

Pathogenese von Knochentumoren und Weichteilsarkomen

T. Grünewald, G. Richter, P. Sorensen, M. Nathrath, H. Wackerhage

Einführung

Bislang wurden über 100 histologische Subtypen von Knochentumoren und Weichteilsarkomen mit zum Teil ausgeprägten morphologischen Überschneidungen beschrieben [1, 2]. Obwohl die Ätiologie der meisten Sarkome nicht genau bekannt ist, entstehen manche Sarkome häufiger in bestimmten Patientenpopulationen und/oder in Assoziation mit bestimmten genetischen, infektiösen und/oder therapeutischen Faktoren.

So treten einige Sarkome häufiger bei Patienten mit Krebs-Prädispositionssyndromen wie dem Li-Fraumeni-Syndrom auf. Patienten mit autosomal dominanten Mutationen in *TP53* (Li-Fraumeni-Syndrom) haben beispielsweise ein erhöhtes Risiko, Osteosarkome und Rhabdomyosarkome zu entwickeln [3]. Ebenso haben Patienten mit Heterozygotieverlust im Retinoblastom-Gen (*RBI*) ein erhöhtes Risiko für Osteosarkome [4]. Patienten mit Gorlin-Syndrom (Mutationen im *PTCH1*-Gen) und Costello-Syndrom (Mutationen in *HRAS*) sind demgegenüber empfänglicher für Rhabdomyosarkome [5, 6].

Auch virale Infektionen können unter bestimmten Bedingungen Sarkome auslösen bzw. deren Entstehung begünstigen. So entsteht beispielsweise das Kaposi-Sarkom aus Endothelzellen oder deren Vorläuferzellen nach Infektion mit dem humanen Herpesvirus 8 (HHV-8) in Patienten mit schwerer Immundefizienz [7].

Daneben treten Sarkome auch gehäuft als Sekundärmalignome nach vorhergehender genotoxischer Therapie eines Erst malignoms auf. Tatsächlich sind circa 3 % aller Sarkome mit einer Bestrahlungstherapie assoziiert. Die mediane Latenz nach Strahlentherapie liegt dabei bei ungefähr 10 Jahren [8]. Das

häufigste strahlenassoziierte Sarkom ist das undifferenzierte pleomorphe Sarkom. Gehäuft treten auch Angiosarkome, Leiomyosarkome und extraskeletale Osteosarkome auf [9].

Es wird angenommen, dass die meisten Sarkome von primitiven Stammzell-ähnlichen Vorläuferzellen ausgehen, die noch die Fähigkeit besitzen, in verschiedene Gewebe zu differenzieren (Multipotenz). Dies wird insbesondere durch differenzierte Sarkomsubtypen veranschaulicht, die in Geweben ohne Bezug zu ihrer eigenen Differenzierung entstehen (z. B. extraskeletale Osteosarkome und extramuskuläre Rhabdomyosarkome). Weitere Belege hierfür liefern verschiedene Tiermodelle, in denen unterschiedliche Sarkomsubtypen aus multipotenten Vorläuferzellen generiert werden können [10, 11].

Basierend auf den vorliegenden genetischen Alterationen können Sarkome grob in zwei Gruppen eingeteilt werden [12]: Die erste Gruppe umfasst circa zwei Drittel aller Sarkome, die durch einen komplexen Karyotyp, erhebliche Aneuploidie und eher unspezifische chromosomale Veränderungen (rearrangements) sowie durch chromosomale Gewinne und Verluste gekennzeichnet sind [13]. Typische Vertreter dieser Gruppe sind das Osteosarkom, das Myxofibrosarkom, das Leiomyosarkom, das embryonale Rhabdomyosarkom [72] sowie das Chondrosarkom [1, 13–15].

Die zweite Gruppe umfasst circa ein Drittel aller Sarkome, die durch erstaunlich einfache Karyotypen, ein nahezu diploides Genom, sehr wenige somatische Punktmutationen und/oder durch spezifische chromosomale Translokationen charakterisiert sind [13]. Typische Vertreter dieser Gruppe

sind das Synovialsarkom, das alveoläre Rhabdomyosarkom, das myxoide Liposarkom, der gastrointestinalen Stromatumor (GIST) und das Ewing-Sarkom [1, 13–15].

Im Folgenden werden das Osteosarkom als Vertreter der ersten Gruppe sowie das Ewing-Sarkom als Vertreter der zweiten Gruppe exemplarisch ausführlicher dargestellt. Ebenso wird auf das Rhabdomyosarkom eingegangen, dessen Hauptsubtypen je einer Gruppe zugeordnet werden können. Diesen genetisch sehr unterschiedlichen Sarkomen ist gemein, dass sie überwiegend bei Jugendlichen auftreten [16].

