

## Prädiktive EGFR-Genanalysen in der Zytologie

Die Auswahl von Patienten für zielgerichtete Therapien mit neuen Medikamenten gegen spezifische molekulare Zielstrukturen gewinnt laufend an Bedeutung. Die Diagnose von Primärtumoren und von Fernmetastasen wird je nach Organsystem häufig ausschließlich zytologisch gestellt. Deshalb ist es entscheidend, dass prädiktive molekulare Markeranalysen nicht nur an histologischem Material, sondern auch an zytologischen Präparaten gelingen. Solche Analysen erfordern allerdings Zytologieexpertise und bestimmte technische Voraussetzungen. Epidermale-Wachstumsfaktor-Rezeptor- („epidermal growth factor receptor“, EGFR-) Genanalysen an nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen („non-small cell lung cancer“, NSCLC) sind ein aktuelles Beispiel dafür. In dieser Arbeit geben wir eine Übersicht über den Stellenwert von EGFR-Genanalysen in NSCLC und deren Anwendbarkeit in der Zytologie.

### EGFR-Genanalysen für die Vorhersage des Therapieansprechens auf EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren

EGFR gehört zu einer Familie transmembranöser Tyrosinkinasen, welche nach Ligandbindung zu einer spezifischen Signalübermittlung mit Regulation der zellulären Proliferation führt. Die Bedeutung des EGFR für die Entstehung und Progression maligner Tumoren hat kürzlich zur Entwicklung von EGFR-Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) geführt. Diese zielgerichteten Medikamente sind vielversprechend in der Behandlung von NSCLC, wirken jedoch nur bei einem Teil der Patienten. EGFR-Mutationen und eine vermehrte Anzahl von EGFR-Genkopien gelten als molekulare Prädiktoren für ein Ansprechen auf EGFR-TKI beim NSCLC [1].

Die relative Bedeutung dieser beiden Veränderungen wird z. T. noch kontrovers diskutiert [2]. Am prädiktiven Wert

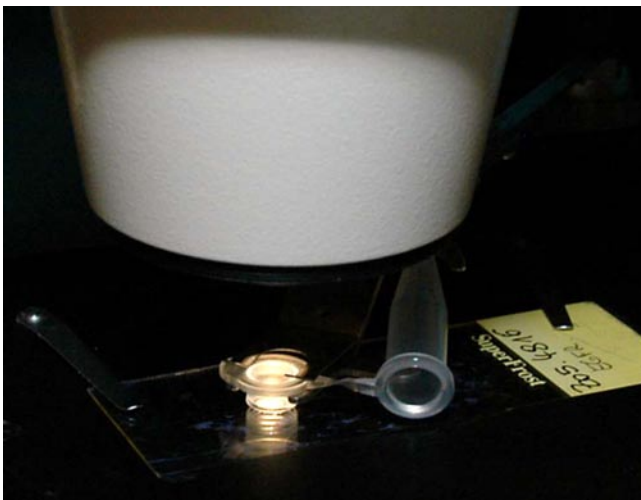
von EGFR-Mutationen wird aber kaum mehr gezweifelt, da vor allem Deletionen in Exon 19 und die L858R-Punktmutation in Exon 21 häufig mit einem sehr guten Ansprechen auf EGFR-TKI assoziiert sind [3].

EGFR-Mutationen in NSCLC sind mit etwa 30% bei Asiatinnen und Nichtraucherinnen besonders häufig verglichen mit etwa 10% in der kaukasischen Bevölkerung. Die Prävalenz von therapielevanten EGFR-Mutationen in unserer eigenen Serie von 307 mitteleuropäischen NSCLC-Patienten war mit 8,1% vergleichbar, und EGFR-Mutationen waren bei Frauen im Vergleich zu Männern (16,8% vs. 2,7%;  $p < 0,001$ ) und in Adenokarzinomen im Vergleich zu den übrigen Karzinomen (11,4% vs. 3,8%;  $p = 0,017$ ) gehäuft [4].

Leider werden NSCLC, die initial hervorragend auf EGFR-TKI ansprechen, meist innerhalb von 12 Monaten resistent. Die Resistenz ist bedingt durch sekundär auftretende spezifische EGFR-Mutationen oder durch eine Amplifikation des MET-Gens [5]. KRAS-Mutationen gelten als negativer Prädiktor, treten praktisch nie gleichzeitig mit einer EGFR-Mutation auf und KRAS-mutierte NSCLC sprechen nicht auf EGFR-TKI an.

