

# **Sinn und klinische Relevanz des HER-2-Nachweises (Immunhistologie und FISH)**

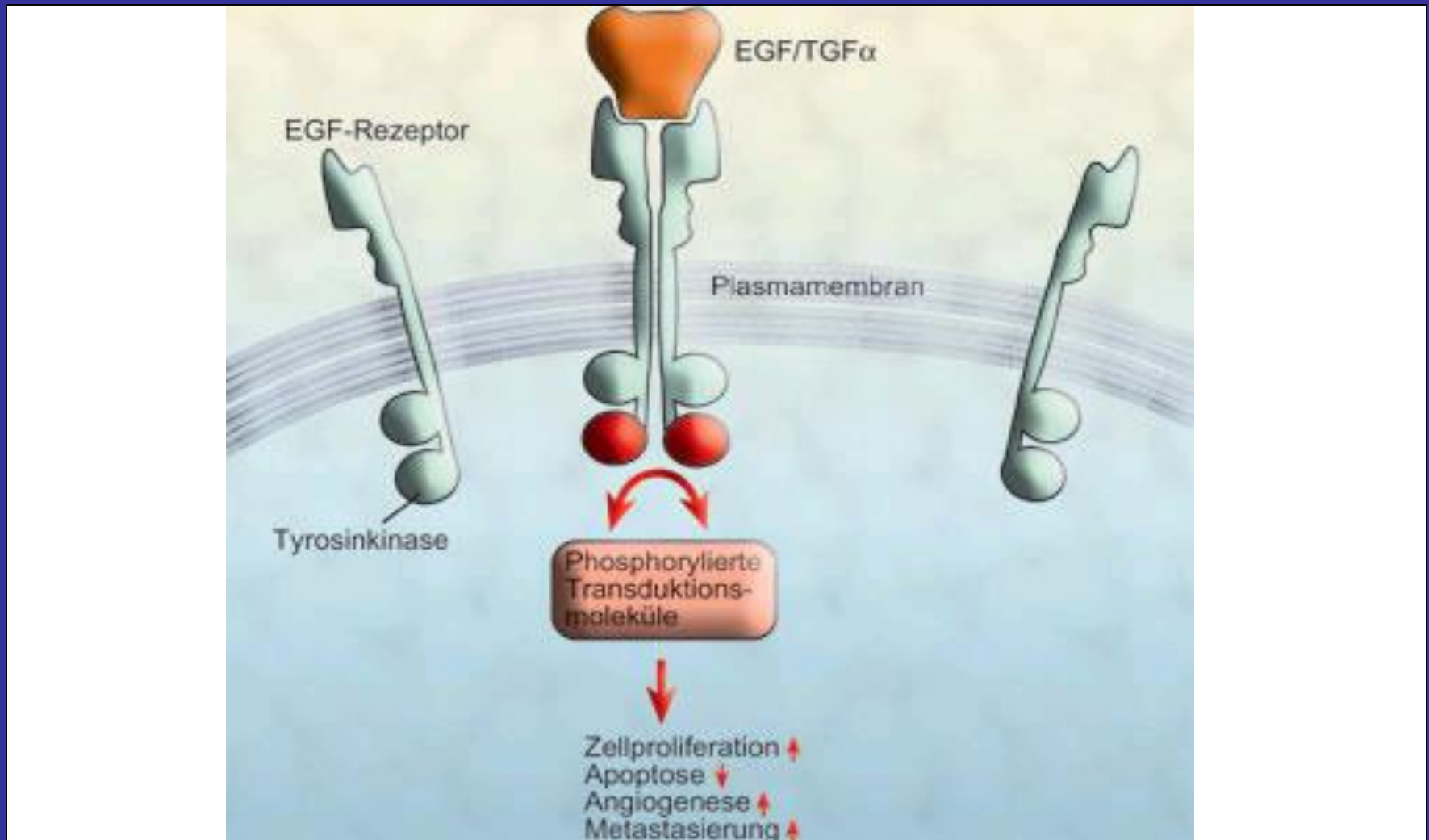
**(Interne Fortbildungsveranstaltung im Institut)**

Dr. Katrin Henneicke  
Prof. Richter  
Institut für Pathologie Hannover

# HER-2/neu

- Bezeichnung für „**H**umanen **E**pidermalen Wachstumsfaktor-**R**ezeptor 2“
- HER-2/neu zählt zu den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGFR), von denen bisher vier (HER-1 bis HER-4) bekannt sind
- Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an die extrazelluläre Domäne des HER-2-Rezeptoren bilden sich Dimeren, die wiederum im Inneren der Zelle als Tyrosinkinase Transkriptionsfaktoren aktivieren, welche die Proliferation der Zelle beeinflussen
- D.h. HER-2/neu fördert die Zellteilung und damit das Zellwachstum

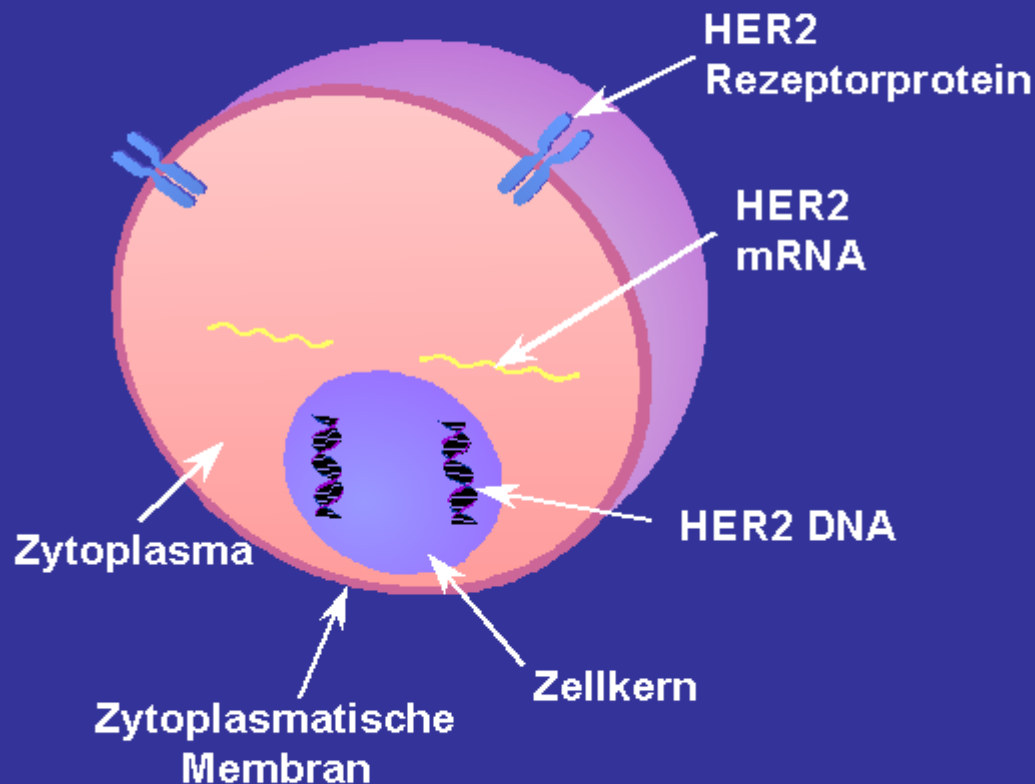
# Funktion der Wachstumsfaktor-Rezeptoren



