

Aus der  
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
München Klinik Schwabing der Technischen Universität München  
Direktor: Dr. Stephanie Vogt (Pflegerische Klinikdirektion)

**Zielgerichtete individualisierte Therapie für Kinder, Jugendliche und  
junge Erwachsene mit refraktären pädiatrischen Sarkomen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Bushra Weidenbusch

aus  
Homs, Syrien

Jahr  
2025

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. Lars Lindner  
Mitberichtersteller: PD Dr. Ferdinand Wagner  
Prof. Dr. Roland Dürr  
Prof. Dr. Roland Kappler

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2025



## **Erklärung zur Übereinstimmung der gebundenen Ausgabe der Dissertation mit der elektronischen Fassung**

Weidenbusch, Bushra

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

Hiermit erkläre ich, dass die elektronische Version der eingereichten Dissertation mit dem Titel:

**Zielgerichtete individualisierte Therapie für Kinder, Jugendliche und junge  
Erwachsene mit refraktären pädiatrischen Sarkomen**

in Inhalt und Formatierung mit den gedruckten und gebundenen Exemplaren übereinstimmt.

Berchtesgaden, 21.01.2026

Ort, Datum

Bushra Weidenbusch

Unterschrift Bushra Weidenbusch

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>4</b>
<b>Vorwort.....</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Pädiatrische Knochen und Weichteilsarkome.....</b>	<b>5</b>
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	5
1.1.2 Jugendliche und junge Erwachsene.....	7
1.1.3 Ewing Sarkom.....	8
1.1.4 Osteosarkom.....	11
1.1.5 Rhabdomyosarkom.....	14
1.1.6 Synovialsarkom.....	17
1.1.7 Fibrosarkom.....	19
<b>1.2 Das Cancer Hallmarks Modell.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Zielgerichtete Krebstherapie.....</b>	<b>23</b>
<b>2. Forschungshypothese und Zielsetzung.....</b>	<b>24</b>
<b>3. Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Patienten.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Gewebeproben.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4 Histologische Untersuchungen.....</b>	<b>29</b>
3.4.1 Färbungen.....	29
3.4.2 Rückgewinnung des Antigens.....	29
3.4.3 Detektion des Antigens.....	30
3.4.4 Visualisierung des Antigens.....	30
3.4.5 Bewertungen.....	30
<b>3.5 Genexpressionanalyse.....</b>	<b>31</b>
3.5.1 Hintergrund.....	31
3.5.2 Das Array Experiment.....	34
3.5.3 Bearbeitung der Array Daten.....	35
<b>3.6 Identifizierung von Zielen (Targetanalyse).....</b>	<b>38</b>
<b>3.7 Auswahl von Therapeutika.....</b>	<b>39</b>
<b>3.8 Therapie und Verlaufskontrollen.....</b>	<b>39</b>
<b>3.9 Überlebensanalyse.....</b>	<b>40</b>
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>41</b>



<b>4.1 Patienten.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2 Immunhistochemie.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3 Immuninfiltration.....</b>	<b>53</b>
<b>4.4 Identifizierte Ziele und empfohlene Medikamente.....</b>	<b>56</b>
<b>4.5 Therapie, Nebenwirkungen und Ansprechen auf Therapie.....</b>	<b>59</b>
<b>4.6 Lebensqualität.....</b>	<b>64</b>
<b>4.7 Überleben.....</b>	<b>64</b>
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>66</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>75</b>
<b>7 Anlagen.....</b>	<b>77</b>
<b>8 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>83</b>
<b>9 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>100</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>101</b>
<b>Publikationsliste.....</b>	<b>102</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: EURO-EWING 99 Therapieprotokoll.....	11
Abbildung 2: EURAMOS-1 Protokoll.....	14
Abbildung 3: CWS/ EpSSG RMS 2005 Protokoll für Patienten mit Metastasen.....	17
Abbildung 4: Behandlung von SS nach dem EpSSG NRSTS Schema.....	19
Abbildung 5: Schlüsselmerkmale und Eigenschaften von Krebszellen.....	22
Abbildung 6: Das neue Cancer Hallmarks Modell.....	23
Abbildung 7: Ablauf einer GeneChip Microarray Untersuchung.....	32
Abbildung 8: Technische Informationen eines GeneChip Microarray Experiments..	33
Abbildung 9: Beispiel eines Affymetrix GeneChips.....	35
Abbildung 10: Beispiel der Benutzeroberfläche bei TARGETgene.....	37
Abbildung 11: Beispiel einer GSEA-Analyse.....	38
Abbildung 12: Die Genexpression und der Anteil der positiven Ziele der IHC.....	50
Abbildung 13: Streudiagramm für das mRNA und die IHC.....	51
Abbildung 14: Streudiagramm für das Überlebens und die IHC.....	52
Abbildung 15: Streudiagramm für das progressionsfreies Überleben und die IHC...	52
Abbildung 16: Gestapeltes Balkendiagramm der CIBERSORT Analyse.....	53
Abbildung 17: Ausschnitt der Heatmap der CIBERSORT Analyse.....	54
Abbildung 18: Gesamte Heatmap der CIBERSORT Analyse.....	55
Abbildung 19: Zusammenfassung der identifizierten Ziele.....	56
Abbildung 20: Medikamente die als zielgerichtet Therapien verwendet wurden.....	57
Abbildung 21: Häufigkeit von Grad 1, Grad 2, Grad 3 und Grad 4 Nebenwirkungen.	64
Abbildung 22: Lebensqualität nach Karnofsky- und Lansky-Skala.....	64
Abbildung 23: Kaplan_Meier Schätzung des Gesamtüberlebens.....	65
Abbildung 24: Kaplan_Meier Schätzung des progressionsfreien Überlebens.....	66

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sarkome mit definierten chromosomalen Veränderung.....	6
Tabelle 2: Chromosomale Translokationen und Fusionsgenen bei Ewing Sarkomen.....	9
Tabelle 3: Risikofaktoren zwischen die zT-Gruppe und die KzT-Gruppe.....	43
Tabelle 7: Zusammenfassung der gefärbten Ziele.....	49
Tabelle 4: Zusammenfassung der identifizierten Ziele und Medikamenten.....	58
Tabelle 5: die zielgerichteten Therapien, das Ansprechen und die unerwünschten Ereignisse.....	60
Tabelle 6: Unerwünschte Ereignisse bei der KzT-Gruppe.....	62

## **Vorwort**

Teilergebnisse der vorliegenden Dissertation wurden in der folgenden Arbeit vorab zur Veröffentlichung eingereicht am 7.10.2017, angenommen am 05.03.2018 und am 17.04.2018 bei Oncotarget publiziert. (Weidenbusch *et al.*, 2018)

## **1. Einleitung**

### **1.1 Pädiatrische Knochen und Weichteilsarkome**

#### **1.1.1 Definition und Epidemiologie**

Sarkome sind bösartige Tumore, die aus mesenchymalen Geweben z.B. Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Fett- und Bindegewebe in verschiedenen Körperteilen entstehen können. Obwohl Sarkome generell als seltene Erkrankungen gelten, treten sie häufiger bei Kindern und Jugendlichen auf (rund 20% der soliden malignen Krebserkrankungen in dieser Altersgruppe). (Bleyer *et al.*, 2006)

Nach Daten des umfangreichen epidemiologischen epidemiologischen Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Programms in den USA liegt die Fünfjahresüberlebensrate für pädiatrische Sarkome (Sarkome die im Kindesalter diagnostiziert sind) bei fast 60% und bleibt trotz aggressiver multimodaler Therapie bei Rezidiven und metastasierten Fällen bei rund 20-30%. (Bleyer *et al.*, 2006) Daten aus Studien in Europa und in Deutschland zeigen ähnliche Zahlen zu den Daten aus den USA. (Pastore *et al.*, 2006; Verdecchia *et al.*, 2007) Die ersten Symptome sind oft unspezifisch, was eine frühzeitige Diagnose erschwert und was zu einer Verzögerung bei der Therapie und eventuell zur Metastasierung führt. (Ilaslan *et al.*, 2010, Ahrensberg *et al.*, 2012)

Histologisch sind mehr als 50 Subtypen den Sarkomen zuzuordnen. Diese können je nach vorhandenen molekularen Veränderungen in zwei Gruppen unterteilt werden: Die erste Gruppe ist durch komplexe Karyotypen charakterisiert und betrifft vorwiegend Erwachsenen, während die zweite durch spezifische chromosomale Translokationen oder aktivierende Mutationen charakterisiert ist. Von Letzterer sind mehr Kinder als Erwachsene betroffen (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Sarkome mit definierten chromosomalen Veränderung.**

<b>Tumorart</b>	<b>Translokation</b>	<b>Fusion</b>
Ewing Sarkom	t(11;22)(q24;q12)	EWS-FLI1
	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG
	t(7;22)(p22;q12)	tEWS-ETV1
	t(17;22)(q21;q12)	EWS-ETV4
	t(2;22)(q33;q12)	EWS-FEV
	t(16;21)(p11;q22)	FUS-ERG
	t(2;16)(q35;p11)	FUS-FEV
	t(1;22)(p36.1;q12)	EWS-ZSG
	t(20;22)(q13;q12)	EWS-NFATc2
Ewing Sarkom-ähnliche Tumore	t(6;22)(p21;q12)	EWS-POU5F1
	t(1;22)(q36.1;q12)	EWS-PATZI
	t(2;22)(q31;q12)	EWS-SP3
	t(4;19)(q35;q13)	CIC-DUX4
	X chromosomaler Inversion *	BCOR-CCNB3
Klarzellsarkom	t(12;22)(p13;q12)	EWS-ATF1
	t(2;22)(q33;q12)	EWS-BREB1
Desmoplastisches klein, blau, rundzelliges Tumor	t(11;22)(p13;q12)	EWS-WT1
	t(21;22)(q22;q12)	EWS-ERG
Myxoides Liposarkom	t(12;16)(q13;q11)	FUS-DDIT3
	t(12;22)(q13;q12)	EWS-DDIT3
Extraskeletales Myxoides Chondrosarkom	t(9;22)(q22-31;q11-12)	EWS-NR4A3
	t(9;17)(q22;q11)	TAF15-NR4A3
	t(9;15)(q22;q21)	TCFI2-NR4A3
	t(9;22)(q22;q15)	TFG-NR4A3
Niedriggradiges Fibromyxoides Sarkom	t(7;16)(q33;p11)	FUS-CREB3L2
	t(11;16)(p11;p11)	FUS-CREB3L1
Angiomatoid faseriges Histiozytom	t(12;16)(q13;p11)	FUS-ATF1

	t(12;22)(q13;q12)	EWS-ATF1
	t(2;22)(q33;q12)	EWS-CREB1
Alveolares Rhabdomyosarkom	t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FOXO1
	t(1;13)(q36;q14)	PAX7-FOXO1
	t(2;2)(p23;q35)	PAX3-NCOA1
	t(2;8)(q35;q13)	PAX3-NCOA2
	t(8;13;9)(p11.2;q14;9q32)	FGFR1-FOXO1
Alveolares Weichteilsarkom	t(X;17)(p11;q25)	ASPSL-TFE3
Infantiles Fibrosarkom	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3
Angeborenes mesoblastisches Nephrom	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3
Inflammatorischer myofibroblastischer Tumor	t(1;2)(q25;q23)	TPM3-ALK
	t(2;19)(q23;q13)	TPM4-ALK
	t(2;17)(q23;q23)	CLTC-ALK
	t(2;2)(p23;q13)	RANBP2-ALK
Synovialsarkom	t(X;18)(p11;q11)	SS18-SSX1
	t(X;18)(p11;q11)	SS18-SSX2
	t(X;18)(p11;q13)	SS18-SSX4
	t(X;20)(p11;q13)	SS18L1-SSX1
Endometriales Sarkom	t(7;17)(p15;q21)	JAZF1-SUZ12
	t(6;7)(p21;p15)	JAZF1-PHF1
	t(6;10)(p21;p11)	EPC1-PHF1
Dermatofibrosarkom protuberans	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB
Giant-cell Fibroblastom	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB

\* (Pierron *et al.*, 2012), Tabelle modifiziert Von (Anderson *et al.*, 2012)

### 1.1.2 Jugendliche und junge Erwachsene

Jugendliche und junge Erwachsene (engl. adolescents and young adults) oder kurz (AYAs) sind Patienten im Alter zwischen 15 und 39 Jahren. Mit Ausnahme des Kaposi-Sarkoms haben Jugendliche und junge Erwachsene mit Knochen- und Weichteilsarkomen am wenigsten von den Behandlungsfortschritten in der Onkologie in den letzten Jahren profitiert. Die durchschnittliche jährliche prozentuale

Veränderung der 5-Jahres-Überlebensrate nimmt in den Altersgruppen zwischen 15-45 Jahre ab, während sie in älteren Patientenpopulationen ansteigt. (Bleyer *et al.*, 2005; Bleyer *et al.*, 2006; Pastore *et al.*, 2006; Stiller *et al.*, 2006; Verdecchia *et al.*, 2007; Kaatsch *et al.*, 2016) Traditionell wurden diese Patienten entweder von Kinder- und Jugendmedizinerinnen oder von Internisten gemäß den entsprechenden Studienprotokollen für Kinder bzw. Erwachsene behandelt.

Klinische Studien, die sich an den Bedürfnissen dieser Altersgruppe spezifisch orientieren, sind eher die Ausnahme. Die Aufnahme in den verschiedenen Studien für Sarkome bei Erwachsenen oder Kindern (sog. “Cross-enrollment”) ist aufgrund organisatorischer und manchmal auch finanzieller Gründe selten. (Davis *et al.*, 2017) Die häufigsten pädiatrischen Sarkome bei AYAs sind Osteosarkome (OS), Ewing Sarkome (ES), Rhabdomyosarkome (RMS), Synovialsarkome (SS) und Fibrosarkome (FS).

### **1.1.3 Ewing Sarkom**

Das Ewing Sarkom (ES) ist der zweithäufigste bösartige Knochentumor bei Kindern und Jugendlichen. Es tritt in einem Verhältnis von 3:2 häufiger bei männlichen als bei weiblichen Patienten auf und ist häufiger bei Patienten mit europäischer Herkunft als bei Patienten mit afrikanischer oder asiatischer Herkunft. (Jawad *et al.*, 2009)

#### **1.1.3.1 Pathologie und Molekularpathologie**

Ewing Sarkome sind laut Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation, kurz “WHO”) als Tumore mit einer FET-ETS Genfusion definiert. (Sankar & Lessnick, 2011) Pathologisch ähnliche Tumore, die andere Genfusionen zeigen, werden als “Ewing-like sarcomas” also Ewing-ähnliche Tumore bezeichnet.

Die Ursprungszelle des Ewing Sarkoms bleibt bisher umstritten. (Toomey *et al.*, 2010; Ross *et al.*, 2013) Ergebnisse aus verschiedenen Studien deuten entweder auf mesenchymale Stammzellen oder primitive neuroektodermale Stammzellen als Ursprungszellen des Ewing Sarkoms hin. (Ewing 1921, Schmidt 1985, Lipinski *et al.*, 1987; Torchia *et al.*, 2003, Staegle 2004). Die Genfusionen im Ewing Sarkom sind sehr gut definiert (Tabelle 2). Es handelt sich um eine Fusion eines FET-Gens mit einem ETS-Gen. FET-Proteine sind RNA gebundene Proteine, die Transkription und Spleißen vermitteln. ETS sind Transkriptionsfaktoren, die für Zellproliferation,

Zelldifferenzierung, Zellzyklus-Kontrolle, Angiogenese und Apoptose zuständig sind. (Grünwald *et al.*, 2018)

Durch die Genfusion entsteht ein chimäres Peptid, welches eine aminoterminal Domäne der FET-Proteins mit einer DNA-Bindungsdomäne des ETS-Proteins verbindet. (Grünwald *et al.*, 2018) In ca. 85% der Fälle handelt es sich um eine EWSR1-FLI1 Genfusion (Delattre *et al.*, 1992) und in ca. 10% der Fälle ist stattdessen eine EWSR1-ERG Genfusion vorhanden (Ruzanov *et al.*, 2024). Das Fusionsprotein EWSR1-FLI1 dereguliert durch epigenetische Mechanismen die Expression hunderter Gene durch Bindung an Ewing-spezifische Enhancer (Transkriptionsverstärker) in GGAA Mikrosatelliten. (Staege *et al.*, 2004; Riggi *et al.*, 2014; Boulay *et al.*, 2017; Grünwald *et al.*, 2018) Polymorphismen in der EWSR1-FLI1-abhängigen EGR2 Expression wurden bei Patienten mit afrikanischer Herkunft beobachtet und könnten die niedrige Inzidenz von Ewing Tumoren bei diesen Patienten erklären. (Grünwald *et al.*, 2016)

**Tabelle 2: Chromosomale Translokationen und Fusionsgenen bei Ewing Sarkomen**

FET	ETS	Fusionsgen	Chromosomale Translokation	Häufigkeit
FUS	FEV	FUS–FEV	t(2;16)(q35;p11)	<1%
	ERG	FUS–ERG	t(16;21)(p11;q22)	<1%
EWSR1	FLI1	EWSR1–FLI1	t(11;22)(q24;q12)	85%
	ERG	EWSR1–ERG	t(21;22)(q22;q12)	10%
	ETV1	EWSR1–ETV1	t(7;22)(p22;q12)	<1%
	ETV4	EWSR1–ETV4	t(17;22)(q21;q12)	<1%
	FEV	EWSR1–FEV	t(2;22)(q33;q12)	<1%

Adaptiert von (Burchill, 2003; Grünwald *et al.*, 2018)

### 1.1.3.2 Klinisches Bild

Das Ewing Sarkom (ES) entsteht hauptsächlich in den Knochen, kann aber in weniger als 10% der Fälle in den Weichteilen auftreten. (Hotowitz *et al.*, 1992) Die ersten

Beschwerden sind meistens lokalisierte Schmerzen oder eine lokalisierte Schwellung in den Weichteilen. (Widhe & Widhe, 2000)

Wie bei anderen Knochentumoren sind bildgebende Untersuchungen unumgänglich für die Diagnose des Ewing Sarkoms. Ein Röntgenbild oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) ist wichtig für die Diagnose des primären Tumors. Für den Nachweis von Metastasen ist eine Computertomographie (CT) der Thorax (zur Erfassung von Lungenmetastasen), ein Knochenmarkaspirat sowie eine Biopsie der verdächtigen Lymphknoten (LK) sehr wichtig.

Außerdem liefert die 18F-Fluorodeoxyglucose-Positronenemissionstomographie (18F-FDG-PET) bzw. PET/CT (mit oder ohne ergänzende Magnetresonanztomographie, MRT) wertvolle Informationen zum Tumormetabolismus, zum Vorliegen von Metastasen und zum Therapieansprechen. (Gerth *et al.*, 2007; Kaste, 2011)

Für die endgültige Diagnose des primären Tumors ist eine Biopsie mit histopathologischen, zytologischen und molekulopathologischen Befunden erforderlich.

### **1.1.3.3 Behandlung**

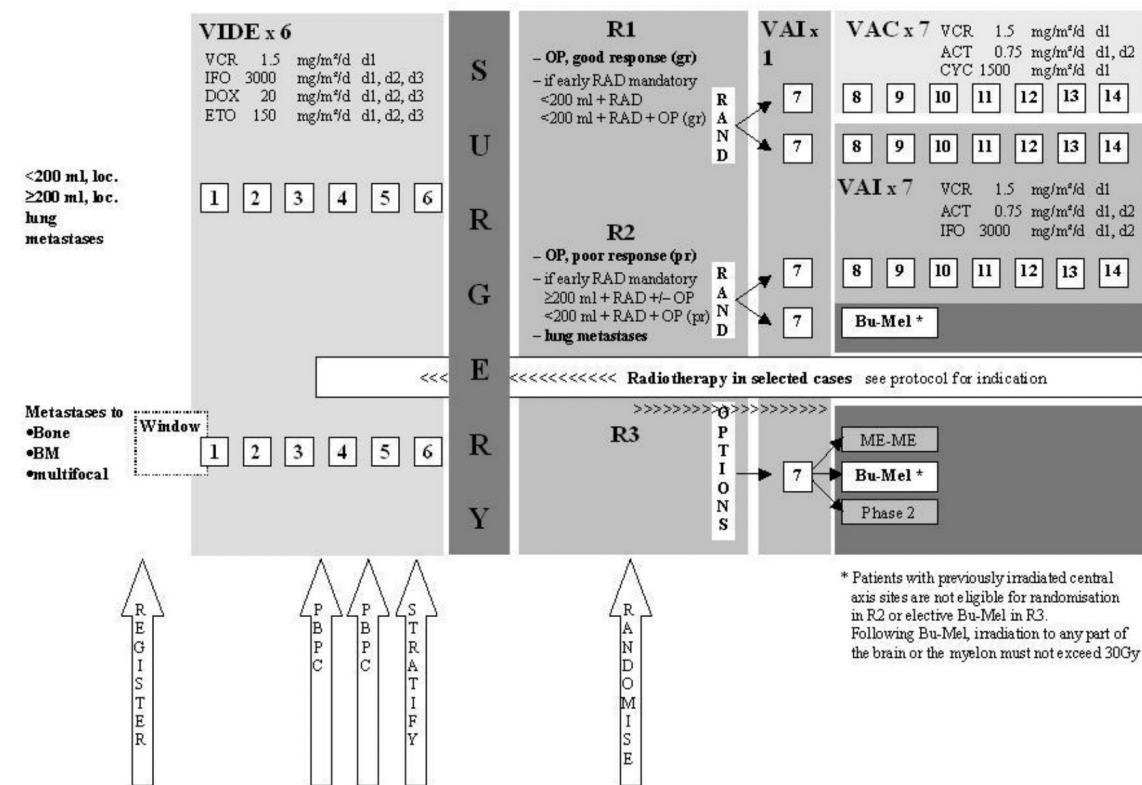
Aktuell werden Patienten in Deutschland und vielen anderen Ländern gemäß dem EURO EWING 99 Protokoll als Nachfolger der CESS/EICESS Studie initial mit 4-6 Zyklen Vincristine, Ifosfamid, Doxorubicin, und Etoposide (VIDE) als Induktionstherapie behandelt. Es folgt eine Operation (OP) mit oder ohne Radiotherapie, um den primären Tumor und die vorhandenen Metastasen zu entfernen. Danach werden Patienten mit einer weiteren Konsolidierungstherapie mit Vincristin, Actinomycin D und entweder Ifosfamid oder Cyclophosphamid behandelt (VAI vs. VAC). (Juergens *et al.*, 2006 ; Ladenstein *et al.*, 2006; Le Deley *et al.*, 2014)

### **Abbildung 1: EURO-EWING 99 Therapieprotokoll**

(EUROpean Ewing tumour Working Initiative of National Groups Ewing Tumour Studies 1999, 2010).



## EURO-E.W.I.N.G. 99



## 1.1.3.4 Prognose

Die 5-Jahres-Überlebenschancen von Patienten mit lokalisiertem Tumor liegen zwischen 65% und 75%. Patienten mit isolierten Lungenmetastasen haben ein besseres ereignisfreies Überleben (29% bis 52%) als Patienten mit anderen Metastasen. Bei initial metastasierter Erkrankung bleibt die Prognose mit 30% Gesamtüberleben und 8% bis 25% ereignisfreies Überleben schlecht. (Gaspar *et al.*, 2015)

## 1.1.4 Osteosarkom

Osteosarkom (OS) ist ein osteoidproduzierender, maligner Tumor. Er ist die häufigste Art von primärem Knochenkrebs bei Kindern und Jugendlichen. Das Osteosarkom ist sehr selten bei Kindern unter 5 Jahren. Die Inzidenz erhöht sich mit dem Alter und ist höher bei männlichen Patienten, sowie bei Patienten mit afroamerikanischer und hispanischer Herkunft. (Mirabello *et al.*, 2009) Außerdem sind Osteosarkome häufig bei Patienten mit genetischen Tumorprädispositionssyndromen wie dem Li-Fraumeni

Syndrom, dem hereditären Retinoblastom und dem Rothmund Thomson Syndrom. (Calvert *et al.*, 2012)

#### **1.1.4.1 Pathologie und Molekularpathologie**

Primäre Osteosarkome werden nach der Klassifikation der WHO in folgende Kategorien eingeordnet: Konventionell intramedullär/zentral hochgradig (osteoblastisch, chondroblastisch und fibroblastisch), kleinzellig, teleangiektatisch, zentral-niedriggradig und oberflächlich (Paraosteal, Periosteal und hochgradig). (Kundu, 2014)

Molekulargenetisch sind Osteosarkome sehr komplexe Krebserkrankungen mit zahlreichen genetischen Veränderungen und einer sehr hohen Heterogenität. (Engert *et al.*, 2017) Als Hauptmechanismus scheint die durch strukturelle Genvariationen (engl. structural variation „SV“) und Kopiezahlvariationen (engl. copy number variations „CNV“) verursachte genomische Instabilität in den DNA-Reparatur und Tumorsuppressorgenen eine große Rolle zu spielen. (Chen *et al.*, 2014)

Amplifikationen in MDM2 und CDK4 sind sehr häufig, besonders bei paraostealem und zentral-niedriggradigen Osteosarkomen. (Baumhoer *et al.*, 2019)

Keimbahnmutationen wie TP53 und RB1 können zur Entstehung von Osteosarkomen besonderes bei jüngeren Patienten beitragen. (Chen *et al.*, 2014; Kovac *et al.*, 2015)

Dabei scheint eine Art lokalisierte Hypermutation, genannt “Kataegis” eine große Rolle zu spielen. (Nik-Zainal *et al.*, 2012) Andere wichtige Gene bei der Pathogenese von Osteosarkomen sind ATRX sowie andere Gene im PI3K/mTOR Signalweg.

(Perry *et al.*, 2014) Auf somatischer Ebene wurden viele chromosomale Brüche und Umlagerungen in Osteosarkomen nachgewiesen (Chromothripsis). (Behjati *et al.*, 2017) Diese genomische Instabilität und die vielen genetischen Veränderungen führen zu einem genomischen Profil sehr ähnlich den Tumoren mit BRCA-Mutationen (die sog. „BRCAness“). Diese sind mit Mutationen in der DNA-Reparatur, in der chromosomalen Trennung, und im Zellzyklus charakterisiert. (Kovac *et al.*, 2015; Barenboim *et al.*, 2021)

#### **1.1.4.2 Klinisches Bild**

Osteosarkome entwickeln sich häufiger in den metaphysären Bereichen der langen Röhrenknochen wie im distalen Femur, der proximalen Tibia und dem proximalen

Humerus. Zunehmende lokale Knochenschmerzen sind oft das leitende Symptom. (Prater & McKeon, 2023)

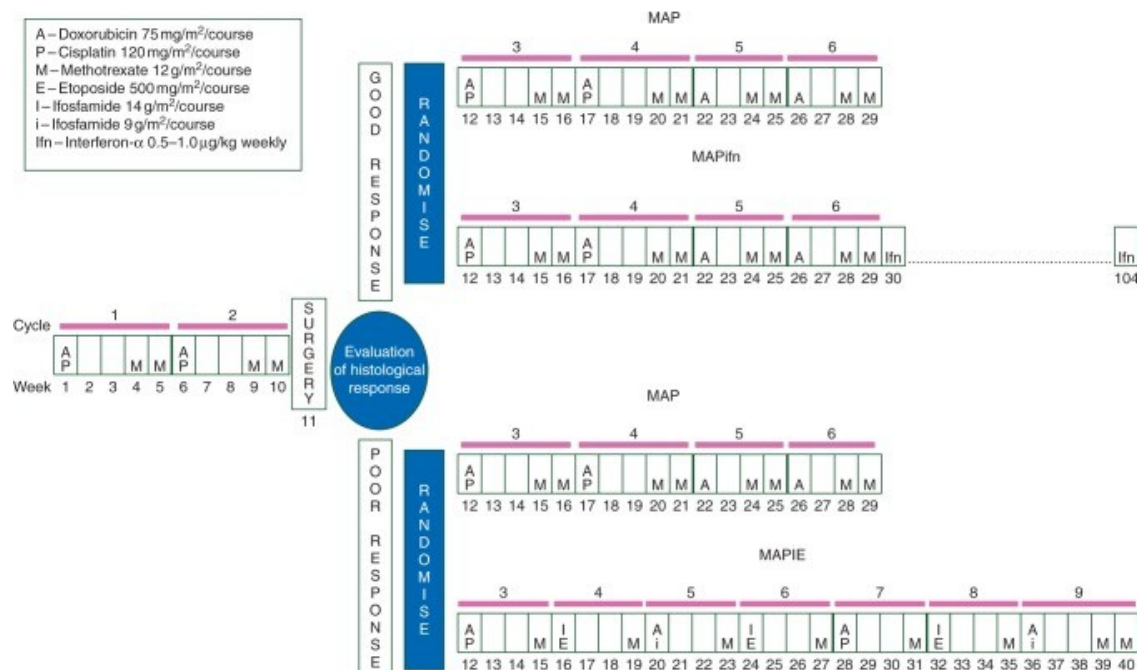
Bei rund 15-20% der Erstdiagnosen sind Metastasen vorhanden, darunter sind Lungenmetastasen sehr häufig (ca. 80% der Metastasen). (Bielack *et al.*, 2022; Isakoff *et al.*, 2015) Bei dem Verdacht auf ein Knochensarkom ist ein einfaches Röntgenbild auf zwei Ebenen indiziert. Danach folgt ein MRT, Thorax CT oder sogar PET-CT/ PET-MRT zum weiteren Staging. (Buchbender *et al.*, 2012) Eine Biopsie ist für die endgültige Diagnose unumgänglich und sollte von einem multidisziplinären Team mit altersspezifischer operativer Erfahrung bei Knochentumoren angeordnet und entsprechend durchgeführt werden. (Bielack *et al.*, 2009; Casali *et al.*, 2018)

#### **1.1.4.3 Behandlung**

Hochgradige Osteosarkome werden chirurgisch mit zusätzlicher Chemotherapie vor und nach dem chirurgischen Eingriff behandelt. Eine optimale Operation sollte den Primärtumor sowie möglicherweise alle Metastasen entfernen. Niedriggradige paraosteale Osteosarkome werden ausschließlich chirurgisch behandelt. (Laitinen *et al.*, 2015) Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene mit primären Osteosarkomen werden weitgehend gemäß dem internationalen multizentrischen EURAMOS -1 Studienprotokoll behandelt. Dieses besteht aus zwei präoperativen Zyklen Cisplatin/Doxorubicin (Adriamycin) und vier Zyklen Methotrexat (kurz “MAP”). Nach der Resektion des primären Tumors werden Patienten je nach Tumoransprechen entweder in eine MAP/MAP anschließend PEGyliertes Interferon- $\alpha$  (MAPifn) oder in eine MAP/MAP anschließend Ifosfamid/Etoposid (MAPIE) Gruppen randomisiert. (Whelan *et al.*, 2015) Bei rezidivierenden Osteosarkomen werden Ifosfamid, Cyclophosphamid mit oder ohne Etoposid/Carboplatin als Second-line Chemotherapie eingesetzt. (Casali *et al.*, 2018)

#### **Abbildung 2: EURAMOS-1 Protokoll**

Eine randomisierte Studie der europäischen und amerikanischen Osteosarkom Studiengruppe. (Whelan *et al.*, 2015)



