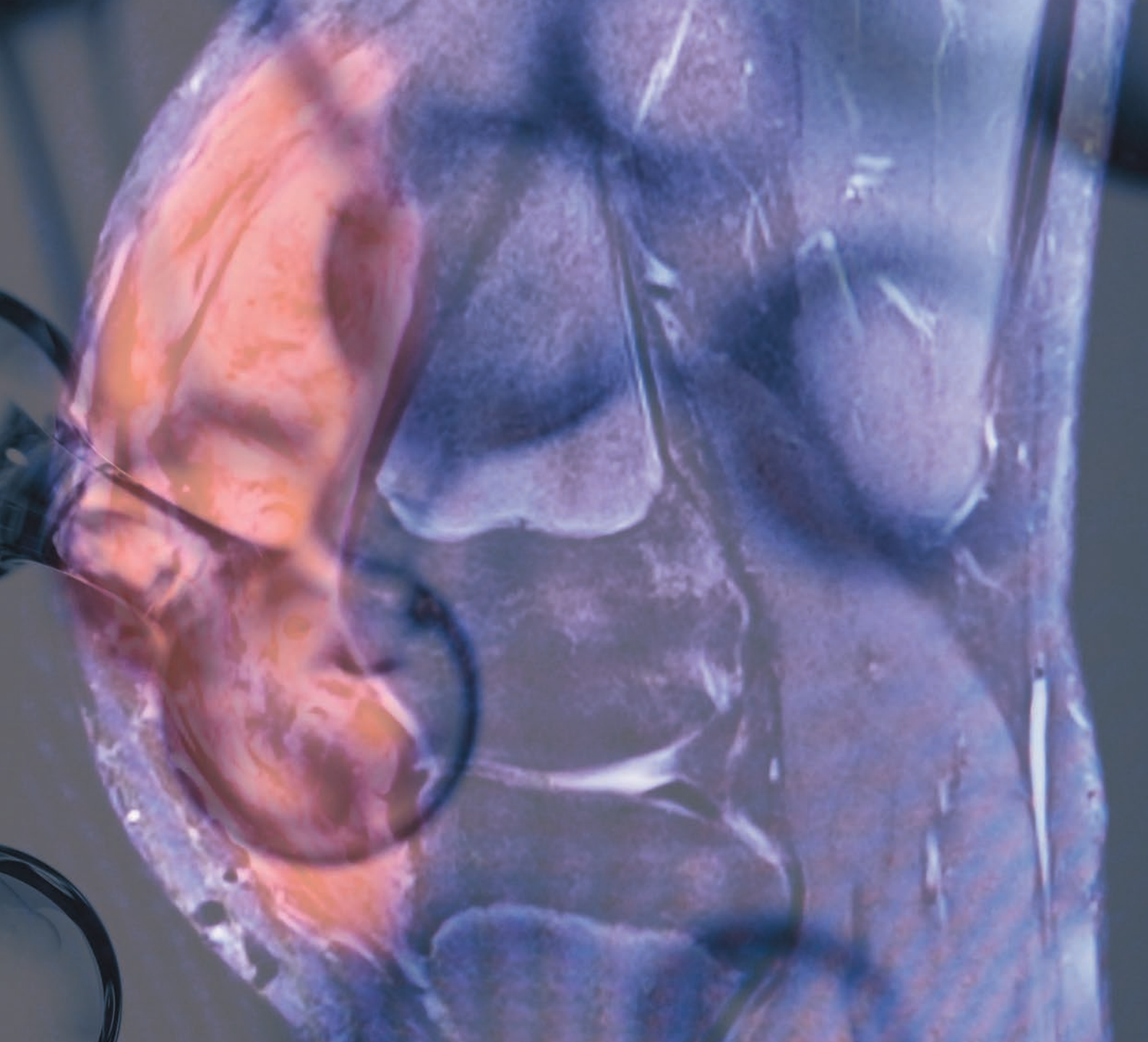


# MOLEKYLÄRA ANALYSER inom sarkomdiagnostik

De molekylära analysmetoderna är ett värdefullt tillskott till den histopatologiska diagnostiken. Nedan redogör **Charles Walther**, disputerad vid Institutionen för laboratoriemedicin, Lunds universitet och specialistläkare i klinisk cytologi och patologi vid Labmedicin Skåne, för de olika metoderna.



**G**odartade mjukdelatumörer som till exempel lipom och uterusmyom är vanliga och utgör sällan ett diagnostiskt problem ur histologisk synvinkel. Uterusmyom har till exempel noterats hos över 75 procent av fertila kvinnor<sup>1</sup>, vilket illustrerar hur vanliga de är.

