



S. Scheil-Bertram¹ · V. Krenn² · K. Hauptmann³

¹ Institut für Pathologie und Zytologie, HELIOS Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden, Wiesbaden, Deutschland

² Zentrum für Histologie, Zytologie & Molekulare Diagnostik, Trier, Deutschland

³ Institut für Pathologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Charité Campus Mitte (CCM), Berlin, Deutschland

Sitzungsbericht der AG Knochen-, Gelenk- und Weichgewebspathologie

DGP-Tagung am 31. Mai 2015

Zum siebten Mal tagte die Arbeitsgemeinschaft der Knochen-, Gelenk- und Weichgewebspathologie (AG). Es wurde ein breites Spektrum an Themen aus unterschiedlichen Forschungsgebieten präsentiert. Erneut gelang es der AG, nicht nur Beiträge zu neuen molekularen Aspekten der Weichteil- und Knochensarkome (teilweise wurden diese schon an anderen Tagen im Rahmen der AG Molekularpathologie vorgestellt), sondern auch orthopädische Fragestellungen zur Verbesserung der Diagnostik in der Gelenkinfektionspathologie für die Sitzung der AG zu gewinnen. Ferner wurde ein technischer Beitrag zur Qualitätssicherung von Multi-Tissue-Blöcken in der Immunhistochemie umfangreich diskutiert.

Aus der Ulmer Arbeitsgruppe von Professor Möller stellte Herr von Witzleben („Chordomzelllinien sprechen gleichermaßen auf die pharmakologische Inhibition des CDK4/CDK6-Pathways an. Präsentation von 6 neuen Chordomzelllinien und Definition eines potenziellen immunhistologischen Responder-Profiles“) Daten aus seiner Dissertation zum Thema Chordomtherapie vor. Diese seltenen Tumore treten zumeist im Bereich des Sakrums auf. In der Regel wird eine komplette Resektion angestrebt und diese mit postoperativer Bestrahlung kombiniert oder auch eine Schwerionenbestrahlung bei Schädelbasistumoren erwogen. Für die Standardtherapie liegt noch keine einheitliche zielgerichtete Therapie vor, wenngleich vielversprechende therapeuti-

sche Ansätze mit Tyrosinkinaseinhibitoren vorliegen. Eine sensitive Mutation ist für diese Therapeutika bislang nicht identifiziert. Der Ulmer Arbeitsgruppe gelang es, mehrere Chordomzelllinien dieser langsam wachsenden Neoplasien zu etablieren. Mithilfe von genomischen, mRNA- und Proteinprofiling-Methoden, die speziell den CDK4/6-Signalweg betreffen, gelang es der Ulmer Arbeitsgruppe in einer Inhibitionsstudie mit dem CDK4/6-Inhibitor Palbociclib erste Hinweise auf eine zielgerichtete Therapie in diesen lokal aggressiven und oft rezidivierenden Tumoren zu finden. Die Gruppe analysierte zusätzlich 43 Chordomen und identifizierte Biomarker für eine potenzielle Respondergruppe (87%). Hieraus könnten sich Ansätze für Targeted-Therapie-Strategien in Chordomen entwickeln.

Der von Frau Casadonte („Untersuchung von Proteinen/Peptiden neutrophiler Granulozyten in periprothetischen Gewebe mittels Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) imaging“) eingereichte Artikel wurde von Herrn Mark Kriegsmann vorgestellt. Aktuell gibt es keine weltweit akzeptierten histomorphologischen Grenzwerte, ab wann man von einem Infekt bei Arthritis und/oder bei Gelenkersatz spricht. Diese Diagnose stellt immer noch eine interdisziplinäre Herausforderung dar, da bei Low-grade-Infekten ein geringer Mikroorganismenanteil vorliegt und der Keimnachweis schwierig sein kann. Es stellte sich die Frage, ob die MALDI-TOF-Massenspektro-

metrie hier das Methodenspektrum hilfreich erweitern kann. Es wurden 60 Paraffinmaterial (FFPE)/FFPE-Gewebe von Synovialmembranen analysiert [30 neutrophilenreiche Proben mit > 20 Neutrophilen je "High Power Field" (HPF) und 30 neutrophilenarme Proben]. Es fand sich ein hochsignifikant unterschiedlicher Proteinnachweis zwischen beiden Gruppen. Es wurden folgende Proteine identifiziert (Abb. 1): Calgranulin C (S 100-A12), Annexin-A1 (m/z 660.273), Histone H2A (m/z 944.533) und Calgizzarin (m/z 1349.621; $p < 0,000001$; [1]). Möglicherweise kann diese proteomische Methode das methodologische Spektrum für die Infektdiagnose verbessern. Ob die MALDI-Imaging-Methode als Routineverfahren und zuverlässiger Test bei dem Screening von Prothesenpräparaten an periprothetischem FFPE-Gewebe eingesetzt werden kann, muss noch in weiteren Studien geklärt werden.

