hen. Als solche könnten sogenannte Neo-Antigene genutzt werden, die bei rekurrenden somatischen Mutationen im protein-codierenden Erbgut entstehen (3). Jedoch weisen vor allem pädiatrische Tumoren – und insbesondere pädiatrische Sarkome wie das Ewing-Sarkom – kaum rekurrende Mutationen auf, weshalb sie zur Gruppe der oligo-mutierten Tumoren gehören (4–6). Umso vielversprechender sind hier Antigene, die von sogenannten Krebs-spezifischen Genen (KSGs) codiert werden. KSGs sind im Tumor überexprimiert, werden jedoch in Normalgeweben kaum bzw. nicht exprimiert. Peptide aus Proteinen, die durch Transkription dieser KSGs entstehen, könnten immunogenes Potenzial haben und eine gezielte Immuntherapie ermöglichen (7).

Um ausgehend von öffentlich zugänglichen Genexpressionsdaten eine automatisierte und schnelle Identifizierung von KSG-codierten Peptiden mit hoher Affinität zu Major Histocompatibility Complexes (MHC) zu ermöglichen, entwickelten wir einen Algorithmus und implementierten diesen in eine benutzerfreundliche Software (RAVEN, Rich Analysis of Variable gene Expressions in Numerous tissues) (7).

Mithilfe von RAVEN analysierten wir einen Genexpressionsdatensatz, der 2678 simultan normalisierte Genexpressions-Microarrays für 50 Tumorarten mit einem Fokus auf Sarkomen und oligo-mutierten pädiatrischen Tumoren sowie 71 Normalgewebetypen umfasste (7).

Es wurde ein Transkriptom-weiter Suchvorgang in jeder einzelnen Tumorentität nach geschlechtsspezifischen KSGs durchgeführt, durch den bereits etablierte tumorassoziierte Antigene wie LIPI im Ewing-Sarkom oder PRAME im Neuroblastom identifiziert wurden (8, 9). Jedoch wurden auch viele neue Kandidaten, von denen einige als Zielstruktur für mehrere Tumorentitäten geeignet zu sein scheinen, identifiziert (7).

Die spezifische Expression mehrerer KSGs wurde anschließend durch qRT-PCR in Tumor-Zelllinien und für das KSG PAX7 auch mithilfe von Immunhistochemie in Tissue Microarrays mit 289 Gewebeprobe aus 16 Tumorentitäten und 120 Gewebeprobe aus 41 Normalgewebetypen validiert (7).

Anschließend identifizierte RAVEN KSG-codierte Peptide, die eine hohe Affinität zu MHC-I-Molekülen zeigen. Dazu nutzten wir machine-learning Algorithmen zur Vorhersage der Peptid-MHC-Bindungsstärke zu HLA-A02:01. Die als hochaffin vorhergesagten Peptide wurden dann mit Protein-Datenbanken abgeglichen, um eine Sequenz-Gleichheit mit anderen eventuell übermäßig exprimierten Proteinen auszuschließen. Die Affinität der identifizierten KSG-Peptide wurde in einem T2-Zellen-Peptid-Bindungs-Assay validiert, in dem einige Peptide eine ähnliche Kinetik wie ein hoch-immunogenes Influenza-Peptid aufwiesen (7).

Zusammenfassend erstellten wir einen umfangreichen, kuratierten und validierten Katalog an krebs-spezifischen und hochgradig MHC-affinen Peptiden für 50 Tumorarten mit einem besonderen Schwerpunkt für Sarkome. Darüber hinaus entwickelten wir eine benutzerfreundliche und frei verfügbare Software, wodurch unser Algorithmus einfach und schnell auf neue Expressionsdatensätze angewandt werden kann (<https://github.com/JSGerke/RAVENsoftware>) (7). Unsere Daten und unsere Software stellen eine wertvolle Ressource für die Weiterentwicklung von Immuntherapien dar und könnten damit langfristig zur Verbesserung der Patientenversorgung beitragen.

