

Her2 Diagnostik beim Magenkarzinom

Was ist anders im Vergleich zum Mammakarzinom?

J. Rüschoff^{1,7}, I. Nagelmeier¹, G. Baretton², M. Dietel³, H. Höfler⁴, H.U. Schildhaus⁵,
R. Büttner⁵, W. Schlake⁶, O. Stoss⁷, H.H. Kreipe⁸

¹Pathologie Nordhessen, Kassel

²Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Carl-Gustav-Carus, Technische Universität, Dresden

³Institut für Pathologie, Humboldt-Universität, Campus Charité, Berlin

⁴Institut für Pathologie, Universität Rechts der Isar, München

⁵Institut für Pathologie, Universität Bonn, Bonn

⁶Pathologisches und Gewerbepathologisches Institut, Gelsenkirchen

⁷TARGOS Molecular Pathology GmbH, Kassel

⁸Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule, Hannover

Adresse für Korrespondenz:

Prof. Dr. J. Rüschoff
Pathologie Nordhessen
u. Targos GmbH
Germaniastrasse 7-9
34119 Kassel

Tel. 0561 4500 101

Fax 0561 980 6985

Mail rueschoff@patho-nordhessen.de

Her2 Testing in Gastric Cancer

What is different from breast cancer?

J. Rüschoff^{1,7}, I. Nagelmeier¹, G. Baretton², M. Dietel³, H. Höfler⁴, H.U. Schildhaus⁵, R. Büttner⁵, W. Schlake⁶, O. Stoss⁷, H.H. Kreipe⁸

¹Pathologie Nordhessen, Kassel

²Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Carl-Gustav-Carus, Technische Universität, Dresden

³Institut für Pathologie, Humboldt-Universität, Campus Charité, Berlin

⁴Institut für Pathologie, Universität Rechts der Isar, München

⁵Institut für Pathologie, Universität Bonn, Bonn

⁶Pathologisches und Gewerbepathologisches Institut, Gelsenkirchen

⁷TARGOS Molecular Pathology GmbH, Kassel

⁸Institut für Pathologie der Medizinischen Hochschule, Hannover

Address of Correspondence:

Prof. Dr. J. Rüschoff
Pathologie Nordhessen
u. Targos GmbH
Germaniastrasse 7-9
34119 Kassel

Tel. 0561 4500 101

Fax 0561 980 6985

Mail rueschoff@patho-nordhessen.de

Zusammenfassung

Aufgrund einer großen multizentrischen Phase III Studie (ToGA) wurde aktuell Trastuzumab (Herceptin) für das metastasierte Adenokarzinom des Magens und des Ösophagogastralen Überganges in der Kombinationstherapie von der EMEA zugelassen. Voraussetzung ist der Nachweis einer Her2 Überexpression definiert durch IHC 2+ und ein positives FISH Ergebnis (Ratio ≥ 2.0) oder durch IHC 3+. Die immunhistochemische Bestimmung des Her2 Status (IHC) unterscheidet sich aber in zentralen Punkten vom Mammakarzinom: **1.** IHC2+/3+ werden auch bei inkompletter (basolateraler oder nur lateraler) Membranfärbung diagnostiziert, vorausgesetzt diese ist bereits bei Lupenvergrößerung (entsprechend 3+) oder bei mittlerer Vergrößerung (10x-20x, entsprechend 2+) zweifelsfrei nachweisbar. Jede Membranfärbung, die sich erst bei starker Vergrößerung (40x) nachweisen lässt, entspricht IHC 1+ und wird zusammen mit IHC 0 als negativ gewertet. **2.** Nur bei Resektaten ist noch zusätzlich darauf zu achten, dass mindestens 10% der Tumorzellen eine Membranfärbung der entsprechenden Intensität aufweisen. Diese Grenze entfällt bei Biopsien, wobei die Mindestzahl positiv gefärbter Tumorzellen wenigstens 5 kohäsiven Zellen entsprechen sollte. Von der Beurteilung sind auszuschließen Einzelzellularfärbungen und zytoplasmatische oder nukleäre Färbungen, die vor allem in Siegelringzellen und bei intestinaler Metaplasie vorkommen können. Die Auswertung der Her2 in situ Hybridisierung (ISH) ist an die Regeln beim Mammakarzinom angelehnt, wobei ab Ratio ≥ 2.0 eine Amplifikation diagnostiziert wird und im Bereich 1.8.-2.2 weitere 40 Zellen gezählt werden sollten. Definiert man IHC 3+ und IHC2+/FISH+ Fälle als HER2 positiv, so liegt die Positivitätsrate bei ca. 16%, typischerweise in intestinal differenzierten Karzinomabschnitten. Da das Magenkarzinom im Unterschied zum Mammakarzinom in bis zu einem Drittel ein heterogenes Her2 Verteilungsmuster aufweist, sind Lichtmikroskopie-basierte ISH Verfahren insbesondere beim Auffinden amplifizierter Foci tendenziell der FISH Analyse überlegen.

Sachverzeichnis: Her2 Diagnostik, Immunhistochemie (IHC), FISH, SISH, Magenkarzinom

Abstract

Based on data of a large multicentric phase III trial (ToGA study) trastuzumab (Herceptin) has very recently been approved by the EMEA for metastatic gastric cancer and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. Thereby only patients are eligible for Herceptin therapy those tumors overexpress Her2 as defined by IHC2+ and a confirmatory FISH+ result, or IHC 3+, determined by an accurate and validated assay. However, testing of Her2 status by immunohistochemistry (IHC) differs from breast cancer in central aspects: **1.** IHC2+/3+ is scored even though membranous staining is incomplete (basolateral or lateral). If membrane staining is already visible at low magnification (2.5x-5x), staining intensity corresponds to IHC3+. In case medium magnification (10x-20x) is required, the score is IHC2+. In any case where high magnification (40x) is used to unequivocally demonstrate at least some (IHC 1+) or no membrane staining (IHC 0), Her2 status is classified as negative. **2.** The criterion of at least 10% stained tumor cells is restricted to resection specimens. In biopsies, at least 5 cohesive tumor cells should show intercellular membrane staining. Staining of single cells, e.g. isolated signet ring cells, or in intestinal metaplasia with usually cytoplasmic and nuclear staining should be excluded from scoring. Evaluation of in situ hybridization (ISH) is quite similar to breast cancer with ratio values of ≥ 2.0 indicating Her2 gene amplification. In cases where the ratio is in the borderline range (1.8-2.2), 40 additional tumor cells should be counted. Taking these modifications into account and defining the HER2 positive subgroup as IHC 3+ and IHC2+/FISH+ about 16% of GC are considered Her2 positive, affecting mainly tumor regions with intestinal (gland formig) type carcinoma. In contrast to breast cancer, up to one third of GC show a heterogeneous Her2 status both at IHC and ISH level favoring brightfield ISH over FISH.