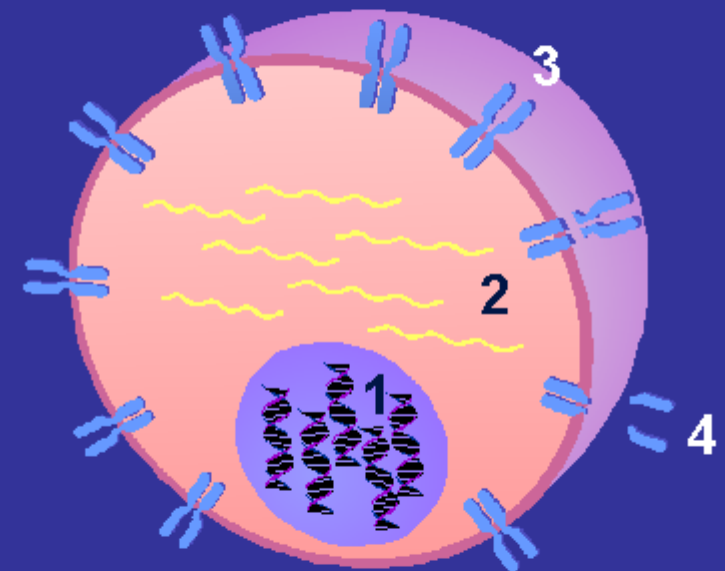
Bildquelle nicht mehr eruiert

# HER2 Genamplifikation und Proteinüberexpression

Normal



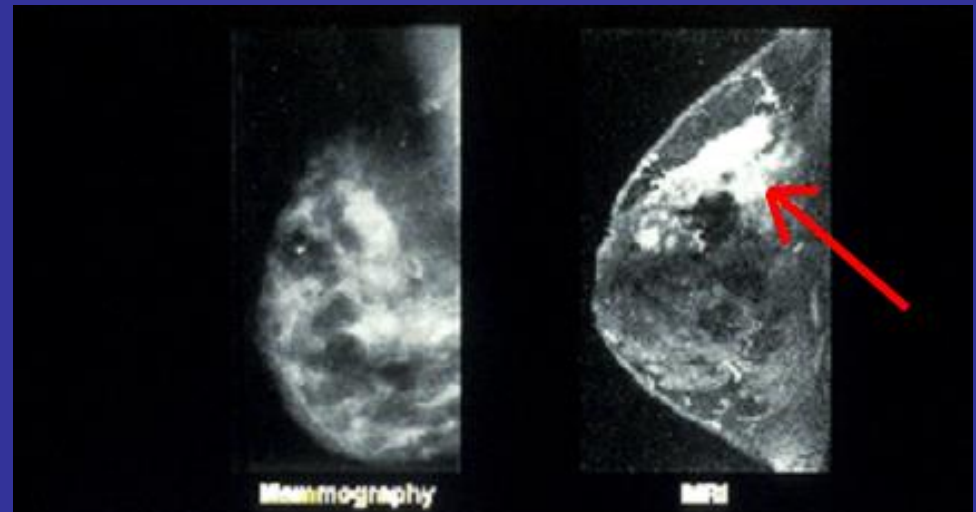
Amplifikation/Überexpression



- 1 = ↑ Anzahl Genkopien
- 2 = ↑ mRNA Transkription
- 3 = ↑ Zelloberfläche:  
Rezeptorprotein-Expression
- 4 = ↑ Freisetzung der extrazellulären  
Rezeptordomäne

# Bedeutung von HER-2/neu für Mammakarzinome

- Das Gen findet sich bei 25-30% aller Mammakarzinome in erhöhter Anzahl in den Tumorzellen (Amplifikation), was zu einer Überexpression des HER-2/neu-Rezeptors führt, sodass eine ungehemmte Zellteilung stattfinden kann



Bildquelle nicht mehr eruiierbar

# Methoden der HER2-Bestimmung

## → Proteinüberexpression

- Immunhistochemie (IHC)
- Western blot
- im Serum zirkulierendes “Shed-Antigen” mit ELISA

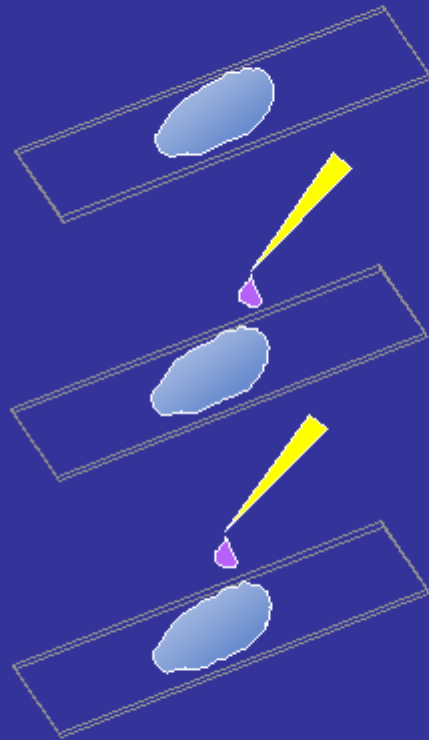
## → mRNA-Transkription

- Northern blot
- quantitative RT-PCR

## → Genamplifikation

- Fluoreszenz in-situ Hybridisierung (FISH)
- Southern blot
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

