Intratumorale HER2-Heterogenität des invasiven Mammakarzinoms

Intratumorale HER2-Heterogenität

Die Bestimmung des HER2-Status ist eine obligate Zusatzuntersuchung bei invasivem Mammakarzinom, da die Möglichkeit einer adjuvanten oder neoadjuvanten Behandlung mit Trastuzumab (Herceptin®) durch einen positiven HER2-Status der Karzinomzellen bestimmt wird [11, 12, 18]. Ein positiver HER2-Status liegt vor, wenn >30% der Karzinomzellen eine intensive ringförmige HER2-Proteinexpression zeigen oder eine HER2-Genamplifikation vorliegt [11, 12, 18]. Sowohl HER2-Proteinexpression als auch HER2-Genamplifikation können jedoch innerhalb eines Mammakarzinoms variieren.

Meistens wird unter intratumoraler HER2-Heterogenität die regionale Variation des HER2-Status in Tumorzellen des gleichen Karzinoms verstanden [1, 2, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 14, 16]. Unterschiede hinsichtlich des Vorliegens oder des Grades einer HER2-Genamplifikation werden auch als genetische HER2-Heterogenität bezeichnet. So untersuchten Lewis et al. [6] bis zu 4 unterschiedliche Blöcke des gleichen Karzinoms mittels HER2- (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung-)FISH in einer Serie von 21 Mammakarzinomen mit einem HER2-Immunscore von (2+). Die Variabilität der ermittelten HER2/CEP17-Ratios zwischen den Blöcken war erheblich, so dass das gleiche Karzinom in Abhängigkeit vom verwendeten Block als HER2-amplifiziert oder HER2-nichtamplifiziert zu klassifizieren war.

In einem ähnlichen Ansatz analysierten Brunelli et al. (2009, [2]) eine Serie von 30 invasiv-duktalem Karzinomen mit einem HER2-Immunscore von (3+). Der HER2-Genstatus wurde an regulären Schnitten und Tissue-Microarray- (TMA-)Zylindern aus verschiedenen Arealen des gleichen Karzinoms ermittelt. Von 20 Karzinomen mit hochgradiger HER2-Genamplifikation an regulären Schnitten zeigten 30% eine geringgradige HER2-Genamplifikation in zumindest einem TMA-Zylinder. Neben der Variabilität des HER2-Status innerhalb eines Primärtumors wurden auch Unterschiede im HER2-Status von Primärkarzinom und Metastasen des gleichen Karzinoms beobachtet und als intratumorale HER2-Heterogenität bezeichnet [3, 10, 15, 19].

Im letzten Jahr (2009) wurde genetische HER2-Heterogenität von der „American Society of Clinical Oncology“ (ASCO) und dem „College of American Pathologists“ (CAP) als das Vorhandensein von >5 bis <50% Tumorzellen mit einer HER2/CEP17-Ratio von >2,2 definiert [17]. Mit dieser Empfehlung steht eine formale Definition für genetische HER2-Heterogenität zur Verfügung, die eine zuverlässige und reproduzierbare Bestimmung ermöglicht.

Entwicklung eines Auswertungswerkzeugs für die HER2-FISH

Für die Auswertung von HER2-FISH-Untersuchungen wurde am Institut für Pathologie, Kantonsspital St. Gallen, ein

Auswerteinstrument in Form eines Excel-Arbeitsblattes (Microsoft Office 2003/2007) entwickelt (Abb. 1). Das Arbeitsblatt ermöglicht die Dokumentation der HER2-FISH-Befunde von bis zu 100 Karzinomzellen und führt die Berechnung von für die HER2-Diagnostik bedeutsamen Kennzahlen automatisiert durch.

