

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Gesamtfakultät
für Mathematik, Ingenieur- und Naturwissenschaften
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Sara-Sheena Engel, M. Sc.

aus: St. Wendel

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2022

Der Transkriptionsfaktor SOX11 ist ein potenzielles Onkogen in malignen
peripheren Nervenscheidentumoren und Ewing-Sarkomen

Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Brors

Prof. Dr. Kai Breuhahn

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abstract	VI
Zusammenfassung	VII
1. Einleitung	1
1.1 Weichgewebe- und Knochensarkome.....	1
1.1.1 Genese von Weichgewebe- und Knochensarkomen.....	2
1.1.2 Maligne periphere Nervenscheidentumoren.....	3
1.1.2.1 Therapie von MPNSTs	4
1.1.3 Ewing-Sarkome.....	5
1.1.3.1 Therapie von ES	7
1.2 SOX-Familie von Transkriptionsfaktoren.....	8
1.2.1 SOX11 (SRY (sex-determining region Y)-box 11)	10
1.2.1.1 SOX11 in der Tumorigenese	11
2. Ziele	13
3. Material und Methoden	14
3.1 Material	14
3.1.1 Zelllinien	14
3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	14
3.1.2.1 Geräte.....	14
3.1.2.2 Verbrauchsmaterialien.....	14
3.1.3 Kommerzielle Kits, biologische Reagenzien und Plasmide.....	16
3.1.3.1 Kommerzielle Kits.....	16
3.1.3.2 Biologische Reagenzien	16
3.1.3.3 Plasmide	17
3.1.4 Antikörper	17
3.1.5 Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	18
3.1.5.1 Chemikalien.....	18
3.1.5.2 Puffer und Lösungen	19
3.1.6 Datenbanken und Software	19
3.1.7 Oligonukleotide für die Klonierung, qPCR, ChIP-qPCR und Sanger-Sequenzierung.....	20
3.2. Methoden	21
3.2.1 Zellkultur.....	21
3.2.2 Generierung stabiler Zelllinien mit SOX11-Knockout mittels dem CRISPR/Cas9-System	22
3.2.2.1 Generierung stabiler Zelllinien mit Cas9 Expression	22
3.2.2.1.1 Herstellung von Lentiviren mit Cas9	22

3.2.2.1.2 Lentivirale Transduktion von Cas9	23
3.2.2.2 Generierung stabiler Zelllinien mit <i>SOX11</i> -Knockout.....	23
3.2.2.2.1 sgRNA Design.....	23
3.2.2.2.2 Klonierung der sgRNA in den pLKO-Vektor	24
3.2.2.2.3 Herstellung von Lentiviren mit <i>SOX11</i> sgRNAs	25
3.2.2.2.4 Lentivirale Transduktion von sgRNA	26
3.2.2.3 Einzelklon-Isolierung	26
3.2.2.4 Sanger-Sequenzierung.....	26
3.2.3 Funktionelle Assays	27
3.2.3.1 Klonogenitäts-Assay	27
3.2.3.2 Viabilitäts-Assay mit Resazurin (CTB-Reagenz)	27
3.2.3.3 BrdU-Proliferations-Assay	28
3.2.3.4 Apoptose-Assay	28
3.2.3.5 Migrationsassay.....	28
3.2.3.6 Adhäsionsassay	29
3.2.3.7 Inhibitor-Assays	29
3.2.4 Quantitative <i>real-time</i> PCR (qRT-PCR).....	30
3.2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA	30
3.2.4.2 Reverse Transkription.....	30
3.2.4.3 Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	30
3.2.5 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)	32
3.2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA und Qualitätskontrolle	32
3.2.5.2 RNA-Sequenzierung und Datenauswertung.....	33
3.2.6 SDS-PAGE und Western Blot	33
3.2.6.1 Proteinlyse und -quantifizierung.....	33
3.2.6.2 SDS-PAGE.....	33
3.2.6.3 Western Blotting	34
3.2.7 Immunhistochemische Färbemethoden	35
3.2.8 Chromatin-Immunpräzipitation	36
3.2.8.1 ChIP-qPCR	36
3.2.8.2. ChIP-qPCR <i>SOX11</i> Kandidaten	37
3.2.8.2.1 <i>In-silico</i> Analyse der Promotorregionen.....	37
3.2.9 Antibody Array Assays.....	39
3.2.9.1 Ingenuity Pathway Analysis der Antibody Arrays.....	39
3.2.10 Statistische Analysen und Software	40
4. Ergebnisse	41

4.1 SOX11 in MPNSTs	41
4.1.1 SOX11-Expression in MPNSTs und in MPNST-Zelllinien	41
4.1.2 Generierung einer MPNST-Zelllinie mit <i>SOX11</i> -Knockout.....	42
4.1.3 Funktionelle Charakterisierung von SOX11 nach Knockout in der MPNST-Zelllinie S462	43
4.1.4 Transkriptomanalyse nach <i>SOX11</i> -Knockout	46
4.1.4.1 Funktionelle Annotation differentiell exprimierter Gene	46
4.1.4.2 Identifikation potenzieller SOX11-Zielgene mit einer positiven Korrelation in primären MPNSTs	50
4.1.4.3 Identifikation potenzieller SOX11-Zielgene im Kontext mit Sarkomen und bekannten SOX11-Zielgenen	51
4.1.4.4 Verifizierung von <i>NKX2-2</i> , <i>CD24</i> , <i>KDR</i> und <i>SYK</i> als SOX11-Zielgene in MPNSTs.....	54
4.1.5 Der Einfluss von SOX11 auf den VEGF-Signalweg	55
4.1.5.1 Der Einfluss von SOX11 auf die Sensitivität gegenüber Multikinase-Inhibitoren in MPNSTs.....	60
4.2 SOX11 in Ewing-Sarkomen	62
4.2.1 SOX11-Expression in Ewing-Sarkomen und in ES-Zelllinien	62
4.2.2 Generierung einer ES-Zelllinie mit <i>SOX11</i> -Knockout.....	64
4.2.3 Funktionelle Charakterisierung von SOX11 nach Knockout in der ES-Zelllinie POE.....	65
4.2.4 Transkriptomanalyse nach <i>SOX11</i> -Knockout	67
4.2.4.1 Funktionelle Annotation differentiell exprimierter Gene	68
4.2.4.2 Identifikation potenzieller SOX11-Zielgene.....	71
4.3 Identifikation übereinstimmender deregulierter Gene nach <i>SOX11</i>-Knockout in der MPNST-Zelllinie S462 und in der ES-Zelllinie POE	73
5. Diskussion	75
5.1 Die Bedeutung von SOX11 in MPNSTs	75
5.2 Die Bedeutung von SOX11 in ES	82
5.3 Die Sarkomtyp-spezifische Bedeutung von SOX11	85
6. Literatur	87
Abbildungsverzeichnis	103
Tabellenverzeichnis	104
Anhang	105
Danksagung	106

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
<i>18S</i>	<i>Ribosomal protein S18</i>
<i>ACTB</i>	<i>Actin beta</i>
AK	Antikörper
APC	Adenomatöse Poliposis Coli
AS	Allred-Score
ASA	Angiosarkom
<i>BCL6</i>	<i>BCL6 transcription repressor</i>
<i>BLM</i>	<i>BLM-RecQ Like Helicase</i>
bp	Basenpaar
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bzw.	Beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
<i>CAMK1G</i>	<i>Calcium/Calmodulin dependent protein kinase 1G</i>
<i>CASP4</i>	<i>Caspase 4</i>
CC-Domäne	<i>Coiled-coil</i> Domäne
<i>CD24</i>	<i>Cluster of differentiation 24</i>
<i>CDH2</i>	<i>Cadherin 2, N-cadherin</i>
<i>CDH5</i>	<i>Cadherin 5</i>
<i>CDK4</i>	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
CESS	<i>Cooperative Ewing Sarcoma Study</i>
c-fms	<i>Macrophage colony-stimulating factor receptor</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
c-Kit	<i>KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CRISPR	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CTB	<i>Cell titer blue</i>
DAVID	<i>Database for annotation, visualization and integrated discovery</i>
<i>DBN1</i>	<i>Drebin 1</i>
DCIS	Duktales Carcinoma <i>in situ</i>
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DDLs	Dedifferenziertes Liposarkom
DDIT3	<i>DNA-damage inducible transcript 3</i>
DIM-Domäne	Dimerisierungsdomäne
DKKR	Deutsches Kinderkrebsregister
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>

DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>EED</i>	<i>Embryonic ectoderm development</i>
<i>EGFR</i>	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
<i>EPHA7</i>	<i>EPH receptor A7</i>
<i>EPHB1</i>	<i>EPH receptor B1</i>
ERG	<i>ETS transcription factor ERG</i>
ES	Ewing-Sarkom
ETS	<i>Erythroblast transformation specific</i>
<i>EWSR1</i>	<i>Ewing sarcoma breakpoint region 1</i>
Ex/Em	Extinktion/Emission
<i>FBN2</i>	<i>Fibrillin 2</i>
FC	<i>Fold change</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
<i>FES</i>	<i>FES proto-oncogene</i>
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet
FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
<i>FLI1</i>	<i>Friend leukemia insertion 1</i>
FLT3LG	<i>Fms-related receptor tyrosine kinase 3 ligand</i>
<i>FN1</i>	<i>Fibronectin 1</i>
FUS	<i>Fused in sarcoma RNA-binding protein</i>
<i>FUSIP1</i>	<i>FUS interacting protein (serine-arginine rich) 1 pseudogene</i>
<i>FZD1</i>	<i>Frizzled class receptor 1</i>
<i>FZD8</i>	<i>Frizzled class receptor 8</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
<i>GAS1</i>	<i>Growth arrest specific 1</i>
GIC	Glioma-initiierende Zellen
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
h	Stunde
H3K27me3	<i>Trimethylated lysine 27 of histone H3</i>
<i>HIG2</i>	<i>Hypoxia-inducible protein 2</i>
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
HMG	<i>High mobility group</i>
<i>HMGGA2</i>	<i>High mobility group AT-hook 2</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
<i>IGF-1R</i>	<i>Insulin like growth factor receptor 1</i>
IHC	Immunhistochemie
IPA	<i>Ingenuity pathway analysis</i>
IRAK2	<i>Interleukin 1 receptor associated kinase 2</i>
<i>KDR</i>	<i>Kinase insert domain receptor</i>
KO	Knockout
LMS	Leiomyosarkom
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>

LRRK2	<i>Leucine rich repeat kinase 2</i>
LSD-1	<i>Lysine demethylase 1A</i>
MAP3K3	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>
MCL	Mantelzelllymphom
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homologue</i>
MET	<i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
MFS	Myxofibrosarkom
Mg ²⁺	Magnesium
min	Minute
miRNA	<i>Micro Ribonucleic acid</i>
MKI	Multikinaseinhibitor
ml	Milliliter
MLS	Myxoides Liposarkom
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
n	Anzahl der Replikate
NCT	Nationales Centrum für Tumorerkrankungen
NELL2	<i>Neural EGFL like 2</i>
NF1	Neurofibromin 1
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NKX2-2	<i>NK2 homeobox 2</i>
nm	Nanometer
NRP2	<i>Neuropilin 2</i>
nt	Nukleotid
NTC	<i>Non-targeting control</i>
NTSR1	<i>Neurotensin receptor 1</i>
OD	Optische Dichte
ORR	<i>Objective response rate</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAM	<i>Protospacer adjacent motif</i>
PARP	<i>Poly(ADP-Ribose) polymerase</i>
PAX2	<i>Paired box 2</i>
PAX5	<i>Paired box 5</i>
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
PEI	Polyethylenimine
PGF	<i>Placental growth factor</i>
PLS	Pleomorphes Liposarkom
PN	Plexiforme Neurofibrome
PNS	Peripheres Nervensystem
PRKCI	<i>Protein kinase C iota</i>
qPCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RB1	Retinoblastoma 1
RECQ4	<i>RecQ Like Helicase 4</i>
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RKI	Robert-Koch-Institut

RMS	Rhabdomyosarkom
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI-1640	<i>Roswell park memorial institute 1640 medium</i>
RT	Raumtemperatur
RTU	<i>Ready to use</i>
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
<i>SEMA6A</i>	<i>Semaphorin 6A</i>
<i>SETMAR</i>	<i>SET domain and mariner transposase fusion gene</i>
SFT	Solitär fibröser Tumor
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
SOX	<i>SRY-related HMG- box</i>
SOX11	<i>SRY (sex-determining region Y)-box 11</i>
SOX12	<i>SRY (sex-determining region Y)-box 12</i>
SOX4	<i>SRY (sex-determining region Y)-box 4</i>
SRC	<i>SRC proto-oncogene</i>
SRY	<i>Sex-determining region Y</i>
SS	Synoviale Sarkome
<i>STAG2</i>	<i>Stromal antigene 2</i>
STAT6	<i>Signal transducer and activator of transcription 6</i>
<i>SUZ12</i>	<i>SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit</i>
SYK	<i>Spleen associated tyrosine kinase</i>
TAD	Transaktivierungsdomäne
TBS-T	<i>Tris-buffered saline + 1 % Tween® 20</i>
<i>TEAD2</i>	<i>TEA domain family member 2</i>
TET	<i>Ten-eleven translocation</i>
TGF-beta	<i>Transforming growth factor beta</i>
THBS1, TSP1	<i>Thrombospondin 1</i>
Tm	Schmelzpunkt
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidine
<i>TMSB15A</i>	<i>Thymosin beta 15A</i>
TP53	Tumorprotein 53
TRD	Transrepressionsdomäne
<i>TRIB2</i>	<i>Tribbles pseudokinase 2</i>
<i>TUBB3</i>	<i>Class III β-tubulin</i>
UPS	Undifferenziertes pleomorphes Liposarkom
UV-Vis	Ultraviolettes und sichtbares Licht
<i>VANGL2</i>	<i>VANG planar cell polarity protein 2</i>
VDC/IE	Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid/Ifosfamid, Etoposid
VEGFR2	<i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>
VIDE	Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin, Etoposid

VSV-G	<i>Vesicular stomatitis virus G glycoprotein</i>
WDLS	Gutdifferenziertes Liposarkom
WGS	Weichgewebesarkome
WHO	<i>World health organization</i>
WRN	<i>WRN-RecQ Like Helicase</i>

Abstract

Soft tissue and bone sarcomas are highly aggressive, histological and genetic heterogeneous malignant tumors of mesenchymal origin. Despite multimodal therapy options, tumor-related lethality remains a major challenge. Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNSTs) account for about 2 % of all soft tissue sarcomas (STS) and half of the cases are associated with neurofibromatosis 1. Ewing Sarcoma (ES) is the second common bone tumor in children and young adults and is characterized by the fusion oncoprotein EWSR1-FLI1. SOX11 is a neural transcription factor that is mainly expressed during early embryogenesis but largely not expressed in adult tissues. In various tumor entities SOX11 is overexpressed and exerts a tumor-suppressive or oncogenic function depending on tumor entity.

