

Moleculair-biologische diagnostiek bij tumoren van het steun- en bewegingsapparaat

J.V.M.G. BOVÉE EN P.C.W. HOGENDOORN

Tumoren van het steun- en bewegingsapparaat zijn relatief zeldzaam. Bij de diagnostiek van deze tumoren zijn behalve de pathologie ook de klinische observatie en disciplines zoals de epidemiologie en de radiodiagnostiek van groot belang. De interpretatie van een biopsie door de patholoog dient daarom altijd te geschieden met inachtneming van deze facetten.

Voor de histologische diagnostiek is de belangrijkste bewerking van biopsiemateriaal het vervaardigen van adequaat ontkalkte, gesneden en met hematoxyline en eosine (HE) gekleurde coupes. Juist bij tumoren van steun- en bewegingsapparaat komt men met de klassieke morfologie soms moeizaam tot een eensluitend oordeel, waardoor vaak een beroep op aanvullende diagnostische technieken wordt gedaan.

Tot voor kort waren het immunohistochemisch onderzoek en de elektronenmicroscopie de belangrijkste aanvullende technieken. Wanneer op lichtmicroscopisch niveau geen uitsluitel kan worden gegeven over de typering van ongedifferentieerde sarcomen, kan deze vergemakkelijkt worden door het aantonen van expressie van bepaalde eiwitten met behulp van immunohistochemische technieken of door het zichtbaar maken van ultrastructurele differentiatiekenmerken door middel van elektronenmicroscopie. Aan beide technieken kleven echter vele, vooral technische, bezwaren.

Sinds de opkomst van de moleculaire biologie zijn steeds meer technieken beschikbaar gekomen om de bijdrage van genetische factoren aan de oncogenese te bestuderen. Met cytogenetische onderzoeksmethoden, waarbij het chromosomenpatroon in cellen wordt bekeken, kunnen numerieke en structurele chromosoom-

SAMENVATTING

- Bij de diagnostiek van tumoren van steun- en bewegingsapparaat komt men met de klassieke morfologie soms moeizaam tot een eensluitend oordeel, waardoor vaak een beroep wordt gedaan op aanvullende diagnostische technieken.
- In het afgelopen decennium zijn nieuwe technieken beschikbaar gekomen, gebaseerd op tumorspecifieke genetische afwijkingen, bijvoorbeeld chromosomale translocaties.
- Nu een aantal translocatiebreukpunten is gekloneerd en de betrokken genen zijn geïdentificeerd, is detectie van het fusiegen met de 'reverse transcriptase'-polymerasekettingreactie (RT-PCR) een zeer belangrijk diagnosticum geworden.
- Ook kunnen niet-tumorspecifieke genetische afwijkingen met prognostische waarde worden gedetecteerd.

afwijkingen worden gedetecteerd. Op genetisch niveau kunnen deleties en amplificaties van bepaalde genen worden aangetoond.

De hiermee verworven kennis is niet alleen van belang voor het ophelderen van de oncogenese, maar ook voor mogelijke toepassingen in de diagnostiek. In tegenstelling tot de meeste epitheliale tumoren, waarbij complexe genetische afwijkingen een rol lijken te spelen, wordt bij sommige mesenchymale tumoren een beperkt aantal specifieke genetische afwijkingen gevonden. Dit is de reden dat deze nieuwe vorm van aanvullende diagnostiek in het bijzonder op het gebied van de bot- en wekedelentumoren zo'n hoge vlucht heeft genomen.

CYTOGENETISCHE ANALYSE

Door middel van cytogenetische analyse kan het chromosomenpatroon van tumorcellen in kaart worden gebracht. Hiervoor moet vers tumormateriaal in kweek worden gebracht. Een voorbeeld van een aldus verkregen karyogram van een Ewing-saroom staat afgebeeld in figuur 1. Een groot aantal bot- en wekedelentumoren

Academisch Ziekenhuis, afd. Pathologie, Postbus 9600, 2300 RC Leiden.

Dr.P.C.W.Hogendoorn, patholoog; mw.J.V.M.G.Bovée, arts-onderzoeker.

Correspondentieadres: dr.P.C.W.Hogendoorn.



