

KEMIAN LAITOS  
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

**Rinta- ja keuhkosyövän molekyyliprofiloinnin modernit  
menetelmät**

**Kandidaatin tutkielma  
Jyväskylän yliopisto  
Kemian laitos  
20.12.2024  
Vilma Niemi**





## **Tiivistelmä**

Tässä kandidaatintutkielmassa tavoitteena oli perehtyä modernissa syöpätutkimuksessa käytettyjen molekyyliprofiloinnin työkaluihin, niiden sovelluksiin sekä tutustua menetelmiin myös laboratorioprojektissa. Kirjallisessa osassa otettiin tarkasteluun molekyyliprofiloinnin perusteita, yleisimpiä menetelmiä ja niissä hyödynnettäviä biomarkkereita erityisesti rinta- ja keuhkosyöpään keskittyen. Lisäksi kirjallisessa osassa tarkasteltiin perinteisiin patologian menetelmiin kuuluvien, uusien biomarkkereiden käyttökelpoisuutta. Kokeellisessa osassa, eli laboratorioprojektissa tavoitteena oli vertailla digitaalisesta dropletti PCR:tä ja massiivisesta paralleelisekvensoinnista saatuja tuloksia ja laitteistojen herkkyyttä keskenään. Laboratorioprojekti suoritettiin Keski-Suomen sairaala Novan patologian yksikössä, ja tulokset tukivat aiemmin julkaistuja tutkimuksia.

## **Esipuhe**

Tämä kandidaatintutkielma tehtiin Jyväskylän kemian laitoksella vuoden 2024 aikana. Tutkielman kirjallisuuslähteiden etsiminen aloitettiin tammikuun lopussa 2024 ja kirjoittaminen helmikuun puolivälissä 2024. Tutkielma valmistui joulukuun aikana 2024. Kirjallisuuslähteiden hakuun käytettiin JYKDOK- sekä Web of Science ja National Library of Medicine-tietokantoja. Kandidaatintutkielman ohjaajina toimivat työelämäprofessori Sauli Vuoti ja Sairaala Novan molekyylibiologi Laura Lahtinen.

# Sisällysluettelo

Tiivistelmä	iii
Esipuhe	iv
Käytetyt lyhenteet	vi
1 Johdanto	1
2 Molekyylipatologiset näytteet	2
2.1 Biomarkkerit ja niiden luokittelu	2
2.1.1 HER2 ja EGFR-biomarkkereina	2
2.2 Kudos- ja nestebiopsia	3
2.3 DNAn eristys	4
3 Molekyyliprofiloinnin menetelmät	5
3.1. PCR-tekniikat	5
3.1.1 Digitaalinen dropletti PCR	5
3.2 Next Generation Sequencing	6
4 Menetelmät molekyyliprofiloinnin tukena	9
4.1 Fluoresenssi <i>in situ</i> hybridisaatio	9
4.2 Immunohistokemialliset värjäykset	9
4.2.1 Minichromosome maintenance- protein 2	11
4.2.2 Ki-67	11
4.2.3 Sykliini A	12
4.2.4 PhH3, fosforyloitu histoni 3	12
5 Laboratorioprojekti Sairaala Novassa	13
5.1 Projektin suoritus	13
5.2 Tulokset	20
5.3 Tulosten tarkastelu	23
6 Yhteenveto	24
Viitteet	25
Liitteet	29

**Käytetyt lyhenteet**

<b>HER2</b>	Human Epidermal Growth Factor 2
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor; Epidermaalinen kasvutekijäreseptori
<b>NSCLC</b>	non-small cell lung cancer; ei-pienisoluinen keuhkosityöpä
<b>cfDNA</b>	cell free DNA; solunulkoinen DNA
<b>ctDNA</b>	circulating tumor DNA; solunulkoinen kasvain-DNA
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction; polymeraasiketjureaktio
<b>DDPCR</b>	Digital droplet PCR; digitaalinen dropletti PCR
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing; massiivinen rinnakkaissekvensointi
<b>FISH</b>	Fluoresenssi <i>in situ</i> hybridisaatio
<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing; massiivinen rinnakkaissekvensointi
<b>UMI</b>	Unique Molecular Identifier-sekvenssi

## 1 Johdanto

Viime vuosikymmeninä lääketieteen, sekä tekniikan kehityksen myötä syöpädiagnostiikan työkalut ovat harpanneet merkittäviä askeleita kehityksessään. Teknologian kehittyminen on mahdollistanut keskittymisen yhä pienempiin mittakaavoihin patologian tutkimuksessa ja molekyylipatologian aikakausi alkoi PCR-tekniikan kehityksestä 1990-luvulla. Tänä päivänä olemme päässeet kehityksessä pisteeseen, jossa lääketiede on yhä yksilöllisempää ja molekyyli-tason diagnostiikka on arkipäivää kliinisessä työssä.

Viimeisen vuosikymmenen aikana naisten yleisimmän syöpäsairauden, rintasyövän, ilmaantuvuus Suomessa on kasvanut vuosittain 0,6 % ja kolmanneksi yleisimmän syövän, keuhkosityövän 1,5 % vuodessa.<sup>1,2</sup> Myös miehillä keuhkosityöpä on kolmanneksi yleisin syöpäsairaus, mutta keskimääräinen sairastumisriski on laskenut 2,1 %. Rintasyövän ennuste on nykyisin erittäin hyvä ja viiden vuoden jälkeen sairastumisesta elossa oli 91 % naisista ja 81 % miehistä, kun taas keuhkosityövän ennusteet ovat edelleen synkät. Syöpäsairauksien oikeanlaista ja tehokasta hoitoa edellyttävät oikean syöpätyypin tunnistaminen ja potilaan uniikin genomivariaation aikaansaaman erityisen mikroympäristön huomioonottaminen.

Tässä kandidaatintutkielmassa tehdään katsaus viimeisimpiin molekyyliprofiloinnin menetelmiin sekä yleisempien onkogeneien, että uudempien biomarkkereiden johdolla rinta- ja keuhkosityöpään keskittyen.

## 2 Molekyylipatologiset näytteet

### 2.1 Biomarkkerit ja niiden luokittelu

Syöpien tunnistamisessa ja modernissa molekyyliprofiloinnissa biomarkkerit eli biologiset merkkiaineet ovat tärkeässä roolissa.<sup>2</sup> Biomarkkerit syöpädiagnostiikassa voivat olla lähes mikä vaan ominaisuus tai tekijä, joka jollain tapaa kuvaa potilaan sen hetkistä terveydentilaa tai taudin ominaisuutta. Ne voivat siis käytännössä olla geenejä tai niiden mutaatioita, entsyymeitä, hormoneita, soluja tai muita isompia ja pienempiä molekyylejä.

Biomarkkerit voidaan luokitella sen mukaan, millaista tietoa niistä halutaan tuottaa. Syöpätautien kannalta oleellisimpia biomarkkereita ovat diagnostiset, monitoroivat, prediktiiviset ja prognostiset biomarkkerit.<sup>3</sup> Diagnostiset biomarkkerit nimensä mukaisesti varmistavat tai havaitsevat olemassa olevan, epäillyn sairauden tai tautityypin olemassaolon. Monitoroivat biomarkkerit taas kertovat jo diagnosoidun ja hoidettavan syöpätaudin tilan mahdollisista muutoksista pitkän ajan kuluessa useilla näytteillä, jotka voivat olla tulosta lääkkeen, syöpähoidon tai syövän mikroympäristön muutoksista.

Prediktiiviset biomarkkerit antavat tietoa siitä, miten paljon potilas voi hyötyä mistäkin hoidosta, verrattuna hänen lähtötilanteeseensa. Prognostisia eli ennustebiomarkkereita käytetään lähinnä ennustamaan taudin lopputuleman, remission, eli sairauden häviämisen tai tietyn kliinisen tapahtuman todennäköisyyttä. Prediktiiviset ja prognostiset biomarkkerit eroavatkin siinä, että prediktiiviset biomarkkerit ennustavat sitä, miten tietyt syöpähoidot vaikuttamaan taudin etenemiseen, ja prediktiiviset sairauden lopputuleman eri vaihtoehtojen todennäköisyyttä.<sup>4</sup>

#### 2.1.1 HER2 ja EGFR-biomarkkereina

Yksiä tunnetuimpia biomarkkereita tässä työssä käsiteltäville syöpätyypeille, rinta- ja keuhkosityöville, ovat HER2- (*Human Epidermal Growth Factor 2*) ja EGFR-onkogeenit (*Epidermal Growth Factor Receptor*).<sup>5,6</sup> Nämä onkogeenit, eli potentiaalisesti syöpää aiheuttavat geenit<sup>7</sup>, kuuluvat samaan epidermaalisen kasvutekijän reseptori-geeniperheeseen. Geenien tuottamien proteiinien tehtävä terveessä solussa on toimia solujen membraanilla reseptoreina signaalinvälityksessä, reseptorityrosiinikinaaseina, ja siten säädellä solunjakautumista, selviytymistä ja erilaistumista. Näiden proteiinien toimintaperiaate pohjautuu dimerisaatioon ja biologiseen konformaatiomuutokseen, mikä aktivoi reseptorin viestinnän soluun autofosforylaation kautta.<sup>8</sup>



HER2-geenin mutatoituminen voi muuttaa HER2 proteiinin jatkuvasti aktiiviseksi tai aiheuttaa sen yli-ilmentymisen, joka lopulta johtaa hallitsemattomaan solunjakautumiseen. Neljästä biologisesta rintasyöpätyypistä, luminaalisista A & B, HER2-positiivisista, ja kolmoisnegatiivisista rintasyövistä, HER2-positiivisia on noin 15 %.<sup>9</sup> HER2-proteiini voi toimia sekä diagnostisena, prediktiivisenä että prognostisena biomarkkerina ja sen yli-ilmentyminen voidaan selvittää kromosomistosta muun muassa *in situ* hybridisaatiolla tai proteiinitasolla immunohistokemiallisella värjäyksellä.<sup>5</sup>

Kaikista keuhkosyövistä noin 80 % on ei-pienisoluista keuhkosyöpää (*non-small cell lung cancer*, NSCLC).<sup>6</sup> Histologisesti yleisin NSCLC:n alatyyppejä on keuhkojen adenokarsinoma, joista EGFR-mutaatioiden osuus on 10–15 %.<sup>10</sup> Aktivoiva EGFR-mutaatio löytyy yleensä sen eksoneista 18, 19 ja 21, ja mutaatiotyyppi voi määrittää vastetta tietylle lääkehoidolle. Esimerkiksi eksonin 19 deleetiot ja eksonin 21 Leu858Arg-mutaatiot ovat herkempiä ensimmäisen linjan EGFR-tyrosiinikinaasi-estäjillä (TKI) toteutetuille lääkehoidoille, kun taas T790M-mutaatiotyyppin NSCLC:n sairastunut hyötyy paremmin kolmannen sukupolven TKI-lääkityksestä (Esim Osimertinibi).<sup>11,12</sup> Mutaatioiden spesifisyyden takia EGFR:n mutaatiotyyppi selvitetään tarkemmilla molekyylipatologisilla analyyseilla, PCR:lla (polymeraasiketjureaktio) ja NGS:lla (massiivinen rinnakkaissekvensointi). Kuten HER2, myös EGFR voi toimia niin diagnostisena, että prediktiivisenä sekä prognostisena, mutta myös monitoroivana biomarkkerina.<sup>6</sup>

## 2.2 Kudos- ja nestebiopsia

Perinteisesti syöpädiagnostiikka on kliinisesti perustettu kudoksi otetusta kudosbiopsiasta saatavan tiedon pohjalta, mutta kudosbiopsian ongelmana on laaja kajoavaisuus.<sup>13</sup> Toimenpiteenä tehtävässä biopsiassa on aina riskinsä ja kohdekudos voi sijaita paikassa, johon on vaikea päästä käsiksi. Lisäksi taudin edetessä voi kasvaimen mikroympäristössä tapahtua geneettistä muuntelua, minkä vuoksi biopsioita olisi tarvittavaa tehdä monta pitkän ajan kuluessa.<sup>14</sup> Vasta näin saataisiin tietoa solujen molekulaarisista muutoksista lähes reaaliajassa toistuvasti.

