

••• effektiv metodutveckling

Snabbare

” *Många frågeställningar som inkommer till genetiska laboratorier kräver snabba svarstider för att möta sjukvårdens och vårdprogrammets behov.*

genetiska analyser

– för att möta världens behov

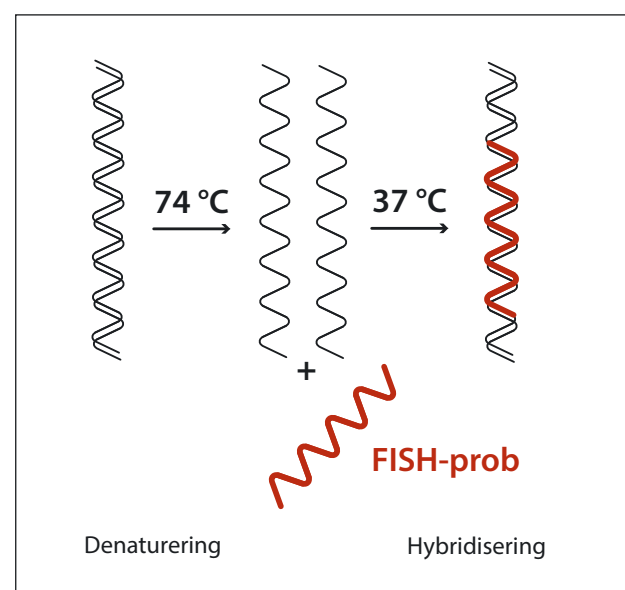
Patienter med misstänkt akut leukemi får nu snabbare provsvar. Allt tack vare ett nytt arbetssätt och en effektiv metod som har utvecklats i Skåne. Det innebär att behandlande läkare kan få snabbare svar om en patient har misstänkt akut leukemi. Tidigare tog det alltid över två dygn. Nu tar det bara fyra till fem timmar för medarbetarna på laboratoriet att göra en genetisk analys. Här beskriver sjukhusgenetiker **Linda Arvidsson** och enhetschef **Anna Collin** hur utvecklingsarbetet gått till.

Ett omfattande tekniksifte pågår inom sjukvården och innebär att de mer traditionella genetiska undersökningsmetoderna på våra genetiska laboratorier successivt ersätts av storskaliga tekniker som gemensamt benämns next generation sequencing (NGS) eller, mer korrekt, massiv parallell sekvensering (MPS)^{1,2}. Dessa storskaliga tekniker möjliggör undersökningar av vårt genom i en enda analys och används för att hitta genetiska förändringar som ger upphov till sjukdomar eller som kan användas som riskmarkörer och ge varje individ chansen till att få individuellt anpassad behandling (precisionsmedicin). Många frågeställningar som inkommer till genetiska laboratorier kräver snabba svarstider för att möta sjukvårdens och vårdprogrammets behov. Ett område där sådana krav ställs är till exempel utredning av patienter som insjuknat i leukemi. MPS är en omfattande undersökningsmetod och innebär idag en svarstid på 21 dagar i normalfallet för dessa förvärvade frågeställningar och som snabbast sju dagar för en mycket brådskande analys. För att kunna tillgodose det fortsatta behovet av snabba svarstider har vi, parallellt med införandet av MPS, också satsat på att optimera och förbättra de klassiska genetiska metoderna såsom fluorescence *in situ* hybridisering (FISH).

