

5.års oppgave

**Deteksjon av HER-2 reseptor ved tumor
mamma med FISH imprint**

Hallvard Njøs, MK-03

Tromsø, September 2008

**Veileder: Elin Mortensen, overlege dr.med. PAA UNN, 1.amanuensis
pat.avd IMB UITØ**

Innholdsfortegnelse

1. Sammendrag

2. Innledning

2.1 Problemstilling

2.2 Bakgrunn

2.2.1 HER2 reseptor

2.2.2 Cancer mamma

2.2.3 Trastuzumab

3. Materialet

3.1 Prøvematerialet

4. Metode

4.1 Immunhistokjemi

4.1.1 Generell prosedyre

4.1.2 HER2 immunhistokjemi prosedyre

4.2 Fluorescens in situ hybridisering

4.2.1 Generell prosedyre

4.2.2 HER2 FISH prosedyre

4.3 PCR analyse av HER2

5. Resultater

6. Diskusjon

7. Referanser

1. Sammendrag

Bakgrunn. 20-30% av pasienter med cancer mamma har overuttrykk av HER2 reseptoren (Human Epidermal growth factor Receptor) på overflaten av tumorcellene. HER2-positiv cancer mamma er assosiert med økt tumorvekst, økt metastasering og dårligere prognose. Immunhistokjemi (IHC) og FISH (Fluorescence in situ hybridization) på formalinfiksert parafin innstøpt (FFPE) materiale er de mest brukte metodene for å bestemme HER2-status. Metodene er sårbare og resultatet påvirkes av omliggende fett og bindevev. I tillegg er det problemer med varierende fikseringstid. Vi ønsket og finne ut om imprint av ferskt tumorvev kunne brukes til FISH analyse. Et imprint lages ved å forsiktig presse et objektglass mot nålebiopsien, deretter tørkes og farges preparatet. Dermed vil man ikke få forstyrrelse av omliggende vev siden bare tumorvev avsettes på objektglasset ved imprint. Samtidig unngår man problemene knyttet til variabel fikseringstid.

Materiale og metode. Nålebiopsier av tumor mamma ble analysert med IHC og FISH på FFPE, samt FISH på imprint.

Resultater. FISH analyse for HER2 genet ble gjort på 26 imprint. Av disse var 1 amplifisert (>20 signaler pr kjerne). Dette ble gitt en score på 3+ med immunhistokjemi utført på den korresponderende biopsien, som dermed bekreftet imprint resultatet. 2 andre var borderline og derfor ikke konklusive. IHC var negativ på begge. 11 prøver var ikke amplifisert ved FISH imprint og var også negative med IHC. 12 prøver kunne ikke vurderes på grunn av for få celler på objektglasset.

Konklusjon. Denne studien viser at imprint kan brukes for FISH analyse. Materialet er for lite, og antall celler var i mange prøver for få til og kunne gjøre en pålitelig scoring. Metoden må imidlertid utvikles videre, men kan foreløpig være et supplement til andre metoder.

2. Innledning

2.1 Problemstilling

Ved ca.20-30% av tilfellene av cancer mamma er HER2 reseptoren overuttrykt på overflaten av tumorcellene. Amplifisering av genet for HER2 er den underliggende biologiske endring som resulterer i overuttrykk av reseptoren.

Immunhistokjemi (IHC), som viser nivå av HER2 protein som er produsert etter transkribering av genet, og FISH, som viser antall av HER2 gener pr. cellekjerne, er de mest brukte metodene for å bestemme HER2-status ved rutinemessig diagnostikk. Både IHC og FISH gjøres på formalinfiksert parafin innstøpt (FFPE) materiale. Ved IHC klassifiseres HER2-status som 0, 1+, 2+, eller 3+, der score 0-1+ er negativ og 2-3+ er positiv. Ved tumorer som er uavklart (2+) ved IHC går man rutinemessig videre og gjør FISH-analyse. Dette er både en dyrere og mer ressurskrevende metode. Formalinfiksert materiale kan imidlertid gi en del problemer med FISH i det man må gjøre tilpasninger til de ulike vevsbitene, for eksempel vedrørende proteasebehandling, varmebehandling, fikseringstid, buffer pH, degradering av kjerner, for sterk bakgrunnsfarging, pH, og parafininnstøping. Fett og bindevev kan forstyrre analysen ved at det dekker til epitopen i kjernen. Dermed har det vært nødvendig å repetere analyser. Dette har medført forsinkelser i svartid som igjen har gitt forsinket oppstart av behandling.

Et imprint lages ved først å forsiktig presse et objektglass mot nålebiopsien. Deretter blir glasset lufttørket og farget med Diff-Quick. Diagnosen kan gjøres i løpet av minutter. Et imprint inneholder oftest bare epitel (cancerceller) og sjelden fett eller bindevev som kan forstyrre analysen. Vi prøvde derfor å gjøre FISH på ferskt imprint materiale i stedet for på FFPE.

2.2 Bakgrunn

2.2.1 HER2 reseptor

HER står for Human Epidermal growth factor Receptor. Det er i dag funnet 4 ulike reseptorer i HER-familien, og de kalles HER1-4. Hver av disse reseptorene har en ekstracellulær region, en transmembran region og en intracellulær region som inneholder et tyrosin kinase domene. HER-reseptorene har til oppgave å regulere signaler for cellevekst og celledeling. Aktivering av disse reseptorene skjer via dimerisering innad eller mellom de ulike reseptorene (1).

HER2 protoonkogenet ble oppdaget tidlig på 80-tallet, og lokalisert til den lange armen av kromosom 17. Genet koder for et 185kDa transmembrant glykoprotein med tyrosin kinase aktivitet (1). Protoonkogenet er normalt til stede i celler som to kopier i hver kjerne, og uttrykt på et lavt nivå i mange typer epitel.

HER2 binder ikke noen kjent vekstfaktor eller annen ligand (2). Aktivering skjer i stedet ved binding av ligand til HER1, 3 eller 4. Deretter assosierer reseptorene med hverandre og danner homo- eller heterodimerer. HER2 er den mest foretrukne dimeriseringspartner (3). Dimerisering etterfølges av autofosforylering av reseptor, som skaper bindingssteder for en rekke cytosoliske proteiner. Dermed aktiveres flere intracellulære signalveier, blant annet Ras, fosfoinositid 3-kinase (PI3K) og protein kinase C signalveiene (1). Disse signalveiene fører til en rekke responser, blant annet celleproliferasjon, cellemotilitet, celleoverlevelse og angiogenese.

Ved cancer mamma er overuttrykk av spesifikke onkogener ofte observert. Overuttrykk av protein er som regel et resultat av amplifisering av genet som koder for det aktuelle proteinet. HER2/neu (erB-2) genet er amplifisert i ca 20-30% av tilfellene av cancer mamma. HER2-genet kan også være amplifisert ved andre typer kreft, som for eksempel i ovarier, lunger, pancreas, og GI-tractus.

Overuttrykt av HER2-reseptor er relatert til en rekke cancer-fremmende effekter:

- Økt celledeling og bedret overlevelse for tumorcellene
- Dimerene unnslipper nedregulering, slik at signaleringen forlenges
- Økt metastasering (4). Dette skjer ved sekresjon av degraderingszymer, økt invaderingspotensial og økt celledeling
- Økt resistens mot endokrin terapi (5)
- Aggressiv vekst og dårligere prognose (5)

HER2-overuttrykk har med andre ord sammenheng med en mer aggressiv form for brystkreft. Men det har også vist seg å være et effektivt angrepspunkt for behandling, da kvinner med HER2-positiv brystkreft kan tilbys medikamentet Trastuzumab.