De maligna tumörerna, sarkom, är däremot ovanliga och utgör endast en procent av alla maligna tumörer. Till skillnad från de godartade tumörerna är sarkomen ofta diagnostiskt utmanande såväl kliniskt som histologiskt. De är ovanliga, morfologiskt likartade och uppvisar ett brett och varierande biologiskt beteende. Ett tecken på denna he-

***”De maligna tumörerna, sarkom, är ovanliga och utgör endast en procent av alla maligna tumörer.”***

terogenitet är att det i den senaste WHO klassificeringen finns över 100 subtyper av dessa tumörer<sup>2</sup>.

Morfologisk bedömning tillsammans med immunhistokemisk utvärdering utgör grunden för den histopatologiska diagnostiken och räcker i många fall för att fastställa diagnosen. Dock har molekylärpatologiska och genetiska analysmetoder såsom cytogenetik, fluorescens in-situ hybridisering (FISH), singel nukleotid polymorfism (SNP) array, polymeras kedjereaktion (PCR) och sekvensering (Next Generation Sequencing-NGS) blivit alltmer värdefulla ur diagnostisk synvinkel (Tabell 1). Den genetiska informationen rörande dessa tu-

TABELL 1. EXEMPEL PÅ SARKOM OCH DERAS MOLEKYLÄRA PROFIL SAMT HUR DEN KAN DIAGNOSTISERAS MOLEKYLÄRT

Diagnos	Kromosom-lokalisation	Gener 5'-3'	Cellulär effekt av mutationen	Klinisk användbarhet	Molekylär/Genetisk metod för detektion*
<b>Ewing/PNET</b>	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q12;q12) t(2;22)(q33;q12) t(16;21)(p11;q22) t(2;16) inv (22)	EWSR1-FLI1 EWSR1-ERG EWSR1-ETV1 EWSR1-ETV4 EWSR1-FEV FUS- ERG FUS-FEV EWSR1-ZSG	Överuttryck av onkgener	Diagnostisk	Cytogenetik FISH RT-PCR NGS
<b>Myxoitt liposarkom</b>	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	FUS-DDIT3 EWSR1-DDIT3	Aktiverar transkription	Diagnostisk Potentiellt behandlingsprediktiv	FISH RT-PCR NGS
<b>Synovialt sarkom</b>	t(X;18)(p11;q11) t(X;18)(p11;q11) t(X;18)(p11;q13) t(X;20)(p11;q13)	SS18-SSX1 SS18-SSX2 SS18-SSX4 SS18L1-SSX1	Stört genuttryck	Diagnostiskt Prognos (SS18-SSX2=bättre prognos)	FISH RT-PCR NGS
<b>GIST (Gastrointestinal stromacellstumör)</b>	Punktmutation 4q12	KIT eller PGDFRA	Aktiverar tyrosinkinaser	Diagnos Behandling (Imatinib)	PCR NGS

\* FISH= Fluorescerande In-Situ Hybridisering, RT-PCR= Reverse Transcriptase polymeras kedjereaktion, NGS= Next Generation Sequencing, sekvensering

mörtyper ökar snabbt och kan användas för att bekräfta eller avfärda en specifik diagnos, men kan även ha betydelse för prognosen hos alveolära rhabdomyosarkom och för behandlingen avseende gastrointestinala stromacellstumörer (GIST)<sup>3,4</sup>.

Då ben- och mjukdelstumörer är svårvärderade och konsekvenserna av en felaktig diagnos kan vara stora för patienten är de molekylära analysmetoderna ett värdefullt tillskott till den diagnostiska arsenalen. Avsikten är att här i korthet beskriva metoderna, vilken typ av tumörmaterial som kan användas och hur resultaten tolkas.

**CYTOGENETISK ANALYS - EN MIKROSKOPISK KROMOSOMANALYS**

Cytogenetisk analys är en metod för att visualisera cellernas kromosomer. Färska tumörceller tas via biopsiering eller kirurgisk resektion och odlas. Cellerna stimuleras till celdelning och skördas när kromosomerna är kondenserade under mitosens metafase. De färgas vilket resulterar i mörka och ljusa band som bildar ett specifikt mönster för respektive kromosom. Därmed kan kromosomernas antal och eventuella strukturella förändringar inklusive förluster, ökning och förflyttningar av genetiskt material bedömas (Bild 1).