FIGUUR 1. Karyogram van tumorcellen van een Ewing-saroom. De tumorcellen tonen de typische reciproque translocatie tussen de lange armen van chromosoom 11 (band q24) en 22 (band q12), aangeduid met $t(11;22)(q24;q12)$ die gevonden wordt in ongeveer 95% van de Ewing-sarcomen (foto: H.Wessels, afdeling Cytogenetica, Rijksuniversiteit Leiden).

is met deze techniek onderzocht.¹ Hierbij zijn bij diverse tumoren specifieke chromosomale translocaties vastgesteld. Enkele voorbeelden staan weergegeven in tabel 1. Deze tumoren kunnen op basis van hun translocaties worden geïdentificeerd, vaak nauwkeuriger dan met histologische en immunohistochemische methoden. In de dagelijkse praktijk kan het dan ook zeer waardevol zijn om, indien men klinisch-radiologisch een primaire bot- of wekedelentumor overweegt, vers weefsel te gebruiken voor cytogenetisch onderzoek.

Ook deze techniek kent echter verscheidene problemen zoals arbeidsintensiviteit en de noodzaak tot weefselkweek met een variabel succespercentage. Bovendien laten resultaten, gezien de bewerkelijkheid van de techniek, vaak lang op zich wachten, zodat dit een slagvaardig begin van de therapie op basis van deze resultaten in de weg staat.

'REVERSE TRANSCRIPTASE'- POLYMERASEKETINGREACTIE

Eén van de belangrijkste ontwikkelingen was de klonering van de translocatiebreukpunten met de identificatie van de genen waarin deze breukpunten liggen. Deze genen bleken voornamelijk transcriptiefactoren te coderen. De 'reverse transcriptase'-polymerasekettingreactie (RT-PCR) bleek daardoor een zeer geschikte methode om het fusiegen, en daarmee de translocatie, aan te tonen. Het principe van deze techniek, met als voorbeeld weer het Ewing-saroom, staat schematisch weergegeven in figuur 2. De translocatie bij deze tumor leidt tot fusie van een deel van het op chromosoom 11 gelegen *FLI1*-gen en een deel van het *EWS*-gen op chromosoom 22, waardoor een fusiegen ontstaat; door trans-

criptie van het gen wordt een fusietranscript gevormd dat door middel van RT-PCR gedetecteerd kan worden.^{2,3} Het resultaat hiervan wordt getoond in figuur 3. Een PCR-product wordt alleen verkregen indien deze specifieke translocatie aanwezig is.

Het voordeel van deze snelle, efficiënte en sensitieve techniek is dat slechts een kleine hoeveelheid weefsel nodig is, waardoor deze toepasbaar is op biopten en wellicht zelfs op cytologische preparaten. Verder kan deze techniek gebruikt worden bij identificatie van (micro-)metastasen en circulerende tumorcellen.⁴

VERLIES VAN HETEROZYGOTIE

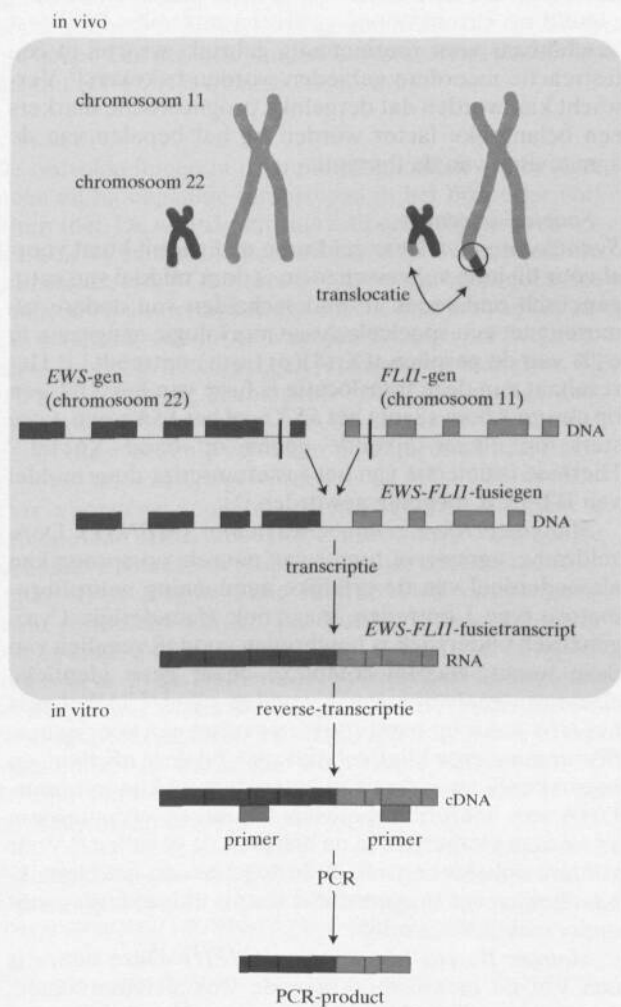
Bij sommige tumoren spelen bepaalde tumorsuppressorgenen een rol in de oncogenese. Deze genen zijn ook vaak betrokken bij familiale syndromen met verhoog-

