uten å ha kjennskap til mutasjonsspekteret på forhånd var deteksjongrensen på 0,4 % (19).

### Monitorering av sykdomsforløp ved hjelp av ctDNA

For mange kreftformer bruker man, i tillegg til klinisk undersøkelse, serumanalyser for kreftantigener som CEA, CA125, CA 15-3 og PSA for monitorering. Disse analysene har i en del tilfeller manglende spesifisitet og sensitivitet. Når det gjelder radiologi kan både tumorstørrelse og påvisning av metastaser underveis i behandlingen være utfordrende.

Ved enkelte leukemier har man i mer enn ti år rutinemessig målt behandlingsrespons i blod eller benmargsprøver ved å påvise tumorspesifikke endringer i hvite blodlegemer. Svært sensitive metoder har gjort det mulig å finne én leukemisk

celle blant 100 000 normale celler, såkalt minimal restsykdom (MRD). Endringer i MRD-verdiene sier noe om respons på behandling og brukes for å velge behandlingsregimer underveis (20, 21). For solide svulster har det ikke vært like enkelt å detektere MRD. Det har vært gjort mye arbeid basert på deteksjon av sirkulerende tumorceller i blod (CTC) og disseminerte tumorceller i benmarg (DTC) fra solide svulster. Men frekvensen av slike sirkulerende kreftceller er relativt lav (gjerner 1 av 10 000 000 celler). Og i tillegg kan falskt negativt resultat være en utfordring, fordi cellene identifiseres ved hjelp av epitelspesifikke proteiner, som kan være underuttrykt.

I en studie ble pasienter under behandling for metastatisk brystkreft, monitorert med måling av ctDNA, CTC og CA15-3, i tillegg til standard radiologisk undersøkelse. Formålet var å undersøke hvor informativ ctDNA var når det gjaldt respons på terapi, sammenlignet med de andre markørene. Resultatene viste at ctDNA korrelerte best (89 %) med de radiologiske funnene og at ctDNA varslet tilbakefall to til ni måneder tidligere enn radiologi hos 53 % av pasientene (22). I en annen studie hvor man analyserte ctDNA i plasma hos pasienter med kolorektalkreft, fant man ctDNA i blod ti måneder tidligere enn sykdomsprogresjon påvist ved radiologi (23). Dette indikerer at man kan bruke deteksjon av ctDNA for å endre behandling. Det gir større mulighet til å forhindre metastatisk sykdom.

En annen studie har vist at mengde ctDNA kan variere, selv hos pasienter ►

## Prøvetakning og ekstraksjon

EDTA er foretrukket som antikoagulant, fordi heparin hemmer PCR. Prøven bør sentrifugeres så fort som mulig og helst innen to timer ved lav hastighet (1000-1900g). Deretter avpippeteres plasma ca. 0,5 cm over leukocytlaget og sentrifugeres ved høy hastighet (16000g) for å fjerne cellerester. Plasma avpippeteres forsiktig og fryses ved -70°C. Sentrifugering ved høy hastighet kan også gjøres etter at prøven har vært fryst, men gjentatt frysing og tining av prøvematerialet bør unngås (17).

Blodprøven kan også tas på BCT-rør (Streck), som fikserer blodlegemene og forhindrer lysering. Bruken av disse rørene kan være en fordel ved desentralisert prøvetakning, fordi de kan sendes i romtemperatur og prosesseres sentralt.

For ekstrahering av cfDNA finnes ulike ekstraksjonskit.

med fremskreden sykdom, og at nivået ikke nødvendigvis reflekterer grad av sykdom. Ved hjelp av detaljundersøkelser av prøver fra én brystkreftpasient med store mengder sirkulerende tumorceller, fant man kun 3 % ctDNA i plasma. I en tidligere studie hadde samme forskningsgruppe, hos en andel av pasienter med metastatisk kolorektal- eller brystkreft, sett en sammenheng mellom økt antall CTC, økte fragmentlengder og økt nivå av ctDNA (24, 25).

