

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Eine neue diagnostische Dimension in der Zytologie

Entwicklung und Progression maligner Tumoren gehen mit einer Akkumulation genetischer Veränderungen einher [1]. Funktionsstörungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen beruhen oft auf strukturellen oder quantitativen Veränderungen der Desoxyribonukleinsäure (DNS). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) erlaubt die Darstellung spezifischer DNS-Sequenzen in einzelnen Zellen und kann für die Quantifizierung von Chromosomen und Genen auf Einzelzellbasis verwendet werden [17, 26].

Methode

Bei FISH-Untersuchungen werden DNS-Zielsequenzen mit spezifischen Proben markiert und mittels Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht. Zur Detektion chromosomaler Aberrationen werden repetitive Zentromerproben und zur Detektion spezifischer chromosomaler Regionen lokusspezifische Proben eingesetzt. Allen FISH-Protokollen sind folgende elementare Schritte gemeinsam (■ **Abb. 1**): Auf die Verdauung von zellulären Proteinen durch Proteasen folgt die Denaturierung der DNS. Dadurch öffnet sich der DNS-Doppelstrang, worauf sich die markierte DNS-Sequenz der ebenfalls denaturierten FISH-Probe an die komplementäre Stelle im Chromosom anlagern kann. Überschüssige Proben werden nach der Hybridisierung in einem Waschschrift entfernt. Kommerzielle FISH-Proben sind

direkt mit Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass kein zusätzlicher Detektionsschritt erforderlich ist. Die hybridisierten, fluoreszenzmarkierten DNS-Sequenzen werden durch Licht geeigneter Wellenlängen unter Verwendung geeigneter Filter visualisiert. Die Größe von FISH-Proben bewegt sich zwischen 30–40 und mehreren 100 Kilobasen.

FISH-Untersuchungen werden nach Entfernung des Deckglases mit Xylol direkt auf den zytologischen Präparaten durchgeführt. Konventionelle Ausstriche, Zytozentrifugenpräparate und Dünnschichtpräparate (z. B. ThinPrep® oder SurePath®) sind für FISH gleichermaßen geeignet. FISH gelingt sowohl an luft- als auch an alkoholfixierten Präparaten. Ungefärbte Präparate können ebenso wie Papanicolaou- oder May-Grünwald-Giemsa gefärbte Präparate verwendet werden. Vorgängig immunzytochemisch untersuchte Präparate können ebenfalls ohne Protokolländerung hybridisiert werden, sofern 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) als Chromogen verwendet wurde. Das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) erzeugt hingegen eine nukleäre Autofluoreszenz, welche die Auswertung erschwert. Die Verwendung von beschichteten Objektträgern ist ratsam. Durch die bessere Zellhaftung auf diesen Objektträgern wird der Zellverlust infolge des Abschwimmens von Zellgruppen im Verlauf der Vorbehandlung und Denaturierung deutlich vermindert.

Eine wichtige technische Voraussetzung für die FISH-Auswertung ist die

Verfügbarkeit eines Fluoreszenzmikroskops mit adäquaten Fluoreszenzfiltern. In der diagnostischen Routearbeit hat sich zudem ein automatischer Kreuztisch mit Relokalisationsmöglichkeit hervorragend bewährt. Dadurch lassen sich die Koordinaten individueller Zellen und Zellgruppen in der konventionellen Färbung auf dem Präparat speichern, sodass dieselben Zellen nach Hybridisierung gezielt ausgewertet werden können. Diese Relokalisation definierter Zellgruppen erleichtert zudem die Zweitbeurteilung und die Diskussion von FISH-Befunden am Fluoreszenzmikroskop.

Im diagnostischen Alltag gelingt die FISH-Untersuchung in über 95% der Fälle. Die Hybridisierbarkeit der zytologischen Präparate nimmt allerdings mit zunehmender Archivierungszeit ab [20].

Befundung

Ein Vorteil zytologischer Präparate für die FISH-Untersuchung gegenüber histologischen Schnittpräparaten liegt in den vollständig erhaltenen Zellkernen. An histologischen Präparaten sind die Zellkerne durchgeschnitten, sodass nur ein Teil der zu untersuchenden DNS-Abschnitte vorliegt. Die Zahl der FISH-Signale liegt somit tiefer als bei den intakten Zellkernen am zytologischen Material.

Normale Zellkerne sind diploid und enthalten jeweils 2 Kopien eines Chromosoms und Gens. Auf Genomebene wird eine messbare Änderung des Chro-

mosomengehalts als *Aneuploidie* bezeichnet. Der Verlust eines der beiden Chromosomen führt zu einer *Monosomie* und der Zugewinn eines bestimmten Chromosoms zu einer *Polysomie*. Eine Polysomie ist meist Ausdruck einer allgemeinen chromosomalen Instabilität, die bei Tumoren häufig vorkommt und deshalb diagnostisch genutzt werden kann. Eine Polysomie lässt jedoch nicht sicher auf eine Dysfunktion bestimmter Gene schließen. Verluste oder Zugewinne kurzer DNS-Sequenzen sind hingegen oft Ausdruck einer veränderten Genfunktion. Deletionen weisen auf den Verlust von Tumorsuppressorgenen hin, während Zugewinne von DNS-Sequenzen durch eine Erhöhung der „Gendosis“ typischerweise zur Aktivierung von (Onko-)Genen führen. Biologisch besonders relevant sind *Genamplifikationen*. Für eine Amplifikation sollte die Anzahl der Gensignale mindestens doppelt so hoch sein wie die Anzahl der Referenzsignale (Zentromerproben des entsprechenden Chromosoms).

Anwendungen in der Zytologie

Der Hauptvorteil der FISH-Untersuchung gegenüber Expressionsmarkern liegt darin, dass chromosomale Aberrationen in Normalgewebe nur sehr selten vorkommen. Die Expression von Proteinen ist hingegen sowohl in Tumoren als auch im Normalgewebe meist variabel und abhängig vom zellulären Funktionszustand. Nachfolgend und in **Tab. 1** sind die nach unserer Ansicht derzeit bedeutendsten FISH-Anwendungen in der Zytologie dargestellt.

FISH in der Urinzytologie

Durch eine Mischprobe aus 4 unterschiedlich fluoreszenzmarkierten FISH-Sonden (Chromosomen 3, 7, 17 und 9p21; UroVy-sion, Abbott/Vysis Inc., Downer's Grove) lässt sich die Sensitivität der Urinzytologie zum Nachweis urothelialer Tumoren deutlich verbessern [5, 4, 9, 28, 29].