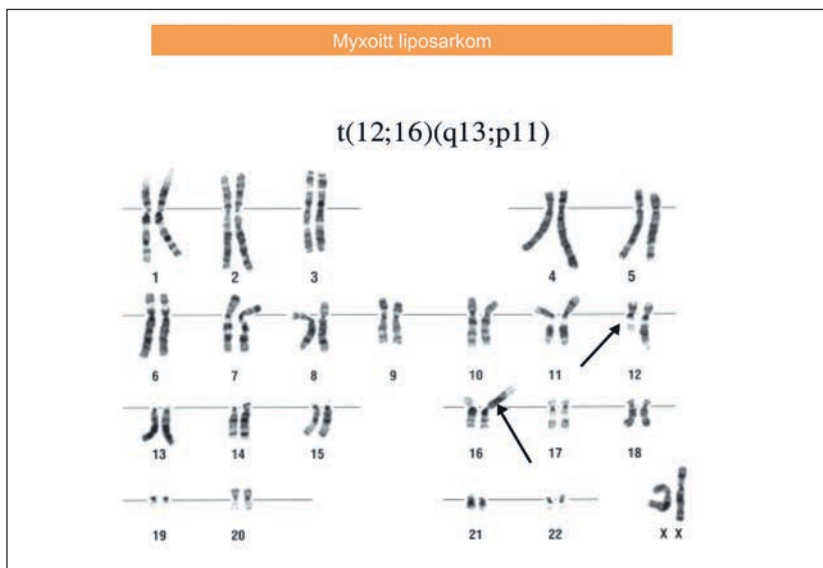


Bild 1. Karyotyp från ett myxoitt liposarkom med en translokation associerad med denna diagnos t(12;16)(q13;p11)

Metoden ger en översiktsbild över tumörcellernas kromosomuppsättning vilket kan ge vägledning om malign potential och diagnos men även bekräfta behov av och rikta vidare molekylär undersökning. Metoden bygger på mikroskopisk undersökning och det innebär att förändringar under fem miljoner baspar inte säkert uppträcks. Metodens begränsningar är att den kräver färskt tu-

mörmaterial, cellodling och arbetsintensiv analys<sup>5</sup>.

**FLUORESCENS IN-SITU HYBRIDISERING (FISH) - EN MIKROSKOPISK FLUORESCENSANALYS**

FISH är en beprövad och väl använd metod där fluorescensmärkta prober binder till komplementära nukleotidsekvenser hos en tumörcell. Det finns tre olika ty-

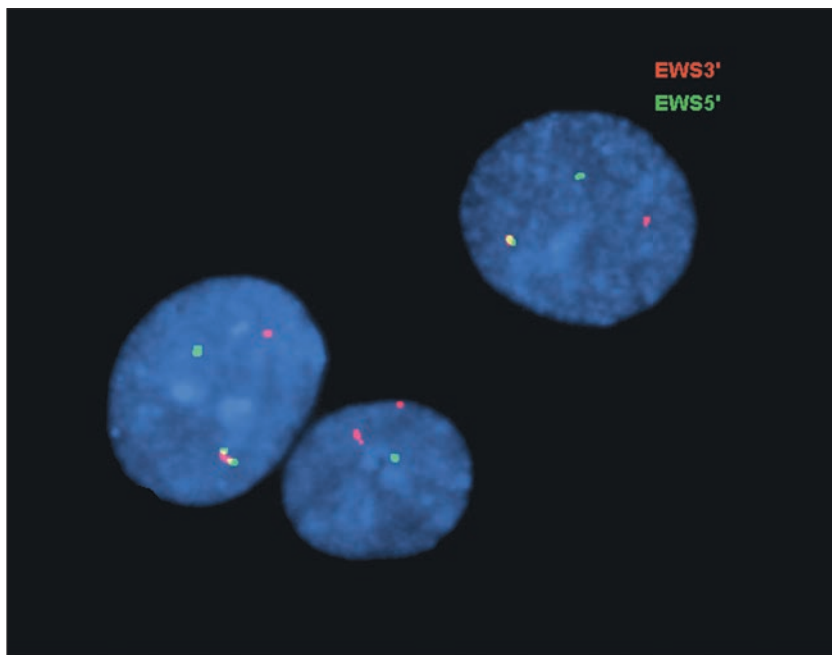


Bild 2. FISH med break-apart prober som visar delning och förflyttning av EWSR1 genen. Detta är karakteristiskt re arrangemang för Ewing sarkom/PNET.