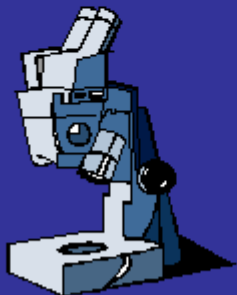
# Immunhistochemie (IHC)



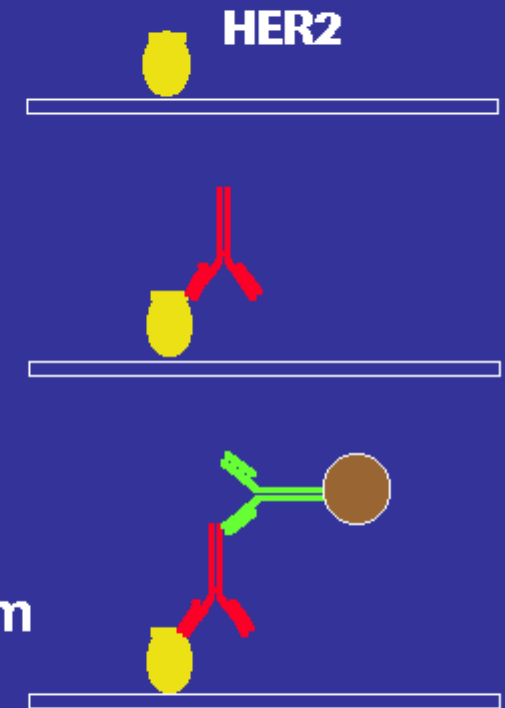
Formalin-fixiertes,  
Paraffin-eingebettetes  
Mamma-Ca Gewebe

Anti-HER2-Antikörper

Anti-Anti-HER2 Antikörper  
Farbstoff-freisetzendes Enzym



Mikroskopische Beurteilung  
der HER2-Anfärbung



# Möglichkeiten der immunhistochemischen Darstellung des HER-2/neu Rezeptors

## HercepTest:

- Epitop-Demaskierung durch „Epitope-Retrieval“-Lösung bei 95 – 99°C für 40 Min.
- Kaninchen Anti-Human HER-2
- Detektion über enzymmarkierten Sekundärantikörper
- Substrat-Chromogen = DAB

## In unserem Institut:

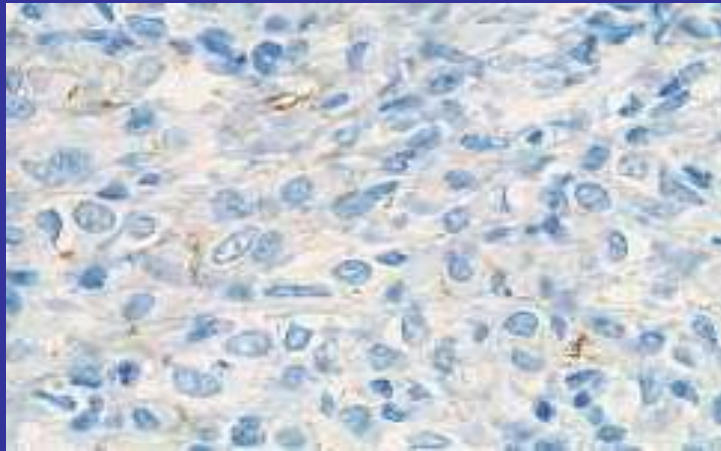
- Epitop-Demaskierung durch „Target Retrieval-Lösung“ bei 70°C über Nacht
- Kaninchen Anti-Human HER-2
- Detektion mit Sekundärantikörper über Avidin-Biotin-System
- Substrat-Chromogen = Neufuchsin



# Interpretation der immunhistologischen Färbemuster von HER-2/neu

- Keine Färbung oder Membranfärbung in weniger als 10% der Tumorzellen = Score 0
- Sehr schwache Membranfärbung in mehr als 10% der Tumorzellen. Es ist jeweils nur ein Teile der Zellmembran gefärbt = Score 1+
- Schwache bis mäßig intensive Färbung der gesamten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen = Score 2+
- Intensive Färbung der gesamten Zellmembran in mehr als 10% der Tumorzellen = Score 3+

