

Targeteret patientdiagnostik – bioanalytikere er en del af det!

I det danske sundhedsvæsen er det i dag muligt at behandle kræftpatienter meget specifikt grundet udviklingen af nye lægemidler til targeteret behandling. Det er dermed også et krav, at der udføres analyser, der kan undersøge, om patienter kan modtage en targeteret behandling.

Dette behov for mere specifik information om patientens kræfttype og molekylære baggrund giver nye arbejdsopgaver til bioanalytikere og skaber for professionen en ny rolle i kræftpatienters behandlingsforløb.

Der er i dag flere afdelinger, hvor bioanalytikere udfører disse analyser og deltager i denne nye form for præcisionsdiagnostik. Udviklingslaboratoriet, Patologisk Institut, Aarhus Universitetshospital er et af de steder, hvor der af bioanalytikere udføres molekylærbiologiske analyser, der er til gavn for patientens videre behandlingsforløb.

Udviklingslaboratoriet er en afdeling tilhørende Patologisk Institut, som siden 2009 har taget sig af udviklingsopgaver inden for molekylærpatologien. Det er en afdeling, hvor mange molekylærbiologiske analyser i dag er rutineanalyser, der indgår i udredning af kræftpatienter i forbindelse med targeteret behandling. Udviklingslaboratoriet er opdelt i en rutinedel og en forskningsdel, hvor bioanalytikere er ansat til at varetage molekylære rutineanalyser samt forskningsprojekter. Afdelingen består af en afdelingsbioanalytiker, to molekylærbiologer, 6½ forsk-

ningsbioanalytikere og 7½ bioanalytikere, der varetager rutineanalyser. Udviklingslaboratoriet modtager prøver fra histologiske og cytologiske laboratorier samt blod fra forskellige hæmatologiske afdelinger, og laboratoriet har for nogle af analyserne lands- eller landsdelsfunktion.

Rutineanalyser i molekylærpatologien

De 7½ bioanalytikere, ansat til at varetage de molekylære rutineanalyser, arbejder med mange former for molekylærbiologiske teknikker, såsom real-time PCR til detektion af specifikke mutationer i udvalgte gener, pyrosekventering til detektion af methylering i udvalgte gensekvenser og FISH-hybridisering til detektion af strukturelle genforandringer, som for eksempel translokationer og deletioner, hvor de molekylære analyser ofte kombineres med immunhistokemiske farvninger.

Udviklingslaboratoriet udfører analyser i forbindelse med targeteret behandling, men også i forhold til både diagnostik og prognose. Størstedelen af de analyser, der udføres i udviklingslaboratoriet, er fra patienter diagnosticeret med colorectal cancer, lungecancer, malignt melanom samt hjernetumorer.

Af de mindre hyppige analyser, der udføres i afdelingen, kan nævnes analyser til diagnosticering af patienter med sarkom, T- og B-celle rearrangement samt hårcelle-leukæmi.

Informationen ligger i DNA'et

Laboratoriet modtager forskellige former for prøvematerialer, og analyseresultatet er med til at føre til en beslutning om patientens videre behandling og om, hvorvidt targeteret behandling er mulig.

Følgende er for de vævstyper, der oftest udføres analyser på i laboratoriet.



Tekst // Cathrine Toustrup, Udviklingslaboratoriet, Patologisk Institut, Aarhus Universitetshospital
Foto // Kristian Bang

COLON

Patienter med colorectal cancer undersøges i udviklingslaboratoriet for mutationer i tre forskellige gener, KRAS, NRAS og BRAF. Den mest hyppige mutation ved colorectal cancer er mutationen i KRAS-genet, som er et onkogen, der findes i 35-40 % af colorectal cancer. KRAS-mutationer fører blandt andet til konstant signalering til cellen om at dele sig (1).

Information om patientens mutationsstatus er afgørende for, hvilken behandling patienten kan modtage. Hvis patienten ikke har mutationer i et af de tre gener, er den targeterede behandling mulig, da der dermed ikke er blokering af target, og patienten vil få gavn af en targeteret behandling, hvilket forbedrer patientens prognose.