M. C. Baldauf^{1,*}; J. S. Gerke^{1,*}; T. G. P. Grünewald^{1,2,3,*}

¹Max-Eder Nachwuchsgruppe für Pädiatrische Sarkombiologie, Pathologisches Institut, Medizinische Fakultät, LMU München; ²Deutsches Konsortium für Translationale Krebsforschung (DKTK), partner site München; ³Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg

*gleicher Beitrag

[§]Korrespondenzadresse:

Dr. med. Thomas Grünewald, Ph.D.
Max-Eder Nachwuchsgruppe für Pädiatrische Sarkombiologie, Pathologisches Institut, Medizinische Fakultät, LMU München
Thalkirchner Str. 36, 80337 München
Tel.: 089/2180-73716, Fax: 089/2180-73604

E-Mail:
thomas.gruenewald@med.uni-muenchen.de

Literatur

1. Coulie PG et al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 135–146.
2. Mellman I et al. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 2011; 480: 480–489.
3. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015; 348: 69–74.
4. Lawrence MS et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 2013; 499: 214–218.
5. Pugh TJ et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma. *Nat Genet* 2013; 45: 279–284.
6. Tirode F et al. Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov* 2014; 4: 1342–1353.
7. Baldauf MC et al. Systematic identification of cancer-specific MHC-binding peptides with RAVEN. *bioRxiv* 193276 (2017). doi:10.1101/193276
8. Oberthuer A et al. The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 4307–4313.
9. Foell JL et al. Membrane-associated phospholipase A1 beta (LIPI) Is an Ewing tumour-associated cancer/testis antigen. *Pediatr Blood Cancer* 2008; 51: 228–234.

Ewing-ähnliche Tumoren – Update der Klassifikation rundzelliger Sarkome

Sarkome der Ewing/PNET-Familie sind eine aggressive Gruppe von Tumoren, die im Knochen und Weichgewebe zumeist bei Kindern und jungen Erwachsenen auftreten. In den letzten Jahren wurden neben klassischen Ewing/PNET-Tumoren rundzellige Sarkome identifiziert, die bei ähnlicher Morphologie und immunhistochemischem Profil aus praktischen und therapeutischen Erwägungen als „Ewing Sarkom-artig“ eingestuft wurden. Im Gegensatz zu klassischen Ewing-Sarkomen besitzen rundzellige Ewing-ähnliche Tumoren jedoch nicht die pathognomonische Fusion zwischen einem Gen der RNA-bindenden TET Familie (EWSR1 oder FUS) mit einem Gen der ETS- Transkriptionsfaktor Familie (FLI1, ERG, ETV1, ETV4 oder FEV). Vielmehr wurden bei einem Teil der Ewing-ähnlichen Tumoren u.a. EWSR1-Fusionen mit non-ETS Genen (NFATC2, POU5F1, SMARCA5, PATZ, ZSG, SP3) nachgewiesen.

Weiterhin konnte in EWSR1-negativen rundzelligen Sarkomen als häufigste Translokation eine CIC-DUX4 Genfusion nachgewiesen werden. Das Fusionsprotein dieser Translokation beinhaltet den Transkripti-

ons-Repressor CIC und den Transkriptionsfaktor DUX4, dessen Gene auf den Chromosomen 4 und 10 lokalisiert sind (1). Signifikante Unterschiede im klinischen Verlauf, der Morphologie, dem Immunphänotyp sowie der Genexpression von CIC-DUX4-positiven Tumoren im Vergleich zu Tumoren der Ewing/PNET-Gruppe deuten allerdings darauf hin, dass es sich bei den CIC-DUX4-positiven Tumoren eher um eine eigene Tumorentität als eine Variante des Ewing-Sarkoms handelt (2). Auch weisen Tumoren mit CIC-DUX4-Fusion schlechtere 5-Jahresüberlebensraten als Ewing-Sarkome mit klassischen Translokationen auf (3). Die WHO stuft CIC-DUX4-positive Tumoren bis zum Vorliegen weiterer Erkenntnisse gegenwärtig temporär unter den rundzelligen undifferenzierten Sarkomen ein.

Ebenfalls zu den „Ewing-ähnlichen“ Sarkomen gehören Tumoren mit einer kürzlich charakterisierten BCOR-CCNB3 Fusion, die durch eine Inversion im X-Chromosom entsteht. Verglichen mit Tumoren mit CIC-DUX4-Fusion ist die Gruppe von Tumoren wohl seltener und nur in 4% aller rundzelligen Sarkome ohne EWSR1-ETS-Translokation nachweisbar (4).