# Immunhistologische Beurteilung der HER-2-Expression



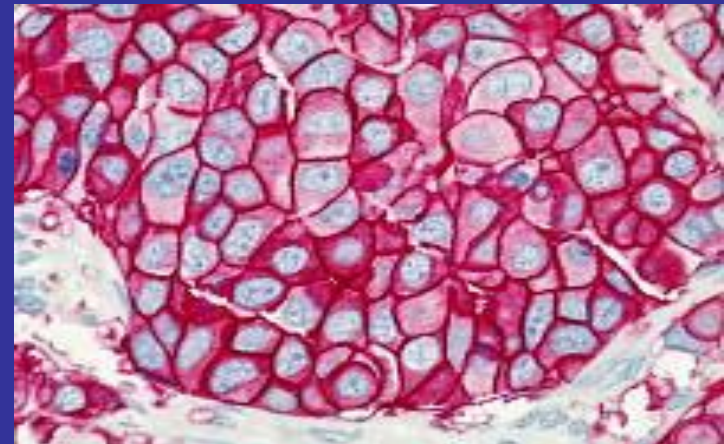
1+



2+



3+



3+

DAB-Detektion

Neufuchsin-Detektion

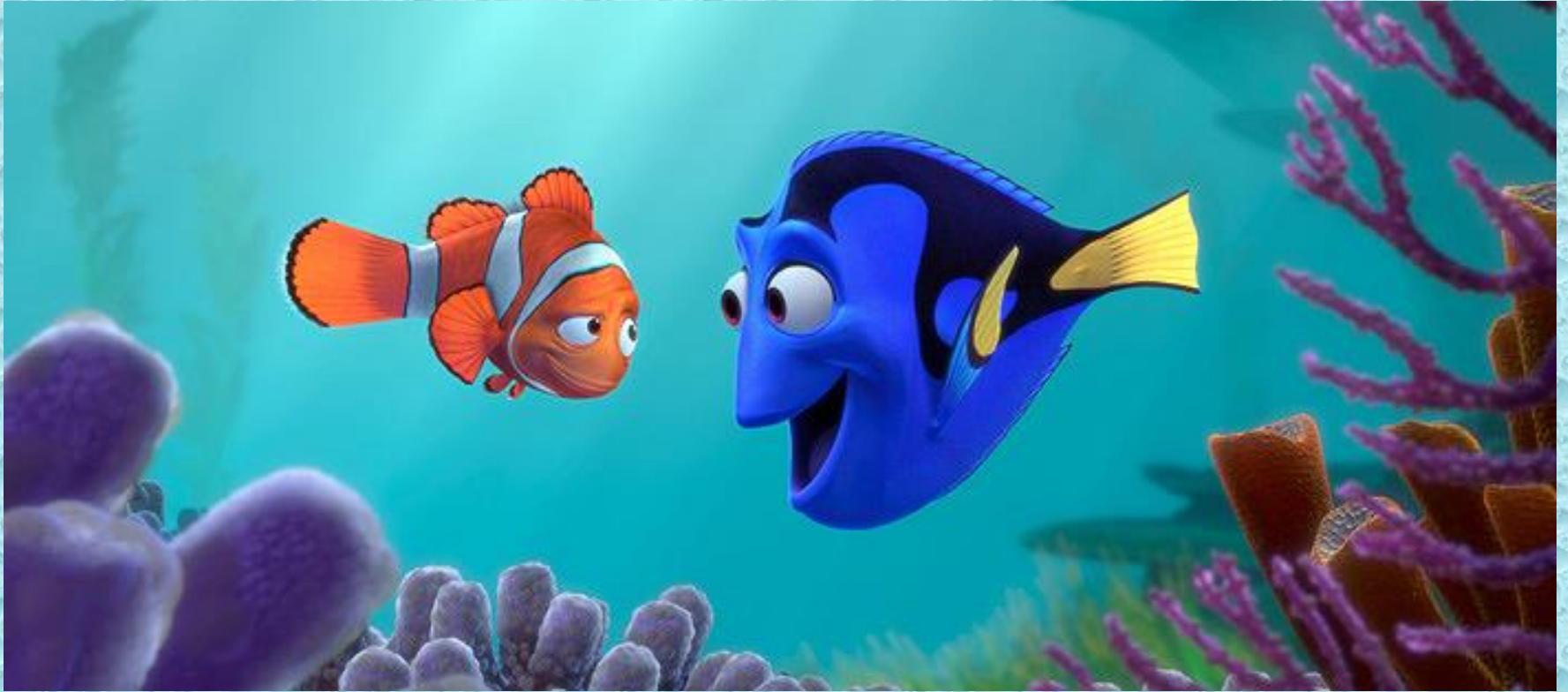
Bildquelle nicht mehr eruierbar

# Weitere Vorgehensweise anhand der immunhistologischen Ergebnisse:

- 0 bis 1+: immunhistologisch „negativ“, d.h. keine Herceptin-Behandlung
- 2+: immunhistologisch fraglich, weitergehende Untersuchungen erforderlich (FISH), dann erst Behandlungsentscheid
- 3+: immunhistologisch deutlich positiv, d.h. Indikation für Herceptin-Behandlung