## ***”Ur klinisk synvinkel är de molekylära och genetiska metoderna i första hand diagnostiska hjälpmedel.”***

per av prober för att upptäcka genetiska avvikelser som genbrott, genfusioner och förekomst/förlust av specifika gener. Således kan både numeriska och strukturella avvikelser upptäckas (Bild 2). Metoden är dock riktad och svarar på förekomst eller avsaknad av de specifika mutationerna som proverna utformats för. Det går att använda färskt, formalinfixerat och cytologiskt utstryksmaterial för analys. Detta ger metoden en bred klinisk användning och tillåter en översikt på kromosomnivå men kan även upptäcka förändringar ner till gennivå. Således utgör FISH en detektionsmässig brygga mellan cytogenetik och mer högupplösta molekylära metoder. En nackdel med metoden är att den bara kan svara på en specifik frågeställning och inte ge uppslag om alternativa diagnoser eller mutationer. Andra begränsningar är tekniska problem med ospecifik inbindning av prober och variabilitet mellan bedömare.

### **SINGEL NUKLEOTID POLYMORFISM (SNP)- EN PLATTFORMS (ARRAY) BASERAD ÖVERSIKTSTEKNIK**

Singel Nukleotid Polymorfism (SNP) är en individuell variation av enstaka nukleotider i ett kromosompar. Prevalensen av denna nukleotidvariation mellan två homologa kromosomer är en procent och det finns över 63 miljoner enskilda polymorfismer beskrivna (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>; build 141). Majoriteten av dessa ”genetiska skönhetsfläckar” får inga biologiska konsekvenser även om somliga predisponerar för sjukdom<sup>6</sup>. SNP array är en teknik som använder de enskilda variationerna som markörer för att kartlägga genom. Korta nukleotidsekvenser är fixerade på ett chip och tumörcellernas fragmenterade DNA binder in till de komplementära sekvenserna. De inbundna oligonukleotiderna avger en fluorescerande signal som mäts och kvantifieras. Utöver information om förlust och ökning av

genmaterial så framgår det om det finns två olika kopior av allt genetiskt material, det vill säga det normala heterozygota förhållandet. Både färskt och fixerat material går att använda även om det förstnämnda är det mest beprövade. Metoden ger en ”virtuell karyotyp” på kromosomnivå och kan detektera förändringar på ner till 20 000 baser. Den används i varierande utsträckning som ersättning eller komplement till den traditionella cytogenetiska analysen. En begränsning är att balanserade förändringar (till exempel en balanserad translokation) inte upptäcks utan en ökning eller en förlust av mängden genetiskt material måste ske för detektion. En annan begränsning är tillblandningen av normalceller som kan maskera tumörcellsförändringar i ett prov.

### **POLYMERAS KEDJEREAKTION (PCR)- EN MOLEKYLÄR DNA/RNA BASERAD METOD**

PCR är en flexibel teknik som kan användas för att upptäcka specifika genetiska förändringar inkluderande translokationer, brottspunkter, punktmutationer och fusionsgener.

Metoden kan använda genomiskt DNA eller mRNA (Reverse Transcriptase, RT-PCR) vilket ger den en stor diagnostisk bredd. Tekniken bygger på att små nukleotidprober skapas för att detektera om en specifik sekvens/mutation existerar i provet. En fördel är att mycket små mängder av den efterfrågade sekvensen behövs för att den ska upptäckas. Det går att använda såväl färskt som fixerat tumörmaterial. Metoden är mycket känslig och kan upptäcka sekvenser mellan 100 och 10 000 baser. Den höga känsligheten innebär också en begränsning då förorening eller processgenererade artefakter kan ge falskt positiva resultat.

### **SEKVENSERING (NEXT GENERATION SEQUENCING-NGS) – EN HELTÄCKANDE MOLEKYLÄRGENETISK ANALYS**

Sekvensering är en metod för att bestämma ordningen av nukleotider i en DNA eller RNAsträng. Utvecklingen av sekvenseringstekniker har varit mycket snabb de senaste åren. Den nya generationens sekvensering (NGS) utför analys av miljontals nukleotidfragment i en enda undersökningssession. Det första

## ”De molekylära analysmetoderna är ett värdefullt tillskott till den diagnostiska arsenalen.”

steget i analysen är fragmentering av DNA/RNA som märks och arrangeras i ett bibliotek. Därefter spolas fragmenten över fixerad yta och binder in till komplementära sekvenser. Det inbundna materialet utvidgas med PCR vilket resulterar i miljontals kopior och ”kluster” av de olika sekvenserna. Därefter tillsetts fluorescensmärkta nukleotider och reagens för att få fram den specifika nukleotidsekvensen. Utsläppen från de märkta baserna registreras vilket ger sekvensordningen. Materialet korreleras sedan till referensgenomet och därmed skapas en detaljerad bild av tumörprovets genetiska utseende. Tekniken kan räkna flera nivåer inkluderande hela genomet, enbart exon, selekterade intressanta genområden samt genuttryck i form av RNA sekvensering.