Patienter med colorectal cancer undersøges for methylering i promoterregionen i MLH1-genet, hvis der ud fra immunhistokemiske farvninger af DNA-repair-proteiner er mistanke om, at deres colorectal cancer er arvelig. MLH1 er et gen, der er involveret i DNA-repair-systemet. Skader på DNA kan, hvis det ikke bliver repareret, have potentiale til at danne mutationer i somatiske eller germinale celler, hvilket kan medføre udvikling af cancer (2).

Information om patientens methyleringsstatus giver indblik i oprindelsen af patientens colorectal cancer. Hvis MLH1-genets promoterregion ikke er methyleret, betyder det, at patientens colorectal cancer er arvelig, og grunden til, at DNA-repair-systemet ikke virker optimalt, er en nedarvet defekt i repair-systemet. Denne information er afgørende for patienten og dennes familie, som nu henvises til Klinisk Genetisk Afdeling til videre udredning.

En anden knap så hyppig analyse, der udføres på colonvæv, er en mutationsanalyse for gastrointestinal stromal tumor (GIST). GIST er en sjælden form for sarkom, der opstår i mave-tarm-kanalen i de celler, der kaldes mesenkymal-celler. Ved GIST ses onkogene mutationer i specifikke cellereceptorer. 85 % af alle gastrointestinal stromal tumorer indeholder onkogene mutationer i en af de disse receptorer, som fører til øget vækst af cancerceller (3).

Information i henhold til det molekylærbiologiske billede af patientens gastrointestinal tumor, og i hvilken cellereceptor mutationen findes, er afgørende for behandling af patienten, da der findes specifikke molekylær-targeterede terapier med specifikke inhibitorer til disse targets.

LUNGE

Ved patienter med lungecancer diagnosticeret med typen adenocarcinom undersøges der i udviklingslaboratoriet for 29 forskellige mutationer i epidermal growth factor receptor-genet (EGFR-genet). Til dette kan både anvendes paraffinindstøbt væv, finnålsaspirater samt koagelmateriale.

EGFR-genet koder for de receptorer, der findes i cellemembranen, og som medvirker til signalering til celledeling. Hvis der opstår mutation i dette gen, og receptorerne ikke fungerer optimalt, forstyrres denne signalering og fører til konstant aktivering og kan medføre celleproliferation og udvikling af cancer (4).

Information om patientens mutationsstatus er afgørende for patientens overlevelse.

Hvis patienten har en mutation i EGFR-genet, findes der forskellige targeterede behandlingsmuligheder, og disse patienter har dermed en forbedret prognose, hvis de kommer i en targeteret behandling frem for en almindelig kemobehandling (4).

Patienter med lungeadenocarcinom undersøges også for ALK-gen-rearrangement. Dette udføres primært ved hjælp af immunhistokemi, men ved inkonklusiv immunfarvning udføres en FISH-analyse (fluorescence in situ hybridisering). Her undersøges for gen-rearrangement i form af brud et specifikt sted i ALK-genet.

Et brud i dette gen fører til transskription af proteiner, der konstant er aktive og resulterer i proliferation og overlevelse af cancerceller (5).

Information om patientens gen-rearrangement bidrager til, at man kan finde frem til, om patienten kan være kandidat til behandling med ALK-inhibitorer. Hvis der ved hjælp af FISH-analyse detekteres "break-apart" samt positiv immunfarvning for ALK, betyder det, at patienten kan modtage targeteret behandling, som forbedrer patientens prognose og overlevelse (5).

HJERNE

For patienter med hjernetumorer undersøges der i udviklingslaboratoriet for mutationer i IDH-1 og IDH-2, som især findes hos patienter med tumorer i gliacellerne, kaldet gliomer. IDH står for isocitrat dehydrogenase og er et enzym, der indgår i den biokemiske proces i stofskiftet. Ved mutation i genet, der koder for IDH, produceres en onko-metabolit, der fremmer tumorgenese. IDH-1 er den hyppigste af de to mutationer og er muteret i op til 80 % af tilfældene i forskellige former for gliomer (6).