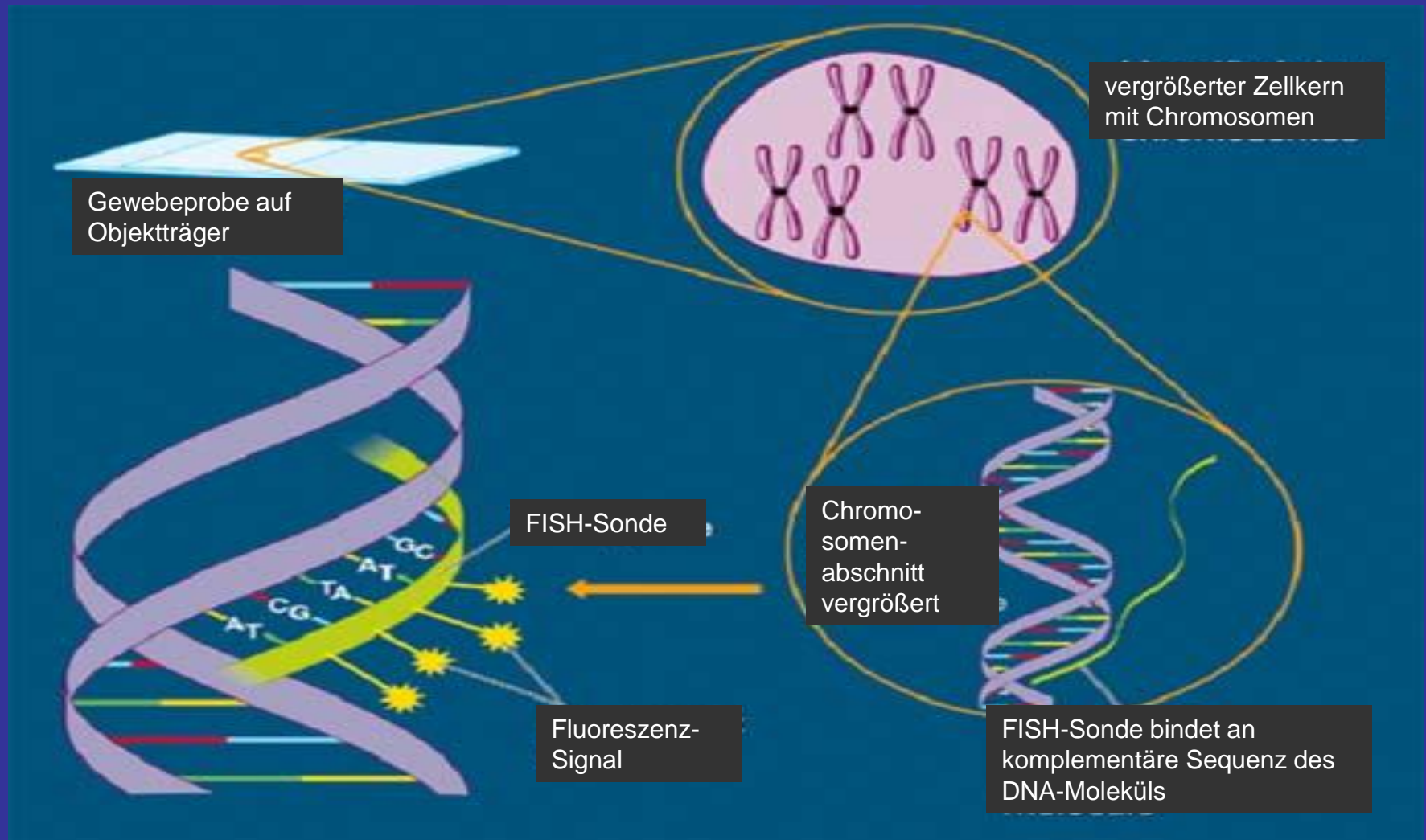


# Was versteht man unter FISH?



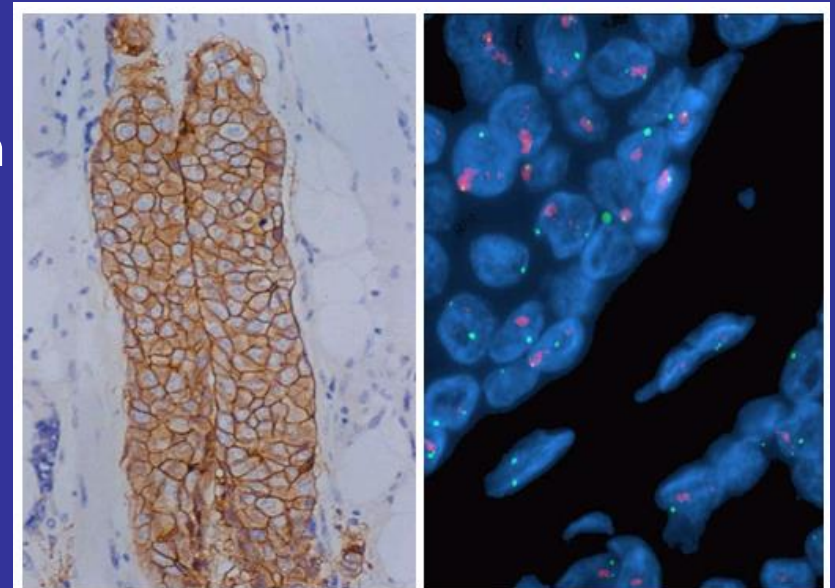


# FISH = Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung



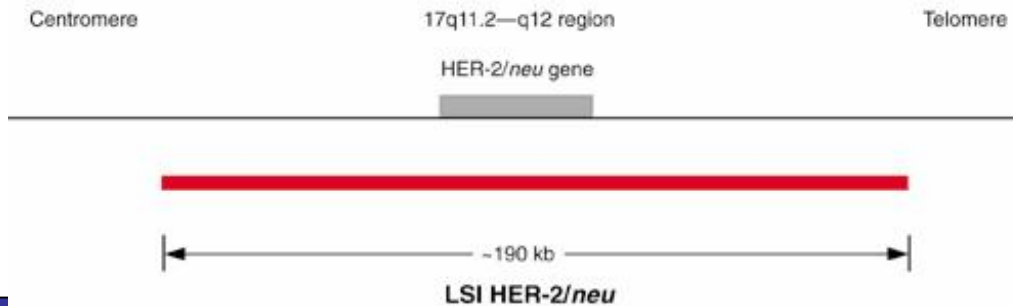
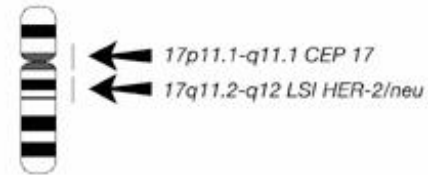
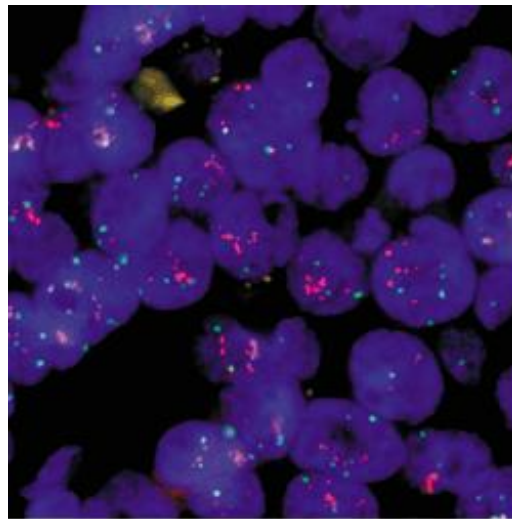
# Vergleich Immunhistologie und FISH

- FISH ist sensitiver als Immunhistologie und hochspezifisch, zudem besser standardisierbar (Cut-off-Point lässt sich gut festlegen)
- Proteine, an die in der Immunhistologie die Antikörper binden, sind instabiler als DNA, außerdem können sie durch Formalinfixation und Paraffineinbettung „maskiert“ sein, so daß es zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann
- FISH kann auch an sehr kleinen Gewebeproben durchgeführt werden
- Die FISH-Methode ist aufwändiger als Immunhistologie und kostenintensiver, mit Hilfe der Immunhistologie kann also ein höherer Probendurchsatz kostengünstiger erzielt werden