Keywords: HER2 testing, Immunohistochemistry (IHC), FISH, SISH, Gastric carcinoma

Einleitung

Auf dem letzten amerikanischen Onkologenkongress, ASCO 2009, wurden die Ergebnisse der ersten randomisierten und kontrollierten Phase III Studie zur Wirksamkeit von Trastuzumab (Herceptin) beim fortgeschrittenen Magenkarzinom vorgestellt (ToGA) [9]. In die Studie konnten Patienten mit inoperablem, metastasiertem und/oder rezidiviertem Magenkarzinom eingeschlossen werden, wenn eine HER2 Genamplifikation (Ratio ≥ 2.0) und/oder eine HER2 Proteinüberexpression (IHC Score 3+) vorlag. Insgesamt wurden 3807 Magenkarzinome auf Her2/neu Amplifikation mittels FISH und Überexpression mittels HercepTest (IHC) geprüft mit einer Positivitätsrate von 22.1% [1].

In der ToGA Studie wurden 584 Patienten mit Her2 positivem lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Magenkarzinom entweder mit H+CT (Herceptin und Cisplatin und 5-FU oder Capecitabine) oder mit CT (Cisplatin und 5FU oder Capecitabine) behandelt. Nach einem medianen Beobachtungszeitraum von 17.1 Monaten stellte sich bereits ein Jahr früher als ursprünglich erwartet heraus, dass Herceptin signifikant die mediane Überlebenszeit um 2.4 Monate ($p=0.0048$) verlängerte. Eine signifikante Verkleinerung des Primärtumors und/ oder der Metastasen (Response rate) wurde bei 34.5 % der Patienten im CT Arm und bei 47.3% im H+CT Arm beobachtet ($p=0.0017$). Eine explorative post-hoc Subgruppenanalyse zeigte, dass bei Patienten deren Tumor einen HER2 Status von IHC 3+ oder IHC 2+/FISH positiv aufwies, eine Verlängerung der medianen Überlebenszeit von 4.2 Monaten (16 Monate gegenüber 11.8 Monate) zu beobachten war (**Abb. 1**).

Prinzip des Her2 Immunoscoring beim Magenkarzinom

In der ToGA Studie wurden alle Gewebeproben (ca. 2/3 Biopsien und 1/3 Resektate) parallel immunhistologisch und mittels in-situ Hybridisierung untersucht. Dabei kam ein gegenüber der Her2 Testung beim Mamakarzinom modifiziertes Scoring zum Einsatz [5]. Dies unterscheidet sich vor allem in zwei zentralen Punkten von dem beim Mammakarzinom:

1. Her2 Positivität ist vorwiegend in drüsig-intestinal differenzierten Tumoren (ca. 30%) oder beim Mischtyp in entsprechend differenzierten Tumorabschnitten (ca. 15%) nachweisbar. Der diffuse Typ zeigt nur in 5% eine Her2 Positivität, wobei reine Siegelringzellkarzinome meist vollständig negativ sind. Da sich in Tumordrüsen

luminal typischerweise keine Rezeptoren befinden, ergibt sich in den Tumoren mit nachgewiesener Genamplifikation immunhistochemisch primär nur eine basolaterale oder laterale, d.h. an den Zell-Zell-Kontaktzonen ausgebildete Membranfärbung (**Abb. 2a-c**). Ringförmige Färbungen kommen vor allem bei gering differenzierten intestinalen Adenokarzinomen mit soliden Zellnestern vor, sind aber eher die Ausnahme als die Regel.

2. Die Her2 Positivität ist auf Protein- und Gen-Ebene in nahezu jedem dritten fortgeschrittenen Magenkarzinom heterogen (<30% positive Tumorzellen) oder nur fokal ausgeprägt (**Abb. 2d-k**). Die Vorstellung, dass solche Foci in der Biopsie möglicherweise nur am Rand „zufällig“ erfasst sind, haben zur Empfehlung geführt, den Cut-off von mindestens 10% gefärbten Zellen speziell für Biopsien aufzugeben. In der ToGA Studie ergab sich dementsprechend auch für Biopsien eine den Resektaten in etwa entsprechende Her2 Positivitätsrate von ca. 22% [1].

Der auch heute noch von der FDA empfohlene flächenbezogene Cut-off von mindestens 10% gefärbten Tumorzellen ist beim Magenkarzinom somit nur noch für Resektate gültig, er entfällt bei Biopsien (**Tab. 1**). Damit stellt sich die Frage nach der Mindestzahl der zu beurteilenden Tumorzellen in bioptisch gewonnenen Tumorproben. In einer Studie zur Übereinstimmung der Her2 Testung am Magenkarzinom zwischen 8 deutschen und französischen Instituten für Pathologie konnte gezeigt werden, dass bei Beurteilung von weniger als 5 gefärbten Tumorzellen in TMAs die Übereinstimmungsrate deutlich abnahm [7]. Die Bestimmung des IHC-Scores sollte somit in Biopsien auf mindestens 5 gefärbten, kohäsiven Zellen basieren, die eine eindeutig beurteilbare, strichförmige Membranreaktion an den Zell-Zellkontakten aufweisen (**Abb. 2l,m**). Ringförmige Immunreaktionen, wie sie z.B. bei einzeln gelegenen Siegelringzellen mit typischerweise fehlender Genamplifikation vorkommen können sind diagnostisch nicht verwertbar und werden deshalb als falsch-positive Reaktion von der Auswertung ausgeschlossen (**Abb. 2n,o**).

Prinzip der Her2 Testung mittels ISH beim Magenkarzinom

Der Nachweis der Genamplifikation erfolgt im Prinzip analog zu den Regeln beim Mamakarzinom: 20 kohäsive auswertbare Zellen werden gezählt und dann aus dem Quotienten der Summe aller Gen-spezifischen Signale und der Summe aller

Chromosom 17-spezifischen Signale die Ratio bestimmt. Es wird weiterhin der traditionelle FDA Cut-off zugrundegelegt, so dass bei Ratio-Werten von ≥ 2.0 eine Her2 Genamplifikation diagnostiziert wird. In Anlehnung an die ASCO/CAP Richtlinien von 2007 [10] werden bei grenzwertiger Ratio (1.8-2.2) 40 weitere Zellen ausgezählt. Auf dieser Basis ergab sich in der ToGA Studie eine enge Korrelation zwischen Proteinüberexpression und dem Genamplifikationsstatus: Etwa 7.5% der IHC 0 / 1+ Tumoren zeigten zwar eine Amplifikation, die in der Mehrzahl aber nur niedriggradig ausgeprägt war (Zweidrittel mit einer Ratio zwischen 2-3). Immunhistochemisch stark überexprimierende Zellen (IHC 3+) wiesen in über 90% der Fälle eine hohe Genamplifikation (Ratio >3) auf (**vgl. auch Abb. 2d-j**).