Nestebiopsia on viime vuosikymmenellä kehitetty näytteenoton menetelmä, jossa kudosbiopsian sijasta tutkittavia soluja tai muita biomarkkereita eristetään elimistön nesteestä, useimmiten verestä.<sup>15</sup> Vereen päätyy erilaisten fysiologisten solutoimintojen kautta monenlaisia partikkeleita, kuten soluvapaata DNA:ta (cfDNA) ja syöpäsolulähtöistä DNA:ta (ctDNA). Näiden konsentraatio voi nousta syöpätaudin aikana merkittävästi. Terveillä ihmisillä soluvapaan DNA:n konsentraatio on yleisesti muutamia nanogrammoja millilitrassa (ng/ml),

kun taas syöpää sairastavilla pitoisuus voi olla <100 ng/ml.<sup>16</sup> Täytyy kuitenkin ottaa huomioon, että solun ulkoisen DNA:n pitoisuus voi nousta myös liikunnan, raskauden, trauman tai muun sairauden seurauksena. Riippuen syövän laadusta, kasvainten koosta ja levinneisyysasteista, ctDNA:ta on cfDNA:ssa 0–89 %.<sup>13</sup>

Nestebiopsiassa on omat rajoituksensa, sillä edellä mainittujen markkereiden puoliintumisajan uskotaan olevan maksimissaan 2 tuntia, mikä on kliinisessä mielessä lyhyt aika.<sup>17,18</sup> Myöskään kaikilla potilailla ei ole detektoitavaa määrää cfDNA:ta, jotta sen avulla tehtävät analyysit olisivat kannattava, johtaen edustavuuden vaikeaan arviointiin.<sup>19</sup>

### 2.3 DNAn eristys

Näytteiden analysoimiseksi täytyy kudosis- tai verinäytteistä erotellusta plasmasta eristää tutkittava DNA. DNA eristys voidaan tehdä esimerkiksi kaupallisilla eristysautomaateilla ja niihin kuuluvilla reagensseilla, joiden yksi yleisimmistä toimintaperiaatteista perustuu anionin vaihdolla tapahtuvaan magneettipartikkeliteknologiaan.<sup>20</sup> Useimpien DNA-pesukittien magneettipartikkeleina toimivat (SiO<sub>2</sub>) piidioksidi- eli silikapäällystetyt Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tai γ-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-rautaoksidit, jolloin biomolekyylit sitoutuvat partikkelin silikakerrokseen elektrostaattisin sidoksin. Magneetin sisältävän kärjen avulla partikkelit voidaan pestä alkoholilla sekä siirtää uusiin putkiin. DNA irrotetaan magneettipartikkeleista konsentraation ja pH:n muutoksella, joka rikkoo sidokset DNA:n fosfaattirangan ja silikakerroksen välillä. Pesu toistetaan useita kertoja puhtaan lopputuotteen aikaansaamiseksi. Lopuksi lopputuote eluoidaan lopullisiin näyteputkiin.<sup>21</sup>

### 3 Molekyyliprofiloinnin menetelmät

#### 3.1. PCR-tekniikat

Polymeraasiketjureaktio- eli PCR-menetelmän rooli molekyyliprofiloinnissa on perinteisesti ollut tuottaa potilaan näytteen DNA:sta runsas määrä kopioita näytteen analyysia varten.<sup>22</sup> Menetelmä perustuu nukleotidijärjestyksen hybridisaatioon, jossa komplementaariset juosteet liittyvät toisiinsa emästen normaalien pariutumissääntöjen mukaisesti.<sup>23</sup> Hybridisaatiota voi syntyä sekä DNA-DNA, että DNA-RNA ja RNA-RNA-parien välille. Uutta DNA:ta ei synny tyhjästä, vaan reaktio toistuu tiettyjen lämpösykliä kautta tiettyjä rakennuspalikoita hyödyntäen. Yksinkertaisimmillaan reaktio vaatii alkuperäisen DNA-näytteen lisäksi kaksi aluketta (oligonukleotideja), yksittäisiä nukleotideja ja DNA-polymeraasi entsyymiin. Aluke on muutaman kymmenen emäksen pituinen DNA-juoste, joka on komplementaarinen alkuperäisen DNA:n kanssa ja nimensä mukaisesti toimii alukkeena kopioitaville juosteille. Lisäksi reaktiossa tarvitaan termostabiili DNA- polymeraasientsyymi, joka syntetisoi eli rakentaa alkuperäisen DNA:n kanssa komplementaariset DNA-juosteet sekä yksittäisiä nukleotideja (guaniini, adeniini, sytosiini ja tymiini), joista uudet juosteet rakennetaan.<sup>24</sup> Prosessi alkaa lähtö-DNA:n denaturaatiolla, jossa 94°C lämpötilassa DNA:n emästen väliset vetysidokset katkeavat, eli kaksoiskierakerakenne hajoaa yksittäisiksi juosteiksi. Toisessa vaiheessa lämpötilaa lasketaan noin 60° C, jolloin oligonukleotidit eli alukkeet kiinnittyvät yksittäisiin DNA-juosteisiin uusin vetysidoksin noudattaen emästen pariutumissääntöjä. Kolmannessa, elongaatiovaiheessa, alukkeisiin kiinnittynyt polymeraasientsyymi syntetisoi denaturoiduille DNA-juosteille komplementaariset juosteet yksittäisistä nukleotideista. Tätä sykliä toistetaan 20–30 kertaa, aloittaen alukkeiden sitoutumisen jälkeisestä polymerisaatioreaktiosta.<sup>22</sup> PCR:n merkitys molekyyliprofiloinnissa ja -diagnostiikassa on suuri, sillä yksittäisiä muutoksia voidaan tutkia suoraan PCR tai ddPCR tekniikalla. Polymeerasiketjureaktio on tärkeä apu myös DNA-kirjaston valmistuksessa. DNA-kirjasto on suuri kokoelma pieniä pätkiä eli fragmentteja tutkittavaa DNA:ta, josta voidaan tehdä analyysejä, kuten NGS-sekvensointia.<sup>25</sup>

##### 3.1.1 Digitaalinen dropletti PCR

Digitaalinen dropletti PCR, eli ddPCR, on käytössä vaikeasti havaittavien ja määrällisesti vähäisten syöpämutaatioiden analyysiin, ja sen herkkyys antaa keinon pienien (0,01 %) kopiolukumuutosten lukemiseen.<sup>26</sup> Kopiolumuutokset tarkoittavat yksilön kromosomistossa

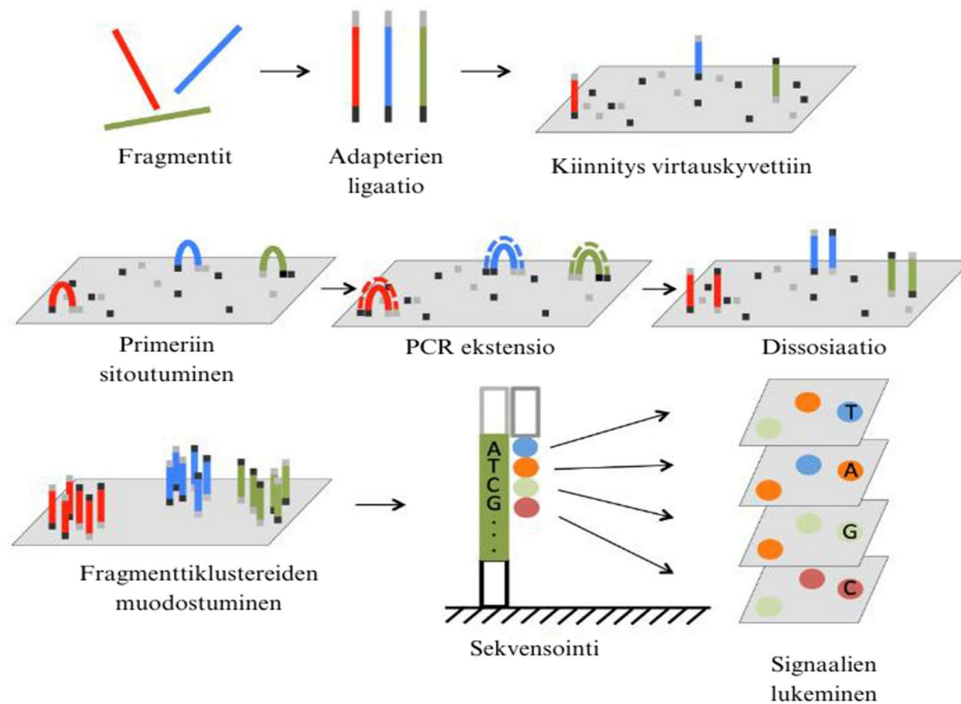
tai geenialueella tapahtuvia deleetioita, tai duplikaatioita,<sup>22</sup> jotka ovat relevantteja tutkimuskohteita syöpädiagnostiikassa. Tämän lisäksi ddPCR:ää voidaan käyttää harvinaisten mutaatioiden, sekvenssien ja geeniekspression tutkimukseen.<sup>27</sup>

DdPCR perustuu PCR-reaktion osiointiin emulsiopisaroiden muodostuksen avulla, joista voidaan lukea DNA:n absoluuttinen määrä fluoresenssiin perustuvalla lukulaitteella. Lähtö-DNA jaetaan 20 000 noin 1 nanolitran (nl) kokosiin pisaroihin, jotka koostuvat vesiöljyemulsiosta. Emulsiopisarot erottavat DNA-pätkät toisistaan ja näyte-DNA:n jako pisaroihin on täysin sattumanvaraista. Kuten perinteisessä PCR:ssä, myös ddPCR:n tehdään reaktioseos, joka sisältää näytteen, alukkeet, yksittäiset nukleotidit sekä DNA-polymeraasin. Lisäksi tarvitaan fluoresoiva väriaine, jotta pisaroiden sisältämät mutaatiot erottuvat lopullisessa analyysissä. Bio-Rad Technologies-QX200-droplettigeneraattori jakaa näytteet öljypisaroihin, ja lopullinen reaktioseos valmistuu hetkessä. Vesiöljypisarot näytteineen pipetoidaan 96-kuoppalevylle ja asetetaan PCR-lämpösyklioneeseen, jossa on etukäteen asetettu PCR-ohjelma. PCR-reaktion jälkeen QX200-droplettilukija lukee kaikki pisarat. Fluoresoivat pisarat eli ne, joissa on 1 tai useampi mutatoitunut DNA-sekvenssi. Nämä näytteet emittoivat huomattavasti voimakkaampaa intensiteettiä. Näin pisarat jaetaan positiivisiin ja negatiivisiin arvoihin, ja usein hyväksi havaittu kynnyksarvo rajaa pois negatiiviset, kohde-DNA:ta sisältämättömät pisarat pois.<sup>27</sup> Mikäli halutaan tutkia mutaation määrää näytteessä, on ddPCR reaktiossa käytettävä eritavoin fluoresoivia merkkiaineita, joilla voidaan erottaa näytteen normaali DNA ja mutatoitunut DNA toisistaan.

### 3.2 Next Generation Sequencing

Tämän hetken tehokkaimpia molekyyliprofiloinnin menetelmiä on NGS- eli massiivinen paralleelisekvensointi.<sup>28</sup> Sillä pystytään sekä sekvensoimaan miljoonia DNA-sekvenssejä,<sup>22</sup> että tutkimaan kymmeniä tai satoja syöpägenejä tai "hotspot"-alueita samanaikaisesti. Sairaala Novan käyttämän Illuminan NGS-teknologia perustuu "sekvensointi synteesillä" (SBS) menetelmään käyttäen fluoresenssileimattua, palautuvaa terminaattoria (*reversible terminator*). Varsinaista sekvensointia ennen tutkittavat geenialueet on monistettava eli on muodostettava geenikirjasto perinteisellä PCR-tekniikalla. Lisäksi tarvitaan klonaalinen amplifikaatio, joka Illuminan laitteistolla tapahtuu silta-PCR:n kautta. Menetelmä perustuu kohdennettuihin, ennalta merkittyihin alukkeisiin eli adaptereihin, jotka liitetään DNA-kirjaston fragmentteihin kirjaston kokoamisen aikana. Adapterit kiinnittyvät silta-PCR:n tapahtuma-alustaan, eli virtauskyvetin pintaan ja samaan kohtaan muodostuu siltatekniikalla niin paljon saman

sekvenssin fragmentteja, kuin luotettavaa mittaamista varten on tarve, eli miljoonia. Adapterit toimivat fragmenttiklustereiden muodostuksessa alukkeina juosteille.<sup>24</sup> Tapahtuma on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Massiivisen rinnakkaissekvensoinnin vaiheet SBS-tekniikalla, muokattu lähteestä<sup>29</sup>

Varsinainen sekvensointireaktio tapahtuu perinteisen DNA-polymeraasin ja oligonukleotidien lisäämisen avulla, mutta NGS:n erottaa perinteisistä sekvensointimenetelmistä palautuvan terminaattorin käyttö. Käytännössä terminaattoreina toimivat fluoresoivat deoksiribonukleotiditriposfaatit, dNTP:t, jotka liittyvät DNA-polymeraasin syntetisoimiin juosteisiin kiinni, yksi dNTP kohti sekvensointisykliä. Fluoresoivan leiman avulla tunnistetaan emäkset, jotka on lisätty nukleiinihappoketjuun, ja leima pilkkoutuu entsyymaattisesti jokaisen syklin jälkeen. Tämä sykli toistetaan lukuisia kertoja rinnakkaisesti useilla näytteillä, mahdollistaen miljoonien sekvenssien samanaikaisen lukemisen suurella tarkkuudella.<sup>30</sup> NGS-protokollan viimeinen vaihe on data-analyysi, jossa laitteesta saatua raakadataa verrataan bioinformatiivisen käsittelyprosessin lopuksi ihmisen referenssigenomiin.<sup>22</sup>