#### 1.1.4.4 Prognose

Die Prognose unterscheidet sich je nach histologischem Grad, Größe des primären Tumors und Vorhandensein von Metastasen bei der Erstdiagnose. (Clark *et al.*, 2008; Eleutério *et al.*, 2015) Das Ansprechen nach der präoperativen Chemotherapie spielt eine deutliche prognostische Rolle für die Prognose bei Patienten mit lokalisierten Osteosarkomen in den Extremitäten. (Davis *et al.*, 1994) Eine Analyse von 1702 Patienten mit Osteosarkomen hat auf eine schlechtere Prognose bei proximaler Lokalisierung hingewiesen. (Bielack *et al.*, 2002) Die Tumorgöße war auch prognostisch relevant, obwohl sie nicht mit dem therapeutischen Ansprechen korrelierte. Die Autoren führten diese Korrelation zwischen Tumorgöße und Rezidivwahrscheinlichkeit auf das parallele Vorhandensein von Metastasen bei den größeren Tumoren zurück. Außerdem haben männliche Patienten sowie Patienten mit axialen Osteosarkomen (nicht in den Extremitäten) eine deutlich schlechtere Prognose. (Bielack *et al.*, 2002)

#### 1.1.5 Rhabdomyosarkom

Rhabdomyosarkom (RMS) ist ein Weichteilsarkom mit hauptsächlich myogener Differenzierung der Tumorzellen. Es ist die häufigste Art von Weichteilsarkomen bei Kindern. Ca. 50% der Weichteilsarkome bei zwischen 0 und 14 Jahre sind RMS. (Gurney *et al.*, 1999) Der Rest der Weichteilsarkome bei Kindern und Jugendlichen

wird als nicht-rhabdomyosarkomatoses Weichteilsarkom Kurz (NRSTS) bezeichnet. (PDQ Cancer Information Summaries, 2024)

#### **1.1.5.1 Pathologie und Molekularpathologie**

Nach der Definition der WHO werden RMS in vier Kategorien unterteilt: embryonales RMS (eRMS), alveolares RMS (aRMS), spindelzelliges/sklerosierendes RMS und pleomorphes RMS. (Jo & Doyle, 2016; Rudzinski *et al.*, 2015)

Morphologisch sind RMS-Zellen sehr heterogen bestehend aus undifferenzierten und differenzierten Rhabdomyoblasten. (Dziuba *et al.*, 2018)

Aktuell werden RMS entsprechend dem Vorhandensein genomischer Fusionen entweder als Fusion-positives RMS (FPRMS) oder als Fusion-negatives RMS (FNRMS) klassifiziert. (Hettmer & Wagers, 2010; Skapek *et al.*, 2019) eRMS sind häufiger bei Patienten unter vier Jahre, während pleomorphe RMS häufiger bei Patienten zwischen 15 -19 Jahren auftreten. (Perez *et al.*, 2011) Bei den meisten Patienten mit aRMS konnte eine t(2;13)(q35;q14) oder eine t(1;13)(p36;q14) Translokation nachgewiesen werden. Die resultierenden Fusionsgene sind jeweils PAX3-FOXO1 oder PAX7-FOXO1. (Galili *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994) Das Fusionsprotein fungiert als Oncoprotein (Marshall und Grosveld, 2012; Bennicelli *et al.* 1999) in dem es gleichzeitig andere Transkriptionsfaktoren, die als sog. „Super-Enhancer“ funktionieren, aktiviert. (Gryder *et al.*, 2017) Mutationen in den RAS–RAF–MAPK oder den PI3K–AKT–mTOR-Signalwege sind bei rund 50% der Patienten mit FNRMS vorhanden. (Martinelli *et al.*, 2009; Seki *et al.*, 2015; Skapek *et al.*, 2019) FGFR4 ist bei rund 7% der FNRMS Patienten mutiert. (Taylor *et al.*, 2009) Außerdem wurde eine erhöhte genetische Expression der IGF sowie der Wnt Signalwege beschrieben. (Bridge *et al.*, 2002; Annavarapu *et al.*, 2013)

#### **1.1.5.2 Klinisches Bild**

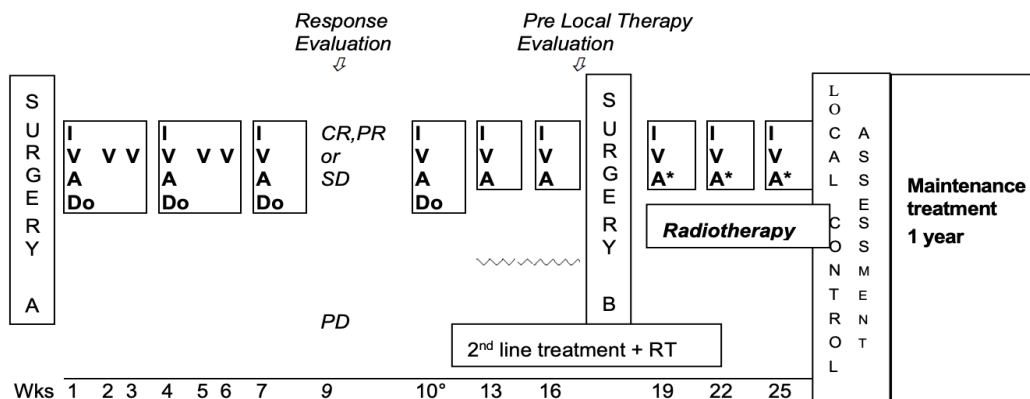
Während die meisten eRMS im Kopf- und Nackenbereich, sowie im Urogenitalbereich manifestieren, treten aRMS häufiger in den Extremitäten auf. (Enterline und Horn, 1958) Grundsätzlich können RMS überall im Körper vorkommen. Die ersten Symptome sind oft eine schmerzfreie Schwellung in den Weichteilen oder andere unspezifische Symptome, die aus der Kompression der Organe durch den Tumor oder die Metastasen resultieren. Bei rund 20% den betroffenen Kindern sind Metastasen bereits bei der Erstdiagnose vorhanden. (Hawkins *et al.*, 2013) Häufig sind dann bereits Lungen-, Knochen-, Knochenmark-

und Lymphknotenmetastasen vorhanden. (Jawad & McHugh, 2019) Eine Biopsie mit histopathologischen sowie molekularpathologischen Befunden ist für die Diagnose entscheidend. (Rudzinski *et al.*, 2014) Für die Diagnose von Lungenmetastasen ist ein Lungen CT sehr wichtig. Ein FDG-PET/CT ist hilfreich um die Tumorgroße, Lokalisation und Metastasen, und im Verlauf Ansprechen auf die Therapie zu evaluieren. (Jawad & McHugh, 2019; Federico *et al.*, 2013; Voss, 2019)

### **1.1.5.3 Behandlung**

Eine OP entfernt möglichst den Tumor sowie weitere Metastasen, allerdings ohne Mutilation. Danach werden Patienten nach den Richtlinien der Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe /European Pediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group (CWS/ EpSSG) RMS 2005 je nach Risikogruppe behandelt. RMS-Patienten mit niedrigem Risiko werden mit 8 Zyklen Vincristin und Actinomycin-D (VA) behandelt. (van Ewijk *et al.*, 2021; Bisogno *et al.*, 2023) Patienten mit Standardrisiko werden mit Radiotherapie und 9 Zyklen Vincristin und Actinomycin D (VA) mit oder ohne Ifosfamid (IVA) nach dem 4. Zyklus behandelt. Patienten mit erhöhtem Risiko werden mit 4 Zyklen IVA oder IVADo (IVA mit Doxorubicin) und danach mit 5 Zyklen IVA behandelt. Patienten mit einem extrem erhöhten Risiko bekommen dazu eine Erhaltungstherapie mit Vinorelbin und Cyclophosphamid. (Bisogno *et al.*, 2023; Bisogno *et al.*, 2022; Sparber-Sauer *et al.*, 2024)

### **Abbildung 3: CWS/ EpSSG RMS 2005 Protokoll für Patienten mit Metastasen**



- I Ifosfamide 3 g/m<sup>2</sup> is given as a 3 hour intravenous infusion daily, with Mesna (3 g/m<sup>2</sup>) and hydration, on days 1 & 2 for each course of treatment. (Total IFO dose/course = 6 g/m<sup>2</sup>).
- V Vincristine 1.5 mg/m<sup>2</sup> (maximum single dose 2 mg) is given as a single intravenous injection on day 1 of each course and weekly, for a total of seven consecutive doses, from week 1 to 7.
- A Actinomycin D 1.5 mg/m<sup>2</sup> (maximum single dose 2 mg) as a single intravenous injection on day 1 of each course of treatment.
- Do Doxorubicin 30 mg/m<sup>2</sup> given as a 4-hour intravenous infusion daily on days 1 & 2 for courses 1-4 of treatment (total dose per course = 60 mg/m<sup>2</sup>).

#### 1.1.5.4 Prognose

Patienten mit lokalisiertem RMS weisen vergleichsweise bessere Heilungschancen (rund 70%) auf. Die Prognose bleibt für Patienten mit initial metastasierter oder rezidivierter Erkrankung sehr schlecht. Relevante Faktoren für die Prognose sind TNM-Status, Tumorgroße, Lokalisation, histologischer Typ und Alter des Patienten. (Koscielniak *et al.*, 2002)

#### 1.1.6 Synovialsarkom

Rund 8-10% der pädiatrischen Weichteilsarkomen sind Synovialsarkome (SS). (Okcu *et al.*, 2003) Synovialsarkome sind selten bei Kindern unter 10 Jahren. Männliche Patienten sind dabei öfter betroffen als weibliche. (Okamoto *et al.*, 2000)

##### 1.1.6.1 Pathologie und Molekularpathologie

Die Ursprungszelle des Synovialsarkoms ist bisher nicht endgültig nachgewiesen. Synovialsarkome entstehen vermutlich aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen. (Fiore *et al.*, 2021) 90-95% der Synovialsarkome sind durch die chromosomale Translokation t(X,18; p11,q11) charakterisiert. (Lagarde *et al.*, 2013) Das resultierende Fusionsprotein SS18-SSX dysreguliert weitere Multiproteinkomplexe wie den SWItch/Sucrose Non-Fermentable (SWI/SNF) Komplex (BAF Komplex) und die Polycomb Repressive Komplexe 1 und 2 (PRC1 und PRC2). Der ATP-abhängige Chromatin-Remodellierungskomplex BAF

(mammalian SWI/SNF complex) ist für die Regulation der Genexpression und Differenzierung von entscheidender Bedeutung. (Schick *et al.*, 2020; Boulay *et al.*, 2021)

#### **1.1.6.2 Klinisches Bild**

70% der Synovialsarkome entstehen in den Extremitäten, besonders in den weichen Geweben rund um das Knie. (Bakri *et al.*, 2012) Lungenmetastasen sind am häufigsten zu beobachten. (Sultan *et al.*, 2009; Ferrari *et al.*, 2012) Im Vergleich treten Lymphknotenmetastasen eher selten auf (weniger als 1% der Patienten). (Orbach *et al.*, 2011) Ein MRT ist für die Diagnose sowie für das weitere Staging unverzichtbar. (Kransdorf *et al.*, 1989)

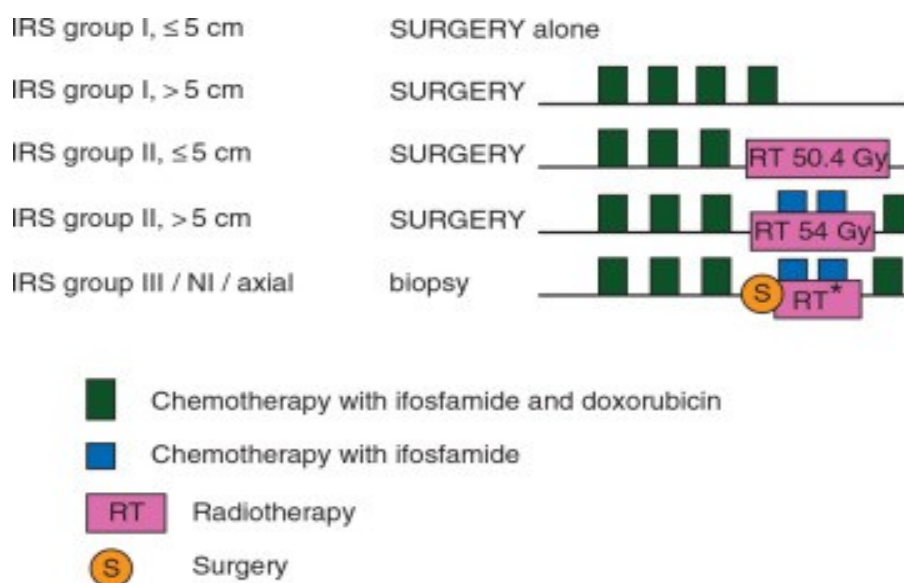
#### **1.1.6.3 Behandlung**

Patienten werden nach Empfehlungen der EpSSG NRSTS 2005 Protokoll behandelt. Dieses Studienprotokoll ersetzte das früheren CWS 81 Protokoll und empfiehlt, dass Patienten mit drei oder vier Zyklen Doxorubicin und Ifosfamid mit oder ohne Radiotherapie je nach Risikogruppe behandelt werden. Operative Behandlung ist wichtig, um den Tumor sowie weitere Metastasen zu entfernen. Kleine Synovialsarkome mit niedrigem Risiko werden dabei nur operativ behandelt. (Ladenstein *et al.*, 1993; Ferrari *et al.*, 2017; Ferrari *et al.*, 2021) Die risikobasierte operative Behandlung bei Patienten mit lokalisierter Erkrankung führt zu einer günstigen Prognose und reduziert die Notwendigkeit und Exposition zu Radiotherapie bei Kindern und Jugendlichen. (Venkatramani *et al.*, 2021)

#### **Abbildung 4: Behandlung von SS nach dem EpSSG NRSTS Schema**

(Ferrari *et al.*, 2015)





#### 1.1.6.4 Prognose

Die Prognose des Synovialsarkoms hängt vom Risikostatus und dem Vorhandensein von Metastasen ab. (Kerouanton *et al.*, 2014; Venkatramani *et al.*, 2021) Bei Kindern und Jugendlichen ist die Prognose, im Vergleich zu Erwachsenen, deutlich besser. (Sultan *et al.*, 2009)

#### 1.1.7 Fibrosarkom

##### 1.1.7.1 Pathologie und Molekularpathologie

Fibrosarkome (FS) sind Weichteilsarkome, die auch in den Knochen entstehen können. Histologisch wurden einige genetische Translokationen wie COL1A1-PDGFB, ETV6-NTRK3, und FUS-CREB3L2 bei Fibrosarkomen beschrieben (Kaye, 2009; Knezevich *et al.* 1998). Fibrosarkome zeigen einen ausgeprägten Pleomorphismus und sind daher meist Ausschlussdiagnosen. (Davia *et al.*, 2023)

##### 1.1.7.2 Klinisches Bild und Behandlung

Es wird zwischen dem infantilen Fibrosarkom und dem adulten Fibrosarkom unterschieden. Infantile Fibrosarkome entstehen bei Kindern unter 5 Jahren, während adulte Fibrosarkome klinisch aggressiver sind und bei Kindern sowie Jugendlichen und jungen Erwachsenen entstehen.

Fibrosarkome zählen nicht zu den Chemotherapie-sensiblen Tumoren. Sie sind Weichteilsarkome, die aus Fibroblasten (Bindegewebszellen) entstehen, und gehören zu den Tumoren, die in der Regel eine geringe Chemotherapieempfindlichkeit besonders im Kindesalter aufweisen. Obwohl Chemotherapie in bestimmten Fällen von Fibrosarkomen eingesetzt wird, insbesondere bei metastasierten oder rezidivierenden Tumoren, wird sie nicht als primäre Therapie angesehen. Der Hauptfokus der Behandlung liegt auf der chirurgischen Entfernung des Tumors, sofern dies möglich ist, und in einigen Fällen auch auf der Strahlentherapie, um die Heilungschancen zu erhöhen und das Risiko eines Rezidivs zu senken.

Eine Ifosfamid-Doxorubicin-Therapie könnte bei ausgewählten fortgeschrittenen Fibrosarkomen die Tumorlast reduzieren und eine Resektion ermöglichen. (Sparber-Sauer *et al.*, 2020)

Das Ansprechen auf die Therapie hängt von Tumorgroße und -stadium sowie molekulare und genetische Merkmale des Tumors. Die Ansprechrate auf Chemotherapie bei Kindern mit Fibrosarkomen liegt bei 20-30%. Bei metastasierten oder fortgeschrittenen Fibrosarkomen könnten die Ansprechraten jedoch noch niedriger sein.

#### **1.1.7.3 Prognose**

Infantile Fibrosarkome sind mit einer sehr guten Prognose assoziiert (80% komplette Remission). (Cecchetto *et al.* 2001) Adulte Fibrosarkome zeigen wenig Ansprechen auf Chemotherapien und sind mit einer schlechteren Prognose assoziiert. (Ferrari *et al.*, 2022)

## 1.2 Das Cancer Hallmarks Modell

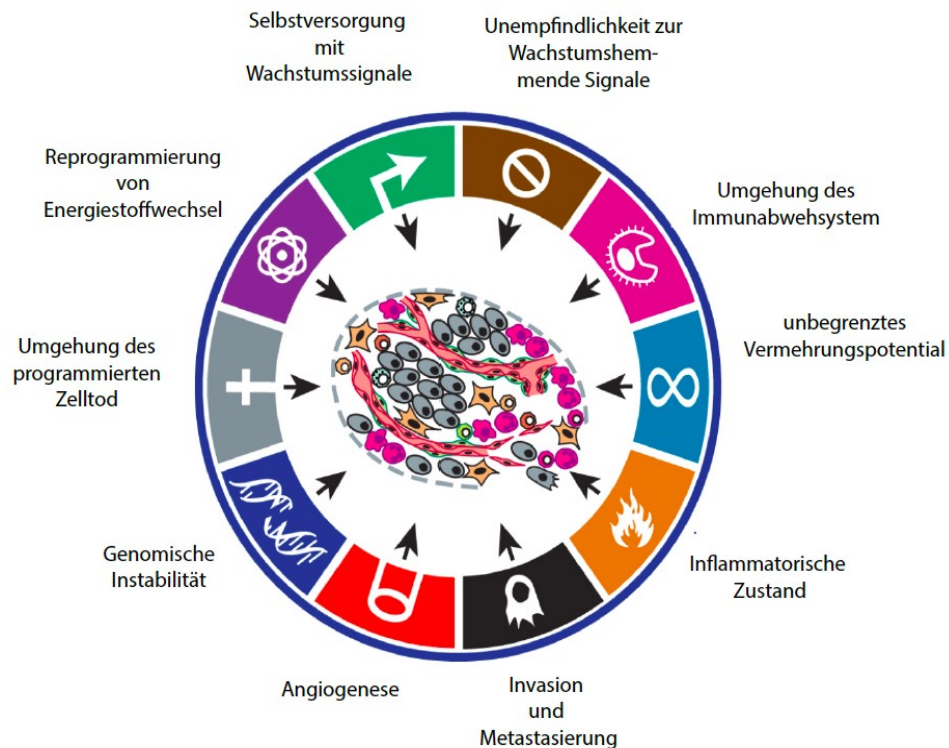
Zur Gewinnung präziser Daten über genetische Hintergründe und Zusammenhänge von Krebserkrankungen wurden in den letzten Jahrzehnten mehrere nationale und internationale Forschungs Kooperationen initiiert. Diese haben das Ziel, das Genom verschiedener Tumorarten bei zahlreichen Patientinnen und Patienten zu analysieren, zu dokumentieren und vergleichend auszuwerten. Beispiele sind das The Cancer Genome Atlas (TCGA) und das The Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) des National Cancer Institut (NCI) in den Vereinigten Staaten sowie mehreren nationalen und internationalen Kooperationsprojekten. Viele dieser einzelnen Projekte wurden in das International Cancer Genome Consortium (ICGC) integriert und als eine Art globales Register für zahlreiche Krebsarten dienen.

Die Ergebnisse aus diesen Projekten ermöglichten eine genaue Charakterisierung der genetischen Veränderungen in Krebszellen und inspirierten eine übergreifende Klassifizierung solcher Veränderungen, unabhängig von der Krebsart, in bestimmten Schlüsselmerkmalen genannt “Hallmarks of Cancer“. (Hanahan & Weinberg, 2002) Nach dem Cancer Hallmark Modell von Hanahan und Weinberg entsteht die maligne Veränderung normaler Zellen durch komplexe genetische Schritte, die zum Überleben, Vermehrung und Verbreitung von Krebszellen dienen. Nach dem ersten Modell, welches im Jahr 2000 veröffentlicht wurde, sind diese Schlüsselmerkmale: Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Umgehung von wachstumshemmenden Signalen, unbegrenztes Vermehrungspotential, Umgehung des programmierten Zelltods, Angiogenese und die Invasion der normalen Blutgefäße, Invasion der Gewebe und die Fähigkeit zur Metastasierung. (Hanahan & Weinberg, 2000)

Im Jahr 2011 wurden zwei weitere Schlüsselmerkmale zu diesem Modell hinzugefügt: die Änderung von Energiestoffwechsel und die Umgehung des Immunabwehrsystems. Dabei wurden zwei Eigenschaften definiert, die den gesamten malignen Prozess ermöglichen: die genomische Instabilität und der inflammatorische Zustand in Krebs- und Krebsvorläuferzellen. (Hanahan & Weinberg, 2011)

### Abbildung 5: Schlüsselmerkmale und Eigenschaften von Krebszellen

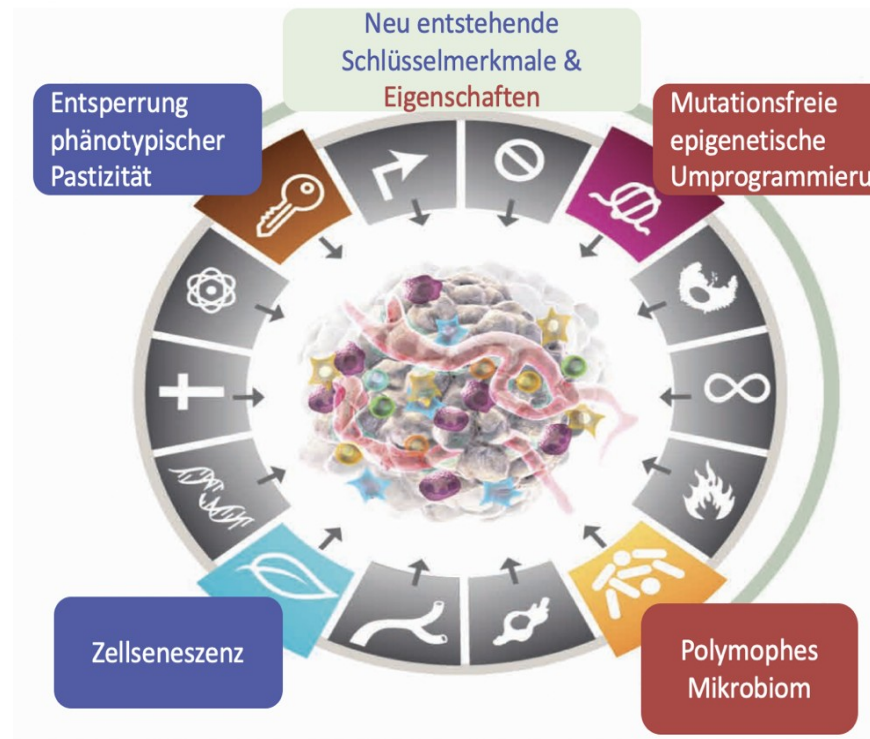
Übersetzt von (Hanahan & Weinberg, 2011)



Im Jahr 2022 wurden zwei weitere Schlüsselmerkmale und zwei weitere Eigenschaften von Hanahan vorgeschlagen: die Entsperrung phänotypischer Plastizität in Form von Dedifferenzierung, blockierter Differenzierung und Transdifferenzierung, sowie die mutationsfreie epigenetische Umprogrammierung; das polymorphe Mikrobiom und die Zellseneszenz. (Hanahan, 2022)

## Abbildung 6: Das neue Cancer Hallmarks Modell

Übersetzt von (Hanahan, 2022)



### 1.3 Zielgerichtete Krebstherapie

Zielgerichtete Krebstherapien sind neue Therapien die im Gegensatz zur “konventionellen”, zytotoxischen Chemo- und Radiotherapie die individuellen genetischen Veränderungen oder bestimmte dysregulierte Signalwege in den Tumorzellen gezielt ansteuern. Unterschieden werden monoklonale Antikörper (mAk) sowie niedermolekulare Inhibitoren (NMI), darunter sind Kinaseinhibitoren (KI), Proteasomeinhibitoren (PI) sowie Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi) und Histon-Methyltransferase Inhibitoren (HMi). (Hanahn & Weinberg, 2011; Crisci *et al.*, 2019) Als therapierbare Ziele („Actionable Targets“) können chromosomale Translokationen, somatische Mutationen sowie Veränderungen in der Genexpression bezeichnet werden. (Topper *et al.*, 2019)

Die zielgerichtete Therapie (“Targeted Therapy”) bietet die Möglichkeit, wichtige Mechanismen für das Überleben sowie die Vermehrung und Metastasierung von Krebszellen gezielt anzugreifen. (Hanahan & Weinberg, 2011) Außerdem könnte die Therapie durch genetische Untersuchung der Tumorgewebe je nach Tumor und Patient spezifisch angepasst werden („personalisierte Medizin“ oder „Präzisionsmedizin“). (Schütte *et al.*, 2017)

## 2. Forschungshypothese und Zielsetzung

Diese Arbeit basiert auf folgender **Forschungshypothese**: die personalisierte, genexpressionsbasierte, zielgerichtete Therapie ist eine sinnvolle Therapieoption bei Patienten mit chemotherapierefraktären pädiatrischen Knochen- und Weichteilsarkomen.

**Hauptziel** ist die Realisierbarkeit und Wirksamkeit dieser Therapie zu untersuchen.

Parameter für die Realisierbarkeit sind die Umsetzbarkeit der Abläufe von Patientenauswahl und Probengewinnung bis zur Therapieauswahl und Verlaufskontrollen, sowie das Vorhandensein therapierbarer Ziele.

Parameter für die Wirksamkeit sind das Ansprechen auf die Therapie, sowie das Gesamtüberleben (OvS) und das progressionsfreie Überleben (PFS).

Als **Nebenziele** sind die Therapieverträglichkeit durch Lebensqualität (Quality of Life, “QoL”) und unerwünschte Ereignisse (Adverse Events, “AE”) zu untersuchen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### RNA-Isolierung

TRIzol Reagent	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe, DE
----------------	---

RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
-----------------	--------------------

##### Markierung

IVT Labeling Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
------------------	------------------------------

one cycle cDNA synthesis Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
------------------------------	------------------------------

Sample Cleanup Modules	Affymetrix, Santa Clara, USA
------------------------	------------------------------

Eukaryotic Poly-A RNA Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
-----------------------------------	------------------------------

##### Hybridisierung

Hybridization Control Kit	Affymetrix, Santa Clara, USA
---------------------------	------------------------------

##### Histologie

Paraffin	Merck, Darmstadt, DE
----------	----------------------

Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad, München, DE
-------------------------	---------------------

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, DE
-------------------------------------	--

Xylol	Merck, Darmstadt, DE
-------	----------------------

Ethanol	Merck, Darmstadt, DE
---------	----------------------

Periodic acid-Schiff (PAS)-Reagenz	Bio-Optica, Mailand, IT
------------------------------------	-------------------------

Hämatoxylin	Merck, Darmstadt, DE
-------------	----------------------

Methanol	Merck, Darmstadt, DE
----------	----------------------

Wasserstoffperoxide H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt, DE
---	----------------------

Antigen-Demaskierungslösung	Vector, Burlingame, CA, USA
-----------------------------	-----------------------------

Avidin	Vector, Burlingame, CA, USA
--------	-----------------------------

Biotin	Vector, Burlingame, CA, USA
--------	-----------------------------

Superblock	ID Labs, London, ON, Canada
------------	-----------------------------

ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, CA, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck, Darmstadt, DE
3,3'-diaminobenzidine (DAB)	Sigma-Aldrich, St.Loius, USA
NiCl	Sigma-Aldrich, St.Loius, USA
Methylgrün-Färbelösung	Fluka/Sigma-Aldrich, München, DE
Vecta Mount® Einbettmedium	Vector, Burlingame, CA, USA
Objektträger	BioRad, München, DE
ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, CA, USA
Vecta Mount® Einbettmedium	Vector, Burlingame, CA, USA

### **Antikörper**

biotinylierte anti-Kaninchen IgG (H+L) Ziegenantikörper (ZRB 1001)	Linaris, Mannheim, DE
Biotinylierte anti-Maus IgG2b Rattenantikörper (550333)	BD Pharmingen, San Diego, USA
Biotinylierte anti-Maus IgG1 Rattenantikörper (406604)	Biolegend, San Diego, USA
TOP2A Antikörper (ab180393)	Abcam, Cambridge, UK
FGFR1 Antikörper (HPA056402)	Sigma-Aldrich, St.Loius, USA
RET Antikörper (HPA008356)	Sigma-Aldrich, St.Loius, USA
HDAC2 Antikörper (ab32117)	Abcam, Cambridge, UK

### **Geräte**

GeneChip® Fluidics Station 450	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Scanner 3000 7G	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip® Human Genome 1.0 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
GeneChip™ Human Genome U133Plus 2.0 Array	Affymetrix, Santa Clara, USA
Bioanalyzer 2100	Agilent, Santa Clara, USA
Elektrophoresekammer	BioRad, München, DE



Gefrierfach (-80°C) Hera freeze	Heraeus, Hanau, DE
Gefrierfach (-20 °C) Cool vario	Siemens, München, DE
Gefrierfach (+4°C) Cool vario	Siemens, München, DE
Mikrowelle	Siemens, München, DE
Autoklav	Systec, Linden, DE
Flüssigstickstofftank L-240 K	Taylor-Wharton, Husum, DE
Micropipetten 0.5-10µl, 10-100µl, 20-200µl, 100-1000µl)	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetting assistant Easypet	Eppendorf, Hamburg, DE
Wasserreinigungssystem TKA GenPure	TKA GmbH, Niederelbert, DE
Microscope DMIL	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Schneidgerät Jung CM 3000	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Lichtmikroskop Leica DMRBE	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Lichtmikroskop Leica Wild MPS52	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Digitale Kamera DC 300F	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen, DE
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, DE

## Software

macOS Sierra Version 10.12.6	Apple, CA, USA
Word® for Mac 2011	Microsoft, Redmond, WA, USA
Excel® for Mac 2011	Microsoft, Redmond, WA, USA
Expression console, v.1.1.	Affymetrix, Santa Clara, USA
TARGETgene 2.0 beta	BMSR, University of Southern California
RMAExpress 1.1.0.	Online GUI, Ben Bolstad
GraphPad Prism Version 6.0h	GraphPad Software, San Diego. USA
ENDNOTE x7.8	Thomson-Reuters, New York, NY, USA

R Studio Version 1.0.136

R. RStudio, PBC, Boston, USA

GSEA Software 2.2.x

Broad Institute

### **3.2 Patienten**

Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene mit refraktären, rezidivierenden (zwei Rezidive oder mehr) oder progressiven pädiatrische Knochen- und Weichteilsarkomen wurden im Rahmen eines interdisziplinären Tumorboards in der Kinderklinik der Technischen Universität München als potentielle Kandidaten für die zielgerichtete Therapie ausgewählt.

Das interdisziplinäre Tumorboard besteht i.d.R. aus pädiatrischen Onkologen und ggf. Onkologen, einer Pathologin, Radiologen/Nuklearmedizinern, Kinderchirurgen, und einem Biologen.

Die Entnahme der Gewebeproben, die genetische Analyse des Tumormaterials und die Erfassung der klinischen Daten in einer Registerstudie wurden vom Ethikkomitee der Technischen Universität München bewilligt (2562/09). Gewebeproben wurden nach Einverständniserklärung der volljährigen Patienten oder der Eltern bzw. der Sorgeberechtigten und nur, wenn klinisch indiziert, entnommen. Der Zweck der Probenentnahme und die wissenschaftlichen Grundlagen des Forschungsprojektes wurden im Rahmen eines persönlichen Gesprächs mit den Patienten und deren Eltern bzw. deren Sorgeberechtigten in einfacher, verständlicher Sprache durch die behandelnden Ärzte ausführlich erklärt.