Die 9p21-Deletion ist ein frühes zytogenetisches Ereignis bei der Entstehung von Urotheltumoren, das einer chromosomalen Instabilität mit Aneusomie vorausgeht und häufig bei niedrigmalignen urothelialen Tumoren beobachtet wird. **Abb. 2 a–c** zeigt Zellen aus einer

Tab. 1 Auswahl von FISH-Applikationen in der Zytologie

Zellmaterial	Chromosomen- und lokusspezifische FISH-Sonden	Aberration	Diagnostische und klinische Bedeutung
Urin/Harnblase	3, 7, 17, 9p21	Aneusomie	Klärung unklarer Atypien, Verbesserung der Sensitivität in der Urothelkarzinomdiagnostik
Lunge	6, 5p15, 7p12 (EGFR), 8q24 (MYC)	Aneusomie	Klärung unklarer Atypien
Malignes Mesotheliom	7 9p21	Polysomie Deletion	Unterscheidung reaktiver Mesothelien von Zellen eines malignen Mesothelioms
Mammakarzinom	HER2	Amplifikation	Selektion für Therapie mit Trastuzumab
Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom	EGFR	„Hohe Polysomie“/ Amplifikation	Eventuell prädiktiver Marker für Ansprechen auf eine Therapie mit Gefitinib und Erlotinib
Cervix uteri (Vorsorgezytologie)	HPV TERC, MYC	Episomal oder integriert Zugewinn	Abschätzung des Progressionsrisikos?
Neuroblastom	2p24.1 (N-MYC)	Amplifikation	Schlechtere Prognose, aggressivere Therapie
Multiples Myelom	13q14 (RB)	Deletion	Schlechtere Prognose
Oligodendrogliom	1p/19q	Deletion	Prädiktiver Marker für Ansprechen auf Chemotherapie, bessere Prognose

Translokationen bei Lymphomen und Sarkomen sind nicht berücksichtigt.

Tab. 2 Mehrfachproben-FISH-Test für die gynäkologische Vorsorgezytologie: Resultate einer Pilotstudie

Fall	Zytologie	Mehrfachproben-FISH-Test		
		HPV Anzahl positiver Zellen	Integration in das Genom	TERC/MYC Polysomie
1	LSIL	2	Nein	Nein
2	LSIL	19	Ja	Ja
3	LSIL	25	Ja	Nein
4	HSIL	1	Ja	Ja
5	HSIL	18	Ja	Ja
6	HSIL	25	Nein	Nein

FISH Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, HPV humanes Papillomavirus, LSIL „low grade squamous intraepithelial lesion“, HSIL „high grade squamous intraepithelial lesion“

Harnblasenspülflüssigkeit mit einer heterozygoten 9p21-Deletion. Ganz unabhängig vom zytologischen Befund handelt es sich hier zweifellos um eine klonale Population von Tumorzellen.

Ein Beispiel einer Tumorzelle mit multiplen Aberrationen ist in **Abb. 3 a, b** dargestellt. Bei den gefährlichen invasiven pT1-bis -4-Karzinomen erreicht der Test eine Sensitivität von 90–100% bei einer Spezifität von über 95% [2, 4, 9]. Bei den nied-

rigmalignen (pTaG1/G2) Tumoren verbessert FISH die Sensitivität der Zytologie von etwa 25 auf 60–75%. In der Nachsorge erlaubt diese FISH-Untersuchung eine Aussage über das Rezidivrisiko von Urotheltumoren, sodass sich zystoskopische Nachsorgeuntersuchungen individuell besser planen und bei Patienten mit geringem Risiko auch einsparen lassen [28, 29]. Den größten Nutzen bietet FISH unserer Erfahrung nach bei unklaren zytologischen

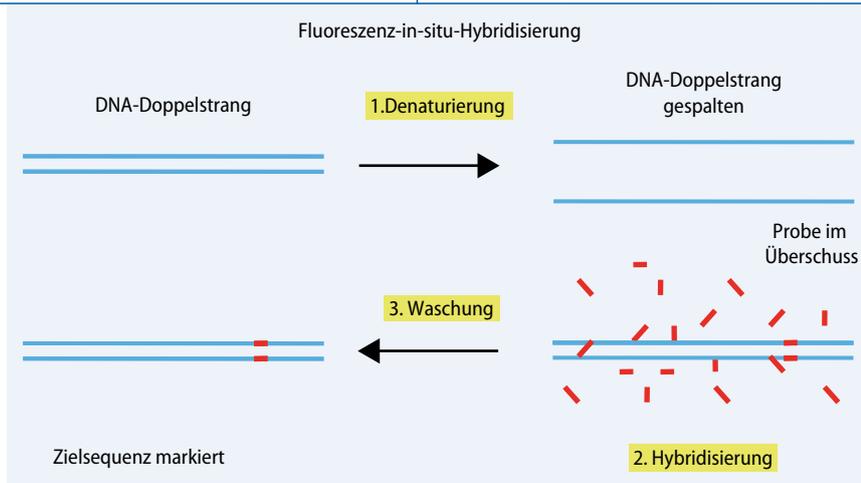


Abb. 1 ▲ Technischer Ablauf der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Urotheltypen, die sich mittels FISH meist klären lassen [8]. Bei einem eindeutig positiven Zytologiebefund ist FISH dagegen weitgehend überflüssig, da ohnehin mit einem positiven Resultat zu rechnen ist und die Diagnose eines High-grade-Urothelkarzinoms rein morphologisch sicher gestellt werden kann.

Bei der FISH-Auswertung urozytologischer Präparate muss beachtet werden, dass nicht jede chromosomale Aberration einer Neoplasie gleichzusetzen ist. Ein tetraploides Muster mit jeweils 4 Kopien pro Sonde hat nicht dieselbe diagnostische Bedeutung wie unbalancierte Polysomien oder eine 9p21-Deletionen. Tetraploide Zellen kommen gelegentlich auch in reaktiv veränderten Urothelien vor und liefern bei entsprechendem zytologischem Korrelat keinen Hinweis auf eine urotheliale Neoplasie.

Eine Strahlentherapie führt im bestrahlten Bereich zur dauerhaften Aneuploidie. Bei vorausgegangener Bestrahlung im kleinen Becken, z. B. wegen eines Prostata- oder Zermixkarzinoms, lässt sich ein positives FISH-Resultat deshalb nicht eindeutig verwerten.

Trotz der überzeugenden Daten in der Literatur und der guten Erfahrungen in der Alltagsdiagnostik wird der relative Stellenwert der FISH im Vergleich zur zytologischen Untersuchung sowohl von Urologen als auch von Zytologen z. T. noch kontrovers diskutiert [15, 16]. Wir halten es für entscheidend, dass diese FISH-Untersuchung schon aus Kostengründen nicht unbesehen, sondern gut indiziert und unter Berücksichtigung des Zytologiebefundes

angewendet wird. Entsprechende diagnostische Algorithmen mit Auswirkung auf die Verlaufsuntersuchungen und die Therapie von Patienten mit einer urothelien Neoplasie müssen zusammen mit den Urologen entwickelt werden.

Mehrfach-FISH zur Diagnose maligner Mesotheliome

Mittels immunzytochemischer Markerprofile lassen sich Karzinomzellen von mesothelialen Zellen gut unterscheiden. Zuverlässige Marker für die sichere Abgrenzung zwischen Mesotheliomzellen und reaktiven Mesothelien fehlen aber. Die affirmative Diagnose eines Mesothelioms wird an Ergüssen deshalb nur selten gestellt. Maligne Mesotheliome zeigen häufig eine Deletion von 9p21 sowie eine Trisomie oder eine Polysomie von Chromosom 7 ([13, 23]; ▣ Abb. 4 a–c). Diese Veränderungen wurden in normalen oder reaktiv veränderten Mesothelien bisher nicht beobachtet. Beide Aberrationen, lassen sich mit dem bereits oben genannten FISH-Test (UroVysion, Abbott/Vysis Inc., Downer’s Grove) gleichzeitig nachweisen. Nach eigenen bisherigen Erfahrungen können Mesotheliome mittels dieses FISH-Tests am zytologischen Präparat zuverlässig diagnostiziert werden.