Pathogenese des Osteosarkoms

Das Osteosarkom ist ein meist hochaggressives knocheneigenes Sarkom, das von pluripotenten mesenchymalen Vorläuferzellen mit der Fähigkeit, das pathognomonische Tumorosteoid zu bilden, ausgeht. Die Seltenheit des Tumors (Inzidenz 2–3/1000000 pro Jahr) und die große genomische Komplexität wie auch die intra- und intertumorale Heterogenität waren und sind Herausforderungen für die molekulare Charakterisierung des Osteosarkoms.

Genetik

Konventionelle Osteosarkome, die mit etwa 80–90 % die Mehrheit der Osteosarkome darstellen, zeichnen sich zumeist durch eine hohe genomische Instabilität mit komplexem Karyotyp und zahlreichen numerischen und strukturellen Aberrationen aus [17]. Dieses genomische Chaos hat die Identifikationen von krankheitsverursachenden Genen (*driver genes*) insbesondere vor den Zeiten des *next generation sequencing* sehr erschwert.

Die ersten und wichtigsten Hinweise auf Gene mit Bedeutung für die Entstehung des Osteosarkoms kamen daher von Patienten mit familiären Tumorsyndromen durch Keimbahnmutationen in Genen, die auch mit einem erhöhten Risiko einer Osteosarkomentstehung einhergehen, so in *RB1* und in *TP53* [3, 4]. Somatische Mutationen oder andere genetische Alterationen in diesen Genen ließen sich dann auch in der Mehrzahl der Tumoren nachweisen und bestätigten ihre Bedeutung für die Entstehung des Osteosarkoms [18]. Neben den Veränderungen in

RB1 selbst werden auch Veränderungen in Genen beobachtet, die zur funktionellen Inaktivierung des *RB1*-Signalwegs führen, so die Amplifikation von chr12q13-15 (mit Amplifikation von *CDK4*) in 5–10 % der Osteosarkome oder die Deletion der *INK4A*-Region. Auch der *p53*-Signalweg ist betroffen, so durch *MDM2*-Amplifikation und *COP3*-Amplifikation in etwa 10 % der Osteosarkome [19, 20].

Bei anderen Tumorprädispositionssyndromen, so bei Patienten mit Keimbahnmutation in *RECQ*-DNA-Helikasen wie beispielsweise dem Rothmund-Thompson-Syndrom (*RECQL4*) oder dem Werner-Syndrom (*RECQL3*) wird auch eine erhöhte Inzidenz von Osteosarkomen beobachtet [21, 22]. Es ließen sich jedoch nur in einem geringen Prozentsatz der sporadischen Osteosarkome somatische Veränderungen in diesen Genen nachweisen [18].

Mit Hilfe von *next generation sequencing* ließen sich Veränderungen in *TP53* und in *RB1* als die häufigsten rekurrierenden Veränderungen bestätigen. Sie sind hierbei oft assoziiert mit komplexen gesamtgenomischen, für das Osteosarkom typischen Veränderungen wie *Kataegis* (einer lokalisierten Hypermutation einzelner chromosomaler Abschnitte) und *Chromothripsis* (einer massiven strukturellen chromosomalen Veränderung), die auf ein einzelnes katastrophales Ereignis im Genom zurückzuführen sind [23]. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass diesem Chaos doch eine gewisse Ordnung im Sinne einer wiederkehrenden Signatur zugrunde liegt: Etwa 80 % der Osteosarkome weisen Veränderungen auf, die auch bei Krebserkrankungen mit Defekten im homologen Reparatursystem gefunden werden [18]. Diese Signatur ist typisch für Tumoren mit einer sogenannten *BRCA*-ness, was genomischen Veränderungen entspricht, die typischerweise bei Ovarialkarzinomen mit Keimbahnmutationen in den *BRCA1/2*-Genen gefunden werden und durch eine spezifische Kombination von Einzelbasensubstitution, Allelverlust und erheblicher genomischer Instabilität charakterisiert sind [24]. In einer Klonalitätsanalyse bei Osteosarkomen ließ sich zeigen, dass dieser genomischen Instabilität Treibermutationen zugrunde liegen, so in *RB1* und *TP53* in knapp 50 %, aber auch in anderen Genen, die funktionell in der DNA-Reparatur und der Erhaltung genomischer Integrität involviert sind [18].