### **3.3 Gewebeproben**

Gewebeproben wurden vom primären Tumor oder von einer repräsentativen Tumormetastase mittels minimalinvasiver Biopsie oder ggf. durch eine Operation gewonnen.

Die Bestätigung der Diagnose bzw. des Rezidivs erfolgte in dem schockgefrorenen Material durch die Pathologie. Gewebeproben mit mindestens 70% Tumorerhalt wurden zur weiteren Analyse verwendet. Dafür wurden Tumorproben möglichst aus der aktuellen Rezidiv- bzw. Progressionsstelle analysiert.

### 3.4 Histologische Untersuchungen

#### 3.4.1 Färbungen

Probenmaterial aus Stichbiopsien oder Resektionsmaterial wurden nach Entnahme und initialer klinisch histologischer Untersuchung in 4% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Weitere forschungsbezogene histologische Bewertungen wurden im Rahmen dieser Arbeit retrospektiv an den vorhandenen Paraffin-Blöcken durchgeführt. In dieser Bewertung wurden hochexpressierte Gene, die als Therapieziele für die Behandlung definiert wurden, histologisch untersucht. Hier wurden nur Proben aus bereits behandelten zielgerichtete Therapie-Patienten (zT Patienten) retrospektiv ausgewertet. Die Auswahl des primären Antikörpers (Produkt und Hersteller) wurde angesichts der tumorspezifischen Referenzfärbungen in der online Datenbank Human Protein Atlas getroffen. (The Human Protein Atlas) (Uhlén *et al.*, 2015; Uhlen *et al.*, 2017) Technische Daten für den jeweiligen Antikörper wurden nach Herstelleranweisungen bzw. Datenblatt des Produktes evaluiert. Für die Vorbereitung der histologischen Untersuchung wurden aus den archivierten Blöcken jeweils 2 µm dicke Schnitte auf Ammoniumpersulfat-beschichteten Objektträgern für 12 Stunden bei 37° C getrocknet.

#### 3.4.2 Rückgewinnung des Antigens

Die Schnitte wurden dreimal für je fünf Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer Alkoholreihe mit absteigenden Konzentrationen (100%, 96% und 70%) jeweils für zwei Minuten rehydriert und anschließend in phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline; PBS) zweimal für jeweils eine Minute gewaschen. Um die endogene Peroxidase zu blockieren, wurden die Schnitte in 20 ml 30% Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) auf 180 ml Methanol für zwanzig Minuten im Dunkeln inkubiert und danach zweimal für eine Minute in PBS gewaschen. Für die Demaskierung des Antigens wurden je 300 ml destilliertes Wasser mit 3 ml Antigendemaskierlösung in der Mikrowelle für drei Minuten zum Kochen gebracht.

Die Schnitte wurden dann bei 1 bar für 20 Minuten autoklaviert, für 40 Minuten abgekühlt und anschließend in PBS gewaschen.

### **3.4.3 Detektion des Antigens**

Für die Blockierung des endogenen Biotins wurde zunächst 1 Tropfen Avidin für 15 Minuten appliziert, dann kurz in PBS gewaschen, anschließend 1 Tropfen Biotin für 15 Minuten appliziert und zuletzt für 7 Minuten in PBS gewaschen.

Bei polyklonalen Kaninchen-Antikörpern wurde die Blockierlösung „Superblock“ bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert und anschließend kurz in PBS gewaschen.

Bei Einsatz eines sekundären Ziegen-Antikörpers betrug die Inkubationszeit 10 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurde der primäre Antikörper appliziert und über Nacht bei 4°C inkubiert.

### **3.4.4 Visualisierung des Antigens**

Biotinylierte sekundäre Antikörper wurden in einer 1:300 Verdünnung in PBS-für 30 Minuten inkubiert und anschließend für 7 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte für 30 Minuten mit der ABC-Substrat-Lösung (Avidin-Biotin Komplex) in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend in PBS und 50 mM Tris-HCl, pH 7,6 jeweils für 5 Minuten gewaschen. Für die Färbung wurden 200 ml Tris bei 37°C vorgewärmt. Eine Lösung aus 4ml DAB (3,3'-diaminobenzidine) und 1ml NiCl und 500µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde für die Färbung verwendet und mit Methylgrün für 1 bis 2 Minuten gegengefärbt und in eine aufsteigende Alkoholreihe ab 96% und in Xylol für jeweils 10 Sekunden eingetaucht. Anschließend wurden die Präparate mit VectaMount eingedeckt.

### **3.4.5 Bewertungen**

Die Schnitte wurden hinsichtlich Tumorerhalt und Qualität der Färbung bzw. der Immunhistochemie (IHC) evaluiert. Die erwartete normale Lokalisation des untersuchten Antikörpers in den entsprechenden Tumorgeweben (Nukleus, Zytoplasma, Membran, etc.) wurde mittels der Referenzdaten der Human Protein Atlas Datenbank evaluiert bzw. ausgesuchter Referenzfotos verglichen.

Als Antikörperkontrolle wurden Schnitte von normalen Geweben mit einer bekannten natürlichen Hochexpression des entsprechenden Ziels (RNA-Expression und

Proteinexpression bzw. Anteil der positiv gefärbten Zellen) mit den untersuchten Proben gefärbt.

Für die Bewertung der Ziele bzw. des Proteins wurden je nach Möglichkeit zwischen drei und fünf Schnitte pro Ziel und Block verwendet. Das Vorhandensein des Zielproteins in jedem Schnitt wurde durch die Betrachtung positiv gefärbter Zellen unter mindestens 100x Vergrößerung in einer Skala zwischen 0% und 100% mit einer Gittermethode geschätzt und von einer erfahrenen Histologin bestätigt. Daraus wurde ein Durchschnittswert pro Probe und Ziel bzw. Protein berechnet.

Ein Korrelationskoeffizient nach Pearson wurde berechnet, um mögliche statistische Zusammenhänge zwischen RNA-Expression mittels Array-Analyse und Proteinexpression mittels IHC zu evaluieren. Dasselbe wurde für die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen dem Gesamtüberleben bzw. PFS und der IHC berechnet.

Ein Wilcoxon-Mann-Whitney Test wurde zusätzlich verwendet um die Proteinexpression mittels IHC (hoch: definiert mit 35% oder mehr positiven Zellen und gering: mit weniger als 35 %) mit der RNA-Expression bzw. des Fold Changes mittels Arrays (hoch: definiert mit 3 oder mehr Fold Change und gering: mit weniger als 3 Fold Change) zu vergleichen.

### **3.5 Genexpressionanalyse**

#### **3.5.1 Hintergrund**

Die Genexpressionsanalyse bietet die Möglichkeit, einen dynamischen Überblick über das Genom zu schaffen, in dem die Expression von Messenger RNAs (mRNA) quantitativ analysiert wird. (San Segundo-Val & Sanz-Lozano, 2016)

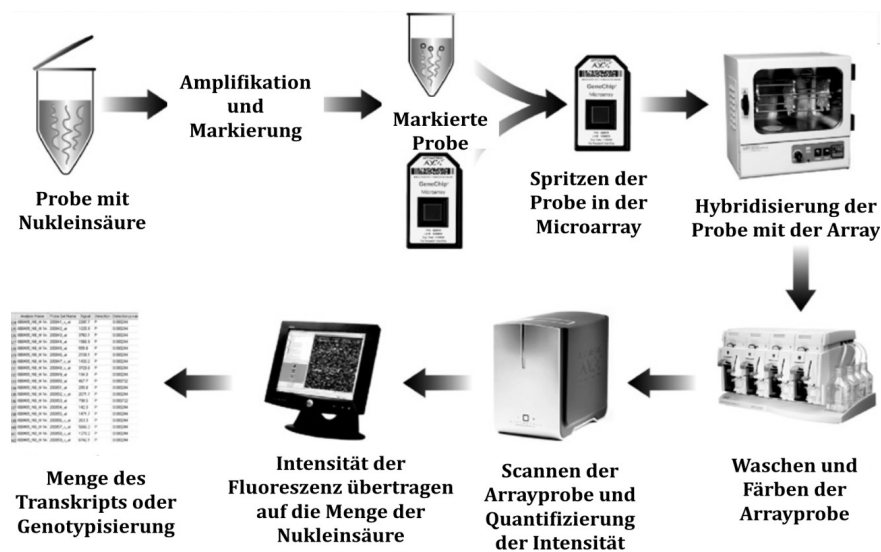
Die Microarray Technologie basiert auf *in situ* Hybridisierung und erlaubt die gleichzeitige Analyse tausender Gene. Bei den GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA) handelt es sich um DNA-Sequenzen, die auf einer Quartz Basis mittels Photolithographie befestigt sind. (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006)

cDNA-Moleküle werden mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) aus mRNA in der Untersuchungsprobe generiert und amplifiziert. Danach werden sie fluoreszenzmarkiert und mit künstlich hergestellten

Proben im Array hybridisiert. Wenn die Untersuchungsprobe sich mit der komplementären Probe im Array hybridisiert, erhöht sich das Fluoreszenzsignal, wird durch einen Scanner gemessen und entsprechend dokumentiert.

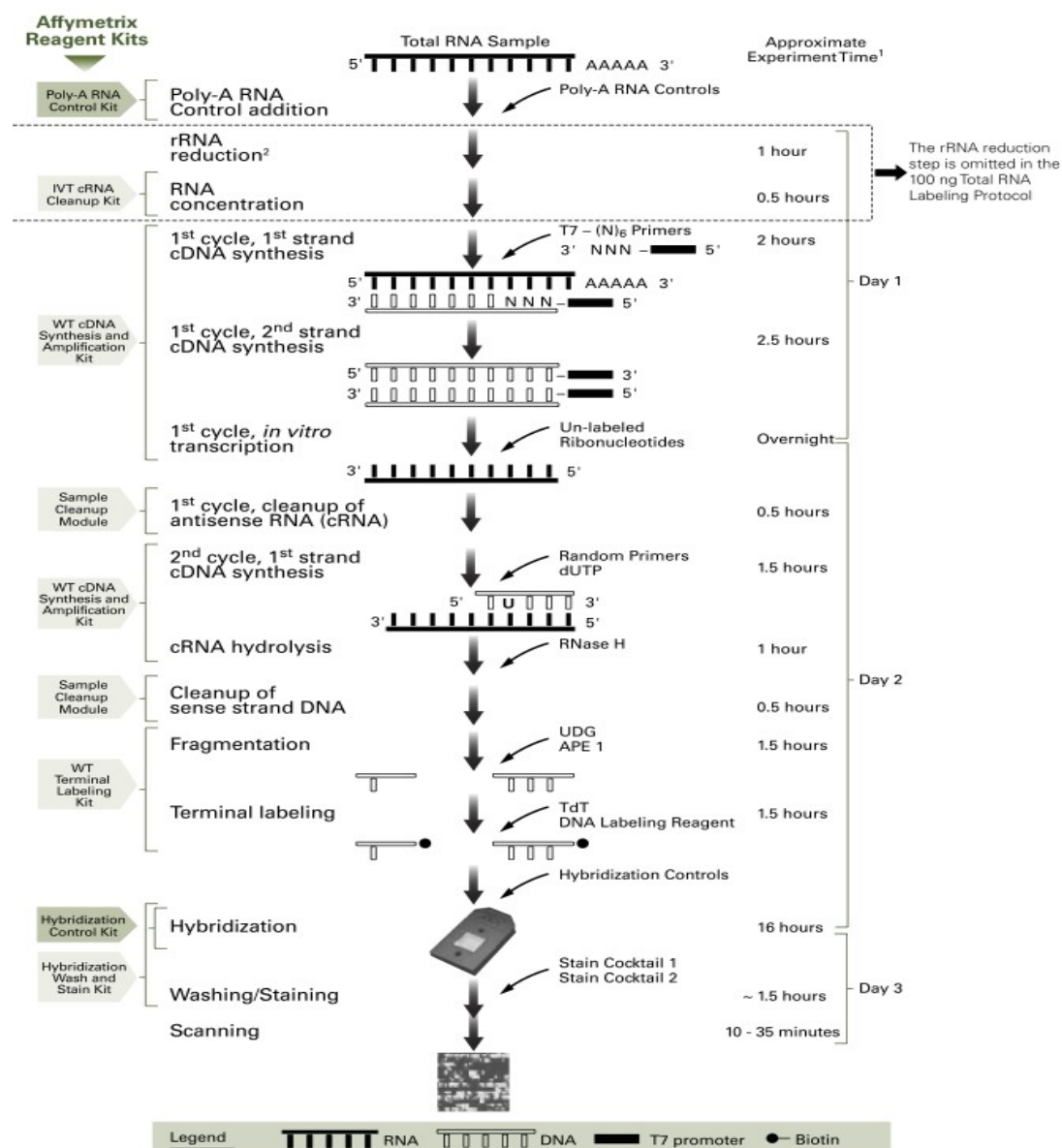
### Abbildung 7: Ablauf einer GeneChip Microarray Untersuchung

von (Dalma-Weiszhausz *et al.*, 2006)



### Abbildung 8: Technische Informationen eines GeneChip Microarray Experiments.

(Affymetrix Data Sheet)



Die Technologie von Affymetrix GeneChip verwendet Probesets. Jedes Probeset hat 16-20 Oligonukleotidpaare (ProbeNpaare) und erprobt ein spezifisches Gen. (Liu *et al.*, 2003) Ein ProbeNpaar besteht aus einer "Perfect Match Probe (PM)" die das Ziel perfekt komplementiert und eine "Mismatch Probe (MM)" mit einer zentralen mismatch Base, um Hintergrundsignale möglichst zu minimieren. (Jiang *et al.*, 2008) Der numerische Output des Fluoreszenzscanners repräsentiert die Intensität des Fluoreszenzsignals und korreliert mit der Hybridisierung der ProbeNpaare. Diese werden oft als Rohdaten betrachtet, weiterbearbeitet und mittels verschiedener statistischer Methoden zusammengefasst.

### 3.5.2 Das Array Experiment

#### 3.5.2.1 Vorbereitung der RNA

Die gesamte RNA wurde vom Biopsiematerial mittels Phenol/Chloroform/IAA (TRIzol) extrahiert und mit einem RNeasy Mini Kit purifiziert. Die Qualität und Menge der gesamten RNA wurde mittels eines Bioanalyzers bewertet. Dafür wurden zwei gut definierte Peaks (die mit der Visualisierung der 18S und 28S RNA-Banden in der Agarosegel-Elektrophorese korrespondieren) benötigt. Für die Poly-A Kontrollen (spike-in control) wurde ein Poly-A Control Kit mit Probesets für einige *B.subtilis* Gene (*lys*, *phe*, *thr*, und *dap*), die in eukaryotischen Proben fehlen, benutzt. Die Kontrollen wurden dann mit Hilfe der Untersuchungsproben amplifiziert und markiert. Hier wurde die Reihenfolge  $lys < phe < thr < dap$  als relative Signalstärke erwartet.

#### 3.5.2.2 Synthese der cDNA und cRNA

Für die cDNA-Synthese wurden One-Cycle cDNA Synthesis-Kits und SuperScript II Kits mit RNA/T7-Oligo(dT) Primer und T4 DNA Polymerase gemäß der Herstelleranleitung verwendet. Anschließend wurden Biotin-markierte cRNA mittels eines GeneChip IVT Labeling Kits generiert und mit dem GeneChip Sample Cleanup Module gereinigt. Die Qualität und Quantität der cRNA wurde mittels eines Bioanalyzers kontrolliert (Absorbanz A260/A280). Die aufgearbeitete cRNA-Menge wurde schließlich an die jeweils eingesetzte Gesamt-RNA- und cDNA-Menge angepasst.

$$\text{angepasster cRNA Inhalt} = \text{RNAm} - (\text{gesamt RNAi}) \cdot y$$

$$\text{RNAm} = \text{Menge der cRNA nach IVT } (\mu\text{g})$$

$$\text{gesamt RNAi} = \text{Ausgangsmenge der gesamten RNA } (\mu\text{g})$$

$$y = \text{Anteil der in IVT eingesetzten cDNA}$$

Für die optimale Hybridisierung wurde die cRNA mittels metallinduzierter Hydrolyse in 35 bis 200 Basen fragmentiert.

#### 3.5.2.3 Hybridisierung und Scannen

Die cRNA wurde mittels eines Hybridisierungskontrollkits gemäß der Herstelleranleitung für 16 Stunden zu den Affymetrix Human Gene 1.0 ST oder GeneChip U133 Plus 2.0 Array (Probe-Arrays) hybridisiert.



### Abbildung 9: Beispiel eines Affymetrix GeneChips



Ein GeneChip® Scanner und die Expression Console Version 1.1 Software von Affymetrix® wurden für das Scannen und die Generierung der Daten verwendet.

### 3.5.3 Bearbeitung der Array Daten

Die aus dem Scanner generierten Rohdaten sind Affymetrix.CEL Dateien, die auch als zweispaltige Excel Dateien bearbeitet werden können (Probesets und Expressionswerte). Für die weitere Bearbeitung der Rohdaten wurde R Studio Version 1.0.136 verwendet. (RStudio Team, 2020)

#### 3.5.3.1 Normalisierung und Generierung von Fold Change Werten

Die Daten wurden mittels “Robust Multi-array Average” (RMA) bearbeitet und zusammengefasst. Die RMA-Methode normalisiert Daten aus PM-Proben und präsentiert sie als Log-Daten. (Irizarry *et al.*, 2003) Transkripte wurden auch nach Funktion mit GO-Annotationen annotiert. (Balakrishnan *et al.*, 2013)

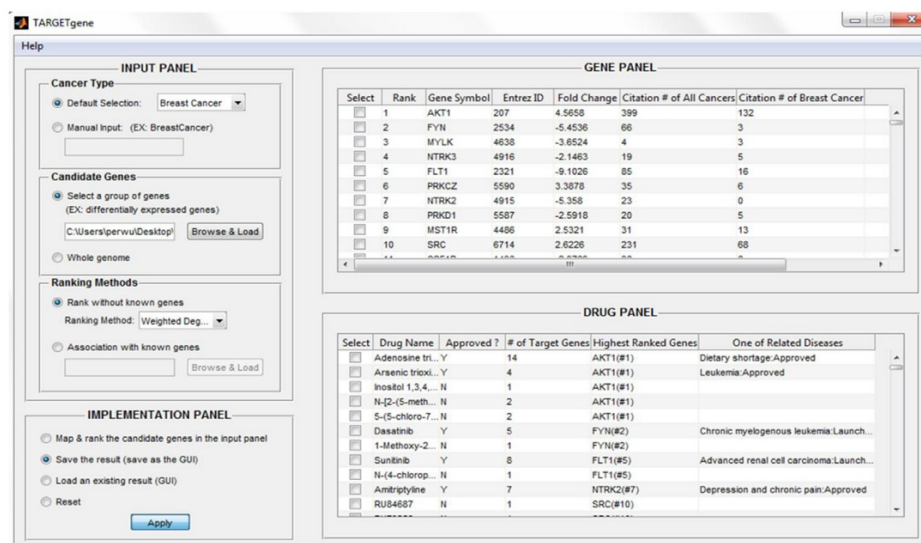
Um Referenzexpressionswerte zu generieren wurden 23 Proben aus verschiedenen normalen Geweben analysiert (21 Gewebearten für Human Gene ST1.0 Arrays (GEO: GSE45544) und 22 Gewebearten für U133 Plus 2.0 Arrays (GSE18674) und daraus ein arithmetischer Mittelwert für jedes Gen generiert. (Miya, 2012; Richter, 2016) Folgende Referenzgewebe wurden verwendet: Normale PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes), Knochenmark, Milz, Thymus, zwei Magen Proben, Dünndarm, Kolon, Herz, Leber, Lunge, Skelettmuskulatur, Gehirn, Zerebellum, Rückenmark, Luftröhre, Speicheldrüse, Prostata, HodenKonsi, Uterus, fetales Gehirn,

fetale Leber. Die gemessenen Genexpressionswerte in der Untersuchungsproben wurden dann mit der Expression derselben Gene in normalen Geweben (dessen Mittelwerts) mittels der n-Fach Veränderung (fold change) und eines zweistichproben *t*-Testes verglichen. Als hochexpressierte Gene wurden Gene mit zweifach höheren (2-fold) Expressionswerten im Vergleich zu den RMA normalisierten, linearisierten Expressionswerten in den normalen Geweben definiert.

### 3.5.3.2 TARGETgene

Um die generierten Daten weiter zu filtern und hochexpressierte Gene mit funktioneller Relevanz in den Tumorgeweben einfacher identifizieren zu können, wurde eine maschinelle Lernsoftware (TARGETgene) verwendet. (Wu *et al.*, 2012) TARGETgene wurde in der University of Southern California (USC) entwickelt und basiert auf funktionellen Gen-Gen Netzwerken, die aus der Literatur generiert und für einige gutdefinierte Referenztumore angepasst wurden. Es ist damit möglich differenziell exprimierte Gene je nach Krankheitsrelevanz und Therapierbarkeit einzuordnen. Entscheidend sind dabei zwei Werte: der “hub score” (Gene im Mittelpunkt des analysierten Gennetzwerks) und der “seed gene association score” (Gene, die mit einem gut definierten Tumor-Gen assoziiert sind). Der Output von TARGETgene wird in einer benutzerdefinierten Tabelle visualisiert. Dabei ist es möglich die analysierten Gene nach den folgenden Kriterien zu ordnen: Rang (Rank), Gensymbol (Gene symbol), Entrez ID, n-Fach Veränderung in den Expressionswerten (fold change), Anzahl der Zitate in der Literatur bei allen Krebsarten und die Anzahl der Zitate in Bezug auf die aktuelle probenspezifische Krebsart. Außerdem bietet TARGETgene einen Überblick über die verfügbaren Wirkstoffe für jedes hoch exprimierte bzw. hochrangige Gen und ordnet diese in Hinblick auf den Zulassungsstatus, sowie die Anzahl und den Rang der therapierbaren Zielgene ein. Es ist auch während der Analyse möglich einzelne hochexpressierte Gene und Wirkstoffe nach bestimmten Kriterien einzuordnen und weiter in der Literatur zu recherchieren. Unter den in dieser Studie untersuchten Tumorerkrankungen wurde nur ES als Referenztumor im TARGETgene integriert. Deshalb wurde der Rangwert nur bei ES berücksichtigt. Bei allen anderen Tumorarten wurden Gene mit einer hohen n-fachen Veränderung bzw. hochexpressierte Gene priorisiert.

Abbildung 10: Beispiel der Benutzeroberfläche bei TARGETgene

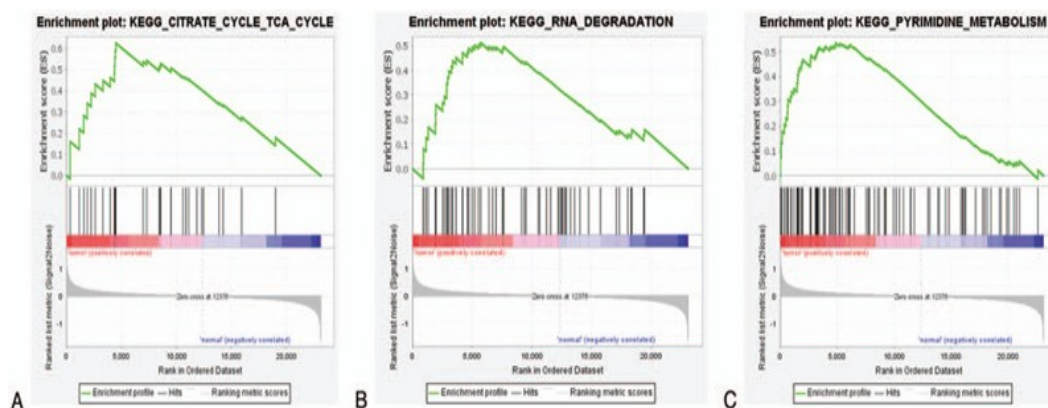


Von (Wu *et al.*, 2012)

### 3.5.3.3 Visualisierung und funktionelle Analyse

Für die Visualisierung der differenziell exprimierten Gene innerhalb der Signalwege wurden online verfügbare Datenbanken wie KEGG und REACTOME verwendet. (Kanehisa & Goto, 2000; Croft *et al.*, 2011) Zusätzlich wurde die Gene Set Enrichment Analysis (kurz GSEA) vom Broad Institute für die Analyse der hochexprimierten Gene eingesetzt. GSEA ist eine Berechnungsmethode für die Analyse von Expressionswerten in Bezug auf eine A-Priori definierte Genliste (z.B. für ein bestimmtes Signalweg, das gleiche Funktion, oder dasselbe Genkategorie). Außerdem bietet GSEA einen Überblick über das Vorhandensein von Genen, die eine Resistenz gegen eine bestimmte Therapie verursachen können, was bei der Therapieauswahl wichtig ist. (Mootha *et al.*, 2003; Subramanian *et al.*, 2005)

Abbildung 11: Beispiel einer GSEA-Analyse



Von (Zhao *et al.*, 2020)

### 3.5.3.4 Weitere Array Analysen - Immuninfiltration

Der Immunzellgehalt einer Biopsie bzw. die Immuninfiltration wurde *in silico* mit CIBERSORT geschätzt. CIBERSORT (Cell-type Identification By Estimating Relative Subsets Of known RNA Transcripts) ist ein online verfügbarer Algorithmus bzw. Tool welches die Signatur von 22 gut definierten Subsets von Immunzellen in Arraydaten berechnet. Diese Signaturen wurden mittels des TCGA-Projekts identifiziert. Die Ergebnisse werden als gestapeltes Balkendiagramm und als Heatmap visualisiert. (Chen *et al.*, 2018)

Der Output umfasst einen P-Wert für jede Probe. Ein Schwellenwert von  $<0.05$  wurde dafür definiert. Die Ergebnisse der Dekonvolution wurden als relative Bruchteile des gesamten Inhalts von Leukozyten (zu 1 normalisiert) präsentiert. (Chen *et al.*, 2018)

## 3.6 Identifizierung von Zielen (Targetanalyse)

Ziele wurden als hochexprimierte Gene, die eine zentrale Rolle in einem für die Entstehung, das Wachstum und die Metastasierung der Krebszellen wichtigen Signalwegen, definiert. Diese Gene wurden mit Hilfe des TARGETgene Algorithmus und der oben genannten Analyse- und Visualisierungsmethoden identifiziert. Dafür wurden die ersten hundert „hub genes“ als relevant für die Analyse in ES und nur hochexprimierte Gene, also ohne den „hub score“ für OS und STS, verwendet. Ein mögliches Zielgen sollte idealerweise eine zentrale Rolle und eine bekannte annotierte Funktion in einem Krebssignalweg spielen. Eine Liste mit möglichen Zielen wurde dann individuell pro Probe generiert und nach Relevanz priorisiert.

### 3.7 Auswahl von Therapeutika

Nach der Zielidentifizierung wurden Therapeutika, die hochrangige bzw. hochexprimierte Ziele in der Zielliste spezifisch angreifen, ausgesucht. Diese wurden entweder mittels der eingebauten Funktionen im TARGETgene oder der Online-Datenbank Drugbank einzeln identifiziert und in der Literatur weiter recherchiert. (Wishart *et al.*, 2006) Kriterien für die Auswahl der Therapeutika sind: Verfügbarkeit, vorherige Anwendung bei Patienten (um Verträglichkeit und Resistenzen zu identifizieren), Krankheitsspezifische Zitierung in der Literatur, Zitierung in Bezug auf Krebserkrankungen, Nebenwirkungen, Wechselwirkungen, kumulative Toxizität, Möglichkeit der oralen Anwendung und Zulassungsstatus. Eine Liste von Therapeutika wurde dann entsprechend diesen Kriterien generiert und in einem therapieorientierten internen Tumorboard diskutiert. Dieses bestand i.d.R. aus drei pädiatrischen Onkologen, einer klinischen Pharmakologin, einem Biologen und einer Studienärztin (die Autorin dieser Arbeit). Eine patientenspezifische, pharmazeutische Expertise wurde dann mit der Apotheke in Anbetracht der Auswahlkriterien, sowie der kumulativen Dosis von bisherigen Therapien generiert. Diese umfasst ebenfalls potenzielle Nebenwirkungen und gibt Empfehlungen für individuelle Verlaufskontrollen.

### 3.8 Therapie und Verlaufskontrollen

Die Therapie erfolgte entweder stationär oder in der onkologischen Tagesklinik. Bei den meisten Patienten handelte es sich um einen individuellen Heilversuch. Bei palliativen Patienten erfolgte die orale Therapie in der häuslichen Umgebung. Die Reihenfolge und das Zeitfenster für die empfohlenen Therapien, sowie die Verlaufskontrollen wurden in Anbetracht der pharmazeutischen Expertise in der Patientenakte festgelegt. Die Wirksamkeit der Therapie wurde bei den meisten Patienten im Rahmen regelmäßiger, klinischer und radiologischer Verlaufskontrollen dokumentiert. Das Ansprechen auf die Therapie wurde nach den RECIST 1.1 Kriterien „Response Evaluation Criteria in Solid Tumors“ möglichst monatlich ausgewertet. (Eisenhauer *et al.*, 2009)

Verlaufskontrollen erfolgten monatlich auch für Patienten, die eventuell keine zielgerichtete Therapie bekommen haben (KzT Gruppe) um Krankheitsverlauf, Überleben und Lebensqualität zu evaluieren und einen Vergleich mit den mit

zielgerichteter Therapie behandelten Patienten (zT Gruppe) zu ermöglichen.

Nebenwirkungen (NB) wurden nach den “Common Terminology Criteria for Adverse Events “ Kriterien des “National Cancer Institute “(NCI-CTCAE) Version.4.03. in fünf Stufen graduiert und entsprechend dokumentiert. Die Kausalität der Therapie wurde in diesem Zusammenhang nach den Kriterien der Weltgesundheitsorganisation (WHO-UMC) Kategorien als sicher, wahrscheinlich, möglich, unwahrscheinlich, vorbehaltlich und nicht abschätzbar eingestuft. (U.S.Department Of Health And Human Services, 2010; Meyboom & Royer, 1992) Ein Dokumentationsbogen wurde in jeder Patientenakte hinterlegt und von den behandelten Ärzten entsprechend ausgefüllt. (Anlage 1)

Die Häufigkeit der dokumentierten Nebenwirkungen und unerwünschten Ereignisse in den verschiedenen Stufen wurde zu zwei vordefinierten Zeitpunkten (zu Beginn der Studie, nach vier, und nach acht Monaten) in zT und KzT Patienten mittels eines Chi-square Tests evaluiert. Der Anfangszeitpunkt wurde als der Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie definiert.

Die gesundheitsbezogene Lebensqualität und der Leistungszustand der Patienten wurden mittels der Karnofsky-Skala (für Patienten ab 16 Jahre) oder der Lansky-Skala (für Patienten jünger als 16 Jahre) bei allen Patienten an den obengenannten, vordefinierten Zeitpunkten dokumentiert. (Lansky *et al.*, 1987; Verger *et al.*,1992) (Anlage 1)

Um die Lebensqualität und den Leistungszustand der Patienten in den zwei Gruppen zu vergleichen, wurde ein Zweistichproben-T-Test für den Vergleich der Mittelwerte für gleiche Varianzen verwendet.

