

Originalien

Pathologie 2009 · 30:384–392
 DOI 10.1007/s00292-009-1141-4
 Online publiziert: 10. April 2009
 © Springer Medizin Verlag 2009

C. Tapia · S. Savic · M. Bihl · A. Rufle · I. Zlobec · L. Terracciano · L. Bubendorf
 Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel, Schweiz

EGFR-Mutationsanalyse beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom

Erfahrungen aus der Routinediagnostik

Das Lungenkarzinom ist weltweit die häufigste zum Tode führende Tumorerkrankung [1]. Rund 80% der Lungenkarzinompatienten leiden an einem nichtkleinzelligen Karzinom (NSCLC), welches häufig erst in einem späten, inoperablen Tumorstadium diagnostiziert wird [4]. Chemo- und Radiotherapie werden bei diesen Patienten palliativ eingesetzt, beeinflussen aber kaum die Überlebenszeit [9]. Neue zielgerichtete, molekulare Therapiestrategien sind deshalb von großem Interesse.

Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass ein Teil der Patienten mit einem NSCLC auf eine Therapie mit epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-Tyrosinkinase-Hemmern (EGFR-TKI) wie Gefitinib (Iressa®; Astra Zeneca, Macclesfield, UK)

oder Erlotinib (Tarceva®; OSI Pharmaceuticals Inc., Melville/NY, USA) ansprechen [3, 12, 16, 20, 25]. Der Nachweis einer somatischen Mutation im EGFR-Gen des Tumorgewebes gilt dabei als wichtiger prädiktiver Faktor für ein Therapieansprechen [26].

Therapierelevante EGFR-Mutationen führen zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des EGFR-Proteins, während stumme Mutationen keinen Effekt auf die Aminosäuresequenz und somit auf die Struktur und Funktion des EGFR-Proteins haben. Die meisten therapielevanten Mutationen sind mit einem Ansprechen auf EGFR-TKI assoziiert. Rund 5% der EGFR-Mutationen führen dagegen zu einer sekundären Therapieresistenz auf EGFR-TKI [21].

EGFR-Mutationen führen meist zu einer konstitutiven Autophosphorylierung

der EGFR-Tyrosinkinase mit konsekutiver Aktivierung verschiedener Signalübertragungswege, die in einer erhöhten Zellproliferation und einer verminderten Apoptose resultieren.

EGFR-Mutationen treten bevorzugt bei Asiaten, Frauen, Nichtrauchern und in Adenokarzinomen auf [16, 27]. Die Prävalenz von EGFR-Mutationen schwankt somit je nach Bevölkerungszusammensetzung und wird mit 55–80% in der asiatischen [22, 24] und mit 7–16% in der kaukasischen Bevölkerung angegeben [5, 22].

In dieser Arbeit untersuchten wir die Prävalenz von EGFR-Genmutationen in einer Population mitteleuropäischer Patienten mit NSCLC. Gleichzeitig prüften wir, wie gut sich diagnostische Routinebiopsien und -zytologien für die EGFR-Gensequenzierung eignen.

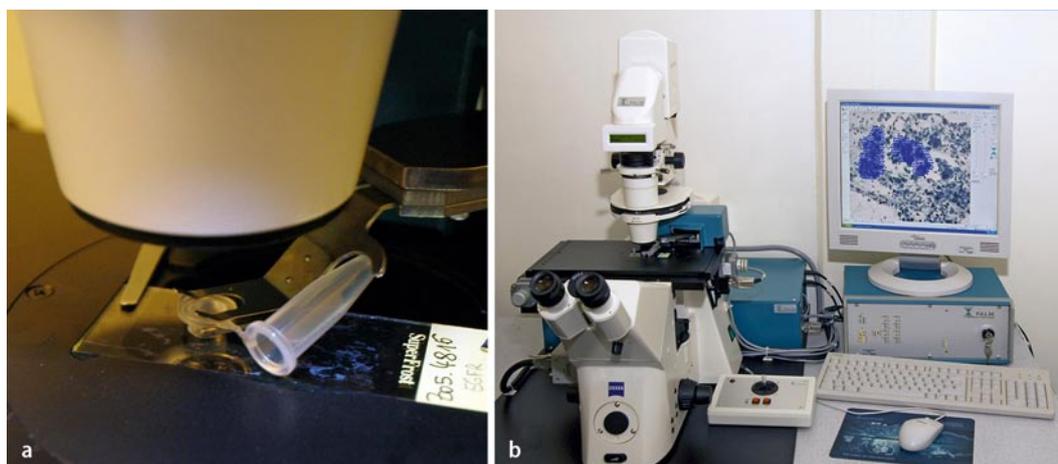


Abb. 1 ◀ Prinzip der Laser-Mikrodissektion (PALM MicroLaser Technology System). **a** Invertiertes Mikroskop mit eingebautem Lasersystem, welches Gewebe/Zellen mikrodisseziert und direkt in den Deckel eines Eppendorfröhrchens katapultiert. **b** Ganzes System mit Computersteuerung. Das zu mikrodissezierende Areal wird interaktiv am Bildschirm markiert

