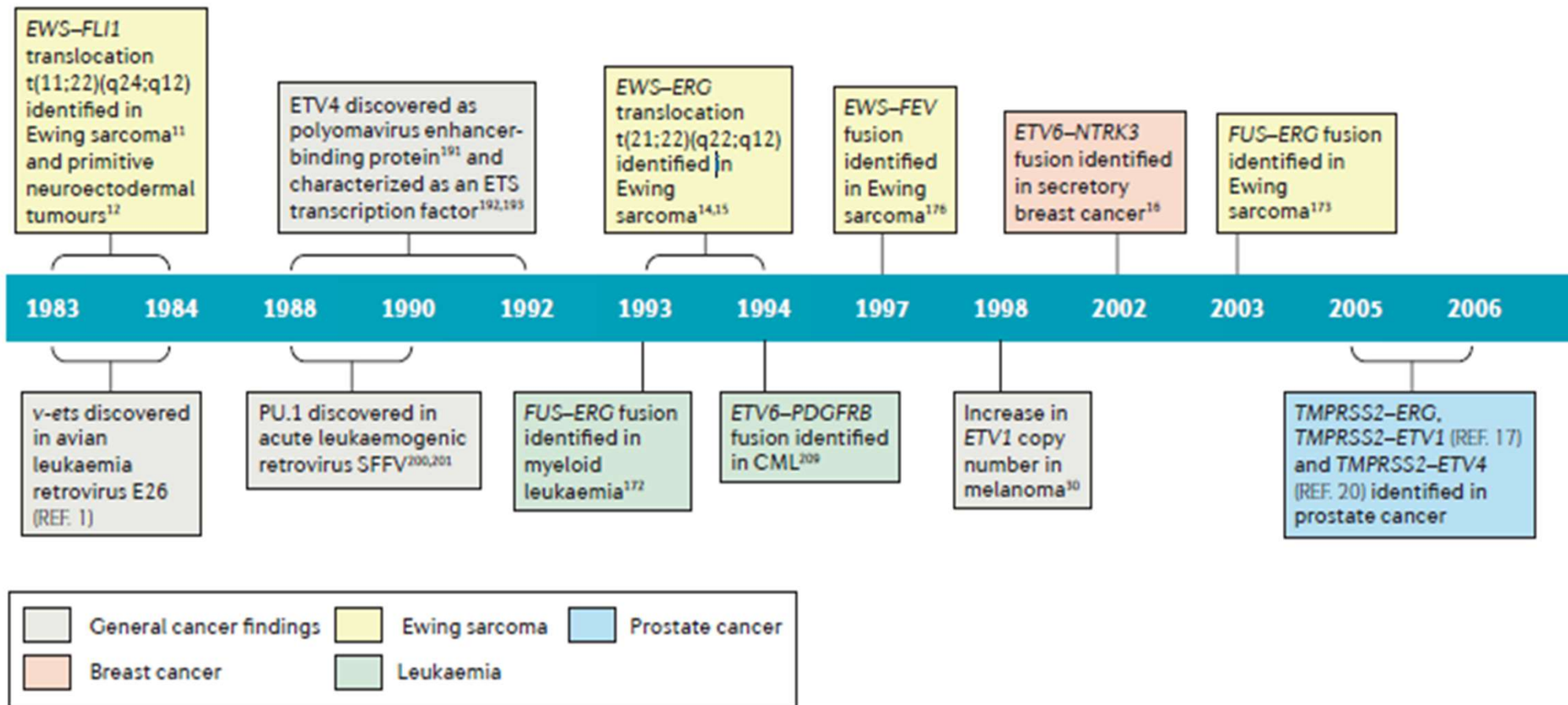


Η ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΩΝ ΣΑΡΚΩΜΑΤΩΝ – ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΟΓΕΝΩΝ ΟΓΚΩΝ

ΛΟΥΙΖΑ Γ. ΜΑΧΑΙΡΑ, Ph.D
ΤΜΗΜΑ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ
ΓΟΝΚ «Ο Άγιος Σάββας»

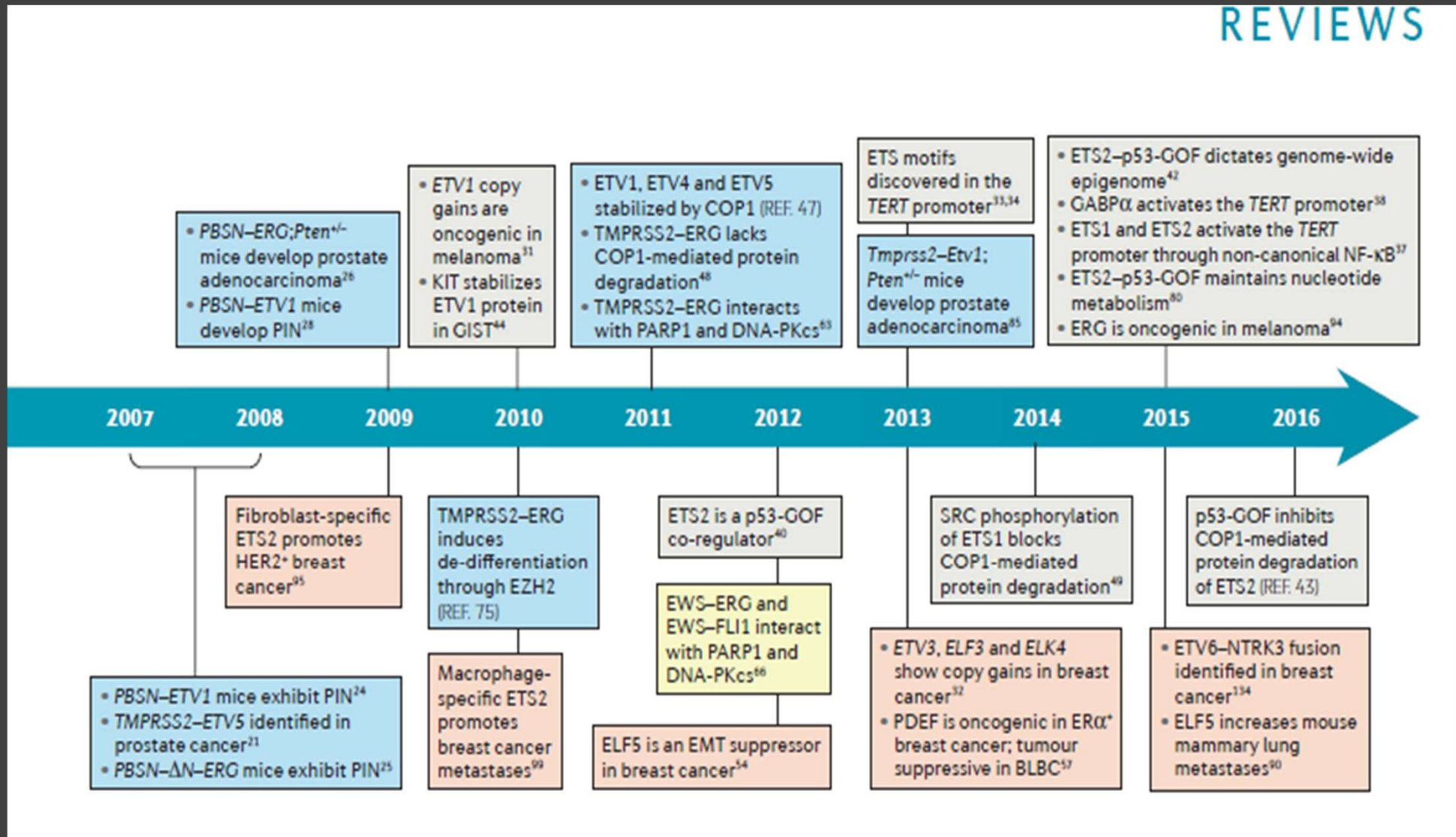


ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ



ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

REVIEWS



NCCN GUIDELINES FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER

NCCN is hiring: view current opportunities to join our team today. 



[About](#) [Donate](#) [News](#) [JNCCN](#) [Store](#)



Louisa Mahaira 

[Guidelines](#) [Compendia & Templates](#) [Education & Research](#) [Patient Resources](#) [Business & Policy](#) [Global](#)

 **Annual 2025 Conference**
March 28-30

NCCN
30th
ANNIVERSARY

**Tour research posters with an expert
and attend oral poster presentations!**



PRINCIPLES OF ANCILLARY TECHNIQUES USEFUL IN THE DIAGNOSIS OF SARCOMAS

TUMOR	ABERRATION	GENE(S) INVOLVED
<u>Malignant Round Cell Tumors</u>		
Alveolar RMS	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14) t(X;2)(q13;q35)	PAX3::FOXO1 PAX7::FOXO1 PAX3::AFX
Desmoplastic small round cell tumor	t(11;22)(p13;q12)	EWSR1::WT1
Embryonal RMS	Complex alterations	Multiple, MYOD1, KRAS, HRAS, TP53, NF1, NRAS, PIK3CA, FBXW7, FGFR4, BCOR
Ewing sarcoma/peripheral neuroectodermal tumor	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(2;22)(q33;q12) t(7;22)(p22;q12) t(17;22)(q12;q12) inv(22)(q12q;12) t(16;21)(p11;q22)	EWSR1::FLI1 EWSR1::ERG EWSR1::FEV EWSR1::ETV1 EWSR1::E1AF EWSR1::ZSG FUS::ERG
Undifferentiated round cell sarcoma	t(4;19)(q35;q13) or t(10;19)(q26;q13) inv(X)(p11.4p11.22)	CIC::DUX4 ⁴ BCOR::CCNB3 ⁵
<u>Lipomatous Tumors</u>		
ALT/WDLPS	Supernumerary ring chromosomes; giant marker chromosomes	Amplification of region 12q13-15, including MDM2, CDK4, HMGA2, SAS, GLI
Dedifferentiated liposarcoma	Same as for ALT/WDLPS	Same as for ALT/WDLPS
Myxoid/round cell liposarcoma	t(12;16)(q13;p11) t(12;22)(q13;q12)	FUS::DDIT3 EWSR1::DDIT3
Pleomorphic liposarcoma	Complex alterations	Unknown



National
Comprehensive
Cancer
Network®

NCCN Guidelines Version 4.2024 Soft Tissue Sarcoma

[NCCN Guidelines Index](#)
[Table of Contents](#)
[Discussion](#)

PRINCIPLES OF ANCILLARY TECHNIQUES USEFUL IN THE DIAGNOSIS OF SARCOMAS

TUMOR	ABERRATION	GENE(S) INVOLVED
Other Sarcomas		
Alveolar soft part sarcoma	der(17)t(X;17)(p11;q25)	<i>ASPL::TFE3</i>
Angiomatoid fibrous histiocyte	t(12;22)(q13;q12) t(2;22)(q33;q12) t(12;16)(q13;p11)	<i>EWSR1::ATF1</i> <i>EWSR1::CREB1</i> <i>FUS::ATF1</i>
Clear cell sarcoma	t(12;22)(q13;q12) t(2;22)(q33;q12)	<i>EWSR1::ATF1</i> <i>EWSR1::CREB1</i>
Congenital/infantile fibrosarcoma	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6::NTRK3</i> ⁶
Dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q21;q13) and derivative ring chromosomes	<i>COL1A1::PDGFB</i>
Desmoid fibromatosis	Trisomy 8 or 20; loss of 5q21	<i>CTNNB1</i> or <i>APC</i> mutations
High-grade endometrial stromal sarcoma	t(10;17)(q22;p13) t(x;22)(p11;q13)	<i>YWHAE::NUTM2</i> <i>ZC3H7B::BCOR</i> ⁷
Epithelioid hemangioendothelioma	t(1;3)(p36;q25) t(X;11)(p11.23; q22.1)	<i>WWTR1::CAMTA1</i> <i>YAP1::TFE3</i>
Epithelioid sarcoma	Inactivation, deletion, or mutation of <i>INI1</i> (<i>SMARCB-1</i>)	<i>INI1</i> (<i>SMARCB-1</i>)
Extrarenal rhabdoid tumor	Inactivation of <i>INI1</i> (<i>SMARCB-1</i>)	<i>INI1</i> (<i>SMARCB-1</i>)
Extraskelatal myxoid chondrosarcoma	t(9;22)(q22;q12) t(9;17)(q22;q11) t(9;15)(q22;q21) t(3;9)(q11;q22)	<i>EWSR1::NR4A3</i> <i>TAF2N::NR4A3</i> <i>TCF12::NR4A3</i> <i>TFG::NR4A3</i>
Sporadic and familial GIST Carney-Stratakis syndrome (gastric GIST and paraganglioma)	Activating kinase mutations Krebs cycle mutation	<i>KIT</i> or <i>PDGFRA</i> Germline <i>SDH</i> subunit mutations



National
Comprehensive
Cancer
Network®

NCCN Guidelines Version 4.2024

Soft Tissue Sarcoma

[NCCN Guidelines Index](#)
[Table of Contents](#)
[Discussion](#)

PRINCIPLES OF ANCILLARY TECHNIQUES USEFUL IN THE DIAGNOSIS OF SARCOMAS

TUMOR	ABERRATION	GENE(S) INVOLVED
Inflammatory myofibroblastic tumor (IMT)	t(1;2)(q22;p23) t(2;19)(p23;p13) t(2;17)(p23;q23) t(2;2)(p23;q13) t(2;11)(p23;p15) inv(2)(p23;q35)	TPM3::ALK ⁶ TPM4::ALK ⁶ CLTC::ALK ⁶ RANBP2::ALK ⁶ CARS::ALK ⁶ ATIC::ALK ⁶ ETV6::NTRK3 ^{6,8} TFG::ROS1 ^{8,9,10}
Leiomyosarcoma (LMS)	Complex alterations	Unknown
Low-grade fibromyxoid sarcoma/sclerosing epithelioid fibrosarcoma	t(7;16)(q33;p11) t(11;16)(p11;p11)	FUS::CREB3L2 FUS::CREB3L1
Malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST)		NF1, CDKN2A and EED or SUZ12
Mesenchymal chondrosarcoma	t(8;8)(q13;q21)	HEY1::NCOA2
NTRK-rearranged spindle cell neoplasm ^{a,11}	Multiple	NTRK 1, 2, 3
Solitary fibrous tumor	inv(12)(q13q13)	NAB2::STAT6
Synovial sarcoma	t(X;18)(p11;q11); t(X;18)(p11;q11); t(X;18)(p11;q11)	SS18::SSX1; SS18::SSX2; SS18::SSX4
Tenosynovial giant cell tumor/pigmented villonodular synovitis (TGCT/PVNS)	CSF1 rearrangements	Multiple ¹²⁻¹⁴

^a Emerging entity; NGS testing is preferred.

