



*Revolutionerande metod bäddar för mer specificerade val av behandling*

## **SPATIAL TRANSKRIPTOMIK** – gifter ihop histologi med kvantitativ analys av de aktiva generna

Möjligheten att studera och analysera förekomsten av mRNA-molekyler i vävnader har tagit ett kvantsprång det senaste decenniet. Utvecklingen har möjliggjorts genom nya metodologiska landvinningar inom DNA-sekvensering. Detta beskrivs ofta med termen Next Generation Sequencing och förekommer i spekulationer om kommande Nobelpris. Den nya kunskapen kan på sikt bidra till förbättrad diagnostik och möjliggöra att val av behandling kan göras utifrån en vävnads genuttrycksmönster.

Det skriver professor **Joakim Lundeberg** vid Science för Life Laboratory i en översikt av det spännande fältet.

**V**år kunskap om hur kroppens vävnader utvecklas och fungerar har till stor del grundlagts under de senaste hundra åren. En stor del av denna kunskapsbas har erhållits genom att studera en vävnads detaljerade morfologi med mikroskopi. Numera går det även att visualisera närvaro av specifika enstaka molekyler (till exempel mRNA eller protein) på subcellulär nivå, vilket är oerhört värdefullt för många typer av analyser. Men begränsningen är just att det är enstaka biomarkörer som studeras i ett experiment även om

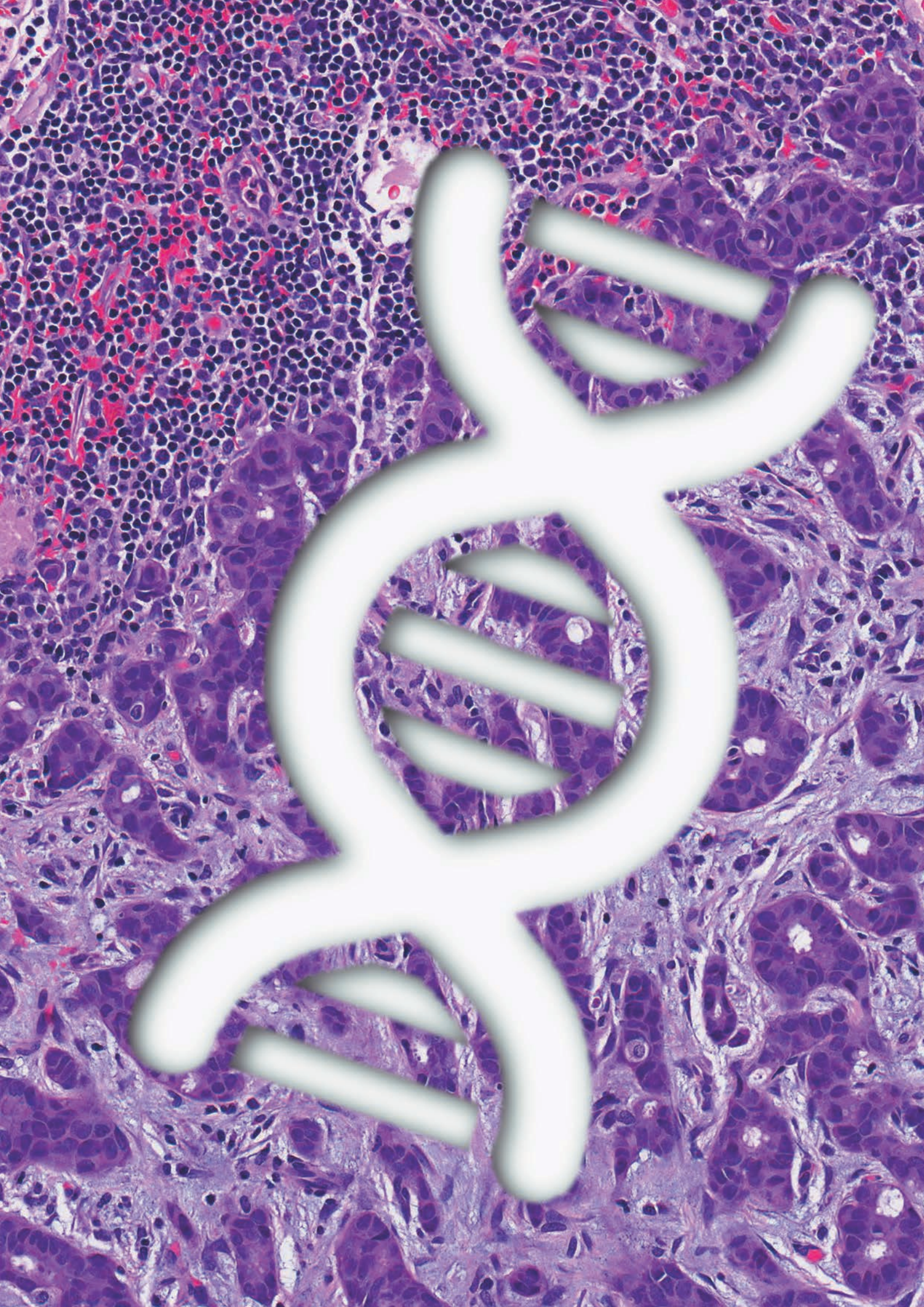
man i viss utsträckning kan multiplexera, det vill säga kombinera ett mindre antal prover eller antikroppar i samma analys av ett vävnadssnitt. Signalen från en hybridisering med prover eller antikropps-antigen-binding till en biomarkör i ett vävnadssnitt brukar inte heller betraktas som en strikt kvantitativ analysmetod.

