

Metoda RNAscope® pro analýzu exprese HER2 ve vzorcích karcinomů mléčné žlázy s neprokázanou amplifikací

Markéta Kolečková¹, Gabriela Kořínková¹, Vladimíra Koudeláková², Jana Potočková², Barbora Šopíková¹, Marián Hajdúch², Zdeněk Kolář¹

¹Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

²Ústav molekulární a translační medicíny LF UP Olomouc

Pokud je u pacientek s invazivním karcinomem prsu prokázána nadměrná exprese transmembránového proteinu HER2/c-erbB2/neu (dále jen HER2) nebo amplifikace jeho genu, je indikována cílená léčba humanizovanou monoklonální protilátkou trastuzumab (Herceptin™). Nově se ve světě začíná testovat metoda detekce mRNA proteinu HER2, založená na RNA in situ hybridizaci (RNAscope®). Metoda by mohla přispět ke zpřesnění diagnostiky zejména v situacích, kdy obě standardní metody vedou k hraničně pozitivním výsledkům nebo jsou tyto výsledky diskrepantní. Cílem naší práce byla optimalizace RNAscope® metody a její otestování na souboru tkáňových vzorků s diskrepantními výsledky (nadměrná exprese proteinu HER2, neprokázaná amplifikace genu HER2). Do pilotní studie bylo dosud zařazeno celkem 10 případů. U většiny z nich byla nalezena vysoká pozitivita signálu HER2 mRNA korelující s nadměrnou expresí proteinu HER2. Metoda RNAscope® by mohla být do budoucna dobrým pomocníkem. Je vysoce senzitivní a specifická, navíc oproti fluorescenční in situ hybridizaci (FISH) hodnotitelná běžným světelným mikroskopem, kde lze celkovou pozitivitu signálu hodnotit v kontextu morfologie konkrétního preparátu. Nevýhodou metody je zatím vysoká časová a finanční náročnost. Dalším cílem byla analýza frekvence výskytu nehodnotitelných vzorků z důvodů nedostatečné hybridizace v souboru 545 karcinomů prsu vyšetřených v naší laboratoři v roce 2011. Celkový podíl nevyhodnotitelných vzorků vyšetřovaných v naší laboratoři (1,3 %) odpovídá údajům uváděným v literatuře. HercepTest™ nebylo možné vyhodnotit v 1,7 % případů, FISH v 16 % případů.

Klíčová slova: karcinom prsu, HER2 mRNA, RNAscope®.

RNAscope® method for analysis of HER2 expression in the samples of breast cancer without amplification

The patients with invasive breast cancer are indicated for the targeted therapy by human monoclonal antibody trastuzumab (Herceptin™) only when there is an evidence of overexpression or amplification of the transmembrane HER2/c-erbB2/neu (HER2) protein or gene. Currently, detection of the HER2 mRNA using RNA in situ hybridization (RNAscope®) is being introduced. The method could be especially useful for increasing the diagnosis accuracy in the cases where both standard methods lead to border positive or discrepant results. Our study was aimed at optimizing the RNAscope® method in practice and testing it on the set of patients' samples with discrepant results (overexpression of HER2 protein, unproved amplification of the HER2 gene). The pilot study was concluded with 10 samples up to now. In majority of these samples we found high positivity of HER2 mRNA signal correlating with overexpression of HER2 protein. In future, RNAscope® could be very useful in a routine laboratory practice. The method is highly sensitive and specific and in comparison to fluorescent in situ hybridization (FISH) it can be assessed using common light microscope, where the whole positivity is evaluated in the context of the morphology of the sample. Disadvantages of this method are higher time and cost. The presented study had a second aim to analyze the HER2 overall non-assessability rate in 545 patient samples diagnosed in our laboratory in 2011. The overall rate of non-assessable samples was 1.3 % what is in agreement with the data published in the literature. HercepTest™ was impossible to assess in 1.7 % of samples, FISH in 16 %.

Key words: breast cancer, HER2 mRNA, RNAscope®.