NGS-menetelmässä virhelähteitä ovat PCR-monistusreaktiot sekä varsinainen sekvensointi reaktio. Molekyyliprofiloinnin yksilöimisen kannalta tulosten tarkkuus ja luotettavuus ovat ratkaisevia tekijöitä ja monissa NGS-testeissä käytetään lyhyitä UMI-sekvenssejä (*Unique Molecular Identifier*) datan validointiin.<sup>30</sup> Alkuperäisten DNA-juosteiden merkitseminen UMI-sekvensseillä mahdollistaa PCR-kopiointivirheiden sekä sekvensointivirheiden suodattamisen pois datasta. Jos testin herkkyuden tavoite on 1 %, tämä tarkoittaa, että yksi mutaatio havaitaan sadasta molekyylistä. Tällöin, jotta mutaatio havaittaisiin 95 % varmuudella, tarvittava näytemäärä on kolminkertainen: 300 molekyyliä 1 % herkkyydelle ja 3000 molekyyliä 0,1 % herkkyydelle. UMI-sekvensointisyvyyden validoinnin monimutkaisuus NGS-testauksessa johtuu usein sen määrittelyn vaikeudesta, sillä se vaikuttaa suoraan herkkyYTEEN, spesifisyyteen ja tulosten toistettavuuteen. Lisäksi, koska cfDNA-näytteiden tutkimiseen NGS-testauksella ei ole Suomessa kansallista ohjeistusta, selkeitä rajoja sekvensointisyvyyden tarpeista ei ole vielä asetettu.<sup>31</sup>

## 4 Menetelmät molekyyliprofiloinnin tukena

### 4.1 Fluoresenssi *in situ* hybridisaatio

Fluoresenssi *in situ* hybridisaatio on yksi vanhimmista edelleen käytössä olevista patologian menetelmistä, joka perustuu DNA- tai RNA-sekvenssien hybridisaatioon. Fluoresenssi *in situ* hybridisaatiossa, eli FISH:ssa käytetään fluoresoivia koettimia, eli lyhyitä nukleiinihapposekvenssejä, joiden emäsjärjestys tunnetaan. Koettimen tarkoitus menetelmässä on toimia komplementaarisenä juosteena nukleiinihapposekvenssille ja tunnistaa tutkittavien kromosomien mutaatioita ja geenien lokaatioita. Koettimet merkitään fluoresoivalla merkkiaineella eli fluoroforilla,<sup>32</sup> kuten fluoreskeiinijohdannaisella FITC:llä tai rodamiinijohdannaisella TRITC:lla.<sup>33</sup> Merkkiaineiden fluoresoitumisen taustalla ovat delokalisoituneet  $\pi$ -elektronit, jotka reaktiossa nousevat suuremman energian  $\pi^*$ -orbitaalille. Kun molekyylit relaxoituvat takaisin perustilaansa, ne emittoivat valoa näkyvän tai ultraviolettivalon aallonpituusalueella. Tämä signaali voidaan havaita fluoresenssimikroskopiolla, jolloin merkityt kromosomilokaatiot erottuvat selvästi muusta kromosomimateriaalista.<sup>34</sup>

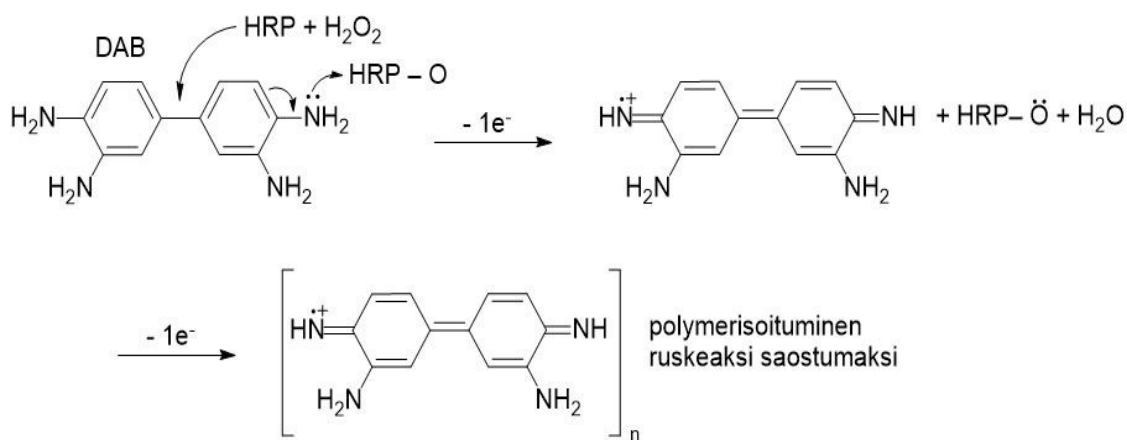
*In situ* hybridisaatio tarkoittaa pohjimmiltaan sitä, että DNA:ta ei eristetä näytteestä, vaan sen sijaan koetin hybridisoidaan suoraan näytteeseen. Ensin näyte denaturoidaan korkeassa lämpötilassa, joka hajottaa DNA kaksoiskierre-rakenteen yksittäisiksi juosteiksi. Koettimen kiinnitys näytteeseen onnistuu vain yksijuosteiseen DNA:an. Seuraavaksi näytteen annetaan inkuboitua tietyssä lämpötilassa koettimen hybridisaation aikaansaamiseksi. Hybridisaation jälkeen ylimääräiset, mukaan lukien ei-komplementaariset juosteet pestään pois. Jäljellä on koettiin hybridisoitunut kohdemutaatiosekvenssi tai muu kromosomin lokaatio. Koettimen kiinnittymiskohta luetaan fluoresenssimikroskoopilla, mikä emittoi muusta kromosomistosta erottuvaa väriä.<sup>32</sup> Tutkimuskohteena voi olla esimerkiksi rintasyövässä usein esiintyvä HER2-onkogeneeni. HER2-onkogeenin monistuma (positiivisuus) tai monistumattomuus (negatiivisuus) rajaa syöpätyyppejä, sekä toimii merkkiaineena, kuten aiemmin mainittu.

### 4.2 Immunohistokemialliset värjäykset

Immunohistokemia eli IHC on patologian menetelmä, jonka tarkoituksena on havaita tutkimuskohteena olevien kohdeproteiinien tai muiden -molekyylien ilmeneminen kudoksenäytteestä.<sup>35</sup>

Tunnistuksessa käytetään kohdeantigeenien ja vasta-aineiden välistä sitoutumisreaktiota hyväksi. IHC-menetelmät voidaan jakaa kahteen alatyypin niiden ilmentämistekniikan mukaan. Kromogeeninen monivärimenetelmä perustuu väriaineen syntymiseen kemiallisen reaktion pohjalta, jolloin eri väriaineet voivat ilmentää kahta tai useampaa antigeeniä valomikroskoopin avulla. Toinen perustuu FISH:ssäkin käytettäviin fluoroforeihin, jotka sitoutuvat reaktiossa primäärivasta-aineeseen.<sup>36</sup>

Esimerkiksi HER2-tapauksessa kudოსleike käsitellään lämmön avulla, jonka jälkeen siihen kiinnitetään primäärivasta-aine. Vasta-aine kiinnittyy antigeeniin, jos sitä kudოსnäytteessä esiintyy. Primäärivasta-aineeseen kiinnitetään sekundäärivasta-aine, johon on konjugoituneena entsyymi, kuten piparjuuripersoksidaasi, HRP (*horseradish peroxidase*). Sekundäärivasta-aineen lisäämisen jälkeen lisätään HRP:n hapettava 3,3'-diaminobentsidiini tetrahydrokloridi (DAB).<sup>36</sup> Tämä hapettava reaktio (kuva 2) saa aikaan valomikroskoopilla nähtävän ruskean värin.



Kuva 2. Piparjuuriperoksidaasin ja 3'3'-diaminobentsidiini tetrahydrokloridin hapettava reaktio, muokattu lähteestä<sup>37</sup>

Seuraavissa kappaleissa esitellään rinta- ja keuhkosityövälle tyypillisiä, immuunokemiallisella värjäyksellä detektoitavia, tärkeitä biomarkkereita.



#### 4.2.1 Minichromosome maintenance- protein 2

Minichromosome maintenance proteiini 2 eli MCM2 on osa minichromosome maintenance-proteiiniperhettä, jonka kuusi proteiinia muodostavat yhdessä replikoivan DNA-helikaasin. DNA-helikaasin roolina on varmistaa DNA:n replikoitumisen onnistuminen avaamalla DNA-kaksoiskierre solusyklin S-vaiheen alussa.<sup>38</sup> S-vaiheen eli interfaasin aloittaa S-CDK:n ja DDK:n aktivointi, joista DDK (Ddf4 dependent Cdc7 kinase) fosforyloi osan MCM-kompleksista, sisältäen MCM2. Proteiinien fosforylointi yhdessä muiden tapahtumien kanssa saa aikaan CMG-kompleksin (Cdc45/MCM2-7/GINS), joka vaaditaan kaksoiskiirteen aukaisemiseen.<sup>39</sup> MCM-helikaasilla on myös rooli estää genomien replikoituminen useampaan kertaan, ja replikoitumisen loppuvaiheessa CDK (*cyclin-dependent kinase*) inaktivoi MCM-helikaasin fosforyloimalla sen uudempaan kertaan.<sup>40</sup>

Rooli solusykliissä ja erityisesti DNA:n kahdentumisessa on MCM2-proteiinilla suuri, ja sen takia virheet sen toiminnassa voivat johtaa säätelyhäiriöihin replikoinnissa.<sup>38</sup> MCM2-proteiinin yliekspressio on linkitetty korreloivan positiivisesti sekä ei-pienisoluisen keuhkosyövän<sup>41</sup>, että monen eri rintasyöpätyypin<sup>42</sup> aggressiivisuuden ja huonon prognostisen ennusteen kanssa.

#### 4.2.2 Ki-67

Antigeeni Ki-67 on geenin MKI67 koodaama soluproliferaatiomarkkeri, joka esiintyy aktiivisena solusyklin G1-, S-, G2- ja M-vaiheissa.<sup>43</sup> Ki-67:n funktio solujakautumisessa on sen vankasta biomarkkeri-roolistaan huolimatta epäselvä, mutta viimeisimpien tutkimusten mukaan sen rakenteista on löydetty yksiköitä, joiden mukaan Ki-67 tehtävät voivat liittyä genomisen tasapainon säätelyyn.<sup>44</sup> Ki-67:n konsentraatio muuttuu eri vaiheissa solusykliä; matalimmillaan G1- ja S-vaiheissa, ja huipussaan mitoosin alkuvaiheilla. Sen on todettu olevan kansainvälisesti luotettava markkeri, sekä diagnostisesti, että prognostisesti, mutta sen arvioinnin vaihtelevuus on vaikeuttanut sen käytön standardisointia.

Ki-67:n rooli rintasyöpä- sekä ei-pienisoluisessa keuhkosyövän<sup>45</sup> hoidossa on moninainen ja se on osoittanut positiivista korrelaatiota aggressiivisiin ja suurikokoisiin kasvaimiin, varsinkin B-tyypin luminaalisessa rintasyövässä.<sup>43</sup> Diagnostiikan lisäksi Ki-67-antigeenivärjäystä käytetään neoadjuvanttihoitoon, eli syöpäleikkausta ennen tapahtuvan hoidon tarpeen arviointiin.