TABEL 1. Voorbeelden van 'non-random'-translocaties in tumoren van steun- en bewegingsapparaat

tumortype	chromosomale afwijking*	frequentie (in %)
Ewing-saroom en PNET	$t(11;22)(q24;q12)$	95
rabdomyosaroom (alveolair)	$t(2;13)(q35;q14)$	80
synoviosaroom	$t(X;18)(p11.2;q11.2)$	95
myxoïd chondrosaroom	$t(9;22)(q31;q12.2)$	50
'clear-cell'-saroom	$t(12;22)(q13-14;q12)$	90
myxoïd liposaroom	$t(12;16)(q13;p11)$	75

PNET = primitieve neuro-ectodermale tumor.

*Voorbeeld: $t(11;22)(q24;q12)$ betekent translocatie (t) tussen chromosoom 11 en 22 betreffende respectievelijk band q24 en q12 (q is de lange arm, p de korte).



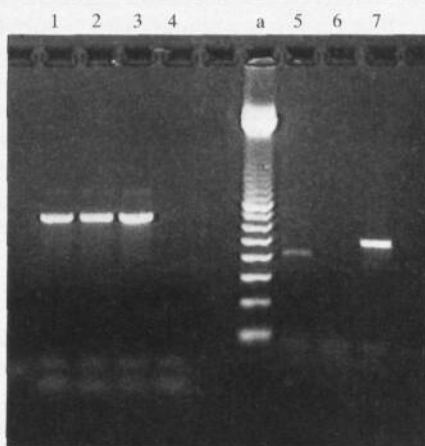
FIGUUR 2. Schematische voorstelling van het principe van de 'reverse transcriptase'-polymerasekettingreactie (RT-PCR) ter detectie van een chromosomale translocatie, met als voorbeeld het Ewing-sarcoom. De voor deze tumor kenmerkende translocatie tussen chromosoom 11 en 22 leidt tot een fusiegen. Dat fusiegen bestaat uit een deel van het op chromosoom 11 gelegen *FLII*-gen en een deel van het *EWS*-gen op chromosoom 22. Bij de diagnostiek wordt uit tumormateriaal RNA geïsoleerd. Dat RNA wordt vervolgens in vitro teruggeschreven (de 'reverse transcriptie') naar complementair DNA (cDNA). Het cDNA kan daarna worden vermenigvuldigd (geamplificeerd) door middel van de polymerasekettingreactie. Het enzym DNA-polymerase vermenigvuldigt het stuk DNA dat gelegen is tussen de specifieke primers, die zo gekozen zijn dat ze aan weerszijden van het breekpunt hechten. De PCR zal daarom alleen een product opleveren indien een fusietranscript, ontstaan door de translocatie, aanwezig is.

de predispositie voor oncogenese. Deletie van een dergelijk gen kan worden aangetoond met onderzoek gericht op verlies van heterozygotie. Dit onderzoek berust op de vergelijking van constitutioneel (normaal) DNA in een bepaald chromosoomgebied met DNA uit tumorcellen. Hiervoor wordt gebruikgemaakt van DNA-polymorfismen die in de bevolking voorkomen en die

nauw gekoppeld met een bepaald gen overerven. In geval van verlies van heterozygotie in het bestudeerde gebied zal blijken dat, indien het normale DNA twee allelen had, er in het tumor-DNA slechts één allel gedetecteerd kan worden. Aangezien verlies van heterozygotie zelden tumorspecifiek is, wordt deze techniek niet vaak ter ondersteuning van de diagnostiek gebruikt. Daarentegen blijkt het verlies bij sommige bot- en wekedelentumoren te correleren met de prognose waardoor gebruik als prognostische marker mogelijk is.