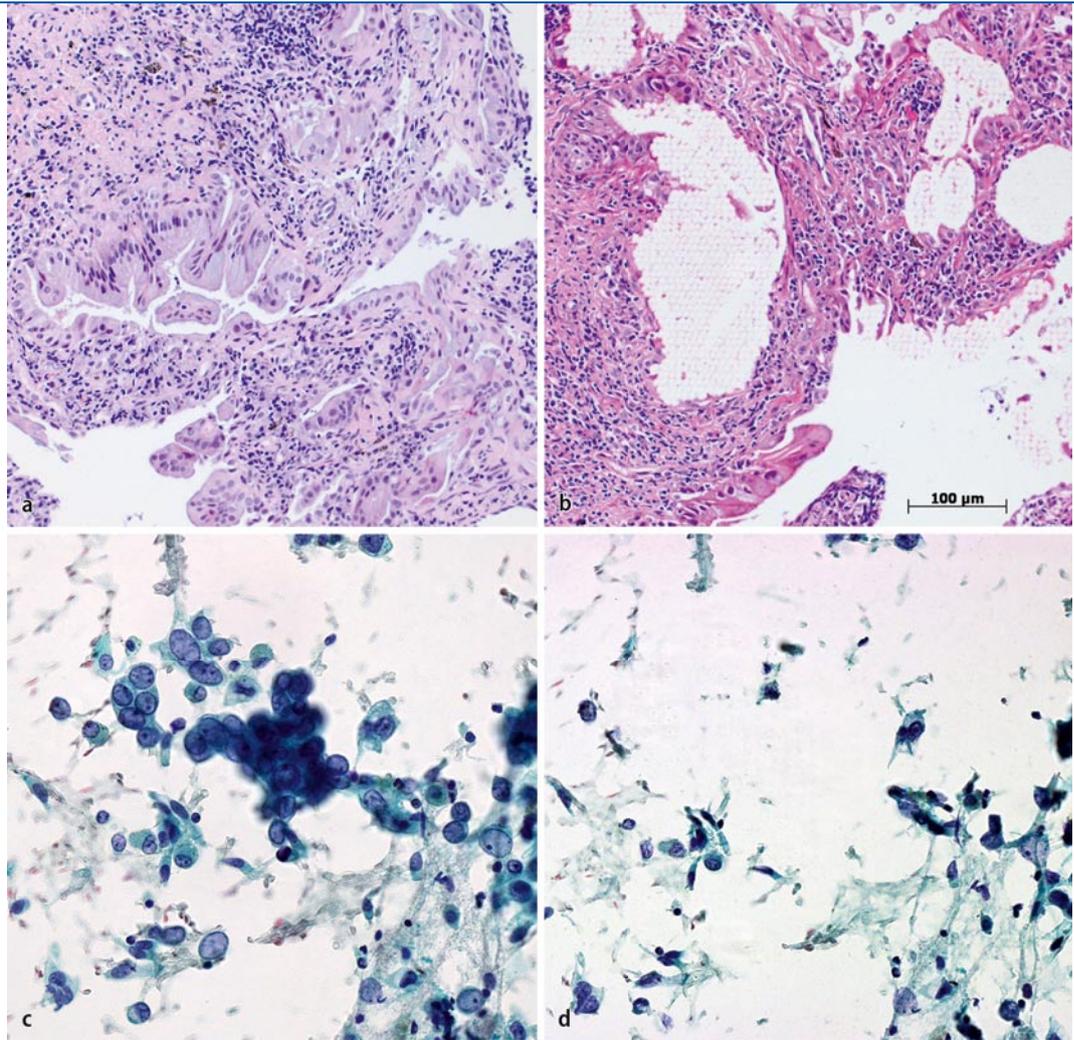


Abb. 2 ▶ Histologie und Zytologie mit Zellen von pulmonalen Adenokarzinomen vor und nach Laser-Mikrodissektion (**a, b** Vergr. 20:1, **c, d** Vergr. 40:1)

Patienten und Methodik

Wir untersuchten eine prospektive Serie von 307 Patienten mit NSCLC, bei denen wir in den Jahren 2004 bis Mitte 2008 am Institut für Pathologie des Universitätsspitals Basel eine EGFR-Genmutationsanalyse der Exone 18–21 durchgeführt hatten. Darin eingeschlossen waren 178 (58,0%) histologische Proben und 129 (42,0%) Zytologien. Die histologischen Proben setzten sich aus 146 Biopsien und aus 32 Resektaten zusammen. Die zytologischen Präparate umfassten Bronchialsekrete, Bürstenzytologien oder transbronchiale Feinnadelpunktate. Die NSCLC bestanden aus 302 primären NSCLC, 4 mediastinalen Lymphknotenmetastasen sowie einer Hirnmetastase. Folgende Tumortypen waren vertreten:

- 176 (57,3%) Adenokarzinome,
- 41 (13,4%) Plattenepithelkarzinome,

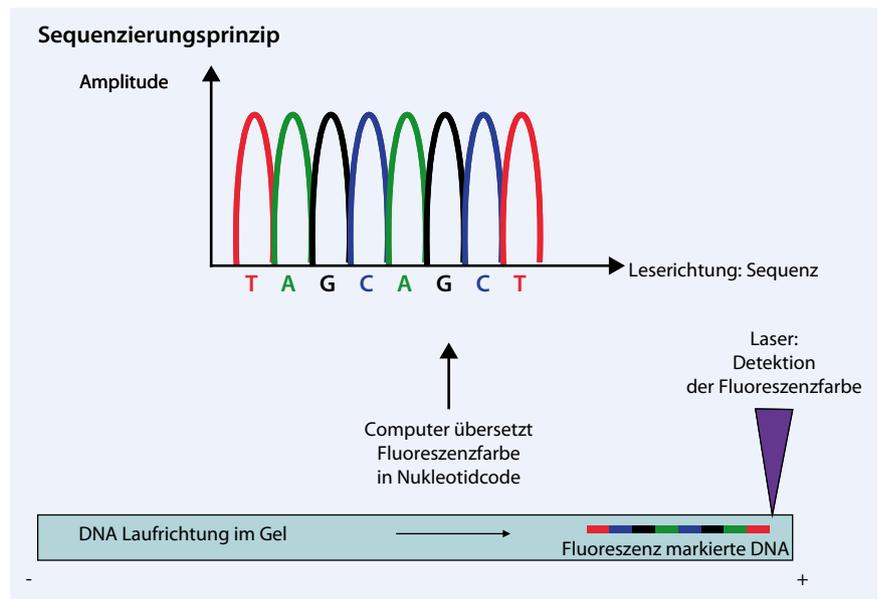


Abb. 3 ▶ Sequenzierungsprinzip: Fluoreszenzmarkierte DNA läuft elektrophoretisch durch ein Kapillargel. Am Ende des Gels befindet sich ein Laserdetektionssystem, welches die markierten Nukleotide registriert. Ein Computer übersetzt die verschiedenen Fluoreszenzsignale in ein Kurvendiagramm

Pathologe 2009 · 30:384–392 DOI 10.1007/s00292-009-1141-4
© Springer Medizin Verlag 2009

C. Tapia · S. Savic · M. Bihl · A. Ruffe · I. Zlobec · L. Terracciano · L. Bubendorf
EGFR-Mutationsanalyse beim nichtkleinzelligen Lungenkarzinom. Erfahrungen aus der Routinediagnostik

Zusammenfassung

Hintergrund. Einige Patienten mit einem nichtkleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) sprechen hervorragend auf Tyrosinkinase-Hemmer (TKI) an. Eine somatische Mutation im epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) gilt dabei als wichtiger prädikativer Faktor.

Patienten und Methode. Wir untersuchten 307 NSCLC auf EGFR-Mutationen (Exone 18–21) und überprüften deren Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern.

Ergebnisse. Unter 178 histologischen und 129 zytologischen Tumorproben fanden sich 25 (8,1%) relevante EGFR-Mutationen. Am häufigsten waren Deletionen in Exon 19 (50%), gefolgt von der Punktmutation L858R in Exon 21 (12,5%). 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. Mutierte NSCLC waren zu 96% TTF-1-positiv.

Schlussfolgerung. Therapierelevante EGFR-Mutationen kommen in $< 10\%$ der mitteleuropäischen NSCLC-Patienten vor und sind gehäuft bei Frauen und TTF-1-positiven Adenokarzinomen. Histologische und zytologische Proben aus der Routinediagnostik sind in gleichem Maße für eine Mutationsanalyse geeignet.