Da auch ein Teil von NSCLC-Patienten ohne EGFR-Mutation auf EGFR-TKI anspricht, wurde nach alternativen prädiktiven Markern gesucht. Tatsächlich hat sich wiederholt gezeigt, dass eine erhöhte EGFR-Genkopiezahl einen unabhängigen prädiktiven Faktor darstellt [2].

Somit könnte es sich als sinnvoll erweisen, EGFR- und KRAS-Mutationen simultan zu untersuchen und bei fehlender Mutation beider Gene zusätzlich



**Abb. 1** ◀ Laser-Mikrodissektion von Karzinomzellen an zytologischen Präparaten für nachfolgende PCR und Gensequenzierung (PALM Mikrolaser Technology System): Am invertierten Mikroskop werden Zellen mittels Laser disseziert, direkt in den Deckel eines Eppendorf-Röhrchens kapultiert und von dort weiterverarbeitet

eine EGFR-FISH- („Fluoreszenz-in-situ-Hybridization“-) Analyse anzuschließen. Patienten mit einem negativen Resultat sowohl in der EGFR-Mutations- als auch in der FISH-Analyse oder Patienten mit einer KRAS-Mutation werden mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf eine EGFR-TKI ansprechen.

### Zytologie für EGFR-Genanalysen

In kürzlich publizierten Richtlinien für EGFR-Analysen in klinischen Studien wurde von zytologischen Präparaten abgeraten [6]. Dies begründet sich vor allem auf einen höheren Bedarf an Tumormaterial in klinischen Studien, in denen häufig multiple Biomarker mittels Immunhistochemie, Polymerasekettenreaktion (PCR) oder FISH untersucht werden.

In der diagnostischen Routine wird die Diagnose eines NSCLC in bis zu einem Drittel der Fälle allein zytologisch gestellt. In Fernmetastasen dürfte dieser Anteil noch höher liegen. Die zytologischen Präparate enthalten oft reichlich und optimal erhaltenes Tumorzellmaterial. Wir halten es deshalb für nicht gerechtfertigt, bei diesen Patienten aus grundsätzlichen Überlegungen eine erneute Bronchoskopie oder andere invasive Maßnahmen zur Biopsiegewinnung für prädiktive Markeranalysen zu erzwingen. Es gibt keinen Grund zur Annahme, dass EGFR-Genanalysen in zytologischen Präparaten problematischer sein könnten als in der Biopsie. In der Routinediagnostik wählen wir jeweils dasjenige Material für die Markeranalysen aus, das uns aufgrund von Zellmenge und Zellerhalt am besten geeignet erscheint.

Die größte Herausforderung der EGFR- und KRAS-Mutationsanalyse mittels PCR und Sequenzierung in kleinen Biopsien und in zytologischen Präparaten liegt in der Isolation einer möglichst reinen Tumorzellpopulation. Damit wird eine Verdünnung der Tumor-DNS mit Normal-DNS von beigemischten benignen Zellen vermieden, was zu falsch-negativen Resultaten führen könnte. Dies lässt sich gelegentlich durch manuelles Abkratzen von sehr tumorzellreichen Präparaten erreichen. Häufig erfordern die Präparate aber eine präzise Gewinnung von Tumorzellen mittels Laser-assistierter und com-

Pathologe 2009 · [Suppl 2] 30:136–139 DOI 10.1007/s00292-009-1191-7  
© Springer Medizin Verlag 2009

L. Bubendorf · S. Savic

### Prädiktive EGFR-Genanalysen in der Zytologie

#### Zusammenfassung

Mutationen und Genkopienanzahl des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors („epidermal growth factor receptor“, EGFR) gelten beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) als prädiktive Marker für ein Ansprechen auf EGFR-Tyrosinkinase-Hemmer.

Die Diagnose eines NSCLC wird häufig allein zytologisch gestellt. Die Isolation einer möglichst reinen Tumorzellpopulation ist für Mutationsanalysen mittels PCR und Sequenzierung wichtig, um eine Verdünnung der Tumor-DNS mit Normal-DNS von angrenzenden benignen Zellen zu vermeiden. Dies ist heute mittels Laser-assistierter und computergesteuerter Mikrodissektion (LMD) einfach möglich.