2.2.2 Cancer mamma

Cancer mamma er den hyppigst forekommende krefttypen blant kvinner i Norge og i den vestlige verden. I 2006 ble det diagnostisert 2673 nye tilfeller av brystkreft blant kvinner i Norge (6). Carcinom utgått fra kjertelepitelet er den dominerende maligne tumor i mamma.

Epidemiologi og risikofaktorer

Insidensen av brystkreft var altså 2673 i 2006. Prevalensen pr 31.12.2004 var 30359 hvorav 18690 hadde levd lengre enn 5år med sykdommen (6). Insidensen er svakt stigende i Norge, noe som blant annet kan skyldes innføring av mammografiscreening i alle norske fylker. Gjennomsnittlig debutalder er ca.60 år, og livstidsrisikoen for å få brystkreft er ca.10 % (7).

En rekke risikofaktorer er identifisert (7):

- **Alder.** Risikoen øker med alderen.
- **Familiær forekomst.** Brystkreft hos mor eller søster øker risikoen for å få brystkreft 3-4ganger.

- **Genetiske forhold.** Ca. 5-10 % av tilfellene av brystkreft er relatert til arv. Særlig defekter i BRCA1 og 2 genene er involvert. Mutasjoner i BRCA1 genet har en penetrans på ca.85 % for brystkreft og ca.50 % for ovarialkreft.
- **Paritet.** Nullipara eller sen alder for første fødsel har økt risiko sammenlignet med multipara.
- **Amming.** Risiko avtar med økende varighet av amming.
- **Tidlig menarche og sen menopause.** Øker risiko.
- **Tidligere sykehistorie.** Kreft i ett bryst øker risikoen for kreft også i det andre brystet. Kvinner med kreft i livmorkroppen (cancer corporis uteri) har økt risiko for brystkreft.
- **Hormonerstatnings behandling.** Postmenopausale kvinner som har fått østrogen enten alene eller i kombinasjon med gestagen har økt risiko.
- **Andre faktorer.** Overvekt, alkohol, røyk og bruk av p-piller gir svakt økt risiko for brystkreft.

Patologi og patogenese

Brystkreft forekommer i en ikke-invasiv og en invasiv form. Ved den ikke-invasive typen, eller carcinoma in situ, vokser ikke de maligne cellene gjennom basalmembranen. Det forekommer to former for in situ cancer, ductalt og lobulært carcinoma in situ (DCIS og LCIS). Ved invasiv cancer er det vekst gjennom basalmembranen, og det finnes en rekke subtyper, men invasivt ductalt carcinom er den vanligste.

Som med de fleste typer kreft, er årsakene til brystkreft i stor grad ukjent. Imidlertid synes 3 hovedfaktorer å spille en rolle.

1. **Genetiske forhold.** Genetiske endringer er involvert både i arvelige og i sporadiske former for brystkreft. Mange av disse genene er identifisert, som for eksempel BRCA1/2, p53, C-myc, Mucin 1 Glykoprotein, og HER2. Mutasjoner i BRCA1 (Breast Cancer Gene 1) predisponerer både for bryst- og ovarialkreft. BRCA1 og 2 fungerer som tumor suppressorgener og begge alleler må være mutert for å utvikle cancer. Første mutasjon er som regel en germ-linje mutasjon, mens den andre er en somatisk mutasjon. Begge genene har funksjoner i DNA-

reparasjon. P53 er også et tumor suppressorgen, og kalles ofte ”guardian of the genome”. Genet koder for en transkripsjonsfaktor, og uttrykk av genet aktiveres ved DNA-skade. Proteinet p53 stanser cellyklus mellom G1- og S-fase i celler med DNA-skade, slik at DNA-skaden kan repareres. Mutasjoner i p53 er involvert i en rekke krefttyper, og ca.20-40% av tilfellene av brystkreft (1). Amplifisering av C-Myc gen og overuttrykk av proteinet tror man spiller en rolle utvikling av tumor fra en ikke-invasiv til en invasiv type (1). Mucin 1 Glykoprotein (MUC1) er overuttrykt i noen tilfeller av brystkreft og man tror at det kan være med på mediere de første trinn i metastasering av tumor. For detaljert beskrivelse av HER2 sin rolle ved brystkreft henvises det til avsnitt 2.2.1. Overuttrykk av HER2 er imidlertid assosiert med økt tumorvekst, økt metastasering og dårligere prognose.

2. **Hormonelle faktorer.** Høyt nivå av endogent østrogen spiller en viktig rolle. Mange av risikofaktorene som er nevnt – lav paritet, tidlig menarche, sen menopause – medfører økt og forlenget påvirkning av østrogen. Østrogen stimulerer både normalt brystepitel og cancerceller til produksjon av vekstfaktorer (8).
3. **Miljø faktorer.** Miljø-påvirkning understøttes av store forskjeller i insidens mellom ulike land. Risiko for brystkreft er signifikant større i Nord-Amerika og Nord-Europa enn i Asia og Afrika (8). Andre viktige miljøfaktorer er stråling og eksogent østrogen (hormonerstatnings behandling).

Diagnostikk, utredning og behandling

Som regel presenterer brystkreft seg ved mammografi-screening eller at kvinnen selv oppdager en kul i brystet.

I utredning og diagnostikk av brystkreft er den såkalte trippeldiagnostikken hovedprinsippet. Dette innebærer klinisk undersøkelse, billeddiagnostikk (mammografi og eventuelt ultralyd) og biopsi. To hovedtyper biopsi brukes mest, finnålsaspirasjon

(FNAC=Fine needle aspiration cytology) og/eller sylindربیopsi (CNB=Core needle biopsy).

Prøvetaking ved hjelp av finnål er lite smertefullt og krever ingen lokalanestesi (9). Det er en enkel og rask metode, og muliggjør en ”on the spot” histologisk preliminærdiagnose. Endelig diagnose kan gis etter videre tolkning. FNAC gjøres UL-veiledet.

Sylindربیopsi (CNB = core needle biopsy) anvendes i tillegg til eller alene på samme indikasjoner som FNAC. Prøvetakingen er teknisk noe mer omstendelig enn FNAC. Den krever vanligvis lokalanestesi og endelig histologisk svar kan gis i løpet av 12-24 timer. Metoden er dyrere enn FNAC. Ved ønske om preliminært hurtigsvar kan det gjøres et avtrykk eller imprint av sylindربیopsien på et objektglass.

Fra vevsprøven utføres histologisk gradering av tumor, hormonreseptoranalyse og undersøkelse av HER2-status. Histologisk gradering gir viktig informasjon om prognose og hvilken behandling som vil være optimal. Hormonreseptoranalyse innebærer immunhistokjemisk undersøkelse for å avgjøre om tumorcellene uttrykker østrogen- eller progesteronreseptorer. Dette er viktig med tanke på mulig effekt av endokrin terapi, for eksempel behandling med antiøstrogenet Tamoxifen. Det er viktig å være klar over at hormonreseptorstatus kan forandre seg i forløpet av brystkreft. HER2-status bestemmes som tidligere nevnt ved IHC og/eller FISH, og de som er HER2-positive kan behandles med Trastuzumab.