Für jede beurteilte Karzinomzelle (60 Tumorzellen pro Tumor aus 3 verschiedenen Tumorearealen) wird die Anzahl der Signale für das HER2-Gen und für die Chromosom-17-spezifische Sonde (CEP17) in die Tabelle des Arbeitsblattes eingetragen. Auf der Grundlage dieser FISH-Ergebnisse erfolgt die automatisierte Berechnung der HER2/CEP17-Ratio für jede einzelne Karzinomzelle und der durchschnittlichen HER2/CEP17-Ratio der Karzinomzellen als HER2/CEP17-Gesamtratio des Tumors. Falls die HER2/CEP17-Gesamtratio von 60 Karzinomzellen zwischen 1,8 und 2,2 liegt, werden in 2 weiteren Tumorearealen jeweils 20 weitere Karzinomzellen ausgewertet. Die abschließende HER2/CEP17-Gesamtratio wird auf der Grundlage dieser 100 Karzinomzellen berechnet.

Die Einzelzelldokumentation der FISH-Ergebnisse ermöglicht die automatisierte Berechnung von weiteren für die HER2-Diagnostik wichtigen Parametern. So wird die relative Anzahl der Karzinomzellen mit einer HER2/CEP17 Ratio >2,2 ermittelt. Bei einem Prozentsatz zwischen >5 und <50% liegt in dem untersuchten Karzinom eine genetische HER2-Hetero-

genität gemäß ASCO/CAP-Kriterien vor [17]. Weiterhin wird die durchschnittliche Zahl der CEP17-Signale in den Karzinomzellen berechnet. Aufgrund dieses Wertes kann die Diagnose einer CEP17-Polysomie gestellt werden und die Zuordnung zu einer der von Ma et al. (2005, [7]) angegebenen Somieklassem erfolgen:

- hohe Polysomie (>3,75 CEP17-Signale pro Zellkern),
- niedrige Polysomie (2,26–3,75 CEP17-Signale pro Zellkern),
- Disomie (1,51–2,25 CEP17-Signale pro Zellkern),
- Hypodisomie (0,80–1,50 CEP17-Signale pro Zellkern) oder
- Monosomie (<0,80 CEP17-Signale pro Zellkern).

Als Zusatzinformation zeigt das Arbeitsblatt im oberen Abschnitt die Spannweite der ermittelten *HER2*- und CEP17-Signale an und bietet eine Spalte zur Dokumentation von *HER2*-Genclustern.

Neben leichter Anwendbarkeit und Arbeitserleichterung durch die automatisierte Berechnung der diagnostisch relevanten Kennzahlen bietet das Auswerteeinstrument Vorteile bei der Fehlervermeidung in der *HER2*-Diagnostik, da es einen direkten Vergleich der verschiedenen untersuchten Tumoreareale ermöglicht und aufgrund der übersichtlichen Gestaltung die Plausibilitätsüberprüfung der Untersuchungsergebnisse erleichtert. Das Auswerteeinstrument wird an unserem Institut auch für die *HER2*-Status-Bestimmung bei Magenkarzinom eingesetzt.

Eigene Ergebnisse

In einer eigenen Studie sind wir der Frage nachgegangen, wie oft eine genetische *HER2*-Heterogenität gemäß ASCO/CAP-Kriterien in invasiven Mammakarzinomen mit einem (2+) *HER2*-Immunscore vorliegt. In unsere retrospektive Analyse wurden 345 invasive Mammakarzinome eingeschlossen, bei denen mittels *HER2*-Immunhistochemie (HercepTest, Dako) ein *HER2*-Immunscore von (2+) – d. h. eine komplette starke ringförmige Membranfärbung in $\geq 10\%$, aber $\leq 30\%$ der Karzinomzellen – gefunden wurde (Appendix G, [18]). Die nachfolgend durchgeführte Zwei-Farben-FISH mit *HER2*-