Mehrfach-FISH an lungenzytologischen Präparaten

Analog zum Mehrfach-FISH-Test am Urin lässt sich die Probenkombination für die Chromosomen 5p15, 6, 7p12 und 8q24 (LA

Vysion, Abbott/Vysis Inc., Downer’s Grove) für eine verbesserte Diagnostik in lungenzytologischen Präparaten verwenden. In peripheren, nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen kann die FISH die Sensitivität der Bürstenzytologie deutlich von 49–51% auf 71–79% erhöhen [6, 10]. Allerdings ist die Sensitivität in einer solchen Situation nach wie vor unbefriedigend, zumal der Zugewinn mit einem Spezifitätsverlust von 100% auf 83–87% erkauft wird.

Die interessanteste diagnostische FISH-Anwendung in der Lungenzytologie liegt in der Abklärung unklarer Lungenzytologien [20]. Beim Fehlen chromosomaler Aberrationen handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit lediglich um regenerativ veränderte Epithelien und nicht um Karzinomzellen, sodass je nach klinischer Gesamtsituation eine abwartende Haltung mit Nachkontrolle vertretbar ist. Im Falle von chromosomalen Aberrationen sollte hingegen ohne Zeitverlust eine morphologische Diagnose erzwungen werden (▣ Abb. 5 a–c).

Translokationsnachweis in der Lymphom- und Sarkomdiagnostik

Translokationen sind ein wichtiger zytogenetischer Mechanismus für die Entstehung von Lymphomen und Sarkomen. Dabei verlagern sich Gene oder Teile von (Onko-)Genen nach Chromosomenbrüchen in die unmittelbare Nähe eines anderen Gens auf einem anderen Chromosom. Dadurch kommt es zur Aktivierung und Überexpression des translozierten (Onko-)Gens oder zur Bildung eines neuen Fusionsgens. Der Nachweis von Translokationen wird für die Diagnose und genaue Klassifikation von Lymphomen genutzt [24]. Ein klassisches Beispiel ist die Translokation des *BCL2*-Gens von Chromosom 14 hin zum konstitutionell aktiven *IgH*-Gen auf Chromosom 18, was zu einer Überexpression von *BCL2* führt. Eine solche $t(14;18)(q24;q32)$ findet sich in etwa 80% der folliculären Lymphome.

Wegen ihrer höheren Sensitivität hat FISH die Polymerasekettenreaktion (PCR) für den Translokationsnachweis vielerorts ersetzt. Für den Translokationsnachweis reicht meist eine einfach auswertbare „Splitprobe“ („Break-apart-Probe“; [25]). Bei einer Translokation bricht

die mit 2 Fluoreszenzfarben markierte Genprobe auseinander, sodass neben einem normalen doppelfarbigen Signal, 2 Signale in den beiden Einzelfarben entstehen (■ **Abb. 6 a, b**). Die Identifikation des Partnergens der Translokation ist oft zweitrangig, kann bei Bedarf aber durch Fusionsproben erreicht werden.

Die Möglichkeit, spezifische Translokationen mittel FISH an zytologischen Präparaten nachzuweisen, stellt einen diagnostischen Quantensprung für die zytologische Lymphomdiagnostik dar. Translokationen sind allerdings nicht absolut spezifisch für bestimmte Lymphomtypen und kommen nicht bei allen Lymphomen vor [24]. Die Zytologie kann eine histologische Aufarbeitung deshalb nach wie vor nur in Ausnahmefällen ersetzen. Spezifische Translokationen bei Sarkomen sind in einem anderen Beitrag dieses Heftes beschrieben.

HER2-Amplifikation beim Mammakarzinom

Eine Amplifikation von *HER2* auf 17q11 findet sich in 20–25% der Mammakarzinome und ist mit einer ungünstigen Prognose assoziiert, lässt sich aber therapeutisch nutzen (■ **Abb. 7**). Mammakarzinome mit einer *HER2*-Amplifikation sprechen im Gegensatz zu solchen ohne *HER2*-Amplifikation oft auf eine spezifische Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) an, der direkt gegen das *HER2*-Protein gerichtet ist [19, 27]. Die Bestimmung des *HER2*-Status ist deshalb bei allen Patientinnen mit einem Mammakarzinom zum Standard geworden. Da die FISH-Untersuchung zuverlässiger als die immunzytochemische Erfassung der Proteinexpression ist und kein standardisierter immunzytochemischer Test für zytologische Präparate zur Verfügung steht, sollte der *HER2*-Status in der Zytologie mittels FISH bestimmt werden [18].

Gynäkologische Vorsorgezytologie

Dyplasien und Karzinome der Zervix zeigen häufig Polysomien und chromosomenspezifische Veränderungen. Von besonderer Bedeutung sind *MYC* auf 8q24 und *TERC* auf 3q26. Die Prävalenz ei-

Zusammenfassung · Abstract

Pathologe 2007 · 28:384–392 DOI 10.1007/s00292-007-0930-x
© Springer Medizin Verlag 2007

S. Savic · L. Bubendorf

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung. Eine neue diagnostische Dimension in der Zytologie

Zusammenfassung

Der Nachweis chromosomaler Veränderungen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) kann die diagnostische Aussagekraft in der Zytologie markant verbessern. Nahezu jedes zytologische Präparat kann unabhängig von Entnahmearart, Fixation und Färbung mittels FISH untersucht werden. FISH verbessert die Sensitivität der Urothel- und Lungenkarzinomdiagnostik und eignet sich besonders zur Abklärung unklarer Atypien. Sie erlaubt eine zuverlässige Unterscheidung maligner von reaktiv veränderten Mesothelien. Spezifische Translokationen für die Diagnose gewisser Lymphome und Sar-

kome sind mittels FISH einfach nachweisbar. Die Untersuchung auf eine *HER2*-Amplifikation ist bei Mammakarzinomen zum Standard geworden. Die simultane FISH-Untersuchung von humanen Papillomaviren (HPV) und ausgewählter Gene könnte sich in der gynäkologischen Vorsorgezytologie als nützlich erweisen. Das Spektrum klinisch relevanter Anwendungen dieser Methode wird sich auch in Zukunft kontinuierlich erweitern.