Signalübertragung

Andere, möglicherweise auch therapeutisch nutzbare Mutationen betreffen den PI3K/mTOR-Signalweg [25] sowie die Neoangiogenese durch den VEGF-Signalweg. Epidemiologische Faktoren, wie das bevorzugte Auftreten dieser Tumoren zum Zeitpunkt des pubertären Wachstumsschubs, lassen zudem einen Einfluss von Wachstumsfaktoren vermuten. Hierbei macht die Redundanz der genetischen Veränderungen – z. B. die Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren wie IGFR, VEGFR, EGFR1, EGFR2 (Her2/neu), EGFR4 (ErbB4) – es schwierig, die Bedeutung der einzelnen Ereignisse insbesondere auch in der zeitlichen Abfolge zu bewerten [26].

Pathogenese des Ewing-Sarkoms

Ewing-Sarkome wurden 1921 erstmalig von dem amerikanischen Pathologen *James Ewing* beschrieben [27]. Ewing-Sarkome sind maligne, meist vom Knochen ausgehende, solide Sarkome. Selten entstehen sie in anderen Weichgeweben wie in Binde-, Fett- oder Muskelgewebe oder in peripheren Nerven [28]. Trotz ihrer relativen Seltenheit (Inzidenz: 1,6/1000000 pro Jahr) sind Ewing-Sarkome nach Osteosarkomen die zweithäufigsten Sarkome des Knochens bei Kindern und jungen Erwachsenen [16]. Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass Ewing-Sarkome häufiger bei Kaukasiern als in anderen Ethnien auftreten [29], was auf einen starken Beitrag der Keimbahngenetik bei der Pathogenese des Ewing-Sarkoms hinweist. Tatsächlich konnten genomweite Assoziationsstudien erste Suszeptibilitäts-Loci im Erbgut identifizieren, die die Entstehung des Ewing-Sarkoms begünstigen [30, 31].

Ursprungszelle

Histologisch gehören Ewing-Sarkome zu den klein-, rund-, blauzelligen Tumoren mit variierender neuroektodermaler Differenzierung. Die genaue Ursprungszelle des Ewing-Sarkoms ist jedoch bislang nicht bekannt. Es werden neben osteo-/chondrogenen Vorläuferzellen [32] auch mesenchymale Stammzellen, die entweder aus dem Mesoderm oder aus dem Neuroektoderm abstammen, diskutiert [33, 34]. Ewing-Sarkome bestehen aus primiti-

ven Zellen mit runden bis ovalen Nuclei mit feinem Chromatin sowie zahlreichen Glykogenaggregaten im Zytoplasma. Die Tumorzellen zeigen ein spärliches, klares oder eosinophiles, PAS-positives Zytoplasma, und verschwommene Plasmamembranen (klassisches Ewing-Sarkom) [35]. In anderen Fällen sind die Tumorzellen größer, haben prominente Nucleoli und irreguläre Konturen (atypische Ewing-Sarkome) [36]. Immunhistologisch zeigen sie in gewissem Umfang Charakteristika einer neuronalen Differenzierung. Klassischen Ewing-Sarkomen fehlt jedoch eine solche Differenzierung. Sie zeigen in den meisten Fällen eine diffuse membranöse CD99-Färbung. Eine solche Färbung wird allerdings auch bei lymphoblastischen Leukämien, Lymphomen, und myeloiden Sarkomen beobachtet. Eine CD99-Färbung kann aber auch ungleichmäßig oder negativ sein und wird auch in sogenannten „Ewing-like“ Sarkomen beobachtet [37, 38].

Genetik

Trotz der unklaren Histogenese sind Ewing-Sarkome genetisch sehr gut charakterisiert: In den meisten Fällen können balancierte chromosomale Translokationen nachgewiesen werden, die zur Fusion des *EWSR1*-Gens auf Chromosom 22 mit einem Mitglied der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren führt. Die daraus resultierenden Fusionsonkogene tragen maßgeblich zur Pathogenese des Ewing-Sarkoms bei. Ungefähr 85 % der Ewing-Sarkome weisen eine t(11;22)(q4;q12) *EWSR1-FLI1*-Genfusion auf [39, 40]. *EWSR1-FLI1* fungiert als aberrierender Transkriptionsfaktor, der hunderte Gene in ihrer Expression massiv dereguliert, was für den onkogenen Phänotyp von Ewing-Sarkomen notwendig erscheint [41, 42]. In selteneren Fällen fusioniert *EWSR1* mit anderen Mitgliedern der ETS-Familie, einschließlich t(21;22)(q22;q12) *EWSR1-ERG*, t(7;22)(p22;q12) *EWSR1-ETV1*, t(17;22)(q12;q12) *EWSR1-ETV4* oder t(2;22)(q35;q12) *EWSR1-FEV* [43–48]. Interessanterweise bindet *EWSR1-FLI1* im Erbgut an repetitive GGAA-Sequenzen, sog. GGAA-Mikrosatelliten [49, 50]. Diese Bindung konvertiert die ansonsten funktionslosen GGAA-Mikrosatelliten in potente Enhancer, deren Enhancer-Aktivität mit der Anzahl an sich wiederholenden GGAA-Sequenzen positiv korreliert ist [49, 50]. Es wird angenommen, dass ca. 40 % der *EWSR1-FLI1*-Zielgene über sol-

