

molecular mechanisms of lymphomagenesis. Disruption of programmed cell death is a key feature of many low-grade lymphomas, while more aggressive lymphoid tumors carry additional genetic alterations, e.g. in the molecular pathways that control the cell division cycle and DNA repair. The application of genetic analysis and gene expression profiling of lymphoid tumors may be used as diagnostic and prognostic tools, and may help identifying new targets for specific, biologically based treatment strategies, which can supplement or replace the conventional chemotherapy.

Reprints: *Kirsten Grønbaek*, Institut for Biologisk Kræftforskning, Kræftens Bekæmpelse, Strandboulevarden 49, DK-2100 København Ø.
E-mail: Kig@cancer.dk

Antaget den 27. januar 2003.

H:S Rigshospitalet, Patologisk Institut og Hæmatologisk Afdeling, og Kræftens Bekæmpelse, København, Institut for Biologisk Kræftforskning.

Litteratur

- Jaffe ES, Harris NL, Stein H et al, eds. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC Press, 2001.
- Hokland P, Pallisgaard N. Molecular biology in acute lymphoblastic leukemia. *Ugeskr Læger* 2001;163:4721-4.
- Svejgaard A, Madsen HO, Nyvold C et al. Molecular biology diagnosis and monitoring in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin-lymphoma. *Ugeskr Læger* 1996;158:7101-2.
- Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100:1177-84.
- Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T et al. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 2001;412:341-6.
- Lindstrom M, Wiman K. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 2002;12:381.
- Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002;2:175-87.
- Kutok JL, Aster JC. Molecular biology of anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2002;20:3691-702.
- Grønbaek K, Nedergaard T, Andersen MK et al. Concurrent disruption of cell cycle associated genes in mantle cell lymphoma: a genotypic and phenotypic study of cyclin D1, p16, p15, p53 and pRb. *Leukemia* 1998;12:1266-71.
- Grønbaek K, de Nully Brown P, Møller MB et al. Concurrent disruption of p16INK4a and the ARF-p53 pathway predicts poor prognosis in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Leukemia* 2000;14:1727-35.
- Garcia-Manero G, Daniel J, Smith TL et al. DNA Methylation of Multiple Promoter-associated CpG Islands in Adult Acute Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2002;8:2217-24.
- Grønbaek K, Worm J, Ralfkiaer E et al. ATM mutations are associated with inactivation of the ARF-TP53 tumor suppressor pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2002;100:1430-7.
- Kitada S, Pedersen IM, Schimmer AD et al. Dysregulation of apoptosis genes in hematopoietic malignancies. *Oncogene* 2002;21:3459-74.
- Grønbaek K, thor Straten P, Ralfkiaer E et al. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 1998;92:3018-24.
- Adida C, Haioun C, Gaulard P et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood* 2000;96:1921-5.
- Starostik P, Patzner J, Greiner A et al. Gastric marginal zone B-cell lymphomas of MALT type develop along 2 distinct pathogenetic pathways. *Blood* 2002;99:3-9.
- Streubel B, Lamprecht A, Dierlamm J et al. T(14;18)(q32;q21) involving IGH and MALT1 is a frequent chromosomal aberration in MALT lymphoma. *Blood* 2003 (i trykkes).
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-7.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000;403:503-11.
- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 2002;8:68-74.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 2002;346:1937-47.
- Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 2002;99:1745-57.

Solide tumorer

Molekylærbiologisk baseret klassifikation, prognose og terapi

STATUSARTIKEL

Claus Fenger & Stephen Hamilton Dutoit

En tumors biologiske opførsel bestemmes af individets genetiske disposition, de efterfølgende genetiske og epigenetiske forandringer, der giver anledning til den pågældende tumor, og organismens reaktion herpå. Disse forandringer fører også til det lysmikroskopiske billede, som har dannet basis for tumordiagnostikken gennem mere end hundrede år. Den hastigt tiltagende viden om tumorers molekylærbiologi har imidlertid betydet, at den klassiske makroskopiske og mikroskopiske vurdering i dag kan suppleres med en række undersøgelser, som giver mere præcise udsagn om tumorcellernes struktur og funktion. De nye undersøgelser

har blandt andet vist, at tumorer med nogenlunde ens lysmikroskopisk fænotype i virkeligheden kan repræsentere flere molekylærbiologiske varianter med forskellig biologisk opførsel.