Schlüsselwörter

EGFR · Mutation · Lungenkarzinom · Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom · TTF-1

EGFR mutation analysis in non-small-cell lung cancer. Experience from routine diagnostics

Abstract

Background. Some patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) respond well to therapy with tyrosine kinase inhibitors (TKI). Somatic mutation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene is an important predictive marker for TKI response.

Patients and methods. We performed EGFR mutation analysis in 307 NSCLC (exon 18–21). The data were analyzed for associations with clinical-pathological parameters.

Results. Relevant EGFR mutations were found in 25/307 NSCLC (8.1%; 178 biopsies and 129 cytologies). Most mutations were found in exon 19 (50%) followed by the L858R point mutation in exon 21 (12.5%). EGFR mutations were significantly more common in women than in men (16.8% vs. 2.7%;

$p < 0.001$) and in adenocarcinoma than in other carcinoma subtypes (11.4% vs. 3.8%; $p = 0.017$). EGFR mutation was associated with TTF-1 positivity ($p < 0.041$). Almost all (96%) mutated NSCLC were TTF-1 positive.

Conclusion. In Central Europe, the prevalence of relevant EGFR mutations in NSCLC is $< 10\%$ of patients with NSCLC. EGFR mutations are more common in women and TTF-1 positive adenocarcinomas. Mutation analysis can be performed both from biopsies and cytologies.

Keywords

EGFR · Mutation · Lung cancer · Non-small-cell lung cancer · TTF-1

- 17 großzellige Karzinome (5,6%; darunter drei großzellige neuroendokrine Karzinome),
- 1 (0,3%) neuroendokrines Karzinom,
- 1 (0,3%) adenosquamöses Karzinom und
- 71 (23,1%) nicht näher klassifizierbare NSCLC.

Die Biopsien wurden mit 4% gepuffertem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die zytologischen Ausstriche wurden mit Delaunay fixiert und anschließend nach Papanicolaou gefärbt.

EGFR-Gensequenzierung

Die Laser-Mikrodissektion und nachfolgende EGFR-Gensequenzierung erfolgte wie kürzlich im Detail beschrieben [5, 18]. Für die Laser-Mikrodissektion verwendeten wir das „PALM Microlaser Technology System“ [19]. Dabei werden die ausgewählten Tumorzellen und Tumorzellgruppen an einem invertierten Mikroskop mittels eines UV-A-Laserstrahls direkt aus dem Präparat disseziert und für die nachfolgende Sequenzierung in den Deckel eines Eppendorf-Röhrchens katalpultiert (■ **Abb. 1 a, b**, ■ **Abb. 2 a–d**).

Um falsch-positive Punktmutationen zu verhindern, führten wir jeweils zwei unabhängige Multiplex-PCR- (Polymerasekettenreaktion-) Untersuchungen durch [13]. Die zweite Multiplex-PCR erfolgte unter denselben Bedingungen wie die erste PCR, jedoch mit einer anderen Primer-Zusammensetzung („nested-PCR“). Die genaue Primer-Zusammenstellung ist in ■ **Tab. 1** aufgeführt. Für die lineare Sequenzierungsanalyse und Datenverarbeitung verwendeten wir den „16 Kapillar Big Dye Terminator v1.1 kit“ (Applied Biosystems®), und die Sequenzierprogramme „Sequencing Analysis Software 5.2“ und „SeqScape 2.5 Software“ (Applied Biosystems®). Das Prinzip der Sequenzierung ist in ■ **Abb. 3** dargestellt.

TTF-1-Expression

115 (37,5%) Tumorproben wurden zusätzlich auf eine TTF-1-Expression untersucht. Für die TTF-1-Immunhistochemie verwendeten wir ein standardisiertes

Protokoll. Die Antigendemaskierung erfolgte mittels Mikrowelle. Ein monoklonaler Mausantikörper gegen TTF-1 (Klon 8G7G3/1; Lab Vision/NeoMarkers®, Fremont/CA, USA) wurde in einem Verhältnis von 1:25 für Biopsien und in einem Verhältnis von 1:100 für Zytologien verdünnt und nach der Inkubation mit dem AEC-Chromogen sichtbar gemacht.

Statistische Methoden

Alle statistischen Berechnungen erfolgten mit SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary/NC, USA). Mittels „Fisher’s Exact Test“ und „Chi-square-Test“ untersuchten wir die Assoziation zwischen EGFR-Mutationsstatus und den nominalen Variablen Geschlecht, Karzinomsubtyp und TTF-1-Immunstatus. Für die Multivariatanalysen verwendeten wir die logistische Regression.

Ergebnisse

Das mediane Alter von Patienten mit und ohne EGFR-Mutation war mit 64,9 Jahren und 66,2 Jahren vergleichbar.

Die übrigen klinisch-pathologischen Parameter und deren Assoziation mit dem EGFR-Mutationsstatus sind in **Tab. 2** zusammengefasst.

EGFR-Mutationen

Von allen 307 NSCLC (178 Biopsien und 129 Zytologien) zeigten 30 (9,7%) eine EGFR-Mutation. Bei 30 Patienten fanden wir insgesamt 32 Mutationen, darunter 25 therapierelevante Mutationen mit

Tab. 1 Primer für Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung

	Vorwärts	Rückwärts	Produktgröße
<i>1. Multiplex-PCR</i>			
Exon 18	GCATGGTGAGGGCTGAGGTGA	CCCCACCAGACCATGAGAGGC	234 bp
Exon 19	TGCCAGTTAACGTCTTCCTTC	CCACACAGCAAAGCAGAAAC	158 bp
Exon 20	CCACCATGCGAAGCCACTGA	TCCTTATCTCCCCTCCCGTATCTC	268 bp
Exon 21	AGCTTCTCCCATGATGATCTGTCC	GGCAGCCTGGTCCCTGGTGTC	264 bp
<i>2. Multiplex-seminested-PCR und Sequenzierung</i>			
Exon 18	ACCCTTGCTCTGTGTTCTTGTC	GCCCAGCCCAGAGGCTGTG	187 bp
Exon 19	AACGTCTCTCTCTCTCTG	CCACACAGCAAAGCAGAAAC	150 bp
Exon 20	CCATGCGAAGCCACTGACGT	CCCCTCCCGTATCTCCCTTCC	256 bp
Exon 21	TCCCATGATGATCTGCCCTACA	CAGGAAATGTGGCT-GACCTAAAG	238 bp

Tab. 2 Klinisch-pathologische Parameter (nur relevante Mutationen berücksichtigt)

Klinisch-pathologische Charakteristika	Gesamtzahl	EGFR-Mutationen ^a
	[n (=100%)]	[n (%)]
<i>Geschlecht</i>		
Frau	119	20 (16,8)
Mann	188	5 (2,7)
<i>Histologischer Typ</i>		
Adenokarzinome	97	13 (13,4)
Plattenepithelkarzinome	31	0
Großzellige Karzinome	11	0
NSCLC, NOS ^b	37	4 (10,8)
Adenosquamöse Karzinome	1	0
Neuroendokrine Karzinome	1	0
<i>Zytologie</i>		
Adenokarzinome	79	7 (8,9)
Plattenepithelkarzinome	10	0
Großzellige Karzinome	6	0
NSCLC, NOS ^b	34	1 (2,9)

^a Stumme Mutationen nicht berücksichtigt.