GENSPECIFIKA FISH-PROBER

FISH är en metod som i sin nuvarande form har funnits sedan 80-talet och baseras på användning av så kallade FISH-prober som binder till specifika, väl karakteriserade områden, i genomet. FISH-prober är denaturerade DNA-

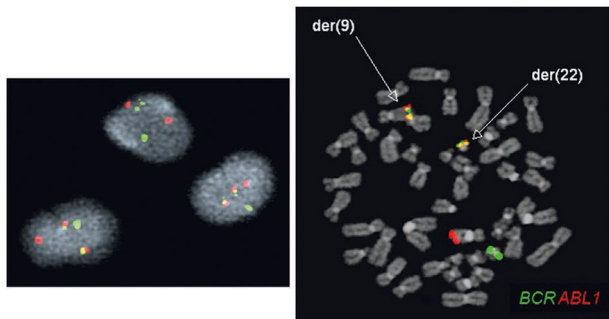
fragment som bär på fluorescerande molekyler (fluoroforer) och i en undersökning kombineras normalt 2–3 prober som var och en bär på specifik fluorofor med särskild våglängd (färg). Genom att låta FISH-proberna smälta samman med sina komplementära målsekvenser (figur 1) på deras specifika platser i genomet (så kallad hybridisering *in situ*) så kan dessa områden undersökas direkt i cellerna genom analys i



Figur 1. En schematisk bild på komplementär FISH-probe som smälter samman med sin målsekvens i cellkärnan och bildar en DNA-hybrid.

●●● effektiv metodutveckling

fluorescensmikroskop³. Genom att använda genspecifika FISH-prober kan undersökningen till exempel ge svar på om kända, leukemiassocierade gener i området är intakta eller rearrangerade till följd av kromosomförändringar, se figur 2.



Figur 2. Undersökning i fluorescensmikroskop. Till vänster ses cellkärnor i interfase, till höger kromosomer i metafase. På båda bilderna ses resultat av hybridisering med FISH-prober för generna ABL1 på kromosom 9 (röd signal) samt BCR på kromosom 22 (grön signal). Provet uppvisar ett rearrangemang mellan ena kromosom 9 och 22 som gör att delar av ABL1 flyttat till BCR och tvärtom, vilket resulterar i en fusion mellan dessa gener som visualiseras som två gula signaler, där den lilla derivatkromosomen (der(22)) kallas Philadelphia-kromosom (bilder från bildanalysystemet CytoVision).

En stor fördel med FISH är dess mångsidighet med avseende på målsekvenser. Kartläggningen av det mänskliga genomet och utvecklingen av den molekylärgenetiska diagnostiken har lett till att vi idag kan köpa kommersiellt tillgängliga FISH-prober för de flesta riktade genetiska frågeställningarna. Förutom genspecifika FISH-prober finns andra slags FISH-prober för andra användningsområden:

hela kromosomer eller stora delar av kromosomer kan undersökas med specifika ”painting probes” och kromosomernas centromer, telomerer och polymorfiska satelliter kan undersökas med specifika ”repetitions sekvens prober”^{3,4}. Företagen som tillverkar FISH-proberna testar och kvalitetssäkrar produkterna noga vilket möjliggör ett snabbare införande i kliniskt bruk. Dessa kommersiella FISH-prober ger mer stabila och starkare signaler än när vi behövde tillverka dem själva i laboratoriet från bakterier, vilket underlättar vid analysen.

MÅSTE VÄLJA MÅLSEKVENSER

Alla de olika FISH-applikationerna kräver dock att laboratoriet gör ett aktivt val av vilka sekvenser som ska undersökas samtidigt i en analys innan den påbörjas eftersom tekniken möjliggör detektering av ett begränsat antal målsekvenser samtidigt per cell beroende på vilka fluoroforer som kan kombineras i samma hybridisering. I en analys får varje fluorofor/färg bara användas en gång, i annat fall är inte resultatet tolkningsbart. Att undersökningen inte kan ske förbehållslöst som vid MPS utan är en riktad analys där de sekvenser/specifika områden i genomet som eftersöks måste ha fastställts innan, är en begränsande faktor för FISH¹. FISH-proberna är relativt stora (100 kbp-1 Mbp) vilket visserligen ger en bättre upplösning än kromosomanalys men är lägre än exempelvis microarray och MPS och andra molekylärgenetiska metoder. Vid FISH-analys, precis som vid kromosomanalys, undersöks varje cell var för sig vilket gör det möjligt att även med FISH-analys besvara om de olika genetiska förändringarna som detekteras, är närvarande i samma cell/klon eller finns i olika celler/kloner i provet. Vid molekylärgenetiska undersökningar är detta generellt