Schlüsselwörter

Zytologie · Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) · Unklare Atypien · Tumordiagnostik

Fluorescence in situ hybridization. A new diagnostic dimension in cytology

Abstract

Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a powerful method for the identification of chromosomal aberrations to improve the diagnostic performance of cytology. FISH is applicable to almost any type of cytological specimen irrespective of cell type, staining or fixation modality. Multi-target tests for the simultaneous analysis of four chromosomes or chromosomal loci improves the sensitivity of cytological diagnosis in bladder and lung cancer and is most helpful in equivocal cytology. FISH also allows a reliable distinction between malignant mesothelioma and reactive mesothelial cells. Specific translocations can

easily be detected by FISH for precise diagnosis of lymphomas and sarcomas. Testing for *HER-2* amplification has become a standard method to select patients with breast cancer for therapy with trastuzumab. Co-analysis of HPV and selected genes could become a useful approach in gynecological cytology. The spectrum of diagnostic FISH applications is continuously growing.

Keywords

Cytology · Fluorescence in situ hybridization · Equivocal cytology · Tumor diagnosis

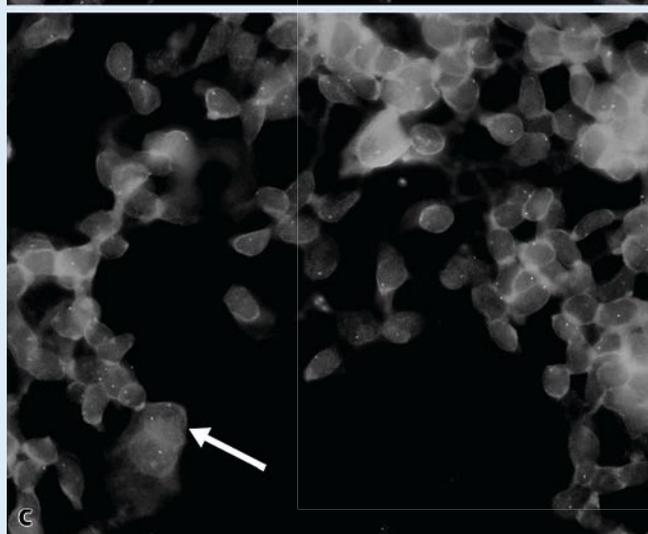
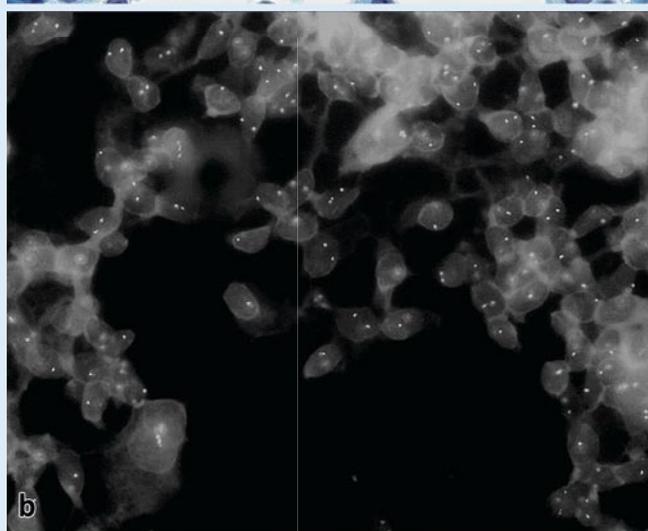
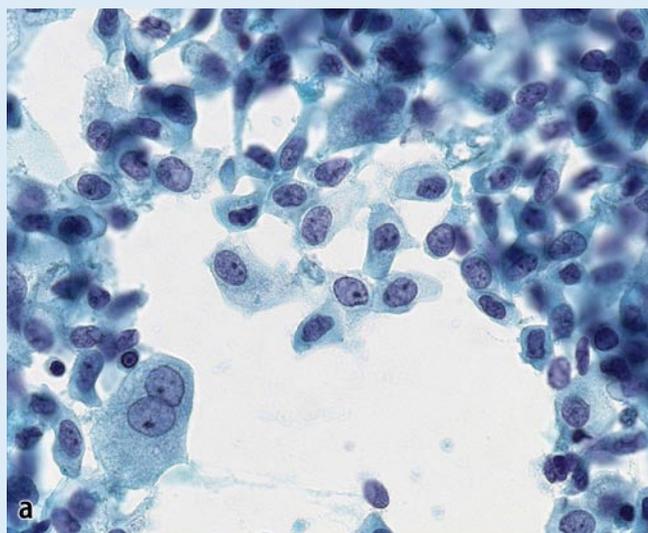


Abb. 2 ▲ **a** Urothelien mit geringen Atypien (Harnblasenspülflüssigkeit; Papanicolaou-Färbung, Vergr. 430:1). Die FISH zeigt einen heterozygoten Verlust der chromosomalen Region 9p21, bei einer normalen Anzahl von Signalen für die Chromosomen 3, 7 und 17: **b** 2 Signale pro Zellkern für das Chromosom 7. **c** Heterozygoter Verlust der chromosomalen Region 9p21 mit jeweils nur einem Signal pro Sonde und Zellkern. Die doppelkernige Superficialzelle zeigt eine normale Anzahl mit 2 Signalen (Pfeil)