Anschließend stellte Frau Schmitz („MET-Amplifikation ist ein potenzielles therapeutisches Target in undifferenzierten pleomorphen Sarkomen“) eine Multicenterstudie aus Göttingen, Münster und Kassel vor. Undifferenzierte pleomorphe Sarkome (UPS) treten mit einer Inzidenz von 1 bis 2/100.000/Jahr auf, haben hohe Rezidivraten und ein hohes Metastasierungsrisiko. Die 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 50–60%. In der Studie wurden 36 UPS zunächst mit je 2 Stanzproben im "Tissue Micro Array" (TMA) untersucht. Die Kohorte wurde mithilfe

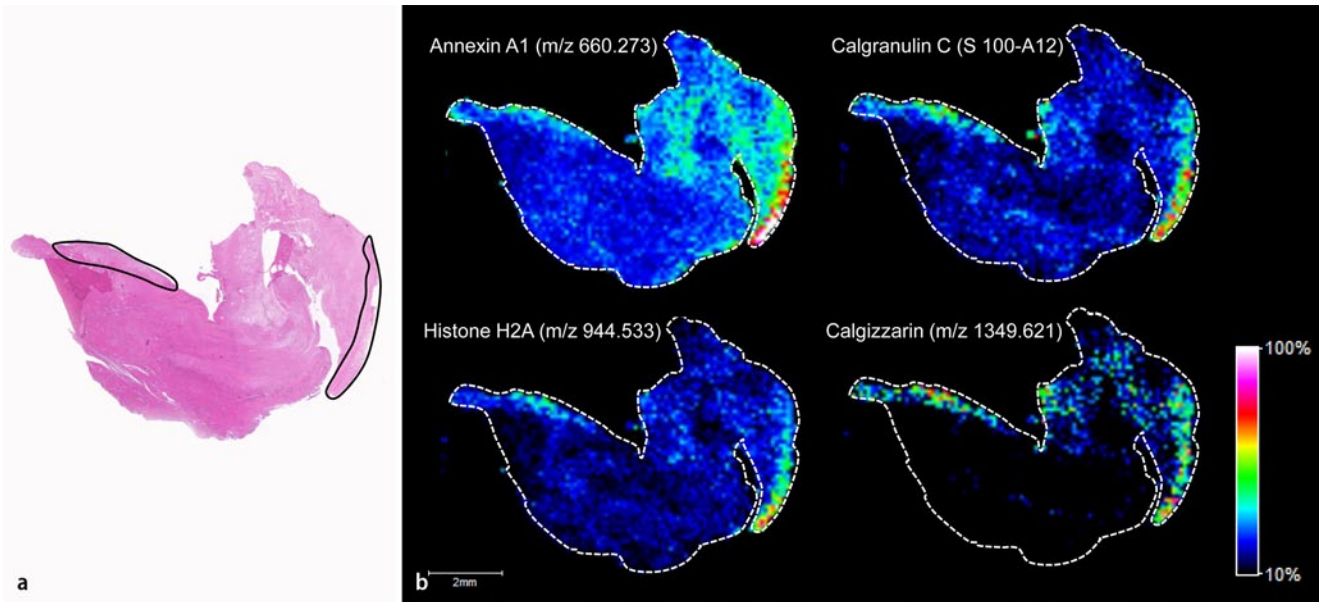


Abb. 1 ▲ **a** HE-Färbung: periprothetisches Gewebe mit Arealen mit > 20 neutrophilen Granulozyten pro hochauflösendem Gesichtsfeld (schwarze Umrandung). **b** MALDI-Bildgebung: Die Verteilung von 4 Peptidionen (Annexin A1, Calgranulin C, Histone H2A und Calgizzarin) ist dargestellt. Diese sind mit neutrophilen Granulozyten assoziiert und stellen somit mögliche prädiagnostische Biomarker für die Diagnose einer periprothetischen Infektion dar. (Mit freundl. Genehmigung von Herrn K. Kriegsmann)