che De-novo-Enhancer dysreguliert werden [51, 52], die in ihrer Summe für die maligne Transformation der Ursprungszelle des Ewing-Sarkoms verantwortlich sein könnten. In der Tat konnte bislang kein genetisches Tiermodell für Ewing-Sarkome generiert werden [53]. Dies könnte an den humanspezifischen GGAA-Mikrosatelliten liegen, die im Tierreich nicht in vergleichbarer Weise vorkommen [53, 54].

In weiteren seltenen Fällen werden *FUS-ERG*-oder *FUS-FEV*-Fusionen nachgewiesen [55, 56]. Das FUS-Protein (TLS) ist in der Aminosäuresequenz ähnlich zu EWSR1 und wird selbst als Teil der FET-Proteinfamilie betrachtet (einschließlich FUS, EWSR1 und TAF15) [57]. In Ergänzung zu obigen Fusionen wurden in den letzten Jahren Fälle von Ewing-ähnlichen Sarkomen charakterisiert, die Fusionen zwischen EWSR1 und anderen, Non-ETS-Proteinen aufweisen, einschließlich NFATc2, SMARCA5, PATZ1, und SP3; wieder anderen fehlen Umlagerungen mit *EWSR1* oder anderen FET-Genen, enthalten aber solche mit t(4;19)(q35;q13) oder t(10;19)(q26;q13) und kodieren für eine *CIC-DUX4*-Fusion [46, 58–62]. Ob diese Fälle als Ewing-Sarkome oder als separate Tumorentität zu betrachten sind, ist derzeit unklar [46]. Viele Patienten mit solchen Tumoren werden aber vergleichbar behandelt. Bei einer Untergruppe Ewing-ähnlicher Sarkome mit charakteristischer *BCOR-CCNB3*-Genfusion, wird ein deutlich unterschiedliches Genexpressionsprofil und abweichendes Muster sekundärer Aberrationen beobachtet, die Tumoren mit diesen Translokationen als separate Entität erscheinen lassen [63]. Für Ewing-Sarkome wurde inzwischen der Nachweis zirkulierender genomischer Tumor-DNA im peripheren Blut, durch die PCR von *EWSR1-FLI1*-Translokationen, etabliert [64, 65]. Hiermit soll zukünftig nicht nur frühzeitig das Auftreten von Rezidiven, sondern auch ein sensitiveres Therapiemonitoring etabliert werden (*liquid biopsy*).

Die Diagnose eines Ewing-Sarkoms kann durch positive RT-PCR-Ergebnisse oder durch Nachweis eines Bruchpunkts im *EWSR1*-Gen mittels FISH-Analyse geführt werden (während die Diagnose noch andere Tumoren mit *EWSR1*-Umlagerungen, wie *desmoplastic round cell* Tumoren, extraskeletale myxoide Chondrosarkome, myxoide Liposarkome, oder *clear cell* Sarkome etc. ausschließt). Das Fehlen molekularer Nachweise sollte zu einer

Revision der klinischen, histologischen und immunhistochemischen Daten führen, aber nicht die Diagnose eines Ewing-Sarkoms von vornherein ausschließen. Neben den *EWSR1-ETS*-Fusionsonkogenen kommen weitere rekurrende somatische Mutationen nur in sehr niedriger Frequenz vor [66–69]. Jüngste Ergebnisse zeigen ferner, dass die EWSR1-ETS-Fusionsproteine mit spezifischen epigenetischen Veränderungen einhergehen [52, 70]. Zudem wurde beobachtet, dass das DNA-Methylom bei Patienten mit Metastasen bei Diagnose deutlich heterogener ist als bei Patienten mit lokaler Primärerkrankung [71]. Inwieweit diese Erkenntnisse zur Pathogenese des Ewing-Sarkoms beitragen und ob sie zu neuen Therapieansätzen führen, muss die Zukunft zeigen.