TOEPASSING IN DE DIFFERENTIËLE DIAGNOSTIEK

Binnen de groep bot- en wekedelentumoren zijn het vooral de rondcellige tumoren (tabel 2), die veelal op jonge leeftijd voorkomen, en de spoelcelsarcomen (tabel 3) die zich kenmerken door afwezigheid van betrouwbare criteria om de verschillende tumoren onderling van elkaar te kunnen onderscheiden op basis van de HECoupe. Een specifieke diagnose is echter essentieel voor de bepaling van de prognose en de effectiviteit van de vaak op dit moment nog experimentele adjuvante therapieën.



FIGUUR 3. Resultaat van 'reverse transcriptase'-polymerasekettingreactie (RT-PCR) met tumormateriaal van 2 patiënten met een tumor, mogelijk Ewing-sarcoom. De afbeelding is van agarose-gel-elektroforese (looprichting van de preparaten van boven naar beneden). PCR-producten zijn zichtbaar gemaakt met ethidiumbromide; deze stof hecht zich aan DNA en is zichtbaar onder ultraviolet licht. Laan 5 en 6 bevatten een PCR-product uit patiëntenmateriaal, in laan 7 staat als positieve controle het PCR-resultaat van een cellijn van Ewing-sarcoom met de met behulp van klassieke cytogenetica bewezen translocatie $t(11;22)$ uit figuur 1. Laan 5 geeft aan dat bij deze patiënt in de tumorcellen translocatie $t(11;22)$ aanwezig is, terwijl deze bij het materiaal van de patiënt in laan 6 afwezig is. Het PCR-product is iets kleiner (het is verder in de gel gemigreerd) dan het product in laan 7, doordat de exacte plaats van de breekpunten licht kan variëren. Als controle op de RNA-kwaliteit bevatten laan 1, 2 en 3 PCR-producten van de RNA-monsters uit respectievelijk de lanen 5, 6, en 7 waarbij een ander gen is geamplificeerd: het huishoudgen HPRT. Laan 4 bevat een controle (water) ter uitsluiting van contaminatie. De grootte van de PCR-producten kan worden afgelezen aan de 100-baseparen ladder (laan a).

TABEL 2. Differentiële diagnose van rondcellige bot- en wekedelentumoren

Ewing-sarcoom
primitieve neuro-ectodermale tumor (PNET)
rabdomyosarcoom (alveolair)
neuroblastoom
non-Hodgkin-lymfoom/leukemie
kleincellig osteosarcoom
mesenchymaal chondrosarcoom

TABEL 3. Differentiële diagnose van de spoelcelsarcomen

monofasisch synoviosarcoom
maligne perifere zenuwschedetumoren (MPNST)
maligne fibreus histiocytoom (MFH)
fibrosarcoom
leiomyosarcoom
'clear-cell'-sarcoom

Rondcellige tumoren

Ewing-sarcoom en primitieve neuro-ectodermale tumor (PNET). De 'Ewing-familie' (Ewing-sarcoom en PNET) kan op twee manieren worden onderscheiden van de andere rondcellige tumoren: immuunhistochemisch met de monoklonale antistof O13 (gericht tegen een eiwit gecodeerd door het *mic2*-gen)⁵ en moleculair-biologisch met het aantonen van de reeds besproken translocatie tussen chromosoom 11 en 22 die in 95% van de Ewing-sarcomen aanwezig is. In de overige 5% wordt een *EWS-ERG*-transcript gevonden dat ontstaat door t(21;22).^{2,6}

Rabdomyosarcoom. Deze tumor kan immuunhistochemisch van de andere rondcellige tumoren worden onderscheiden door de positiviteit voor myogene markers, en expressie van het *MYOD1*-gen.⁷ Een verdere subclassificatie in de drie onderscheiden hoofdgroepen van rabdomyosarcomen is, gezien de sterk uiteenlopende prognose, noodzakelijk: embryonaal, alveolair of pleomorf. In 80% van de alveolaire rabdomyosarcomen is een consistente translocatie t(2;13)(q35;q14) aanwezig,⁸ resulterend in een fusiegen dat bestaat uit delen van het *PAX3*-gen op chromosoom 2 en het *ALV*-gen op chromosoom 13, dat gedetecteerd kan worden door middel van de RT-PCR-detectiemethode,⁹ die wordt geïllustreerd in figuur 2 en 3. Bovendien is beschreven dat *N-myc*-amplificatie gedetecteerd kan worden in een deel van de alveolaire rabdomyosarcomen.¹⁰ Het embryonale subtype heeft een betere prognose; bij dat type zijn de (2;13)-translocatie en de *N-myc*-amplificatie afwezig en lijkt er een consistent verlies van heterozygotie op te treden op de korte arm van chromosoom 11.⁷