### **3.9 Überlebensanalyse**

Das Gesamtüberleben (Overall Survival OvS) wurde als die Zeitspanne zwischen der Aufnahme des Patienten in die Studie und dem Datum der letzten Verlaufskontrolle bzw. dem Todesdatum definiert. Das progressionsfreie Überleben „Progression Free Survival PFS“ wurde als die Zeitspanne zwischen der Aufnahme des Patienten und dem Datum einer radiologisch bewiesenen Krankheitsprogression oder dem Todesdatum definiert. Die OvS und PFS wurden anschließend mittels der Kaplan-Meier-Methode zwischen den zwei Patientengruppen verglichen. (Dudley *et al.*, 2016)

Die Überlebensanalyse wurde mittels GraphPad Prism Version V6.0h Software durchgeführt und grafisch dargestellt.

Zusätzlich wurden folgende Risikofaktoren zwischen beiden Gruppen mittels eines Chi-2-Unabhängigkeitstest verglichen: Geschlecht, Alter bei der ersten Diagnose, Alter am Aufnahmezeitpunkt, Die Zeitspanne zwischen der ersten Diagnose und dem Aufnahmezeitpunkt, Krankheitsstadium am Aufnahmezeitpunkt (Anzahl der Rezidive) und Tumorart.

## 4 Ergebnisse

Absätze 1, 4, 5, 6 und 7 dieses Kapitels sind eine überarbeitete Fassung des bereits publizierten Aufsatzes in (Weidenbusch *et al.*, 2018).

### 4.1 Patienten

Über eine Zeitspanne von knapp drei Jahren erfüllten 20 Patienten mit refraktären, pädiatrischen Sarkomen die Voraussetzungen für eine personalisierte, zielgerichtete Therapie (12 männliche und 8 weibliche). Die primäre Diagnose war ES in zehn Patienten, OS in fünf, RMS in drei, sowie zwei weitere Patienten jeweils mit SS und FS.

Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der ersten Diagnose war 15.35 Jahre (6 - 28 Jahre). Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Registerstudie bzw. die Erfüllung der Voraussetzungen für die zielgerichtete Therapie war 19.75 Jahre (8 - 35.3 Jahre). Das Zeitintervall zwischen der Erstdiagnose und der Aufnahme im Register war durchschnittlich 4.25 Jahre (1- 15.5 Jahre). Alle Patienten hatten mindestens ein zweites Rezidiv bzw. eine Progression der Erstdiagnose und waren refraktär bzw. progressiv unter konventionellen Therapien.

Patientencharakteristika zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Registerstudie wurden in Anlage 2 zusammengefasst.

Bei 9 von 20 der teilnahmequalifizierten Patienten erfolgte eine zielgerichtete Therapie basierend auf der Expressionsanalyse des Tumormaterials (zT- Gruppe).

Diese Therapie erfolgte im Rahmen von Heilversuchen. Bei den 11 weiteren Patienten erfolgte keine zielgerichtete Therapie (KzT- Gruppe).

Bei Patient 10 (PT10) war die Qualität des Biopsiematerials nicht ausreichend und der Patient war leider verstorben, bevor ein erneuter Versuch zur Gewinnung von Tumormaterial erfolgte. Patienten 11 (PT11), 13 (PT13), 14 (PT14), 16 (PT16), 18 (PT18), 19 (PT19) und 20 (PT20) bzw. deren Sorgeberechtigten haben sich gegen eine zielgerichtete Therapie entschieden. Patient 12 (PT12), sowie Patient 17 (PT17) erhielten andere experimentelle Therapien aufgrund ärztlicher Entscheidung. Patient 15 (PT15) litt unter massiven Schluckbeschwerden und wurde anschließend rein palliativ behandelt.

Der Anteil von Patienten mit ES in den zwei Gruppen war wie folgt: In der zT-Gruppe waren 5 von 9 Patienten mit ES (55%) mit durchschnittlich 2,4 Rezidive im Vergleich zu 5 von 11 ES Patienten mit durchschnittlich 2,4 Rezidive in der KzT-Gruppe (45%),  $p$ -Wert der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) für den Anteil der ES in den zwei Gruppen ist 0.65.

Weitere Risikofaktoren in der zT-Gruppe und der KzT-Gruppe: Geschlecht, Alter bei der ersten Diagnose, Alter bei Registrierung in der Studie, Intervall zwischen die erste Diagnose und die Aufnahme in der Registerstudie, Krankheitsstatus im Zeitpunkt der Aufnahme im Register (Anzahl der Rezidive). Diese Risikofaktoren wurden zwischen beiden Gruppen verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tabelle 3: Risikofaktoren zwischen die zT-Gruppe und die KzT-Gruppe**

Risikofaktor	zT	KzT	P Wert
Geschlecht	5 männlich	7 männlich	0.71*
	4 weiblich	4 weiblich	
Alter bei der ED J (D $\pm$ V)	17.2 $\pm$ 7.3	13.8 $\pm$ 3.9	0.2†
Alter bei der Registrierung J (D $\pm$ V)	21.1 $\pm$ 6.7	18.6 $\pm$ 6.6	0.42†
Zeitintervall zwischen der ED und der Registrierung	3.6 $\pm$ 2.9	4.8 $\pm$ 4.8	0.48†



J (D $\pm$ V)			
Krankheitsstatus bei Aufnahme in			
die Registerstudie	2.4	3.2	0.22 †
(Anzahl der Rezidive)			

\* p-Wert der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$  -Test)

† p-Wert eines Zweistichproben-t-Test

J: Jahre, D: Durchschnitt, V: Varianz, ED: Erstdiagnose.

## 4.2 Immunhistochemie

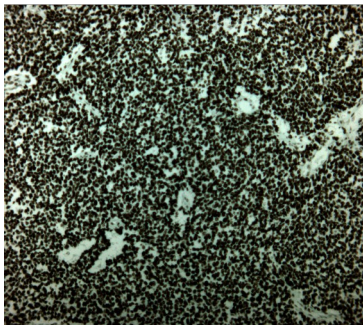
PT1- ES

Ziel HDAC2

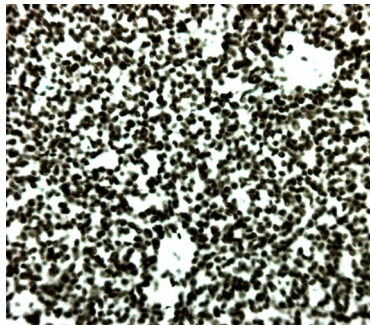
Lokalisation Nuklear

Fold change 3.2404

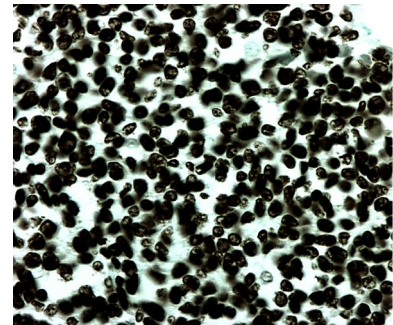
a) x 100 Vergrößerung



b) x200 Vergrößerung



c) x400 Vergrößerung



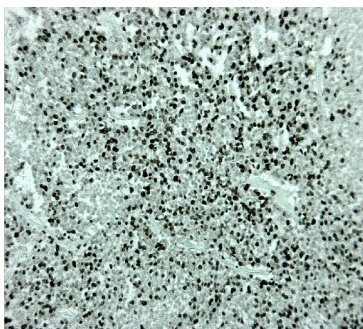
PT1- ES

Ziel TOP2A

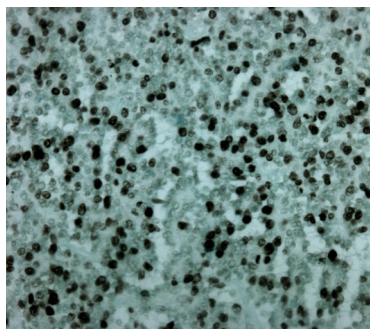
Lokalisation Nuklear

Fold change 10.0484

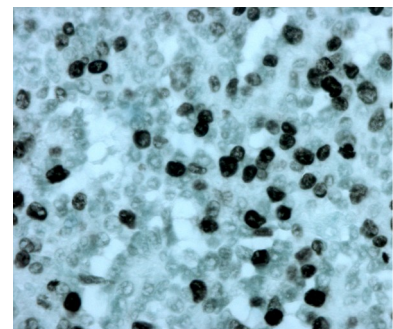
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



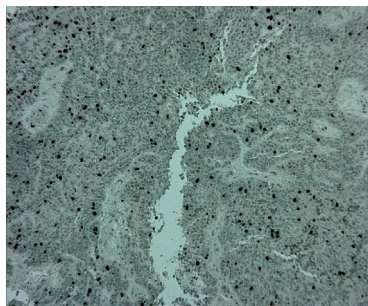
c) Vergrößerung x400



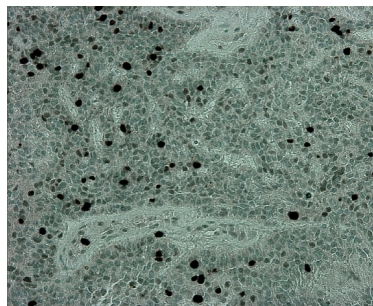


---

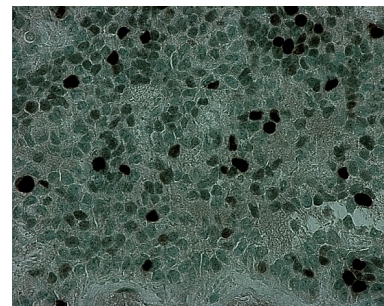
PT2- ES  
Ziel TOP2A  
Lokalisation Nuklear  
Fold change 3.342  
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200

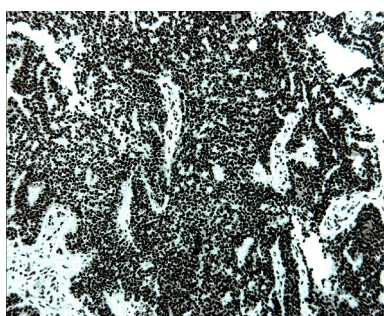


c) Vergrößerung x400

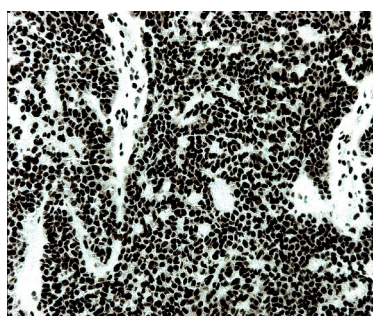


---

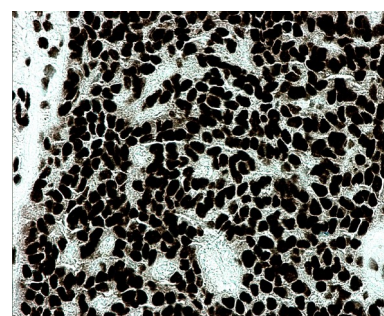
PT2- ES  
Ziel HDAC2  
Lokalisation Nuklear  
Fold change 2.3777  
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



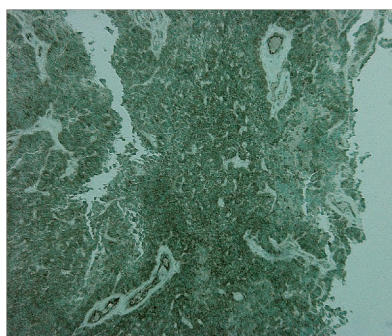
c) Vergrößerung x400



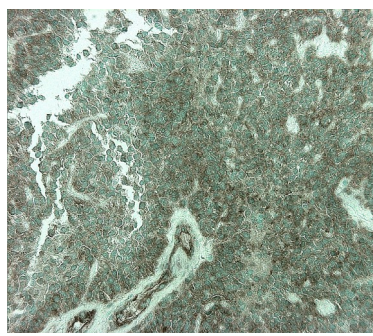
---

PT2- ES  
Ziel FGFR1  
Lokalisation  
Zellmembran/Zytoplasma  
Fold change 6.474

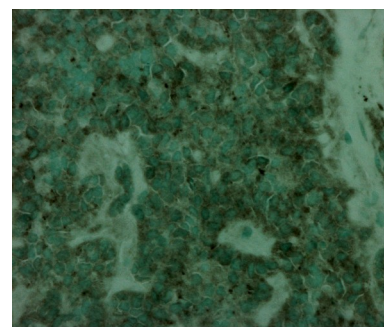
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



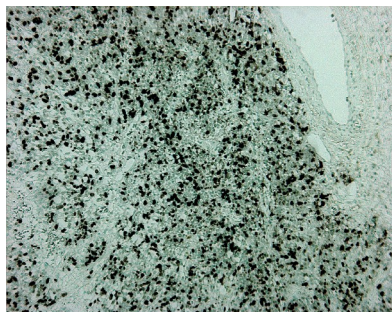
c) Vergrößerung x400



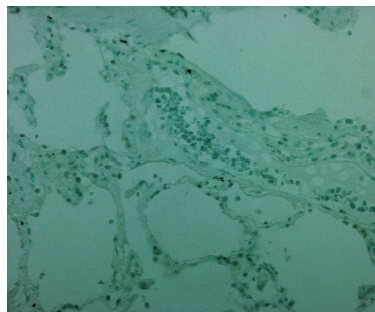


---

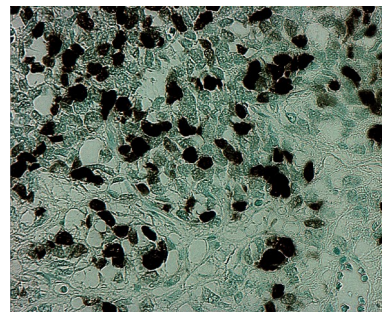
PT3- ES  
Ziel TOP2A  
Lokalisation Nuklear  
Fold change 2.9749  
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



c) Vergrößerung x400



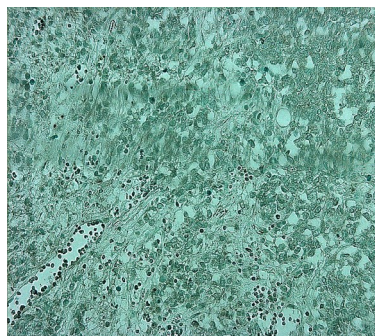
---

PT3- ES  
Ziel FGFR1  
Lokalisation  
Zellmembran/Zytoplasma  
Fold change 2.834

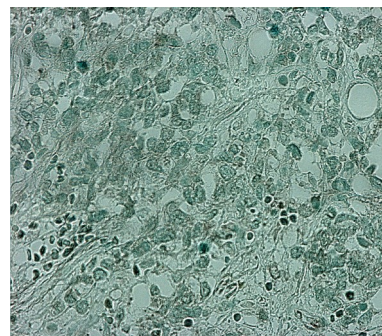
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



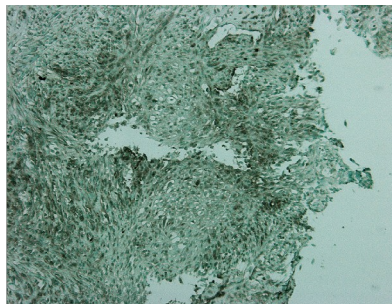
c) Vergrößerung x400



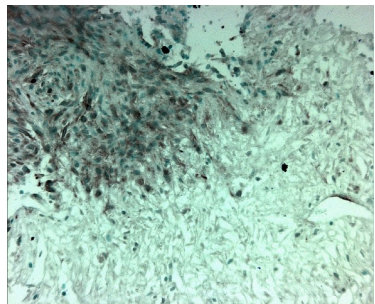
---

PT4- RMS  
Ziel FGFR1  
Lokalisation  
Zellmembran/Zytoplasma  
Fold change 3.7466

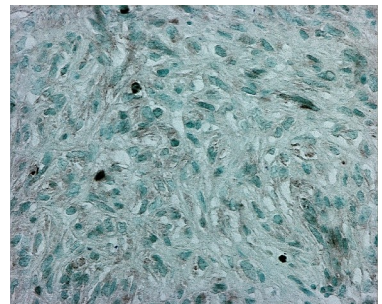
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



c) Vergrößerung x400





---

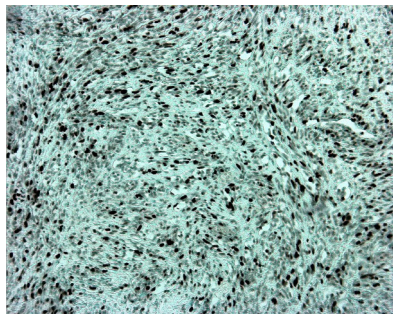
PT4- RMS

Ziel TOP2A

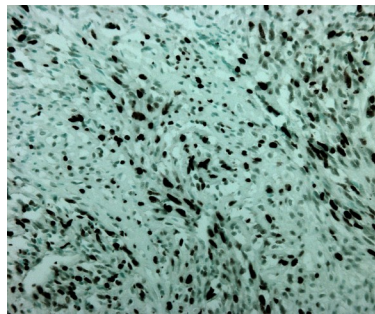
Lokalisation Nuklear

Fold change 5.1575

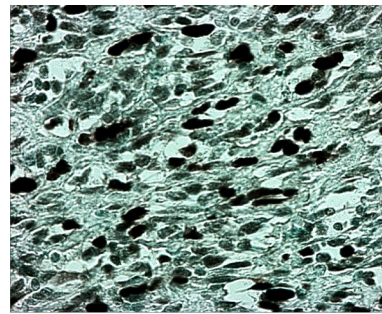
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



c) Vergrößerung x400



---

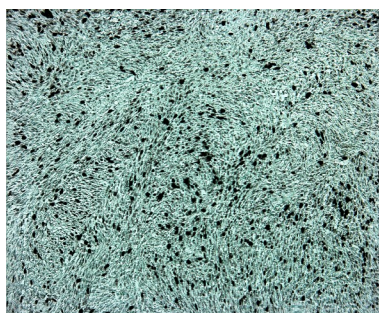
PT5- SYS

Ziel TOP2A

Lokalisation Nuklear

Fold change 1.6785

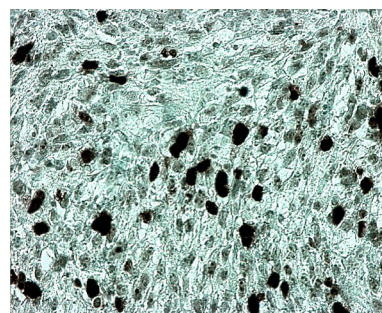
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



c) Vergrößerung x400



---

PT5- SYS

Ziel FGFR1

Lokalisation

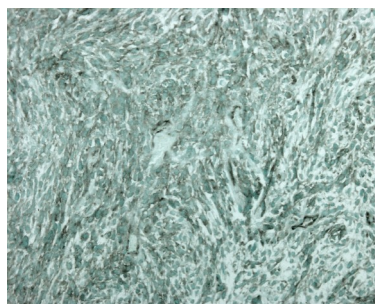
Zellmembran/Zytoplasma

Fold change 1.3641

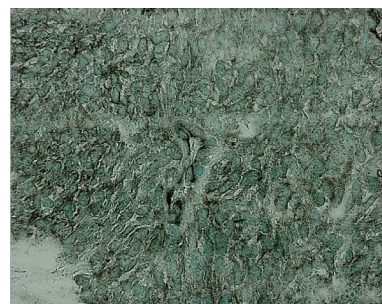
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



c) Vergrößerung x400





---

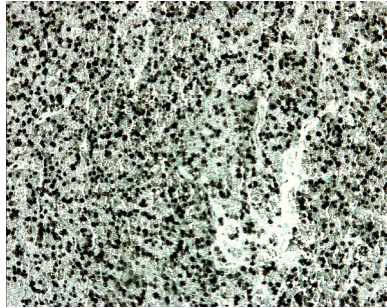
PT7- ES

Ziel TOP2A

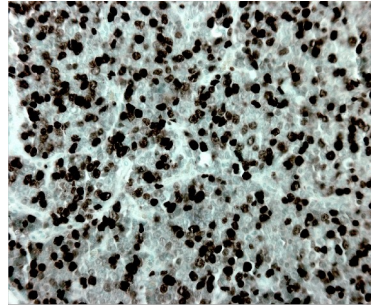
Lokalisation Nuklear

Fold change 3.4151

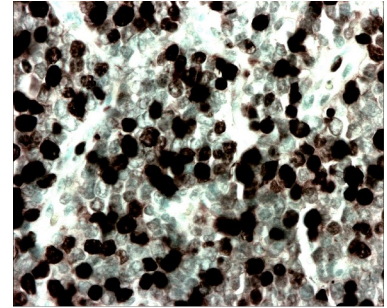
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200



c) Vergrößerung x400




---

PT7- ES

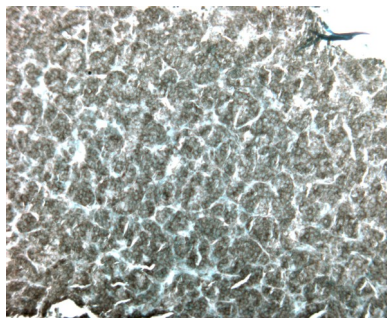
Ziel RET

Lokalisation

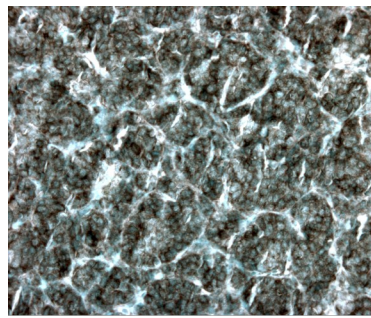
Zellmembran/Zytoplasma

Fold change 7.1312

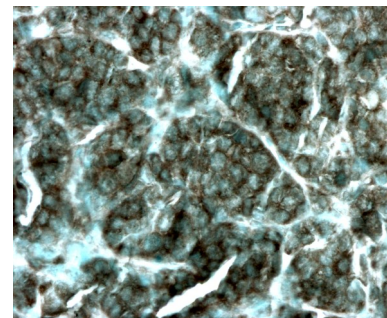
a) Vergrößerung x100



b) Vergrößerung x200

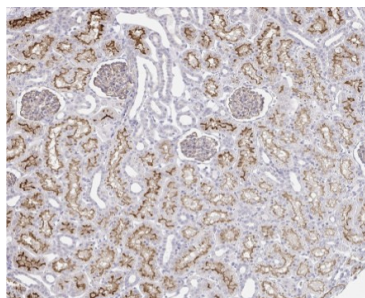


c) Vergrößerung x400

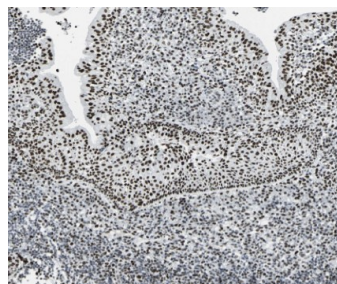



---

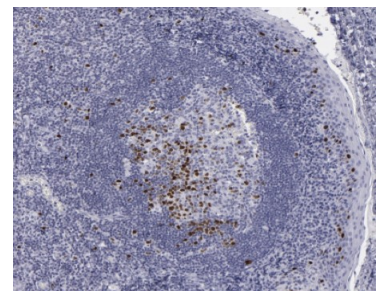
Kontrollgewebe  
anti FGFR1 in der Niere  
\_ The human protein atlas\_



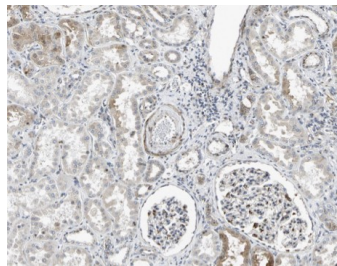
Kontrollgewebe  
anti HDAC2 in der Tonsille  
\_ The human protein atlas\_



Kontrollgewebe  
anti TOP2A in der Tonsille  
\_ The human protein atlas\_



Kontrollgewebe  
anti RET in der Niere  
\_ The human protein atlas\_



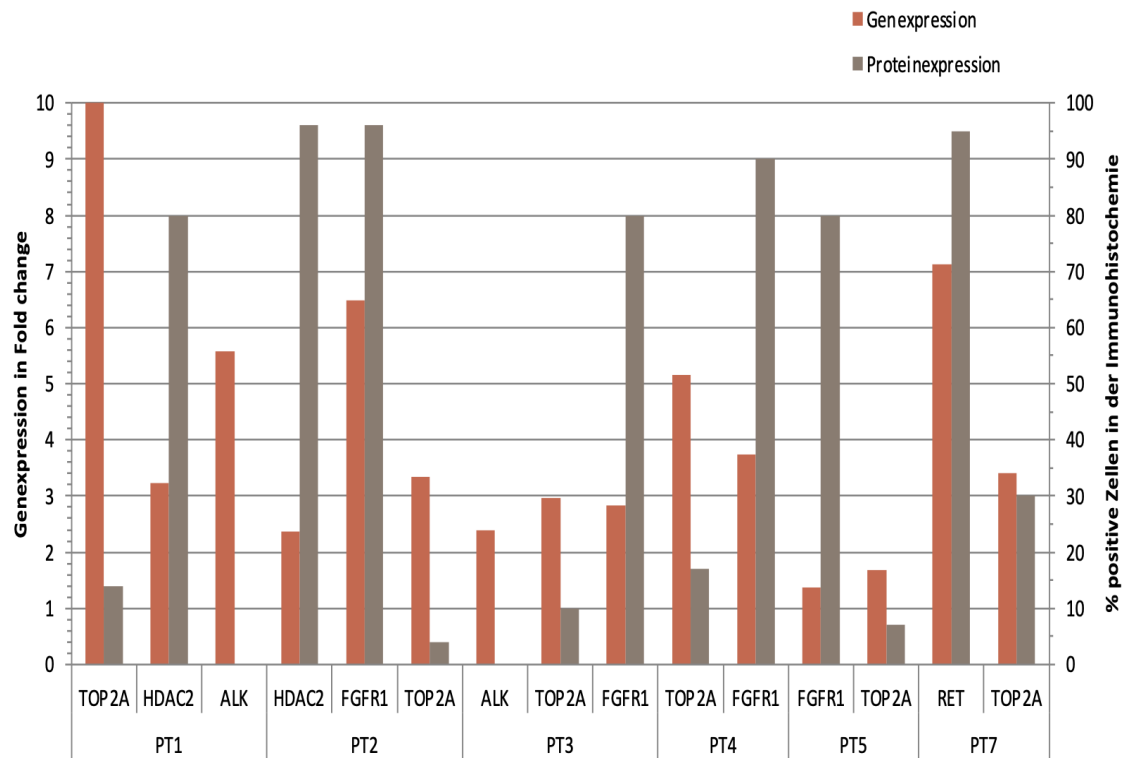
**Tabelle 4: Zusammenfassung der gefärbten Ziele**

Der geschätzte durchschnittliche Inhalt des Zielproteins in den untersuchten repräsentativen Proben mit der Intensität der Färbung und die korrelierende Fold Change der Genexpressionsanalyse

Patient	Ziel	Fold Change	% Positive Zellen im IHC	Intensität der Färbung
PT1	TOP2A	10.0484	14%	stark positiv
	HDAC2	3.2404	80%	stark positiv
PT2	HDAC2	2.3777	96%	stark positiv
	FGFR1	6.474	96%	positiv
	TOP2A	3.342	4%	stark positiv
PT3	TOP2A	2.9749	10%	stark positiv
	FGFR1	2.834	80%	schwach positiv
PT4	TOP2A	5.1575	17%	Stark positiv
	FGFR1	3.7466	90%	schwach positive
PT5	FGFR1	1.3641	80%	schwach positive
	TOP2A	1.6785	7%	stark positiv
PT7	RET	7.1312	95%	Positiv
	TOP2A	3.4151	30%	stark positiv

### Abbildung 12: Die Genexpression und der Anteil der positiven Ziele der IHC

Der mRNA-Expressionswert berechnet durch den Fold Change und der korrelierende geschätzte Anteil des Zielproteins in der IHC. Für Patienten PT6, PT8 sowie PT9 waren keine Immunhistochemie-Daten vorhanden.





Es besteht keine Korrelation zwischen dem gemessenen Fold Change auf der mRNA-Ebene und dem geschätzten Anteil der positiv gefärbten Zellen bzw. Zielen in der Immunhistochemie. In einer einfachen linearen Regression beträgt das Bestimmtheitsmaß  $R^2 = 0.0016$  und die Regressionsgerade  $y = -0.0025x + 4.2716$ .

Weitere Analysen zeigen ebenso keine Korrelation zwischen dem Überleben ab Therapiebeginn ( $R^2 = 0.0002$ ,  $y = -0.0299x + 171.22$ ), dem progressionsfreien Überleben ab Therapiebeginn ( $R^2 = 0.0286$ ,  $y = -0.1427x + 75.75$ ) und dem geschätzten Anteil der positiv gefärbten Ziele in der Immunhistochemie. Diese Ergebnisse wurden als Streudiagramme in Abbildungen 13, 14 und 15 illustriert.