Immunohistochemical analysis in MPNST showed nuclear expression of SOX11 in 61.5 % (8/13) of cases. Knockout of *SOX11* in the SOX11-positive cell line S462 resulted in decreased cell migration and colony formation and increased apoptosis rate. Using RNA sequencing I could identify numerous potential SOX11 target genes and *KDR*, *CD24*, *NKX2-2* and *SYK* as direct SOX11 target genes by ChIP-qPCR. RNA sequencing also showed that processes related to angiogenesis were downregulated after *SOX11* knockout. In a VEGF phospho array, *SOX11* knockout in S462 cells showed a predicted inhibition of VEGF signaling. In the S462 cells, the expression of SOX11 led to a slightly increased sensitivity to the anti-angiogenic multikinase inhibitors sunitinib and pazopanib.

In ES, I detected nuclear expression of SOX11 by immunohistochemistry in 81 % (62/77) of cases. In a gene expression dataset of 196 patients with ES, high SOX11 expression levels correlated with poorer survival. Knockout of *SOX11* in the SOX11-expressing ES cell line POE resulted in decreased viability, proliferation and colony formation. Similarly, POE cells showed a reduced ability to adhere after *SOX11* knockout. Using RNA sequencing I could detect numerous potential SOX11 target genes that are involved in processes of cell adhesion. Among others, I found that the cell adhesion molecule gene *CD24* was strongly downregulated in POE cells after *SOX11* knockout.

In summary, my results are strong evidence for an oncogenic function of SOX11 in MPNST and ES. My data show that SOX11 predominantly affects sarcoma subtype-specific and only a few overlapping target genes and consequently different biological processes. Furthermore, I could show that SOX11 could be considered as a potential biomarker of MKI therapy in MPNSTs and as a prognostic marker in ES. For verification, studies of further independent patient collectives and in vivo models are appropriate.

Zusammenfassung

Weichgewebe- und Knochensarkome sind hoch aggressive, histologisch und genetisch heterogene maligne Tumoren mesenchymalen Ursprungs. Trotz multimodaler Therapieoptionen ist die tumorbedingte Letalität weiterhin eine große Herausforderung. Maligne periphere Nervenscheidentumore (MPNSTs) machen etwa 2 % aller Weichgewebesarkome (WGS) aus und die Hälfte der Fälle sind mit Neurofibromatose 1 assoziiert. Das Ewing-Sarkom (ES) ist der zweithäufigste Knochentumor in Kindern und jungen Erwachsenen und ist charakterisiert durch das Fusionsonkoprotein EWSR1-FLI1. SOX11 ist ein neuronaler Transkriptionsfaktor, der vor allem während der frühen Embryogenese jedoch im adulten Gewebe weitestgehend nicht mehr exprimiert wird. In verschiedenen Tumorentitäten wird SOX11 überexprimiert und übt je nach Tumorentität eine tumorsuppressive oder onkogene Funktion aus.

Die immunhistochemische Analyse in MPNST zeigte in 61,5 % (8/13) der Fälle eine nukleäre Expression von SOX11. Der Knockout von *SOX11* in der SOX11-positiven MPNST-Zelllinie S462 führte zu einer verminderten Zellmigration und Kolonienbildung sowie zu einer erhöhten Apoptoserate. Mittels RNA-Sequenzierung konnte ich zahlreiche potenzielle SOX11-Zielgene und *KDR*, *CD24*, *NKX2-2* und *SYK* durch ChIP-qPCR als direkte SOX11-Zielgene identifizieren. Ebenfalls zeigte sich in der RNA-Sequenzierung, dass Prozesse mit Bezug zur Angiogenese nach *SOX11*-Knockout runterreguliert waren. In einem VEGF-Phospho-Array zeigte sich nach *SOX11*-Knockout in den S462-Zellen eine vorhergesagte Inhibition des VEGF-Signalweges. In den S462-Zellen führte die Expression von SOX11 zu einer leicht erhöhten Sensitivität gegenüber den antiangiogenetischen Multikinase-Inhibitoren Sunitinib und Pazopanib.

In ES konnte ich immunhistochemisch in 81 % (62/77) der Fälle eine nukleäre Expression von SOX11 detektieren. In einem Genexpressionsdatensatz von 196 ES-Patienten korrelierten hohe *SOX11*-Expressionslevel mit einem schlechteren Überleben. Der Knockout von *SOX11* in der SOX11-exprimierenden ES-Zelllinie POE führte zu einer Verminderung der Viabilität, der Proliferation und der Kolonienbildung. Ebenfalls zeigten die POE-Zellen nach *SOX11*-Knockout eine verminderte Fähigkeit zur Zelladhäsion. In der RNA-Sequenzierung konnte ich zahlreiche potenzielle SOX11-Zielgene detektieren, die in Prozesse der Zelladhäsion involviert sind. Hierbei fand ich unter anderen das Zelladhäsionsmolekül-Gen *CD24* nach *SOX11*-Knockout in den POE-Zellen stark runterreguliert.

Zusammenfassend sind meine Ergebnisse starke Hinweise auf eine onkogene Funktion von SOX11 in MPNSTs und ES. Meine Daten zeigen, dass SOX11 überwiegend Sarkomtyp-spezifische und nur wenige überlappende Zielgene und folglich unterschiedliche biologische Prozesse beeinflusst. Ferner konnte ich zeigen, dass SOX11 in MPNSTs als potenzieller Biomarker einer MKI-Therapie und in ES als prognostischer Marker in Betracht kommt. Zur Verifizierung bieten sich Untersuchungen weiterer unabhängiger Patientenkollektive und *in vivo*-Modelle an.

1. Einleitung

1.1 Weichgewebe- und Knochensarkome

Der Begriff Sarkom stammt von den altgriechischen Wörtern *sárx* „Fleisch“ und *-om* „Geschwulst“ ab. Sarkome sind seltene maligne Neoplasien, die aus Zellen des Weichgewebes oder des Knochens entstehen. Sarkome können zwar in jedem Alter auftreten, bei den Weichgewebesarkomen steigt die Inzidenz jedoch mit der Zunahme des Alters an (Fletcher et al., 2002). Knochensarkome zeigen hingegen eine bimodale Altersverteilung mit einem ersten Peak in der Altersgruppe der 10- bis 20-Jährigen und einem zweiten Anstieg in der Altersgruppe der über 60-Jährigen.

Weichgewebesarkome (WGS) sind hoch aggressive, histologisch und genetisch heterogene maligne Tumoren mesenchymalen Ursprungs. Als Weichgewebe definiert sind nicht-epitheliales extraskellettales Gewebe, wie Fett-, Muskel-, Nerven- und fibröses Strukturgewebe (Clark et al., 2005). Weichgewebesarkome können an fast jeder anatomischen Lokalisation auftreten. Am häufigsten lokalisieren sie je nach Sarkomtyp an den Extremitäten, dem Thorax, dem Abdomen und dem Retroperitoneum (Schoffski et al., 2014). Die klinische Symptomatik eines WGS ist in der Regel eine indolente Schwellung. Die Tumorgöße bei der Erstdiagnose ist dabei abhängig von der Region des Auftretens (Clark et al., 2005). Tumoren in den distalen Gliedmaßen oder der Kopfregion sind bei der Erstdiagnose üblicherweise kleiner, da sie früher erkannt werden, während Tumoren an den unteren Extremitäten und im Retroperitoneum sehr groß werden können bis sie entdeckt werden. Die Wachstumsraten der WGS unterscheiden sich je nach Aggressivität des Tumors. *Low-grade* Tumore können sich über einen langen Zeitraum entwickeln und mit benignen Weichgewebetumoren, insbesondere Lipomen, verwechselt werden.

Knochensarkome können an allen Stellen des Skeletts auftreten. Die klinische Symptomatik von Knochensarkomen sind hauptsächlich Schmerzen, Schwellung und mechanische Störungen an der betroffenen Stelle (Rosenberg, 2017). Seltene Symptome sind spontane Frakturen, Fieber und Gewichtsverlust (Fletcher et al., 2002).

WGS sind seltene Tumoren, die etwa 1 % aller malignen Tumoren im Erwachsenenalter und etwa 7 % aller pädiatrischen Malignomen ausmachen (Fletcher et al., 2002). In der aktuellen Studie „Krebs in Deutschland für 2015/2016“ des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts (RKI) und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland betrug die altersstandardisierte Erkrankungsrate für WGS bei Frauen 3,2 und bei Männer 4,1 Fällen pro 100.000 Personen für das Jahr 2016 (*Krebs in Deutschland für 2015/2016*, 2019). Das mittlere Erkrankungsalter lag dabei bei 68 (Frauen) bzw. 67 (Männer) Jahren. Die altersstandardisierte Mortalitätsrate betrug bei Frauen 1,2 und bei Männer 1,4 Fälle pro 100.000 Personen. Als relative 5-Jahres-Überlebensrate gibt die Studie 54 % (Frauen) bzw. 60 % (Männer) an.

Knochensarkome machen etwa 0,2 % aller malignen Tumoren aus und sind damit sehr selten (Howlader et al., 2021). Am häufigsten kommen Osteosarkome (35 %), Chondrosarkome (26 %) und Ewing-Sarkome (16 %) vor (Dorfman & Czerniak, 1995). Chondrosarkome treten dabei häufiger in der Altersgruppe ab 50 Jahren auf, während Osteosarkome und Ewing-Sarkome vor allem bei Kindern und Jugendlichen auftreten. Allgemein sind Männer öfters von Knochensarkomen betroffen als Frauen (Verhältnis Männer zu Frauen: 1:0,7) (Rosenberg, 2017).

In der aktuellen Ausgabe der *World Health Organization* (WHO) werden mehr als 100 Subtypen von Weichgewebe- und Knochensarkomen klassifiziert (*WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft tissue and bone tumours.*, 2020). Speziell in Sarkomen erfolgt die Klassifizierung immer häufiger basierend auf molekulargenetischen Eigenschaften, wie beispielsweise Amplifikationen der Fusionen (Farid & Ngeow, 2016). Weiterhin unterscheiden sich die verschiedenen Subtypen in ihrem Methylierungsmuster (Koelsche et al., 2021; Renner et al., 2013). Aus klinischer Sicht unterscheiden sich diese Subtypen in ihrem Krankheitsbild, dem Ansprechen auf derzeit verfügbare Therapien und dem Risiko der Tumorprogression (Zhu et al., 2019).

1.1.1 Genese von Weichgewebe- und Knochensarkomen

Die meisten Sarkome treten sporadisch auf und sind idiopathisch. Die Ätiologie der meisten Sarkome ist somit nicht bekannt, aber es wurden einige assoziierte oder prädisponierende Risikofaktoren ermittelt (Zahm & Fraumeni, 1997). Virale Infektionen, die mit der Entstehung von Sarkomen korrelieren, wurden für HIV (Burningham et al., 2012), Herpes Zoster, Windpocken und Mumps beschrieben (Franceschi & Serraino, 1992). Ein weiterer bekannter Risikofaktor stellt die Strahlenbelastung, insbesondere bei der therapeutischen Radiatio von Non-Hodgkin Lymphomen, Zervix- oder Mammakarzinomen, dar (Lagrange et al., 2000). Umweltgifte (Edwards et al., 2021), Hormone und chronische Reparaturmechanismen können ebenfalls das Entstehen von Sarkomen begünstigen (Froehner & Wirth, 2001). Ebenfalls stellen Vorläuferläsionen Risikofaktoren für die Genese von Sarkomen dar.

Weiterhin sind einige genetische Erkrankungen bekannt, die mit dem Auftreten von Sarkomen assoziiert sind. Dazu zählen das Li-Fraumeni Syndrom (Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen *TP53* (Tumorprotein p53)), das Retinoblastom (Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen *RB1*, (Retinoblastoma 1)), die Neurofibromatose-1 (Keimbahnmutation im Tumorsuppressorgen *NF1* (Neurofibromin 1)) und die familiäre adenomatöse Polyposis (Keimbahnmutation in Tumorsuppressorgen *APC* (adenomatöse Polyposis Coli)) (Hui, 2016). Das Bloom-Syndrom (Keimbahnmutation im Gen *BLM*, (*BLM RecQ Like Helicase*)), das Werner-Syndrom (Keimbahnmutation

im Gen *WRN* (*WRN RecQ Like Helicase*) und das Rothmund-Thomson-Syndrom (Keimbahnmutation im Gen *RECQ4* (*RecQ Like Helicase 4*)) gelten als Risikofaktor für Osteosarkome (Hui, 2016). Es sind jedoch keine erblichen Tumorsyndrome bekannt, die mit der Entstehung von Ewing-Sarkomen assoziiert sind (Randall et al., 2010).