^b Nicht näher klassifizierbar („not otherwise specified“).

mindestens einer veränderten Aminosäure. Therapierelevante Mutationen fanden wir somit bei 8,1% (25/307) und irrelevante (stumme) Mutationen bei nur 1,6%

(5/307) der Patienten. Zwei Patienten hatten eine doppelte Mutation.

Mutationen fanden sich vorwiegend in Exon 19 (n=16; 50%), gefolgt

Hier steht eine Anzeige.

Tab. 3 Beschreibung der EGFR-Mutationen und deren Assoziation mit dem Therapieansprechen

Anzahl	Exon	Mutationstyp	Beschreibung	Besseres Therapieansprechen
2	18	Punktmutation	G719A	Ja
1	18	Punktmutation	G719C	Ja
10	19	Deletion	E746-A750	Ja
1	19	Deletion	E746-T751	Ja
1	19	Deletion	L747-T751	Ja
1	19	Deletion	E746-T751P	Ja
1	19	Deletion	L747-A750	Ja
1	19	Deletion	L747-E749	Ja
1	19	Deletion	L747-A750, T751P	Ja
2	20	Punktmutation	Q787Q	Nein
1	20	Insertion	A767-V769 (insASV)	Resistenz
1	20	Punktmutation	T790M	Resistenz
1	20	Insertion	S768-D770 (insRCD)	Ja
4	21	Punktmutation	R836R	Nein
4	21	Punktmutation	L858R	Ja

Tab. 4 Assoziationen von EGFR- und TTF-1-Status mit klinisch-pathologischen Parametern

Klinisch-pathologische Charakteristika	EGFR-Status [n (%)]		p-Wert
	Keine Mutation	Mutation	
<i>Geschlecht</i>			
Frau	99 (83,2)	20 (16,8)	p<0,001
Mann	183 (97,3)	5 (2,7)	
<i>Karzinomtyp</i>			
Adenokarzinom	156 (88,6)	20 (11,4)	p=0,017
Andere	126 (96,2)	5 (3,8)	
<i>Bronchioloalveoläres Wachstumsmuster^a</i>			
Nicht vorhanden	56 (86,2)	9 (13,8)	p=n.s.
Vorhanden	28 (87,5)	4 (12,5)	
<i>TTF-1-Expression</i>			
Positiv	69 (75)	23 (25)	p=0,041
Negativ	22 (95,7)	1 (4,3)	

^a Nur Adenokarzinome in Biopsien berücksichtigt.

von Exon 21 (n=8; 25%), Exon 20 (n=5; 15,6%) und Exon 18 (n=3; 9,4%). Ein Patient mit einer Deletion (E746-A750) in Exon 19 entwickelte unter EGFR-TKI-Therapie zusätzlich eine zur EGFR-TKI-Resistenz führende Punktmutation in Exon 20 (T790M). Ein weiterer Patient hatte eine stumme Mutation in Exon 20 (Q787Q) und eine Punktmutation in Exon 21 (L858R). Bei allen anderen Patienten wiesen wir lediglich eine Mutation nach. Die genaue Aufstellung aller relevanten Mutationen ist in **Tab. 3** wiedergegeben. Beispiele typischer Mutationen sind in **Abb. 4 a, b** dargestellt.

Bei 7 Patienten erfolgte die Mutationsanalyse sowohl an einer zytologischen wie auch an einer bioptischen Probe desselben NSCLC. Bei 4 dieser Patienten fanden wir eine EGFR-Mutation, die sowohl in der Zytologie als auch in der Histologie nachweisbar war. Bei einem bereits oben erwähnten Patienten wurde zu Beginn lediglich die Mutation Q787Q in der Biopsie nachgewiesen und ein Jahr später eine zusätzliche Mutation in der Zytologie (Q787Q und zusätzlich L858R).

Somit wurden insgesamt in 18 Biopsien (18/179=10,1%) und in 11 Zytologien (11/132=8,3%) relevante Mutationen nachgewiesen. Therapierelevante Mutati-

onen fanden sich signifikant häufiger bei Frauen als bei Männern (16,8% vs. 2,7%, p=0,001) und bei Adenokarzinomen im Vergleich zu den nicht näher klassifizierbaren NSCLC (11,4% vs. 3,8%; p=0,017).

Von den 97 histologisch diagnostizierten Adenokarzinomen zeigten 12 (12,4%) ein vollständiges und 20 (20,6%) ein herdförmiges bronchioloalveoläres Wachstumsmuster. Bei 4 dieser 32 Karzinome (12,5%) fanden wir eine therapierelevante Mutation (**Tab. 4**).

Bei den Plattenepithelkarzinomen, großzelligen Karzinomen und bei dem einen adenosquamösen Karzinom fanden wir keine EGFR-Mutationen.

TTF-1-Assoziation

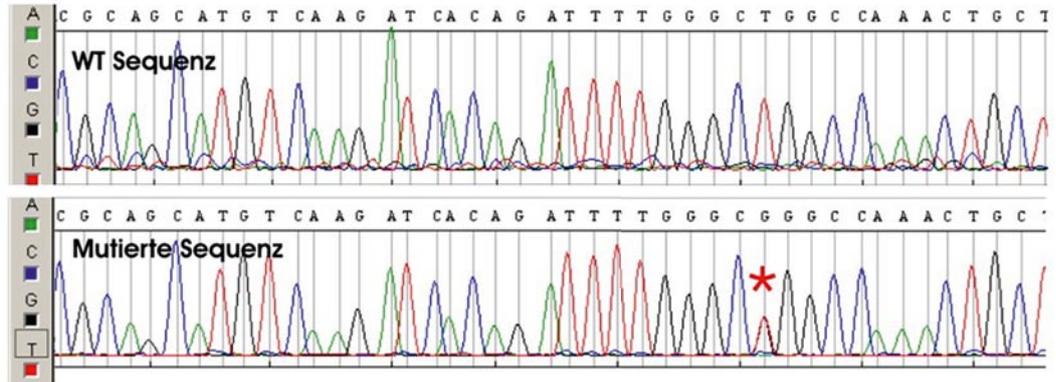
Eine immunhistochemische TTF-1-Positivität war signifikant mit einer relevanten EGFR-Mutation assoziiert (p<0,05). Von den 25 NSCLC mit einer relevanten EGFR-Mutation waren 23 TTF-1-positiv. **Abb. 5 a, b** zeigt ein TTF-1-positives Adenokarzinom mit Mutation. Lediglich ein EGFR-mutiertes NSCLC war TTF-1-negativ, bei einem weiteren war kein Gewebematerial mehr für eine nachträgliche immunhistochemische Untersuchung verfügbar. Bei 91 nichtmutierten NSCLC war der TTF-1-Status bekannt. Davon waren 69 TTF-1-positiv und 22 TTF-1-negativ.