De fleste studiene hittil har fokusert på påvisning av ctDNA hos pasienter med metastatisk sykdom, ettersom konsentrasjonene er høyest hos denne gruppen. Noen få studier har også vist at ctDNA er detekterbart i tidlig stadium. En studie som omfattet 14 krefttyper der ctDNA ble undersøkt hos pasienter både i tidlig og sen fase av sykdom, viste at 49 % av pasientene i tidlig stadium hadde detekterbart ctDNA, kontra 82 % av pasienter med metastatisk sykdom. De påviste også store forskjeller i mengde ctDNA hos pasienter med ulike kreftformer. Også innad i samme kreftsykdom kunne mengde ctDNA variere betydelig (26). I en liten, prospektiv studie ble pasienter med brystkreft i tidlig stadium analysert for ctDNA før og etter operasjon. Selv om nivået var lavt hos de fleste før operasjon, kunne man fortsatt påvise små konsentrasjoner av ctDNA hos 50 % av pasientene hvor det var tatt postoperativ blodprøve (27).

Dersom ctDNA skal brukes for monitoring, er standardisert prøvetakning og prosessering viktig, slik at det kvantita-

tive nivået av ctDNA er sammenlignbart for hver enkelt pasient gjennom hele løpet. Selv om det letes etter spesifikke molekylære tumormarkører med sensitive metoder, viser studier at ctDNA ikke er påvisbart hos enkelte pasienter, for eksempel ved progressiv metastatisk sykdom (25). Dette kan skyldes at ctDNA faktisk ikke er tilstede i blod, men man må også vurdere om det kan være metodiske årsaker. Mens man i mange studier av ctDNA har benyttet fragmentlengder på rundt ett nukleosom, har andre påvist at ctDNA kan detekteres ved analyse av kortere fragmentlengder. Dette kan forklare hvorfor enkelte rapporterer om høyere andel ctDNA i kolorektalkreft, sammenlignet med andre studier, når analysene var tilpasset fragmentlengder mindre enn 100 bp (28–30).

For oppfølging av enkeltpasienter er det i tillegg viktig å velge best egnet metode for måling av ctDNA gjennom hele sykdomsforløpet. Bare små endringer i fragmentlengder kan gi stor innvirkning på kvantitative målinger. Siden utviklingen av metoder for dPCR og MPS skjer raskt, er det viktig å ta dette med i betraktning hvis man endrer metoder underveis.

### **Deteksjon av ctDNA i blod; utfordringer og muligheter**

En utfordring ved deteksjon av ctDNA er at de mest sensitive metodene, slik som dPCR, krever at man vet hva man leter etter. For enkelte tumortyper med få høyfrekvente mutasjoner forutsettes det at man kjenner mutasjonsprofilen for den

enkelte pasient, for deretter å kunne skreddersy tester til oppfølging. I forskningsstudier er dette viktig for å kunne kartlegge betydningen av slik monitoring, men som rutinediagnostikk kan det være litt for tid- og ressurskrevende. Utviklingen innen MPS går raskt, og muligheten for å gjøre sekvensering av mange selekterte gener med lite startmateriale og høy sensitivitet, er snart innen rekkevidde. Det forventes også at både pris og tidsbruk vil falle betraktelig. Det muliggjør design av målrettede sekvenseringsanalyser for hver tumorform, for både kartlegging av DNA-forandringer i primærtumor, og deteksjon av ctDNA i oppfølgingsprøver. En fordel med å undersøke genpaneler er at man kan detektere forandringer i ctDNA som ikke var tilstede i primærtumoren.

En annen utfordring ved deteksjon av ctDNA er presis kvantitering. Ettersom en økning av ctDNA ser ut til å være informativ, må protokollene være standardiserte slik at variasjonen mellom prøver fra ulike tidspunkt er minimale. I en EU-finansiert studie vi deltar i, arbeides det med å utvikle protokoller for prøvetakning, prosessering og ekstraksjon som vil kunne ISO-sertifiseres. Det er i tillegg av betydning hvor stort blodvolum man ekstraherer DNA fra, og hvor mye DNA man tar videre i analysen. Har man mye cfDNA (for eksempel ved infeksjon) er totalmengden cfDNA høy og man må undersøke mer DNA for å finne ctDNA. Mange oppgir derfor mengde ctDNA per ml plasma som standard. Ved design av assay for dPCR, er det også av betydning hvor lang fragmentlengde man undersøker. Ved negative prøver bør man alltid vurdere om det kan være metodiske årsaker til at man ikke klarer påvise ctDNA.

### **Konklusjon**

Deteksjon av ctDNA er et felt som er i rask utvikling, både kunnskapsmessig og teknologisk. Kombinasjon av økt fokus på standardisering av prøvetakning og målemetoder, og at flere kliniske studier velger å inkludere ctDNA-målinger, vil på sikt gi svar på om ctDNA-analyser skal inn som rutine for oppfølging av kreftpasienter. Denne metoden kan bli et viktig bidrag til bedre monitoring av behandlingsrespons og sykdomsprogresjon hos kreftpasienter.