Auf molekularer Ebene lassen sich Sarkome an Hand ihrer genetischen Veränderungen in zwei Gruppen einteilen: Sarkome mit spezifischen genetischen Veränderungen und Sarkome mit einem komplexen Karyotyp (Teicher, 2012).

Sarkome mit spezifischen genetischen Veränderungen können wiederum unterteilt werden in solche mit Translokationen, Amplifikationen und solche mit spezifischen Mutationen oder Deletionen (Guillou & Aurias, 2010). Etwa 20 % davon sind Translokations-assoziierte Sarkome. Die Mehrheit der reziproken Translokationen führt zur Bildung eines onkogenen Fusionstranskripts. Hierzu zählen beispielsweise *FUS-DDIT3* in myxoiden Liposarkomen, *SS18-SSX* in synovialen Sarkomen und *EWSR1-FLI1* in Ewing-Sarkomen (Jain et al., 2010). Ein klassisches Beispiel für Sarkome mit Amplifikationen stellen gut- und dedifferenzierte Liposarkome (WDLS und DDLS) dar. Sie zeigen eine rekurrente Amplifikation der chromosomalen Region 12q13-15, in der neben anderen Onkogenen die Onkogene *MDM2*, *CDK4* und *HMGA2* lokalisiert sind (Meis-Kindblom et al., 2001).

Die Hälfte aller WGS bilden Sarkome mit einem komplexen und unbalancierten Karyotyp (Guillou & Aurias, 2010). Durch genomische Instabilität führt dieser zu multiplen genetischen Aberrationen innerhalb eines Tumors und zu einer Heterogenität von Aberrationen zwischen Tumoren (Taylor et al., 2011). Ebenfalls kommt Chromothripsis häufig in Sarkomen, insbesondere in Liposarkomen, vor (Cortes-Ciriano et al., 2020).

Im Gegensatz zu Translokations-assoziierten Sarkomen können einige karyotypisch-komplexe Sarkome aus einer weniger aggressiven Form entstehen und während der Progression an genomischer Komplexität zunehmen. Die meisten *high-grade* Sarkome mit komplexem Karyotyp treten jedoch *de novo* ohne vorangegangene *low-grade* Läsionen auf. Zur Gruppe der Sarkome mit einem komplexen Karyotyp gehören beispielsweise Leiomyosarkome, Myxofibrosarkome, undifferenzierte pleomorphe Sarkome, pleomorphe Liposarkome, Angiosarkome und maligne periphere Nervenscheidentumoren.

1.1.2 Maligne periphere Nervenscheidentumoren

Maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNSTs) machen etwa 2 % aller WGS aus und treten hauptsächlich bei Erwachsenen mittleren Alters auf (Farid et al., 2014). Die 5-Jahresüberlebensrate von Patienten mit MPNST betrug in einer Studie von Yan et al. 55,9 % für Patienten ohne Metastasen und 7,3 % bei Vorliegen von Metastasen (Yan et al., 2019).

Die Ursprungszelle von MPNSTs ist bis heute unklar, es wird jedoch vermutet, dass es sich um periphere Nerven oder von mit Nervenscheiden assoziierten Zellen, wie Schwann-Zellen, Fibroblasten und Perineural-Zellen, handeln könnte (Farid et al., 2014; Thway & Fisher, 2014). MPNSTs treten am häufigsten in den Extremitäten, im Rumpf sowie im Kopf-/Hals-Bereich auf. Die meisten entstehen in den Hauptnervenstämmen, insbesondere im Ischiasnerv. Morphologisch zeichnen sich MPNSTs meist durch spindelförmige Zellen und häufig auftretender Nekrose aus (Belakhova & Rodriguez, 2021).

MPNSTs gehören zur Gruppe von Sarkomen mit komplexem Karyotyp (Mechtersheimer et al., 1999). Die Hälfte der MPNST-Fälle sind mit Neurofibromatose Typ 1 (NF1) assoziiert, die durch Mutationen oder Verlust des Tumorsuppressorgens *NF1* charakterisiert ist (Longo et al., 2018). Etwa 40 % entstehen sporadisch und ungefähr 10 % der MPNST-Fälle sind strahlenassoziiert (Farid et al., 2014). Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt für Patienten mit NF1-assoziierten MPNSTs zwischen 34 – 60 % und ist damit ungünstiger als für sporadisch auftretende MPNSTs (Longo et al., 2018). Der Verlust des Genprodukts von *NF1*, Neurofibromin, führt zur Aktivierung von Ras und dadurch zu einer verstärkten Aktivierung des MAP-Kinase- und des PI3K-Signalweges (Martin et al., 2020). NF1-assoziierte MPNSTs entstehen häufig aus benignen Vorläufer-Läsionen, wie plexiforme Neurofibrome (PN) (Prudner et al., 2020). Dabei ist für die Entstehung von MPNSTs der Verlust von NF1 alleine nicht ausreichend und es müssen zusätzliche Mutationen von Treibergenen hinzukommen (Longo et al., 2018). Hierbei wurden Mutationen in *TP53*, *EGFR* und *SUZ12* als essentiell für die Pathogenese von MPNSTs beschrieben (Prudner et al., 2020). Mutationen und Kopienzahlvariationen in *NF1*, *CDKN2A/B*, *SUZ12*, *EED* und/oder *TP53* werden jedoch auch bei den meisten MPNSTs unabhängig von der NF1-Diagnose gefunden (Pemov et al., 2020).

Die Diagnose von MPNSTs gestaltet sich durch das Fehlen von spezifischen immunhistochemischen Biomarkern als schwierig. Immunhistochemisch zeigen MPNSTs eine fokale Positivität von SOX10 und S100 (Kang et al., 2014). Speziell bei *high-grade* MPNSTs kann im Vergleich zu *low-grade* MPNSTs ein Verlust des Trimethylierungsmarkers H3K27me3 beobachtet werden (Schaefer et al., 2016).

1.1.2.1 Therapie von MPNSTs

Die Therapie von lokalisierten MPNSTs umfasst eine vollständige chirurgische Resektion, die gegebenenfalls mit perioperativer Radiatio und adjuvanter Chemotherapie kombiniert werden kann (Sobczuk et al., 2020). Die Wahrscheinlichkeit, ein lokales Rezidiv zu entwickeln ist sehr hoch. Bei etwa 40 – 70 % der Patienten treten Fernmetastasen auf, die vorwiegend in der Lunge und Leber sowie im Knochen lokalisiert sind (Farid et al., 2014; Sobczuk et al., 2020).

Die derzeitige Erstlinientherapie für Patienten mit nicht-resezierbarem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem MPNST ist eine Anthrazyklin-basierte Chemotherapie (Hassan et al., 2021). Eine Kombinationstherapie mit Doxorubicin und Ifosfamid oder Dacarbazin oder eine Monotherapie mit Doxorubicin stehen hierbei zur Auswahl. Die Kombination von Doxorubicin und Ifosfamid verbessert das progressionsfreie Überleben und die Ansprechrate, hat jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten und erhöht die Toxizität im Vergleich zur Monotherapie mit Doxorubicin (Judson et al., 2014). Als Zweitlinientherapie kommen Gemcitabin und Docetaxel oder Dacarbazin zur Anwendung.

Neben den konventionellen zytotoxischen Chemotherapeutika ist die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien von großem Interesse und aktuell Gegenstand mehrerer klinischer Studien. Diese Therapien sind spezifisch gegen Zielstrukturen auf oder in den Tumorzellen gerichtet und können dadurch weniger Nebenwirkungen haben (Martin et al., 2019). Ein Beispiel stellt Pazopanib dar, ein anti-angiogenetischer Multikinaseinhibitor (MKI) mit VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, PDGFR, FGFR, c-fms und c-KIT im Wirkspektrum (Harris et al., 2008). In der randomisierten, Placebo-kontrollierten Phase III Studie PALETTE zu Pazopanib in Patienten mit WGS war das progressionsfreie Überleben unter Pazopanib 4,6 Monate gegenüber Placebo mit 1,6 Monate (van der Graaf et al., 2012). Die Ergebnisse der Studie führten in Europa zur Zulassung von Pazopanib in Patienten mit fortgeschrittenen WGS nach Progress unter Chemotherapie. In einer Phase II Studie mit acht MPNST-Patienten von Nishida et al. betrug das progressionsfreie Überleben 5,4 Monate und das Gesamtüberleben 10,6 Monate nach Therapie mit Pazopanib (Nishida et al., 2021). Die aktuelle S3-Leitlinie zu adulten Weichgewebesarkome empfiehlt als Zweitlinientherapie Pazopanib für alle WGS außer beim Liposarkom (*Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Adulte Weichgewebesarkome, 2021*).

1.1.3 Ewing-Sarkome

Das Ewing-Sarkom (ES) ist der zweithäufigste Knochentumor in Kindern und jungen Erwachsenen. ES sind seltene, hochmaligne Tumoren des Knochens und Weichgewebes (Fletcher et al., 2002), wobei etwa 15 % aller ES-Fälle Weichgewebesarkome sind (Redini & Heymann, 2015). Laut des Deutschen Kinderkrebsregisters (DKKR) beträgt in Deutschland die Inzidenzrate für ES in Kindern unter 15 Jahren 5,5 pro eine Million (Erdmann et al., 2020). Das mittlere Erkrankungsalter bei Erstdiagnose liegt in Deutschland bei 13 Jahren. Ewing-Sarkome metastasieren häufig und etwa 25 % der ES-Fälle weisen Metastasen bei der Erstdiagnose auf (Marchetto et al., 2020). Hierbei sind meistens Lunge, Knochen und Knochenmark betroffen (Strauss et al., 2021).

Ewing-Sarkome entstehen in der Regel in der Diaphyse oder dem metaphysär-diaphysären Abschnitt der langen Knochen. Häufig sind ebenfalls das Becken und die Rippen betroffen (Fletcher et al., 2002). Patienten zeigen in vielen Fällen an der betroffenen Stelle klinische Symptome wie Schwellung und Schmerzen (Fletcher et al., 2002). Die Ursprungszelle für ES ist bisher nicht bekannt. In Studien wurden mesenchymale Stammzellen (Miyagawa et al., 2008; Riggi et al., 2005), Stammzellen der Neuralleiste (von Levetzow et al., 2011) sowie embryonale osteochondrotische Vorläuferzellen (Tanaka et al., 2014) als Ursprungszelle vorgeschlagen.

Ewing-Sarkome gehören zur Familie der klein-blau-rundzelligen Tumoren und sind histomorphologisch durch kleine runde Zellen mit einer erhöhten Kern-zu-Plasma-Relation charakterisiert (Durer & Shaikh, 2021). Ewing-Sarkome werden immer als *high-Grade* Sarkome klassifiziert (Fletcher et al., 2002). Das Oberflächenglykoprotein CD99 ist ein sehr relevanter diagnostischer Marker und wird in etwa 95 % aller ES-Fälle membranär exprimiert (Grunewald et al., 2018). *NKX2-2* wurde als ein Zielgen des EWSR1-FLI1 Onkoproteins beschrieben (Smith et al., 2006) und zeigt in der immunhistochemischen Färbung eine hohe Sensitivität für Ewing-Sarkome (Yoshida et al., 2012).

ES gehören zu der Gruppe von Sarkomen mit einem simplen Karyotyp. Etwa 85 % aller ES zeigen eine somatische reziproke chromosomale Translokation $t(11;22)(q24;q12)$ (Turc-Carel et al., 1988). Diese Translokation führt zur Fusionierung von *EWSR1* (*Ewing sarcoma breakpoint region 1*) mit *FLI1* (*Friend Leukemia Insertion*) und zur Generierung des EWSR1-FLI1 Onkoproteins. Neben EWSR1-FLI1 wurden weitere Fusionsvarianten zwischen Mitgliedern der ETS-Transkriptionsfaktorfamilie und Mitgliedern der TET-Familie identifiziert (Sankar & Lessnick, 2011). In 10 % der ES-Fälle findet sich die Translokation $t(21;22)(q22;q12)$, die für das EWSR1-ERG Onkoprotein kodiert (Zucman et al., 1993). Der Nachweis der Translokation stellt das wichtigste Kriterium für die Diagnose von ES dar.

EWSR1-FLI1 hat die Funktion eines aberranten Transkriptionsfaktors, der für den onkogenen Phänotyp von ES verantwortlich ist (Smith et al., 2006). Das Fusionsprotein allein fördert allerdings nicht die Entstehung des Tumors (Sand et al., 2015). Zusätzliche sekundäre genetische Veränderungen sind für die Tumorigenese notwendig. Diese genetischen Veränderungen mit hoher Prävalenz umfassen beispielsweise Mutationen in *STAG2* (15 – 22 %) und *TP53* (6 – 7 %) sowie Deletionen von *CDKN2A* (12 – 14 %) (Brohl et al., 2014; Crompton et al., 2014; Tirode et al., 2014). Genomische Sequenzanalysen ergaben jedoch eine geringe Mutationsrate für ES im Vergleich zu anderen adulten und pädiatrischen Krebserkrankungen (Brohl et al., 2014; Tirode et al., 2014), was einen Mangel an therapeutischen Zielstrukturen darstellt.