Bildquelle nicht mehr eruierbar

# Genetische Lokalisation von HER-2/neu



# Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

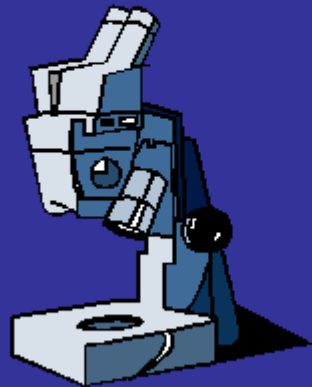
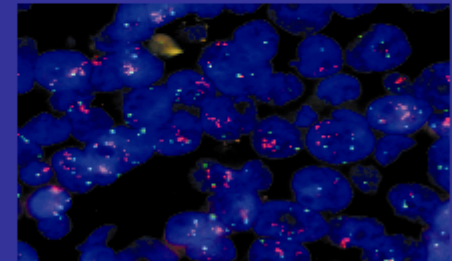
Formalin-fixiertes,  
Paraffin-eingebettetes  
Mammakarzinomgewebe

HER2

Hybridisierung mit  
fluoreszierender  
**HER2 Gen-Sonde**

HER2

Mikroskopische  
Auswertung der  
Fluoreszenz-Signale  
(Auszählung der Genkopien)





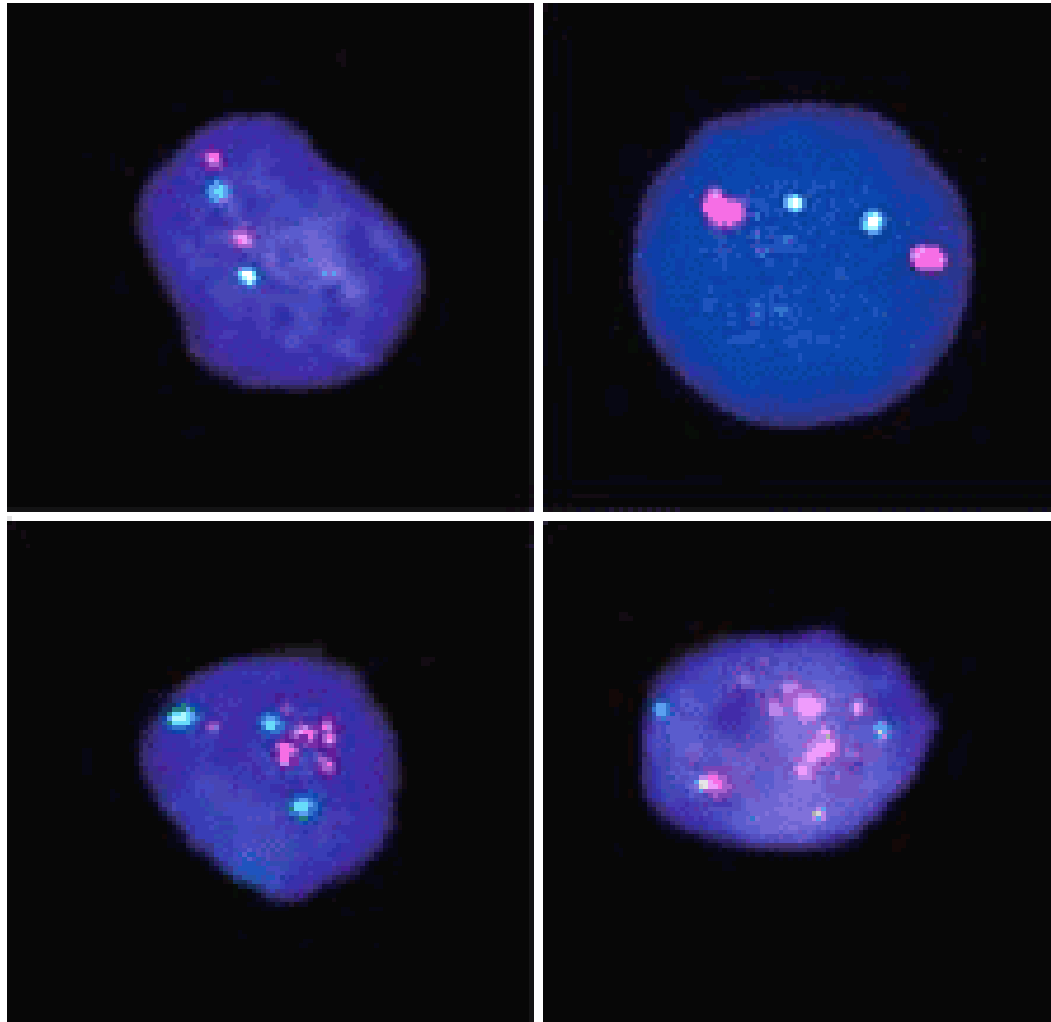
# Durchführung der FISH zum Nachweis von HER-2/neu

- Anfertigen von Gewebeschnitten und Deparaffinierung
- Vorbehandlung der Schnitte mit „Pretreatment“-Lösung bei 80°C für 15 Min., um den Zellkern für die DNA-Sonde zugänglicher zu machen
- „Verdau“ der Schnitte mit einer Protease-Lösung (Pepsin) bei 37°C für ca. 1,5 h, ebenfalls für eine bessere Zugänglichkeit der DNA-Sonde
- Die Genom-DNA der Gewebeprobe wird durch Denaturierung in Einzelstränge aufgespalten (75°C) und dann mit der HER-2/neu-Sonde über Nacht bei 37°C hybridisiert
- Kurzes Waschen mit SSC-Puffer bei 75°C, bei dem nicht-gebundene Sonde entfernt wird
- Gegenfärbung der Zellkerne DAPI (blauer Fluoreszenzfarbstoff)
- Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop

# Auswertung der FISH

- Es werden pro Patientenprobe zwei Tumoreareale zu je dreißig Zellkernen ausgezählt.
- Pro Zellkern werden die HER-2-Signale und die Centromersignale (CEP 17) gezählt und aufgelistet.
- Der Quotient zwischen Gesamtzahl der HER-2-Signale und Gesamtzahl der Centromersignale wird gebildet.
- Bei einer Zelle mit normalem Chromosomensatz müsste der Quotient 1 ergeben (2 HER-2-Signale: 2 Centromersignale).
- Bei einem Quotienten über 2 gilt die Zelle als amplifiziert (HER--Signale vermehrt, Centromersignale normal).
- Sind sowohl HER-2-Signale als auch Centromersignale im Zellkern vermehrt, liegt eine Polyplodie vor
- Grenzwertige Ergebnisse (Quotient 1,8 bis 2,2) sollten mit Vorsicht bewertet werden.