In der Multivariatanalyse unter Berücksichtigung von Geschlecht, Tumortyp (Adenokarzinom vs. andere Karzinomtypen) und TTF-1-Status war lediglich das Geschlecht signifikant mit einer relevanten EGFR-Mutation assoziiert [p=0,017; „Odds Ratio“ (95%-Konfidenzintervall): 3,81 (1,3–11,4)]. Bei Frauen war die Wahrscheinlichkeit einer EGFR-Mutation im Lungenkarzinom demnach fast 4-mal höher als bei Männern.

Diskussion

Die EGFR-TKI Gefitinib und Erlotinib sind seit einigen Jahren für die Zweitlinientherapie bei fortgeschrittenen NSCLC zugelassen. Der Nachweis einer EGFR-Mutation gilt dabei als wichtiger positiver prädiktiver Faktor [11]. In retrospektiven Studien zeigten Patienten mit einer EGFR-Mutation unter EGFR-TKI ein bes-

L858R



WT Sequenz:

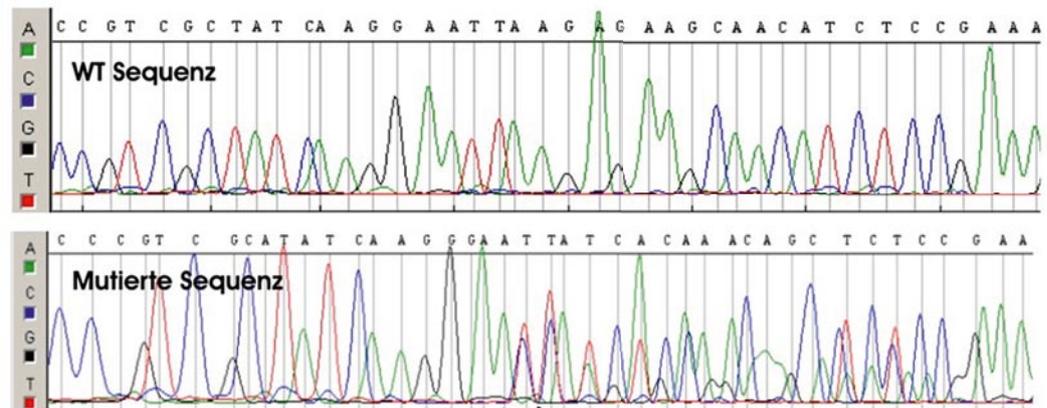
GGGCTGGCC
G857 L858 A859

Mutierte Sequenz

GGGCGGGCC
G857 R858 A859

a

Del L747-A750, T751P



WT Sequenz: T A T C A A G G A A T T A A G A G A A G C A A C A T C T C C G A A A
E746 L747 R748 E749 A750 T751

Mutierte Sequenz G A A C * C A T C T C C G A A A G C C A A C A A G G
E746 P747 S748 P749 K750 A751

b

Abb. 4 ▶ Beispiele von EGFR-Mutationen. **a** L858R ist ein Beispiel einer häufigen Punktmutation in Exon 21, Codon 858. Dabei wird das 2. Nukleotid, welches für Thymin kodiert, durch Guanin ersetzt (*). Das führt zu einer Änderung der Aminosäure: Lysin (L) wird zu Arginin (R). **b** Deletion von 12 Basenpaaren (Codon 747 bis 750) in Exon 19 mit anschließender Fusionsmutation in Codon 751 (Threonin wird zu Prolin; T751P)

seres progressionsfreies Überleben und/oder Gesamtüberleben als Patienten mit Wildtyp-EGFR [11, 12]. Die Ansprechraten von EGFR-mutierten NSCLC wird mit bis zu 70% angegeben, wobei einige Patienten hervorragend ansprechen [26]. Allerdings sind EGFR-Mutationen auch unter Chemotherapie oder Placebo mit einem verbesserten Überleben assoziiert [7, 30]. Dies lässt vermuten, dass EGFR-mutierte NSCLC generell eine günstige

re Prognose aufweisen als nichtmutierte NSCLC.

In welchem Ausmaß EGFR-Mutationen tatsächlich prädiktiv für das Ansprechen auf TKI sind und nicht nur einen Prognosefaktor darstellen, wird gegenwärtig in klinischen Studien an selektierten Patienten mit EGFR-Mutationen geprüft. Vorderhand ist die EGFR-Mutationsanalyse bei NSCLC vor EGFR-TKI-Therapie kein Standard, wird aber bei in-

dividuellen Patienten als Entscheidungskriterium eingesetzt.

Neben der EGFR-Mutation gilt eine Vermehrung der EGFR-Genkopiezahl, nachgewiesen mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), ebenfalls als aussichtsreicher prädiktiver Faktor [26, 30]. Die KRAS-Mutationsanalyse bietet sich als attraktiver negativer prädiktiver Test an, da KRAS-mutierte NSCLC praktisch nie auf EGFR-TKI ansprechen [5, 29]. Im

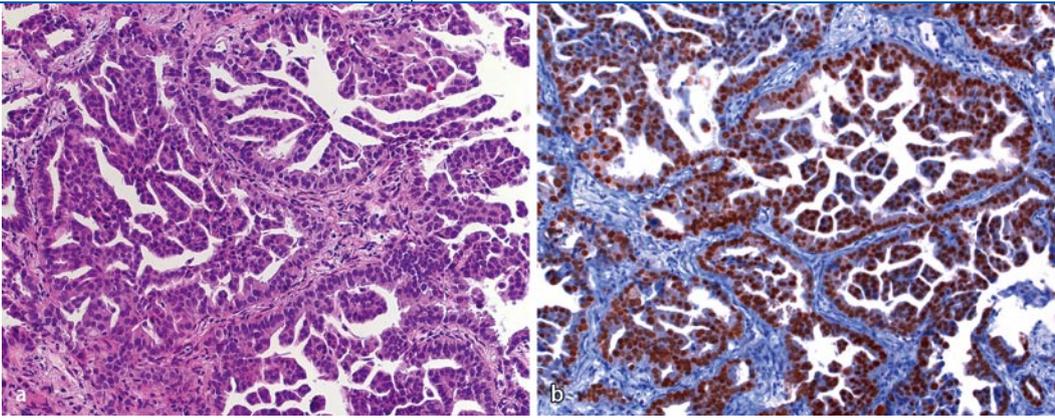


Abb. 5 ◀ Adenokarzinom mit EGFR-Mutation und TTF-1-Positivität. **a** HE-Färbung, Vergr. 20:1. **b** TTF-1-Immunhistochemie, Vergr. 20:1