Primærbehandling ved brystkreft er kirurgi ved operabel svulst og eventuelt adjuvant behandling. Den adjuvante behandlingen består av stråling, cytostatika og endokrin terapi.

2.2.3 Trastuzumab

Trastuzumab (Herceptin) er et monoklonalt rekombinant antistoff rettet mot HER2-reseptoren (10). Det binder til den ekstracellulære delen av HER2-molekylet og hemmer dets funksjon som blant annet medfører nedsatt celleproliferasjon. I tillegg ser det ut til at midlet har en antitumor-effekt ved at det kan utløse celledød i tumorceller ved å aktivere immunceller som angriper og dreper kreftcellene via antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC=Antibody-dependent cellular cytotoxicity) (4). Det er også holdepunkter for at effektene av Trastuzumab og annen kjemoterapi forsterker hverandre (10). Tillegg av Trastuzumab til standard kjemoterapi øker den objektive responsraten, utsetter progrediering, forlenger totaloverlevelsen og bedrer den generelle livskvaliteten.

Indikasjoner for bruk er palliativ behandling av HER2-positiv mamma-cancer. Medikamentet gis som intravenøs infusjon.

Den mest alvorlige bivirkningen er kardiale komplikasjoner i form av kardiomyopati med varierende grad av hjertesvikt (10). Et viktig poeng angående bivirkningene er at det ser ut til at Trastuzumab er mindre toksisk enn tradisjonelle cytostatika, og at det i liten grad gir beinmargsdepresjon.

3. Materialet

3.1 Prøvematerialet

Kvinner i alle aldre med palpabel tumor mamma eller påvist tumor mamma ved mammografiscreening i 2005 og 2006. Etter biopsi ble de ulike analysene utført, immunhistokjemi og eventuelt FISH, begge på standard formalinfiksert parafininnstøpt materiale. Imprint blir lagd ved å forsiktig presse et objektglass mot nålebiopsien.

Preparatene lufttørkes over natten og legges så i fryseboks. Selve FISH-analysen ble deretter gjort på et senere tidspunkt. Totalt ble det laget 26 imprint.

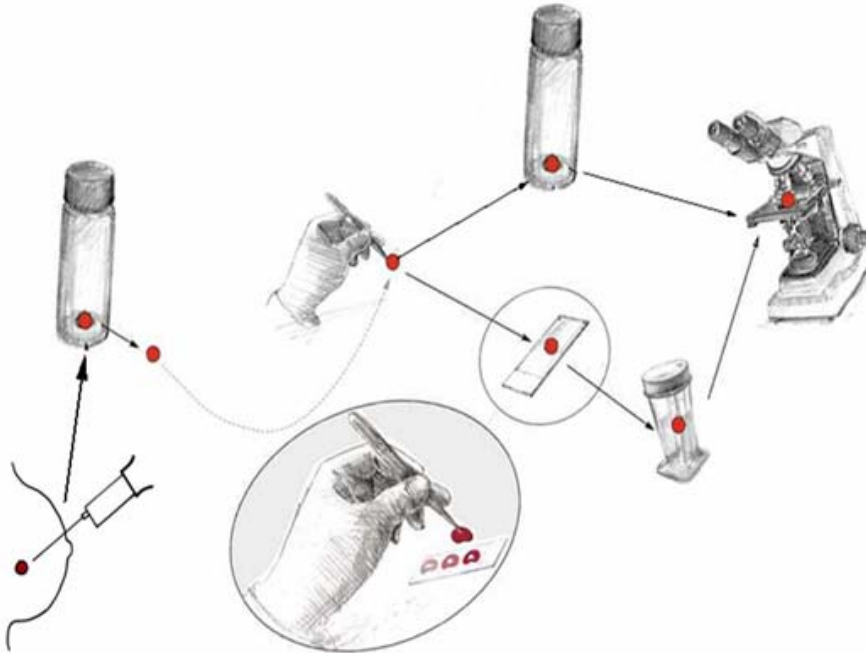


Fig. 1. Framstilling av imprint (Elin Mortensen, arkiv)

4. Metode

4.1 Immunhistokjemi

Immunhistokjemi (IHC) kan defineres som bruk av antistoff til å merke celler eller vev for å detektere et mål-antigen ved å bruke et deteksjonssystem og et visualiserende agens (enzym, fluorokrom, eller annet molekyl) (1). Antigenet kan for eksempel være et protein, et glykoprotein, et lipoprotein eller et karbohydrat. Ved bestemmelse av HER2-status er HER2-reseptoren antigenet.

I dag brukes IHC som et diagnostisk verktøy for å bestemme tilstedeværelse eller fravær av spesifikke proteiner eller karbohydrater i ulike typer prøvemateriale. Man kan få informasjon om lokalisasjon og nivå av uttrykk av både normale og abnormale genprodukter. Dette utnyttes ved for eksempel diagnostikk av ulike typer cancer (cancer mamma, lymfom, sarcom etc.) og forskjellige virus (Epstein-Barr, Cytomegalovirus etc.).

4.1.1 Generell prosedyre (11)

Prøvetaking

Ved tumor mamma inngår biopsi i trippeldiagnostikken. Grovnålsbiopsi brukes for å skaffe vevsprøve som det gjøres immunhistokjemisk analyse på.

Fiksering

IHC utføres på standard formalin fiksert parafin innstøpt (FFPE) materiale. Hensikten med fiksering er å bevare alle komponenter av en vevsprøve. Fikseringsvæsken hindrer autolyse ved lysosomale enzymer og hindrer bakterievekst. Samtidig stabiliseres celler og vev slik at de beskyttes under videre prosessering og farging.

Antistoffer

Antistoffer for IHC er produsert fra vertsdyr (mus, geit, kanin) ved respons på antigen stimulering. Avhengig av produksjonsmåte kan antistoffene være monoklonale eller polyklonale. Monoklonale antistoffer kommer fra en enkelt klon som produserer et enkelt antistoff og som gjenkjenner en epitop på et antigen. Epitop er bindingssetet for antistoffet på antigenet. Polyklonale antistoffer er dannet fra mange celler og gjenkjenner ulike epitoper på et antigen.

I immunhistokjemisk metode har antistoffer to hovedfunksjoner. Den første er å gjenkjenne og binde en spesifikk epitop på antigenet. Dette er karakteristisk for det ”primære” antistoffet. Den andre funksjonen er selv og fungerer som et antigen. Det primære antistoffet gjenkjennes og bindes av et sekundært antistoff. Det sekundære

antistoffet er ofte bundet til et annet molekyl, for eksempel et fluorokrom, et enzym, ABC=Avidin-Biotin Complex etc. Her finnes ulike kombinasjoner av antistoffer og molekyler som er bundet til disse. Den nøyaktige prosedyren vil avhenge av hva det er man skal analysere. Uansett prosedyre, er hensikten at antigenet skal merkes med antistoff og gjerne et annet molekyl slik at det skal kunne avdekkes og visualiseres.

Antigen avdekking

Ved hjelp av tilsetting av en spesielt sammensatt buffer, og oppvarming til en bestemt temperatur ”avdekkes” antigenet. Det blir da mulig å visualisere antigenet. Mekanismen for hvordan avdekkingen skjer er ikke fullt forstått, blant annet på grunn av at formalin-fikseringen har en del ukjente effekter.