⁶ Yamamoto H, Yoshida A, Taguchi K, et al. ALK, ROS1 and NTRK3 gene rearrangements in inflammatory myofibroblastic tumours. Histopathology 2016;69:72-83.

⁸ Taylor MS, Chougule A, MacLeay AR, et al. Morphologic overlap between

¹¹ Davis JL, Al-Ibraheemi A, Rudzinski ER, Surrey LF. Mesenchymal neoplasms with NTRK and other kinase gene alterations. Histopathology 2022;80:4-18.

¹² Ho J, Peters T, Dickson BC, et al. Detection of CSF1 rearrangements deleting the 3' UTR in tenosynovial giant cell tumors. Genes Chromosomes Cancer. 2008;50:99-105.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟΠΟΙΗΣΗΣ

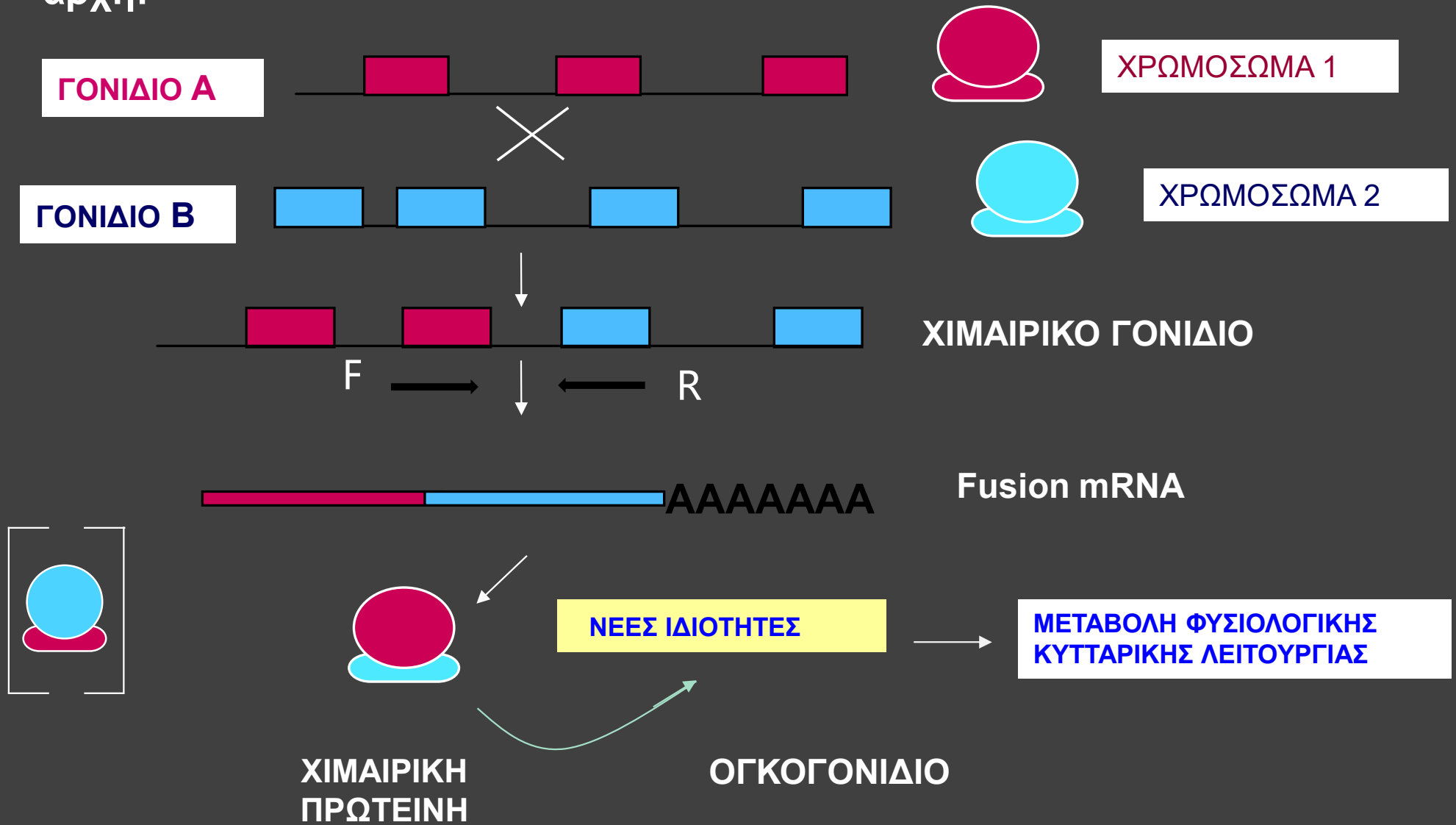
ΑΝΟΣΟΙΣΤΟΧΗΜΕΙΑ

ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ (ΚΑΡΥΟΤΥΠΟΣ όχι πια)

ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ (FISH)

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: RT-PCR
SANGER SEQUENCING
NEXT GEN SEQ

Σχηματισμός χιμαιρικού γονιδίου - Γενική αρχή:



Γιατι μελετούμε τα χιμαιρικά γονίδια σε επίπεδο RNA και όχι σε επίπεδο DNA στις τεχνικές της Μοριακής Γενετικής

Τα σημεία θραύσης των χιμαιρικών γονιδίων μπορεί να ποικίλουν και να κατανέμονται σε μεγάλη έκταση του DNA (**χιλιάδες βάσεις**), δημιουργώντας προβλήματα στην έγκυρη ανίχνευση τους.

Αντιθέτως, τα σημεία αυτά έρχονται πολύ κοντά (απόσταση που κυμαίνεται στις 500bp) στα ώριμα μόρια του χιμαιρικού mRNA μετά το μάτισμα.

Έτσι, με υπόστρωμα ολικό κυτταρικό RNA (περιέχει το σύνολο των μεταγράφων, κανονικών και χιμαιρικών) συντίθεται συμπληρωματικό (complementary DNA, cDNA). Το cDNA είναι απαλλαγμένο από ιντρόνια, οπότε η ενίσχυση των χιμαιρικών αλληλουχιών είναι ευχερέστερη.

Οπότε αντί για χιμαιρικά γονίδια στην ουσία ανιχνεύονται **χιμαιρικά μετάγραφα**

ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΝΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΟΓΕΝΟΥΣ ΟΓΚΟΥ

Επιλογή κατάλληλης μεθοδολογίας για την απομόνωση ολικού RNA.

Προσδιορισμός της ποιότητας και της συγκέντρωσης του απομονωμένου υλικού.

Επιλογή της κατάλληλης μοριακής τεχνικής για την ανίχνευση της αλληλουχίας ενδιαφέροντος.

ΤΙ ΕΙΔΟΥΣ ΥΛΙΚΟ ΦΤΑΝΕΙ ΣΤΟ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

Υλικό μετά από χειρουργική επέμβαση ή από βιοψία

Μπορεί να είναι: Νωπός ιστός (ελάχιστες περιπτώσεις)

Μονιμοποιημένο υλικό που περίσσεψε μετά
την παθολογοανατομική εξέταση

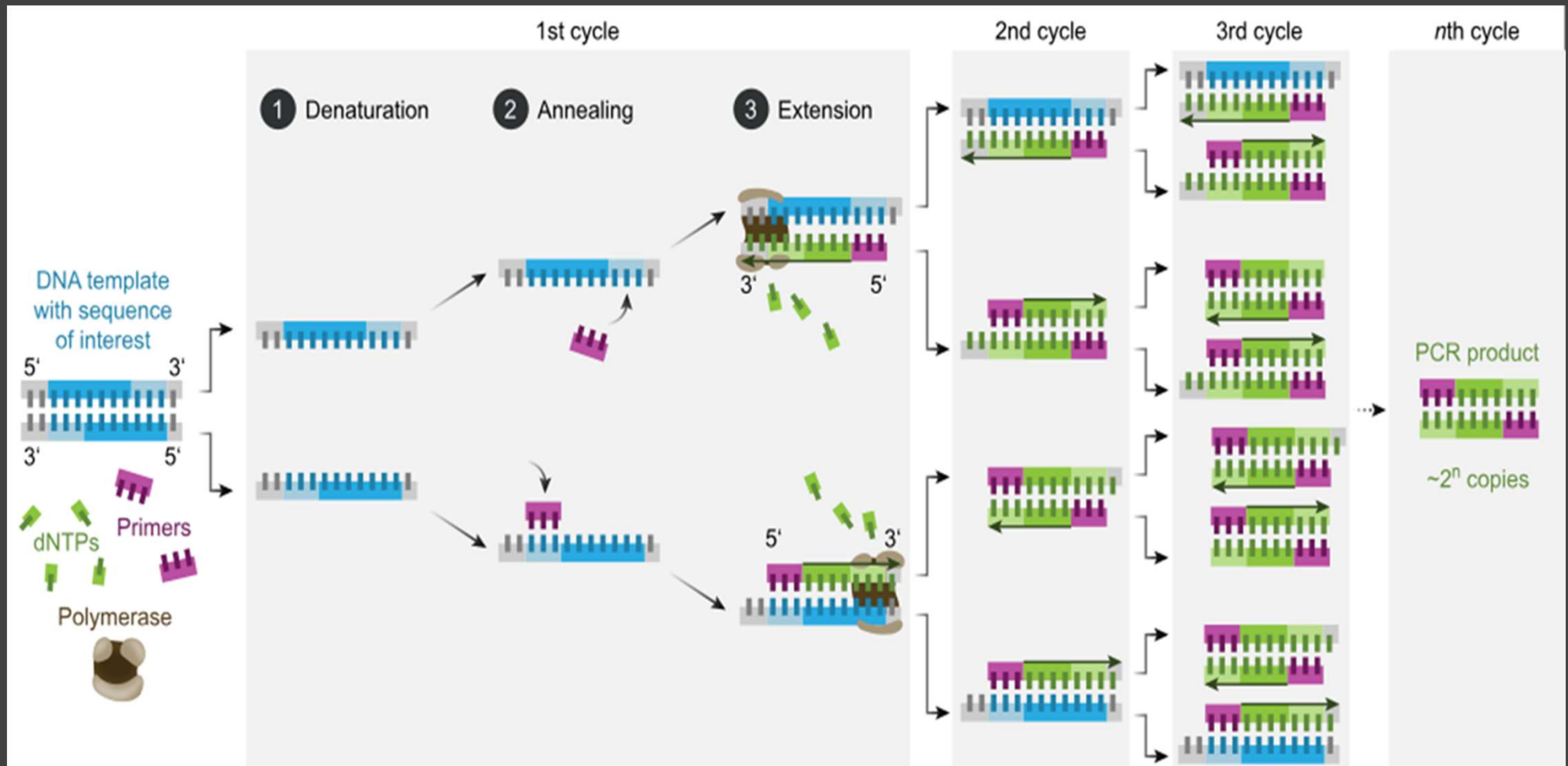
ΠΟΙΑ ΤΑ ΘΕΤΙΚΑ ΚΑΙ ΤΑ ΑΡΝΗΤΙΚΑ ΚΑΘΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ ?