Neuroblastoom. Bij jonge kinderen is een neuroblastoom de meest voorkomende solide tumor; de ziekte heeft een zeer wisselend beloop. Het tumorweefsel vertoont relatief vaak tekenen van amplificatie en een deletie van de korte arm van chromosoom 1 (1p36) bij cytogenetisch onderzoek.¹ Deze afwijkingen zijn echter niet specifiek en kunnen dus niet in de diagnostiek gebruikt worden. Daarentegen is bewezen dat verlies van heterozygotie op 1p en *N-myc*-amplificatie sterke prog-

nostische waarde hebben.^{11,12} Voor verlies van heterozygotie op chromosoom 1p is een multiplex-PCR-test beschikbaar voor routinematig gebruik, waarbij in één testreactie meerdere gebieden worden bekeken.¹³ Verwacht kan worden dat dergelijke prognostische markers een belangrijke factor worden bij het bepalen van de agressiviteit van de therapie.

Spoelcelsarcomen

Synoviosarcoom. Deze zeldzame maligniteit komt vooral voor bij jong volwassenen en is door middel van cytogenetisch onderzoek te onderscheiden van andere tumoren met een spoelcelachtige morfologie aangezien in 95% van de gevallen t(X;18)(p11;q11) optreedt.^{1,14} Het resultaat van deze translocatie is fusie van het *SYT*-gen op chromosoom 18 met het *SSX1*- of het *SSX2*-gen, twee sterk op elkaar lijkende genen op band Xp11.2.¹⁵ Hiermee is detectie van het fusietranscript door middel van RT-PCR mogelijk geworden.¹⁶

Maligne perifere zenuwschedetumor (MPNST). Deze zeldzame, agressieve tumor van neurale oorsprong kan als onderdeel van de erfelijke aandoening neurofibromatose type I optreden, maar ook afzonderlijk. Cytogenetisch onderzoek is beschreven voor 38 gevallen van deze tumor, waarbij complexe, maar geen identieke chromosoomafwijkingen gevonden zijn.^{17,18} Wel was het *NF1*-locus op band 17q11, waar het gen voor neurofibromatose type I ligt, relatief vaak bij deze afwijkingen betrokken,¹⁷ en verlies van heterozygotie kon in tumor-DNA van neurofibromatosepatiënten op chromosoom 17 worden vastgesteld in de helft van de gevallen.¹⁹ Voor verdere opheldering van de histogenese en het beschikbaar komen van diagnostische tests is uitbreiding van dit onderzoek noodzakelijk.

Maligne fibreus histiocytoom (MFH). Deze tumor is een van de meest voorkomende wekedelensarcomen, met een breed morfologisch spectrum. Net als bij maligne perifere zenuwschedetumor worden complexe, maar geen karakteristieke chromosomale afwijkingen gevonden.^{1,20} Wel is chromosoomband 19p13 relatief vaak betrokken bij structurele veranderingen en de aanwezigheid van extra chromosomaal materiaal op 19p is gecorreleerd met een slechtere prognose.²¹ Het tot nu toe ontbreken van karakteristieke chromosomale afwijkingen staat de toepassing van moleculaire diagnostiek bij maligne fibreus histiocytoom echter nog in de weg.

Fibrosarcoom. Het fibrosarcoom komt vooral voor diep in de extremiteiten bij volwassenen van 30-55 jaar. Tot op heden is cytogenetisch onderzoek gedaan bij 6 tumoren, hetgeen zowel structurele afwijkingen van chromosoom X, 7 en 22 liet zien als numerieke afwijkingen: verlies van chromosoom 11 en 19.¹ Voordat diagnostische mogelijkheden zich eventueel aandienen, zal dit onderzoek uitgebreid moeten worden.

