



UPPSALA
UNIVERSITET

Proteogenomik

Nya och kommande metoder i diagnostisering av cancer

Tobias Grylling

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, höstterminen 2015
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Proteogenomik: Nya och kommande metoder i diagnostisering av cancer

Tobias Grylling

Självständigt arbete i biologi 2015

Sammandrag

Cancer är en av de vanligaste sjukdomsrelaterade dödsorsakerna i de industrialiserade länderna och givetvis inte mindre dödlig i något annat land. Under de två senaste årtiondena har nya metoder och instrument tagits fram för att underlätta och framskrida förståelsen för dessa sjukdomar. Här ges en övergripande bild av hur cancer allmänt uppstår, varpå några framstående exempel på nya proteogenomiska metoder och verktyg för detektion, diagnostisering och övervakning av sjukdomsförlopp för cancer tas upp. Nästa-generationssekvensering (NGS) och digital PCR (dPCR) tas upp som exempel på verktyg, varpå potentiella biomarkörer för cancer, så som p53 i olika sammanhang, cirkulerande tumör-DNA (ctDNA), cellfritt DNA (cfDNA) och mikro-RNA (miRNA) behandlas. Undersökningarna som gjorts visar på lovande utsikter för många av metoderna. Användandet av miRNA som biomarkör verkar för tillfället ha ljusast utsikter, tack vare hög specificitet och ofarliga diagnosmetoder. Nya upptäckter görs dock hela tiden inom alla berörda områden.

Inledning

Cancerrelaterade sjukdomar är några av dagens största hälsoproblem. Bara i de nordiska länderna (Sverige, Norge, Danmark, Finland och Island) var det årliga dödstalet mellan 2008 och 2012 i snitt nästan 70 tusen (Engeland *et al.* 1995, International Agency for Research on Cancer (IARC)) och globalt uppskattades dödstalet vara ungefär 8,2 miljoner år 2012 (IARC).

Det finns inte någon hittills känd typisk mekanism som är applicerbar på alla cancertyper, för hur normalt fungerande celler blir tumörogena. Hade det funnits en sådan, så skulle det vara mycket enklare att både diagnostisera och behandla samtliga cancertyper i och med att de alla skulle ha uppstått av samma orsak, exempelvis en ändring i ett specifikt protein. Fullt fokus skulle i så fall läggas på forskning kring just det proteinet för att undersöka några viktiga faktorer:

- Mekanismer – Är det en post-translationell modifiering (PTM) eller en mutation som gett upphov till ändringen av proteinet?
- Orsaker – Är orsaken genetisk eller inducerad av omgivningen? Finns det några genetiska eller beteenderelaterade samband mellan patienter?
- Diagnostisering - Kan en metod utvecklas för att upptäcka proteinet eller något spår av dess aktivitet innan sjukdomen etablerar sig?
- Behandling – Kan en behandlingsmetod tas fram? Hur effektiv är behandlingen vid olika stadier av sjukdomen? Skiljer sig behandlingens effektivitet mellan olika individer?

I verkligheten är det olyckligtvis inte så enkelt. Hade det varit det så är det sannolikt att cancer inte längre skulle vara något problem, med den nu rådande graden av internationell samordning, teknologiska möjligheter inom, och stora anslag på cancerforskning. Tvärtom har istället sekvensering av tumörers genetiska material visat på förvånansvärt hög genotypisk heterogenitet mellan tumörer av samma typ och med samma histopatologiska

(vävnadsangripande) fenotyp (Shukla *et al.* 2015). Trots det, är det just de ovan beskrivna faktorerna som undersöks för att få en klarare, mer övergripande bild över olika cancertyper (Brennan & Wild 2015).

Forskning inom både diagnostisering och behandling av cancer präglas mer och mer av molekylära metoder, där ett speciellt framträdande och lovande fält är proteogenomik. Proteogenomik är ett relativt ungt forskningsområde som kombinerar proteomik (forskning på kvantitet, lokalisering och funktion av, ändringar på och interaktioner mellan proteiner inom ett biologiskt system, såsom en cell, vävnad eller en hel organism) med dess vägbana, genomik (datorbaserade metoder för att undersöka, pussla ihop och tolka stora mängder genetisk information) (Shukla *et al.* 2015).

Sekvensering av en individs genom som metod för att upptäcka och behandla cancer skulle kunna medföra flera genombrott inom både forskningen på och behandlingen av cancer (Kanagal-Shamanna *et al.* 2014, Shukla *et al.* 2015) men med det uppkommer även många etiska frågeställningar. Hur förhindrar man att informationen om en individs genom hamnar i orätta händer? Vad händer om ett försäkringsbolag får ta del av information som säger att en potentiell kund löper större risk att få cancer än ”normalt” för att någon av dess föräldrar hade cancerogena avvikelser i sina reproduktiva celler?

Uppkomst och spridning av cancer

För att förstå hur och varför cancer uppstår, är det hjälpsamt att tänka sig en cell i en multicellulär organism som en individ snarare än en del av organismen. För att organismens gener, och därmed dess cellers gener, ska kunna föras vidare till vidare generationer, måste alla celler samarbeta – gör de inte det, kan deras gener inte överleva.

För att en cancercell ska kunna uppstå måste den ha samlat på sig mutationer som bland annat ger den egenskaperna att bryta sig loss från andra celler, undvika immunförsvaret, dela sig med högre frekvens än andra celler och sprida sig till andra vävnader (Hanahan & Weinberg 2011). Den är så fundamentalt olik sitt ursprung att den beter sig som en främmande art. Eftersom framgångsrika cancerceller i slutänden dödar sin värdorganism kan de naturligt aldrig sprida sina gener längre än så (ett artificiellt undantag är HeLa-cellerna som beskrivs nedan), men från det att den första tumörögena cellen uppstår tills dess att den orsakat värdens död, så är den, på individnivå, i praktiken mer evolutionärt framgångsrik än någon annan cell i omgivningen.

Tumörceller är fria, självständiga och odödliga

För att en normal cell ska kunna utvecklas till en tumörögen cell, måste flera kriterier uppfyllas. Kommunikation inom och mellan celler och adhesion mellan dem är typiska negativt påverkade faktorer som vanligtvis påträffas hos tumörceller (Hanahan & Weinberg 2011, Bussemakers *et al.* 2000, Carystinos *et al.* 2001, Desgrosellier & Cheresch 2010). Ökad förmåga att dela sig och undvika celldöd, liksom erhållandet av nya förmågor, som rörlighet, förmåga att invadera andra vävnader, uppbyggnad av blodkärl för syretillförsel och att undvika immunförsvaret är också karaktäristiska drag. Alla dessa förmågor kombinerade ger upphov till de farligaste cancer varianterna, men kombinationen av några av dem räcker för att tumörbildande celler ska kunna uppstå (Hanahan & Weinberg, 2011).

Friska celler kommunicerar med varandra och inom sig själva och kan på så sätt reglera tillväxt, signalera om skador på genetiskt material, ge start- eller stoppsignaler för mitos eller inducera apoptos bland annat (Hanahan & Weinberg 2011). Ett vanligt drag hos tumörceller

är att de har tappat inter- eller intracellulär kommunikation, ofta på grund av en eller flera förändringar i något protein som är inblandat i den inter- eller intracellulära signalöverföringen hos den drabbade cellen (Crichton *et al.* 2006, Morselli *et al.* 2008). Följaktligen blir den drabbade cellen oförmögen att svara på dessa signaler, eller själv skicka ut varningssignaler när skador uppstått på dess DNA. I det sistnämnda fallet kan detta leda till att cellen, som i vanliga fall skulle fått en stoppsignal för mitos tills skadan var reparerad, delar sig med inkorrekt reparerat DNA och ger upphov till fler muterade celler. Felaktiga eller uteblivna signaler kan också leda till att cellen börjar dela sig mer frekvent än den normalt sett skulle tillåtit, eller att den inte dör när den ska (Crichton *et al.* 2006, Morselli *et al.* 2008, Hanahan & Weinberg 2011).

En annan intressant egenskap som ofta återfinns hos cancerceller är att de är odödliga. För en cell innebär odödlighet att den inte slutar dela sig så länge det finns tillgång på livsnödvändiga substrat. Normala celler når efter en viss tid något som kallas cellulär senescens – de slutar dela sig, vilket innebär att deras specifika genetiska linje upphör, varpå de så småningom ersätts av nydifferentierade stamceller. Odödliga celler uppnår aldrig cellulär senescens, så deras specifika genotyp upphör aldrig förutsatt att inga utomstående faktorer dödar dem (Rassoulzadegan *et al.* 1983, Jenkins *et al.* 1984, Shay & Wright 2000).