Onkologie 2015; 9(5): 245–247

Úvod

Vyšetření nadměrné exprese a amplifikace genu HER2 se stala nedílnou součástí diagnostických a léčebných protokolů u pacientek s karcinomem prsu, u kterých je zvažována cílená léčba protilátkou trastuzumab (Herceptin™). U pacientek s HER2 pozitivními nádory je však cílená léčba anti-HER2 účinná jen u 30 % případů (1, 2). Jednou z možností vysvětlující důvody této diskrepance je nedokonalost laboratorního testování exprese HER2. Mechanismem účinku trastuzumabu je inhibice transmembránového receptoru s tyrosin-kinázovou aktivitou HER2 (3),

který je kódovaný genem HER2 na chromozomu 17. Pacientky jsou indikovány k léčbě trastuzumabem na základě jednoznačné positivity alespoň jednoho ze dvou standardizovaných vyšetření využívajících metodu imunohistochemie (IHC) nebo DNA in situ hybridizace (ISH) (4, 5). Při hodnocení výsledků se někdy setkáváme se situací, kdy pozitivní IHC není provázena pozitivitou ISH. Tato situace bývá obvykle vysvětlována nevhodnou fixací vzorku tkáně, která znehodnotí buněčnou DNA a znemožní tak provedení hybridizačního protokolu. Bývá ovšem i diskutována možnost existence na amplifikaci nezávislé

nadměrné exprese proteinu (6). Naším cílem tedy je analyzovat výskyt takových případů vyšetřovaných v naší laboratoři za určité definované období a pokusit se odpovědět na otázku, zda nepřítomnost amplifikace je způsobena degradací nukleových kyselin například nevhodnou fixací, či zda je u těchto případů možné detegovat transkripci genu na úrovni RNA, a tím potvrdit, že k nadměrné expresi proteinu může docházet i v případě neamplifikovaného genu.

Certifikovaný HercepTest™ (Dako Denmark A/S and F. Hoffmann-La Roche Ltd.) je založen na imunohistochemické detekci exprese

Tabulka 1. Vyšetřené vzorky s diskrepantními profily

	Typ nádoru	HercepTest™	Amplifikace genu	Poměr HER2/Cep17	RNAscope®
Ko.	IDC G2	3+	ANO	7,19	4+
1	IDC G2	3+	NE	1,46	4+
2	IDC G2	3+	NE	1,44	3+
3	IDC G2	2+	NE	1,05	4+
4	IDC G2	2+	NE	1,35	4+
5	IDC G2	2+	NE	1,19	3+
6	IDC G2	2+	NE	1,1	0
7	IDC G2	2+	NE	1,15	2+
8	IDC G2	2+	NE	1,28	3+
9	IDC G3	2+	NE	1,78	3+
10	IDC G1	2+	NE	1,08	4+

IDC – invazivní duktální karcinom; G – grade

Tabulka 2. Nehodnotitelnost vzorků jednotlivými metodami

Celkový počet vyšetřených pacientek	545	
Nehodnotitelný HercepTest™	9	1,7 %
Nehodnotitelná FISH	87	16 %
Z toho současná nehodnotitelnost obou parametrů	7	1,3 %

se HER2 proteinu na formalínem fixovaných a parafínem zalitých tkáních (FFPE). Výsledky se interpretují semikvantitativně na škále 0 až 3+ (za pozitivní výsledek indikovaný k léčbě trastuzumabem je považována jen 3+ pozitivita). Druhou standardní metodou je HER2 DNA in situ hybridizace (fluorescenční FISH, či chromogenní CISH) sloužící k vyhodnocení amplifikace genu HER2. Nově byly publikovány práce popisující využití metody RNA in situ hybridizace pro detekci přítomnosti HER2 mRNA v FFPE vzorcích (7, 8, 9, 10). Metoda RNAscope® využívá speciální patentované párové oligonukleotidové sondy v kombinaci s následnou silnou amplifikací výsledného signálu. Pokusili jsme se proto použít tuto metodu RNAscope® k detekci HER2 mRNA u některých diskrepantních případů s neobvyklými expresními profily (nepřítomná amplifikace a současně 2+ nebo 3+ IHC pozitivita).

Materiál a metodika

Výskyt diskrepantních výsledků

Byly retrospektivně analyzovány výsledky standardizovaných testů amplifikace genu a nadměrné exprese proteinu HER2 v souboru 545 vzorků karcinomu prsu vyšetřených v naší laboratoři v roce 2011 a zaznamenaný nesouhlas mezi interpretací ISH a IHC. Byl vybrán soubor 10 vzorků karcinomu prsu získaných resekci s nepřítomnou amplifikací a současnou pozitivitou HercepTestu 2+ nebo 3+.

RNAscope®

Pro detekci HER2 mRNA byla použita metoda RNAscope® 2.0 vyvinutá firmou Advanced Cell Diagnostics, USA. K vizualizaci buněčné mRNA na FFPE tkáňových řezech o síle 5 µm slouží komerčně dostupné RNAscope® sondy (pozitivní kontrolní POLR2A sonda a negativní dapB kontrolní sonda) a RNAscope® 2.0 Reagent Kit, který zahrnuje soupravu pro předběžné ošetření antigenicity, detekční soupravu a zásobní promývací roztok. Každá součást tohoto produktu obsahuje množství reagens k provedení 20 vyšetření.