FISH-protokoll tidigare (3 dagar)	FISH-protokoll nu (ca 4.5h)
Lysering av blod/benmärg 40 min	Lysering av blod/benmärg 40 min
Hypotonbehandling (alla prov) 10 min	Hypotonbehandling (alla prov) 10 min
Fixering (4 gånger) 40 min	Fixering (4 gånger, sista iskall) 40 min
Spridning på objektglas	Spridning på objektglas
60° C över natt	60° C 30 min
2 x SSC+Tween20 60°C 30 min	2 x SSC + Tween20 60°C 60 min
Skölj i kranvatten	skölj i kranvatten
Dehydrera i etanolserie	Dehydrera i etanolserie
Lufttorka	Lufttorka
Pepsin 37° 8 min	Denat + prob 30 sek-2 min
1 x PBS	Hyb 37° C 60 min (FAST-hyblösning)
Formaldehyd 10 min	0,4xSSC + Tween20 i 74° C 2 min
1 x PBS	Dehydrera i etanolserie
Dehydrera i etanolserie	Lufttorka
Lufttorka	Monteringsmedium med DAPI
Denat + prob 3-5 min	Analys
Hyb 37° C över natt	
0,4 x SSC+Tween20 i 74° C 2 min	
Dehydrera i etanolserie	
Lufttorka	
Monteringsmedium med DAPI	
Analys	

Tabell 1. Jämförelse mellan grundprotokollen för FISH före och efter optimering av metoden.

••• effektiv metodutveckling



inte möjligt då allt DNA från alla celler i provet analyseras samtidigt. FISH-metodens största styrkor är att den är välkänd, robust och kan användas på många olika material så som blod, benmärg, färskas solida tumörer och prenatala prover.

För att få fram cellkärnorna till FISH-analysen krävs det att det inkommande provmaterialet förädlas, det vill säga omhändertas på rätt sätt. För detta finns ett validerat och ackrediterat grundprotokoll som följs av medarbetarna på laboratoriet, se tabell 1. Detta protokoll sträckte sig tidigare över tre dagar och innehöll giftiga ämnen såsom formaldehyd. Efter ett intensivt arbete under senare delen av 2019 och början av 2020 med många tester och valideringar så har vi i Lund kunnat utesluta vissa steg i metoden samt infört en ny hybridiseringslösning för att få fram resultaten snabbare, se jämförelsen mellan protokollen i tabell 1. Arbetet har också gjort det möjligt att helt utesluta formaldehyd.

SPRÄNGA SÖNDER BLODKROPPAR

Det nya grundprotokollet innebär för våra blod- och benmärgsprover att de direkt vid ankomst lyseras med egenblandad 1x lyseringsbuffert. Lyseringsbuffert är en hypoton

lösning som gör att vätska dras in i cellerna på grund av skillnader i jonstyrka över cellens membran, detta för att spränga sönder de röda blodkropparna som inte innehåller någon cellkärna och är mer känsliga än de vita blodkropparna med cellkärna. Nu har vi en cellpellet av de vita blodkropparna på botten av ett centrifugrör där de hypotonbehandlas igen med en egenblandad saltlösning (0,075 M kaliumklorid) så att de sväller när de drar in vätskan i cellerna. Cellerna fixeras sedan i minst fyra omgångar med en egenblandad fixeringslösning (3 delar isättika, 1 del metanol) som successivt renar och härdar cellsuspensionen i centrifugören. I nästa steg tillverkas preparat för FISH-analys genom att fixerade celler från cellsuspensionen sprids ut på ett objektglas. Preparaten förbehandlas sedan genom inkubering i värme och tvätt i isoton saltbuffert (2x SSC) som inte förändrar cellernas volym. Saltbufferten är blandad med en tvällösning (Tween20) för att få bort cellmembran och proteiner på preparaten så att cellkärnan blottläggs vilket underlättar för FISH-proberna att binda in. Tvätt med etanol gör slutligen att vatten drivs ut och preparaten torkar. Nu kan FISH-proberna appliceras vilket de gör tillsammans med en hybridiseringslösning som ska hjälpa FISH-proben att binda till sin komplementära DNA-sekvens i cellkär-