Ett välkänt exempel på odödliga celler är ”HeLa-cellerna”, de första mänskliga cellerna att odlas *in vitro*. HeLa-cellerna är uppkallade efter kvinnan de härstammar från, Henrietta Lacks, som år 1951 diagnostiserades med livmoderhalscancer som samma år tog hennes liv. Ett vävnadsprov från hennes tumör användes av medicinska forskare för att försöka odla tumörcellerna. Forskarna lyckades få tumörcellerna från Lacks att växa i kultur, vilket ledde till att de blev tillgängliga för forskare världen över. Sedan dess har diskussioner uppstått om hurvida HeLa-cellerna fortfarande kan anses vara mänskliga eller borde räknas som en ny art (Lucey *et al.* 2009).

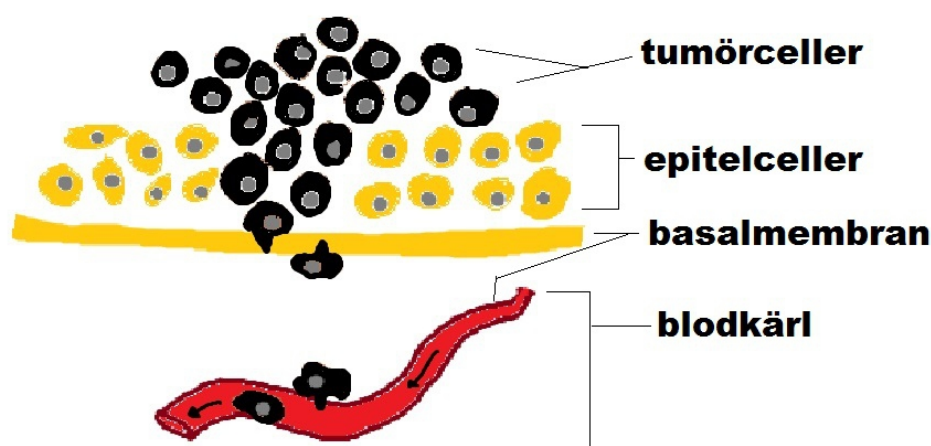
Tumörcellernas höga specificitet kräver ackumulering av mutationer

Först när en cell har erhållit ett flertal abnormala egenskaper, som högfrekvent mitos, odödlighet och nedsatt reglering, börjar en tumör bildas. De naturliga system som finns för reglering av celler förhindrar i de flesta fall att det går så långt – även om en cell lyckas undvika apoptos signaler, kan immunförsvaret upptäcka och döda cellen innan den hinner dela sig (Hanahan & Weinberg 2011, Balkwill *et al.* 2015). Av den anledningen är cancer mer vanligt förekommande hos äldre individer, eftersom den nödvändiga ackumuleringen av överlevande mutationer för uppkomst av cancer tar tid att åstadkomma. Det är också av den anledningen som cancer är vanligare i celler som delar sig än i fullt differentierade icke-delande celler. Det senare kräver antingen mutationer i stamceller, eller i de differentierade cellerna på så sätt att de återfår förmågan att dela sig (Clarke & Fuller 2006).

När förstadiet till en tumör väl har börjat bildas, krävs ökad syretillförsel eftersom cellerna fortfarande behöver näring och syre. Då krävs att tumören kan skicka ut signaler som ger upphov till uppbyggnad av blodkärl utifrån redan existerande blodkärl. Misslyckas detta, kommer inte tumören kunna växa sig så stor att den börjar utgöra en fara, eftersom cellerna i mitten av tumören kontinuerligt dör av syre- och näringsbrist. Denna ”rekrytering” av nya blodkärl kallas för angiogenes och kan uppstå på olika sätt hos tumörer – antingen har de erhållit mutationer som tillåter dem själva att skicka ut signaler som inleder angiogenes, eller så ”lurar” de andra celler att signalera för angiogenes. Alla aspekter av hur angiogenes uppstår i cancerceller, eller ens i normala fall, är inte kända men en del inblandade faktorer och deras funktion är kartlagda. Tack vare den vetenskapen forskas det nu på terapiformer där

inhibering av angiogenes används för att hindra tumörer från att växa (Kim *et al.* 2016, Martins *et al.* 2016).

Det sista steget för en etablerad tumör är att inleda metastas, vilket innebär att tumörceller från modertumören tar sig in i blodcirkulationssystemet och sprider sig till andra vävnader (Figur 1). Detta sker genom att fria tumörceller tar sig från modertumören, invaderar närmaste blod- eller lymfkärl och cirkulerar med blodomloppet tills de nått en lämplig punkt för extravasation – utpassage genom blodkärlen på ett likartat sätt som leukocyter (vita blodkroppar) använder sig av, genom att pressa sig emellan två endotelceller (Hanahan & Weinberg, 2011). För att ta sig från tumören till blodkärlen, måste de ta sig igenom två så kallade basalmembran (Huber *et al.* 2005). Basalmembranet ligger under de celler som formar ytorna på organ, håligheter och externa ytor (epitelceller) och omger även de celler som utgör insidan av blod- och lymfkärl (endotelceller). Dess funktion är att, tillsammans med cellernas egna bindningar (cell-cell adhesion), hålla cellerna på sin designerade plats (Paulsson 1992). För att ta sig igenom ett basalmembran använder tumörcellerna dels proteaser som kan lösa upp basalmembranet, och dels invadopodier (invadopodia, latin: *in*: ”in i”, *vadere*: ”gå” och grekiska: *podion*: ”fot”). Ett invadopodium är en formation som sticker ut från cellen och tillåter den att både penetrera basalmembranet, men sedan också röra sig igenom det (Murphy & Courtneidge 2011).



Figur 1. Metastas. Tumörceller bryter sig igenom basalmembranet med invadopodier och tränger sedan även in genom basalmembranet i blodkärlen.

Naturliga och medicinska bekämpningsmetoder ger upphov till riktad selektion

De naturliga försvarsmekanismerna mot cancer är ständigt sysselsatta med att söka efter celler med avvikande proteiner, celler som inte längre räknas som tillhörande den egna organismen. Dessa avvikande celler uppsöks och dödas av immunförsvaret på samma sätt som invasiva främmande celler, exempelvis främmande bakterier. Allteftersom avvikande celler dödas, uppstår en selektion för de celler som kan undvika upptäckt av immunförsvaret eller inaktivera det. Detta selektionstryck förstärks om de avvikande cellerna redan vunnit förmågan att proliferera snabbt. På så sätt agerar immunförsvaret både hämmande och gynnande på potentiella tumörceller (Balkwill *et al.* 2015, Hanahan & Weinberg 2011).

Detta fenomen förklarar också varför cancer, till skillnad från patogena organismer eller virus, är farligare vid återfall – i likhet med bakteriesjukdomar där små kolonier överlevt

antibiotikabehandling och därför vunnit resistens, anpassar sig också cancerceller snabbt till naturliga och medicinska behandlingsmetoder.