Gen-spezifischen und Chromosom-17-spezifischen Sonden (PathVysion *HER2* DNA Probe Kit, Abbott Molecular) wurde mit dem oben beschriebenen Arbeitsblatt ausgewertet. Entsprechend wurde für jede Karzinomzelle die Anzahl der *HER2*- und CEP17-Signale ermittelt und eine *HER2*/CEP17-Einzelzellratio berechnet. Als Grenzwert für das Vorliegen einer *HER2*-Genamplifikation wurde eine *HER2*/CEP17-Ratio $> 2,2$ verwendet [18]. Eine genetische *HER2*-Heterogenität wurde gemäß ASCO/CAP-Kriterien bei dem Nachweis von > 5 bis $< 50\%$ Karzinomzellen mit einer *HER2*/CEP17-Ratio $> 2,2$ diagnostiziert [17].

In unserem Kollektiv fand sich eine genetische *HER2*-Heterogenität gemäß ASCO/CAP-Kriterien in 40% der invasiven Karzinome mit einem (2+) *HER2*-Immunscore. In der Untergruppe der Karzinome mit einer *HER2*/CEP17-Gesamtratio $< 2,2$ betrug die Häufigkeit der genetischen *HER2*-Heterogenität 41%. Dies bedeutet, dass ein großer Teil der invasiven Mammakarzinome mit einem (2+) *HER2*-Immunscore bis zu 50% Tumorzellen mit einer *HER2*-Genamplifikation enthält, ohne die aktuell gültigen Voraussetzungen für eine Trastuzumab-Therapie zu erfüllen.

Schlussfolgerungen

Für genetische *HER2*-Heterogenität ist seit Kurzem eine Definition verfügbar, die eine zuverlässige Diagnosestellung anhand quantifizierbarer Kriterien erlaubt. Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass in etwa 40% der Mammakarzinome mit einem (2+) *HER2*-Immunscore eine genetische *HER2*-Heterogenität gemäß ASCO/CAP-Definition vorliegt. Im Gegensatz dazu berichteten Tubbs et al. [16] über eine Häufigkeit von 5%, obwohl in beiden Studien die gleiche Definition für genetische *HER2*-Heterogenität verwendet wurde. Der Unterschied erklärt sich vermutlich dadurch, dass in der Studie von Tubbs et al. primär eine *HER2*-FISH zur Bestimmung des *HER2*-Status durchgeführt wurde, so dass diese Häufigkeitsangabe für Mammakarzinome ohne Berücksichtigung des *HER2*-Immunscores Gültigkeit hat.

Pathologie 2010 · [Suppl 2] 31:292–295
DOI 10.1007/s00292-010-1316-z
© Springer-Verlag 2010

C. Öhlschlegel · K. Zahel · D. Kradolfer · M. Hell · W. Jochum

Intratumorale *HER2*-Heterogenität des invasiven Mammakarzinoms

Zusammenfassung

Intratumorale Heterogenität von *HER2*-Proteinexpression und *HER2*-Genamplifikation erschweren die zuverlässige Bestimmung des *HER2*-Status bei einem Teil der invasiven Mammakarzinome. Häufigkeit und klinische Bedeutung der genetischen *HER2*-Heterogenität sind unbekannt, teils wegen Fehlens einheitlicher Kriterien zu ihrer Bestimmung. Empfehlungen von ASCO/CAP (2009) definieren genetische *HER2*-Heterogenität als das Vorhandensein von > 5 bis $< 50\%$ Tumorzellen mit einer *HER2*/CEP17-Ratio von $> 2,2$. Ein von uns entwickeltes Auswerteeinstrument (Excel-Arbeitsblatt) ermöglicht die einfache und zuverlässige Diagnosestellung einer genetischen *HER2*-Heterogenität gemäß ASCO/CAP-Kriterien. Es könnte zukünftig Einsatz in der *HER2*-Routinediagnostik sowie in Studien zur bisher unbekannten prädiktiven Bedeutung von genetischer *HER2*-Heterogenität finden.

