

Tyrosinkinase in Weichgewebstumoren

Hintergrund

Weichgewebssarkome sind seltene, heterogene und überwiegend hochmaligne Tumoren, die eine mesenchymale Liniendifferenzierung aufweisen. Lokale Rezidive sind häufig (20%) und Metastasen entstehen in ca. einem Drittel der Fälle [2, 16]. Prognostische und prädiktive Marker sollten in Weichgewebstumoren die Therapie nach der chirurgischen Therapie lenken. Die neoadjuvante Therapie wird in einer steigenden Anzahl an Fällen durchgeführt und verbessert offensichtlich die Prognose bei einigen hochmalignen Sarkomen. Die Indikation für eine adjuvante Chemotherapie für hochmaligne Sarkome ist immer noch Stand der Diskussion, und neue diagnostische, prädiktive und prognostische Marker werden dringend gebraucht [8, 13]. Diese Biomarker sollten idealerweise die Therapie bestimmen und speziell eine tumor- bzw. patientenbezogene Therapie einleiten.

Die Angiogenese ist ein Prozess, bei dem neue Blutgefäße aus schon vorhandenen entstehen. Folkman [3] hat erkannt, dass Tumoren nicht über 2 mm wachsen, ohne neue Blutgefäße zu bilden [9, 10, 18]. Im Jahr 2001 nahmen Hanahan u. Weinberg [7] die Angiogenese mit in ihre „Bausteine der Krebsentstehung“ auf und in der neuen Auflage von 2011 ist die Angiogenese immer noch eine der wichtigsten Grundlagen der Krebsentstehung.

Verschiedene Medikamente, die die Angiogenese hemmen, sind in den letzten Jahren entwickelt worden und sind derzeit in Phase-2- und -3-Studien oder werden in vitro untersucht [5].

Vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (Vascular Endothelial Growth Factors, VEGFs) und die korrespondierenden Tyrosinkinase-Rezeptoren (VEGFRs) sind entscheidend bei der Endothelzellproliferation und Aussprossung bzw. der Entstehung und dem Längengewachstum der Blut- und Lymphgefäße [17]. Die VEGFs sind schon in einer kleinen Anzahl von Studien überprüft worden, über die Rezeptoren, also die VEGFRs, ist bis jetzt jedoch noch wenig bekannt.

Weiterhin spielen die Platelet-Derived Growth Factors (PDGFs) und deren Rezeptoren (PDGFRs) eine wichtige Rolle bei der Regulation des Tumorstromas und der Rekrutierung der Perizyten und der glattmuskulären Zellen, welche bei der Stabilisierung der neuen Blutgefäße bzw. der Stimulation der Stromazellen helfen und VEGFA produzieren, um so die Angiogenese voranzutreiben [4, 14].

Da bis jetzt über die Expression der Rezeptoren der Tyrosinkinase in Sarkomen noch wenig bekannt ist und nur wenige Daten in größeren Sarkomkollektiven vorliegen, waren unsere Ziele:

- die Sarkome der Ludwig-Maximilians-Universität in München zu cha-

- rakterisieren und nach der neuen WHO-Einteilung zu kategorisieren,
- den Expressionsstatus von Tyrosinkinase in verschiedenen Subtypen der Sarkome zu überprüfen und
- den Expressionsstatus mit den klinikopathologischen Parametern zu vergleichen.

