

Biomarker-Diagnostik in der Pathologie

K. Jöhrens¹, D. Molnar¹

Die Entwicklung der personalisierten Medizin hat die Therapiemöglichkeiten in der Onkologie revolutioniert. Die zielgerichtete Therapie setzt dabei voraus, dass die Tumoren Charakteristika aufweisen, die spezifisch therapierbar sind. Bezogen auf die Pathologie gibt es hier prinzipiell drei verschiedene Ansatzmöglichkeiten. Dies sind:

- die Morphologie unter Berücksichtigung des TNM-Status und des Gradings,
- das Vorhandensein von Proteinen, darstellbar durch immunhistologische Untersuchungen,
- Mutationen und Varianten sowie Fusionen und Amplifikationen, identifizierbar durch molekulare Methoden.

Die Darstellung und Identifikation dieser Charakteristika bezeichnet man als Biomarker-Diagnostik. Im Folgenden werden exemplarisch einzelne Biomarker aus den drei verschiedenen oben genannten Kategorien vorgestellt.

Morphologie unter Berücksichtigung des TNM-Status und des Gradings

Als Beispiele für einen morphologischen Biomarker werden hier Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) für das Nierenzellkarzinom, das Plattenepithelkarzinom des Ösophagus und das Adenokarzinom des Ösophagus und des gastro-ösophagealen Überganges beschrieben.

Seitens der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) wurde Pembrolizumab als Monotherapie für die adjuvante Behandlung des Nierenzellkarzinoms mit

erhöhtem Rezidivrisiko zugelassen. Dies setzt voraus, dass die Patientinnen und Patienten entweder ein intermediäres Rezidivrisiko, ein hohes Rezidivrisiko oder einen M1-NED-Status bei metastasierter Erkrankung nach vollständiger Resektion des Primarius und metastasierter Läsionen aufweisen.

Das Intermediärrisiko ist definiert durch ein pT2-Stadium mit einem histologischen Differenzierungsgrad 4 (G4) oder einer sarkomatoiden Differenzierung ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen oder durch ein pT3 egal welchen Differenzierungsgrades ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen. **Das hohe Rezidivrisiko** ist definiert als pT4 egal welchen Differenzierungsgrades ohne Lymphknoten- oder Fernmetastasen oder jegliches T-Stadium mit positivem Lymphknotenstatus ohne Fernmetastasen [1].

Nivolumab kann bei Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus und Adenokarzinomen des Ösophagus und des gastro-ösophagealen Überganges in einem adjuvanten Setting nach Chemo-Radio-Therapie appliziert werden, wenn die Patienten einen ypT+ oder ypN+ Status aufweisen [2].

Das Vorhandensein von Proteinen, darstellbar durch immunhistologische Untersuchungen ohne und mit zusätzlichen molekularen Untersuchungen

Programmed cell Death Ligand 1 PD-L1 Die Gabe von ICI hat die therapeutischen Möglichkeiten in der Onkologie deutlich erweitert. Momentan therapeutisch relevante Checkpoint-Moleküle sind das cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), programmed cell death (PD-1) und sein Ligand PD-L1. Sie sind für die Eigentoleranz notwendig. Es wird angenommen, dass die Tumoren über eine Ex-

pression von zum Beispiel PD-L1 versuchen, der Immunabwehr zu entgehen. Ziel der Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie ist es, diesen Mechanismus rückgängig zu machen. Die bekanntesten therapeutisch einsetzbaren Checkpoint-Inhibitoren sind gegen CTLA4 Ipilimumab, gegen PD-1 Nivolumab/Pembrolizumab und gegen PD-L1 Atezolizumab, Avelumab, Cemiplimab und Durvalumab. Für einige Tumorentitäten wird die Gabe dieser (ICI) an die immunhistologische Bestimmung von PD-L1 gekoppelt und in der Zulassung seitens der EMA oder der U.S. Food and Drug Administration (FDA) verankert. Dabei sei darauf hingewiesen, dass die FDA eine Companion Diagnostik fordert, während sich die EMA bisher für eine Methodenoffenheit ausgesprochen hat. Die Companion Diagnostik setzt voraus, dass der Biomarker gemäß der Studie, die zu der Zulassung geführt hat, angewendet werden muss. Bei der Methodenoffenheit ist die Wahl der immunhistologischen Antikörper, der Kits und der Geräte dem Pathologen überlassen. Dadurch können laboratory developed tests (LDT) entstehen [3].