Visualisering/deteksjon

Mange ulike metoder er tilgjengelig for visualisering av antigen-antistoff reaksjon i vevsprøven. Hva som velges vil være avhengig av hva som skal analyseres. I dag brukes ofte merking av sekundære antistoffer med fluorokromer, ABC=Avidin-Biotin Complex, eller LSAB=Labeled Streptavidin-Biotin.

Tolkning

Når preparatet er ferdig, gjenstår mikroskopering og analyse av snittet. Dette innebærer en subjektiv vurdering av patologen. Hva som regnes som positivt vil i varierende grad avhenge av fargingens intensitet, fargingens distribusjon i cellen og/eller prosentandel av celler som viser farging. Det som da er viktig er å ha klare kriterier for hva som er en ”positiv” prøve.

Scoring av membranfarging:

- 0 (negative): ingen farging eller membranfarging i mindre enn 10% av tumorcellene
- 1+ (negative): svakt/knapt erkjennbar membranfarging i mer enn 10% av tumorcellene. Bare deler av membranen er positiv (inkomplett farging)

- 2+ (positiv): svak til moderat komplett membranfarging i mer enn 10% av tumorcellene
- 3+ (positiv): kraftig komplett membranfarging i mer enn 10% av tumorcellen

Staining Pattern	Score	HER-2
No membrane staining is observed	0	Negative
Faint, partial staining of the membrane	1+	Negative
Weak complete staining of the membrane, > 10 % of cancer cells	2+	Positive
Intense complete staining of the membrane, > 10 % of cancer cells	3+	Positive

Tabell 1. Scoring av membranfarging.

4.1.2 HER2 immunhistokjemi prosedyre (iVIEW DAB metoden) (12)

iVIEW DAB metoden er en indirekte biotin/ streptavidin teknikk til påvisning av antigenbundet antistoff. Metoden brukes hovedsakelig til kreftdiagnostikk og kan gi oss opplysninger om tumorens utgangspunkt slik at vi kommer nærmere en riktig diagnose. Den kan også gi direkte behandlingsmessige og prognostiske opplysninger til klinikerer.

Prinsipp

iVIEW DAB metoden påviser spesifikke muse-IgG, muse-IgM og kanin-IgG-

antistoffer som er bundet til et antigen i vevssnittet. Enzymet Horse Radish Peroxidase (HRP) som benyttes har høy katalytisk aktivitet, noe som gjør at det dannes mye produkt på relativt kort tid. Det dannes et brunt presipitat der antistoffet har lokalisert antigenet.

- Snittet tilsettes et mono-, eller polyklonalt primærantistoff (Ab), rettet mot humant vev. Når det aktuelle antigenet er tilstede får man en antigen- antistoff binding.
- En tilsetter et polyvalent biotinyllert sekundærantistoff som binder seg til primærantistoffet. Det sekundære antistoffet består av geit anti-mus (IgM og IgG) samt geit anti-kanin (IgG). Dette gjør sekundærantistoffet i stand til å reagere med både mono-og polyklonale primærantistoffer.
- Det tilsettes så et kompleks av streptavidin og enzymet Horse Radish Peroxydase (HRP). Da streptavidin har meget sterk affinitet til biotin, vil komplekset binde seg til det biotinyllerte sekundære antistoffet.
- Reaksjonen visualiseres ved å tilsette et substrat av diaminobenzidin (DAB) og hydrogenperoksyd. HRP vil redusere H₂O₂ til H₂O i nærvær av elektrondonor, og oksidere DAB slik at det dannes et brunfarget presipitat. Se ligning nedenfor.
- For hvert steg er det inkubering til valgte tider og riktig temperatur. Mellom hvert steg under hele prosessen vil maskinen utføre vask og tilsetning av coverslip. Vask for å fjerne ubundet antistoff og coverslip for å forhindre fordampning av reagenser fra snittene. Coverslip sørger også for en jevn fordeling av antistoffer og reagenser på glasset.

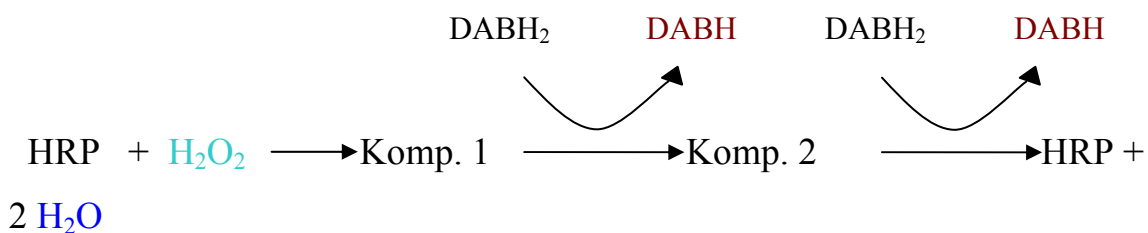


Fig.2. Reaksjonsligning (Ventana iVIEW DAB).

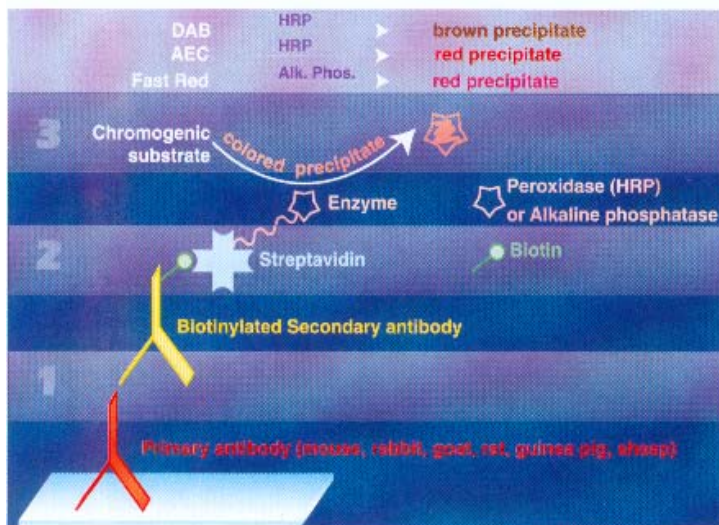


Fig.3. Antistoff-enzym kompleks (Ventana iVIEW DAB)

Utførelse

Benchmark XT

- Tørking av snitt ved oppvarming til 75°C i 4 min.
- Avparafinering i flere steg med EZ Prep. 4 min. 75°C, vask og tilsetting av coverslip, tilslutt varmes snittene opp i 2 min. 42°C
- Evt. forbehandling med Cell conditioner 1 gjentatte ganger ved 100°C, eller Cell conditioner 2 gjentatte ganger ved 95°C, mellom hver gang tilsettes coverslip

Vasking av snitt

- Snittene tas ut av maskinen og settes i vann.
- Skyll deretter snittene godt i varmt vann (ca.40°C).
- Skyll med 2x2 dråper Zalo®/Renax® i vannet for å fjerne restene av oljen.

Kjernefarging

- Kjernefarg 15-20 sek i Instant Hematoxylin, Shandon
- Skyll godt i vann.
- Blåne snittene i Scotts væske ca.15 sek.
- Skyll godt i vann.

Dehydrering/Innleiring

- Dypp snittene 5-10 gang gjennom 96 % alkohol og absolutt alkohol på fremste rekke.
- Sett snittene i Xylen og leir inn med Histokit ® og legg på dekkglass.
- Snittene tørkes i avtrekk eller i 60⁰ C skapet.

Avlesning

Ventana iVIEW DAB deteksjonskit gir et brunt reaksjonsprodukt, som presipiterer der primærantistoffet har lokalisert antigenet. Scoringen gjøres i vanlig lysmikroskop.