Vlastní metoda se skládá ze čtyř kroků. Prvním je příprava tkáňových řezů na hybridizaci, jejich deparafinace, permeabilizace membrán a ošetření tkání proteázou. Druhým krokem této metody je in situ hybridizace RNA po dobu 3 hodin, při teplotě 40° C. Následuje několikakroková amplifikace signálů, při které se na hledanou sekvenci RNA naváže až 8 000 chromogenních molekul. Posledním krokem je zobrazení a vyhodnocení barevného signálu. Výsledné signály HER2 mRNA se vyhodnocují semikvantitativně pod světelným mikroskopem s užitím škály 0 až 4+ (viz www.acdbio.com). Stupeň 0 odpovídá žádnému pozorovatelnému zbarvení při zvětšení 40×. Stupeň 1+ obtížně pozorovatelnému zbarvení u více než 10 % nádorových buněk při zvětšení 40×. Stupně 2 až 4+ pak dobře pozorovatelnému zbarvení u více než 10 % nádorových buněk při zvětšení 40× (stupeň 2), 20× (stupeň 3) a 10× (stupeň 4). Kompletní příprava vzorků v laboratoři trvá cca 10 hodin. Zásadní význam pro interpretaci výsledků má rovněž správná fixace tkání. Formalín, který je skladován déle než 6 měsíců, případně používán opakovaně, může výsledky značně ovlivnit.

Výsledky

Diskrepantní výsledky

V roce 2011 bylo u nás vyšetřeno celkem 545 pacientů. Pouze u 7 pacientů nebyl získán kombinací obou metod žádný výsledek (1,3 %). HercepTest™ nebylo možné vyhodnotit pouze u 9 pacientů (1,7 %). U většiny pacientů bylo důvodem minimální množství tkáně v punkčním vzorku (nereprezentativní vzorky), pouze u dvou vzorků bylo uvedeno poškození tkáně, které pravděpodobně vzniklo při nesprávné fixaci materiálu. Nemožnost vyhodnocení pak byla častěji avizována u metody FISH, celkem 87 vzorků (16 %). Pouze u 1/3 těchto vzorků je jako důvod uvedeno, že materiál je nereprezentativní pro FISH vyšetření. U ostatních vzorků převládá zdůvodnění, že u nich nedochází k hybridizaci, což zřejmě opět souvisí s nesprávnou fixací materiálu (tabulka 2).

Detekce HER2 mRNA

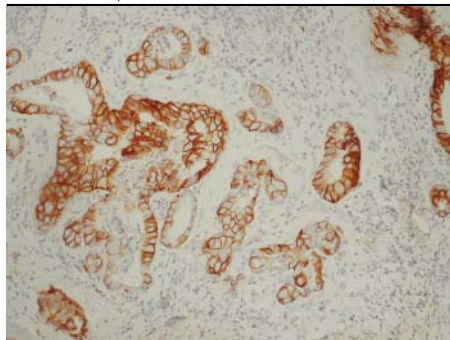
Při kalibraci metody jsme jako pozitivní kontrolu používali vzorky karcinomu prsu se současnou vysokou amplifikací i nadměrnou expresí HER2. Podle pokynů výrobce byla provedena optimalizace kroku ošetření tkání proteázou. Jako optimální se ukázalo použití neředěné proteázy. Oproti doporučenému postupu se však ukázalo vhodnější prodloužit čas hybridizace z původních 2 hodin na 3 hodiny. Při zavádění nového pracovního postupu jsme u dodaných kontrolních buněk (buněčná linie HeLa) použili také pozitivní kontrolní sondu POLR2A a negativní kontrolní sondu dapB obsaženou v dodané detekční soupravě.

Metoda RNAscope® se ukázala být vysoce citlivá. Díky silné amplifikaci signálu je teoreticky možné detekovat přítomnost jednotlivých molekul mRNA, které se zobrazí jako samostatné tečky v buňkách a to i v případě velice nízké aktivity vyšetřovaných genů. U našich kontrolních tkáňových vzorků byla pozitivita natolik vysoká, že se jednotlivé signály (tečky) často překrývaly a tvořily klastry. Celkem bylo metodou RNAscope® vyšetřeno 10 vzorků s diskrepantními profily. U většiny vzorků byla zjištěna vysoká pozitivita exprese HER2 mRNA (4+ nebo 3+) korelující s nadměrnou expresí proteinu HER2 (tabulka 1). Na druhé straně byl ale také zaznamenán 1 případ, kdy IHC pozitivita 2+ nebyla doprovázena výrazně zvýšenou pozitivitou exprese mRNA.