Uppsättningen av uttryckta gener/proteiner i olika vävnader förändras på karaktäristiska sätt vid olika tumörsjukdomar. Detta studeras rutinemässigt i vävnadsprover för att kunna ställa rätt diagnos och därigenom

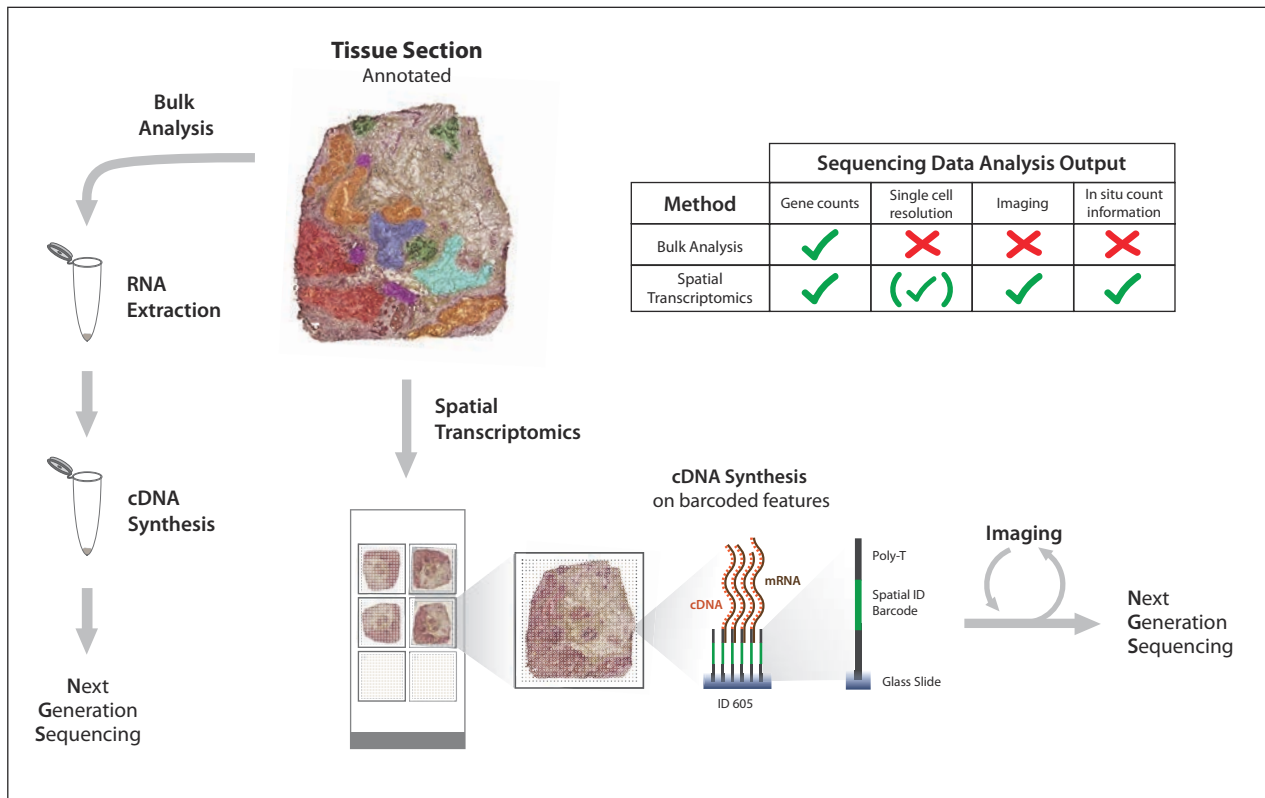
kunna erbjuda patienter optimal och korrekt behandling. Faktum är att mer än hälften av de idag FDA-godkända companion diagnostics-kiten är baserade på mikroskopi i någon form där man använder prover eller antikroppar för att detektera en sjukdomsmarkör.