**Abbildung 13: Streudiagramm für das mRNA und die IHC**

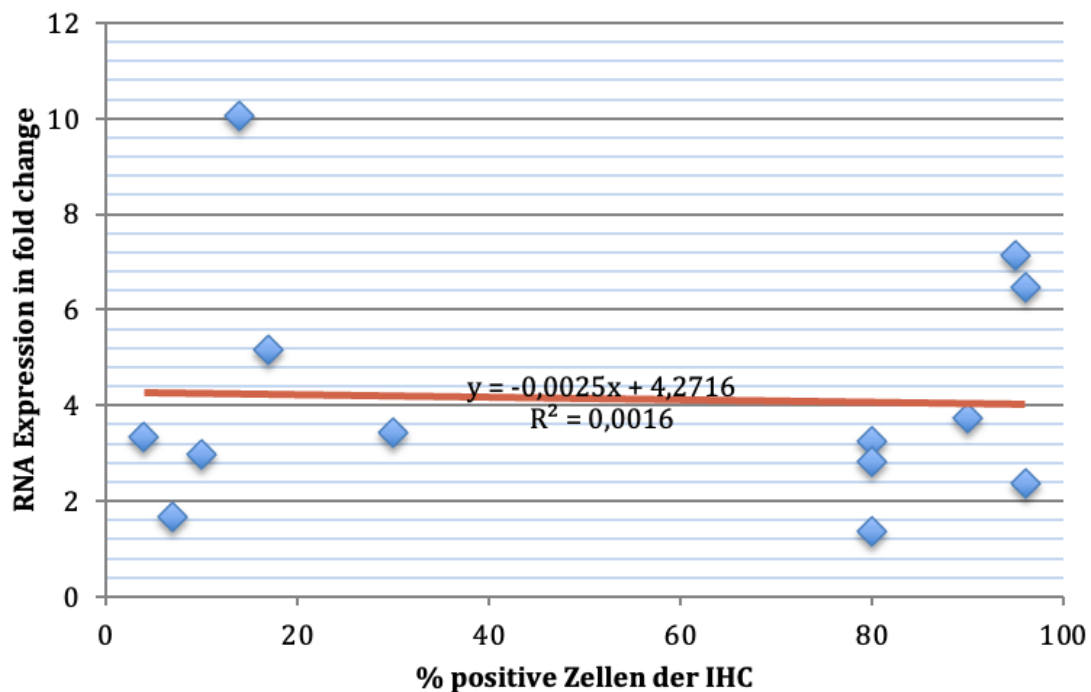


Abbildung 14: Streudiagramm für das Überlebens und die IHC

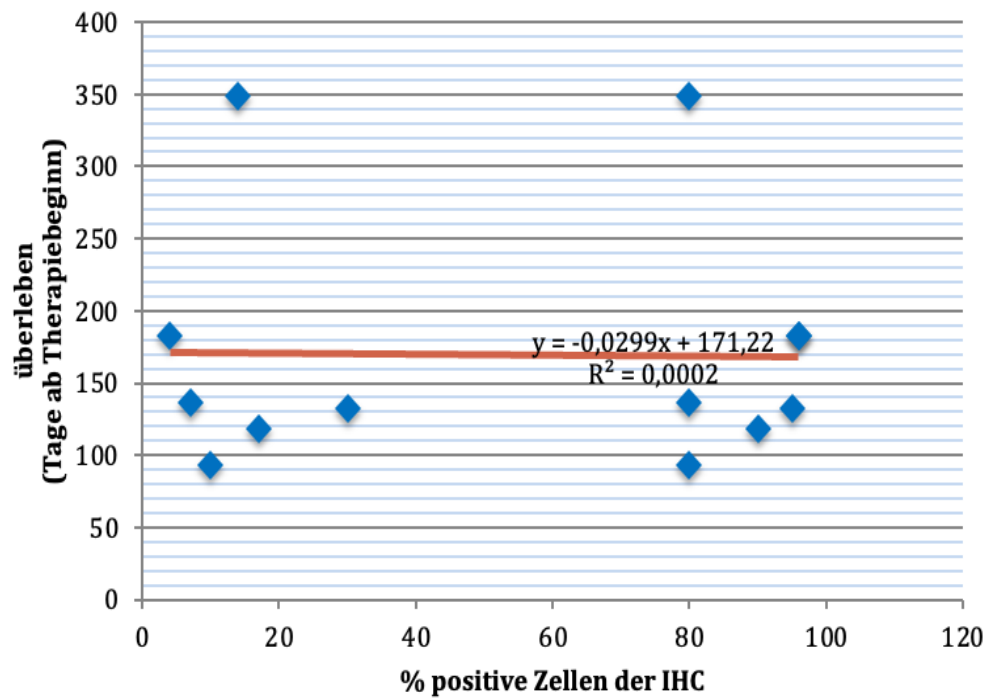
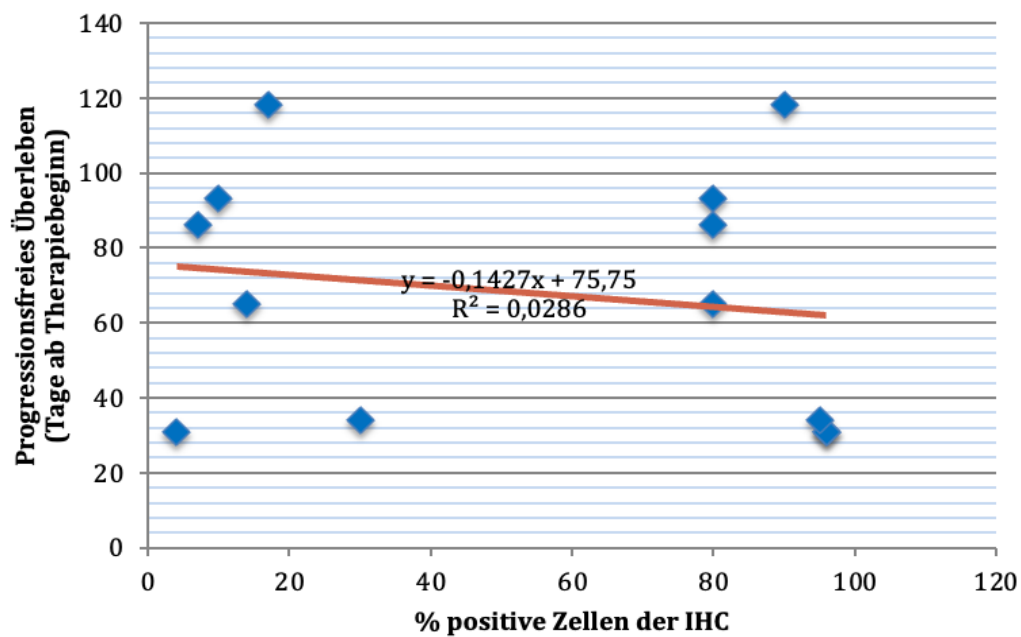


Abbildung 15: Streudiagramm für das progressionsfreies Überleben und die IHC

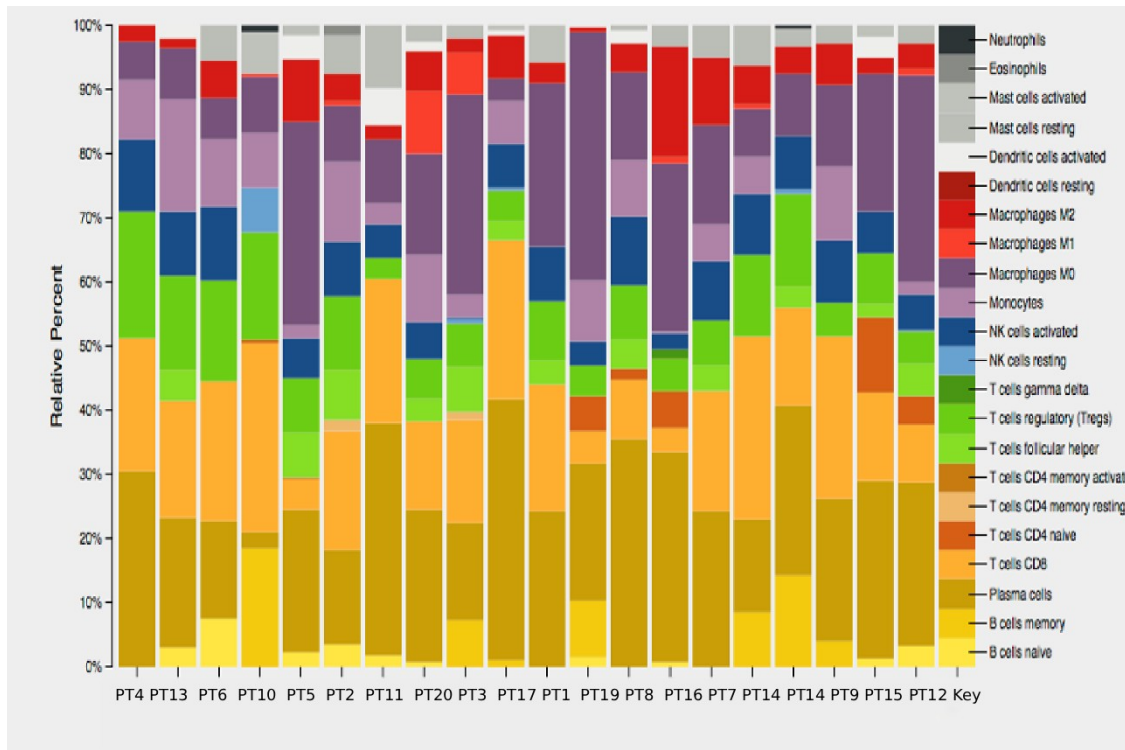


### 4.3 Immuninfiltration

Die geschätzte Immuninfiltration wurde mittels der online Plattform CIBERSORT als gestapeltes Balkendiagramm (Abbildung 16) und als Heatmap (Abbildungen 17 und 18) illustriert

#### Abbildung 16: Gestapeltes Balkendiagramm der CIBERSORT Analyse

Der geschätzte relative Inhalt von Immunzellen illustriert als Bruchteile des geschätzten gesamten Inhalts von Leukozyten in jeder Patientenprobe (zu 1 normalisiert). Die verschiedenen Immunzellen sind wie in der Legende rechts farblich markiert. Plasmazellen, M0-Makrophagen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen waren in den meisten Proben überwiegend vertreten.



### Abbildung 17: Ausschnitt der Heatmap der CIBERSORT Analyse

Ausschnitt aus der Heatmap des geschätzten Immunzellanteils basierend auf der CIBERSORT-Dekonvolutionsanalyse im Vergleich zur integrierten LM22-Immunsignatur. Rotmarkierte Felder bzw. Zellen sind hochexprimiert und blaumarkierte sind unterexprimiert bzw. unverändert im Vergleich zur LM22. Für die Qualitätskontrolle der Analyse wurde ein globaler P-Wert, ein R2- Wert, der Pearson-Korrelationskoeffizient (die Korrelation der Ergebnisse mit der Signaturprobe, 1 bedeutet absolute Korrelation) sowie eine Wurzel des mittleren quadratischen Fehlers kurz RMSE (der Unterschied zu der Signaturprobe bzw. der Durchschnittliche Unterschied in der Expression im Vergleich zur Signalprobe) für jede Patientenprobe berechnet. Für die Analyse wurden 100 Permutationen definiert sowie ein P-Schwellenwert von unter 0.05.

Input sample	B cells naive	B cells memory	Plasma cells	T cells CD8	T cells regulatory (Tregs)	Macrophages M0	P-value	Pearson Correlation	RMSE
PT4	0	0	0.306	0.206	0.197	0.06	0.105	0.121	1.068
PT13	0.031	0	0.201	0.183	0.149	0.081	0.374	0.046	1.080
PT6	0.075	0	0.153	0.216	0.158	0.065	0.611	0.016	1.093
PT10	0	0.184	0.026	0.294	0.168	0.087	0.012	0.231	1.002
PT5	0.023	0	0.221	0.048	0.085	0.319	0.011	0.237	1.002
PT2	0.035	0	0.148	0.185	0.113	0.087	0.509	0.027	1.076
PT11	0.017	0	0.364	0.224	0.032	0.102	0.083	0.131	1.058
PT20	0.008	0	0.238	0.136	0.061	0.157	0.211	0.081	1.061
PT3	0	0.074	0.15	0.16	0.069	0.312	0.000	0.524	0.853
PT17	0	0.01	0.406	0.247	0.049	0.033	0.046	0.158	1.063
PT1	0	0	0.243	0.198	0.091	0.254	0.342	0.052	1.092
PT19	0.016	0.087	0.214	0.051	0.047	0.388	0.000	0.649	0.771
PT8	0	0	0.354	0.093	0.084	0.138	0.214	0.080	1.081
PT16	0.007	0	0.327	0.038	0.049	0.262	0.000	0.472	0.883
PT7	0.001	0	0.242	0.188	0.071	0.155	0.125	0.110	1.051
PT14	0	0.085	0.146	0.284	0.128	0.076	0.004	0.334	0.951
PT14	0	0.142	0.266	0.151	0.146	0.098	0.000	0.481	0.877
PT9	0	0.04	0.224	0.252	0.052	0.127	0.073	0.137	1.043
PT15	0.012	0	0.278	0.136	0.081	0.215	0.001	0.387	0.927
PT12	0.033	0	0.255	0.089	0.05	0.323	0.004	0.273	0.987

### Abbildung 18: Gesamte Heatmap der CIBERSORT Analyse

Gesamte Heatmap des geschätzten Inhalts von Immunzellen nach der Dekonvolutionsanalyse von CIBERSORT im Vergleich zur integrierten LM22 Immunsignatur. Die Ergebnisse sind wie in Abbildung 17 zu interpretieren.

Input Sample	B cells memory	8 cells Plasma cells	T cells CD4 cells				T cells CD8 cells				T cells				Macrophages				Dendritic cells				Mast cells				Eosinophils	Neutrophils	P-value	Pearson Correlation	RMSE		
			naive		memory		activated		resting		memory		activated		resting		M1		M2		resting		activated		resting							activated	
			resting	activated	memory	effector	resting	effector	resting	effector	resting	effector	resting	effector	resting	effector	resting	effector	resting	effector	resting	effector	resting	effector	resting	effector						resting	effector
P74	0	0	0.385	0.206	0	0	0	0	0	0.197	0	0	0	0.113	0.094	0.06	0	0.024	0	0	0	0	0	0	0	0	0.106	0.121	1.068				
P74	0.031	0	0.201	0.183	0	0	0	0.046	0.149	0	0	0	0.1	0.174	0.081	0	0.015	0	0.015	0	0.02	0	0	0	0	0	0	0.380	0.046	1.000			
P76	0.075	0	0.153	0.216	0	0	0	0	0.158	0	0	0	0.114	0.107	0.065	0	0.056	0	0	0	0	0.056	0	0	0	0	0.612	0.016	1.093				
P71	0	0	0.184	0.026	0.294	0.007	0	0	0.168	0	0.069	0	0	0.086	0.087	0.035	0	0	0	0	0	0	0.066	0	0.01	0	0.014	0.231	1.002				
P75	0.023	0	0.221	0.049	0.003	0	0	0.069	0.085	0	0	0	0.062	0.019	0.319	0	0.098	0	0.037	0.014	0	0	0	0	0	0	0.014	0.237	1.002				
P72	0.035	0	0.148	0.185	0	0.018	0	0.078	0.113	0	0.002	0.084	0.125	0.087	0.008	0.043	0	0	0	0.015	0	0	0	0	0	0	0.522	0.027	1.076				
P72	0.017	0	0.364	0.224	0	0	0	0	0.032	0	0	0.055	0.03	0.102	0	0.021	0	0.021	0	0.059	0.097	0	0	0	0	0	0.079	0.131	1.058				
P70	0.008	0	0.238	0.136	0	0	0	0.036	0.061	0	0	0.058	0.105	0.157	0.097	0.062	0	0.016	0.025	0	0	0	0	0	0	0	0.207	0.081	1.061				
P73	0	0.074	0.15	0.16	0	0.013	0	0.069	0.069	0	0.006	0.003	0.035	0.312	0.066	0.022	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.514	0.853				
P78	0	0.01	0.405	0.247	0	0	0	0.031	0.049	0	0.004	0.069	0.067	0.033	0	0.068	0	0	0	0	0	0.007	0	0	0	0	0.047	0.138	1.063				
P71	0	0	0.243	0.198	0	0	0	0.037	0.091	0	0	0.086	0	0.254	0	0.032	0	0	0	0	0	0.059	0	0	0	0	0.352	0.032	1.092				
P79	0.016	0.087	0.214	0.051	0.055	0	0	0	0.047	0	0	0.037	0.095	0.308	0	0.007	0	0.003	0	0	0	0	0	0	0	0	0.000	0.649	0.771				
P78	0	0	0.354	0.093	0.017	0	0	0.045	0.084	0	0	0.108	0.089	0.138	0	0.045	0	0.019	0.009	0	0	0	0	0	0	0	0.209	0.080	1.081				
P77	0.007	0	0.237	0.038	0.058	0	0	0	0.049	0.015	0	0.026	0.001	0.362	0.012	0.173	0	0	0.032	0	0	0	0	0	0	0	0.001	0.472	0.883				
P77	0.001	0	0.242	0.188	0	0	0	0.038	0.071	0	0	0.094	0.057	0.155	0	0.004	0	0	0.051	0	0	0	0	0	0	0	0.132	0.110	1.051				
P75	0	0.085	0.146	0.284	0	0	0	0	0.128	0	0	0.095	0.057	0.076	0.006	0.061	0	0	0.062	0	0	0	0	0	0	0	0.005	0.334	0.951				
P75	0	0.142	0.266	0.151	0	0	0	0.034	0.146	0	0.005	0.084	0	0.098	0	0.041	0	0	0.029	0	0	0	0	0.005	0	0	0.001	0.481	0.877				
P79	0	0.04	0.214	0.252	0	0	0	0.001	0.052	0	0	0.098	0.115	0.127	0	0.066	0	0	0.026	0	0	0	0	0	0	0	0.070	0.137	1.043				
P76	0.012	0	0.278	0.136	0.118	0	0	0.02	0.081	0	0	0.064	0	0.215	0	0.025	0	0.035	0	0.016	0	0	0	0	0	0	0.004	0.387	0.927				
P73	0.033	0	0.255	0.089	0.044	0	0	0.052	0.05	0	0.002	0.055	0.02	0.333	0.003	0.04	0	0	0.028	0	0	0	0	0	0	0	0.010	0.273	0.987				

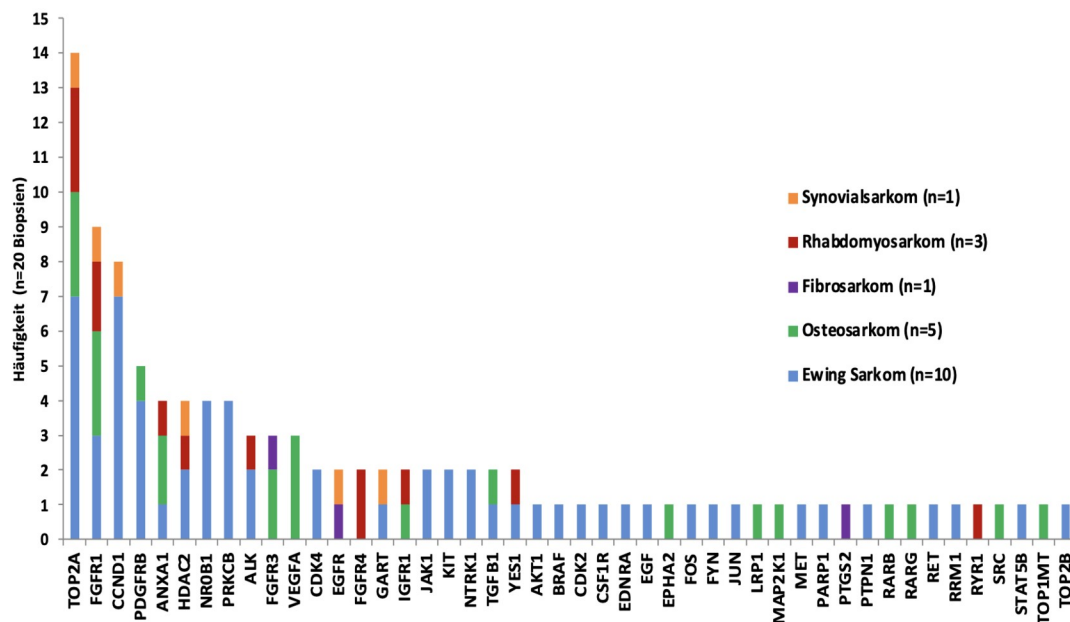
#### 4.4 Identifizierte Ziele und empfohlene Medikamente

Die Zielanalyse wurde an frisch gewonnenem Tumormaterial des aktuellen Progresses bzw. Metastase durchgeführt. Dadurch sollten potenziell therapierbare Ziele in allen untersuchten Biopsien identifiziert werden.

TOP2A (DNA topoisomerase II alpha) und FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1) wurde in allen Proben am häufigsten hochexprimiert (n=14/20 bzw. n=9/20 Biopsien). In den ES Biopsien wurde CCND1 (Cyclin D1) sowie PDGFRB (platelet-derived growth factor receptor beta) hochexprimiert (n=8/20, n=5/20).

In den OS Biopsien war VEGFA (vascular endothelial growth factor A) hochexprimiert (n=3/20). Weitere hochexprimierte Ziele waren ANXA1 (annexin A1), HDAC2 (histone deacetylase 2), ALK (anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase), FGFR3 (fibroblast growth factor receptor 3), NR0B1 (nuclear receptor subfamily 0 group B member 1) und PRKCB (protein kinase C beta).

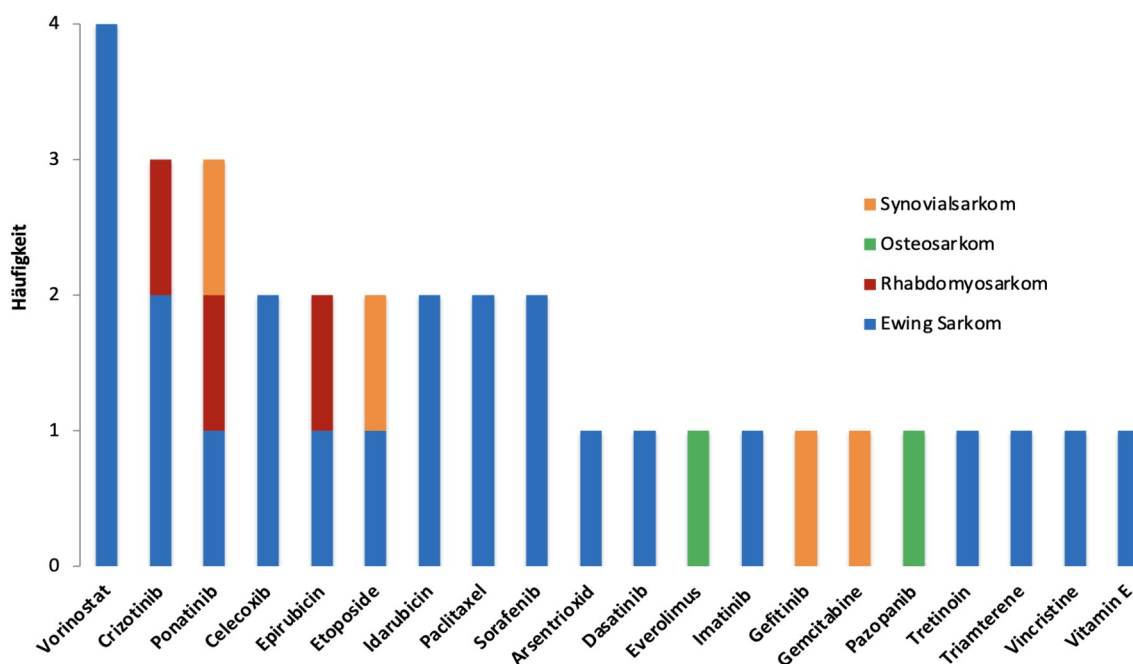
**Abbildung 19: Zusammenfassung der identifizierten Ziele**



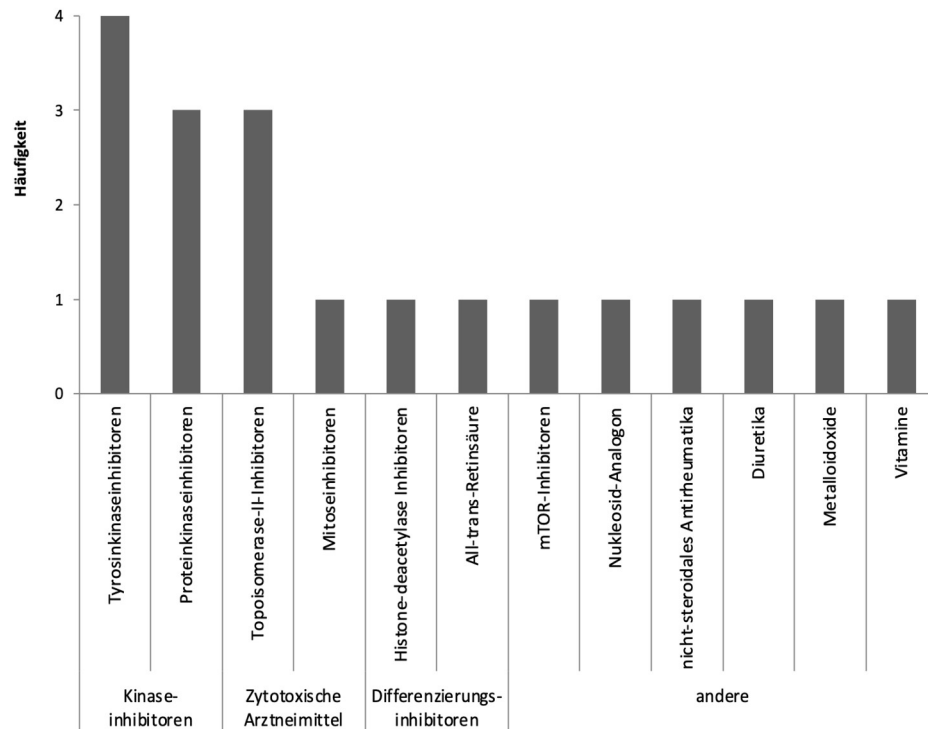
Es wurden insgesamt 20 verschiedene Arzneimittel als zielgerichtete Therapien bei den Patienten eingesetzt. Kinaseinhibitoren bzw. Tyrosinkinaseinhibitoren wie z.B.: Ponatinib, Dasatinib, Gefitinib, Pazopanib, Crizotinib, Sorafenib und Imatinib wurden am häufigsten verwendet. Zytotoxische Medikamente wie Topoisomerase-II-Inhibitoren, darunter Epirubicin, Etoposide und Idarubicin wurden auch häufig eingesetzt. Andere Medikamente die als zielgerichtet Therapien verwendet wurden sind der mTOR-Inhibitor Everolimus, das Taxan Paclitaxel, sowie Differenzierungsinhibitoren wie das Histon-Deacetylase (HDACs) Inhibitor Vorinostat und das Vitamin-A-Säure bzw. all-trans-Retinsäure Tretinoin. Außerdem wurden Gemcitabine (ein Nukleosi-Analogon), Celecoxib (ein nicht-steroidales Antirheumatikum), Triamteren (ein Diuretikum), ein Metalloid-Oxid (Arsentrioxid) sowie Vitamin E als zielgerichtete Therapien eingesetzt.

**Abbildung 20: Medikamente die als zielgerichtet Therapien verwendet wurden**

**a. Eingesetzte zielgerichtete Therapien nach Diagnose**



**b. Eingesetzte zielgerichtete Therapien nach Art der Medikamente**



**Tabelle 5: Zusammenfassung der identifizierten Ziele und Medikamenten**

Patient	Diagnose	Ziel	Medikament
PT1_1	Ewing Sarkom	HDAC2	Vorinostat
		STEAP1	Paclitaxel
PT1_2	Ewing Sarkom	HDAC2	Vorinostat
		BRAF	Sorafenib
		NR0B1	Tretinoin
		SCNN1G	Triamteren
PT1_3	Ewing Sarkom	CCND1	Arsentrioxid
		PRKCB	Vitamin E
PT1_4	Ewing Sarkom	ALK	Crizotinib
PT2	Ewing Sarkom	HDAC2	Vorinostat
		FGFR1	Ponatinib



		TOP2A	Idarubicin
		STEAP1	Paclitaxel
PT3	Ewing Sarkom	ALK	Crizotinib
		TOP2A	Etoposide
		FGFR1	Sorafenib
PT4	Rhabdomyosarkom	MET	Crizotinib
		TOP2A	Epirubicin
		FGFR1	Ponatinib
PT5	Synovialsarkom	FGFR1	Ponatinib
		RRM1	Gemcitabine
		TOP2A	Etoposide
		EGFR	Gefitinib
PT6	Ewing Sarkom	TOP2A	Idarubicin
		STEAP1	Paclitaxel
PT7	Ewing Sarkom	RET	Imatinib
		PDPK1	Celecoxib
		PDGFRB	Dasatinib
		TOP2A	Epirubicin
PT8	Osteosarkom	SRC, MAP2K1	Everolimus
		PTEN	Sorafenib
PT9	Osteosarkom	FGFR3	Pazopanib
		Cdkn2a/b	Palbociclib

#### 4.5 Therapie, Nebenwirkungen und Ansprechen auf Therapie

Die eingesetzten, zielgerichteten Therapien, das Ansprechen auf Therapie sowie die aufgetretenen unerwünschten Ereignisse bzw. Nebenwirkungen und deren Zusammenhang mit der Therapie in der zT-Gruppe sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 6: die zielgerichteten Therapien, das Ansprechen und die unerwünschten Ereignisse**

Patient	Therapie	Ansprechen	Unerwünschte Ereignisse	Grad	Kausalität
PT1_1	Vorinostat Paclitaxel Vincristine	Stabile Erkrankung (7 Monate)	Lymphopenie	3	s
			Thrombozytopenie	3	s
PT1_2	Vorinostat Sorafenib Triamteren Tretinoin	Stabile Erkrankung (2 Monate)	aPTT Verlängerung	2	m
			Anämie	2	m
PT1_3	Arsentrioxid Vitamin E	Progression	Knochenschmerzen	4	uw
PT1_4	Crizotinib	Progression	Dyspnoe	3	uw
PT2	Vorinostat Ponatinib Idarubicin Paclitaxel	Progression	Lymphopenie	3	s
			Neutropenie	2	s
PT3	Crizotinib Etoposide Sorafenib	Progression	n.a.		
PT4	Crizotinib, Epirubicin Ponatinib	Stabile Erkrankung (7 Monate)	Neutropenie	4	s
			Lymphopenie	2	s
			Erhöhtes AST Wert	3	w
			Erhöhtes Bilirubin Wert	2	w
PT5	Gemcitabine Etoposide Ponatinib Gefitinib	Progression	Neutropenie	4	s
			Anämie	3	s
			Lymphopenie	3	s

			Husten	2	uw
			Perikarderguss	2	uw
			Pleuraerguss	1	uw
PT6	Idarubicin Vorinostat	n.a.	n.a.		
PT7	Imatinib Dasatinib Epirubicin Celecoxib	Progression	Angstattacken	4	s
			Depression	4	s
			Anämie	4	s
			Neutropenie	4	s
			Lymphopenie	4	s
			Thrombozytopenie	4	s
			Übelkeit	2	s
			Erbrechen	2	s
PT8	Everolimus	Stabile Erkrankung (7 Monate)	Panzytopenie	2	s
			Thrombozytopenie	3	s
			Neutropenie	4	s
			Knochenschmerzen	n.a.	s
			Herzinsuffizienz	n.a.	s
			Hand-Fuß-Syndrom	2	w
			neuropathischer Schmerz	2	w
PT9	Pazopanib	Stabile Erkrankung (5 M, Lunge) Progression (Abdomen)	Inaktivität Müdigkeit Übelkeit Neutropenie	n.a.	s

s: sicher, m: möglich, uw: unwahrscheinlich, w: wahrscheinlich, n.a.: nicht verfügbar,  
aPTT: aktivierte partielle Thromboplastinzeit, M: Monate.

Bei den restlichen Patienten wurde keine zielgerichtete Therapie eingesetzt. Diese Patienten wurden entweder ambulant oder zuhause palliativ (symptomatisch und hauptsächlich gegen Schmerzen) behandelt.

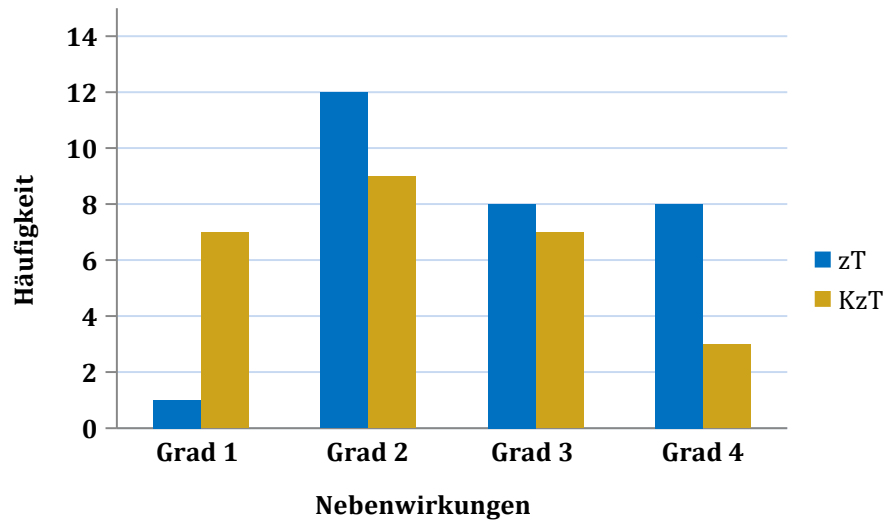
Die aufgetretenen, krankheitsbedingten, unerwünschten Ereignisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 7: Unerwünschte Ereignisse bei der KzT-Gruppe**

Patient	Unerwünschte Ereignisse	Grad
PT10	Krampfanfall	2
	Lungenödem	2
	Hypokaliämie	1
	kutanes Ödem	1
	Anämie	2
	Erhöhung des AST Wertes	2
PT11	Pleuraerguss	2
	Harnwegsinfektion	2
	Lymphopenie	3
	Dyspnoe	3
	Sepsis	4
PT12	Hypokaliämie	1
	Erhöhung des AP Wertes	2
	Anämie	3
	Dysphagie	3
	Lymphopenie	4
	Sepsis	4
PT13	Sinusbradykardie	1
PT14	n.a.	
PT15	Erhöhung des Amylases	1
	Lymphopenie	3

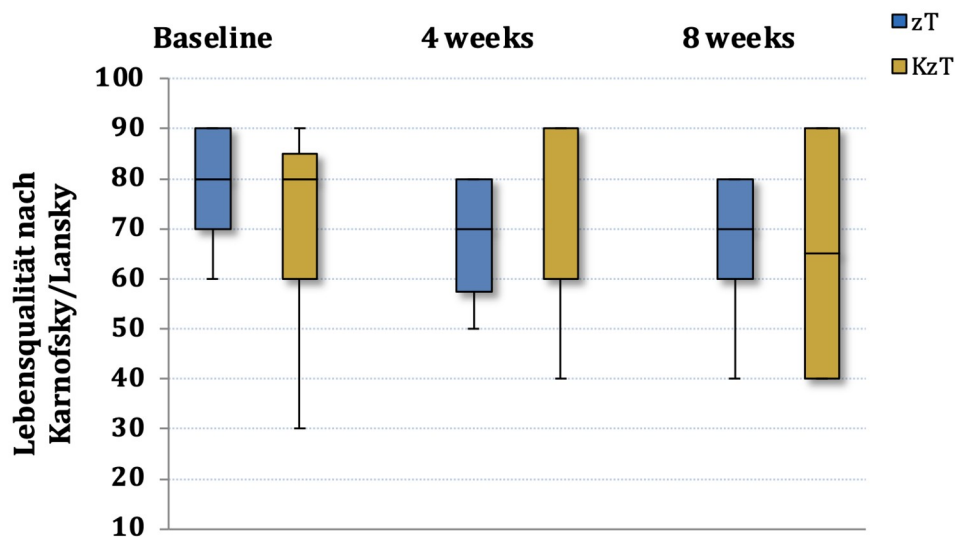
	Dysphagie	3
	Hyperkalzämie	1
	Schmerzen	1
PT16	Anämie	2
	Infusionsbedingte Reaktion	2
	Tachykardie	3
PT17	Parästhesie	n.a.
	Hypokalämie	n.a.
	Erhöhte Leberfunktionswerte	n.a.
PT18	n.a.	n.a.
PT19	n.a.	n.a.
PT20	n.a.	n.a.