Mit Hilfe molekularer Methoden, insbesondere der NGS-Technologie gelang es darüber hinaus, weitere neue molekulare Aberrationen in bisher nicht klassifizierbaren rundzelligen Sarkomen zu identifizieren, darunter CIC-FOXO4, sowie BCOR-MAML3 und ZC3H7B-BCOR Genfusionen (5) und BCOR-Internal Tandem Duplikationen. Parallel zu diesen molekularen Erkenntnissen wurde eine Vielzahl neuer immunhistochemischer Marker, wie BCOR, ETV4 und DUX4 zur Charakterisierung und differenzialdiagnostischen Abgrenzung der aufgeführten rundzelligen Sarkome gegenüber klassischen Ewing-Sarkomen veröffentlicht.

Ob die neu charakterisierten rundzelligen Sarkome nach molekularen Kriterien insgesamt doch noch als Ewing-artige Tumoren oder als jeweils separate Entitäten eingeordnet werden können, ist Gegenstand aktueller Diskussionen und bedarf weiterer Einordnung und Evaluation.

K. Specht, Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie, Technische Universität München

Literatur

1. Kawamura-Saito M et al. Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 2125–2137.
2. Specht K et al. Distinct transcriptional signature and immunoprofile of CIC-DUX4 fusion-positive round cell tumors compared to EWSR1-rearranged Ewing sarcomas: further evidence toward distinct pathologic entities. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; 53: 622–633.
3. Antonescu C et al. Sarcomas With CIC-rearrangements are a Distinct Pathologic Entity With Aggressive Outcome. *Am J Surg Pathol* 2017.
4. Pierron G, Tirode F, Lucchesi C et al. A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. *Nat Genet* 2012; 44: 461–466.
5. Specht K, Zhang L, Sung YS et al. Novel BCOR-MAML3 and ZC3H7B-BCOR Gene Fusions in Undifferentiated Small Blue Round Cell Sarcomas. *Am J Surg Pathol* 2016; 40: 433–442.

Identifikation von therapeutisch nutzbaren molekularen Veränderungen beim Osteosarkom im Rahmen von INFORM (Individualized Therapy FOR Relapsed Malignancies in Childhood), einer Studie für pädiatrische Hoch-Risiko-Krebs-Patienten

Kinder und Jugendliche mit Krebserkrankungen haben mit aktuellen multimodalen Therapiekonzepten eine Heilungswahrscheinlichkeit von über 80%. Anders sieht die Situation im Rezidiv oder bei refraktärer Erkrankung aus, hier ist die Wahrscheinlichkeit, von der Tumorerkrankung geheilt zu werden, deutlich schlechter und liegt für viele Entitäten, so auch für das Osteosarkom, unter 20%.

Um neue Therapiestrategien für pädiatrische Patienten mit einer rezidierten oder refraktären Krebserkrankung entwickeln zu können, wurde deutschlandweit die INFORM (Individualized Therapy FOR Relapsed Malignancies in Childhood)-Studie initiiert. Das Ziel dieser Studie war es, eine Plattform zu etablieren, die zeitnah und so der klinischen Situation angemessen ein umfassendes molekulares Profil dieser Tumoren erstellt, um so mögliche therapeutische Zielstrukturen zu identifizieren.

Im Rahmen von INFORM wurden im Zeitraum von 01/2015 bis 04/2017 328 Tumoren von 310 Patienten registriert. Von

den 303 Fällen, die den Einschlusskriterien entsprachen, konnten 270 Tumoren analysiert werden. 40% der Proben waren Sarkome, 30% Hintumoren, 12% Neuroblastome, 9% maligne hämatologische Erkrankungen und 9% andere Tumoren. Es wurden Gesamt-Exom-, low coverage Gesamt-Genom- und RNA-Sequenzierungen sowie Methylierungs- und Expressionsmikroarray-Analysen durchgeführt. Die molekularen Veränderungen wurden entsprechend eines hierfür erstellten Algorithmus als mögliche therapeutische Zielstrukturen mittels eines Scores priorisiert und anschließend in einem interdisziplinären molekularen Tumorboard diskutiert. Die Zeit vom Probeneingang bis zur Erstellung des Ergebnisberichts betrug im Durchschnitt 28 Tage. Bei einem Großteil der Patienten (87%) wurden Zielstrukturen identifiziert, bei knapp der Hälfte (46%) wurden die molekularen Veränderungen mit Hilfe eines 7-stufigen Scores als potenziell therapie-relevant (Score 1 [sehr hoch] bis 3 [moderat]) eingestuft. Zudem wurden im Rahmen der Analyse bei 7% der Patienten relevante tumorprädisponierende Keimbahnmutationen identifiziert, hierunter auch die vor allem bei Osteosarkompatienten nachweisbaren Keimbahnmutationen in TP53.