'Clear-cell'-sarcoom. De spoelcellige component van het clear-cellsarcoom, ook bekend als het melanoom van de weke delen, kan een lastig differentiële-diagnostisch probleem vormen. Het is van belang deze tumor te onderscheiden van satellietmetastasen van het cutane melanoom. In 90% van de clear-cellsarcomen kan de ka-

rakteristieke translocatie t(12;22)(q13-14;q12) gevonden worden, terwijl deze in het cutane melanoom nooit wordt gezien.^{22, 23} De betrokken genen (*AFT1* en *EWS*) zijn bekend en detectie van het fusietranscript door middel van RT-PCR is onlangs beschreven.²⁴

BESLUIT

De ontwikkelingen in de tumordiagnostiek in het algemeen en bij bepaalde tumortypen in het bijzonder vorderen snel. De waarde van aanvullend cytogenetisch onderzoek bij maligne wekedelentumoren is inmiddels uitgekristalliseerd.²⁵ Gebleken is dat vooral bij rondcellige tumoren bij kinderen cytogenetische analyse van het tumormateriaal van grote waarde is. Ook voor wekedelentumoren in het algemeen is chromosoomanalyse, bij een niet-eenduidig histologisch beeld, een zinnige aanvulling voor het stellen van de diagnose.²⁵⁻²⁷ Omdat steeds meer genen, betrokken bij de optredende translocaties, bekend zijn geworden, is de RT-PCR beschikbaar voor een snellere, efficiëntere en sensitievere detectie van karakteristieke translocaties.²⁸ Dergelijke technieken worden in gespecialiseerde centra reeds toegepast in de diagnostische routine. Ook van prognostische genetische markers kan worden verwacht dat deze een bijdrage zullen leveren bij het nemen van de beslissing over de te geven therapie. Voor wekedelentumoren waarbij geen karakteristieke genetische afwijkingen bekend zijn, gaat de zoektocht door. Het is dan ook te verwachten dat de moleculair-biologische diagnostiek op dit veld van de pathologie in het komende decennium sterk een stempel zal gaan drukken.

Wij danken prof.dr.C.J.Cornelisse, hoogleraar Moleculaire Tumorpathologie, en prof.dr.R.O.van der Heul, patholoog, voor commentaar op eerdere versies van dit artikel.

ABSTRACT

Molecular-biological diagnostics in bone and soft tissue tumours – It is sometimes difficult to make an unequivocal diagnosis of tumours of bone and soft tissue based upon classical morphology alone, which has led to an increased use of additional diagnostic tools.

– In the past decade new techniques have become available, based on tumour specific genetic alterations, for instance chromosomal translocations.

– With the cloning of the translocation breakpoints and the identification of the genes involved, the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of the fusion gene has become an important diagnostic test.

– Also, non-tumour specific genetic alterations with prognostic value can be detected.

LITERATUUR

- 1 Sandberg M, Bridge JA. The cytogenetics of bone and soft tissue tumors. Austin: Landes, 1994.
- 2 Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, et al. The Ewing family of tumors. *N Engl J Med* 1994;331:294-9.
- 3 Downing JR, Head DR, Parham DM, Douglass EC, Hulshof MG, Link MP, et al. Detection of the (11;22)(q24;q12) translocation of Ewing's sarcoma and peripheral neuroectodermal tumor by reverse transcription polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1993;143:1294-300.