Praxis der Her2 Testung – Testalgorithmus

Aufgrund der aktuellen Zulassung seitens der europäischen Zulassungsbehörde, EMA, kann Herceptin in Kombination mit Capecitabin oder 5FU und Cisplatin für das metastasierte Adenokarzinom des Magens und der gastrointestinalen Übergangszone (ÖGÜ) eingesetzt werden [3]. Die Patientenselektion unterscheidet sich insofern vom Mammakarzinom als IHC und FISH nicht gleichberechtigt genutzt werden können, vielmehr ist die Immunhistochemie das primäre Testverfahren, die FISH Analyse wird nur zur Absicherung des IHC2+ Befundes herangezogen (**Abb. 3**).

Praxis der Her2 Testung – Bedeutung des korrekten Immunoscoring

Aufgrund dieser Vorgaben kommt der Her2 Immunhistochemie eine führende Rolle zur Patientenselektion für eine Herceptintherapie zu. Eine einfache Übertragung der Her2 Testung vom Mamma- auf das Magenkarzinom wäre allerdings mit einer hohen **Falsch-Negativ-Rate** verbunden.

Die im Unterschied zur Beurteilung beim Mammakarzinom wesentlichste Änderung betrifft den *Wegfall der ringförmigen Färbung* als Voraussetzung für die Festlegung auf einen IHC 2+ oder IHC 3+ Score. Dass sich dies deutlich auf die Positivitätsrate auswirkt, lässt sich anhand der Literaturdaten belegen. In einer aktuellen Studie von Barros-Silva u. Mitarb. [2] wurden von 463 Magenkarzinomen 3.9% als IHC2+ und 5.4% als IHC3+ beurteilt, wobei das Prinzip des klassischen DAKO-/FDA-Scorings für Mammakarzinome angewandt wurde. In der ToGA Studie

lagen die entsprechenden Werte mit 12% für Score 2+ und 11% für Score 3+ etwa doppelt so hoch [1].

Ebenso ist der *Wegfall der 10% Regel bei Biopsien* von Bedeutung. Dies dürfte eine zusätzlich Erklärung dafür geben, warum in einer auf TMAs basierenden Studie an 61 Magenkarzinomen mit dem traditionellen Immunoscoreing nur 1.6% als IHC 2+ und 3.2% als IHC 3+ klassifiziert wurden [8]. Die gleiche Arbeitsgruppe veröffentlichte kürzlich nochmals TMA Daten zum Magenkarzinom (n=166 Fälle), wobei jetzt aber das von uns vorgeschlagene modifizierte Immunoscoreing angewandt wurde. Die Rate wird nunmehr mit 4% für IHC 2+ und mit 13% für IHC 3+ angegeben [6]. Die Anwendung des Mammascoring beim Magenkarzinom dürfte demnach zu einer ca. 50%igen Falsch-Negativ-Rate führen.

Als weiterer Einflussfaktor für eine hohe Interobserver-Varianz hat sich schließlich auch die Beurteilung der *Färbeintensität* herausgestellt. Die Panelisten der erwähnten Ringstudie waren sich einig, dass Tumoren, bei denen der zweifelsfreie Nachweis einer Membranfärbung erst bei starker Vergrößerung (40x Obj.) gelingt, als IHC 1+ zu klassifizieren ist. Lassen sich die membrangebundenen Färbereaktionen erst bei 10x Objektiv eindeutig erfassen, spricht dies für eine mässiggradige Färbeintensität (IHC 2+). Starke Membranfärbungen (IHC 3+) zeigen schon mit dem bloßen Auge einen „braunen“ Schnitt, wobei ein gewisses Maschendrahtmuster schon in der Lupenvergrößerungen (Obj. 2.5x oder 5x) nachweisbar ist (**Abb. 4, Objektivregel**).

Schließlich besteht auch das Risiko einer **falsch-positiven Beurteilung**. Grundsätzlich sollten nur validierte Assays zum Einsatz kommen, was für FDA zugelassene Testplattformen (HercepTest, DAKO und 4B5, Ventana) spricht. Bei Verwendung dieser Antikörper, insbesondere aber bei 4B5, können vor allem in der intestinalen Metaplasie aber auch in Siegelringzellen unspezifische Färbungen im Zytoplasma, selbst im Zellkern und auch im Bereich der Zellmembran auftreten. Diese Färbereaktion, die nicht mit einer Genamplifikation einhergeht (**Abb. 2n-r**), darf nicht mit einer spezifischen IHC3+ Färbung verwechselt werden. Es empfiehlt sich somit ein stufenweises Vorgehen, bei dem zunächst das zweifelsfreie Tumorareal identifiziert und dann die Beurteilung nach den o.a. Regeln vorgenommen wird (**Abb. 4**).

Praxis der Her2 Testung – Bedeutung der korrekten ISH Analyse

Im Gegensatz zum Mammakarzinom sind in bis zu einem Drittel der Magenkarzinome heterogene Genamplifikationen zu erwarten. Dies erklärt sich einerseits durch den Anteil von bis zu 30% gemischten Tumortypen beim fortgeschrittenen Magenkarzinom. Nicht selten können aber selbst in einer Tumordrüse beim intestinalen Typ nebeneinander amplifizierte und nicht-amplifizierte Tumorzellgruppen vorkommen (**Abb. 2k**). Dies macht ein präzises Scannen der Tumorprobe erforderlich, um amplifizierte Klone nicht zu übersehen. Aus diesem Grund ist nach eigener Erfahrung speziell beim Magenkarzinom ein lichtmikroskopisch auswertbares ISH Verfahren, welches ein Scannen bei mittlerer Vergrößerung (20x-40x) erlaubt, der Fluoreszenz-basierten Technik überlegen, bei der zumeist mit starker Vergrößerung (100x, Oilimmersion) gearbeitet wird. Diese im Lichtmikroskop beurteilbaren Färbungen, wie z.B. die der Brightfield Dual Color SISH (BDISH, Ventana) Technik, ermöglichen somit eine nahezu 1:1 Zuordnung zwischen Immunhistochemie und ISH für einzelne Zellen und Zellgruppen. Dies erlaubt eine gezielte Beurteilung insbesondere auch von fokalen oder grenzwertigen IHC 2+ Befunden (**Abb. 2l,m**). Die bei der ISH Untersuchung zu beachtenden Regeln entsprechen weitgehend denen beim Mammakarzinom (**Abb. 5**).