Pathogenese von Rhabdomyosarkomen

Das Rhabdomyosarkom ist ein seltenes Sarkom, das einen mesenchymalen Ursprung hat und bei dem die Tumorzellen nicht vollständig differenzierte Muskelzellen sind, die sich Myoblasten nennen. Beim Namen „Rhabdomyosarkom“ steht – aus dem Griechischen abgeleitet – „*myo*“ für Muskel, „*sar*“ für Fleisch und Weichteile und *-om* für Geschwulst. Das „Rhabdo“ am Anfang steht für „Stab“ und ist bezogen auf die Querstreifung der Skelettmuskulatur. Die zwei Hauptformen sind das alveoläre Rhabdomyosarkom (ARMS \approx 20 % der Fälle) mit schlechter Prognose, das durch *PAX3*- oder *PAX7*-Fusionsgene gekennzeichnet ist [72, 73] und das embryonale Rhabdomyosarkom (ERMS \approx 60 % der Fälle) mit besserer Prognose, bei dem typische Proto-Onkogene wie die *RAS*-Isoformen mutiert sind [72]. Zusätzlich existieren noch das pleomorphe Rhabdomyosarkom und spindelzellige Formen (beide je 10 % der Fälle). Rhabdomyosarkome treten vor allem bei Kindern und Jugendlichen (ARMS: 10–25 Jahre, ERMS: <10 Jahre) auf [74].

Ursprungszelle

Rhabdomyosarkome entwickeln sich aus Mesenchymzellen und können sich aus den „Satellitenzellen“ genannten Muskelstammzellen entwickeln [75, 76]. Die somatischen Mutationen bewirken unter anderem eine Differenzierung in sogenannte Myoblasten oder Rhabdomyoblasten, die für die Muskelentwicklung essenzielle Transkriptionsfak-

toren wie *MYOD1*, *MYF5* oder *Myogenin* exprimieren [77]. In Gegensatz zur normalen Muskelentwicklung und normalen Muskelregeneration differenzieren Rhabdomyoblasten nicht in postmitotische Muskelfasern, sondern bleiben in einem präterminalen, aber hochproliferativen Differenzierungszustand. Interessanterweise entwickeln sich Rhabdomyosarkome auch oft in Geweben ohne Skelettmuskulatur (extramuskuläre Rhabdomyosarkome). Die Gründe hierfür sind nicht bekannt.

Genetik

ARMS und ERMS sind nicht nur histologisch, sondern auch klar über somatische Mutationen unterscheidbar. Dies wurde in großen DNA-Sequenzierungsstudien bestätigt [72, 78]. Das erste Unterscheidungsmerkmal ist, dass ARMS eine sehr niedrige Mutationsrate und einen meist normalen Karyotyp aufweisen, wohingegen bei ERMS die Mutationsrate höher ist und das Genom instabiler, mit abnormalen Kopien von Chromosomenfragmenten und ganzen Chromosomen (Aneuploidie) [72, 78]. Das zweite Unterscheidungsmerkmal ist die Art der Mutation: Fast alle ARMS-Fälle weisen $t(2;13)(q35;q14)$ *PAX3-FOXO1*- (schlechteste Prognose) oder $t(1;13)(q36;q14)$ *PAX7-FOXO1*-Genfusionen auf, wohingegen beim ERMS typischerweise Mutationen in Proto-Onkogenen aus der RAS-Familie (*NRAS*, *KRAS* und *HRAS*) sowie *FBXW7*, *PIK3CA*, *FGFR4* gefunden werden [72]. Zudem gibt es einen Heterozygotieverlust am *IGF2*-Locus, der mit einer hohen Expression des Wachstumsfaktors IGF2 assoziiert ist, sowie eine Aneuploidie der Chromosomen 2, 8 und 13 [72].

Signalübertragung

Die wichtigen Charakteristika von Rhabdomyosarkomen sind die Myoblastendifferenzierung der Rhabdomyoblasten und deren abnorme Proliferationsrate. Die DNA-Bindungsdomänen von *PAX3* und *PAX7* bleiben in den *PAX3-FOXO1*- und *PAX7-FOXO1*-Fusionsgenen erhalten. Dies ist wahrscheinlich für die Myoblastendifferenzierung wichtig, denn beide Proteine sind in Vorläuferzellen von Myoblasten und/oder den Muskelstammzellen (Satellitenzellen) exprimiert und regulieren deren Identität [77]. Im Gegensatz dazu sind die Mecha-

nismen, die zur Expression von *MYOD1*, *MYF5* oder *Myogenin* im ERMS führen, nicht vollständig bekannt. Für die Proliferation und den Differenzierungsblock in Rhabdomyosarkomen kommen verschiedene Signalübertragungsproteine in Frage. Hierfür scheinen sowohl im ARMS [79] als auch im ERMS [76] die Hippo-Proteine eine besondere Rolle einzunehmen, da sie in der Lage sind, gleichzeitig die Proliferation von Myoblasten zu stimulieren und deren Differenzierung zu blockieren.