Als PD-L1 positiv gilt eine Karzinomzelle, wenn sie eine membranäre Färbung aufweist. Diese kann komplett also transmembranär oder inkomplett sein. Die Intensität der Expression spielt keine Rolle, das heißt auch eine sehr schwache Expression wird als positiv gewertet [4]. In Abhängigkeit der Scores (IC, CPS) spielt auch die Expression von PD-L1 in Immunzellen eine Rolle. Aktuell sind in Europa drei verschiedene Scores zur Bestimmung der PD-L1 Expression therapierelevant:

- Bei dem Tumor Proportion Score (TPS) wird die membranäre Expression von PD-L1 auf den Tumorzellen bestimmt und in das Verhältnis aller auf dem immunhistologischen

¹ Institut für Pathologie am Klinikum Chemnitz gGmbH

Schnitt vorhandenen vitalen Tumorzellen gesetzt. Es handelt sich hier also um einen Zellscore.

- Zur Bestimmung des Combined Positive Scores (CPS) werden die PD-L1 positiven Tumorzellen und Immunzellen in Bezug zu den vitalen Tumorzellen gesetzt und mit 100 multipliziert. Im Gegensatz zum TPS ist dies kein Prozent-Wert. Der ermittelte Wert kann theoretisch größer als 100 sein. Von den Immunzellen gehen die Lymphozyten und Makrophagen in die Wertung ein, Granulozyten werden nicht einbezogen. Auch hier handelt es sich um einen Zellscore.
- Im Gegensatz hierzu ist der Immune Cell Score ein Flächenscore. Hier werden die Immunzellen (Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten), die innerhalb der Tumorzellen oder im benachbarten peritumoralen Stroma liegen und PD-L1 positiv sind, gezählt und auf das Tumora-real bezogen. Es handelt sich hier um einen prozentualen Wert.

Die Cut-Offs für diese Scores und die Scores selber hängen von der Gabe der jeweiligen ICI entsprechend der Zulassungen ab [5]. Da die Pathologinnen und Pathologen in der Regel nicht über die konkrete Gabe der ICI informiert sind, wird empfohlen, alle (therapie-relevanten) Scores anzugeben.

In vielen Instituten für Pathologie wird aufgrund der Zulassungsbestimmungen und Leitlinien-Empfehlungen PD-L1 bereits während der Erstdiagnose (nicht kleinzellige Lungen-, Magen-, Ösophagus-Karzinome und die des gastro-ösophagealen Übergangs) bestimmt, was als „Reflextestung“ bezeichnet wird. Bei den übrigen Karzinomen, bei denen der immunhistologische Nachweis von PD-L1 als Biomarker gefordert wird (zum Beispiel Karzinome des Kopfes und des Halses, Mammakarzinome), erfolgt diese Untersuchung zu-

Tab. 1: Interpretation der HER2 Immunhistologie am Mammakarzinom modifiziert nach der S3- Leitlinie Mammakarzinom 2021 [9]

Färbeintensität Score IHC	Biopat/Resektat	HER2-Status
0	keine Membranfärbung in den Tumorzellen	negativ
1+	schwache inkomplette Membranfärbung in > 10 % der Tumorzellen	low
2+	schwache/mäßige zirkuläre Membranfärbung in > 10 % der Tumorzellen oder kräftige zirkuläre Membranfärbung in ≤10 % der Tumorzellen 2+/ISH negativ	low
2+	schwache/mäßige zirkuläre Membranfärbung in > 10 % der Tumorzellen oder kräftige zirkuläre Membranfärbung in ≤10 % der Tumorzellen/ISH positiv	positiv
3+	gleichmäßig kräftige zirkuläre Membranfärbung in > 10 % der Tumorzellen	positiv

meist nach Anforderung der klinischen Kollegen, da die Gabe der ICI vom Stadium und gegebenenfalls der Vortherapie abhängig ist.

HER2-Expression /-Amplifikation

HER2 ist die Abkürzung für human epidermal growth factor receptor 2 beziehungsweise erb-b2 rezeptor tyrosinase 2. Er stimuliert die Zellproliferation über die Aktivierung des RAS-MAP-Kinase Weges. Zusätzlich wird die Apoptose über den mTor-Signalweg gehemmt [6]. Eine zielgerichtete Therapie gegen HER2 ist möglich, wenn Karzinomzellen eine Expression/ Amplifikation dieses Moleküls aufweisen. Hierfür ist zunächst die immunhistologische Untersuchung zum Nachweis einer möglichen HER2-Expression der Tumorzellen notwendig. Die Interpretation der Färbung ist abhängig von der Tumorentität. Die Tabellen 1 und 2 zeigen diese bezogen auf das Mammakarzinom und das Magenkarzinom/ Adenokarzinom des Ösophagus/gastro-ösophagealen Übergangs.