Im Rahmen der Studie waren von den 34 registrierten Fällen zum Zeitpunkt der Auswertung 28 Osteosarkome von 22 Patienten analysiert, darunter auch mehrfach verschiedene Tumorproben des selben Patienten zu verschiedenen Rezidivzeitpunkten. Als potenzielle Zielstrukturen wurden hierbei Rezeptor-Tyrosinkinasen sowie molekulare Veränderungen im VEGF- und im PI3K-Akt-Signalweg gefunden (► Abb. 1). Die von unserer Arbeitsgruppe erstmals beschriebene, potenziell therapeutisch nutzbare BRCAness, also die molekulare Signatur, die auf eine Defizienz in der homologen Reparatur in Analogie zu Tumoren mit BRCA1/2-Mutationen hinweist, wurde in 62% (13/21 OS) gefunden. Bei einzelnen Patienten lagen mehrere Tumoren zu verschiedenen Rezidivzeitpunkten vor. Hierbei war nur ein kleiner Teil der molekularen Veränderungen zu allen Zeitpunkten nachweisbar. Auch die BRCAness unterliegt einer Tumorevolution: Bei einzelnen Tumoren ist sie erst im Rezidiv

Abb. 1 Rezeptor-Tyrosinkinasen sowie molekulare Veränderungen im VEGF- und im PI3K-Akt-Signalweg

nachweisbar, bei anderen verliert sie sich mit Fortschreiten der Erkrankung. So zeigt sich auch beim Osteosarkom, dass Tumorbiomarker im Verlauf der Erkrankung nicht stabil sind, sondern einer Tumorevolution unterliegen. Dies ist bedeutsam für Studien, deren Therapiestrategie auf der Stratifizierung nach Biomarkern beruht. Zusammenfassend ließ sich in INFORM zeigen, dass potenziell therapeutisch nutzbare molekulare Veränderungen in einem Zeitrahmen generiert werden können, der für klinische Therapieentscheidungen nutzbar ist. Inwieweit sich die Hoffnung erfüllt, die derzeit in Studien mit Biomarkern als Stratifizierungsmerkmal gesetzt wird, und diese Studien zu einer höheren Heilungsrate bei Kindern und Jugendlichen mit einer rezidierten oder therapieresistenten

Krebserkrankung führen, werden künftige Projekte zeigen, so auch die Nachfolgestudie INFORM2.

M. Nathrath

Klinische Kooperationsgruppe Osteosarkom, Kinderklinik der TU München und Klinik für Kinderonkologie, Klinikum Kassel) für das INFORM-Team (K. Pajtlar, M. Blattner-Johnson, D. Jones, S. Pfister und O. Witt, DKFZ Heidelberg)

Vorstand

Vorsitzende

Priv.-Doz. Dr. med. Elisabeth Bruder
Universitätsspital/Pathologie
Schönbeinstr. 40, CH-4031 Basel, Schweiz
E-Mail: elisabeth.bruder@usb.ch

Stellvertretender Vorsitzender

Prof. Dr. med. Klaus Wörtler
Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie
Technische Universität München
Ismaninger Straße 22, 81675 München
E-Mail: klaus.woertler@tum.de

Beisitzer

Prof. Dr. med. Jendrik Hardes, MBA
Klinik für allgemeine Orthopädie und Tumororthopädie
Universitätsklinikum Münster
Albert-Schweitzer-Campus 1, 48149 Münster
E-Mail: jendrik.hardes@ukmuenster.de

Geschäftsführer

Prof. Dr. med. Gernot Jundt
Universitätsspital Basel/Pathologie
Knochtumor-Referenzzentrum
Schönbeinstr. 40, CH-4031 Basel, Schweiz
E-Mail: sekretariat@agkt.org

Kassenwart

Prof. Dr. med. Axel Hillmann
Asklepios Klinikum Bad Abbach GmbH
Zentrum für Sarkome und muskuloskelettale Tumoren
Kaiser-Karl V.-Allee 3, 93077 Bad Abbach
E-Mail: a.hillmann@asklepios.com

Mitgliedsbeitrag

Der Mitgliedsbeitrag für ordentliche Mitglieder beträgt Euro 50,- (Deutschland, Österreich, Schweiz) bzw. Euro 20,- (Ungarn und Tschechien).

agkt im Internet

www.agkt.org

Impressum

Verantwortlich für den Inhalt

Prof. Dr. Daniel Baumhoer, Basel
Prof. Dr. Gernot Jundt, Basel