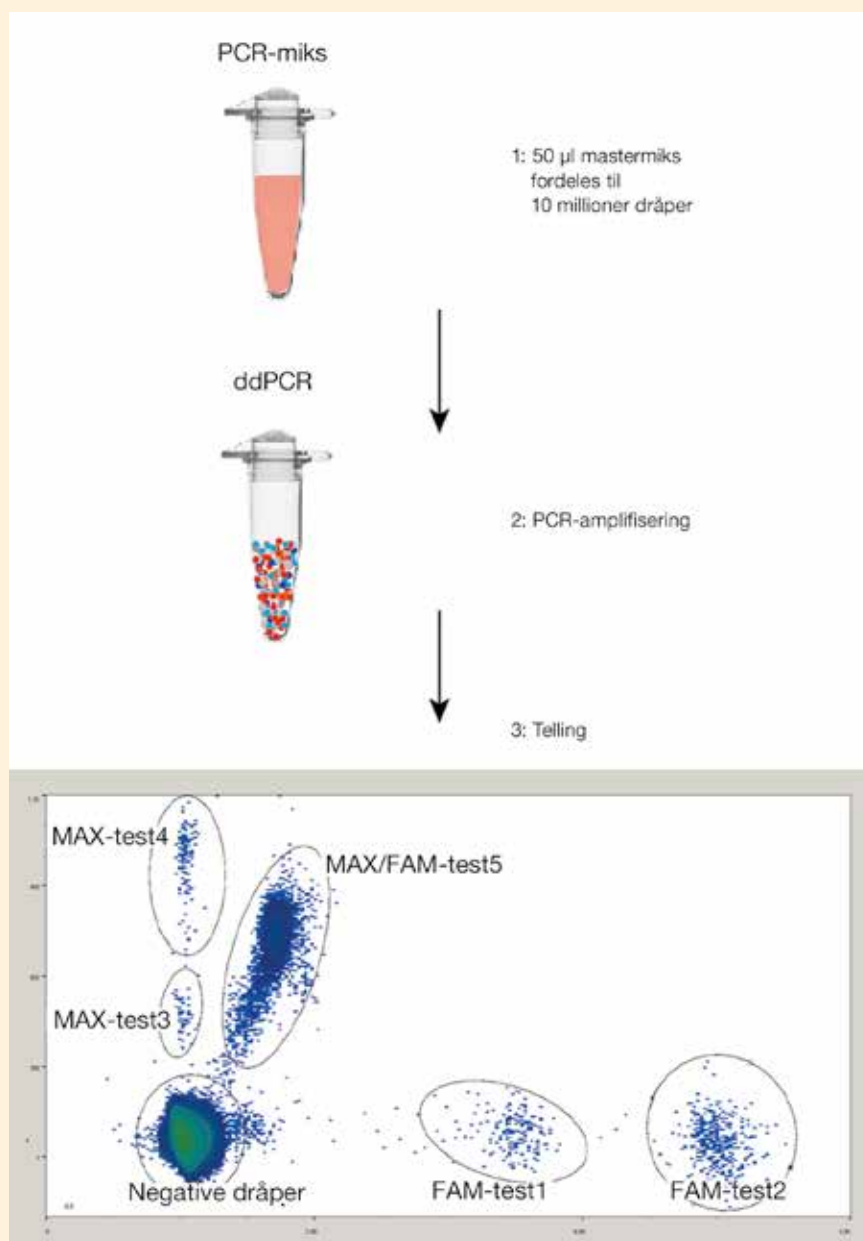
## **Massiv parallell sekvensering (MPS)**

MPS, som også kalles next generation sequencing og dypsekvensering, gir mulighet til å sekvensere en rekke genregioner og prøver parallelt. Ved målrettet sekvensering velges de regionene av genomet man ønsker å sekvensere ved hjelp av spesifikke prober eller primere. Deretter amplifiseres og barkodes de utvalgte fragmentene. Barkoden er en liten nukleotidsekvens som er unik for hver prøve og muliggjør at ulike prøver kan blandes og sekvenseres samtidig. I sekvenseringsprosessen splittes fragmentene og hver DNA-tråd sekvenseres individuelt. Etter MPS har man millioner av sekvenser som sorteres etter barkode, slik at resultatene for hver prøve samles. Deretter sammenliknes sekvensene med et referansegemot for identifikasjon av mutasjoner. Denne prosessen er krevende, spesielt i et diagnostisk laboratorium uten bioinformatikere, men standardisert programvare begynner å bli mer tilgjengelig.