norna på preparatet^{4,5}. Traditionella hybridiseringslösningar kräver 16h inkubering för att nå en fullgod hybridisering men med IntelliFISH hybridiseringsbuffert som är en ”Fast working buffer” (Fast-hyb) från Abbott Molecular har företaget lyckats framställa en hybridiseringslösning som endast kräver 1h inkubering för fullgod hybridisering. Även för till exempel den aggressiva solida tumören Ewings sarkom som drabbar barn och unga vuxna har vi validerat att Fast-hyb kan användas för att få ut ett snabbt svar om genen EWSR1 är rearrangerad, vilken definierar denna tumörtypp⁶. Efter hybridiseringen sker tvätt i saltlösning (0,4x SSC) blandad med tvällösningen för att få bort ospecifikt bundna FISH-prober/bakgrundsbrus. Innan analys tillsätts också DAPI till preparaten, en fluorescerande blå ”kontrastfärg”, som färgar in allt DNA och gör det möjligt att urskilja cellkärnorna/kromosomerna mot den svarta bakgrunden, se figur 2 som visar ett exempel på hur det ser ut när vi tittar i ett fluorescensmikroskop. Förändringarna i grundprotokollet har inte bara effektiviserat FISH-metoden och reducerat tiden från 3 dagar till 4.5h (tabell 1) utan har också gjort den mer stabil. Stabiliteten visar sig till exempel i att vi numera har färre omhybridiseringar, det vill säga ny tillsats av prob på annat preparat från patienten och analys på nytt, vilket behövs om preparaten är skräpiga och ger mycket bakgrundssignaler eller när signalerna från FISH-proberna är svaga och stör analysen. Baserat på tre månaders mätning behöver vi nu göra om hybridiseringen i 1 procent av alla analyser vi utför i rutin, jämfört med 8 procent med det gamla protokollet och detta sparar både tid och pengar.

TYDLIGA RESULTAT VID AML

Ett exempel där dessa förbättringar i FISH-metoden get tydliga resultat är vid akut myeloisk leukemi (AML). I Sverige insjuknar varje år cirka 350 vuxna och 10 barn i AML. Hos de cirka 8 procent av de vuxna patienterna som har så kallad CBF-AML, med de karakteristiska kromosomavvikelserna $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ eller $t(8;21)(q22;q22)$, bör man lägga till behandlingen gemtuzumab ozogamicin (GO) i första induktionskuren enligt det nationella vårdprogrammet för AML från 2019⁸. Detta innebär att behandlande läkare önskar svar på om patienten har någon av dessa varianter i sina cancerceller inom 24h för att kunna följa vårdprogrammet vilket vi nu kan tillgodose med vår modifierade FISH-metod. Även svar på förekomst av fusionsgenen BCR-ABL1, $t(9;22)(q34;q11)$ ⁷, kan vara akut och det finns som bekant målterapi mot cancerceller med denna fusion. Translokationen (t) innebär att material från ena kromosom 9 innehållande delar av ABL1-genen, samlokaliseras med material från kromosom 22 innehållande BCR-genen och är väl synligt vid FISH-analys, se figur 2.

Akut promyelocytyleukemi (APL), en ovanlig undergrupp av AML med särskilt hög risk för initiala blödningskomplikationer, behandlas enligt ett speciellt protokoll som inkluderar syntetiskt A-vitamin (ATRA) i kombination med arseniktrioxid (ATO) vilket är en målterapi mot den specifika fusionsgenen PML-RARA som uppstått genom rearrangemang av material från kromosom 15 och 17 i patientens cancerceller^{7,8}. Patienten är ofta svårt sjuk och behandlingen

behövs genast och räddar liv om fusionsgenen är närvarande men behandlingen bör ibland inte sättas in förrän fusionen bekräftats. I dessa fall räknas varje timme och då är det fantastiskt att vi på ett validerat och robust sätt kan ha svar på detta inom 5h med vår modifierade FISH-metod.

