

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht - Karls - Universität

Heidelberg

vorgelegt von:

Diplom-Ingenieur Biologische Chemie (FH) Patrick Klaus Neubert

aus: Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:

T h e m a

The transcription factor SOX11 is a potential tumor suppressor in myxoid liposarcomas:

Analysis of function, target genes and mutation

Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Wiemann

Prof. Dr. Benedikt Brors

Inhaltsverzeichnis

Summary	1
1 Zusammenfassung	2
2 Einleitung	3
2.1 Weichgewebesarkome	3
2.1.1 Genese von Weichgewebesarkomen	5
2.1.2 Liposarkome	7
2.1.2.1 WDLS/DDLS	7
2.1.2.2 PLS	9
2.1.2.3 MLS	9
2.1.2.3.1 Therapie von MLS	11
2.1.2.3.1.1 Konventionelle zytotoxische Chemotherapie	11
2.1.2.3.1.2 Neue systemische Therapien	11
2.1.2.3.1.2.1 Trabectedin	11
2.1.2.3.1.2.2 Dasatinib	12
2.1.2.3.1.2.3 Weitere potentielle neue systemische Chemotherapeutika	13
2.2 SOX-Transkriptionsfaktoren	13
2.2.1 Funktionen der SOX-Proteine	14
2.2.2 Die SOX-Gruppe C	17
2.2.3 SOX11	18
2.2.3.1 Die Rolle von SOX11 in der Tumorigenese	20
2.2.3.2 Regulation der SOX11-Expression	23
2.2.3.3 Genetische Aberrationen von <i>SOX11</i>	25
2.2.3.3.1 Keimbahnmutationen	25
2.2.3.3.2 Somatische Mutationen	26
3 Methoden	28
3.1 Zellkultur	28
3.2 SDS-PAGE und Western Blot	29
3.2.1 Proteinlysate	29
3.2.2 SDS-PAGE	29
3.2.3 Western Blot	29
3.3 Quantitative <i>real-time</i> PCR	30

3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	30
3.3.2	Reverse Transkription	30
3.3.3	Quantitative <i>real-time</i> PCR	30
3.4	Immunhistochemie	32
3.4.1	Zellpräzipitate	32
3.4.2	Immunhistochemie	32
3.5	Funktionelle Assays	33
3.5.1	Wundheilungs-Assay	33
3.5.2	Klonogenitäts-Assay	33
3.5.3	MTT-Assay	33
3.5.3.1	Zeitverlaufs-Experimente	33
3.5.3.2	Dosis-Wirkung-Experimente	33
3.5.4	EdU-Proliferations-Assay	34
3.5.5	ApoTox-Glo™ Assay	34
3.5.6	CytoSelect™ Cell Adhesion Assay ECM Array	34
3.5.7	Zelladhäsions-Assay	35
3.6	Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array	35
3.7	Dual-Luciferase Reporter Assay	36
3.7.1	<i>In silico</i> -Analyse der Promotorregionen	36
3.7.2	Klonierung der Promotorregionen	37
3.7.3	Dual-Luciferase Reporter Assay	39
3.8	Vorinostat- und Trichostatin A-Behandlung	40
3.9	HIPO-Sequenzierungsprojekt	40
3.9.1	Sanger-Sequenzierung	40
3.10	<i>In silico</i> -Analysen der SOX11 ^{T248A} -Mutation	41
3.10.1	PolyPhen-2 Analyse	41
3.10.2	MutationTaster2 Analyse	41
3.10.3	PyMOL Visualisierung	41
3.10.4	COSMIC- und cBioPortal-Datenbank Abfrage	42
3.11	Generierung der stabilen Zelllinie MLS-1765 ^{T248A-SOX11}	42
3.11.1	Mutagenese	42
3.11.2	Transfektion und Selektion	42

3.12	Materialien und Geräte _____	43
4	Ergebnisse _____	50
4.1	Zuvor durchgeführte Arbeiten _____	50
4.1.1	SOX11-Expression in Liposarkomen _____	50
4.1.2	SOX11-Proteinexpression in Liposarkomzelllinien _____	52
4.1.3	Generierung einer MLS-Zelllinie mit ektoptischer SOX11-Expression _____	53
4.1.4	Globale Genexpressionsanalyse und Identifizierung von SOX11-Zielgenen _____	54
4.2	Eigene Arbeiten _____	56
4.2.1	Funktionelle Charakterisierung von SOX11 nach ektoptischer Überexpression in der MLS-Zelllinie MLS-1765 _____	56
4.2.2	SOX11-Expression erhöht die Sensitivität von MLS-1765 gegenüber Chemotherapeutika _____	58
4.2.3	SOX11 hat keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsprofil von MLS-1765 _____	60
4.2.4	Verifizierung potentieller Zielgene von SOX11 in MLS _____	60
4.2.5	Die Expression von SOX11 in Liposarkomen ist abhängig vom Acetylierungsstatus der Histone _____	64
4.2.6	SOX11-Mutation in MLS _____	65
4.2.6.1	Die <i>SOX11</i> ^{T248A} -Mutation beeinträchtigt die transkriptionelle Aktivierung der SOX11-Zielgene und -vermittelten Phänotypen Proliferation und Chemosensitivität in MLS-1765 _____	69
5	Diskussion _____	72
6	Literatur _____	81
7	Danksagung _____	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie der Weichgewebesarkome. _____	4
Abbildung 2: Gruppierung der Sox-Proteine. _____	14
Abbildung 3: Struktur der Sox-Proteine. _____	16
Abbildung 4: SOX11-Expression in Liposarkomen. _____	51
Abbildung 5: Immunhistochemische Analyse der SOX11-Expression in Liposarkomen. _____	52
Abbildung 6: SOX11-Proteinexpression in acht Liposarkomzelllinien. _____	53
Abbildung 7: Stabile Überexpression von SOX11 in der MLS-Zelllinie MLS-1765. _____	53
Abbildung 8: Globale Genexpressionsanalyse nach Überexpression von SOX11 in MLS-1765. _____	54
Abbildung 9: Funktionelle Charakterisierung von MLS-1765 ^{SOX11} . _____	57
Abbildung 10: Zelladhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix. _____	58
Abbildung 11: Die SOX11-Expression erhöht die Sensitivität von MLS-1765 gegenüber den Chemotherapeutika Dasatinib und Trabectedin, jedoch nicht gegenüber dem Standarderstlinientherapeutikum Doxorubicin. _____	59
Abbildung 12: SOX11 hat keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsprofil von MLS-1765. _____	61
Abbildung 13: Verifizierung potentieller Zielgene von SOX11 in MLS. _____	63
Abbildung 14: Die Expression von SOX11 in Liposarkomen ist abhängig vom Acetylierungsstatus der Histone. _____	64
Abbildung 15: Somatische SOX11-Mutationen. _____	65
Abbildung 16: Die SOX11 ^{T248A} -Mutation in MLS-Patient M615. _____	66
Abbildung 17: Merkmale und Auswirkung der SOX11 ^{T248A} -Mutation. _____	68
Abbildung 18: Die SOX11 ^{T248A} -Mutation beeinträchtigt die transkriptionelle Aktivierung der SOX11-Zielgene und -vermittelten Phänotypen Proliferation und Chemosensitivität in MLS-1765. _____	70

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zelllinien und Kultivierungsbedingungen. _____	28
Tabelle 2: Primäre Antikörper Western Blot. _____	29
Tabelle 3: Sekundärantikörper Western Blot _____	30
Tabelle 4: QPCR-Primer. _____	31
Tabelle 5: Reaktionsansatz qPCR. _____	31
Tabelle 6: QPCR-Programm <i>Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR System</i> . ____	32
Tabelle 7: Immunhistochemie Antikörper. _____	32
Tabelle 8: Potentielle Sox11-Bindestellen in der Promotorregion von <i>CD24</i> . _____	36
Tabelle 9: Potentielle Sox11-Bindestellen in der Promotorregion von <i>LHX2</i> . _____	36
Tabelle 10: Primer zur Klonierung der Promotorregion von <i>CD24</i> und <i>LHX2</i> . _____	37
Tabelle 11: PCR-Reaktionsansatz zur Klonierung der Promotorregion von <i>CD24</i> . _____	37
Tabelle 12: PCR-Reaktionsansatz zur Klonierung der Promotorregion von <i>LHX2</i> . _____	37
Tabelle 13: PCR-Programm zur Klonierung der Promotorregion von <i>CD24</i> . _____	38
Tabelle 14: PCR-Programm zur Klonierung der Promotorregion von <i>LHX2</i> . _____	38
Tabelle 15: Sequenzierungs-Primer. _____	39
Tabelle 16: Sanger-Sequenzierungs-Primer für die kodierende Region von <i>SOX11</i> . _____	41
Tabelle 17: Materialien. _____	43
Tabelle 18: Geräte. _____	48
Tabelle 19: 19 hochregulierte Transkripte, die in MLS-1765 ^{SOX11} versus MLS-1765 ^{EV} und in primären MLS versus normales Fett eine positive Korrelation mit <i>SOX11</i> zeigen. ____	55
Tabelle 20: <i>SOX11</i> -Mutationen in Liposarkomen. _____	67

Abkürzungen

18S	<i>Ribosomal Protein S18</i>
aa	Aminosäuren
ABL	<i>Abelson Tyrosine Protein Kinase 1</i>
ACTB	Actin Beta
ADIPOQ	Adiponektin
ADSC	<i>Adipose-derived stem cells</i>
AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
Array-CGH	Array-basierter komparative genomische Hybridisierung
AZA	5-aza-2'-deoxycytidine
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ
BAX	<i>BCL2-Associated X Protein</i>
bp	Basenpaar
BRC	<i>Breakpoint Cluster Region</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1, Early Onset</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BTK	<i>Bruton Agammaglobulinemia Tyrosine Kinase</i>
C/EBP α	<i>CCAAT / Enhancer-Binding Protein Alpha</i>
C/EBP β	<i>CCAAT / Enhancer-Binding Protein Beta</i>
Ca ²⁺	Calcium
CCL2	<i>Chemokine (C-C Motif) Ligand 2</i>
CCND1	Cyclin D1
CD24	<i>Cluster of Differentiation 24</i>
CDH1	<i>Epithelial Cadherin1</i>
CDH2	<i>Cadherin 2, Type 1, neuronal N-Cadherin</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CFD	<i>Complement factor D (Adipsin)</i>
CHARGE	Kolobom des Auges, Herzfehler, Atresie der Choanen, Retardiertes Längenwachstum und Entwicklungsverzögerung, Geschlechtsorgan-Anomalien, Ohrfehlbildungen
CHD7	<i>Chromatin Remodeler Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7</i>

ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CIAP	<i>Calf Intestinal alkaline phosphatase</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNV	<i>Copy Number Variations</i>
CO ₂	Kohlendioxid
COLI	Collagen I
COLIV	Collagen IV
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CSS	Coffin-Siris-Syndrom
CXCL8	Interleukin 8
ddH ₂ O	<i>Double-distilled water</i>
DDIT3	<i>DNA-Damage-Inducible Transcript 3</i>
DDR1	<i>Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 1</i>
DDR2	<i>Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2</i>
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DPYSL4	<i>Dihydropyrimidinase-Like 4</i>
DSB	Doppelstrang-Brüche
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECM	Extrazellulären Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	<i>5-Ethynyl-2'-deoxyuridine</i>
EIF4E	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E</i>
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EMSA	Elektromobilitätshift-Assay
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EOC	Epitheliales Ovarialkarzinom
ESC	Embryonale Stammzellen

EWSR1	<i>Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1</i>
Ex _{485 nm} /Em _{520 nm}	Extinktion 485 nm / Emission 520 nm
FABP4	<i>Fatty Acid Binding Protein 4</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FF	Firefly
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FL	Follikuläres Lymphom
FN1	Fibronectin 1
FNG	Fibrinogen
FRK	<i>Fyn-Related Src Family Tyrosine Kinase</i>
FUS	<i>Fused in Sarcoma RNA-Binding Protein</i>
G418	Geneticin
GDF5	<i>Growth Differentiation Factor 5</i>
gDNA	Genomische DNA
GIC	Gliom-initiierende Zellen
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde
H3K27me3	<i>Trimethylated lysine 27 of histone H3</i>
H3K4me3	<i>Trimethylated lysine 4 of histone H3</i>
H3K9/14Ac	<i>Histone H3 acetylated at lysines 9 and 14</i>
H3K9me2	<i>Dimethylated lysine 9 of histone H3</i>
H3K9me3	<i>Trimethylated lysine 9 of histone H3</i>
HDAC	Histon-Deacetylase
HET	Heterozygot
HHV-8	Humanes Herpesvirus 8
HIER	<i>Heat induced epitope retrieval</i>
HIPO	<i>Heidelberg Center for Personalized Oncology</i>
HMG	<i>High-Mobility-Group</i>
HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1</i>
HR	Homologe Rekombination
HSP90	<i>Heat Shock Protein 90kDa</i>

IGF1R	<i>Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor</i>
IHC	Immunhistochemie
IL6	Interleukin 6
IRX3	<i>Iroquois Homeobox 3</i>
K _d	Dissoziationskonstante
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KIT	<i>Proto-Oncogene KIT</i>
KLF6	<i>Kruppel-Like Factor 6</i>
KSHV	Kaposi Sarkom Herpesvirus
LAMA1	Laminin Alpha 1
LEF1	<i>Lymphoid Enhancer Binding Factor 1</i>
LHX2	<i>LIM Homeobox 2</i>
LMNI	Laminin I
LMS	Leiomyosarkom
M	Molar (mol / L)
MAPC	Multipotente adulte Vorläuferzellen
MCL	Mantelzell-Lymphom
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homologue</i>
MEF	Embryonale Mausfibroblasten
MFH	Malignes fibröses Histiozytom
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minuten
miRNA	<i>Micro Ribonucleic acid</i>
MLS	Myxoides Liposarkom
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic acid</i>
MRT	<i>Minus reverse transcriptase</i>
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTT	<i>Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide</i>
n	Anzahl der Fälle
n.a.	Nicht verfügbar
NCT	Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen

NF1	Neurofibromin 1
NHEJ	Nicht-homologes <i>end-joining</i>
NNAT	Neuronatin
NPC	Neuronale Vorläuferzellen
NREP	<i>Neuronal Regeneration Related Protein</i>
NSC	Neuronale Stammzellen
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
NTC	<i>None template control</i>
<i>p</i>	<i>Percentage of false predictions</i>
P/S	Penicillin / Streptomycin
PAX5	<i>Paired Box 5</i>
PDGFA	<i>Platelet-Derived Growth Factor Alpha</i>
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PDGFRA	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Alpha Polypeptide</i>
PDGFRB	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Beta Polypeptide</i>
Ph+ ALL	Philadelphia-Chromosom-positive akute lymphatische Leukämie
PI3K-AKT	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase-Protein Kinase B</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha</i>
PLS	Pleomorphes Liposarkom
PNET	Primitiver neuroektodermaler Tumor
PolyPhen-2	<i>Polymorphism Phenotyping-2</i>
PPAR γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
PTX3	Pentraxin 3
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PyMOL	<i>The PyMOL Molecular Graphics System</i>
qPCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
rDNase	Rekombinate Desoxyribonuklease
RefSeq	Referenzsequenz
rH	Relative Luftfeuchtigkeit
RKI	Robert Koch-Institut

rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SAHA	Suberoylanilid-hydroxamsäure
SBK1	<i>SH3 Domain Binding Kinase 1</i>
SCAP	<i>SREBF Chaperone</i>
SCC	Plattenepithelkarzinom der Lunge
SCLC	kleinzelliges Bronchialkarzinom
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SMAD4	<i>SMAD Family Member 4</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SNV	<i>Single-nucleotide Variants</i>
SOX	<i>SRY-related HMG-Box</i>
SOX11	<i>SRY (Sex-determining region Y)-Box 11</i>
SRSF4	<i>Serine / Arginine-Rich Splicing Factor 4</i>
SRY	<i>Sex-determining region Y</i>
SS	Synoviale Sarkome
TA	Transaktivierung
TBS-T	<i>Tris-buffered saline + 1 % Tween® 20</i>
TCF7	<i>T-Cell specific Transkription Factor 7</i>
TERT	<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
TFBS	Transkriptionsfaktor-Bindestelle
TGFB2	<i>Transforming Growth Factor, Beta 2</i>
THEM6	<i>Thioesterase Superfamily Member 6</i>
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TMSB15A	Thymosin Beta 15A
TMSB15B	Thymosin Beta 15B
TP53	Tumor Protein p53
TSA	Trichostatin A
TUBB	<i>Tubulin Beta, Class I</i>
TUBB2B	<i>Tubulin Beta, Class IIB</i>
TUBB3	<i>Tubulin beta, Class III</i>
UPS	Undifferenziertes <i>high-grade</i> pleomorphes Sarkom

UV-Vis	Ultraviolettes und sichtbares Licht
v/v	Volumenkonzentration (<i>volume per volume</i>)
VEGFA	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
w/v	Massenkonzentration (<i>weight per volume</i>)
WDLS/DDLS	Gutdifferenziertes / dedifferenziertes Liposarkom
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

Summary

Soft tissue sarcomas are a rare group of highly aggressive, histologically and genetically heterogeneous malignant tumors of mesenchymal origin. Liposarcomas are the most common type of sarcomas and are classified into the three types well-differentiated / dedifferentiated liposarcomas, pleomorphic liposarcomas and myxoid liposarcomas (MLS). MLS are characterized by a t(12;16)(q13;p11) translocation resulting in a FUS-DDIT3 fusion protein causing a block of differentiation during adipogenesis and malignant transformation. SOX11 is a neuronal transcription factor which is expressed during embryonic development of central and peripheral nervous system. In adult tissues SOX11 is rarely expressed. SOX11 expression is elevated in a variety of tumors but seems to exert different functions in tumorigenesis. Prior to this study a genome-wide expression profile of primary MLS samples identified SOX11 as the significant most upregulated gene in comparison to non-neoplastic adipose tissue. Additionally, SOX11 target genes in MLS were identified. The overexpression of SOX11 in the SOX11-negative MLS cell line MLS-1765 decreased migration, clonogenicity, and viability. In addition, the reduced cell growth is caused by decreased proliferation. However, overexpression of SOX11 had no influence on apoptosis and necrosis and on the phosphorylation profile of MLS-1765 cells. Also, SOX11 increased the sensitivity of MLS-1765 cells against treatment with the chemotherapeutic drugs dasatinib and trabectedin, but not against the standard first line treatment doxorubicin. The potential target genes *LHX2*, *TMSB15A*, *CD24*, *NNAT*, *THEM6*, *TUBB2B* und *SOX11* were validated by qPCR. Positive correlation of gene expression with SOX11 in primary MLS and non-neoplastic adipose tissue and results from dual-luciferase reporter assays revealed that *CD24* and *LHX2* are putative direct target genes of SOX11. The treatment of T778 cells with histone deacetylase inhibitors indicated that the SOX11 expression in liposarcomas may be regulated via histone modifications. Sequencing of the chromosomal SOX11 gene locus identified a somatic heterozygous mutation (c.248T>A; *SOX11*^{T248A}) in the tumor of a patient with MLS. According to *in silico* analyses the *SOX11*^{T248A} mutation significantly affects folding of the HMG-box domain leading to a loss of DNA binding. Stable overexpression of *SOX11*^{T248A} in MLS-1765 cells showed reduced ability to activate the downstream transcription of the seven SOX11 target genes and impaired the SOX11-mediated phenotypes proliferation and chemosensitivity against trabectedin. Taken together, this study obtained first evidence for a tumor suppressive role of SOX11, validated *CD24* and *LHX2* as potential SOX11 target genes and discovered a SOX11 loss-of-function mutation.

1 Zusammenfassung

Weichgewebesarkome bilden eine seltene Gruppe hoch aggressiver, histologisch und genetisch heterogener maligner Tumoren mesenchymalen Ursprungs. Liposarkome bilden den häufigsten Sarkom-Typ und werden in die drei Typen gutdifferenziertes / dedifferenziertes Liposarkom, pleomorphes Liposarkom und myxoides Liposarkom (MLS) klassifiziert. MLS sind durch eine t(12;16)(q13;p11) Translokation charakterisiert, deren Fusionsprotein FUS-DDIT3 während der normalen Adipogenese zu einer Blockade der Differenzierung und zur malignen Transformation führt. SOX11 ist ein neuronaler Transkriptionsfaktor, der während der Embryonalentwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert wird. In adulten Geweben wird SOX11 nur noch selten exprimiert. Die Expression von SOX11 ist in diversen Krebserkrankungen erhöht, jedoch scheint es unterschiedliche Funktionen in der Tumorigenese auszuüben. Vor Beginn dieser Arbeit wurde in einem genomweiten Genexpressionsprofil von primären MLS-Proben im Vergleich zu nicht-neoplastischem Fettgewebe SOX11 als das signifikant am stärksten hochregulierte Gen identifiziert. Zusätzlich wurden SOX11-Zielgene in MLS identifiziert. Die Überexpression von SOX11 in der SOX11-negativen MLS-Zelllinie MLS-1765 führte zu einer Verminderung der Migration, der Klonogenität und der Viabilität. Weiter ist das reduzierte Zellwachstums auf eine verminderte Proliferation zurückzuführen. Auch hat die Überexpression von SOX11 keinen Einfluss auf Apoptose und Nekrose, sowie auf das Phosphorylierungsprofil von MLS-1765-Zellen. Ebenfalls erhöhte SOX11 die Sensitivität von MLS-1765-Zellen gegenüber der Behandlung mit den Chemotherapeutika Dasatinib und Trabectedin, jedoch nicht gegenüber dem Standarderstlinientherapeutikum Doxorubicin. Die potentiellen Zielgene *LHX2*, *TMSB15A*, *CD24*, *NNAT*, *THEM6*, *TUBB2B* und *SOX11* konnten mit qPCR validiert werden. Die positive Korrelation der Genexpression mit SOX11 in primären MLS und nicht-neoplastischen Fettgewebe, sowie Ergebnisse aus *Dual-Luciferase Reporter Assays* deuten darauf hin, dass *CD24* und *LHX2* vermutlich direkte Zielgene von SOX11 darstellen. Die Behandlung von T778-Zellen mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Expression von SOX11 in Liposarkomen über Histon-Modifikationen reguliert wird. Die Sequenzierung des chromosomalen SOX11 Genlokus identifizierte eine somatische heterozygote Mutation (c.248T>A; *SOX11*^{T248A}) im Tumor eines Patienten mit MLS. Gemäß der *in silico*-Analysen beeinflusst die *SOX11*^{T248A}-Mutation signifikant die Faltung der HMG-Box-Domäne, was zum Verlust der DNA-Bindung führt. Die stabile Überexpression von *SOX11*^{T248} in MLS-1765-Zellen zeigte eine verringerte Fähigkeit die Transkription der sieben SOX11-Zielgene zu aktivieren und beeinträchtigte die von SOX11 vermittelten Phänotypen Proliferation und Chemosensitivität gegenüber Trabectedin. Zusammenfassend gibt diese Arbeit erste Hinweise auf eine tumorsuppressive Rolle von SOX11, validierte *CD24* und *LHX2* als potentielle SOX11-Zielgene und identifizierte eine SOX11 *loss-of-function* Mutation.

2 Einleitung

2.1 Weichgewebesarkome

Weichgewebesarkome bilden eine Gruppe hoch aggressiver, histologisch und genetisch heterogener maligner Tumoren, die aus Fett-, Muskel-, Knorpel-, oder Bindegewebezellen hervorgehen. Nach Angaben der *World Health Organization* (WHO) sind Weichgewebesarkome seltene Tumoren mit einer Inzidenz von 2-3 / 100.000 Fällen pro Jahr in der Weltbevölkerung, wobei die Häufigkeit mit dem Alter ansteigt. Weltweit machen sie damit ungefähr 1 % aller malignen Tumoren im Erwachsenenalter und etwa 8 % aller pädiatrischen Malignome aus (Fletcher *et al.*, 2013).

Die aktuelle Studie "Krebs in Deutschland 2011/2012" des Robert Koch-Instituts (RKI) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland prognostiziert zurzeit eine standardisierte Inzidenz an einem Weichgewebesarkom zu erkranken von 3,8 (Männer) bzw. 3,1 (Frauen) Fällen pro 100.000 Einwohner für das Jahr 2016, was etwa 4000 Neuerkrankungen entspricht. Betrachtet man den Zeitraum 2011-2012, steigt die Inzidenz generell mit zunehmenden Alter bis zu ihrem Höchstwert in der Altersgruppe der über 85-jährigen an (ungefähr zwölf (Frauen) bzw. 22 (Männer) Fälle / 100.000 Einwohner). Zusätzlich zeigt sich eine moderate Spitze in der Altersgruppe der 0-4-jährigen (ungefähr 2,5 (für beide Geschlechter) / 100.000 Einwohner). Das mittlere Erkrankungsalter lag dabei bei 65 (Männer) bzw. 69 (Frauen) Jahren. Als relative Überlebensrate für Patienten mit Weichgewebesarkom bis fünf Jahre nach Erstdiagnose nennt die Studie 62 % (Männer) bzw. 52 % (Frauen). Allgemein verlaufen die Erkrankungs- und Sterberaten in Deutschland seit 1999 nahezu konstant (Kaatsch *et al.*, 2015).

Als Erkrankung mesenchymalen Ursprungs umfassen die Weichgewebesarkome alle aus nicht-epithelalem und extraskelletalem Gewebe aufgebaute Neoplasien, einschließlich der neuroektodermalen Neoplasien. Ausgenommen von dieser Gruppe sind Tumoren des retikuloendothelialen Systems, der Glia und des Stützgewebes parenchymatöser Organe (Mentzel & Schneider-Stock, 2009). Die Klassifikation der WHO beschreibt dabei mehr als 50 verschiedene Sarkomtypen, welche sich gemäß ihrer molekularen Eigenschaften und Prognosen weiter subklassifizieren lassen (Abbildung 1) (Fletcher *et al.*, 2013).

Die klinische Erstmanifestation eines Weichgewebesarkoms ist in der Regel eine indolente Schwellung. Im weiteren Verlauf kann sich diese zu einer hoch invasiven, metastasierenden und fortwährend wachsenden Raumforderungen entwickeln. Weichgewebesarkome können in allen Regionen des Körpers auftreten, jedoch findet sich die Mehrheit in den Extremitäten, dem Gliedergürtel und im Abdomen (retroperitoneal oder viszeral und peritoneal). Dabei ist die Tumorgröße bei der Erstdiagnose abhängig von der Region des Auftretens. Tumoren in den distalen Gliedmaßen und der Kopfregion sind üblicherweise kleiner, da sie früh erkannt werden.

Dagegen können Tumoren an den Oberschenkeln und im Retroperitoneum sehr groß werden bis sie entdeckt werden. Allgemein breiten sich Weichgewebesarkome kugelförmig im Gewebe aus und infiltrieren dabei die Tumorpseudokapsel einschließlich der benachbarten Strukturen. Die Wachstumsraten der Weichgewebesarkome insgesamt unterscheiden sich je nach Aggressivität des Tumors. *Low-grade* Tumoren brauchen mitunter länger zur Entstehung, was dazu führt, dass sie oft fälschlicherweise als benigne, oftmals als Lipom, eingeschätzt werden. Generell finden sich benigne Weichgewebetumoren, vor allem Lipome, 100-mal häufiger als maligne (Clark *et al.*, 2005).

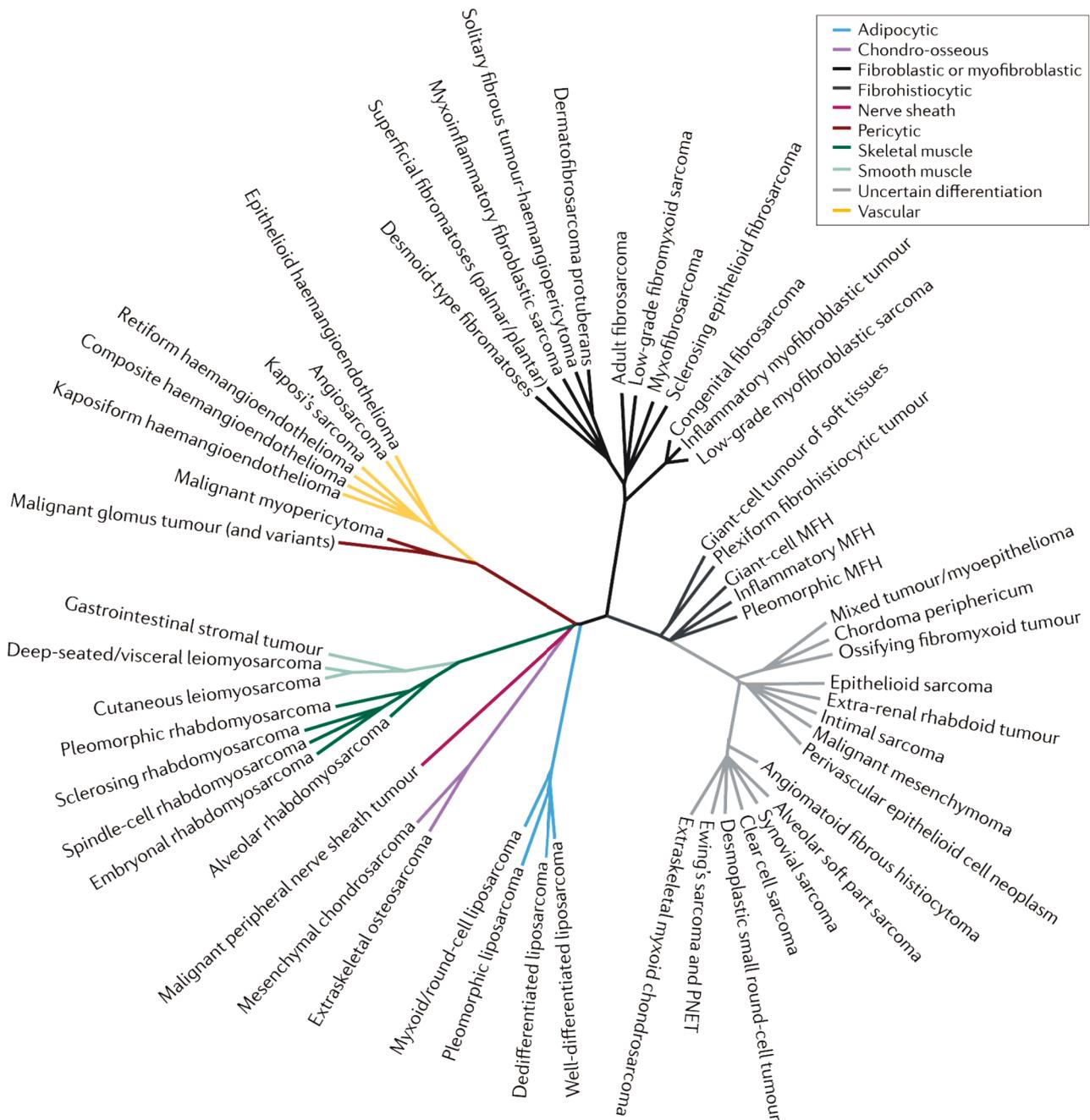


Abbildung 1: Taxonomie der Weichgewebesarkome.

Der phylogenetische Baum zeigt 55 Sarkomtypen, die von der *World Health Organization International Agency for Research on Cancer* definiert wurden. Die Klassifizierung basiert auf der Beziehung zwischen

Zelllinien, Prognose (maligne, intermediär oder lokal aggressiv, intermediär oder selten metastasierend), *Driver*-Alterationen und weiteren Parameter. Die Länge der Zweige basiert auf einer diskreten Distanzmatrix, die mit dem *Neighbour-Joining* Verfahren mit den zuvor erwähnten Variablen erstellt wurde. Die initiale Verzweigung zeigt die Unterschiede der Zelllinien, wobei assoziierte Zelllinien näher zueinander erscheinen (beispielsweise Skelett- und glatte Muskulatur). Anschließend verzweigen sich die Äste gemäß vergleichbarer Prognosen, der Ähnlichkeit der Translokationen und der, falls dadurch beeinflussten, Gene der jeweiligen Fusionen (in dieser Reihenfolge). Das Diagramm verdeutlicht die Beziehung der Sarkome zwischen Zelllinie und wichtigster molekularer Läsionen, wenn auch für viele Typen kein bestimmtes molekulares Profil existiert. 52 benigne Typen an Tumoren sind in der Abbildung nicht aufgeführt. Die Gruppe MFH (malignes fibröses Histiozytom) entspricht der in der aktuellen WHO-Klassifikation neu definierten Gruppe der undifferenzierten *high-grade* pleomorphen Sarkome (UPS); PNET: primitiver neuroektodermaler Tumor (Taylor *et al.*, 2011).

2.1.1 Genese von Weichgewebesarkomen

Die Entstehung von Sarkomen korreliert äußerst selten mit bestimmten Ursachen und Risiken. Als Risikofaktor für das Auftreten von Weichgewebesarkomen gibt es Korrelationen mit einigen viralen Infektionen (Herpes Zoster, Windpocken, Mumps) (Franceschi & Serraino, 1992). Patienten mit AIDS haben eine höhere Wahrscheinlichkeit ein Kaposi's Sarkom als Komorbidität zu entwickeln, verursacht durch das Humane Herpesvirus 8 (*HHV-8*, auch Kaposi-Sarkom-Herpesvirus (KSHV)) (Burningham *et al.*, 2012). Ein weiterer Risikofaktor für die Entstehung eines Sarkoms stellt die therapeutische Radiation bei Lymphomen, Zervix-, Hoden- oder Mammakarzinomen dar. Ebenso treten selten chronische Lymphangiosarkome (Stewart-Treves-Syndrom) als Komplikation bei der Behandlung von Mammakarzinomen auf (Clark *et al.*, 2005).

Auch Umweltgifte und Chemikalien, wie unter anderem Phenoxyessigsäure-Herbizide, Chlorphenole und Dioxine können zur Entstehung von Sarkomen beitragen. Vinylchlorid ist ein Risikofaktor für Angiosarkome. Ebenso könnten chronische Entzündungsprozesse die Entstehung von Weichteilsarkomen begünstigen (Kaatsch *et al.*, 2015).

Darüber hinaus sind einige genetische Erkrankungen mit der Entstehung von Weichgewebesarkomen assoziiert. Patienten mit Neurofibromatose, auch bekannt als *Morbus Recklinghausen* (Keimbahnmutationen des Tumorsuppressorgens *NF1* (Neurofibromin 1)), haben ein Lebenszeitrisiko von 8-13 % an einem malignen peripheren Nervenscheidentumor (MPNST) zu erkranken (Evans *et al.*, 2002). Weichgewebesarkome gehören zudem zu den charakteristischen Tumorerkrankungen, die in Verbindung mit dem Li-Fraumeni-Syndrom (Keimbahnmutationen im Tumorsuppressorgen *TP53* (Tumor Protein p53)) auftreten (Malkin, 2011). Trotz der erwähnten Zusammenhänge entsteht der Großteil der Sarkome *de novo* ohne Zuordnung zu einem kausalen Ereignis.

Als molekulare Ursachen der Sarkomentstehung kommen transkriptionelle Dysregulation aufgrund Translokation-assoziiierter Fusionsproteine, somatische Mutationen in Signalkaskaden und

Schlüsselgenen sowie *DNA Copy Number Variations* (CNV) in Frage. Aktuell werden auch epigenetische Ursachen der Sarkomentstehung diskutiert. Diese umfassen deregulierte miRNAs (Renner *et al.*, 2012), DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen (Renner *et al.*, 2013).

Allgemein lassen sich die Sarkome in zwei Gruppen einteilen:

Zum einen in die Gruppe der Sarkome mit einem nahezu diploiden Karyotyp und wenigen spezifischen simplen genetischen Veränderungen, wie beispielsweise Translokationen oder aktivierende Mutationen. Ungefähr 30 % der Sarkome dieser Gruppe sind Translokation-assoziierte Sarkome. Diese Tumoren entstehen *de novo* aufgrund einer einzelnen spezifischen zytogenetische Abnormität, die zu Beginn der Tumorigenese vorliegt und über die gesamte klonale Evolution erhalten bleibt. Die Mehrheit dieser Translokationen führt zu chimären Transkriptionsfaktoren, die eine transkriptionelle Dysregulation von Zielgenen nach sich zieht. Hierzu zählen beispielsweise myxoide Liposarkome mit ihrer charakteristischen Translokation t(12;16)(q13;p11), die zum Fusionsprotein FUS-DDIT3 führt (Aman *et al.*, 1992), oder synoviale Sarkome (SS) mit charakteristischer t(X;18)(p11;q11)-Translokation mit resultierendem SYT-SSX1-Fusionsprotein (Clark *et al.*, 1994).

Zum anderen in die Gruppe der Sarkome, die einen komplexen und unbalancierten Karyotyp besitzen. Dieser führt durch genomische Instabilität zu zahlreichen unspezifischen Aberrationen und zu einer intra- und intertumoralen Heterogenität. Die karyotypisch komplexen Sarkome können, im Gegensatz zu den Sarkomen mit wenigen simplen genetischen Veränderungen, auch aus weniger aggressiven Formen des Tumors entstehen und während der Progression durch zunehmend komplexere genomische Alterationen charakterisiert sein. Dennoch entstehen die meisten *high-grade* Sarkome mit komplexen Karyotyp *de novo* ohne vorangehende *low-grade* Läsionen (Taylor *et al.*, 2011). Zur Gruppe der Sarkome mit komplexen und unbalancierten Karyotyp zählen beispielsweise die Leiomyosarkome (LMS). Diese gelten als komplex, da sie hauptsächlich durch selten rekurrente *DNA Copy Number Variations* charakterisiert sind. Hierbei zählen Verluste der chromosomalen Regionen 1p12, 2p, 13q, 10q und 16q und Zugewinne der chromosomalen Regionen 17p, 15q, 8q und 5p zu den am häufigsten auftretenden Alterationen. In einer aktuellen Studie von Agaram *et al.* wurden 230 Krebs-assoziierte Gene in einem Kollektiv aus 35 primären LMS mittels Exom-Sequenzierung untersucht. Diese Studie bekräftigt, dass diese chromosomale Regionen häufig von Alterationen betroffen sind, da auch hier Verluste an 10q23 (Tumorsupressorgen *PTEN*), 13q14 (Tumorsupressorgen *RB1*), 16q22 (*CDH1*) und 17p13 (Tumorsupressorgen *TP53*) zu den am häufigsten beobachteten molekularen Ereignissen gehörten. Zusätzlich identifizierten sie in mehr als einem Drittel der Fälle rekurrente Mutationen in *TP53*. Die allgemein niedrige Mutationsfrequenz in LMS legt nahe, dass die Genese dieser Tumoren hauptsächlich durch die *DNA Copy Number Variations* bestimmt werden (Agaram *et al.*, 2015). In diese Gruppe der komplexen Sarkome sind auch die pleomorphen Liposarkome einzuordnen, wie Rieker *et al.* in ihrer Analyse von 14 pleomorphen Liposarkomen

mittels *Array*-basierter komparativer genomischer Hybridisierung (*Array*-CGH) zeigen konnten. Sie identifizierten hierbei insgesamt 251 Zugewinne und 84 Verluste (Rieker *et al.*, 2002).

Die Mutationsrate ist nicht nur in LMS gering, sondern dies gilt allgemein für alle Sarkome im Vergleich zu anderen Tumoren. So zeigen Boland *et al.* in ihrer Studie bei der Analyse von 37 unterschiedlichen Tumorentitäten, dass die Gruppe der Sarkome die geringsten Mutationsraten (20%) im Vergleich zu beispielweise Pankreas- (100 %), Kolorektal- (89 %) und Endometrialkarzinomen (75 %) oder Melanomen (86 %) aufweisen (Boland *et al.*, 2015). Lawrence *et al.* finden ähnliche somatischen Mutationsraten bei ihrer Analyse von 27 unterschiedlichen Tumortypen. Hier zeigen Ewing-Sarkome exemplarisch die zweitniedrigsten Mutationsraten (ungefähr 0,5 somatische Mutation pro Millionen Basen), welche ungefähr 1000-mal geringer sind als beispielweise für Melanome (Lawrence *et al.*, 2013).