Udviklingen er imidlertid gået lidt langsommere for solide tumorer end for de hæmatologiske neoplasier, der som regel er karakteriserede ved få og veldefinerede kromosomale forandringer, og hvoraf flere typer nu simpelthen defineres ved deres molekylære abnormiteter. Dette skyldes forskellige forhold. Tumorceller i solide tumorer er ofte vanskeligere at isolere og dyrke, hvilket besværliggør undersøgelser, som kræver metafasekromosomer. De genetiske forandringer er som regel meget komplekse, og under tumorrens udvikling kan der opstå adskillige subkloner med hver deres forandringer.

En lang række undersøgelser kan anvendes til molekylærbiologisk karakteristik af solide tumorer (1). Disse omfatter dels metoder til påvisning af større kromosomale forandringer (f.eks. fluorescens in situ-hybridisering, komparativ genomisk hybridisering og spektralkaryotypering), dels metoder til bestemmelse af mindre forandringer (f.eks. *polymerase chain reaction* [PCR] og sekvensanalyse). Specifik mRNA kan påvises med revers transskriptase (RT)-PCR. DNA- og RNA-sekvenser kan påvises in situ i biologisk materiale ved hjælp af in situ-hybridisering. DNA-analyser kan udføres på såvel friskt/frosset som formalinfikseret og paraffinindstøbt materiale. Til RNA-analyser foretrækkes friskt/frosset væv. For alle molekylærbiologiske undersøgelser gælder det, at repræsentativiteten må sikres ved lysmikroskopi af det umiddelbart tilgrænsende væv. Da solide tumorer typisk er heterogene og desuden indeholder non-neoplastiske elementer, kan påvisning af molekylære forandringer i tumorcellerne undertiden nødvendiggøre brug af teknikker som laserbaseret mikrodisektion.

Den store hyppighed af solide tumorer betyder, at behovet for enklere og billigere undersøgelser er stort. En sådan undersøgelse er immunhistokemi, hvor man kan påvise ikke blot tilstedeværelsen, men også lokaliseringen af stoffer i celler og væv ved hjælp af antistoffer. Teknikken er mest anvendt i diagnostik til karakteristik af tumorcellers fænotype, men bruges nu i stigende grad også til at undersøge for ændret genekspression og kan give oplysninger om f.eks. proliferationsrate og metastaseringssevne samt følsomhed for og udvikling af resistens over for terapeutika. Immunhistokemi har i flere sammenhænge vist sig at være af stort set samme værdi som de molekylærbiologiske teknikker (2, 3). Det er sandsynligt, at denne udvikling fortsætter, og at den immunhistokemiske metode i et vist omfang vil kunne supplere eller erstatte de mere komplicerede molekylærbiologiske undersøgelser. I de nedenfor valgte eksempler vil vi derfor omtale denne på lige fod med de øvrige teknikker.

Identifikation af risikogrupper

Karcinomer udgår fra områder med prækankrøse forandringer. Det er imidlertid ikke alle disse, som bliver invasive, og en selektion af patienter med øget risiko vil kunne medføre en bedre udnyttelse af ressourcer til opfølgingsprogrammer. For celleforandringer på cervix uteri er det således påvist, at kun læsioner inficeret med højrisikotyper af HPV indebærer risiko for cancer. HPV-typen kan bestemmes ved f.eks. PCR.

Kontrol efter behandling har som hovedformål at opspore recidiver, men også at finde nye cancere. For kolorektal cancer er det vist, at patienter med mikrosatellitinstabile (MSI)-cancer har en over fem gange øget relativ risiko for at få metakron cancer.

Klassifikation og prognose

Det vigtigste formål med tumorklassifikation er at forudsige det biologiske forløb. Molekylærbiologiske teknikker er ved at blive indført og har vist betydelige forskelle på mesenchymale og epitheliale tumorer.

Maligne mesenchymale tumorer

Sarkomer er relativt sjældne og fordelt på mange undertyper. Disse er hyppigt karakteriserede ved specifikke kromosomale forandringer, som ofte giver anledning til dannelse af fusionsgener. Udfaldet af molekylærbiologiske undersøgelser, herunder realtid-RT-PCR, kan være afgørende for såvel diagnose som prognose og valg af terapi ved f.eks. PNET/Ewings sarkom og neuroblastom (4).