1.1.3.1 Therapie von ES

Ewing-Sarkome sollten in der Regel eine neoadjuvante Chemotherapie erhalten, um den Tumor für eine bessere Resektion zu verkleinern und um potentielle Mikrometastasen zu behandeln (Thaler & Khosravi, 2020). Das derzeitige Behandlungsschema für ES sieht daher eine neoadjuvante Chemotherapie, gefolgt von chirurgischer Resektion, Radiatio und adjuvanter Chemotherapie vor. Als Erstlinientherapie für lokalisierte und metastasierte ES wird ein Chemotherapie-Protokoll bestehend aus Vincristin (V), Doxorubicin (D), Cyclophosphamid (C)/Ifosfamid (I) und Etoposid (E) (= VDC/IE) oder das EWING 2008 Protokoll mit Vincristin, Ifosfamid, Doxorubicin und Etoposid (= VIDE) angewendet (Strauss et al., 2021). Patienten mit Metastasen bei Erstdiagnose erhalten die gleiche Behandlung wie Patienten mit lokalisiertem ES, haben jedoch eine schlechtere Prognose. Demnach liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach multimodalem Therapieschema bestehend aus Chemotherapie, chirurgischer Resektion und Radiatio bei lokalisierten Tumoren bei 70 % und bei metastasierenden Tumoren bei 20 – 40 % (Potratz et al., 2012).

Nach Beendigung der multimodalen Therapie entwickeln dennoch über 25 % der Patienten mit lokalisiertem Tumor und 50 – 80 % der Patienten mit metastasiertem Tumor ein Rezidiv (Van Mater & Wagner, 2019). Die Prognose bei einem Rezidiv ist ungünstig und stark abhängig von der Zeit zwischen Erstdiagnose und Rezidiv. Patienten mit einem Intervall von > 2 Jahren haben eine 5-Jahres-Überlebensrate von etwa 30 % und Patienten mit einem Intervall von < 2 Jahren von 7 % (Stahl et al., 2011). Die Behandlungsmöglichkeiten nach der multimodalen Therapie sind jedoch limitiert.

Weiterhin stehen die Identifikation und die Wirkungsweise neuer Biomarker und Therapeutika für eine zielgerichtete Therapie im Fokus der Forschung und vieler klinischer Studien. Es werden beispielsweise Studien mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, die gegen IGF-1R (Ganitumumab) oder PGF gerichtet sind (Van Mater & Wagner, 2019). Signalwege, die mit Rezeptortyrosinkinase-Inhibitoren gehemmt werden können, stellen ebenfalls eine Option einer zielgerichteten Therapie dar. Für Cabozantinib, ein Inhibitor von VEGFR2 und MET, konnte in der klinischen Studie CABONE eine antitumorale Aktivität mit einer Ansprechrates von 26 % nach 6 Monaten bei fortgeschrittenen ES beobachtet werden (Italiano et al., 2020). Andere klinische Studien untersuchen die Wirksamkeit von PARP-, LSD-1- und Immuncheckpoint-Inhibitoren (Van Mater & Wagner, 2019). Ein weiterer möglicher Therapieansatz beschäftigt sich mit der Inhibition des für ES charakteristischen EWS-FLI1 Onkoproteins. Aufgrund der Aktivität als Transkriptionsfaktor und der intranukleären Lokalisation erweist sich dieser Ansatz jedoch als schwierig (Marchetto et al., 2020).

1.2 SOX-Familie von Transkriptionsfaktoren

SOX-Proteine (*SRY-related HMG-box-Proteine*) bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die sich durch eine hochkonservierte HMG- (*high-mobility-group-*) Domäne auszeichnen (Lefebvre, 2019). Die HMG-Domäne ist eine aus 79 Aminosäuren bestehende DNA-Bindedomäne (Bowles et al., 2000). Sie bindet die DNA Sequenz-spezifisch in der kleinen Furche, biegt die DNA und dient der Interaktion mit weiteren Transkriptionsfaktoren (Lefebvre et al., 2007).

SRY (*sex-determining region Y*) wurde als erstes Mitglied der *SOX* Genfamilie entdeckt (Kumar & Mistri, 2020). Derzeit sind 20 verschiedene *SOX*-Gene im Säugetiergenom bekannt (Schepers et al., 2002). Basierend auf der Ähnlichkeit der HMG-Domäne lassen sich die 20 *SOX*-Mitglieder in acht Subgruppen (A bis H) einteilen (Abbildung 1). Die *SOX*-Proteine einer Gruppe sind innerhalb und außerhalb der HMG-Box zu einem hohen Grad identisch (70 – 95 %) (Lefebvre et al., 2007). Dies zeigt sich durch ähnliche biochemische Eigenschaften und folglich ähnlichen Funktionen von *SOX*-Proteinen der gleichen Gruppe (Wegner, 2010).

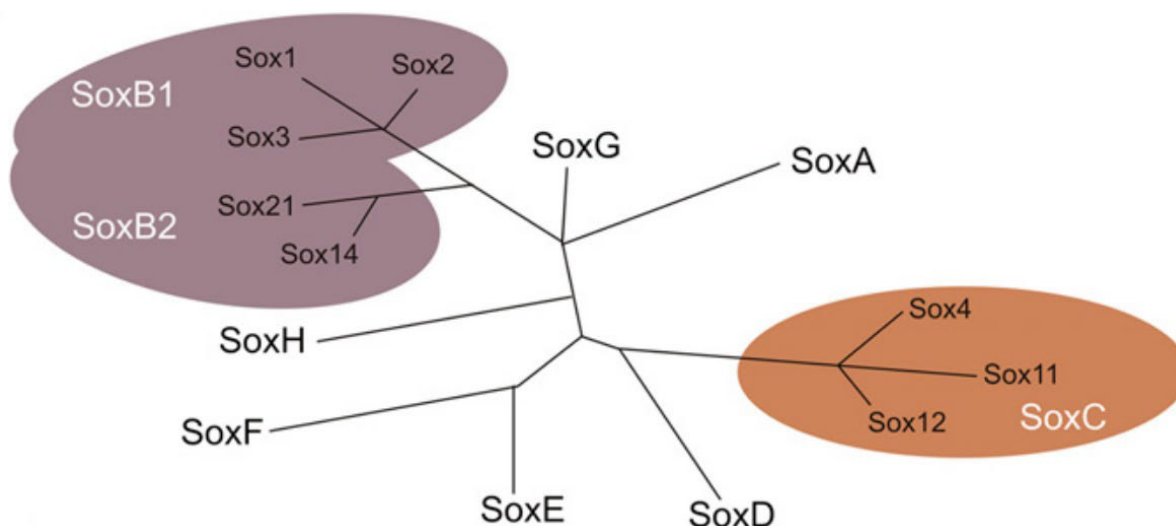


Abbildung 1: Phylogenetische Beziehung der Sox-Proteine. Der phylogenetische Baum zeigt die acht Subgruppen der Sox-Proteine (A-H). Die Mitglieder sind nur für die Subgruppen SoxB1, SoxB2 und SoxC aufgelistet (Wegner, 2011).

Zusätzlich zur HMG-Domäne besitzen die *SOX*-Proteine, mit Ausnahme von *SRY*, weitere funktionelle Domänen, die innerhalb der Mitglieder einer *SOX*-Subgruppe hochkonserviert sind (Kamachi & Kondoh, 2013; Lefebvre, 2019). Dabei besitzen die meisten Proteine eine Transaktivierungs- oder eine Transrepressionsdomäne und üben dadurch die typische Funktion eines Transkriptionsfaktors aus (Lefebvre et al., 2007). Proteine der *SOX*-Gruppe B2 besitzen eine Transrepressionsdomäne und Proteine der *SOX*-Gruppe D eine zusätzliche *Coiled-coil*-Domäne (Abbildung 2) (Kamachi & Kondoh, 2013; Schock & LaBonne, 2020). Die Mitglieder der *SOX*-Gruppe E haben eine Dimerisierungs-Domäne upstream der HMG-Domäne sowie eine mittlere und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne.

Weiter besitzen Proteine der SOX-Gruppen B1, C, F und G jeweils zusätzlich eine C-terminale Transaktivierungsdomäne.

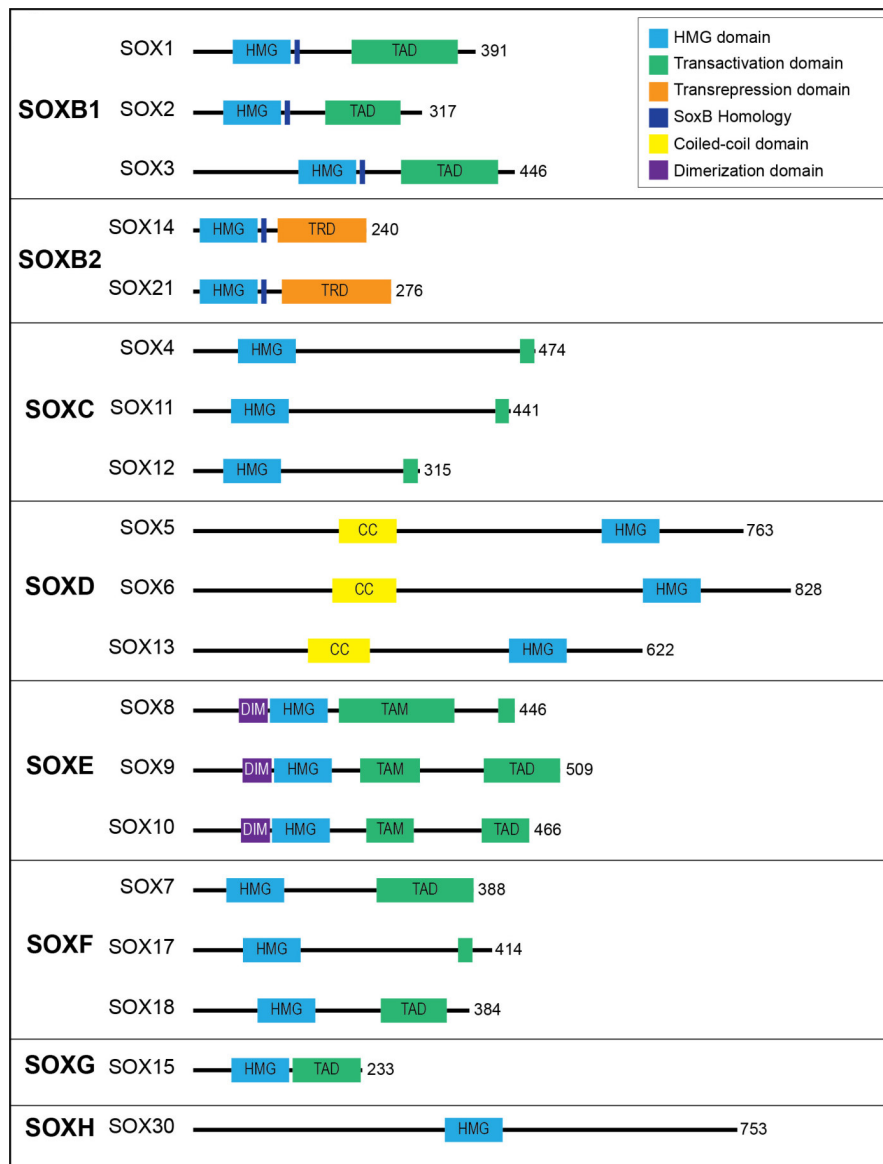


Abbildung 2: Struktur der SOX-Proteine. Diagramm der humanen SOX-Proteine sortiert nach Subgruppen mit ihren funktionellen Domänen. Die funktionellen Gruppen sind durch farbliche Boxen gekennzeichnet: *High-mobility group* (HMG)-Domäne (hellblau), Transaktivierungsdomäne (TAD, grün), Transrepressionsdomäne (TRD, orange), SoxB Homologie-Domäne (dunkelblau), *Coiled-coil* (CC)-Domäne (gelb) und Dimerisierungs (DIM)-Domäne (lila) (Schock & LaBonne, 2020).

Generell spielen SOX-Proteine viele wichtige Rollen bei der Regulierung von Entwicklungsprozessen, wie Förderung der Progression und Regulierung des Stammzellstatus (Kamachi & Kondoh, 2013; Schock & LaBonne, 2020). So sind sie beispielsweise an der Entwicklung des zentralen Nervensystems, der Retina und des kardiovaskulären Systems sowie an der Differenzierung von Chondrozyten beteiligt (Grimm et al., 2019).

1.2.1 SOX11 (SRY (sex-determining region Y)-box 11)

Das humane SOX11 Protein gehört mit SOX4 und SOX12 zur SOX-Gruppe C, besteht aus 441 Aminosäuren und besitzt N-Terminal eine HMG-DNA-Bindedomäne sowie C-Terminal eine Transaktivierungsdomäne (Abbildung 2) (Penzo-Mendez, 2010; Schock & LaBonne, 2020). Es wird von einem intronlosen Gen auf Chromosom 2p25.2 kodiert (Lefebvre et al., 2007).