2.1.2 Liposarkome

Liposarkome bilden den häufigsten Typ der Weichgewebssarkome mit einem Anteil von 17-25 % aller Sarkome (Dodd, 2011). Die WHO unterteilt die Liposarkome in ihrer Klassifikation von 2013 in die drei Typen gutdifferenziertes / dedifferenziertes Liposarkom (WDLs/DDLS), myxoides Liposarkom (MLS) und pleomorphes Liposarkom (PLS) (Fletcher *et al.*, 2013).

Die Liposarkomtypen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer molekularen Eigenschaften, ihrer Histologie und ihrem Verhalten in Klinik, Therapie und Prognose.

Chirurgische Resektion stellt die Hauptbehandlungsmethode für örtlich begrenzte Tumoren aller Liposarkomtypen dar. Dennoch besitzen, oder entwickeln mit fortschreitendem Krankheitsverlauf, einige Patienten inoperable oder metastasierende Tumoren. Für diese nicht-resektierbaren oder metastasierenden Krankheitsverläufe bietet die derzeitige konventionelle Chemotherapie zwar eine Möglichkeit zur Kontrolle, jedoch ist deren Toxizität relativ hoch. Daher wird der Nutzen adjuvanter und neoadjuvanter Chemotherapie und Radiation seit geraumer Zeit in Studien überprüft. Gegenstand aktueller Studien sind neue systemische Therapien für Liposarkome als Alternative zu den konventionellen Chemotherapeutika (Guan *et al.*, 2015).

2.1.2.1 WDLs/DDLS

WDLs/DDLS ist der häufigste Typ der Liposarkome. Dabei haben WDLs und DDLS keine bestimmte Prädilektion für Alter oder Geschlecht und es sind auch keine Risikofaktoren (beispielsweise Adipositas) bekannt (Tseng *et al.*, 2013).

WDLs und DDLS besitzen eine diagnostisch relevante Amplifikation der chromosomalen Region 12q13-15. In dieser Region sind unter anderen die Gene für den p53-Inhibitor *MDM2* (*Mouse double minute 2 homologue*) und den Zellzyklusregulator *CDK4* (*Cyclin-dependent kinase 4*) lokalisiert. Zur Diagnose werden deren Amplifikation durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder die Überexpression ihrer Proteine durch Immunhistochemie (IHC) nachgewiesen.

Unterscheiden lassen sich WDLS von DDLS durch ihre unterschiedliche pathologische Histologie. Während WDLS ausschließlich Adipozytenproliferation zeigen, sind DDLS durch beides gekennzeichnet: Sowohl einen adipozytenreichen gutdifferenzierten Anteil als auch durch einen spindelförmigen, zellreichen dedifferenzierten Anteil (Tseng *et al.*, 2013). Weiter unterscheiden sich WDLS von DDLS durch das Fehlen von Zugewinnen und Amplifikationen von 13q, was zusätzlich signifikant mit einer schlechteren Prognose korreliert ist (Schmidt *et al.*, 2005).

WDLS sind typischer Weise *low-grade* Tumoren, während DDLS deutlich aggressiver sind im Verlauf. Hierbei gilt die Resektion von WDLS allgemein als schwierig, da sie meist tief im Weichgewebe vorkommen. Außer der chirurgischen Behandlung bleiben für WDLS und DDLS die Behandlungsmöglichkeiten limitiert, da sie oftmals resistent gegenüber konventioneller Chemotherapie oder Radiotherapie sind. Ausnahme sind WDLS in den Extremitäten, da diese stets differenziert bleiben, was eine gute Kontrolle durch chirurgische Resektion oder Radiotherapie möglich macht (Guan *et al.*, 2015).

WDLS/DDLS besitzen eine hohe Wahrscheinlichkeit an lokaler Rekurrenz, die oftmals mit einer Dedifferenzierung als histologische Form der Tumorprogression einhergeht. So berichten Singer *et al.* von einer mindestens einmaligen Rekurrenz bei ungefähr 40 % der Patienten mit WDLS, wovon 83 % der WDLS-Patienten ein erneutes WDLS und 17 % ein DDLS entwickelt hatten. Die WDLS-Patienten mit einer zweiten Rekurrenz entwickelten zu 56 % erneut ein WDLS und zu 44 % ein DDLS, was vermuten lässt, dass die Wahrscheinlichkeit zur Dedifferenzierung mit der Rekurrenz steigt. Ein Rezidiv bei Auftreten eines DDLS ist ungefähr viermal wahrscheinlicher als bei Auftreten eines WDLS. So entwickelten 80 % der Patienten mit primären DDLS innerhalb von drei Jahren eine lokale Rekurrenz. Zudem entwickelten ungefähr 30 % der Patienten mit DDLS innerhalb von drei Jahren Metastasen, wohingegen die WDLS nicht metastasierten (Singer *et al.*, 2003).

WDLS und DDLS können zeitgleich (synchron) oder zeitlich versetzt (metachron) in einem Patienten auftreten und zeigen dabei ähnliche molekulare Eigenschaften. Ob DDLS aus WDLS hervorgehen oder unabhängig auftreten ist bisher nicht bekannt (Keung *et al.*, 2015). Jedoch gibt es erste Anhaltspunkte, welche Gene, Faktoren und Signalwege für eine mögliche Progression von WDLS zu DDLS verantwortlich sein könnten. So zeigen Snyder *et al.* beispielweise eine Überexpression des Protoonkogen *JUN* in einer Mehrzahl von DDLS und deren gutdifferenzierten Regionen im Vergleich zu reinen WDLS, was Ursache für eine Progression sein könnte (Snyder *et al.*, 2009). In ihrer aktuellen Studie schlagen Keung *et al.* einen Dedifferenzierungs-Mechanismus vor, der den Transkriptionsfaktor *KLF6* (*Kruppel-Like Factor 6*) beinhaltet. Hierbei könnte epigenetische Repression von *KLF6* durch den Histon-Marker *H3K9me3* (*Trimethylated lysine 9 of histone H3*) zu einer geringeren Expression seiner Zielgene *PPAR γ* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma*), *C/EBP α* (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha*) und *C/EBP β* (*CCAAT/Enhancer-Binding Protein Beta*) führen. Die

Transkriptionsfaktoren PPAR γ , C/EBP α und C/EBP β wiederum sind Schlüsselregulatoren der Adipozytendifferenzierung und ihre geringere Expression könnte somit an der Dedifferenzierung von WDLS zu DDLS beteiligt sein (Keung *et al.*, 2015).

2.1.2.2 PLS

Pleomorphe Liposarkome stellen den seltensten und aggressivsten Typ der Liposarkome dar. Sie gelten als hoch resistent gegenüber allen Behandlungsmöglichkeiten, sind aber vergleichsweise selten. Histologisch ähneln die PLS einem anderem nicht-adipozytischen Weichgewebssarkom, dem undifferenzierten *high-grade* pleomorphen Sarkom (vormals malignes fibröses Histiocytom). Die PLS kennzeichnen eine hohe Zellularität, zusätzliche pleomorphe Lipoblasten und teilweise multinukleäre Riesenzellen (Fletcher *et al.*, 2013). Molekular lassen sich die PLS nicht von den UPS unterscheiden und bilden zusammen basierend auf ihren chromosomalen Aberrationen ein *Cluster*, das sich aber von anderen schlecht differenzierten Sarkomen mit komplexen genomischen Aberrationen, wie den LMS, klar abgrenzen lässt. PLS zeigen häufig Zugewinne von Chromosom 1, 5p, 19q, 20q und 22q, sowie Verluste von 1q, 2q, 3p, 4q, 10q, und 11q (Idbaih *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005).

Neben der Histologie lassen sich die PLS von den anderen Liposarkomtypen durch das Fehlen von Zugewinnen von 12q13-15 unterscheiden, was für die genomisch weniger komplexen WDLS/DDLS ein charakteristischer molekularer Marker ist. MLS zeigen üblicherweise keine chromosomalen Imbalancen und werden über ihre charakteristische Translokation diagnostiziert (Schmidt *et al.*, 2005). Weiter werden die auf 1q22 lokalisierten Gene *HSP90* (*Heat Shock Protein 90kDa*) und *SCAP* (*SREBF Chaperone*) stark in PLS exprimiert und können zur weiteren Differenzierung von DDLS herangezogen werden (Fritz *et al.*, 2002).

2.1.2.3 MLS

Die Kategorie der myxoiden Liposarkome bildet mit etwa einem Drittel aller Liposarkome und etwa 10 % aller adulten Sarkome den zweithäufigsten Subtyp der Liposarkome. Hierbei bilden die myxoiden Liposarkome (*low-grade*; keine rundzelligen Anteile im Tumor) und die rundzelligen Liposarkome (*high-grade*; mehr als 5 % rundzellige Komponenten im Tumor) ein histologisches Kontinuum dieser Gruppe. Der rundzellige Anteil korreliert hierbei mit aggressiverem Tumorverhalten und schlechterer Prognose. Auch die Präsenz von Nekrose und eine Überexpression von *TP53* sind Prädiktoren eines ungünstigen Krankheitsverlaufs (Fletcher *et al.*, 2013).

MLS sind häufig am Oberschenkel lokalisiert, treten meist zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr auf und metastasieren in etwa 30 % der Fälle, bevorzugt in die serösen Häute (Pleura und Perikard) sowie in das Zwerchfell. In mehr als 95 % der Fälle lässt sich in MLS die chromosomale Translokation t(12;16)(q13;p11) nachweisen, welche die beiden Gene *FUS* (*Fused in Sarcoma RNA-Binding Protein*) und *DDIT3* (*DNA-Damage-Inducible Transcript 3*) fusioniert. Selten findet

sich die chromosomale Translokation t(12;22)(q13;q12) als Folge der Fusion von *EWSR1* (*Ewing Sarcoma Breakpoint Region 1*) mit *DDIT3* (Antonescu *et al.*, 2001).

Die Expression des für MLS charakteristischen Fusionsproteins FUS-DDIT3 führt während der normalen Adipogenese zu einer Blockade der Differenzierung und zur malignen Transformation. Bei der normalen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen über Adipoblasten hin zu reifen Adipozyten werden die entscheidenden adipogenen Transkriptionsfaktoren PPAR γ und C/EBP α für die terminale Differenzierung und Expression von reifen Adipozytenmarkern wie *FABP4* (*Fatty Acid Binding Protein 4*), *Adiponektin* (*ADIPOQ*) oder *Adipsin* (*Complement factor D, CFD*) benötigt. Das onkogene Fusionsprotein FUS-DDIT3 reprimiert während des Differenzierungsprogramms die Promotoren von PPAR γ und C/EBP α in den betroffenen mesenchymalen Vorläuferzellen. Dies führt zu einer Reduktion beider Transkriptionsfaktoren. Zusätzlich hemmt es die Aktivität der normalen Translationsinitiation, zumindest von EIF4E (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E*), was die Expression von C/EBP α hin zu einer verkürzten, weniger aktiven Isoform verschiebt und den *feedback-loop* zwischen C/EBP α und PPAR γ abschwächt (Pérez-Mancera *et al.*, 2008).

Wahrscheinlich stellt die *FUS-DDIT3*-Translokation und der damit verbundene Mechanismus die Hauptursache für die Tumorigenese von MLS dar. Dazu zeigt sich die allgemein vergleichsweise niedrige Mutationsrate für Sarkome auch in Liposarkomen. Exemplarisch verdeutlicht dies die Studie von Taylor *et al.* über Alterationen, die zur Liposarkomgenese beitragen könnten. Sie identifizieren hierbei eine moderate somatische Mutationsrate in DDLS mit ungefähr 0,53 Tumor-spezifischen Mutationen pro Million Basen (Taylor *et al.*, 2011). Trotzdem werden auch einige wichtige Mutationen beschrieben, welche möglicherweise die Entstehung oder Progression von MLS begünstigen können. Sowohl Killela *et al.*, als auch Koelsche *et al.* berichten von (74-80 %) rekurrente Mutationen im Promotor von *TERT* (*Telomerase Reverse Transcriptase*) in einem Großteil der analysierten MLS-Fälle (Killela *et al.*, 2013; Koelsche *et al.*, 2014). Ebenso entdecken Barretina *et al.* und Joseph *et al.* häufig Mutationen des Gens *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha*) in MLS, was Indiz für eine Beeinträchtigung des *PI3K-AKT*-Signalwegs in MLS sein kann. Das Tumorsuppressorgen *TP53* hingegen liegt in den meisten MLS-Fällen als wildtyp vor (Joseph *et al.*, 2014; Barretina *et al.*, 2010).

2.1.2.3.1 Therapie von MLS

2.1.2.3.1.1 Konventionelle zytotoxische Chemotherapie

Neben der chirurgischen Resektion und der Radiotherapie stellt die neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie eine Möglichkeit zur Behandlung von MLS dar. Diese zeigen generell eine höhere Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika im Vergleich zu den anderen Liposarkomen mit fortgeschrittenen oder metastasierenden Krankheitsverläufen (Guan *et al.*, 2015).

Die derzeitigen Chemotherapeutika für Patienten mit inoperablen und oder metastasierenden MLS basieren auf Daten von Studien, die meist alle Typen an Weichgewebssarkomen umfassen. Zur derzeitigen Standarderstlinientherapie werden daher Anthracycline (hauptsächlich Doxorubicin) in Monotherapie oder in Anthracyclin-basierenden Kombinationen mit Ifosfamid und Dacarbazin verwendet. Kombinationen von Doxorubicin und Ifosfamid zeigen objektive Ansprechraten von 43 % in MLS-Patienten und sind daher oft die erste Wahl bei der Behandlung. Als Zweitlinientherapie werden oftmals Gemcitabin und Docetaxel ohne die Kombination mit einem Anthracyclin verwendet.

In den letzten 20 Jahren zeigte sich für alle Weichgewebssarkome neben den objektiven Ansprechraten, allgemein ein mittleres Überleben von acht bis 13 Monaten, beginnend beim Start der Erstlinientherapie einer Anthracyclin-basierenden Chemotherapie. Das mittlere Überleben für Patienten, bei denen die konventionelle Chemotherapie mit einem Anthracyclin oder Ifosfamid versagt hat, lag im Bereich von sechs Monaten. Daher fokussieren sich die meisten Wirksamkeitsstudien auf die progressionsfreie Rate von Patienten (Tseng *et al.*, 2013).

2.1.2.3.1.2 Neue systemische Therapien

Neben der konventionellen zytotoxischen Chemotherapie gewinnen neue systemische Therapien von Tumorerkrankungen immer mehr an Bedeutung. Hierbei kommen Agentien zum Einsatz, die hoch spezifisch einem Mechanismus der Tumorentstehung, -proliferation oder -progression entgegenwirken. Ziel soll eine bessere Verträglichkeit für den Patienten aufgrund geringerer Dosis und Nebenwirkungen mit besseren Ansprechen und günstigerer Prognose sein. Systemische Therapien können Teil einer stratifizierten Medizin sein: Dank genauer Diagnose des Tumors mit seinen molekularen Eigenschaften und ursächlichen Entstehungsmechanismen kann die bestmögliche Therapie individuell für einen Patienten gewählt werden. Weiter lässt sich die Behandlung im Verlauf an mögliche molekulare Veränderungen eines Tumors anpassen. Daher werden zurzeit zahlreiche präklinische und klinische Studien mit neuen potentiellen systemischen Therapeutika, wie unter anderen Trabectedin und Dasatinib, durchgeführt.

2.1.2.3.1.2.1 Trabectedin

Trabectedin (Yondelis[®], Ecteinascidin-743, ET-743) wurde ursprünglich aus der Seescheide *Ecteinascidia turbinata* isoliert und ist ein innovatives Chemotherapeutikum, das 2007 von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) für die Zweitlinientherapie von Weichgewebesarkomen

zugelassen wurde. Trabectedin bindet an Guanin der kleinen Furche der DNA und induziert Doppelstrang-Brüche (DSB). Die allgemeinen Reparaturmechanismen für DSB sind Homologe Rekombination (HR) und nicht-homologes *end-joining* (NHEJ), was für die Wirkung von Trabectedin von besonderer Bedeutung ist. Zellen ohne HR-Mechanismus sind 100-fach sensitiver gegenüber einer Behandlung mit Trabectedin. Hingegen zeigen Zellen ohne NHEJ-Mechanismus keinerlei Unterschiede in ihrer Sensitivität. Das Fehlen des HR-Mechanismus ist ebenfalls mit einem Zellzyklusarrest in der S-Phase und Apoptose assoziiert (D'Incalci & Galmarini, 2010). Weiterhin verdrängt Trabectedin in MLS das Fusionsprotein FUS-DDIT3 von seiner gebundenen DNA und hindert die Aktivierung von Zielgenen und die damit einhergehende onkogene Transformation (Di Giandomenico *et al.*, 2013). Mit Trabectedin behandelte MLS-Patienten zeigten im Vergleich zu vor Behandlungsbeginn deutlich geringere Tumordichten einschließlich Reduktion der Tumorgöße (Grosso *et al.*, 2007). Neben dem direkten Effekt auf die Inhibition des Zellwachstums besitzt Trabectedin eine anti-inflammatorische Wirkung. Trabectedin behindert hierbei die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL6), Interleukin 8 (CXCL8), CCL2 (*Chemokine (C-C Motif) Ligand 2*), VEGFA (*Vascular Endothelial Growth Factor A*) und Pentraxin 3 (PTX3), was schließlich zu einer Reduktion der Tumor-assoziierten Infiltration von Makrophagen führt (Germano *et al.*, 2010).

2.1.2.3.1.2.2 Dasatinib

Dasatinib (Sprycel[®], BMS-354825) ist ein oraler niedermolekularer Multi-Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI), der seit 2010 von der EMA für die Erstlinientherapie von chronischer myeloischer Leukämie (CML) und Philadelphia-Chromosom-positiver akuter lymphatischer Leukämie (Ph+ ALL) zugelassen ist (Hochhaus & Kantarjian, 2013). Zu den inhibierten Kinasen zählen unter anderem das Fusionsprotein der Gene *BRC* (*Breakpoint Cluster Region*) und *ABL* (*Abelson Tyrosine Protein Kinase 1*), die Familie der SRC-non-Rezeptor-Tyrosinkinasen (SRC, LCK, HCK, YES, FYN, FGR, BLK, LYN, FRK (*Fyn-Related Src Family Tyrosine Kinase*)), Rezeptor-Tyrosinkinasen (KIT, PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*), DDR1 (*Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 1*), DDR2 (*Discoidin Domain Receptor Tyrosine Kinase 2*), FMS, Ephrin-Rezeptoren) und die Familie der TEC-non-Rezeptor-Tyrosinkinasen (TEC, BTK (*Bruton Agammaglobulinemia Tyrosine Kinase*)).

Willems *et al.* berichten bei ihrer *in vitro* Analyse von vier primären MLS und zwei MLS-Zelllinien (MLS-1765 und MLS-402) von einer signifikanten Aktivierung des SRC-Kinase-Signalweges, weshalb sie anschließend die Zellen mit Dasatinib behandeln. Dies zeigt milde Effekte auf deren Viabilität (maximal 40 % Reduktion) mit einer deutlichen Inhibierung der SRC-Kinaseaktivität. Sie vermuten, dass der *Cross-Talk* anderer Signalwege die Wirkung von Dasatinib reduziert. Daher erachten sie Dasatinib als besser geeignet für eine Kombinationstherapie, als für eine Monotherapie von MLS (Willems *et al.*, 2010).

Sievers *et al.* können ebenfalls eine Aktivierung der SRC-Kinase in primären Liposarkomen, sowie in MLS- und PLS-Liposarkomzelllinien identifizieren. Ihre Behandlung der Zellen mit Dasatinib reduziert die Viabilität aller Subtypen, wovon die MLS am sensitivsten reagieren. Durchflusszytometrieanalysen bestätigen darauf, dass diese Effekte auf gesteigerter Apoptose und verringerter Proliferation beruhen. Weiter führt Dasatinib zu einer verminderten Invasion und Migration der Tumorzellen. Aufgrund seines hohen klinischen Potentials, empfehlen Sievers *et al.*, dass Dasatinib in Kombinationsansätzen für die Therapie von WDLS/DDLS und MLS verwendet werden sollte, um die SRC-Kinase neben IGF1R (*Insulin-Like Growth Factor 1 Receptor*) zu inhibieren (Sievers *et al.*, 2015).

Die Wirksamkeit von Dasatinib bei der Behandlung von fortgeschrittenen Liposarkomen wird derzeit im Rahmen einer Phase II-Studie (NCT00464620) evaluiert.

2.1.2.3.1.2.3 Weitere potentielle neue systemische Chemotherapeutika

Das Behandlungspotential von weiteren Chemotherapeutika für MLS wird derzeit in aktuellen Studien untersucht. Diese umfassen oft alle Subtypen der Liposarkome und ihr Status befindet sich im Moment von der abgeschlossenen Behandlung von wenigen Patienten bis hin zu laufenden klinischen Phase II-Studien. Die Agentien mit denen die MLS dieser Studien behandelt werden umfassen den *DNA-minor-groove*-Binder Brostallicin (Leahy *et al.*, 2007; NCT00633165), PPAR γ -Agonisten, wie Troglitazone (Demetri *et al.*, 1999), Rosiglitazone (Debrock *et al.*, 2003; NCT00004180) und Efatutazone (Pishvaian *et al.*, 2012; NCT02249949), sowie unterschiedliche Inhibitoren der Tyrosinkinase-Rezeptoren, wie Pazopanib (Sleijfer *et al.*, 2009; NCT01692496), Sorafenib (von Mehren *et al.*, 2012) und Sunitinib (Mahmood *et al.*, 2011). Weitere Studien mit einer größeren Patientenzahl sind derzeit initiiert. Basierend auf diesen Studien können die derzeit vielversprechenden Ergebnisse, im Bezug auf die Wirksamkeit bei der Behandlung von MLS, besser evaluiert werden.

2.2 SOX-Transkriptionsfaktoren

Der Transkriptionsfaktor *SRY* (*Sex-determining region Y*) wurde als erstes einer Reihe von Mitgliedern der *SOX*-Transkriptionsfaktorfamilie entdeckt und beschrieben. Weitere *SOX*-Gene wurden im Anschluss aufgrund ihrer Homologie zur HMG-Box-Domäne von *SRY* identifiziert. Aus diesem Grund tragen die Mitgliedern der *SOX*-Transkriptionsfaktorfamilie das Akronym *SOX* für *SRY-related HMG-Box*, gefolgt von einer Nummer, gemäß der Reihenfolge ihrer Entdeckung (Lefebvre *et al.*, 2007). Unter Berücksichtigung der bis dahin entdeckten *SOX*-Gene als Orthologe anderer Spezies (beispielsweise ist murines *Sox12* ein Ortholog des humanen *SOX22*) existieren derzeit 20 *SOX*-Gene im Säugetiergenom (Schepers *et al.*, 2002). Basierend auf der Homologie der HMG-Box-Domäne lässt sich die *SOX*-Familie in acht Gruppen (A bis H), mit den zwei Untergruppen B1 und B2, gliedern (Abbildung 2). Nicht nur in ihrer HMG-Box-Domäne sind *SOX*-Proteine der gleichen Gruppe zu einem hohen Grad identisch (allgemein zwischen 70-95 %),

sondern auch in ihrer übrigen Aminosäuresequenz. Dies spiegelt sich in ähnlichen biochemischen Eigenschaften von SOX-Proteinen der gleichen Gruppe wider (Lefebvre *et al.*, 2007).

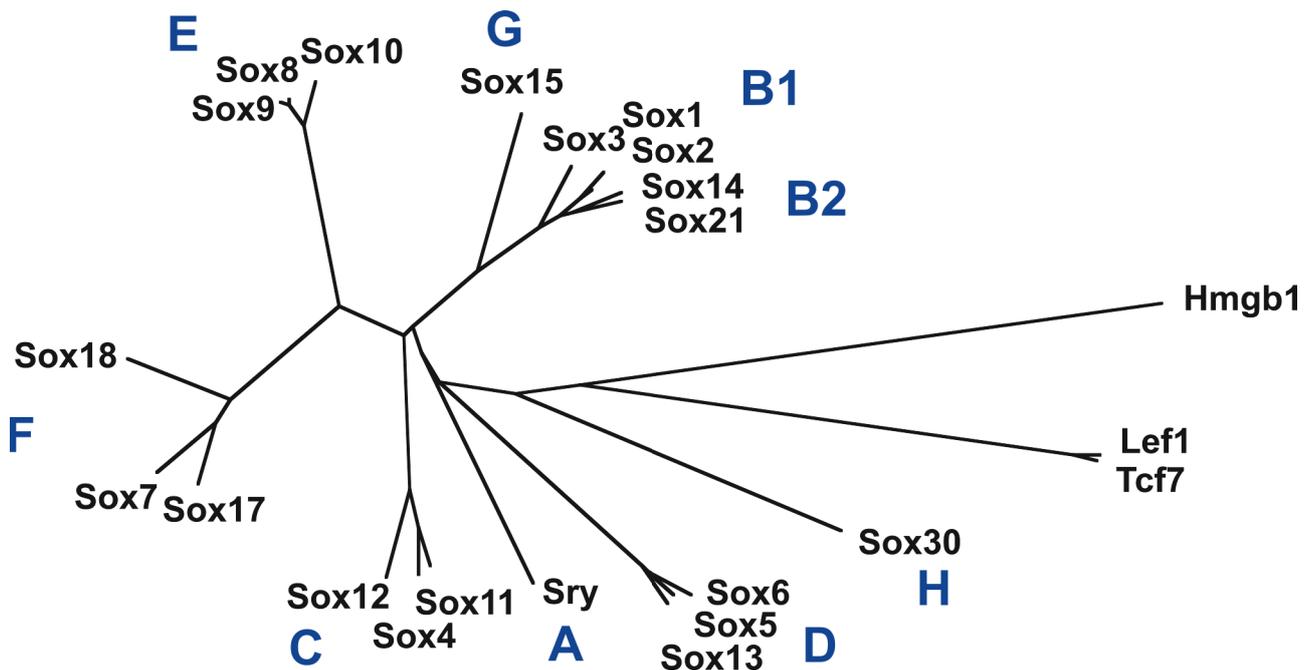


Abbildung 2: Gruppierung der Sox-Proteine.

Der phylogenetische Baum zeigt die acht Gruppen der Sox-Proteine (A-H, mit den zwei Untergruppen B1 und B2). Die Länge der Zweige basiert auf einer diskreten Distanzmatrix, die mit dem *Neighbour-Joining*-Verfahren der *High-Mobility-Group* (HMG)-Domänen der murinen Sox-Proteine im Vergleich zur HMG-Domäne von Lef1 / Tcf7 (*Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 / T-Cell specific Transkription Faktor 7*) und Hmgb1 (*High Mobility Group Box 1*) erstellt wurde (Kamachi & Kondoh, 2013).

2.2.1 Funktionen der SOX-Proteine

Anfänglich wurden die SOX-Proteine als Regulatoren zahlreicher Entwicklungsprozesse charakterisiert. Sie haben Funktionen in Stammzellen, während der frühen Embryogenese, der Gastrulation, der neuralen Induktion, der Bildung unterschiedlicher Organe und Gewebe, sowie bei der Spezifikation und Differenzierung vieler Zelltypen (Guth & Wegner, 2008). Inzwischen gibt es Hinweise darauf, dass die SOX-Proteine zusätzliche Funktionen bei der Homöostase und Regeneration von adulten Geweben besitzen. Darüber hinaus ist eine Dysregulation von SOX-Transkriptionsfaktoren eine mögliche Ursache von kongenitalen Erkrankungen und Krebs (Sarkar & Hochedlinger, 2013).

Allgemein haben die SOX-Proteine die Aufgabe Gene transkriptionell zu regulieren. Dies wird durch die HMG-Box-Domäne ermöglicht, die DNA mit der allgemeinen Konsensus-Sequenz 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)-3' binden kann (Harley *et al.*, 1994). Dieses Motiv ist sehr kurz und variabel, weshalb es sehr häufig im gesamten Genom vorkommt und das spezifische Unterscheiden von Bindestellen prinzipiell ausschließt. Wie SOX-Proteine dennoch verschiedene Bindestellen identifizieren, könnte durch eine unterschiedliche Präferenz für bestimmte

angrenzende Nukleotide der hexameren Kernsequenz oder Varianten der Hexamere selbst erklärt werden. Dieses Konzept ist jedoch bisher noch nicht vollständig verstanden und bildet daher keine Grundlage für die Bindestellen-Prädiktionsalgorithmen der *in silico*-Analysen. Ebenfalls wichtig ist, dass für einige SOX-Transkriptionsfaktoren ein Binden an DNA-Sequenzen von Zielgenen *in vivo* gezeigt wurde, die nur teilweise der Konsensus-Sequenz *in vitro* entsprachen. Dies erschwert die Suche nach Bindestellen in der Praxis. Deutlich wird, dass *in vivo* die DNA-Sequenz nicht der einzige Faktor für das direkte Binden eines SOX-Proteins an sein Zielgen sein kann.

Testet man sie isoliert, so binden SOX-Proteine die DNA nicht nur mit geringer Sequenzspezifität, sondern auch mit einer geringeren Affinität ($K_d \approx 10^{-7}$ - 10^{-9} M) als die meisten Transkriptionsfaktoren ($K_d \approx 10^{-9}$ - 10^{-11} M). Deshalb nutzen manche SOX-Proteine besondere Anordnungen von benachbarten Bindestellen, um ihre Binde-Effektivität zu erhöhen. Dies könnte der Grund für die häufig höhere Anzahl an Bindestellen in den regulierten Promotorregionen sein. Diese Bindestellen, wovon eine in ihrer Sequenz von der eigentlich definierten Bindesequenz abweichen kann, werden zur Bildung von Dimeren durch kooperatives Binden der DNA benötigt. Das bilden von Dimeren kann auch zuvor in Lösung erfolgen, bevor die DNA gebunden wird. Hierbei können diese sowohl als konstitutive Homo- als auch Heterodimere aufgebaut sein. Neben den dimeren Bindestellen existieren weitere Verbundelemente, bei denen sich eine SOX-Bindestelle in der unmittelbaren Nachbarschaft zu einer Bindestelle eines nicht-SOX-Transkriptionsfaktors befindet. In diesem Fall bestimmen meist die Protein-Protein-Oberflächeninteraktionen zwischen den Transkriptionsfaktoren, welches der SOX-Proteine bindet, um den *Enhancer* zu aktivieren (Wegner, 2010; Lefebvre *et al.*, 2007).

Die meisten SOX-Proteine besitzen zusätzlich zu ihrer HMG-Box-Domäne eine oder mehrere weitere funktionelle Domänen, welche hochkonserviert zwischen den Orthologen und Mitgliedern einer Gruppe sind, mit Ausnahme SRY (Abbildung 3). Diese Domänen können in die Dimerisierung, in Transrepression oder Transaktivierung (TA) involviert sein. Hierbei ist die Struktur der TA-Domänen, wie bei den meisten Transkriptionsfaktoren, schlecht analysiert. Sie zeigen erhebliche Unterschiede in ihrer primären Aminosäuresequenz, was wiederum eine Interaktion mit unterschiedlichen Coaktivatoren und unterschiedlichen Komponenten der allgemeinen Transkriptionsmaschinerie denkbar macht. Darüber hinaus besteht Hinweis darauf, dass sich die TA-Domänen möglicherweise unter dem Einfluss interagierender Transkriptionsfaktoren restrukturieren können.

Generell sind die meisten SOX-Proteine Aktivatoren der Transkription. Jedoch kann die Menge eines SOX-Proteins für seine Funktion entscheidend sein und muss daher *in vivo* streng kontrolliert werden. Beispielsweise kann eine zu hohe Abundanz aus einem Aktivator einen Repressor machen. Allerdings wurde in den meisten Studien das intrazelluläre SOX-Protein selten quantitativ betrachtet (Wegner, 2010; Lefebvre *et al.*, 2007).

Weiter beinhaltet die SOX-HMG-Box-Domäne zwei Nukleäre-Lokalisations-Domänen, die unabhängig voneinander und hochkonserviert in allen SOX-Proteinen vorliegen. Ob nukleärer Import und Export zu den allgemeinen Mechanismen zählt, die die SOX-Proteinaktivität *in vivo* regulieren, ist nur für wenige Sox-Proteine erforscht. Meist wird beschrieben, dass die SOX-Proteine im Nukleus lokalisiert sind (Lefebvre *et al.*, 2007).

Zusätzlich zu ihrer Funktion als echte Transkriptionsfaktoren, die sequenzspezifisch an DNA binden, sind die SOX-Proteine in der Lage die DNA-Struktur über ihre HMG-Box-Domäne zu beeinflussen. So kann die HMG-Box-Domäne Änderungen des DNA-Biegungswinkels induzieren, was anderen Transkriptionsfaktoren die DNA-Bindung oder das Bilden von aktiven Proteinkomplexen ermöglichen kann. Bisher konnte allerdings für kein SOX-Protein eine primär-strukturgebender Mechanismus gezeigt werden (Wegner, 2010; Lefebvre *et al.*, 2007).

Neben dem starken direkten Einfluss auf die Transkription gibt es auch Hinweise für zusätzliche indirekte Mechanismen der SOX-Proteine. So üben sie zumindest einige ihrer Funktionen aus, indem sie durch Komplexbildung die Bioverfügbarkeit anderer Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren verändern (Wegner, 2010).

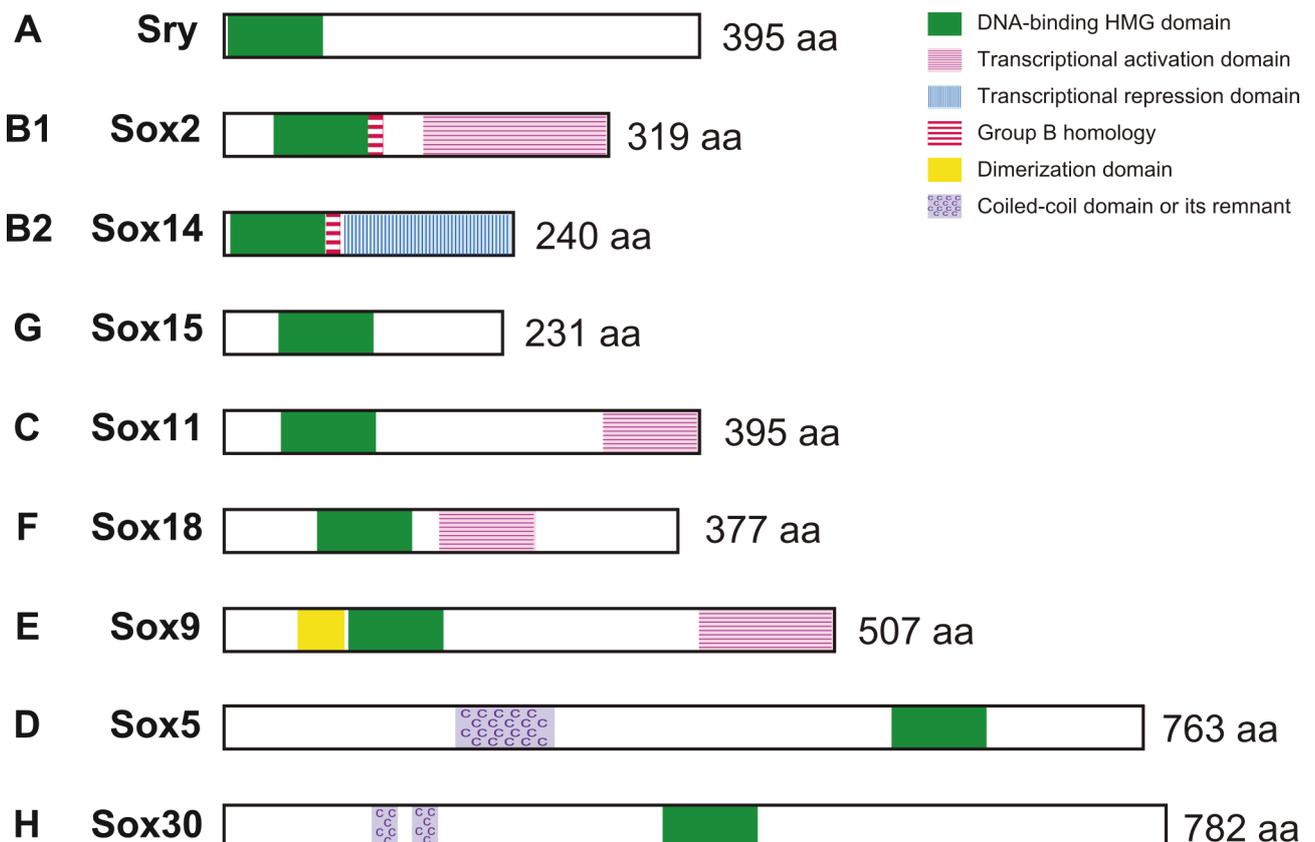


Abbildung 3: Struktur der Sox-Proteine.

Die abgebildeten Proteinstrukturen zeigen repräsentativ für jede Gruppe die funktionellen Domänen der murinen Sox-Proteine. Die gezeigten Basisstrukturen sind hochkonserviert zwischen allen Mitgliedern einer Gruppe (Kamachi & Kondoh, 2013).

2.2.2 Die SOX-Gruppe C

Die SOX-Gruppe C der Familie der SOX-Transkriptionsfaktoren wird durch die Gene *SOX4*, *SOX11* und *SOX12* gebildet. Wie die meisten SOX-Gene, haben alle drei Gene dieser Gruppe ihre wesentliche Aufgabe während der Embryogenese. Ihre jeweilige Expression kann zusammen mit einem oder zwei weiteren Genen der *SOX-Gruppe C* stattfinden und differenziell, teilweise auch sequenziell erfolgen (Chen *et al.*, 2015; Bergsland *et al.*, 2006). Im Falle einer Coexpression ist die Funktion von Sox-Proteinen einer Gruppe oft redundant. Grund hierfür können neben synergistischen auch antagonistische Effekte sein. Abhängig ist dies von der jeweiligen Phase des Entwicklungsprozesses und des individuellen Zelltyps (Wegner, 2010).

Die mRNA aller drei Gene der Sox-Gruppe C wird in den Geweben des zentralen und peripheren Nervensystems von embryonalen Mäusen exprimiert. Dies schließt das Gehirn, das Neuralrohr, die Retina, das olfaktorische Epithel, das Cochlea-Epithel und das Spinalganglion mit ein. Weiter zeigt das Mesenchym des Skeletts und der Gonaden, sowie das Epithel und Mesenchym der Lunge, der Niere und des Mitteldarmtraktes eine Expression aller drei Gene der Sox-Gruppe C. In der Anlage der Augenlider und des Gaumenfortsatzes findet sich eine differenzielle Genexpression, wobei *Sox11* und *Sox12*, jedoch nicht *Sox4*, exprimiert werden. Genauso werden im Herzen *Sox4* und hohe Mengen *Sox12*, jedoch nicht *Sox11*, differenziell exprimiert. In der Anlage der Zähne, in der Milz, im Thymus und den Haarfollikel wird hauptsächlich *Sox4* exprimiert (Dy *et al.*, 2008; Hoser *et al.*, 2008).

Darüber hinaus analysierten Lioubinski *et al.* die Expression der Gene der Sox-Gruppe C im Pankreas von embryonalen Mäusen. Hierbei zeigte sich eine *Sox12*-Expression nur selten und nur in einer sehr frühen embryonalen Phase. Hingegen wird *Sox11* im Pankreas während der gesamten Embryonalentwicklung exprimiert. In den späteren Phasen der Entwicklung findet auch eine *Sox4*-Expression statt. Beschränkt sich zu Beginn der embryonalen Entwicklung die Expression von *Sox11* fast ausschließlich auf das Mesenchym des Pankreas, das beide Epithelknospen umgibt, findet man es später nur noch in den Epithelzellen und in den Langerhans'schen Inseln. Die *Sox4*-Expression findet man fortwährend im Epithel, den Langerhans'schen Inseln und den exokrinen Drüsenzellen des Pankreas (Lioubinski *et al.*, 2003).

Sox4-mRNA wird auch in der Tibia embryonaler Mäuse in den Zonen des mineralisierenden Knorpels exprimiert. Diese Expression besteht über die primäre Ossifikation hinaus, in den hypertrophierenden Chondrozyten (Reppe *et al.*, 2000).