Maligne epitheliale tumorer

For de langt hyppigere karcinomer er brugbare resultater kommet langsommere, da disse tumorer hyppigt viser mere komplekse og forskelligartede forandringer. For kolorektale cancere skete der dog et gennembrud, da det blev klart, at disse tumorer kunne inddeles i to grupper. Den største (ca. 85%) er karakteriseret ved kromosominstabilitet, typisk med deletioner af kromosom 18q og 17p og mutationer i K-ras og p53, og disse tumorer har ofte en dårlig prognose. De øvrige er karakteriserede ved MSI på grund af defekt funktion af *mismatch repair*-systemet, sidder oftest i højre del af colon og har en bedre prognose (3).

For renalcellekarcinom er det nu kendt, at translokation og deletioner af Hippel-Lindau-genet, der fungerer som tumorsuppressorgen, er forbundet med dårlig prognose. Molekylærbiologisk undersøgelse vil her ud over at give et prognostisk udsagn også kunne være medvirkende til opsporing af patienter med det sjældne von Hippel-Lindau-syndrom.

Minimal residualcancer

Trods formodet kurativ kirurgi får mange patienter senere recidiv. Dette skyldes okkulte mikrometastaser, og det er vist, at op til 85% af patienterne med solide maligne tumorer har cirkulerende tumorceller. Mange af disse celler overlever ikke, mens andre efter måneders hvilestadiet igen prolifererer til klinisk erkendelige metastaser. Påvisning af disseminerede tumorceller kan således være af afgørende betydning ved valg af adjuverende systemisk terapi. Cellerne optræder imidlertid i et meget lille antal og kan vanskeligt findes ved almindelig mikroskopi. Der er derfor i de senere år udviklet en række metoder til at påvise disse celler, herunder molekylærbiologiske i form af såvel DNA-teknikker med påvisning af specifikke ændringer i genomet som realtid-RT-PCR til påvisning af små mængder vævs- eller tumor-specifikt mRNA. Metoderne har været afprøvet på cancer fra mamma, lunger, prostata og tarm, men har alle vist sig at være forbundet med betydelige tekniske problemer og mulige fejlkilder, og indførelse i rutinen vil næppe ske de første par år (5). Nogle af disse metoder har imidlertid givet gode resultater ved identifikation af mikrometastaser i *sentinel node*.

Vejledning ved valg af terapi

De største landvindinger inden for dette område er sket inden for hæmatologiske sygdomme og mammacancer. Også for andre solide tumorer kan undersøgelser for receptorer være vejledende. Påvisning af aktiverende mutationer i c-kit-genet ved gastrointestinal stromal tumor (GIST) og andre

mesenkymale tumorer har ført til lovende resultater med behandling med tyrosinkinaseinhibitoren STI571 (Glivec, Novartis) (6).

For det langt hyppigere adenokarcinom i colon er det i flere arbejder vist, at effekten af kemoterapi (5FU) er størst over for tumorer med MSI og intakt p53 (7). For såvel planocellulære karcinomer i hoved-hals-området som for en række andre tumorer foregår forsøg med en anden tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 (Iressa), som blokerer *epidermal growth factor*-receptoren. Alle disse forandringer kan nu også påvises immunhistokemisk.

Inden for nervetumorer er der også sket fremskridt. Omkring 80% af oligodendrogliomerne har tab af 1p og evt. 19q. Forandringerne kan påvises ved PCR og betyder øget følsomhed for trestofbehandling (8). For tiden undersøges det, om analysen også skal udføres på beslægtede tumorer.

Hjælp til opsporing af arvelige cancere

Udredning af patienter med mulig arvelig cancer foretages af kliniske genetkere, men resultaterne af en patoanatomisk undersøgelse kan bevirke, at man har formodning om arvelighed som f.eks. ved diagnoserne medullært thyroideakarcinom (MEN type 2) eller lavt differentieret højresidig coloncancer (HNPCC). I sidstnævnte tilfælde vil molekylærbiologisk påvisning af MSI og normal metyleringsstatus for MLH1-genet styrke mistanken, ligesom immunhistokemisk undersøgelse for manglende ekspresion af MLH1, MSH2 eller MSH6 kan være vejledende for, i hvilket gen mutationen skal søges.