## Digital PCR (dPCR)

Ved dPCR benyttes spesifikke primere i kombinasjon med fluoriserende fargestoffer eller prober som binder seg til DNA, slik at dannelsen av PCR-produkt kan måles. Det finnes ulike instrumenter på markedet i dag for dPCR, for eksempel dråpebaserte metoder (ddPCR) og metoder med mikrokammer. Dråpebaserte systemer kan generere mange millioner dråper fra ett reaksjonsvolum, mens mikrokammermetoder ofte genererer noe færre antall reaksjoner per prøve. Hver dråpe/kammer er av picoliterstørrelse hvor alle PCR-reagenser, prober, primere og templat er tilstede. Det som er viktig ved dPCR er å optimalisere mengde templat slik at man i størst mulig grad oppnår ett DNA-fragment i hver dråpe/kammer.

Illustrasjonen viser et eksempel på en ddPCR hvor fem analyser utføres i samme eksperiment. Systemet kan kun avlese fluorescens i to bølgelengdeområder, men man kan likevel kombinere flere tester samtidig (multipleks), ved å justere mengde probe (signalstyrke) og bruke prober med to fluoroforer for én analyse. Etter PCR telles og skilles dråpene fra hverandre ut fra størrelse og fluorescens ved hjelp av væskestrøm. Hver prikk i diagrammet tilsvarende én dråpe. Diagrammet viser signalstyrken til FAM-probene langs X-aksen, MAX-probene langs Y-aksen og testen med både FAM- og MAX-probe i midten. Nede til venstre i diagrammet er bakgrunnsfluorescens fra dråper uten PCR-produkt. Positive kontroller benyttes til å identifisere hvor signalet fra de ulike



testene skal ligge. Dråper utenfor de avgrensede områdene kan være dråper hvor det har kommet mer enn ett tem-

plat eller støy fra ødelagte dråper. Normalt vil dette ikke påvirke resultatet siden man har flere millioner dråper.

### Takk

Alle tre forfattere mottar støtte fra Helseregion Helse Sør-Øst for forskning og metodeutvikling. Takk også til Den Norske Kreftforening og til K. G. Jebsen forskningsstiftelse for økonomisk støtte.

### Interessekonflikter

Ingen av medforfatterne har interessekonflikter å melde. ■

### Referanser

- Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. 2002;48(3):421-7.
- Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma and serum: an overview. *Ann NY Acad Sci*. 2001;945:1-7.
- Peters DL, Pretorius PJ. Origin, translocation and destination of extracellular occurring DNA--a new paradigm in genetic behaviour. *Clin Chim Acta*. 2011;412(11-12):806-11.
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol*. 2013;10(8):472-84.
- Rykova EY, Morozkin ES, Ponomaryova AA, Loseva EM, Zaporozhchenko IA, Cherdynytseva NV et al. Cell-free and cell-bound circulating nucleic acid complexes: mechanisms of generation, concentration and content. *Expert Opin Biol Ther*. 2012;12 Suppl 1:S141-53.
- Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med*. 2008;14(9):985-90.

7. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet.* 1999;64(1):218-24.
8. Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res.* 1977;37(3):646-50.
9. Diaz LA, Jr., Bardelli A. Liquid Biopsies: Genotyping circulating tumor DNA. *J Clin Oncol.* 2014;32(6):579-86.
10. Madhavan D, Wallwiener M, Bents K, Zucknick M, Nees J, Schott S et al. Plasma DNA integrity as a biomarker for primary and metastatic breast cancer and potential marker for early diagnosis. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;146(1):163-74.
11. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, Del Rio M, Ychou M, Molina F et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS one.* 2011;6(9):e23418.
12. Umetani N, Kim J, Hiramatsu S, Reber HA, Hines OJ, Bilchik AJ et al. Increased integrity of free circulating DNA in sera of patients with colorectal or periampullary cancer: direct quantitative PCR for ALU repeats. *Clin Chem.* 2006;52(6):1062-9.
13. Umetani N, Giuliano AE, Hiramatsu SH, Amersi F, Nakagawa T, Martino S et al. Prediction of breast tumor progression by integrity of free circulating DNA in serum. *J Clin Oncol.* 2006;24(26):4270-6.
14. Wang BG, Huang HY, Chen YC, Bristow RE, Kas-sauei K, Cheng CC et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res.* 2003;63(14):3966-8.
15. Holdenrieder S, Burges A, Reich O, Spelsberg FW, Stieber P. DNA integrity in plasma and serum of patients with malignant and benign diseases. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1137:162-70.
16. Ciriello G, Miller ML, Aksoy BA, Senbabaoglu Y, Schultz N, Sander C. Emerging landscape of oncogenic signatures across human cancers. *Nature Genet.* 2013;45(10):1127-33.
17. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta.* 2013;424C:222-30.
18. Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Le Corre D, Li X et al. Multiplex picodroplet digital PCR to detect KRAS mutations in circulating DNA from the plasma of colorectal cancer patients. *Clin Chem.* 2013;59(12):1722-31.
19. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JE, Eclow NCW, Modlin LA et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med.* 2014; 20(5):548-54.
20. Toft N, Birgens H, Abrahamsson J, Bernell P, Griskevicius L, Hallbook H et al. Risk group assignment differs for children and adults 1-45 yr with acute lymphoblastic leukemia treated by the NOPHO ALL-2008 protocol. *Eur J Haematol.* 2013;90(5):404-12.
21. Bruggemann M, Gokbuget N, Kneba M. Acute lymphoblastic leukemia: monitoring minimal residual disease as a therapeutic principle. *Semin Oncol.* 2012;39(1):47-57.
22. Dawson SJ, Tsui DW, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368(13):1199-209.
23. Misale S, Yaeger R, Hobor S, Scala E, Janakiraman M, Liska D et al. Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature.* 2012;486(7404):532-6.
24. Heidary M, Auer M, Ulz P, Heitzer E, Petru E, Gasch C et al. The dynamic range of circulating tumor DNA in metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2014;16(4):421.
25. Heitzer E, Auer M, Hoffmann EM, Pichler M, Gasch C, Ulz P et al. Establishment of tumor-specific copy number alterations from plasma DNA of patients with cancer. *Int J Cancer.* 2013;133(2):346-56.
26. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Translational Med.* 2014;6(224):224ra24.
27. Beaver JA, Jelovac D, Balukrishna S, Cochran R, Croessmann S, Zabransky D et al. Detection of cancer DNA in plasma of early stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2014;20(10):2643-50.
28. Mouliere F, El Messaoudi S, Pang D, Dritschilo A, Thierry AR. Multi-marker analysis of circulating cell-free DNA toward personalized medicine for colorectal cancer. *Mol Onc.* 2014;8(5):927-41.
29. Mouliere F, El Messaoudi S, Gongora C, Guedj AS, Robert B, Del Rio M et al. Circulating cell-free DNA from colorectal cancer patients may reveal high KRAS or BRAF mutation load. *Transl Oncol.* 2013;6(3):319-28.
30. Andersen RF, Spindler KL, Brandslund I, Jakobsen A, Pallisgaard N. Improved sensitivity of circulating tumor DNA measurement using short PCR amplicons. *Clin Chim Acta.* 2015;439:97-101.

## Søk om:

# Pris for godt gjennomført utviklingsprosjekt

NITO Bioingeniørfaglig institutt (BFI) utlyser i 2016 for første gang en pris for godt gjennomført utviklingsprosjekt i et medisinsk laboratorium. Prisen, som er på 25 000 kroner, tildeles arbeidsplassen.

### Søknad

Alle som har gjort noe lurt som andre kan lære av eller få inspirasjon fra, kan søke om prisen. Søkere må sende en beskrivelse av prosjektet til BFI.

Beskrivelsen bør være på maksimalt 750 ord og kan inneholde:

- Bakgrunn. For eksempel mål, kontekst, begrunnelse.
- Plan for endring, tiltak. For eksempel valg av metode, kvalitetsindikatorer.

- Resultater. For eksempel kvantitativ/kvalitativ presentasjon av resultater, og tolkning av resultater, begrensninger, funn, kostnader, innsparinger.
- Diskusjon og konklusjon. For eksempel generalisering av resultatene, råd til andre.

### Innsending og frist

Beskrivelsen sendes [bf@nito.no](mailto:bf@nito.no) innen fredag 15. april 2016.

### Prisutdeling

Prisen deles ut i forbindelse med avslutningen av Bioingeniørkongressen 2016, fredag 3. juni kl. 15.00.

**Søk om prisen og vis fram det dere har fått til!**