Wahrscheinlich besitzen die Gene der SOX-Gruppe C einen unterschiedlichen Stellenwert für die Embryonalentwicklung. So erliegen Mäuse mit homozygoter *Sox4*-Deletion als Embryo ab Tag E14 einem Kreislaufversagen und haben unterschiedliche Entwicklungsdefekte des Herzens (Schilham *et al.*, 1996). Auch Mäuse mit homozygoter *Sox11*-Deletion sterben als Embryo mit schweren Organdefekten (Sock *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu scheint *Sox12* eine weniger

essentielle Rolle in der Embryonalentwicklung einzunehmen, da sich Mäuse mit homozygoter *Sox12*-Deletion normal entwickeln und vital sind (Hoser *et al.*, 2008).

Neben der Embryonalentwicklung findet sich auch in einigen wenigen adulten Geweben eine Expression der Gene der SOX-Gruppe C. So konnten hohe Expressionslevel von *Sox4* in Thymus, Testes und Ovarien adulter Mäuse und geringe Expressionslevel in Lymphknoten, Lunge und Herzen nachgewiesen werden. Im gesamten Gehirn von neonatalen Mäuse lässt sich ebenfalls eine *Sox4*-Expression detektieren. Diese nimmt aber im Verlauf der weiteren Entwicklung ab. Ebenso findet sich eine *Sox4*-Expression in den unreifen B- und T-Zell-Lymphozyten adulter Mäuse (van de Wetering *et al.*, 1993). *SOX11* wird laut Meta-Analyse fast ausschließlich in der Prostata im adulten Normalgeweben exprimiert. Daneben gibt es wenige Hinweise auf eine Expression in mesenchymalen Stammzellen (Brennan *et al.*, 2009). Die mRNA von *SOX12* wird in allen humanen adulten Geweben exprimiert, darunter vor allem im Herz, im Pankreas, den Testes und den Ovarien (Jay *et al.*, 1997).

Zusammenfassend werden die Gene der SOX-Gruppe C während der Embryonalentwicklung in neuronalen und mesenchymalen Geweben zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit zeitlich komplexem Verlauf exprimiert. Eine Expression in adulten Geweben findet sich unter physiologischen Bedingungen, mit Ausnahme von *SOX12*, äußerst selten.

2.2.3 SOX11

SOX11 (*SRY (Sex-determining region Y)-Box 11*) ist ein 8718 bp langes Gen ohne Intron, das auf Chromosom 2p25.2 lokalisiert ist. Das Protein besteht aus 441 Aminosäuren und besitzt zwei funktionelle Domänen: Die HMG-Box-Domäne am Amino-Terminus (Aminosäuren 47 bis 122) und die Transaktivierungs-Domäne am Carboxy-Terminus (Aminosäuren 408 bis 441). Zwischen den drei Proteinen der SOX-Gruppe C ist die Aminosäuresequenz der HMG-Box-Domäne zu 84 % und die der TA-Domäne zu 66 % identisch (Dy *et al.*, 2008).

Wie bereits erwähnt wird *SOX11* weitreichend während verschiedener Phasen der Embryonalentwicklung exprimiert. Es nimmt eine entscheidende Rolle in der embryonalen Neurogenese ein, indem es die Reifung von neuronalen Vorläuferzellen fördert und an der Gestaltung und Erhaltung der Dendriten von früh-entwickelten Neuronen des Cortex beteiligt ist (Bergsland *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2015).

Weiter ist *SOX11* an der embryonalen Entwicklung der Zellen der Neuralleiste und deren Nachkommen beteiligt. Die Expression in den mesenchymalen und epithelialen Kompartimenten deutet auf einen Anteil an der embryonalen Um- und Neugestaltung von Geweben hin, womöglich im Rahmen der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT). *Sox11*-defiziente Mäuse sterben früh nach der Geburt an kongenitaler Zyanose aufgrund schwerer Defekte des Herzens. Des Weiteren zeigen sie eine Asplenie, eine Hypoplasie von Lunge, Magen und Pankreas, sowie eine

verspätete Ossifikation. Letzteres weist ebenfalls auf eine Beteiligung an der Osteogenese hin (Sock *et al.*, 2004). Sox11 ist wahrscheinlich auch in die morphogenetischen Prozesse der frühen Augenentwicklung involviert, da Sox11-defiziente Mäuse auch zahlreiche schwere Augendefekte bei der Geburt aufweisen (Wurm *et al.*, 2008).

Nach der Embryonalentwicklung, im adulten Gewebe, hat SOX11 nur noch Anteil an wenigen Prozessen. So findet sich eine sehr geringe SOX11-Expression in den adulten Geweben des Dünn- und Dickdarms, des Herzens und des Gehirns (Weigle *et al.*, 2005). Weiter weisen die Prostata und seltener mesenchymale Stammzellen eine Expression von SOX11 auf (Brennan *et al.*, 2009).

Darüber hinaus exprimieren periphere Nerven nach Verletzung SOX11. Wahrscheinlich ist es dort am Neuritenwachstum beteiligt und nimmt eine wichtige Rolle bei der Regeneration der Axone ein (Patodia & Raivich, 2012). Neuere Studien in Mäusen beschreiben, dass eine forcierte Sox11-Expression effektiv die Regeneration von Nervenschäden fördert. Sox11 wird nicht in den Neuronen des Spinalganglions und der Pyramidenbahn nach zentraler spinaler Axonverletzung hochreguliert. Wird die Expression von Sox11 jedoch forciert, ist dies ausreichend um das Wachstum der Axonen der Pyramidenbahn zu steigern. Die Funktion des Bewegungsapparates wird dabei aber nicht wiederhergestellt (Wang *et al.*, 2015). Ähnlich begünstigt eine forcierte Sox11-Expression die Wiederherstellung des Rückenmarks nach vorangegangener Verletzung. Grund hierfür könnte eine neuronale Differenzierung der endogenen neuralen Stammzellen sein, die während der Regeneration in das Rückenmark migrieren (Guo *et al.*, 2014).

Um seine Funktion auszuüben, muss SOX11 mit seiner HMG-Box-Domäne die DNA binden. Für humanes SOX11 ist jedoch bisher keine explizite DNA-Bindesequenz definiert worden. Die JASPAR-Datenbank (Mathelier *et al.*, 2014) verzeichnet für Sox11 ausschließlich zwei Bindesequenzen in *Mus Musculus* 5'-AATTGT-3' und 5'-AACAA(A/T)-3', wobei letztere die wahrscheinlichere für die humane DNA-Bindung darstellt. Dennoch konnte das SOX11-DNA-Bindemotiv 5'-ACAA(A/T)-3' (bzw. 3'-(T/A)TTGT-5' auf dem komplementären DNA-Strang) in Chromatin-Immunopräzipitations (ChIP)-Experimenten unabhängig voneinander in murinen Embryonalstammzellen und in humanen Mantelzell-Lymphomen (MCL) identifiziert (Bergsland *et al.*, 2011; Kuo *et al.*, 2014).

Interessant ist, dass die DNA von Sox11 *in vitro* nur sehr schwach gebunden wird (beispielsweise in Elektromobilitätshift-Assays (EMSA)). Grund hierfür scheint eine auto-regulatorische Region in Sox11 zu sein, welche die HMG-Box-Domäne am Binden der DNA hindert. Diese Inhibition kann durch Protein-Protein-Interaktionen der TA-Domäne von Sox11 aufgehoben werden. *In vivo* hat dieser auto-regulatorische Inhibierungsmechanismus allerdings keine Relevanz, wie es beispielsweise in HeLa-Zellen gezeigt werden konnte (Wiebe *et al.*, 2003).

Zu etablierten direkten Zielgenen von SOX11 zählt *TUBB3* (*Tubulin beta, Class III*). *TUBB3* ist eine der sieben Tubulin-Isoformen des humanen Genoms und wird hauptsächlich in neuronalen Geweben exprimiert, wo es die Bildung der Microtubuli reguliert. Darüber hinaus gilt es als prognostischer Marker für solide Tumoren. Zahlreiche ChIP-Experimente in murinen und humanen Zelllinien, sowie Dosis-abhängige EMSAs zeigen ein direktes Binden der Promotor-DNA von *TUBB3* durch SOX11 *in vitro*. Weiter wurde die direkte Regulation von *Tubb3* durch Sox11 in den neuronalen Geweben von Mäusen *in vivo* bestätigt (Dy *et al.*, 2008; Bergsland *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2010; Bergsland *et al.*, 2011; Sha *et al.*, 2012).

LHX2 (*LIM Homeobox 2*) könnte ein weiteres potentiell direktes Zielgen von SOX11 sein. *LHX2* ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Kontrolle der Zelldifferenzierung bei der Entwicklung von lymphoiden (B-Zellen) und neuralen Zellen (Gehirn, Auge) beteiligt ist. So wurde *LHX2* in frühen Neuronen, die aus murinen embryonalen Stammzellen gewonnen wurden, und bei der umfangreichen Analyse von MCL-Zelllinien als direktes Zielgen von SOX11 identifiziert (Bergsland *et al.*, 2011; Vegliante *et al.*, 2013).

Neben *LHX2* wurde auch *CD24* (*Cluster of Differentiation 24*) als weiteres potentiell direktes Zielgen von SOX11 in MCL-Zellen gefunden. *CD24* ist ein Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-geankertes Glykoprotein, das auf der Oberfläche der meisten B-Lymphozyten und differenzierenden Neuroblasten gefunden wird. Zudem konnte gezeigt werden, dass *CD24* in neuronalen SH-SY5Y-Zellen wahrscheinlich zu einem *Cluster* an SOX11-Zielgenen auf Chromosom 6 gehört. (Wang *et al.*, 2010; Vegliante *et al.*, 2013; Sha *et al.*, 2012).

2.2.3.1 Die Rolle von SOX11 in der Tumorigenese

Allgemein ist die funktionelle Bedeutung der SOX-Transkriptionsfaktoren in der Tumorigenese nur wenig erforscht. Die meisten Publikationen korrelieren den Expressionsstatus der SOX-Gene in Tumoren mit Tumoreigenschaften und -verhalten. Über die kausalen Zusammenhänge von SOX11 und der Tumorigenese ist nur wenig bekannt.

Beispielsweise konnte SOX11 in 81,67 % der untersuchten Prostatahyperplasien nachgewiesen werden, jedoch nur in 16,67 % der Prostatakarzinome. Weiter konnte nach Überexpression von SOX11 in Prostatakarzinomzellen *in vitro* eine verminderte Migration und Invasion beobachtet werden (Yao *et al.*, 2015).

Xu *et al.* untersuchten die SOX11-Expression in primären Magenkarzinomen, korrespondierender nicht-maligner Mukosa, fünf Magenkarzinom- und einer Mukosazelllinie. Dabei fanden sie in den Karzinomen im Vergleich zu den nicht-malignen Geweben und Zellen eine signifikant geringere SOX11-Expression. Als mögliche Ursache hierfür vermuten sie eine Promotor-Hypermethylierung von SOX11. Ebenso korrelierte DNA-Hypermethylierung mit schlechter Prognose und die Azacitidin-Behandlung von Magenkarzinomzellen führte zu einer Re-expression von SOX11.

Weiter führte die Behandlung mit Azacitidin zu einer Inhibierung der Proliferation, weshalb sie von einer Wirkung von SOX11 als Tumorsuppressoren in Magenkarzinomen ausgehen (Xu *et al.*, 2015). Ähnliches beschrieben zuvor Qu *et al.*, die eine reduzierte Migration und Invasion von Magenkarzinomzellen nach SOX11-Überexpression *in vitro* und *in vivo* zeigen. Sie identifizierten zudem SOX11 als prognostischen Faktor für das Überleben von Patienten mit Magenkarzinom und als potentiellen Marker für einen intestinalen Subtyp (Qu *et al.*, 2014).

In Nasopharynxkarzinomen könnte SOX11 ebenfalls eine tumorsuppressive Rolle einnehmen. Zhang *et al.* untersuchten hierzu Karzinome und chronisch inflammatorische Gewebe des Nasopharynx auf ihre SOX11-Expression und dessen Promotor-Methylierungsstatus. Dabei zeigten alle unmethylierten Karzinome und alle chronisch inflammatorischen Gewebe eine starke SOX11-Expression, alle methylierten Karzinome eine schwache. Ebenso reduzierte sich das Zellwachstum und das Invasionsverhalten einer Nasopharynxkarzinomzelllinie, nachdem diese mit Decitabin behandelt wurde und SOX11 re-exprimierte (Zhang *et al.*, 2013).

Korkolopoulou *et al.* bestärken die tumorsuppressiven Eigenschaften von SOX11. Bei ihrer Untersuchung einer Patienten-Kohorte mit supratentoriellen diffus infiltrierenden Astrozytomen (Grade II-IV) und einer aus Glioblastompatienten bestehenden Validierungskohorte fanden sie eine SOX11-Expression in allen Astrozytomen und 93 % aller Glioblastome. Dies steht im Einklang mit der Studie von Weigle *et al.*, die eine Überexpression von SOX11 in ihrer Kohorte von malignen Gliomen identifizierten (Weigle *et al.*, 2005). Dabei stellt sich SOX11 als unabhängiger prognostischer Faktor dar, dessen hohe Expression mit einem besseren Gesamtüberleben korreliert (Korkolopoulou *et al.*, 2013). Eine Bedeutung von SOX11 für neurologische Tumoren zeigt sich auch in tumorigenen murinen Gliomzellen. Diese haben ihre Sox11-Expression *in vivo* verloren und eine Sox11-Überexpression *in vitro* inhibiert die Tumorigenese durch neuronale Differenzierung. Hide *et al.* vermuten diese Eigenschaften auch in humanen Gliom-initiiierenden Zellen (GIC), die ähnlich ihre SOX11-Expression verloren haben und sich auch hier die Tumorigenese durch SOX11-Überexpression *in vivo* verhindern lässt. Zusätzlich vermittelt eine Überexpression von SOX11 eine höhere Sensitivität von GIC gegenüber den Chemotherapeutika Taxol und Etoposid und ein Knockdown von SOX11 in nicht-GIC führt zu einer malignen Entartung der Zellen. Weiter lassen sich geringe SOX11-mRNA-Mengen mit dem schlechteren Überleben von Gliompatienten korrelieren (Hide *et al.*, 2009). Zu den weiteren neurologischen Tumorerkrankungen, die eine erhöhte SOX11-Expression besitzen, gehören Meningiome (Stuart *et al.*, 2011) sowie pädiatrische Medullablastome und Ependymome (de Bont *et al.*, 2007).

Ovarialkarzinome exprimieren ebenso SOX11, was mit einem besseren Überleben von Patienten mit *high-grade* epithelialen Ovarialkarzinom (EOC) assoziiert ist. Weiter verursacht eine SOX11-Überexpression in EOC-Zellen eine verminderte Proliferation und vermindertes Zellwachstum (Sernbo *et al.*, 2011). Auch Brennan *et al.* beschreiben eine Hochregulation der SOX11-mRNA in EOCs im Vergleich zu Normalgeweben. Die Analyse ihrer Kohorte zeigte eine

hohe Expression in 40 % der Fälle und korrelierte mit Rezidiv-freiem Überleben nach Resektion. Daher empfehlen sie *SOX11* als prognostischen Marker für EOC (Brennan *et al.*, 2009).

Eine Expression von *SOX11* wurde auch in Progesteronrezeptor-negativen Mammakarzinomen entdeckt (Lopez *et al.*, 2011). Ebenso exprimieren murine Mammakarzinome mit *Brca1* (*Breast Cancer 1, Early Onset*)-Deletion in hoher Menge *Sox11*. Zvelebil *et al.* beschreiben zudem eine verminderte Proliferation und höherer Apoptose von Mammakarzinomzelllinien nach *Knockdown* von *SOX11*. Hingegen führt die *SOX11*-Überexpression zu gesteigerter Proliferation (Zvelebil *et al.*, 2013).

Zudem exprimieren einige Burkitt-Lymphom-, Mantelzell-Lymphom-, Mammakarzinom-, Ovarialkarzinom-, Neuroblastom- und kleinzelliges Bronchiolalkarzinom (SCLC)-Zelllinien *SOX11* (Nordström *et al.*, 2015; Castillo *et al.*, 2011).

Neben seiner häufig beschriebenen tumorsuppressiven Rolle scheint *SOX11* in Mantelzell-Lymphomen vom klassischen Typ onkogene Eigenschaften zu besitzen. So wird in der Immunhistochemie der MCL eine spezifische Hochregulation von *SOX11* als Diskriminierungsmarker zur Differenzierung von anderen B-Zell-Lymphomen, wie Follikuläres Lymphom (FL) und Chronischer lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL), genutzt. Benigne Tonsillen exprimieren hingegen kein *SOX11* (Ek *et al.*, 2008). Überexpression von *SOX11* ist unabhängig vom diagnostischen Marker *CCND1* (Cyclin D1) und identifiziert MCL selbst in der *CCND1*-negativen Subgruppe der MCL-Patienten (Mozos *et al.*, 2009). Außerdem dient *SOX11* in Blutproben als Marker für minimale Resterkrankung bei MCL. Die Korrelation von klinischen Status und *SOX11*-Expression ist hierbei vergleichbar mit der Diagnostik der t(11;14)-Translokation in MCL (Simonsen *et al.*, 2013).

Aktuell wird vermutet, dass *SOX11* in B-Zellen die Spitze eines onkogenen transkriptionellen Netzwerkes einnimmt und zur Transformation führt. So aktiviert *SOX11* in MCL konstitutiv sein direktes Zielgen *PAX5* (*Paired Box 5*) und dessen Signalwege, was zu einer Blockade in der terminalen Differenzierung der B-Zellen führt (Ferrando, 2013; Vegliante *et al.*, 2013). Ebenso führt die Expression von *SOX11* zu einem gesteigerten Tumorstadium und aggressiveren Verhalten von MCL, da es durch die eine Aktivierung seines direkten Zielgens *PDGFA* (*Platelet-Derived Growth Factor Alpha*) die Angiogenese und damit eine vaskuläre Tumormikroumgebung begünstigt (Palomero *et al.*, 2015).

In Weichgewebesarkomen war die Expression von *SOX11* oder seine Funktion in der Tumorigenese bisher weitestgehend unbekannt. Lediglich Misemer *et al.* zeigen in Gewebeproben mit aggressiver Fibromatose, dass nur aktivere Zellen *SOX11* exprimieren. Dabei ist *SOX11* hauptsächlich in Nucleus lokalisiert. In einer *follow-up*-Studie ließ sich eine geringe

SOX11-Expression mit einer schlechten klinischen Prognose und früher Rezidiv korrelieren (Misemer *et al.*, 2013).

2.2.3.2 Regulation der SOX11-Expression

Über die Regulation der SOX11-Expression ist bisher wenig bekannt, jedoch gibt es einige Hinweise auf epigenetische Regulationen. Die stattfindenden epigenetischen Ereignisse scheinen sich hierbei nicht nur auf *SOX11* während der Embryonalentwicklung und der normalen physiologischen Funktion auszuwirken, sondern auch eine Bedeutung bei der Entstehung einiger Tumorerkrankungen zu haben.

Pamnani *et al.* berichten von einer inversen Korrelation von Expression und Methylierung des Promotors von *Sox11* in den Gehirn-, Testikel- und Nierengewebe von Mäusen während der unterschiedlichen Entwicklungsstadien. So ist der Promotor während des Embryonal- und Neonatalstadiums wenig, im adulten Gewebe jedoch stark methyliert. Daher sehen sie die Methylierungsdynamik des Promotors als die Ursache für die Regulation der *Sox11*-Genexpression in den betroffenen Geweben (Pamnani *et al.*, 2014).

Als weiterer Regulator hält CHD7 (*Chromatin Remodeler Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7*), das in die Symptomatik des CHARGE-Syndrom und die Neurogenese involviert ist, den Promotor von *Sox11* in neuronalen Stammzellen (NSC) in einem Status offenen Chromatins. So führt der Verlust von CHD7 zu einer Reduzierung der aktivierenden H3K4me3 (*Trimethylated lysine 4 of histone H3*)-Markierungen des *Sox11* Promotors, jedoch zu keinen Änderungen der reprimierenden H3K27me3 (*Trimethylated lysine 27 of histone H3*)-Markierungen (Feng *et al.*, 2013).

Mikkelsen *et al.* veröffentlichten ebenfalls, dass der Promotor von *Sox11* in pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESC) sowohl mit aktivierenden H3K4me3- und reprimierenden H3K27me3-Markierungen versehen ist, wohingegen in neuronalen Vorläuferzellen (NPC) und embryonalen Mausfibroblasten (MEF) nur die aktivierende H3K4me3-Markierungen zu finden sind (Mikkelsen *et al.*, 2007).

Auch Vegliante *et al.* berichten, dass in ESC und einigen untersuchten B-Zell-Neoplasien die SOX11-Expression mit den aktivierenden Histon-Markern H3K9/14Ac (*Histone H3 acetylated at lysines 9 and 14*) und H3K4me3 korrelieren. Im Gegensatz dazu zeigen adulte Stammzellen (mesenchymale Stammzellen (MSC) und multipotente adulte Vorläuferzellen (MAPC)), normale hämatopoetische Zellen und die anderen untersuchten lymphoiden Tumoren, alle ohne SOX11-Expression, dass am *SOX11*-Promoter die reprimierenden Marker H3K9me2 (*Dimethylated lysine 9 of histone H3*) und H3K27me3 überwiegen. Weiter ist eine Behandlung mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor SAHA (Suberoylanilid-hydroxamsäure; Vorinostat), jedoch nicht mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor AZA (5-aza-2'-deoxycytidine;

Decitabin), in der Lage stillgelegtes *SOX11* in Lymphomzelllinien mit unterschiedlicher *SOX11*-Promotor-Methylierung zu re-exprimieren (Vegliante *et al.*, 2011).

Gustavsson *et al.* gehen von einer möglichen Funktion von *SOX11* als Tumorsuppressor in hämatopoietischen Tumoren aus, da *SOX11* ein negativer Regulator des Zellwachstums und der Proliferation in Lymphomzelllinien *in vitro* ist. Weiter zeigt die Analyse des *SOX11*-Promotors von B-Zell-Lymphomen, dass dort die Expression von *SOX11* durch Promotor-Methylierung stillgelegt wird und wahrscheinlich epigenetisch reguliert ist (Gustavsson *et al.*, 2010).

Tong *et al.* finden bei ihrer genomweiten Untersuchung von aberranten DNA-Methylierungen in Chronischer lymphatischer Leukämie eine häufige Methylierung des *SOX11*-Promotors. Eine angeschlossene klinische Studie mit Hinblick auf das Ansprechen der identifizierten Gene auf eine epigenetische Therapie mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Azacitidin (5'-Azacytidin; Vidaza) zeigte in den bis dahin untersuchten zwei Patienten eine Reduktion der *SOX11*-Promotor-Methylierung nach 49 Tagen bzw. dem ersten und zweiten Zyklus der Behandlung (Tong *et al.*, 2010).

In den von Ihnen untersuchten primären Mantelzell-Lymphomen und nicht-malignen lymphoiden Geweben (Tonsillen, Lymphknoten und Milz) fanden Wasik *et al.* eine unterschiedliche *SOX11*-Expression, jedoch besaßen alle (mit einer Ausnahme) einen hypomethylierten Promotor. *SOX11* wurde in ungefähr 90 % aller untersuchten MCL exprimiert, dagegen in keinem nicht-malignen Gewebe. Zu dem vermuten sie, dass andere durch Methylierung bedingte Mechanismen außerhalb der von ihnen untersuchten *SOX11*-Promotor Region für eine *SOX11*-Expression notwendig sind. So konnte die Behandlung mit Azacitidin in den lymphoiden Zelllinien mit hypomethylierten Promotor die *SOX11*-Expression reduzieren (Wasik *et al.*, 2013).

Neben den hämatopoietischen Tumorerkrankungen finden sich weitere Hinweise für eine funktionelle Bedeutung der epigenetischen Regulation von *SOX11* in anderen Tumorerkrankungen.

So kann der Methylierungsstatus von *SOX11*, als Teil eines aus fünf Genen bestehenden epigenetischen Biomarker-Panel, zur Detektion von Blasentumoren im frühen Stadium verwendet werden (Chung *et al.*, 2011).

Xu *et al.* zeigen, dass der *SOX11*-Promotor in Magenkrebszelllinien häufig hypermethyliert ist, in nicht-malignen Geweben hingegen eher selten. Weiter führt die Re-expression von *SOX11* nach AZA-Behandlung *in vitro* zur Inhibierung der Proliferation und die Hypermethylierung des Promotors zu einer schlechteren Prognose *in vivo* (Xu *et al.*, 2015).

In epithelialen Ovarialkarzinomen ist der *SOX11*-Promotor ebenfalls hypermethyliert (Sernbo *et al.*, 2011). Ebenso ist dieser in Patienten mit Lymphknotenmetastasen signifikant

stärker methyliert als in Patienten ohne metastasierendes Nasopharyngealkarzinom. Zudem führt die Behandlung einer Nasopharyngealkarzinomzelllinie mit AZA zur Re-expression von SOX11-mRNA und -Protein und verursacht eine Inhibierung des Zellwachstums und -invasion (Zhang *et al.*, 2013).

Schließlich zeigen Nordström *et al.*, dass neben der Methylierung von DNA und Histonen auch der Acetylierungsstatus an der Regulation von SOX11 beteiligt ist. Bei der Behandlung von Zellen unterschiedlicher Tumorentitäten mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren (Vorinostat und Trichostatin A) waren diese in der Lage in drei von fünf Zelllinien ohne Methylierung SOX11 zu re-exprimieren. In Zelllinien mit Methylierung kam es in keinem Fall zu einer Re-expression von SOX11 (Nordström *et al.*, 2015).

Renner *et al.* veröffentlichen zum Methylierungsstatus der Promotorregion von SOX11 in Weichgewebssarkomen eine Analyse von zwei CpG-Stellen in 74 primären, unbehandelten, *high-grade* Weichgewebssarkomen relevanter Subtypen einschließlich zwei nicht-malignen Fettgeweben. Hierbei sind 17 (23 %) der Weichgewebssarkome mit unterschiedlichem Subtyp an einer CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin)-Stelle hypermethyliert, eines an beiden, ansonsten liegt die untersuchte Promotorregion von SOX11 hypomethyliert in den untersuchten Weichgewebesarkomen vor. Für die Gruppe der Liposarkome (DDLs, MLS, PLS) sind fünf von 28 (18 %) an jeweils einer CpG-Stelle hypermethyliert (zwei DDLs, drei PLS), alle übrigen sind, wie das nicht-maligne Fettgewebe hypomethyliert. Erwähnenswert ist, dass alle der neun untersuchten MLS hypomethyliert sind und alle, im Gegensatz zu den Liposarkomen anderer Subtypen, eine hohe SOX11-Expression besitzen. In der untersuchten Kohorte ließ sich jedoch keine signifikante Korrelation zwischen Methylierungsstatus und SOX11-Expression in Weichgewebesarkomen erkennen (Renner *et al.*, 2013).

2.2.3.3 Genetische Aberrationen von SOX11

2.2.3.3.1 Keimbahnmutationen

Bei der Sequenzierung von 79 Patienten mit Mikrophthalmie, Anophthalmie (zu kleine oder abnorme Augen) und Kolobom (Fehlen von Teilen des Augengewebes) wurden zwei unterschiedliche Keimbahnmutationen in SOX11 identifiziert. Ein Patient zeigte eine heterozygote *missense*-Mutation (c.488G>T (p.G145C)) und ein weiterer wies eine heterozygote *in-frame*-Duplikation (c.1106-1117 (p.S351-354dup)) auf. Beide genetischen Aberrationen beeinflussen die Funktionalität von SOX11 und scheinen sich auf die Augenentwicklung auszuwirken. In einem Reporter-Assay waren beide SOX11-Varianten nicht mehr in der Lage die Expression des bekannten SOX11-Zielgens *GDF5* (*Growth Differentiation Factor 5*) zu aktivieren. Darüber hinaus konnten beide SOX11-Varianten nicht den auftretenden Linsendefekt oder Kolobome im Zebrafisch nach *Sox11-knockout* aufheben. Auch führte die Überexpression der

beiden SOX11-Varianten in *Danio rerio*, im Gegensatz zu nicht-mutiertem SOX11, zu einem zyklischen Phänotyp (Pillai-Kastoori *et al.*, 2014).

Weitere SOX11-Keimbahnmutationen wurden bei Patienten mit Coffin-Siris-Syndrom (CSS) identifiziert, eine sehr seltene genetisch bedingte Erkrankung, die durch Wachstumsdefizite, leichte bis schwere Behinderung, charakteristische Gesichtszüge und hypoplastischen Nägeln der kleinen Finger und Zehen gekennzeichnet ist. Tsurusaki *et al.* identifizierten bei der Sequenzierung von 92 Patienten mit Coffin-Siris-Syndrom zwei Patienten mit jeweils einer SOX11-Mutation (c.347A>G (p.Y116C); c.178T>C (p.S60P)), die beide in der HMG-Box-Domäne lokalisiert sind. Beide SOX11-Mutationen führen ebenfalls in Reporter-Assays zu einer starken Reduktion der Aktivierung des GDF5-Promoters und sind nicht in der Lage einen normalen Phänotyp in *Danio rerio* mit Sox11-Knockout wiederherzustellen (Tsurusaki *et al.*, 2014).

Basierend auf den Beobachtungen von Tsurusaki *et al.* sequenzierten Hempel *et al.* Patienten mit neurologischen Entwicklungserkrankungen (Mikrozephalie, Entwicklungsverzögerungen und dysmorphe Veränderungen ähnlich eines milden CSS). Dabei identifizierten sie sieben Deletionen der Region 2p25, in der SOX11 lokalisiert ist, und drei neue Keimbahnmutationen von SOX11: Eine nonsense- (c.87C>A (p.C29*)) und zwei missense-Mutationen (c.150G>C (p.K50N); c.359C>A (p.P120H)). Eine weitere Charakterisierung der beiden missense-Mutationen durch Reporter-Assays zeigte, dass diese den Promoter des Zielgens GDF5 auch nur eingeschränkt aktivieren können (Hempel *et al.*, 2015).

2.2.3.3.2 Somatische Mutationen

Bei der Exom-Sequenzierung von 16 Oligodendrogliomen mit einer 1p/19q-Codeletion fanden Yip *et al.* insgesamt 340 somatische Single-nucleotide Variants (SNV), wovon 54 Mutationen des gleichen Gens in mehr als zwei Proben auftraten. Darunter befanden sich auch zwei rekurrente somatische SOX11-Mutationen (c.103G>A (p.D35N); c.95T>G (p.V32G)) (Yip *et al.*, 2012).

Rudin *et al.* identifizierten bei einer umfangreichen genetischen Analyse von 80 humanen SCLC in elf Tumoren somatische Mutationen, jeweils exklusiv eines einzelnen SOX-Gens. Darunter ein Tumor mit einer heterozygoten nonsense-Mutation (c.301G>T (p.E101*)) in der HMG-Box-Domäne von SOX11 (Rudin *et al.*, 2012).

Da die HMG-Box- und TA-Domäne der Transkriptionsfaktoren der SOX-Gruppe C hohe Homologien besitzen, sind auch Mutationen von SOX4 und SOX12 von Interesse im Hinblick auf SOX11. So untersuchten Medina *et al.* 70 primäre nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (NSCLC) und 85 Bronchialkarzinomzelllinien auf aktivierende SOX4-Mutationen, nachdem sie eine SOX4-Überexpression identifiziert hatten. Hierbei entdeckten sie eine somatische nonsense-Mutation von SOX4 (c.1207C>A (p.S395X)) in einem primären Plattenepithelkarzinom der Lunge (SCC) (Medina *et al.*, 2009). Das durch diese nonsense-Mutation eingeführte Stoppcodon führt zu einem Verlust der TA-Domäne und damit zur Überexpression des verkürzten

Proteins. Ursächlich ist wahrscheinlich eine längere Proteinhalbwertszeit, da die TA-Domäne an der proteosomalen Degradation von SOX4 beteiligt ist (Vervoort *et al.* 2012). Reporter-Assays zeigen zudem den kompletten Verlust der transkriptionellen Aktivität dieser SOX4-Mutation. Ebenso reduziert die SOX4-Mutante die Transformationsfähigkeit von NIH3T3-Zellen, die mit dem aktivierten Onkoprotein HRAS-G12V cotransfiziert wurden. Auf die Transformationsfähigkeit von NIH3T3-Zellen, die mit dem aktivierten Onkoprotein RHOA-Q63L cotransfiziert wurden, hatte die SOX4-Mutante allerdings keine Auswirkung. So führt diese Mutation zwar zu einer Überexpression, jedoch besitzt sie im Gegensatz zu nicht-mutiertem SOX4 kein onkogenes Potential (Medina *et al.*, 2009).

Aktuell sind relativ zu allen in der COSMIC- und cBioPortal-Datenbank hinterlegten Mutationen (3.702.312 codierende Mutationen in 1.177.397 Proben) lediglich 152 SOX11-Mutationen beschrieben (Stand 22.05.2015) (Forbes *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2013) (Abbildung 15). Von den identifizierten somatischen Mutationen führen potentiell die *missense*-, *nonsense*- oder komplexen Mutationen der HMG-Box-Domäne (48-118 aa) von SOX11 zur Beeinträchtigung der Funktion des Transkriptionsfaktors. Ebenso können *missense*- und *nonsense*-Mutationen der TA-Domäne (408-441 aa) und grundsätzlich *frame-shift*-Mutationen zur weiteren Beeinflussung der Funktion führen. Allerdings sind diese funktionellen Auswirkungen von somatischen SOX11-Mutationen kaum in der Literatur beschrieben.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in Standardzellkulturplatten in entsprechendem Kulturmedium bei 37 °C, 95 %rH, 5 % CO₂ unter sterilen Bedingungen kultiviert (Tabelle 1). Hierbei wurden die adhärennten Zellen bei Subkonfluenz (80-90 %) mit *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) ohne Ca²⁺ / Mg²⁺ gewaschen und mit 0,05 % Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Trypsinierung gestoppt, indem die Reaktion durch Zugabe des entsprechendem Kulturmedium inaktiviert wurde. Im Anschluss wurden die Zellen je nach Zelllinie im Verhältnis 1:5 bis 1:20 in neue Standardzellkulturplatten passagiert. Nach 20 Passagen wurden die Zellen verworfen und eine neue Charge aufgetaut. Die regelmäßigen Kontrollen auf Mykoplasmen-Kontamination wurden mit dem *Lonza MycoAlert™ PLUS Mycoplasma Detection Kit* durchgeführt.

Tabelle 1: Zelllinien und Kultivierungsbedingungen.

Die Tabelle zeigt die verwendeten Zelllinien, den Sarkomtyp, aus dem sie ursprünglich generiert worden sind, den diagnostisch relevanten molekularen Nachweis und das verwendete Kulturmedium; DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, FCS: *fetal calf serum*, P/S: Penicillin / Streptomycin.

Zelllinie	Typ	Molekularer Nachweis	Kulturmedium	Zusätze	Referenz / Quelle
MLS-1765	MLS	FUS-DDIT3	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	Aman <i>et al.</i> , 1992
MLS-1765 ^{EV}	MLS	FUS-DDIT3	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	
MLS-1765 ^{SOX11}	MLS	FUS-DDIT3	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	
MLS-1765 ^{T248A-SOX11}	MLS	FUS-DDIT3	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	
MLS-402	MLS	FUS-DDIT3	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	Aman <i>et al.</i> , 1992
FU-DDLS-1	DDLS	Amplifikation 12q13-15	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	Nishio <i>et al.</i> , 2003
LPS-141	DDLS	Amplifikation 12q13-15	RPMI-1640	+ 15 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL) + 1 % L-Glutamin (200 mM)	Snyder <i>et al.</i> , 2009
T449	WDLS	Amplifikation 12q13-15	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	Pedeutour <i>et al.</i> , 1999
T778	WDLS	Amplifikation 12q13-15	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	Pedeutour <i>et al.</i> , 1999
LISA-2	PLS	-	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	Wabitsch <i>et al.</i> , 2000
SW872	LS	-	RPMI-1640	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL)	ATCC
ST-8814	MPNST	NF1 ^{-/-}	DMEM (<i>high-glucose</i>)	+ 10 % FCS + 1 % P/S (10.000 U / mL) + 1 % L-Glutamin (200 mM) + 0,5 % Natriumpyruvat (100 mM)	DeClue <i>et al.</i> , 1992

3.2 SDS-PAGE und Western Blot

3.2.1 Proteinlysate

Subkonfluente kultivierte Zellen wurden mit eiskaltem DBPS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen, anschließend auf Eis mit Proteinlysepuffer (inklusive Protease-Inhibitor und Phosphatase-Inhibitor) lysiert und mit einem Zellschaber gesammelt. Daraufhin wurden die Proteinlysate 15 min auf 4 °C bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurden die Proteinkonzentrationen mittels *BCA Protein Assay* bestimmt.

3.2.2 SDS-PAGE

Die Proteinlysate wurden mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95 °C denaturiert. Im Anschluss wurden jeweils 40 g Protein auf SDS-Polyacrylamidgele zur Elektrophorese (SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)) geladen und unter Verwendung eines Tris-Glycin-Puffersystem aufgetrennt.

3.2.3 Western Blot

Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im *wet-blot*-Transfervorgang unter Verwendung eines Borat-Transferpuffers auf PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membranen gebロットet. Im Anschluss wurden die PVDF-Membranen für 1 h mit 5 % (w/v)-BSA (*bovine serum albumin*) oder Milchpulver geblockt, mit 1 % TBS-T (*Tris-buffered saline + 1 % Tween® 20*) (drei mal 5 min) gewaschen und mit den entsprechenden primären Antikörpern (Tabelle 2) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Gegen ACTB (Actin Beta) und TUBB (*Tubulin Beta, Class I*) gerichtete Antikörper wurden hierbei als Ladekontrollen verwendet. Am nächsten Tag wurden die PVDF-Membranen erneut mit 1 % TBS-T (drei mal 5 min) gewaschen und für 1 h mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (Tabelle 3) inkubiert. Abschließend wurden die Signale mit einem *LI-COR Odyssey® Sa Infrared Imaging System* detektiert, dokumentiert und ausgewertet.

Tabelle 2: Primäre Antikörper Western Blot.

Protein	Bezeichnung Antikörper	Reaktivität	Verdünnung	Referenz / Quelle
SOX11	Anti-SOX11 antibody [EPR8192], #ab134107	Kaninchen, monoclonal	1:500	Abcam plc (Cambridge, UK)
CD24	CD24 (SWA11) (Zellkulturüberstand)	Maus, monoclonal	1:5	Peter Altevogt (DKFZ Heidelberg) (Jackson <i>et al.</i> 1992)
ACTB	Mouse Anti-Actin, Monoclonal (Clone: C4), #69100	Maus, monoclonal	1:6.000	MP-Biomedicals (Aurora, USA)
TUBB	Monoclonal Anti- β -Tubulin, clone TUB 2.1 (ascites fluid), #T4026	Maus, monoclonal	1:200	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Tabelle 3: Sekundärantikörper Western Blot

Bezeichnung Antikörper	Reaktivität	Verdünnung	Referenz / Quelle
IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H + L), #926-32212	Sekundärantikörper	1:10.000	LI-COR Biotechnology GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
IRDye® 800CW Donkey anti-Mouse IgG (H + L), #926-32213	Sekundärantikörper	1:10.000	LI-COR Biotechnology GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
IRDye® 680LT Goat anti-Rabbit IgG (H + L), #926-68021	Sekundärantikörper	1:10.000	LI-COR Biotechnology GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
IRDye® 680LT Goat anti-Mouse IgG (H + L), #926-68020	Sekundärantikörper	1:10.000	LI-COR Biotechnology GmbH (Bad Homburg, Deutschland)

3.3 Quantitative *real-time* PCR

3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Subkonfluent kultivierte Zellen wurden trypsiniert, pelletiert und mit DPBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA mit dem *Macherey-Nagel NucleoSpin® RNA* Kit, einschließlich rDNase-Verdau, gemäß Herstellerprotokoll isoliert und im Anschluss die Konzentrationen mit einem UV-Vis-Spectrophotometer vermessen.