Απομόνωση νουκλεϊκών οξέων

Αποτελεί το πρώτο βήμα στις αναλύσεις DNA και RNA

- ✓ Απομόνωση **με χρήση απλών χημικών αντιδραστηρίων** (όχι πια σε κλινική εφαρμογή)
- ✓ Απομόνωση **με εμπορικά κιτ** που περιέχουν όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια και λεπτομερείς οδηγίες
- ✓ Απομόνωση με **αυτοματοποιημένες μεθόδους**
 - (+) εκμηδένιση του κινδύνου επιμόλυνσης από δείγμα σε δείγμα
 - (+) σύντομος χρόνος απομόνωσης (τυπικά 30-45 λεπτά για 6 έως 16 δείγματα)
 - (+) ελάχιστη ενασχόληση του χειριστή
 - (-) απομόνωση γενετικού υλικού από πιο «δύσκολες πηγές»
 - (-) υψηλό κόστος

Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

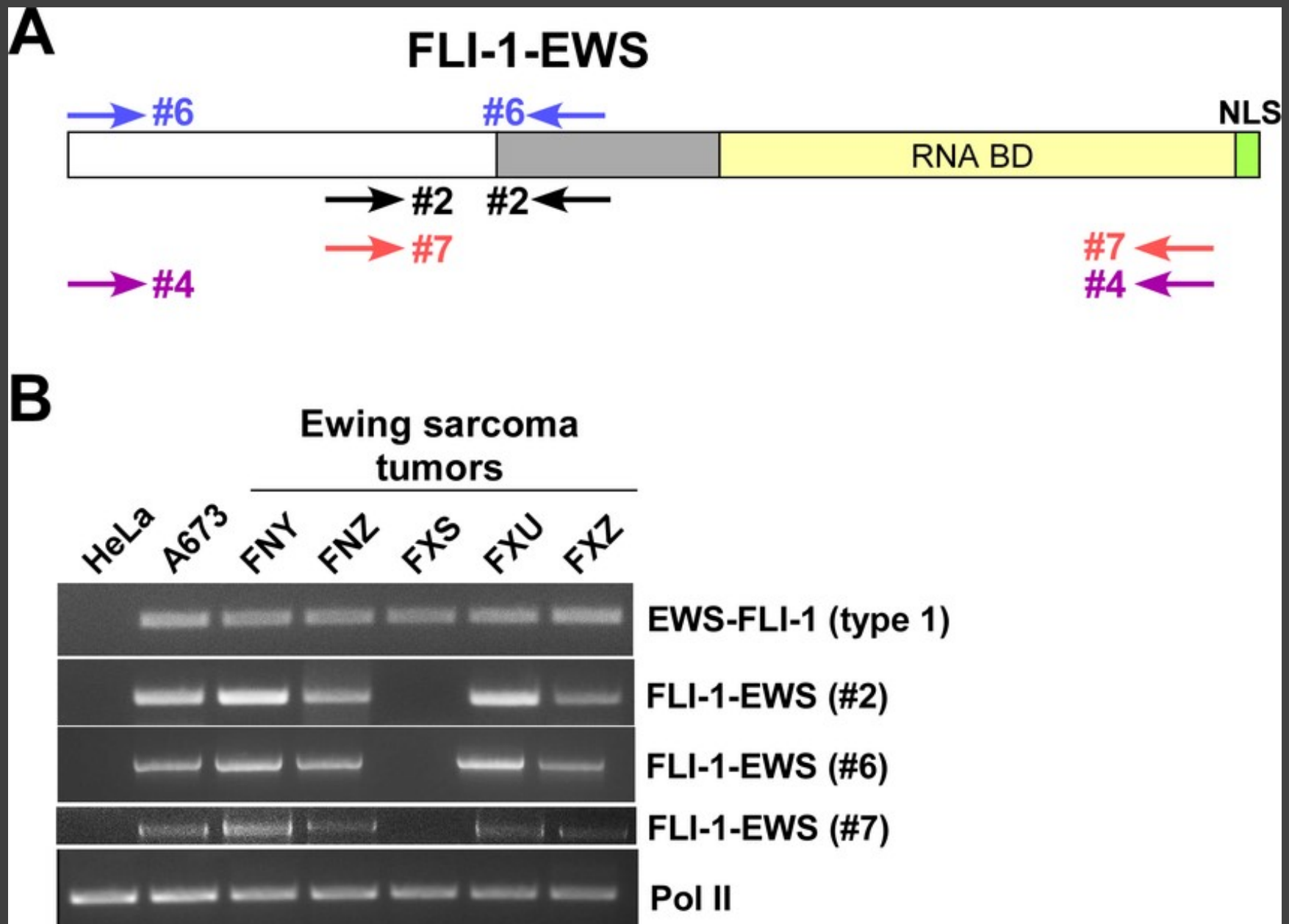


Προβληματισμοί σχετικά με την PCR

- Επεξεργασία των δειγμάτων και η **προ-αναλυτική φάση** (υλικό κακής ποιότητας)
- Αναστολείς: Ηπαρίνη, αιμοσφαιρίνη, λακτοφερρίνη
- Σχεδιασμός των εκκινητών : με τη χρήση **on line tools** (**primer3plus.com**)
- Επιμόλυνση

ΕΙΝΑΙ ΙΣΩΣ Η ΠΙΟ ΠΟΛΥΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΜΟΡΙΑΚΗ ΤΕΧΝΙΚΗ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΙ ΟΥΣΙΑΣΤΙΚΑ ΤΗΝ **ΚΑΡΔΙΑ** ΟΛΩΝ ΤΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΑΙΧΜΗΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΣΗΜΕΡΑ.

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΧΙΜΑΙΡΙΚΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΩΝ ΤΟΥ EWS/FLI1



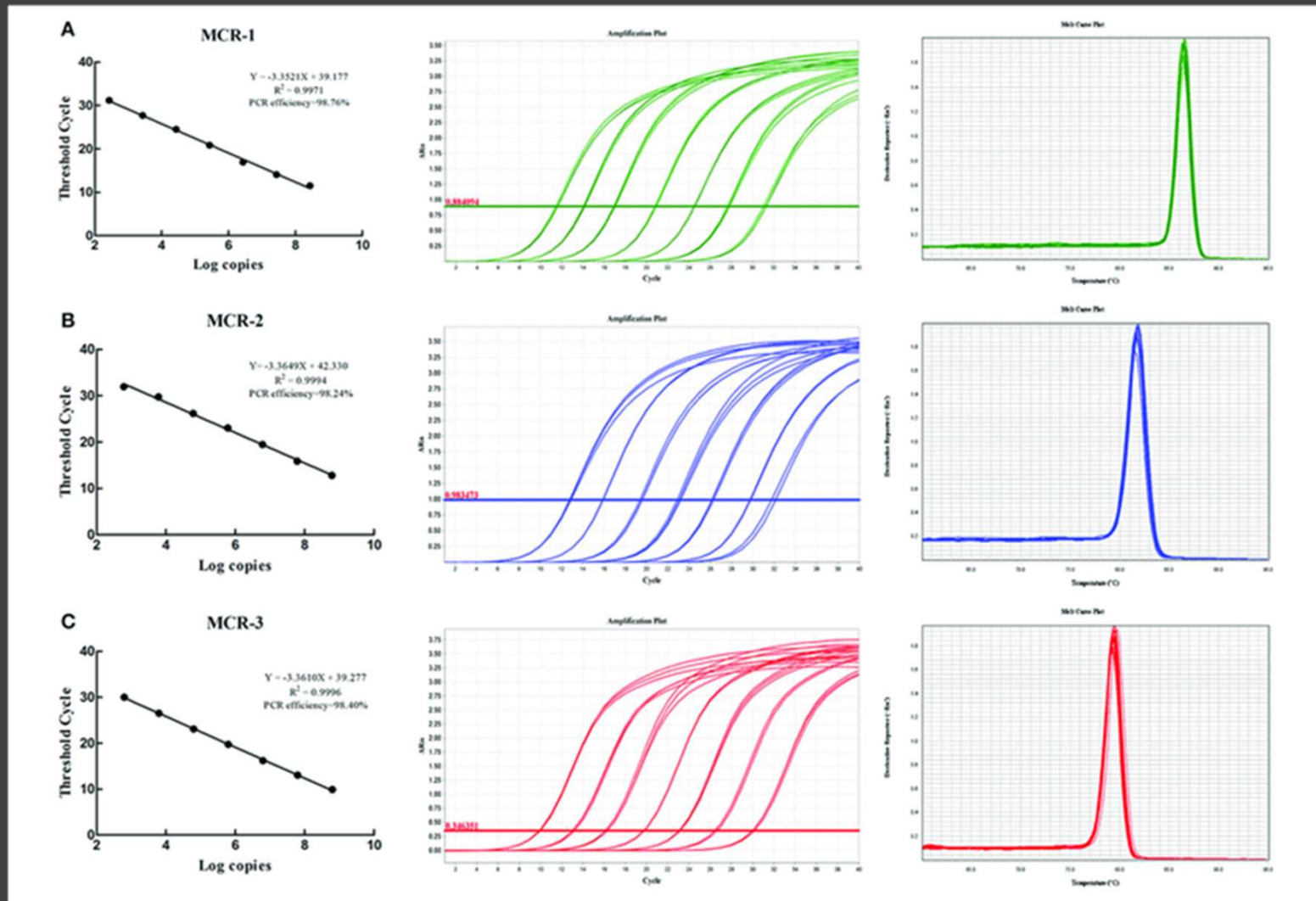
Ανίχνευση των προϊόντων ενίσχυσης qRT-PCR

- ✓ Πολλαπλασιασμός – ανίχνευση – **ποσοτικοποίηση** τμήματος cDNA (μήτρας) σε πραγματικό χρόνο
- ✓ Μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα, σε μικρότερο χρόνο από PCR
- ✓ Χρήση αυτοποιημένου μηχανήματος - ανάλυση και ποσοτικοποίηση του σήματος φθορισμού- ανίχνευσης της μήτρας
- ✓ Ένταση φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων σε κάθε κύκλο της αντίδρασης
- ✓ Threshold/Κατώφλι (το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το βασικό επίπεδο (baseline)).

ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΙΣΜΟΙ: Η απόδοση της μεθόδου εξαρτάται κατά βάση από την ποιότητα του αρχικού υλικού (**προ-αναλυτική φάση**)

Quantitative Real Time PCR

Η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του συντιθέμενου προϊόντος και σχετίζεται άμεσα με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος.



Συνοψίζοντας μέχρι εδώ:

Όταν έρχεται ένα υπό εξέταση υλικό στο εργαστήριο απομονώνουμε RNA και χρησιμοποιούμε μια από τις προαναφερθείσες τεχνικές για την ανίχνευση κάποιου συγκεκριμένου χιμαιρικού γονιδίου.

Σε όλες τις περιπτώσεις ψάχνουμε **ένα συγκεκριμένο χιμαιρικό γονίδιο**

Αυτό συνήθως καθορίζεται από τον Παθολογοανατόμο που έχει αναλύσει ήδη το υλικό και με βάση συγκεκριμένους δείκτες και άλλα στοιχεία της ανατομίας, της ιστολογίας κλπ του όγκου υποθέτει ότι πρόκειται για κάποιο συγκεκριμένο τύπο όγκου που είναι ήδη γνωστό ότι χαρακτηρίζεται από την παρουσία συγκεκριμένου χιμαιρικού γονιδίου.

Αυτό όμως δεν ισχύει ΠΑΝΤΑ.

Υπάρχουν πολλές περιπτώσεις που η «υπόθεση εργασίας» μας ΔΕΝ επιβεβαιώνεται.

ΤΙ ΚΑΝΟΥΜΕ ΟΤΑΝ

ΔΕΝ ΓΝΩΡΙΖΟΥΜΕ ΚΑΝ ΓΙΑ ΠΟΙΟ ΧΙΜΑΙΡΙΚΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΨΑΞΟΥΜΕ?

ΥΠΑΡΧΟΥΝ ΠΑΡΑΠΑΝΩ ΑΠΟ ΜΙΑ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΤΕΝΕΡ ΓΙΑ ΈΝΑ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΓΟΝΙΔΙΟ (όπως ΣΥΜΒΑΙΝΕΙ ΜΕ ΤΟ EWSR1)??

Η ΑΡΧΙΚΗ ΥΠΟΘΕΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΝ ΕΠΑΛΗΘΕΥΕΤΑΙ ΜΕ ΚΑΜΙΑ ΤΕΧΝΙΚΗ (FISH , RT-PCR)??

NEXT GENERATION SEQUENCING

The impact of next generation sequencing on sarcoma diagnosis.