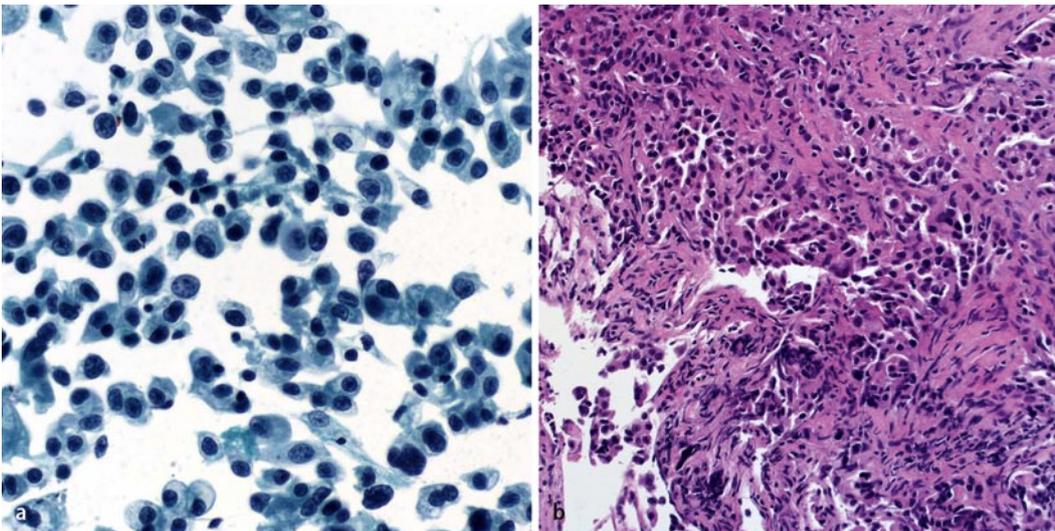


Abb. 6 ◀ Adenokarzinom der Lunge in einem transbronchialen Punktat (Zytologie) und in einer Bronchusbiopsie. **a** Reine Population von Karzinomzellen im zytologischen Präparat. **b** In der Biopsie ist das Karzinom z. T. mechanisch alteriert und zum peritumoralen Stroma hin schlecht abgrenzbar (Vergr. 40:1)

Falle einer EGFR-Sequenzierung untersuchen wir deshalb an derselben DNS heute immer auch gleichzeitig das KRAS-Gen.

Prävalenz der EGFR-Mutationen

In dieser Studie untersuchten wir prospektiv 307 NSCLC über einen Zeitraum von 4 1/2 Jahren auf eine EGFR-Mutation in den Exonen 18–21. Wir fanden in 8,1% der Karzinome relevante EGFR-Mutationen. Diese Mutationsrate liegt etwas niedriger als in anderen europäischen Studien (13–15%; [2, 15]), deckt sich aber mit unseren kürzlich veröffentlichten Daten einer klinischen Studie aus der Schweiz [5].

Die Prävalenz von EGFR-Mutationen bei unseren Patienten ist erwartungsgemäß niedriger als in Asien (55–80%; [22, 24]).

Die etwas höhere Prävalenz in den USA (10–15%) lässt sich möglicherweise auf einen höheren asiatischen Bevölkerungsanteil oder auch auf eine unterschiedliche Patientenselektion zurückfüh-

ren [17]. Übereinstimmend mit früheren Studien waren EGFR-Mutationen in Adenokarzinomen und bei Frauen signifikant gehäuft [3].

Deletionen in Exon 19 standen in unserer Serie im Vordergrund (50% aller Mutationen). Dies deckt sich mit früheren Daten, bei denen der Anteil von Exon-19-Deletionen mit 45% angegeben wird [21]. NSCLC mit einer Deletionen in Exon 19 sprechen besonders gut auf eine EGFR-TKI-Therapie an [21]. Zwei (2/25; 8%) der relevanten Mutationen in unserer Studie sind mit einer Resistenz auf EGFR-TKI assoziiert (T790M und A767V769 im Exon 20; [21]). Tatsächlich trat die T790M-Mutation in unserer Studie nachweislich unter EGFR-TKI-Behandlung auf. Auch initial hervorragend auf EGFR-TKI ansprechende NSCLC werden meist innerhalb von 12 Monaten resistent. Die T790M-Mutation ist für rund 50% der sekundären Resistenzen gegen TKI verantwortlich [10]. Diese Mutation verändert die dreidimensionale Struktur

der ATP-bindenden Stelle, was die Bindung von Erlotinib und Gefitinib verhindert. Als weiterer wichtiger Mechanismus für eine Resistenzentwicklung wurde die Amplifikation des MET-Gens identifiziert [8].

Zylogische vs. histologische Untersuchungen

Unsere Untersuchung war nicht primär auf einen Vergleich der EGFR-Sequenzierung zwischen zytologischem und histologischem Material ausgelegt. Die annähernd identische Mutationsrate in histologischen und zytologischen Präparaten (10,1% vs. 8,3%) lässt aber in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten darauf schließen, dass sich beide Materialien in gleichem Maße für eine EGFR-Mutationsanalyse eignen. Dies deckt sich auch mit den Resultaten vorhergehender Studien [5, 18, 23].

In kürzlich publizierten Empfehlungen [6] wird dagegen von EGFR-Un-

tersuchungen an zytologischen Proben abgeraten. Als Argument wird vor allem der angeblich hohe technische und zeitliche Aufwand der Tumorzellanreicherung mittels Laser-Mikrodissektion ins Feld geführt. Wir können uns dieser Beurteilung nicht anschließen. Die Laser-Mikrodissektion ist auch an histologischen Präparaten oftmals unabdingbar, um eine Vermischung von wenig Tumor-DNS mit Normal-DNS von benignen Gewebsteilen zu verhindern. Deshalb sollte eine Mikrodissektionstechnik in jedem Labor verfügbar sein, das EGFR- und andere Mutationsanalysen von diagnostischem Material anbietet. Es handelt sich dabei um eine Methode, die von technisch und morphologisch geschultem Personal ohne großen Zeitaufwand einsetzbar ist.

Histologische Biopsien zum Goldstandard zu erheben, lässt sich unseres Erachtens auch deshalb nicht rational begründen, da es sich in Biopsien und Zytologien letztlich um dasselbe Tumorzellmaterial handelt. Die alkoholbasierte Fixation zytologischer Präparate steht dabei einer erfolgreichen DNS-Extraktion, PCR und Sequenzierung nicht entgegen. Nach unserer Erfahrung reichen 30 bis 50 Tumorzellen für eine erfolgreiche Sequenzierung aus [18].