- 4 Ghossein RA, Rosai J. Polymerase chain reaction in the detection of micrometastases and circulating tumor cells. *Cancer* 1996;78:10-6.
- 5 Fellingner EJ, Garin-Chesa P, Triche TJ, Huvos AG, Rettig WJ. Immunohistochemical analysis of Ewing's sarcoma cell surface antigen p30/32^{MIC2}. *Am J Pathol* 1991;139:317-25.
- 6 Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D, Liu XF, Triche TJ, Denny CT. A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the *EWS* gene to another ETS-family transcription factor, *ERG*. *Nat Genet* 1994;6:146-51.
- 7 Scrabble H, Witte D, Shimada H, Seemayer T, Sheng WW, Soukup S, et al. Molecular differential pathology of rhabdomyosarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1989;1:23-35.
- 8 Douglass EC, Valentine M, Etcubanas E, Parham D, Webber BL, Houghton PJ, et al. A specific chromosomal abnormality in rhabdomyosarcoma. *Cytogenet Cell Genet* 1987;45:148-55.
- 9 Shapiro DN, Sublett JE, Li B, Downing JR, Naeve CW. Fusion of *PAX3* to a member of the forkhead family of transcription factors in human alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 1993;53:5108-12.
- 10 Dias P, Kumar P, Marsden HB, Gattamaneni HR, Heighway J, Kumar S. N-myc gene is amplified in alveolar rhabdomyosarcomas (RMS) but not in embryonal RMS. *Int J Cancer* 1990;45:593-6.
- 11 Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121-4.
- 12 Caron H, Sluis P van, Kraker J de, Bokkerink J, Egeler M, Laureys G, et al. Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996;334:225-30.
- 13 Schleiermacher G, Peter M, Michon J, Zucker JM, Thomas G, Magdalenat H, et al. A multiplex PCR assay for routine evaluation of deletion of the short arm of chromosome 1 in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995;31A:535-8.
- 14 Turc-Carel C, Dal Cin P, Limon J, Rao U, Li FP, Corson JM, et al. Involvement of chromosome X in primary cytogenetic change in human neoplasia: nonrandom translocation in synovial sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1981-5.
- 15 Clark J, Rocques PJ, Crew AJ, Gill S, Shipley J, Chan AM, et al. Identification of novel genes, *SYT* and *SSX*, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nat Genet* 1994;7:502-8.
- 16 Shipley J, Crew J, Birdsall S, Gill S, Clark J, Fisher C, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization and reverse transcription polymerase chain reaction as a diagnostic aid for synovial sarcoma. *Am J Pathol* 1996;148:559-67.
- 17 Mertens F, Rydholm A, Bauer HF, Limon J, Nedoszytko B, Szadowska A, et al. Cytogenetic findings in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Int J Cancer* 1995;61:793-8.
- 18 Jhanwar SC, Chen Q, Li FP, Brennan MF, Woodruff JM. Cytogenetic analysis of soft tissue sarcomas. Recurrent chromosome abnormalities in malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST). *Cancer Genet Cytogenet* 1994;78:138-44.
- 19 Skuse GR, Kosciulek BA, Rowley PT. Molecular genetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis: loss of heterozygosity for chromosome 17. *Genes Chromosomes Cancer* 1989;1:36-41.
- 20 Mandahl N, Heim S, Willen H, Rydholm A, Eneroth M, Nilbert M, et al. Characteristic karyotypic anomalies identify subtypes of malignant fibrous histiocytoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1989;1:9-14.
- 21 Rydholm A, Mandahl N, Heim S, Kreicbergs A, Willen H, Mitelman F. Malignant fibrous histiocytomas with a 19p+ marker chromosome have increased relapse rate. *Genes Chromosomes Cancer* 1990;2:296-9.
- 22 Bridge JA, Borek DA, Neff JR, Huntrakoon M. Chromosomal abnormalities in clear cell sarcoma. Implications for histogenesis. *Am J Clin Pathol* 1990;93:26-31.
- 23 Fletcher JA. Translocation (12;22)(q13-14;q12) is a nonrandom aberration in soft-tissue clear-cell sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;5:184.
- 24 Zucman J, Delattre O, Desmazes C, Epstein AL, Stenman G, Speleman F, et al. *EWS* and *ATF-1* gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. *Nat Genet* 1993;4:341-5.
- 25 Fletcher JA, Kozakewich HP, Hoffer FA, Lage JM, Weidner N, Tepper R, et al. Diagnostic relevance of clonal cytogenetic aberrations in malignant soft-tissue tumors. *N Engl J Med* 1991;324:436-42.

- ²⁶ Molenaar WM, DeJong B, Buist J, Idenburg VJ, Seruca R, Vos AM, et al. Chromosomal analysis and the classification of soft tissue sarcomas. *Lab Invest* 1989;60:266-74.
- ²⁷ Sozzi G, Minoletti F, Miozzo M, Sard L, Musso K, Azzarelli A, et al. Relevance of cytogenetic and fluorescent in situ hybridization analyses in the clinical assessment of soft tissue sarcoma. *Hum Pathol* 1997;28:134-42.
- ²⁸ Barr FG, Chatten J, D'Cruz CM, Wilson AE, Nauta LE, Nycum LM, et al. Molecular assays for chromosomal translocations in the diagnosis of pediatric soft tissue sarcomas. *JAMA* 1995;273:553-7.

Aanvaard op 14 augustus 1997