Bioteknologiska metoder för att upptäcka och undersöka cancerrelaterade biomarkörer

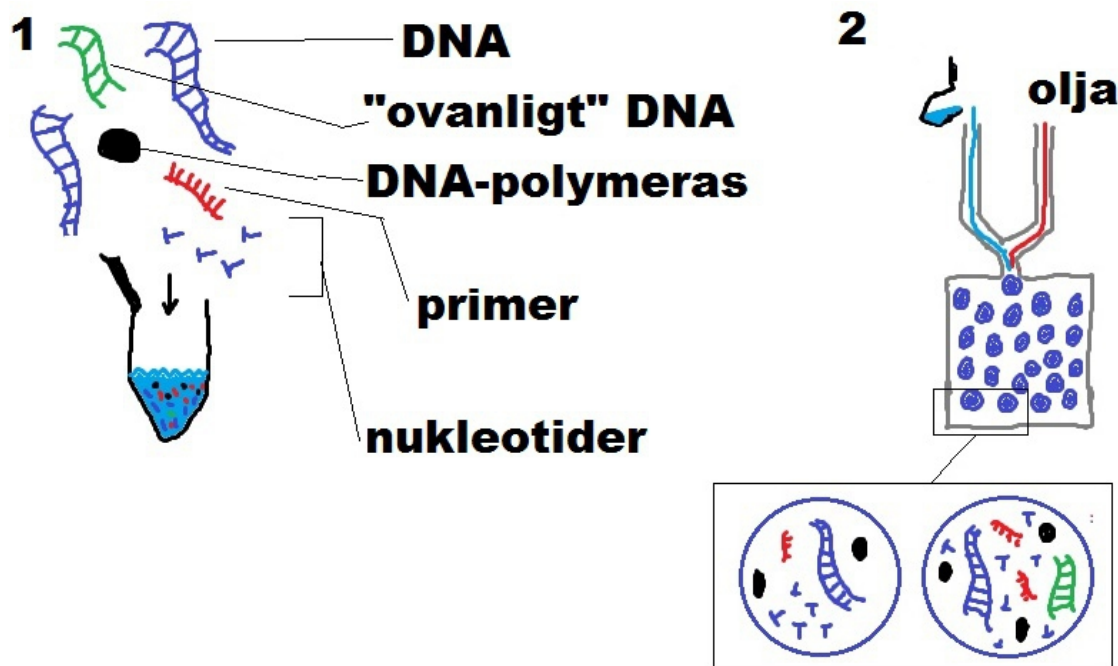
För att undersöka och jämföra tumörer med frisk vävnad och även med varandra utifrån genetisk information, krävs mycket precisa och pålitliga verktyg som kan hantera enorma mängder data. Två framträdande exempel på sådana verktyg är dPCR och NGS. Dessa används redan aktivt inom proteogenomiken, men nya appliceringar hittas ännu för dem (Laurie *et al.* 2013).

Digital PCR delar upp prover i mycket små delelement och använder Poissonfördelning för analys av genetiskt material

För att förstå hur användningen av dPCR är av betydelse för nuvarande och framtida cancerforskning, diagnostisering och behandling, är det hjälpsamt att jämföra det med kvantitativ PCR (quantitative PCR, qPCR). I båda metoderna används termiska cykler, där DNA först värms tills det denatureras (denatureringssteg) och bildar enkelsträngade DNA-templater. Därefter sänks temperaturen och RNA-primers hybridiserar (binder) till DNA-templaten (hybridiseringssteg). Slutligen elongeras DNA-templaten av ett värmeresistent DNA-polymeras (elongeringssteg). Sedan upprepas proceduren för att amplifiera mängden DNA.

I qPCR antas DNA-fragmenten under amplifiering öka exponentiellt (Carr & Moore 2012). Problemet som det antagandet medför är att det förutsätter 100% elongeringseffektivitet, vilket innebär att alla DNA-templatsträngar skulle hinna elongeras under ett elongeringssteg i en termisk cykel. Detta är inte alltid fallet, eftersom det blir mer och mer DNA-templat ju längre PCR-reaktionen pågår. Då ökar hela tiden risken att det polymeras som finns i reaktionsblandningen inte hinner med att elongera alla templatsträngar innan elongeringssteget nått sitt slut (Laurie *et al.* 2013, Huggett *et al.* 2015). Om man är intresserad av att undersöka om ett prov innehåller en liten mängd avvikande DNA, är det därför lätt hänt att den lilla mängden ”drunknar” bland allt normalt DNA som elongeras och därmed aldrig upptäcks (Vogelstein & Kinzler 1999, Huggett *et al.* 2015).

Med dPCR undviks många av problemen med qPCR, genom att reaktionsblandningen (DNA-provet blandat med PCR-substrat så som polymeras, joner, primrar och nukleotider) delas upp i mindre element som hålls åtskilda från varandra. Detta kan ske på olika sätt, men en vanlig metod är ”droplet dPCR” (ddPCR) där en oljefas används med en surfaktant för att skapa små ”droppar” innehållandes reaktionsblandningen (Laurie *et al.* 2013, Wang *et al.* 2015). Vid rätt utspädning av reaktionsblandningen innehåller varje droppe därför ytterst få DNA-molekyler, vilket skapar mindre konkurrens om PCR-substraten och därmed kraftigt minskar risken att den avvikande DNA-sekvensen drunknar bland de andra (Figur 2). Utöver det medför uppdelningen att en mindre ursprunglig volym DNA-prov behövs för att få resultat och studier har visat att resultaten dessutom är mer tillförlitliga än med qPCR (Wang *et al.* 2015). Ännu en fördel som partitioneringen medför är att för varje termisk cykel utförs tusentals PCR-reaktioner samtidigt, vilket också sparar tid.



Figur 2. Droplet digital PCR. Med hjälp av en oljefas bildas små ”droppar”, vilket orsakar att reaktionen delas upp i mängder av små ”delreaktioner” - ett fåtal per dropp.

Inom cancerforskning är det viktigt att kunna urskilja små mängder avvikande gensekvenser från normala sekvenser, eftersom det är en tydlig indikation på att det finns muterade celler närvarande i systemet. Detta görs i många fall genom att specifika prober som binder till DNA-fragmenten av intresse fluorescerar när DNA-fragmentet de sitter på elongeras (Taly *et al.* 2013). När reaktionen fortgått så länge att signalen från DNA-fragmenten som undersöks når en viss styrka, används antalet termiska cykler för att räkna ut hur mycket av DNA-fragmentet som fanns närvarande från början genom ett matematiskt samband (Carr & Moore 2012, Baker M 2012). Med qPCR är det därför mycket svårt att upptäcka små mängder avvikande DNA i en reaktionsblandning med en jämförelsevis hög andel normalt DNA, eftersom de konkurrerar om nukleotider, primrar och prober, vilket medför en risk att det avvikande DNA-fragmentet inte ger upphov till en tillräckligt stark signal för att upptäckas (Vogelstein & Kinzler 1999, Huggett *et al.* 2015).

Resultatet av en dPCR-reaktion är att de element som innehåller den eftersökta DNA-molekylen ger upphov till en signal och benämns därför som positiva, medan de som inte ger upphov till någon signal är negativa. Flera DNA-fragment kan undersökas samtidigt genom att olika specifika prober används (Taly *et al.* 2013). Eftersom signalerna bara tolkas som positiva eller negativa för varje prob, kan de tolkas som ettor och nollor, därav namnet ”digital” PCR. Andelen av det eller de DNA-fragment som undersöks räknas ut efter korrigerig utifrån Poissonfördelning, vilket kompenserar för sannolikheten att mer än en kopia av det aktuella DNA-fragmentet ursprungligen kan ha funnits närvarande i vissa av elementen (Vogelstein & Kinzler 1999, Huggett *et al.* 2015).

Med hjälp av dPCR har framsteg redan gjorts inom cancerforskningen. År 2013 hittades ett matematiskt samband mellan längden på en PCR-produkt och fluorescenssignalens styrka, vilket möjliggör både kvantifiering och storleksbestämning av mål-DNA i samma reaktion (Laurie *et al.* 2013). Samma år visade sig dPCR vara ett mycket effektivt verktyg för screening av olika typer av mutationer i samma gen (Taly *et al.* 2013). År 2015 gjordes ett

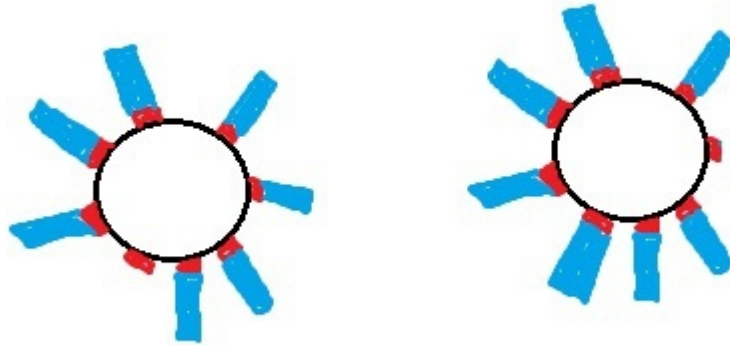
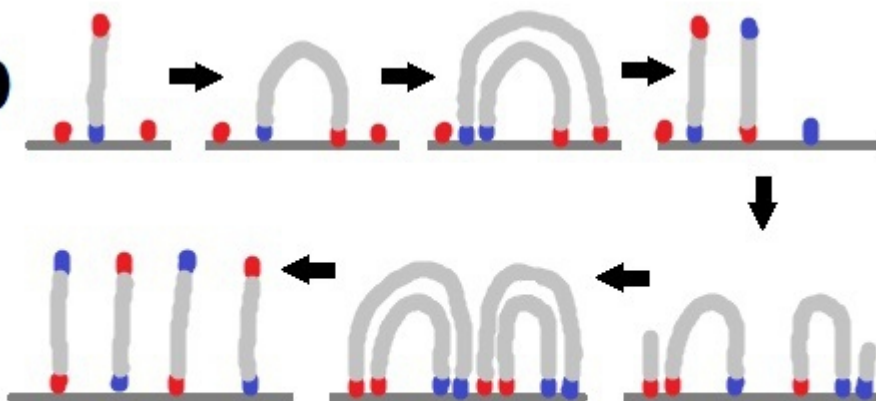
jämförande försök mellan qPCR och ddPCR att bestämma koncentrationen av lungcancerrelaterat mikroRNA. Båda metoder var framgångsrika men också här visade sig ddPCR vara överlägset i effektivitet och noggrannhet (Wang *et al.* 2015). Fler exempel finns och det är troligt att ännu fler kommer dyka upp i framtiden.