Information om patientens mutationsstatus i IDH-1/2 bidrager som prognostisk markør, da IDH-muterede gliom-patienter overlever signifikant længere end dem med en IDH-wild-type tumor. Påvisning af IDH-mutationer er derfor af klinisk relevans i forhold til tumorklassifikation samt prognose (5).

Ved patienter med hjernetumorer er det ofte nødvendigt at klassificere disse i forhold til prognose og behandling. Deletion af to specifikke kromosomområder i kromosom 1 og 19 (1p,19q) forbindes med en undergruppe af gliomer, kaldet oligodendrogliale tumorer. I udviklingslaboratoriet udføres en FISH-analyse, der kan undersøge for denne co-deletion.

Information om, hvorvidt patienten har deletion af kromosomområderne, bidrager som en prognostisk markør. Patienter med denne co-deletion (1p,19q) har en bedre prognose end patienter, der ikke har deletionen, og dermed er detektion af denne co-deletion afgørende for at klassificere tumor samt udarbejde en optimal behandlingsstrategi for patienten.

Patienter med gliomer undersøges også for methylering af promoterregion i MGMT-genet.

MGMT-genet koder for et enzym (O6-methylguanin DNA methyltransferase), som indgår i DNA-repair-systemet. Hvis enzymet ikke virker optimalt, fører dette til brud på DNA'et og forkert baseparring og dermed tumorgenese (7).

Information om patientens methyleringsstatus bidrager til den videre behandlingsstrategi samt en prognose. Hvis patientens promoterregion er methyleret, kan patienten modtage targeteret behandling og responderer bedre på denne end patienter, hvis promoterregion ikke er methyleret, og patienten har ved hjælp af behandlingen dermed en forbedret overlevelse. (7).

HUD

For patienter med malignt melanom undersøges tumorvæv for mutationer i BRAF-genet. BRAF-genet koder for intracellulære signalmolekyler, der styrer celledeling. Ved mutation i dette gen forstyrres denne signalering, og cellen deler sig uhæmmet og ukontrolleret. Der findes forskellige mutationer, der kan forekomme i BRAF-genet, hvor punktmutationen V600E er den hyppigste (8).

Information om patientens mutationsstatus er afgørende for, om patienten kan modtage targeteret behandling. Hvis patienten har en mutation i BRAF-genet, kan der behandles med BRAF-inhibitorer, som forbedrer patientens prognose og overlevelse (8).

