

Določanje onkogenega Her-2 pri karcinomu dojke

Primož Drev, Rastko Golouh

Her-2, imenovan tudi »c-erbB-2« ali »neu«, je transmembranski glikoprotein iz skupine receptorjev rastnih faktorjev. Protein je izražen v nizkih koncentracijah v mnogih normalnih epitelijih, tudi v duktalnem epiteliju dojke. V signifikantno večji meri pa je pomnožen pri eni petini do eni četrtini invazivnih karcinomov dojke.

V mnogih raziskavah so dokazali, da je pomnoženi Her-2 neodvisen napovedni dejavnik preživetja posebej pri bolnicah s karcinomom dojke in z limfogenimi zasevki. Pomnoženi protein napoveduje dober odziv na adriamicinsko kemoterapijo, hkrati pa slab odziv na tamoksifen celo pri bolnicah z izraženimi estrogenskimi receptorji. V zadnjem času je postalo dokazovanje pomnoženega proteina Her-2 metoda za selekcijo tistih bolnic z metastatskim karcinomom dojke, ki bi bile primerne za imunoterapijo s humaniziranim protitelesom proti Her-2 proteinu, trastuzumabom (Herceptin®). O tem, novjšem zdravljenju nekaterih bolnic, smo v časopisu Onkologija že pisali (Tanja Čufer: Novosti v onkologiji 2001;5:75-6 in Bojana Pajk: Kdaj me boste zdravili s Herceptinom®? 2000;4:79-81).

Določanje statusa Her-2 je postalo na oddelkih za patologijo izjemno pomemben segment strokovnega dela. Ugotavljanje Her-2 pri karcinomu dojke, podobno kot določanje steroidnih receptorjev, ne nadomešča, ampak samo dopolnjuje dokazovanje ostalih tradicionalnih prognostičnih znakov, kot so tip tumorja, njegova velikost, gradus in ugotavljanje zasevkov v bezgavkah.

HER-2 LAHKO DOKAZUJEMO NA VEČ NAČINOV

Pomnoženi protein Her-2 je razen v izjemnih situacijah neposredna posledica zvečanega števila kopij gena Her-2, ki se iz neznanega razloga pojavijo v genomu. Zdi se, da je količina pomnoženega proteina Her-2 na membrani tumorski celici odvisna od števila kopij gena Her-2.

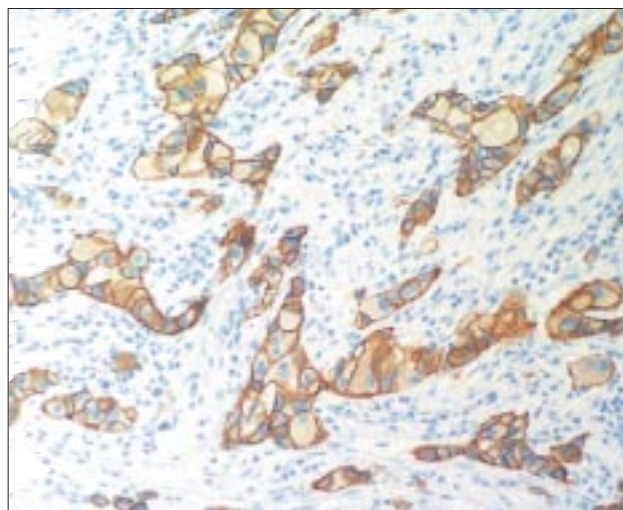
Status Her-2 lahko določimo torej na dva načina. Število kopij gena Her-2 lahko analiziramo z metodo fluorescentne hibridizacije in situ (FISH), množino membranskega proteina Her-2 pa z imunohistokemijo. Obe metodi sta v kirurški patologiji izjemno praktični, saj lahko za preiskave uporabljamo tumorsko tkivo iz standardnih parafinskih blokov.

KAKO JE Z IMUNOHISTOKEMIJO?

Ugotavljanje pomnoženega proteina Her-2 z imunohistokemijo je bistveno drugačno kot pri drugih

protitelesih, kjer zadostujeta običajna izraza »pozitivno« ali »negativno«. Pri oceni proteina Her-2 uporabljamo sistem, ki semikvantitativno upošteva dve značilnosti barvne reakcije.