” Att automatisera analysförfarandet är ett viktigt steg för att kunna möta den ökande efterfrågan på dessa analyser och innebär att fler laboratoriemedarbetare kan delta i analysarbetet då underlaget är tillgängligt via bildanalyssystemet och inte begränsas av hur många fluorescensmikroskop som finns tillgängliga.

KOMBINATION AV METODER

Om FISH-analysen inte uppvisar någon fusionsgen finns det i dessa fall en liten risk för falskt negativt resultat på grund av ovanliga men kända kryptiska rearrangemang (insertioner) som inte är möjliga att detektera med FISH-analys⁷. Vi initierar därför alltid, om möjligt, parallellt en molekylärgenetisk analys för att detektera PML-RARA med metoden reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). RT-PCR utgår från RNA som extraherats från patientprovet och som görs om till komplementärt DNA (cDNA) med hjälp av enzymet reverse transcriptase. Genom att använda en kombination av så kallade primers, cirka 20–25 bp långa enkelsträngade DNA-fragment, specifika för en viss genfusion amplifieras målsekvensen/genfusionen i PCR-analysen och gör det möjligt att detektera den om den finns i provet⁹. Baserat på de senaste fem åren har vi haft fyra kliniska fall (<5 %) med diskrepans mellan FISH-analysen som visade ett negativt resultat och RT-PCR analysen som visade ett positivt resultat för närvaro av PML-RARA. Dock har vi också i två fall detekterat rearrangemang av RARA-genen med annan fusionspartner än *PML* vilket enbart kan påträffas med vår FISH-analys⁷.

Under det senaste året har även våra PCR-baserade molekylärgenetiska metoder såsom RT-PCR, fragmentlängdsanalys (för till exempel detektion av interna tandemduplikationer (ITD) i genen FLT3 för vilken vårdprogrammet för AML önskar svar på inom 72h⁸) och kvantitativ RT-PCR

••• effektiv metodutveckling

(RT-qPCR), setts över och effektiviserats och vi står nu inför ett införande av digital-PCR (BIO-RAD) för att ytterligare förstärka vårt utbud av riktade analyser. De kvalitativa undersökningarna är viktiga för att fastställa förekomst eller inte av ett rearrangemang eller en genvariant och de kvantitativa metoderna används för att följa patienten över tid för att detektera ”mätbar kvarvarande sjukdom” (MRD, measurable resistant disease). Arbetet med de molekylärgenetiska metoderna har till exempel inneburit att vi reducerat tiden för cDNA-syntesen från 2.5h till 20 minuter samt infört pipetteringsrobotar, vilket lett till att vi idag för till exempel *PML-RARA* kan ha ett resultat från RT-PCR-analysen nästan lika snabbt som vid FISH-analys vilket sammantaget är mycket betydelsefullt för patienten.

FORTSATT UTVECKLING

Detta har varit ett intensivt och viktigt arbete. Hela arbetsflödet har setts över/ses över: från det att patienten lämnat ett prov ute i sjukvården med tydliga remisser och instruktioner om hur prov ska tas (volym, typ av provrör), förvaras och transporteras; hur ett prov ska fördelas smidigt när det kommer till vårt laboratorium för att räkna till alla de olika analyserna som ska utföras; hur analyser ska prioriteras och det dagliga praktiska arbetet och analysarbetet lämpligen fördelas för att anpassa arbetssättet till vårdens behov; till det att behandlande läkaren har svaret. Vidare jobbar vi nu med att automatisera själva FISH-analysen genom att ett nytt automatiserat mikroskop, CytoVision GSL120 (Leica biosystems genom TRIOLAB), anpassat för fluorescensanalys, integreras i vårt befintliga bildanalyssystem (CytoVision). GSL120 hittar cellerna och tar bilder på dessa och sedan kan signalerna på preparaten analyseras på en datorskärm med hjälp av bildanalyssystemet istället för manuellt mikroskoparbete. Idag undersöker laboratoriemedarbetarna manuellt 200 cellkärnor per FISH-analys och ibland krävs så många som sju olika FISH-analyser för en patient för att svara på allt som vårdprogrammet kräver att vi ska undersöka. Att automatisera analysförfarandet är ett viktigt steg för att kunna möta den ökande efterfrågan på dessa analyser och innebär att fler laboratoriemedarbetare kan delta i analysarbetet då underlaget är tillgängligt via bildanalyssystemet och inte begränsas av hur många fluorescensmikroskop som finns tillgängliga.