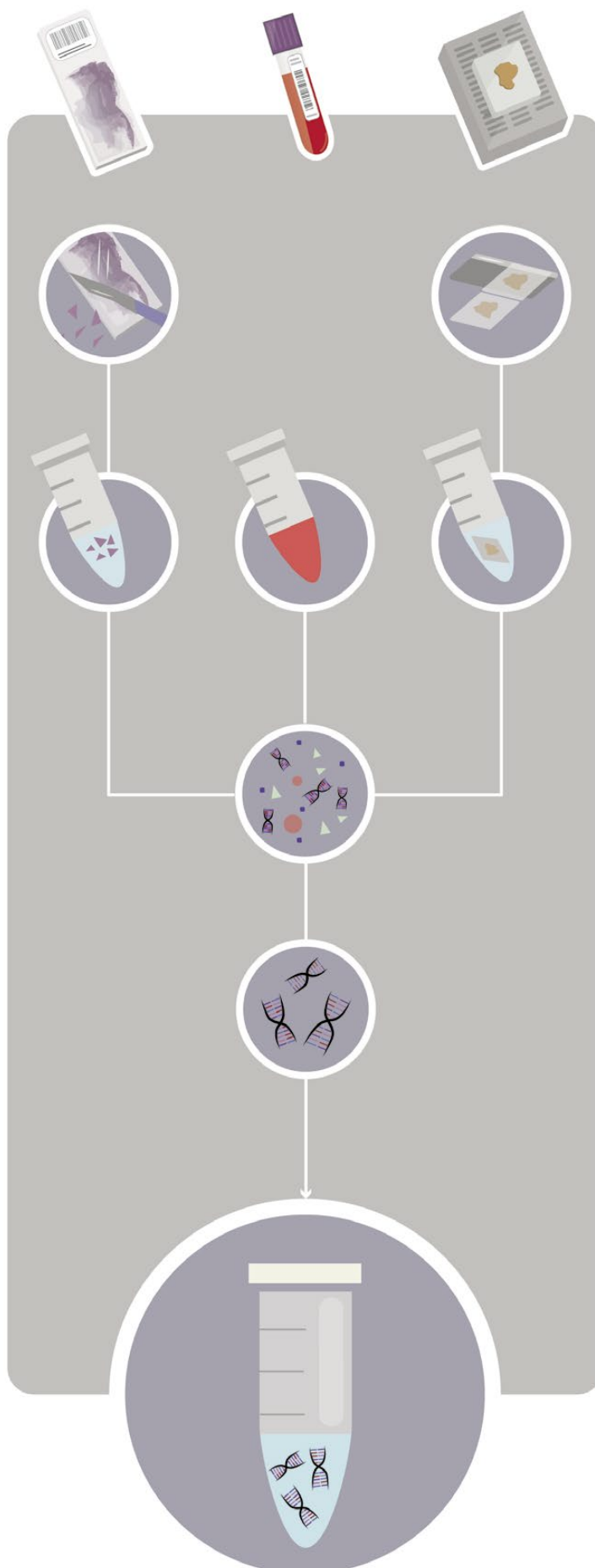
Figur 1

Ved modtagelse af cytologisk materiale i form af et udstrygningspræparat skrubes cellerne af objektglasset og ned i mikrorør.

Ved modtagelse af formalinfixeret paraffinindstøbt væv skæres der snit, som kommes i mikrorør, og der skæres et snit på 2 µm til HE-farvning. Vævssnittene samt cellerne i mikrorøret behandles med Proteinase K og deparaffineringsbuffer. De varmebehandles for at nedbryde paraffinen og nedbryde cellerne, så DNA'et bliver blotlagt. Herefter sker en automatiseret oprensning, og det færdige eluat indeholder rent DNA. Ved væv, der skal analyseses for BRAF-mutation ved malignt melanom, udføres manuel oprensning af DNA.

Ved modtagelse af blod afpipetteres dette ned i et mikrorør, og blodet oprensnes automatiseret, og eluatet indeholder nu rent patient-DNA.

Efter oprensning af de forskellige prøvetyper måles til slut DNA-koncentrationen.





Informationen ligger i DNA'et. Den targeterede patientbehandling bygger blandt andet på det, bioanalytikerne finder i patientens DNA og gør dermed DNA'et til et centralt udgangspunkt i patientens udredningsforløb.



HE-snit med indtegnede område med de tumorceller der ønskes undersøgt. Vævsblokken microtomeres, og bioanalytikeren skærer området fra og skraber med en skalpel det udvalgte materiale ned i et eppendorffor, der oprenses og efterfølgende køres analyse på.



Analyseresultaterne, her i form af kurver ved q-PCR, kvalitetsikres og tolkes selvstændigt af bioanalytikerne.

Prøvernes gang i Udviklingslaboratoriet

Materialet kommer til Udviklingslaboratoriet, og afhængigt af materialetypen og den efterfølgende analyse er der forskellige præanalytiske forhold, prøven

skal igennem, inden den molekylære analyse kan udføres.

Patientmaterialet, der analyseres på, udvælges af patologer. Tumorer er ofte heterogene, og dermed er udvælgelsen af det rette materiale essentielt for den vi-

dere analyse. Ved mange af analyserne udvælges og markeres et helt specifikt tumorområde på et vedlagt HE-farvet snit, hvorved bioanalytikerne udfører en makrodissektion, når vævsblokken mikrotomeres. Vævssnittene skæres rent, hvilket vil sige, at mikrotomen rengøres, og kniven skiftes mellem hver patientprøve, så der ikke sker kontaminering.