Methoden

Patientenkollektiv

Gewebearrays („tissue microarrays“, TMAs) von 275 Patienten wurden erstellt. Die Proben entstammten überwiegend den chirurgisch eingesandten Operationspräparaten des Sarkomzentrums der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Die klinischen Daten wurden dem Pathologiebericht bzw. der Datenbank der klinischen Studien entnommen (ClinicalTrials.gov, number NCT 00003052 [8]). Zusätzlich wurden die Proben erneut begutachtet (Tumortyp entsprechend der aktuellen WHO-Einteilung und Graduierung). Fast alle Patienten wurden chirurgisch behandelt und anschließend wurde ggf. eine Radiotherapie entsprechend den ESMO-Richtlinien durchge-

Tab. 1 Antikörper und Vorbehandlung

Antigen	Produktnummer	Hersteller	Verdünnung	Vorbehandlung
VEGFR-1	Ab32152	Abcam	1:50	Mikrowelle
VEGFR-2	2479	Cell Signaling	1:100	Mikrowelle
VEGFR-3	NCL-LVEGFR3	Novocastra	1:20	Mikrowelle
PDGFR-A	3174	Cell Signaling	1:150	Mikrowelle
PDGFR-B	Sc339	Santa Cruz	1:150	Mikrowelle

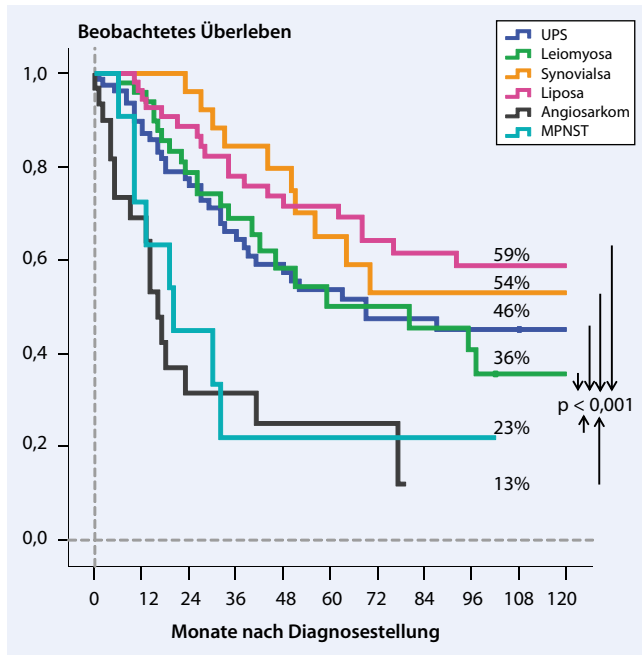


Abb. 1 ▲ 10-Jahres-Überlebenskurven in Abhängigkeit von der Histologie (UPS, n=81, Leiomyosarkom, n=50, Synovialsarkom, n=28, Liposarkom, n=57, Angiosarkom, n=32; MPNST, n=11). UPS undifferenziertes pleomorphes Sarkom, MPNST maligner peripherer Nervenseidentumor

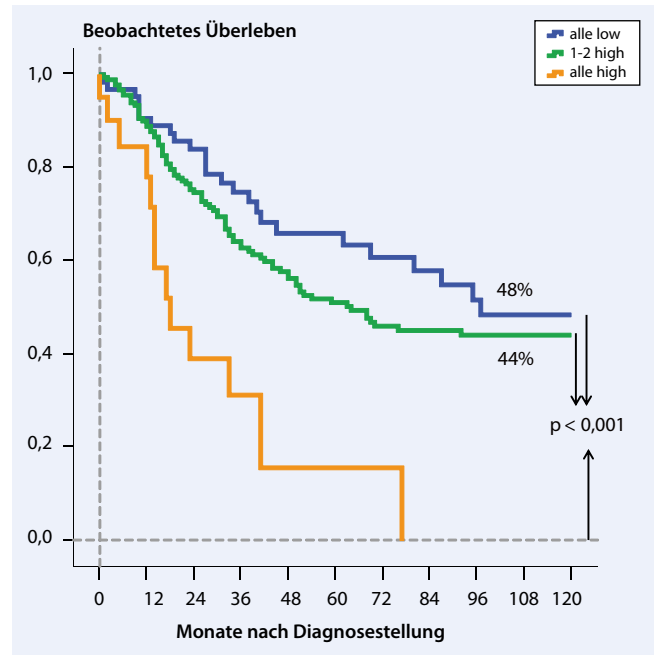


Abb. 2 ▲ Univariate Überlebensanalyse der Tumoren in Abhängigkeit von der VEGFR-1- bis 3-Expression