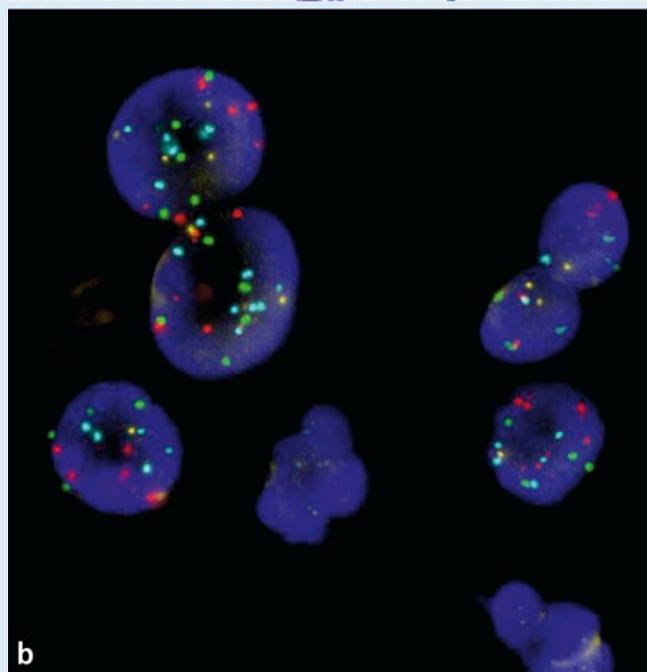
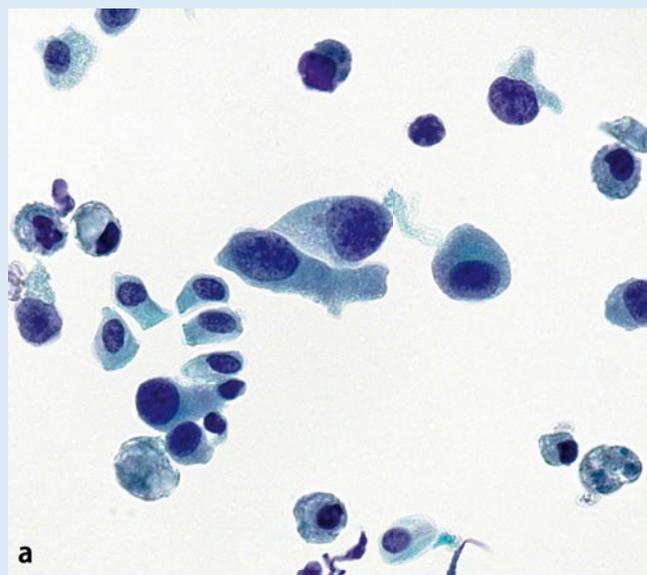
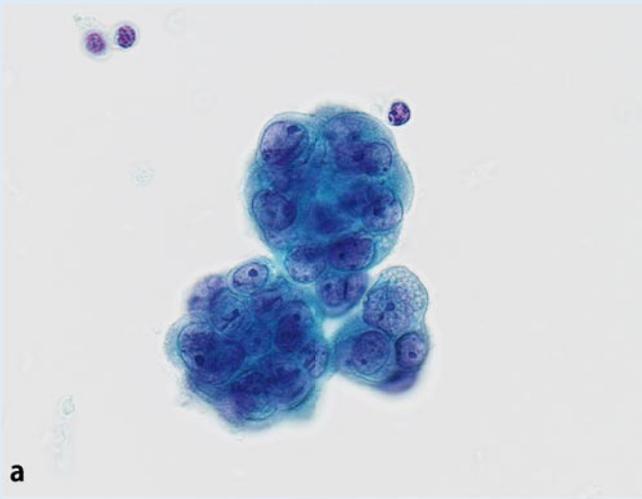
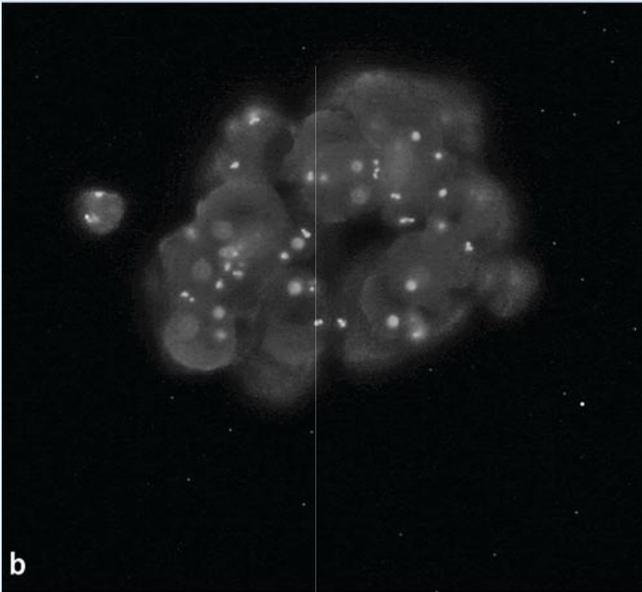


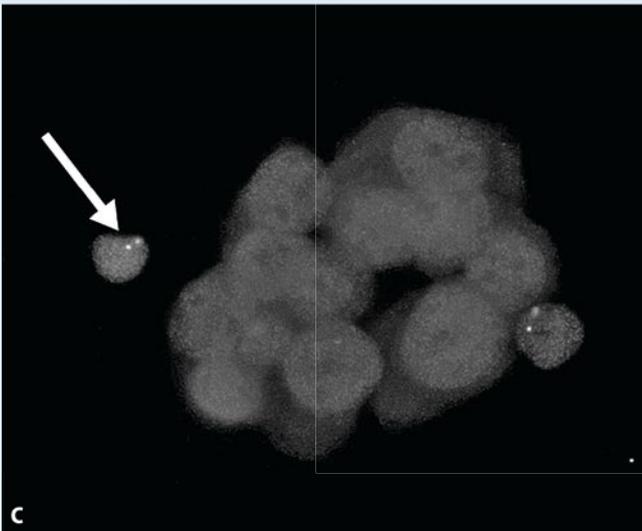
Abb. 3 ▲ **a** Zellen eines urothelialen Carcinoma in situ (Harnblasenspülflüssigkeit; Papanicolaou-Färbung, Vergr. 430:1). Die FISH zeigt multiple chromosomale Abberationen: **b** Bis zu 6 Signale pro Sonde und Zellkern für das Chromosom 3 (rot), 5 für das Chromosom 7 (grün) und 7 für das Chromosom 17 (blau). Gleichzeitig zeigt sich ein relativer Verlust für die chromosomale Region 9p21 (gelb) mit 2 oder weniger Signalen pro Zellkern