SOX11 wird vor allem während der frühen Embryogenese exprimiert. Hohe Expressionslevel finden sich im zentralen Nervensystem, in den Lungen, im Pankreas, im Gastrointestinaltrakt, in den Nieren und in der Milz von humanen Föten (Pamnani et al., 2014; Sock et al., 2004; Yang et al., 2019). SOX11 wird zudem in mehreren Zelltypen des peripheren Nervensystems exprimiert, darunter Schädelganglien, sympathische Ganglien und Spinalganglien (Schock & LaBonne, 2020). Ebenso zeigen neurale und mesenchymale Vorläuferzellen hohe SOX11-Level (Hargrave et al., 1997). Während der Embryonalentwicklung reduziert sich die SOX11-Expression schon früh bei fortschreitender Entwicklung, was auf eine wichtige Rolle von SOX11 in der frühen Differenzierung hindeutet (Kuhlbrodt et al., 1998). Interessanterweise wird SOX11 im adulten Gewebe hingegen weitestgehend nicht mehr exprimiert (Weigle et al., 2005). Eine Expression von *Sox4* und *Sox11* konnte jedoch in unreifen Neuronen im Gehirn adulter Mäuse nachgewiesen werden (Haslinger et al., 2009; Mu et al., 2012). Als Mechanismen für die Regulation der SOX11-Expression und Aktivität wurden epigenetische Veränderungen, wie DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen, posttranslationale Modifikationen, microRNA (miRNA)-Interferenz und Signalwege, wie der WNT- und Notch-Signalweg, beschrieben (Yang et al., 2019).

SOX11 ist in die embryonale Neuro- und Organogenese (Penzo-Mendez, 2010; Wegner, 2010), in die Regeneration von Schäden des peripheren Nervensystems (Patodia & Raivich, 2012) und in den Gewebeumbau (Sock et al., 2004) involviert. In Mäusen führte der Knockdown von *Sox11* im verletzten *Nervus saphenus* zur Inhibition der Nervenregenerierung (Jankowski et al., 2009). *Sox11*-defiziente Mäuse sterben bei der Geburt aufgrund von Entwicklungsstörungen des Herzens an kongenitaler Zyanose und entwickeln multiple Organdefekte (Sock et al., 2004). Die Expression von SOX11 ist wichtig für die Differenzierung von Retinavorläuferzellen (Usui et al., 2013). Bei der Augenentwicklung limitiert *Sox11* die Level des Hedgehog-Signalweges (Pillai-Kastoori et al., 2014). *Sox11*-defiziente Mausföten zeigen eine verzögerte Ossifikation (Sock et al., 2004).

Bei SOX11 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von Zielgenen durch direkte Promotor-Bindung oder über Interaktion mit anderen Faktoren reguliert. Die ersten beschriebenen Zielgene von SOX11 waren *TUBB3* (*class-III β -tubulin*) in neuronalen Zellen (Bergsland et al., 2006) und der Transkriptionsfaktor *TEAD2* (*TEA domain family member 2*) in neuronalen und mesenchymalen Vorläuferzellen (Bhattaram et al., 2010). Wang et al. identifizierten die Gene *DBN1* (*drebin 1*), *SETMAR*

(*SET domain and mariner transposase fusion gene*) und *HIG2* (*hypoxia-inducible protein 2*) als direkte Zielgene von SOX11 in primären Mantelzelllymphomen (MCL) und in MCL-Zelllinien (Wang et al., 2010). *CD24* (*cluster of differentiation 24*) stellt ein weiteres potenzielles Zielgen von SOX11 in MCL dar. *CD24* ist nach Inhibition von *SOX11* in MCL-Zellen runterreguliert (Kuci et al., 2016) und SOX11-positive MCL zeigen eine stärkere Expression von *CD24* im Vergleich zu SOX11-negativen MCL (Vegliante et al., 2013).

1.2.1.1 SOX11 in der Tumorigenese

Wie bereits beschrieben ist die Expression von SOX11 in humanen Geweben auf das fetale Gehirn beschränkt (Weigle et al., 2005). Mehrere Studien haben die Expression von SOX11 in verschiedenen Tumorentitäten untersucht. So zeigte sich eine aberrante Expression von SOX11 in Mantelzelllymphomen (MCL), in malignen Gliomen sowie in Ovarial-, Mamma-, Prostata- und Magenkarzinomen (Brennan et al., 2009; Penzo-Mendez, 2010; Qu et al., 2014; Weigle et al., 2005; Zvelebil et al., 2013).

In frühen Arbeiten wurde die Expression von SOX11 in Mantelzelllymphomen untersucht. Es zeigte sich, dass SOX11 in etwa 90 % der Mantelzelllymphome überexprimiert wird (Mozos et al., 2009). Da auch in Cyclin-D1-negativen MCL eine SOX11-Expression detektiert werden konnte (Dictor et al., 2009; Mozos et al., 2009), dient der Nachweis von SOX11 mittlerweile als diagnostischer Marker (Mozos et al., 2009). In späteren Arbeiten wurde die funktionelle Rolle von SOX11 in MCL untersucht. Die hohe Expression von SOX11 in MCL trägt durch Blockade der terminalen B-Zell-Differenzierung zur Tumorentstehung bei (Vegliante et al., 2013). Dabei führte der Knockdown von *SOX11* in MCL-Zelllinien zu einer Anreicherung eines Genexpressions-Profiles, das mit der Plasmadifferenzierung assoziiert ist. In zwei Studien wurden die Transkriptionsfaktoren *PAX5* und *BCL6* als direkte Zielgene von SOX11 in MCL identifiziert (Palomero et al., 2016; Vegliante et al., 2013). Weitere SOX11-Zielgene in MCL konnten mittels Chromatin-Immunpräzipitations-Sequenzierung (ChIP-Seq) ermittelt werden (Kuo et al., 2015). Hierbei zeigte sich, dass SOX11 zahlreiche Gene reguliert, die im WNT-, PKA- und TGF-beta-Signalweg involviert sind. In MCL-Zelllinien führt eine starke Expression von SOX11 zu einer Repression der WNT/ β -Catenin-Aktivität. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass SOX11 die Angiogenese durch transkriptionelle Regulation von *PDGFA* in MCL fördert (Palomero et al., 2014). Aufgrund der Erkenntnisse aus funktionellen Untersuchungen kann SOX11 als ein bedeutender onkogener Schlüsselfaktor in MCL angesehen werden (Beekman et al., 2018).

Im Prostatakarzinom ist SOX11 runterreguliert und wurde als Tumorsuppressor beschrieben. So inhibierte SOX11 nach Überexpression die Proliferation, Migration und Invasion *in vitro* (Yao et al.,

2015). Eine weitere Studie zeigte, dass der SOX11-Promotor im Prostatakarzinom im Vergleich zur benignen Prostatahyperplasie häufiger hypermethyliert ist und die Promoter-Hypermethylierung mit ungünstigen klinisch-pathologischen Eigenschaften (erhöhter PSA-Level, erhöhter Gleason-Score, perineurale Invasion) korreliert (Pugongchai et al., 2017).

In einer Studie von Weigle et al. zeigte sich eine starke Überexpression von SOX11 in einer Kohorte mit malignen Gliomen (Weigle et al., 2005). In humanen Glioma-initiiierenden Zellen (GIC), die keine Expression von SOX11 mehr zeigten, konnte die Tumorentstehung durch Überexpression von SOX11 verhindert werden (Hide et al., 2009). SOX11 wurde daher als potentieller Tumorsuppressor in malignen Gliomen vorgeschlagen.

Die Studie von Zvelebil et al. zeigte, dass eine hohe SOX11-Expression in Brustkrebs mit einer schlechteren Prognose korreliert (Zvelebil et al., 2013). Die Progression vom Östrogenrezeptor-negativem duktalem Carcinoma *in situ* (DCIS) zum invasiven Brustkrebs wird durch SOX11 gefördert (Oliemuller et al., 2017). Zudem ist eine hohe SOX11-Expression mit der Entstehung von Fernmetastasen in Patienten mit Mammakarzinom und DCIS assoziiert (Oliemuller et al., 2017; Oliemuller et al., 2020).

Zusammenfassend scheint SOX11 je nach Tumorentität eine onkogene oder tumorsuppressive Rolle zu spielen. SOX11 trägt in MCL zur Tumorentstehung bei (Mozos et al., 2009), während tumorsuppressive Eigenschaften von SOX11 in Ovarial-, Prostata- und Magenkarzinomen beschrieben wurden (Brennan et al., 2009; Qu et al., 2014; Yao et al., 2015).

In einer kürzlich durchgeführten Studie von Seok et al. wurde mittels der *Oncomine*-Datenbank die mRNA-Expression von *SOX11* in humanen Krebserkrankungen im Vergleich zu Normalgewebe untersucht. Hierbei wurde eine höhere Expression von *SOX11* in Brust-, Gehirn-, Lunge-, Leber- und Nierenkrebs sowie auch in Sarkomen festgestellt (Seok et al., 2021). Die Expression von SOX11 in 16 Sarkomsubtypen wurde im Rahmen einer immunhistochemischen Studie von Xu et al. untersucht. Hierbei zeigten Rhabdomyosarkome, myxoide Liposarkome (MLS) und Ewing-Sarkome eine hohe nukleäre SOX11-Expression (Xu et al., 2018). In einem unabhängigen Kollektiv wurde in MLS im Vergleich zu nicht-neoplastischen Fettgewebe eine hohe Expression von SOX11 beobachtet. Ergebnisse aus der funktionellen Charakterisierung von SOX11 in MLS ergaben starke Hinweise auf eine tumorsuppressive Rolle. Darüber hinaus konnten SOX11-Zielgene in MLS identifiziert werden (Neubert, 2016).

2. Ziele

Die bisherigen Ergebnisse zur funktionellen Bedeutung von SOX11 im Mantelzelllymphom und in verschiedenen Karzinomentitäten deuten darauf hin, dass SOX11 je nach Tumorentität eine tumorsuppressive oder onkogene Eigenschaft ausübt. Da es sich bei SOX11 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der in der embryonalen Entwicklung eine bedeutende Rolle spielt, ist davon auszugehen, dass SOX11 je nach Tumorentität an der Spitze eines onkogenen oder tumorsuppressiven Netzwerkes steht und somit entscheidende Effektorgene und Signalwege beeinflusst. Die in mehreren Sarkomsubtypen beschriebenen hohen Expressionslevel von SOX11 deuten auf eine funktionelle Bedeutung von SOX11 in Sarkomen hin. So sind die Ergebnisse zur funktionellen Bedeutung von SOX11 in MLS starke Hinweise darauf, dass SOX11 in dieser Sarkomentität ein Tumorsuppressor darstellt, der mit seiner Eigenschaft als Transkriptionsfaktor Effektorfaktoren in seiner Expression beeinflusst, die teilweise auch im Mantelzelllymphom identifiziert wurden.

Hohe Expressionslevel von SOX11 wurden neben MLS auch in MPNSTs und in Ewing-Sarkomen beschrieben (Xu et al., 2018). Welche Rolle SOX11 in diesen beiden Sarkomentitäten spielt und welchen Einfluss SOX11 hier auf das transkriptionelle Netzwerk ausübt ist noch völlig unbekannt. Das übergeordnete Ziel meines Projektes umfasste daher die beiden folgenden Ziele:

1. Die funktionelle Charakterisierung von SOX11 in MPNSTs und ES nach stabilem CRISPR-vermitteltem Knockout von *SOX11 in vitro*.
2. Die Darstellung des durch SOX11 regulierten transkriptionellen Netzwerkes tumorrelevanter Gene und Signalwege in MPNSTs und ES.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind im entsprechenden Methodenabschnitt 3.2.1 aufgeführt.

3.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.1.2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller
Agilent Scanner G2505C	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG (Waldbronn, Deutschland)
Axiovert 40C Mikroskop	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
BioWizard Silver line Biosafety cabinet	Kojair® Tech Oy (Tampere, Finnland)
Color Sprout Plus Mini-Zentrifuge	Biozyme Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Consort EV231 power supply	Consort (Turnhout, Belgien)
Discovery Comfort Pipetten	Corning HTL SA (Warszawa, Polen)
FLUOStar Omega Microplaterereader	BMG LABTECH GmbH (Ortenberg, Deutschland)
Gelkammer	Febikon Labortechnik GmbH (Wermelskirchen, Deutschland)
Heracell VIOS 250i CO2 Incubator	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
LI-COR D-DiGit Gel Scanner	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
LI-COR Odyssey CLx Imager	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Live Cell Imaging System	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Megafuge 1.ORS	Heraeus Instruments (Thermo Fisher Scientific GmbH) (Dreieich, Deutschland)
Mixing Block MB-102	Bioer Technology (Binjiang, China)
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Pipettierhelfer	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
PowerPac 200	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
QuantStudio™ 3 System	Applied Biosystems (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
REAX 2000 Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Rollschüttler RM5-30V	BioCat GmbH (Heidelberg, Deutschland)
SW22 Schüttelwasserbad	Julabo GmbH (Seelbach, Deutschland)
T1 Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)
Tischzentrifuge Z 252 MK	Hermle AG (Gosheim, Deutschland)
VacuSafe comfort Pumpe	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH (Biebertal, Deutschland)
Wasserbad GFL 1002	Gesellschaft für Labortec™ (Lauda-Königshofen, Deutschland)

3.1.2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Bestellnummer	Hersteller
25 Culture-Inserts 2 well for self-insertion	80209	Ibidi GmbH (Gräfelfing, Deutschland)