führt (ESMO/Sarcoma Network Working Group). Das Alter der Patienten lag zwischen 18 und 81 Jahren (Median 54 Jahre, weiblich n=135, männlich n=140). Die Tumoren waren lokalisiert in den Extremitäten (n=92) und Nichtextremitäten (n=183). Die mediane Follow-up-Zeit war 34 Monate für alle Patienten, 60 Monate für die 151 noch Lebenden und 23 Monate für die schon Verstorbenen.

TMA-Konstruktion

Der Sarkom-TMA wurde erstellt mit 0,6 mm Stanzen in Duplikaten von allen 275 Proben einschließlich Normalgewebe entsprechend standardisierter Methode [12].

Immunhistochemie der Tyrosinkinasen

Die immunhistologische Färbung wurde an 5 µm dicken Gewebeschnitten durchgeführt. Kommerziell verfügbare Antikörper gegen VEGFR-1, 2, 3 und PDGFR-A, B wurden angewendet (Tab. 1). Die Immunhistochemie wurde in standardisierter Weise durchgeführt. Die Schnitte wurden wie in Tab. 1 vorbehandelt

und dann mit den Antikörpern inkubiert. Weiterhin wurde die PDGFRB-Färbung mit dem Ventana-Benchmark-XT-Färbesystem mit dem XT ultraView DAB-Kit (Ventana Medical Systems) durchgeführt. Alle Schnitte wurden Hämatoxylin (Vector) gegengefärbt. Um eine unspezifische Färbung auszuschließen, wurden Systemkontrollen durchgeführt. Die Färbungen wurden evaluiert und semiquantitativ ausgewertet:

- 0 negativ,
- 1 gering,
- 2 mäßig,
- 3 stark positiv.

Für die statistische Auswertung wurde die Gruppe 0/1 als niedrige Expression und 2/3 als hohe Expression zusammengefasst. Die statistische Auswertung wurde mit dem SPSS-Programm Version 20 durchgeführt (SPSS, Chicago, IL), wobei Werte von <math>< 0,05</math> als signifikant angesehen wurden.

Ergebnisse

Die gezielte Hemmung der Angiogenese ist eine vielversprechende Strategie zur Krebsbekämpfung [3, 7]. Vaskuläre en-

dotheliale Wachstumsfaktoren (VEGFs) und ihre Rezeptoren (VEGFR-1–3) spielen hierbei eine sehr wichtige Rolle. Wir analysierten in einer Studie die Expression der VEGFRs und PDGFRs in einem sehr großen Kollektiv von Weichgewebstumoren. Als Standardmethode wurde hierbei die TMA-Technologie und die Immunhistochemie als In-situ-Proteinanalyse verwendet. Die Kombination dieser beiden Methoden ermöglicht die Untersuchung von hunderten von Proben in sehr standardisierter Art und Weise [6]. In unserer früheren Publikation an einem etwas kleineren Kollektiv konnten wir zeigen, dass die Heraufregulation von p16(INK4A) mit einer Senescence-Barriere assoziiert war und eine Herunterregulation von p16(INK4A) mit einem kürzeren Überleben signifikant korreliert war [11]. In dieser Studie erweiterten wir unser Tumorkollektiv und untersuchten die VEGF- und PDGF-Rezeptoren, um eventuell Gruppen zu finden, die von einer sogenannten gezielten Therapie profitieren. Die VEGF-Rezeptoren (VEGFRs) gehören zur Familie der Tyrosinkinaserzeptoren. Insgesamt wurden bis jetzt 3 Rezeptoren identifiziert [15]:

- VEGFR-1, auch bekannt als Flt-1 (fms-like TK1),
- VEGFR-2 oder auch KDR („kinase insert domain-containing receptor TK“) und
- VEGFR-3, auch bekannt als Flt-4 (fms-like TK4).