### **NYA METODOLOGISKA FRAMSTEG**

Möjligheten att studera och analysera förekomsten av mRNA-molekyler, det vill säga de aktiva generna, i vävnader har tagit ett kvantsprång det senaste decenniet genom nya metodo-



## ••• next generation sequencing



Figur 1. Arbetsflöde – normalt förfarande för RNA-sekvensering av biopsi (bulkanalys till vänster) samt spatial RNA-sekvensering in situ (spatial transcriptomics till höger).

logiska landvinningar inom DNA-sekvensering. Detta beskrivs ofta med termen Next Generation Sequencing. Detta tekniksprång förekommer ofta i förhandstipsen till Nobelpriset. Istället för att studera enstaka biomolekyler i en vävnad kan man nu ta fram den fullständiga katalogen av alla gener som är aktiva i en vävnad. Vidare är denna teknik helt kvantitativ vilket gör att analyserna blir betydligt mer precisa och robusta. Förutom att leta efter sina markörgener kan man vinna ny kunskap genom analys av en grupp av gener relevanta för sjukdomen vilket i förlängningen möjliggör bättre behandlingar. Exempel på analys av en panel av gener kan hämtas från bröstcancerdiagnostiken (Mammaprint, PAM50, Oncotype) där även vissa av dessa kit är FDA-godkända. Hitintills är dessa kit baserade på någon typ av mikroarray.

Kostnaden att analysera ett prov med DNA-sekvensering (RNA sequencing) har reducerats signifikant under de senaste åren och är idag ett reellt alternativ till mikroarraybaserade analyser (till exempel Affymetrix). Ett tillkortakom-

**”Istället för att studera enstaka biomolekyler i en vävnad kan man nu ta fram den fullständiga katalogen av alla gener som är aktiva i en vävnad.”**

mande med både mikroarray och DNA-sekvensering är att de, till skillnad från mikroskopering, inte erbjuder spatial information. Genom att vävnaden mals ned före den genetiska analysen kan man bara se förekomsten av vissa mRNA-molekyler, men inte precisera det spatiella ursprunget i vävnadsprovet (så kallad bulkanalys, se figur 1). Och det finns en överhängande risk att mRNA-signalen från ett fåtal tumörceller försvinner i signaler från omgivande celler när man mal ned provet.