2020 ASCO Annual Meeting

Background: The rarity and heterogeneity of sarcoma has been complicating the diagnosis of sarcoma for years. Even expert pathologists of sarcoma could make mistakes in the diagnosis of this disease. The availability of Next Generation Sequencing (NGS) data enabled more accurate diagnosis of sarcoma. In this study, we systematically described the application of NGS on the diagnosis of sarcoma and the contribution of NGS to the diagnostic accuracy of sarcoma. **Methods:** A multi-center, retrospective study included 235 sarcoma patients' tumor and paired normal samples that were sent from 56 hospitals to a College of American Pathologists (CAP) accredited and Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) certified laboratory, at Shanghai, China for Next Generation Sequencing (NGS) was performed. Using next generation sequencing based YS panel consisting 450 genes, these 235 sarcoma patients' sample were sequenced and the NGS data was analyzed. The initial diagnosis without NGS information was reconsidered by expert pathologists. **Results:** Taking into consideration both the initial diagnosis and the NGS results, the final diagnosis of these 235 sarcoma cases included 8 low grade malignant fibromyxoid tumors, 11 dermatofibrosarcoma protuberans (DFSP), 38 myxoliposarcomas, 22 alveolar rhabdomyosarcomas, 11 alveolar soft tissue sarcoma, 2 desmoplastic small round cell tumors, 37 *NTRK* rearrangement spindle cell tumors, 40 Ewing' s sarcoma and 66 synoviosarcomas. **In total, 29% initial diagnoses were changed according to NGS identified fusions,** including 13% low grade malignant fibromyxoid tumors (1 *FUS-CREB3L2* fusion), 27% DFSPs (3 *COL1A1-PDGFB* fusions), 11% myxoliposarcomas (3 *FUS-DDIT3* fusions and 1 *EWSR1-DDIT3* fusion), 14% alveolar rhabdomyosarcomas (2 *PAX7-FOXO1* fusions and 1 *FOXO1-LINC00598* fusion), 18% alveolar soft tissue sarcomas (2 *ASPSCR1-TFE3* fusions), 50% desmoplastic small round cell tumor (1 *EWSR1-WT1* fusion), 95% *NTRK* rearrangement spindle cell tumors, 13% Ewing' s sarcomas (3 *EWSR1-FLI1* fusions and 2 *EWSR1-ERG* fusions) and 21% synoviosarcomas (9 *SS18-SSX1* fusions and 5 *SS18-SSX2* fusions). **Conclusions:** NGS would be highly recommended for accurate diagnosis of sarcoma, especially for *NTRK* rearrangement spindle cell tumor, the majority of which were confirmed according to NGS identified fusions.

Χρονολόγιο της «εξέλιξης» στην αλληλούχιση βιομορίων

Illumina workflow

454system-1st NGS machine

IonTorrent workflow

3rd generation sequencing
Real-time-single molecule seq

1953: Sequencing of insulin protein²

1965: Sequencing of alanine tRNA⁴

1968: Sequencing of cohesive ends of phage lambda DNA⁶

1977: Maxam–Gilbert sequencing⁹

1977: Sanger sequencing⁸

1981: Messing's M13 phage vector¹²

1986–1987: Fluorescent detection in electrophoretic
sequencing^{14,15,17}

1987: Sequenase¹⁸

1988: Early example of sequencing by stepwise dNTP
incorporation¹³⁹

1990: Paired-end sequencing²³

1992: Bodipy dyes¹⁴⁰

1993: *In vitro* RNA colonies³⁷

1996: Pyrosequencing⁴⁴

1999: *In vitro* DNA colonies in gels³⁸

2000: Massively parallel signature sequencing by ligation⁴⁷

2003: Emulsion PCR to generate *in vitro* DNA colonies on beads⁴²

2003: Single-molecule massively parallel sequencing-by-synthesis^{33,34}

2003: Zero-mode waveguides for single-molecule analysis⁵⁷

2003: Sequencing by synthesis of *in vitro* DNA colonies in gels⁴⁹

2005: Four-colour reversible terminators^{51–53}

2005: Sequencing by ligation of *in vitro* DNA colonies on beads⁴¹

2007: Large-scale targeted sequence capture^{93–96}

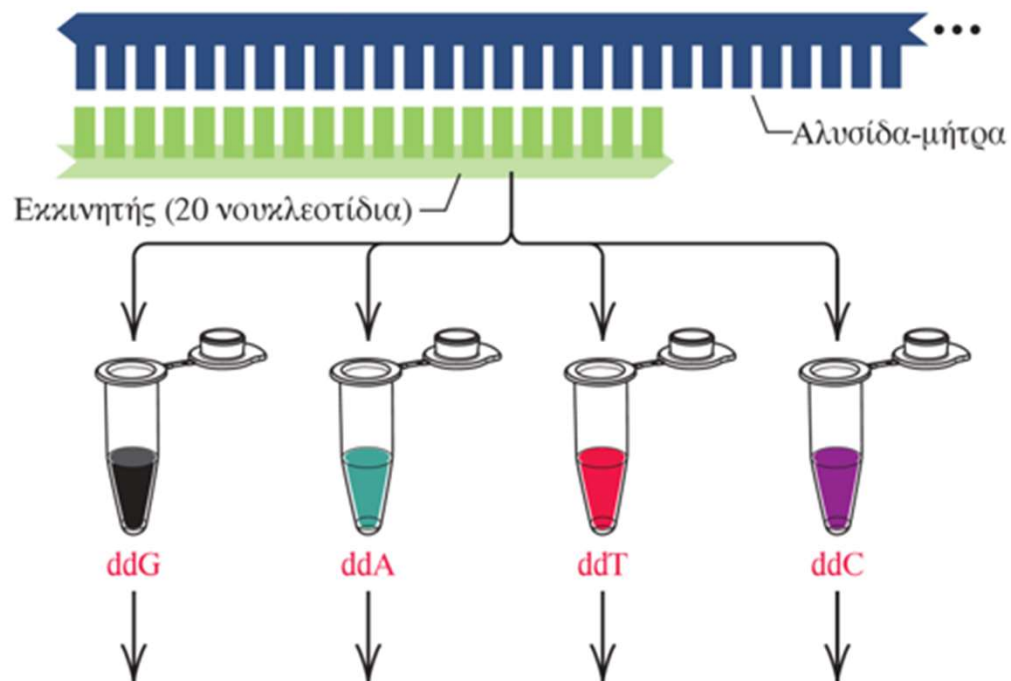
2010: Direct detection of DNA methylation during single-molecule
sequencing⁶⁵

2010: Single-base resolution electron tunnelling through a solid-
state detector¹⁴¹

2011: Semiconductor sequencing by proton detection¹⁴²

2012: Reduction to practice of nanopore sequencing^{143,144}

2012: Single-stranded library preparation method for ancient DNA¹⁴⁵

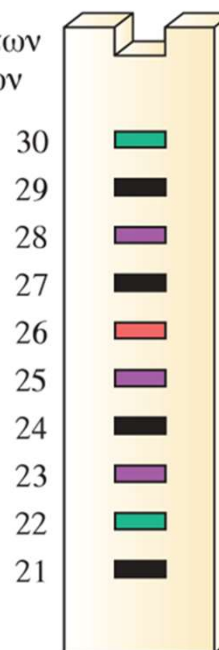


Η σύνθεση συνεχίζεται μέχρι να ενσωματωθεί ένα διδεοξυνουκλεοτίδιο (G, A, T ή C).

ΜΕΘΟΔΟΣ SANGER ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ

Οι τέσσερις αντιδράσεις αναλύονται μαζί στην ίδια διαδρομή ενός πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

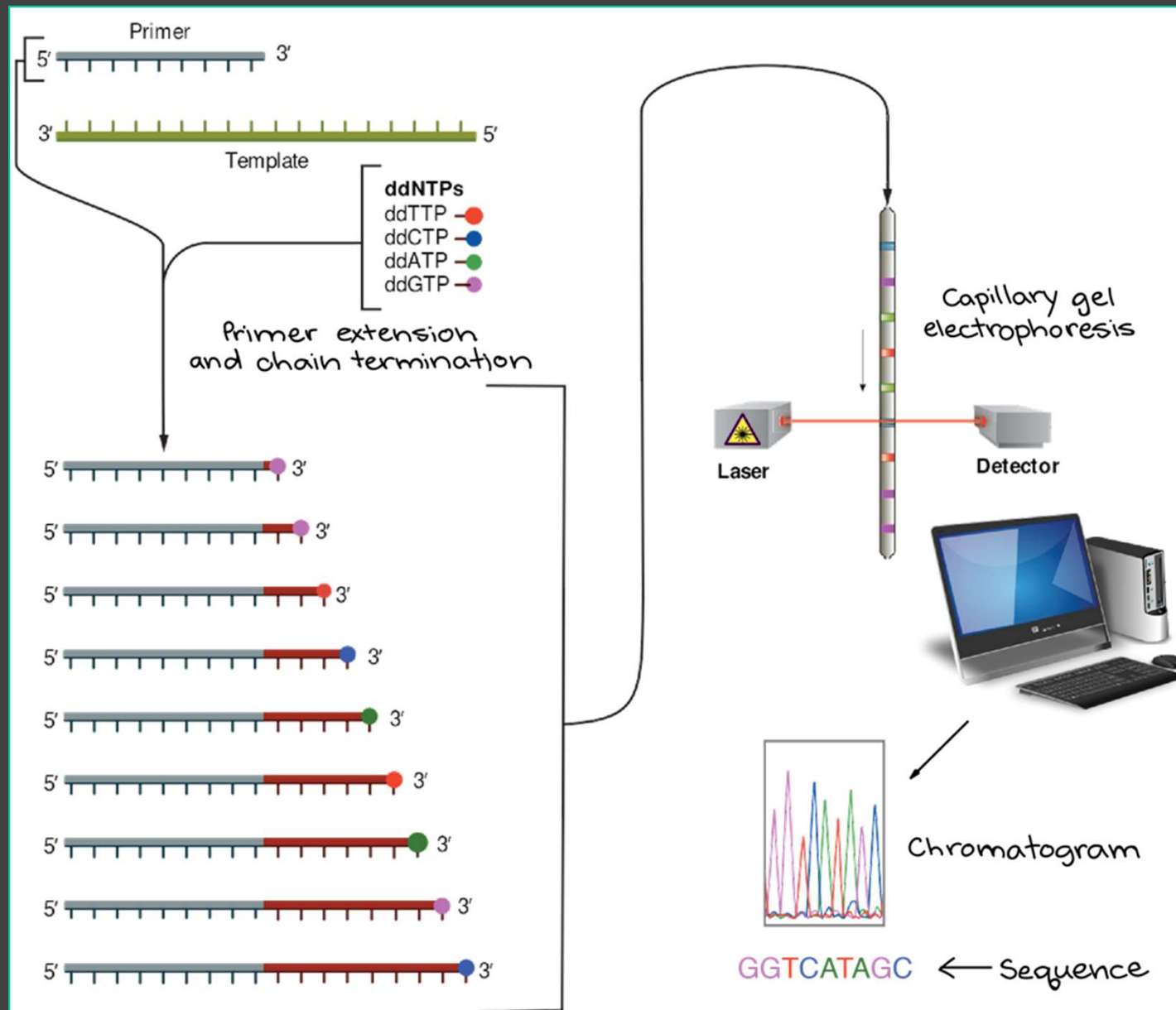
Μήκος των
τμημάτων
DNA

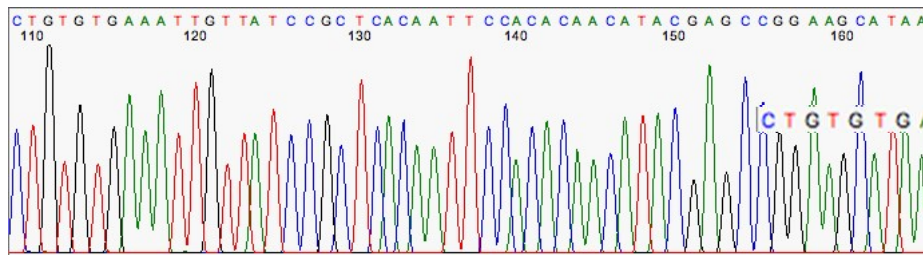


Αλληλουχία των τετραμοτίμων σε διδεοξυνουκλεοτίδια κομματιών από τον εκκινητή και μετά

Αυτή η αλληλουχία είναι συμπληρωματική προς την αλυσίδα-μήτρα του DNA.

ΜΕΘΟΔΟΣ SANGER ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ





CTGTGTGAAATTTGTTATCTCGCTCACAAATTCACACAACAATACGAGCCGGAAAGCATAA

Fasta ή FASTA

Fasta

1. Η πρώτη γραμμή περιγράφει το είδος του βιολογικού δείγματος.
2. Μετά το σύμβολο > περιγραφή της αλληλουχίας.
3. Στις επόμενες γραμμές η αλληλουχία (συνήθως) των νουκλεοτιδίων ανά γραμμή.

```
>NZ_CP050202.1:4372567-4375353 Escherichia coli strain RH-045-CS DNA polymerase I
ATGGTTCAGATCCCCAAATCCACTTATCCTTGTAGATGGTTCATCTTATCTTTATCGCGCATATCACG
CGTTTCCCCCGTGACTAACAGCGCAGGCGAGCCGACCGGTGCGATGTATGGTGTCTCAACATGCTGCG
CAGTCTGATCATGCAATATAAACCGACGCATGACGCGGTGGTCTTTGACGCCAAGGGAAAAACCTTCGT
GATGAACGTGTTGAACATTACAAATCACATCGCCCGCAATGCCGACGATCTGCGTGCACAAATCGAAC
CTTTGCACGCGATGGTTAAAGCGATGGGACTGCCGCTGCTGGCGGTTTCTGGCGTAGAAGCGGACGACGT
TATCGGTACTCTGGCGCGCAAGCCGAAAAAGCCGGGCGTCCGGTGTGATCAGCACTGGCGATAAAGAT
ATGGCGCAGCTGGTGACGCCAAATATTACGCTTATCAACACTATGACGAATACCATCCTCGACCGGAAG
AGGTGGTGAATAAGTACGGCGTGCCGCGAGAATTGATCATGACTTCTGGCGTGATGGTGACTCCTC
TGATAACATTCCAGGCGTACCGGGCGTCCGGTGAAAAACCGCACAGGCATTGCTGCAAGGTCTTGGCGGA
CTGGATACGCTGTATGCCGAGCCAGAAAAATTGCCGGTTGAGCTTCCGTGGCGCAAAACAAATGGCAG
CGAAGCTCGAGCAAAACAAGAAGTTGCTTATCTCTCATACCAGCTGGCGACGATTAACACCGACGTTGA
ACTGGAGCTGACCTGCGAACAACTGGAAGTGCAGCAACCGGACGCGGAAGAGTTGTTGGGGCTGTTCAAA
```

BLAST® » blastn suite

blastn blastp blastx tblastn tblastx **Standard Nucleotide BLAST**

BLASTN programs search nucleotide databases using a nucleotide query sequence.