Unser Tumorkollektiv zeigte eine hohe Expression von VEGFR-1 in 61%, VEGFR-2 (KDR) in 11%, VEGFR-3 in 64%, PDGFR-A in 42% und PDGFR-B in 73%. Eine hohe Expression von VEGFR-1–3 war mit einem kürzeren Überleben assoziiert (■ **Abb. 1, 2**).

Diskussion

Nach unserem Kenntnisstand erstellten wir eines der derzeit größten Tumorkollektive von Weichgewebstumoren mit dem entsprechenden Überleben der Patienten und untersuchten dies auf die Expression von VEGFRs und PDGFRs. Wir konnten zeigen, dass eine hohe Expression mit einer Tumorprogression assoziiert war. Bis jetzt gibt es nur wenige Studien an Sarkomen und den Rezeptoren der Tyrosinkinase. Im Jahre 2009 publizierten Abdeen et al. [1] bei 48 Patienten mit Osteosarkomen, dass eine hohe VEGFR-3-Expression mit einem reduzierten Überleben korrelierte. Zwei Jahre später zeigte eine Gruppe aus Japan, dass VEGFR-2 und PDGFR-B das Überleben bei Angiosarkomen beeinflusst [19].

Vor kurzem publizierten Kilvaer et al. [9] eine Studie mit 181 Patienten, in der sie den Einfluss von VEGFRs auf rezidivfreies, metastasenfreies und krankheitsspezifisches Überleben in Abhängigkeit von der Tumorklassifikation und der Therapie zeigten. Weiterhin wiesen dieselben Autoren [10] nach, dass ein hohes VEGFR-3 bei weiten operativen Sicherheitsabständen signifikant mit einem kürzeren Überleben korreliert. Wir fanden in unserer Studie, dass eine hohe Expression von VEGFRs mit der Tumorprogression assoziiert ist und unabhängig von der Lokalisation und der Therapie mit einem kürzeren Überleben der Patienten korreliert. Die Überlebensanalyse zeigte, dass die 21 Patienten, bei denen alle 3 VEGFRs hoch exprimiert waren, eine statistisch signifikant schlechtere Überlebensrate hatten

Pathologe 2014 · [Suppl 2] · 35:198–201 DOI 10.1007/s00292-014-1958-3
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

T. Knösel · E. Kampmann · T. Kirchner · A. Altendorf-Hofmann
Tyrosinkinase in Weichgewebstumoren

Zusammenfassung

Die Entwicklung von Medikamenten, die molekulare Alterationen blockieren, welche entscheidend sind für die Tumorentstehung, ist derzeit eine extrem wichtige Herausforderung. Die erfolgreiche „GIST-Story“ (gastrointestinaler Stromatumor) gibt neue Impulse für mögliche weitere Medikamente, die sogenannte aktivierende Mutationen oder auch Treibermutationen hemmen können. Tyrosinkinase und Tyrosinkinase-Rezeptoren sind vielversprechende Angriffspunkte für eine sogenannte zielgerichtete Therapie, neue Medikamente sind zurzeit in Phase-2- und -3-Studien. Wir haben in einem großen Tumorkollektiv die Rezeptoren verschiedener Tyrosinkinase-Rezeptoren überprüft und die Resultate mit den klinisch-pathologischen Parametern verglichen. Aus der Chirurgischen Klinik der Ludwigs-Maximilians-Universität (LMU) München wurden 275 Sarkome der letzten 20 Jahre erneut begutachtet und nach der neuen WHO Einteilung kategorisiert. Zusätzlich wurden einzelne Tyrosinkinase, die Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien sind, immunhistologisch angefärbt. Einzelne Tumorentitäten zeigten unterschiedliche Über-