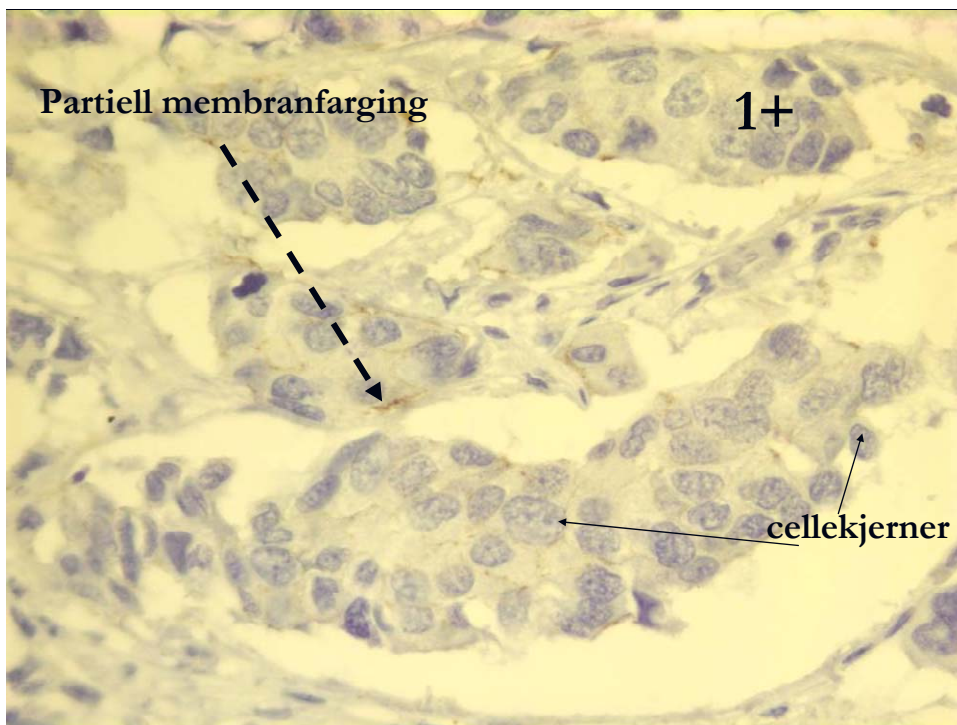


Fig.4. Immunhistokjemi 1+ (Elin Mortensen, arkiv)

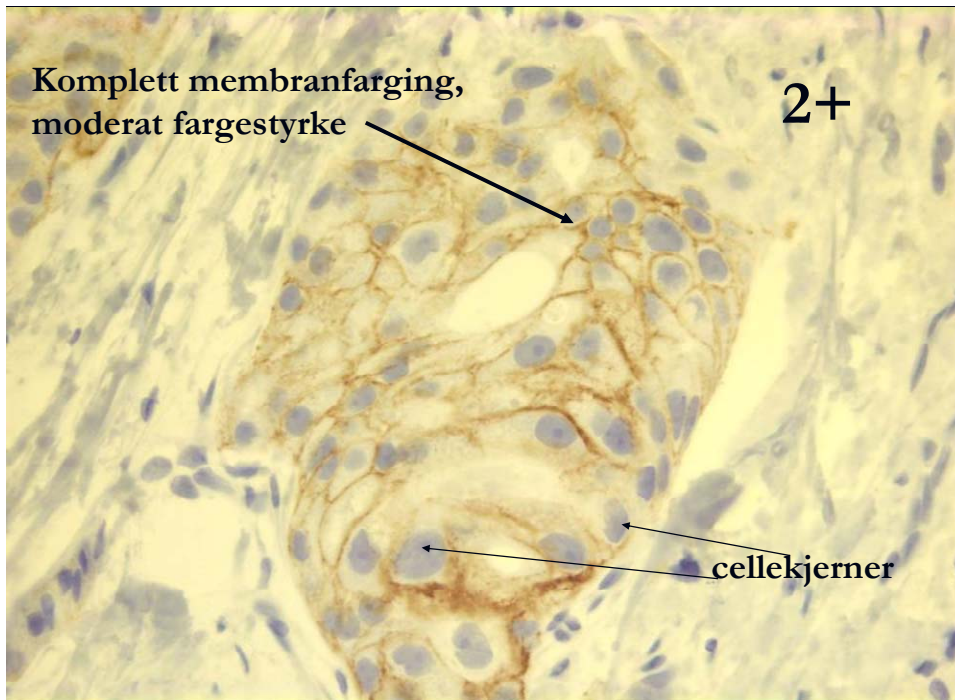


Fig.5. Immunhistokjemi 2+ (Elin Mortensen, arkiv).

4.2 Fluorescens in situ hybridisering

Fluorescens in situ hybridisering, eller FISH, muliggjør direkte visualisering av genuttrykk på cellulært eller kromosomalt nivå. In situ hybridisering (ISH) kan defineres som morfologisk lokalisasjon av genetiske sekvenser. Hensikten med ISH er å bestemme tilstedeværelse eller fravær av spesifikke DNA eller RNA sekvenser (1). Dette muliggjøres ved å utnytte nukleinsyrenes evne til å feste seg til hverandre slik at de danner hybrider.

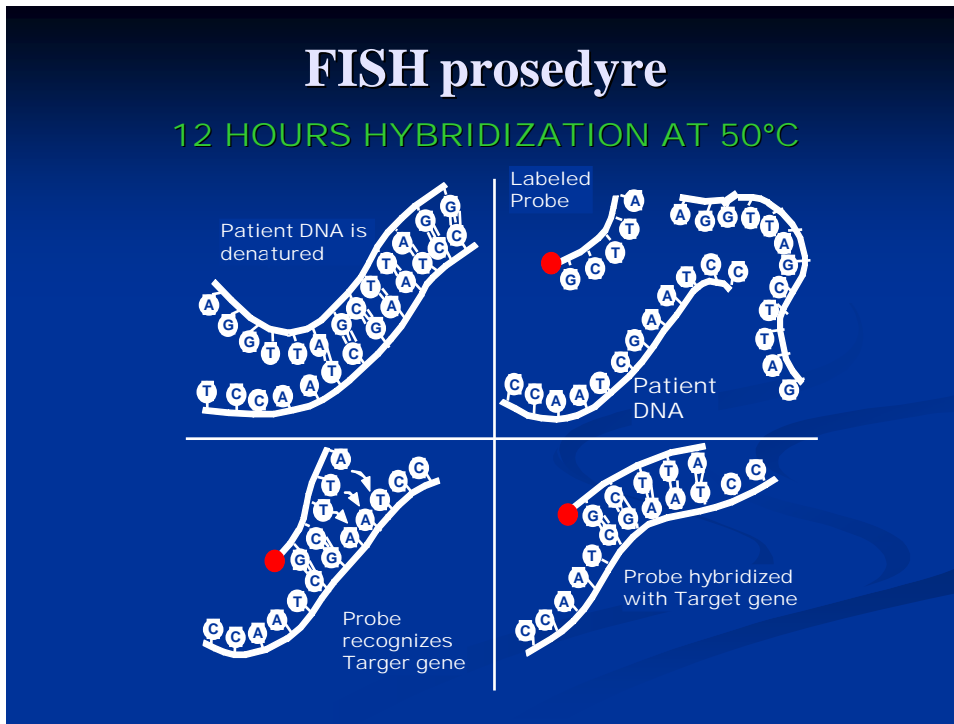


Fig.5. FISH prosedyre (Ventana INFORM.HER-2/neu Gene Detection System, Technical Points).