Applied Biosystems MicroAmp Fast 96-well Reaction Plate (0,1 ml)	4346907	Applied Biosystems (Life Technologies GmbH, Frankfurt, Deutschland)
Atemschutzmaske ecoComfort	245	ecoComfort (DACH Schutzbekleidung GmbH & Co. KG, Rastatt, Deutschland)
BD 3 ml Syringe Luer-Lok Tip	309658	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Corning Costar 10 ml Stripette	4488	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Corning Costar 25 ml Stripette	4489	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Corning Costar 5 ml Stripette	4487	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
CryoPure Gefäß, 1,6 ml weiß	72.380	Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, Deutschland)
DeckWorks pipet tips low binding barrier tip, sterile 10 µl / 20 µl / 100 µl / 200 µl / 1000 µl	800.492.1110	Corning GmbH (Kaiserslautern, Deutschland)
Dermatril P nitrile gloves (S)	1083843	Rala GmbH & Co. KG (Ludwigshafen am Rhein, Deutschland=)
Distritips Mini ST 1250 µl	F164140	Gilson Germany (Limburg-Offheim, Deutschland)
FP 30/0.2 CA-S Filter Unit (0.2 µm)	10462200	Cytiva (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland)
Greiner Cellstar 96 well plates (white)	M0187-32EA	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Hämazytometer-Deckgläser, 20x26 mm	C-1005	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
neoCulture Multitestplatten 12-Well, PS, steril,	C-8209	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
neoCulture Zellkulturschalen 100mm, PS, steril,	C-8213	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Pasteur Capillary Pipetts		WU Mainz (Bamberg, Deutschland)
PCR Reaktionsgefäß 0,2 ml	683271	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Safe-Lock Tubes 0,5 ml / 1,5 ml / 2,0 ml	0030120.086	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Sleeve Protectors, PP/PE	113-8255	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Snapcap PP Tube 14 ml Sterile	187261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterile Syringe Filter	514-0063	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Tissue Culture Plate 6 Well, Flat Bottom with Lid	353046	Falcon (Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland)
TPP Zellschaber	TPP99002	TPP Techno Plastic Products GmbH (Trasadingen, Schweiz)
Transfermembran Nitrocellulose Protran, 0,45 µm, 300 mm x 4 m	19259794	Cytiva (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland)
Tubes, 15 ml, PP, brown, graduated, conical bottom	188283	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)
Whatman Blotting Papier 460x570 mm 3MM	3030-917	Cytiva (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland)
Zählkammer nach Neubauer, doppelt, CE	C-1003	neoLab (Heidelberg, Deutschland)

3.1.3 Kommerzielle Kits, biologische Reagenzien und Plasmide

3.1.3.1 Kommerzielle Kits

Tabelle 3: Verwendete kommerzielle Kits.

Kit	Bestellnummer	Hersteller
Amersham Cell Proliferation Biotrak Version 2 ELISA System	GERPN250	GE Healthcare GmbH (Solingen, Deutschland)
Caspase-Glo® 3/7 Assay System	G8090	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	G8081	Promega GmbH (Walldorf, Deutschland)
CytoSelect 48-Well Cell Adhesion Array (ECM Array), Fluorometric	CBA-071-CB	BioCat GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Eukaryote total RNA nano assay		Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG (Waldbronn, Deutschland)
Full Moon Biosystems Antibody Array Assay Kit	KAS02-FM	Full Moon Biosystems Inc (Sunnyvale, CA USA)
High Pure PCR Product Purification Kit	11 732 676 001	Roche (Mannheim, Deutschland)
Pierce BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
Qiagen Gentra Puregene Cell Kit	158767	Qiagen N. V. (Hilden, Deutschland)
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	K1631	Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland)
RIPA Lysis Buffer System	SC24948	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
SimpleChIP Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)	9003S	Cell Signaling Technology (Frankfurt am Main, Deutschland)
VEGF Pathway Phospho Antibody Array	PVE185-FM	Full Moon Biosystems Inc (Sunnyvale, CA USA)
Zyppy Plasmid Kit Miniprep	D4036	Zymo Research (Freiburg, Deutschland)

3.1.3.2 Biologische Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete biologische Reagenzien

Reagenzien	Bestellnummer	Hersteller
<i>BsmBI</i>	R0580S	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
DMEM high glucose (no sodium pyruvate)	41965062	Gibco (Life Technologies GmbH, Frankfurt, Deutschland)
DPBS no Ca ²⁺ /Mg ²⁺	14190250	Gibco (Life Technologies GmbH, Frankfurt, Deutschland)
FCS	F7524-500 ml (Charge: 19B123)	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Fisher BioReagents EZ-Run vorgefärbte Rec Protein-Leiter	BP3603-500	Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)
Gateway LR Clonase II Enzyme Mix	11791020	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland)
MEM Medium	31095052	Gibco (Life Technologies GmbH, Frankfurt, Deutschland)

Oligos, sgRNAs	<i>custom design</i>	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	31985047	Gibco (Life Technologies GmbH, Frankfurt, Deutschland)
primaQUANT CYBR qPCR-Mastermix	SL-9912-20ml	Steinbrenner Laborsysteme GmbH (Wiesenbach, Deutschland)
RPMI 1640 Medium	21875091	Gibco (Life Technologies GmbH, Frankfurt, Deutschland)
Shrimp Alkaline Phosphatase	M0371S	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
T4 DNA Ligase	M0202S	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
T4 Polynucleotide Kinase	M0201S	New England Biolabs GmbH (Frankfurt, Deutschland)
Trypsin-EDTA (0,05%), phenol-red	25300054	Gibco (Life Technologies GmbH, Frankfurt, Deutschland)
Trypsin-EDTA (0,25%), phenol-red	25200056	Gibco (Life Technologies GmbH, Frankfurt, Deutschland)
Versene Solution	15040033	Gibco (Life Technologies GmbH, Frankfurt, Deutschland)
Wasser, DNase, RNase-free	821739	MP Biomedicals (Eschwege, Deutschland)

3.1.3.3 Plasmide

Tabelle 5: Verwendete Plasmide.

Plasmide	Bestellnummer	Hersteller	Referenz
LentiCas9-Blast	52962	Addgene, Watertown, MA USA	https://www.addgene.org/52962/ (Sanjana et al., 2014)
PAX2	35002	Addgene, Watertown, MA USA	https://www.addgene.org/35002/ (Pfisterer et al., 2011)
pLKO-U6sgRNA_improved-E1Fs-GFP-P2A-Puromycin			Plasmidkarte siehe Anhang
VSV-G	14888	Addgene, Watertown, MA USA	https://www.addgene.org/14888/ (Reya et al., 2003)

3.1.4 Antikörper

Die Antikörper für den Western Blot und die immunhistochemischen Färbungen sind im jeweiligen Methodenabschnitt 3.2.6.3 und 3.2.7 aufgelistet.

3.1.5 Chemikalien, Puffer und Lösungen

3.1.5.1 Chemikalien

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Bestellnummer	Hersteller
2-Mercaptoethanol	4227.3	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Acrylamid/Bis-Lösung, 29:1, 30 %	10687.01	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Agarose		Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Albumin, Rind, Fraktion V, Protease-frei (BSA)	11926.03	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Ampicillin		
Bacto Agar		BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)
Blasticidin S Hydrochloride	sc-204655A	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Calciumchlorid Dihydrat	HN04.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Carbenicillin Dinatriumsalz	6344.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Cabozantinib malate (XL184)	SEL-S4001-10MG	Selleck Chemicals GmbH (Houston, TX USA)
Cy3-Streptavidin	GEPA43001	Cytiva (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid für die Zellkultur BC (DMSO)	A3672,0100	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Formaldehyd Solution ACS reagent, 37%	252549-500ml	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Gel Red Nucleic Acid Gel Stain (10.000x in Water)	41003	Biotium Inc. (Hayward, CA USA)
Kristallviolett p. a.	T123.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
LB-Medium (Lennox)	X964.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Methanol Rotipuran	4627.1	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Milchpulver	T145.2	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Mitomycin C 0,5 mg		Apothek Universitätsklinikum Heidelberg
Pazopanib	SEL-S3012-25MG	Selleck Chemicals GmbH (Houston, TX USA)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml)	A2213	Merck Chemicals GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Polybrene	sc-134220	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Polyethylenimine, linear M. W 25.000	sc-360988	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Puromycin dihydrochloride	sc-108071	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
Schwefelsäure, 250 ml, Glas, Rotipuran 96%	4623.3	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)
Staurosporine	S5921-.1mg	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Sunitinib malate	SEL-S1042-10MG	Selleck Chemicals GmbH (Houston, TX USA)
TEMED	35930.01	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)
Tween20	P1379	Sigma-Aldrich (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

3.1.5.2 Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben wurden die verwendeten Puffer und Lösungen mit MilliQ-Wasser angesetzt. Kommerziell erworbene Puffer und Lösungen sind im jeweiligen Methodenabschnitt aufgeführt.

Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Komponenten
10X Laufpuffer	30 g Tris, 144 g Glycin, 10 g SDS auf 1 L H ₂ O
1,5 M Tris/HCl, pH = 8,8	181,71 g Tris auf 1 L H ₂ O
1 M Tris/HCl, pH = 6,8	60,57 g Tris auf 500 ml H ₂ O
10X TBS, pH = 7,6	24,2 g Tris, 80 g NaCl
1X TBST	100 ml 10X TBS, 900 ml H ₂ O, 1 ml Tween-20
1X Laufpuffer	100 ml 1X Laufpuffer, 900 ml H ₂ O
10X Transferpuffer	30 g Tris, 145 g Glycin, 3,75 g SDS auf 1 L H ₂ O
1X Transferpuffer	100 ml 1X Transferpuffer, 200 ml Methanol, 700 ml H ₂ O
APS 10%	10 g APS auf 100 ml H ₂ O
4X Lämmli-puffer	15,5 ml H ₂ O, 12 ml 1M Tris (pH = 6,8), 4 g SDS, 20 mg Bromphenolblau, 20 ml Glycerin, 2,5 ml β-Mercaptoethanol
10 % SDS	10 g SDS auf 100 ml H ₂ O
Einfriermedium	70 % Standardmedium, 20 % FCS, 10 % DMSO
LB-Medium	750 ml H ₂ O, 15 g LB-Medium
LB-Medium mit Ampicillin	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
LB-Agar mit Carbenicillin	250 ml H ₂ O, 5 g LB-Medium, 3,75 g Bacto-Agar, 100 µg/ml Carbenicillin

3.1.6 Datenbanken und Software

Tabelle 8: Verwendete Datenbanken und Software.

Datenbank/Software	Version	Herausgeber/Referenz
Adobe Photoshop Version 13.0	6.2	Adobe (München, Deutschland)
CHOPCHOP	3	https://chopchop.cbu.uib.no/ , (Labun et al., 2019)
CorelDRAW X5	15.2.0.686	Corel Corporation (Ottawa, Kanada)
DAVID bioinformatics resources	6.8	https://david.ncifcrf.gov/ , (Huang da et al., 2009)
DNASTAR Lasergene	15.2.0.130	DNASTAR (Madison, WI USA)
Fiji	1.53c	(Schindelin et al., 2012)
GraphPad Prism	9.0.2	GraphPad Software (San Diego, CA USA)
Geneious Prime		Biomatters (Auckland, Neuseeland)
Image Studio Lite	5.2	LI-COR Biosciences GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
ImageJ	1.53a	(Abràmoff et al., 2004)
Inkscape	0.91	Inkscape
JASPAR	2020	https://jaspar.genereg.net/ , (Fornes et al., 2020)
QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis	70750971	Qiagen N. V. (Hilden, Deutschland)
QuantStudio™ Design & Analysis Software	01.05.2001	Applied Biosystems (Life Technologies GmbH) (Frankfurt, Deutschland)
QuPath	0.2.3	(Bankhead et al., 2017)

RStudio	1.4.1103	RStudio PBC (Boston, MA USA)
Venn Diagram		https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/

3.1.7 Oligonukleotide für die Klonierung, qPCR, ChIP-qPCR und Sanger-Sequenzierung

Eine Auflistung aller Primer und sgRNAs mit Angabe der Sequenz findet sich im jeweiligen Methodenabschnitt 3.2.2.2.1 (sgRNAs), 3.2.2.2.2 (Klonierung), 3.2.2.4 (Sanger-Sequenzierung), 3.2.4.3 (qPCR) und 3.2.8.1 (ChIP-qPCR).

3.2. Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien habe ich in Standardzellkulturplatten in entsprechendem Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %rH unter sterilen Bedingungen kultiviert (Tabelle 9). Die adhärennten Zellen wurden bei Subkonfluenz (70 – 90 %) mit 1X *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline* (DPBS) ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und mit 0,05 % oder 0,25 % Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) inkubiert. Nach dem Ablösen der Zellen wurde die Trypsinierung durch Zugabe des entsprechenden Kulturmediums gestoppt. 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.

Tabelle 9: Eigenschaften der Zelllinien und Kultivierungsbedingungen.

Die Tabelle zeigt die verwendeten Zelllinien, den Sarkomtyp aus dem sie ursprünglich generiert worden sind, charakteristische genetische Aberrationen, das verwendete Kulturmedium und ggf. ein ergänzendes *Coating* mit Gelatine in H₂O. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, RPMI-1640 = *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*, FCS = *fetal calf serum*, P/S = Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml.