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) [?](#) [Clear](#)

Query subrange [?](#)

From

To

Or, upload file No file selected. [?](#)

Job Title

Enter a descriptive title for your BLAST search [?](#)

☐ Align two or more sequences [?](#)

Choose Search Set

Database ☒ Standard databases (nr etc.): ☐ rRNA/ITS databases ☐ Genomic + transcript databases ☐ Custom ☐ [?](#)

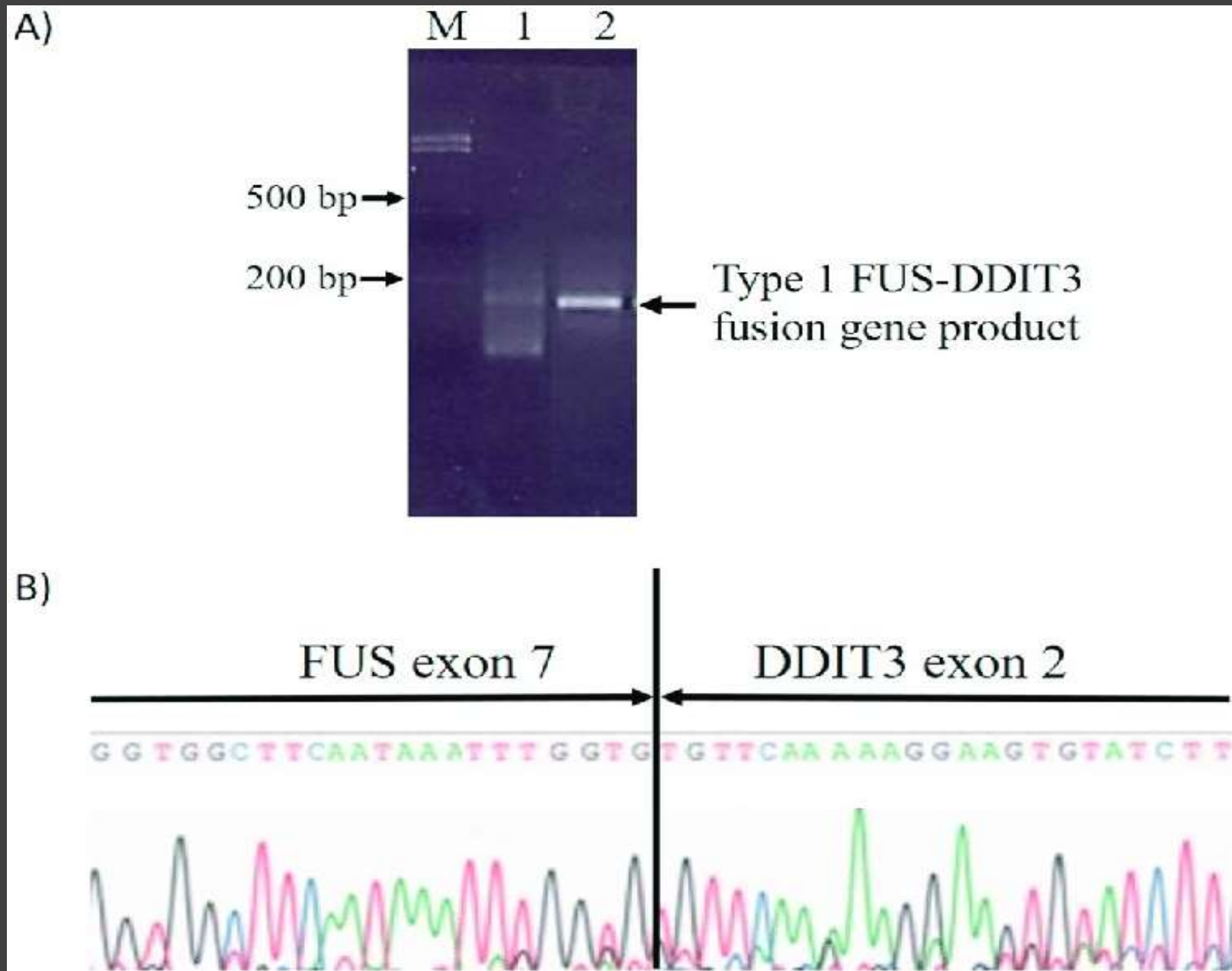
Nucleotide collection (nr/nt) [?](#)

BLAST

B L A S T

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΠΟΥ «ΔΙΑΒΑΣΑΜΕ»

Επιβεβαίωση ευρημάτων PCR ένας στόχος κάθε φορά!!!



ΠΟΙΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΟΔΗΓΗΣΑΝ ΣΤΗΝ ΑΥΞΑΝΟΜΕΝΗ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΑΖΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ?

ΑΝΑΓΚΗ ΓΙΑ ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΗ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΑ

ΡΑΓΔΑΙΑ ΕΞΕΛΙΞΗ ΣΤΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ

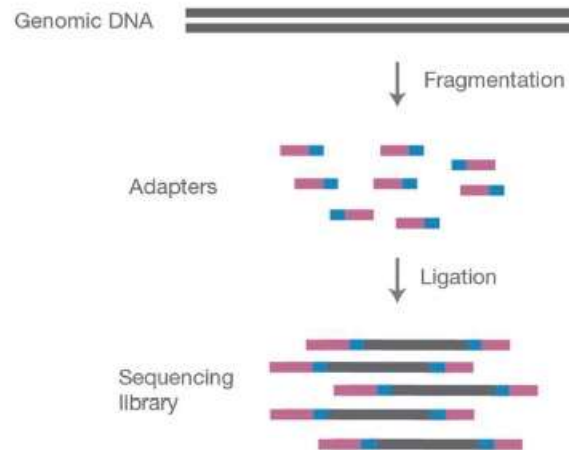
ΑΥΞΗΜΕΝΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ ΤΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΗΣ ΚΟΙΝΟΤΗΤΑΣ
ΓΙΑ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΜΕΝΟΥΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ

ΣΤΡΟΦΗ ΠΡΟΣ ΤΗΝ ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗ ΙΑΤΡΙΚΗ

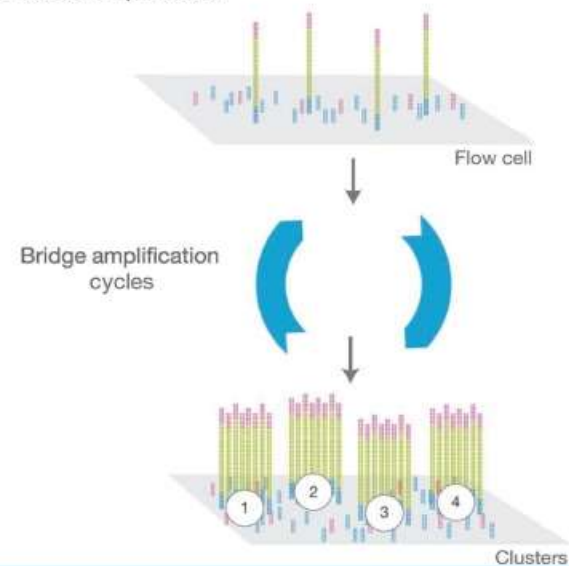
ΜΕΙΩΣΗ ΤΟΥ ΚΟΣΤΟΥΣ

ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ PAIRED-END ILLUMINA

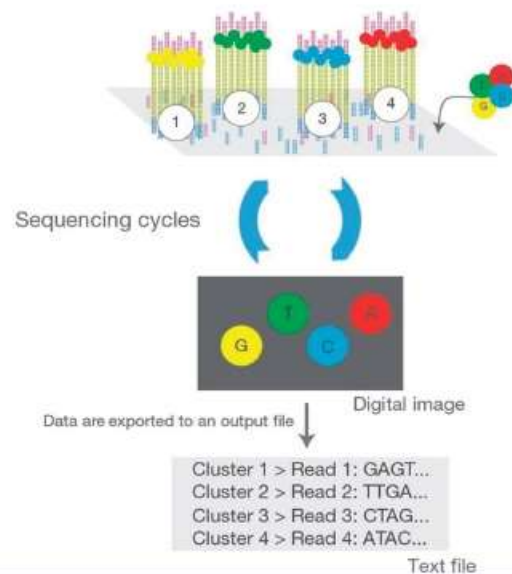
A. Library preparation



B. Cluster amplification



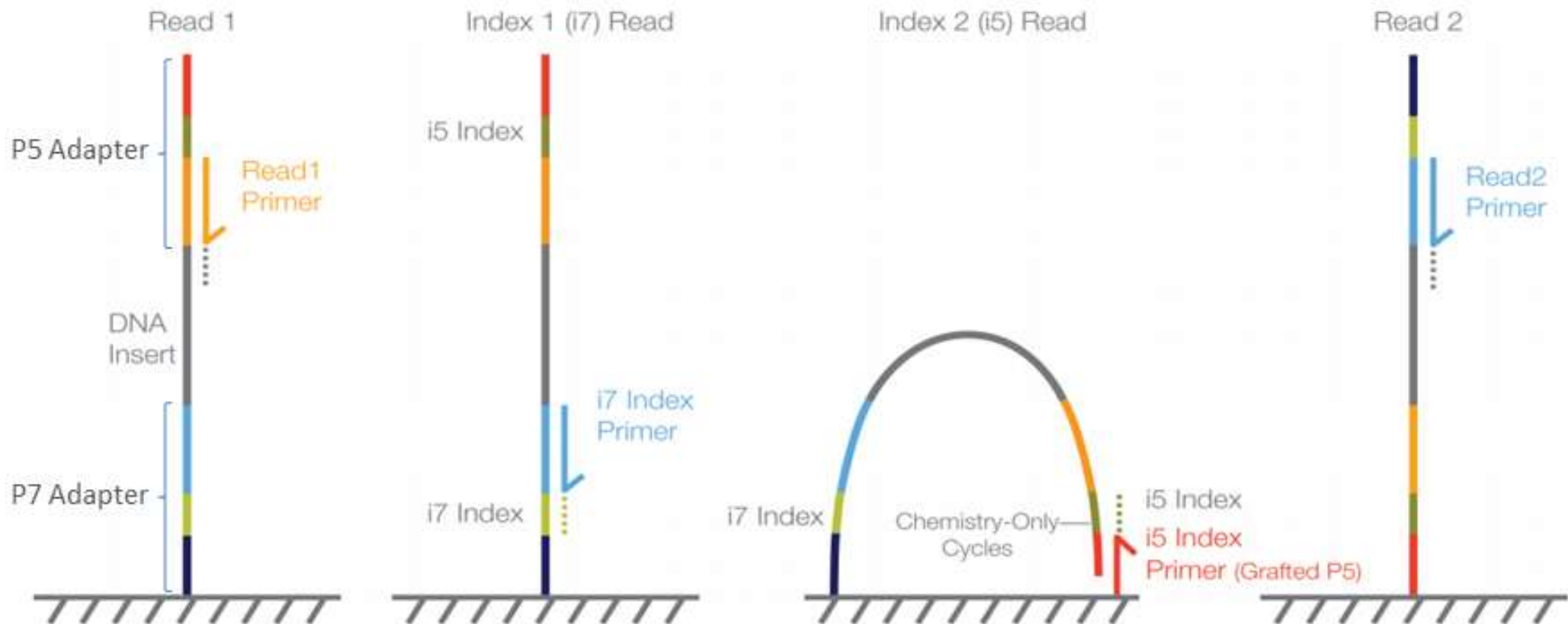
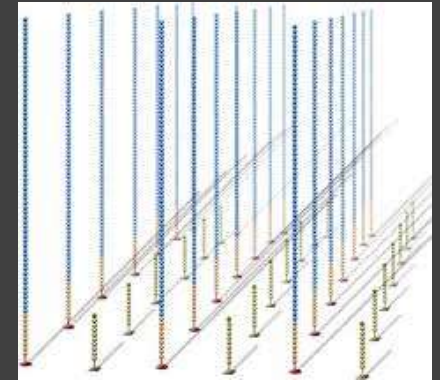
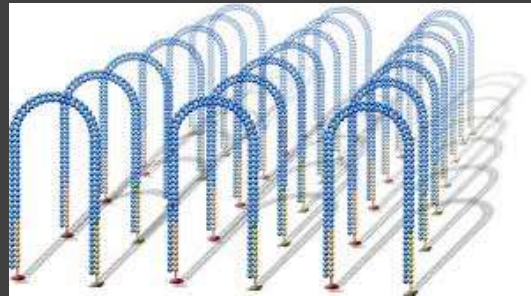
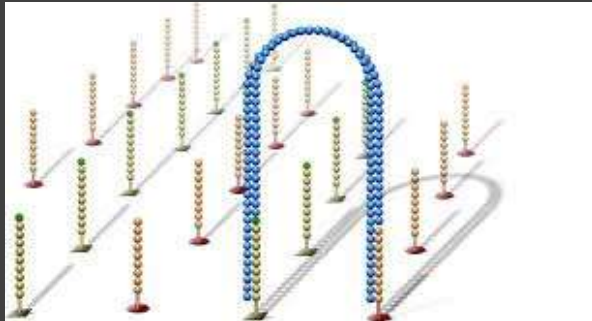
C. Sequencing