Einen grenzwertigen Befund stellt der Score HER 2+ dar, der eine Überprüfung idealerweise mittels einer in-situ-Hybridisierung fordert [7].

Zusätzlich gibt es seit 2023 eine Therapieoption für HER2 Low Mammakarzi-

nome. Entsprechend des ESMO expert consensus statements (ECS) [8] werden hierunter Mammakarzinome verstanden, die einen HER2 Score 1+ oder 2+/ISH nicht amplifiziert aufweisen.

Entsprechend der Interdisziplinären S3-Leitlinie [9] für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms liegt der Grenzwert für ein ISH-positives Testergebnis bei HER2/CEN17-Ratio > 2,0. Da der Zugewinn der perizentromeren Region des Chromosoms 17 zu falsch negativen Ergebnissen führen kann, wenn nur die Ratio als Kriterium zur Unterscheidung HER2-positiver und -negativer Fälle berücksichtigt wird, gilt gemäß dem aktuellen Update bei einer Ratio < 2,0 auch die mittlere HER2-Signalzahl pro Zelle. Der Nachweis von 6,0 Signalen und mehr ist als HER2-positiv, von weniger als 4,0 Signalen als HER2 negativ zu interpretieren. Die „Borderline“-Kategorie für die ISH umfasst Tumoren mit > 4,0 und < 6,0 HER-Signalen pro Zelle. In diesem Falle sollte eine Re-Testung (andere validierte Methode an dem gleichen Material oder Neutes-tung an anderem Material, beispielsweise am Exzidat, wenn Borderline-Ergebnis an der Nadelbiopsie) erfolgen. Die Testung von HER2 ist während der Erstdiagnose von Mammakarzinomen

Tab. 2: Interpretation der HER2 Immunhistologie nach Rüschoff et al 2010 [6]

Färbeintensität Score IHC	Resektat	Biopsat	HER2-Status
0	keine Reaktivität oder Membranfärbung in < 10 % der Tumorzellen	keine Reaktivität oder Membranfärbung in keiner oder < 5 zusammenhängende Tumorzellen	negativ
1+	sehr schwache Membranfärbung in minst. 10 % der Tumorzellen	sehr schwache Membranfärbung in Tumorzellgruppen unabhängig vom Prozentsatz (mindest. 5 Tumorzellen)	negativ
2+	schwache bis mittelkräftige komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung in minst. 10 % der Tumorzellen	Schwache bis mittelkräftige komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung unabhängig vom Prozentsatz (mindest. 5 Tumorzellen)	grenzwertig (ISH Überprüfung notwendig)
3+	starke komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung in minst. 10 % der Tumorzellen	Starke komplette, basolaterale oder nur laterale Membranfärbung unabhängig vom Prozentsatz (mindest. 5 Tumorzellen)	positiv

obligat [9]. Entsprechend der Onkopedia Leitlinie [10] wird auch der HER2-Status bei Magenkarzinomen als Standarddiagnostik empfohlen.

Mismatch Repair (dMMR)-Defizienz/ MikroSatelliteninstabilität

Die Mismatch-Reparatur-Proteine haben die Funktion, Fehlpaarungen in den Doppelsträngen zu erkennen und zu beseitigen. Sie werden im Kern aller Zellen exprimiert. Der Nachweis der Mismatch-Reparatur Defizienz (dMMR) erfolgt über eine immunhistologische Untersuchung, die den Verlust der nukleären Expression zur Darstellung bringt. Immunhistologisch werden in der Regel die 4 Proteine MLH1, PMS2, MLH2 und MLH6 untersucht. Bei einer dMMR fallen klassischerweise die MMR-Protein-Heterodimere MLH1/PMS2 oder MSH2/MLH6 in den Tumorzellen aus, während sie im Normalgewebe erhalten bleiben. Daneben gibt es aber auch ungewöhnliche dMMR-Befunde, wie zum Beispiel einen isolierten Ausfall von PMS2 oder MLH6 oder einen Ausfall von mehr als drei Proteinen. Bei erhaltenem Mismatch-Reparaturstatus spricht man von einer Mismatch-Reparatur Profizienz (pMMR) [11].