Figur 1 illustrerer, hvordan de tre mest hyppige prøvematerialer bearbejdes, inden der udføres molekylære analyser.

Analysesvarene kvalitetssikres, og alle analyseresultaterne i form af blandt andet PCR-kurver og pyrogrammer tolkes af bioanalytikere, evt. i samråd med molekylærbiologer. Tolkning af laboratoriets FISH-analyser varetages af patologer. Det molekylære analysesvar er en del af en større svarafgivelse, som især bygger på morfologisk vurdering samt histokemiske og immunkemiske farvninger. Analysesvaret sendes direkte ud til patologerne, som giver svaret videre til de rekvirerende klinikere. Hermed er bioanalytikerne i Udviklingslaboratoriet med fra prøvens modtagelse til svarafgivelse og følger dermed selv hele analysen til dørs.

Et Udviklingslaboratorium

Som navnet på afdelingen også antyder, er Udviklingslaboratoriet ud over at være et laboratorium, der udfører molekylære rutineanalyser, også et laboratorium, hvor udvikling og forskning er i centrum.

Laboratoriet deltager ofte i opsætning af nye analyser, hvilket foregår i tæt samarbejde mellem afdelingens molekylærbiologer og bioanalytikerne. Her gør de to faggrupper brug af hinandens kompetencer og sammen udvikles nye analyseopsæt, der er til gavn for patienterne og deres videre behandling.

Laboratoriet beskæftiger sig med analyser inden for et område, hvor der er konstant udvikling og forskning. Dette stiller krav til afdelingen om hele tiden at være opdateret på den nyeste forskning og mulige behandlingsstrategier. Til dette er der blandt andet til afdelingen tilknyttet en klinisk farmakolog, der fungerer som et bindeled mellem laboratorium og klinik. Da man i dag netop kan målrette behandlingen til patienten, er det essentielt, at dette sammenholdes

med, hvad der i dag er muligt at behandle for, og hvad der i laboratoriet rent teknisk kan undersøges for. Den kliniske farmakolog er også med til at informere om, hvad der er på vej af nye behandlingsmuligheder inden for de forskellige kræftformer, og laboratoriets opgave er hermed at opsætte analyser, der kan efterkomme denne efterspørgsel.

I og med at bioanalytikerne ansat i Udviklingslaboratoriet hele tiden skal være med i den udvikling, der foregår i forbindelse med behandlingsmuligheder til kræftpatienter, er bioanalytikernes faglige udvikling essentiel. Hvert år afholdes inden for molekylærpatologien en erfa-dag, som er en dag, hvor bioanalytikere og molekylærbiologer fra hele landet mødes og deler deres viden og erfaring inden for de molekylærbiologiske analyser. På den måde er bioanalytikere også med til at udvikle og formidle faget og udvide deres kompetencer inden for feltet. Bioanalytikerne ansat i Udviklingslaboratoriet holder sig også opdateret på nye analyser og behandlingsmuligheder ved at deltage i diverse seminarer, kurser og foredrag om alt inden for kræftforskning og behandlingsmuligheder.

Udviklingslaboratoriet deltager ofte i projekter om behandlingsprotokoller sammen med Klinisk Forskningsenhed, hvor der skæres og sendes vævsprøver til andre lande. Yderligere er laboratoriet med til at udføre metodestudier for større molekylær-diagnostiske firmaer, hvor metoder i forbindelse med apparaturer og nye assays valideres.

Laboratoriet er nu også et af de steder, der analyserer patientprøver ved hjælp af Next Generation Sequencing (NGS), som er en teknologi, der sekventerer store dele af genomet eller hele genomet.

Netop nu er opsat en ny analyse, der

skal indgå i rutineanalyserne til patienter med ovariecancer for undersøgelse af mutationer i BRCA-genet.