Fyra huvudsakliga system inom NGS

Gensekvensering går ut på att ta reda på i vilken ordning nukleotiderna sitter i en gensekvens. DNA-fragment amplifieras och denatureras, varpå primrar tillsätts, men därefter börjar de olika sekvenseringsmetoderna skilja sig åt.

I sangersekvensering tillsätts terminerade nukleotider (3'-änden är blockerad så att ingen ny nukleotid kan binda till den gamla) till reaktionsblandningen tillsammans med ”vanliga” nukleotider (Sanger *et al.* 1977). Efter ett tag sköljs nukleotiderna bort och fragmenten analyseras med gelelektrofores. Eftersom både vanliga nukleotider och terminerade nukleotider finns i reaktionsblandningen, blir resultatet många DNA-fragment av olika längder, vilket med gelelektrofores ger en bestämd ordning för vilken nukleotid som har vilken position i gensekvensen. Varje terminerad nukleotid innehåller dessutom ett fluorescerande ämne som är unikt för varje kvävebas – A, T, C och G. På så sätt vet man också vilken nukleotid som svarar för vilken längd på DNA-fragmentet. Denna metod kallas kedjetermineringsmetoden (chain termination procedure) (Sanger *et al.* 1977).

NGS är inte, som namnet kanske antyder, en ”efterträdare” till sangermetoden eftersom det finns olika för- och nackdelar både mellan olika NGS-system och mellan NGS och sangersekvensering. Sangermetoden är tidskrävande men noggrann och kan ge pålitliga resultat för långa DNA-sekvenser, medan NGS-systemen tenderar vara mer tidseffektiva men mindre noggranna. Det finns fyra huvudsakliga NGS-system: pyrosekvensering, sekvensering via syntes och ligering samt jon-halvledarsekvensering (Garcia *et al.* 2000, Drmanac *et al.* 2010, Rusk 2011, Cummings *et al.* 2013, Chen 2014). Det som de har gemensamt är att de, i likhet med dPCR, delar upp reaktionen i upp till flera miljarder delreaktioner. Detta görs genom att ssDNA-templat fästs vid så kallade ”länkare” (linkers), som binder templatet vid en fast yta, där amplifiering sedan sker för att skapa separerade ansamlingar av templat. Två vanligt förekommande sätt det sker på är antingen genom att templatet fästs i vardera änden (5'- och 3'-änden) vid en plan yta och på så sätt bildar U-formade ”broar”, i en metod som kallas ”bridge PCR” (Figur 3b), eller att templatet fästs i ena änden vid flera mycket små sfäriska ytor (Ion sphere particles) (Quail *et al.* 2012), som då bildar något som kan liknas vid ett kastanjenötskal, där taggarna i så fall utgörs av DNA-templatet. Den senare metoden kallas ”emulsion PCR” och de resulterande sfäriska DNA-templatansamlingarna kallas emulsionspärlor (emulsion beads, Figur 3a) (Hori *et al.* 2007, Cummings *et al.* 2013, Leong *et al.* 2014, Kojima *et al.* 2015).

a**b**

Figur 3. Amplifieringsmetoder för separering av DNA-templat. a) ”emulsion beads”, där DNA-templaten sitter fast på en sfärisk yta, b) DNA-templaten bundna vid en fast plan yta och amplifieras med ”bridge PCR”

Efter att templaten förberetts och amplifierats startas själva sekvenseringsreaktionen, vilket är det steg som främst skiljer sig mellan de olika NGS-systemen. Informationen från sekvenseringen tolkas och kvalitetskontrolleras slutligen genom jämförelse med redan validerade resultat från tidigare försök, eller så används sangermetoden för att validera resultaten (Kanagal-Shamanna *et al.* 2014, Simen *et al.* 2015).

NGS möjliggör kostnads- och tidseffektiva jämförelser mellan gensekvenser hos tumörer och frisk vävnad för att lokalisera genetiska avvikelser, vilket möjliggör att behandlingsprogram för cancer och andra genetiska sjukdomar kan skräddarsys på individuell nivå. Dessutom görs nu ansträngningar för att skapa en informationsbank där olika tumörer har sekvenserats och jämförts mot varandra. På så sätt hoppas man kunna upptäcka nya biomarkörer för ännu snabbare diagnostisering och eventuellt behandling av cancer (Simen *et al.* 2015).

Det finns flera exempel på framsteg som gjorts med NGS som verktyg. Forskare vid The Genomic Pathology Laboratory validerade år 2014 en mutationspanel, en sorts ”mall” över vanligt förekommande mutationer i olika cancertyper som kan användas som referens vid diagnostisering, för klinisk användning (Simen *et al.* 2015).

Lovande biomarkörer

Genom åren har forskare med hjälp av den kraftiga teknologiska utvecklingen inom datahantering kunnat utveckla genomik och proteomik till nya nivåer. Samtidigt har internationella samarbeten, där omfattande genomisk information från avslutade cancerfall tillgängliggjorts för berörda forskare, inletts (Brennan & Wild 2015). Därmed har man fått en djupare förståelse för både molekylära och miljörelaterade faktorer som kan bidra till att orsaka cancer. De stora framstegen inom molekylära forskningsmetoder har möjliggjort insikt i ett flertal tänkbara dignostiseringsmetoder, genom upptäckten av många nya potentiella biomarkörer för cancer.

Undersökning av proteiner som kan associeras med cancer

En av de vanligast förekommande tumörsuppressorer (proteiner som hindrar potentiella cancerceller från att etablera sig) är p53 (Lane & Crawford 1979). Proteinet upptäcktes redan 1979, men antogs länge vara produkten av en onkogen (Crawford *et al.* 1981, Jenkins *et al.* 1984). Inte förrän tio år efter upptäckten av p53, fann man bevis som tydde på att det var muterade p53-gener (här kommer genen benämnas *TP53* hos *Homo sapiens* och proteinet i allmänhet benämns p53) som tenderade att ge upphov till cancer, snarare än vildtypsvarianten (Baker *et al.* 1989). Idag är det allmänt accepterat att p53 är en tumörsuppressor och att mutationer i *TP53* är en vanlig orsak till många olika typer av cancer (Chakarov *et al.* 2012). I en studie gjord år 2013, där gensekvenser från tolv olika cancertyper undersöktes, visade det sig att det rentav är den vanligaste genen att ha muterat i många cancertyper (Kandoth *et al.* 2013). Tre tillstånd som p53 kan inducera i en cell är avstannande av cellcykeln (cell cycle arrest, CCA), senescens (permanent CCA) och apoptos (Mooi & Peepers 2006, Chakarov *et al.* 2012).

Petos paradox – varför är cancer vanligare hos människor än hos elefanter?