### 4.2.3 Sykliini A

Sykliini A:lla on oleellinen osa solusyklin säätelyssä osana sykliinien säätelyproteiiniperhettä.<sup>46</sup> Sykliinit aktivoivat solusyklin etenemistä sitoutumalla jokaiselle proteiinille spesifiseen kohdekinaasiinsa. Sykliini A:n rooli on vahvasti läsnä DNA:n replikoitumisen aikana, sekä mitoosin alkamisessa myöhemmässä vaiheessa. Sillä on kaksi kohdekinaasia, eli sykliiniriippuvaista kinaasia, CDK1 ja CDK2, joiden aktivoiminen eri solusyklin vaiheissa edistävät sen etenemistä. CDK2:n sitoutuessaan sykliini A saattaa solusyklin G1-vaiheesta S-vaiheeseen, ja CDK1:n sitoutuessaan se edistää G2-vaiheen siirtymistä mitoosiin.<sup>47</sup>

Sykliini A on linkitetty sekä ei-pienisoluiseseen keuhkosityöpään<sup>48</sup>, että eri rintasyöpätyyppeihin.<sup>46</sup> Sen yliekspressio ilmenee vaihtelevasti kasvaimen suurena kokona, ja sen toiminta tai toiminnan puutos liittyy myös MCM4,6,7-kompleksin inaktivaatioon fosforyloinnin kautta CDK2:n avulla.<sup>47,49</sup> Tutkimukset ovat myös osoittaneet sykliini A:n korreloivan Ki-67:n esiintymisen kanssa aggressiivisimmissä rintasyöpätyypeissä, sekä huonomman prognostisen ennusteen myös ei-pienisoluisessa keuhkosityövässä.<sup>48,50</sup>

### 4.2.4 PhH3, fosforyloitu histoni 3

Histonit ovat proteiineja, joiden ympärille kaksijuosteinen DNA keräytyy muodostaen nukleosomin, mikä on oleellinen osa kromatiinia.<sup>51</sup> Histoniproteiinien N-terminusta kutsutaan "histonihänniksi", ja niissä tapahtuvat post-translacionaaliset modifikaatiot, kuten fosforylaatio. Post-translacionaalisen modifikaation, mukaanlukien fosforylaation, funktiona on geeniekspression säätely modifioimalla DNA-juosteen kireyttä histonien ympärillä. H3:n fosforylaatio tapahtuu kaikkein useimmiten seriini- ja treoniinitähteissä, ja modifikaatiot vaikuttavat spesifisesti DNA:n korjausmekanismien aktivoitumiseen, solujakautumiseen, sekä apoptoosiin.<sup>52</sup> Onkogeneettisesti olennaisten tähteiden, kuten H3S10 ja H3S28, vajavainen toiminta edistää äkillistä proliferaatiota sekä onkogeneenien promootiota normaalin solukasvun ja geenien ekspression sijasta. H3S28 esimerkiksi on osana solustressin vasteen signaalireittejä, ja sen toimimattomuudella on tällöin suora linkki onkogeneesiin.<sup>53</sup>

PhH3 on osoittanut olevansa samankaltainen, mutta vakaampi, uusittavampi ja selektiivisempi prognostinen biomarkkeri kuin Ki-67, myös pitkällä aikavälillä.<sup>54,55</sup> Korkea PhH3:n esiintyvyys korreloi positiivisesti kasvainten suureen kokoon, potilaiden korkeaan ikään ja muun muassa korkeaan histologiseen arvioon, mikä tarkoittaa huonoa prognostista vaikutusta eri rintasyöpätyypeissä, sekä ei-pienisoluisessa keuhkosityövässä.<sup>56,57</sup>

## 5 Laborioprojekti Sairaala Novassa

18.3. aloitetun laboratorioprojektin tavoitteena oli tehdä vertailua EGFR-mutaation analyysimetodien, NGS:n ja ddPCR:n välillä, Keski-Suomen sairaala Novan patologian yksikössä.

### 5.1 Projektin suoritus

Primäärimateriaalina toimi vuosien 2022–2024 aikana patologian osastolle tutkittavaksi lähetettyjen laskimoverinäytteiden etukäteen erotettu plasma. cfDNA:n eristämiseen käytettiin Qiagenin QIASymphony SP-erotuslaitteistoa ja erityisesti solunulkoisen DNA:n eristykseen tarkoitettua DSP Circulating DNA-eristyskittiä (Qiagen). Kaikki eristykseen tarvittavat reagenssit, fosfaattipuskuroitua keittosuolaliuosta (PBS) lukuunottamatta, sisältyi eristyskittiin. Reagenssit oli suljettu reagenssikasettiin, mihin kuuluivat ei-ioninen puhdistusaine, magneettipartikkelit, NaOH ja C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH eli etanoli sekä proteinaasi K. PBS toimi reaktiossa puskuriliuksena, jonka tehtävänä oli lisätä näytteiden tilavuutta vaikuttamatta näytteisiin itsessään. Proteinaasi K toimii nukleaaasin inaktivoijana ja se on tehokas rikkomaan solujen ja tumien membraaniproteiineja saaden sisällä olevan DNA:n vapautumaan ja erottumaan muusta proteiinirakenteesta.

Eristäminen aloitettiin valmistelemalla 12 näytettä laitteiston näytekasettiin, johon mitattiin plasmaa automaattipipetillä 4000 µl eli 4 ml tilavuuteen. Kaikkia näytteitä ei ollut 4 ml, jolloin lopputilavuus korvattiin PBS:llä. Reagenssit ja näytteet asetettiin laitteistoon, joka suoritti eristysohjelman automaattisesti annetun protokollan mukaisesti. Tähän lukeutui muun muassa tieto puhtaan cfDNA:n lopputilavuudesta, eluutiutilavuudesta, joka määritettiin 60 µl eli 0,06 ml.

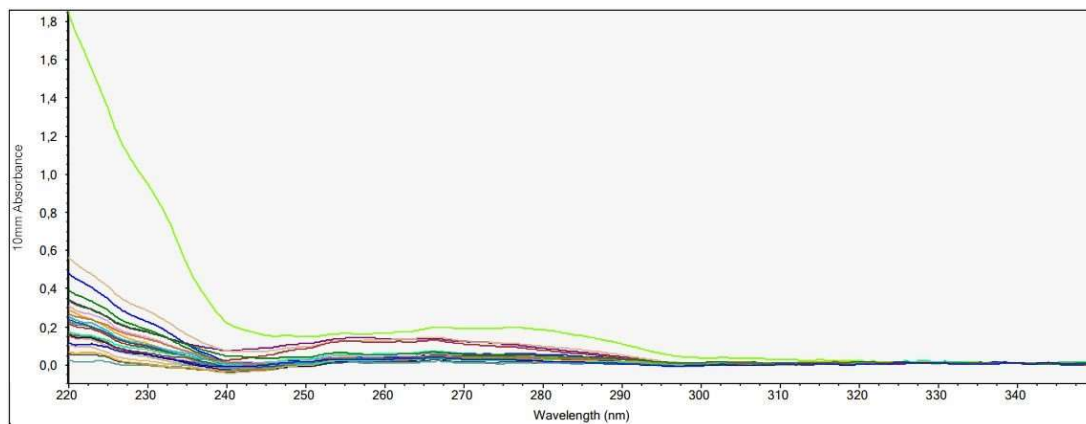
Eluoidusta cfDNA:sta voitiin suorittaa ensimmäiset konsentraatiomittaukset, jotka pääasiassa tehdään fluoresenssispektrofotometriä käyttäen. Fluorometrinä toimi Qubit<sup>®</sup> (Thermo Fischer Scientific), ja mittauskittinä toimi Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen). Qubit-mittausta varten oli valmisteltava standardiliukset ja näytteet valmistajan ohjeiden mukaisella tavalla. Ohjeiden mukaisesti näytettä tarvittiin 1–10 µl, tilavuudeksi valittiin 3 µl.

Ensimmäisenä valmistettiin Master mix, johon tuli diluutiopuskuriliuosta 2786 µl ja fluoresoivaa reagenssia 14 µl, eli yhteensä 2 800 µl. Standardiputket valmistettiin pipetoimalla

putkiin master mixiä 190  $\mu\text{l}$  sekä 10  $\mu\text{l}$  standardi 1 tai 2-reagenssia. Näytteiden mittausputkiin pipetoitiin 197  $\mu\text{l}$  master mixiä ja 3  $\mu\text{l}$  itse cfDNA-näytettä. Sekä standardit, että näytteet valmistettiin valmistajan omiin Qubit<sup>®</sup> Assay-putkiin. Liuosten valmistusten jälkeen näyteputket sekoitettiin vortexoimalla ja annettiin inkuboitua huoneenlämmössä kahden minuutin ajan ennen mittauksen tekemistä.

Mittaus suoritettiin Qubit 4 fluorometriä käyttäen lukemalla ensin molemmat standardit ja sen jälkeen kaikki 12 näytettä peräjälkeen. Itse mittaus kesti muutaman sekunnin ja tulokset vaihtelivat 0,203–7,39 ng/ $\mu\text{l}$  välillä, keskiarvon ollessa 1,104 ng/ $\mu\text{l}$ . Qubit-mittaus tehtiin kahdelle ensimmäiselle näytekokonaisuudelle, kuten myös Uv/Vis-spektrofotometriä hyödyntävä NanoDrop-mittaus.

NanoDrop-mittauksessa cfDNA:n konsentraatio määritetään absorbanssin 260 nm aallonpituudelta, joka on suoraan verrannollinen näytteiden konsentraatioon. Laitteena käytettiin Thermo Scientificin NanoDrop 2000-laitetta, joka kalibroitiin käyttämällä nukleasivapaata vettä ja nukkaamatonta liinaa. Näytetilavuutena käytettiin 1  $\mu\text{l}$  ja konsentraation tulokset vaihtelivat 0,20–7,80 ng/ $\mu\text{l}$  välillä, keskiarvon ollessa 1,90  $\mu\text{l}$ . Kuvassa 3 on esitetty NanoDrop-mittauksen näytteiden absorbanssin arvo suhteessa aallonpituuteen (nm). Liitteestä 1 löytyy tulokset näytekoodien K404-22P-K181-24P Qubit- sekä Nanodrop-mittauksista



Kuva 3. NanoDrop-mittauksen tulokset 10 mm absorbanssin suhteena aallonpituuteen näytekoodeille

Konsentraation tarkistuksen jälkeen voitiin aloittaa cfDNA-kirjaston valmistaminen. Ennen kirjaston aloittamista, näytteet säilyivät jääkaapissa +2°-8°C lämpötilassa muutaman päivän tai pitempään -20°C lämpötilassa pakastimessa.

Varsinaisten geenikirjaston valmistamiseen käytettiin Qiagenin Sairaala Novan molekyylipatologian laboratoriolle kustomoitua Human Actionable Solid Tumor-paneelia ja tuottajan protokollaa automatisoituja laitteita hyödyntäen. Kustomoituun NGS-geenipaneeliin kuuluivat ERBB2-, PIK3CA- ja TP53-geenien koko koodaava alue, BRAF, PDGFRA, ERBB1, KRAS, NRAS ja CD117:n valikoidut eksonit sekä hotspot alueet, joihin kuuluivat AKT1, CTNNB1, ERBB3, ESR1, FOXL2, GNA11, GNAQ, IDH2, MET, RAF1 ja RET. Kirjaston valmistus alkoi DNA-näytteiden fragmentaatiolla, johon sisältyivät myös end- repairing ja A-addition. Fragmentaatiota varten valmistettiin entsyymireaktioseos, joka sisälsi fragmentaatiopuskurin, FERA-liuoksen, FG-liuoksen sekä fragmentaatioentsyymien taulukon 1 mukaisin määrin 1,5 ml mikrosentrifugiputkiin.

Taulukko 1. Fragmentaatioreaktioseos QIAgility laitteelle (2x ektraa).

<b>Näytemäärä (kpl)</b>	<b>Fragmentaatiopuskuri (µl)</b>	<b>FERA-liuos (µl)</b>	<b>FG-liuos (µl)</b>	<b>Fragmentaatioentsyymiseos (µl)</b>	<b>Yhteensä (µl)</b>
8	25	7,5	12,5	50	95

Käsittely tehtiin automatisoidulla QIAgility-pipetointirobotilla, jolloin robotti yhdisti liuoksen (9,5 µl) näytteet (15,5 µl) 96-kuoppalevyllä, jolloin lopputilavuudeksi tulee 25µl. Fragmentaatioreaktion jälkeen 96-kuoppalevy asetettiin Bio-Rad T100 Thermal Cycler PCR-laitteeseen lämpösykliä varten, taulukon 2 mukaisessa ohjelmassa.

Taulukko 2. PCR-laitteen lämpötilasyklit

Lämpötila °C	Inkubaatioaika
4 °C	1 min.
32 °C	14 min.
72 °C	30 min.
4 °C	∞

Fragmentaation jälkeen aloitettiin adapterien ligaatio näytteisiin. QIAgilityyn asetettiin ligaatiopuskuri, DNA-ligaasi, ligaatioliuos sekä nukleasivapaa H<sub>2</sub>O omissa reagenssiputkissaan, joista pipetoitiin fragmentaatiosta tulleeseen 96-kuoppalevyyn taulukon 3 mukaiset määrät.

Taulukko 3. Reaktioseos (adapterien ligaatio)

Reagenssi	Tilavuus (µl/reaktio)
Fragmentoitu DNA	25
Ligaatiopuskuri, 5x	10
DNA ligaasi	5
Ligaatioliuos	7,2
Nukleasivapaa H <sub>2</sub> O	2,3
Tilavuus yhteensä	49,5

Adapterit pipetoitiin itse reaktiotuotteisiin. Jokaiselle näytteelle tuli eri adapteri, jotka kirjattiin ylös myöhempiä vaiheita varten. Jokaista IL-N7##-adapteria pipetoitiin 0,5 µl 96-kuoppalevyille monikanapipetillä, jonka jälkeen reagenssit sekoitettiin keskenään 25 µl- monikanavapipetillä edes takaisin 8 kertaa. Adapteriligaation jälkeen kuoppalevy asetettiin lämpösykliin PCR-laitteeseen (4°C 1 min, 20°C 15 min, 4°C pito, tilavuus 50 µl).

Ligaation jälkeen reaktiotuotteet puhdistettiin ensimmäistä kertaa, käyttäen Eppendorfin Epmotion-pipetointiautomaattia. Puhdistuksessa käytettiin samanlaista magneettipartikkeli-teknologiaa, kuin DNA:n eristyksessä ja puhdistus kesti 1,5 h. Puhdistuksen ensimmäisen vaiheen aikana valmisteltiin Target enrichment PCR-seos, sisältäen TEPCR-puskurin, QIAseq Targeted DNA panel-liuoksen, IL-forward-primerin ja HotStarTaq DNA-polymeraasin taulukon 4 mukaisin määrin. Pesun ollessa lähes loppuillaan, target enrichment PCR-seos lisättiin laitteeseen 1,5 ml mikrosentrifugi-putkessa. EpMotionin pesuohjelman ja PCR-seoksen lisäyksen jälkeen kuoppalevy asetettiin PCR-lämpösykliin taulukon 5 mukaisessa ohjelmassa.