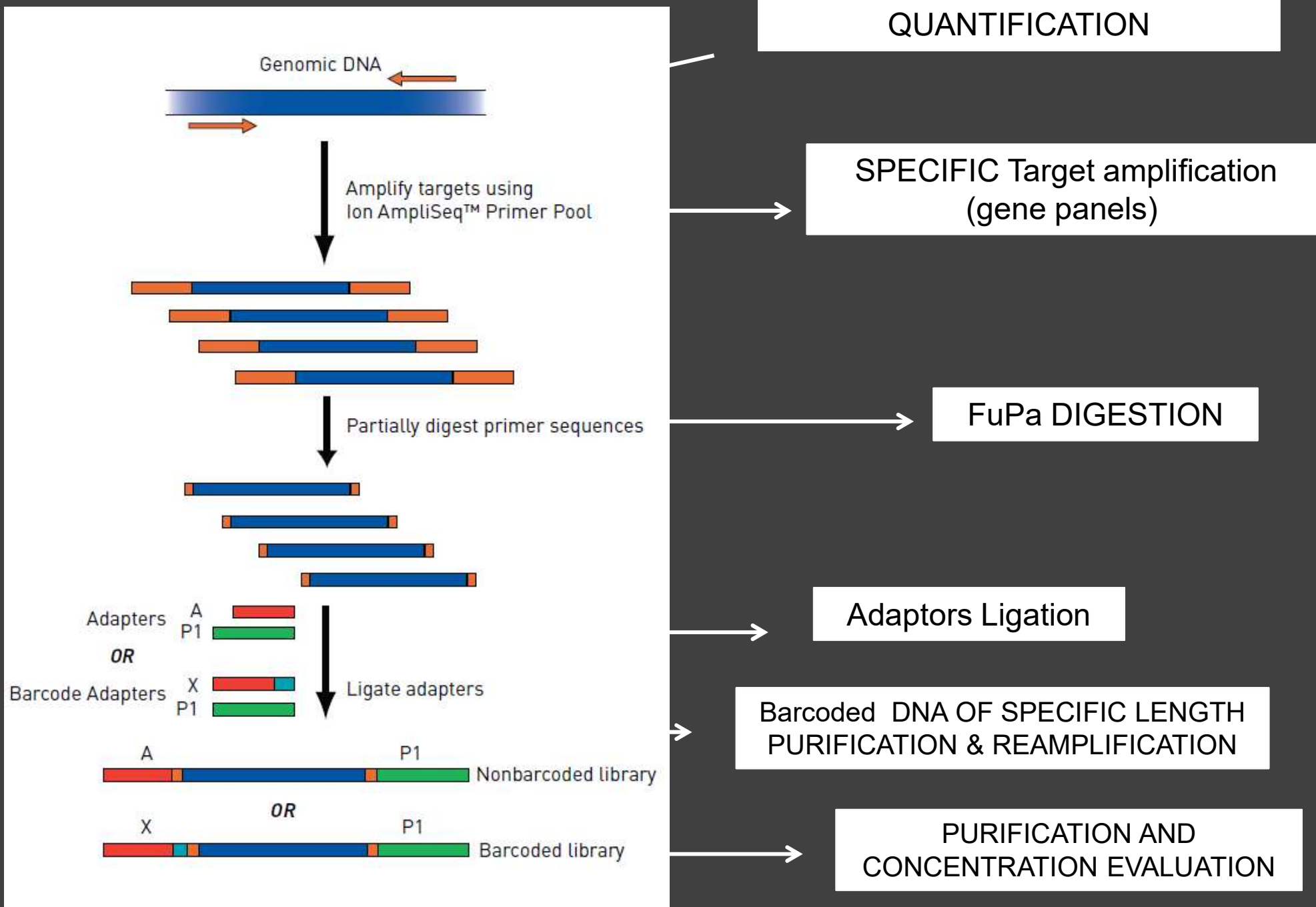


D. Alignment and data analysis

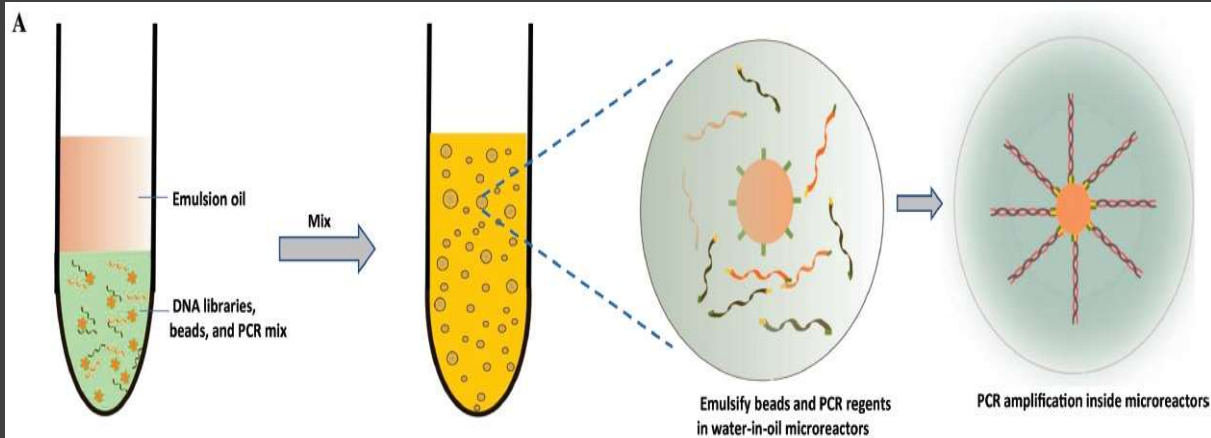


Clustering & Sequencing

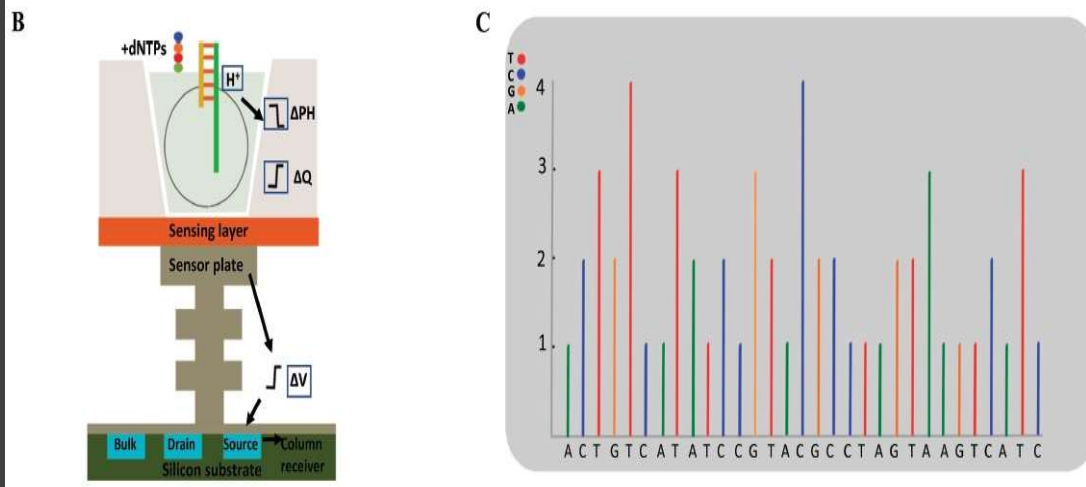




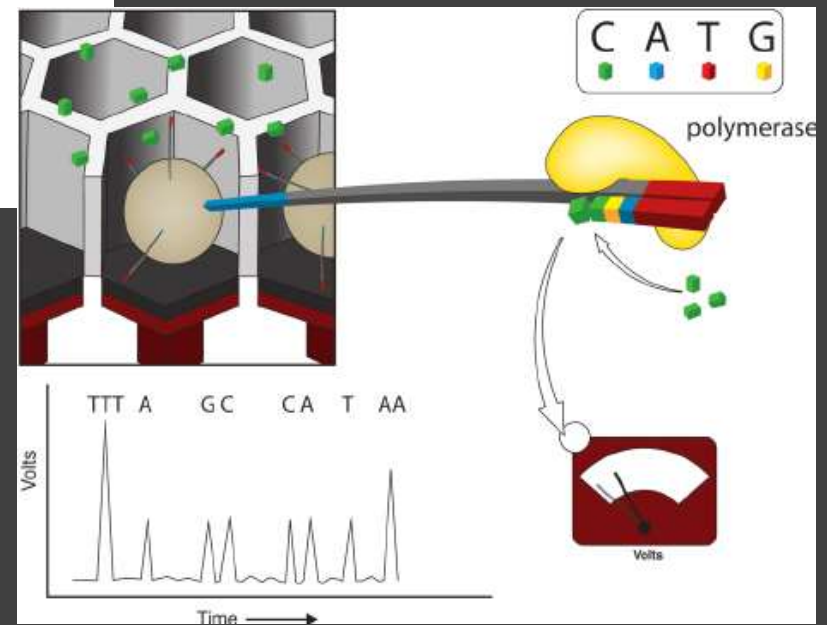
Emulsion PCR -Sequencing



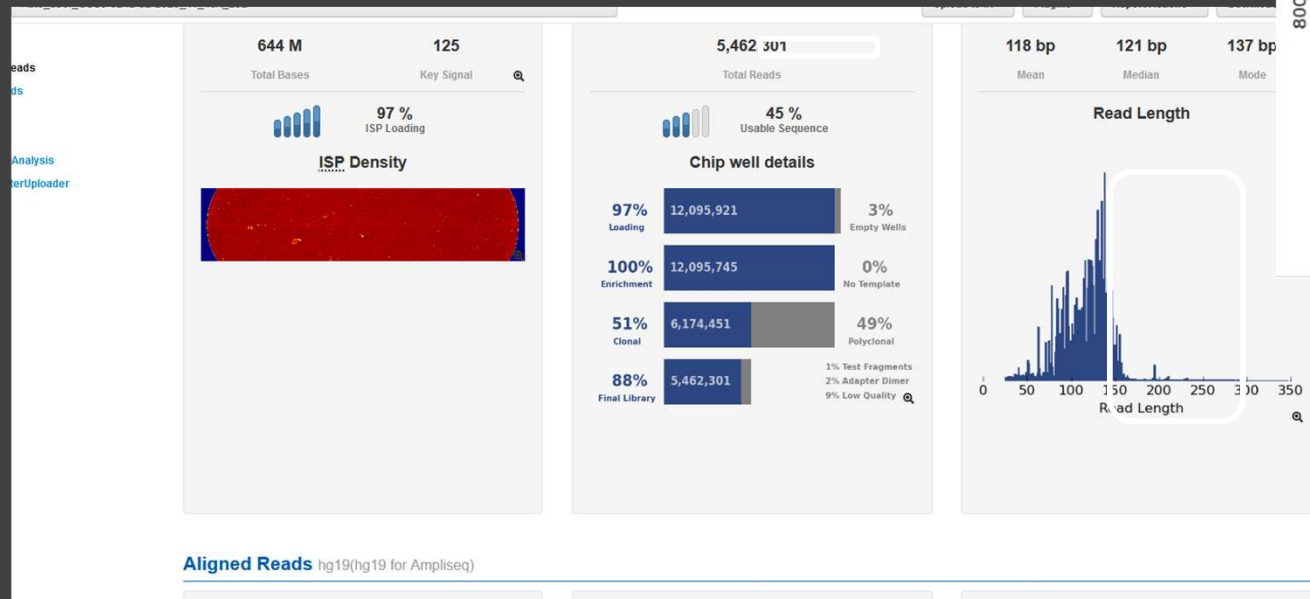
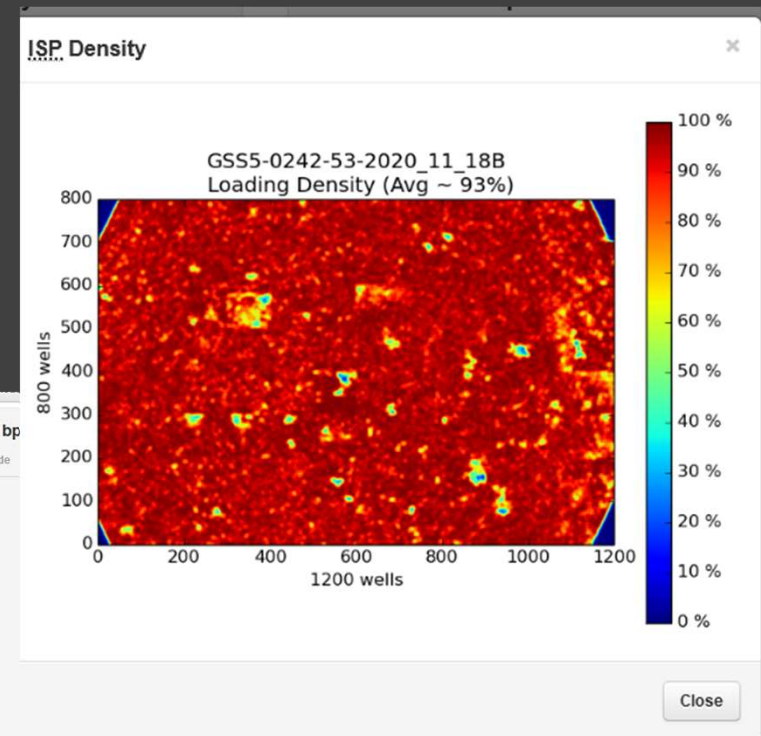
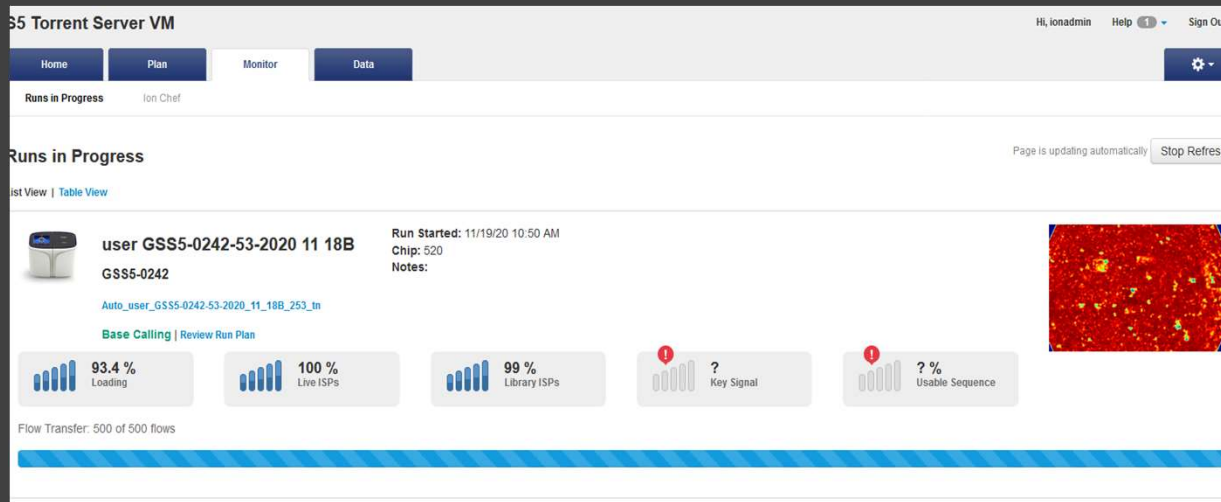
EMULSION PCR
AND BINDING
ON MICROSPHERES



PH ALTERATIONS DETECTION



Run metrics & Data analysis



Gene Fusions

Variants Table
 Variant Impact
 Gene Fusions
 IRGV & Generate Report

Search

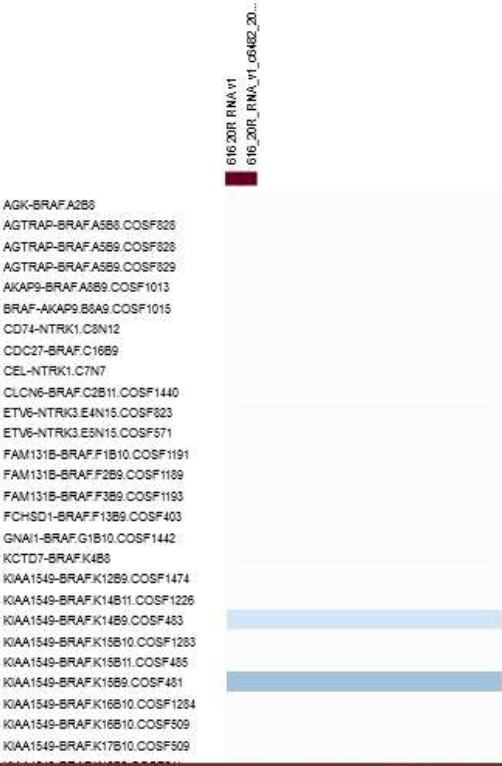
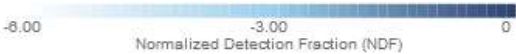
Go

	Locus	Ref	Type	Genes	Location	616_20R_RNA_v1	A
	chr7:127631109 - chr7:140487384	G	FUSION	SND1(16) - BRAF(9)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138210102 - chr7:140494267	G	FUSION	TRIM24(5) - BRAF(8)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138239609 - chr7:140487384	G	FUSION	TRIM24(9) - BRAF(9)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138239711 - chr7:140487384	G	FUSION	TRIM24(9) - BRAF(9)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138524878 - chr7:140487384	G	FUSION	KIAA1549(18) - BRAF(9)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138529062 - chr7:140482957	C	FUSION	KIAA1549(17) - BRAF(10)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138536969 - chr7:140482957	C	FUSION	KIAA1549(16) - BRAF(10)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138545885 - chr7:140482883	A	FUSION	KIAA1549(15) - BRAF(10)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138545885 - chr7:140481493	A	FUSION	KIAA1549(15) - BRAF(11)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138545885 - chr7:140487384	A	FUSION	KIAA1549(15) - BRAF(9)		Present	