Petos paradox, efter epidemiologen Richard Peto, ställer frågan varför djur med större kroppsmassa generellt inte får cancer mer frekvent än djur med mindre kroppsmassa. Stora djur har fler celler och borde intuitivt därför oftare råka ut för mutationer och därmed också löpa större risk att få cancer, men enligt en studie av Peto gjord 1975 tycktes inget sådant samband existera. Experimentet visade att bland möss indelade i olika åldersgrupper, som blivit utsatta för ett carcinogent ämne (bensopyren), var risken ungefär lika stor att få cancer – tiden det tog innan tumörer iaktogs verkade generellt bero på exponeringstid snarare än ålder (Peto *et al.* 1975). Ett flertal teorier finns till vad detta kan bero på, bland annat att större djur har långsammare metabolism och därför har mindre reaktivt syre i sina system. Dessutom tenderar deras celler att dela sig mindre frekvent (Gewin 2013, Callaway 2015). Nyligen publicerades två oberoende artiklar, där p53 hos elefanter undersöktes. Tillsammans visade artiklarna att elefanter hade 20 kopior av p53-genen (vilket kan jämföras med en enda kopia hos de flesta andra däggdjur) och att de oftare använder apoptos än reparation av skadat DNA (Abegglén *et al.* 2015, Sulak *et al.* 2015).

p53 som biomarkör

Tack vare sin relativt tidiga upptäckt har många aspekter av p53 blivit utforskade och den kunskap som det lett till har gjort proteinet till en attraktiv biomarkör. Samtidigt har proteinet visat sig vara mer mångsidigt än man tidigare trott, vilket gör det komplicerat att använda som biomarkör. I en artikel från 2008 visades att p53 i cytoplasman tycktes motverka autofagocytos (nedbrytandet av organeller på grund av skador eller yttre stressfaktorer i en cell), samtidigt som det nämns att tidigare fynd visat på att p53 i cellkärnan tvärtom verkade stimulera samma process (Morselli *et al.* 2008). I en annan rapport beskrivs hur p53 kan reglera autofagocytos i cellen och på så sätt bidra till apoptos genom att binda till

”skadereglerad autofagocytos-modulator” (damage-regulated autophagy modulator, DRAM), en gen som kodar för ett lysosomprotein, som i sin tur medierar inledandet av autofagocytos (Crighton *et al.* 2006). Interaktioner med andra gener har hittats i flera fall och det tycks vara på det sättet p53 kan påverka så många olika processer (Mooi & Peeper 2006, Chakarov *et al.* 2012, Muller & Vousden 2014). Om det dessutom finns fler fall där lokaliseringen av p53 i cellen har betydelse för hur dess funktion uttrycker sig, som i fallet ovan, så blir det ännu svårare att få ett grepp om dess funktion.

Dessa problem till trots, har ett flertal undersökningar gjorts där p53 granskats som kliniskt applicerbar biomarkör, med varierande resultat. I en sammanställande undersökning där 109 autoantikroppar (proteiner utformade för att binda till specifika antigener; kliniskt för att undersöka mängd eller närvaro av en viss antigen) för tidig diagnos av tjocktarmscancer från 67 studier jämfördes, fann man att autoantikroppar mot p53 även fanns närvarande i lung-, lever- och magcancer (Chen *et al.* 2014). Det tyder på att p53 kan användas som markör för många olika typer av cancer. Jia och medarbetare (2014), testade ett multiplex-system där 14 tumörrelaterade autoantigener användes för att upptäcka lungcancer. I den studien fann man p53 i 15% av fallen. Där drogs slutsatsen att mer forskning behövs på diagnosmetoderna som testats och mer kunskap behövs om hurvida överlevnadschansen signifikant ökar om lungcancer upptäcks tidigt (Jia *et al.* 2014).

PTM – undersökning av proteiner ändrade efter translation

Ett utmärkande drag som delas av tumörbildande celler är att de måste kunna bryta sig fria från sina grannar. Eftersom glykoproteiner är viktiga för kommunikation och bindning mellan celler är det föga överraskande att cancerceller tenderar ge upphov till avvikande glykosylering, som mellan vissa cancertyper är likartade och därför kan användas som biomarkörer för tidig diagnostisering av cancer (Meany & Chan 2011, Shukla *et al.* 2015). Avvikande glykosylering är ett exempel på en PTM som kan ske på många proteiner och regioner av proteiner. Kända specifika PTMs har använts för att testa deras lämplighet som biomarkörer, däribland p53 (Meany & Chan 2011, Nguyen *et al.* 2014).

Glykosylering, modifiering av nysyntetiserade proteiner till glykoproteiner, sker ständigt i eukaryota celler och är ett exempel på en PTM (Nelson *et al.* 2008). Wu och medarbetare genomförde år 2010 en studie där elakartade bröstcancertumörer jämfördes med godartade, för att undersöka närvaron av ett visst protein, polypeptid N-acetylgalaktosaminyltransferas 14 (GalNAc-T14) i de båda typerna. GalNAc-T14 tillhör en proteinfamilj som katalyserar det första steget i en specifik sorts glykosylering i däggdjursceller och misstänktes uttryckas mer frekvent i den elakartade cancertypen. Prover från 88 patienter testades med immunohistokemisk färgning (IHC), 56 med elakartade tumörer och 32 med godartade och det visade sig att hypotesen stämde, vilket tydde på att GalNAc-T14 skulle kunna användas som biomarkör. Dessutom fann man att uttrycksnivån av GalNAc-T14 tycktes korrespondera med tumörprogression (Wu *et al.* 2010). IHC går kortfattat ut på att specifika antikroppar används för att binda till en antigen (proteinet som ska undersökas, här GalNAc-T14). Antikropparna bär på en markör som ger upphov till färgning när de binder till ”sitt” protein (Coons *et al.* 1942).

ctDNA och cfDNA – normalt förekommande fritt DNA i jämförelse med fritt DNA från tumörer

I blodomloppet förekommer naturligt små DNA-fragment som kallas cfDNA. Om tumörceller finns närvarande i systemet kommer en liten andel av detta cfDNA vara av tumörursprung och skilja sig från normalt cfDNA. Denna typ av cfDNA kallas då ctDNA.

Med olika metoder har man undersökt hurvida ctDNA kan ge upphov till nya biomarkörer för diagnostisering och forskning på cancer och kommit fram till några lovande resultat som beskrivs här.

I en stor studie där 640 cancerpatienter med olika typer av cancer deltog, testades hur väl ctDNA kunde användas som biomarkör. Med hjälp av PCR och sekvenseringsmetoder analyserades koncentrationen av ctDNA i blodplasman hos patienter i olika stadier av sjukdomsprogression, med varierande resultat. I många av fallen där canceren nått mer avancerade stadier och inlett metastas, nåddes föga förvånande positiva resultat med högt genomslag. Hos patienter där sjukdomen ännu var lokaliserad (inte börjat sprida sig) fanns dock också tillräckligt höga koncentrationer ctDNA för upptäckt i många av fallen. Hos patienter som befann sig i första stadiet kunde ctDNA upptäckas i nästan hälften (47%) av dem och mer än två tredjedelar av patienterna som befann sig i tredje stadiet hade också uppmätbara mängder (Simen *et al.* 2015). Trots att dessa resultat talar för att ctDNA som biomarkör är mycket lovande, är ett problem att den eftersökta mutationen i kliniska undersökningar är okänd. Därför är det viktigt att genpaneler för jämförelser mellan kända mutationer och kliniska resultat, som den beskriven ovan utvecklas (Bettegowda *et al.* 2014).

En annan upptäckt i studien var att mätning av ctDNA kan användas för att övervaka sjukdomsprogression. Detta har tidigare påvisats i tjocktarmscancer i en tidigare nämnd rapport av Diehl och medarbetare (2008), där metoden att mäta koncentration av ctDNA jämfördes mot uppmätning av CEA (carcinoembryonic antigen), ett receptorprotein relaterat till cancer, vilket var rutinmetoden. Där visade det sig att ctDNA-mätning var signifikant mer känsligt än CEA-mätning (Diehl *et al.* 2008).

miRNA

Små (~22 nukleotider), icke-kodande RNA-molekyler, som kan ha viktiga regulatoriska funktioner i djur och växter genom att binda till, och sedan klyva eller blockera, mRNA och därmed reglera translation, kallas miRNA (Bartel 2004). miRNA troddes under lång tid sakna funktion i genomet, har idag sedan länge visat sig spela in i ett flertal processer i cellers reglering och bevis pekar också på deras inblandning i olika sjukdomar, däribland cancer. Begreppet är inte nytt inom biologin, men miRNA börjar nu betraktas som tänkbara och attraktiva biomarkörer för diagnostisering av cancer, eftersom tekniken nu på allvar börjar stödja det. miRNA har kunnat identifieras som onkogener och tumörsuppressorer eftersom de kan binda till mRNA och på så sätt hindra eller aktivera translation, antingen genom att binda till sekvenser av mRNA eller genom att orsaka att det degraderas (Iorio & Croce 2012).