Schlüsselwörter

Mammakarzinom · *HER2* · Genetische Heterogenität

Intratumoral heterogeneity of *HER2* status in breast carcinoma

Abstract

Intratumoral heterogeneity of *HER2* protein expression and *HER2* gene amplification can negatively affect determination of *HER2* status in a subset of invasive breast carcinomas. The frequency and clinical significance of *HER2* genetic heterogeneity are unknown due to the lack of uniform criteria for diagnosis. Recent ASCO/CAP guidelines (2009) define *HER2* genetic heterogeneity as the presence of between 5% and 50% of tumor cells with a *HER2*/CEP17 ratio > 2.2 . We describe a tool (a customized Excel spreadsheet) for easy and reproducible diagnosis of *HER2* genetic heterogeneity according to ASCO/CAP criteria. Our tool may be useful for routine *HER2* diagnostics and for studies to analyse the hitherto unknown predictive significance of *HER2* genetic heterogeneity.

Keywords

Breast carcinoma · *HER2* · Genetic heterogeneity

HER2 Gen

1 - 10

HER2-Signale pro 100 Zellen: 4.32HER2 / CEP17 (17q11.2-q12 / 17p11.1-q11.1)

HER2 Genkopie-Cluster in

0%

 der Tumorzellkerne (Cluster ab 16 Signale)

CEP17

1 - 5

CEP17-Signale pro 100 Zellen: 2.23

CEP17-Somie

2.23 = Disomie: 1.51-2.25 CEP17 Signale pro Zellkern

Polysomie erst ab CEP17 >= 3.00 werten und diktieren

GH = HER2 genetic heterogeneity
GH = >5% - <50% Zellkerne mit HER2 / CEP17 Ratio höher 2.20

Bemerkungen:

Areal 1					Areal 2					Areal 3					Areal 4					Areal 5				
N	HER2	CEP17	Ratio	Clu	N	HER2	CEP17	Ratio	Clu	N	HER2	CEP17	Ratio	Clu	N	HER2	CEP17	Ratio	Clu	N	HER2	CEP17	Ratio	Clu
1	3	3	1.00		21	6	3	2.00		41	3	2	1.50		61	6	2	3.00		81	6	2	3.00	
2	4	3	1.33		22	3	2	1.50		42	3	2	1.50		62	6	2	3.00		82	5	2	2.50	
3	5	2	2.50		23	2	2	1.00		43	4	2	2.00		63	3	2	1.50		83	3	3	1.00	
4	3	2	1.50		24	10	4	2.50		44	5	3	1.67		64	3	1	3.00		84	3	2	1.50	
5	4	2	2.00		25	6	3	2.00		45	6	1	6.00		65	5	4	1.25		85	3	1	3.00	
6	2	3	0.67		26	3	1	3.00		46	3	2	1.50		66	4	3	1.33		86	4	3	1.33	
7	5	2	2.50		27	3	2	1.50		47	4	2	2.00		67	5	2	2.50		87	4	2	2.00	
8	4	3	1.33		28	3	2	1.50		48	3	2	1.50		68	3	2	1.50		88	2	2	1.00	
9	3	2	1.50		29	5	2	2.50		49	5	2	2.50		69	6	3	2.00		89	2	1	2.00	
10	5	3	1.67		30	10	4	2.50		50	7	2	3.50		70	7	5	1.40		90	5	2	2.50	
11	5	2	2.50		31	2	2	1.00		51	2	1	2.00		71	5	2	2.50		91	5	2	2.50	
12	5	2	2.50		32	4	2	2.00		52	4	2	2.00		72	6	2	3.00		92	3	2	1.50	
13	5	3	1.67		33	4	3	1.33		53	5	2	2.50		73	4	2	2.00		93	6	3	2.00	
14	3	2	1.50		34	4	2	2.00		54	5	2	2.50		74	4	2	2.00		94	4	3	1.33	
15	6	3	2.00		35	3	1	3.00		55	3	2	1.50		75	3	2	1.50		95	6	4	1.50	
16	3	1	3.00		36	5	3	1.67		56	6	2	3.00		76	6	2	3.00		96	4	3	1.33	
17	6	3	2.00		37	2	2	1.00		57	3	2	1.50		77	1	1	1.00		97	6	3	2.00	
18	4	2	2.00		38	5	2	2.50		58	4	2	2.00		78	4	2	2.00		98	5	2	2.50	
19	5	2	2.50		39	3	2	1.50		59	4	2	2.00		79	4	2	2.00		99	3	2	1.50	
20	6	3	2.00		40	4	1	4.00		60	4	2	2.00		80	6	2	3.00		100	6	2	3.00	
HER2	4.30				HER2	4.35				HER2	4.15				HER2	4.55				HER2	4.25			
CEP17	2.40				CEP17	2.25				CEP17	1.95				CEP17	2.25				CEP17	2.30			
HER2 / CEP17	1.79				HER2 / CEP17	1.93				HER2 / CEP17	2.13				HER2 / CEP17	2.02				HER2 / CEP17	1.85			
GH	30%				GH	35%				GH	30%				GH	40%				GH	35%			