a

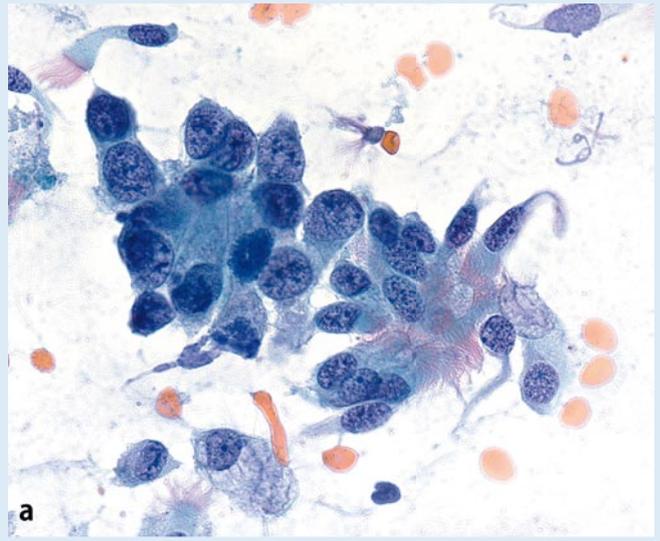


b

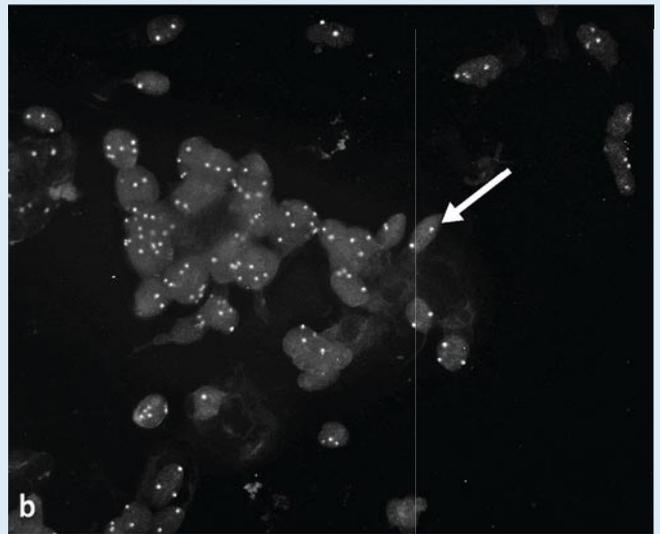


c

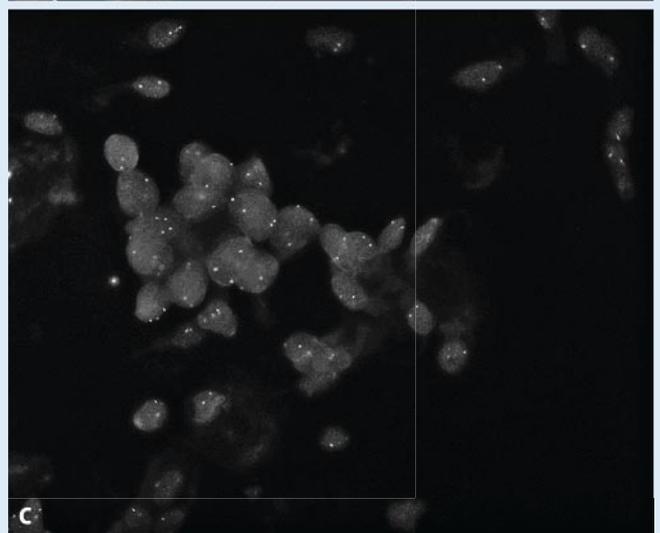
Abb. 4 ▲ **a** Pleuraerguss mit atypischen, kugeligen mesothelialen Zellverbänden (Papanicolaou-Färbung, Vergr. 430:1). Die FISH zeigt einen kompletten Verlust der chromosomalen Region 9p21 bei einer normalen Anzahl Signale für die Chromosomen 3, 7 und 17: **b** Normaler Befund für Chromosom 7 mit 2 Signalen pro Zellkern. **c** Homozygote Deletion von 9p21. Lymphozytenkern mit 2 Signalen als interne Kontrolle (*Pfeil*)



a



b



c

Abb. 5 ▲ **a** Bronchialsekret mit einigen atypischen Epithelien neben unauffälligen Flimmerepithelien (Papanicolaou-Färbung, Vergr. 430:1). Die FISH mit 4 fluoreszenzmarkierten Sonden (Chromosom 6, *EGFR*-Gen, 5p15 und *MYC*-Gen) zeigt multiple chromosomale Aberrationen: **b** Sonde für das *EGFR*-Gens (7p12) mit bis zu 8 Signalen pro Zellkern (*Pfeil*), **c** Sonde für das *MYC*-Gen mit bis zu 4 Signalen pro Zellkern. Flimmerepithelien mit normaler Anzahl Gene

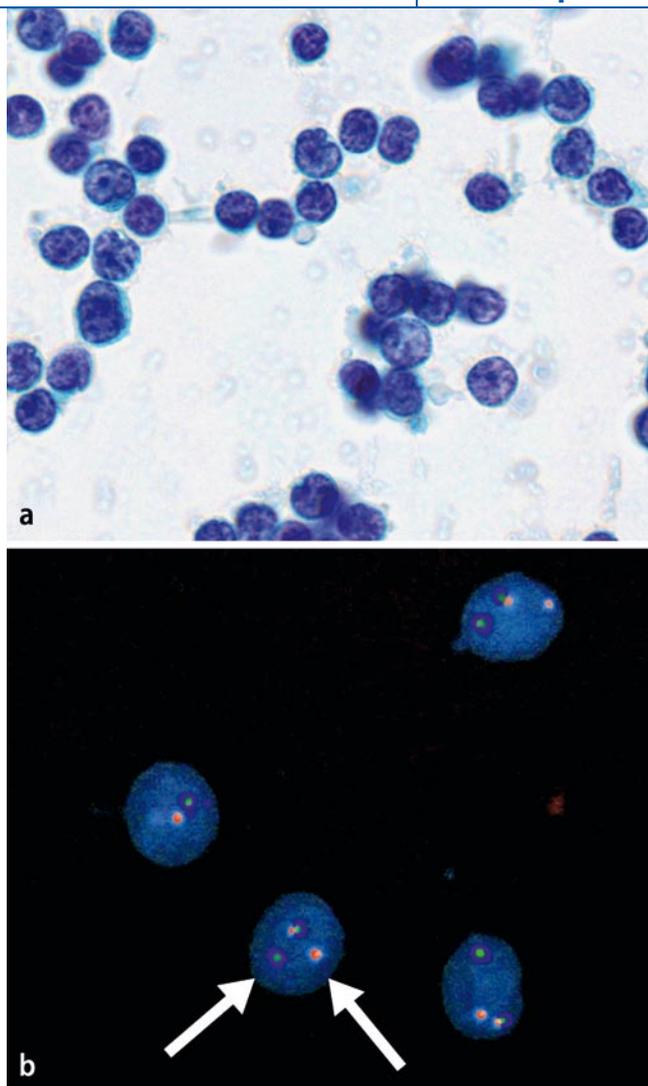


Abb. 6 ◀ **a** Zellen eines Mantelzellymphoms (Frischgewebsausstrich eines Lymphknotens; Papaniolaou-Färbung, Vergr. 430:1). **b** Die FISH mit der Break-apart-rearrangement-Probe t(11;14) (IgH/Cyclin D1) zeigt ein normales doppeltes Signal und jeweils ein Einzelsignal für das IgH (grün) und das Cyclin D1 (orange) als Zeichen einer Translokation (Pfeile)

ner erhöhten Genkopiezahl dieser 2 Gene nimmt mit zunehmendem Schweregrad der Dysplasie bis hin zum invasiven Karzinom zu [11, 30]. Die Integration von viraler DNS ist ein biologisches Schlüsselereignis für die Progression von zervikalen Neoplasien, da sie u. a. die Entstehung von chromosomalen Aberrationen begünstigt [12].

Vor kurzem wurde ein FISH-Test mit Sonden gegen High-risk-humane-Papillomaviren-(HPV)-DNS, *MYC* und *TERC* entwickelt (Abbott/Vysis). Mit diesem Sondenscocktail lassen sich HPV-positive Zellen identifizieren, der HPV-Integrationsstatus in das Genom und gleichzeitig auch die Genkopien von *TERC* und *MYC* in diesen Zellen bestimmen (■ **Abb. 8 a-d**). Diese molekulargenetischen Informationen könnten eine bessere Vorhersage des Progressionsrisikos bei individu-

ellen Patientinnen ermöglichen. Zellen mit HPV-Integration (punktförmige Signale) bei gleichzeitig erhöhter Genkopiezahl von *TERC* und/oder *MYC* sind wahrscheinlich gefährlich und somit therapiebedürftig. Bei fehlender HPV-Integration (diffuse Signale) und unverändertem *TERC*/*MYC* liegt wahrscheinlich eine ungefährliche Läsion vor. Diese Hypothese muss allerdings noch in Studien bestätigt werden. Die Resultate unserer Pilotuntersuchung an Dünnschichtpräparaten sind in ■ **Tab. 2** dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die „gefährliche“ HPV-Integration in Form von punktförmigen Signalen und die Genvermehrungen sowohl bei LSIL („low grade squamous intraepithelial lesion“) als auch bei HSIL („high grade squamous intraepithelial lesion“) vorkommt.