Wir verwenden jeweils dasjenige Material eines Patienten, das am besten geeignet ist. Tumorzellreichen Biopsien geben wir den Vorzug gegenüber tumorzellarmen oder stark mit reaktiven Zellen vermischten zytologischen Präparaten. Andererseits fällt die Wahl bei einer tumorzellreichen Zytologie nicht schwer, wenn die Alternative aus einem schlecht abgrenzbaren und mechanisch gequetschten Tumorfiltrat in einer Bronchusbiopsie besteht (▣ Abb. 6 a, b). Wir halten es für nicht vertretbar, in solchen Fällen eine erneute Biopsie zur Gewinnung von histologischem Material zu forcieren. Im Gegensatz zu zytologischen Präparaten ermöglichen Biopsien auf Stufenschnitten multiple standardisierte Markeruntersuchungen. Deshalb kann es im Rahmen von klinischen Studien durchaus sinnvoll sein, Biopsien für umfangreiche immunhistochemische und andere molekulare Markeruntersuchungen zu fordern.

TTF-1-Assoziation

96% (23/24) der immunhistochemisch untersuchten EGFR-mutierten NSCLC dieser Serie waren TTF-1-positiv. Dies untermauert die Resultate früherer Untersuchungen, wonach EGFR-Mutationen vor allem bei Adenokarzinomen vorkommen, die Eigenschaften von Typ-2-Alveolarepithelien besitzen und deshalb meist TTF-1-positiv sind [27, 28]. Interessanterweise scheint der Transkriptionsfaktor TTF-1 in der EGFR-Signalkaskade eine Rolle zu spielen, die aber noch nicht ausreichend untersucht ist [14, 21]. Gemäß unserer Daten ist eine EGFR-Mutationsanalyse vor allem bei TTF-1-positiven Adenokarzinomen aussichtsreich, bei Plattenepithelkarzinomen, großzelligen Karzinomen und nicht näher klassifizierbaren und TTF-1-negativen NSCLC dagegen kaum zu empfehlen.

Fazit für die Praxis

Eine EGFR-Mutationsanalyse gilt vor einer Behandlung von NSCLC mit einem EGFR-TKI wie Erlotinib derzeit nicht als Standard. Sie kann bei ausgewählten Patienten aber eine Entscheidungshilfe sein, da die Mehrzahl der Patienten mit EGFR-Mutationen von einer Therapie profitieren. Anhand klinisch-pathologischer Informationen wie Geschlecht, Herkunft, Raucherstatus, Karzinomsubtyp und TTF-1-Status lassen sich Tumoren mit nur sehr geringer Mutationswahrscheinlichkeit gut eingrenzen. Biopsien und Zytologien eignen sich in gleichem Maße für diese Analyse, sollten aber unter der Aufsicht von erfahrenen Diagnostikern oder morphologisch geschultem Personal durchgeführt werden.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. L. Bubendorf
 Institut für Pathologie, Universitätsspital Basel
 Schönbeinstr. 40, 4031 Basel, Schweiz
 lbubendorf@uhbs.ch

Interessenkonflikt. Der korrespondierende Autor gibt an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

1. Billelo KS, Murin S, Matthay RA (2002) Epidemiology, etiology and prevention of lung cancer. *Clin Chest Med* 23:1–25
2. Boldrini L, Gisfredi S, Ursino S et al (2007) Mutational analysis in cytological specimens of advanced lung adenocarcinoma: a sensitive method for molecular diagnosis. *J Thorac Oncol* 2:1086–1090
3. Ciardiello F, Tortora G (2008) EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 358:1160–1174
4. Crino L, Foglietta J, Hamzaj A (2007) Lung cancer. *J Thorac Oncol* 2:S24–S26
5. D'addario G, Rauch D, Stupp R et al (2008) Multicenter phase II trial of gefitinib first-line therapy followed by chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): SAKK protocol 19/03. *Ann Oncol* 19:739–745
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. Eberhard DA, Johnson BE, Amler LC et al (2005) Mutations in the epidermal growth factor receptor and in KRAS are predictive and prognostic indicators in patients with non-small-cell lung cancer treated with chemotherapy alone and in combination with erlotinib. *J Clin Oncol* 23:5900–5909
8. 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
9. Grossi F, Aita M, Follador A et al (2007) Sequential, alternating and maintenance/consolidation chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer: a review of the literature. *Oncologist* 12:451–464
10. Janne PA (2008) Challenges of detecting EGFR T790M in gefitinib/erlotinib-resistant tumours. *Lung Cancer* 60 (Suppl 2):S3–S9
11. Ladanyi M, Pao W (2008) Lung adenocarcinoma: guiding EGFR-targeted therapy and beyond. *Mod Pathol* 21 (Suppl 2):S16–S22
12. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350:2129–2139
13. Marchetti A, Felicioni L, Buttitta F (2006) Assessing EGFR mutations. *N Engl J Med* 354:526–528
14. Missero C, Pirro MT, Di Lauro R (2000) Multiple ras downstream pathways mediate functional repression of the homeobox gene product TTF-1. *Mol Cell Biol* 20:2783–2793
15. Murray S, Timotheadou E, Linardou H et al (2006) Mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain and associations with clinicopathological features in non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 52:225–233
16. Paez JG, Janne PA, Lee JC et al (2004) EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304:1497–1500
17. Riely GJ (2008) Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 3:S146–S149
18. 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
19. Schutze K, Niyaz Y, Stich M et al (2007) Noncontact laser microdissection and catapulting for pure sample capture. *Methods Cell Biol* 82:649–673

20. 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
21. Sharma SV, Bell DW, Settleman J et al (2007) Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* 7:169–181
22. Shigematsu H, Lin L, Takahashi T et al (2005) Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 97:339–346
23. Smith GD, Chadwick BE, Willmore-Payne C et al (2008) Detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in cytology specimens from patients with non-small cell lung cancer utilizing high-resolution melting amplicon analysis. *J Clin Pathol* 61:487–493
24. Tsao AS, Tang XM, Sabloff B et al (2006) Clinicopathologic characteristics of the EGFR gene mutation in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 1:231–239
25. Tsao MS, Sakurada A, Cutz JC et al (2005) Erlotinib in lung cancer - molecular and clinical predictors of outcome. *N Engl J Med* 353:133–144
26. Yamamoto H, Toyooka S, Mitsudomi T (2008) Impact of EGFR mutation analysis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 315–321
27. Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T et al (2005) EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 29:633–639
28. Yatabe Y, Takahashi T, Mitsudomi T (2008) Epidermal growth factor receptor gene amplification is acquired in association with tumor progression of EGFR-mutated lung cancer. *Cancer Res* 68:2106–2111
29. Zhang X, Chang A (2008) Molecular predictors of EGFR-TKI sensitivity in advanced non-small cell lung cancer. *Int J Med Sci* 5:209–217
30. Zhu CQ, Da Cunha Santos G, Ding K et al (2008) Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.21. *J Clin Oncol* 26:4268–4275