Qualitätssicherung in der BRD

Um eine qualitätsgesicherte Her2 Testung in der Breite anbieten zu können, werden nunmehr drei verschiedene Test- und Trainingsmodule zusammen von der Deutschen Gesellschaft für Pathologie und dem Berufsverband der Deutschen Pathologen angeboten. Dies sind im Einzelnen neben dem bekannten QuIP Ringversuchen nunmehr auch zunächst an den Instituten der Autoren angebotene Fortbildungskurse. Als Drittes ist ein web-basiertes Biomarkerportal (mit frdl. Unterstützung der Fa. Roche) in der Diskussion, welches die Dokumentation der eigenen Ergebnisse und ein Experten-basiertes Konsilsystem umfassen soll.

Häufig gestellte Fragen

1. *Wieviele Biopsien müssen untersucht bzw. entnommen werden, um ein verlässliches Her2 Ergebnis zu erzielen?* Hierzu liegen noch keine systematischen Vergleichsstudien vor. Nach S3 Leitlinie zum Magenkarzinom wird die Entnahme von mindestens 6-8 Biopsien aus tumorverdächtigen Läsionen empfohlen (pers. Mitteilung. PD Dr Möhler, AGO).

2. *Gibt es Unterschiede zwischen Primärtumor und Metastasen?* Auch hierzu liegen erst wenige Daten vor. In der bereits erwähnten TMA basierten Untersuchung waren der Her2 Status im Primarius und der korrespondierenden Lymphknotenmetastase identisch [6].

3. *Welche Magenkarzinome sind auf Her2 Expression zu testen?* Entsprechend der Zulassung für das metastasierte Magenkarzinom ist eine grundsätzliche Testung aller Magenkarzinome heute (noch) nicht zu rechtfertigen. Die Indikation zur Testung stellt somit der betreuende Onkologe. Eine Beschränkung der Testung auf bestimmte Typen des Magenkarzinoms, z.B. Ausschluss der siegelringzelligen diffusen Karzinome (mit <5% Positivität), ist dabei nicht vorgesehen. Insbesondere bei Mischtypen sollten aber gezielt die Tumorblöcke bevorzugt zur Analyse herangezogen werden, bei denen drüsig-intestinal differenzierte Areale nachweisbar sind. Ferner ist daraufhinzuweisen, dass Karzinome am ösophagogastralen Übergang im Vergleich zum distalen Magenkarzinom (Antrum) eine etwa doppelt so hohe Her2 Positivität (30% vs. 16%) in der ToGA Studie aufwiesen, was sich ebenfalls im Wesentlichen auf den unterschiedlichen Anteil intestinaler Tumortypen zurückführen lässt.

4. *Polysomie und fokale Positivität:* In der ToGA Studie zeigten weniger als 10% der Tumoren eine *Polysomie*. Aufgrund der nur wenigen Einzelfälle lässt sich für bestimmte Untergruppen, wie z.B. den nicht-amplifizierten aber polysomen Fällen mit mehr als 6 Gencounts für das Magenkarzinom noch keine abschließende Aussagen treffen. In der Zulassung wird nur auf die Genamplifikation ≥ 2 Referenzgenom genommen. Letztlich für diese Gruppe nach dem IHC-Score zu entscheiden, d.h. nur Fälle mit IHC3+ sind für eine Herceptintherapie geeignet.

Eine weitere nicht abschließend beantwortete Frage betrifft die Gruppe der Magenkarzinome vom Mischtyp, bei denen die intestinale Komponente <10% im Schnittpräparat eines Tumorsektates einnimmt, dieser Focus aber zu 100% IHC 3+ ist. Solche Fälle würden selbst beim Mammakarzinom als den Verlauf bestimmender

Tumorklon betrachtet und somit positiv gewertet (persönliche Mitteilung Dr. Wedad Hanna, Toronto). Für die Praxis dürfte ein analoges Vorgehen auch beim Magenkarzinom Sinn machen, zumal die 10% Regel in der Biopsie schon entfallen ist. In jedem Fall aber sollte man dies im Befund gesondert aufführen und versuchen, noch zusätzliche Tumorblöcke zur Her2 Untersuchung zu bringen.

5. *Tumorbiologische Aspekte:* Eine eigenständige *prognostische Bedeutung* von Her2/neu beim Magenkarzinom ist bislang nicht gesichert. Warum ein Patient mit metastasiertem Magenkarzinom von der Therapie mit Herceptin profitiert, selbst wenn die *Positivität nur fokal (<10-30%) ausgeprägt* ist, bleibt noch weiter aufzuklären. Anzumerken ist aber, dass die (F)ISH Analyse z.B. lediglich auf 20 (-40) Zellen basiert, ein Bruchteil dessen, was für die Rezeptorexpression zumindest noch für Resektate gefordert wird. Insofern wurde in der ToGA Studie mit dem Wegfall der 10% Regel für Biopsien ein erster Schritt zur Angleichung der Beurteilungskriterien zwischen Immunhistologie und in situ Hybridisierung getroffen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Daten zum Magenkarzinom möglicherweise auch zu einem Überdenken der Beurteilungskriterien beim Mammakarzinom führen werden [4]. Letztlich ist die Frage nach der „richtigen“ Her2 Testmethode weniger an Test-zu-Test-Übereinstimmungen als vielmehr an den Therapieergebnissen auszurichten.

Fazit

Die Her2/neu Bestimmung wird in 2010 zu einem festen Bestandteil in der Magenkarzinomdiagnostik des Pathologen werden. Aufgrund der Zulassung von Herceptin für das metastasierte Magen- und Kardia-/ÖGÜ-Karzinom wird die Indikation zur Untersuchung primär der klinische Onkologe stellen. Die Her2 Diagnostik unterscheidet sich in zentralen Punkten von dem beim Mammakarzinom (**Tab. 2**). Demnach sind FISH und IHC nicht gleichberechtigt. Vielmehr erfolgt primär die immunhistochemische Testung, wobei nur bei IHC 2+ eine zusätzliche Prüfung der Genamplifikation (ISH Untersuchung) erforderlich ist. Die Beurteilung der Her2 Immunfärbung unterscheidet sich aber in wesentlichen Punkten vom Mammakarzinom: Auch inkomplette Färbungen werden gewertet und bei Biopsien entfällt der Grenzwert von mindestens 10% gefärbter Tumorzellen. Die Anwendung der sog. Objektivregel zur Beurteilung der Färbeintensität hat sich als hilfreich zur Verbesserung der Beobachter-Übereinstimmung herausgestellt.