Literatur

- 1 Bovée JVM, Hogendoorn PCW (2010) Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications. *Virchows Arch Int J Pathol* 456: 193–199
- 2 IARC (2013) WHO classification of tumours of soft tissue and bone. IARC, Lyon
- 3 Malkin D, Li FP, Strong LC et al (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250 1233–1238
- 4 Hansen MF, Koufos A, Gallie BL et al (1985) Osteosarcoma and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6216–6220
- 5 Gripp KW, Scott CI, Nicholson L et al (2002) Five additional Costello syndrome patients with rhabdomyosarcoma: proposal for a tumor screening protocol. *Am J Med Genet* 108: 80–87
- 6 Hahn H, Wojnowski L, Zimmer AM et al (1998) Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med* 4: 619–622
- 7 Stürzl M, Blasig C, Schreier A et al (1997) Expression of HHV-8 latency-associated T0.7 RNA in spindle cells and endothelial cells of AIDS-associated, classical and African Kaposi's sarcoma. *Int J Cancer* 72: 68–71
- 8 Patel SR (2000) Radiation-induced sarcoma. *Curr Treat Options Oncol* 1: 258–261
- 9 Kirova YM, Vilcoq JR, Asselain B et al (2005) Radiation-induced sarcomas after radiotherapy for breast carcinoma: a large-scale single-institution review. *Cancer* 104: 856–863
- 10 Hatley ME, Tang W, Garcia MR et al (2012) A mouse model of rhabdomyosarcoma originating from the adipocyte lineage. *Cancer Cell* 22: 536–546
- 11 Lin PP, Pandey MK, Jin F et al (2009) Targeted mutation of p53 and Rb in mesenchymal cells of the limb bud produces sarcomas in mice. *Carcinogenesis* 30: 1789–1795
- 12 Helman LJ, Meltzer P (2003) Mechanisms of sarcoma development. *Nat Rev Cancer* 3: 685–694
- 13 Taylor BS, Barretina J, Maki RG et al (2011) Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 11: 541–557