Christian Andree
Rudolf Virchow. Vielseitigkeit, Genialität und Menschlichkeit
 Ein Lesebuch

Hildesheim Zürich New York: Georg Olms Verlag 2008, 311 S., (ISBN 978-3487088228), 22,80 EUR

Rudolf (Rudolf Ludwig Carl) Virchow hat ein insgesamt gewaltiges Gesamtwerk hinterlassen, das in vielen Punkten auch heute noch aktuell ist. Wegen der breiten „Streuung“ seiner Tätigkeit – Virchow war Pathologe, Hygieniker, Sozialmediziner, Anthropologe, Ethnologe und Prähistoriker – ist es aber nicht einfach, sich über seine so verschiedenen Aktivitäten näher zu informieren, zumal es oft schwierig ist, jenseits der überwiegend leicht zugänglichen pathologisch-anatomischen Literatur an die Originalquellen heranzukommen. Christian Andree, der beste Kenner von Leben, Wirken und Werk Virchows, ist seit Jahren unermüdlich damit befasst, eine (auf 71 Bände konzipierte) kritische Gesamtausgabe der Werke Rudolf Virchows zu erstellen (vgl. *Pathologie* 2008, 29: 165–167). Ohne Frage sind die bisher publizierten 27 Bände sehr informativ, gleichwohl ist es für den individuellen Leser nicht möglich, diese Bücher „von A bis Z“ im Zusammenhang zu lesen. Um aber einer breiteren Leserschaft Wissenswertes von und über Virchow zu vermitteln, hat Andree nun in seinem aktuellsten Buch eine Auswahl von besonders wichtigen und typischen Texten zu den verschiedenen Arbeitsgebieten Virchows publiziert und diese Texte mit einleitenden oder textbegleitenden Kommentaren sowie Anmerkungen versehen.

Nach einer ausführlichen Schilderung des Lebens Rudolf Virchows folgen 5 Briefe an seinen Vater, darunter 4 aus dem Revolutionsjahr 1848. Der nächste Abschnitt erstreckt sich auf die ebenso eindrucksvollen wie sozialkritischen Berichte Virchows aus Oberschlesien aus Anlass der dortigen „Typhus-Epidemie“. Umfang und Schwere dieser Epidemie (die tatsächlich eine Fleckfieber-epidemie war) wurden durch geradezu schreckliche soziale Missstände begünstigt. Konsequenterweise und mit allem Nachdruck hatte Virchow deshalb tief greifende soziale Reformen gefordert, wie überhaupt „Bildung mit ihren Töchtern Freiheit und Wohlstand das Mittel gegen Krankheit“ seien. Mit diesen Berichten begann Virchows Karriere als mutiger und immer einsatzbereiter Sozialmediziner.

Im Abschnitt Politik werden vor allem Virchows Auseinandersetzungen mit Bismarck herausgestellt, wobei es insbesondere um die Rechte des Parlaments sowie die Duellaffäre mit Bismarck ging, ferner Texte zu Fragen der Gleichberechtigung der verschiedenen Konfessionen, diese auch in den Schulen – insgesamt 5 scharf, aber doch fair formulierte Reden im Abgeordnetenhaus, die nicht selten auch Heiterkeit und Bravour bewirkt haben. In einer dieser Reden ging es auch um Glauben und Wissen. Der Kampf zwischen Glauben und Wissen werde jedes Mal

zu Gunsten des Wissens entschieden. Virchow war durchaus ein gläubiger (protestantischer) Christ. Mit aller Entschiedenheit wandte er sich jedoch gegen einen zu starken, dogmatisch bestimmten Einfluss besonders der katholischen Kirche auf den Staat und dessen Entscheidungen. Näheres hierüber findet sich auch in dem Kapitel über den Kulturkampf. Obwohl die Erfindung des Wortes Kulturkampf, wie Andree jetzt nachgewiesen hat, nicht unmittelbar auf Virchow zurückgeht, war er doch eine der Hauptpersonen in dieser keineswegs nur parlamentarisch wichtigen Angelegenheit.

Natürlich darf ein wenigstens kurzer Abschnitt über die Medizin nicht fehlen. Hier geht es um so verschiedene Themen wie Thrombose und Embolie, „die Entwicklungsgeschichte des puerperalen Zustands bis zur Geburt“, den weit verbreiteten Alkoholmissbrauch, die auch damals schon aufflammende Tierversuchsproblematik und schließlich die Kurfürscherei. Besonders in seinen letzten Lebensjahrzehnten hatte sich Virchow zusätzlich intensiv und wissenschaftlich-systematisch mit Fragen der Anthropologie, Ethnologie, Urgeschichte und der deutschen Volkskunde befasst. Hiermit waren z. T. weite Reisen (Ägypten, Türkei Troja!, Kaukasus) verbunden. Andree hat zu diesem Abschnitt Anthropologie etc. 3 Texte ausgewählt, nämlich über das Wachstum des Menschen, über eine Reise in den Nordkaukasus und sehr anschaulich, einfühlsam und brillant formulierte „Erinnerungen an Schliemann“.

Mit großer Entschiedenheit hatte Virchow jedwede Art des Antisemitismus abgelehnt. Das wird in einem weiteren Kapitel am Beispiel eines auf heftigen Widerstand gestoßenen Wiederbesetzungsverfahrens an seinem Institut sowie durch seinen umfangreichen Briefwechsel mit seinem langjährigen Freund (und bedeutenden Sanskrit-Forscher) Theodor Goldstücker klar ersichtlich. Darüber hinaus wird in diesem Briefwechsel Virchows „menschliches Einfühlungsvermögen“ immer wieder erkennbar. Das Schlusskapitel enthält Virchows Dankesworte aus Anlass der Feierlichkeiten zu seinem 80. Geburtstag. Hier gibt Virchow einen Rückblick auf sein Leben. Noch einmal betont er, er habe „im Laufe der Zeit recht verschiedene Richtungen der Forschung und der Tätigkeit eingeschlagen“, und „ich habe je nach Umständen sowohl die Medizin und die Naturwissenschaften, als auch die Anthropologie und die Archäologie, gelegentlich auch die Literatur, die Philosophie, die Politik und die sozialen Zustände zum Gegenstand meiner Studien gemacht“.

Andree hatte bei der notwendigerweise subjektiven Auswahl der Texte „eine glückliche Hand“, und in Verbindung mit seinen Kommentaren möchte man beinahe denken, Rudolf Virchow leibhaftig in Aktion zu sehen. Der Titel dieses sehr lesenswerten Buchs trifft das Wesentliche: Rudolf Virchow – Vielseitigkeit, Genialität und Menschlichkeit.

Dieter Harms, Kiel