Literatur

1. Bang Y, Chung H, Xu J, Lordick F, Sawaki A, Lipatov O, Al-Sakaff N, See C, Rueschoff J, Van Cutsem E (2009) Pathological features of advanced gastric cancer (GC): Relationship to human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) positivity in the global screening programme of the ToGA trial. JCO 27:15s (ASCO 2009, Abstr. No 4556)
2. Barros-Silva JD, Leitão D, Afonso L, Vieira J, Dinis-Ribeiro M, Fragoso M, Bento MJ, Santos L, Ferreira P, Rêgo S, Brandão C, Carneiro F, Lopes C, Schmitt F, Teixeira MR (2009) Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. Br J Cancer 100:487-93
3. EMEA, European Medicines Agency (2009): Opinion
www.emea.europa.eu/pdfs/human/opinion/Herceptin_82246709en.pdf
4. Gilcrease MZ, Woodward WA, Nicolas MM, Corley LJ, Fuller GN, Esteva FJ, Tucker SL, Buchholz TA (2009) Even low-level HER2 expression may be associated with worse outcome in node-positive breast cancer. Am J Surg Pathol. 2009 May;33(5):759-67.
5. Hofmann M, Stoss O, Shi D, Büttner R, van de Vijver M, Kim W, Ochiai A, Rüschoff J, Henkel T (2008) Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. Histopathology. 52:797-805
6. Marx AH, Tharun L, Muth J, Dancau AM, Simon R, Yekebas E, Kaifi JT, Mirlacher M, Brümmendorf TH, Bokemeyer C, Izbicki JR, Sauter G (2009) HER-2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. Hum Pathol 40:769-77
7. Rüschoff J et al. (2010) Her2 testing in gastric cancer: Guideline validation and development. Virch Arch, accepted
8. Tapia C, Glatz K, Novotny H, Lugli A, Horcic M, Seemayer CA, Tornillo L, Terracciano L, Spichtin H, Mirlacher M, Simon R, Sauter G (2007) Close association between HER-2 amplification and overexpression in human tumors of non-breast origin. Mod Pathol 20:192-8
9. Van Cutsem E, Kang Y, Chung H, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Hill J, Lehle M, Feyereislova A, Bang Y (2009) Efficacy results from ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human

epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC).
JCO 27: 18s, (ASCO 2009, Abstr. No 4509)

10. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists (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

Abb. 1 Relatives Risiko (Hazard ratio) zu überleben bei Trastuzumab behandelten Patienten mit Her2 amplifiziertem Magenkarzinom (FISH+) in Abhängigkeit vom Grad der Her2 Rezeptorüberexpression (IHC0 bis IHC3+). Der Therapieerfolg von Herceptin ist auf die Tumoren mit IHC2+/FISH+ und IHC3+ begrenzt (nach [9]).