Glede na delež obarvanih celic in glede na intenziteto membranske reakcije (slika 1) uvrstimo karcinom v eno od



Slika 1. Invazivni karcinom dojke. Imunohistokemična reakcija na celičnih membranah, ocenjena kot 3+, dokazuje močno pomnožen protein Her-2.

štirih skupin: negativna reakcija (0), šibko pozitivna reakcija (1+), zmerno pozitivna reakcija (2+) in močno pozitivna reakcija (3+). Reakciji 2+ in 3+ pomenita prekomerno izraženost proteina (pozitivno), reakciji 0 in 1+ pa ne (negativno).

Imunohistokemična reakcija napoveduje pomnožitev gena Her-2. Negativna imunska reakcija (0 in 1+) skoraj zagotovo kaže, da gen ni pomnožen, močno pozitivna reakcija (3+) pa, da ga je več. Pri zmerno pozitivnem Her-2 (2+) je sklepanje o pomnožitvi nezanesljivo.

Ob imunohistokemičnem dokazovanju pa se pojavljajo nekatere težave. Z vse bolj občutljivimi protitelesi in ob uporabi metod za razkrivanje antigenov najdemo pozitivno reakcijo tudi na celicah normalnega duktalnega epitela, kjer je število kopij gena Her-2 na kromosomu 17 nespremenjeno. Očitno so postale imunohistokemične metode »preobčutljive« in odkrijejo protein tudi na celicah brez pomnoženega gena, ob tem pa bo reakcija sorazmerno intenzivnejša tudi na tumorskih celicah, ocena pa previsoka. Patologi že opažajo, da je delež Her-2 imunohistokemično pozitivnih primerov nenavadno visok,

kar lahko vsaj delno pripišemo taki »napačno pozitivni« reakciji.

ALI LAHKO FISH POMAGA PRI NATANČNEJŠEM DOLOČANJE PREKOMERNE EKSPRESIJE HER-2?

FISH, hibrid molekularne biologije in citogenetike, je novejša metoda prikazovanja nukleinskih kislin.

Pri FISH izkoristimo osnovno lastnost nukleinskih kislin prileganja dveh komplementarnih enojnih verig. Proces imenujemo hibridizacija. V praksi predhodno označimo eno od verig DNK. Tako označeno verigo DNK imenujemo sonda. Potem ko komplementarna sonda prileže na iskano verigo DNK v jedru, lahko s primerno detekcijsko metodo prikazemo nastali hibrid.

V primerjavi z ostalimi molekularnimi metodami ima FISH to prednost, da nukleinskih kislin iz vzorca ne ekstrahiramo, ampak ostane preiskovano tkivo ohranjeno. Na poseben način obarvan histološki preparat analiziramo s fluorescentnim mikroskopom.

Na splošno velja, da lahko z metodo FISH prikazemo v jedru lokalizacijo in število kopij DNK. Razen pri spolnih kromosomih pričakujemo zaradi dvojnih kromosomov v interfazi v vsakem običajnem jedru po dva signala iste DNK. Metodo FISH uporabljamo najpogosteje za odkrivanje štirih osnovnih kromosomskih sprememb – aneuploidije, genskih delecij, translokacij in pomnožitev. Pri karcinomu dojke nas zanima zadnja kromosomska sprememba, to je pomnožitev specifičnega gena.

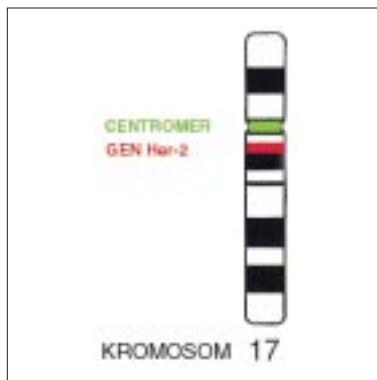
Gen Her-2 leži na kromosomu 17 (slika 2). V običajnih celicah najdemo torej po dva kromosoma 17 in na vsakem od njiju po en gen Her-2. Teoretično bi bilo vsako število jedrnih genskih kopij, ki je večje od dve, že znak pomnožitve. Ker pa je pri invazivnih karcinomih dojke aneuploidija kromosoma 17 zelo pogosta, saj so kromosomi pomnoženi po nekaterih raziskavah v 47% primerov, je povečano število kopij gena Her-2 lahko posledica polisomije kromosoma 17, in ne pomnožitve. Če ne bi poznali števila kromosomov 17, bi v takem primeru samo po številu signalov lahko napačno ugotovili pomnožitev. To velja še posebej takrat, ko je število kopij gena Her-2 le malo zvišano.