Dermed kan to komplementære enkeltrådede DNA-molekyler, eller et DNA- og et RNA-molekyl, binde seg til hverandre og altså danne en hybrid. Ved å merke en av disse to trådene med en probe, kan hybridene detekteres. Proben består av en fluorescens merket DNA-sekvens som er spesifikk for den sekvensen man ønsker å undersøke. Deretter kan man ved hjelp av UV-lys visualisere den aktuelle DNA-sekvensen i et fluorescensmikroskop.

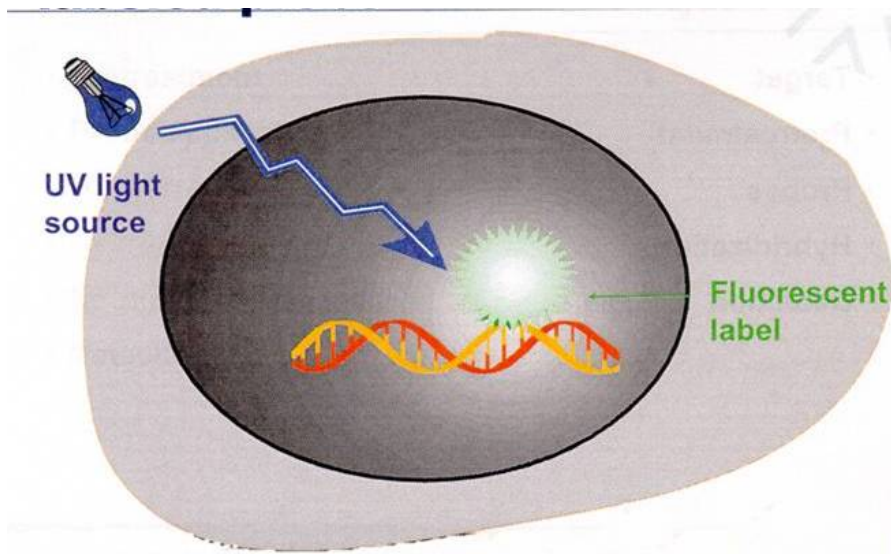


Fig.6. Cellekjerne med DNA som er merket med fluorescerende molekyl (Ventana INFORM.HER-2/neu Gene Detection System, Technical Points).

4.2.1 Generell prosedyre

Prøvetaking og preparering

FISH kan brukes til å analysere en rekke ulike typer cellulært materiale, og hver prøvetype krever spesifikk forbehandling. Etter biopsi må prøven fikseres for å bevare dens morfologi. Når celler eller vev har blitt fiksert, må nukleinsyrene i prøvematerialet gjøres tilgjengelig for proben. Dette innebærer oftest tilsetning av proteolytiske enzymer. Enzymene fjerner komponenter fra cellekjernen og cytoplasma slik at proben kan nå målstedet.

Valg av probe

Mange typer prober kan brukes for in situ hybridisering, og hvilken man bruker avhenger av hva det er man skal analysere.

Et viktig poeng ved valg av probe og merkelapp ("label") er sensitivitet, med andre ord hvordan målsekvensen best kan detekteres. Dette avhenger av flere faktorer:

- Størrelsen på målsekvensen. Store sekvenser kan binde mer probe og dermed kan mer av merkelappen også binde seg
- Er målsekvensen unik eller finnes den i multiple kopier. Jo flere kopier, jo mer probe kan binde seg
- Størrelsen på proben. Store prober kan bære med seg mer av merkelappen, men max størrelse er ca300-500 basepar fordi store prober har vanskeligheter med å penetrere målsekvensen
- Indirekte merkelapp teknikker gir mulighet for amplifisering av signal

De fleste laboratorier bruker i dag ikke-radioaktive merkelapper. Det er to hovedmetoder for ikke-radioaktiv merking, fluorescerende og ikke-fluorescerende.

Fluorescerende merking er mest brukt, og den kan være enten direkte eller indirekte. Ved direkte merking er proben merket med et nukleotid som er bundet til et fluorokrom. Ved indirekte merking er proben merket med et nukleotid bundet til et annet molekyl som deretter kan detekteres med vanlig immunhistokjemiske metoder. En fordel med direkte merking er at man da har mulighet for amplifisering av signalet.

Denaturering av probe og prøvemateriale

Når DNA-prober brukes for deteksjon av DNA-mål i celler eller vev er det nødvendig å denaturere proben og vevsprøve for å oppnå en vellykket hybridisering. Dette kan gjøres kjemisk eller ved oppvarming slik at DNA-trådene separeres. I praksis brukes ofte en kombinasjon av disse metodene.

Hybridisering

Når proben og målsekvensen er enkeltrådet legges forholdene til rette for hybridisering. Dette gjøres ved å sikre høy konsentrasjon av probe og å senke inkubasjonstemperaturen. Den merkede proben binder seg til målsekvensen i DNA.

Post-hybridisering vasking

Etter hybridisering må ubundet probe fjernes. Dette utføres ved å vaske preparatet i standard saltcitrat løsning.

Deteksjon

Tilstedeværelse og lokalisasjon av probe-mål hybrid kan demonstreres ved deteksjon av den merkede proben. Direkte fluorescensmerkede prober kan visualiseres umiddelbart i fluorescensmikroskop.

4.2.2 FISH og HER2

FISH HER2 prosedyre på FFPE materiale (13)

- **Prøvetaking.** Biopsi og deretter formalinfiksering og parafininnstøping av tumorvev. 4 µm snitt skjæres med microtom og legges på objektglass.
- **Preparering.** Preparatet varmebehandles og deparaffineres. Enzymatisk nedbrytning av protein ved hjelp av proteaser for å øke tilgjengelighet for probe til mål-DNA.
- **Denaturering.** Tilsetning av 100µL HER2/neu probe. Varmebehandles i 10 minutter ved 90°C.
- **Hybridisering.** 12 timer ved 50°C.
- **Vasking.** 2x SSC (saline-sodium citrate buffer) 50°C i 6 minutter. 2x SSC 60°C i 6 minutter. Vaskingen fjerner ubundet probe.
- **Deteksjon.** Tilsetning av FITC (fluorescein isothiocyanate) anti-biotin og FITC anti-mus.
- **Bakgrunnsfarging.** Kjerne DNA bakgrunnsfarges med DAPI.
- **Mikroskopering.** Bruker fluorescensmikroskop og teller antall signaler.

FISH HER2 prosedyre på imprint

- **Prøvetaking.** Imprintet lages ved først å forsiktig presse et objektglass mot nålebiopsien. Preparatet ble lufttørket over natten og så lagt i fryseboks. Ved analysetidspunkt ble preparatene fiksert i 10 min i 75ml etanol og 25ml eddiksyre, og deretter farget med Diff-Quick.
- **Preparering.** Varmebehandling samt tilsetning av protease.

- **Denaturering.** Tilsetting av 100 μ L HER2/neu probe. Varmerbehandles i 10 minutter ved 90°C.
- **Hybridisering.** 12 timer ved 50°C.
- **Vasking.** 2x SSC (saline-sodium citrate buffer) 50°C i 6 minutter. 2x SSC 60°C i 6 minutter. Vaskingen fjerner ubundet probe.
- **Deteksjon.** Tilsetting av FITC (fluorescein isothiocyanate) anti-biotin og FITC anti-mus.
- **Bakgrunnsfarging.** Kjerne DNA bakgrunnsfarges med DAPI.
- **Mikroskopering.** Bruker fluorescensmikroskop og teller antall signaler.