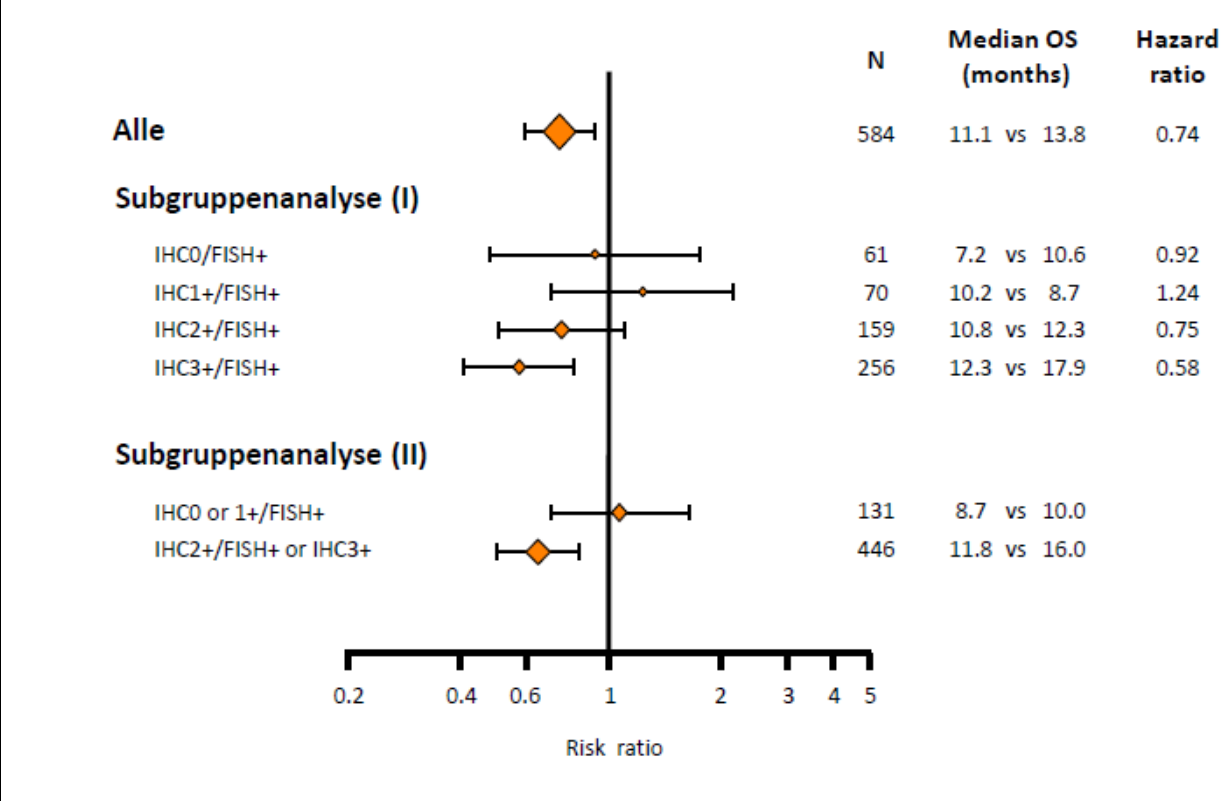


Abb. 2 Her2 Diagnostik beim Magenkarzinom. *IHC-Färbereaktion (a-c):* Kräftige Her2 Überexpression im Adenokarzinom (intestinaler Typ) mit meist nur lateral an den Zell-Zellkontaktstellen (teilweise auch basolateral und ringförmig) ausgeprägter Membranfärbung (**a**: -> 3+, > 2+) bei Her2 Genamplifikation (**b**: Nachweis mittels lichtmikroskopischer dualer Silber in situ Hybridisierung, BDISH; **c**: mittels Fluoreszenz in-situ Hybridisierung, FISH). *Heterogene Her2 Positivität in Biopsie (d-k):* **d**: Drei Biopsiepartikel aus Karzinom vom Mischtyp, fokale IHC 3+ (**g**) mit hoher Genamplifikation (**j**, Ratio=6.5), teilweise IHC2+ (**f**) mit niedriggradiger Amplifikation (**i**, Ratio=2.4) und fehlender Her2 Expression im diffusen siegelringzelligen Anteil (**e**: IHC0, **h**: Ratio=1.2). **k** Fokale Amplifikation in Tumordrüse eines intestinalen Karzinoms (BDISH). *Mindestzahl zu beurteilender Tumorzellen (l.-m):* Auswertbare Tumorzellgruppe sollte mindestens 5 Zellen aufweisen (**l**). Gleicher Focus leicht erkennbar in BDISH Technik (**m**). *Unspezifische Färbungen (n-r):* Unspezifische nukleäre und zytoplasmatische Färbung in Siegelringzellen (4B5 Antikörper, Ventana) ohne spezifische Membranfärbung (**n**), dementsprechend keine Genamplifikation (**o**). *Vergleich 4B5 (Ventana) und HercepTest (DAKO) in intestinaler Metaplasie (obere Bildhälfte) und angrenzender High-grade Dysplasie (untere Bildhälfte) (p.-r):* **p. 4B5:** Kräftige zytoplasmatische und nukleäre Färbung im Bereich der intestinalen Metaplasie (oben), dagegen spezifische kräftige Membranfärbung in angrenzender High-grade Dysplasie (untere Bildhälfte). **q. HercepTest:** Kaum unspezifische Färbung in intestinaler Metaplasie, allerdings auch nur schwache (IHC2+) Färbung in High-grade Dysplasie. **r. BDISH:** Hohe Genamplifikation in High-Grade Dysplasie (rechte Bildhälfte), keine Amplifikation in angrenzender intestinaler Metaplasie (linke Bildhälfte).

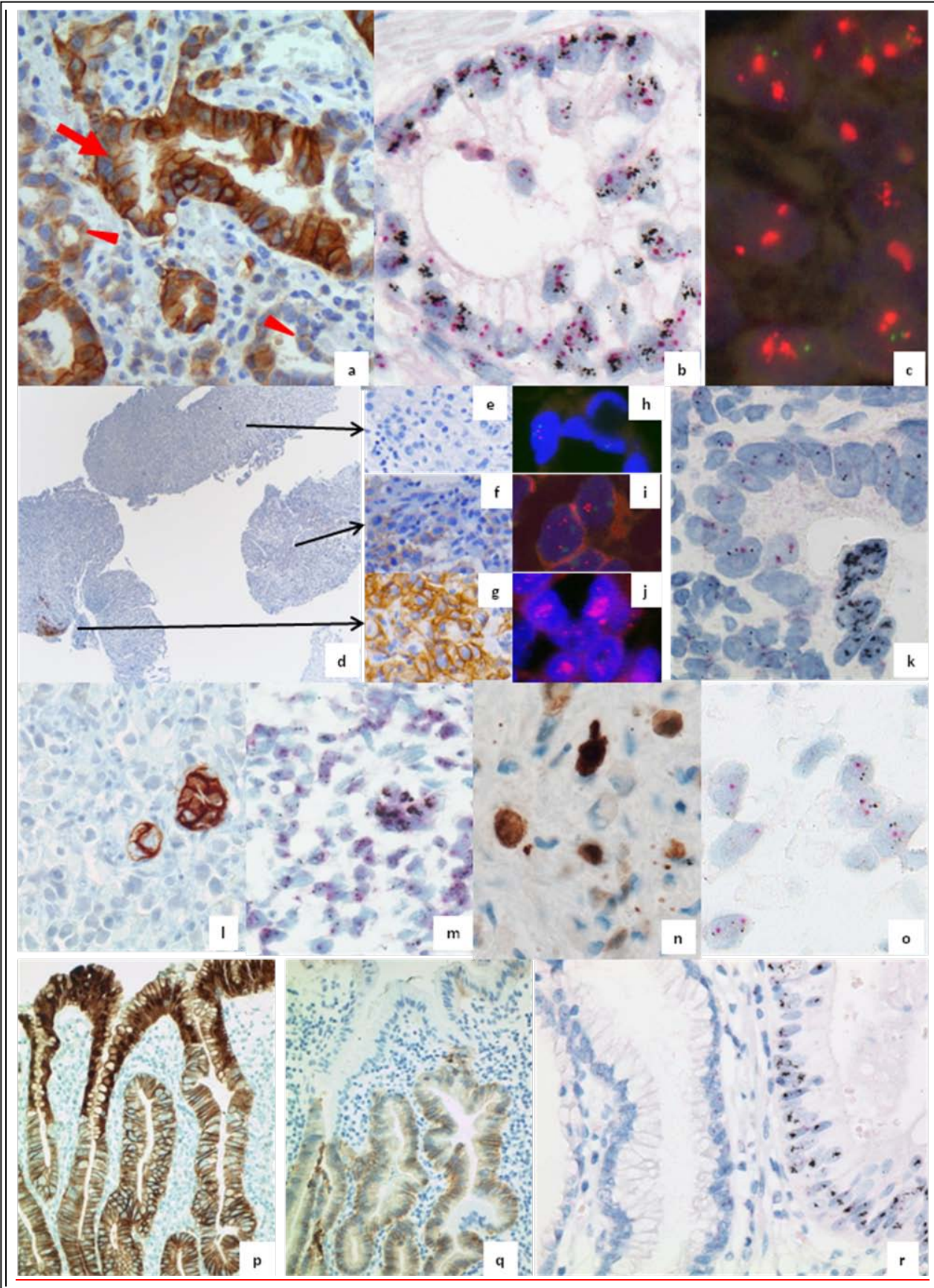


Abb. 3 Her2 Testalgorithmus beim Adenokarzinom des Magens und des ösophagogastralen Überganges (nach Zulassung [3])