	chr7:138545885 - chr7:140482957	A	FUSION	KIAA1549(16) - BRAF(10)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138552721 - chr7:140481493	T	FUSION	KIAA1549(14) - BRAF(11)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:138552721 - chr7:140487384	T	FUSION	KIAA1549(14) - BRAF(9)		Absent, READ_COUNT<=20	
	chr7:138555903 - chr7:140487384	C	FUSION	KIAA1549(12) - BRAF(9)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	
	chr7:140158807 - chr7:140481493	T	FUSION	MKRN1(4) - BRAF(11)		Absent, READ_COUNT<=20 and NORM_COUNT<=0.0	

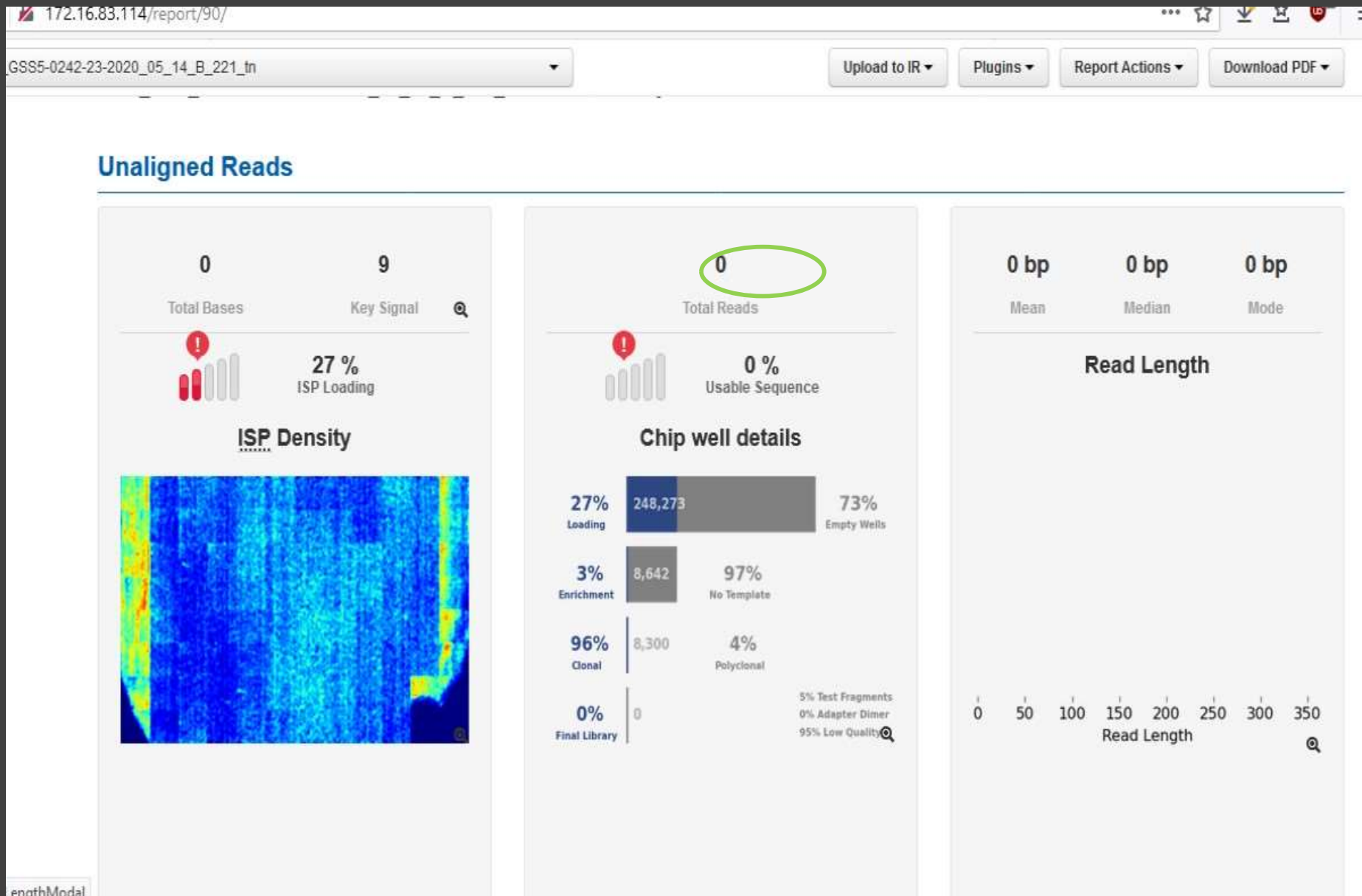
Overview
 Launch
 My Variants

Analysis Visualization

Variants Table
 Variant Impact
 Gene Fusions
 IRGV & Generate Report



Run metrics & NO Data analysis



lengthModal

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ «Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ»

- Το Εργαστήριο ασχολείται με τη διαφοροδιάγνωση των Σαρκωμάτων από το 1996
- Τα τελευταία 8 έτη >600 εξετασθέντα δείγματα , με αυξανόμενη συχνότητα (υλικό βιοψίας)
- Η μεθοδολογική προσέγγιση που επιλέγεται εξαρτάται από τον τύπο της γενετικής αλλαγής που διερευνάται π.χ. η ανίχνευση γνωστού χιμαιρικού γονιδίου γίνεται με PCR ενώ η διερεύνηση άγνωστων μεταλλάξεων με seq-ανάλυση
- Παθολογοανατομικά Εργαστήρια Νοσοκομείων και Ογκολογικές κλινικές
- Η πλειονότητα ήταν Σαρκώματα Ewing.
- Συνδυασμός με FISH

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

«Ο ΑΓΙΟΣ ΣΑΒΒΑΣ»