Taulukko 4. Reaktioseos (target enrichment PCR) EpMotion laitteelle

Näytemäärä (kpl)	TEPCR-puskuri (µl)	QIAseq Targeted DNA panel (µl)	IL-forward primeri (µl)	HotStarTaq DNA polymeraasi (µl)	Yhteensä (µl)
8	38	47,5	7,6	7,6	100,7

Taulukko 5. PCR-ohjelma (alukkeiden lkm. <1500/reaktio, kesto noin 2 h). Näytteiden tilavuus 20 µl.

Vaihe	Aika	Lämpötila °C
Denaturaatio	13 min	95
	2 min	98
8 sykliä	15 sek	98
	10 min	68
1 sykli	5 min	72
Jäähdytys	∞, kuitenkin vähintään 5 min.	4

PCR-lämpösyklin jälkeen kuoppalevy asetettiin toiseen pesuun EpMotion-pipetointiautomaatilla. Pesu tapahtui analytiikkatilan laitteistolla ja oli pituudeltaan 35 min. Seuraavaksi valmistettiin universaali PCR-reaktioseos taulukon 6 mukaisesti.

Taulukko 6. Reaktioseos (universal PCR), sisältää 15 % pipetointivaran

Näytemäärä (kpl)	UPCR- puskuri ( $\mu$ l)	HotStarTaq DNA polymeraasi ( $\mu$ l)	Nukleaasivapaa H <sub>2</sub> O	Yhteensä ( $\mu$ l)
8	36,8	9,2	14,7	60,7

UPCR-seos lisättiin toisiin IL-S5##-adaptoreihin, 6,6  $\mu$ l kuoppaa kohden. Valmista indeksiseosta lisättiin pestyyn kirjasto-kuoppalevyyn 6,6  $\mu$ l PCR-tuotetta kohden. Sekoitus tapahtui monikanavapipetillä pipetoimalla edestakaisin 5 kertaa. Adapterit merkittiin ylös myöhempää vaihetta varten. Toisen pään adapterien lisäyksen jälkeen kuoppalevy asetettiin PCR-lämpösykliin taulukon 7 mukaisella ohjelmalla. Sillä tutkimusmateriaalina oli cfDNA, syklien lukumääräksi valittiin 23.

Taulukko 7. PCR-ohjelma uPCR

Vaihe	Aika	Lämpötila °C
Denaturaatio	13 min.	95
	2 min.	98
23 sykliä	15 sek.	98
	2 min.	60
1 sykli	5 min.	72
Jäähdytys	$\infty$ , kuitenkin vähintään 5 min.	4

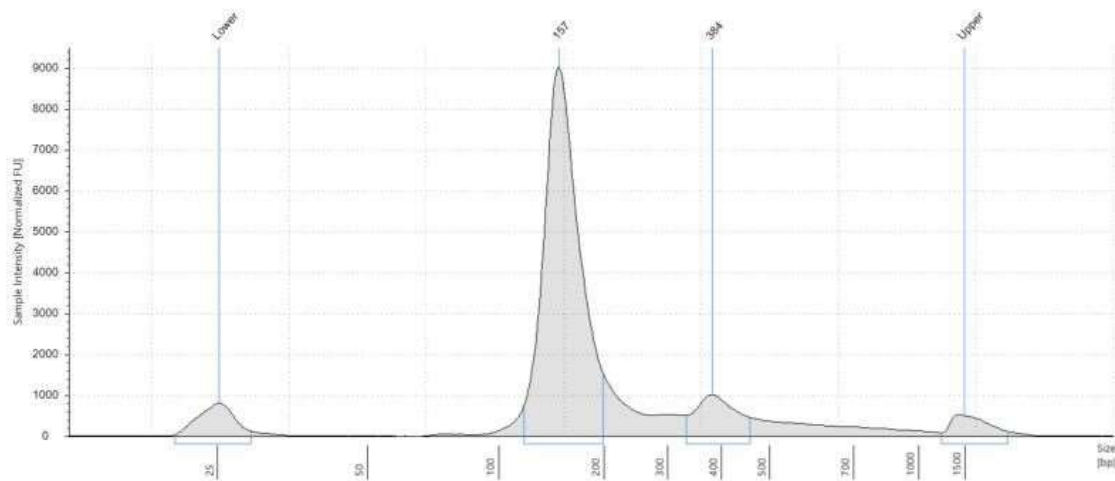
Viimeisen PCR:n jälkeen DNA-tuotteet pestiin vielä kertaalleen EpMotion-pipetointiautomaatilla.

Geenikirjastojen fragmenttikoot ja konsentraatiot määritettiin vertailun vuoksi kahdella eri menetelmällä: Fragment analyzer laitteistolla käyttäen Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis kittiä (Agilent) sekä Agilent 2200 TapeStation-laitteistolla TapeStation High Sensitivity D1000 Screen Tape kittiä.



Geenikirjastojen fragmentit analysoitiin kirjaston valmistumisen jälkeen Agilent 2200 TapeStation-laitteistolla, joka toimii geielektroforeesi-systeeminä. Analyysin tarkoituksena oli selvittää fragmenttien koko ja puhtaus. Suoritus oli lähes täysin automatisoitu, lukuunottamatta reagenssien valmistelua. Reagenssiseos, joka valmistettiin 96-kuoppalevyllä, sisälsi 2 µl näytettä, 2 µl näytepuskuria, yksi kuoppa sisälsi näytteen sijasta 2 µl ladder-molekyylimarkkeria. Komponentit ja valmis kuoppalevy vorteksoitiin ja spinnattiin ennen ja jälkeen valmistuksen. Varsinainen fragmentaatioanalyysi tehtiin Agilentin High Sensitivity D1000 Screen Tape-ajoprotokollaa käyttäen, ja tulokset saatiin TapeStation Analysis Software-ohjelmistoa käyttäen. Liitteessä 1–4 on ohjelmiston antamat tulokset kaikista valmistetuista kirjastoista, ja kuvassa 4 näytteen K404-22P tulokset esimerkkinä. Kuvasta voidaan nähdä, että huomattavin piikki on 157 bp, mikä viittaa suureen määrään mononukleosomaalista DNA-fragmenttia. Sekundaarinen piikki 384 bp viittaa dinukleosomaaliseen järjestäytymiseen, mikä on toinen yleinen esiintymä cfDNA-analyysissa.

**A1: K404-22**



Kuva 4. Näytteen K404-22P TapeStation-analyysi

Fragment analysaattorilla tehdyssä kvantitoinnissa sekoitettiin 2 µl näytettä ja 22 µl Diluent Marker puskuria 96-kuoppalevyllä. Sekoittamisen jälkeen, levy fuugattiin ja ajettiin Fragment Analyzer Automated CE System –analysaattorilla. Reagesseina käytettiin DNF-473-33-SS NGS kittiä, joka on tarkoitettu fragmenttikoon 1–6 000 bp erotteluun.

Fragmentaatioanalyysin jälkeen suoritettiin varsinainen NGS-ajo Illuminan NextSeq500-laitteella Mid-output.sekvensointikittiä käyttäen. Sekvensontia varten kvantitoitujen

geenikirjastojen konsentraatio laimennettiin 1 nanomoolin pitoisuuteen nukleasivapaata vettä käyttäen. Esimerkiksi näytteen K404-22P konsentraatioksi TapeStationilla saatiin 45,9 nM, jolloin näytettä pipetoitiin 2 µl ja nukleasivapaata vettä 100 µl, 5 nM tarkkuudella.

NGS-ajon muu valmistelu tehtiin valmistajan ohjeiden mukaisesti paired-end tekniikalla 150 sykliä kumpaakin sekvensointisuuntaan.

Illuminan NextSeq500-laitteesta tullut raakadata ajettiin sairaalan omalle serverille, jonka jälkeen sille tehtiin demultiplexaus eli näytteiden datan erottelu ja datan muunto fastq-muotoon. Varsinainen fastq-datan bioinformatiivinen analyysi tehtiin Qiagenin omalla CLC Genomics Workbench-tietokoneohjelmalla ja varianttilistan filteröinti sekä tulkinta Eufomaticsin OmnomicsNGS-tietokoneohjelmalla, Sairaala Novan serverillä. Vertailtavat ddPCR-testit oli tehty Bioradin QX200-laitteistoa käyttäen tutkimalla EGFR:n L858R, T790M, L861Q ja 15 erilaista eksonin 19 deleetiota.

## 5.2 Tulokset

DdPCR-analyysi ja sen tulokset oli valmistettu aikaisemmin molekyylipatologian toimesta. NGS- ja ddPCR-testien lisäksi oli joidenkin potilaiden kudoksesta tehty aikaisemmin EGFR-testit ja tulokset esitetty kaikkiaan liitteessä 1 ja 2. Taulukossa 8 on eritelty ne näytteet, joista löytyi mutaatiota NGS- ja/tai ddPCR- testissä.

Tuloksista huomaa, että tekniikoissa on selkeä eroavaisuus herkkyudessa. DdPCR on herkempi havaitsemaan matalan frekvenssin mutaatioita, kuten näytekoodin K16899-23P tuloksista näkee. Siinä ddPCR havaitsee L858R-mutaation 0,16 % frekvenssillä. NGS-testi on negatiivinen, vaikka UMI-syvyys on suhteellisen korkea. Syy siihen, että joitakin EGFR-mutaatioita ei ole havaittu, vaikka mutaatio olisi ddPCR:llä havaittu, voi löytyä UMI-sekvensointisyvyyden mataluudesta. Esimerkiksi näytekoodilla K20768-23P (0,36 & 0,25 %) ja K2104-22P (0,43 & 0,30 %) olevien testien tulokset näyttävät suhteellisen matalaa, mutta usein NGS:llä detektoitavaa mutaatiofrekvenssiä, jonka matala sekvensointisyvyys estää. UMI-sekvensointisyvyyttä ja siten tulosten toistettavuutta ovat voineet heikentää esimerkiksi näytteen epäpuhtaudet, pipetointivirheet kirjaston valmistelussa tai sekvensointivirheet.

Tulosten perusteella NGS:n vahvuutena on kokonaisvaltaisempi mutaatioiden detektio koko EGFR-eksonien alueella. Samassa NGS-testissä näytteestä voidaan lukea useita mutaatiotyyppejä, kuten pistemutaatioita, deleetioita tai duplikaatioita. Esimerkiksi näytekoodilla K11937-23P olevan NGS-testin tulokset kertovat kolmesta eri mutaatioista, p.Glu746\_Ala750del (8 %), p.Glu746\_Ala750del (0,50 %) ja p.Gly598Arg (0,27 %), kun ddPCR kertoo tuloksen vain yläkäsitteen “EGFR ex19del 12,98 %” kautta spesifioimatta tarkkaa kohtaa eksonissa.

Oletettavasti kaikki testatut näytteet ovat ei-pienisoluisia keuhkosityöpää sairastavilta potilailta. Tuloksissa on nähtävillä, että eniten toistuvia mutaatioita ovat eksonin 19 deleetiot, joihin lukeutui Glu746-Ala750-deleetio sekä Leu747-Pro753 seriinin insertiolla. Näistä oli kaikista mutaatioita sisältävistä, 11 näytteestä kuusi näytettä. Seuraavaksi eniten toistuvia mutaatioita olivat eksonin 20 Thr790Met- (3 näytettä) sekä eksonin 21 Leu858Arg-pistemutaatiot (2 näytettä). Myös harvinaisempia mutaatioita, kuten Gly779Asp, Ala289Val ja Gly598Arg esiintyi näytteissä.