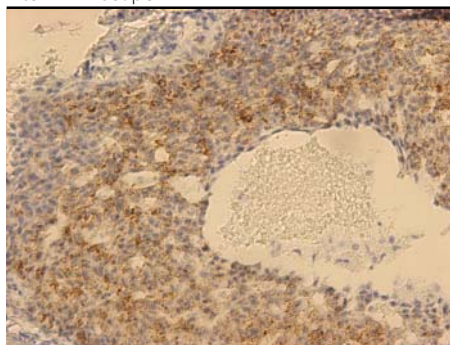
Diskuze

Hodnocený soubor diskrepantních profilů je zatím sice velice malý, nicméně tato vyšetření ukázala vysokou míru korelace výsledků RNAscope® s výsledky IHC, což potvrzuje teorii, že za určitých podmínek dochází navzdory

Obrázek 1. Příklad vyšetření exprese proteinu HER2 (HercepTest 3+)



Obrázek 2. Příklad detekce mRNA detekčním kitem RNAscope®



neprokázané amplifikaci HER2 genu ke zvýšené transkripci mRNA, vedoucí k nadměrné expresi HER2 proteinu (tabulka 1). Jednoznačně pozitivní, tzn. výsledek u RNAscope® 4+, byly 4 vzorky z 10. Byl ale také zaznamenán 1 případ, kdy IHC pozitivita 2+ nebyla doprovázena žádnou mRNA pozitivitou. Můžeme jen spekulovat, že v tomto případě byl proteinový epitop odolnější k nestandardní fixaci, než nukleové kyseliny. Možnost nesprávného vyhodnocení 2+ positivity proteinu HER2 můžeme vyloučit, protože vyšetření bylo opakováno. V literatuře jsou popsány výsledky, kdy u skupiny pacientů s IHC pozitivitou 2+ byla zaznamenána HER2 mRNA pozitivita u 6/78 pacientů, kdežto ve skupině s IHC pozitivitou 3+ to bylo už 8/13 pacientů (7). Zvyšující se stupeň positivity IHC tedy pozitivně koreloval se zvyšující se pozitivitou mRNA vyšetření, a to i u diskrepantních případů. Celkem u 25/403 pacientů byla pozorována pouze pozitivita HER2 mRNA (vzorky bez amplifikace a současně IHC 0/1+ nebo 2+). Autoři zmiňované práce uvádí, že by použití metody RNAscope® mohlo zpřesnit diagnostiku celkem u 12,4% pacientů (7). V článku jiných autorů je diskutován velký potenciál metody u HER2 hraničně pozitivních pacientů, kdy je výsledek IHC 2+ a současně ve vzorku hraniční amplifikace (8). V USA se jedná o 5% pacientů ročně. V naší laboratoři jsme zjistili celkem 3% takových případů v průběhu 5 let. V takových případech by vyšetření u některých pacientů mělo

být opakováno, a to na jiném vzorku, pokud je takový k dispozici.

V práci Wanga a spolupracovníků (8) je popsáno plně automatizované kvantitativní vyhodnocení signálu s využitím speciálního programu spojeného s obrazovou analýzou. Tímto způsobem by bylo možné vyhodnotit signály u několika set až několika tisíc buněk. Výsledky RNAscope® autoři porovnávali s detekcí HER2 mRNA pomocí qPCR, ale také s metodami FISH, IHC, CISH a s duální hybridizací in situ. V případech, kde výsledky FISH byly jednoznačné, byly obě metody, RNAscope® i qPCR, z 97,3% konkordantní s FISH. V opačném případě, kdy byly výsledky metody FISH nejednoznačné, však metoda RNAscope® nad qPCR vynikala. Pravděpodobným důvodem zkreslení výsledků u qPCR by mohla být buněčná heterogenita vyšetřovaných tkání, která by ovšem neměla mít zásadní vliv na výsledky RNAscope®, kde je výsledný signál porovnáván s buněčnou morfolofií. U nás se problematikou detekce exprese HER2 na úrovni proteinu, RNA i DNA zabývali Skálová se spolupracovníky (9), kteří pozorovali snížení exprese HER2 na všech úrovních u části pacientů po neoadjuvantní chemoterapii. V tomto případě však byla exprese HER2 mRNA měřena metodou RT-PCR.