Syntes av miRNA sker i två huvudsakliga steg. De gener som kodar för miRNA finns givetvis i cellkärnan, men de kodar för längre RNA-molekyler, primärt mikroRNA (pri-miRNA). Pri-miRNA viker sig vid olika regioner och bildar ”hårklämme-strukturer” (”hairpins”, eftersom deras struktur kan liknas vid hårklämmor) som ”klippas” bort från pri-miRNA-molekylen. Dessa kortare hårklämmor benämns som prekursor-mikroRNA (pre-miRNA), som sedan transporteras ut ur kärnan. I cytoplasman behandlas pre-miRNA vidare genom degradering av olika proteiner och slutligen klyvning längs med molekylen från (dsRNA till ssRNA) av ett helikas. Det är inte ovanligt att flera mogna miRNA syntetiseras från samma polycistroniska pri-miRNA (Iorio & Croce 2012).

Calin *et al.* 2002, upptäckte att en kromosomregion, 13q14, som ofta raderats i samband med en typ av leukemi (kronisk B-cell lymfocyt-leukemi), kodade för två miRNA, miR-15a och miR-16a (Calin *et al.* 2002). Detta ledde till en senare undersökning där fler kända miRNA

utforskades, vilket ledde till att man fann bevis som talade för att ett flertal miRNA var kopplade till tumörer (Calin *et al.* 2004).

Numera forskas det flitigt på miRNA och deras potential som biomarkörer. En studie av Sozzi med kollegor (2014), pekade på att analys av miRNA i blodplasma hos lungcancerpatienter (miRNA-signaturklassificerare, MSC) kan användas tillsammans med låg-dos spiralberäknad tomografi (low dose spiral computed tomography, LDCT) för att minska antalet felaktigt positiva resultat som LDCT kan ge upphov till. Studien tydde samtidigt på att MSC hade diagnostiskt och prognostiskt värde (Sozzi *et al.* 2014). LDCT går ut på att man ”scannar” kroppen med penetrerande vågor, vanligtvis röntgen, varpå en dator sammanställer de resulterande två-dimensionella tvärsnittsbilderna till en övergriplig tre-dimensionell bild av kroppens insida. LDCT kan producera tillräckligt tydliga bilder för att abnormaliteter som tumörer ska kunna upptäckas. ”Låg dos” i sammanhanget betyder att stråldosen inte får överstiga en viss gräns. Vid lungcancertomografi ligger dosen på ungefär 1,5 mSv, vilket är hälften så högt som man i snitt beräknas utsättas naturligt för under ett år i USA (ICRP 2007).

Utöver de lovande utsikterna för miRNA som biomarkörer för diagnos, har studier också visat på att de kan användas som prognostiska verktyg. I en studie, där ddPCR användes för att mäta miRNA-halter för olika miRNA i bröstcancerpatienter, påvisades att försökspersonerna hade högre halter av två specifika typer av miRNA (miR-148b-3p och miR-652-3p) jämfört med kontroller. Intressant nog iaktogs också att ännu ett miRNA (miR-10b-5p), i förhöjda halter gentemot kontroller, hängde ihop med andra kända biomarkörer som används för att förutspå utkomst av sjukdomen, som tumörstadium och lymfnodmetastas (Mangolini *et al.* 2015).

Ett tidigare experiment visade att miRNA kan användas inte bara för att upptäcka cancer, utan också för att skilja mellan olika undertyper av bröstcancer. Återigen undersöktes olika typer av miRNA i vävnad från bröstcancerpatienter, men här upptäcktes att olikheter i andelen miRNA av olika typer visade på om det rörde sig om en basal eller luminal (olika typer av celler i mjölkörteln) kategori. Kategorierna visar vilken typ av behandling som helst bör användas, eftersom tumörcellerna skiljer sig mellan undertyperna i vilka receptorer de har och inte har (Sempere *et al.* 2007).

Diskussion

Att metoderna som beskrivs här utvecklas i takt med analytiska system - så som de tidigare beskrivna dPCR och NGS-systemen - är ingen slump, men just nu befinner vi oss i en gränsperiod mellan äldre analysmetoder och verktyg, och nya. Tester genomförs kontinuerligt där de nya verktygen testas med metoder som tidigare inte var möjliga på grund av en kombination av framförallt höga kostnader, låg noggrannhet och hög tidskonsumtion (Taly *et al.* 2013, Sefrioui *et al.* 2015).

Som ofta är fallet inom många forskningsområden, är det svårt att veta vilka upptäckter som kommer vara av stor betydelse och vilka som kanske spelar mindre roll. Upptäckten av p53 och senare även dess roll som tumörsuppressör, hade stor betydelse och har fortsatt vara ett hett forskningsområde sedan dess. miRNA däremot, hade inte en lika självklar roll som biomarkör för cancer, men nu är det på frammarsch sedan några år inom cancerforskningen och det finns inget som tyder på att intresset kommer avsvälna inom någon nära framtid.

Korsdisciplinära fält som bioinformatik har redan revolutionerat cancerforskningen, liksom forskningen inom andra sjukdomar. Med nästa generation analytiska instrument och målsättningar kommer vi ytterligare ett steg närmare att koppla ihop bioinformatik med laborativa undersökningar med färre mellanhänder. Givetvis återstår ännu problemet att ingen behandlingsmetod fungerar i alla lägen eller ens i närheten av det men så länge utvecklingen går framåt, blir metoderna mer träffsäkra. Trots att de nya systemen, liksom de gamla, har för- och nackdelar beroende på vad som undersöks (Quail *et al.* 2012), tyder mycket på att de är mer träffsäkra i rätt händer.

Diehl med kollegor skriver i en rapport från 2008, där andelen cirkulerande tumör-DNA (ctDNA) undersöktes som potentiell biomarkör för övervakning av progression för tjocktarmscancer, att ett av cancer genomatlas-projektets (the Cancer Genome Atlas Project) främsta mål är att förbättra och utveckla diagnostiska applikationer för sekvenseringsteknologin för att göra det relativt enkelt att upptäcka mutationer i praktiskt taget vilken cancertyp som helst (Diehl *et al.* 2008). Detta uttalande är ett utmärkt exempel på hur viktigt det är att utveckla verktyg som NGS, så att utvecklingen kan gå snabbare och fler liv kan räddas.

Sammanfattningsvis tycks nuvarande forskning peka på att de nya systemen som finns tillgängliga idag är mycket lovande för framtida cancerforskning, behandling och diagnostisering och dessutom sannolikt har applikationer som ännu inte upptäckts. Samtidigt tas fler internationella initiativ fram för att öka samarbetet länder emellan, vilket på sikt kommer leda till enorma databaser speciellt framtagna för snabb identifiering av olika cancertyper. Med riktade ansträngningar mot klara mål, samt bra samordning i dessa samarbeten kan utvecklingen gå extremt fort på den här fronten (Brennan & Wild 2015). Med alla de framsteg som skett och med de ansträngningar som görs, ser framtiden ljus ut för cancerforskningen.

Tack

Jag tackar Magnus Eklund, Adrian Silberman, Anghella Lambruschini Falcon, Oskar Bergman och Anna Rosling för deras tid och tålamod med att ge återkoppling och råd.

Referenser

- Abegglen LM, Caulin AF, Chan A, Lee K, Robinson R, Campbell MS, Kiso WK, Schmitt DL, Waddell PJ, Bhaskara S, Jensen ST, Maley CC, Schiffman JD. 2015. Potential Mechanisms for Cancer Resistance in Elephants and Comparative Cellular Response to DNA Damage in Humans. *JAMA* 314: 1850.
- Balkwill F, Bastian BC, Wolchok JD. Animation: Tumour immunology and immunotherapy. WWW-dokument 2015-10-22:
<http://www.nature.com/reviews/multimedia/tumourimmunotherapy/index.html>.
Besökt 2015-11-16.
- Baker M. 2012. Digital PCR hits its stride. *Nat Methods* 9: 541–544.
- Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton, Preisinger AC, Jessup JM, vanTuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R, Vogelstein B. 1989. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244: 217–221.