Die EGFR-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung-(FISH-)Analyse an zytologischen Präparaten mit einem hohen Anteil benigner respiratorischer Zellen sollte mit Hilfe einer automatisierten Relokalisation der Karzinomzellen durchgeführt werden. Die einzigen

bisher etablierten EGFR-FISH-Kriterien wurden an histologischen Präparaten erarbeitet und können nicht ohne Weiteres für zytologische Präparate übernommen werden. Zellkerne in zytologischen Präparaten sind intakt, während in histologischen Schnittpräparaten Teile der Zellkerne weggeschnitten sind. Die Rate an FISH-positiven Befunden unter Anwendung der Colorado-Kriterien liegt somit in der Zytologie deutlich höher als in der Histologie.

Zytologische Präparate sind für EGFR-Mutations- und FISH-Untersuchungen genauso geeignet wie histologisches Material. Die Aussagekraft der EGFR-FISH-Analyse an zytologischem Material ist gegenwärtig noch durch das Fehlen geeigneter Kriterien für ein positives FISH-Resultat eingeschränkt.

#### Schlüsselwörter

EGFR · FISH · Mutation · Zytologie · Biopsien

### Predictive EGFR gene analyses in cytology

#### Abstract

EGFR mutations and EGFR gene copy number are considered as predictive markers for response to EGFR tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer (NSCLC).

NSCLC are often diagnosed by cytology alone. The isolation or selection of a pure tumour cell population is critical for mutation analysis by PCR and sequencing in order to avoid an admixture of tumour DNA with normal DNA of adjacent benign cells. The collection of tumour cells is easily possible by laser microdissection (LMD).

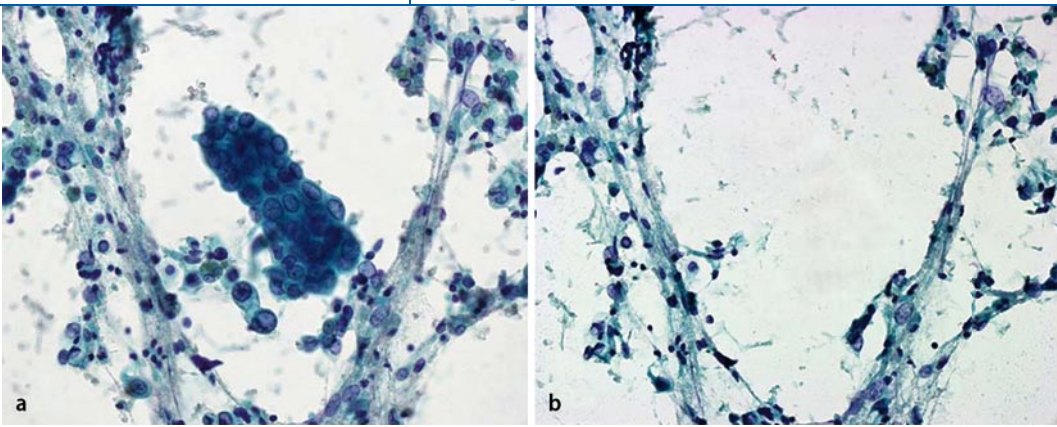
EGFR FISH analysis on cytological specimens with a high proportion of benign respiratory cells should be performed after automated relocation of carcinoma cells. The only hitherto established EGFR-FISH criteria were

developed using histological specimens and cannot be applied to cytological specimens as such. The cell nuclei in cytological specimens are intact, while they are often truncated in histological specimens. Therefore, when applying the Colorado criteria, the rate of FISH positive results is higher in cytological than in histological specimens and in fact represents false positive results in cytology.