Abb. 1 ▲ St. Galler Arbeitsblatt (Excel) für die Auswertung der HER2/CEP17-FISH-Untersuchung. Das beispielhaft dargestellte invasiv-duktales Mammakarzinom zeigt eine genetische HER2-Heterogenität gemäß ASCO/CAP-Definition (2009) bei Abwesenheit einer HER2-Genamplifikation auf der Grundlage der HER2/CEP17-Gesamtratio des Tumors. Es wurden 100 Karzinomzellen in 5 unterschiedlichen Tumorebenen beurteilt. Für jede Karzinomzelle wurde die Anzahl der HER2- und CEP17-Signale dokumentiert. Alle abgeleiteten Kennzahlen (durchschnittliche HER2- und CEP17-Signanzahl, HER2/CEP17-Ratio, CEP17-Somienklasse, genetische HER2-Heterogenität) wurden automatisiert aufgrund der hinterlegten Rechenanweisungen berechnet und angezeigt.

Die Häufigkeit und diagnostische Bedeutung der genetischen HER2-Heterogenität wurde bisher unterschätzt. Falls die Bestimmung der genetischen HER2-Heterogenität gemäß ASCO/CAP-Definition den Weg in die Routinediagnostik findet, sind Anpassungen in der Auswertung von HER2/CEP17-FISH-Untersuchungen erforderlich. Für eine zuverlässige Diagnose der genetischen HER2-Heterogenität ist die Auswertung und Dokumentation des HER2/CEP17-FISH-Ergebnisses auf der Ebene der einzelnen Tumorzelle bei einer ausreichend großen Zahl von Karzinomzellen (>60) erforderlich. Weiterhin sind Studien notwendig, um die prognostische und prädiktive Bedeutung der genetischen HER2-Heterogenität gemäß ASCO/CAP-Definition zu bestimmen.

Das von uns entwickelte Auswertinstrument könnte sich hier als hilfreich erweisen.

Fazit für die Praxis

Intratumorale Heterogenität der HER2-Genamplifikation tritt in invasiven Mammakarzinomen auf und kann die zuverlässige Bestimmung des HER2-Status beeinträchtigen. Eine 2009 von ASCO/CAP veröffentlichte Definition beschreibt genetische HER2-Heterogenität als das Vorhandensein von >5 bis <50% Tumorzellen mit einer HER2/CEP17-Ratio von >2,2. Um eine genetische HER2-Heterogenität gemäß dieser Definition zuverlässig zu diagnostizieren, ist die Einzelzellauswertung und -dokumentation der HER2/