fe der kommerziellen c-MET-FISH-Sonde (ZytoLight® SPEC MET/CEN 7 Dual Color Probe) und immunhistochemisch mit einem validierten, kommerziellen c-MET-Antikörper (Rabbit Monoclonal Primary Antibody, clon SP44, Ventana) analysiert. Die Auswertung der FISH erfolgte nach Kriterien von Schildhaus et al. [2]. Die Ergebnisse der Immunhistochemie wurde nach Empfehlungen von Koeppe et al. [3] ausgewertet. Insgesamt fand sich bei 19 % der TMA-UPS-Proben ein positiver MET-FISH-Befund. An Großflächenschnitten des Tumors wurden daraufhin bislang die 6 positiven Fälle und zusätzlich 4 weitere UPS-Proben mittels der FISH analysiert. Erstaunlicherweise zeigen die Tumore an Großflächenschnitten eine erhebliche intratumorale Heterogenität. Durch die ergänzende Untersuchung konnten 3 weitere positive UPS identifiziert werden. Es fand sich keine Korrelation zwischen Immunhistochemie oder FISH-Analyse. Teile dieser Arbeit wurden kürzlich publiziert [4]. Welche Methode für die Identifikation der Patienten mit therapeutischem Target valide geeignet ist, ist noch nicht komplett geklärt (Nachweis der MET-Amplifikation in FISH vs. Nachweis der Proteinüberexpression mit kommerziellen

Antikörpern). In Zukunft könnten mit den hier angewandten Methoden möglicherweise UPS-Patienten für spezielle Tyrosinkinaseinhibitoren-Studien identifiziert werden.

Herr Lüke („Der Nachweis der H3F3A-Genmutation ist charakteristisch für Riesenzelltumoren des Knochens und ist vorhanden in der Riesenzelltumorlinie U-GCT-1“) stellte eine weitere Arbeit aus der Ulmer Arbeitsgruppe vor. Der Schwerpunkt dieser Arbeit waren Riesenzelltumoren (RZT). Die Differenzialdiagnose ossärer riesenzellreicher Läsionen bereitet häufig Probleme. Von Flanagan et al. [5] konnte im RZT eine Mutation im *H3F3*-Gen beschrieben werden, die in fast 90 % der Fälle zu finden war. Mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sanger-Sequenzierung wurden in Ulm insgesamt 31 riesenzellreiche Läsionen, darunter auch Fälle von aneurysmatischen Knochenzysten (AKZ) und riesenzellreiche Sarkome, hinsichtlich dieser Mutation im *H3F3*-Gen untersucht. Ferner wurde auch die erste in Ulm etablierte Zelllinie eines RZT (UGCT-1) hinsichtlich dieser Alteration überprüft. Eine Mutation im *H3F3*-Gen fand sich nicht nur in den RZTs, sondern auch in der Zelllinie UGCT-1. In UGCT-1 konnte zusätzlich

eine starke Hypomethylierung nachgewiesen werden, die nach Gabe eines Methylendonors, wie z. B. SAM, reversibel war. Mittels ELISA konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie UGCT-1 vermehrt den RANK-Liganden synthetisiert. Die Beobachtung in der Zelllinie UGCT-1 lässt vermuten, dass Genmutationen, die das Histone H3 kodieren, mit einer globalen Hypomethylierung gekoppelt sind. Dies ist bereits von H3-Mutationen in kindlichen Glioblastomen bekannt [6]. Der Nachweis der Mutation ist in der Differenzialdiagnose des RZT bzw. von riesenzellreichen Läsionen des Knochens hilfreich.

Herr Knösel stellte die Studie aus seiner Arbeitsgruppe vor (E. Kampmann et al.: „Tumorer infiltrierende Lymphozyten sind mit einem kürzeren Überleben und der Graduierung in Weichgewebstumoren assoziiert“): Die Rolle der den Tumorer infiltrierenden Lymphozyten (TILs) als Prognosemarker ist in einer Reihe von Karzinomen beschrieben. Dagegen ist deren Bedeutung in Weichgewebssarkomen bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Studie wurden 279 Weichgewebssarkome auf TILs untersucht und mit klinisch-pathologischen und Prognosemarkern, wie z. B. dem Langzeitüberleben, korreliert. Hohe Werte für TILs (30 %) wur-

den in 84 undifferenzierten pleomorphen Sarkomen (UPS) gefunden, außerdem in 19 % von 53 Leiomyosarkomen, in 18 % von 50 untersuchten dedifferenzierten Liposarkomen, in 10 % von 29 Angiosarkomen, in 4 % von 11 MPNSTs sowie in 8 % von 23 Mischsarkomen. In den untersuchten Synovialsarkomen waren die TILs nicht erhöht. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass die Zahl der TILs mit höherem Grading korreliert. So konnten in 69 % der Grad-2-Tumoren und in 85 % der G3-Tumoren 4 oder mehr TILs ($p=0,002$) nachgewiesen werden. In einer univariaten und multivariaten Analyse, die die Expression der TILs, das Grading, die Abwesenheit von Fernmetastasen sowie die Art der Operation (radikal oder nicht) bzw. die neoadjuvante Chemotherapie einschloss, konnte gezeigt werden, dass TILs signifikant mit einem kürzeren Patientenüberleben und mit einem hohen Malignitätsgrad assoziiert sind. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass eine TIL-basierte Immunotherapie, wie z. B. eine Anti-PD-L1-Gabe, einen neuen Ansatz in der Behandlung der Weichgewebssarkome darstellen kann.