Weitere FISH-Applikationen in der Zytologie

Das Ansprechen von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen auf eine zielgerichtete Therapie mit Tyrosinkinasehemmern gegen den „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) ist mit Veränderungen des *EGFR*-Gens assoziiert [22]. Der Nachweis von *EGFR*-Mutationen gilt dabei als wichtiger prädiktiver Marker. Außerdem wurde gezeigt, dass auch eine „hohe Polysomie“ oder eine Amplifikation des *EGFR*-Gens einen prädiktiven Wert besitzt. Die relative Bedeutung dieser beiden Veränderungen wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Es ist aber denkbar, dass die Untersuchung der *EGFR*-Gen-Kopiezahl bei gewissen nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen im Rahmen der Therapieplanung künftig gefordert wird. Als Kriterien für ein positives FISH-Resultat gilt gegenwärtig der Nachweis einer sogenannten „hohen Polysomie“ (≥ 4 Gensignale in $\geq 40\%$ der Tumorzellen) oder einer Amplifikation (≥ 2 -mal mehr Gensignale als Chromosomensignale oder ≥ 15 Gensignale in $\geq 10\%$ der untersuchten Tumorzellen; [7]).

Diese Kriterien wurden jedoch an histologischen Präparaten aus Therapiestudien etabliert. Nach eigenen noch unveröffentlichten Untersuchungen können diese Kriterien nicht unbesehen auf zytologische Präparate übertragen werden. Die Zellkerne in zytologischen Präparaten sind intakt und enthalten immer alle Genkopien, während ein Teil der Zellkerne und Gene am histologischen Präparat weggeschnitten ist. Der Anteil von „hoher Polysomie“ ist in zytologischen Präparaten deshalb naturgemäß deutlich höher als in entsprechenden Gewebeschnitten, was im Vergleich zu den histologischen Präparaten zu falsch-positiven Resultaten führt.

Bei High-grade-Gliomen und vor allem Oligodendrogliomen spricht eine 1p- und 19q-Deletionen für ein gutes Ansprechen auf Chemotherapie und für ein verlängertes Patientenüberleben [14]. Diese Veränderung lässt sich bevorzugt mittels FISH auf zytologischen Abklatschpräparaten nachweisen [21].

Eine wichtige Rolle könnte künftig die Kombination von FISH und Zytolo-

gie auch in der Nachkontrolle von Patienten mit einem Barrett-Ösophagus spielen, wo eine sichere Unterscheidung zwischen Dysplasie und reaktiven Zellveränderungen sowohl histologisch als auch zytologisch oftmals schwierig ist [3].

Fazit für die Praxis

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine technisch ausgereifte Methode zur Analyse chromosomaler Aberrationen. Die Technik eignet sich hervorragend für den Einsatz in der Zytologie, wo sie sich in verschiedenen Bereichen als wichtiges Hilfsmittel für verbesserte Diagnostik, individuelle Vorhersage der Prognose und Therapieplanung einsetzen lässt. Die FISH-Untersuchung ist vor allem dort diagnostisch gewinnbringend, wo sie unter Kenntnis und Berücksichtigung der konventionellen Zytologie angewandt wird. FISH ermöglicht eine direkte Korrelation zwischen zytomorphologischen und molekularzytologischen Veränderungen, was eine einzigartige Methode der Qualitätskontrolle darstellt. Angesichts der rasch wachsenden molekularen Erkenntnisse wird die Bedeutung chromosomaler Analysen an klinisch-zytologischem Material weiter zunehmen und kontinuierlich zu neuen, klinisch relevanten FISH-Anwendungen führen.

Korrespondenzadresse

Dr. S. Savic

Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel
Schönbeinstraße 40, 4003 Basel
Schweiz
spasavic@yahoo.com

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor weist auf folgende Beziehungen hin: L. Bubendorf erhielt finanzielle Forschungsunterstützung durch die Firma Abbott/Vysis und ist als Referent für diese Firma tätig.

Literatur

1. Albertson DG, Collins C, McCormick F et al. (2003) Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 34: 369–376
2. Arentsen HC, Rosette JJ de la, Reijke TM de et al. (2007) Fluorescence in situ hybridization: a multi-target approach in diagnosis and management of urothelial cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 7: 11–19
3. Brankley SM, Wang KK, Harwood AR et al. (2006) The development of a fluorescence in situ hybridization assay for the detection of dysplasia and adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *J Mol Diagn* 8: 260–267
4. Bubendorf L, Grilli B, Sauter G et al. (2001) Multiprobe FISH for enhanced detection of bladder cancer in voided urine specimens and bladder washings. *Am J Clin Pathol* 116: 79–86
5. Bubendorf L, Grilli B (2004) UroVysion multiprobe FISH in urinary cytology. *Methods Mol Med* 97: 117–131
6. Bubendorf L, Muller P, Joos L et al. (2005) Multitarget FISH analysis in the diagnosis of lung cancer. *Am J Clin Pathol* 123: 516–523
7. 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
8. Glatz K, Willi N, Glatz D et al. (2006) An international telecytologic quiz on urinary cytology reveals educational deficits and absence of a commonly used classification system. *Am J Clin Pathol* 126: 294–301

Abb. 7 ▶ HER2-amplifizierte Zellen eines Mammakarzinoms (Pleuraerguss). Wolkige HER2-Amplifikation (rot) und bis zu 4 Referenzsignale (Chromosom 17)

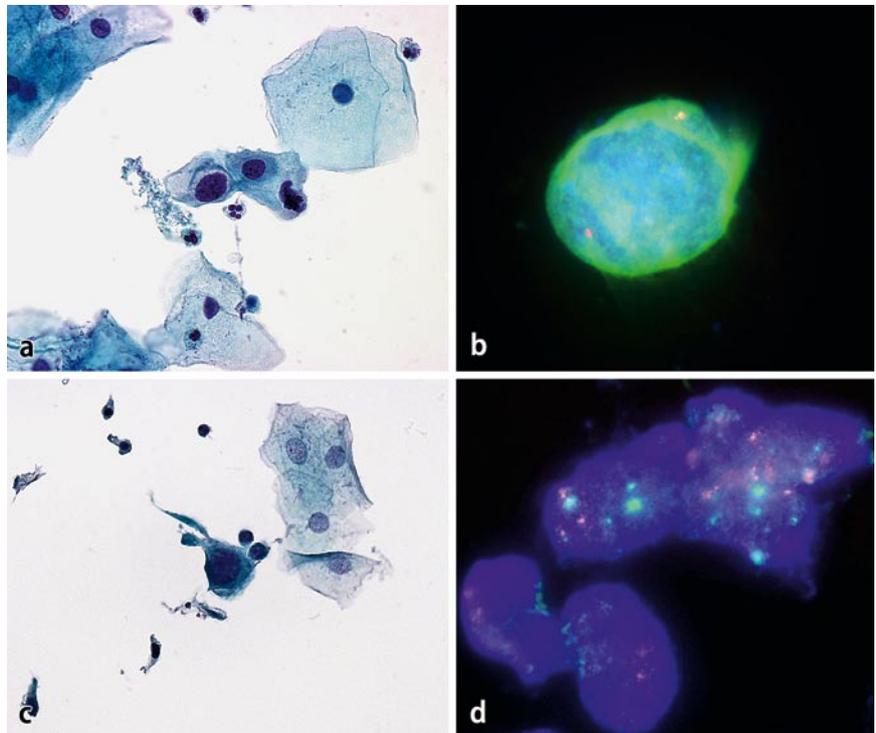
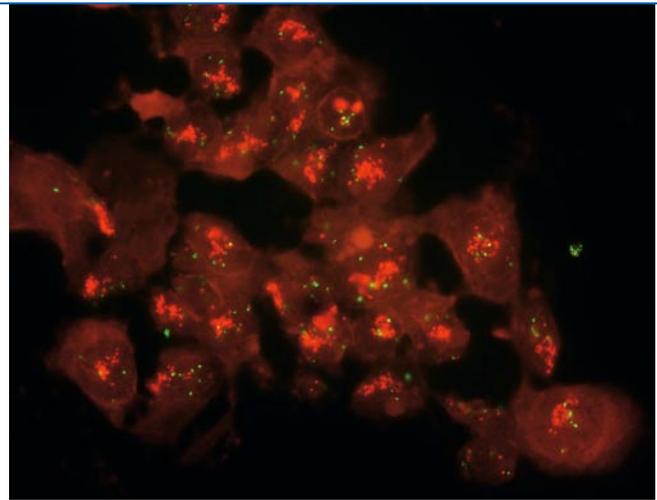