Za natančnejšo interpretacijo rezultatov uporabljamo zato dve sondi. Z eno prikazemo število signalov gena, z drugo pa število centromerov kromosoma 17 in s tem število kromosomov 17. Lokalizacije genov so v fluorescentnem mikroskopu obarvane rdeče, centromeri pa zeleno (slika 3).

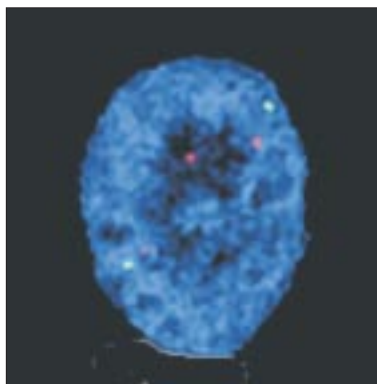
V analizi vzorca preštejemo signale v 60 jedrih tumorskih celic invazivne komponente tumorja. O pomnožitvi sklepamo na podlagi razmerja števila signalov gena Her-2 in števila signalov centromera kromosoma 17. Če je količnik med obema enak ali večji od 2, govorimo o pomnožitvi Her-2 protoonkogene (slika 4). Če je količnik manjši od 2, ni pomnožitve.

FISH je kvantitativna metoda s 100% specifičnostjo in 96-98% senzitivnostjo.

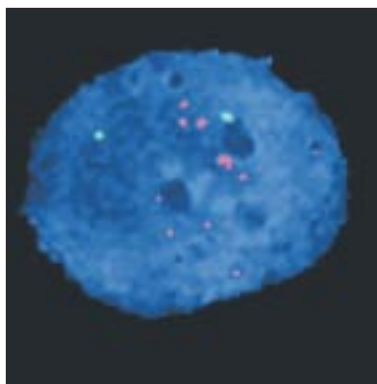
Preiskava traja tri dni.



Slika 2. Na shemi kromosoma 17 sta označeni mesti za centromer (zeleno) in za gen Her-2 (rdeče).



Slika 3. Celica duktalnega epitela dojke z običajnim številom zelenih signalov (2) za centromer kromosoma 17 in rdečih signalov (2) za gen Her-2.



Slika 4. Celica invazivnega karcinoma dojke. Običajno število zelenih signalov (2) za centromer kromosoma 17 in povečano število rdečih signalov (najmanj 8) za gen kaže na očitno pomnožitev gena Her-2.

ALI JE FISH PRAVA KVANTITATIVNA METODA?

Ne vedno. Kadar je število pomnoženih kopij gena Her-2 majhno, je relativno lahko prešteti signale genov in kromosomov. Če pa število signalov preseže 8 do 10, jih je zaradi prekrivanja težje razločiti in prešteti, tako da rezultati postanejo semikvantitativni. Res pa je, da še ne vemo, ali je kvantitativen podatek klinično pomemben.

KAKŠEN NAJ BO STANDARDEN NAČIN DOLOČANJA HER-2?

O tem, ali naj bi imunohistokemijo in FISH kombinirali, in če, na kakšen način, še ni dogovora. Najpogostejša priporočila so:

- Samo imunohistokemija. Zaradi težav z lažno pozitivnimi in lažno negativnimi rezultati ima tak način le še malo zagovornikov.
- Imunohistokemija za presejanje vseh duktalnih karcinomov, FISH uporabimo za potrditev primerov z imunohistokemičnim rezultatom 2+.
- Presejanje z imunohistokemijo, FISH za dodatno analizo vseh imunopozitivnih primerov (2+ in 3+).
- FISH pri vseh primerih. Tako obdelavo zahtevajo ponekod predvsem kliniki.