Der Beitrag von Herrn A. Jungbluth und seiner technischen Mitarbeiterin D. Frosina („Eine verbesserte Methode zur Herstellung von Gewebe-Arrays mittels eines Trägermediums“) stieß ebenfalls auf großes Interesse und hätte durchaus auch einen Stellenwert in einer Sitzung gemeinsam mit den medizinisch-technischen Mitarbeitern finden können. Im Rahmen von immunhistochemischen oder molekularpathologischen Analysen gewinnen Paraffinblöcke mit mehr als einem Gewebe u. a. als Kontrollgewebe immer mehr an Bedeutung. In Abhängigkeit von Größe und Anzahl des Gewebes werden sie als Multi-Tissue-Blocks (MTBs) oder Tissue-Micro-Arrays (TMAs) bezeichnet. Während MTBs verschiedene größere Gewebeproben enthalten, bestehen TMAs aus mehreren 100 Gewebestanden (Testfeldern) von gewöhnlich <1 mm. Die Anzahl der Gewebeproben in MTBs ist aufgrund der Größe und Form der einzelnen Proben begrenzt, und in TMAs kommt es immer wieder aufgrund des mehrfachen Trimmens bzw. Anschneidens des Gewebes zu hohem und unnötigem Gewebeerlust. Deshalb wur-

de am New York Sloan-Kettering Cancer Center eine Methode zur Optimierung der Verwendung von MTBs und TMAs entwickelt, die vorgestellt wurde. Benutzt wird dafür ein Akzeptormedium/-gewebe, das die Qualität und Anzahl der eingebetteten Gewebezylinder garantiert. Dafür wurden die Gewebezylinder (Donorgewebe) für die MTBs mit Stanznadeln gewonnen, die routinemäßig in der Dermatologie verwendet werden. Sie werden in ein zirkuläres Akzeptorgewebe großen Durchmessers eingelassen, das nach Entnahme aus einem Block neu eingebettet wurde. Dieses Gewebe, z. B. Milz, dient als Stützgewebe. Es enthält Poren, die durch Stanznadeln größeren Durchmessers eingelassen wurden. In diese Poren werden die anfangs beschriebenen Gewebezylinder (Donorgewebe) gegeben. Nachdem das Paraffin nochmals erwärmt wurde, können die Gewebezylinder eingelassen werden, und man erhält eine weitgehend plane Oberfläche mit den vorbereiteten Poren. Die gleiche Technik wird für TMAs angewendet, statt der Oberfläche des Paraffins wird ein Carrier-Gewebe-medium verwendet. Das Verfahren ist inzwischen patentiert. Eine zusätzliche Vorstellung im Rahmen eines MTA-Workshops wäre zu empfehlen.

Korrespondenzadresse

PD Dr. S. Scheil-Bertram

Institut für Pathologie und Zytologie
HELIOS Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden
Ludwig-Erhard-Str. 100, 65199 Wiesbaden
scheil-bertram@pathologie-wiesbaden.de

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. S. Scheil-Bertram, V. Krenn und K. Hauptmann 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. Gravius S, Randau TM, Casadonte R et al (2015) Investigation of neutrophilic peptides in periprosthetic tissue by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight imaging mass spectrometry. *Int Orthop* 39:559–567

2. Schildhaus HU, Schultheis AM, Rüschoff J et al (2015) MET amplification status in therapy-naive adeno- and squamous cell carcinomas of the lung. *Clin Cancer Res* 21:907–915
3. Koeppen H, Januario T, Filvaroff E et al (2012) Characterization and clinical validation of an immunohistochemical assay for Met in non-small cell lung cancer. *Lab Invest* 92:480A–480A
4. Schmitz K, Koeppen H, Binot E et al (2015) MET gene copy number alterations and expression of MET and hepatocyte growth factor are potential biomarkers in angiosarcomas and undifferentiated pleomorphic sarcomas. *PLOS one* 10:e0120079
5. Behjati S, Tarpey PS, Presneau N et al (2013) Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nat Genet* 45:1479–1482
6. Lewis PW, Müller MM, Koletsky MS et al (2013) Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* 340:857–861