ΠΑΡΕΛΘΟΝ

ΙΣΤΟΣ

ή



cDNA

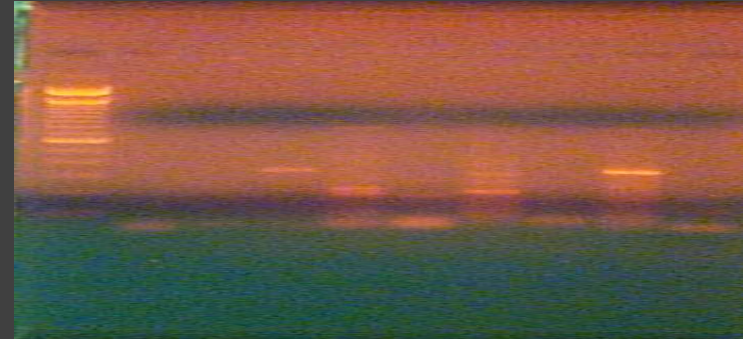


FFPE

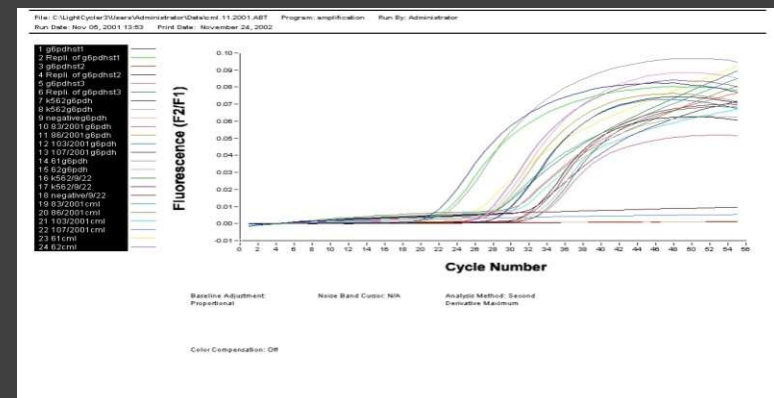


SANGER SEQ-ANALYSIS

Nested ή Long PCR



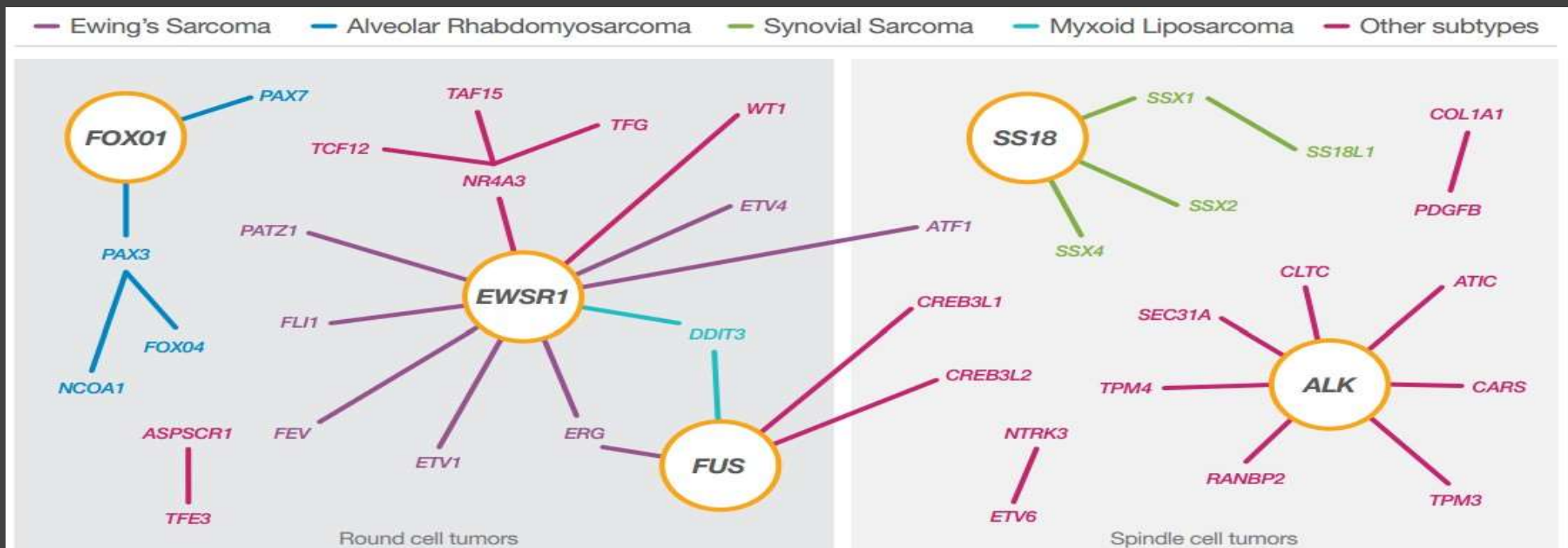
Real-Time PCR



ΠΑΡΟΝ: ΑΛΛΗΛΟΥΧΟΠΟΙΗΣΗ ΝΕΑΣ ΓΕΝΙΑΣ

PCR ανάλυση: Προϋποθέτει τη γνώση των δύο παρτενέρ γονιδίων ή αλλιώς γίνεται μακροσκελής και χρονοβόρα

FISH ανάλυση: Συνήθως εστιάζει σε ένα γονίδιο και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να άνιχνεύσει τον παρτενέρ, αλλά πάλι προϋποθέτοντας ποιο γονίδιο μπορεί να είναι.



Next-generation sequencing (NGS) ανάλυση:

Καλύπτει μεγάλο νούμερο **γονιδίων (81)** που μπορεί να σχετίζονται με το σχηματισμό του χιμαιρικού και

Μπορεί να αναδείξει και νέα εμπλεκόμενα γονίδια με μία δοκιμασία (στην ίδια εξέταση).



National
Comprehensive
Cancer
Network®

NCCN Guidelines Version 4.2024

Soft Tissue Sarcoma

[NCCN Guidelines Index](#)

[Table of Contents](#)

[Discussion](#)

PRINCIPLES OF ANCILLARY TECHNIQUES USEFUL IN THE DIAGNOSIS OF SARCOMAS

Morphologic diagnosis based on microscopic examination of histologic sections remains the gold standard for sarcoma diagnosis. However, several ancillary techniques are useful in support of morphologic diagnosis, including IHC, classical cytogenetics, electron microscopy, and molecular genetic testing. Molecular genetic testing has emerged as an ancillary testing approach since many sarcoma types harbor characteristic genetic aberrations, including single base pair substitutions, deletions and amplifications, and translocations. Molecular testing utilizes multiple techniques such as fluorescence in situ hybridization (FISH), polymerase chain reaction (PCR)-based methods, or next-generation sequencing (NGS)-based methods (including DNA and RNA sequencing).¹ The selection of the “best” technique depends on the individual tumor and clinical needs. NGS may be beneficial; the timing of when to perform NGS and for which patients must be evaluated individually. NGS findings can: determine patient eligibility for clinical trials, identify actionable mutations that may not have been targeted previously, and select patients who may benefit from immunotherapy. Thus, NGS may be appropriate for patients who may qualify for and who are interested in enrolling in a clinical trial or for patients with disease that is refractory or has progressed on standard therapies. NGS also may be helpful in certain histologies where NGS is likely to provide clinically actionable information. NGS should not replace expert pathology review, as NGS only rarely results in a diagnosis change following expert review. Technically successful NGS on bone biopsies requires use of decalcification agents, such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), that do not interfere with genomic testing. Each type of molecular testing is associated with test limitations and sources of false-negative results; if negative results are received when a molecular aberration clinically was expected, discussion with the testing lab is highly recommended as testing by another technique may be indicated. Selected recurrent genetic aberrations in sarcoma^{2,3} are listed on the next page.

Παραδείγματα από την κλινική εφαρμογή του εργαστηρίου μας

Δείγμα Χ: ήρθε ως πιθανό συνοβιοσάρκωμα.

Μετά από έλεγχο με RT-PCR βρέθηκε αρνητικό για την παρουσία του συγκεκριμένου χιμαιρικού γονιδίου.

Ακολούθησε NGS ανάλυση με το πάνελ των Σαρκωμάτων όπου ανιχνεύτηκε η παρουσία του EWSRI/CREB1 (αγγειωματώδες ινοιστιοκύττωμα)

Δείγμα Ψ: ήρθε ως πιθανό συνοβιοσάρκωμα επίσης.

Μετά από έλεγχο με RT-PCR βρέθηκε αρνητικό για την παρουσία του συγκεκριμένου χιμαιρικού γονιδίου.

Ακολούθησε NGS ανάλυση με το πάνελ των Σαρκωμάτων όπου ανιχνεύτηκε η παρουσία του BCOR/ZC3H7B (EWING LIKE SARCOMAS)

Hellenic Group of Sarcoma and Rare Cancers

A prospective study



cancers



Article

The Impact of Expert Pathology Review and Molecular Diagnostics on the Management of Sarcoma Patients: A Prospective Study of the Hellenic Group of Sarcomas and Rare Cancers

Stefania Kokkali ^{1,*}, Ioannis Boukovinas ², Eelco de Bree ³ , Anna Koumarianou ⁴ , Vassilis Georgoulas ⁵ , Anastasios Kyriazoglou ⁶, Nikolaos Tsoukalas ⁷ , Nikolaos Memos ⁸, John Papanastassiou ⁹ , Anastasia Stergioula ^{10,11} , Konstantinos Tsapakidis ¹² , Konstantia Loga ¹³, Jose Duran-Moreno ¹⁴ , Panagiotis Papanastasopoulos ¹⁵, Nikolaos Vassos ^{16,17} , Vasileios Kontogeorgakos ¹⁸, Ilias Athanasiadis ¹⁹, Luiza Mahaira ²⁰, Efthymios Dimitriadis ²⁰, Dionysios J. Papachristou ^{21,†} and George Agrogiannis ^{22,†}

¹ Oncology Unit, 2nd Department of Medicine, Medical School, Hippocratio General Hospital of Athens, National and Kapodistrian University of Athens, V. Sofias 114, 11527 Athens, Greece

² Oncology Department, Bioclinic of Thessaloniki, 54622 Thessaloniki, Greece; ibouk@bioncology.gr

³ Department of Surgical Oncology, University Hospital of Heraklion, 71110 Heraklion, Greece

expert diagnosis	molecular result	molecular diagnosis
ALT	FISH MDM2 neg	ALT
atypical ossifying fibromyxoid tumor	ESR1-FLI1 (first time), NGS neg	no modification (false positive)
CCS	ESR1-ATF1	angiomatoid fibrous histiocytoma
DDLPS or myxLPS	FISH MDM2 pos	DDLPS with myxoid component
dedif. CS or mesench.CS or small cell OS	NGS neg	probably small cell OS
ES	BCOR-CCNB3	
Ewing-like	NGS neg	USRC
Ewing-like	NGS neg, BCOR neg	URCS
Ewing-like	ESR1-FLI1	Ewing Sa
Ewing-like or ASPS	NGS neg	ASPS
Ewing-like or MPNST	EWSR1-FLI1	Ewing Sa
Ewing-like or MPNST or SS	NGS neg	MPNST
Ewing-like or myoepithelial Ca	NGS neg, BCOR neg	URCS
Ewing-like or spindle cell RMS	NGS neg, BCOR neg	RMS
high-grade Sa	FISH MDM2 pos	DDLPS
lipoma or ALT	NGS neg, FISH MDM2 pos	ALT
LMS	ETV6-NTRK3	NTRK-rearranged LMS
LMS or DDLPS	NGS neg	LMS
LMS or GIST	NGS neg, KIT/PDGFRa/BRAF/RAS neg	LMS
LMS or GIST	NGS neg, KITexon10 mut, PDGFRa/BRAF/RAS neg	LMS
MFS G1 or intramuscular myxoma	DNA seq	MFS G1
MPNST or SS	NGS neg	MPNST
myofibroblastic tumor	MYH9-USP6	nodular fasciitis
myxLPS or MFS	NGS neg, FISH FUS-DDIT3 neg	MFS
myxLPS or MFS G1	NGS neg	MFS G1
probaly myxLPS	NGS neg, FISH MDM2 pos	WDLPS
SS	TAF15-NR4A3	EMC
UPS or DDLPS	NGS neg, FISH MDM2 neg	UPS

ALT: atypical lipomatous tumor, ASPS: alveolar soft part sarcoma, Ca: carcinoma, CCS: clear cell sarcoma, CS: chondrosarcoma, DDLPS: dedifferentiated liposarcoma, EMC: extraskeletal myxoid chondrosarcoma, ES: epithelioid sarcoma, FISH: fluorescence in situ hybridization, GIST: gastrointestinal stromal tumor, LMS: leiomyosarcoma, MFS: myxofibrosarcoma, MPNST: malignant peripheral nerve sheath tumor, myxLPS: myxoid liposarcoma, NGS: next-generation sequencing, OS: osteosarcoma, RMS: rhabdomyosarcoma, Sa: sarcoma, SS: synovial sarcoma, UPS: undifferentiated pleomorphic sarcoma, URCS: undifferentiated round-cell sarcoma, WDLPS: well-differentiated liposarcoma.

Οι συμπαγείς όγκοι (καρκινώματα – σαρκώματα) παρουσιάζουν λόγω της υφής τους μια σειρά περιορισμούς στο χειρισμό τους.

- Η πιστότητα της γενετικής ανάλυσης εξαρτάται πολύ από την **ποιότητα του βιοπτικού υλικού**.
- Ο ιστολογικός τύπος πολλών όγκων απαιτεί ιδιαίτερους χειρισμούς για την απομόνωση γενετικού υλικού πχ **οστά με εκτεταμένη νέκρωση**.
- Ο χειρισμός του υλικού μετά τη βιοψία ή τη χειρουργική επέμβαση επηρεάζει σημαντικά την ποιότητα του υλικού. Υλικό που έχει υποστεί **επανειλημμένες αφαλατώσεις ή εκτεταμένη έκθεση σε οργανικούς διαλύτες** χρειάζεται ειδική επεξεργασία για την απομόνωση γενετικού υλικού.
- Για την αποτελεσματικότερη ανάλυση ο **νωπός ιστός** είναι η καλύτερη πηγή γεγονός που προϋποθέτει τον προγραμματισμό της γενετικής ανάλυσης ήδη από την ώρα του χειρουργείου.

Η γενετική ανάλυση για να είναι όσο το δυνατόν πιο επιτυχής
απαιτεί την στενή και συνεχή συνεργασία Κλινικής,
Παθολογοανατομικού και Εργαστηρίου Γενετικής