Zelllinie	Typ	Genetische Eigenschaft	Kulturmedium	Coating	Referenz/Quelle
S462	MPNST	NF1 ^{-/-}	DMEM + 10 % FCS, 1 % P/S		(Frahm et al., 2004)
S462 ^{Cas9}	MPNST	NF1 ^{-/-}	DMEM + 10 % FCS, 1 % P/S		
S462 ^{SOX11-KO}	MPNST	NF1 ^{-/-}	DMEM + 10 % FCS, 1 % P/S		
S462 ^{NTC}	MPNST	NF1 ^{-/-}	DMEM + 10 % FCS, 1 % P/S		
STS26T	MPNST	NF1-Wildtyp	DMEM + 10 % FCS, 1 % P/S		(Huynh & Pulst, 1996)
1507.2	MPNST	NF1 ^{-/-}	DMEM + 10 % FCS, 1 % P/S		(Reuss et al., 2013)
S18441	MPNST	NF1 ^{-/-}	DMEM + 10 % FCS, 1 % P/S		(Rad et al., 2015)
POE	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	0,1 % Gelatine	Delattre O.; Institut Curie; Paris; France.
POE ^{Cas9}	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	0,1 % Gelatine	
POE ^{SOX11-KO}	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	0,1 % Gelatine	
POE ^{NTC}	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	0,1 % Gelatine	
RD-ES	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	0,1 % Gelatine	(Sano et al., 1990)

SK-ES-1	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	Bloom ET, Sloan Kettering Institute, Memorial Sloan Kettering
MHH-ES1	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	(Pietsch et al., 1989)
A673	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	(Giard et al., 1973), (Martinez- Ramirez et al., 2003)
TC-71	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	(Whang-Peng et al., 1986)
RH1	ES	EWSR1-FLI1	DMEM + 10 % FCS, 1 % P/S	St. Jude Children's Research Hospital, (Smith et al., 2008)
CHLA-57	ES	EWSR1-FLI1	RPMI-1640 + 10 % FCS, 1 % P/S	
HEK 293T	Niere		DMEM + 10 % FCS, 1 % P/S	(DuBridg e et al., 1987)

3.2.2 Generierung stabiler Zelllinien mit *SOX11*-Knockout mittels dem CRISPR/Cas9-System

Das CRISPR/Cas9-System verwendet eine *single-guide*-RNA (sgRNA), die aus einer 20-nt-Leitsequenz besteht, um die Cas9-Nuklease auf eine gewünschte DNA-Sequenz zu richten. Das Einbringen von Cas9 und sgRNA in die Zielzellen erfolgte in zwei separaten Schritten unter Verwendung von Lentiviren. In einem ersten Schritt wurde Cas9 mittels lentiviraler Transduktion in die Zielzellen gebracht. In einem zweiten Schritt wurden die Zelllinien mit stabiler Expression von Cas9 mit Lentiviren, die eine gegen *SOX11* gerichtete sgRNA oder eine Kontroll-sgRNA enthalten, transduziert und anschließend selektiert.

3.2.2.1 Generierung stabiler Zelllinien mit Cas9 Expression

3.2.2.1.1 Herstellung von Lentiviren mit Cas9

Zur Herstellung von Lentiviren habe ich HEK 293T-Zellen mit $1,5 \times 10^6$ Zellen/Well in 6-Well-Zellkulturplatten in entsprechendem Standardmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion (Tabelle 10) der HEK 293T-Zellen mittels PEI (Polyethylenimine). Hierzu wurde ein Transfektionsansatz bestehend aus LentiCas9-Vektor-Plasmid-DNA und den beiden Plasmiden PAX2 (*packaging plasmid*) und VSV-G (*envelope plasmid*) in Medium ohne Zusätze hergestellt und 150 μ l auf die subkonfluenten Zellen gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgewechselt. 48 h nach der Transfektion habe ich den Virusüberstand entnommen und steril filtriert.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die lentivirale Transfektion von HEK293T-Zellen.

Die Tabelle zeigt den Reaktionsansatz für die lentivirale Transfektion von HEK 293T-Zellen in einem 6-Well. PAX2 = *paired box 2*, VSV-G = *vesicular stomatitis virus G glycoprotein*, PEI = Polyethylenimine.

Reagenzien	Reaktionsansatz für ein 6-Well
Medium ohne Zusätze	150 µl
PAX2 DNA	1,2 µg
VSV-G DNA	0,375 µg
Plasmid DNA	1,5 µg
PEI (1 µg/µl)	9 µl

3.2.2.1.2 Lentivirale Transduktion von Cas9

S462-Zellen wurden mit 1×10^5 Zellen/Well und POE-Zellen mit 8×10^5 Zellen/Well in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transduktion der 30 – 40 % konfluenten Zellen mit 2 ml Virusüberstand (Cas9, siehe Abschnitt 3.2.2.1.1) unter Zugabe von 8 µg/ml Polybrene. Nach 48 bis 72 h habe ich den Virusüberstand vorsichtig abgenommen, die Zellen mit 1X DPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, trypsinisiert und je zwei 6-Well auf eine 10 cm Standardzellkulturschale in Selektionsmedium gepoolt. Für die Antibiotikaselektion habe ich schließlich alle Zelllinien mit 1,0 µg/ml Blastocidin in entsprechendem Standardkulturmedium über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Als Kontrolle dienten untransduzierte Zelllinien. Nach der Antibiotikum-Selektion habe ich die Expression von Cas9 mittels Western Blotting (siehe Abschnitt 3.2.6.3) überprüft. Die S462^{Cas9}- oder POE^{Cas9}-Zellen wurden nachfolgend als Parental-Zelllinien für die Generierung der Zelllinien mit stabilem *SOX11*-Knockout verwendet.

3.2.2.2 Generierung stabiler Zelllinien mit *SOX11*-Knockout

3.2.2.2.1 sgRNA Design

Es wurden drei verschiedene *single guide* RNAs (sgRNA), die gegen das humane *SOX11* gerichtet sind (*SOX11* sgRNA1, 2 und 3), sowie eine *non-targeting* sgRNA als Negativkontrolle (*non-targeting control*, NTC), mit einer Sequenzlänge von 20 Nukleotiden erstellt. Die *SOX11* sgRNAs habe ich mittels des *web tools CHOPCHOP Version 3.0* entworfen (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) (Labun et al., 2019). Die Auswahl der Sequenzen erfolgte anhand des Rankings, des GC-Gehaltes (55 – 75 %) und der Anzahl der *Off-Targets* (Tabelle 11). Die Sequenz für die sgRNA NTC wurde der *Addgene Brunello Library* entnommen (Doench et al., 2016). Zusätzlich habe ich an die sgRNAs Klonierungsüberhänge mit einer Länge von 4 Nukleotiden angefügt (Tabelle 12).

Tabelle 11: sgRNA Sequenzen.

Die Tabelle gibt die Sequenzen, das Ranking, den prozentualen GC-Gehalt und die Anzahl der *Off-Targets* der sgRNAs an. NTC = *non-targeting control*, grau = PAM (*protospacer adjacent motif*)-Sequenz.

sgRNA Bezeichnung	Sequenz	Ranking	GC [%]	Off- Targets	Referenz
SOX11 sgRNA1	GCGAGAAGATCCC GTTCATCCGG	5	55	0	CHOPCHOP
SOX11 sgRNA2	CGGCGTCGGGCCACATCAAGCGG	14	70	1	CHOPCHOP
SOX11 sgRNA3	CGCGGGCGACGACTACGTGCTGG	7	75	0	CHOPCHOP
sgRNA NTC	GTAGGCGCGCCGCTCTCTAC		70		Addgene

Tabelle 12: sgRNA Oligonukleotide.

Die Tabelle zeigt die Sequenzen der sgRNA Oligonukleotide inklusive der Klonierungsüberhänge. Ein zusätzliches Guanin (G) wurde an sgRNA Sequenzen, die nicht mit einem G beginnen, angefügt. Kursiv/unterstrichen = Klonierungsüberhänge.

Oligo Bezeichnung sgRNAs	Sequenz
SOX11 sgRNA1 Plus	5' <u>CACCGCGAGAAGATCCC GTTCATC</u> 3'
SOX11 sgRNA1 Minus	5' <u>AAACGATGAACGGGATCTTCTCGC</u> 3'
SOX11 sgRNA2 Plus	5' <u>CACCGCGGCGTCGGGCCACATCAAG</u> 3'
SOX11 sgRNA2 Minus	5' <u>AAACCTTGATGTGGCCCGACGCCGC</u> 3'
SOX11 sgRNA3 Plus	5' <u>CACCGCGCGGGCGACGACTACGTGC</u> 3'
SOX11 sgRNA3 Minus	5' <u>AAACGCACGTAGTCGTCGCCCGCGC</u> 3'
sgRNA NTC Plus	5' <u>CACCGTAGGCGCGCCGCTCTCTAC</u> 3'
sgRNA NTC Minus	5' <u>AAACGTAGAGAGCGGCGGCCTAC</u> 3'

3.2.2.2 Klonierung der sgRNA in den pLKO-Vektor

Ich habe 3 µg isolierte Plasmid-DNA des Vektors pLKO-U6sgRNA mit dem Restriktionsenzym *BsmBI* verdaut (Tabelle 13), dephosphoryliert und anschließend mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) aufgereinigt und die DNA-Konzentration mit einem UV-Vis-Spektrophotometer (NanoDrop) vermessen. Nach Phosphorylierung und Annealing der sgRNA-Oligonukleotid-Paare (Tabelle 14) folgte die Ligation der sgRNA-Oligonukleotide in den mit *BsmBI* verdauten Vektor im Verhältnis 5:1 (Insert:Vektor-Ratio). Für die anschließende Transformation habe ich 2 µl Ligations-Reaktionsmix zu kompetenten Bakterien (NEB stable C3040) gegeben, auf Eis inkubiert und nach dem Hitzeschock auf LB-Agarplatten mit 100 µg/ml Carbenicillin über Nacht bei 37 °C inkubiert und auf Bakterienkolonien mit integriertem Plasmid selektiert. Anschließend wurden Bakterienkolonien gepickt und Übernachtkulturen in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angesetzt. Die Plasmid-DNA habe ich mit dem *Zymo Research Zyppy Plasmid Kit Miniprep* isoliert. Eine erfolgreiche Klonierung der sgRNA in den Vektor wurde mittels Sanger-Sequenzierung und einem gegen U6 gerichteten Primer überprüft.

Tabelle 13: Vektorverdau mit *BsmBI*.

Reagenzien	Volumen	Finale Konzentration
pLKO-U6sgRNA Vektor DNA		3 µg
<i>BsmBI</i> (NEB) (10.000 U/ml)	1 µl	10 U
10X NEB Buffer 3.1	5 µl	1X
ddH ₂ O	Ad 50 µl	
total	50 µl	

Tabelle 14: Annealing der sgRNA Oligonukleotide.

Reagenzien	Volumen	Finale Konzentration
Oligo 1 (100 µM)	1 µl	10 µM
Oligo 2 (100 µM)	1 µl	10 µM
10X T4 Ligation Buffer (NEB) (enthält ATP)	1 µl	1X
T4 PNK (NEB M0201S) (10000 U/ml)	0,5 µl	5 U
ddH ₂ O	6,5 µl	
total	10 µl	

Tabelle 15: Annealing Programm.

Temperatur	Zeit
37 °C	30 min
95 °C	5 min, anschließend die Proben im <i>Cycler</i> auf 25 °C (RT) abkühlen lassen

Tabelle 16: Ligationsansatz.

Reagenzien	Volumen	Finale Konzentration
<i>BsmBI</i> verdauter pLKO-Vektor		50 ng
Annealed Oligos = Insert (1:250 in ddH ₂ O verdünnt)	x µl nach Insert:Vektor Ratio 5:1	
10X T4 Ligase Buffer	1 µl	1X
T4 Ligase (400 U/µl)	1 µl	400 U
ddH ₂ O	Ad 10 µl	
total	10 µl	

3.2.2.3 Herstellung von Lentiviren mit SOX11 sgRNAs

HEK 293T-Zellen wurden mit $1,5 \times 10^6$ Zellen/Well in 6-Well-Zellkulturplatten in entsprechendem Standardmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transfektion der HEK 293T-Zellen mittels PEI

(Polyethylenimine) entsprechend Tabelle 10 (siehe Abschnitt 3.2.2.1.1). Hierzu stellte ich in drei Reaktionsansätzen bestehend aus pLKO-U6sgRNA-(mit *SOX11* sgRNA1, 2 bzw. 3) oder pLKO-U6sgRNA NTC-Plasmid-DNA und den beiden Plasmiden PAX2 (*packaging plasmid*) und VSV-G (*envelope plasmid*) in Medium ohne Zusätze her und gab 150 µl Transfektionsansatz auf die 90 – 100 % konfluenten Zellen. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgewechselt. 48 h nach der Transfektion habe ich den Virusüberstand entnommen und steril filtriert.

3.2.2.4 Lentivirale Transduktion von sgRNA

S462^{Cas9}-Zellen wurden mit 2×10^5 Zellen/Well und POE^{Cas9}-Zellen mit 8×10^5 Zellen/Well in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Transduktion der 30 – 40 % konfluenten Zellen mit 1 ml Virusüberstand (*SOX11* sgRNA oder sgRNA NTC) unter Zugabe von 8 µg/ml Polybrene. Nach 48 bis 72 h habe ich den Virusüberstand vorsichtig abgenommen, die Zellen mit 1X DPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen, trypsiniert und je zwei 6-Well auf eine 10 cm Standardzellkulturschale in Selektionsmedium gepoolt. Die transduzierten S462^{Cas9}-Zellen habe ich mit 0,3 µg/ml und die POE^{Cas9}-Zellen mit 0,2 µg/ml Puromycin in entsprechendem Standardkulturmedium für 14 Tage kultiviert. Als Kontrolle dienten die untransduzierten Cas9-exprimierenden Zelllinien.