Es konnte kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von Grad-2, Grad-3 und Grad-4 der unerwünschten Ereignisse zwischen beiden Gruppen festgestellt werden (Chi-Quadrat Test jeweils  $P=0.98$ ,  $0.54$  und  $0.12$ ). Die Grad-1 unerwünschten Ereignisse traten signifikant seltener bei den zT Patienten auf (Chi-Quadrat Test  $P=0.009$ ).

**Abbildung 21: Häufigkeit von Grad 1, Grad 2, Grad 3 und Grad 4 Nebenwirkungen**

#### 4.6 Lebensqualität

Die Lebensqualität, eingeschätzt nach Karnofsky- und Lansky Skala, war nicht signifikant unterschiedlich am Anfangszeitpunkt sowie vier und acht Wochen nach Therapiebeginn zwischen den zwei Gruppen (jeweils  $P=0.33$ ,  $0.96$  und  $0.89$ )

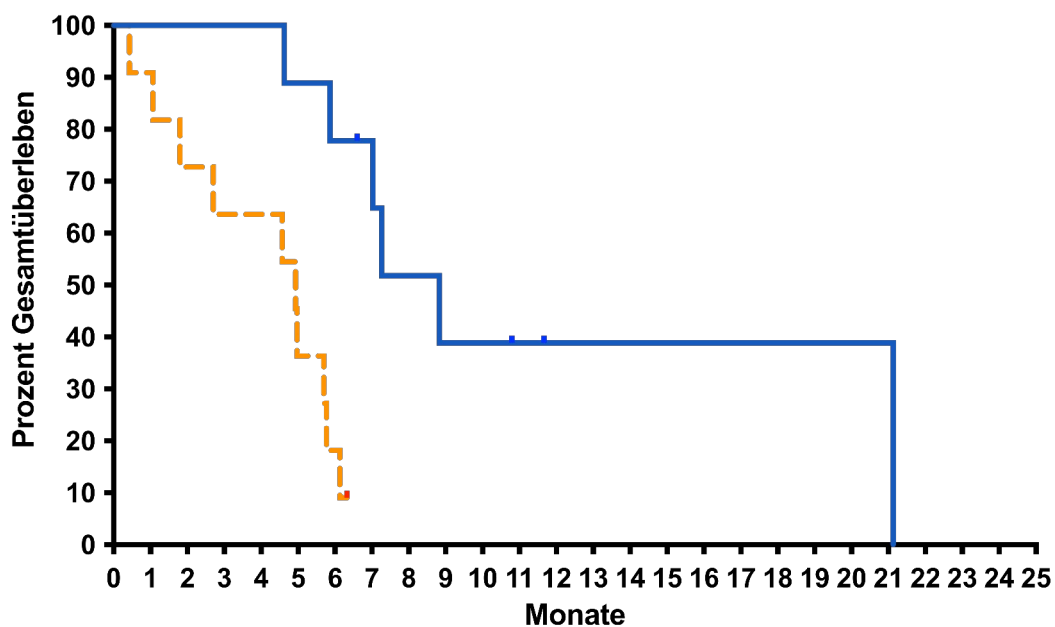
**Abbildung 22: Lebensqualität nach Karnofsky- und Lansky-Skala**

#### 4.7 Überleben

### Gesamtüberleben (OvS)

Patienten, die eine zielgerichtete Therapie erhalten hatten ( $n = 9$ ), wiesen ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben (OvS) im Vergleich zu Patienten ohne zielgerichtete Therapie ( $n = 11$ ) auf. Im Mantel–Cox-Test betrug der P-Wert 0,0014, im Gehan–Breslow–Wilcoxon-Test 0,0025. Das mediane OS lag bei 8,83 Monaten in der zT-Gruppe gegenüber 4,93 Monaten in der KzT-Gruppe. Das Hazard Ratio im Mantel–Haenszel-Modell betrug 0,1435 (95 % KI: 0,0437–0,4714), im Log-Rank-Modell 0,2515 (95 % KI: 0,0859–0,7362).

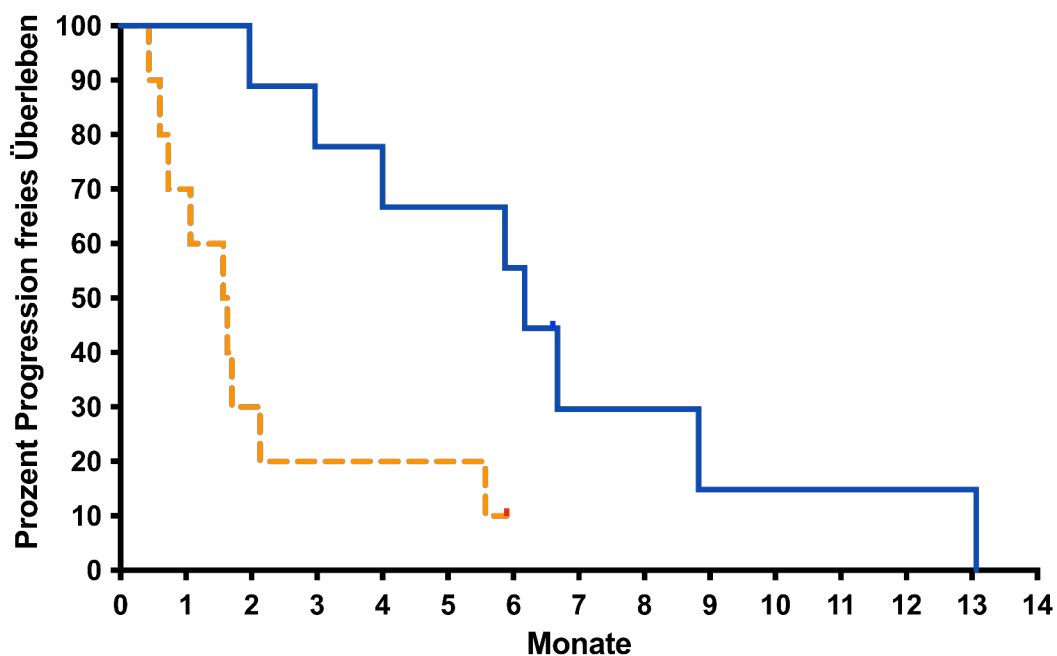
**Abbildung 23: Kaplan\_Meier Schätzung des Gesamtüberlebens**



### Progressionsfreies Überleben PFS

Patienten, die eine zielgerichtete Therapie erhalten hatten ( $n = 9$ ), wiesen ein signifikant erhöhtes progressionsfreies Überleben im Vergleich zu Patienten ohne zielgerichtete Therapie ( $n = 11$ ) auf. Im Mantel–Cox-Test betrug der P-Wert 0,0046, im Gehan–Breslow–Wilcoxon-Test 0,0030. Das mediane PFS lag bei 6,17 Monaten in der zT-Gruppe gegenüber 1,6 Monaten in der KzT-Gruppe. Das Hazard Ratio im Mantel–Haenszel-Modell betrug 0,1785 (95 % KI: 0,05421–0,5876), im Log-Rank-Modell 0,3044 (95 % KI: 0,1023–0,9059).

**Abbildung 24:** Kaplan\_Meier Schätzung des progressionsfreien Überlebens



## 5 Diskussion



Pädiatrische Knochen- und Weichteilsarkome werden wie viele andere Krebsarten in erster Linie mit zytotoxischen Chemotherapien behandelt. Diese Therapien erfassen Zellen, die sich schnell vermehren, hauptsächlich also maligne Krebszellen aber auch normale, sich schnell multiplizierende Körperzellen. Die zielgerichteten Therapien sollen im Gegensatz dazu spezifische oder zumindest selektive Veränderungen in Krebszellen adressieren und zu weniger unerwünschten Wirkungen führen. Bei unerwünschten Wirkungen ist zwischen On und Off-Target-Effekten zu unterscheiden. (Waarts *et al.*, 2022)

Technologische Fortschritte und die Entwicklung funktioneller Methoden der Genomanalyse mittels Arrays und Next-Generation Sequencing (NGS) ermöglichen eine breite und schnelle Analyse des Krebsgenoms. Diese Methoden wurden in internationalen kooperativen Projekten eingesetzt, um die genomischen Veränderungen bei zahlreichen Krebsarten und Patienten zu analysieren, zu dokumentieren und daraus für viele Wissenschaftler öffentlich zugängliche Datenbanken zu generieren.

Die Erkenntnisse aus diesen großen Projekten, sowie zahlreiche kleinere wissenschaftliche Untersuchungen, führten zu neuen Perspektiven in Hinblick auf Krebskrankheiten. Die vorher histologisch und anatomisch als distinkt betrachteten Krebsentitäten wiesen in diesen breiten Analysen ähnliche Eigenschaften und Merkmale auf. Das Cancer Hallmark Modell von Hanahan und Weinberg war revolutionär, aber auch wissenschaftlich sehr anerkannt, weil es die bisherigen Erkenntnisse über das Verhalten von Krebszellen und die Mechanismen für Überleben, Vermehrung und Metastasierung sehr gut zusammengefasst hat.

Als diese Mechanismen und die unterliegenden und dazu notwendigen genetischen Veränderungen genauer untersucht wurden, konnten zahlreiche Therapien entwickelt werden, die diese Mechanismen und Veränderungen auf verschiedenen genetischen Ebenen gezielt angreifen.

Das traditionelle Design von klinischen Studien wurde zunehmend durch neue, mehr umfassende Studiendesigns ersetzt. Die Basket-Studien zum Beispiel untersuchen Therapien, die spezifische genetische Veränderungen bzw. Mutationen bei Patienten mit verschiedenen Krebsarten angreifen. Dadurch wird ein einziges Arzneimittel in

histologisch unterschiedlichen Krebsarten eingesetzt und entsprechend untersucht. Die Umbrella-Studien andererseits untersuchen im Gegensatz dazu die Wirkung verschiedener Therapien bzw. Wirkstoffe auf verschiedene genetische Veränderungen in einer spezifischen Krebsart. (Taylor *et al.*, 2011)

Im Vergleich zu anderen Krebsarten bei Kindern und Jugendlichen, bleiben die Fortschritte bei der Therapie von Knochen- und Weichteilsarkomen besonders bei Rezidiven in Hinblick auf das 5-Jahres-Überlebensrate deutlich geringer. Die 5-Jahres-Überlebensrate bleibt seit 1990 bei 67% für Jugendliche mit OS und seit 1995 bei 59% und 48% für Jugendliche mit ES bzw. RMS. Dies gilt besonders für Jugendliche und junge Erwachsenen zwischen 15 und 45 Jahren. (Bleyer *et al.*, 2006; Pastore *et al.*, 2006; Verdecchia *et al.*, 2007; Emith *et al.*, 2010)

Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen diesen Ergebnissen bzw. den vergleichsweise geringen Fortschritten in dieser Altersgruppe und der Teilnahme an klinischen Studien wurde dazu festgestellt. (Bleyer *et al.*, 2005) Traditionell konzipierte, klinische Studien orientierten sich entweder an pädiatrischen oder erwachsenen Altersgruppen und meist sind die Therapieprotokolle schwer anzupassen die verschiedenen Altersgruppen dazwischen. Allerdings ist die Biologie von diagnostisch gleich kategorisierten Krebsarten im Kindesalter und im Erwachsenenalter unterschiedlich.

Die Etablierung genetischer Untersuchungen und die Anwendung zielgerichteter Therapien führten zu biologisch verankerten und pragmatischen Designs von klinischen Studien, die eine Präzisionsmedizin bei einzelnen Patienten in verschiedenen Altersgruppen ermöglichen. Diese Studiendesigns orientieren sich an dem Vorhandensein von spezifischen Mutationen bei der Therapieauswahl. Pädiatrische Tumore und besonders pädiatrische Knochen- und Weichteilsarkome zeigen deutlich weniger somatische Mutationen im Vergleich zu den Tumorerkrankungen bei erwachsenen Patienten. (Lawrence *et al.*, 2013; Gröbner *et al.*, 2018)

Die Mutationsanalyse soll eine Gesamtschau der zugrundeliegenden Mechanismen und Fähigkeiten von Krebszellen liefern. Die Expressionsanalyse ermöglicht im Vergleich zur Mutationsanalyse einen Überblick über die aktuelle, genetische Aktivität in den Krebszellen bei einzelnen Patienten und kann sich in verschiedenen Proben und Zeitpunkten auch ändern.

Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene mit pädiatrischen Knochen- und Weichteilsarkomen, die trotz verschiedener konventioneller Therapieprotokolle mehrfach unter Rezidiven leiden, werden meist palliativ behandelt. Für diese Patienten sind die Therapieoptionen oft ausgeschöpft und daher ist die Lebensqualität in dieser Phase für sie sehr entscheidend.

In dieser Registerstudie wurden Proben von 20 Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen mit refraktären pädiatrischen Knochen- und Weichteilsarkomen (OS, ES, RMS und SS) auf therapierbare Ziele untersucht. Die Analyse erfolgte durch Genexpressionsanalysen mittels GeneChip® Arrays, RMA-Normalisierung und im Vergleich zu Expressionswerten derselben Gene in normalen Geweben. Für die Zielanalyse wurde eine maschinelle Lernsoftware (TARGETgene), die funktionelle Gen-Gen Netzwerke integriert, verwendet. Zusätzlich wurden online-verfügbare Datenbanken (KEGG und REACTOME) sowie GSEA für die Visualisierung der differentiell exprimierten Signalwege und der Zentralität und Funktionalität der hochexprimierten Gene verwendet.

Im Rahmen dieser Studie wurden therapierbare Ziele in allen 21 Proben von 20 Patienten festgestellt. Das ist von großer praktischer Bedeutung in Hinblick auf die relativ geringe Mutationslast in pädiatrischen Knochen- und Weichteilsarkomen.

Die funktionelle Genexpressionsanalyse in dieser Studie bietet besonders für Patienten, die konventionelle Therapieoptionen ausgeschöpft haben, weitere Therapieoptionen im Rahmen eines personalisierten Heilversuchs. Die Auswahl von Therapeutika erfolgte nach pharmazeutischer Expertise und wurde durch ein Tumorboard konsentiert. Es berücksichtigte die quantitative und qualitative Zielanalyse sowie Eigenschaften der passenden Therapeutika in Anbetracht der präzisen Wirkung, aber auch Neben- und Wechselwirkungen bei einer Kombinationstherapie. Eine solche Kombinationstherapie mit mehreren Wirkstoffen wurde angestrebt, um die wichtigsten hochexprimierten Signalwege im Tumor simultan zu blockieren und mögliche Escape-Mechanismen der Krebszellen zu verhindern oder zu erschweren. Dabei wurde eine gute Lebensqualität der palliativ behandelten, jungen Patienten bestrebt.

9 von 20 Patienten im Alter von 8 und 35.3 Jahre wurden mit zielgerichteter Therapie behandelt. Die Therapie erfolgte meistens als Kombinationstherapie mit verschiedenen

Wirkstoffen. Dabei wurden Tyrosinkinaseinhibitoren bzw. Topoisomerase II Inhibitoren am häufigsten eingesetzt. Die Letzteren zählen zu den zytotoxischen Krebsmedikamenten. Der Grund dafür war die Hochexpression von TOP2A bei den meisten Patienten (n=14/20 Patienten). Eine solche Hochexpression von TOP2A wurde mit einer schlechteren Prognose in erwachsenen Patienten mit hochgradigen Weichteilsarkomen korreliert. (Berclaz *et al.*, 2021) Die Vermutung der Autorin war, dass eine solche Hochexpression von TOP2A mit einer Resistenz gegenüber Doxorubicin-haltiger-Therapien zu erklären ist. Weitere Analysen der Expressionsdaten zeigten, dass Patienten in der zT-Gruppe eine signifikant höhere Expression von TOP2A im Vergleich zu Patienten in der KzT-Gruppe aufweisen, was zu einer schlechteren Prognose führen könnte.

Patienten, die im Rahmen dieser Arbeit eine zielgerichtete Therapie mittels Expressionsanalyse erhalten haben (n=9) hatten ein signifikant höheres Gesamtüberleben mit einem medianen OS von 8.83 Monate verglichen mit Patienten, die einfach palliativ behandelt wurden (n=11) mit einem medianen OvS von 4.93 Monate. Das PFS war ebenfalls signifikant höher bei Patienten in der zT-Gruppe mit einem medianen PFS von 6.17 Monate im Vergleich zu 1.6 Monate bei Patienten in der KzT-Gruppe.

Trotz des verbesserten OvS und der verbesserten PFS in den zT-Patienten im Vergleich zu den KzT-Patienten, könnte der Krankheitsverlauf bzw. die weitere Progression nicht verhindert werden. Eine Stabilisierung der Krankheit für mindestens sieben Monate erfolgte lediglich bei drei von neun behandelten Patienten.

Hier scheint die Hochexpression von TOP2A als Risikofaktor keine Rolle in Hinblick auf die Prognose bei den zT-Patienten zu spielen.

Weitere Risikofaktoren wie das Geschlecht, Alter bei der ersten Diagnose, Alter bei Registrierung in der Studie, Intervall zwischen die erste Diagnose und die Aufnahme in die Registerstudie und Krankheitsstatus zum Zeitpunkt der Aufnahme im Register waren nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen.

Andere unbekannte Risikofaktoren könnten eine Rolle gespielt haben, wurden aber im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Die Lebensqualität von den mit zielgerichteter Therapie behandelten Patienten war trotz Kombinationstherapie nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den palliativ

behandelten Patienten. Die unerwünschten Ereignisse waren nicht signifikant häufiger in der zT-Gruppe. Allerdings traten die schweren G4 UEs dreifach öfter bei der zT-Gruppe im Vergleich zu der KzT- Gruppe (n=9 vs. n=3) auf. Die meisten davon wurden allerdings bei einem einzelnen Patienten festgestellt (n=6), was zu einer frühzeitigen Aussetzung der Therapie führte. Diese Daten deuten auf eine gute Verträglichkeit der zielgerichteten Therapie hin.

Das Überleben ist deutlich höher bei dieser kleinen Patientengruppe. Die hier festgestellten Befunde sind allerdings, aufgrund der kleinen Patientenzahl, statistisch nicht aussagekräftig. Erfahrungsgemäß war die nach dieser Methode durchgeführte zielgerichtete Therapie klinisch machbar und hat den meisten Patienten wertvolle Lebenszeit geschenkt. Da die Biopsien ausnahmsweise klinisch indiziert waren, hat die Durchführung der Analyse keine zusätzliche Belastung für die Patienten dargestellt. Die daraus gewonnenen Informationen leiteten eine besser informierte klinische Entscheidungsfindung, insbesondere in Anbetracht der Ausschöpfung etablierter Therapiemöglichkeiten.

Die Ergebnisse dieser kleinen Registerstudie korrelieren mit den beobachteten Ergebnissen von mehreren ähnlichen, aber größeren nationalen und internationalen Studien. In der deutschen INFORM Registerstudie wurden 962 Proben von Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen mit refraktären Krebserkrankungen mittels Sequenzierung analysiert. (Worst *et al.*, 2016) In 85.9% der analysierten Proben wurden „actionable Targets“ bzw. therapiebare Ziele identifiziert, 43% davon waren genetisch veränderte Ziele. In 33% der Patienten wurden passende zielgerichtete Therapien appliziert. In INFORM wurde kein signifikanter Unterschied in den PFS und den OvS bei den nach der Zielanalyse behandelten Patienten festgestellt. Allerdings bei einer Untergruppe der Patienten in der die Ziele als „very high priority“ eingestuft wurden, wurde eine statistisch signifikante Verbesserung der PFS der behandelten Patienten festgestellt, korrelierend mit den Ergebnissen dieser Arbeit. (Van Tilburg *et al.*, 2021) Ähnliche Studien der Präzisionsmedizin in der pädiatrischen Onkologie wurden bereits publiziert. Die amerikanische MATCH Studie untersuchte als „umbrella trial“ das Vorhandensein verschiedener genetischer Veränderungen und behandelte die Patienten in den entsprechenden therapeutischen Armen bzw. Unterstudien. (Allen *et al.* 2017) Die

französische MOSCATO-01 analysierte Proben von 75 Patienten hauptsächlich mittels Sequenzierung und konnte in 60.9% der Patienten „actionable targets“ identifizieren. (Harttrampf *et al.*, 2017) Ähnlich wurden in der SACHA Registerstudie 51% der 366 Patienten mit zielgerichteten Therapien aufgrund der genetischen Untersuchung als off-label Therapie behandelt. Messbares Ansprechen auf die Therapie als „partial response“ oder „best response“ wurde in 25% der behandelten Patienten festgestellt. (Berlanga *et al.*, 2023). Weitere ähnliche Studien wurden in (Forrest *et al.*, 2018) sowie in (Burdach *et al.*, 2018) zusammengefasst.

Die Verwendung von Genexpressionsanalysen ermöglichte bei unserer Arbeit behandelbare Ziele in allen analysierten Patienten festzustellen. Das Vorhandensein von genetischen Veränderungen mittels Sequenzierung wurde in diesem Rahmen nicht untersucht. Obwohl solche Untersuchung wertvolle Informationen liefern können, war die Genexpressionsanalyse in diesem Fall ausreichend, um eine informierte und teilweise effektive personalisierte Therapie zu ermöglichen.

Im Laufe dieser Arbeit stellten sich einige Fragen bezüglich der Übertragbarkeit der Informationen von der Expressionsanalyse bzw. von der mRNA-Ebene auf die Protein-Ebene. Die Frage war konkret, ob die hochexpressierten Gene sich auch als hochexpressierte Proteine aufweisen und von daher ansprechbar auf die zielgerichtete Therapie sind. Um diesen Fragestellungen zu beantworten, wurden die Proben, die für die Zielanalyse verwendet wurden, mittels Immunhistochemie gefärbt.

Es wurden zwei bis drei hoch exprimierte Ziele pro Probe auf das Vorhandensein von Zielproteinen untersucht und dabei der Anteil der geschätzten positiven Zellen berechnet. Obwohl die Expression der entsprechenden Proteine histologisch nachweisbar war, konnte keine Korrelation zwischen der Hochexpression der mRNA und der geschätzte Anteil der positiv gefärbten Zellen oder der Intensität der Färbung nachgewiesen werden. Da lediglich sechs von neun Proben histologisch untersucht wurden, sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt aussagekräftig. Höchstwahrscheinlich spielen weitere Faktoren in der Expressionskaskade eine Rolle bzw. die Hochexpression von mRNA überträgt sich nicht direkt auf eine entsprechende Hochexpression des Zielproteins. Ob die gewählten zielgerichteten Therapien diese Proteine direkt angreifen, bleibt daher fraglich bzw. nicht nachweisbar. Wir gehen davon aus, dass die zielgerichteten Therapien

und Wirkstoffe, die exprimierten Ziele auf der Proteinebene angreifen. Letztlich kann diese Frage nur durch ein „*Downstream Processing*“ kurz (*DSP*) beantwortet werden. Allerdings war dies nicht Bestandteil der aktuellen Arbeit. Die Tatsache, dass die Ziele auf der Protein-Ebene vorhanden waren, bestätigt unter diesen Prämissen die beobachteten Effekte, allerdings ist die Intensität der Färbung bzw. der geschätzte Anteil der positiv gefärbten Zellen in der IHC mit den Überlebensdaten nicht korrelierbar. Dies gilt jedoch auch für etablierte Therapien wie z.B. die Checkpoint-Inhibition. Diese Analyse war eher ein präliminärer Versuch, mögliche Muster zu entdecken. Die quantitative Expression hat höchstwahrscheinlich keine zuverlässige Aussagekraft hinsichtlich des Ansprechens auf die Therapie. Eine zielgerichtete Therapie könnte große Effekt erzielen, in dem die Überlebens- und Vermehrungsmechanismen der Tumorzellen effektiv unterbunden werden. Dazu ist es wichtig zu evaluieren, ob die adressierte Zielstruktur für den Tumor verzichtbar oder unverzichtbar ist: Ein Ziel welches hoch exprimiert aber weniger zentral ist für den Tumor ist, wird weniger bestimmend sein in Hinblick auf die Effekte bzgl. des Überlebens und der Vermehrung der Tumorzellen. Vorausgesetzt, dass die gewählten zielgerichteten Therapien die entsprechenden Ziele angreifen, könnte eine Therapie, welche die häufig exprimierten und gleichzeitig zentralen Ziele angreift, die Tumorlast reduzieren und das Überleben verlängern. Hinsichtlich der Heterogenität im Tumor bzw. des angenommenen Vorhandenseins von verschiedenen Arealen im Tumor, die eine unterschiedliche Expression zeigen, ist eine einzige Biopsie nicht repräsentativ. Außerdem ist es wahrscheinlich, dass verschiedene Metastasen in einem einzigen Patienten unterschiedliche Genexpressionsprofile aufzeigen und entsprechend unterschiedlich auf die gewählten zielgerichteten Therapien reagieren.

Eine Wiederholung der Biopsie im Laufe der zielgerichteten Therapie wäre wissenschaftlich und klinisch interessant, ist aber nur in Einzelfällen praktikabel oder vertretbar.

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse vieler Studien der Präzisionsmedizin, weisen Wissenschaftler vermehrt auf die sog. angeborene darwinistische Evolution im Tumor hin, welche den Tumorzellen ermöglicht „escape pathways“ zu aktivieren und den Angriff durch die zielgerichtete Therapie auszuweichen. (Tannock & Hickman, 2016;

Burdach *et al.*, 2018) Einige Arbeiten deuten auf eine partielle Inhibition der molekularen Ziele aufgrund der Plastizität der Signalwege im klinischen Setting hin. (Begley & Ellis, 2012) Eine Kombinationstherapie, um mehrere Signalwege gleichzeitig anzugreifen, resultiert aufgrund der toxischen Effekten oft in einer Reduzierung der Dosis der einzelnen zielgerichteten Therapien und einer unzureichenden Blockierung der Signalwege. (Johnson *et al.*, 2014)

Tumorzellen, besonders in pädiatrischen Tumoren, zeigen eine ausgeprägte Plastizität auf der genetischen und auch der epigenetischen Ebene. Eine zielgerichtete Therapie, welche die onkogenabhängigen Signalwege bzw. „oncogene addiction pathways“ nicht blockieren, fördern eher eine Resistenz durch die alternativen Signalwege sog. „priming for resistance,,. (Burdach, 2014)

Die Frage der Tumormarker bleibt nach wie vor sehr interessant, besonders wenn es sich um weniger invasive Biopsien, die sog. „Liquid Biospy“ und funktionelle Bildgebung handelt. Extrazelluläre Vesikel mit aberranten ETS-Proteinen wurden im Blut und Urin von ES Patienten nachgewiesen, konnten quantitativ sowie genetisch untersucht werden und bieten die Möglichkeit als Biomarker im Laufe der Therapie zu dienen. (Miller *et al.*, 2013; Pachva *et al.*, 2021; Ruzanov *et al.*, 2024)

Einige Studien konnten die Genexpression mit den radiologischen Befunden korrelieren und sogar Modelle entwickeln, die das Überleben anhand dieser Informationen vorhersagen. (Zhou *et al.*, 2018; Qiu *et al.*, 2020) Ob eine klinisch relevante Vorhersage der Genexpression oder des Mutationsstatus mittels Bildgebung möglich wäre, ist eine intensiv bearbeitete Frage. (Mahajan *et al.*, 2024; Hinterwimmer *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2023)

Eine verbesserte Analyse der verschiedenen Tumorklone im Patienten im Rahmen der Präzisionstherapie ist weiterhin interessant in Hinblick auf die Therapieauswahl.

Die Informationen aus der Arrayanalyse sind vielseitig und interessant in Anbetracht klinischer sowie wissenschaftlicher Fragestellungen. Die Expressionswerte bieten nicht nur Informationen über die Tumorzellen, sondern auch über alle anderen Zellen, die in der Biopsie vorhanden sind. Mit Hilfe von Algorithmen, die bestimmte Signaturen von 22 verschiedenen Immunzellen identifizieren, war es möglich, ein gewisses Muster in den Proben zu entdecken.



Alle Patienten zeigten eine Signatur von Plasmazellen, CD8 T-Zellen, M0 Makrophagen und Treg Zellen. Obwohl histologisch nicht untersucht, deuten diese Analysen auf eine den Tumor begünstigende Mikroumgebung hin, korrelierend mit früheren Studien, die auf eine immunsuppressive Mikroumgebung in ES bzw. OS hindeuten (Evdokimova *et al*, 2022). Auch wenn diese präliminären Befunde im Rahmen der aktuellen Arbeit nicht weiterverfolgt wurden, ist es vorstellbar, dass diese Informationen im Fall einer möglichen personalisierten Immuntherapie bedeutend sein könnten.

Neben der experimentellen Reproduzierbarkeit der Daten sind die Array Informationen sehr von der rechnerischen und statistischen Analyse abhängig. Wissenschaftlich leiten sie zu weiteren Fragestellungen und Untersuchungen. Klinisch bieten sie einen Einblick in den Tumor auf der genetischen aktiven Ebene hinein und stellen eine Basis für mögliche individualisierte und personalisierte Therapien dar.

## 6 Zusammenfassung

Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene mit pädiatrischen Knochen und Weichteilsarkomen haben weniger von den Fortschritten der Krebstherapie in den letzten zwanzig Jahren profitiert als z.B. Kinder mit Leukämien. Die Prognose bei fortgeschrittenen und metastasierenden Erkrankungen bleibt schlecht. Traditionelle Therapien basieren meist auf zytotoxische Krebsmedikamenten. Informationen aus der Genanalyse von internationalen Projekten zeigten, dass Krebszellen trotz unterschiedlicher Histologie, ähnliche Wachstums- und Metastasierungs- Mechanismen verwenden. Die RNA-Expressionsanalyse mittels Arrays bietet eine standardisierbare Methode, um einen Einblick in die Gen-Transkription des Tumors zu verschaffen. Tumorbiopsien bei refraktären Patienten wurden mittels GeneChip Arrays untersucht und mit Hilfe online verfügbare Datenbanken aus internationalen Kooperativen Projekten sowie online Algorithmen und Tools weiter analysiert. Dabei wurden therapierbare Ziele in allen untersuchten Proben festgestellt. Die Therapie wurde individuell für die Patienten anhand der Ergebnisse der Analysen ausgewählt. Im Vergleich zu Patienten, die keine zielgerichtete Therapie bekommen haben, zeigten Patienten, die mit einer personalisierten, zielgerichteten Therapie behandelt worden verlängertes

Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben. Die Lebensqualität blieb dabei nicht signifikant unterschiedlich.