Taulukko 8: Tulokset näytteistä, joissa havaittu mutaatio NGS- ja/tai ddPCR-testillä

<b>näytekoodi</b>	<b>Average coverage (UMI)</b>	<b>NGS-tulos (EGFR)</b>	<b>ddPCR-tulos (EGFR)</b>	<b>Muut testit</b>
K404-22P	2506	EGFR ENST00000275493.2:c.2236_2250del p.Glu746_Ala750del 0,41%	EGFR ex19del 0,65%	kudos ollut ex19del+
K12022- 22P	1176	EGFR ENST00000275493.2:c.2240_2257del p.Leu747_Pro753delinsSer 0,17 % (3 sekvenssiä )	ei EGFR mut	(1 kudos ollut EGFR+
K11937- 23P	621	EGFR ENST00000275493.2:c.2235_2249del p.Glu746_Ala750del 8%; EGFR ENST00000275493.2:c.2236_2250del p.Glu746_Ala750del 0,50%; EGFR	EGFR ex19del 12,98%	ei testattu

ENST00000275493.2:c.1792G&gt;C

p.Gly598Arg 0,27%

K16899- 23P	2163	ei EGFR mut	L858R+ 0,16%	Aik. plasma ollut L858R mut +
K427-22P	512	EGFR ENST00000275493.2:c.2336G>A p.Gly779Asp 2%	ei EGFR mut (testi ei kata NGS:llä todettua muutosta)	kudos ollut ex19del+
K2104- 22P	314	ei EGFR mut	0,43% ex19del ja 0,30% p.T790M	kudos ollut Ex19del+
K2957- 22P	257	EGFR ENST00000275493.2:c.866C>T p.Ala289Val 3%	ei EGFR mut (testi ei kata NGS:llä todettua muutosta)	ei testattu
K7403- 23P	2540	EGFR ENST00000275493.2:c.2573T>G p.Leu858Arg 5%	EGFR L858R 5,9%	ei testattu
K20768- 23P	267	ei EGFR mut	0,36% ex19del ja 0,25% p.T790M	kudos ollut EGFR+
K21252- 23P	693	EGFR ENST00000275493.2:c.2253_2276del p.Ser752_Ile759del 5%	ei EGFR mut (testi ei kata NGS:llä todettua muutosta)	kudos ollut EGFR+
K13613- 23P	603	EGFR ENST00000275493.2:c.2235_2249del p.Glu746_Ala750del 8%; EGFR ENST00000275493.2:c.2369C>T	10% ex19del ja 5% p.T790M	kudos ollut Ex19del+

p.Thr790Met 4%; EGFR

ENST00000275493.2:c.2389T>A

p.Cys797Ser 1%

---

### 5.3 Tulosten tarkastelu

Tulokset alleviivasivat merkittäviä eroja tekniikoiden herkkyydessä, kuten edellisessä kappaleessa on esitetty. Suhteellisen pienestä aineistosta huolimatta nämä havainnot ovat linjassa aiempien tutkimustulosten kanssa, joissa on myös raportoitu ddPCR:n suuremmasta herkkyydestä matalille mutaatiofrekvensseille, joskin sen heikkoutena on todettu myös olevan detektiokyky vain etukäteen asetetuille kohteille. Tämä on taas NGS:n selkeä vahvuus, sillä kuten aikaisemmin on mainittu, NGS kykenee identifioimaan näytteistä mitä vain geneettisiä muutoksia koko sekvensointikitin lueteltuilta alueilta.<sup>58,59</sup>

Laitteiston käytettävyyden puolesta ddPCR on nopeampi ja taloudellisesti kannattavampi vaihtoehto, mutta tälläkin hetkellä sairaala Nova kehittää HER2-testiä kopiolutekniikalla, perustuen sekvensointisyvyysiin. Tämä tuo uusia mahdollisuuksia ja tarkkuutta HER2-mutaatioiden tutkimiseen, mikä itsessään edistää yksilöllistettyjen hoitojen mahdollisuutta.

Tulevaisuuden sovelluksissa UMI-sekvensointisyvyyden parantaminen ja tuotantoketjun automatisointi ovat todennäköisiä kehityskohteita. HER2-testin kehityksen lisäksi myös jyväskyläläinen bioteknologiayritys Biopsense on piloitunut oman tutkimuksensa laskimoverinäytteiden cfDNA-erotusmenetelmän täydellisestä automatisoinnista, jota tällä hetkellä sairaala Novassa tutkitaan Keski-Suomen Biopankin, Lääkärikeskus Mehiläisen ja Syöpäsairaala Docratesin yhteistyössä.

## 6 Yhteenveto

Tämän kandidaatintutkielman tarkoituksena oli tarkastella ajankohtaisimpia molekyyliprofiloinnin menetelmiä. Laboratorioprojektin tarkoituksena oli vertailla ddPCR:tä ja NGS:tä saatuja tuloksia ja laitteistojen herkkyyttä keskenään. Tulokset osoittivat, että NGS-testin vahvuutena on monipuolisempi mutaatioiden detektio, mutta se on vähemmän herkkä kuin ddPCR-testi. Päätelmänä voitiin tehdä NGS:n osalta, että UMI-sekvensointisyvyyden validointi on erittäin tärkeä osa NGS-testin käytettävyyttä diagnostiikassa ja siten myös osana molekyyliprofilointia. Eri mutaatiotyypit vaikuttavat eri lääkkeitöiden toiminnallisuuteen ja lääkehoidon oikeaan valintaan, ja mutaatioiden oikeanlainen tunnistaminen on yksilöllisen lääketieteen kulmakivi.

Laboratoriojakso alkoi 18.3. ja päättyi 12.4. Tutkimusprojekti myös itsessään toimi korvaamattomana oppimiskokemuksena, sillä opin käyttämään uudenlaista laitteistoa, automaattipipettejä sekä kliinisen laboratorioympäristön käytänteistä. Käytännön kokemus vahvisti teoreettista tietoa ja tarjosi käytännön perustan tulevalle.

## Viitteet

1. Rinta, [https://syoparekisteri.fi/assets/themes/ssy3/factsheets/syopien-tietolaatikot/24fi\\_Rinta.html](https://syoparekisteri.fi/assets/themes/ssy3/factsheets/syopien-tietolaatikot/24fi_Rinta.html) (27.2.2024).
2. Keuhkot, henkitorvi, [https://syoparekisteri.fi/assets/themes/ssy3/factsheets/syopien-tietolaatikot/22fi\\_Keuhkot.html#sy%C3%B6p%C3%A4tilastot](https://syoparekisteri.fi/assets/themes/ssy3/factsheets/syopien-tietolaatikot/22fi_Keuhkot.html#sy%C3%B6p%C3%A4tilastot) (27.2.2024).
3. Akhila, G.; Nagashree, A. G.; Spandana, K. A.; Kumar, S. H.; Harshith, H. S.; Vardh, R. V . and Shailesh, T., An Overview of a Biomarker in Breast Cancer, *Int J Pharm Investigation.*, **2023**, *13*, 721–734.
4. Califf, R. M., Biomarker definitions and their applications, *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, *243*, 213–221.
5. Ziv, E.; Durack, J. C. and Solomon, S. B., The Importance of Biopsy in the Era of Molecular Medicine, *Cancer J*, 2016, *22*, 418–422.
6. Cheng, X., A Comprehensive Review of HER2 in Cancer Biology and Therapeutics, *Genes (Basel)*, 2024, *15*, 903.
7. Subramaniyan, V.; Fuloria, S.; Gupta, G.; Kumar, D. H.; Sekar, M.; Sathasivam, K. V.; Sudhakar, K.; Alharbi, K. S.; Al-Malki, W. H.; Afzal, O.; Kazmi, I.; Al-Abbasi, F. A.; Altamimi, A. S. A. ja Fuloria, N. K., A review on epidermal growth factor receptor's role in breast and non-small cell lung cancer, *Chemico-Biological Interactions*, **2022**, *351*, 109735.
8. Oncogene, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Oncogene> (5.11.2024).
9. Dang, D. T., Molecular Approaches to Protein Dimerization: Opportunities for Supramolecular Chemistry, *Frontiers in Chemistry*, 2022, *10*, 829312.
10. Keuhkosyövän molekyylipatologinen diagnostiikka edellyttää perustietoja myös klinikoilta, <https://www.duodecimlehti.fi/duo13030> (5.11.2024).
11. Bai, Y.; Liu, X.; Zheng, L.; Wang, S.; Zhang, J.; Xiong, S.; Zhang, P.; Jiao, Z.; Zhao, G.; Zhou, C.; Pang, J.; Xu, Y.; Ou, Q.; Mao, Y. ja Zhang, L., Comprehensive profiling of EGFR mutation subtypes reveals genomic-clinical associations in non-small-cell lung cancer patients on first-generation EGFR inhibitors, *Neoplasia*, 2023, *38*, 100888.
12. Edenneen ei-pienisoluisen keuhkosyövän lääkehoito: molekyyliogenetiikka, täsmälääkkeet ja immuno-onkologia tiennäyttäjinä, <https://www.duodecimlehti.fi/duo16497> (25.11.2024).

13. Verenkierron solunulkoiset DNA syövän merkkiaineena, <https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2015/5/duo12134?keyword=nestebiopsia> (15.3.2024).
14. Ex vivo -mallit ja nestebiopsia yksilöllistetyssä syövänhoidossa, <https://www.duodecimlehti.fi/lehti/2021/13/duo16314> (31.3.2024).
15. Michela, B., Liquid Biopsy: A Family of Possible Diagnostic Tools, *Diagnostics (Basel)*, **2021**, *11*, 1391.
16. Jahr, S.; Hentze, H.; Englisch, S.; Hardt, D.; Fackelmayer, F. O.; Hesch, R.-D. ja Knippers, R., DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells<sup>1</sup>, *Cancer Research*, 2001, *61*, 1659–1665.
17. Cisneros-Villanueva, M.; Hidalgo-Pérez, L.; Rios-Romero, M.; Cedro-Tanda, A.; Ruiz-Villavicencio, C. A.; Page, K.; Hastings, R.; Fernandez-Garcia, D.; Allsopp, R.; Fonseca-Montaño, M. A.; Jimenez-Morales, S.; Padilla-Palma, V.; Shaw, J. A. ja Hidalgo-Miranda, A., Cell-free DNA analysis in current cancer clinical trials: a review, *Br J Cancer*, **2022**, *126*, 391–400.2.
18. Kustanovich, A.; Schwartz, R.; Peretz, T. ja Grinshpun, A., Life and death of circulating cell-free DNA, *Cancer Biology & Therapy*, 2019, *20*, 1057.
19. Nikanjam, M.; Kato, S. ja Kurzrock, R., Liquid biopsy: current technology and clinical applications, *J. Hematol. Oncol.*, 2022, *15*, 131.
20. Stemmer, C.; Beau-Faller, M.; Pencreac'h, E.; Guerin, E.; Schneider, A.; Jaqmin, D.; Quoix, E.; Gaub, M.-P. and Oudet, P., Use of Magnetic Beads for Plasma Cell-free DNA Extraction: Toward Automation of Plasma DNA Analysis for Molecular Diagnostics, *Clinical Chemistry*, **2003**, *49*, 1953–1955.
21. Chen, Y.; Liu, Y.; Shi, Y.; Ping, J.; Wu, J. and Chen, H., Magnetic particles for integrated nucleic acid purification, amplification and detection without pipetting, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2020, *127*, 115912.
22. Aittomäki, K.; Moilanen, J.; Perola, M. ja Aarnisalo, A. A., Toim., *Lääketieteellinen genetiikka*, 1. painos, Duodecim, Helsinki, 2016.
23. Hybridization, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/hybridization> (5.11.2024).
24. Brown, T. A., *Gene Cloning and DNA Analysis: An Introduction*, 8. painos, Wiley-Blackwell, 2020.



25. Head, S. R.; Komori, H. K.; LaMere, S. A.; Whisenant, T.; Nieuwerburgh, F. V.; Salomon, D. R. ja Ordoukhanian, P., Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges, *BioTechniques*, **2014**, *56*, 61.
26. Head, S. R.; Komori, H. K.; LaMere, S. A.; Whisenant, T.; Nieuwerburgh, F. V.; Salomon, D. R. ja Ordoukhanian, P., Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges, *BioTechniques*, **2014**, *56*, 61.
27. Droplet Digital PCR Applications Guide, [https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_6407.pdf](https://www.bio-rad.com/sites/default/files/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf) (6.10.2024).
28. Hu, T.; Chitnis, N.; Monos, D. ja Dinh, A., Next-generation sequencing technologies: An overview, *Human Immunology*, 2021, *82*, 801–811.
29. gd-admin, Illumina pre-made libraries, <https://bmkgene.com:443/dnarna-sequencing-illumina-sequencer-product/> (11.12.2024).
30. An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology, [https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina\\_sequencing\\_introduction.pdf](https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf). (6.11.2024)
31. Molekyylipatologia osana syöpäpotilaan hoitoa, <https://www.duodecimlehti.fi/duo16298> (22.11.2024).
32. Suominen, I. and Ollikka, P., *Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet*, 2. p., Opetushallitus, Helsinki, **1997**.
33. Clark Brelje, T.; Wessendorf, M. W. and Sorenson, R. L., Chapter 5 - Multicolor Laser Scanning Confocal Immunofluorescence Microscopy: Practical Application and Limitations. In: Matsumoto, B. (ed.), *Methods in Cell Biology*, Academic Press, 2002, vol. 70, pp. 165–249e.
34. Sjöback, R.; Nygren, J. and Kubista, M., Absorption and fluorescence properties of fluorescein, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 1995, *51*, L7–L21.
35. Duraiyan, J.; Govindarajan, R.; Kaliyappan, K. and Palanisamy, M., Applications of immunohistochemistry, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2012, *4*, S307.
36. Immunohistokemialliset monivärjäykset kudostutkimuksessa: diagnostiikan arkipäivää ja tulevaisuutta, <https://www.duodecimlehti.fi/duo17623> (22.11.2024).
37. Detection Methods | Bio-Rad, <https://www.bio-rad.com/en-fi/applications-technologies/detection-methods?ID=LUSO6KKG4> (22.11.2024).