Metoden är mycket effektiv och upptäcker flertalet genetiska avvikelser inkluderande nukleotidsubstitutioner, deletioner, insertioner, fusioner, allelfrekvens och translokationer. Således ger undersökningen möjlighet till en global översikt över genomet ner till nukleotidnivå. I likhet med PCR kan metoden använda flera olika typer av material, färsk vävnad, formalinfixerat material samt cytologiskt utstryksmaterial. Alla har gett tekniskt adekvata undersökningsresultat<sup>7,8</sup>.

Således är sekvensering kliniskt användbart men det finns begränsningar. Mängden information som genereras är stor och resurskrävande att bearbeta. Även om flera prov kan analyseras samtidigt är undersökningen fortfarande relativt dyr. Mängden tumörceller och därmed provets representativitet är av-

görande för att få ett tillförlitligt resultat. Slutligen är det en avancerad metod med många steg som kan ge processgenerade tekniska artefakter vilket kan leda till både falskt positiva och falskt negativa resultat.

### DET KLINISKA VÄRDET AV ANALYSERNA AVSEENDE MESENCHYMALA TUMÖRER

Ur klinisk synvinkel är de molekylära och genetiska metoderna i första hand diagnostiska hjälpmedel. Specifika tumörtyper kan i bästa fall bekräftas eller uteslutas och i svårvärderade fall kan informationen ge vägledning om tumörens malignitetspotential. Behandlingsgrundande mutationer förekommer hittills endast hos GIST i sarkomsammanhang. I takt med att fler mutationer upptäcks så kommer troligtvis mängden diagnostiska och behandlingsprediktiva avvikelser upptäckas och behöva utvärderas. Sammanfattningsvis är metoderna ett värdefullt diagnostiskt verktyg inom ben- och mjukdeltumörer men i likhet med andra tekniker måste informationen värderas utifrån den kliniska bilden och sammanhanget.

### REFERENSER

1. Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol.* 1990 ;94:435-8.
2. Grimer RJ, Hogendoorn PCW, Vanel D. 2013. Introduction. In: Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F, editors. *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone.* IARC: Lyon 2013. p 244-247.

3. Missiaglia E, Williamson D, Chisholm J, Wirapati P, Pierron G, Petel F, Concordet JP, Thway K, Oberlin O, Pritchard-Jones K, Delattre O, Delorenzi M, Shipley J. PAX3/FOXO1 fusion gene status is the key prognostic molecular marker in rhabdomyosarcoma and significantly improves current risk stratification. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 1670-7.

4. Nishida T, Blay JY, Hirota S, Kitagawa Y, Kang YK. The standard diagnosis, treatment, and follow-up of gastrointestinal stromal tumors based on guidelines. *Gastric Cancer.* 2016; 19: 3-14.

5. Smeets DFCM. Historical prospective of human cytogenetics: from microscope to microarray. *Clin Biochem* 2004; 37: 439-446.

6. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, Girtman K, Mathew S, Ma J, Pounds SB, Su X, Pui CH, Relling MV, Evans WE, Shurtleff SA, Downing JR. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446: 758-764.

7. Hedegaard J, Thorsen K, Lund MK, Hein AM, Hamilton-Dutoit SJ, Vang S, Nordentoft I, Birkenkamp-Demtröder K, Kruhøffer M, Hager H, Knudsen B, Andersen CL, Sørensen KD, Pedersen JS, Ørntoft TF, Dyrskjøt L. Next-generation sequencing of RNA and DNA isolated from paired fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples of human cancer and normal tissue. *PLoS One* 2014; 9: e98187.

8. Nikiforov YE, Otori NP, Hodak SP, Carty SE, LeBeau SO, Ferris RL, Yip L, Seethala RR, Tublin ME, Stang MT, Coyne C, Johnson JT, Stewart AF, Nikiforova MN. Impact of mutational testing on the diagnosis and management of patients with cytologically indeterminate thyroid nodules: a prospective analysis of 1056 FNA samples. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 3390-3397.

CHARLES WALTHER, DISPUTERAD VID INSTITUTIONEN FÖR LABORATORIEMEDICIN, LUNDS UNIVERSITET OCH SPECIALISTLÄKARE VID LABMEDICIN SKÅNE, CHARLES.WALTHER@MED.LU.SE