Der Nachweis der dMMR mit konsekutiver hoher Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) (s.u.) ist seit langem für den möglichen Nachweis einer erblich be-

dingten Tumordisposition im Sinne des Lynch-Syndroms etabliert. Studien in jüngerer Zeit konnten zeigen, dass Tumoren mit Nachweis einer dMMR/MSI-H gut auf eine Immuncheckpoint-Inhibitor-Therapie ansprechen [11].

Zulassungsrelevant ist die Bestimmung des dMMR/MSI-Status als Biomarker für das kolorektale Karzinom (KRK), das Endometrium-Dünndarm, das Magenkarzinom und Gallenwegskarzinom. Während beim KRK der immunhistologische Nachweis und die PCR-Untersuchung gleichwertig sind, fällt eine Diskordanz bei den übrigen erwähnten Karzinomen auf. Dabei ist die Sensitivität der PCR bei den nicht-kolorektalen Karzinomen geringer. Bei heterogener Expression der MMR-Proteine ohne MSI-H sollte eine weitere molekulare Methode zur Klärung angewandt werden [11].

Der MMR-Status wird bei kolorektalen Karzinomen, dem Endometrium- und Magenkarzinomen während der Erstdiagnose empfohlen beziehungsweise gefordert [10, 12].

Mutationen und Varianten identifizierbar durch molekulare Methoden BRAF-Mutation

BRAF, ein Protoonkogen, kodiert das B-RAF Protein, das das Wachstum, die Zellteilung und die Zelldifferenzierung reguliert. Mutationen im BRAF-Gen

können zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen. Eine zielgerichtete Therapie mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren finden zum Beispiel bei BRAF-Mutationen für maligne Melanome, nicht kleinzellige Lungenkarzinome und den Kolonkarzinomen eine Anwendung. Der Nachweis einer onkogenen und aktivierenden BRAF-Mutation ist ein Biomarker für die Therapieindikation und wird durch eine molekulare Untersuchung identifiziert. Es gibt verschiedene molekulare Testverfahren, um eine BRAF-Mutation nachweisen zu können. Die Sangersequenzierung hat eine recht hohe Sensitivität und hohe Spezifität, allerdings ist es materialkonsumierend [13]. Insbesondere unter der Berücksichtigung, dass die Tumoren verschiedene Mutationen und Varianten sowie Fusionen und Amplifikationen aufweisen können, erscheint ein Next Generation Sequenzierungs-Verfahren sinnvoll, mit denen sich eine Auswahl von diagnose- und therapielevanten Genen/Genabschnitten („targeted NGS“) simultan mit hoher Sensitivität und Spezifität nachweisen lassen [13]. Dies betrifft insbesondere nicht kleinzellige Lungenkarzinome im Stadium IV, bei denen zielgerichtete Therapien gegen folgende Mutationen [13]:

- ALK,
- BRAF-V600E,
- EGFR Exon 18-21,

- HER2-,
- KRAS-G12C,
- c-MET Exon 14 Skipping Mutationen und Translokationen:
- NTRK Translokationen,
- RET Translokationen,
- ROS1 Translokationen zugelassen sind.

Homologe Rekombinations-Defizienz (HRD)

Die homologe Rekombinationsreparatur (HRR) stellt einen Reparaturmechanismus dar, der in der Lage ist, die immer wieder entstehenden Doppelstrangbrüche in der DNA zu beseitigen. Im Laufe des Lebens kann dieser Reparaturmechanismus Defizienzen aufweisen, sodass der Körper nicht mehr in der Lage ist, diese Doppelstrangbrüche zu reparieren. Dies bezeichnet man als Homologe Rekombinations-Defizienz (HRD) [14]. Durch diese Reparaturdefizienz kann es zu Genmutationen kommen, die letztlich zur malignen Tumorentstehung beitragen können. Die bekanntesten Gene für die HRR sind BRCA 1/ 2 (Breast cancer 1 early onset), CHEK2 (Checkpoint kinase 2), RAD51 (Reparatur-Gen) und ATM (Serin-Proteinkinase: Ataxia Telangiectasia Mutated). Der Nachweis einer HRD kann für die Gabe von Hemmstoffen gegen das Enzym Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP-Inhibitoren) notwendig sein. Die Mutationen können dabei somatisch oder eine Keimbahnmutation sein. Sind Genabschnitte verändert, die nicht zu BRCA1/2 gehören, werden diese als BRCA-ness bezeichnet. Bei der HRD-Diagnostik werden genomische Fehler, insbesondere der Verlust der Heterozygotie, der allelischen Imbalance der Telomere und größere chromosomale Rearrangements nachgewiesen. Zielgerichtete Therapien mit PARP-Inhibitoren sind für das high-grade epitheliale Ovarialkarzinom, Eileiter-, das primäre Peritoneal-, das Mamma- (insbesondere des Triple