3.3.2 Reverse Transkription

Die isolierte Gesamt-RNA wurde mit dem *Thermo Scientific RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* Kit zusammen mit einer MRT (*minus reverse transcriptase*)-Kontrolle, unter Verwendung von Oligo(dT)₁₈-Primer gemäß Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben und im Anschluss bezogen auf die eingesetzte Menge an Gesamt-RNA auf 2 ng / L mit ddH₂O (*double-distilled water*) verdünnt.

3.3.3 Quantitative *real-time* PCR

Jede quantitative *real-time* PCR (qPCR)-Reaktion wurde in *Applied Biosystems MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate* mit genspezifischen Primer (Tabelle 4) als *SYBR Green*-basierte Reaktion angesetzt (Tabelle 5) und mit dem *Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR System* unter Verwendung eines qPCR-Programms mit anschließender Schmelzkurvenanalyse detektiert (Tabelle 6). Das experimentelle Setup beinhaltete NTC (*none template control*)- und MRT-Kontrollen. Alle Proben wurden als technische Duplikate gemessen. Die C_T-Werte der jeweiligen Gene wurden nach der $\Delta\Delta\text{C}_T$ -Methode relativ zu den endogenen Kontrollen (*ACTB*, *SRSF4* (*Serine / Arginine-Rich Splicing Factor 4*), *18S* (*Ribosomal Protein S18*)), sowie relativ zu einer entsprechenden Referenz-Probe ausgewertet. Die Experimente wurden jeweils in zwei unabhängigen biologischen Replikaten wiederholt.

Tabelle 4: QPCR-Primer.

SOX11 GeneArt bezeichnet Primer, die gegen die Codon-optimierte Sequenz von SOX11 gerichtet sind.

Gen	Bezeichnung Primer	Sequenz (5'-3')	Referenz / Quelle
SOX11	SOX11 For.	CCAGGACAGAACCACCTGAT	Gustavsson <i>et al.</i> , 2010
SOX11	SOX11 Rev.	CCCCACAAACCACTCAGACT	Gustavsson <i>et al.</i> , 2010
SOX11	SOX11-QU For.	GGTGGATAAGGATTTGGATTTCG	Qu <i>et al.</i> , 2014
SOX11	SOX11-QU Rev.	GCTCCGGCGTGCACTAGT	Qu <i>et al.</i> , 2014
ACTB	ACTB For.	TCACCCACACTGTGCCCATCTACG	
ACTB	ACTB Rev.	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	
LHX2	LHX2 For.	CCAAGGACTTGAAGCAGCTC	
LHX2	LHX2 Rev.	GTAAGAGGTTGCGCCTGAAC	
TMSB15A	TMSB15A qPCR For.	GGTCTCAGCCCCGCGAACAG	
TMSB15A	TMSB15A qPCR Rev.	CAGGTAATGTCGAAATCTGCTGTTG	
CD24	CD24 qPCR For.	GCACTGCTCCTACCCACGCAGATTT	
CD24	CD24 qPCR Rev.	GCCTTGTTGGTGGCATTAGTTGGAT	
NNAT	NNAT qPCR For.	CAACAGCGGACTCCGAG	
NNAT	NNAT qPCR Rev.	CATTCCAGGAACACCTGCA	
THEM6	THEM6 qPCR For.	CGCGCGTTCTACCTGGAG	
THEM6	THEM6 qPCR Rev.	TGACATCACTGAGCCCACT	
TUBB3	TUBB3 For.	GGCCTTTGGACATCTCTTCA	
TUBB3	TUBB3 Rev.	ATACTCCTCACGCACCTTGC	
TUBB2B	TUBB2B qPCR For.	CATCCTCGTGGATCTGGAGC	
TUBB2B	TUBB2B qPCR Rev.	GTCTGACACCTTGGGTGAGG	
SOX11 GeneArt	SOX11 GeneArt For.	CTACAAGTACCGGCCAGAA	
SOX11 GeneArt	SOX11 GeneArt Rev.	TCTTGCTGCTGCCCTTAGAT	
ccdB	pDEST26 ccdB For.	GCCGTTATCGTCTGTTTGTG	
ccdB	pDEST26 ccdB Rev.	CATATCGGTGGTCATCATGC	
18S	18S For.	AAACGGCTACCACATCCAAG	Macher-Goeppinger <i>et al.</i> , 2009
18S	18S Rev.	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	Macher-Goeppinger <i>et al.</i> , 2009
SRSF4	SRSF4 For.	TGCAGCTGGCAAGACCTAAA	
SRSF4	SRSF4 Rev.	TTTTTGCGTCCCTTGTGAGC	

Tabelle 5: Reaktionsansatz qPCR.

Die Tabelle zeigt den Reaktionsansatz für eine qPCR-Reaktion.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
cDNA [2 ng / µL]	5,0 µL	
2x ABsolute qPCR SYBR Green ROX Mix	7,5 µL	1x
Forward Primer [10 µM]	0,45 µL	0,3 µM
Reverse Primer [10 µM]	0,45 µL	0,3 µM
ddH ₂ O	ad 15 µL	

Tabelle 6: QPCR-Programm Applied Biosystems StepOne Plus™ Real-Time PCR System.

Schritt	Temperatur	Dauer
<i>Holding Stage</i>		
1	95 °C	10 min
<i>Cycling Stage (40 Zyklen)</i>		
2	95 °C	15 s
3	60 °C	1 min
4	95 °C	15 s
<i>Melting Curve Stage (Inkrement + 0,5 °C)</i>		
5	60 °C	1 min
6	95 °C	15 s

3.4 Immunhistochemie

3.4.1 Zellpräzipitate

Subkonfluente kultivierte Zellen wurden trypsiniert und 10 min bei 1.000 rpm pelletiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, indem sie in DPBS ohne Ca²⁺ / Mg²⁺ resuspendiert und erneut 10 min bei 1.000 rpm pelletiert wurden. Danach wurden die Zellen in 4 %-Formalin in DBPS resuspendiert und 15 min bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss an einem erneuten Waschschrift mit DPBS ohne Ca²⁺ / Mg²⁺, wurde das Zellpellet in 500 L 100 %-Ethanol resuspendiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 100 L FCS wurden die Zellen für 10 min bei 1.000 rpm präzipitiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in eine Biopsie-Kapsel überführt. Das Zellpräzipitat wurde über Nacht fixiert und am nächsten Tag in Paraffin eingebettet.

3.4.2 Immunhistochemie

Die Proben wurden entparaffiniert und mit einer ansteigenden Ethanolreihe rehydratisiert. Anschließend wurde die Antigendemaskierung mit Citratpuffer (pH = 6,1) und Hitze (98 °C, 30 min) durchgeführt (HIER (*heat induced epitope retrieval*)). Daraufhin wurde das Antigen unter Verwendung des jeweiligen primären Antikörpers (Tabelle 7) mit dem *Dako REAL™ Detection System* Kit gemäß Herstellerprotokoll immunhistochemisch gefärbt. Als Negativkontrolle wurde standardmäßig an Stelle der primären Antikörper des betreffenden Antigens eine entsprechende Isotypkontrolle verwendet.

Tabelle 7: Immunhistochemie Antikörper.

Protein	Bezeichnung Antikörper	Reaktivität	Verdünnung	Referenz / Quelle
SOX11	Anti-SOX11 antibody produced in rabbit, #HPA000536	Kaninchen, polyclonal	1:50	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
CD24	CD24 (SWA11) (Zellkulturüberstand)	Maus, monoclonal	1:5	Peter Altevogt (DKFZ Heidelberg) (Jackson <i>et al.</i> 1992)
	Normal rabbit IgG, #sc-2027	Kaninchen, polyclonal	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, USA)
	Normal mouse IgG, #sc-2025	Maus, polyclonal	1:5	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, USA)

3.5 Funktionelle Assays

3.5.1 Wundheilungs-Assay

MLS-1765^{SOX11-} und MLS-1765^{EV}-Zellen wurden mit 5×10^5 Zellen / well in 6-well-Standardzellkulturplatten in Triplikaten ausgesät und mit entsprechendem Kulturmedium bis zur Konfluenz kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen für 3 h mit 5 μ g / mL Mitomycin C in Kulturmedium ohne FCS behandelt und im Anschluss daran zwei Kratzwunden pro well mit einer sterilen 200 μ L-Pipettenspitze generiert. Daraufhin wurden Zellbruchstücke durch Waschen mit DPBS entfernt und die Zellen in normalen Kulturmedium über einen Zeitraum von 24 h in einem *Olympus Live Cell Imaging System* kultiviert und beobachtet. Zur Auswertung wurde die Wundheilungsfläche als Verhältnis der eingenommenen Fläche zur Gesamtfläche mit der Software *Zeiss AxioVision* gemessen. Die Experimente wurden jeweils als fünf unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.5.2 Klonogenitäts-Assay

MLS-1765^{SOX11-} und MLS-1765^{EV}-Zellen wurden mit jeweils 500 Zellen / well in 6-well-Standardzellkulturplatten in sechs Replikaten ausgesät und kultiviert. Zehn Tage nach Aussaat wurden die Zellklone mit 0,5 % (w/v)-Kristallviolett in 20 %-Methanol-Lösung gefärbt, fixiert und mit dem *ProteinSimple FluorChem M Detection System* dokumentiert. Zur Auswertung wurde die Anzahl der Kolonien mit der Software *ProteinSimple AlphaView* quantifiziert. Die Experimente wurden jeweils als drei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.5.3 MTT-Assay

3.5.3.1 Zeitverlaufs-Experimente

MLS-1765^{SOX11-}-Zellen wurden mit $1,1 \times 10^3$ Zellen / well und MLS-1765^{EV}-Zellen oder MLS-1765^{T248A-SOX11-}-Zellen mit $0,7 \times 10^3$ Zellen / well in 96-well-Standardzellkulturplatten in 30 Replikaten ausgesät. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden die Zellen für 3 h mit 0,5 mg / mL MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*)-Reagenz in entsprechendem Kulturmedium inkubiert, danach die präzipitierten Kristalle mit 50:50 (v/v)-Ethanol-DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und die Absorption bei 570 nm mit einem *Microplate*-Photometer gemessen. Die jeweiligen Absorptionen als Maß für die Zellviabilität wurden zur Erstellung von Zeitverlaufs-Kurven verwendet, indem diese als *fold-change* zur Absorption nach 24 h dargestellt wurden. Die Experimente wurden jeweils als drei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.5.3.2 Dosis-Wirkung-Experimente

MLS-1765^{SOX11-}-, MLS-1765^{EV}- und MLS-1765^{T248A-SOX11-}-Zellen wurden mit jeweils 5×10^3 Zellen / well in 96-well-Standardzellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit einer 1:3-Verdünnungsserie von 4 nM bis 0 nM Trabectedin, 10.000 nM bis 0 nM Dasatinib oder 1.000 nM bis 0 nM Doxorubicin (bezogen über die Klinikapotheke des Universitätsklinikums

Heidelberg) in Triplikaten behandelt. 72 h nach Beginn der Behandlung wurden die Zellen für 3 h mit 0,5 mg / mL MTT-Reagenz in entsprechendem Kulturmedium inkubiert, danach die präzipitierten Kristalle mit 50:50(v/v)-Ethanol-DMSO gelöst und die Absorption bei 570 nm mit einem *Microplate*-Photometer gemessen. Die jeweiligen Absorptionen als Maß für die Zellviabilität wurden zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven verwendet. Die Experimente wurden jeweils als drei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.5.4 EdU-Proliferations-Assay

MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen wurden mit jeweils $0,4 \times 10^3$ Zellen / *well* in 96-*well*-Standardzellkulturplatten in zehn Replikaten ausgesät. 72 h nach Aussat wurden die Zellen für 6 h mit EdU (*5-Ethynyl-2'-deoxyuridine*)-Reagenz in entsprechendem Kulturmedium inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen gemäß *baseclick EdU HTS 488* Kit Herstellerprotokoll mit *eBioscience Permeabilization Buffer* permeabilisiert, fixiert und markiert. Abschließend wurden die Fluoreszenzen bei $Ex_{485 \text{ nm}}/Em_{520 \text{ nm}}$ mit einem Fluoreszenz-*Microplatereader* gemessen und als *fold-change* dargestellt. Die Experimente wurden jeweils als drei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.5.5 ApoTox-Glo™ Assay

MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen wurden mit jeweils $0,4 \times 10^3$ Zellen / *well* in weiße 96-*well*-Zellkultur-*Microplates* in 15 Replikaten ausgesät. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 100 nM Ionomycin 5 h (induziert Nekrose), 10 nM Staurosporine 5 h (induziert Apoptose) und 30 µg / mL Digitonin 15 min (induziert Zytotoxizität) vor der Messung jeweils in Triplikaten behandelt. 72 h nach der Aussat wurden die Fluoreszenzen bei $Ex_{400 \text{ nm}}/Em_{505 \text{ nm}}$ (Viabilität) und $Ex_{485 \text{ nm}}/Em_{520 \text{ nm}}$ (Zytotoxizität) gemäß *Promega ApoTox-Glo™ Assay* Kit Herstellerprotokoll mit einem Fluoreszenz-*Microplatereader* detektiert. Die Lumineszenz (Apoptose) wurde im Anschluss ebenso mit dem *Microplatereader* in 50 Intervallen mit jeweils 0,2 s gemessen und zur Auswertung die Summe über alle Intervalle gebildet. Die erhaltenen Werte wurden als *fold-change* dargestellt und die Experimente jeweils als drei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.5.6 CytoSelect™ Cell Adhesion Assay ECM Array

MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen wurden zum Ablösen mit 5 mM-EDTA-DPBS gewaschen und anschließend mit 5 mM-EDTA-DPBS für 15 min auf 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 10 min bei 1.000 rpm pelletiert, in RPMI-1640 / 0,5 % BSA / 2 mM CaCl₂ / 2 mM MgCl₂ resuspendiert und die Zellkonzentrationen auf $0,4 \times 10^6$ Zellen / mL verdünnt. Im Anschluss wurde mit 150 µL / *well* der jeweiligen Zellsuspension der *CytoSelect™ Cell Adhesion Assay ECM Array* in vier Replikaten pro ECM-Protein für 90 min bei 37 °C, 95 %rH, 5 % CO₂ inkubiert. Darauf wurden die Zellen gemäß Herstellerprotokoll gewaschen, markiert und lysiert. Zur Bestimmung der Fluoreszenz bei $Ex_{485 \text{ nm}}/Em_{520 \text{ nm}}$ wurden jeweils 150 µL der markierten Zelllysate in weiße

96-well-Zellkultur-Microplates überführt und im Fluoreszenz-Microplatereader vermessen. Das Experiment wurde als zwei unabhängige biologische Replikaten wiederholt.

3.5.7 Zelladhäsions-Assay

Zum Beschichten einer 96-well-Standardzellkulturplatte wurde die Hälfte der wells mit jeweils 100 μ L 10 μ g / mL Fibronectin in DPBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} und die andere Hälfte mit 100 μ L 1 % BSA in DPBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} über Nacht auf 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Fibronectin-beschichtete 96-well-Zellkulturplatte zweimal mit DPBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen bevor diese für den Zelladhäsions-Assay verwendet wurde. Hierfür wurden MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen zum Ablösen mit 5 mM-EDTA-DPBS gewaschen und anschließend mit 5 mM-EDTA-DPBS für 15 min auf 37 °C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen 10 min bei 1.000 rpm pelletiert, in RPMI-1640 / 0,5 % BSA / 2 mM CaCl_2 / 2 mM MgCl_2 resuspendiert und die Zellkonzentrationen auf $0,5 \times 10^6$ Zellen / mL verdünnt. Die jeweilige Zellsuspension wurde anschließend in einer 1:2-Verdünnungsserie beginnend mit 5×10^4 Zellen / well (100 %) bis $0,625 \times 10^4$ Zellen / well (25 %) in einem Volumen von 100 μ L / well in jeweils zwölf Replikaten in die Fibronectin-beschichtete 96-well-Zellkulturplatte ausgesät und für 90 min bei 37 °C, 95 %RH, 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurde die Zellkulturplatte viermal mit 150 μ L DPBS / 2 mM CaCl_2 / 2 mM MgCl_2 gewaschen und die Zellen mit 70 %-Ethanol für 30 min auf 4 °C fixiert. Abschließend wurden die Zellen mit 0,5 % (w/v)-Kristallviolett in 20 %-Methanol-Lösung gefärbt und mit dem *ProteinSimple FluorChem M Detection System* dokumentiert. Danach wurden die gefärbten Zellen in 100 μ L 10 %-Essigsäure gelöst und die Absorption bei 570 nm mit einem *Microplate*-Photometer gemessen. Die Werte wurden als *fold-change* dargestellt und das Experiment wurde als zwei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.6 Proteome ProfilerTM Human Phospho-Kinase Array

Subkonfluente kultivierte MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen, jeweils einer frühen und einer späten Passage, wurden mit eiskaltem DPBS ohne Ca^{2+} / Mg^{2+} gewaschen, auf Eis mit jeweils 1 mL pro 10×10^6 Zellen eines speziellen Proteinlysepuffers (*R&D Systems Lysis Buffer 6* ergänzt mit Proteinase-Inhibitor und Protease-Inhibitor) lysiert und mit einem Zellschaber gesammelt. Die Proteinlysate wurden anschließend auf einem Rotator 30 min bei 4 °C inkubiert, für 5 min auf 14.000 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurden die Proteinkonzentrationen mittels *BCA Protein Assay* bestimmt und durch Verdünnung mit dem speziellen Proteinlysepuffer entsprechend angeglichen. Der *R&D Systems Proteome ProfilerTM Human Phospho-Kinase Array* wurde danach mit 300 μ g Protein pro *Array Set (A+B)* gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Abschließend wurde die ECL (*enhanced chemiluminescence*) mit einem Röntgenfilm zu verschiedenen Expositionszeiten detektiert, die Filme fixiert und entwickelt. Der entwickelte Film mit einer Expositionsdauer von 2 min wurde gescannt und mit der Software *ProteinSimple AlphaView* densitometrisch analysiert. Die Daten

wurden zur Auswertung reziprok verwendet, *Background* korrigiert, die technischen Duplikate gemittelt, die beiden Zeitpunkte als biologische Replikate gemittelt und mit den *Reference Spots* des *Arrays* normalisiert.

3.7 Dual-Luciferase Reporter Assay

3.7.1 *In silico*-Analyse der Promotorregionen

Die Sequenzen der Promotorregionen von *CD24* auf Chromosom 6q21 (-1931 bp bis -35 bp vor ATG; Thomas *et al.*, 2012) und *LHX2* auf Chromosom 9q33 (-1926 bp bis -360 bp vor ATG) wurden mit der Software JASPAR (Mathelier *et al.*, 2014) auf potentielle Sox11-Bindestellen analysiert. Hierbei wurden die Algorithmen PB0061.1 Sox11_1 und PB0165.1 Sox11_2 für die Spezies *Mus Musculus* verwendet, da kein Algorithmus für humanes SOX11 vorhanden war. Der *relative profile score threshold* wurde bei 80 % behalten. Die *in silico*-Analyse prognostizierte für die Promotorregion von *CD24* elf (Tabelle 8) und für *LHX2* drei (Tabelle 9) potentielle Sox11-Bindestellen.

Tabelle 8: Potentielle Sox11-Bindestellen in der Promotorregion von *CD24*.

Modell		Score	relativer Score	Start	Ende	Strang	potentielle Bindesequenz
PB0165.1	Sox11_2	8,033	0,815783122961265	71	84	+1	GAAATTCTTGTGTT
PB0165.1	Sox11_2	7,553	0,803756439270439	145	158	-1	TGAATTGGTTTGTG
PB0061.1	Sox11_1	8,956	0,816680015233611	188	204	-1	AAAGTGACAATGAAATC
PB0061.1	Sox11_1	11,279	0,861978873307586	216	232	-1	ATTAAAACAAAGTAAGT
PB0165.1	Sox11_2	7,757	0,80886777983904	255	268	-1	AAATTGTCTAAAT
PB0165.1	Sox11_2	7,724	0,808040945335296	354	367	+1	AAAATTGAACCAAA
PB0165.1	Sox11_2	8,643	0,831067033485024	399	412	-1	AAATTGTTTAAAT
PB0061.1	Sox11_1	9,540	0,828068105253069	543	559	-1	CATACAACAAAAGTTGA
PB0165.1	Sox11_2	9,611	0,855320845594857	773	786	+1	TGAATTGTAGTGGG
PB0061.1	Sox11_1	11,212	0,860672362980011	1061	1077	+1	CACAGAACAAAGCAAGG
PB0061.1	Sox11_1	13,572	0,906692726757273	1456	1472	+1	CGGGAAACAAAGGAAAC

Tabelle 9: Potentielle Sox11-Bindestellen in der Promotorregion von *LHX2*.

Modell		Score	relativer Score	Start	Ende	Strang	potentielle Bindesequenz
PB0165.1	Sox11_2	9,024	0,840613213664617	299	312	-1	CAAATTATTTTCATT
PB0061.1	Sox11_1	8,847	0,814554498432034	1280	1296	-1	AGGAGAAAAAGAGGAG
PB0165.1	Sox11_2	7,762	0,808993057794153	1338	1351	-1	AGAATTGAAGAGGA

3.7.2 Klonierung der Promotorregionen

Genomische DNA (gDNA) der MPNST-Zelllinie ST88-14 wurde mit dem *Genra Puregene DNA Isolation* Kit gemäß Herstellerprotokoll isoliert und anschließend photometrisch vermessen. Die isolierte gDNA wurde als *Template* für die PCR-Amplifikation der Promotorregionen von *CD24* und *LHX2* verwendet. Hierzu wurden Primer mit zusätzlichen Restriktionsschnittstellen für *NheI* und *HindIII* verwendet (Tabelle 10) und sowohl der PCR-Reaktionsansatz mit dem *Invitrogen Platinum® Pfx DNA Polymerase* Kit (Tabelle 11; Tabelle 12), als auch das PCR-Programm (Tabelle 13; Tabelle 14) entsprechend optimiert.

Tabelle 10: Primer zur Klonierung der Promotorregion von *CD24* und *LHX2*.

Promotor	Bezeichnung Primer	Sequenz (5'-3')	Referenz / Quelle
<i>CD24</i>	CD24Promoter_For (NheI)	GATC-GCTAGC-CACGCCCGGCCAAAGTATTTTC	Thomas <i>et al.</i> , 2012
<i>CD24</i>	CD24Promoter_Rev (HindIII)	GATC-AAGCTT-CAGGATGCTGGGTGCTTGGAG	Thomas <i>et al.</i> , 2012
<i>LHX2</i>	LHX2Promoter-NEU3_For (NheI)	GATC-GCTAGC-CTAAATCCCTCCCCACCCAGACA	
<i>LHX2</i>	LHX2Promoter-NEU3_Rev (HindIII)	GATC-AAGCTT-CGGGGCGCAAAGCAAGG	

Tabelle 11: PCR-Reaktionsansatz zur Klonierung der Promotorregion von *CD24*.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
gDNA [100 ng]		
10x Pfx Amplification Buffer	2,5 µL	1x
10x PCRx Enhancer	2,5 µL	1x
dNTPs [10 mM]	0,75 µL	0,3 mM
MgSO ₄ [50 mM]	0,5 µL	1 mM
Platinum Pfx Polymerase [2,5 U / µL]	0,2 µL	0,5 U
CD24Promoter_For (NheI) Primer [10 µM]	0,375 µL	0,15 µM
CD24Promoter_Rev (HindIII) Primer [10 µM]	0,375 µL	0,15 µM
ddH ₂ O	ad 25 µL	

Tabelle 12: PCR-Reaktionsansatz zur Klonierung der Promotorregion von *LHX2*.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
gDNA [100 ng]		
10x Pfx Amplification Buffer	5,0 µL	2x
10x PCRx Enhancer	7,5 µL	3x
dNTPs [10 mM]	0,75 µL	0,3 mM
MgSO ₄ [50 mM]	0,5 µL	1 mM
Platinum Pfx Polymerase [2,5 U / µL]	0,2 µL	0,5 U
LHX2Promoter-NEU3_For (NheI) Primer [10 µM]	0,375 µL	0,15 µM
LHX2Promoter-NEU3_Rev (HindIII) Primer [10 µM]	0,375 µL	0,15 µM
ddH ₂ O	ad 25 µL	

Tabelle 13: PCR-Programm zur Klonierung der Promotorregion von CD24.

Schritt	Temperatur	Dauer
<i>Holding Stage</i>		
1	95 °C	10 min
<i>Cycling Stage (35 Zyklen)</i>		
2	95 °C	30 s
3	62,5 °C	30 s
4	68 °C	2 min
<i>Final Stage</i>		
5	68 °C	10 min
6	4 °C	∞

Tabelle 14: PCR-Programm zur Klonierung der Promotorregion von LHX2.

Schritt	Temperatur	Dauer
<i>Holding Stage</i>		
1	95 °C	10 min
<i>Cycling Stage (30 Zyklen)</i>		
2	95 °C	30 s
3	60 °C	20 s
4	68 °C	2 min
<i>Final Stage</i>		
5	68 °C	10 min
6	4 °C	∞

Im Anschluss wurde die Qualität der PCR-Reaktion durch Gelelektrophorese eines Aliquot auf einem 3 %-Agarosegel kontrolliert. Hierbei zeigte sich jeweils ein einzelnes PCR-Produkt mit 1916 bp für die Promotorregion von CD24 und mit 1566 bp von LHX2. Der Rest der PCR-Reaktion wurden daraufhin mit dem *Roche High Pure PCR Purification Kit* gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt und photometrisch vermessen.

Zur Klonierung wurden die aufgereinigten PCR-Produkte und der *Promega pGL3-Basic* Vektor mit den Restriktionsenzymen *NheI* und *HindIII* gemäß Herstellerprotokolle doppelt verdaut, mit dem *Roche High Pure PCR Purification Kit* aufgereinigt und photometrisch vermessen. Der Vektor wurde zusätzlich mit CIAP (*calf Intestinal alkaline phosphatase*) dephosphoryliert.

Anschließend wurden die PCR-Produkte mit dem *New England Biolabs Quick Ligation Kit* in einer molaren Ratio von 3:1 in die *multiple cloning region* des *Promega pGL3-Basic* Vektor legiert und in kompetente Bakterien (*JM109, Promega*) transformiert. Mit allen gepickten und kultivierten Kolonien wurden Glycerin-Cryostocks erstellt und die Plasmide mit dem *Qiagen Qiaprep Spin Miniprep Kit* isoliert. Die erfolgreiche Ligation der isolierten Plasmide wurde durch Restriktionsverdau und Gelelektrophorese auf einem 1 %-Agarosegel überprüft und anschließend

sequenziert (Seqlab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH; Tabelle 15). Die Sequenzierung der Promotorregion von *CD24* zeigte hierbei zwei SNP (*single nucleotide polymorphisms*), die bereits durch Wang *et al.* beschrieben wurden (P-246 A/G; P-534 A/C; Wang *et al.*, 2012). Die erfolgreich klonierten Vektoren mit den Promotorregionen von *CD24* und *LHX2*, die in den *Dual-Luciferase Reporter Assays* verwendet wurden, werden im Folgenden entsprechend *CD24P-pGL3* und *LHX2P-pGL3* genannt. Abschließend wurden die Vektoren *CD24P-pGL3*, *LHX2P-pGL3*, *Promega pGL3-Basic* und *Promega pRL-SV40* als Plasmid-DNA mit dem *Promega PureYield Plasmid Midiprep System* unter Verwendung des enthaltenen *Endotoxin Removal Wash* isoliert und vermessen.

Tabelle 15: Sequenzierungs-Primer.

Bezeichnung Primer	Sequenz (5'-3')	Referenz / Quelle
GL3 (Standard Primer)	CCGGGCCTTTCTTTATGTTTTTG	Seqlab
RV3 (Standard Primer)	CTAGCAAAATAGGCTGTCC	Seqlab
CD24Promoter_Seq_For_1	CGAGAGTGTCTGCAAACTGA	
CD24Promoter_Seq_For_2	CAGGAGGGGAGGTTCTCTG	
CD24Promoter_Seq_Rev_1	CACAATAGCCGTGACGTGG	
CD24Promoter_Seq_Rev_2	ACCTGCCATCTTACCCCC	
CD24Promoter_Seq_Rev_3	CAGAGGAAAGGGGAACGC	

3.7.3 Dual-Luciferase Reporter Assay

MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen wurden mit den Vektoren eines *Firefly-Luciferase-Promoter Reporter* (*CD24P-pGL3* oder *LHX2P-pGL3*) und des *Renilla-Luciferase-Control Reporter Promega pRL-SV40* als interne Kontrolle im Verhältnis 10:1 cotransfiziert. Als Kontrollexperiment wurden MLS-1765^{SOX11} und MLS-1765^{EV}-Zellen ebenfalls mit den Vektoren *Promega pGL3-Basic* (ohne Promotorregion) und *Promega pRL-SV40* im Verhältnis 10:1 cotransfiziert. Hierzu wurden jeweils insgesamt 4 g Plasmid-DNA mit 15 L *Qiagen Attractene Transfection Reagent* in 10mL Kulturmedium gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen jeweils mit 4x10³ Zellen / well in weiße 96-well-Zellkultur-Microplates in 18 technischen Replikaten ausgesät und bei 37 °C, 95 %RH, 5 % CO₂ weiter kultiviert.

48 h nach der Transfektion wurden die Aktivitäten der *Firefly*- und der *Renilla-Luciferase* mit dem *Promega Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit* gemäß Herstellerprotokoll im *Microplatereader* detektiert. Hierbei wurden die Lumineszenzen in 50 Intervallen mit jeweils 0,2 s gemessen und die Summe aller Intervalle gebildet. Zur Auswertung wurden die Aktivitäten der *Firefly-Luciferase* mit denen der *Renilla-Luciferase* normalisiert und im Anschluss als *fold-change* dargestellt. Die Experimente wurden jeweils als drei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.8 Vorinostat- und Trichostatin A-Behandlung

T778-Zellen wurden mit 2×10^5 Zellen / well in 6-well-Standardzellkulturplatten ausgesät und bei 37 °C, 95 %rH, 5 % CO₂ kultiviert. Nach 24 h wurden die subkonfluenten T778-Zellen entweder mit einer 1:2-Verdünnungsserie von 5 M bis 0 M Vorinostat oder einer 1:2-Verdünnungsserie von 5 M bis 0 M Trichostatin A inkubiert. Nach weiteren 24 h wurde die Gesamt-RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und die SOX11-Expression mittels qPCR bestimmt.

3.9 HIPO-Sequenzierungsprojekt

Im Rahmen des von DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) und NCT (Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen) gemeinschaftlich finanzierten HIPO (*Heidelberg Center for Personalized Oncology*)-Projekts „*Genomic Sequencing of High Grade Soft Tissue Sarcomas*“ wurde eine Exom-Sequenzierung zur Identifizierung bisher unbekannter genetischer Aberrationen als mögliche therapeutische Ziele durchgeführt. Dieses Projekt wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen (Prof. Sebastian Bauer, Essen) und der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Heidelberg genehmigt. Dies schließt die im Tumorgewebe des Patienten M615 identifizierte heterozygote Sequenzvariation in der kodierenden Region von SOX11 (c.248T>A; SOX11^{T248A}) mit ein.

3.9.1 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierungen der kodierenden Region von SOX11 sowohl des Tumors- und des nicht-neoplastischen Gewebes des Patienten M615, als auch einer unabhängigen Kohorte von 92 Liposarkomen (37 MLS, 48 DDLS und sieben PLS) wurden mit den entsprechenden Primer (Tabelle 16) in der Abteilung Molekulare Diagnostik des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikum Heidelberg durchgeführt. Im Anschluss wurden die Sequenzierungs-Chromatogramme mit der Software *DNASTAR LaserGene SeqMan Pro* ausgewertet und mit der Referenzsequenz von SOX11 (RefSeq: NM_003108) verglichen.

Tabelle 16: Sanger-Sequenzierungs-Primer für die kodierende Region von SOX11.

Bezeichnung Primer	Sequenz (5'-3')
SOX11 SeqR01NEU_For	GTGCCGAGGACTTTGCAACT
SOX11 SeqR01NEU_Rev	TTCGATCTTGACCATACCA
SOX11 Seq03 For.	GAGGGCGAATTCATGGCTTG
SOX11 Seq03 Rev.	CGGTACTTGTAGTCGGGGTA
SOX11 SeqR03NEU_For	GTCTCCGGACATGCACAAC
SOX11 SeqR03NEU_Rev	GCCCAGCACGTAGTCGTC
SOX11 SeqR04NEU_For	CAAGGGCTCCAGCAAGAA
SOX11 SeqR04NEU_Rev	GAGCTGCTCAGCGTAGGG
SOX11 SeqR05NEU_For	GAGGAGGACGAGGAACCAC
SOX11 SeqR05NEU_Rev	GCTTGGTGATGTTCTTGAAGC
SOX11 SeqR06NEU_For	GAGCCTCTACGACGAGGTG
SOX11 SeqR06NEU_Rev	CACCCTCCGAGAGAAAGAGC
SOX11 SeqR07NEU_For	CTCTCAAAGCGCGCACAG
SOX11 SeqR07NEU_Rev	CACTACAACCTCCTCCAAGG

3.10 *In silico*-Analysen der SOX11^{T248A}-Mutation

3.10.1 PolyPhen-2 Analyse

Die *non-silent missense*-Mutation SOX11^{T248A} (c.248T>A) führt zu einem Aminosäureaustausch der unpolar hydrophoben Aminosäure Leucin gegen die polar neutrale Aminosäure Glutamin (p.L83Q). Dieser Aminosäureaustausch in SOX11 wurde mit der Software *PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping-2)* (Adzhubei *et al.*, 2010) unter Beibehaltung der *minimal alignment length* von 100, einem *minimal identity in alignment* von 0,5, einem *maximal gap length in alignment* von 20 und einem *threshold for contacts* von 6 Å analysiert. Zur Prädiktion wurde das *HumDiv Model* verwendet.

3.10.2 MutationTaster2 Analyse

Die *non-silent missense*-Mutation SOX11^{T248A} (c.248T>A) wurde mit der Software *MutationTaster2* (Schwarz *et al.*, 2014) unter Verwendung von *Model: simple_aae* analysiert.

3.10.3 PyMOL Visualisierung

Zur Visualisierung des durch die *non-silent missense*-Mutation SOX11^{T248A} (c.248T>A) verursachten Aminosäureaustauschs der unpolar hydrophoben Aminosäure Leucin gegen die polar neutrale Aminosäure Glutamin (p.L83Q) wurde die Software *PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System)* verwendet. Es wurde die Kristallstruktur HMG-Box-Domäne von murinen Sox4, die an *Lama1* (Laminin Alpha 1)-DNA bindet gewählt, da bisher keine Strukturaufklärung von SOX11 existiert und diese Struktur die ähnlichste verfügbare ist. Daher wurde die entsprechende *.pdb-file (Protein Data Bank code 3U2B; (Jauch et al., 2012))* bei der *RCSB Protein Data*

Bank (www.rcsb.org; Berman *et al.*, 2000) heruntergeladen und in *PyMOL* importiert. Im Anschluss wurde manuell der Aminosäureaustausch (p.L93Q) in der Struktur des murinen Sox4 vorgenommen. Dieser ist homolog zum Aminosäureaustausch (p.L83Q) im humanen SOX11. Abschließend wurde die Struktur um 90° und 180° gedreht und die Visualisierungen exportiert.

3.10.4 COSMIC- und cBioPortal-Datenbank Abfrage

Sowohl die COSMIC-Datenbank (Forbes *et al.*, 2015) als auch die cBioPortal-Datenbank (Gao *et al.*, 2013) wurden mit dem Suchbegriff *SOX11* nach möglichen somatischen *SOX11*-Mutationen durchsucht (Suche 22.05.2015). Im Anschluss wurden die Ergebnisse beider Abfragen verglichen und vereint.

3.11 Generierung der stabilen Zelllinie MLS-1765^{T248A-SOX11}

3.11.1 Mutagenese

Zur Generierung der stabilen Zelllinie MLS-1765^{SOX11} wurde zuvor via *Gateway*-Klonierung die *ccdB*-Sequenz eines pDEST26-Expressionsvektors (CMV-Promotor) durch die Codon-optimierte Sequenz (GeneArt) des humanen *SOX11* (inklusive Kozak-Sequenz) ersetzt (im folgenden *SOX11-pDEST26* genannt). Dieser Vektor wurde mit dem *Agilent Technologies QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis* Kit gemäß Herstellerprotokoll so mutiert, dass Thymidin²⁴⁸ durch Adenosin ersetzt wurde (im folgenden *SOX11^{T248A}-pDEST26* genannt). Dies entspricht der im HIPO-Projekt zuvor identifizierten *SOX11^{T248A}*-Mutation im Tumor des Patienten M615.

3.11.2 Transfektion und Selektion

MLS-1765-Zellen wurden mit dem *SOX11^{T248A}-pDEST26*-Vektor stabil transfiziert. Hierzu wurden 4 µg durch *BamHI*-Verdau linearisierte Plasmid-DNA mit 15 µL *Qiagen Attractene Transfection Reagent* in 10 mL Kulturmedium gemäß Herstellerprotokoll verwendet. Im Anschluss wurden die transfizierten MLS-1765-Zellen 14 Tage in Kulturmedium unter Selektion von 250 µg / mL Geneticin (G418) kultiviert. Monoklonale Zellklone mit stabiler Integration wurden selektiert und gemäß ihrer RNA- und Proteinexpression charakterisiert. Die mit dem *SOX11^{T248A}-pDEST26*-Vektor stabil transfizierten MLS-1765-Zellen werden im folgendem MLS-1765^{T248A-SOX11} genannt.

3.12 Materialien und Geräte

Tabelle 17: Materialien.