Na Oddelku za patologijo Onkološkega inštituta smo oktobra 2001 postavili laboratorij za molekularno genetiko, novembra je steklo uvajanje FISH, januarja 2002 pa standardizacija metode

v sodelovanju z Inštitutom za patologijo Univerze v Baslu.

S pomladjo 2002 začnemo rutinsko ugotavljati pomnoženi gen z metodo FISH pri vseh karcinomi dojke z imunohistokemično dokazanim zmerno pomnoženim proteinom Her-2 (2+).

NEKAJ O TEHNIKI

Za določanje pomnožitve protoonkogenega Her-2 uporabljamo PathVysion™ HER-2 DNA PROBE KIT, ki ga je ameriški Urad za živila in zdravila januarja 2002 odobril za izbiro tistih bolnic z metastatskim karcinomom dojke, ki bi jih lahko zdravili s Herceptinom®.

Kit vsebuje dve sondi. Prva je s fluorokromom spectrum orange direktno označena sonda za Her-2 genski lokus, ki se prilega na 17q11.2- q12 regijo človeškega kromosoma 17. Druga je s fluorokromom spectrum green direktno označena alfasatelitna sonda za centromer kromosoma 17, prilegajoča na lokus D17Z1 kromosoma 17.

Vzorec za preiskavo je v formalinu fiksiran in v parafin vklopljeno tumorsko tkivo. Tanko, 2-4 µm debelo tkivno rezino naplavimo na objektno stekelce, parafin otopimo s ksilolom, tega pa speremo z etanolom. Z encimsko digestijo razkrijemo DNK in tako omogočimo dostop sond do ciljne molekule.

Preparat ponovno fiksiramo v blagi raztopini formalina, nato naneseemo sondi. Denaturiranje preiskovane DNK in sond, ki je bistveni pogoj za hibridizacijo, dosežemo s kombinacijo kemičnih (formamid) in fizikalnih (segrevanje) postopkov. Hibridizacija poteka v hibridizacijski komori pri temperaturi 37° C vsaj 16 ur. Ostanke nevezanih sond speremo. Vso jedrno DNK obarvamo z barvilom DAPI.

Detekcija hibridnih molekul temelji na fizikalnem pojavu - fluorescenci. Posebna barvila - fluorokromi, se ob vplivu

svetlobe določene valovne dolžine vzburi in elektroni atomov barvila preidejo na višjo energetska raven. Ko se elektroni vrnejo na osnovno energetska raven, oddajo energijo v obliki svetlobe z večjo valovno dolžino, kot je bila ekscitacijska. Tako emitirano svetlobo nato registriramo.

V našem laboratoriju uporabljamo za detekcijo reakcij:

1. Svetlobni mikroskop Olympus BX 51, ki je prirejen za epifluorescenčno mikroskopiranje.
2. Videokamera (Sensys™ Charge Coupled Device, CCD).
3. Računalnik z operacijskim sistemom Mac OS9, z bazo podatkov Lab manager, s programom za zajemanje in obdelavo slike Smart capture 2.0 in IP Lab 3.0 in programom za oblikovanje poročil Report layouts, združenih v programski sistem Quips®, proizvajalca Applied imaging corporation.

Ob pregledu preparata izberemo z manjšo povečavo primerno področje invazivnega karcinoma s celičnimi jedri, ki se ne prekrivajo. Vsako izbrano jedro slikamo trikrat. S prvim posnetkom registriamo sliko, dobljeno s svetlobo, ki ekscitira barvilo DAPI, z drugim sliko s svetlobo, ki ekscitira fluorokrom, vezan na sondo za gen Her-2, in s tretjim sliko s svetlobo, ki ekscitira fluorokrom, vezan na sondo za centromer kromosoma 17. Z monokromatsko videokamero dobimo črno bele posnetke. Računalniški program doda nato ustrezne barve in sestavi posamezne posnetke v barvno sliko jedra s signali obeh sond. V končni sliki je jedro modre barve, signali sonde, hibridizirane na gen Her-2, so rdeči, signali sonde centromera kromosoma 17 pa zeleni.

Ker za razliko od večine histoloških, preparati pri metodi FISH niso trajni, je posebej pomembno shranjevanje posnetkov v bazo podatkov.