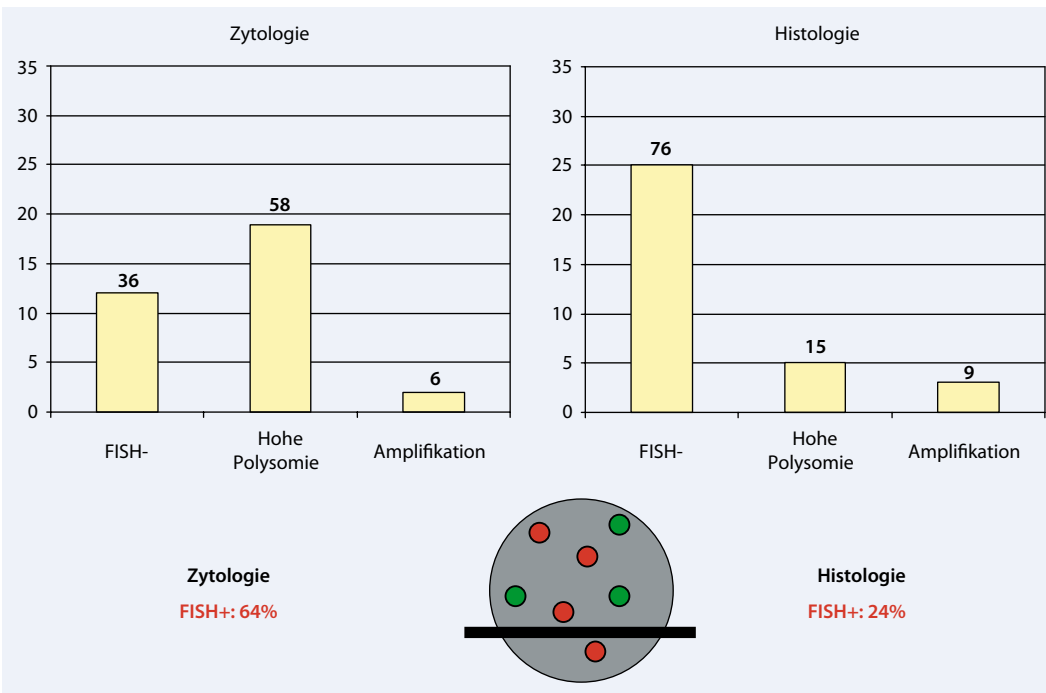
Cytological specimens are equally well suited for EGFR gene analyses and FISH analysis as histological specimens. At present, the value of EGFR-FISH analysis is limited by the lack of validated criteria for FISH positivity.

#### Keywords

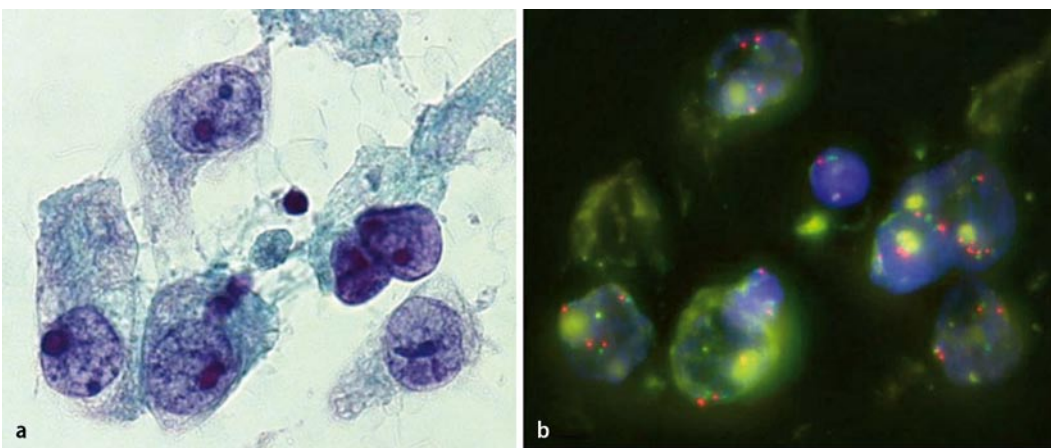
EGFR · FISH · Mutation · Cytology · Biopsies



**Abb. 2** ◀ Adenokarzinom der Lunge in Papanicolaou-gefärbtem zytologischem Präparat **a** vor und **b** nach Laser-Mikrodissektion



**Abb. 3** ◀ Vergleichende EGFR-FISH-Resultate an 33 Zytologien und entsprechenden Histologien von 33 NSCLC. Auswertungskriterien gemäß Cappuzzo et al. [8]. Signifikant höherer Anteil von „hoher Polysomie“ in den Zytologien als in den Histologien (58% vs. 15%;  $p < 0,001$ ) aufgrund intakter Tumorzellkerne. (adaptiert nach Savic et al. [7])



**Abb. 4** ◀ Zellen eines pulmonalen Adenokarzinoms aus transbronchialen Fein Nadelpunktat. **a** Papanicolaou und **b** dieselben Zellen nach FISH und Relokalisation: Karzinomzellen mit je 4 roten EGFR-Signalen und 4 grünen Referenzsignalen (Zentromer Chromosom 7). Im Zentrum ein Zellkern eines normalen Lymphozyten mit je 2 Signalen

putergesteuerter Mikrodissektion (LMD). Wie in **Abb. 1** und **Abb. 2 a, b** illustriert, lassen sich Einzelzellen oder kleine Zellgruppen mittels LMD aus routinemä-

ßig verarbeiteten zytologischen Präparaten isolieren.