Scoring av HER2

Når man skal score preparatet i fluorescensmikroskop må man telle 20 intakte cellekjerner fra hvert av to separate tumorområder i preparatet. Normale celler har 2 kopier av kromosom 17 og har derfor 2 kopier av HER2-genet. Celler i replikasjonsfasen har 4 kopier av både kromosom 17 og HER2-genet. Cut off verdi settes derfor til mindre eller lik 4 signaler pr cellekerne. Tellingene skal utføres av 2 personer uavhengig av hverandre.

Dersom det er overlappende kjerner, kjerner som er for små eller for store, uintakte kjerner eller for sterk bakgrunnsfarging skal det ikke scores.

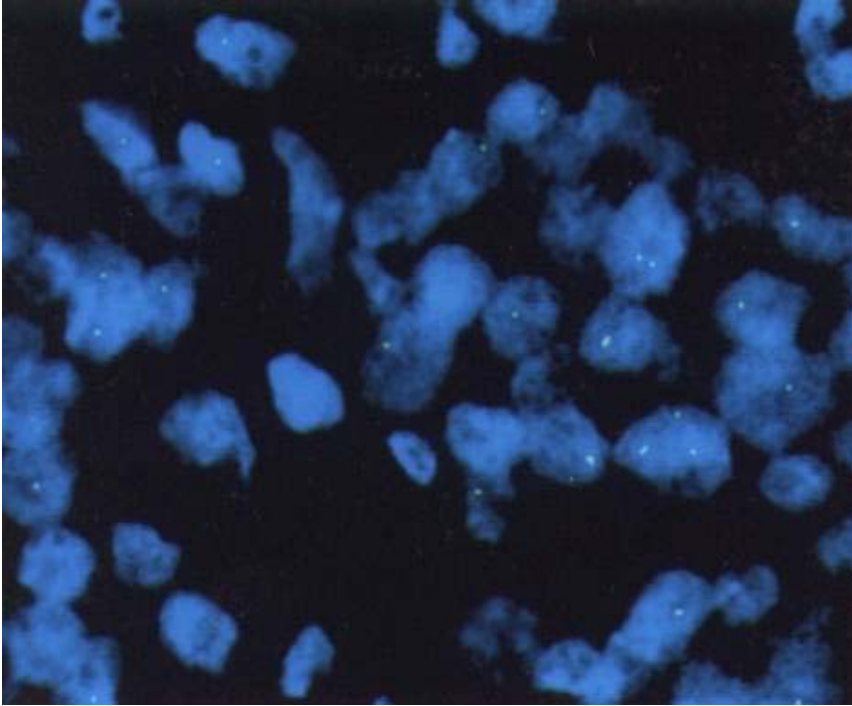


Fig.7. FISH på FFPE, 2 signaler pr. kjerne i de fleste cellene (Elin Mortensen, arkiv).

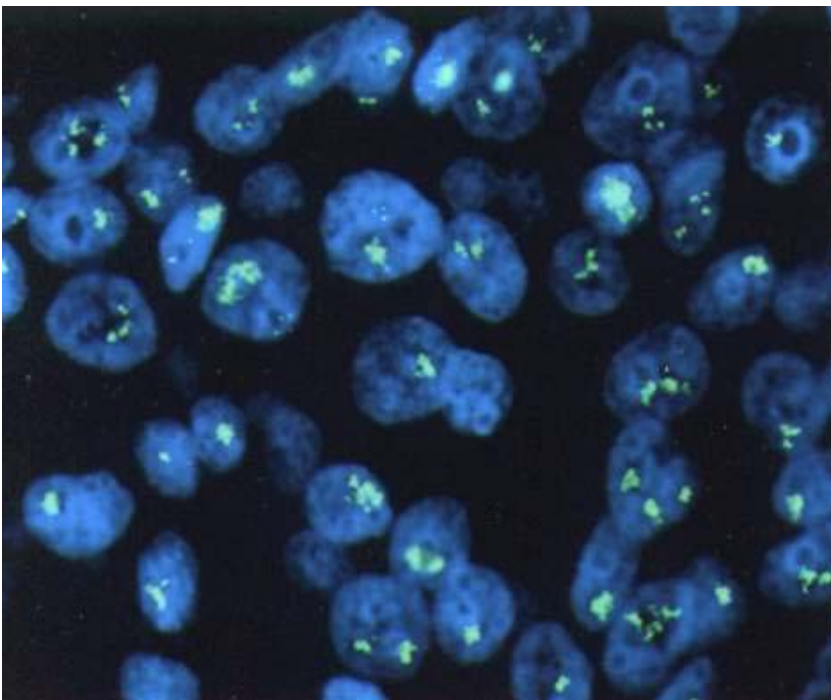


Fig.8. FISH på FFPE, amplifisert gen, gjennomsnittlig ca 25 signaler pr. kjerne (Elin Mortensen, arkiv).

4.3 PCR analyse av HER2

Deteksjon av amplifisering av HER2-genet gjøres rutinemessig med FISH, men det er også mulig å benytte polymerase chain reaction (PCR). Dersom man etter analyse med både IHC og FISH fortsatt er i tvil om HER2-status gjøres PCR. Ved kvantitativ PCR-analyse av HER2-genet brukes såkalt ”real-time” PCR. Prinsippet for real-time PCR er det samme som for konvensjonell PCR. Hovedforskjellen er at det ved real-time PCR i tillegg til to primere også brukes to prober. Ved analyse av HER2 er disse probene merket med et fluorescerende molekyl.

5. Resultater

FISH analyse for HER2 genet ble gjort på 26 imprint. Av disse var 1 amplifisert (>20 signaler pr kjerne). Dette ble gitt en score på 3+ med immunhistokjemi utført på den korresponderende biopsien, som dermed bekreftet imprint resultatet. 2 andre var borderline og derfor ikke konklusive. IHC var negativ på begge. 11 prøver var ikke amplifisert ved FISH imprint og var også negative med IHC. 12 prøver kunne ikke vurderes på grunn av for få celler på objektglasset.

Preparat	FISH		Immunhistokjemi	Kommentar
	innstøpt	FISH imprint		
C-9954/05	Ikke indisert	4,50	0	90/20
C-69/07	Ikke indisert	>20	3+	
C-22847/06	1-2	For få celler	2+	
C-15285/06	Ikke utført	Ikke celler	2-3+	
C-6806	1-2	Ikke celler	2+	
C-1097	1-2	1-2	2+	

C-13192	Ikke indisert	For få celler	3+	
C-20754	Ikke indisert	For få celler	1+	
C-15143/06	Ikke indisert	Ikke celler	0	
C-4191	Ikke indisert	Ikke celler	0	
C-4510	Ikke indisert	Ikke celler	1+	
C-15551	Ikke indisert	Ikke celler	3+	
C-651	Ikke indisert	1-2	1+	Tykt imprint, ytterkant vurderes
C-23604	Ikke indisert	1-2	3+	
C-16553	Ikke indisert	1-2	0	
C-16537	Ikke indisert	4,85	1+	97/20
C-23927/06	Ikke indisert	Ikke celler	3+	
C-27974	Ikke indisert	For få celler	3+	
C-9820	1-2	Ikke celler	2+	
C-9821	Inkonklusiv	1-2	1+	Få celler
C-1180	Ikke indisert	1-2	1+	
C-358	Ikke indisert	1-2	0	
C-2483	1-2	1-2	2-3+	
C-2999	Ikke indisert	1-2	0	
C-3662	Ikke indisert	1-2	0	
C-5018	1-2	1-2	1-2+	

Tabell 2. Resultater.