CEP17-Ratio bei einer ausreichend großen Zahl von Karzinomzellen (>60) erforderlich. Das von uns entwickelte Auswertinstrument könnte hier Verwendung finden.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. W. Jochum
Institut für Pathologie, Kantonsspital St. Gallen
Rorschacher Str. 95, 9007 St. Gallen
Schweiz
wolfram.jochum@kssg.ch

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- Andersson J, Linderholm B, Bergh J et al (2004) HER-2/neu (c-erbB-2) evaluation in primary breast carcinoma by fluorescent in situ hybridization and immunohistochemistry with special focus on intratumor heterogeneity and comparison of invasive and in situ components. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 12:14–20
- Brunelli M, Manfrin E, Martignoni G et al (2009) Genotypic intratumoral heterogeneity in breast carcinoma with HER2/neu amplification: evaluation according to ASCO/CAP criteria. *Am J Clin Pathol* 131:678–682
- Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F et al (2002) Comparison of HER-2 status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 13:1036–1043
- Glockner S, Buurman H, Kleeberger W et al (2002) Marked intratumoral heterogeneity of c-myc and cyclinD1 but not of c-erbB2 amplification in breast cancer. *Lab Invest* 82:1419–1426
- Hanna W, Nofech-Mozes S, Kahn HJ (2007) Intratumoral heterogeneity of HER2/neu in breast cancer – a rare event. *Breast J* 13:122–129
- Lewis JT, Ketterling RP, Halling KC et al (2005) Analysis of intratumoral heterogeneity and amplification status in breast carcinomas with equivocal (2+) HER-2 immunostaining. *Am J Clin Pathol* 124:273–281
- MA Y, Lespagnard L, Durbecq V et al (2005) Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 11:4393–4399
- Nassar A, Radhakrishnan A, Cabrero IA et al (2010) Intratumoral heterogeneity of immunohistochemical marker expression in breast carcinoma: a tissue microarray-based study. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* [Epub ahead of print May 18]
- Pertschuk LP, Axiotis CA, Feldman JG et al (1999) Marked intratumoral heterogeneity of the proto-oncogene Her-2/neu determined by three different detection systems. *Breast J* 5:369–374
- Regitnig P, Schippinger W, Lindbauer M et al (2004) Change of HER-2/neu status in a subset of distant metastases from breast carcinomas. *J Pathol* 203:918–926
- Rüschhoff J, Nagelmeier I, Hofmann M et al (2009) ErbB2 diagnostics in breast cancer-an update. *Pathologe* 30:147–155
- Sauter G, Lee J, Bartlett JM et al (2009) Guidelines for human epidermal growth factor receptor 2 testing: biologic and methodologic considerations. *J Clin Oncol* 27:1323–1333
- Shin SJ, Hyjek E, Early E et al (2006) Intratumoral heterogeneity of her-2/neu in invasive mammary carcinomas using fluorescence in-situ hybridization and tissue microarray. *Int J Surg Pathol* 14:279–284
- Szollösi J, Balazs M, Feuerstein BG et al (1995) ERBB-2 (HER2/neu) gene copy number, p185HER-2 overexpression, and intratumor heterogeneity in human breast cancer. *Cancer Res* 55:5400–5407
- Tapia C, Savic S, Wagner U et al (2007) HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. *Breast Cancer Res* 9:R31
- Tubbs RR, Hicks DG, Cook J et al (2007) Fluorescence in situ hybridization (FISH) as primary methodology for the assessment of HER2 Status in adenocarcinoma of the breast: a single institution experience. *Diagn Mol Pathol* 16:207–210
- Vance GH, Barry TS, Bloom KJ et al (2009) Genetic heterogeneity in HER2 testing in breast cancer: panel summary and guidelines. *Arch Pathol Lab Med* 133:611–612
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al (2007) American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:118–145
- Wu JM, Halushka MK, Argani P (2010) Intratumoral heterogeneity of HER-2 gene amplification and protein overexpression in breast cancer. *Hum Pathol* 41:914–917