Wir können uns den kürzlich geäußerten Bedenken nicht anschließen, wonach die LMD an zytologischen Präpa-

raten extrem aufwendig und deshalb für den Routineeinsatz nicht geeignet sei [6]. Die LMD-Technologie ist heute kein ausgefallenes Forschungsinstrument mehr, sondern zu einer Standardmethode in



modernen Pathologielaboren geworden, die PCR-basierte molekulare Analysen an kleinen Biopsien anbieten. Die EGFR-FISH-Analyse ist in zytologischen Präparaten des Respirationstrakts unproblematisch und an Papanicolaou-gefärbten oder sogar an vorgängig immunzytochemisch untersuchten Präparaten anwendbar. Die automatisierte Relokalisierung von Karzinomzellen, mit der sich die Koordinaten vor der Hybridisierung speichern lassen, sollte in Präparaten mit hohem Anteil benigner respiratorischer Zellen verwendet werden [7]. Die Aussagekraft der EGFR-FISH-Analysen ist gegenwärtig aber noch durch das Fehlen geeigneter Grenzwerte für ein positives FISH-Resultat eingeschränkt.

Kriterien für ein positives EGFR-FISH-Testresultat wurden von Cappuzzo et al. [8] aufgrund des EGFR-TKI-Ansprechens bei NSCLC etabliert und definiert als das Vorhandensein einer EGFR-Amplifikation ( $\geq 2$ -mal mehr Gen- als Zentromersignale oder  $\geq 15$  EGFR-Signale in  $\geq 10\%$  der Tumorzellen) oder einer „hohen Polysomie“ ( $\geq 4$  EGFR-Signale in  $\geq 40\%$  der Tumorzellen). Diese Kriterien wurden aber an histologischen Präparaten etabliert und können nicht ohne Weiteres für zytologische Präparate übernommen werden. Die Zellkerne in zytologischen Präparaten sind intakt, während in histologischen Schnittpräparaten Teile der Zellkerne und somit der EGFR-Gene weggeschnitten sind. Deshalb liegt die Rate an FISH-positiven Befunden in der Zytologie deutlich höher als in der Histologie (■ **Abb. 3**). Dies führt in der Zytologie unweigerlich zu falsch-positiven Resultaten, sofern die an Histologien definierten Kriterien als Goldstandard verwendet werden [7].

■ **Abb. 4 a, b** zeigt Zellen eines pulmonalen Adenokarzinoms, das in der Zytologie nach den Colorado-FISH-Kriterien aufgrund einer „hohen Polysomie“ als FISH-positiv klassifiziert wurde. In der entsprechenden Biopsie war das FISH-Resultat jedoch negativ.

Durch die komparative FISH-Untersuchung zytohistologischer Präparatepaare haben wir kürzlich eine mathematische Formel entwickelt, mit der sich die an der Zytologie erhobenen FISH-Werte auf die entsprechenden Histologiewerte umrech-

nen lassen [9]. Eine solche Formel ermöglicht es, neue Grenzwerte für ein positives FISH-Resultat an zytologischen Präparaten in Anlehnung an die von Cappuzzo et al. [8] etablierten Colorado-Kriterien festzulegen.

## Korrespondenzadresse

### Prof. Dr. L. Bubendorf

Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel  
Schönbeinstr. 40, 4003 Basel  
Schweiz  
lbubendorf@uhbs.ch

**Interessenkonflikt.** Der korrespondierende Autor weist auf folgende Beziehungen hin: Referententätigkeit für Abbott Molecular Inc. mit Honorar und Forschungsdrittittel von Abbott Molecular Inc.

## Literatur

1. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ, Haber DA (2005) Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25:587–595
2. Riely GJ, Politi KA, Miller VA, Pao W (2006) Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12:7232–7241
3. Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T (2009) Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 63:315–321
4. Tapia C, Savic S, Bihl M et al (2009) EGFR mutation analysis in non-small-cell lung cancer: Experience from routine diagnostics. *Pathologie* (Epub ahead of print)
5. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T et al (2007) MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 316:1039–1043
6. Eberhard DA, Giaccone G, Johnson BE (2008) Biomarkers of response to epidermal growth factor receptor inhibitors in Non-Small-Cell Lung Cancer Working Group: standardization for use in the clinical trial setting. *J Clin Oncol* 26:983–994
7. Savic S, Tapia C, Grilli B et al (2008) Comprehensive epidermal growth factor receptor gene analysis from cytological specimens of non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer* 98:154–160
8. Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E et al (2005) Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 97:643–655
9. Zlobec I, Raineri I, Schneider S et al (2009) Assessment of mean EGFR gene copy number is a highly reproducible method for evaluating FISH in histological and cytological cancer specimens. *Lung Cancer* (Epub ahead of print)