lebenskurven in den Kaplan-Meier-Kurven. Zusätzlich konnte eine distinkte Expression verschiedener Tyrosinkinase-Rezeptoren bei den einzelnen Subentitäten gesehen werden. Die Rezeptoren der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren zeigten bei hoher Expression eine Korrelation mit der Tumorprogression. Wenn alle Vascular Endothelial Growth Factor Receptors (VEGFRs) hoch exprimiert waren, zeigten die Patienten ein signifikant schlechteres Überleben. Da nicht alle Patienten auf eine gezielte Tyrosinkinase-Inhibitortherapie ansprechen, sollten die Angriffspunkte der Medikamente und sogenannte Proteinsignaturen, die für verschiedene Signaltransduktionswege wichtig sind, vor der Therapie analysiert werden, um eine optimale personalisierte Therapie zu gewährleisten.

Schlüsselwörter

VEGFR (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) · PDGFR (Blutplättchen hervorgegangener Wachstumsfaktor) · Sarkome · Immunohistochemie · Überleben

Tyrosine kinases in soft tissue tumors

Abstract

The development of therapeutic agents that specifically target the molecular alterations critical for tumorigenesis has a tremendous impact on the management of cancer patients. The successful treatment of advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) with receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitors has raised the hope that other malignancies could also benefit from a similar treatment. Tyrosine kinase receptors are promising targets for personalized medicine and new drugs are currently in phase 2 and phase 3 clinical trials. We analyzed a large cohort of soft tissue sarcomas for different tyrosine kinase receptors and correlated the results with clinicopathological parameters. A total of 275 soft tissue sarcomas from the Ludwig-Maximilians University (LMU) were re-

visited and categorized according to the current World Health Organization (WHO) classification system. Different entities showed distinct survival curves in 10-year long-term survival. Furthermore, different subtypes of sarcomas showed distinct expression profiles at the protein level. The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors is associated with tumor progression. Due to the fact that not all patients respond to RTK inhibitor therapy, protein signatures should be evaluated before targeting therapy to give a rationale for a viable personalized therapy.

Keywords

Vascular endothelial growth factor receptor · Platelet-derived growth factor receptor · Sarcoma · Immunohistochemistry · Survival

ten als die anderen. Insbesondere hat von diesen Patienten bislang keiner 10 Jahre überlebt. Hingegen gab es bei den 64 Patienten, bei denen alle 3 VEGFRs niedrig exprimiert waren, 9 Patienten, welche 10 Jahre überlebten, von den 190 rest-

lichen Patienten haben 27 mehr als 10 Jahre überlebt (■ **Abb. 2**).

Der orale Tyrosinkinaseinhibitor Pazopanib ist für die Therapie der Patienten mit hochmalignen Sarkomen bei nicht wirksamer Erstlinientherapie ge-

nehmt. Die Hauptangriffspunkte sind VEGFR-1–3 und PDGFR-A/B. In der Phase-3-Studie mit PALETTE verlängerte die Therapie mit Pazopanib das Gesamtüberleben signifikant (12,5 vs. 10,7 Monate) und es gab mäßig starke Nebenwirkungen. Die Therapie mit Pazopanib war assoziiert mit einer niedrigen Gesamtansprechrate (6%), einer sehr guten Rate an Krankheitsstabilisierung (67%), jedoch auch in 23% der Fälle mit einer Tumormprogression [18]. Weil einige der Tumoren nicht auf die Therapie ansprechen, sind weitere Studien nötig und ggf. sollten vorher der Rezeptorstatus bzw. bestimmte Proteinsignaturen überprüft werden, um dann eine gezielte Therapie einzuleiten.