6. Diskusjon

Nøyaktig deteksjon av endringer i uttrykk av HER2 ved brystkreft er viktig med tanke på pasientens prognose og behandling. Som tidligere nevnt brukes IHC og FISH rutinemessig for å påvise HER2-positiv brystkreft, og begge utføres på formalinfiksert parafininnstøpt materiale. Vi har imidlertid også gjort FISH på imprint.

Immunhistokjemi vs FISH

En av de største feilkildene ved IHC er knyttet til fikseringen. Dette dreier seg blant annet om følgende (12):

- Lang fiksering kan føre til maskering av antigenene determinanter. På noen antigener vil lang fikseringstid føre til negativ farging.
- Ufullstendig fiksering av store preparater, der de innerste delene av vevet ikke er fullstendig penetrert av formalin. Disse områdene tenderer til å gi uspesifikk binding av immunreagenser eller falske negative prøver.
- Ufullstendig avparafinering av snittene (for eksempel gammel xylen).

Et annet problemområde har vært knyttet til antistoffene (14). Ulike antistoffer med ulik sensitivitet har vært benyttet, og denne mangelen på standardisering har gitt usikkerhet ved sammenligning av analyseresultater. En tredje feilkilde er scorings-bias (14). Den som utfører scoringen må bestemme proporsjon av celler med positiv membranfarging og kategorisere fargingens intensitet. Evaluering av fargingens intensitet er subjektiv og bias ved scoring vil dermed oppstå. Særlig ved score 2+ er det naturlig å anta at det vil være stor intra- og interscorer variabilitet.

Flere studier har vist at FISH både har høyere sensitivitet og spesifisitet enn IHC på FFPE materiale når det gjelder korrelasjon med HER2 overuttrykk bekreftet med Northern og Western blot analyser (15). FISH har heller ikke de samme problemene med hensyn til scoring. Man trenger bare telle 2 fargede signaler, og inter-scorer bias er mindre enn 10% (14). Imidlertid har det vært knyttet en del problemer til formalinfikseringen ved FISH, som for eksempel med proteasebehandling, varmebehandling, fikseringstid, buffer pH, degradering av kjerner, for sterk bakgrunnsfarging, pH, og parafininnstøping.

For å sammenligne resultatene mellom IHC og FISH brukes ofte konkordanse angitt i prosent. Konkordansen for score 3+ varierer mellom 51 % og 100 % i litteraturen (16). Imidlertid kan man hevde at 100 % konkordanse mellom IHC og FISH ikke kan forventes siden metodene ikke påviser det samme (16).

FISH er både dyrere, mindre tilgjengelig og mer ressurskrevende enn IHC. Men kanskje kan analyser bare med FISH være mer kostnadseffektivt enn å benytte begge metodene. Dette vil selvsagt avhenge av prisen for hver enkelt av de to metodene og den relative forekomst av 2+ og 3+ caser i pasientpopulasjonen for det aktuelle laboratorium (17). Imidlertid kan man da gå glipp av de tilfellene (ca. 3 %) hvor HER2 protein er overuttrykt i fravær av amplifisering av genet, men det er usikkert hvilken betydning disse har.

FISH FFPE vs imprint

FISH imprint metoden er betydelig raskere enn FISH på FFPE. Dette gir hurtigere diagnosesvar samt tidligere oppstart av behandling. Et annet fortrinn ved imprint er at det brukes cytologisk materiale som har den fordelen at fett og bindevev ikke er representert, man har med andre ord nesten bare tumorvev. Dermed kan det være enklere å nå inn til cellekjernen. Imidlertid var det i flere prøver for få celler til og kunne gjøre en pålitelig telling av signaler. Cellene kan ha blitt vasket bort etter for røff behandling eller for høy temperatur. At 12 av 26 imprint ikke kunne vurderes på grunn av for få celler tyder på at metoden fortsatt ikke er god nok. Blant de imprintene som kunne scores var det imidlertid bra samsvar med resultatet ved IHC. Beklageligvis fikk vi ikke gjort tilstrekkelig antall analyser med FISH av økonomiske grunner, hver FISH analyse koster ca.3000kr. I tillegg var det jo heller ikke indisert når det ikke var 2+ ved IHC.

Konklusjon

Denne studien viser at imprint kan brukes for FISH analyse. Materialet er for lite, og antall celler var i mange prøver for få til og kunne gjøre en pålitelig scoring. Metoden må imidlertid utvikles videre, men kan foreløpig være et supplement til andre metoder. Det har kommet enda en metode for påvise genamplifisering med in situ hybridisering, såkalt Silver in situ hybridization (SISH). Etter at denne studien ble avsluttet har denne metoden blitt tatt i bruk ved UNN.

Referanser

1. Hayat MA., Handbook of immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas. Volume 1, Elsevier Press 2004.
2. Guren T et al. Antitumormidler rettet mot tyrosinkinaser, Tidsskr Norsk Legeforen nr 22, 2005;125: 3115-9.
3. Graus Porta et al., 1997, ErbB2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptor, is a mediator of lateral signaling. EMBO J16:1647-1655.
4. Menard S, Pupa SM, Campiglio M, Tagliabue E. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. Oncogene 2003 22:6570-6578.
5. Menard S, Casalini P, Campiglio M, Pupa SM, Tagliabue E. Role of HER2/neu in tumor progression and therapy. CMLS 61 2004 2965-2978.
6. Krefregisteret, Cancer in Norway 2006,
http://www.krefregisteret.no/forekomst_og_overlevelse_2006/CiN2006_web.pdf
7. Norsk elektronisk legehåndbok, Brystkreft.
8. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN. Robbins Basic Pathology, 8th edition, Saunders-Elsevier 2007.
9. Norsk brystcancer gruppe, <http://www.nbcg.no/blaaboka/utren.mamm.98.pdf>
10. Legemiddelhåndboken, Trastuzumab.
11. Polak JM, van Noorden S. Introduction to immunocytochemistry. Third edition, BIOS Scientific Publishers Ltd., 2003.
12. Universitetssykehuset Nord-Norge, Patologisk anatomisk avd., kvalitetshåndbok, iVIEW DAB automatisk metode.
13. Ventana INFORM. HER-2/neu Gene Detection System, Technical Points.
14. Bartlett J, Mallon E, Cooke T. The clinical evaluation of HER-2 status: which test to use? J Pathol 2003; 199: 411-417.
15. Pauletti G et al. Assessment of methods for tissue-based detection of the HER2/neu alteration in human breast cancer: A direct comparison of fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. J of Clin Oncology, vol 18, No 21, 2000: 3651-3664.

16. Lottner, C. et al. Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol* 2005; 205: 577-584.
17. Dolan, Michelle and Snover, Dale. Comparison of IHC and FISH assessment of HER-2 status in routine practice. *Am J Clin Pathol* 2005; 123: 766-770.

Takk til veileder Elin Mortensen ved patologisk anatomisk avdeling UNN, samt Mona Pedersen ved immunlab UNN.