Perspektiver

For langt de fleste solide tumorer viser multivariat analyse af mulige prognostiske faktorer stadig, at klassifikation og stadienddeling ved lysmikroskopisk undersøgelse suppleret med immunhistokemi giver de sikreste udsagn for gruppen af patienter med bestemte, veldefinerede forandringer. Molekylærbiologiske undersøgelser har imidlertid allerede bidraget væsentligt til at forbedre den patoanatomiske diagnostik, hvilket afspejles i den gennemgående titel på de seneste udgaver af WHO's meget anvendte bogserie om klassifikation af tumorer (8). Udviklingen vil utvivlsomt fortsætte med stigende fart, og den tid er næppe fjern, da f.eks. kombinationen af *tissue microarrays* og *DNA-microarrays* vil muliggøre fastlæggelse af individuelle tumorprofiler og dermed mere specifik behandling (9, 10). Denne udvikling bør ske i et tæt samarbejde mellem patologer, molekylærbiologer og klinikere for at sikre korrekt indsamling af materiale, valg af indikation og metode og tolkning af resultater. Sådanne laboratorieafsnit er allerede indrettet på flere afdelinger og må som følge af de nødvendige betydelige økonomiske og personalemæssige ressourcer koncentreres på de største hospitaler.

Summary

Claus Fenger & Stephen Hamilton Dutoit: Solid tumours. Molecular biologically based classification, prognosis and therapy.

Ugeskr Læger 2003;165:905-7.

The introduction of molecular techniques into the routine diagnostic analysis of solid tumours has been slower than for hematological neoplasias, both because the former in general genetically are more heterogeneous and because their tumour cells are less accessible. This review presents examples of methods which can be used in the identification of risk groups, classification and prognosis of tumours, detection of minimal residual disease, choice of therapeutic strategy and tracing of possible hereditary cases. It is concluded that molecular laboratories should be established in connection with departments of pathology at the larger hospitals and that further development should take place through close collaboration between pathologists, molecular biologists, and clinicians.

Reprints not available. Correspondence to: *Claus Fenger*, Patologisk Institut, Odense Universitetshospital, DK-5000 Odense C.

Antaget den 21. januar 2003.

Odense Universitetshospital, Patologisk Institut, og

Århus Universitetshospital, Århus Kommunehospital, Patologisk Institut.

Vi takker for bidrag fra *Søren Daugaard, Annelise Krogdahl, Karen Ege Olsen, Bodil Laub Petersen, Birgitte Bruun Rasmussen, Henrik Daa Schröder, Mari- anne Hamilton Therkildsen og Mogens Vyberg.*

Litteratur

- O'Connor SL, Cho JH, McDonnell TJ. The application of molecular techniques to solid tumours. *Sem Diagn Pathol* 2002;19:94-103.
- Gown AM. Genogenic immunohistochemistry: a new era in diagnostic immunohistochemistry. *Curr Diagn Pathol* 2002;8:193-200.
- Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20:1043-8.
- Olsen RJ. Molecular approaches to sarcoma therapy. *Sarcoma* 2002;6:27-42.
- Pantel K, Otte M. Disseminated tumor cells: diagnosis, prognostic relevance and phenotyping. *Rec Results Cancer Res* 2001;158:14-24.
- Fletcher CDM, Berman JJ, Corles C et al. Diagnosis of gastrointestinal stromal tumors: a consensus approach. *Hum Pathol* 2002;33:459-65.
- Elsaleh H, Powell B, McCaul K et al. P53 alteration and microsatellite instability have predictive value for survival benefit from chemotherapy in stage III colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1343-9.
- Kleihues P, Webster KC, eds. Pathology and genetics. Tumors of the nervous system. Lyon: WHO, IARC Press, 2000:64.
- Kallioniemi O-P, Wagner U, Kononen J et al. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics* 2001;10:657-62.
- Gabrielson E, Berg K, Anbazhagan R. Functional genomics, gene arrays and the future of pathology. *Mod Pathol* 2001;14:1294-9.