Forskning i molekylærpatologien

I Udviklingslaboratoriet arbejder p.t. 6½ bioanalytikere fast med forskningsprojekter. Det er både langvarige forskningsprojekter for store medicinalfirmaer, der forløber over flere år, samt udførelse af mindre projekter for ph.d.-studerende, patologer, medicinstuderende og kandidatstuderende. Projekterne for medicinalfirmaerne er rettet mod nye behandlingsmuligheder for kræftpatienter i form af targeteret behandling. Mange af projekterne foregår i store internationale forskningsgrupper på tværs af lande, hvor forskningsbioanalytikerne indgår i tæt samarbejde med patologer, epidemiologer og molekylærbiologer.

Disse projekter ender ofte ud i publikationer, og bioanalytikerne deltager sommetider i udarbejdelse af artikelmanuskripterne. De bioanalytikere, der er ansat i forskningsstillinger, deltager ofte på kongresser i både Danmark og udlandet og er dermed opdateret inden for den nyeste forskning i targeteret patientbehandling og tumormarkører. I Udviklingslaboratoriet arbejdes der desuden med digital patologi. Digital patologi vil sige, at i stedet for at se på vævssnit i mikroskop ses der på det indscannede vævssnit på en computerskærm. En del af den digitale patologi er digital billedanalyse, hvor der anvendes software til at foretage kvantitative beregninger af tumormarkører og andre immunhistokemiske og histokemiske farvninger. Digital patologi er især udbredt inden for forskning, hvor det anvendes til at finde behandlingsmarkører, som både anvendes som prædiktive og prognostiske markører.

Bioanalytikernes rolle i udviklingen inden for targeteret patientbehandling

Targeteret patientbehandling bliver en større og større del af behandlingsmulighederne for kræftpatienter. Det er både favorabelt og i flere tilfælde livsvigtigt for patienten at få en skræddersyet behandling, der ikke skader andet end patientens tumorceller. Også for et presset sundhedsvæsen er denne udvikling inden for targeteret patientbehandling en gevinst. Ved at man kan undersøge, om patienten er modtagelig for behandlingen, kan der spares penge på dyre og unødvendige kemobehandlinger.

Den værdi, der ligger i de informationer, man i dag er i stand til at give ud fra molekylærbiologiske analyser, er dermed stor og spiller en afgørende rolle for både patienter og sundhedsvæsenet. At det mange steder, som blandt andet i Udviklingslaboratoriet, er bioanalytikere, der undersøger for og bidrager med denne information, er med til at placere vores faggruppe som en vigtig brik i det store puslespil, der i dag foreligger i et optimalt udrednings- og behandlingsforløb. Det er vigtigt, at patienten får den helt rette behandling, og dette er vi som bioanalytikere en del af.

Hvad er targeteret behandling?

Targeteret behandling er lægemidler som slår kræftceller ihjel ved at angribe et bestemt mål i kræftcellerne. Targeteret behandling kan f.eks. blokere stoffer, der får kræftceller til at vokse eller kan hjælpe immunsystemet til at dræbe kræftcellerne. Kaldes også målrettet behandling.

KILDE: KRÆFTENS BEKÆMPELSE CANCER.DK

REFERENCER

- (1) Cong Tan, Xiang Du. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer.
- (2) Li G-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. Cell Res. januar 2008;18(1):85-98.
- (3) Pollack SM, Schroeder B, Li Z, Cranmer L, Jones R. Targeting gastrointestinal stromal tumors: the role of regorafenib. OncoTargets Ther. maj 2016;3009.
- (4) Siegelin MD, Borczuk AC. Epidermal growth factor receptor mutations in lung adenocarcinoma. Lab Invest. februar 2014;94(2):129-37.
- (5) Kwak EL, Bang Y-J, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, m.fl. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer. N Engl J Med. 28. oktober 2010;363(18):1693-703.
- (6) Dimitrov L, Hong CS, Yang C, Zhuang Z, Heiss JD. New Developments in the Pathogenesis and Therapeutic Targeting of the IDH1 Mutation in Glioma. Int J Med Sci. 2015;12(3):201-13.
- (7) Thon N, Kretsch S, Kretsch FW. Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status. OncoTargets Ther. september 2013;1363.
- (8) Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob J-J, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, m.fl. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. J Transl Med. 2012;10(1):85.