negativen), das Pankreas- und das Prostatakarzinom in Abhängigkeit des Stadiums, der Art der Therapie (Erstlinientherapie, Erhaltungstherapie) oder einer Rezidivsituation zugelassen [15]. Die Bestimmung der HRD erfolgt über einen NGS basierten Assay. Die Interpretation richtet sich nach IARC (international agency of research on cancer) Klassifikation:

- Group 1: carcinogenic,
- Group 2A: probably carcinogenic,
- Group 2B: possibly carcinogenic,
- Group 3: not classifiable,
- Group 4: probably not carcinogenic.

Ähnlich wie bei dem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom Stadium IV gibt es unterdessen auch bei dem Mammakarzinom im metastasierten Stadium zahlreiche zielgerichtete Therapieoptionen, die eine molekulare Untersuchung notwendig machen [16]:

- PIK3CA-Hotspotmutationen,
- PALB2-Keimbahnmutation,
- BRCA 1/2 Keimbahnmutation und somatische Mutationen,
- NTRK-Fusionen,
- ESR1 Resistenzmutation/-fusion,
- ERBB2-Hotspotmutation,
- ERBB3-Mutationen,
- AKT-Mutation.

Wegen der zunehmenden Bedeutung molekularer Veränderungen im Rahmen der zielgerichteten Therapie erscheint eine NGS basierte Paneldiagnostik bei Mammakarzinomen zusätzlich zu der immunhistologischen Bestimmung des Östrogenrezeptors, des Progesteronrezeptors und von HER2 sowie von PD-L1 bei triple negativen Mammakarzinomen daher sinnvoll.

Qualitätssicherung

Um einen qualitativ hohen und sicheren Standard zu gewährleisten, sollten verschiedene Qualitätssicherungsmaßnahmen durchgeführt werden. Dies beginnt mit der Kontrolle der Präanalytik,

insbesondere der Ischämiezeit (möglichst kurz), das Fixierungsmedium (zehnprozentige gepufferte Formalinlösung), die Dauer der Fixierung (6 bis 72 Stunden) und die Temperatur während der Fixierung (Zimmertemperatur), aber auch der Auswahl adäquater Kontrollen, entsprechender Ringversuche (zum Beispiel QUIP) und die Nutzung von Monitoren.

Ausblick: Verbesserte Biomarker-Diagnostik durch digitale Pathologie und künstliche Intelligenz (AI) – Onkologie der Zukunft?

Ein wichtiges, immer mehr an Bedeutung zunehmendes Einsatzgebiet der künstlichen Intelligenz (KI) in der Pathologie ist die standardisierte Quantifizierung von Biomarkern bei beispielsweise therapielevanten Scores (Ki67-Index, HER2, PD-L1 usw.) an Gewebeschnitten mit Auszählungs-Algorithmen als unterstützendes Werkzeug für die Pathologinnen und Pathologen. Diese Algorithmen erlauben eine schnellere Bestimmung diverser Biomarker-Parameter, die eine Digitalisierung der Schnitte und Nachkontrolle durch Pathologinnen und Pathologen voraussetzt. Ein spannendes Feld der Biomarker-Diagnostik der Zukunft ist die Erarbeitung KI-gestützter Modelle, die Informationen aus HE-Bildern extrahieren, die Morphologie mit komplexen klinischen und molekularen Daten korrelieren, um das Ansprechen zielgerichteter Therapien zu evaluieren [17]. ■

Interessenkonflikte: Prof. Jöhrens: medizinische Beraterin der QUIP, Mitglied beim Adboard MSD, BMS, Agilent, Expertenberatung GSK

Literatur unter www.slaek.de → Über uns → Presse → Ärzteblatt

Korrespondierende Autorin
Prof. Dr. med. Korinna Jöhrens
Klinikum Chemnitz gGmbH
Institut für Pathologie am Klinikum
Chemnitz gGmbH
Kaßbergstraße 16 B / Haus 2, 09112 Chemnitz
E-Mail: k.joehrens@skc.de