Material	Artikelnummer	Hersteller
0,05% Trypsin-EDTA (1x)	25300-054	Gibco (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
16% Formaldehyde Solution (w/v), Methanol-free, 10x 1 mL-Ampule	28906	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	4227.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
2-Propanol ≥ 99,5 p.a.	9866.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
96-well Flat Bottom Cell Culture Microplate, white, Chimney well, sterile	655073	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
96-well Flat Bottom Cell Culture Plate	4430100	Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Belgien)
Absolute SYBR Green ROX Mix (2x)	AB-1162	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase	12337-016	Invitrogen (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
Acrylamide/Bis Solution (37,5:1)	10688	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Agarose NEEO Ultra-Qualität	2267.5	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Albumin, Bovine	A-7638	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ammoniumpersulfate	13375.2	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
ApoTox-Glo Triplex Assay	G6321	Promega (Mannheim, Deutschland)
Attractene Transfection Reagent	301005	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Basic Primary Neurons Nucleofector Kit (25 RCT)	VPI-1003	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
BD Matrigel Matrix	354234	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
BigDye XTerminator Purification Kit	4376484	Applied Biosystems (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
Boric Acid p.A.	A3581	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Bromophenol Blue-Na-salt	15375	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Bromphenol Blue-Xylene Cyanole Dye Solution	B-3269	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Carestream® Kodak® X-Omat LS film	F1274	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Casein nach Hammarsten	440203H	VWR International GmbH (Erlangen, Deutschland)
Cell Culture Dishes 60 mm / 100 mm / 150 mm	5550300	Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Belgien)
Cell Culture Plate 6-well / 12-well / 24-well	4430500	Orange Scientific (Braine-l'Alleud, Belgien)
Cell Line Optimization Nucleofector Kit (20 RCT)	VCO-1001N	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
Cell Lysis Buffer (10x)	9803S	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande)
Cell Scraper/Zellschaber	541070	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

Material	Artikelnummer	Hersteller
Cellstar Tubes 15 mL / 50 mL	188271	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Costar Stripette Serological Pipette Sterile 5 mL / 10 mL / 25 mL	4488	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
CryoPure Gefäß 1,6 mL	72380	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
CSA II Rabbit Link	K1501	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
CytoSelect™ 48-Well Cell Adhesion Assay ECM Array (Fluorometric)	CBA-071-CB	BioCat GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Dasatinib	9052S	Cell Signaling Technology (Leiden, Niederlande)
Deck Works Low Binding Barrier Tip Sterile 10 µL / 20 µL / 100 µL / 200 µL / 1.000 µL	4136	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Deckgläser Menzel-Gläser 20x20 mm		Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Digitonin	19550.02	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Dimethylsulfoxide (for Cell Culture)	A3672	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
DTT (molecular biology grade)	R0861	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Dual-Luciferase Reporter Assay System	E1960	Promega (Mannheim, Deutschland)
Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (no calcium, no magnesium)	14190094	Gibco (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (high glucose)	D6429	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Ecolab Filtrationsvorsätze 0,2 µm	10462200	Schleicher & Schuell BioScience GmbH (Dassel, Deutschland)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ≥ 99% p.a.	8043.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
EdU HTS Kit 488	BCK-HTS488	baseclick GmbH (Tutzing, Deutschland)
Essigsäure Rotipuran 100% p.a.	3738.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol Rotipuran ≥ 99,8% p.a.	9065.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
ExoSAP-IT for PCR Product Cleanup	78205	USB (Affymetrix) (Santa Clara, USA)
EZ-Run™ prestained rec. protein ladder	10785674	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Fermentas BamHI (10 U/µL)	ER0051	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Fermentas CIAP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) (1 U/µL)	18009-027	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Fermentas HindIII (10 U/µL)	15207-012	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Fermentas NheI (10 U/µL)	ER0971	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Fetal Bovine Serum (Lot: 112M3395)	F7524	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Fibrinogen (from human Plasma)	F4883	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Material	Artikelnummer	Hersteller
Fibronectin (from human Plasma)	F2006	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
FideliTaq PCR Master Mix (2x)	71182	USB (Affymetrix) (Santa Clara, USA)
Formaldehyde Solution 37% acid free	1.03999.1000	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
FuGENE HD	E2312	Promega (Mannheim, Deutschland)
G 418 disulfate salt solution (50 mg/mL) (in H ₂ O, sterile-filtered, suitable for cell culture)	G8168	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (10.000x in Water)	41003	Biotium Inc. (Hayward, USA)
GeneRuler DNA Ladder 50bp / 100bp / 1kb	SM0372	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Genra Puregene DNA Isolierungs Kit	202005	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Glycerin ≥ 98% Ph.Eur. Wasserfrei	7530.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin Pufferan ≥ 99% p.a.	3908.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES Pufferan ≥ 99% (für die Gewebezucht)	9105.4	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Hexadimethrine Bromide	H9268	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
High Pure PCR Product Purification Kit	11732676001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)
Hydrochloric Acid (1N) (Salzsäure)	1.09057.1000	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Immobilon-P Membran, PVDF, 0,45 µm	IPVH00010	Millipore (Merck Chemicals GmbH) (Darmstadt, Deutschland)
Ionomycin	I9657	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Kaliumchlorid	4936.0500	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Kristallviolett p.a.	T123.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
L-Glutamine (200 mM)	G7513	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Lipofectamine 2000	11668-019	Invitrogen (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
Magnesiumchlorid Hexahydrat	1.05833.0250	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Menzel-Gläser 76x26 mm		Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Methanol Rotipuran ≥ 99,9% p.a.	4627.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate (0,1 mL)	4346907	Applied Biosystems (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
MicroAmp Optical Adhesive Film	4311971	Applied Biosystems (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
Milchpulver (Blotting Grade)	T145.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Myco Alert Assay Control Set	LT07-518	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)

Material	Artikelnummer	Hersteller
Myco Alert PLUS Mycoplasma Detection Kit	LT07-705	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
N, N, N', N'-Tetramethyl ethylene diamine (TEMED)	35925	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Natriumhydroxid ≥ 99%	9356.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Natronlauge (1N)	K021.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
NucleoSpin RNA (250)	740955.250	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
Opti-MEM (1x) Reduced Serum Medium	31985-047	Gibco (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
Pasteur Capillary Pipetts		WU Mainz (Wilhelm Ulbrich GbR) (Bamberg, Deutschland)
PCR Reaktionsgefäß 0,2 ml	683271	Greiner Bio-One GmbH (Frickhausen, Deutschland)
Penicilin/Streptomycin (10.000 U/mL)	A2213	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
peqGOLD 100 µM dATP / dGTP / dTTP / dCTP	20-1011	Peqlab (VWR International GmbH) (Erlangen, Deutschland)
Permeabilization Buffer (10x)	00-8333-56	eBioscience (Frankfurt, Deutschland)
PhosSTOP	4906845001	Roche Diagnostics Deutschland GmbH (Mannheim, Deutschland)
Pierce BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Pierce Crosslink IP Kit	26147	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Platinum Pfx DNA Polymerase	11708-013	Invitrogen (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
Ponceau S solution (0,2% in 3% TCA)	33427	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Protease Inhibitor Mix G	39101.01	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit	ARY003B	R&D Systems Inc. (Minneapolis, USA)
PureYield Plasmid Midiprep System (300)	A2496	Promega (Mannheim, Deutschland)
Q5 Hot Start High-Fidelity (2x) Master Mix	M0494S	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
Qiaprep Spin Miniprep Kit (50)	27104	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Quick Extract DNA Extraction Solution 1.0	QE09050	Epicentre (Madison, USA)
Quick Ligation™ Kit	M2200S	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit	200517	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Real Antibody Diluent	S2022	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
Real Detection System Peroxidase/AEC Rabbit/Mouse	K5003	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (100)	K-1632	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)

Material	Artikelnummer	Hersteller
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	A156.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
RPMI-1640 Medium	R8758	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Safe-Lock Tubes 0,5 mL / 1,5 mL / 2,0 mL	0030120.094	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
SDS-Solution (10%)	A0676	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Snapcap PP Tube 14 mL Sterile	187261	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäuser, Deutschland)
SOC Outgrowth Medium	B9020S	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
Sodium pyruvate	L0473	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Staurosporine	S5921	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Surveyor Mutation Detection Kit	706020	Integrated DNA Technologies Inc. (Coralville, USA)
Taq DNA Polymerase, recombinant (5 U/μL)	EP0402	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Target Retrieval Solution (10x) pH = 6,1	S1699	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
Target Retrieval Solution (10x) pH = 9	S2367	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)	M5655	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Trabectedin (Yondelis) 0,25 mg		PharmaMar (Madrid, Spanien)
Transcription CHIP Kit for 18 IPs	C01010090	Diagenode (Seraing (Ougrée), Belgien)
Trichostatin A (from Streptomyces sp.)	T8552	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
TRIS Pufferan ≥ 99,9% p.a.	4855.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Trypan Blue 0,5% (w/v)	L6323	Biochrom (Berlin, Deutschland)
Tween 20	P1379	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water	10977035	Gibco (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
Vectashield Mounting Medium for Fluorescence	H-1000	Vector Laboratories Inc. (Burlingame, USA)
Vorinostat (SAHA, MK0683)	S1047	Selleck (Houston, USA)
Whatman® Gel blotting paper	WHA10427826	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)

Tabelle 18: Geräte.

Gerät	Hersteller
3500 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
AE 100 Analysenwaage	Mettler-Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies (Waldbronn, Deutschland)
Axiovert 40C Microscope	Carl Zeiss AG (Jena, Deutschland)
Biowizard Silverline SL-130 Blue Series (mikrobiologische Sicherheitswerkbank)	Kojair (EWALD Innovationstechnik GmbH) (Bad Nenndorf, Deutschland)
Certomat R TischiSchüttler + Certomat H Inkubationshaube	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
CKX41 Inverted Microscope + XM10 Monochrome Camera	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
Covaris S220 High performance Sample Preparation System	Covaris (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
Electrophoresis Power Supply EPS 3500	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)
FluorChem M Detection System	ProteinSimple (San Jose, USA)
FLUOStar Omega Microplatereader	BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, Deutschland)
HERAsafe HS (mikrobiologische Sicherheitswerkbank)	Heraeus (Thermo Fisher Scientific GmbH) (Dreieich, Deutschland)
INCO 2 246 (Zellkultur-Brutschrank)	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Live Cell Imaging System	Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)
Megafuge 1.0RS Zentrifuge	Heraeus (Thermo Fisher Scientific GmbH) (Dreieich, Deutschland)
Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
miniSpin Plus Zentrifuge	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mixing Block MB-102	Bioer Technology (Binjiang, China)
MultiSkan Ascent Microplate Photometer	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Nucleofector 2b/II Device	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
Odyssey® Sa Infrared Imaging System	LI-COR Biotechnology GmbH (Bad Homburg Deutschland)
PerfectBlue Gelsystem Midi S	Peqlab (VWR International GmbH) (Erlangen, Deutschland)
PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
REAX 2000 Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Rollschüttler RM5-30V	BioCat GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Rotator	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Gerät	Hersteller
Sliding Microtome Microm HM 430	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
StepOne Plus Real-Time PCR System	Applied Biosystems (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
SW22 Wasserbad	JULABO GmbH (Seelbach, Deutschland)
Swiftpet Pro Pippettierhilfe	Abimed (Kinesis GmbH) (Langenfeld, Deutschland)
Synergy UV-R SYNSYR000 Water Purification System	Millipore (Merck Chemicals GmbH) (Darmstadt, Deutschland)
T1 Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
T3000 Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Thermomixer 5436	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge Z 252 MK	Hermle AG (Gosheim, Deutschland)
Tissue-Tek TEC 5 Tissue Embedding Console System	Sakura Finetek Germany GmbH (Staufen, Deutschland)
VacuBoy	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH (Biebertal, Deutschland)
VacuSafe Pumpe	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH (Biebertal, Deutschland)
Veriti 96well Thermal Cycler	Applied Biosystems (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
X-Cite 120 Wide-Field Fluorescence Microscope Excitation Light Source	Excelitas Technologies Corp. (Massachusetts, USA)
φ32 pH Meter	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)

4 Ergebnisse

4.1 Zuvor durchgeführte Arbeiten

4.1.1 SOX11-Expression in Liposarkomen

Mit dem Ziel, differentiell exprimierte Gene zwischen primären MLS und nicht-neoplastisch verändertem Fettgewebe zu identifizieren, wurde zu Beginn der Studie ein genomweites Genexpressionsprofil von neun primären MLS und zwei nicht-neoplastischen Fettgeweben mittels *Illumina HumanHT-12 Arrays* erstellt (Renner *et al.*, 2013). Bei der unsupervidierten *Cluster*-Analyse der Expressionsdaten bildeten die MLS-Fälle und die beiden Fettgewebeproben zwei diskrete *Cluster*. In der *Rank-Product*-Analyse (Breitling *et al.* 2004) war der neuronale Transkriptionsfaktor *SOX11* das signifikant am stärksten hochregulierte Gen in MLS im Vergleich zu nicht-neoplastischen Fettgewebe (52,9-fach; $p < 0,001$) (Abbildung 4A).

Nach der Identifikation von *SOX11* als das signifikant am stärksten hochregulierte Gen in MLS, wurde die *SOX11*-mRNA-Expression in 20 weiteren primären unbehandelten *high-grade* Liposarkomen der Typen PLS (n = 8) und DDLS (n = 12) unter Verwendung des gleichen Datensatzes untersucht. Hierbei zeigten PLS eine 1,7-fach und DDLS eine 3,5-fach höhere *SOX11*-Expression als die entsprechenden nicht-neoplastischen Fettgewebe (Abbildung 4B). Zusätzlich wurden die *Array*-basierten *SOX11*-Expressionsdaten in einer unabhängigen Kohorte von 17 normalen Fettgewebeproben und 20 MLS mittels qPCR validiert. Hierbei lag der Median der relativen *SOX11*-Expression in MLS 256,1-fach höher im Vergleich zum Median der normalen Fettgewebe ($p \leq 0,001$; Abbildung 4C).

Zur weiteren Evaluierung der *SOX11*-Expression wurde eine immunhistochemische Analyse auf *Tissue-Microarrays* mit MLS (n = 56) und einer Serie von 237 weiteren Liposarkomen bestehend aus PLS (n = 23), WDLS (n = 95) und DDLS (n = 119) durchgeführt (Abbildung 5A-C). Hierbei zeigten insgesamt 91,1 % (51/56) der MLS eine positive Färbung von *SOX11* (in variierender Stärke von schwach bis stark) und 75 % (42/56) der Fälle wiesen eine starke Expression von *SOX11* auf. Fünf der MLS waren komplett negativ (8,9 %). Die Diagnose konnte in diesen fünf MLS-Fällen allerdings durch histologische Re-Evaluation und durch Nachweis eines *FUS-DDIT3*-Fusionstranskripts verifiziert werden. Weiter zeigte sich eine positive *SOX11*-Färbung in 18,8 % (18/95) der WDLS, 47,1 % (56/119) der DDLS und 47,8 % (11/23) der PLS (Abbildung 5D). Die immunhistochemische Analyse von nicht-neoplastisch veränderten Fettgeweben zeigte keine *SOX11*-Expression.

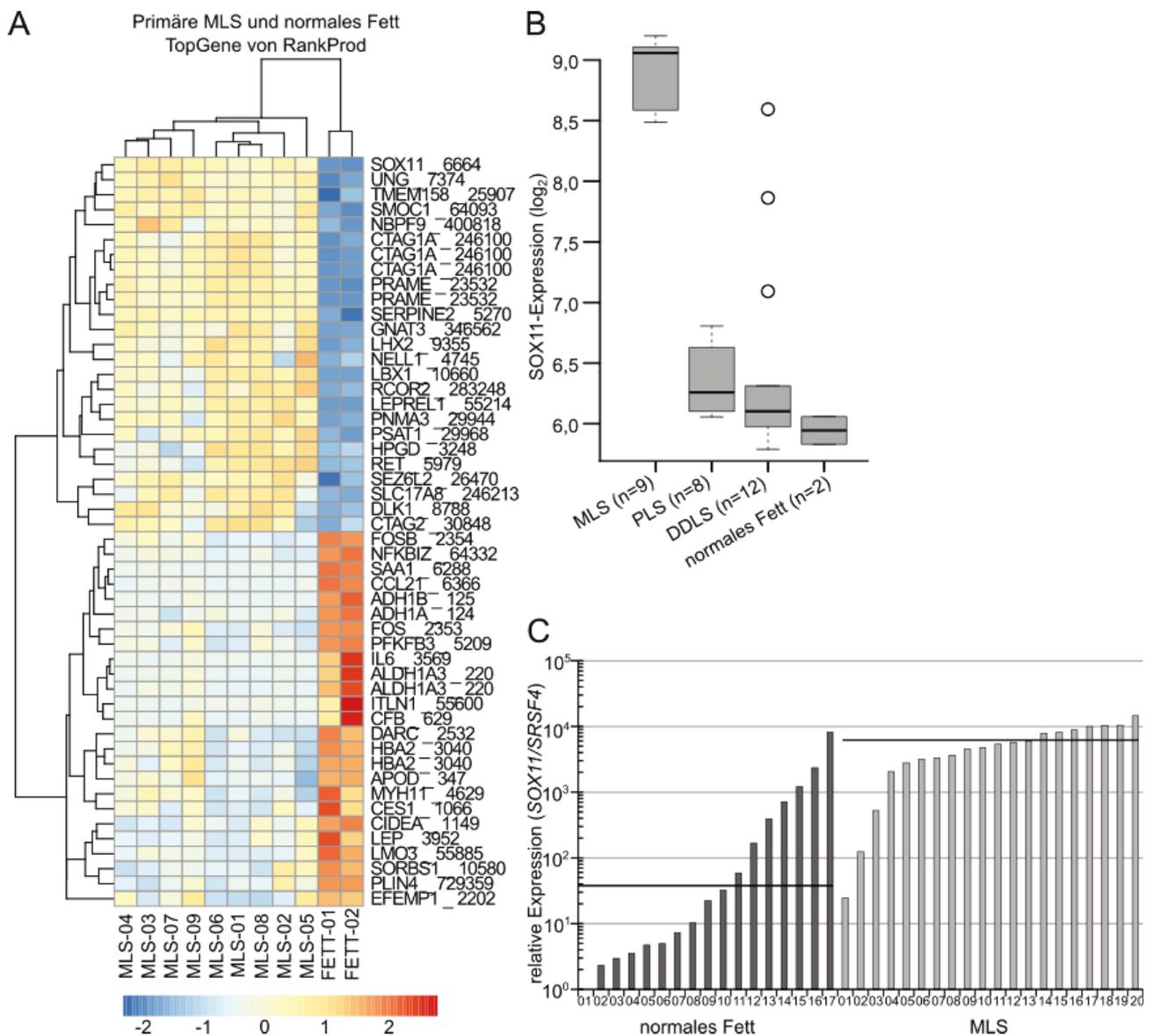


Abbildung 4: SOX11-Expression in Liposarkomen.

(A) *Heatmap* der 25 signifikant am stärksten hoch- und runterregulierten Transkripte in primären MLS im Vergleich zu nicht-neoplastischen Fettgewebe. Die unsupervidierte *Cluster*-Analyse zeigt zwei diskrete *Cluster* für MLS und Fettgewebe. Gemäß *Rank-Product*-Analyse ist *SOX11* das signifikant am stärksten hochregulierte Gen in MLS im Vergleich zu normalen Fettgewebe. Die Daten der Genexpression der neun MLS-Fälle und der zwei Fettgewebe wurden von Renner *et al.* zuvor im Rahmen einer genomweiten Genexpressionsanalyse mit *Illumina HumanHT-12 Arrays* erhoben (Renner *et al.*, 2013). (B) Der *Box Plot* zeigt die mRNA-Expression von *SOX11* in Liposarkomen einer Kohorte von 29 unbehandelten primären *high-grade* Liposarkomen und zwei normalen Fettgeweben, die mit *Illumina HumanHT-12 Arrays* ermittelt wurden. Die gepunkteten Balken zeigen die Extremwerte. Die Boxen repräsentieren den Interquartilabstand (vom 25. bis zum 75. Perzentil der Expression). Die dunklen Linien zeigen den Median an. (C) Relative mRNA-Expression von *SOX11* in einer unabhängigen Kohorte von 17 normalen Fettgeweben (Median $\bar{x} = 22,5$) und 20 MLS (Median $\bar{x} = 5761,5$) bestimmt durch qPCR. Die horizontalen Linien repräsentieren den jeweiligen Median. Die Experimente wurden durchgeführt von Dr. Marcus Renner.

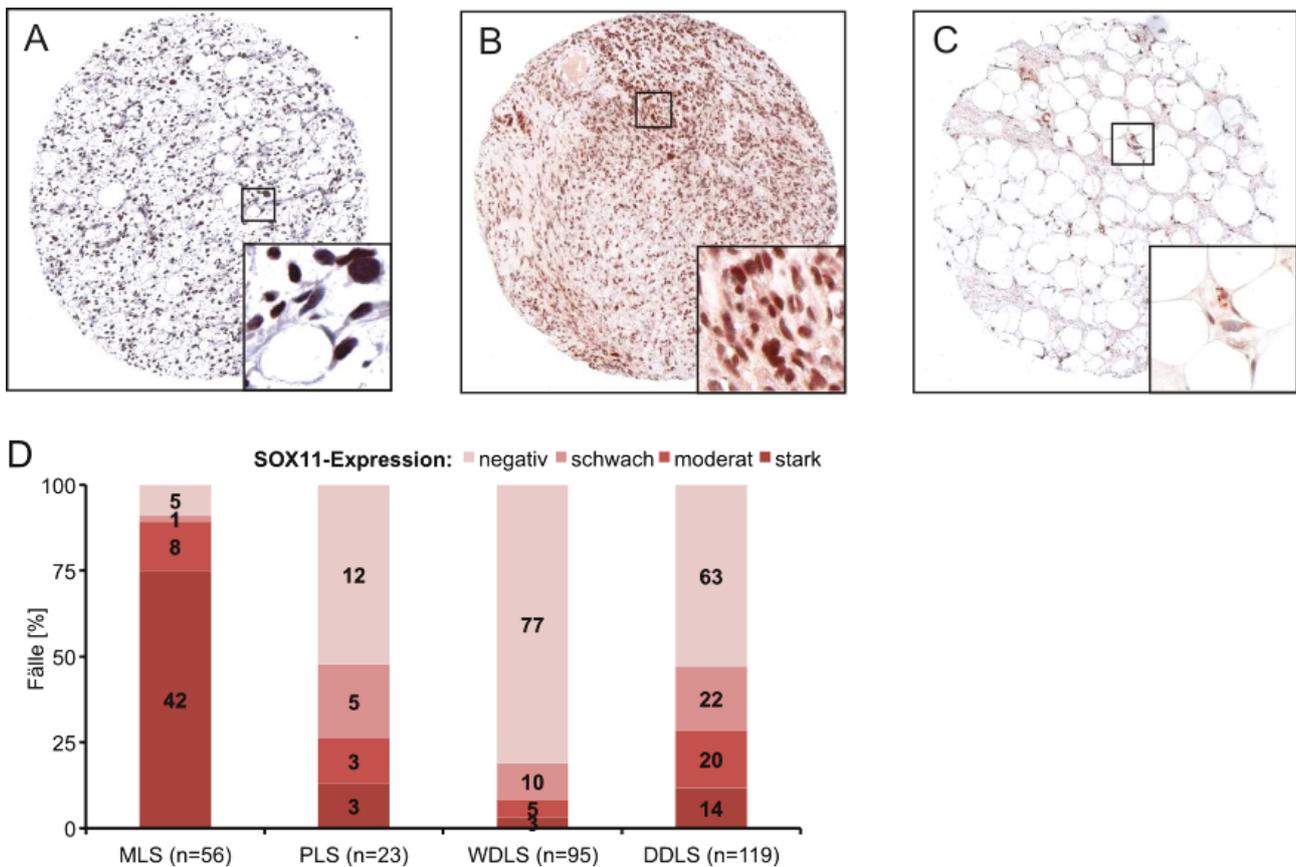


Abbildung 5: Immunhistochemische Analyse der SOX11-Expression in Liposarkomen.

Repräsentative immunhistochemische Färbungen von SOX11 auf *Tissue Microarrays* in MLS (A), DDLS (B) und WDLS (C). Es findet sich eine nukleäre Färbung von SOX11 in der DDLS-Komponente (B), jedoch nicht in der WDLS-Komponente (C) des gleichen Liposarkompatienten. (D) Zusammenfassung der immunhistochemischen Analyse der SOX11-Expression von 293 Liposarkomen unterschiedlicher Typen; n: Anzahl der Fälle. Die Experimente wurden durchgeführt von Dr. Marcus Renner.

4.1.2 SOX11-Proteinexpression in Liposarkomzelllinien

Zusätzlich zur immunhistochemischen Analyse wurde die SOX11-Proteinexpression in acht bereits gut charakterisierten Liposarkomzelllinien bestimmt (Abbildung 6). In diesem Fall exprimieren beide MLS-Zelllinien das determinierende FUS-DDIT3-Fusionsprotein und zeigen äußerst geringe Expressionslevel an SOX11-Protein. Die WDLS/DDLS-Zelllinien FU-DDLS-1, T449, T778 und LPS-141 besitzen alle die charakteristische Amplifikation von Chromosom 12q13-15. Die Zelllinien FU-DDLS-1 und LPS-141 zeigen eine positive SOX11-Proteinexpression, wohingegen die Zelllinien T449 und T778 negativ für SOX11 sind. In der gering differenzierten PLS-Zelllinie LISA-2 und in der undifferenzierten Zelllinien SW872 ist keine SOX11-Proteinexpression detektierbar.

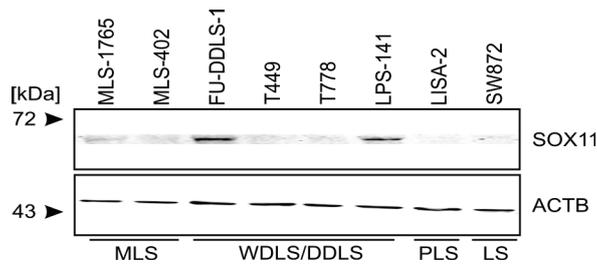


Abbildung 6: SOX11-Proteinexpression in acht Liposarkomzelllinien.

Der Western Blot zeigt eine SOX11-Proteinexpression in den Zelllinien FU-DDLS-1 und LPS-141, äußerst geringe Expressionslevel in den Zelllinien MLS-1765, MLS-402, jedoch keine in den Zelllinien, T449, T778, LISA-2 und SW872. Die Experimente wurden teilweise durchgeführt von Dr. Marcus Renner.

4.1.3 Generierung einer MLS-Zelllinie mit ektopischer SOX11-Expression

Der mit 91,1 % hohe Anteil an primären MLS mit positiver SOX11-Expression gab Anlass, der funktionellen Bedeutung von SOX11 nachzugehen. Da weltweit nur wenige MLS-Zelllinien zur Verfügung stehen und die beiden MLS-Zelllinien MLS-1765 und MLS-402 weitestgehend keine endogene SOX11-Expression gezeigt haben, wurde MLS-1765 zur stabilen Überexpression von SOX11 gewählt. Dazu wurde die Zelllinie MLS-1765 sowohl mit einem Codon-optimierten SOX11-Expressionsvektor (MLS-1765^{SOX11}), als auch dem Leervektor (MLS-1765^{EV}) stabil transfiziert, stabile Zellklone selektiert und auf die SOX11-Expression untersucht. Aus insgesamt 24 stabil transfizierten Zellklonen zeigte der Zellklon 11 hohe SOX11-Expressionlevel in der qPCR (Abbildung 7A) und im Western Blot (Abbildung 7B) sowie eine nukleäre Lokalisation von SOX11 in der immunhistochemischen Analyse von MLS-1765^{SOX11}-Zellen (Abbildung 7C). Dieser Klon wurde für die nachfolgende Identifizierung von SOX11-Zielgenen und die funktionelle Charakterisierung von SOX11 in MLS ausgewählt.

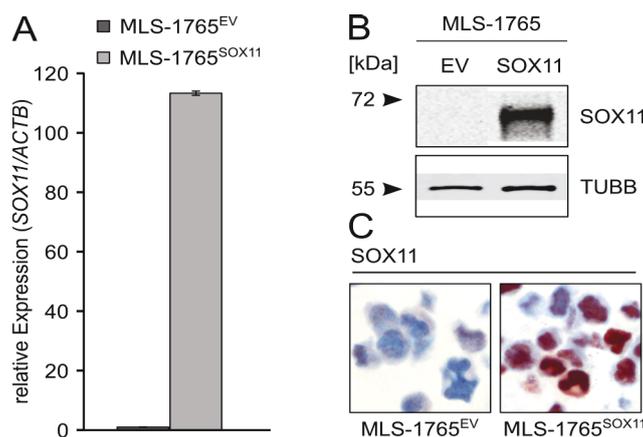


Abbildung 7: Stabile Überexpression von SOX11 in der MLS-Zelllinie MLS-1765.

Die generierte stabile Zelllinie MLS-1765^{SOX11} zeigt im Vergleich zur entsprechenden Kontrollzelllinie MLS-1765^{EV} hohe Mengen an SOX11-mRNA (A) und SOX11-Protein (B). Die immunhistochemische Analyse der präzipitierten MLS-1765-Zellen zeigt eine deutliche nukleäre Färbung von SOX11 (C). Die Experimente wurden durchgeführt von Dr. Marcus Renner.

4.1.4 Globale Genexpressionsanalyse und Identifizierung von SOX11-Zielgenen

Zur Identifizierung von differentiell exprimierten Genen nach Überexpression von SOX11 wurde ein globales Genexpressionsprofil der MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen durchgeführt. Hierbei konnten 858 Transkripte mit mindestens 2-fach verstärkter und 248 Transkripte mit mindestens 2-fach verringerter Expression ermittelt werden. Bei der funktionellen Annotation der hochregulierten Transkripte nach SOX11-Überexpression mit Hilfe der Datenbank KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; Kanehisa & Goto, 2000) zeigte sich eine signifikante Assoziation mit sieben Signalwegen bzw. Prozessen ($p \leq 0,05$). Hierzu zählen Zellzyklus (16 Gene, $p = 1,2 \times 10^{-4}$), Eizellen-Meiose (zwölf Gene, $p = 4,3 \times 10^{-3}$), Biosynthese ungesättigter Fettsäuren (fünf Gene, $p = 1,0 \times 10^{-2}$), arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie (acht Gene, $p = 3,2 \times 10^{-2}$), WNT-Signalweg (zwölf Gene, $p = 3,9 \times 10^{-2}$), Ubiquitin-vermittelte Proteolyse (11 Gene, $p = 4,8 \times 10^{-2}$) und Glutathion-Metabolismus (sechs Gene, $p = 4,9 \times 10^{-2}$) (Abbildung 8A).

Um potentielle SOX11-Zielgene zu identifizieren wurde eine *Rank-Product*-Analyse durchgeführt und die Schnittmenge mit den signifikant differentiell exprimierten Genen in primären MLS im Vergleich zu normalen Fettgeweben gebildet (Abbildung 4; *percentage of false predictions* $p < 0,05$; *fold-change* $\geq 2,0$). Dies führte zu 19 hoch- und sieben runterregulierten Transkripten, die sowohl in primären MLS verglichen zu normalen Fettgewebe, als auch nach Überexpression von SOX11 in MLS-1765 die gleiche Expressionstendenz verbunden mit SOX11 zeigen (Abbildung 8B).

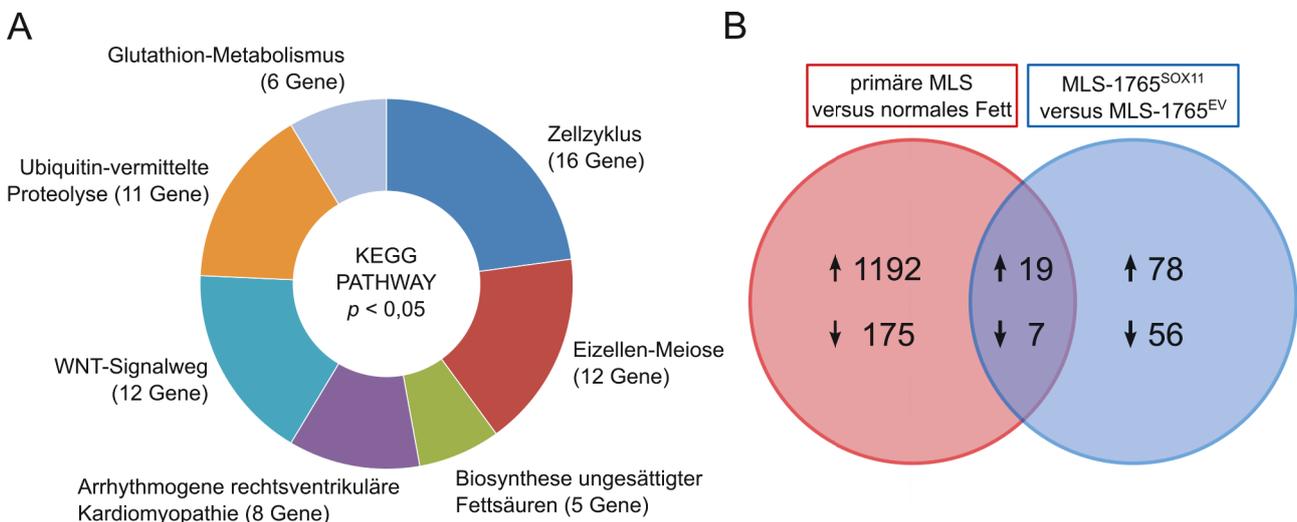


Abbildung 8: Globale Genexpressionsanalyse nach Überexpression von SOX11 in MLS-1765.

(A) Datenbank-Analyse mit *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Kanehisa & Goto, 2000) der hochregulierten Transkripte durch SOX11-Überexpression in MLS-1765 (*fold-change* $\geq 2,0$). (B) Venn-Diagramm der differentiell exprimierten und überlappenden Transkripte zwischen primären MLS versus normalem Fettgewebe und MLS-1765^{SOX11} versus MLS-1765^{EV} ($p < 0,05$; *fold-change* $\geq 2,0$). Die Experimente wurden durchgeführt von Dr. Marcus Renner.

Die größte Übereinstimmung ist hier für *CD24* zu nennen, das mit 20,8-fach den höchsten Expressionslevel im Vergleich zwischen MLS-1765^{SOX11} versus MLS-1765^{EV} und mit 6,9-fach den fünft-höchsten Expressionslevel im Vergleich MLS versus Fettgewebe zeigte. Interessanterweise befindet sich *SOX11* unter den Zielgenen obwohl eine Codon-optimierte *SOX11*-Sequenz zur Generierung der stabilen MLS-1765^{SOX11}-Zelllinie verwendet wurde. Hierbei handelt es sich um das endogene *SOX11*-Transkript, das sich durch seinen Sequenzunterschied separat detektieren lässt. Von den 19 hochregulierten Transkripten zeigen alle, mit Ausnahme *THEM6*, eine Konsensus-Bindesequenz für SRY. Unter den hochregulierten Genen wurden sieben als potentielle *SOX11*-Zielgene in MCL identifiziert (Wang *et al.*, 2010; Vegliante *et al.*, 2013; Kuo *et al.*, 2014) (Tabelle 19).

Tabelle 19: 19 hochregulierte Transkripte, die in MLS-1765^{SOX11} versus MLS-1765^{EV} und in primären MLS versus normales Fett eine positive Korrelation mit *SOX11* zeigen.

SRY-Transkriptionsfaktor-Bindestelle (TFBS) *Score* ermittelt mit oPOSSUM V3.0 (Kwon *et al.*, 2012);

RefSeq: Referenzsequenz, n.a.: nicht verfügbar; ¹ Wang *et al.*, 2010; ² Vegliante *et al.*, 2013;

³ Kuo *et al.*, 2014; * *fold-change*. Die Experimente wurden durchgeführt von Dr. Marcus Renner.

Gen	RefSeq	*MLS-1765 ^{SOX11} vs. EV	*MLS vs. Fett	Referenz	SRY TFBS Score
CD24	NM_013230.2	20,8	6,9	1; 2	n.a.
TMSB15A	NM_021992.2	17,4	4,0	1; 2	7,6
SBK1	NM_001024401.2	15,5	2,1	2	9,8
LHX2	NM_004789.3	12,9	26,0	2; 3	9,2
NNAT	NM_181689.1	6,5	6,0	-	10,2
SOX11	NM_003108.3	6,1	52,9	2; 3	7,2
KIT	NM_001093772.1	5,9	2,3	-	9,6
TUBB2B	NM_178012.3	5,6	8,9	-	8,3
THEM6	NM_016647.2	4,9	6,0	-	-
TMSB15B	NM_194324.1	4,5	3,8	1	9,8
CBX2	NM_005189.1	4,3	6,9	-	10,4
DPYSL4	NM_006426.1	4,2	7,2	-	10,4
TMSB15B	NM_194324.1	4,1	3,7	1	9,8
IRX3	NM_024336.1	4,0	4,9	3	9,8
KIT	NM_000222.1	3,9	2,2	-	10,9
COL5A2	NM_000393.3	3,9	3,2	-	10,9
CDH2	NM_001792.2	3,8	2,7	-	10,4
NREP	NM_004772.1	3,6	5,8	1	11,4
TMSB15B	XM_936687.1	3,4	3,2	1	9,8

4.2 Eigene Arbeiten

4.2.1 Funktionelle Charakterisierung von SOX11 nach ektopischer Überexpression in der MLS-Zelllinie MLS-1765

Um den Einfluss von SOX11 auf den Phänotyp der MLS-Zelllinie MLS-1765 funktionell zu charakterisieren, wurden unterschiedliche zellbasierte Assays mit der zuvor generierten stabilen MLS-1765^{SOX11}-Zelllinie durchgeführt. Zu Beginn wurde ein Wundheilungs-Assay durchgeführt, der nach 24 h eine signifikant verminderte Migration (78 %, $p < 0,05$) von MLS-1765-Zellen nach Überexpression von SOX11 zeigte (Abbildung 9A). Ein im Anschluss durchgeführter Klonogenitäts-Assay über zehn Tage zeigte weiter eine durch SOX11-vermittelte signifikant verminderte Kolonienbildungskapazität (33 %, $p < 0,05$) (Abbildung 9B).

Als nächstes wurde ein MTT-Assay über einen Zeitverlauf von 96 h durchgeführt bei dem die MLS-1765^{SOX11}-Zellen im Vergleich zu den MLS-1765^{EV}-Zellen eine deutlich reduzierte Viabilität aufwiesen (Abbildung 9C). Da die im MTT-Assay beobachtete verminderte Viabilität in den MLS-1765^{SOX11}-Zellen auch durch eine verminderte Proliferation hervorgerufen werden kann, wurde ein EdU-Proliferations-Assay durchgeführt. Dieser Assay ermöglicht die direkte Messung von Proliferation durch Inkorporation von 5-Ethynyl-dU in neu-synthetisierte DNA. Der EdU-Proliferations-Assay zeigte, dass SOX11 die Proliferation der MLS-1765-Zellen signifikant reduziert (Abbildung 9D). Um die Einflüsse von SOX11 auf Viabilität und Proliferation mit einem unabhängigen Assay zu verifizieren und zusätzlich einen Effekt auf Apoptose oder Zytotoxizität auszuschließen, wurde ein *ApoTox-GloTM* Assay gewählt. Dieser Assay erfasst simultan Zellviabilität, Zytotoxizität und Apoptose. Hierbei konnte eine signifikante Reduktion der Zellviabilität durch SOX11 bei unveränderter Zytotoxizität und Apoptose detektiert werden. Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass die zuvor im MTT-Assay und EdU-Proliferations-Assay verzeichnete Reduktion der Zellviabilität ausschließlich durch eine verminderte Proliferation begründet ist. Eine verstärkte Apoptose oder Lyse der Zellen durch Zytotoxizität als Ursache kann weitestgehend ausgeschlossen werden (Abbildung 9E).

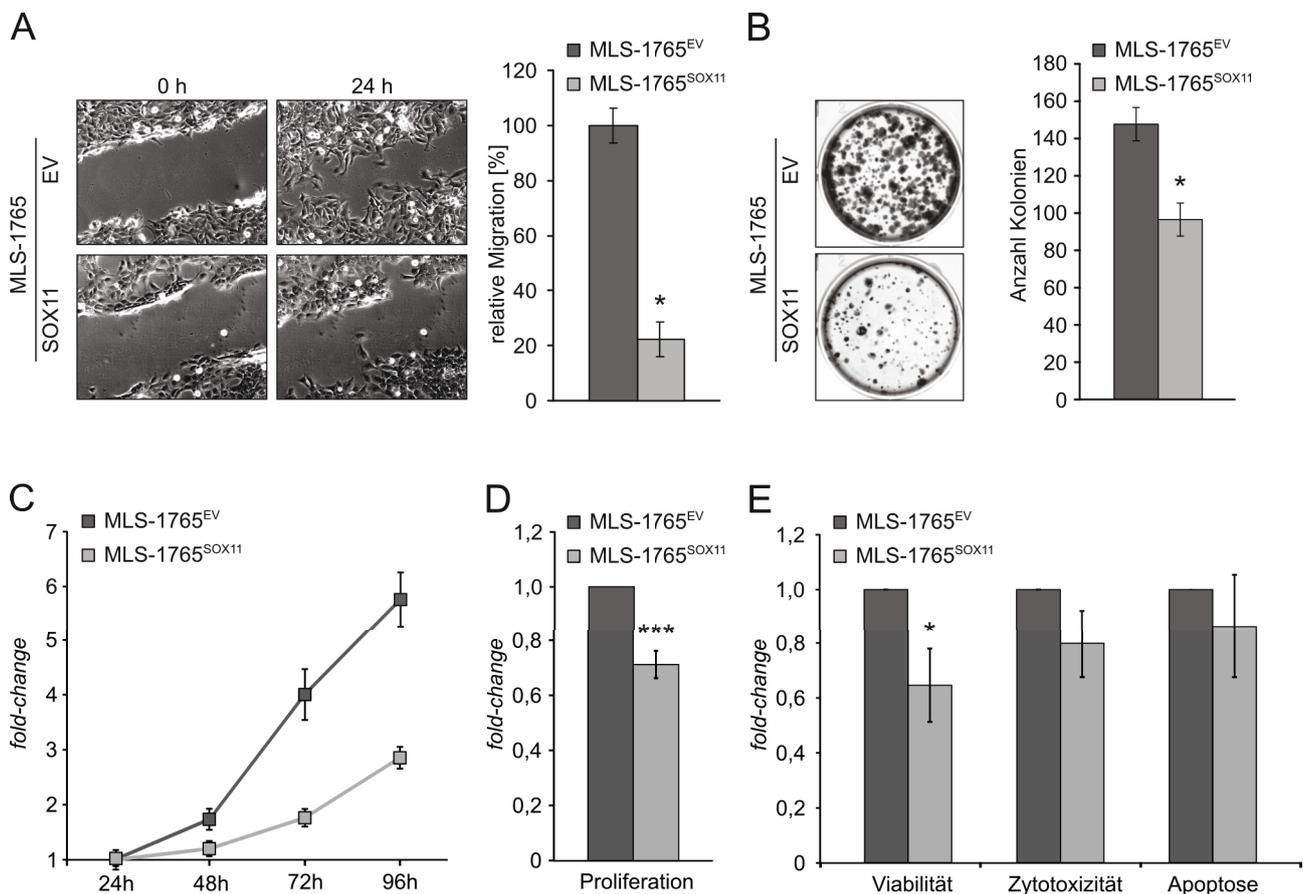


Abbildung 9: Funktionelle Charakterisierung von MLS-1765^{SOX11}.