- 14 Clark MA, Fisher C, Judson I et al (2005) Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med* 353: 701–711
- 15 Mertens F, Panagopoulos I, Mandahl N (2010) Genomic characteristics of soft tissue sarcomas. *Virchows Arch Int J Pathol* 456: 129–139
- 16 Burningham Z, Hashibe M, Spector L et al (2012) The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res* 2: 14
- 17 Smida J, Baumhoer D, Rosemann M et al (2010) Genomic alterations and allelic imbalances are strong prognostic predictors in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* 16: 4256–4267
- 18 Kovac M, Blattmann C, Ribi S et al (2015) Exome sequencing of osteosarcoma reveals mutation signatures reminiscent of BRCA deficiency. *Nat Commun* 6: 8940
- 19 Henriksen J, Aagesen TH, Maelandsmo GM et al (2003) Amplification and overexpression of COPS3 in osteosarcomas potentially target TP53 for proteasome-mediated degradation. *Oncogene* 22: 5358–5361
- 20 Wunder JS, Eppert K, Burrow SR et al (1999) Co-amplification and overexpression of CDK4, SAS and MDM2 occurs frequently in human parosteal osteosarcomas. *Oncogene* 18: 783–788
- 21 Ng AJM, Walia MK, Smeets MF et al (2015) The DNA helicase recq14 is required for normal osteoblast expansion and osteosarcoma formation. *PLoS Genet* 11: e1005160
- 22 Zils K, Klingebiel T, Behnisch W et al (2015) Osteosarcoma in patients with Rothmund-Thomson syndrome. *Pediatr Hematol Oncol* 32: 32–40
- 23 Chen X, Bahrami A, Pappo A et al (2014) Recurrent somatic structural variations contribute to tumorigenesis in pediatric osteosarcoma. *Cell Rep* 7: 104–112
- 24 Lord CJ, Ashworth A (2016) BRCAness revisited. *Nat Rev Cancer* 16: 110–120
- 25 Perry JA, Kiezun A, Tonzi P et al (2014) Complementary genomic approaches highlight the PI3K/mTOR pathway as a common vulnerability in osteosarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: E5564–5573
- 26 Yang J, Zhang W (2013) New molecular insights into osteosarcoma targeted therapy. *Curr Opin Oncol* 25: 398–406
- 27 Ewing J (2006) The classic: diffuse endothelioma of bone. *Proceedings of the New York Pathological Society* 1921;12:17. *Clin Orthop* 450: 25–27
- 28 Balamuth NJ, Womer RB (2010) Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol* 11: 184–192
- 29 Worch J, Cyrus J, Goldsby R et al (2011) Racial differences in the incidence of mesenchymal tumors associated with EWSR1 translocation. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 449–453
- 30 Grünewald TGP, Bernard V, Gilardi-Hebenstreit P et al (2015) Chimeric EWSR1-FLI1 regulates the Ewing sarcoma susceptibility gene EGR2 via a GGAA microsatellite. *Nat Genet* 47: 1073–1078
- 31 Postel-Vinay S, Véron AS, Tirode F et al (2012) Common variants near TARDBP and EGR2 are associated with susceptibility to Ewing sarcoma. *Nat Genet* 44: 323–327
- 32 Tanaka M, Yamazaki Y, Kanno Y et al (2014) Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest* 124: 3061–3074
- 33 von Levetzow C, Jiang X, Gwye Y et al (2011) Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PLoS One* 6: e19305
- 34 Tirode F, Laud-Duval K, Prieur A et al (2007) Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. *Cancer Cell* 11: 421–429
- 35 Llombart-Bosch A, Machado I, Navarro S et al (2009) Histological heterogeneity of Ewing's sarcoma/PNET: an immunohistochemical analysis of 415 genetically confirmed cases with clinical support. *Virchows Arch* 455: 397–411
- 36 Machado I, Noguera R, Mateos EA et al (2011) The many faces of atypical Ewing's sarcoma. A true entity mimicking sarcomas, carcinomas and lymphomas. *Virchows Arch Int J Pathol* 458: 281–290
- 37 Graham C, Chilton-MacNeill S, Zielenska M et al (2012) The CIC-DUX4 fusion transcript is present in a subgroup of pediatric primitive round cell sarcomas. *Hum Pathol* 43: 180–189
- 38 Italiano A, Sung YS, Zhang L et al (2012) High prevalence of CIC fusion with double-homeobox (DUX4) transcription factors in EWSR1-negative undifferentiated small blue round cell sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 51: 207–218
- 39 Delattre O, Zucman J, Plougastel B et al (1992) Gene fusion with an ETS DNA-binding domain caused by chromosome translocation in human tumours. *Nature* 359: 162–165
- 40 Turc-Carel C, Aurias A, Mugneret F et al (1988) Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet* 32: 229–238
- 41 Prieur A, Tirode F, Cohen P et al (2004) EWS/FLI-1 silencing and gene profiling of Ewing cells reveal downstream oncogenic pathways and a crucial role for repression of insulin-like growth factor binding protein 3. *Mol Cell Biol* 24: 7275–7283
- 42 Smith R, Owen LA, Trem DJ et al (2006) Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell* 9: 405–416
- 43 Jeon IS, Davis JN, Braun BS et al (1995) A variant Ewing's sarcoma translocation (7;22) fuses the EWS gene to the ETS gene ETV1. *Oncogene* 10: 1229–1234
- 44 Kaneko Y, Yoshida K, Handa M et al (1996) Fusion of an ETS-family gene, EIAF, to EWS by t(17;22)(q12;q12) chromosome translocation in an undifferentiated sarcoma of infancy. *Genes Chromosomes Cancer* 15: 115–121
- 45 Peter M, Couturier J, Pacquement H et al (1997) A new member of the ETS family fused to EWS in Ewing tumors. *Oncogene* 14: 1159–1164
- 46 Sankar S, Lessnick SL (2011) Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet* 204: 351–365