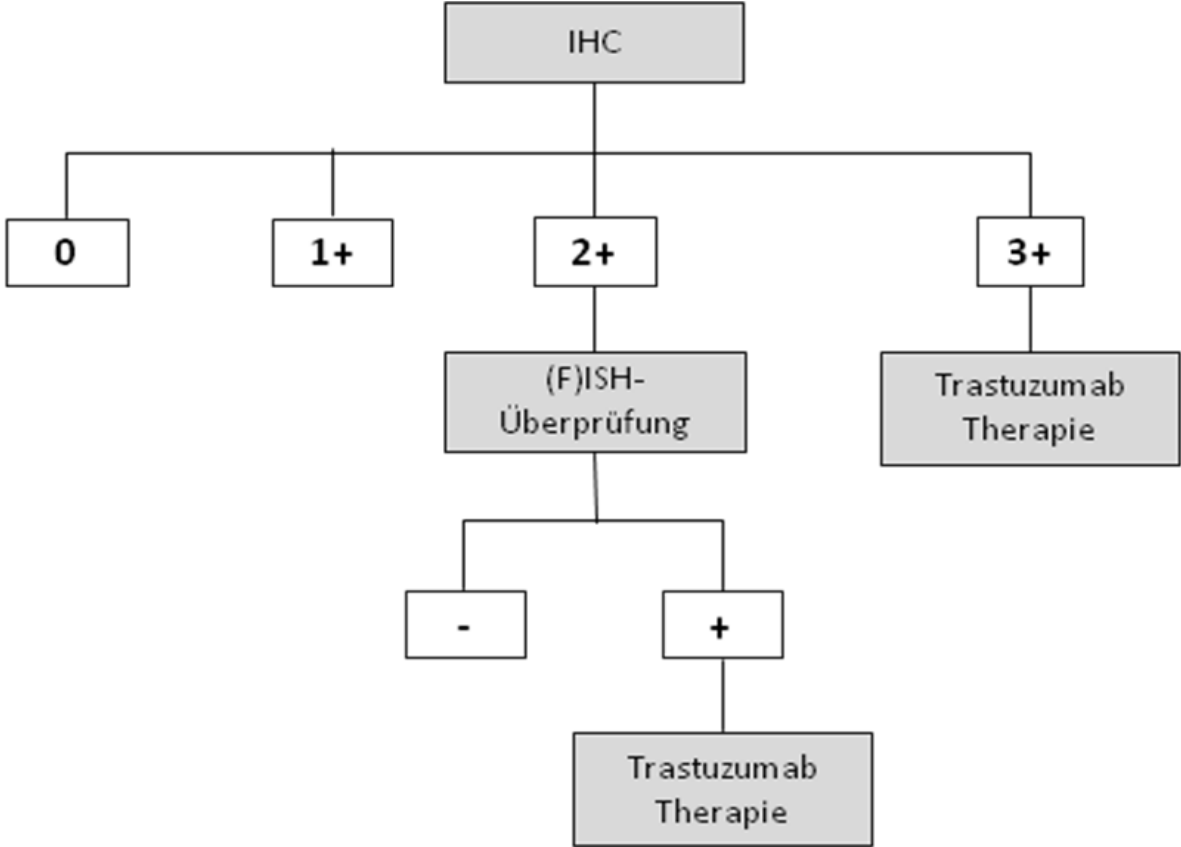


Abb. 4 Praxis des Her2 Immunoscoring: Schrittweises Vorgehen mit zunächst Identifikation des Adenokarzinoms und dann Intensitäts-Scoring unter Berücksichtigung des Vergrößerungsfaktors, ab dem die Membranfärbung eindeutig identifizierbar ist (sog. **Objektivregel**), (Fallbeispiele mit benötigtem Obj. 5x-10x/40x, IM=intestinale Metaplasie, TU=invasiver Karzinomanteil) (mod. n. [7])