- Bartel DP. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
- Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubner B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong S-M, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SKN, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih le-M, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorescu D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang T-L, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA. 2014. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. *Sci Transl Med* 6: 224ra24–224ra24.
- Brennan P, Wild CP. 2015. Genomics of Cancer and a New Era for Cancer Prevention. *PLoS Genet* 11: e1005522.
- Bussemakers MJG, Van Bokhoven A, Tomita K, Jansen CFJ, Schalken JA. 2000. Complex cadherin expression in human prostate cancer cells. *Int J Cancer* 85: 446–450.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 99: 15524–15529.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. 2004. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2999–3004.
- Callaway E. 2015. How elephants avoid cancer. *Nature*, doi 10.1038/nature.2015.18534.
- Carr AC, Moore SD. 2012. Robust Quantification of Polymerase Chain Reactions Using Global Fitting. *PLoS ONE*, doi 10.1371/journal.pone.0037640.
- Carystinos GD, Bier A, Batist G. 2001. The Role of Connexin-Mediated Cell–Cell Communication in Breast Cancer Metastasis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6: 431–440.
- Chakarov S, Petkova R, Russev GC. 2012. p53-GUARDIAN ANGEL AND ARCHANGEL. *Biotechnol Biotechnol Equip* 26: 2695–2702.
- Chen C-Y. 2014. DNA polymerases drive DNA sequencing-by-synthesis technologies: both past and present. *Front Microbiol*, doi 10.3389/fmicb.2014.00305.
- Chen H, Werner S, Tao S, Zörnig I, Brenner H. 2014. Blood autoantibodies against tumor-associated antigens as biomarkers in early detection of colorectal cancer. *Cancer Lett* 346: 178–187.
- Clarke MF, Fuller M. 2006. Stem Cells and Cancer: Two Faces of Eve. *Cell* 124: 1111–1115.

- Coons AH, Creech HJ, Jones RN, Berliner E. 1942. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J Immunol* 45: 159–170.
- Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J. 1981. Detection of a common feature in several human tumor cell lines--a 53,000-dalton protein. *Proc Natl Acad Sci* 78: 41–45.
- Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. 2006. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 126: 121–134.
- Cummings PJ, Ahmed R, Durocher JA, Jessen A, Vardi T, Obom KM. 2013. Pyrosequencing for Microbial Identification and Characterization. *Jove-J Vis Exp UNSP* e50405.
- Desgrosellier JS, Cheresch DA. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 10: 9–22.
- Diehl F, Schmidt K, Choti MA, Romans K, Goodman S, Li M, Thornton K, Agrawal N, Sokoll L, Szabo SA, Kinzler KW, Vogelstein B, Diaz LA. 2008. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. *Nat Med* 14: 985–990.
- Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, Halpern AL, Burns NL, Kermani BG, Carnevali P, Nazarenko I, Nilsen GB, Yeung G, Dahl F, Fernandez A, Staker B, Pant KP, Baccash J, Borcharding AP, Brownley A, Cedeno R, Chen L, Chernikoff D, Cheung A, Chirita R, Curson B, Ebert JC, Hacker CR, Hartlage R, Hauser B, Huang S, Jiang Y, Karpinchyk V, Koenig M, Kong C, Landers T, Le C, Liu J, McBride CE, Morenzoni M, Morey RE, Mutch K, Perazich H, Perry K, Peters BA, Peterson J, Pethiyagoda CL, Pothuraju K, Richter C, Rosenbaum AM, Roy S, Shafto J, Sharanhovich U, Shannon KW, Sheppy CG, Sun M, Thakuria JV, Tran A, Vu D, Zaranek AW, Wu X, Drmanac S, Oliphant AR, Banyai WC, Martin B, Ballinger DG, Church GM, Reid CA. 2010. Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-Assembling DNA Nanoarrays. *Science* 327: 78–81.
- Engeland A, Haldorsen T, Tretli S, Hakulinen T, Hoerte LG, Luostarinen T, Schou G, Sigvaldason H, Storm HH, Tulinius H, Vaittinen P. 1995. Prediction of cancer mortality in the Nordic countries up to the years 2000 and 2010, on the basis of relative survival analysis: A collaborative study of the five Nordic cancer registries. *Apmis* 103: 1–163.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Tillgänglig från: <http://globocan.iarc.fr>, besökt 10/11/15.
- Garcia CA, Ahmadian A, Gharizadeh B, Russom A, Gaber F, Lundeberg J, Ronaghi M, Nyren P. 2000. Cancer gene analysis by pyrosequencing: Towards real-time DNA sequencing on microarrays. *Int Genome Seq Anal Conf* 12: 61.
- Gewin V. 2013. Massive animals may hold secrets of cancer suppression. *Nature*, doi 10.1038/nature.2013.12258.

- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144: 646–674.
- Hori M, Fukano H, Suzuki Y. 2007. Uniform amplification of multiple DNAs by emulsion PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 323–328.
- Huber MA, Kraut N, Beug H. 2005. Molecular requirements for epithelial–mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17: 548–558.
- Huggett JF, Cowen S, Foy CA. 2015. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin Chem* 61: 79–88.
- ICRP, 2007. The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 103. *Ann. ICRP* 37 (2-4).
- Iorio MV, Croce CM. 2012. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis* 33: 1126–1133.
- Jenkins JR, Rudge K, Currie GA. 1984. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature* 312: 651–654.
- Jia J, Wang W, Meng W, Ding M, Ma S, Wang X. 2014. Development of a Multiplex Autoantibody Test for Detection of Lung Cancer. *PLoS ONE* 9: e95444.
- Kanagal-Shamanna R, Portier BP, Singh RR, Routbort MJ, Aldape KD, Handal BA, Rahimi H, Reddy NLG, Barkoh BA, Mishra BM, Paladugu AV, Manekia JH, Kalhor N, Chowdhuri SR, Staerkel GA, Medeiros LJ, Luthra R, Patel KP. 2014. Next-generation sequencing-based multi-gene mutation profiling of solid tumors using fine needle aspiration samples: promises and challenges for routine clinical diagnostics. *Mod Pathol* 27: 314–327.
- Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, Xie M, Zhang Q, McMichael JF, Wyczalkowski MA, Leiserson MDM, Miller CA, Welch JS, Walter MJ, Wendl MC, Ley TJ, Wilson RK, Raphael BJ, Ding L. 2013. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 502: 333–339.
- Kim J, Lee YM, Kim H, Park D, Kim J, Kim WJ. 2016. Phenylboronic acid-sugar grafted polymer architecture as a dual stimuli-responsive gene carrier for targeted anti-angiogenic tumor therapy. *Biomaterials* 75: 102–111.
- Kojima T, Zhu B, Nakano H. 2015. Construction of a DNA Library on Microbeads Using Whole Genome Amplification. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1347: 87–100.
- Lane DP, Crawford LV. 1979. T antigen is bound to a host protein in SY40-transformed cells. *Nature* 278: 261–263.
- Laurie MT, Bertout JA, Taylor SD, Burton JN, Shendure JA, Bielas JH. 2013. Simultaneous digital quantification and fluorescence-based size characterization of massively parallel sequencing libraries. *Biotechniques* 55: 61–67.
- Leong IUS, Skinner JR, Love DR. 2014. Application of Massively Parallel Sequencing in the Clinical Diagnostic Testing of Inherited Cardiac Conditions. *Med Sci* 2: 98–126.

- Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM. 2009. Henrietta Lacks, HeLa Cells, and Cell Culture Contamination. *Arch Pathol Lab Med* 133: 1463–1467.
- Mangolini A, Ferracin M, Zanzi MV, Saccenti E, Ebnaof SO, Poma VV, Sanz JM, Passaro A, Pedriali M, Frassoldati A, Querzoli P, Sabbioni S, Carcoforo P, Hollingsworth A, Negrini M. 2015. Diagnostic and prognostic microRNAs in the serum of breast cancer patients measured by droplet digital PCR. *Biomark Res* 3: 12.
- Martins VL, Caley MP, Moore K, Szentpetery Z, Marsh ST, Murrell DF, Kim MH, Avari M, McGrath JA, Cerio R, Kivisaari A, Kähäri VM, Hodiuala-Dilke K, Brennan CH, Chen M, Marshall JF, O’Toole EA. 2016. Suppression of TGF β and Angiogenesis by Type VII Collagen in Cutaneous SCC. *J Natl Cancer Inst* 108: djv293.
- Meany DL, Chan DW. 2011. Aberrant glycosylation associated with enzymes as cancer biomarkers. *Clin Proteomics* 8: 7.
- Mooi WJ, Peeper DS. 2006. Oncogene-induced cell senescence - Halting on the road to cancer. *N Engl J Med* 355: 1037–1046.
- Morselli E, Tasdemir E, Maiuri MC, Galluzzi L, Kepp O, Criollo A, Vicencio JM, Soussi T, Kroemer G. 2008. Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy. *Cell Cycle* 7: 3056–3061.
- Muller PAJ, Vousden KH. 2014. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* 25: 304–317.
- Murphy DA, Courtneidge SA. 2011. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12: 413–426.
- Nelson LD, Cox MM. 2008. *Principles of Biochemistry*. 5th upplagan. S 242, 243, 252. W. H. Freeman and Company, New York
- Nguyen T-A, Menendez D, Resnick MA, Anderson CW. 2014. Mutant TP53 Posttranslational Modifications: Challenges and Opportunities. *Hum Mutat* 35: 738–755.
- Paulsson M. 1992. Basement-Membrane Proteins - Structure, Assembly, and Cellular Interactions. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27: 93–127.
- Peto R, Roe FJ, Lee PN, Levy L, Clack J. 1975. Cancer and ageing in mice and men. *Br J Cancer* 32: 411–426.
- Quail MA, Smith M, Coupland P, Otto TD, Harris SR, Connor TR, Bertoni A, Swerdlow HP, Gu Y. 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *Bmc Genomics* 13: 341.
- Rassoulzadegan M, Naghashfar Z, Cowie A, Carr A, Grisoni M, Kamen R, Cuzin F. 1983. Expression of the large T protein of polyoma virus promotes the establishment in culture of “normal” rodent fibroblast cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4354–4358.
- Rusk N. 2011. Torrents of sequence. *Nat Methods* 8: 44–44.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463–5467.
- Sefrioui D, Sarafan-Vasseur N, Beaussire L, Baretta M, Gangloff A, Blanchard F, Clatot F, Sabourin J-C, Sesbouee R, Frebourg T, Michel P, Di Fiore F. 2015. Clinical value of chip-based digital-PCR platform for the detection of circulating DNA in metastatic colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 47: 884–890.
- Sempere LF, Christensen M, Silaharoglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, Wells W, Kauppinen S, Cole CN. 2007. Altered MicroRNA Expression Confined to Specific Epithelial Cell Subpopulations in Breast Cancer. *Cancer Res* 67: 11612–11620.
- Shay JW, Wright WE. 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1: 72–76.
- Shukla HD, Mahmood J, Vujaskovic Z. 2015. Integrated proteo-genomic approach for early diagnosis and prognosis of cancer. *Cancer Lett* 369: 28–36.
- Simen BB, Yin L, Goswami CP, Davis KO, Bajaj R, Gong JZ, Peiper SC, Johnson ES, Wang Z-X. 2015. Validation of a Next-Generation-Sequencing Cancer Panel for Use in the Clinical Laboratory. *Arch Pathol Lab Med* 139: 508–517.
- Sozzi G, Boeri M, Rossi M, Verri C, Suatoni P, Bravi F, Roz L, Conte D, Grassi M, Sverzellati N, Marchiano A, Negri E, La Vecchia C, Pastorino U. 2014. Clinical Utility of a Plasma-Based miRNA Signature Classifier Within Computed Tomography Lung Cancer Screening: A Correlative MILD Trial Study. *J Clin Oncol* 32: 768–+.
- Sulak M, Fong L, Mika K, Chigurupati S, Yon L, Mongan NP, Emes RD, Lynch VJ. 2015. TP53 copy number expansion correlates with the evolution of increased body size and an enhanced DNA damage response in elephants. *bioRxiv* 028522.
- Taly V, Pekin D, Benhaim L, Kotsopoulos SK, Corre DL, Li X, Atochin I, Link DR, Griffiths AD, Pallier K, Blons H, Bouché O, Landi B, Hutchison JB, Laurent-Puig P. 2013. Multiplex Picodroplet Digital PCR to Detect KRAS Mutations in Circulating DNA from the Plasma of Colorectal Cancer Patients. *Clin Chem* 59: 1722–1731.
- Vogelstein B, Kinzler KW. 1999. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9236–9241.
- Wang P, Jing F, Li G, Wu Z, Cheng Z, Zhang J, Zhang H, Jia C, Jin Q, Mao H, Zhao J. 2015. Absolute quantification of lung cancer related microRNA by droplet digital PCR. *Biosensors and Bioelectronics* 74: 836–842.
- Wu C, Guo X, Wang W, Wang Y, Shan Y, Zhang B, Song W, Ma S, Ge J, Deng H, Zhu M. 2010. N-Acetylgalactosaminyltransferase-14 as a potential biomarker for breast cancer by immunohistochemistry. *Bmc Cancer* 10: 123.

Proteogenomik: Nya och kommande metoder i diagnostisering av cancer: etisk bilaga

Tobias Grylling

Självständigt arbete i biologi 2015

Dolda och synliga gener

Vissa gener uttrycks på ett sätt som är fullt synligt för alla, som ögonfärg, och utgör en individs fenotyp. När man utför en helgenomsekvensering av individen, får man också fram den information som annars är dold – individens genotyp. Eftersom dessa gener hålls dolda för alla, inklusive individens medvetna själv, finns det inget sätt att se om någonting är fel i någon av dem förrän symptom börjar utvecklas. Även om det inte nödvändigtvis är försent att göra något åt det vid det laget, kan det vara svårt att veta exakt vilken gen som ger upphov till symptomen, eller om det ens är något genetiskt. På så vis ger helgenomsekvensering information som kan rädda liv, men till vilket pris? Här har jag fokuserat kring individen och familjen för min etiska frågeställning.

vem har rätt till informationen?

Är det rätt att lämna ut genetisk information till var och en, eller är det bättre att man inte känner till sådant som kan orsaka problem om man råkar lämna ut det till fel person? Kanske är det bäst att inte känna till saker som att man löper 20% risk att få lungcancer vid 40 års ålder, för att undslippa mental vånda. Att gensekvensera en individ ger dessutom information om dess förfäder, vilket kan orsaka obehag för dem – har man då rätt att bestämma själv om man ska undersökas, eller måste alla levande och rimligt avlägsna släktingar också ge sitt godkännande?

Om förmyndarna får ta del av informationen, står det utanför individens egen förmåga att stoppa dem från att utlämna den. Det skulle kunna leda till spänningar inom familjen och etiska dilemman för förmyndarna. Samtidigt bör förmyndarna ha rätt att veta om deras barn lider av någon sjukdom.

Att var och en själv bör få välja hurvida man vill ta del av resultaten från sin gensekvensering är för mig självklart, men jag är kluven i de familjeorienterade frågorna. Våra gener är både det mest personliga vi har men samtidigt sträcker de sig långt utanför individens gränser och kan innefatta alla dess rimligt närbelägna släktingar, som i många fall inte ens har kontakt med varandra. Liksom Pandoras ask uppstår en hel rad problem när informationen väl avtäckts – om en individ har cancer som hade kunnat stoppas om den upptäckts vid ung ålder, borde man då inte undersöka individens barn och barnbarn? Min åsikt är att det inte finns något enkelt svar, utan att man bör ta varje fall för sig och bestämma vilka som har rätt till vilken del av informationen (vem som har sekvenserats behöver exempelvis inte framgå).

Vem kan man lita på?

Idag präglas samhället av integritet, mycket till följd av vetenskapen att företag och myndigheter kan lagra information från Internet. Att ”obehöriga” kan känna till saker som man vill hålla privat är en obehaglig tanke, så att någon skulle kunna känna till mer än man vet om sig själv är förstås ännu obehagligare. Därför bör varje individ få bestämma om dess genom ska ”få” sekvenseras.

Forskningsetik

När jag skrev min artikel ville jag dels använda källor som jag kunde lita på men också, på grund av min egen knappa erfarenhet av fördjupade aspekter i ämnet, källor som backades upp från flera håll. Därför har jag använt både översiktsartiklar och primärartiklar – det första som referenser till allmänt accepterade teorier, samt ett sätt att hitta primärartiklar, som jag använde för att visa på framsteg och nya upptäckter inom de behandlade områdena.

När man läser vetenskapliga artiklar får man snabbt en känsla av att många forskare, trots sin ödmjukhet för sitt forskningsfält, inte lättvindigt vill erkänna brister i sitt arbete. Därför är det alltid en liten trygghet när andra artiklar refererar till samma artikel som jag själv refererat till, men jag utgår aldrig ifrån att någon annan granskat artikeln noggrannare än jag. Mina egna slutsatser har jag lagt i diskussionsdelen för att undvika förvirring.