(A) Der repräsentative Wundheilungs-Assay aus fünf unabhängigen Experimenten zeigt eine um 78 % verminderte Migration und (B) der repräsentative Klonogenitäts-Assay aus drei unabhängigen Experimenten eine verminderte Kolonienbildungskapazität nach SOX11-Überexpression in MLS-1765. (C) Der repräsentative MTT-Assay aus drei unabhängigen Experimenten demonstriert eine verminderte Zellviabilität der MLS-1765 nach Überexpression von SOX11 im Zeitverlauf. (D) Der EdU-Proliferations-Assay weist eine signifikante Reduktion der Zellproliferation durch SOX11 nach. (E) Der *ApoTox-GloTM* Assay detektiert eine nach SOX11-Überexpression signifikant reduzierte Zellviabilität bei unveränderter Zytotoxizität und Apoptose (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$). Der Wundheilungs-Assay wurde durchgeführt von Dr. Marcus Renner.

Sowohl die verminderte Migration als auch die starke Hochregulation des Oberflächenmoleküls *CD24* nach Überexpression von SOX11 in MLS-1765-Zellen gaben Anlass, den Einfluss auf Integrin-vermittelte Zelladhäsion näher zu untersuchen. Dazu wurde der *CytoSelectTM Cell Adhesion Assay ECM Array* mit unterschiedlichen Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) gewählt.

Hierbei zeigten MLS-1765^{SOX11}- im Vergleich mit MLS-1765^{EV}-Zellen keine signifikante Veränderung im Adhäsionsverhalten an Collagen I, Collagen IV, Laminin I und Fibrinogen. Weiter ließen MLS-1765^{SOX11}-Zellen eine leicht verstärkte Adhäsion an Fibronectin 1 im Vergleich mit MLS-1765^{EV}-Zellen erkennen (Abbildung 10A). Um eine mögliche Veränderung in der Bindung von Fibronectin 1 weiter zu untersuchen wurde ein Zelladhäsions-Assay mit selbstbeschichteten

Zellkulturplatten durchgeführt. Hierbei konnte die leicht verstärkte Adhäsion der MLS-1765^{SOX11}-Zellen an Fibronectin 1 im Vergleich zu MLS-1765^{EV}-Zellen jedoch nicht reproduziert werden (Abbildung 10B).

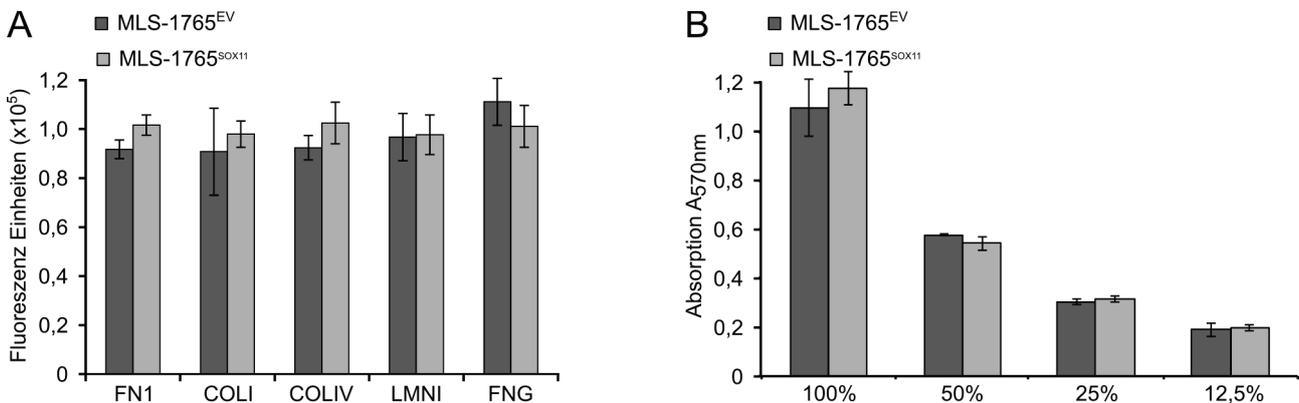


Abbildung 10: Zelladhäsion an Komponenten der extrazellulären Matrix.

(A) SOX11 zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Zelladhäsion an die untersuchten extrazellulären Matrixkomponenten Collagen I (COLI), Collagen IV (COLIV), Laminin I (LMNI) und Fibrinogen (FNG) mit geringem Unterschied in der Bindung an Fibronectin 1 (FN1). (B) Die geringen Unterschiede in der Zelladhäsion an Fibronectin 1 lassen sich in einem Zelladhäsions-Assay mit selbstbeschichteten Zellkulturplatten nicht reproduzieren; die x-Achse zeigt die relative Anzahl der ausgesäten Zellen.

4.2.2 SOX11-Expression erhöht die Sensitivität von MLS-1765 gegenüber Chemotherapeutika

Um einen möglichen Einfluss von SOX11 auf die Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika von MLS-1765-Zellen zu identifizieren, wurden diese in Dosis-Wirkung-Experimenten mit unterschiedlichen Chemotherapeutika behandelt. Zunächst wurden die MLS-1765-Zellen mit Doxorubicin, einem zytotoxischen Anthracyclin, das in der Standarderstlinientherapie von Weichgewebssarkomen verwendet wird, behandelt. Hierbei zeigten die MLS-1765^{SOX11}- im Vergleich zu den MLS-1765^{EV}-Zellen keinen Unterschied in ihrem EC₅₀-Wert (EC₅₀ ≈ 24 nM) (Abbildung 11A). Im nächsten Schritt wurden die MLS-1765-Zellen mit den niedermolekularen Chemotherapeutika Dasatinib und Trabectedin behandelt. Hierbei erschienen die MLS-1765^{SOX11}- im Vergleich zu MLS-1765^{EV}-Zellen sensitiver gegenüber der Behandlung mit beiden Chemotherapeutika zu sein. Dies zeigt sich in ihren niedrigeren EC₅₀-Werten gegenüber Dasatinib (EC₅₀ ≈ 150 nM und EC₅₀ ≈ 980 nM) (Abbildung 11B) und dem hochpotenten Trabectedin (EC₅₀ ≈ 0,8 nM und EC₅₀ ≈ 1,4 nM) (Abbildung 11C).

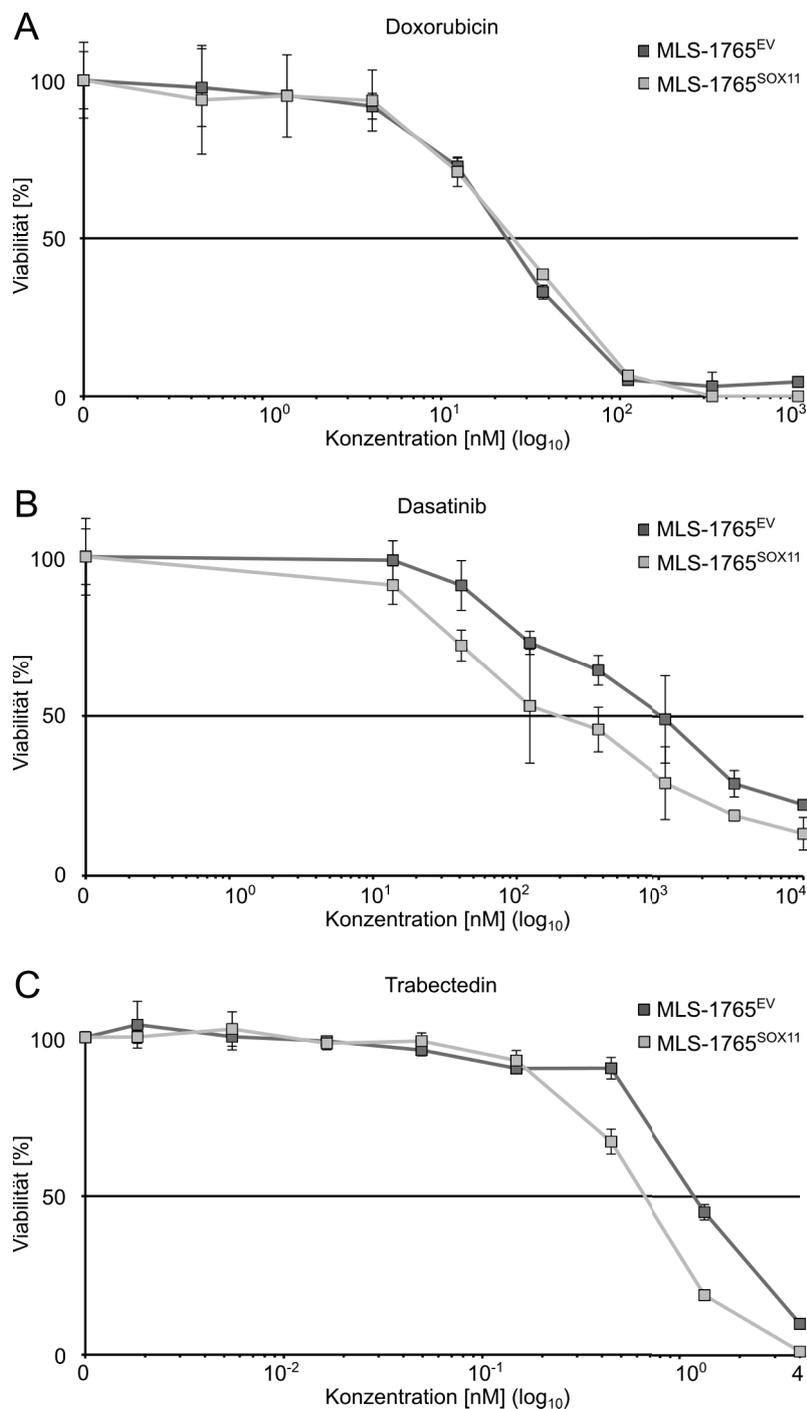


Abbildung 11: Die SOX11-Expression erhöht die Sensitivität von MLS-1765 gegenüber den Chemotherapeutika Dasatinib und Trabectedin, jedoch nicht gegenüber dem Standarderstlinientherapeutikum Doxorubicin.

(A) Die EC_{50} -Werte der MLS-1765^{SOX11}- ($EC_{50} \approx 24$ nM) und MLS-1765^{EV}-Zellen ($EC_{50} \approx 24$ nM) zeigen keine Unterschiede bei der Behandlung mit Doxorubicin. (B) Bei der Behandlung mit Dasatinib zeigen MLS-1765^{SOX11}- einen niedrigeren EC_{50} -Wert ($EC_{50} \approx 150$ nM) als MLS-1765^{EV}-Zellen ($EC_{50} \approx 980$ nM). (C) Ebenso weisen bei der Behandlung mit Trabectedin MLS-1765^{SOX11}- einen niedrigeren EC_{50} -Wert ($EC_{50} \approx 0,8$ nM) als MLS-1765^{EV}-Zellen ($EC_{50} \approx 1,4$ nM) auf. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten, auf deren Mittelwert sich die angegebenen EC_{50} -Werte beziehen.

4.2.3 SOX11 hat keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsprofil von MLS-1765

Mit der Überexpression von SOX11 in MLS-1765 wird die Regulation zahlreicher Gene direkt oder indirekt variiert, was ihre Proteinabundanz beeinflusst. Dies kann eine Veränderung ihrer Aktivität oder die Aktivität anderer Proteine innerhalb der Signalwege mit denen sie im Zusammenhang stehen hervorrufen. Daher wurde das Phosphorylierungsprofil von 43 Phosphorylierungsstellen von 37 Kinasen und zweier zugehöriger Gesamtproteine mittels *Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array* analysiert. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede der Phospho-Kinaseaktivitäten zwischen MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen detektiert werden (Abbildung 12).

4.2.4 Verifizierung potentieller Zielgene von SOX11 in MLS

Zur Verifizierung potentieller Zielgene von SOX11 in MLS wurden zunächst sieben Gene (*LHX2*, *TMSB15A* (Thymosin Beta 15A), *CD24*, *NNAT* (Neuronatin), *THEM6* (*Thioesterase Superfamily Member 6*), *TUBB2B* (*Tubulin Beta, Class IIB*) und *SOX11*) selektiert, deren Transkripte zuvor in der globalen Genexpressionsanalyse der primären MLS und der generierten stabilen MLS-1765^{SOX11}-Zelllinie als stark hochreguliert identifiziert worden sind und deren Promotoren eine Konsensus-Bindesequenz für SRY tragen (Tabelle 19). Die Gene *SBK1* (*SH3 Domain Binding Kinase 1*) und *KIT* (*Proto-Oncogene KIT*) wurden hierbei nicht berücksichtigt, da sie die geringsten Expressionslevel in primären MLS gegenüber den anderen identifizierten 17 Transkripten zeigten. Die Expression von *SOX11* hingegen wurde hier besonders berücksichtigt, da zur Generierung der stabilen MLS-1765^{SOX11}-Zelllinie ein Expressionsvektor mit einer Codon-optimierten *SOX11*-Sequenz verwendet wurde und sich dieses *SOX11*-Transkript in seiner Sequenz vom humanen *SOX11*-Transkript (ENST00000322002) unterscheiden lässt. Bei dem durch den *HumanHT-12 Bead Array* zuvor detektierten *SOX11*-Transkript der globalen Genexpressionsanalyse in der stabilen MLS-1765^{SOX11}-Zelllinie handelt es sich ausschließlich um die Expression von endogenem *SOX11*. Durch die eindeutige Diskriminierung von Codon-optimiertem und endogenem *SOX11* mittels sequenzspezifischer Primer, kann die Expression von endogenem *SOX11* auf eine Beeinflussung der eigenen Expression in Form einer positiven Auto-regulation hinweisen.

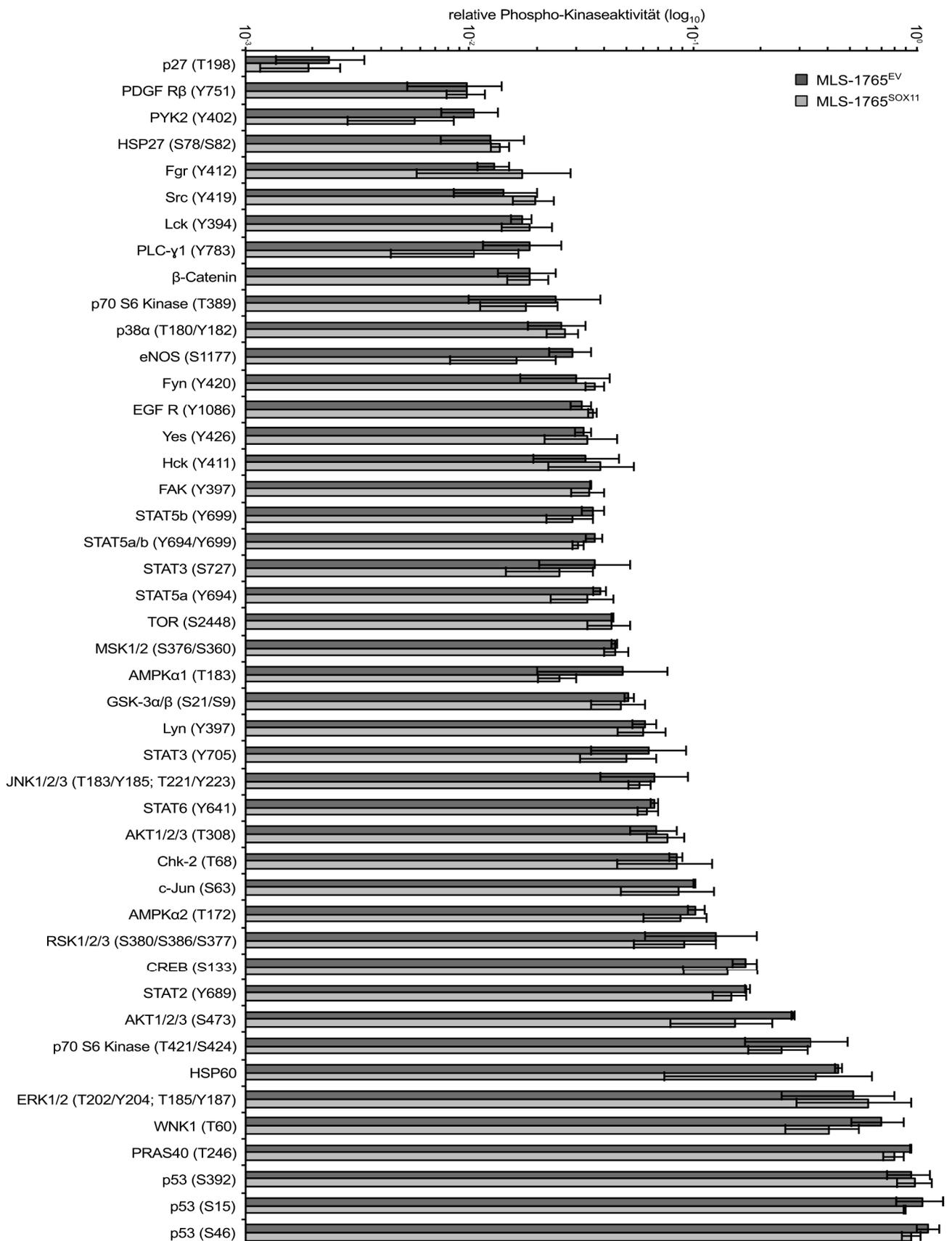


Abbildung 12: SOX11 hat keinen Einfluss auf das Phosphorylierungsprofil von MLS-1765.

Die Analyse von 43 Phosphorylierungsstellen von 37 Kinasen und zweier zugehöriger Gesamtproteine in Proteinlysaten von MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen mittels *Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase Array* zeigt keine signifikanten Unterschiede der Phospho-Kinaseaktivitäten.

Das potentielle Zielgen *CD24* wurde zusätzlich auf Proteinebene weiter evaluiert, indem ein Western Blot (Abbildung 13D) und eine immunhistochemische Analyse (Abbildung 13E) durchgeführt wurden. Diese zeigten hohe Mengen an Protein und eine membranäre und zytoplasmatische Färbung von *CD24* in *MLS-1765^{SOX11}*-Zellen im Vergleich zu *MLS-1765^{EV}*-Zellen. Zu diesem Zeitpunkt konnte *LHX2* nicht auf Proteinebene weiter evaluiert werden, da kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand.

Nachdem die Korrelations- und Expressionsanalysen der Zielgene *CD24* und *LHX2* bereits auf eine potentielle direkte Regulation durch *SOX11* in *MLS* hindeuteten, wurden *Dual-Luciferase Reporter Assays* mit den Promotorregionen dieser Gene durchgeführt. Zunächst wurden die Promotorregionen von *CD24* und *LHX2* *in silico* mittels JASPAR (Mathelier *et al.*, 2014) auf Konsensus-Bindestellen für murines *Sox11* untersucht. Die Analyse identifizierte neun bzw. drei mögliche Konsensus-Bindestellen in den Promotorregionen von *CD24* (-1931 bp bis -35 bp *upstream translation start site*) und *LHX2* (-1926 bp bis -360 bp *upstream translation start site*) (Abbildung 13F). Diese identifizierten Konsensus-Bindestellen sind hoch konserviert zwischen Menschen und Mäusen. Im Anschluss wurden zwei entsprechende Reporter-Konstrukte mit der jeweiligen Promotorregion vor dem Gen der *Firefly-Luciferase* generiert (Abbildung 13F). Hierbei zeigten die *Dual-Luciferase Reporter Assays* nach transienter Transfektion der *CD24*- und *LHX2*-Promotoren jeweils signifikant höhere Luciferase-Aktivitäten in *MLS-1765^{SOX11}*- im Vergleich zu *MLS-1765^{EV}*-Zellen. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis darauf, dass *CD24* und *LHX2* möglicherweise direkte Zielgene von *SOX11* in *MLS* sind (Abbildung 13G).

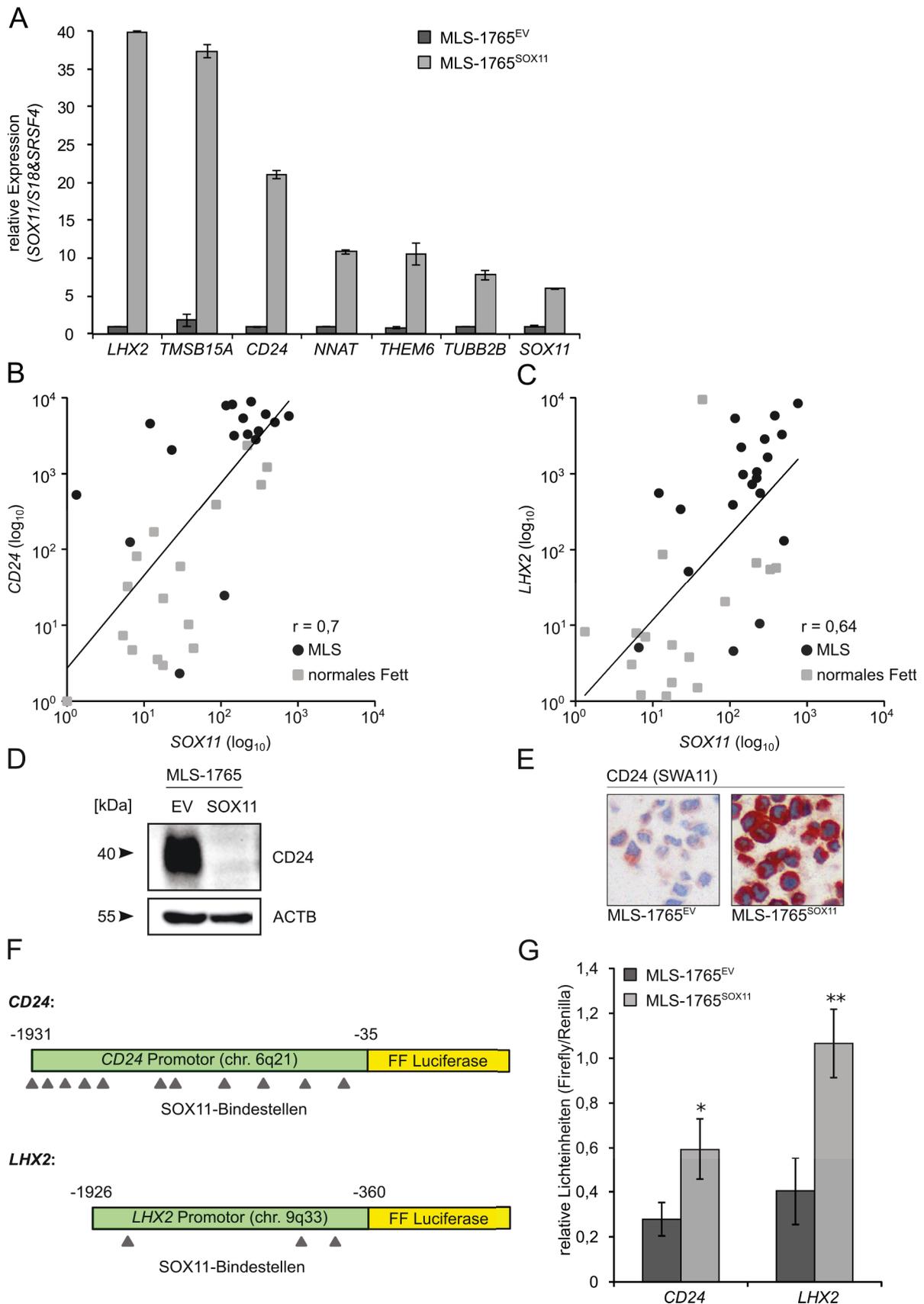


Abbildung 13: Verifizierung potentieller Zielgene von SOX11 in MLS.

(A) Verifizierung sieben potentieller SOX11-Zielgene mittels qPCR in MLS-1765^{SOX11}- und MLS-1765^{EV}-Zellen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*). Korrelationen der SOX11- mit CD24- (B) und LHX2-Expressionswerten (C) in primären MLS (dunkelgraue Kreise) und in

normalen Fettgewebe (hellgraue Quadrate). Die Expressionswerte wurden mit qPCR mit *S18* und *SRSF4* als endogene Kontrolle ermittelt. (D) Der Western Blot zeigt eine starke Proteinexpression von CD24 in MLS-1765^{SOX11}- im Vergleich zu MLS-1765^{EV}-Zellen. (E) Die immunhistochemische Analyse von Zellpräzipitaten zeigt sowohl eine membranäre als auch zytoplasmatische Lokalisation von CD24. (F) Schematische Abbildung der Luciferase-Reporter-Konstrukte der Promotorregionen von *CD24* und *LHX2*. Die potentiellen Konsensus-Bindestellen von Sox11 sind der *in silico*-Analyse mit JASPAR (Mathelier *et al.*, 2014) entnommen und sind als graue Dreiecke dargestellt. (G) Die *Dual-Luciferase Reporter Assays* nach transienter Transfektion der Promotoren zeigen signifikant höhere relative Lichteinheiten in MLS-1765^{SOX11}- im Vergleich zu MLS-1765^{EV}-Zellen. Das Balkendiagramm zeigt den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; FF: *Firefly*. Die Expressionskorrelationen wurden teilweise durchgeführt von Dr. Marcus Renner.

4.2.5 Die Expression von SOX11 in Liposarkomen ist abhängig vom Acetylierungsstatus der Histone

Um die Ursachen der SOX11-Expression in Liposarkomen weiter zu beleuchten, wurde die SOX11-negative WDLs/DDLS-Zelllinie T778 mit den Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren Vorinostat (HDAC1- und HDAC3-Inhibitor) und Trichostatin A (TSA; unspezifischer HDAC-Inhibitor) behandelt. 24 h nach der Behandlung mit den Histon-Deacetylase-Inhibitoren zeigte sich eine Dosis-abhängige Re-expression der *SOX11*-Transkripte in den T778-Zellen. Hierbei nahm die *SOX11*-Expression nach Vorinostat-Behandlung um bis zu 1,5-fach (Abbildung 14A), bei der Behandlung mit TSA um bis zu 2,5-fach gegenüber den unbehandelten T778-Zellen zu (Abbildung 14B). Ein Regulationsmechanismus der *SOX11*-Expression in Liposarkomen ist damit sehr wahrscheinlich abhängig vom Acetylierungsstatus der Histone.

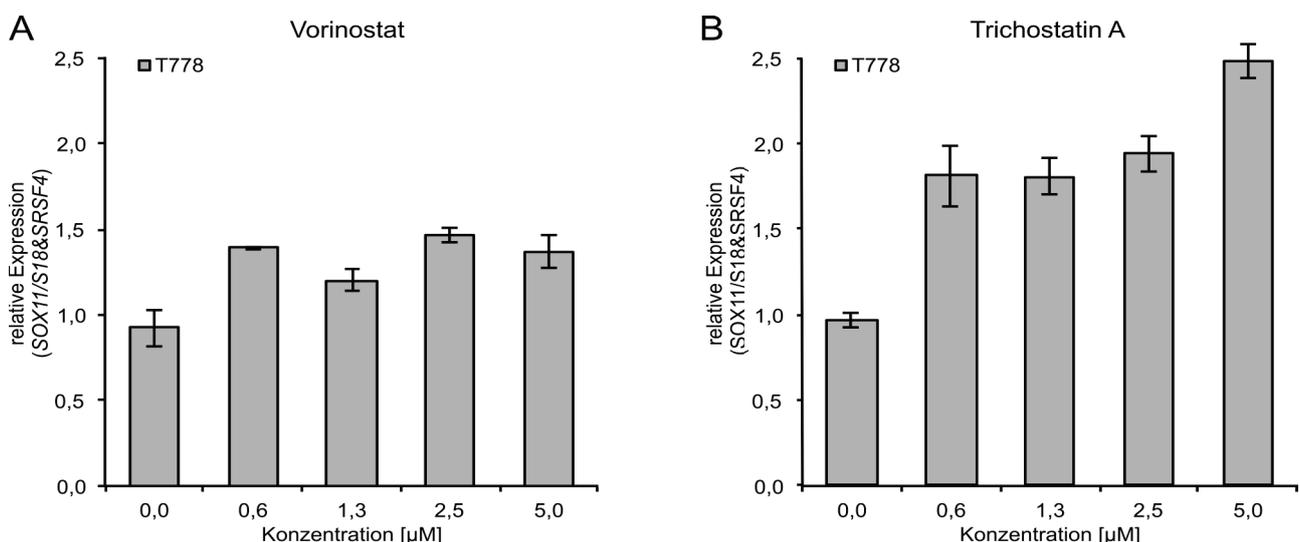


Abbildung 14: Die Expression von SOX11 in Liposarkomen ist abhängig vom Acetylierungsstatus der Histone.

24 h nach Behandlung der WDLs/DDLS-Zelllinie T778 mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Vorinostat (A) oder Trichostatin A (B) wurde mittels qPCR eine Dosis-abhängige Zunahme der *SOX11*-Transkripte um bis zu 1,5-fach bzw. 2,5-fach gegenüber den unbehandelten T778-Zellen detektiert.

4.2.6 SOX11-Mutation in MLS

Im Rahmen des von DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum) und NCT (Nationales Zentrum für Tumorerkrankungen) gemeinschaftlich finanzierten HIPO (*Heidelberg Center for Personalized Oncology*)-Projekts „*Genomic Sequencing of High Grade Soft Tissue Sarcomas*“, das sich der Identifizierung von bisher unbekannt gen genetischen Aberrationen als mögliche therapeutische Ziele mittels Exom-Sequenzierung zur Aufgabe gemacht hat, wurden 19 Liposarkompatienten (fünf MLS-, neun DDLS-, fünf PLS-Patienten) sequenziert und somatische *single-nucleotide variants* identifiziert. Hierbei konnte im Tumorgewebe eines Patienten mit MLS (M615) eine heterozygote Sequenzvariation in der kodierenden Region von *SOX11* nachgewiesen werden (c.248T>A; im folgenden *SOX11^{T248A}* genannt).

Aktuell sind in der COSMIC- und cBioPortal-Datenbank unter 3.702.312 codierenden Mutationen in 1.177.397 Proben insgesamt 152 *SOX11*-Mutationen hinterlegt (Stand 22.05.2015) (Forbes *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2013). Hiervon sind 53 (34,9 %) synonyme Mutationen ohne Aminosäureaustausch, 84 (55,3 %) *missense*-Mutationen mit Aminosäureaustausch und vier (2,6 %) sind *nonsense*-Mutationen mit vorzeitigem Stoppcodon. Die restlichen somatischen Mutationen sind eine Insertion mit *frame-shift* (0,7 %), vier *in-frame*-Deletionen (2,6 %), fünf *frame-shift*-Deletionen (3,3 %) und ein komplexes Rearrangement (0,7 %) (Abbildung 15).

Diese *SOX11*-Mutationen wurden hierbei in Karzinomen aller Gewebetypen (hauptsächlich Lunge, Pankreas, Magen, Darm, Uterus, Haut) und neuronalen Tumoren (Glioblastome) identifiziert.

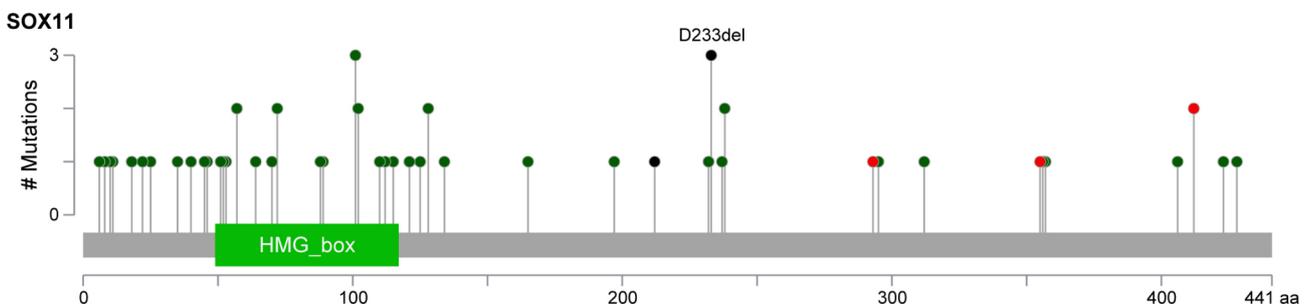


Abbildung 15: Somatische *SOX11*-Mutationen.

Missense-Mutation (grün), *nonsense*-Mutation, *frame-shift*-Deletion, *frame-shift*-Insertion (rot), *in-frame*-Deletion (schwarz) (Gao *et al.*, 2013).

Im Anschluss an die Exom-Sequenzierung wurde zur Validierung der *SOX11^{T248A}*-Sequenzvariation eine Sanger-Sequenzierung des kodierenden *SOX11*-Genlocus im Tumorgewebe des Patienten M615 durchgeführt. Zusätzlich wurde diese Region im nicht-neoplastischen Gewebe des Patienten sequenziert. Dabei konnte die *SOX11^{T248A}*-Mutation im Tumorgewebe verifiziert werden, wobei die Sequenzierung des Normalgewebes keine Sequenzvarianten von *SOX11* zeigte (Abbildung 16A).

Tabelle 20: SOX11-Mutationen in Liposarkomen.

Die Tabelle zeigt die identifizierte SOX11-Mutation der analysierten Liposarkome aus dem HIPO-Projekt und der unabhängigen Kohorte; HET: Heterozygot.

Subtyp	Anzahl SOX11-Mutationen	CDS Mutation	AS Mutation	Typ	Zygotität
MLS	1/42 (2,4%)	c.248T>A	p.L83Q	<i>missense</i>	HET
DDLS	0/57	-	-	-	-
PLS	0/12	-	-	-	-

Die Mutation $SOX11^{T248A}$ stellt eine *non-silent missense*-Mutation dar und führt zu einem Aminosäureaustausch der unpolar hydrophoben Aminosäure Leucin gegen die polar neutrale Aminosäure Glutamin (p.L83Q). Dieser Aminosäureaustausch ist in der α -Helix II der HMG-Box-Domäne von SOX11 lokalisiert (Abbildung 17A). Darüber hinaus ist die mutierte Aminosäure des humanen SOX11 sowohl über eine große Anzahl an Spezies (Abbildung 17B), als auch über die anderen Mitglieder der SOX-Gruppe C hinweg hoch konserviert. Die Lokalisation der Mutation $SOX11^{T248A}$ in der HMG-Box-Domäne sowie der hohe Grad an Spezies-übergreifender Konservierung ist ein erster Hinweis auf eine essentielle funktionelle Relevanz (Abbildung 17C). Um die Auswirkungen des Aminosäureaustauschs auf die Proteinstruktur und -funktionalität zu analysieren wurde *in silico* eine Prädiktion mit der Software *PolyPhen-2* durchgeführt (Adzhubei *et al.*, 2010). Diese prognostizierte unter Verwendung des *HumDiv Models*, dass die $SOX11^{T248A}$ -Mutation die Proteinstruktur von SOX11 mit einer sehr hohen Wahrscheinlichkeit funktionell beeinträchtigt (Score: 0,999; Sensitivität: 0,14; Spezifität: 0,99; Abbildung 17D).

Eine zusätzliche *in silico*-Analyse mit der Software *MutationTaster2* (Schwarz *et al.*, 2014), welche zur Prädiktion einen anderen Algorithmus (*Model: simple_aae*) verwendet, ergab ebenfalls, dass die $SOX11^{T248A}$ -Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit krankheitsverursachend ist (Score: 0,999999998643131). Weiter prognostiziert die Software, dass die DNA-bindende Eigenschaft der HMG-Box Domäne durch die $SOX11^{T248A}$ -Mutation verloren geht.

Um die Ergebnisse der *in silico*-Analysen besser einschätzen zu können, wurde der durch die $SOX11^{T248A}$ -Mutation hervorgerufene Aminosäureaustausch in einem 3D-Strukturmodell mit *PyMOL* visualisiert (Abbildung 17E). Hierfür wurde die *Lama1*-DNA-bindende HMG-Box-Domäne von murinen Sox4 verwendet, da bisher keine Strukturaufklärung von SOX11 existiert (Jauch *et al.*, 2012). Die Region von Sox4 ist jedoch aufgrund ihrer Homologie zu SOX11 annähernd identisch (Abbildung 17C). Die Visualisierung macht dabei deutlich, dass die α -Helix II der HMG-Box Domäne von SOX11 entscheidend an der DNA-Bindung beteiligt ist und einen geringen Abstand zur gebundenen DNA einnimmt. Zusammenfassend liefern die *in silico*-Analysen starke Hinweise dafür, dass der durch die $SOX11^{T248A}$ -Mutation hervorgerufene Aminosäureaustausch zu einer *loss-of-function*-Mutation der Sekundär- und Tertiärstruktur von SOX11 führt und somit die DNA-bindende Eigenschaft von SOX11 beeinträchtigt.

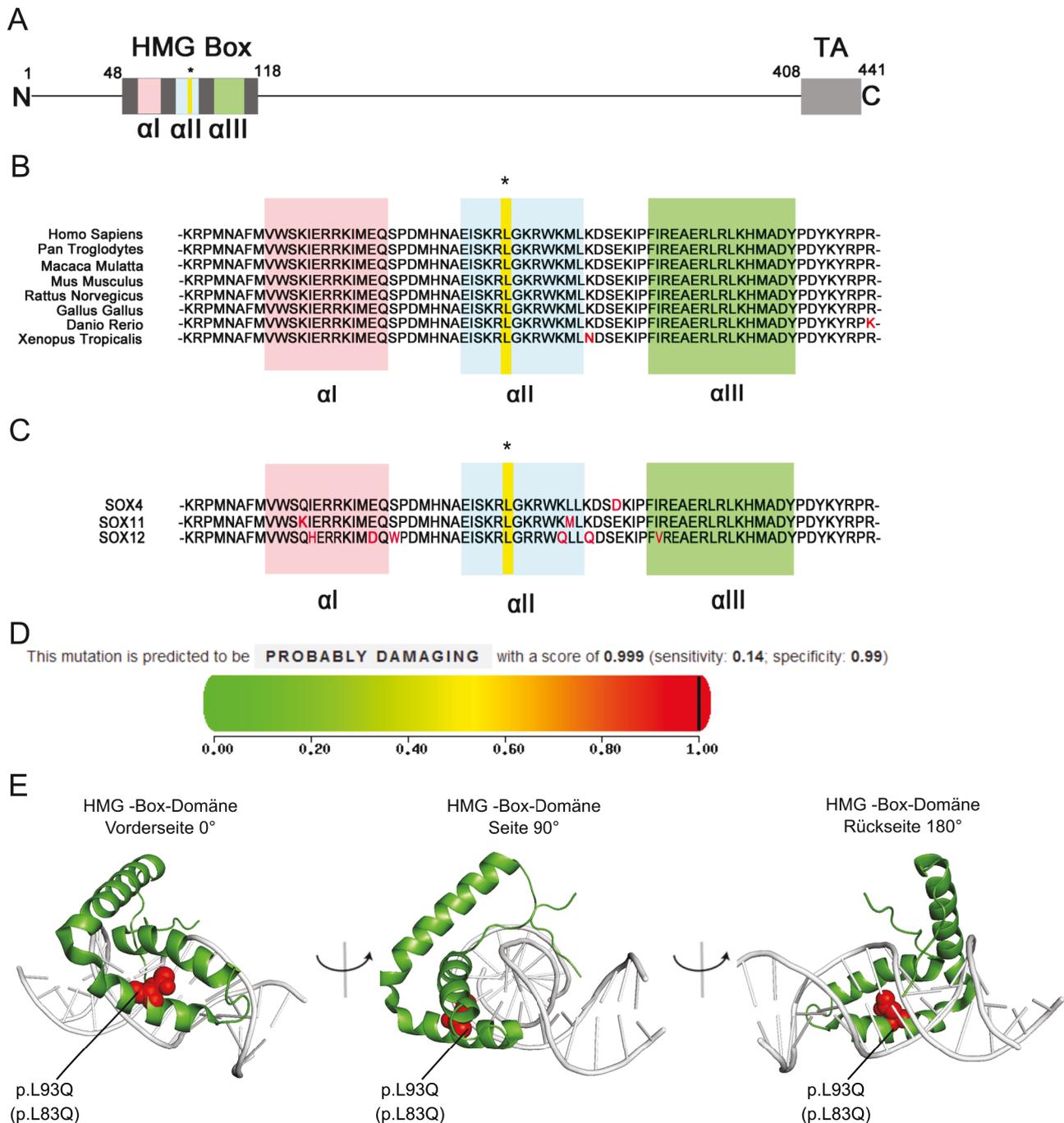


Abbildung 17: Merkmale und Auswirkung der SOX11^{T248A}-Mutation.