Die Daten aus der Expressionsanalyse ermöglichen eine evidenzbasierte Therapieauswahl bei refraktären Patienten und bieten vielen Informationen über den Tumor bei jedem einzelnen Patienten. Die Methode der Therapieauswahl ist wissenschaftlich reproduzierbar sowie klinisch anwendbar.

## 7 Anlagen

### Anlage 1

Dokumentationsbogen für Nebenwirkungen und unerwünschten Ereignissen sowie für Lebensqualität QoL




**Toxicity Evaluation  
and  
Performance Status**

Patient Name \_\_\_\_\_  
 Date of Birth \_\_\_\_\_  
 -Patientenaufkleber-

**NCI-CTCAE definitions of severity for adverse reactions**

Grade	Definition
1	Mild; with no or mild symptoms; no interventions required
2	Moderate; minimal intervention indicated; some limitation of activities
3	Severe but not life threatening; hospitalization required; limitation of ability to care for self
4	Life-threatening; urgent intervention required
5	Death related to AE

**ATTRIBUTION OF ADVERSE EVENTS**

Code	Description
5	Definite The adverse event is <b>Clearly related</b> to therapy
4	Probable The adverse event is <b>likely related</b> to therapy
3	Possible The adverse event <b>may be related</b> to therapy
2	Unlikely The adverse event is <b>doubtfully related</b> to therapy
1	unrelated The adverse event is <b>Clearly NOT related</b> to therapy

**Toxicity Classification according to CTCAE v4.03: June 14, 2010 and Lansky/Karnofsky Performance Status**

**Performance Status**

**Karnofsky Scale (age ≥ 16 years)**

☐ 100 Normal, no complaints, no evidence of disease

☐ 90 Able to carry on normal activity

☐ 80 Normal activity with effort

☐ 70 cares for self, unable to carry on normal activity or to do active work

☐ 60 Requires occasional assistance but is able to care for most needs

☐ 50 Requires considerable assistance and frequent medical care

☐ 40 Disabled, requires equivalent of institutional or hospital care

☐ 30 Severely disabled, hospitalization indicated, although death not imminent

☐ 20 Very Sick, hospitalization necessary

☐ 10 Moribund, fatal process progressing rapidly

**Lansky Scale (age < 16 years)**

☐ 100 Fully active

☐ 90 Minor restriction in physically strenuous play

☐ 80 Restricted in strenuous play, tires more easily, otherwise active

☐ 70 Both greater restrictions of, and less time spent in active play

☐ 60 Ambulatory up to 50% of time, limited active play with assistance/supervision

☐ 50 Considerable assistance required for any active play, fully able to engage in quiet play

☐ 40 Able to initiate quiet activities

☐ 30 Needs considerable assistance for quiet activity

☐ 20 Limited to very passive activity initiated by others

☐ 10 Completely disabled, not even passive play

Toxicities	0	grade 1	grade 2	grade 3	grade 4	grade 5	Not	Attribution Code	Therapy/Dose adjustment based on toxicity
<b>Blood and Lymphatic</b>									
Anemia (Hemoglobin) (Hgb)	WNL	<LLN - 10.0 g/dL <LLN - 6.2 mmol/L <LLN - 100 g/L	<10.0 - 8.0 g/dL <6.2 - 4.9 mmol/L <100 - 80 g/L	<8.0 g/dL <4.9 mmol/L <80 g/L transfusion indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
INR	WNL	>1 - 1.5 x ULN; >1 - 1.5 times above baseline if on anticoagulation	>1.5 - 2.5 x ULN; >1.5 - 2.5 times above baseline if on anticoagulation	>2.5 x ULN; >2.5 times above baseline if on anticoagulation	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Activated partial thromboplastin time (aPTT)	WNL	>ULN - 1.5 x ULN	>1.5 - 2.5 x ULN	>2.5 x ULN; hemorrhage	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Lymphocytes	WNL	<LLN - 800/mm3; <LLN - 0.8 x 10e9 /L	<800 - 500/mm3; <0.8 - 0.5 x 10e9 /L	<500 - 200/mm3; <0.5 - 0.2 x 10e9 /L	<200/mm3; <0.2 x 10e9 /L	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Neutrophils	WNL	<LLN - 1500/mm3; <LLN - 1.5 x 10e9 /L	<1500 - 1000/mm3; <1.5 - 1.0 x 10e9 /L	<1000 - 500/mm3; <1.0 - 0.5 x 10e9 /L	<500/mm3; <0.5 x 10e9 /L	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Platelet count	WNL	<LLN - 75,000/mm3; <LLN - 75.0 x 10e9 /L	<75,000 - 50,000/mm3; <75.0 - 50.0 x 10e9 /L	<50,000 - 25,000/mm3; <50.0 - 25.0 x 10e9 /L	<25,000/mm3; <25.0 x 10e9 /L	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Febrile neutropenia	No	—	—	ANC <1000/mm3 with a single temperature of >38.3C or a sustained temperature of >=38 degrees C > 1	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Bone marrow hypocellular	No	Mildly hypocellular or <=25% reduction from normal cellularity for age	Moderately hypocellular or >25 - <50% reduction from normal cellularity for age	Severely hypocellular or >50 - <=75% reduction from normal cellularity for age	Aplastic persistent for longer than 2 weeks	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Disseminated intravascular coagulation	No	—	Laboratory findings with no bleeding	Laboratory findings and bleeding	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Hemolysis	Normal	Laboratory evidence of hemolysis only	Evidence of hemolysis and >=2 gm decrease in hemoglobin	Transfusion or medical intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Leukocytosis	No	—	—	>100,000/mm3	Clinical manifestations of leukostasis; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<b>Cardiovascular</b>									
Electrocardiogram QT corrected interval prolonged	WNR	QTc 450 - 480 ms	QTc 481 - 500 ms	QTc >= 501 ms on at least two separate ECGs	QTc >= 501 or >60 ms change from baseline and Torsade de pointes or polymorphic ventricular tachycardia or signs/symptoms of	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Palpitations	No	Mild symptoms; intervention not indicated	Intervention indicated	—	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Ventricular arrhythmia	No	Asymptomatic; intervention not indicated	Non-urgent medical intervention indicated	Medical intervention indicated	Life-threatening consequences; hemodynamic compromise; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No

Heart failure	No	Asymptomatic with laboratory (e.g., BNP[B-Natriuretic Peptide]) or cardiac imaging	Symptoms with mild to moderate activity or exertion	Severe with symptoms at rest or with minimal activity or exertion; intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated (e.g., continuous IV therapy or mechanical hemodynamic	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Chest pain - cardiac	No	Mild pain	Moderate pain; limiting instrumental ADL	Pain at rest; limiting self care ADL	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Conduction disorder	No	Mild symptoms; intervention not indicated	Moderate symptoms	Severe symptoms; intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Hypertension	No	Prehypertension (systolic BP 120 - 139 mm Hg or diastolic BP 80 - 89 mm Hg)	Stage 1 hypertension (systolic BP 140 - 159 mm Hg or diastolic BP 90 - 99 mm Hg); medical intervention indicated; recurrent or persistent (>24hrs); symptomatic increase by >20 mm Hg (diastolic) or to >140/90 mm Hg if previously WNL; monotherapy indicated Pediatric: recurrent or persistent (>24 hrs) BP >ULN; monotherapy indicated	Stage 2 hypertension (systolic BP >=160 mm Hg or diastolic BP >=100 mm Hg); medical intervention indicated; more than one drug or more intensive therapy than previously used indicated Pediatric: Same as adult	Life-threatening consequences (e.g., malignant hypertension transient or permanent neurologic deficit, hypertensive crisis); urgent intervention indicated Pediatric: Same as adult	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<b>Ear and labyrinth</b>									
Hearing impaired (Pediatric: on a 1, 2, 3, 4, 6 and 8 kHz audiogram)	No	Threshold shift >20 dB at 8 kHz in at least one ear	Threshold shift >20 dB at 4 kHz and above in at least one ear	hearing loss sufficient to indicate therapeutic intervention, including hearing aids; threshold shift >20 dB at 3 kHz and above in at least one ear; additional speech/language related	Audiologic indication for cochlear implant and additional speech/language related services indicated	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Vertigo	No	Mild symptoms	Moderate symptoms; limiting instrumental ADL	—	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Middle ear inflammation	No	Serous otitis	Serous otitis; medical intervention indicated	Mastoiditis; necrosis of canal soft tissue or bone	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<b>Eyes</b>									
Blurred vision	No	Intervention not indicated	Symptomatic; limiting instrumental ADL	Limiting self care ADL	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Dry eye	No	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; mild symptoms relieved by lubricants	Symptomatic; multiple agents indicated; limiting instrumental ADL	Decrease in visual acuity (<20/40); limiting self care ADL	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Optic nerve disorder	No	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only	Limiting vision of the affected eye (20/40 or better)	Limiting vision in the affected eye (worse than 20/40 but better than 20/200)	Blindness (20/200 or worse) in the affected eye	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Photophobia	No	Symptomatic but not limiting ADL	Limiting instrumental ADL	Limiting self care ADL	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Uveitis	No	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only	Anterior uveitis; medical intervention indicated	Posterior or pan-uveitis	Blindness (20/200 or worse) in the affected eye	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<b>Gastrointestinal</b>									
Colitis	No	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Abdominal pain; mucus or blood in stool	Severe abdominal pain; change in bowel habits; medical intervention indicated; peritoneal signs	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Constipation	No	Occasional or intermittent symptoms; occasional use of stool softeners, laxatives	Persistent symptoms with regular use of laxatives or enemas; limiting instrumental ADL	Obstipation with manual evacuation indicated; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Diarrhea	No	Increase of <4 stools per day over baseline; mild increase in ostomy output compared to baseline	Increase of 4 - 6 stools per day over baseline; moderate increase in ostomy output compared to baseline	Increase of >=7 stools per day over baseline; incontinence; hospitalization indicated; severe increase in ostomy output compared to	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Dry mouth	No	Symptomatic without significant dietary alteration; unstimulated saliva flow >0.2 ml/min	Moderate symptoms; oral intake alterations; unstimulated saliva 0.1 to 0.2 ml/min	Inability to adequately aliment orally; tube feeding or TPN indicated; unstimulated saliva <0.1 ml/min	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Enterocolitis	No	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Abdominal pain; mucus or blood in stool	Severe or persistent abdominal pain; fever; ileus; peritoneal signs	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Gastric hemorrhage	No	Mild; intervention not indicated	Moderate symptoms; medical intervention or minor cauterization indicated	Transfusion, radiologic, endoscopic, or elective operative intervention indicated	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Gastritis	No	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; altered GI function; medical intervention indicated	Severely altered eating or gastric function; TPN or hospitalization indicated	Life-threatening consequences; urgent operative intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No



Anxiety	No	Mild symptoms; intervention not indicated	Moderate symptoms; limiting instrumental ADL	Severe symptoms; limiting self care ADL; hospitalization not indicated	Life-threatening; hospitalization indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Anxiety definition: A disorder characterized by apprehension of danger and dread accompanied by restlessness, tension, tachycardia, and dyspnea unattached to a clearly									
Confusion	No	Mild disorientation	Moderate disorientation; limiting instrumental ADL	Severe disorientation; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Delirium	No	Mild acute confusional state	Moderate and acute confusional state; limiting instrumental ADL	Severe and acute confusional state; limiting self care ADL; hospitalization indicated	Life-threatening consequences; threats of harm to self or others; hospitalization	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Delirium definition: A disorder characterized by the acute and sudden development of confusion, illusions, movement changes, inattentiveness, agitation, and hallucinations usually reversible.									
Depression	No	Mild depressive symptoms	Moderate depressive symptoms; limiting instrumental ADL	Severe depressive symptoms; limiting self care ADL; hospitalization not indicated	Life-threatening consequences; threats of harm to self or others; hospitalization	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Suicidal ideation	No	Increased thoughts of death but no wish to kill oneself	Suicidal ideation with no specific plan or intent	Specific plan to commit suicide without serious intent to die which may not require	Specific plan to commit suicide with serious intent to die which	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<b>Renal</b>									
Hematuria	No	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; urinary catheter or bladder irrigation indicated; limiting instrumental ADL	Gross hematuria; transfusion, IV medications or hospitalization indicated; elective endoscopic, radiologic or operative intervention indicated;	Life-threatening consequences; urgent radiologic or operative intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Proteinuria	No	1+ proteinuria; urinary protein <1.0 g/24 hrs	Adults: 2+ proteinuria; urinary protein 1.0 - 3.4 g/24 hrs; Pediatric: urine P/C (Protein/Creatinine) ratio 0.5 -1.9	Adults: urinary protein ≥3.5 g/24 hrs; Pediatric: urine P/C >1.9	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Creatinine	WNL	>1 - 1.5 x baseline; >ULN - 1.5 x ULN	>1.5 - 3.0 x baseline; >1.5 - 3.0 x ULN	>3.0 baseline; >3.0 - 6.0 x ULN	>6.0 x ULN	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<b>Respiratory</b>									
Dyspnea	No	Shortness of breath with moderate exertion	Shortness of breath with minimal exertion; limiting instrumental ADL	Shortness of breath at rest; limiting self care ADL	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Pleural effusion	No	Asymptomatic; clinical or diagnostic observations only; intervention not indicated	Symptomatic; intervention indicated (e.g., diuretics or limited therapeutic thoracentesis)	Symptomatic with respiratory distress and hypoxia; surgical intervention including chest tube or pleurodesis	Life-threatening respiratory or hemodynamic compromise; intubation or urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<b>Skin and Subcutaneous Tissue</b>									
Alopecia	No	Hair loss of <50% of normal for that individual that is not obvious from a distance but only on close inspection; a different hair style may be required to cover the hair loss but it does not require a wig or hair	Hair loss of ≥50% normal for that individual that is readily apparent to others; a wig or hair piece is necessary if the patient desires to completely camouflage the hair loss; associated with psychosocial impact	—	—	—	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Photosensitivity	No	Painless erythema and erythema covering <10% BSA	Tender erythema covering 10 - 30% BSA	Erythema covering >30% BSA and erythema with blistering; photosensitivity; oral corticosteroid therapy indicated; pain control	Life-threatening consequences; urgent intervention indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
Rash acneiform	No	Papules and/or pustules covering <10% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness	Papules and/or pustules covering 10 - 30% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness; associated with psychosocial impact; limiting instrumental ADL	Papules and/or pustules covering >30% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness; limiting self care ADL; associated with local superinfection with oral antibiotics indicated	Papules and/or pustules covering any% BSA, which may or may not be associated with symptoms of pruritus or tenderness and are associated with extensive superinfection with IV antibiotics indicated	Death	<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
<b>Other, Specify</b>									
							<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
							<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No
							<input type="checkbox"/>	—	<input type="checkbox"/> Yes <input type="checkbox"/> No

#### Activities of Daily Living (ADL)

\*Instrumental ADL refers to preparing meals, shopping for groceries or clothes, using the telephone, managing money, etc.

\*\*Self care ADL refers to bathing, dressing and undressing, feeding self, using the toilet, taking medications, and not bedridden

#### Abbreviations:

LLN/ULN Lower Limit of normal range (LLN) (age related) resp. Upper Limit of Normal Range (ULN)

ADL Activities of Daily Living

## Anlage 2: Patientencharakteristika im Zeitpunkt der Aufnahme in der Registerstudie

Patient	Geschlecht	Diagnose	Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	Lokalisation des primären Tumors	Histologie	Vorherige Therapie	Chirurgische Eingriffe	Rezidiv und Progression	Krankheitsstadium bei Aufnahme	Alter bei Aufnahme (Jahre)	Biopsiestelle für zielgerichtete Therapie	Zeitintervall zwischen Erstdiagnose und Aufnahme (Jahre)
PT1	M	ES	15	Multifokal mit Kinetan-, KM- und Lungenmetastasen	EWS-F11 positiv	hochdosiert Chemotherapie (Euro-EWJMG, 99/Meta-ES/ESS, R3T) autologes SCT & BMT Radiotherapie für Knochen und Lunge laparotomische Resektion & TLI Hypertarant	Tumorektomie Th1a atypisches parietales Lungenmetastase Resektion der pleurären Metastasen	pulmonal und retroperitoneal	3 Rezidiv	19	Metastasen pleural	2
PT2	M	ES	6	Vertebral C2-C5	EWS-F11 positiv	hochdosiert Chemotherapie (EWING 2008/ Meta-ESS) autologes SCT intraarterielle Topotecan Radiotherapie des primären Tumors und der Lunge	aminocaproat & Telexedolom Reaktion der Lungenmetastasen	pulmonal, lokal, ureteral	2 Rezidiv	8	Vertebral C2-C5	2
PT3	W	ES	25,5	Multifokal: Becken, lumbal, mediastinal, pulmonal und retroperitoneal	EWS-F11 positiv, t(6;22) (p21;p11)	Chemotherapie (EWING 2008/ R3) autologes SCT Radiotherapie Lunge, Lumbal, pelvis, mediastinal	atypisches Lungen Tumorektomie	pulmonal	2 Rezidiv	27,5	Lunge	2
PT4	M	RMS	22	Musculus pterygoideus medialis	embryonischer RMS	Chemotherapie (CNS HRG) Proton Radiotherapie	R2 Reaktion	Epipharynx, sinus sphenoidalis & Schilddrüse	2 Rezidiv	23,5	Sinus sphenoidalis	1,5
PT5	M	SS	18,5	Clavicula	t(12;18) SYT gene breakpoint (SYT-SS2-translocation)	Chemotherapie (CNS-2002/HRG, Trabectedin, Irinotecan) lokalisierte Radiotherapie	R2 Reaktion Nachreaktion Rezidiv	lokal, 1.Hip, Humer, pleural & Brustwand	4 Rezidiv	19	Clavicula & Weichteil	10,5
PT6	W	ES	18,5	Reppen und Lunge	EWS-F11 negativ	Chemotherapie (4x VAC/IE, 2x VIE, Meta-ESS) HIPEC with Cisplatin and Docetaxel	Reaktion Pleurotomie rechts	lokal Brustwand, Lunge rechts & mediastinal, LK	2 Rezidiv	20	Lunge	1,5
PT7	W	ES	13,5	Femur	EWS-F11 positiv	Chemotherapie (E100-2/4x VAC-99, E1X Monotherapie mit RBT, Trabectedin & Irinotecan) lokalisierte Radiotherapie	-	Scapula links, Lunge, Progression retroperitoneal & Brustwand Progression Struma, Ovarien & Sektum	3 Rezidiv	18	Scapula links	4,5
PT8	W	OS	18,0	nicht bekannt	nicht bekannt	MAPT/EURAMOS-1 protocol, Mifamurtid, Sorafenib	nicht bekannt	Metastasen gluteal	refraktär progressiv	23	nicht bekannt	5
PT9	M	OS	28,0	Os ileum (rechts)	hochgradig metastasierendes osteoblastisches Sarkom mit bilateraler Differenzierung	MAPT/EURAMOS-1 protocol, Mifamurtid	Hemiparästhesie	Lungenmetastasen und Brustwand (Weichteil)	refraktär progressiv	32	Bauchwand	3
PT10	M	FS	20	Bein (rechts)	sklerosierendes epitheliales FS	Chemotherapie (Tandem, interferon 3 x 60, Vincristine, IFM, IFM, CDCA, VP16, Epirubicin, Docetaxel, Trabectedin, Paclitaxel)	Resektion des primären Tumors und der Lungenmetastasen Progression lokal in Bein rechts	Lungenmetastasen Progression lokal in Bein rechts	3 Rezidiv	35,5	nicht bekannt	15,5
PT11	W	RMS	12	Handgelenk mit LK, KM, Knochen und Lungenmetastasen bilaterale	embryonischer RMS	Chemotherapie (CNS HRG, Topotecan, Treosulfat, Irinotecan, Etoposide) autologes SCT	Resektion der Handgelenke, hantare Weichteile, Vagina, Blasen und LK Panmetastasen mit Teilresektion des Tumors	pulmonal Progress und Rezidiv	2 Rezidiv	14	Lunge	2
PT12	M	OS	15	Os sacrum & lumbal L5	osteoblastisch und unilobuläre chondroblastisches OS, Grad 3	Chemotherapie (EURAMOS-1, Cos-86, CNS HR2007, Carboplatin, Etoposide, Sorafenib) lokale Radiotherapie	Thoraxmetastasen Reaktion der Beckenmetastasen	V. lumb, V. sacrum, LK Locher Progression	4 Rezidiv	17,5	Särum	2,5



Patient	Geschlecht	Diagnose	Alter bei Erstdiagnose (Jahre)	Lokalisation des primären Tumors	Histologie	Vorherige Therapie	Chirurgische Eingriffe	Rezidiv und Progression	Krankheitsstadium bei Aufnahme	Alter bei Aufnahme (Jahre)	Biopsiestelle für zielgerichtete Therapie	Zeitintervall zwischen Erstdiagnose und Aufnahme (Jahre)
PT13	M	ES	10.5	Mandibula (link), ethmoid, sphenoid und Pterygopalatum	EWS-FLI1 negativ	Chemotherapie (EWING 2006 protocol, METR-HXSS, CE) lokalisierte proton Radiotherapie	Tumorsektion transnasal	Os sphenoid (processus pterygoidicus ) und Sinus sphenoidal, ethmoidal, frontal & Augenhöhle	2 Rezidiv	13	Kieferhöhle, pterygopalatum fossa	2.5
PT14	M	OS	7.5	Os femur distal	chondroblastisches OS	Chemotherapie (EURAMOS-1 / CDSS) Hyperthermie	Resektion der Lungenmetastasen	pulmonal	3 Rezidiv	12	Lunge	4.5
PT15	M	RMS	14	Kieferwinkel	alveolares RMS	Chemotherapie (QWS H10, Trabectedin & Irinotecan) lokalisierte Radiotherapie & proton Radiotherapie	Resektion des primären Tumors und des Rezidivs	Progression intraorbital, LK mediastinal, pulmonal, Knochenmetastasen (femur) & M. Vagus lateralis	7 Rezidiv	17	LK submandibular	3
PT16	M	OS	15	Rippen (8 links) mit Weichteilsanteil	hochdifferenziertes osteoblastisches OS Säurer Kinaseaktiv V	Chemotherapie (Eurasian J CDSS)	Resektion des primären Tumors Resektion des Rezidivs Lungenmetastasen	Rezidiv lokal Thorax Rezidiv lokal & Progression Lunge	2 Rezidiv	16	Lunge	1
PT17	W	ES	18	Fibula proximal links	EWS-FLI1 positiv	Chemotherapie (EIRO-EWI-M-G-99) autologes SCT, 1x DLI Radiotherapie (40, 36 und 50 Gy)	Resektion des primären Tumors und des Rezidivs	mehrere Progressionen und Rezidive im Wirbelsäulen thorakal und lumbal, lokales Rezidiv	5 Rezidiv	25	Schambein	7
PT18	W	ES	9	Femur proximal rechts	EWS-FLI1 negativ	Chemotherapie (EIRO-EWI-M-G-99) 2x Cyclophosphamid/Topotecan Zolmitoxan/Temozolamid, VIDE Radiotherapie (Lunge 59.70y, Gehirn 35Gy)	Pneumonie, RL rezidivierender Lungenmetastasen, Resektion der Gehirnmetastasen	Lungen und Gehirnmetastasen Progression Lunge mit Wirbelsäulenmetastasen	3 Rezidiv	20	Lunge	11
PT19	M	ES	13	Humerus proximal rechts	EWS-FLI1 negativ	Chemotherapie (ADWS031 B2, Cyclophosphamid/Topotecan, Irinotecan/Temozolamid, ME) autologes SCT Radiotherapie (50Gy)	Resektion des primären Tumors	multiple Knochenmetastasen (Humerus, proximaler Ulna, Femur, Wirbelsäule thorakal, Rippen, Sacrum, Acetabulum, Scapula, Hinterhauptbein mit Gehirne- und Karkotiscomponente)	2 Rezidiv	16	Femur	3
PT20	W	ES	18	Fibula proximal links	EWS-FLI1 positiv	Chemotherapie (Vincristine, Adriamycin, Cyclophosphamid) 3x DLI-EWI-M-G-99) Radiotherapie Os Sacrum (44.8Gy)	Resektion des primären Tumors	multiple Progressionen und Knochenmetastasen (Femur lokal, Skapula, Rippen, Schultergürtel, Wirbel lumbal) Lungen- und Lebermetastasen	refraktär progressiv	19	Fibula, sacrum	1

demosaikum, SS: Synovialsarkom, FS: Fibrosarkom, KM: Knochentumork, LK: Lymphknoten

SCT: stem cell transplant, BMT: bone marrow transplant, DLI: donor lymphocyte infusion, HIG: high risk group, MAPK: mitral valve, doxorubicin, cyclophosphamide, ifosfamide and etoposide, VAC: Vincristine, Adriamycin and Cyclophosphamide, E: ifosfamide and Etoposide, VIDE: Vincristine, Ifosfamide, Doxorubicin and Etoposide, HIFEC: intrathecal hyperthermic perfusion chemotherapy, HST: Rapamycin/Dexamethasone (HST) for 4 days followed by 5 days of Irinotecan and Temozolomide (ITI), CC: Carboplatin & Etoposide, ME: Mepolizumab & Etoposide, LN: lymph node, BM: bone marrow



## 8 Abkürzungsverzeichnis

SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results
engl.	englisch
AYAs	adolescents and young adults
OS	Osteosarkom
ES	Ewing Sarkom
RMS	Rhabdomyosarkom
SYS	Synovialsarkom
FS	Fibrosarkom
WHO	World Health Organisation
MRT	Magnetresonanztomographie
CT	Computertomographie
LK	Lymphknoten
PET	Positronenemissionstomographie
<sup>18</sup> F-FDG	<sup>18</sup> F fluorodeoxyglucose
OP	Operation
SV	structural variation
CNV	copy number variation
MAP	Methotrexate + Doxorubicin + Cisplatin
MAPifn	MAP anschließend PEGyliertes Interferon- $\alpha$
MAPIE	MAP anschließend Ifosfamid/Etoposid

eRMS	embryonales RMS
aRMS	alveolares RMS
FPRMS	Fusion-positives RMS
FNRMS	Fusion-negatives RMS
CWS	Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe
EpSSG	European Paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group
VA	Vincristine und Actinomycin-D
IVA	Vincristine und Actinomycin D mit oder ohne Ifosfamide
IVADo	Vincristine und Actinomycin D mit oder ohne Ifosfamide mit Doxorubicin
NRSTS	non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas
TCGA	The Cancer Genome Atlas
CGAP	The Cancer Genome Anatomy Project
ICGC	International Cancer Genome Consortium
OvS	Gesamtüberleben, engl. Overall Survival
PFS	Progresionsfreies Überleben
QoL	Lebensqualität, engl. Quality of life
AE	Unerwünschte Ereignisse, engl. Adverse

	Events
i.d.R.	in der Regel
ggf.	gegebenenfalls
IVT	In Vitro Transcription
PM	Perfect Match Probe
MM	Mismatch Probe
RMA	Robust Multi-array Average
PBMC	engl. Peripheral Blood Mononuclear Cell, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
GSEA	Gene set enrichment analysis
RESIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
KzT	Patienten ohne zielgerichtete Therapie
zT	Patienten mit einer zielgerichteten Therapie
NB	Nebenwirkungen
NCI-CTCAE	Common Terminology Criteria for Adverse Events Kriterien der National Cancer Institute
WHO-UMC	World Health Organisation- Uppsala Monitoring Center
PBS	phosphate-buffered saline

ABC	Avidin-Biotin Complex
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
DAB	3,3'-diaminobenzidine
IHC	Immunhistochemie
NGS	Next generation sequencing

## 9 Literaturverzeichnis

Affymetrix Data Sheet. Available at:  
[https://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/gene\\_1\\_0\\_st\\_datasheet.pdf](https://www.affymetrix.com/support/technical/datasheets/gene_1_0_st_datasheet.pdf)  
 (Accessed: 26 November 2019).

Ahrensberg, J.M. et al. (2012) 'Presenting symptoms of children with cancer: a primary-care population-based study', *The British journal of general practice: the journal of the Royal College of General Practitioners*, 62(600), pp. e458–65.

Allen, C. E. et al. (2017) 'Target and Agent Prioritization for the Children's Oncology Group-National Cancer Institute Pediatric MATCH Trial', *Journal of the National Cancer Institute*, 109(5).

Anderson, J., Denny, C., Tap, W. et al. (2012) 'Pediatric sarcomas: translating molecular pathogenesis of disease to novel therapeutic possibilities'. *Pediatric Research* 72, pp.112–121.

Annavarapu, S.R. et al. (2013) 'Characterization of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in rhabdomyosarcoma', *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 93(10), pp. 1090–1099.

Bakri, A. et al. (2012) 'Synovial sarcoma: imaging features of common and uncommon primary sites, metastatic patterns, and treatment response', *AJR. American journal of roentgenology*, 199(2), pp. W208–15.

Balakrishnan, R. et al. (2013) 'A guide to best practices for Gene Ontology (GO) manual

annotation', Database: the journal of biological databases and curation, 2013, p. bat054.

Barenboim M. *et al.* (2021)' DNA methylation-based classifier and gene expression signatures detect BRCAness in osteosarcoma', *PLoS Comput Biol*, 17(11):e1009562.

Baumhoer, D., Amary, F. and Flanagan, A.M. (2019) 'An update of molecular pathology of bone tumors. Lessons learned from investigating samples by next generation sequencing', *Genes, chromosomes & cancer*, 58(2), pp. 88–99.

Behjati, S. *et al.* (2017) 'Recurrent mutation of IGF signalling genes and distinct patterns of genomic rearrangement in osteosarcoma', *Nature communications*, 8, p. 15936.

Begley CG, Ellis LM. (2012) 'Drug development: raise standards for preclinical cancer research'. *Nature*, 483:531-3.

Bennicelli, J.L. *et al.* (1999) 'PAX3 and PAX7 exhibit conserved cis-acting transcription repression domains and utilize a common gain of function mechanism in alveolar rhabdomyosarcoma', *Oncogene*, 18(30), pp. 4348–4356.

Berclaz, L.M. *et al.* (2021) 'Expression Patterns of TOP2A and SIRT1 Are Predictive of Survival in Patients with High-Risk Soft Tissue Sarcomas Treated with a Neoadjuvant Anthracycline-Based Chemotherapy', *Cancers*, 13(19). Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers13194877>.

Berlanga P. *et al.* (2023)' Measuring Safety and Outcomes for the Use of Compassionate and Off-Label Therapies for Children, Adolescents, and Young Adults With Cancer in the SACHA-France Study', *JAMA Netw Open.*, 6(7):e2321568.

Bielack, S. *et al.* (2009) 'Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 20 Suppl 4, pp. 137–139.

Bielack, S.S. *et al.* (2002) 'Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities or trunk: an analysis of 1,702 patients treated on neoadjuvant cooperative osteosarcoma study group protocols', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(3), pp. 776–790.

Bisogno, G. *et al.* (2023) 'Maintenance Chemotherapy for Patients with Rhabdomyosarcoma', *Cancers*, 15(15). Available at: <https://doi.org/10.3390/cancers15154012>.