### REVOLUTIONERANDE METOD

I ett samarbete mellan KTH och Karolinska Institutet på Science for Life Laboratory har vi utvecklat en ny revolutionerande metod, spatial transkriptomik, som löser detta dilemma och

gifter ihop histologi med kvantitativ analys av de aktiva generna. Vi fångar samtliga mRNA-molekyler i en vävnad utan att kompromissa bort den spatiala informationen från mikroskopi-bilden (Ståhl, Salmen et al., Science, 2016). Eftersom morfologi kan länkas med genuttryck är användningsområdet mycket brett och har extra stor potential inom tumörbiologi och diagnostik (Figur 1) och vi kan belysa heterogenitet, men även samverkan mellan stroma och tumör på en helt ny nivå.

Metoden är mycket enkel och baserar sig på spatiellt unika adresslappar (unika DNA-prober på cirka 18 nukleotider) som ligger utspridda i ett jämnt mönster på objektglaset. Det är i grunden samma objektglas som används vid standard-histologi men glastytan är för-

preparerad med över 1 000 olika spatiella prober för att fånga mRNA-molekyler. Rent praktiskt tar man först en bild av vävnadssnittet när det ligger på glasytan, sedan permeabiliserar man vävnaden så att mRNA-molekyler kan migrera ned till glasytan där de binder in till ytproberna. Sedan gör man en standardiserad provpreparering av materialet på ytan och genomför Next Generation Sequencing. Resultatet består av > 100 miljoner korta DNA-läsningar (cirka 75 baspar). Denna längd är tillräcklig för att bestämma vilken gen och från vilken position på glasytan den härstammar, med andra ord är kopplingen mellan histologi och genuttryck uppnådd.

#### TÄCKER IN ALLA GENERS UTTRYCK

Med mer än 100 miljoner av dessa läsningar kan man täcka in alla geners uttryck i vävnadssnittet och även deras position. Man skapar på detta sätt förutsättningar för en kraftfull analys. Man kan till exempel ställa frågan var och hur mycket uttrycks *erbb2* (*HER2*) i en brösttumör eller var och hur mycket uttrycks en panel av gener (till exempel *Mammaprint*). Man kan också utgå från morfologin och bekräfta att det är tumörceller utifrån genuttrycksdata. För att göra det så enkelt som möjligt att tolka ett experiment har vi tagit fram en egenutvecklad och fritt tillgänglig

mjukvara ([www.spatialtranscriptomics-research.org](http://www.spatialtranscriptomics-research.org)) där man kan överlagra informationen från DNA-sekvenseringen, med andra ord vilka gener som är uttryckta och i vilken nivå, med den histologiska bilden.

En mycket spännande utveckling är att utnyttja all data (alla geners spatala uttryck) från ett experiment och låta data presentera vilka mönster som finns utan något stöd från histologin. Kan genuttrycket rekapitulera morfologin utifrån signaturer i genuttrycket och/eller finna ytterligare strukturer där mikroskopin inte har tillräcklig ”upplösning”? Vi har bland annat kunnat konfirmera med avancerade algoritmer (så kallad maskininlärning) den histologiska strukturen i en brösttumör (inflammation, fett, cancer, stroma), men framförallt identifierat sub-kloner av cancerceller där morfologin inte särskiljer olika områden i ett vävnadssnitt.

Den utvecklade spatala tekniken används idag i flera samarbeten inom bröstcancerområdet (Åke Borg), melanom (Johan Hansson), hjärncancer hos barn (Monica Nistér) och prostatacancer (Thomas Helleday) med stöd från Stiftelsen för Strategisk forskning, Barncancerfonden, Cancerfonden, Astra Zeneca, Knut och Alice Wallenberg stiftelse och Stockholms läns landsting. Nyligen har vi även utvecklat metoder att preservera blodprov och sortera ut

enskilda celler på dessa ytor (Vickovic et al, 2015, Vickovic et al 2016) vilket även har öppnat möjligheter att studera leukemier med en väsentligt högre upplösning (Richard Rosenquist Brandell). Sammantaget har vi demonstrerat att metoden för spatial analys kraftigt ökar förståelsen av olika tumörformer och kommer sannolikt att bidra till förbättrad diagnostik och terapival utifrån en vävnads genuttrycksmönster.