I takt med att det pågående teknikskiftet fortskrider blir det alltmer tydligt hur viktigt det fortsatt är med en kombination av de nya storskaliga MPS-analyserna och de mer traditionella undersökningsmetoderna då de tillsammans

gör det möjligt att ge svar på sjukvårdens frågeställningar inom de tidsramar som krävs. De kommande årens fortsatta utveckling inom området kommer troligtvis göra att nya möjligheter uppstår och vi ser att ett nära samarbete och en dialog mellan de parter som är specialister inom sina olika metod- och diagnosområden har en stor betydelse för att använda sjukvårdens resurser på bästa sätt, kunna bidra till sjukvårdens behov utifrån gällande vårdprogram och riktlinjer och för den fortsatta utvecklingen av precisionsmedicin och andra viktiga landvinningar.

REFERENSER

1. Heim, S., and Mitelman, F. 4 uppl. Cancer Cytogenetics: Chromosomal and Molecular Genetic Aberrations of Tumor Cells. England: WILEY Blackwell, 2015.
2. Weiss, M.M., et al. Best practice guidelines for the use of next-generation sequencing applications in genome diagnostics: a national collaborative study of Dutch genome diagnostic laboratories. *Hum Mutat*, 2013. 34(10):1313-21.
3. Levsky, M.J., and Singer, H.R. Fluorescence in situ Hybridization: past, present and future. *Journal of Cell Science*, 2003. 116(Pt 14):2833-8.
4. Mascarello, J.T., et al. Section E9 of the American College of Medical Genetics technical standards and guidelines: Fluorescence in situ hybridization. *Genet Med*, 2011. 13(7):667-75.
5. Matthiesen, S.H., and Hansen, C.M. Fast and non-toxic in situ hybridization without blocking of repetitive sequences. *PLoS One*, 2012. 7(7): e40675.
6. Mertens, F., et al. Translocation-related sarcomas. *Semin Oncol*, 2009. 36(4):312-23.
7. Johansson, B. Cytogenetiska och molekylärgenetiska förändringar i maligna hematologiska sjukdomar. Avdelningen för klinisk genetik, Lunds universitet, 2014. <https://sfmg.se/riktlinjer/hematologisk-genetik/>
8. Nationellt vårdprogram Akut myeloisk leukemi version 4.1. ISBN: 978-91-87587-95-5. 2019. <https://www.cancercentrum.se>
9. Mahdiah, N., and Rabbani, B. An Overview of Mutation Detection Methods in Genetic Disorders. *Iran J Pediatr*, 2013. 23(4): 375-88.

ANNA COLLIN, PHD OCH ENHETSCHEF FÖR GENETIKLAB INOM VERKSAMHETEN FÖR KLINISK GENETIK OCH PATOLOGI LUND, MEDICINSK SERVICE, REGION SKÅNE, ANNA.COLLIN@SKANE.SE



LINDA ARVIDSSON, PHD OCH SJUKHUSGENETIKER INOM VERKSAMHETEN FÖR KLINISK GENETIK OCH PATOLOGI LUND, MEDICINSK SERVICE, REGION SKÅNE, LINDA.K.ARVIDSSON@SKANE.SE