(A) Maßstabsgetreue schematische Darstellung des SOX11-Proteins. Es sind die Lage der wichtigsten Strukturen, wie der HMG-Box-Domäne (HMG-Box, dunkelgraue Box) zusammen mit ihren drei α -Helices-Untereinheiten (α I rote Box, α II blaue Box, α III grüne Box; Lage bezieht sich auf die vollständig aufgeklärte Struktur von murinen Sox4 (van Houte *et al.*, 1995)), und der Transaktivierungsdomäne (TA; hellgraue Box) hervorgehoben. * Lage der SOX11^{T248A}-Mutation (p.L83Q) (gelbe Markierung). (B) Konservierung der mutierten Aminosäure über unterschiedliche Spezies hinweg. (C) Konservierung der mutierten Aminosäure in Mitgliedern der SOX-Gruppe C. (D) Ergebnis der *PolyPhen-2 in silico*-Prädiktion zur Wahrscheinlichkeit eines Einflusses der SOX11^{T248A}-Mutation auf die Proteinfunktion und -struktur von SOX11. (E) Lokalisation der SOX11^{T248A}-Mutation in einem 3D-Strukturmodell der HMG-Box-Domäne von Sox4. Die Abbildung zeigt ein mit *PyMOL* erstelltes 3D-Strukturmodell der HMG-Box-Domäne von Sox4

(grün) gebunden an *Lama1*-DNA (grau) (PDB Code 3U2B; Jauch *et al.*, 2012). Bei Vorliegen der *SOX11*^{T248A}-Mutation kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Lys⁹³ zu Glu⁹³ (rot). Die Position des Aminosäureaustausches (p.L93Q) bezieht sich auf das murine Sox4. In Klammern ist die homologe Aminosäureposition für das humane SOX11 angegeben (p.L83Q).

4.2.6.1 Die *SOX11*^{T248A}-Mutation beeinträchtigt die transkriptionelle Aktivierung der *SOX11*-Zielgene und -vermittelten Phänotypen Proliferation und Chemosensitivität in MLS-1765

Um den in der *in silico*-Analyse prognostizierte Funktionsverlust von SOX11 zu überprüfen wurde als Grundlage einer funktionellen Untersuchung die *SOX11*^{T248A}-Mutation in den Expressionsvektor mit Codon-optimierter *SOX11*-Sequenz (der zur Erstellung der stabilen Zelllinie MLS-1765^{SOX11} verwendet wurde) eingefügt. Dieser Expressionsvektor wurde zur stabilen Transfektion der *SOX11*-negativen MLS-Zelllinie MLS-1765 verwendet (MLS-1765^{T248A-SOX11}), stabile Zellklone selektiert und auf ihre *SOX11*-Expression hin untersucht. Aus insgesamt 18 stabil transfizierten Zellklonen zeigte der Zellklon 18 hohe *SOX11*-Expressionlevel in der qPCR (Abbildung 18A) und im Western Blot (Abbildung 18B) im Vergleich zur Leervektorkontrolle (MLS-1765^{EV}). Dieser Klon wurde für alle weiteren Experimente ausgewählt.

Da die *SOX11*^{T248A}-Mutation in der zweiten α -Helix der DNA-bindenden HMG-Box-Domäne lokalisiert ist und *in silico* eine hohe Wahrscheinlichkeit einer Beeinträchtigung der Proteinstruktur und -funktionalität besteht, galt zu überprüfen, ob das mutierte *SOX11* in der Lage ist, die zuvor identifizierten *SOX11*-Zielgene zu aktivieren. Dazu wurden die Expressionslevel der zuvor identifizierten *SOX11*-Zielgene (*LHX2*, *TMSB15A*, *CD24*, *NNAT*, *THEM6*, *TUBB2B*, *SOX11*) mittels qPCR-Experimente bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass mutiertes *SOX11* nur zu geringen Unterschieden der Expression der sieben Transkripte in MLS-1765^{T248A-SOX11}-Zellen im Vergleich zu MLS-1765^{EV}-Zellen führt, wohingegen der Vergleich mit der Expression in MLS-1765^{SOX11}-Zellen klare Unterschiede zeigt (Abbildung 18C). Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die Mutation die Struktur der HMG-Box-Domäne so stark beschädigt, dass *SOX11* nicht mehr in der Lage ist die Promotor-DNA effektiv zu binden.

Basierend auf diesen Ergebnissen stellte sich die Frage, welche Auswirkungen die *SOX11*^{T248A}-Mutation auf den *SOX11*-vermittelten Phänotypen in MLS-1765-Zellen hat. Zur Überprüfung wurden die identifizierten und gut charakterisierten Eigenschaften Proliferation und Chemosensitivität gewählt. In beiden Fällen verhalten sich die MLS-1765^{T248A-SOX11}- annähernd gleich wie MLS-1765^{EV}- und deutlich unterschiedlich zu MLS-1765^{SOX11}-Zellen. So führt die *SOX11*^{T248A}-Mutation zu kaum Verminderung der Viabilität (als Maß für Proliferation) in einem MTT-Assay über einen Zeitverlauf von 96 h (Abbildung 18D). Des Weiteren zeigen sich MLS-1765^{T248A-SOX11}-Zellen ($EC_{50} \approx 0,9$ nM) eine geringere Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit dem niedermolekularen Chemotherapeutikum Trabectedin als

MLS-1765^{SOX11}-Zellen ($EC_{50} \approx 0,5$ nM), jedoch Verhalten sich annähernd gleich wie MLS-1765^{EV}-Zellen ($EC_{50} \approx 0,8$ nM) (Abbildung 18E).

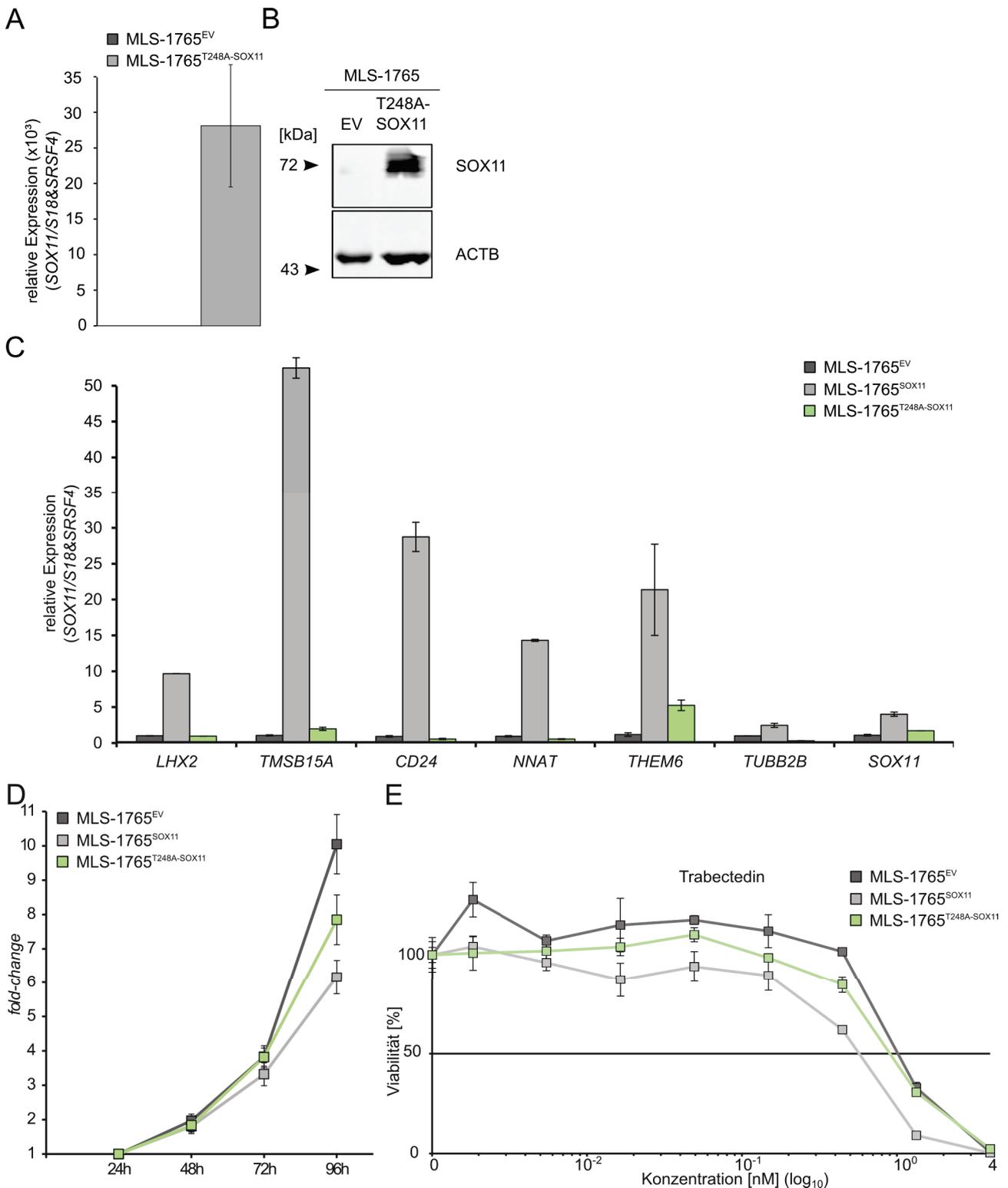


Abbildung 18: Die $SOX11^{T248A}$ -Mutation beeinträchtigt die transkriptionelle Aktivierung der $SOX11$ -Zielgene und -vermittelten Phänotypen Proliferation und Chemosensitivität in MLS-1765.

Die generierte Zelllinie MLS-1765^{T248A-SOX11} mit stabiler ektopischer Expression der $SOX11^{T248A}$ -Mutation zeigt im Vergleich zur entsprechenden Kontrollzelllinie MLS-1765^{EV} hohe Mengen an $SOX11$ -mRNA (A) und -Protein (B). (C) Im Vergleich zu MLS-1765^{SOX11}-Zellen werden die Transkripte der $SOX11$ -Zielgene in

MLS-1765^{T248A-SOX11}-Zellen nicht bzw. vergleichbar wie in MLS-1765^{EV}-Zellen exprimiert. Die Fehlerbalken zeigen den SEM. (D) Der repräsentative MTT-Assay aus drei unabhängigen Experimenten zeigt für MLS-1765^{T248A-SOX11} im Zeitverlauf annähernd gleiche Zellviabilität (als Maß für Proliferation) wie für MLS-1765^{EV}-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigen MLS-1765^{SOX11}-Zellen eine deutliche Reduktion der Zellviabilität. (E) Bei der Behandlung mit Trabectedin weisen MLS-1765^{EV}- ($EC_{50} \approx 0,8$ nM) und MLS-1765^{T248A-SOX11}-Zellen ($EC_{50} \approx 0,9$ nM) kaum Unterschiede in ihren EC_{50} -Werten auf. Im Vergleich hierzu zeigen MLS-1765^{SOX11}-Zellen einen reduzierten EC_{50} -Wert ($EC_{50} \approx 0,5$ nM). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten, aus denen ein Mittelwert für die angegebenen EC_{50} -Werte bestimmt wurde.

5 Diskussion

Vor Beginn dieser Arbeit wurde beim Vergleich mit normalen Fettgewebe eine hohe Expression von *SOX11* in MLS identifiziert. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bisherigen Veröffentlichungen, die ebenfalls eine Überexpression von *SOX11* in Liposarkomen im Vergleich zu nicht-neoplastisch veränderten adipösen Gewebe verzeichneten (Skubitz *et al.*, 2005; Singer *et al.*, 2007). Bis dahin wurde allerdings keine immunhistochemische Validierung oder funktionelle Charakterisierung von *SOX11* in MLS und weiteren Liposarkom-Typen durchgeführt.

Bei der immunhistochemischen Analyse der unterschiedlichen Liposarkom-Typen konnten in mehr als 90 % der MLS eine positive *SOX11*-Expression mit nukleärer Lokalisation beobachtet werden. Unter normalen physiologischen Bedingungen wird der Transkriptionsfaktor *SOX11* vor allem im fetalen Gehirn hoch exprimiert. Demgegenüber lässt sich in den meisten normalen adulten Geweben keine *SOX11*-Expression nachweisen (Weigle *et al.*, 2005).

Grund hierfür ist der Verlust der *SOX11*-Expression während der terminalen Differenzierung der mesenchymalen Gewebe. Beispielsweise wird *Sox11* in murinen aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen (*adipose-derived stem cells* (ADSC)) exprimiert und muss für deren osteogene Differenzierung reduziert werden (Choi *et al.*, 2014). Ähnlich wird eine Verminderung der *SOX11*-Expression in humanen mesenchymalen Stammzellen durch extensive Expansion beschrieben (Larson *et al.*, 2010). Weiter zählt *SOX11* zu den Genen, die in MSC herunterreguliert werden, wenn sie mit adipogenen Induktionsmedium kultiviert worden sind. Dabei reduzierte der Verlust von *SOX11* sowohl das Selbsterneuerungspotential als auch das adipogene Potential der MSC (Kubo *et al.*, 2009).

SOX11 übt auch im adulten Nervengewebe eine Kontrollfunktion aus. Hier kann die *SOX11*-Expression reaktiviert werden, um sich an der Regeneration und dem Überleben von peripheren Nerven nach zellulären Stress, wie beispielsweise Schnittverletzungen, zu beteiligen (Jankowski *et al.*, 2006). Daneben exprimieren zahlreiche neurologische Tumoren *SOX11* (Korkolopoulou *et al.*, 2013; Hide *et al.*, 2009; de Bont *et al.*, 2007; Stuart *et al.*, 2011). Anhand von Gliom-initiiierenden Zellen konnte gezeigt werden, dass die Expression von *SOX11* die Tumorigenese durch Induktion neuronaler Differenzierung hemmt (Hide *et al.*, 2009).

Daher könnte eine Ursache für die konstitutiv hohe Expression von *SOX11* in MLS eine primäre Derivation in Sarkom-initiiierenden mesenchymalen Stammzellen sein. Ebenso ist ein Auftreten *de novo* im Prozess der Tumorprogression möglich.

Mechanismen für diese aberrante Expression von *SOX11* könnten Promotor-Methylierungen sein, wie bereits für unterschiedliche Typen von Krebserkrankungen beschrieben wurde (Xu *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2010; Gustavsson *et al.*, 2010; Sernbo *et al.*, 2011;

Wasik *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013). Bisher zeigte die Analyse der Methylierung des Promotors von *SOX11* in Liposarkomen im Vergleich zu normalen Fettgewebe keine signifikante Korrelation mit seiner Expression (Renner *et al.*, 2013). Allerdings wurden hier nur zwei CpG-Stellen (cg08432727, cg20008332) des *SOX11*-Promotors berücksichtigt. Nordström *et al.* beschreiben vier weitere CpG-Stellen (cg07065111, cg08526991, cg12312988, cg13667638), was eine Regulation der *SOX11*-Expression durch Methylierung in Liposarkomen nicht ausschließt (Nordström *et al.*, 2015). Auch Histon-Modifikationen, wie in einigen aggressiven lymphoiden Erkrankungen kommen als Mechanismus in Betracht (Nordström *et al.*, 2015; Vegliante *et al.*, 2011). Die Behandlung der *SOX11*-negativen WDLS/DDLS-Zelllinie T778 mit den Histon-Deacetylase-Inhibitoren Vorinostat und Trichostatin A führt zu einer Zunahme der *SOX11*-Expression um das 1,5-fache bzw. 2,5-fache, was eine Regulation auf Histon-Ebene ebenfalls denkbar macht.

Zusätzlich zum initiiierenden Mechanismus der aberranten *SOX11*-Expression, gibt es Hinweis auf einen möglichen auto-regulatorischen *positive-feedback-loop*, bei dem *SOX11* seine eigene Expression aktiviert bzw. verstärkt. So findet sich eine 6,1-fache Zunahme der Expression von endogenem *SOX11* nach Überexpression des Codon-optimierten *SOX11* in der Zelllinie MLS-1765. Zudem beinhaltet die von Nordström *et al.* beschriebene *SOX11*-Promotorregion mögliche Bindestellen für *SOX11* selbst, wie eine *in silico*-Analyse mit JASPAR (Mathelier *et al.*, 2014) prognostiziert (Nordström *et al.*, 2015). Autoregulation und -kontrolle sind häufige Mechanismen für die Expression der *SOX*-Gene (beispielsweise *SOX2* und *SOX9*), was einen solchen Mechanismus theoretisch möglich macht (Kamachi & Kondoh, 2013). Der genaue Kontrollmechanismus der *SOX11*-Expression bleibt jedoch weiter unklar und muss genauer beleuchtet werden.

Der immunhistochemische Nachweis von *SOX11* wird als diagnostischer Marker für die Identifikation von Mantelzell-Lymphomen verwendet (Ek *et al.*, 2008). Die Diagnose von MLS hängt zurzeit von der histologischen Morphologie und der Identifikation der rekurrenten Translokation t(12;16)(q13;p11) ab. Bisher sind keine verlässlichen immunohistochemischen Marker für die Diagnose der MLS vorhanden. Diese Arbeit unterstützt die potentielle Verwendung von *SOX11* oder weiterer Marker von der Liste der hochregulierten Gene in MLS als ergänzenden Parameter zur Diskriminierung von MLS von den weiteren Liposarkom-Typen oder dem normalen Fettgewebe.

Generell sind für die funktionelle Charakterisierung von *SOX11* oder anderer Gene in MLS nur eine limitierte Anzahl an MLS-Zelllinien etabliert und verfügbar (Stählberg *et al.*, 2014). Die Zelllinien MLS-1765 und MLS-402 zeigen beide keine wesentliche *SOX11*-Expression. Aus diesem Grund war ein *Knockdown* von *SOX11* in keiner der beiden Zelllinien möglich. Damit wurde die stabile Überexpression von *SOX11* in MLS-1765-Zellen als Strategie gewählt, um ein Modellsystem für alle weiteren Untersuchungen zu generieren.

Durch eine globale Genexpressionsanalyse der etablierten MLS-1765^{SOX11} konnten mit hoher Zuverlässigkeit direkte oder indirekte Zielgene von SOX11 identifiziert werden. Nahezu 50 % der hochregulierten Transkripte in MLS-1765^{SOX11} zeigten eine Gewebsspezifität für Gehirn. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der funktionellen Bedeutung von SOX11 während der Neurogenese und neuronalen Differenzierung (Bergsland *et al.*, 2011). Da viele dieser normalerweise auf neuronales Gewebe beschränkten Transkripte auch in primären MLS hoch exprimiert sind, könnte die Expression von SOX11 zur Imitation eines neuronalen Ursprungs des Gewebes führen.

Eines dieser Neuronen-spezifischen Gene ist *NNAT*, das kürzlich als potentieller Tumorsuppressor in MLS beschrieben wurde (Renner *et al.*, 2013). Primäre MLS zeigen eine hohe Expression von *NNAT*, wobei diese negativ mit der DNA-Methylierung seines Promotors korreliert ist. Entsprechend könnte die hohe Expression von SOX11 in primären MLS zusammen mit der DNA-Hypomethylierung des *NNAT*-Promotors eine Erklärung für die hohe Expression von *NNAT* in MLS sein. Nach der Re-expression von *NNAT* durch die Behandlung der hypermethylierten MLS-1765-Zelllinie mit AZA, konnte eine verminderte Zellmigration und Viabilität beobachtet werden. Daher stellt *NNAT* aus der Liste der SOX11-Zielgene ein Kandidat dar, der zusammen mit weiteren Faktoren den wachstums-inhibierenden Effekt nach Überexpression von SOX11 in MLS-1765 vermittelt.

Durch die Verwendung von unterschiedlich stringenten Annotationen für die hochregulierten Transkripte wurden 19 neue direkte oder indirekte Zielgene von SOX11 in MLS identifiziert. Einige dieser Transkripte (*CD24*, *TMSB15A*, *TMSB15B* (Thymosin Beta 15B), *SBK1*, *LHX2*, *SOX11*, *IRX3* (*Iroquois Homeobox 3*) und *NREP* (*Neuronal Regeneration Related Protein*)) wurden bereits als SOX11-Zielgene in MCL identifiziert (Wang *et al.*, 2010; Vegliante *et al.*, 2013; Kuo *et al.*, 2014). Trotz dessen ist die Anzahl an überlappenden Zielgenen gering. Dies unterstreicht, dass SOX11 möglicherweise eine definierte Gruppe an Genen in unterschiedlichen Zelltypen und Differenzierungsstadien kontrolliert. Grund hierfür können epigenetische und genetische Modifikationen oder die Bildung von Proteinkomplexen mit anderen Proteinen sein, welche die Affinität von SOX11 für gewisse Bindestellen gewebespezifisch beeinflussen.

Tubb3 wird allgemein als direktes Zielgen von Sox11 anerkannt (Dy *et al.*, 2008). Dieses findet sich auch unter den hochregulierten Transkripten nach SOX11-Überexpression in den MLS-1765-Zellen, was ein Indiz für die Eignung des generierten Modellsystems ist. Weiter kommt *LHX2* als direktes oder indirektes Zielgen von SOX11 in MLS in Frage. Dieser neuronale Transkriptionsfaktor hat eine funktionelle Signifikanz in den Entwicklungsprozessen des zentralen Nervensystems (ZNS), bei der Kontrolle der Augenentwicklung und ist mit der Haarfollikelstammzellfunktion assoziiert (Yun *et al.*, 2009; Folgueras *et al.*, 2013). *LHX2* ist ein direktes Zielgen von SOX11 in MCL-Zelllinien (Vegliante *et al.*, 2013). Zudem wurden Sox11-gebundene Genomregionen im Promotor des murinen *Lhx2* als aktivierbare neuronale *Enhancer* identifiziert (Bergsland *et al.*, 2011). Im Kontext von Sarkomen zeigte sich eine höhere

Expression von LHX2 in wildtyp gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) im Vergleich mit *KIT*- oder *PDGFRA* (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Alpha Polypeptide*)-Mutanten GIST (Beadling *et al.*, 2013). Die funktionelle Rolle von LHX2 in GIST und anderen Sarkom-Typen bleibt jedoch bisher unbekannt. Ein weiteres interessantes und mögliches direktes oder indirektes Zielgen von SOX11 in MLS ist *CD24*. *CD24* ist ein GPI-geankertes Zelloberflächen-Glykoprotein, welches in die T-Zellproliferation, synaptische Transmission und Immunantwort involviert ist. Darüber hinaus ist *CD24* ein Ligand für den Adhäsionsrezeptor P-Selectin auf Endothelzellen und Thrombozyten (Kristiansen *et al.*, 2004; Jevsek *et al.*, 2006). *CD24* wird in einem breiten Spektrum von Karzinomen hoch exprimiert und wurde in *low-grade* Fibromyxoidsarkomen hochreguliert gefunden. (Kristiansen *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Möller *et al.*, 2011).

Sowohl die qPCR-Validierung der globalen Genexpressionanalyse, als auch die Analyse der Proteinexpression zeigen, dass die SOX11-Expression zur Expression der Gene *LHX2* und *CD24* in MLS-1765-Zellen führt. Durch die positive Korrelation ihrer Expressionen in den primären MLS wird eine Regulation von *LHX2* und *CD24* durch SOX11 in MLS weiter bestärkt. Zudem sind die *Dual-Luciferase Reporter Assays* mit den Promotorregionen von *LHX2* und *CD24* ein starker Hinweis auf eine direkte Regulation durch den Transkriptionsfaktor SOX11.

Schließlich legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass SOX11 die Expression von unterschiedlichen Zielgenen in MLS, einschließlich *LHX2* und *CD24*, verstärkt. Hierbei bleibt trotz starker Hinweise offen, ob SOX11 diese Gene direkt oder indirekt reguliert. Daher gilt es die direkte Regulation der Zielgene in MLS weiter zu untersuchen.

Zur Charakterisierung der funktionellen Bedeutung von SOX11 wurden unterschiedliche zellbasierte Assays durchgeführt. Hierbei führte die Überexpression von SOX11 zu einer verminderten Migration der MLS-1765-Zellen in einem Wundheilungs-Assay. Ähnliches wurde ebenfalls für Magen- und Prostatakrebszellen beschrieben (Yao *et al.*, 2015; Qu *et al.*, 2014). Dieser Effekt könnte neben *NNAT* durch weitere Zellmotilität-assoziierte Gene vermittelt sein, die in ihrer Expression durch SOX11 beeinflusst werden. So sind die Gene *TMSB15A*, *TMSB15B*, *TUBB2B*, *TUBB3*, *DPYSL4* (*Dihydropyrimidinase-Like 4*) und *NREP* an der Organisation und Ausbildung des Zytoskelettes beteiligt; *CDH2* (*Cadherin 2, Type 1, neuronal N-Cadherin*) beeinflusst die Zell-Zell-Adhäsion.

Auch für das am stärksten durch SOX11 hochregulierte Gen *CD24* wurde eine Beeinflussung der Zellmigration durch seine Expression beschrieben. Unabhängig davon begünstigt *CD24* indirekt die Adhäsion von Tumorzellen an ECM-Komponenten wie Collagen I, Collagen IV, Fibronectin und Laminin, indem es mit $\alpha_3\beta_1$ - und $\alpha_4\beta_1$ -Integrin kolokalisiert. Die vorhandenen Integrine werden dabei aktiviert, was zur Bindung der ECM-Komponenten führt (Baumann *et al.*, 2005). Dies gab Anlass das Adhäsionsverhalten der MLS-1765^{SOX11}-Zellen gegenüber unterschiedlicher Komponenten der ECM in einem Zelladhäsions-Assay zu untersuchen. Hierbei konnten allerdings

keine signifikanten Unterschiede im Bindungsverhalten identifiziert werden. Die immunohistochemische Analyse der CD24-Expression zeigt zudem, dass CD24 membranständig exprimiert ist. Es kann also ausgeschlossen werden, dass CD24 aufgrund seiner Lokalisation nicht funktionell vorliegt. Möglicherweise ist kein Effekt auf das Adhäsionsverhalten zu identifizieren, da die Überexpression von SOX11 die Integrin-Expression nicht beeinflusst und CD24 die Aktivität der vorhandenen Integrine nicht weiter steigern kann.

Weiter wurde der Einfluss der SOX11-Expression auf MLS-1765-Zellen in einem Klonogenitäts-Assay analysiert. Dieser zeigte ein vermindertes Potential zur Kolonienbildung. Dies könnte ein weiterer Hinweis für eine höhere Differenzierung der MLS-1765-Zellen durch SOX11 sein. So induziert SOX11 vermutlich eine neuronale Differenzierung in den nicht vollständig ausdifferenzierten adipogenen Tumorzellen. Festmachen lässt sich dies an der Expression von zahlreichen Genen, welche normalerweise auf neuronale Gewebe beschränkt sind, wie beispielsweise *NNAT*, *LHX2* und *TUBB3*.

Ein weiteres Indiz für einen höheren Grad der Differenzierung der MLS-1765-Zellen nach SOX11-Überexpression ist das langsamere Zellwachstum, das sich im MTT-Assay gezeigt hat. Ähnliche Beobachtungen nach SOX11-Überexpression wurden in EOC-, Prostatakarzinom- und Gliom-initiiierenden Zellen gemacht (Sernbo *et al.*, 2011; Yao *et al.*, 2015; Hide *et al.*, 2009). In Magenkarzinomzellen führte die SOX11-Überexpression *in vitro* und *in vivo* zu keiner Beeinflussung des Wachstums (Qu *et al.*, 2014). Demgegenüber führte eine Überexpression von SOX11 in Mammakarzinomzellen zu einer gesteigerten Proliferation. Jedoch ist der Einfluss von SOX11 auf diesen Zelltyp widersprüchlich, da ein *Knockdown* von SOX11 die Proliferation verminderte (Zvelebil *et al.*, 2013). Der wachstumshemmende Effekt der SOX11-Überexpression auf MLS-1765-Zellen beruht hauptsächlich auf einer Reduktion der Proliferation, wie der EdU-Proliferations-Assay zeigt. Eine direkte Beeinflussung der Apoptose und Zytotoxizität können ausgeschlossen werden können, wie der *ApoTox-GloTM* Assay bestätigt.

Zusammenfassend lassen die durch SOX11 beeinflussten Phänotypen (verminderte Migration, verminderte Kolonienbildung, verminderte Proliferation) der MLS-1765-Zellen eine Tumor-suppressive Rolle in MLS vermuten. SOX11 wird ebenso in unterschiedlichen hämatopoietischen Erkrankungen, neurologischen Tumorerkrankungen und Karzinomen (einschließlich Nasopharynx-, Magen-, Prostata- und Ovarialkarzinomen) als Tumorsuppressor beschrieben (Gustavsson *et al.*, 2010; Sernbo *et al.*, 2011; Qu *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015; Yao *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2013; Korkolopoulou *et al.*, 2013).

Dem gegenüber steht die gut beschriebene Rolle von SOX11 als Onkogen in MCL. Hier wird davon ausgegangen, dass SOX11 an der Spitze eines onkogenen transkriptionellen Netzwerkes steht und kritische Effektor-Zielgene und Signalwege kontrolliert, die für das aggressive klinische Verhalten der MCL verantwortlich sind (Vegliante *et al.*, 2013).

Ähnlich verhält es sich für SOX4, ein weiterer SOX-Transkriptionsfaktor der Gruppe C. Seine Expression findet sich ebenfalls kaum in normalen adulten Geweben, jedoch in einer Vielzahl von Tumoren, was SOX4 potentiell zu einem Onkogen macht. Diese onkogene Rolle wird weiter dadurch bekräftigt, dass SOX4, zusammen mit bestimmten genetischen Läsionen, maligne hämatopoietischen Erkrankungen, wie Leukämie und Lymphome, induziert. Demgegenüber steht, dass es zahlreiche Studien gibt bei denen eine SOX4-Expression mit einer besseren Prognose und einer langsameren Progression der Tumorerkrankungen korreliert, was SOX4 potentiell zu einem Tumorsuppressor macht. Ein möglicher Mechanismus, welcher sowohl die Tumor-suppressive als auch die onkogene Funktion von SOX4 erklärt, ist die direkte Interaktion mit dem durch DNA-Schädigung induzierten p53-Signalweg. Im Falle von DNA-Schädigung bindet SOX4 direkt an p53, was dessen MDM2-vermittelte Ubiquitinierung und Degradation behindert und zu dessen gesteigerten Expression führt. Dementsprechend konnte für SOX4 eine p53-abhängige Induktion von Apoptose *in vitro* und eine Reduktion des Tumorstwachstums *in vivo* für Kolonkarzinome gezeigt werden (Pan *et al.*, 2009) In Leberkarzinomzellen hingegen verursacht die Bindung von SOX4 an p53 eine Reduktion der induzierten Apoptose. Grund hierfür ist, dass die Interaktion mit SOX4 das Binden und Aktivieren des Promotors entscheidender p53-Zielgene wie *BAX* (*BCL2-Associated X Protein*) behindert (Hur *et al.*, 2010).

Ähnlich wie für SOX4 ist für SOX11 denkbar, dass es seine Rolle als Tumorsuppressor in MLS ausübt, indem es einen Komplex mit p53 bildet und damit seine Degradation stabilisiert und seine Aktivität beeinflusst. Die verwendeten MLS-1765-Zellen exprimieren jedoch hohe Level an wildtyp p53 (Stählberg *et al.*, 2014). Als Konsequenz konnte eine mögliche Tumor-suppressive Rolle von SOX11 in der Pathogenese von MLS durch die Induktion des p53-Signalwegs nicht überprüft werden. Das ist von besonderer Relevanz, da genetische *TP53*-Alterationen in MLS ein seltenes Ereignis darstellen (Oda *et al.*, 2005). Ein Hinweis darauf, dass die Expression von SOX11 die Aktivität von p53 nicht beeinflusst liefert der *Human Phospho-Kinase Array*, der eine unveränderte Phosphorylierung für drei häufige Phosphorylierungsstellen von p53 (S15, S46, S392) zeigt. Zudem bestätigt dieser, dass p53 sehr hohe relative Phospho-Kinaseaktivitäten ohne Induktion in MLS-1765 besitzt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass SOX11 das p53-Gesamtprotein oder die Phosphorylierung einer anderen Phosphorylierungsstelle beeinflusst. Andererseits können SOX11-induzierte wachstumshemmende Effekte möglicherweise unabhängig von einer *TP53*-Aktivierung stattfinden: Beispielsweise durch SOX11-modulierte Gene, die in der KEGG-Signalweg-Analyse mit Zellzyklus-Signaturen assoziiert sind. Diese Gene beinhalten Mitglieder der Familie der *E2F*-Transkriptionsfaktoren, *SMAD4* (*SMAD Family Member 4*) und *TGFB2* (*Transforming Growth Factor, Beta 2*), was im Einklang mit Beobachtungen steht, die in MCL gemacht wurden. So identifizierten genomweite Genexpressionsanalysen nach ektoptischer Expression von SOX11 in MCL-Zelllinien

Zellzyklus-regulierende Signalwege, die mit SOX11-induzierter Wachstumsminde- rung assoziiert waren (Gustavsson *et al.*, 2010).

Demzufolge könnte die Tatsache, ob SOX11 als Tumorsuppressor oder Onkogen agiert, abhängig vom zellulären Kontext sein, das heißt vom Status der Zelldifferenzierung oder Ursprung des Gewebes. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse deuten auf eine tumorsuppressive Rolle von SOX11 in MLS hin.

Neben seiner möglichen Rolle als Tumorsuppressor während der Pathogenese der MLS, scheint die Expression von SOX11 eine höhere Sensitivität gegenüber den spezifischen Therapeutika Dasatinib und Trabectedin zu vermitteln. In MLS-1765-Zellen zeigt sich nach SOX11-Überexpression eine Reduktion der EC_{50} -Werte bei der Behandlung mit diesen Therapeutika. Generell wurde eine Sensitivität von MLS-1765-Zellen gegenüber Dasatinib (Willems *et al.*, 2010; Sievers *et al.*, 2015) und Trabectedin (Germano *et al.*, 2010; Forni *et al.*, 2009) *in vitro* bereits mehrfach gezeigt; jedoch bisher ohne Berücksichtigung von SOX11. Sowohl für Dasatinib als auch für Trabectedin könnte die SOX11-Expression den Wirkmechanismus der Therapeutika begünstigen.

So ist im Falle des Multi-Tyrosinkinase-Inhibitors Dasatinib eine höhere Effektivität des Therapeutikums durch eine Verschiebung der molekularen Gleichgewichte und Aktivitätsänderung von Tyrosinkinasen durch SOX11 denkbar. Dies könnte die Inhibition aktivierter Signalwege, wie beispielsweise des SRC-Kinase-Signalweges (Sievers *et al.*, 2015), durch Dasatinib verstärken. Jedoch zeigte der in MLS-1765-Zellen nach SOX11-Überexpression durchgeführte *Human Phospho-Kinase Array* keine signifikanten Unterschiede in den Kinaseaktivitäten der SRC-non-Rezeptor-Tyrosinkinasen (LYN, LCK, FYN, YES, FGR, HCK) oder Rezeptor-Tyrosinkinasen (PDGFRB (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor, Beta Polypeptide*)). Allerdings deckt der *Human Phospho-Kinase Array* nicht alle potentiellen Ziele oder Phosphorylierungen ab, die von Dasatinib beeinflusst werden.

Trabectedin hindert das FUS-DDIT3-Fusionsprotein an der Bindung der DNA. In Folge dessen können für eine adipogene Differenzierung benötigte Transkriptionsfaktoren, wie C/EBP α und PPAR γ , re-exprimiert werden. SOX11 ist in der Lage C/EBP α und PPAR γ transkriptionell zu aktivieren, wie in MSC gezeigt wurde (Xu *et al.*, 2014). Daher könnte die adipogene Differenzierung via C/EBP α und PPAR γ durch SOX11 verstärkt werden und somit die Wirksamkeit von Trabectedin vergrößern. Weiter ist denkbar, dass die Herunterregulation pro-inflammatorischer Zielgene von SOX11, wie beispielsweise CXCL8, die Sensitivität von MLS-1765 gegenüber Trabectedin erhöhen. Dies hat allerdings keine Relevanz für die durchgeführten *in vitro* Experimente.

Unterstrichen wird die Spezifität von SOX11 für die Wirkmechanismen der Tyrosinkinase-Inhibition oder der Bindung der kleinen Furche der DNA in MLS-1765-Zellen durch eine unveränderte

Sensitivität gegenüber Doxorubicin. Doxorubicin ist ein relativ unspezifisch agierendes Therapeutikum, das wahrscheinlich durch DNA-Interkalierung und der damit verbundenen DNA-Schädigung Apoptose induziert. Denkbar ist eine Interaktion von p53 mit SOX11 (ähnlich der für SOX4 beschriebenen (Vervoort *et al.*, 2012)) und einer möglicherweise damit verbundenen höheren Effektivität von Doxorubicin. In MLS-1765 scheint die SOX11-Expression darauf aber keinen Einfluss zu haben. Dies steht im Gegensatz zu den neurologischen Tumoren, bei denen eine Überexpression von SOX11 eine höhere Sensitivität von humanen Gliom-initiiierende Zellen gegenüber den unspezifischen Chemotherapeutika Taxol und Etoposid vermittelt (Hide *et al.*, 2009).

Diese Ergebnisse machen eine Implementierung der Untersuchung der SOX11-Expression zur Therapie-Prognose für das Ansprechen von MLS-Patienten auf Dasatinib oder Trabectedin denkbar. Dies könnte auf lange Sicht zu einer Reduktion von Therapiedosen und den damit verbundenen Nebenwirkungen führen.

Im Rahmen des HIPO-Projekts „*Genomic Sequencing of High Grade Soft Tissue Sarcomas*“ konnte bei der Sequenzierung des Tumors eines Patienten mit MLS eine heterozygote somatische Mutation innerhalb des codierenden Bereichs von SOX11 identifiziert werden (c.248T>A (p.L83Q)). Dies ist der erste Bericht einer solchen c.248T>A SOX11-Mutation (SOX11^{T248A}). Bei der gezielten Sequenzierung des SOX11-Genlocus in 110 weiteren Liposarkomen unterschiedlicher Typen, konnte weder eine Rekurrenz der SOX11^{T248A}-Mutation noch eine weitere SOX11-Mutation identifiziert werden. Somit enthielt nur eines von 42 untersuchten MLS (2,4 %) und kein weiteres der insgesamt 111 untersuchten Liposarkome (0,9 %) eine SOX11-Mutation. Derzeit sind in den Datenbanken COSMIC und cBioPortal insgesamt 152 unterschiedliche SOX11-Mutationen unter 3.702.312 codierenden Mutationen in 1.177.397 Proben hinterlegt, wovon keine in einem Liposarkom identifiziert wurde oder einen c.248T>A Basenaustausch beschreibt (Forbes *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2013). Dies lässt den Schluss zu, dass somatische SOX11-Mutationen generell selten sind. Ebenso fand bisher keine funktionelle Charakterisierung der identifizierten somatischen SOX11-Mutationen statt.