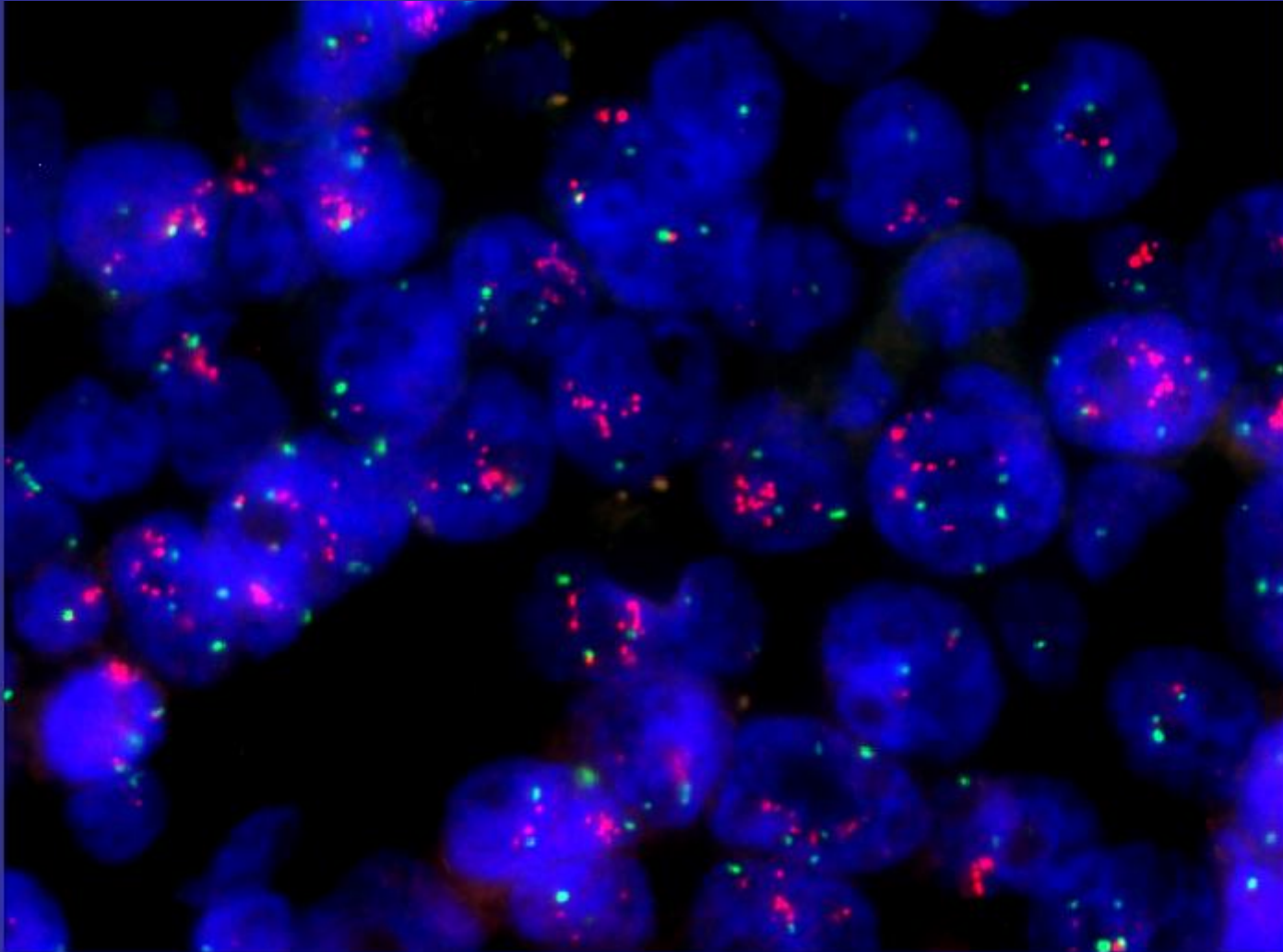
# HER-2- und Centromer-Erkennung mit der PathVysion HER-2-Sonde