Bleyer, A. *et al.* (2005) 'National survival trends of young adults with sarcoma: lack of progress is associated with lack of clinical trial participation', *Cancer*, 103(9), pp. 1891–1897.

Bleyer A, O'Leary M, Barr R, Ries LAG (eds) (2006) *Cancer Epidemiology in Older Adolescents and Young Adults 15 to 29 Years of Age, Including SEER Incidence and Survival*, National Cancer Institute, NIH Pub. No. 06-5767. Bethesda, MD. Available at:

<https://seer.cancer.gov/archive/publications/aya/index.html>.

Boulay, G. et al. (2017) ‘Cancer-Specific Retargeting of BAF Complexes by a Prion-like Domain’, *Cell*, 171(1), pp. 163–178.e19.

Boulay, G. et al. (2021) ‘The chromatin landscape of primary synovial sarcoma organoids is linked to specific epigenetic mechanisms and dependencies’, *Life science alliance*, 4(2). Available at: <https://doi.org/10.26508/lsa.202000808>.

Bridge, J.A. et al. (2002) ‘Genomic gains and losses are similar in genetic and histologic subsets of rhabdomyosarcoma, whereas amplification predominates in embryonal with anaplasia and alveolar subtypes’, *Genes, chromosomes & cancer*, 33(3), pp. 310–321.

Buchbender, C. et al. (2012) ‘Oncologic PET/MRI, part 2: bone tumors, soft-tissue tumors, melanoma, and lymphoma’, *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 53(8), pp. 1244–1252.

Burchill, S.A. (2003) ‘Ewing’s sarcoma: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications of molecular abnormalities’, *Journal of clinical pathology*, 56(2), pp. 96–102.

Burdach S.E.G. (2014), ‘Molecular Precision Chemotherapy: Overcoming Resistance to Targeted Therapies?’, *Clin Cancer Res*, 20 (5): 1064–1066.

Burdach, S.E.G. et al. (2018), ‘Precision medicine in pediatric oncology’, *Mol Cell Pediatr* 5, 6.

Burkhard-Meier A, *et al.* (2024) ‘Unraveling the role of local ablative therapies for patients with metastatic soft tissue sarcoma - A retrospective multicenter study of the Bavarian university hospitals’, *Eur J Surg Oncol*. 50(12):108619.

Calvert, G.T. et al. (2012) ‘At-risk populations for osteosarcoma: the syndromes and beyond’, *Sarcoma*, 2012, p. 152382.

Casali, P.G. et al. (2018) ‘Bone sarcomas: ESMO-PaedCan-EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up’, *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 29(Suppl 4), pp. iv79–iv95.

Cecchetto G. *et al.* (2001) ‘Fibrosarcoma in pediatric patients: results of the Italian Cooperative Group studies (1979-1995)’, *J Surg Oncol.*;78(4), pp.225-231.

Chen, X. et al. (2014) ‘Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma’, *Cell reports*, 7(1), pp. 104–112.

Clark, J.C.M., Dass, C.R. and Choong, P.F.M. (2008) ‘A review of clinical and molecular prognostic factors in osteosarcoma’, *Journal of cancer research and clinical oncology*, 134(3), pp. 281–297.

CLINICAL PRACTICE GUIDELINES FOR PATIENTS WITH RHABDOMYOSARCOMA (current version 1.6 05/02/2022) SIOPE. Available at: <https://siope.eu/media/documents/escp-rhabdomyosarcoma.pdf> (Accessed: 5 December 2024).

Crisci, S. et al. (2019) 'Overview of Current Targeted Anti-Cancer Drugs for Therapy in Onco-Hematology', *Medicina*, 55(8). Available at: <https://doi.org/10.3390/medicina55080414>.

Croft, D. et al. (2011) 'Reactome: a database of reactions, pathways and biological processes', *Nucleic acids research*, 39(Database issue), pp. D691–7.

Dalma-Weiszhausz, D.D. et al. (2006) '[1] The Affymetrix GeneChip® Platform: An Overview', in *DNA Microarrays, Part A: Array Platforms and Wet-Bench Protocols*. Elsevier (Methods in Enzymology), pp. 3–28.

Davis, A.M., Bell, R.S. and Goodwin, P.J. (1994) 'Prognostic factors in osteosarcoma: a critical review', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 12(2), pp. 423–431.

Davis, D.D., Shah, S.J. and Kane, S.M. (2023) *Fibrosarcoma*. StatPearls Publishing.

Davis, L.E. et al. (2017) 'Clinical trial enrollment of adolescents and young adults with sarcoma', *Cancer*, 123(18), pp. 3434–3440.

Davis, R.J. et al. (1994) 'Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma', *Cancer research*, 54(11), pp. 2869–2872.

Delattre, O. et al. (1992) 'Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours', *Nature*, 359(6391), pp. 162–165.

Dudley, W.N., Wickham, R. and Coombs, N. (2016) 'An Introduction to Survival Statistics: Kaplan-Meier Analysis', *Journal of the advanced practitioner in oncology*, 7(1), pp. 91–100.

Dziuba, I. et al. (2018) 'Rhabdomyosarcoma in children - current pathologic and molecular classification', *Polish journal of pathology: official journal of the Polish Society of Pathologists*, 69(1), pp. 20–32.

Eisenhauer, E.A. et al. (2009) 'New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1)', *European journal of cancer*, 45(2), pp. 228–247.

Eleutério, S.J.P. et al. (2015) 'Osteosarcoma in patients younger than 12 years old without metastases have similar prognosis as adolescent and young adults', *Pediatric blood & cancer*, 62(7), pp. 1209–1213.

Engert, F. et al. (2017) 'Osteosarcoma cells with genetic signatures of BRCAness are susceptible to the PARP inhibitor talazoparib alone or in combination with

chemotherapeutics’, *Oncotarget*, 8(30), pp. 48794–48806.

Enterline, H.T. and Horn, R.C., Jr (1958) ‘Alveolar rhabdomyosarcoma; a distinctive tumor type’, *American journal of clinical pathology*, 29(4), pp. 356–366.

EURAMOS (no date) <https://www.uk-essen.de/>. Available at: [https://www.uk-essen.de/fileadmin/tumorforschung/AG\\_Bauer/Studien/EURAMOS.pdf](https://www.uk-essen.de/fileadmin/tumorforschung/AG_Bauer/Studien/EURAMOS.pdf) (Accessed: 5 December 2024).

EUROpean Ewing tumour Working Initiative of National Groups Ewing Tumour Studies 1999 (2010). Available at: <https://www.birmingham.ac.uk/Documents/college-mds/trials/crcu/archive/ee99/EE99-protocol-V3.0a-14-Sep-2010.pdf> (Accessed: 5 November 2024).

Evdokimova, V. *et al.*, (2022) ‘Current State of Immunotherapy and Mechanisms of Immune Evasion in Ewing Sarcoma and Osteosarcoma’, *Cancers*, 15(1), 272.

van Ewijk, R. *et al.* (2021) ‘European guideline for imaging in paediatric and adolescent rhabdomyosarcoma - joint statement by the European Paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group, the Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe and the Oncology Task Force of the European Society of Paediatric Radiology’, *Pediatric radiology*, 51(10), pp. 1940–1951.

Ewing J. (1921) ‘Diffuse endothelioma of bone. (1921) *Proc N Y Pathol Soc*; 21: pp.17-24.

Federico, S.M. *et al.* (2013) ‘Comparison of PET-CT and conventional imaging in staging pediatric rhabdomyosarcoma’, *Pediatric blood & cancer*, 60(7), pp. 1128–1134.

Ferrari, A. *et al.* (2012) ‘Salvage rates and prognostic factors after relapse in children and adolescents with initially localised synovial sarcoma’, *European journal of cancer*, 48(18), pp. 3448–3455.

Ferrari, A. *et al.* (2015) ‘Synovial sarcoma in children and adolescents: the European Pediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group prospective trial (EpSSG NRSTS 2005)’, *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 26(3), pp. 567–572.

Ferrari, A. *et al.* (2017) ‘Surgery alone is sufficient therapy for children and adolescents with low-risk synovial sarcoma: A joint analysis from the European paediatric soft tissue sarcoma Study Group and the Children’s Oncology Group’, *European journal of cancer*, 78, pp. 1–6.

Ferrari, A. *et al.* (2021) ‘Paediatric non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas: the prospective NRSTS 2005 study by the European Pediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group (EpSSG)’, *The Lancet Child & Adolescent Health*, 5(8), pp. 546–558.

Ferrari, A. *et al.* (2022) ‘Pediatric Non-Rhabdomyosarcoma Soft Tissue Sarcomas:



Standard of Care and Treatment Recommendations from the European Paediatric Soft Tissue Sarcoma Study Group (EpSSG)', *Cancer management and research*, 14, pp. 2885–2902.

Fiore, M. et al. (2021) 'The Biology of Synovial Sarcoma: State-of-the-Art and Future Perspectives', *Current treatment options in oncology*, 22(12), p. 109.

Forrest, S. et al., (2018), ' Precision medicine in pediatric oncology. *Current Opinion in Pediatrics*', 30(1):p 17-24.

Galili, N. et al. (1993) 'Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma', *Nature genetics*, 5(3), pp. 230–235.

Gaspar, N. et al. (2015) 'Ewing Sarcoma: Current Management and Future Approaches Through Collaboration', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(27), pp. 3036–3046.

Gerth, H.U. et al. (2007) 'Significant benefit of multimodal imaging: PET/CT compared with PET alone in staging and follow-up of patients with Ewing tumors', *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 48(12), pp. 1932–1939.

Gröbner, S.N. et al. (2018) 'The landscape of genomic alterations across childhood cancers', *Nature*, 555(7696), pp. 321–327.

Grünewald, T. G., et al. (2015). 'Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite'. *Nature genetics*, 47(9), pp. 1073–1078.

Grünewald, T.G.P. et al. (2018) 'Ewing sarcoma', *Nature reviews. Disease primers*, 4(1), p. 5.

Grunewald TG, Greulich N, Kontny U, Frühwald M, Rutkowski S, Kordes U, Scheurlen W, Schmidt W, Stachel D, Metzler M, Mittler U, Graf N, Benesch M, Burdach S. Targeted therapeutics in treatment of children and young adults with solid tumors: an expert survey and review of the literature. *Klin Padiatr.* 2012 Apr;224(3):124-31. doi: 10.1055/s-0032-1301930. Epub 2012 Apr 20. PMID: 22522984.

Gryder, B.E. et al. (2017) 'PAX3-FOXO1 Establishes Myogenic Super Enhancers and Confers BET Bromodomain Vulnerability', *Cancer discovery*, 7(8), pp. 884–899.

Gurney, J.G., Young, J.L. and Roffers, S.D. (1999) 'Soft tissue sarcomas in cancer incidence and survival among children and adolescents', in L AG Ries, MA Smith, JG Gurney: *Cancer incidence and survival among children and adolescents: US SEER program 1975--1995*. National Cancer Institute, p. 99.

Harttrampf A.C. et al., (2017) 'Molecular Screening for Cancer Treatment Optimization (MOSCATO-01) in Pediatric Patients: A Single-Institutional Prospective Molecular

- Stratification Trial', *Clin Cancer Res.*, 23(20), pp. 6101-6112.
- Hanahan, D. (2022) 'Hallmarks of Cancer: New Dimensions', *Cancer discovery*, 12(1), pp. 31–46.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) 'The Hallmarks of Cancer', *Cell*, 100(1), pp. 57–70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011) 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144(5), pp. 646–674.
- Hawkins, D.S. et al. (2013) 'Children's Oncology Group's 2013 blueprint for research: Soft tissue sarcomas', *Pediatric blood & cancer*, 60(6), pp. 1001–1008.
- Hettmer S, Wagers AJ. (2010) , Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma', *Nat Med.* 16(2):171-173.
- Hinterwimmer F, et al.(2024)' Recommender-based bone tumour classification with radiographs-a link to the past', *Eur Radiol*, 34(10):6629-6638.
- Horowitz, M.E., Tsokos, M.G. and DeLaney, T.F. (1992) 'Ewing's sarcoma', *CA: a cancer journal for clinicians*, 42(5), pp. 300–320.
- Ilaslan, H. et al. (2010) 'Clinical presentation and imaging of bone and soft-tissue sarcomas', *Cleveland Clinic journal of medicine*, 77 Suppl 1, pp. S2–7.
- Irizarry, R.A. et al. (2003) 'Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data', *Biostatistics* , 4(2), pp. 249–264.
- Isakoff, M.S. et al. (2015) 'Osteosarcoma: Current Treatment and a Collaborative Pathway to Success', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(27), pp. 3029–3035.
- Jawad, M.U. et al. (2009) 'Ewing sarcoma demonstrates racial disparities in incidence-related and sex-related differences in outcome: an analysis of 1631 cases from the SEER database, 1973-2005', *Cancer*, 115(15), pp. 3526–3536.
- Jawad, N. and McHugh, K. (2019) 'The clinical and radiologic features of paediatric rhabdomyosarcoma', *Pediatric radiology*, 49(11), pp. 1516–1523.
- Jiang, N. et al. (2008) 'Methods for evaluating gene expression from Affymetrix microarray datasets', *BMC bioinformatics*, 9, p. 284.
- Jo, V.Y. and Doyle, L.A. (2016) 'Refinements in Sarcoma Classification in the Current 2013 World Health Organization Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone', *Surgical oncology clinics of North America*, 25(4), pp. 621–643.
- Johnson GL et al. (2014) 'Molecular pathways: adaptive kinome reprogramming in

response to targeted inhibition of the BRAF-MEK-ERK pathway in cancer', *Clin Cancer Res*, 20:2516-22.

Juergens, C. et al. (2006) 'Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial', *Pediatric blood & cancer*, 47(1), pp. 22–29.

Kaatsch P. *et al.* (2016) 'Pediatric bone tumors in Germany from 1987 to 2011: incidence rates, time trends and survival', *Acta Oncol.* 55(9-10):1145-1151.

Kanehisa, M. and Goto, S. (2000) 'KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes', *Nucleic acids research*, 28(1), pp. 27–30.

Kaste, S.C. (2011) 'Imaging pediatric bone sarcomas', *Radiologic clinics of North America*, 49(4), pp. 749–65, vi–vii.

Kaye F. J. (2009) 'Mutation-associated fusion cancer genes in solid tumors', *Molecular cancer therapeutics*, 8(6), pp. 1399–1408.

Kerouanton, A. et al. (2014) 'Synovial sarcoma in children and adolescents', *Journal of pediatric hematology/oncology*, 36(4), pp. 257–262.

Koscielniak, E., Morgan, M. and Treuner, J. (2002) 'Soft tissue sarcoma in children: prognosis and management', *Paediatric drugs*, 4(1), pp. 21–28.

Kovac, M. et al. (2015) 'Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency', *Nature communications*, 6, p. 8940.

Knezevich SR, *et al.* (1998) 'A novel ETV6-NTRK3 gene fusion in congenital fibrosarcoma', *Nat Genet.* 1998;18(2), pp.184-187.

Kransdorf, M.J. et al. (1989) 'Soft-tissue masses: diagnosis using MR imaging', *AJR. American journal of roentgenology*, 153(3), pp. 541–547.

Kundu, Z.S. (2014) 'Classification, imaging, biopsy and staging of osteosarcoma', *Indian journal of orthopaedics*, 48(3), pp. 238–246.

Ladenstein, R. et al. (1993) 'Synovial sarcoma of childhood and adolescence. Report of the German CWS-81 study', *Cancer*, 71(11), pp. 3647–3655.

Ladenstein, R. et al. (2010) 'Primary disseminated multifocal Ewing sarcoma: results of the Euro-EWING 99 trial', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(20), pp. 3284–3291.

Lagarde, P. et al. (2013) 'Chromosome instability accounts for reverse metastatic outcomes of pediatric and adult synovial sarcomas', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(5), pp. 608–615.

- Laitinen, M. et al. (2015) 'The prognostic and therapeutic factors which influence the oncological outcome of parosteal osteosarcoma', *The bone & joint journal*, 97-B(12), pp. 1698–1703.
- Lansky, S.B. et al. (1987) 'The measurement of performance in childhood cancer patients', *Cancer*, 60(7), pp. 1651–1656.
- Lawrence, M.S. et al. (2013) 'Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes', *Nature*, 499(7457), pp. 214–218.
- Le Deley, M.-C. et al. (2014) 'Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 trial', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 32(23), pp. 2440–2448.
- Lipinski, M. et al. (1987) 'Neuroectoderm-associated antigens on Ewing's sarcoma cell lines', *Cancer research*, 47(1), pp. 183–187.
- Liu, G. et al. (2003) 'NetAffx: Affymetrix probesets and annotations', *Nucleic acids research*, 31(1), pp. 82–86.
- Liu, Z. et al. (2023) 'Radiogenomics: a key component of precision cancer medicine', *Br J Cancer* 129, 741–753.
- Mahajan, A. et al., (2024) 'Deep-Learning-Based Predictive Imaging Biomarker Model for EGFR Mutation Status in Non-Small Cell Lung Cancer from CT Imaging', *Cancers*, 16(6), 1130.
- Marshall, A.D. and Grosveld, G.C. (2012) 'Alveolar rhabdomyosarcoma - The molecular drivers of PAX3/7-FOXO1-induced tumorigenesis', *Skeletal muscle*, 2(1), p. 25.
- Martinelli, S. et al. (2009) 'RAS signaling dysregulation in human embryonal Rhabdomyosarcoma', *Genes, chromosomes & cancer*, 48(11), pp. 975–982.
- Meyboom, R.H.B. and Royer, R.J. (1992) 'Causality classification at pharmacovigilance centres in the european community', *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 1(2), pp. 87–97.
- Miller I.V. et al., (2013) 'First identification of Ewing's sarcoma-derived extracellular vesicles and exploration of their biological and potential diagnostic implications', *Biol Cell*, 105(7):289-303.
- Mirabello, L., Troisi, R.J. and Savage, S.A. (2009) 'Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program', *Cancer*, 115(7), pp. 1531–1543.
- Miya, F. (2012) Sample GSM463922, GEO. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM463922> (Accessed: 21 May

2024).

Mootha, V.K. et al. (2003) 'PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes', *Nature genetics*, 34(3), pp. 267–273.

Nik-Zainal, S. et al. (2012) 'Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers', *Cell*, 149(5), pp. 979–993.

Okamoto, S. et al. (2000) 'Synovial sarcomas of three children in the first decade: clinicopathological and molecular findings', *Pathology international*, 50(10), pp. 818–823.

Okcu, M.F. et al. (2003) 'Synovial sarcoma of childhood and adolescence: a multicenter, multivariate analysis of outcome', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(8), pp. 1602–1611.

Orbach, D. et al. (2010) 'Infantile fibrosarcoma: management based on the European experience', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(2), pp. 318–323.

Orbach, D. et al. (2011) 'Sparing strategy does not compromise prognosis in pediatric localized synovial sarcoma: experience of the International Society of Pediatric Oncology, Malignant Mesenchymal Tumors (SIOP-MMT) Working Group', *Pediatric blood & cancer*, 57(7), pp. 1130–1136.

Pachva, M. C. et al. (2021) 'Extracellular Vesicles in Reprogramming of the Ewing Sarcoma Tumor Microenvironment', *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 726205.

Pastore, G. et al. (2006) 'Childhood soft tissue sarcomas incidence and survival in European children (1978–1997): Report from the Automated Childhood Cancer Information System project', *European journal of cancer*, 42(13), pp. 2136–2149.

PDQ Cancer Information Summaries [Internet] (2024) NIH. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65923/> (Accessed: 5 December 2024).

Perez, E.A. et al. (2011) 'Rhabdomyosarcoma in children: a SEER population based study', *The Journal of surgical research*, 170(2), pp. e243–51.

Perry, J.A. et al. (2014) 'Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(51), pp. E5564–73.

Pierron G. et al. (2012) 'A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion', *Nat Genet.* 44(4):461-466.

Prater, S. and McKeon, B. (2023) *Osteosarcoma*. StatPearls Publishing.

Qiu, Y.L. et al. (2020) 'A meta-learning approach for genomic survival analysis', *Nature communications*, 11(1), p. 6350.

Richter, G.H.S. (2016) Sample GSM1108343, GEO. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSM1108343> (Accessed: 21 May 2024).

Riggi, N. et al. (2014) 'EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma', *Cancer cell*, 26(5), pp. 668–681.

Ross, K.A. et al. (2013) 'The biology of ewing sarcoma', *ISRN oncology*, 2013, p. 759725.

Rudzinski, E.R. et al. (2014) 'Myogenin, AP2 $\beta$ , NOS-1, and HMGA2 are surrogate markers of fusion status in rhabdomyosarcoma: a report from the soft tissue sarcoma committee of the children's oncology group', *The American journal of surgical pathology*, 38(5), pp. 654–659.

Rudzinski, E.R. et al. (2015) 'The World Health Organization Classification of Skeletal Muscle Tumors in Pediatric Rhabdomyosarcoma: A Report From the Children's Oncology Group', *Archives of pathology & laboratory medicine*, 139(10), pp. 1281–1287.

Ruzanov, P. et al. (2024) 'Oncogenic ETS Fusions Promote DNA Damage and Proinflammatory Responses via Pericentromeric RNAs in Extracellular Vesicles'. *Journal of Clinical Investigation*, 134(9), e169470.

Sankar, S. and Lessnick, S.L. (2011) 'Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma', *Cancer genetics*, 204(7), pp. 351–365.

San Segundo-Val, I. and Sanz-Lozano, C.S. (2016) 'Introduction to the Gene Expression Analysis', in M. Isidoro García (ed.) *Molecular Genetics of Asthma*. New York, NY: Springer New York (Methods in Molecular Biology), pp. 29–43.

Schick, S. et al. (2019) 'Systematic characterization of BAF mutations provides insights into intracomplex synthetic lethality in human cancers', *Nature genetics*, 51(9), pp. 1399–1410.

Schmidt D, Harms D, Burdach S (1985). 'Malignant peripheral neuroectodermal tumours of childhood and adolescence'. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 406: pp. 351–365.

Schütte, M. et al. (2017) 'Cancer Precision Medicine: Why More Is More and DNA Is Not Enough', *Public health genomics*, 20(2), pp. 70–80.

Seki, M. et al. (2015) 'Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma', *Nature communications*, 6, p. 7557.

Skapek, S.X. et al. (2019) 'Rhabdomyosarcoma', *Nature reviews. Disease primers*, 5(1), p. 1.

Smith, M.A. et al. (2010) 'Outcomes for children and adolescents with cancer: challenges for the twenty-first century', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(15), pp. 2625–2634.

Sparber-Sauer, M. et al. (2020) 'The impact of local control in the treatment of children with advanced infantile and adult-type fibrosarcoma: Experience of the cooperative weichteilsarkom studiengruppe (CWS)', *Journal of pediatric surgery*, 55(9), pp. 1740–1747.

Sparber-Sauer, M et al. (2024) 'Radiotherapy and long-term sequelae in pediatric patients with parameningeal rhabdomyosarcoma: Results of two Cooperative Weichteilsarkom Studiengruppe (CWS) trials and one registry'. *Pediatric Blood Cancer*, 71(1), e30742.

Staeger, M.S., et al. (2004) 'DNA Microarrays Reveal Relationship of Ewing Family Tumors to Both Endothelial and Fetal Neural Crest-Derived Cells and Define Novel Targets'. *Cancer Research* 64, pp. 8213–8221.

Stiller, C.A. et al. (2006) 'Bone tumours in European children and adolescents, 1978-1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project', *European journal of cancer*, 42(13), pp. 2124–2135.

Subramanian, A. et al. (2005) 'Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), pp. 15545–15550.

Sultan, I. et al. (2009) 'Comparing children and adults with synovial sarcoma in the Surveillance, Epidemiology, and End Results program, 1983 to 2005: an analysis of 1268 patients', *Cancer*, 115(15), pp. 3537–3547.

Tannock IF, Hickman JA. (2016) 'Limits to Personalized Cancer Medicine'. *N Engl J Med*, 375(13):1289-1294.

Taylor, B.S. et al. (2011) 'Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets', *Nature reviews. Cancer*, 11(8), pp. 541–557.

Taylor, J.G., 6th et al. (2009) 'Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models', *The Journal of clinical investigation*, 119(11), pp. 3395–3407.

The Human Protein Atlas (no date). Available at: <http://www.proteinatlas.org> (Accessed: 10 February 2021).

The Uppsala Monitoring Centre. 'The use of the WHO-UMC system for standardised case causality assessment'. Available at:

<https://www.who.int/docs/default-source/medicines/pharmacovigilance/whocausality-assessment.pdf> (Accessed: 24 December 2020).

Toomey, E.C., Schiffman, J.D. and Lessnick, S.L. (2010) 'Recent advances in the molecular pathogenesis of Ewing's sarcoma', *Oncogene*, 29(32), pp. 4504–4516.

Topper, M.J. et al. (2019) 'The emerging role of epigenetic therapeutics in immuno-oncology', *Nature reviews. Clinical oncology* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0266-5>.

Torchia, E.C., Jaishankar, S. and Baker, S.J. (2003) 'Ewing tumor fusion proteins block the differentiation of pluripotent marrow stromal cells', *Cancer research*, 63(13), pp. 3464–3468.

Uhlén, M. et al. (2015) 'Proteomics. Tissue-based map of the human proteome', *Science*, 347(6220), p. 1260419.

Uhlen, M. et al. (2017) 'A pathology atlas of the human cancer transcriptome', *Science*, 357(6352). Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aan2507>.

U.S.Department Of Health And Human Services.(2010) Available at: [https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE\\_4.03/CTCAE\\_4.03\\_2010-06-14\\_QuickReference\\_8.5x11.pdf](https://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/CTCAE_4.03/CTCAE_4.03_2010-06-14_QuickReference_8.5x11.pdf) (Accessed: 14 June 2024).

van Tilburg, C. M., et al. (2021) 'The Pediatric Precision Oncology INFORM Registry: Clinical Outcome and Benefit for Patients with Very High-Evidence Targets', *Cancer discovery*, 11(11), pp.2764–2779.

357(6352). Available at: <https://doi.org/10.1126/science.aan2507>.

Venkatramani, R. et al. (2021) 'Synovial Sarcoma in Children, Adolescents, and Young Adults: A Report From the Children's Oncology Group ARST0332 Study', *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 39(35), pp. 3927–3937.

Verdecchia, A. et al. (2007) 'Recent cancer survival in Europe: a 2000-02 period analysis of EURO CARE-4 data', *The lancet oncology*, 8(9), pp. 784–796.

Verger, E., Salamero, M. and Conill, C. (1992) 'Can Karnofsky performance status be transformed to the Eastern Cooperative Oncology Group scoring scale and vice versa?', *European journal of cancer*, 28A(8-9), pp. 1328–1330.

Voss, S.D. (2019) 'Functional and anatomical imaging in pediatric oncology: which is best for which tumors', *Pediatric radiology*, 49(11), pp. 1534–1544.

Waarts, M.R. et al. (2022) 'Targeting mutations in cancer', *The Journal of clinical investigation*, 132(8). Available at: <https://doi.org/10.1172/JCI154943>.



Website (no date). Available at: RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>. (Accessed: 24 December 2020).

Weidenbusch, B. et al. (2018) ‘Transcriptome based individualized therapy of refractory pediatric sarcomas: feasibility, tolerability and efficacy’, *Oncotarget*, 9(29), pp. 20747–20760.

Whelan, J.S. et al. (2015) ‘EURAMOS-1, an international randomised study for osteosarcoma: results from pre-randomisation treatment’, *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 26(2), pp. 407–414.

Widhe, B. and Widhe, T. (2000) ‘Initial symptoms and clinical features in osteosarcoma and Ewing sarcoma’, *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 82(5), pp. 667–674.

Wishart, D.S. et al. (2006) ‘DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration’, *Nucleic acids research*, 34(Database issue), pp. D668–72.

Worst B.C. *et al.* (2016) ‘Next-generation personalised medicine for high-risk paediatric cancer patients - The INFORM pilot study’. *Eur J Cancer*, 65, pp. 91-101.

Wu, C.-C. et al. (2012) ‘TARGETgene: a tool for identification of potential therapeutic targets in cancer’, *PloS one*, 7(8), p. e43305.

Zhao, D., et al. (2020) ‘Identification of therapeutic targets and mechanisms of tumorigenesis in non-small cell lung cancer using multiple-microarray analysis.’, *Medicine (Baltimore)*, 99(44)

Zhou, M. et al. (2018) ‘Non-Small Cell Lung Cancer Radiogenomics Map Identifies Relationships between Molecular and Imaging Phenotypes with Prognostic Implications’, *Radiology*, 286(1), pp. 307–315.

## Danksagung




Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Lars Lindner, der mir die Durchführung dieser Promotion ermöglicht und formell begleitet hat.

Mein besonderer Dank gilt jedoch Herrn Prof. Dr. Stefan Burdach, der mich während der gesamten Promotionszeit mit großem Engagement betreut hat. Durch seine fachliche Expertise, die kritische Begleitung sowie die konsequente wissenschaftliche Förderung hat er meine Arbeit inhaltlich und methodisch entscheidend geprägt. Die hohen wissenschaftlichen Ansprüche, seine präzisen Rückmeldungen und die stets offenen, anregenden Diskussionen haben mich gefordert, mein Denken geschärft und meine wissenschaftliche Entwicklung wesentlich unterstützt. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die wertvollen Anregungen und seine Zeit danke ich ihm sehr herzlich.

Außerdem danke ich Herrn Constantin Segner für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Arbeit und die hilfreichen Hinweise zur sprachlichen und stilistischen Überarbeitung.

Meinen Eltern danke ich von Herzen für ihre beständige Unterstützung, ihr Vertrauen und ihre Ermutigung – nicht nur während dieser Arbeit, sondern auf meinem gesamten bisherigen Weg.

## Eidesstattliche Versicherung

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät		
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>				

Weidenbusch, Bushra

\_\_\_\_\_  
Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Zielgerichtete individualisierte Therapie für Kinder, Jugendliche und junge Erwachsene mit refraktären pädiatrischen Sarkomen

.....

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Berchtesgaden, 28.05.25

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum

Bushra Weidenbusch

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Doktorandin

## Publikationsliste

- |          |  |
|----------|--|
| 2018     | Transcriptome Based Individualized Therapy of Refractory Pediatric Sarcomas: Feasibility, Tolerability and Efficacy<br>Weidenbusch B et al. Oncotarget. 2018 Apr 17;9(29):20747-20760. doi: 10.18632/oncotarget.25087. eCollection 2018 Apr 17.  |
| 06/ 2016 | 2016 ASCO Annual Meeting Proceedings<br>Immunologic signatures of osteosarcoma: implications for prognosis and therapy   |
| 02/2016  | 32. German Cancer Congress DKK 2016, Berlin, Germany<br>Transcriptome based individualized therapy of refractory pediatric bone and soft tissue sarcomas: feasibility, tolerability and efficacy –poster presentation–   |
| 10/ 2015 | SIOP 47 <sup>th</sup> Congress of the International Society of pediatric oncology, Cape Town, South Africa<br>Transcriptome based individualized therapy of refractory pediatric sarcoma –oral presentation–   |
| 07/2015  | 2 <sup>nd</sup> MUNICH CANCER RETREAT, German Cancer Consortium Partner Site München, Herrsching am Ammersee<br>Identification of Molecular Targets for Personalized Therapy of Refractory Pediatric Bone and Soft Tissue Sarcomas<br>-poster presentation-                            |
| 06/ 2015 | ASCO Annual Meeting 2015, Chicago, USA<br>Transcriptome based individualized therapy of refractory cancer in adolescents and young adults (AYAs) –poster presentation–   |
| 03/2015  | Personalized Cancer Medicine & Big Data Analysis, 7 <sup>th</sup> International Conference Of Contemporary Oncology, Poznan, Poland<br>Gene expression profiling and <i>in silico</i> target prediction for personalized therapy of refractory pediatric cancer<br>–oral presentation– |