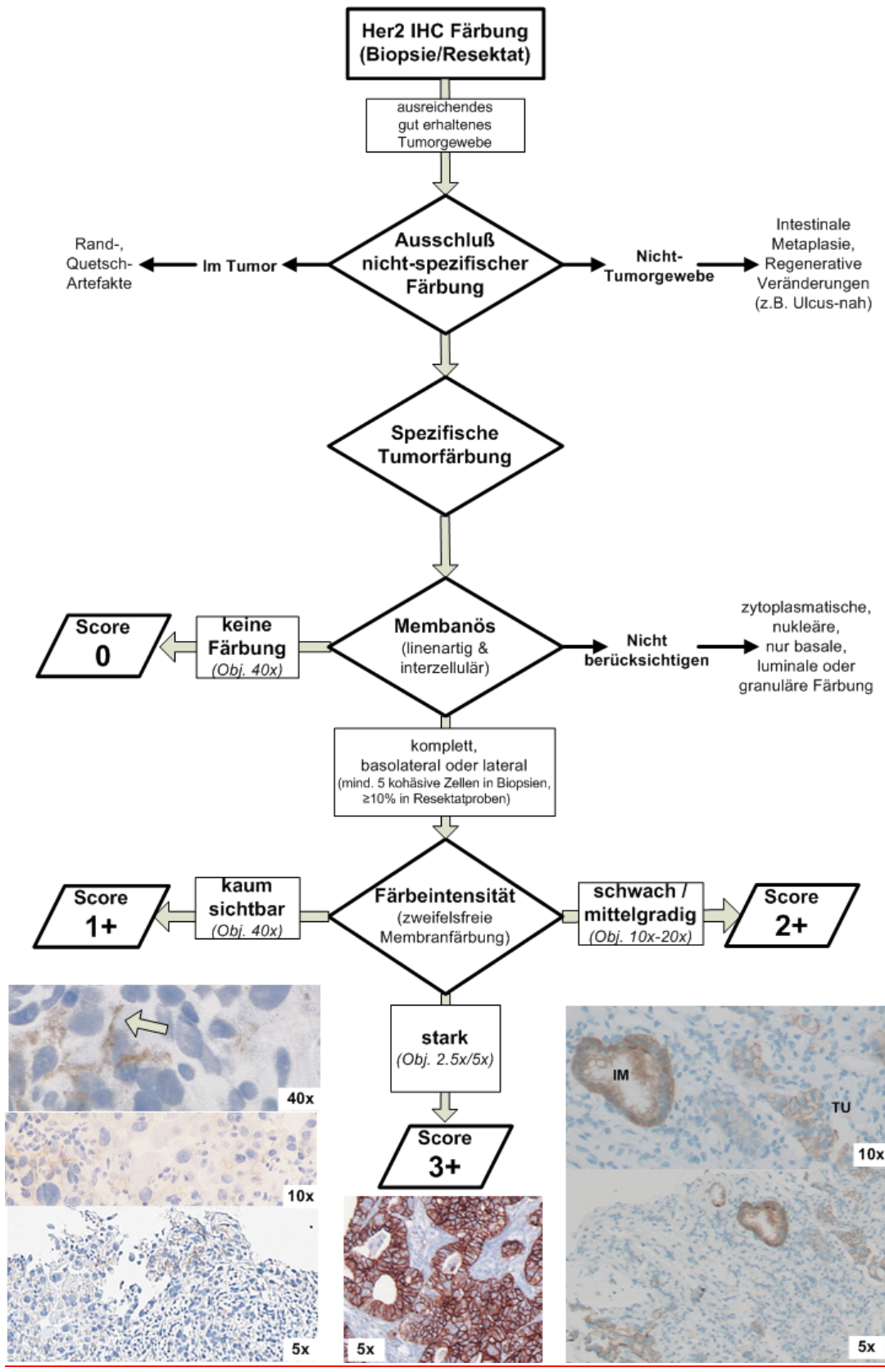
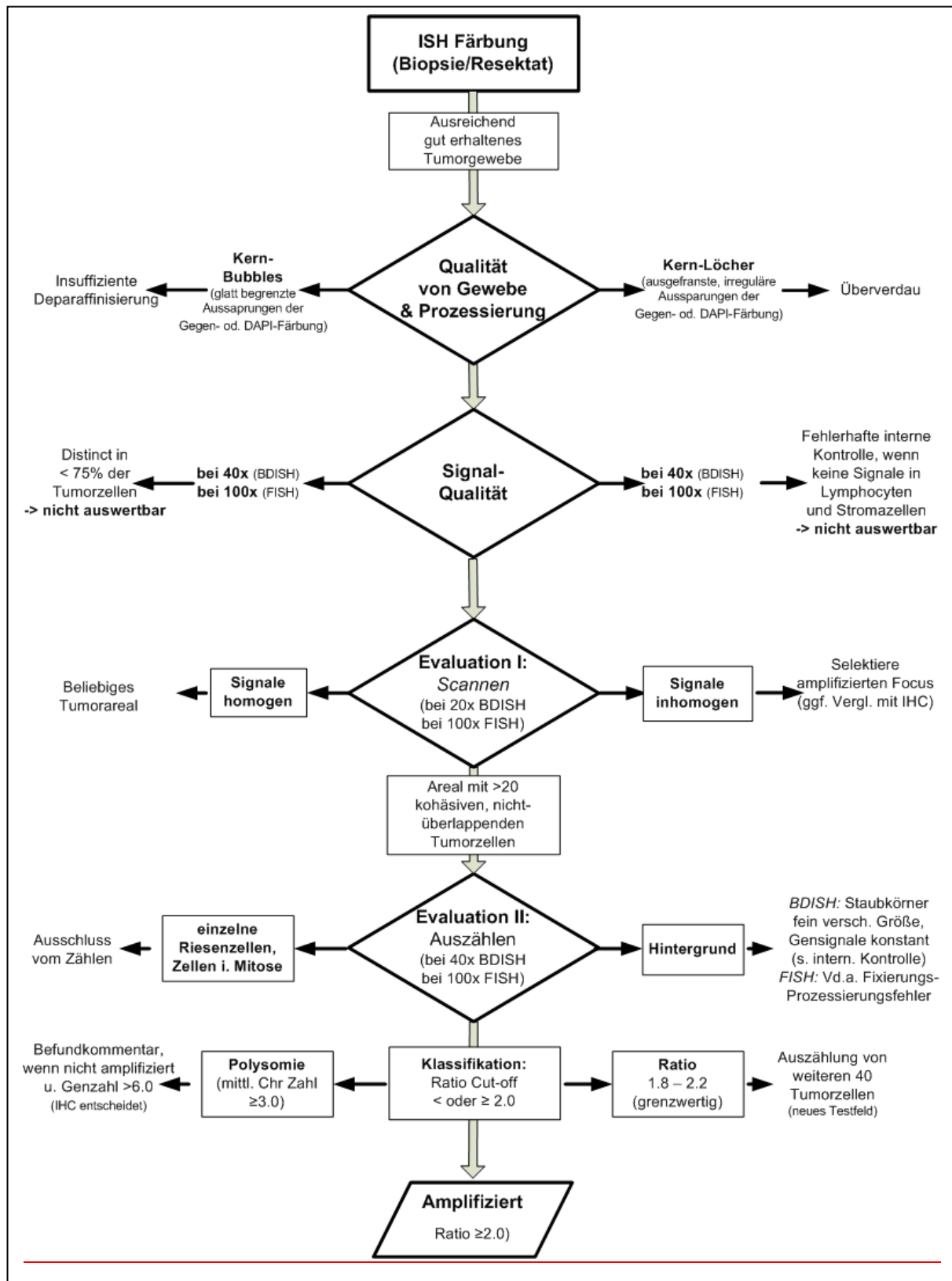


Abb. 5 Praxis der Her2 ISH Auswertung



Tab. 1 Modifiziertes Her2 Immuno-Scoring beim Magenkarzinom (mod. n. [5])

Färbe-Intensität: IHC-Score	Resektat-Beurteilung	Biopsie-Beurteilung	HER2 Status
0	Keine Reaktivität oder Membranfärbung in < 10% der Tumorzellen	Keine Reaktivität oder Membranfärbung in keiner (oder <5) der Tumorzellen**)	Negativ
1+	Sehr schwache Membranfärbung in mind.10% der Tumorzellen	Sehr schwache Membranfärbung in Tumorzellgruppen unabhängig vom Prozentsatz (mind. 5 Tumorzellen)	Negativ
2+	Schwache bis mittelgradige, komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung in mind. 10% der Tumorzellen	Schwache bis mittelgradige, komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung unabhängig vom Prozentsatz (mind. 5 Tumorzellen)	Grenzwertig (ISH Überprüfung erforderlich)
3+	Starke komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung in mind. 10% der Tumorzellen	Starke komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung unabhängig vom Prozentsatz (mind. 5 Tumorzellen)	Positiv

Tab. 2 Her2 Diagnostik beim Magenkarzinom – Unterschiede im Vergleich zum Mammakarzinom. (GC: Gastric Cancer; ÖGÜ-Ca: Karzinom des gastro-ösophagealen Überganges; *) n. ASCO/CAP [10])

		Magenkarzinom	Mammakarzinom
IHC Färbung	Ausmaß (Area Cut-off)	Biopsie ≥5 Zellen Resektat ≥10%	Jeweils ≥10% (≥30%)*)
	Membranfärbung (Zirkulärität)	meist inkomplett (entfällt als Krit. für IHC2+/3+)	Zirkularität Voraussetzung für IHC2+/3+
Her2 Positivität	Tumortyp	bis 30% der intestinalen GC bis 15% bei Mischtyp bis 5% bei diffusem Typ (Siegelringzell-Ca meist neg.)	bis 25% der duktaalen BC (G2/G3); selten oder nie in Sondertypen (z.B. lobulär, medullär) und duktaal G1
	Tumorage	bis 30% der Kardia-/ÖGÜ-Ca bis 15% im Antrum	Keine Beziehung
Patientenselektion	FISH vs. IHC	IHC als Primärtest FISH nur bei IHC2+ FISH pos. ab Ratio ≥2.0	FISH u. IHC gleichwertig FISH pos. ab Ratio ≥2.0 (>2.2)*)