Fazit für die Praxis

- In unserem Tumorkollektiv der Ludwig-Maximilians-Universität zeigen die nach der neuen WHO-Einteilung kategorisierten Sarkome beim 10-Jahres-Überleben distinkte Überlebensverläufe in den Kaplan-Meier-Kurven.
- Verschiedene Tyrosinkinaserzeptoren zeigen ein distinktes Expressionsmuster in bestimmten Subgruppen der Sarkome.
- Die vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren (VEGFRs) sind mit der Tumormprogression in Sarkomen assoziiert.
- Da nicht alle Patienten bei zur Zeit laufenden klinischen Phase-2- und -3-Studien auf eine Rezeptortyrosinkinaseinhibitorthherapie ansprechen, sollten die Angriffspunkte der Medikamente bzw. bestimmte Proteinsignaturen für entscheidende Signaltransduktionswege vor der zielgerichteten Therapie bestimmt werden, um dann eine personalisierte Therapie durchzuführen.

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. T. Knösel
Pathologisches Institut, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU)
Thalkirchnerstr. 36, 80337 München
thomas.knoesel@med.uni-muenchen.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. T. Knösel, E. Kampmann, T. Kirchner und A. Altendorf-Hofmann geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine Studien an Menschen oder Tieren.

The supplement this article is part of is not sponsored by the industry.

Literatur

1. Abdeen A, Chou AJ, Healey JH et al (2009) Correlation between clinical outcome and growth factor pathway expression in osteogenic sarcoma. *Cancer* 115:5243–5250
2. Fletcher CDM, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (2013) WHO classification of tumours of soft tissue and bone. IARC Press, Lyon
3. Folkman J (1972) Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg* 175:409–416
4. Fredriksson L, Li H, Eriksson U (2004) The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:197–204
5. Gacche RN, Meshram RJ (2014) Angiogenic factors as potential drug target: efficacy and limitations of anti-angiogenic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1846:161–179
6. Hamidov Z, Altendorf-Hofmann A, Chen Y et al (2011) Reduced expression of desmocollin 2 is an independent prognostic biomarker for shorter patients survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol* 64:990–994
7. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144:646–674
8. Issels RD, Lindner LH, Verweij J et al (2010) Neoadjuvant chemotherapy alone or with regional hyperthermia for localised high-risk soft-tissue sarcoma: a randomised phase 3 multicentre study. *Lancet Oncol* 11:561–570
9. Kilvaer TK, Smeland E, Valkov A et al (2014) The VEGF- and PDGF-family of angiogenic markers have prognostic impact in soft tissue sarcomas arising in the extremities and trunk. *BMC Clin Pathol* 14:5
10. Kilvaer TK, Valkov A, Sorbye S et al (2010) Profiling of VEGFs and VEGFRs as prognostic factors in soft tissue sarcoma: VEGFR-3 is an independent predictor of poor prognosis. *PLoS One* 5:e15368
11. Knösel T, Altendorf-Hofmann A, Lindner L et al (2014) Loss of p16(INK4a) is associated with reduced patient survival in soft tissue tumours, and indicates a senescence barrier. *J Clin Pathol* 67:592–598
12. Knösel T, Emde A, Schluns K et al (2005) Immunoprofiles of 11 biomarkers using tissue microarrays identify prognostic subgroups in colorectal cancer. *Neoplasia* 7:741–747
13. Knösel T, Heretsch S, Altendorf-Hofmann A et al (2010) TLE1 is a robust diagnostic biomarker for synovial sarcomas and correlates with t(X;18): analysis of 319 cases. *Eur J Cancer* 46:1170–1176
14. Ostman A (2004) PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev* 15:275–286

15. Ranieri G, Mammi M, Donato Di Paola E et al (2014) Pazopanib a tyrosine kinase inhibitor with strong anti-angiogenic activity: a new treatment for metastatic soft tissue sarcoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 89:322–329
16. Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A et al (2012) Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PLoS One* 7:e47068
17. Tammela T, Enholm B, Alitalo K et al (2005) The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 65:550–563
18. Van Der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP et al (2012) Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 379:1879–1886
19. Yonemori K, Tsuta K, Ando M et al (2011) Contrasting prognostic implications of platelet-derived growth factor receptor-beta and vascular endothelial growth factor receptor-2 in patients with angiosarcoma. *Ann Surg Oncol* 18:2841–285