Abb. 8 ▲ a Portioabstrich mit Plattenepithelien einer LSIL (Flüssigkeitszytologie; Papanicolaou-Färbung, Vergr. 430:1). FISH mit Sonden gegen High-risk-HPV-DNS, das MYC- (8q24) und das TERC-Gen (3q26): b punktförmige Signale für die HPV-Sonde (grün) bei HPV-DNS-Integration in das Genom der Zelle. Zusätzlich Zugewinn des MYC-Gens (orange) mit 3 Signalen pro Zellkern. c Portioabstrich mit Plattenepithelien einer HSIL (Flüssigkeitszytologie; Papanicolaou-Färbung, Vergr. 430:1). d Diffuses Signal für die HPV-DNS-Sonde (grün) bei episomaler HPV-DNS ohne Integration in das Genom der Zelle. MYC-Gen (orange) mit 2 Signalen pro Zellkern

9. Halling KC, King W, Sokolova IA et al. (2000) A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *J Urol* 164: 1768–1775
10. Halling KC, Rickman OB, Kipp BR et al. (2006) A comparison of cytology and fluorescence in situ hybridization for the detection of lung cancer in bronchoscopic specimens. *Chest* 130: 694–701
11. Heselmeyer-Haddad K, Janz V, Castle PE et al. (2003) Detection of genomic amplification of the human telomerase gene (TERC) in cytologic specimens as a genetic test for the diagnosis of cervical dysplasia. *Am J Pathol* 163: 1405–1416
12. Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PP et al., (2006) Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer. *J Pathol* 210: 412–419
13. Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF et al. (2003) Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin Cancer Res* 9: 2108–2113
14. Jaeckle KA, Ballman KV, Rao RD et al. (2006) Current strategies in treatment of oligodendroglioma: evolution of molecular signatures of response. *J Clin Oncol* 24: 1246–1252
15. Murphy WM (2006) What's the trouble with cytology? *J Urol* 176: 2343–2346
16. Nieder AM, Soloway MS, Herr HW (2007) Should We Abandon the FISH Test? *Eur Urol* 51: 1469–1471
17. Oliveira AM, French CA (2005) Applications of fluorescence in situ hybridization in cytopathology: a review. *Acta Cytol* 49: 587–594
18. Press MF, Sauter G, Bernstein L et al. (2005) Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. *Clin Cancer Res* 11: 6598–6607
19. Romond EH, Perez EA, Bryant J et al. (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353: 1673–1684
20. Savic S, Glatz K, Schoenegg R et al. (2006) Multi-target fluorescence in situ hybridization elucidates equivocal lung cytology. *Chest* 129: 1629–1635
21. Scheie D, Andresen PA, Cvancarova M et al. (2006) Fluorescence in situ hybridization (FISH) on touch preparations: a reliable method for detecting loss of heterozygosity at 1p and 19q in oligodendroglial tumors. *Am J Surg Pathol* 30: 828–837
22. Sequist LV, Bell DW, Lynch TJ et al. (2007) Molecular predictors of response to epidermal growth factor receptor antagonists in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 25: 587–595
23. Shin HJ, Shin DM, Tarco E et al. (2003) Detection of numerical aberrations of chromosomes 7 and 9 in cytologic specimens of pleural malignant mesothelioma. *Cancer* 99: 233–239
24. Tinguely M, Frigerio S (2006) Assessment of translocations in routine diagnostics of a surgical pathology unit. *Ther Umsch* 63: 279–285
25. van Dongen JJ, Burg M van der, Langerak AW (2005) Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations. *Hematology (Suppl 1)* 10: 66–72
26. Werner M, Wilkens L, Aubele M et al. (1997) Interphase cytogenetics in pathology: principles, methods, and applications of fluorescence in situ hybridization (FISH). *Histochem Cell Biol* 108: 381–390
27. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN et al. (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
28. Yoder BJ, Skacel M, Hedgepeth R et al. (2007) Reflex UroVysion testing of bladder cancer surveillance patients with equivocal or negative urine cytology: a prospective study with focus on the natural history of anticipatory positive findings. *Am J Clin Pathol* 127: 295–301
29. Zellweger T, Benz G, Cathomas G et al. (2006) Multi-target fluorescence in situ hybridization in bladder washings for prediction of recurrent bladder cancer. *Int J Cancer* 119: 1660–1665
30. Zhang A, Maner S, Betz R et al. (2002) Genetic alterations in cervical carcinomas: frequent low-level amplifications of oncogenes are associated with human papillomavirus infection. *Int J Cancer* 101: 427–433

Zwischenzustand von Ras entdeckt

Das Ras-Protein spielt eine zentrale Rolle beim Zellwachstum. Mutiert Ras in eine onkogene Form, führt das zu ungebremstem Zellwachstum. Am Lehrstuhl für Biophysik der Ruhr-Universität Bochum ist es nun gelungen, mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie einen Zustand zu identifizieren, in dem Ras auf abnormes Wachstum ausgerichtet ist, aber noch keine Wachstumssignale weitergeleitet werden. Dieses Zeitfenster von 200 Millisekunden wollen sich die Forscher nun zunutze machen, um molekulare Tumorthérapien zu entwickeln. Ein schnelles Screening soll zukünftig prüfen, ob ein Wirkstoff in der Lage ist, diesen Zwischenzustand der Ras-Proteine zu stabilisieren und so die unkontrollierte Signalweiterleitung zu stoppen.

Originalpublikation: Kötting C, Gerwert K, Kallenbach A, et al. (2007) Surface Change of Ras Enabling Effector Binding Monitored in Real Time at Atomic Resolution. *ChemBioChem* 8 (7): 781–787

Quelle: Ruhr-Universität Bochum,
www.bph.rub.de