- 47 Sorensen PH, Lessnick SL, Lopez-Terrada D et al (1994) A second Ewing's sarcoma translocation, t(21;22), fuses the EWS gene to another ETS-family transcription factor, ERG. *Nat Genet* 6: 146–151
- 48 Urano F, Umezawa A, Hong W et al (1996) A novel chimera gene between EWS and E1A-F, encoding the adenovirus E1A enhancer-binding protein, in extraosseous Ewing's sarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 608–612
- 49 Gangwal K, Sankar S, Hollenhorst PC et al (2008) Microsatellites as EWS/FLI response elements in Ewing's sarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10149–10154
- 50 Guillon N, Tirode F, Boeva V et al (2009) The oncogenic EWS-FLI1 protein binds in vivo GGAA microsatellite sequences with potential transcriptional activation function. *PLoS One* 4: e4932
- 51 Patel M, Simon JM, Iglesia MD et al (2012) Tumor-specific retargeting of an oncogenic transcription factor chimera results in dysregulation of chromatin and transcription. *Genome Res* 22: 259–270
- 52 Riggi N, Knoechel B, Gillespie SM et al (2014) EWS-FLI1 utilizes divergent chromatin remodeling mechanisms to directly activate or repress enhancer elements in Ewing sarcoma. *Cancer Cell* 26: 668–681
- 53 Minas TZ, Surdez D, Javaheri T et al (2017) Combined experience of six independent laboratories attempting to create an Ewing sarcoma mouse model. *Oncotarget* 8(21): 34141–34163
- 54 Gomez NC, Davis IJ (2015) Linking germline and somatic variation in Ewing sarcoma. *Nat Genet* 47: 964–965
- 55 Ng TL, O'Sullivan MJ, Pallen CJ et al (2007) Ewing sarcoma with novel translocation t(2;16) producing an in-frame fusion of FUS and FEV. *J Mol Diagn JMD* 9: 459–463
- 56 Shing DC, McMullan DJ, Roberts P et al (2003) FUS/ERG gene fusions in Ewing's tumors. *Cancer Res* 63: 4568–4576
- 57 Tan AY, Manley JL (2009) The TET family of proteins: functions and roles in disease. *J Mol Cell Biol* 1: 82–92
- 58 Kawamura-Saito M, Yamazaki Y, Kaneko K et al (2006) Fusion between CIC and DUX4 up-regulates PEA3 family genes in Ewing-like sarcomas with t(4;19)(q35;q13) translocation. *Hum Mol Genet* 15: 2125–2137
- 59 Mastrangelo T, Modena P, Tornielli S et al (2000) A novel zinc finger gene is fused to EWS in small round cell tumor. *Oncogene* 19: 3799–3804
- 60 Szuhai K, Ijszenga M, de Jong D et al (2009) The NFATc2 gene is involved in a novel cloned translocation in a Ewing sarcoma variant that couples its function in immunology to oncology. *Clin Cancer Res* 15: 2259–2268
- 61 Wang L, Bhargava R, Zheng T et al (2007) Undifferentiated small round cell sarcomas with rare EWS gene fusions: identification of a novel EWS-SP3 fusion and of additional cases with the EWS-ETV1 and EWS-FEV fusions. *J Mol Diagn* 9: 498–509
- 62 Yamaguchi S, Yamazaki Y, Ishikawa Y et al (2005) EWSR1 is fused to POU5F1 in a bone tumor with translocation t(6;22)(p21;q12). *Genes Chromosomes Cancer* 43: 217–222
- 63 Pierron G, Tirode F, Lucchesi C et al (2012) A new subtype of bone sarcoma defined by BCOR-CCNB3 gene fusion. *Nat Genet* 44: 461–466
- 64 Hayashi M, Chu D, Meyer CF et al (2016) Highly personalized detection of minimal Ewing sarcoma disease burden from plasma tumor DNA. *Cancer* 122: 3015–3023
- 65 Krumbholz M, Hellberg J, Steif B et al (2016) Genomic EWSR1 fusion sequence as highly sensitive and dynamic plasma tumor marker in Ewing sarcoma. *Clin Cancer Res* 22: 4356–4365
- 66 Agelopoulos K, Richter GH, Schmidt E et al (2015) Deep sequencing in conjunction with expression and functional analyses reveals activation of FGFR1 in Ewing sarcoma. *Clin Cancer Res* 21: 4935–4946
- 67 Brohl AS, Solomon DA, Chang W et al (2014) The genomic landscape of the Ewing sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS Genet* 10: e1004475
- 68 Crompton BD, Stewart C, Taylor-Weiner A et al (2014) The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov* 4: 1326–1341
- 69 Tirode F, Surdez D, Ma X et al (2014) Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov* 4: 1342–1353
- 70 Tomazou EM, Sheffield NC, Schmidl C et al (2015) Epigenome mapping reveals distinct modes of gene regulation and widespread enhancer reprogramming by the oncogenic fusion protein EWS-FLI1. *Cell Rep* 10: 1082–1095
- 71 Sheffield NC, Pierron G, Klughammer J et al (2017) DNA methylation heterogeneity defines a disease spectrum in Ewing sarcoma. *Nat Med* 23: 386–395
- 72 Shern JF, Chen L, Chmielecki J et al (2014) Comprehensive genomic analysis of rhabdomyosarcoma reveals a landscape of alterations affecting a common genetic axis in fusion-positive and fusion-negative tumors. *Cancer Discov* 4: 216–231
- 73 Williamson D, Missiaglia E, de Reyniès A et al (2010) Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 28: 2151–2158
- 74 Kashi VP, Hatley ME, Galindo RL (2015) Probing for a deeper understanding of rhabdomyosarcoma: insights from complementary model systems. *Nat Rev Cancer* 15: 426–439
- 75 Hettmer S, Wagers AJ (2010) Muscling in: uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nat Med* 16: 171–173