38. Sun, Y.; Cheng, Z. and Liu, S., MCM2 in human cancer: functions, mechanisms, and clinical significance, *Mol Med*, 2022, 28, 128.
39. Bochman, M. L. and Schwacha, A., The Mcm Complex: Unwinding the Mechanism of a Replicative Helicase, *Microbiol Mol Biol Rev*, 2009, 73, 652–683.
40. Blow, J. J. and Dutta, A., Preventing re-replication of chromosomal DNA, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6, 476–486.
41. Sakai, H.; Kimura, H.; Otsubo, K.; Miyazawa, T.; Marushima, H.; Kojima, K.; Chosokabe, M.; Furuya, N.; Koike, J.; Fujii, K.; Nishimura, T.; Nakamura, H. and Saji, H., Minichromosome maintenance 2 is an independent predictor of survival in patients with lung adenocarcinoma, *Mol Clin Oncol*, 2022, 16, 22.
42. Cheng, L.; Tan, Z.; Huang, Z.; Pan, Y.; Zhang, W. and Wang, J., Expression Profile and Prognostic Values of Mini-Chromosome Maintenance Families (MCMs) in Breast Cancer, *Med Sci Monit*, 2020, 26, e923673-1-e923673-15.
43. Ki-67 as a Prognostic Biomarker in Invasive Breast Cancer - PMC, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ezproxy.jyu.fi/pmc/articles/PMC8430879/> (13.10.2024).
44. Li, L. T.; Jiang, G.; Chen, Q. and Zheng, J. N., Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (Review), *Molecular Medicine Reports*, 2015, 11, 1566–1572.
45. Wen, S.; Zhou, W.; Li, C.; Hu, J.; Hu, X.; Chen, P.; Shao, G. and Guo, W., Ki-67 as a prognostic marker in early-stage non-small cell lung cancer in Asian patients: a meta-analysis of published studies involving 32 studies, *BMC Cancer*, 2015, 15, 520.
46. Bukholm, I. R. K.; Bukholm, G. and Nesland, J. M., Over-expression of cyclin a is highly associated with early relapse and reduced survival in patients with primary breast carcinomas, *International Journal of Cancer*, 2001, 93, 283–287.
47. Jeffrey, P. D.; Russo, A. A.; Polyak, K.; Gibbs, E. and al, et, Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2 complex, *Nature*, 1995, 376, 313–20.
48. Volm, M.; Koomägi, R.; Mattern, J. and Stammers, G., Cyclin A is associated with an unfavourable outcome in patients with non-small-cell lung carcinomas, *Br J Cancer*, 1997, 75, 1774–1778.
49. Ishimi, Y.; Komamura-Kohno, Y.; You, Z.; Omori, A. ja Kitagawa, M., Inhibition of Mcm4,6,7 Helicase Activity by Phosphorylation with Cyclin A/Cdk2\*, *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275, 16235–16241.
50. Tökés, T.; Tökés, A.-M.; Szentmártoni, G.; Kiszner, G.; Mühl, D.; Molnár, B. Á.; Kulka, J.; Krenács, T. ja Dank, M., Prognostic and Clinicopathological Correlations of Cell Cycle

- Marker Expressions before and after the Primary Systemic Therapy of Breast Cancer, *Pathol Oncol Res*, 2020, 26, 1499–1510.
51. Rossetto, D.; Avvakumov, N. ja Côté, J., Histone phosphorylation: A chromatin modification involved in diverse nuclear events, *Epigenetics*, 2012, 7, 1098–1108.
  52. Prigent, C. ja Dimitrov, S., Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?, *Journal of Cell Science*, 2003, 116, 3677–3685.
  53. Sawicka, A.; Hartl, D.; Goiser, M.; Pusch, O.; Stocsits, R. R.; Tamir, I. M.; Mechtler, K. ja Seiser, C., H3S28 phosphorylation is a hallmark of the transcriptional response to cellular stress, *Genome Res.*, 2014, 24, 1808–1820.
  54. Kim, J.-Y.; Jeong, H. S.; Chung, T.; Kim, M.; Lee, J. H.; Jung, W. H. ja Koo, J. S., The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki67, *Oncotarget*, 2017, 8, 65064.
  55. van Steenhoven, J. E. C.; Kuijter, A.; Kornegoor, R.; van Leeuwen, G.; van Gorp, J.; van Dalen, T. ja van Diest, P. J., Assessment of tumour proliferation by use of the mitotic activity index, and Ki67 and phosphohistone H3 expression, in early-stage luminal breast cancer, *Histopathology*, 2020, 77, 579–587.
  56. Imamoglu, E. H. ja Duzcu, S. E., The prognostic importance of PD-L1, PTEN, PHH3, and KI-67 expressions in invasive breast carcinoma, *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 2022, 68, 1638–1644.
  57. Sun, A.; Zhou, W.; Lunceford, J.; Strack, P.; Dauffenbach, L. M. ja Kerfoot, C. A., Level of phosphohistone H3 among various types of human cancers, *BMJ Open*, 2012, 2, e001071.
  58. Ding, P. N.; Becker, T.; Bray, V.; Chua, W.; Ma, Y.; Xu, B.; Lynch, D.; de Souza, P. and Roberts, T., Plasma next generation sequencing and droplet digital PCR-based detection of epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in patients with advanced lung cancer treated with subsequent-line osimertinib, *Thoracic Cancer*, 2019, 10, 1879–1884.
  59. Guibert, N.; Hu, Y.; Feeney, N.; Kuang, Y.; Plagnol, V.; Jones, G.; Howarth, K.; Beeler, J. F.; Paweletz, C. P. and Oxnard, G. R., Amplicon-based next-generation sequencing of plasma cell-free DNA for detection of driver and resistance mutations in advanced non-small cell lung cancer, *Annals of Oncology*, 2018, 29, 1049–1055.

**Liitteet**

Liite 1: Qubit- & NanoDrop tulokset K404-22P-K181-24P

Liite 2: TapeStation tulokset K404-22P-16899-23P

Liite 3: TapeStation tulokset K427-22P-K5032-22P

Liite 4: TapeStation tulokset K7403-23P-K181-24P

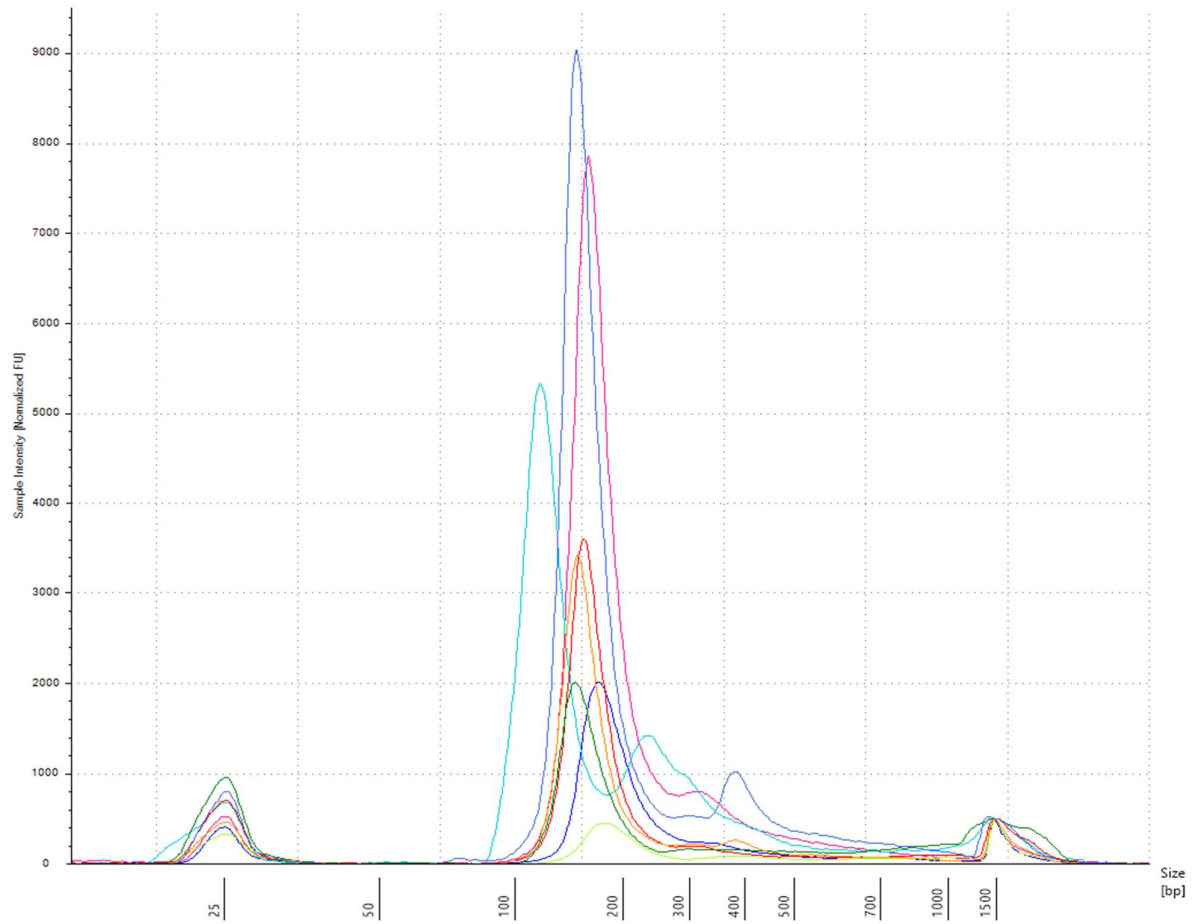
Liite 5: TapeStation tulokset K8001-23P-K5597-24P

Liite 6: NGS & ddPCR tulokset K404-22P – K181-24P

Liite 7: NGS & ddPCR tulokset K8001-23P – K16026-22P

## LIITE 1

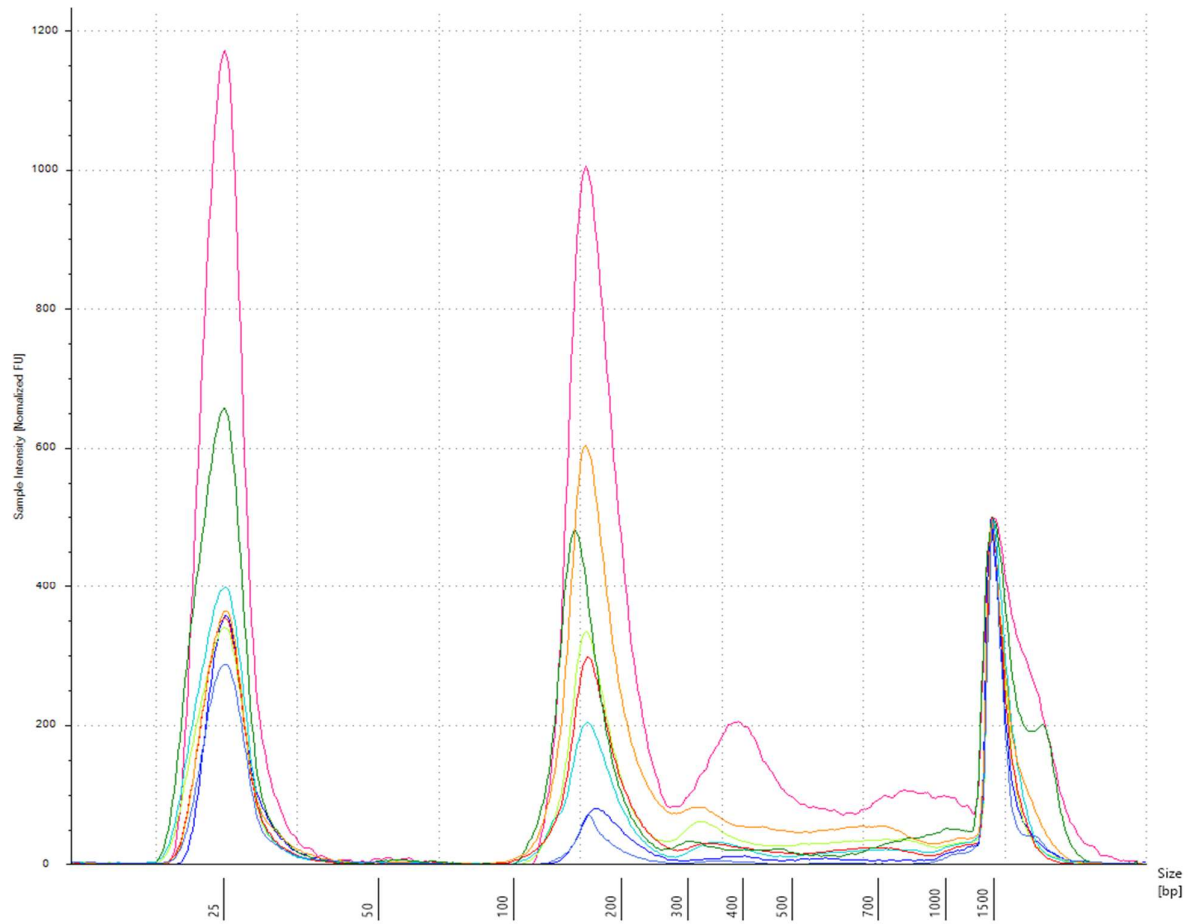
Näytekoodi	konsentraatio, Qubit (ng/μl)	konsentraatio, Nanodrop (ng/μl)
K404-22	4,61	6,5
K2962-22	1,88	2,3
K6929-22	1,59	2,1
K12022-22	3,73	5,5
K16026-22	4,38	6
K11937-23	1,41	
K14463-23	7,39	
K16899-23	4,60	
K427-22	0,26	-0,1
K1512-22	0,69	0,7
K2003-22	0,38	0,9
K2104-22	0,46	1,4
K2672-22	0,20	1,1
K2676-22	0,62	1,1
K2957-22	0,81	2,3
K5032-22	0,36	0,2
K7403-23	3,36	
K10422-23	0,40	
K12943-23	1,23	
K14884-23	0,30	
K16584-23	0,40	
K20768-23	0,85	
K21252-23	0,90	
K181-24	1,52	