Um die hier in MLS identifizierte SOX11-Mutation weiter funktionell zu untersuchen, wurde ein c.248T>A-Basenaustausch in dem bisher verwendeten SOX11-Expressionvektor vorgenommen, um die Zelllinie MLS-1765 stabil zu transfizieren. Wie zuvor beschrieben beeinflusst SOX11 die Zelleigenschaften Proliferation bzw. Viabilität und Chemosensitivität in MLS-1765-Zellen. Beim Vergleich dieser Eigenschaften nach Expression der SOX11^{T248A}-Mutation mit den vorherigen Beobachtungen, zeigte sich ein Phänotyp, der eher dem von wildtyp MLS-1765-Zellen als denen mit SOX11-Überexpression entspricht. Ebenso war die SOX11^{T248A}-Mutation nicht in der Lage die zuvor identifizierten SOX11-Zielgene in MLS-1765 zu aktivieren, was Grund für den Verlust des SOX11-beeinflussten Phänotyps sein könnte. Ähnliches wurde für die Keimbahnmutationen von SOX11 beschrieben, welche an der Entstehung von hereditären Augenerkrankungen,

neurologischen Entwicklungserkrankungen und dem Coffin-Siris-Syndrom beteiligt sind. Die beschriebenen *SOX11*-Mutationen waren nicht in der Lage den Promotor des *SOX11*-Zielgens *GDF5* zu aktivieren oder den normalen Phänotyp nach *SOX11-Knockout* in Zebrafischen wiederherzustellen (Pillai-Kastoori *et al.*, 2014; Tsurusaki *et al.*, 2014; Hempel *et al.*, 2015).

Grund für diesen funktionellen Verlust durch die Mutation könnte ihre Lage in der HMG-Box-Domäne von *SOX11* sein. Diese Domäne des Transkriptionsfaktors ist entscheidend für die Bindung der DNA (Wegner, 2010; Lefebvre *et al.*, 2007). Der c.248T>A-Basenaustausch führt zu einem Aminosäureaustausch (p.L83Q), welcher nach *PolyPhen-2*-Analyse mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu einer Beeinträchtigung der Proteinstruktur führt (Adzhubei *et al.*, 2010). Dies könnte durch die Veränderung der Polarität und Hydrophilie, die der Austausch der Aminosäure Leucin mit Glutamin in der zentral gelegenen α -Helix II der HMG-Box-Domäne bewirkt, begründet sein. Die α -Helix II und damit die HMG-Box-Domäne sind dadurch wahrscheinlich nicht mehr in der Lage unter physiologischen Bedingungen eine Konformation einzunehmen, die DNA funktionell binden kann und einen Transkriptionsprozess initiiert. Dies wird durch die *in silico*-Analyse mit der Software *MutationTaster2* (Schwarz *et al.*, 2014) bestätigt, die ebenfalls prognostiziert, dass die DNA-bindende Eigenschaft der HMG-Box-Domäne durch die *SOX11*^{T248A}-Mutation verloren geht. Weiter ergab diese Analyse, dass die *SOX11*^{T248A}-Mutation mit hoher Wahrscheinlichkeit krankheitsverursachend ist. Dieser Verlust der Funktionalität von *SOX11* durch eine Mutation unterstreicht, dass nicht ausschließlich die *SOX11*-Expression von Bedeutung ist im Hinblick auf Prognose und Therapie von MLS, sondern im genomischen Kontext von *SOX11* betrachtet werden sollte.

Zusammenfassend konnte in einer großen Kohorte von Liposarkomen eine konstitutiv hohe Expression von *SOX11* in MLS identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit demonstrieren eine Verminderung der Tumor-assoziierten Phänotypen Migration und Proliferation nach ektopischer Überexpression *in vitro*, was *SOX11* zu einem potentiellen Tumorsuppressor in MLS macht. Darüber hinaus beschreibt diese Arbeit neue direkte oder indirekte Zielgene, die von *SOX11* in MLS hochreguliert werden, welche die Pathogenese und Progression dieses Liposarkom-Typs behindern könnten. Weiter führt eine *SOX11*-Expression zu einer gesteigerten Sensitivität gegenüber den spezifischen niedermolekularen Chemotherapeutika Dasatinib und Trabectedin. Ebenso wurde zum ersten Mal durch einen systematischen genomischen *Screen* von Liposarkomen eine neue somatische *SOX11*-Mutation in MLS mit funktioneller Bedeutung identifiziert. Zusammengenommen unterstreicht dies den Wert von *SOX11* für die Prognose und Therapie von MLS, weswegen eine weitere funktionelle Evaluierung *in vivo* unter Verwendung von Mausmodellen und klinischen Korrelationsstudien sinnvoll erscheinen.

6 Literatur

Adzhubei, I. A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V. E., Gerasimova, A., Bork, P., *et al.* (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods*, 7(4), 248–249.

Agaram, N. P., Zhang, L., LeLoarer, F., Silk, T., Sung, Y.-S., Scott, S. N., *et al.* (2015). Targeted exome sequencing profiles genetic alterations in leiomyosarcoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*.

Aman, P., Ron, D., Mandahl, N., Fioretos, T., Heim, S., Arheden, K., *et al.* (1992). Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16)(q13;p11). *Genes, Chromosomes & Cancer*, 5(4), 278–285.

Antonescu, C. R., Tschernyavsky, S. J., Decuseara, R., Leung, D. H., Woodruff, J. M., Brennan, M. F., *et al.* (2001). Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(12), 3977–87.

Barretina, J., Taylor, B. S., Banerji, S., Ramos, A. H., Lagos-Quintana, M., DeCarolis, P. L., *et al.* (2010). Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nature Genetics*, 42(8), 715–721.

Baumann, P., Cremers, N., Kroese, F., Orend, G., Chiquet-Ehrismann, R., Uede, T., *et al.* (2005). CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Research*, 65(23), 10783–93.

Beadling, C., Patterson, J., Justusson, E., Nelson, D., Pantaleo, M. A., Hornick, J. L., *et al.* (2013). Gene expression of the IGF pathway family distinguishes subsets of gastrointestinal stromal tumors wild type for KIT and PDGFRA. *Cancer Medicine*, 2(1), 21–31.

Bergsland, M., Ramskold, D., Zaouter, C., Klum, S., Sandberg, R., & Muhr, J. (2011). Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes & Development*, 25(23), 2453–2464.

Bergsland, M., Werme, M., Malewicz, M., Perlmann, T., & Muhr, J. (2006). The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes & Development*.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., *et al.* (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242.

- Boland**, G. M., Piha-Paul, S. A., Subbiah, V., Routbort, M., Herbrich, S. M., Baggerly, K., *et al.* (2015). Clinical next generation sequencing to identify actionable aberrations in a phase I program. *Oncotarget*, 6(24), 20099–20110.
- Breitling**, R., Armengaud, P., Amtmann, A., & Herzyk, P. (2004). Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Letters*, 573(1-3), 83–92.
- Brennan**, D. J., Ek, S., Doyle, E., Drew, T., Foley, M., Flannelly, G., *et al.* (2009). The transcription factor Sox11 is a prognostic factor for improved recurrence-free survival in epithelial ovarian cancer. *European Journal of Cancer*, 45(8), 1510–1517.
- Burningham**, Z., Hashibe, M., & Spector, L. (2012). The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma*.
- Castillo**, S. D., Matheu, A., Mariani, N., Carretero, J., Lopez-Rios, F., Lovell-Badge, R., & Sanchez-Cespedes, M. (2012). Novel Transcriptional Targets of the SRY-HMG Box Transcription Factor SOX4 Link Its Expression to the Development of Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 72(1), 176–186.
- Chen**, C., Lee, G. A., Pourmorady, A., Sock, E., & Donoghue, M. J. (2015). Orchestration of Neuronal Differentiation and Progenitor Pool Expansion in the Developing Cortex by SoxC Genes. *Journal of Neuroscience*, 35(29), 10629–10642.
- Choi**, M. K., Seong, I., Kang, S. A., & Kim, J. (2014). Down-Regulation of Sox11 Is Required for Efficient Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. *Molecules and Cells*, 37(4).
- Chung**, W., Bondaruk, J., Jelinek, J., Lotan, Y., Liang, S., Czerniak, B., & Issa, J. P. J. (2011). Detection of Bladder Cancer Using Novel DNA Methylation Biomarkers in Urine Sediments. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 20(7), 1483–1491.
- Clark**, J., Rocques, P. J., Crew, A. J., Gill, S., Shipley, J., Chan, A. M., *et al.* (1994). Identification of novel genes, SYT and SSX, involved in the t(X;18)(p11.2;q11.2) translocation found in human synovial sarcoma. *Nature Genetics*, 7(4), 502–508.
- Clark**, M., Fisher, C., Judson, I., & Thomas, J. M. (2005). Soft-Tissue Sarcomas in Adults. *The New England Journal of Medicine*, 1–11.
- D'Incalci**, M., & Galmarini, C. M. (2010). A Review of Trabectedin (ET-743): A Unique Mechanism of Action. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9(8), 2157–2163.

- de Bont**, J. M., Kros, J. M., Passier, M. M. C. J., Reddingius, R. E., Smitt, P. A. E. S., Luider, T. M., *et al.* (2008). Differential expression and prognostic significance of SOX genes in pediatric medulloblastoma and ependymoma identified by microarray analysis. *Neuro-Oncology*, 10(5), 648–660.
- Debrock**, G., Vanhentenrijk, V., Sciot, R., Debiec-Rychter, M., Oyen, R., & Van Oosterom, A. (2003). A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *British Journal of Cancer*, 89(8), 1409–1412.
- DeClue**, J. E., Papageorge, A. G., Fletcher, J. A., & Diehl, S. R. (1992). Abnormal regulation of mammalian p21 ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell*, 69(2), 265–273.
- Demetri**, G. D., Fletcher, C. D., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., *et al.* (1999). Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(7), 3951–3956.
- Di Giandomenico**, S., Frapolli, R., Bello, E., Ubaldi, S., Licandro, S. A., Marchini, S., *et al.* (2013). Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas. *Oncogene*.
- Dodd**, L. G. (2011). Update on Liposarcoma: A review for cytopathologists. *Diagnostic Cytopathology*, 40(12), 1122–1131.
- Dy**, P., Penzo-Mendez, A., Wang, H., Pedraza, C. E., Macklin, W. B., & Lefebvre, V. (2008). The three SoxC proteins--Sox4, Sox11 and Sox12--exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Research*, 36(9), 3101–3117.
- Ek**, S., Dictor, M., Jerkeman, M., Jirstrom, K., & Borrebaeck, C. A. K. (2008). Nuclear expression of the non B-cell lineage Sox11 transcription factor identifies mantle cell lymphoma. *Blood*, 111(2), 800–805.
- Evans**, D. G. R., Baser, M. E., McGaughan, J., Sharif, S., Howard, E., & Moran, A. (2002). Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *Journal of Medical Genetics*, 39(5), 311–314.
- Feng**, W., Khan, M., Bellvis, P., Zhu, Z., Bernhardt, O., Herold-Mende, C., & Liu, H.-K. (2013). The Chromatin Remodeler CHD7 Regulates Adult Neurogenesis via Activation of SoxC Transcription Factors. *Cell Stem Cell*, 13(1), 62–72.

- Ferrando, A. A.** (2013). SOX11 is a mantle cell lymphoma oncogene. *Blood*, 121(12), 2169–2170.
- Fletcher CD, Hogendoorn P, Mertens F, Bridge J.** (2013). *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*. 4th ed. Lyon, France: IARC Press.
- Folgueras, A. R., Guo, X., Pasolli, H. A., Stokes, N., Polak, L., Zheng, D., & Fuchs, E.** (2013). Architectural Niche Organization by LHX2 Is Linked to Hair Follicle Stem Cell Function. *Cell Stem Cell*, 13(3), 314–327.
- Forbes, S. A., Beare, D., Gunasekaran, P., Leung, K., Bindal, N., Boutselakis, H., et al.** (2015). COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D805–D811.
- Forni, C., Minuzzo, M., Viridis, E., Tamborini, E., Simone, M., Tavecchio, M., et al.** (2009). Trabectedin (ET-743) promotes differentiation in myxoid liposarcoma tumors. *Molecular Cancer Therapeutics*, 8(2), 449–57.
- Franceschi, S., & Serraino, D.** (1992). Risk factors for adult soft tissue sarcoma in northern Italy. *Annals of Oncology*, 3(suppl 2), S85–S88.
- Fritz, B., Schubert, F., Wrobel, G., & Schwaenen, C.** (2002). Microarray-based copy number and expression profiling in dedifferentiated and pleomorphic liposarcoma. *Cancer Research*.
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., et al.** (2013). Integrative Analysis of Complex Cancer Genomics and Clinical Profiles Using the cBioPortal. *Science Signaling*, 6(269), p11–p11.
- Germano, G., Frapolli, R., Simone, M., Tavecchio, M., Erba, E., Pesce, S., et al.** (2010). Antitumor and Anti-inflammatory Effects of Trabectedin on Human Myxoid Liposarcoma Cells. *Cancer Research*, 70(6), 2235–2244.
- Grosso, F., Jones, R., Demetri, G., Judson, I., & Blay, J.** (2007). Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. *The Lancet Oncology*.
- Guan, Yu, X., Wang, H., Wang, H., Zhang, J., Li, G., et al.** (2015). Advances in the targeted therapy of liposarcoma. *OncoTargets and Therapy*, 125.
- Guo, Y., Liu, S., Zhang, X., Wang, L., Zhang, X., Hao, A., et al.** (2014). Sox11 promotes endogenous neurogenesis and locomotor recovery in mice spinal cord injury. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 446(4), 830–835.

- Gustavsson, E., S, Sernbo, R., Andersson, E., Brennan, D. J., Dictor, M., et al.** (2010). SOX11 expression correlates to promoter methylation and regulates tumor growth in hematopoietic malignancies. *Molecular Cancer*, 9(1), 187.
- Guth, S. I. E., & Wegner, M.** (2008). Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(19), 3000–3018.
- Harley, V. R., Lovell-Badge, R., & Goodfellow, P. N.** (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Research*, 22(8), 1500–1501.
- Hempel, A., Pagnamenta, A. T., Blyth, M., Mansour, S., McConnell, V., Kou, I., et al.** (2015). Deletions and de novo mutations of SOX11 are associated with a neurodevelopmental disorder with features of Coffin-Siris syndrome. *Journal of Medical Genetics*, jmedgenet–2015–103393–13.
- Hide, T., Takezaki, T., Nakatani, Y., Nakamura, H., Kuratsu, J. I., & Kondo, T.** (2009). Sox11 Prevents Tumorigenesis of Glioma-Initiating Cells by Inducing Neuronal Differentiation. *Cancer Research*, 69(20), 7953–7959.
- Hochhaus, A., & Kantarjian, H.** (2013). The development of dasatinib as a treatment for chronic myeloid leukemia (CML): from initial studies to application in newly diagnosed patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 139(12), 1971–1984.
- Hoser, M., Potzner, M. R., Koch, J. M. C., Bosl, M. R., Wegner, M., & Sock, E.** (2008). Sox12 Deletion in the Mouse Reveals Nonreciprocal Redundancy with the Related Sox4 and Sox11 Transcription Factors. *Molecular and Cellular Biology*, 28(15), 4675–4687.
- Hur, W., Rhim, H., Jung, C. K., Kim, J. D., Bae, S. H., Jang, J. W., et al.** (2010). SOX4 overexpression regulates the p53-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma: clinical implication and functional analysis in vitro. *Carcinogenesis*, 31(7), 1298–1307.
- Idbaih, A., Coindre, J. M., Derré, J., & Mariani, O.** (2005). Myxoid malignant fibrous histiocytoma and pleomorphic liposarcoma share very similar genomic imbalances. *Laboratory Investigation*.
- Jackson, D., Waibel, R., Weber, E., Bell, J., & Stahel, R. A.** (1992). CD24, a Signal-transducing Molecule Expressed on Human B Cells, Is a Major Surface Antigen on Small Cell Lung Carcinomas. *Cancer Research*, 52(19), 5264–5270.
- Jankowski, M. P., Cornuet, P. K., McIlwrath, S., Koerber, H. R., & Albers, K. M.** (2006). SRY-box containing gene 11 (Sox11) transcription factor is required for neuron survival and neurite growth. *Neuroscience*, 143(2), 501–14.

- Jauch**, R., Ng, C. L., Narasimhan, K., & Kolatkar, P (2012). The crystal structure of the Sox4 HMG domain–DNA complex suggests a mechanism for positional interdependence in DNA recognition. *Biochemical Journal*, 443(1), 39–47.
- Jay**, P., Sahly, I., Goze, C., Taviaux, S., Poulat, F., Couly, G., *et al.* (1997). SOX22 is a new member of the SOX gene family, mainly expressed in human nervous tissue. *Human Molecular Genetics*, 6(7), 1069–1077.
- Jevsek**, M., Jaworski, A., Polo-Parada, L., Kim, N., Fan, J., Landmesser, L. T., & Burden, S. J. (2006). CD24 is expressed by myofiber synaptic nuclei and regulates synaptic transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(16), 6374–6379.
- Joseph**, C. G., Hwang, H., Jiao, Y., Wood, L. D., Kinde, I., Wu, J., *et al.* (2014). Exomic analysis of myxoid liposarcomas, synovial sarcomas, and osteosarcomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 53(1), 15–24.
- Kaatsch**, P., Spix, C., Hentschel, S., Katalinic, A., Luttmann, S., Stegmaier, C., *et al.* (2015). *Krebs in Deutschland 2011/2012*, 10.
- Kamachi**, Y., & **Kondoh**, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, 140(20), 4129–4144.
- Kanehisa**, M., & **Goto**, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 27–30.
- Keung**, E. Z., Akdemir, K. C., Sannaa, Al, G. A., Garnett, J., Lev, D., Torres, K. E., *et al.* (2015). Increased H3K9me3 drives dedifferentiated phenotype via KLF6 repression in liposarcoma. *Journal of Clinical Investigation*, 125(8), 2965–2978.
- Killela**, P. J., Reitman, Z. J., & Jiao, Y. (2013). TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Presented at the Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Koelsche**, C., Renner, M., Hartmann, W., Brandt, R., Lehner, B., Waldburger, N., *et al.* (2014). TERT promoter hotspot mutations are recurrent in myxoid liposarcomas but rare in other soft tissue sarcoma entities. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 33(1), 33.
- Korkolopoulou**, P., Levidou, G., El-Habr, E. A., Adamopoulos, C., Fragkou, P., Boviatsis, E., *et al.* (2013). Sox11 expression in astrocytic gliomas: correlation with nestin & sol; c-Met & sol; IDH1-R132H expression phenotypes, p-Stat-3 and survival. *British Journal of Cancer*, 1–11.
- Kristiansen**, G., Sammar, M., & Altevogt, P. (2004). Tumour Biological Aspects of CD24, A Mucin-Like Adhesion Molecule. *Journal of Molecular Histology*, 35(3), 255–262.

- Kubo**, H., Shimizu, M., Taya, Y., Kawamoto, T., Michida, M., Kaneko, E., *et al.* (2009). Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes to Cells*, 14(3), 407–424.
- Kuo**, P.-Y., Leshchenko, V. V., Fazzari, M. J., Perumal, D., Gellen, T., He, T., *et al.* (2014). High-resolution chromatin immunoprecipitation (ChIP) sequencing reveals novel binding targets and prognostic role for SOX11 in mantle cell lymphoma. *Oncogene*, 34(10).
- Kwon**, A. T., Arenillas, D. J., Worsley-Hunt, R., & Wasserman, W. W. (2012). oPOSSUM-3: advanced analysis of regulatory motif over-representation across genes or ChIP-Seq datasets. *G3 (Bethesda, Md.)*, 2(9), 987–1002.
- Larson**, B. L., Ylostalo, J., Lee, R. H., Gregory, C., & Prockop, D. J. (2010). Sox11 is expressed in early progenitor human multipotent stromal cells and decreases with extensive expansion of the cells. *Tissue Engineering Part A*, 16(11), 3385–3394.
- Lawrence**, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., *et al.* (2013). Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature*, 499(7457), 214–218.
- Leahy**, M., Ray-Coquard, I., Verweij, J., Le Cesne, A., Duffaud, F., Hogendoorn, P. C. W., *et al.* (2007). Brostallicin, an agent with potential activity in metastatic soft tissue sarcoma: A phase II study from the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *European Journal of Cancer*, 43(2), 308–315.
- Lee**, J.-H., Kim, S.-H., Lee, E.-S., & Kim, Y.-S. (2009). CD24 overexpression in cancer development and progression: a meta-analysis. *Oncology Reports*, 22(5), 1149–1156.
- Lefebvre**, V., Dumitriu, B., Penzo-Méndez, A., Han, Y., & Pallavi, B. (2007). Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(12), 2195–214.
- Lioubinski**, O., Müller, M., Wegner, M., & Sander, M. (2003). Expression of Sox transcription factors in the developing mouse pancreas. *Developmental Dynamics*, 227(3), 402–408.
- Lopez**, F. J., Cuadros, M., Cano, C., Concha, A., & Blanco, A. (2012). Biomedical application of fuzzy association rules for identifying breast cancer biomarkers. *Medical & Biological Engineering & Computing*, 50(9), 981–990.

- Macher-Goeppinger, S., Aulmann, S., Tagscherer, K. E., Wagener, N., Haferkamp, A., Penzel, R., et al.** (2009). Prognostic value of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors in renal cell cancer. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(2), 650–659.
- Mahmood, S. T., Agresta, S., Vigil, C. E., Zhao, X., Han, G., D'Amato, G., et al.** (2011). Phase II study of sunitinib malate, a multitargeted tyrosine kinase inhibitor in patients with relapsed or refractory soft tissue sarcomas. Focus on three prevalent histologies: Leiomyosarcoma, liposarcoma and malignant fibrous histiocytoma. *International Journal of Cancer*, 129(8), 1963–1969.
- Malkin, D.** (2011). Li-Fraumeni Syndrome. *Genes & Cancer*, 2(4), 475–484
- Mathelier, A., Zhao, X., Zhang, A. W., Parcy, F., Worsley-Hunt, R., Arenillas, D. J., et al.** (2014). JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D142–7.
- Medina, P. P., Castillo, S. D., Blanco, S., Sanz-Garcia, M., Largo, C., Alvarez, S., et al.** (2009). The SRY-HMG box gene, SOX4, is a target of gene amplification at chromosome 6p in lung cancer. *Human Molecular Genetics*, 18(7), 1343–1352.
- Mentzel, T. & Schneider-Stock, R.** (2009). *Weichgewebstumoren. Pathologie.*
- Mikkelsen, T. S., Ku, M., Jaffe, D. B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., et al.** (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature*, 448(7153), 553–560.
- Misemer, B. S., Skubitz, A. P., Manivel, J. C., Schmechel, S. C., Cheng, E. Y., Henriksen, J. C., et al.** (2013). Expression of FAP, ADAM12, WISP1, and SOX11 is heterogeneous in aggressive fibromatosis and spatially relates to the histologic features of tumor activity. *Cancer Medicine*.
- Möller, E., Hornick, J. L., Magnusson, L., Veerla, S., Domanski, H. A., & Mertens, F.** (2011). FUS-CREB3L2/L1-positive sarcomas show a specific gene expression profile with upregulation of CD24 and FOXL1. *Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(9), 2646–56.
- Mozos, A., Royo, C., Hartmann, E., de Jong, D., Baro, C., Valera, A., et al.** (2009). SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*, 94(11), 1555–1562.
- Nishio, J., Iwasaki, H., Ishiguro, M., Ohjimi, Y., Fujita, C., Ikegami, H. ... Kikuchi, M.** (2003). Establishment of a novel human dedifferentiated liposarcoma cell line, FU-DDLS-1: Conventional and molecular cytogenetic characterization. *International Journal of Oncology*, 22, 535-542.

- Nordström**, L., Andersson, E., Kuci, V., Gustavsson, E., Holm, K., Ringnér, M., *et al.* (2015). DNA methylation and histone modifications regulate SOX11 expression in lymphoid and solid cancer cells. *BMC Cancer*, 15(1), 273.
- Oda**, Y., Yamamoto, H., Takahira, T., Kobayashi, C., Kawaguchi, K., Tateishi, N., *et al.* (2005). Frequent alteration of p16INK4a/p14ARF and p53 pathways in the round cell component of myxoid/round cell liposarcoma: p53 gene alterations and reduced p14ARF expression both correlate with poor prognosis. *The Journal of Pathology*, 207(4), 410–421.
- Palomero**, J., Vegliante, M. C., Eguileor, A., Guez, M. L. R. I., Balsas, P., Perez, D. M. I., *et al.* (2015). SOX11 defines two different subtypes of mantle cell lymphoma through transcriptional regulation of BCL6, 1–16.
- Pamnani**, M., Sinha, P., Nara, S., & Sachan, M. (2014). Study of promoter DNA methylation of Sox11 and its correlation with tissue-specific expression in the laboratory mouse. *Gene*, 552(1), 133–139.
- Pan**, X., Zhao, J., Zhang, W.-N., Li, H.-Y., Mu, R., Zhou, T., *et al.* (2009). Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53 stabilization and function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), 3788–3793.
- Patodia**, S., & Raivich, G. (2012). Role of transcription factors in peripheral nerve regeneration. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 1–15.
- Pedeutour**, F., Forus, A., Coindre, J. M., Berner, J. M., Nicolo, G., Michiels, J. F., *et al.* (1999). Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 24(1), 30–41.
- Pérez-Mancera**, P. A., Bermejo-Rodríguez, C., Sánchez-Martín, M., Abollo-Jiménez, F., Pintado, B., & Sánchez-García, I. (2008). FUS-DDIT3 Prevents the Development of Adipocytic Precursors in Liposarcoma by Repressing PPAR γ and C/EBP α and Activating eIF4E. *PLoS ONE*, 3(7), e2569–12.
- Pillai-Kastoori**, L., Wen, W., Wilson, S. G., Strachan, E., Lo-Castro, A., Fichera, M., *et al.* (2014). Sox11 Is Required to Maintain Proper Levels of Hedgehog Signaling during Vertebrate Ocular Morphogenesis. *PLoS Genetics*, 10(7), e1004491.
- Pishvaian**, M. J., Marshall, J. L., Wagner, A. J., Hwang, J. J., Malik, S., Cotarla, I., *et al.* (2012). A phase 1 study of efatutazone, an oral peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, administered to patients with advanced malignancies. *Cancer*, 118(21), 5403–5413.

- Qu, Y., Zhou, C., Zhang, J., Cai, Q., Li, J., Tao, du, et al.** (2014). The metastasis suppressor SOX11 is an independent prognostic factor for improved survival in gastric cancer. *International Journal of Oncology*, 44(5), 1512–20.
- Renner, M., Czwan, E., Hartmann, W., Penzel, R., Brors, B., Eils, R., et al.** (2012). MicroRNA profiling of primary high-grade soft tissue sarcomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 51(11), 982–996.
- Renner, M., Wolf, T., Meyer, H., Hartmann, W., Rol, Penzel, R., et al.** (2013). Integrative DNA methylation and gene expression analysis in high-grade soft tissue sarcomas. *Genome Biology*, 14(12), r137.
- Reppe, S., Rian, E., Jemtl, R., & Olstad, O.** (2000). Sox-4 messenger RNA is expressed in the embryonic growth plate and regulated via the parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor in osteoblast like cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15, 2402-2412
- Rieker, R. J., Joos, S., Bartsch, C., Willeke, F., Schwarzbach, M., Ota o-Joos, M., et al.** (2002). Distinct chromosomal imbalances in pleomorphic and in high-grade dedifferentiated liposarcomas. *International Journal of Cancer*, 99(1), 68–73.
- Rudin, C. M., Durinck, S., Stawiski, E. W., & Poirier, J. T.** (2012). Comprehensive genomic analysis identifies SOX2 as a frequently amplified gene in small-cell lung cancer. *Nature*.
- Sarkar, A., & Hochedlinger, K.** (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*.
- Schepers, G. E., Teasdale, R. D., & Koopman, P.** (2002). Twenty pairs of sox: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. *Developmental Cell*, 3(2), 167–170.
- Schilham, M., Oosterwegel, M., Moerer, P., Ya, J., & Boer, P.** (1996). Sox-4 gene is required for cardiac outflow tract formation and pro-B lymphocyte expansion. *Nature*.
- Schmidt, H., Bartel, F., Kappler, M., Würfl, P., & Lange, H.** (2005). Gains of 13q are correlated with a poor prognosis in liposarcoma. *Modern Pathology*.
- Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D.** (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Publishing Group*, 11(4), 361–362.
- Sernbo, S., Gustavsson, E., Brennan, D. J., Gallagher, W. M., Rexhepaj, E., Rydnert, F., et al.** (2011). The tumour suppressor SOX11 is associated with improved survival among high grade epithelial ovarian cancers and is regulated by reversible promoter methylation. *BMC Cancer*, 11(1), 405.

- Sha, L., Kitchen, R., Porteous, D., Blackwood, D., Muir, W., & Pickard, B. (2012).** SOX11 target genes: implications for neurogenesis and neuropsychiatric illness. *Acta Neuropsychiatrica*, 24(1), 16–25.
- Sievers, E., Trautmann, M., Kindler, D., Huss, S., Gruenewald, I., Dirksen, U., et al. (2015).** SRC inhibition represents a potential therapeutic strategy in liposarcoma. *International Journal of Cancer*.
- Simonsen, A. T., Sørensen, C. D., Ebbesen, L. H., Bødker, J. S., Bentzen, H. H. N., & Nyvold, C. G. (2014).** SOX11 as a minimal residual disease marker for Mantle cell lymphoma. *Leukemia Research*, 38(8).
- Singer, S., Antonescu, C. R., Riedel, E., & Brennan, M. F. (2003).** Histologic Subtype and Margin of Resection Predict Pattern of Recurrence and Survival for Retroperitoneal Liposarcoma. *Annals of Surgery*, 238, 358–371.
- Singer, S., Socci, N. D., Ambrosini, G., Sambol, E., Decarolis, P., Wu, Y., et al. (2007).** Gene expression profiling of liposarcoma identifies distinct biological types/subtypes and potential therapeutic targets in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Cancer Research*, 67(14), 6626–6636.
- Skubitz, K. M., Cheng, E. Y., & Clohisy, D. R. (2005).** Differential Gene Expression in Liposarcoma, Lipoma, and Adipose Tissue. *Cancer*.
- Sleijfer, S., Ray-Coquard, I., Papai, Z., Le Cesne, A., Scurr, M., Schoffski, P., et al. (2009).** Pazopanib, a Multikinase Angiogenesis Inhibitor, in Patients With Relapsed or Refractory Advanced Soft Tissue Sarcoma: A Phase II Study From the European Organisation for Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group (EORTC Study 62043). *Journal of Clinical Oncology*, 27(19), 3126–3132.
- Snyder, E. L., Sandstrom, D. J., Law, K., Fiore, C., Sicinska, E., Brito, J., et al. (2009).** amplification and overexpression are oncogenic in liposarcoma but not always sufficient to inhibit the adipocytic differentiation programme. *The Journal of Pathology*, 218(3), 292–300.
- Sock, E., Rettig, S. D., Enderich, J., Bosl, M. R., Tamm, E. R., & Wegner, M. (2004).** Gene Targeting Reveals a Widespread Role for the High-Mobility-Group Transcription Factor Sox11 in Tissue Remodeling. *Molecular and Cellular Biology*, 24(15), 6635–6644.
- Ståhlberg, A., Kåbjörn-Gustafsson, C., Engström, K., Thomsen, C., Dolatabadi, S., Jonasson, E., et al. (2014).** Normal and Functional TP53 in Genetically Stable Myxoid/Round Cell Liposarcoma. *PLoS ONE*, 9(11), e113110–7.

- Stuart**, J. E., Lusic, E. A., Scheck, A. C., Coons, S. W., Lal, A., Perry, A., & Gutmann, D. H. (2011). Identification of Gene Markers Associated with Aggressive Meningioma by Filtering Across Multiple Sets of Gene Expression Arrays. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 70(1), 1–12.
- Taylor**, B. S., Barretina, J., Maki, R. G., Antonescu, C. R., Singer, S., & Ladanyi, M. (2011). Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nature Reviews Cancer*, 11(8), 541–557.
- Taylor**, B. S., DeCarolis, P. L., Angeles, C. V., Brenet, F., Schultz, N., Antonescu, C. R., *et al.* (2011). Frequent Alterations and Epigenetic Silencing of Differentiation Pathway Genes in Structurally Rearranged Liposarcomas. *Cancer Discovery*, 1(7), 587–597.
- Thomas**, S., Harding, M. A., Smith, S. C., Overdevest, J. B., Nitz, M. D., Frierson, H. F., *et al.* (2012). CD24 Is an Effector of HIF-1-Driven Primary Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Research*, 72(21), 5600–5612.
- Tong**, W.-G., Wierda, W. G., Lin, E., Kuang, S.-Q., Bekele, B. N., Estrov, Z., *et al.* (2010). Genome-wide DNA methylation profiling of chronic lymphocytic leukemia allows identification of epigenetically repressed molecular pathways with clinical impact. *Epigenetics*, 5(6), 499–508.
- Tseng**, W., Somaiah, N., Lazar, A., Lev, D., & Pollock, R. (2013). Novel Systemic Therapies in Advanced Liposarcoma: A Review of Recent Clinical Trial Results. *Cancers*, 5(2), 529–549.
- Tsurusaki**, Y., Koshimizu, E., Ohashi, H., Phadke, S., Kou, I., Shiina, M., *et al.* (2014). De novo SOX11 mutations cause Coffin–Siris syndrome. *Nature Communications*, 5.
- van de Wetering**, M., Oosterwegel, M., van Norren, K., & Clevers, H. (1993). Sox-4, an Sry-like HMG box protein, is a transcriptional activator in lymphocytes. *The EMBO Journal*.
- van Houte**, L. P. A., Chuprina, P. V., van der Wetering, M., Boelens, R., Kaptein, R., & Clevers, H. (1995). Solution Structure of the Sequence-specific HMG Box of the Lymphocyte Transcriptional Activator Sox-4. *Journal of Biological Chemistry*, 270(51), 30516–30524.
- Vegliante**, M. C., Palomero, J., Pérez-Galán, P., Roué, G., Castellano, G., Navarro, A., *et al.* (2013). SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. (Plenary Paper). *Blood*, 121(12), 2175–85.
- Vegliante**, M. C., Royo, C., Palomero, J., Salaverria, I., Balint, B., Martín-Guerrero, I., *et al.* (2011). Epigenetic activation of SOX11 in lymphoid neoplasms by histone modifications. *PLoS ONE*, 6(6), e21382.

- Vervoort**, S. J., Boxtel, R., Coffey, P. J., & van Boxtel, R. (2012). The role of SRY-related HMG box transcription factor 4 (SOX4) in tumorigenesis and metastasis: friend or foe? *Oncogene*, 32(29), 3397–3409.
- von Mehren**, M., Rankin, C., Goldblum, J. R., Demetri, G. D., Bramwell, V., Ryan, C. W., & Borden, E. (2011). Phase 2 Southwest Oncology Group-directed intergroup trial (S0505) of sorafenib in advanced soft tissue sarcomas. *Cancer*, 118(3), 770–776.
- Wabitsch**, M., Brüderlein, S., Melzner, I., Braun, M., Mechtersheimer, G., & Möller, P. (2000). LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *International Journal of Cancer*, 88(6), 889–894.
- Wang**, L., Liu, R., Li, D., Lin, S., Fang, X., Backer, G., *et al.* (2012). A hypermorphic SP1-binding CD24 variant associates with risk and progression of multiple sclerosis. *American Journal of Translational Research*, 4(3), 347–356.
- Wang**, X., Björklund, S., Wasik, A. M., Grandien, A., Andersson, P., Kimby, E., *et al.* (2010). Gene expression profiling and chromatin immunoprecipitation identify DBN1, SETMAR and HIG2 as direct targets of SOX11 in mantle cell lymphoma. *PLoS ONE*, 5(11), e14085.
- Wang**, Z., Reynolds, A., Kirry, A., Nienhaus, C., & Blackmore, M. G. (2015). Overexpression of sox11 promotes corticospinal tract regeneration after spinal injury while interfering with functional recovery. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 35(7), 3139–45.
- Wasik**, A. M., Lord, M., Wang, X., Zong, F., Andersson, P., Kimby, E., *et al.* (2013). SOXC transcription factors in mantle cell lymphoma: the role of promoter methylation in SOX11 expression. *Scientific Reports*, 3.
- Wegner**, M. (2010). All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*.
- Weigle**, B., Ebner, R., Temme, A., Schwind, S., Schmitz, M., Kiessling, A., *et al.* (2005). Highly specific overexpression of the transcription factor SOX11 in human malignant gliomas. *Oncology Reports*, 13(1), 139–144.
- Wiebe**, M. S., Nowling, T. K., & Rizzino, A. (2003). Identification of Novel Domains within Sox-2 and Sox-11 Involved in Autoinhibition of DNA Binding and Partnership Specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 17901–17911.
- Willems**, S. M., Schrage, Y. M., Bruijn, I. H. B.-D., Szuhai, K., Hogendoorn, P. C., & Bovée, J. V. (2010). Kinome profiling of myxoid liposarcoma reveals NF-kappaB-pathway kinase activity and Casein Kinase II inhibition as a potential treatment option. *Molecular Cancer*, 1–12.

- Wurm, A.,** Sock, E., Fuchshofer, R., Wegner, M., & Tamm, E. R. (2008). Anterior segment dysgenesis in the eyes of mice deficient for the high-mobility-group transcription factor Sox11. *Experimental Eye Research*, 86(6), 895–907.
- Xu, L.,** Huang, S., Hou, Y., Liu, Y., Ni, M., Meng, F., *et al.* (2014). Sox11-modified mesenchymal stem cells (MSCs) accelerate bone fracture healing: Sox11 regulates differentiation and migration of MSCs. *The FASEB Journal*, 29(4).
- Xu, X.,** Chang, X., Li, Z., Wang, J., Deng, P., Zhu, X., *et al.* (2015). Aberrant SOX11 promoter methylation is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Cellular Oncology*.
- Yao, Z.,** Bin Sun, Hong, Q., Yan, J., Mu, D., Li, J., *et al.* (2015). The role of tumor suppressor gene SOX11 in prostate cancer. *Tumor Biology*.
- Yip, S.,** Butterfield, Y. S., Morozova, O., Chittaranjan, S., Blough, M. D., An, J., *et al.* (2012). Concurrent CIC mutations, IDH mutations, and 1p/19q loss distinguish oligodendrogliomas from other cancers. *The Journal of Pathology*, 226(1), 7–16.
- Yun, S.,** Saijoh, Y., Hirokawa, K. E., Kopinke, D., Murtaugh, L. C., Monuki, E. S., & Levine, E. M. (2009). Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Development (Cambridge, England)*, 136(23), 3895–3906.
- Zhang, S.,** Li, S., & Gao, J.-L. (2013). Promoter methylation status of the tumor suppressor gene SOX11 is associated with cell growth and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell International*, 13(1), 109–8.
- Zvelebil, M.,** Oliemuller, E., Gao, Q., Wansbury, O., Mackay, A., Kendrick, H., *et al.* (2013). Embryonic mammary signature subsets are activated in Brca1^{-/-} and basal-like breast cancers. *Breast Cancer Research*, 15(2), R25.

7 Danksagung

Ich möchte mich bei Herr Prof. Dr. med. Peter Schirmacher, Ärztlicher Direktor des Pathologischen Instituts des Universitätsklinikum Heidelberg, und Frau Priv.-Doz. Dr. med. Gunhild Mechtersheimer, Oberärztin und Leiterin der AG Sarkome, für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation bei Ihnen anfertigen zu dürfen.

Gleichermaßen großen Dank geht an Herr Prof. Dr. Stefan Wiemann, der sich bereit erklärt hat als Erstgutachter meine Doktorarbeit mitzubetreuen.

Ebenso danke ich Herr Prof. Dr. Benedikt Brors für die Bereitschaft als zweiter Gutachter meine Arbeit mitzubewerten.

Herrn Dr. rer. nat. Marcus Renner danke ich besonders für seine exzellente Betreuung und Themastellung.

Auch danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für die Zusammenarbeit.

Ganz besonderen Dank gilt meiner Frau Verena und meiner Tochter Paula, sowie meinen Eltern und meiner Familie für ihre langjährige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.