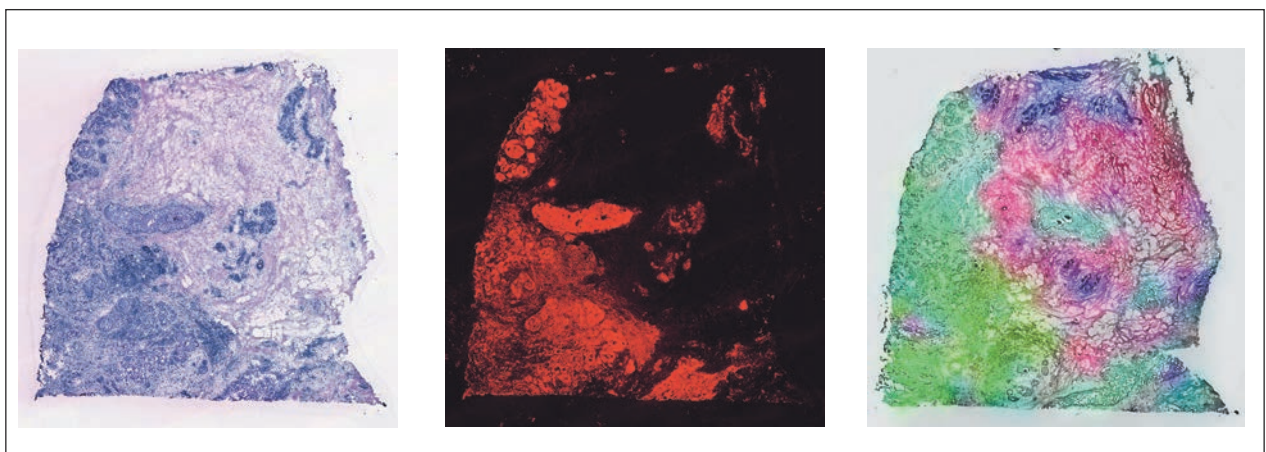
#### REFERENSER

Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, Lundmark A, Fernández Navarro J, Magnusson J, Giacomello S, Asp M, Westholm JO, Huss M, Mollbrink A, Linnarsson S, Codeluppi S, Borg Å, Pontén F, Pi Costea, Sahlén P, Mulder J, Bergmann O, Lundeberg J, Frisén J. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science*. 2016 Jun 353;6294:78-82.

Vickovic S, Ståhl PL, Salmén F, Giatrellis S, Orzechowski Westholm J, Fernández Navarro J, Custodio J, Bienko M, Sutton LA, Rosenquist R., Frisén J, Lundeberg J. Massive and parallel expression profiling using microarrayed single-cell sequencing (MASC-seq) *Nature Communications*. 2016, October 14.

Vickovic S, Ahmadian A, Lewensohn R, Lundeberg J. Toward Rare Blood Cell Preservation for RNA Sequencing. *J Mol Diagn*. 2015 Jul;17(4):352-9.

JOAKIM LUNDEBERG, PROFESSOR, SCIENCE FOR LIFE LABORATORY  
JOAKIM.LUNDEBERG@SCILIFELAB.SE



Figur 2. Information från den spatala analysen av en brösttumör innefattar HE-infärgning (vänster), global genaktivitet (mitten), och slutligen tolkning av genuttrycksanalys med hjälp av maskininlärning (höger). De olika färgerna representerar olika genuttrycks signaturer som erhållits från maskininlärningen som visar sig överlappa med histologisk annotering.