4 [File 1] 2024-04-05-02 cDNA kirjastonaytteet.HSD1000

- A1 K404-22
- B1 K2962-22
- C1 K6929-22
- D1 K12022-22
- E1 K16026-22
- F1 K11937-23
- G1 K14463-23
- H1 K16899-23

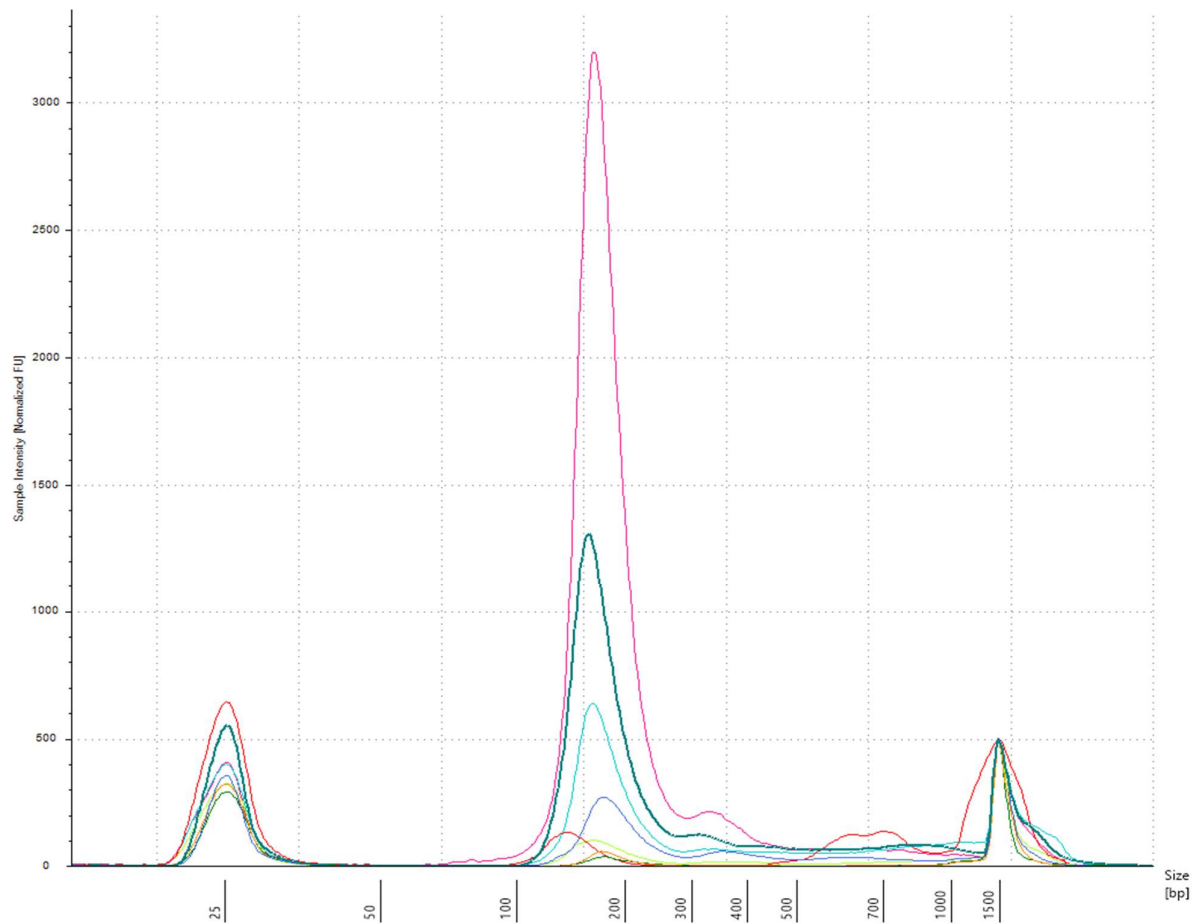
## LIITE 3



4 [File 1] 2024-04-05-02 cDNA kirjastonaytteet.HSD1000

- A2 K427-22
- B2 K1512-22
- C2 K2003-22
- D2 K2104-22
- E2 K2672-22
- F2 K26726-22
- G2 K2957-22
- H2 K5032-22

## LIITE 4

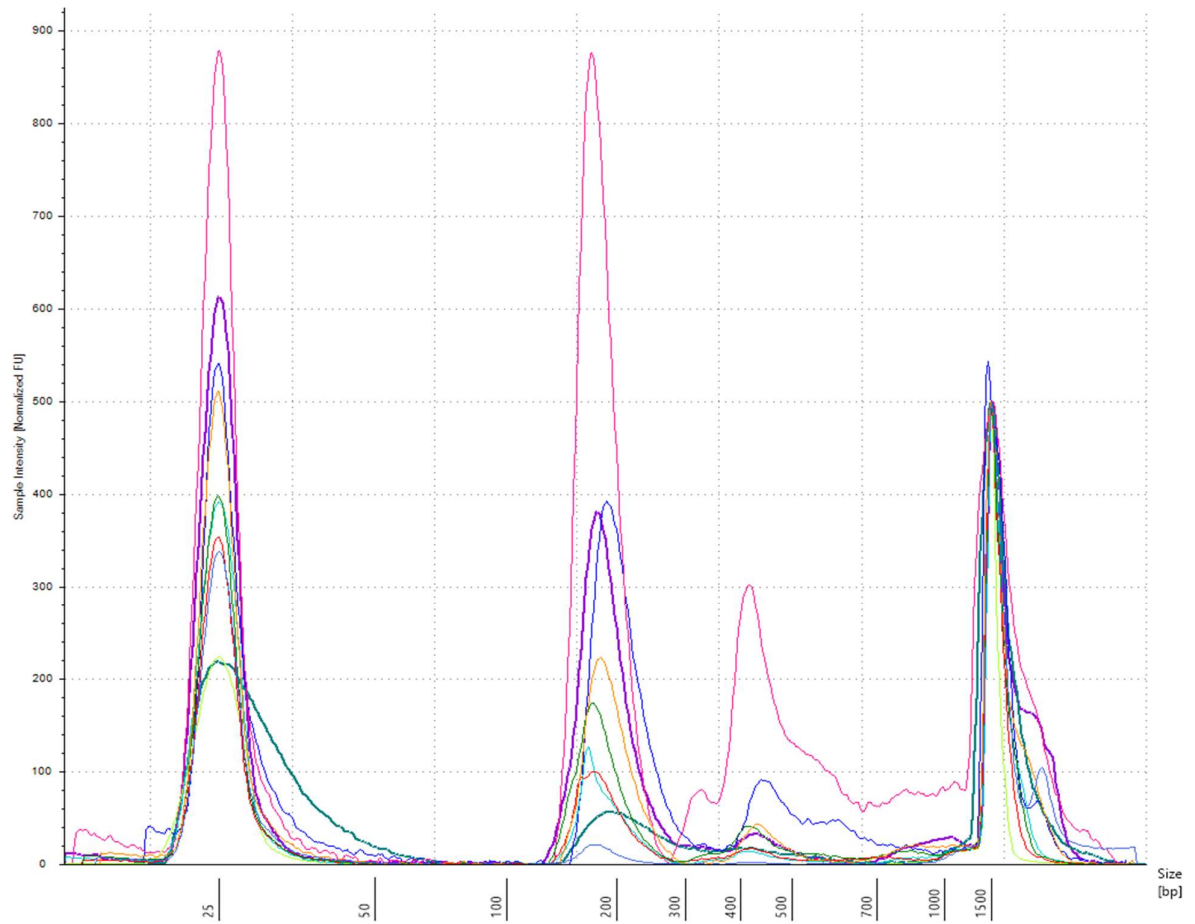


4 [File 1] 2024-04-05-02 cDNA kirjastonaytteet.HSD1000

- A3 K7403-23
- B3 K10422-23
- C3 K12943-23
- D3 K14884-23
- E3 K16584-23
- F3 K20768-23
- G3 K21252-23
- H3 K181-24



## LIITE 5



4 [File 1] 2024-04-05-01 cfDNA.HSD1000

- A1 ■ K8001-23
- B1 ■ K12943-23
- C1 ■ K13613-23
- D1 ■ K18710-23
- E1 ■ K18794-23
- F1 ■ K20768-23
- G1 ■ K21662-23
- H1 ■ K924-24
- A2 ■ K4658-24
- B2 ■ K5597-24

## LIITE 6

näytekoodi	Average coverage (UMI)	NGS tulos (EGFR)	ddPCR tulos	muut testit
K404-22P	2506	EGFR ENST00000275493.2:c.2236_2250del p.Glu746_Ala750del 0,41%	EGFR ex19del 0,65%	kudos ollut ex19del+
K2962-22P	1603	ei EGFR mut	ei EGFR mut	kudos ollut ex19del+
K6929-22P	1035	ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu
K12022-22P	1176	EGFR ENST00000275493.2:c.2240_2257del p.Leu747_Pro753delinsSer 0,17% (3 readia)	ei EGFR mut (1 tp fropletti e19 del reaktiossa)	kudos ollut EGFR+
K16026-22P	ei dataa			
		EGFR ENST00000275493.2:c.2235_2249del p.Glu746_Ala750del 8%; EGFR ENST00000275493.2:c.2236_2250del p.Glu746_Ala750del 0,50%; EGFR		
K11937-23P	621	ENST00000275493.2:c.1792G>C p.Gly598Arg 0,27%	EGFR ex19del 12,98%	ei testattu
K14463-23P	2477	ei EGFR mut	ei EGFR mut	kudos ollut EGFR+
K16899-23P	2163	ei EGFR mut	L858R+ 0,16%	aik plasma ollut L858R mut +
K427-22P	512	EGFR ENST00000275493.2:c.2336G>A p.Gly779Asp 2%	ei EGFR mut (testi ei kata NGS:llä todettua muutosta)	kudos ollut ex19del+
K1512-22P	298	ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu
K2003-22P	162	ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu
K2104-22P	314	ei EGFR mut	0,43% ex19del ja 0,30% p.T790M	kudos ollut Ex19del+
K2672-22P	236	ei EGFR mut	ei EGFR mut	kudos ollut EGFR+
K2676-22P	217	ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu
K2957-22P	257	EGFR ENST00000275493.2:c.866C>T p.Ala289Val 3%	ei EGFR mut (testi ei kata NGS:llä todettua muutosta)	ei testattu
K5032-22P	346	ei EGFR mut	ei EGFR mut	kudoksessa ei EGFR mut (NGS testi K4632-24)
K7403-23P	2540	EGFR ENST00000275493.2:c.2573T>G p.Leu858Arg 5%	EGFR L858R 5,9%	ei testattu
K10422-23P	504	ei EGFR mut	ei EGFR mut	kudos ollut EGFR+
K12943-23P	806	ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu
K14884-23P	643	ei EGFR mut	ei EGFR mut	kudos ollut EGFR+
K16584-23P	190	ei EGFR mut	ei EGFR mut	kudos ollut EGFR+
K20768-23P	267	ei EGFR mut	0,36% ex19del ja 0,25% p.T790M	kudos ollut EGFR+
K21252-23P	693	EGFR ENST00000275493.2:c.2253_2276del p.Ser752_Ile759del 5%	ei EGFR mut (testi ei kata NGS:llä todettua muutosta)	kudos ollut EGFR+
K181-24P	1682	ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu

## LIITE 7

K8001-23	230 ei EGFR mut EGFR ENST00000275493.2:c.2235_2249del p.Glu746_Ala750del 8%; EGFR ENST00000275493.2:c.2369C>T p.Thr790Met 4%; EGFR ENST00000275493.2:c.2389T>A	ei EGFR mut	ei testattu
K13613-23	603 p.Cys797Ser 1%	<b>10% ex19del (multiplex) ja 5% p.T790M</b>	kudos ollut Ex19del+
K18710-23	715 ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu
K18794-23	255 ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei EGFR mut kudoksessa (niukka näyte)
K21662-23	910 ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu
K924-24	606 ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu
K4658-24	1254 ei EGFR mut	ei EGFR mut	ei testattu
K5597-24	1274 ei EGFR mut	Ei EGFR mut	ei testattu
K16026-22P	868 ei EGFR mut	Ei EGFR mut	ei testattu