HER-2/neu-  
Signale:  
Spektrum  
Orange

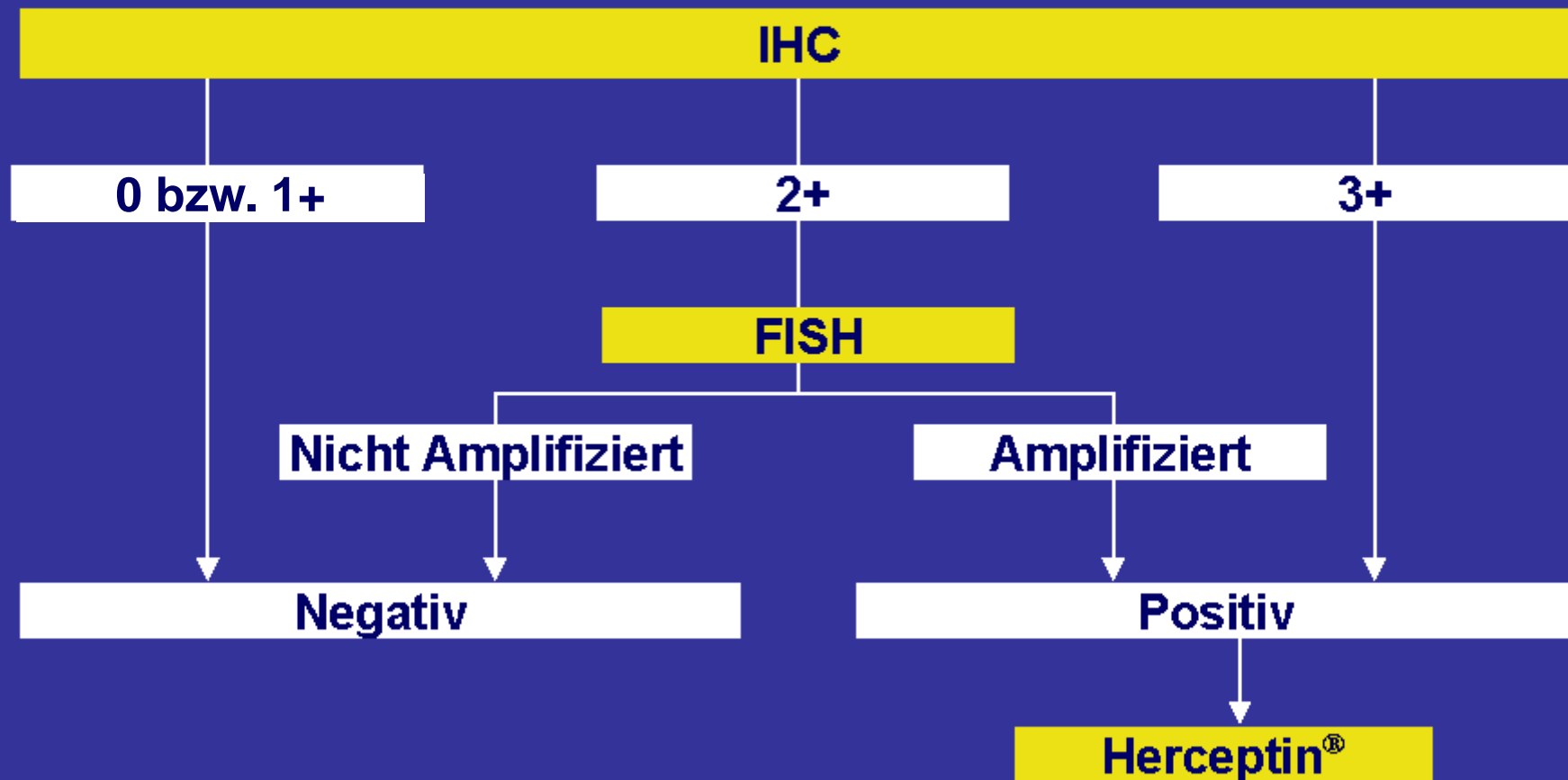
CEP 17-Signale:  
Spektrum Grün

# Mammakarzinom mit HER2 Genamplifikation

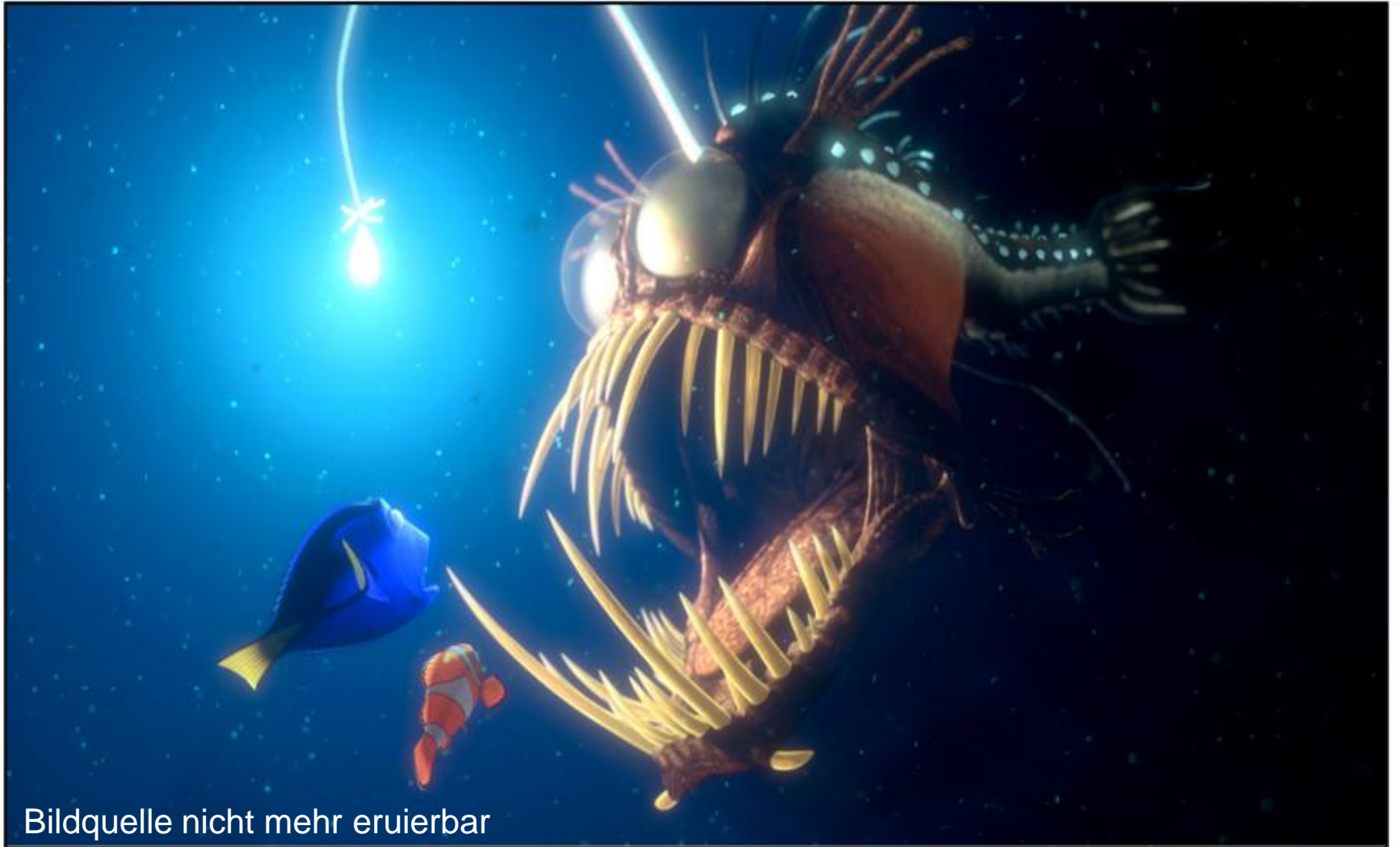


Bildquelle nicht mehr eruiierbar

# Vorgeschlagener Algorithmus zur HER2 Diagnostik



# „Fluoreszenz“-Licht aufgegangen?



Bildquelle nicht mehr eruiierbar