Publikovány jsou i další studie zaměřené na korelaci mezi RNA in situ hybridizací (RNA-ISH) a konvenčními metodami (IHC, FISH). Alba a spolupracovníci (10) zmiňují 96,5% konkordanci RNA-ISH s amplifikací genu určenou pomocí FISH a 95,2% konkordanci s nadměrnou expresí HER2 proteinu určenou metodou IHC. Práce Vassilakopoulou a spolupracovníků (11) zahrnuje 149 pacientů s HER2 pozitivním metastatickým karcinomem prsu léčených chemoterapií v kombinaci s trastuzumabem a považuje výsledky RNA-ISH za nezávislé prediktivní faktory doby do progresu.

Celkový podíl nehodnotitelných vzorků v našem souboru 545 pacientů z roku 2011 odpovídá údajům uváděným v literatuře. V práci Khouryho a spolupracovníků (12) je zdůrazňována především nutnost co nejkratší doby od odběru tkáně do začátku fixace (maximálně 30 minut). Při prodlevě 60 minut klesla hodnotitelnost FISH až na 70%. Práce Portiera a spolupracovníků (13) však uvádí, že začátek fixace je možné oddálit až na 3 hodiny. Podle autorů nebyl prokázán signifikantní význam doby kratší než 3 hodiny na detekci centromery chromozomu 17 nebo signálu HER2.

Můžeme shrnout, že metoda RNAscope® je dobře použitelná v běžné laboratorní praxi, její

nevýhodou však je časová náročnost (doba trvání přípravy vzorků je 10 hodin) a zatím relativně vysoká cena. Proto by tato metoda měla být využívána jen v omezeném spektru případů, kdy IHC pozitivita je hraniční (2+) a současně z nějakého důvodu nelze použít ISH vyšetření amplifikace genu.

Literatura

1. Perez EA, Cortés J, Gonzalez-Angulo AM, Bartlett JMS. HER2 testing: Current status and future directions. *Cancer Treatment Reviews* 2014; 40: 276–284.
2. Ryška A, Hovorková E, Rozkoš T, Laco J. Prediktivní diagnostika u karcinomu prsu. *Cesk Patol* 2011; 47(4): 145–147.
3. Oostra DR, Macrae ER. Role of trastuzumab emtansine in treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2014; 6: 103–113.
4. Ross JS, Slodkowska EA, Symmans WF, et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. *Oncologist* 2009; 14: 320–368.
5. Penault-Llorca F, Bilous M, Dowset M, et al. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol* 2009; 132: 539–548.
6. Panvichian R, Tantiwettrueangdet A, Wongwaisaywan S, et al. HER2 expression in breast cancer with nonamplified HER2 and gains of chromosome 17 centromere. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20(4): 367–374.
7. Bernet L, Benaclocha MM, Castera C, et al. mRNA in situ hybridization (HistoSonda): a new diagnostic tool for HER2-Status in breast cancer – a multicentric Spanish study. *Diagn Mol Pathol* 2012; 21(2): 84–92.
8. Wang Z, Portier BP, Gruver AM, et al. Automated quantitative RNA in situ hybridization for resolution of equivocal and heterogeneous ERBB2 (HER2) status in invasive breast carcinoma. *J Mol Diagn* 2013; 15(2): 210–219.
9. Skálová H, Dunder P, Povýšil C, et al. Study of the effect of neoadjuvant chemotherapy on the status of Her2/neu. *Folia Biol* 2011; 57(5): 191–199.
10. Alba J, Guutierrez J, Coupe VM, et al. HER2 status determination using RNA-ISH – a rapid and simple technique showing high correlation with FISH and IHC in 141 cases of breast cancer. *Histol Histopathol* 2012; 27(8): 1021–1027.
11. Vassilakopoulou M, Togun T, Dafni U, et al. In Situ Quantitative Measurement of HER2mRNA Predicts Benefit from Trastuzumab-Containing Chemotherapy in a Cohort of Metastatic Breast Cancer Patients. *PLoS One* 2014; 9(6): DOI: 10.1371/journal.pone.0099131
12. Khoury T, Sait S, Hwang H, et al. Delay to formalin fixation effect on breast biomarkers. *Modern Pathology* 2009; 22(11): 1457–1467.
13. Portier BP, Wang Z, Downs-Kelly E, et al. Delay to formalin fixation 'cold ischemia time': effect on ERBB2 detection by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 2013; 26(1): 1–9.

Článek doručen redakci: 1. 3. 2015

Článek přijat k publikaci: 14. 5. 2015

Markéta Kolečková

Ústav klinické a molekulární patologie

LF UP a FN Olomouc

Hněvotínská 3, 777 15 Olomouc

M.Koleckova@email.cz