3.2.2.3 Einzelklon-Isolierung

Nach der Selektion mit Puromycin habe ich von den mit *SOX11* sgRNA1, 2 und 3 transduzierten Zellen jeweils 500 bzw. 1000 Zellen pro 10 cm Standardzellkulturschale in konditioniertem Medium ausgesät. Nach 14 Tagen wurden einzeln gewachsene Zellkolonien gepickt und expandiert. Anschließend isolierte ich von den Kolonien Protein und überprüfte die Expression von *SOX11* mittels Western Blotting. Von den Zellklonen, die im Western Blot keine Bande für *SOX11* zeigten, wurde genomische DNA mit dem *Qiagen Genra Puregene Cell Kit* nach Herstellerangaben isoliert. Zur abschließenden Verifizierung des *Gene-Editings* erfolgte eine Sanger-Sequenzierung.

3.2.2.4 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung der klonierten sgRNA Inserts und des CRISPR/Cas9-vermittelten *Gene-Editings* der isolierten Einzelklone erfolgte durch die Firma *Microsynth SeqLab* (Göttingen). Die Sequenzierungs-Primer sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Im Anschluss habe ich die Sequenzierungs-Chromatogramme mit der Software *DNAStar LaserGene SeqMan Pro* und *MegAlign Pro* ausgewertet und mit der Sequenz des pLKO-U6sgRNA-Vektors beziehungsweise der Referenzsequenz von *SOX11* (RefSeq: NC_000002.12) verglichen. Zusätzlich habe ich die

Chromatogramme auf die Effizienz des *Gene-Editings* mit der Software *Geneious* ausgewertet. Die isolierten Zellklone mit stabilem Knockout von *SOX11* werden im Folgenden als S462^{SOX11-KO} und POE^{SOX11-KO} bezeichnet. Die mit dem pLKO-U6sgRNA NTC-Vektor stabil transfizierten Zelllinien werden im folgendem S462^{NTC} und POE^{NTC} genannt.

Tabelle 17: Sequenzierungs-Primer.

Bezeichnung Primer	Sequenz 5' -> 3'	Tm [°C]	Produkt	GC-Gehalt
U6 for	ACTATCATATGCTTACCGTAAC			36,3 %
sgRNA Primer				
SOX11 sgRNA1 for	GAGGGCGAATTCATGGCTTG	59,6	609 bp	55 %
SOX11 sgRNA1 rev	GTCCTCATCCAGAAACACGC	58,9		
SOX11 sgRNA2 for	GCCGAGGACTTTGCAACTTG	60,0	837 bp	55 %
SOX11 sgRNA2 rev	GGCTCCTGTTTGATCTGCAG	58,9		
SOX11 sgRNA3 for	GCTGGAAAATGCTGAAGGAC	59,8	845 bp	50 %
SOX11 sgRNA3 rev	CAAGCTCAGGTCGAACATCA	60,0		

3.2.3 Funktionelle Assays

3.2.3.1 Klonogenitäts-Assay

S462^{SOX11-KO}- bzw. S462^{NTC}-Zellen wurden mit jeweils 300 Zellen/Well und POE^{SOX11-KO}- bzw. POE^{NTC}-Zellen mit jeweils 500 Zellen/Well in 6-Well-Standardzellkulturplatten in Triplikaten ausgesät und zwölf bis vierzehn Tage kultiviert. Nach zwei Tagen erfolgte jeweils ein Mediumwechsel. Die entstandenen Zellklone wurden mit 0,5 % (m/v)-Kristallviolett in 25 %-Methanol-Lösung fixiert und gefärbt. Die Wells wurden anschließend mit einer Kamera fotografiert. Die Anzahl der Kolonien habe ich mit der Software *ImageJ* quantifiziert. Die Experimente wurden jeweils als zwei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.2.3.2 Viabilitäts-Assay mit Resazurin (CTB-Reagenz)

S462^{SOX11-KO}- bzw. S462^{NTC}-Zellen wurden mit jeweils 3×10^3 Zellen/Well und POE^{SOX11-KO}- bzw. POE^{NTC}-Zellen mit jeweils 5×10^3 Zellen/Well in 96-Well-Standardzellkulturplatten in sechs Replikaten ausgesät. Nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden pro Well 20 μ L CTB (*CellTiter-Blue*)-Reagenz (Promega) in das Medium hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend habe ich die Fluoreszenzen bei Ex_{560 nm}/Em_{590 nm} mit einem *Microplate Reader* (FLUOStar Omega) gemessen. Zur Erstellung von Zeitverlaufs-Kurven der Zellviabilität stellte ich die jeweiligen Fluoreszenzwerte als *fold-change* relativ zur Fluoreszenz nach 24 h dar. Die Experimente wurden jeweils als drei unabhängige biologische Replikate durchgeführt.

3.2.3.3 BrdU-Proliferations-Assay

S462^{SOX11-KO}- und S462^{NTC}-Zellen bzw. POE^{SOX11-KO}- und POE^{NTC}-Zellen wurden mit jeweils 5×10^3 Zellen/Well in 96-Well-Standardzellkulturplatten in sechs Replikaten ausgesät. 72 h nach Aussaat inkubierte ich die Zellen für 2,5 h mit 1X BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine)-Reagenz in entsprechendem Kulturmedium bei 37 °C. Als Negativkontrolle verwendete ich Zellen ohne Zugabe von BrdU-Reagenz. Im Anschluss habe ich die Zellen gemäß Herstellerprotokoll (*Amersham Cell Proliferation Biotrak ELISA System*) fixiert, geblockt und mit dem BrdU-Antikörper für 90 – 120 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation mit dem kolorimetrischen TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)-Substrat wurde die resultierende Farbreaktion bei 450 nm mit dem *Omega Microplate Reader* detektiert und als *fold-change* dargestellt. Die Experimente wurden jeweils als drei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.2.3.4 Apoptose-Assay

S462^{SOX11-KO}- bzw. S462^{NTC}-Zellen wurden mit jeweils $1,5 \times 10^3$ Zellen/Well und POE^{SOX11-KO}- bzw. POE^{NTC}-Zellen mit jeweils 5×10^3 Zellen/Well in weiße 96-Well-Standardzellkulturplatten in drei Replikaten ausgesät. Als Positivkontrolle habe ich die Zellen mit 10 µM Staurosporine für 6 h vor der Messung jeweils in Triplikaten behandelt. 72 h nach Aussaat inkubierte ich die Zellen mit dem Caspase-Glo 3/7-Reagenz gemäß des *Promega Caspase-Glo® 3/7 Assay System Kit* Herstellerprotokoll für 30 min bei Raumtemperatur. Die Lumineszenz wurde im Anschluss mit dem *Microplate Reader* in 50 Intervallen mit jeweils 0,2 s gemessen und zur Auswertung die Summe aller Intervalle gebildet. Die erhaltenen Werte wurden als *fold-change* dargestellt und die Experimente jeweils als drei unabhängige biologische Replikate wiederholt.

3.2.3.5 Migrationsassay

S462^{SOX11-KO}- und S462^{NTC}-Zellen habe ich auf 3×10^5 Zellen/ml verdünnt. Je 70 µl der entsprechenden Zellsuspensionen wurde in *Ibidi*-Wells (*Ibidi Culture-Insert 2 Wells*) in drei Replikaten ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %rH bis zur Konfluenz inkubiert. Nach 24 h behandelte ich die Zellen für 3 h mit 5 µg/ml Mitomycin C in Kulturmedium ohne FCS und entfernte die *Ibidi*-Einsätze. Danach wurden abgelöste Zellen durch Waschen mit 1X DPBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ entfernt und die Zellen in normalem Kulturmedium über einen Zeitraum von 24 h in einem *Olympus Live Cell Imaging System* bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %rH kultiviert und automatisiert ein Bild pro Stunde aufgenommen. Zur Auswertung wurde die ausgesparte Fläche für jeden Zeitpunkt mit Hilfe der Software *Fiji* und dem *Plugin MRI Wound*

Healing Tool bestimmt und das Verhältnis der eingenommenen Fläche zur Gesamtfläche am Zeitpunkt 0 h berechnet.

3.2.3.6 Adhäsionsassay

Zur Bestimmung der Zelladhäsion verwendete ich den *CytoSelect™ Cell Adhesion Assay ECM Array*. S462^{SOX11-KO-} und S462^{NTC-}-Zellen bzw. POE^{SOX11-KO-} und POE^{NTC-}-Zellen wurden mit 1X DPBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ gewaschen und mit *Gibco® Versene Solution* (0,48 mM EDTA-PBS-Lösung) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %rH inkubiert bis sich die Zellen ablösen. Anschließend habe ich die Zellen 5 min bei 1000 rpm pelletiert, in DMEM- oder RPMI-1640-/ 0,5 % BSA / 2 mM CaCl₂ / 2mM MgCl₂ resuspendiert und die Zellkonzentration der S462^{SOX11-KO-} und S462^{NTC-}-Zellen auf 0,25 x 10⁶ Zellen/ml bzw. der POE^{SOX11-KO-} und POE^{NTC-}-Zellen auf 0,4 x 10⁶ Zellen/ml verdünnt. Im Anschluss wurden in dem ECM-Array pro Well 150 µl der jeweiligen Zellsuspension für 90 min bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %rH inkubiert. Daraufhin habe ich die Zellen gemäß Herstellerprotokoll viermal mit 1X DPBS-/2 mM CaCl₂ / 2mM MgCl₂ gewaschen, mit *CyQuant® GR Dye* markiert und lysiert. Zur Bestimmung der Fluoreszenz bei Ex_{485 nm}/Em_{520 nm} wurden jeweils 150 µl der markierten Zelllysate in weiße 96-Well-Standardzellkulturplatten überführt und im *Microplate Reader* vermessen.

3.2.3.7 Inhibitor-Assays

S462^{SOX11-KO-} und S462^{NTC-}-Zellen wurden mit jeweils 2,5x10³ Zellen/Well in 96-Well-Standardzellkulturplatten in sechs Replikaten ausgesät. 24 h nach Aussaat wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Medium mit 0,3 % FCS gewaschen. Anschließend habe ich die Zellen mit 100 µl einer Verdünnungsserie von 0,5 µM bis 10 µM Sunitinib malate, Cabozantinib malate (XL184) oder 0,5 µM bis 20 µM Pazopanib in Medium mit 0,3 % FCS und 0,1 % DMSO bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %rH inkubiert. Nach 72 h wurde 20 µL CTB-Reagenz hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz bei Ex_{560 nm}/Em_{590 nm} mit dem *Microplate Reader* gemessen. Die jeweiligen Fluoreszenzwerte als Maß für die Zellviabilität habe ich zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven verwendet sowie zur Bestimmung des IC₅₀-Wertes. Die Experimente wurden jeweils als drei unabhängige biologische Replikate durchgeführt.

3.2.4 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

3.2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Subkonfluente Zellen habe ich mit 1X DPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen und die Gesamt-RNA mit dem *NucleoSpin RNA II Kit (Macherey-Nagel)* nach Herstellerangaben isoliert. Im Anschluss wurde die Konzentration der RNA mit einem UV-Vis-Spektrophotometer (NanoDrop) vermessen.

3.2.4.2 Reverse Transkription

Es wurden 100 bis 1000 ng isolierte Gesamt-RNA mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific)* unter Verwendung von Oligo(dT)₁₈ Primer gemäß Herstellerangaben in cDNA transkribiert und anschließend mit H₂O auf 2 ng/μl verdünnt.

Tabelle 18: Thermocycler Programm für die Reverse Transkription.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	70 °C	5 min
2	37 °C	5 min
3	42 °C	60 min
4	70 °C	10 min
5	4 °C	

3.2.4.3 Quantitative *real-time* PCR

Jede quantitative *real-time* PCR (qPCR)-Reaktion wurde in *Applied Biosystems MicroAmp Fast 96-well Reaction Plates* mit genspezifischen Primern (Tabelle 19) als *SYBR Green*-basierte Reaktion angesetzt (Tabelle 20) und mit dem *QuantStudio™ 3 System (Applied Biosystems)* unter Verwendung eines qPCR-Programms mit anschließender Schmelzkurvenanalyse (Tabelle 21) detektiert. Das experimentelle Setup beinhaltete als Kontrollen Reaktionen ohne Template (NTC, *non template control*). Alle Proben wurden als technische Duplikate oder Triplikate gemessen. Die C_T-Werte der jeweiligen Gene wurden nach der $\Delta\Delta\text{C}_T$ -Methode relativ zu den endogenen Kontrollen, *ACTB (Actin Beta)* und *18S (Ribosomal Protein S18)*, sowie relativ zu einer entsprechenden Referenz-Probe ausgewertet.

Tabelle 19: Eigenschaften der qPCR-Primer.

Gen	Bezeichnung Primer	Sequenz 5'→3'	T _m [°C]
18S	18S qPCR for	ACGGCTACCACATCCAAG	56,64
	18S qPCR rev	CCTCCAATGGATCCTCGTTA	56,41
ACTB	ACTB for	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	67,49
	ACTB rev	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	68,91
CASP4	CASP4 for	GAGAAGCAACGTATGGCAGG	58,99
	CASP4 rev	GTCCAGCCTCCATATTCGGA	58,95

<i>CD24</i>	CD24 qPCR for CD24 qPCR rev	GCACTGCTCCTACCCACGCAGATTT GCCTTGGTGGTGGCATTAGTTGGAT	67,25 65,58
<i>CDH2</i>	CDH2 qPCR for CDH2 qPCR rev	ACCAGGTTTGGGAATGGGACA ACATGTTGGGTGAAGGGGTG	59,14 60,18
<i>CDH5</i>	CDH5 for CDH5 rev	ATCGGTTGTTCAATGCGTCC TACATGACAGAGGCGTGGTC	59,2 59,47
<i>EMB</i>	EMB for EMB rev	TGGCAAATAACTTTTCCTTGGAG ACTGCATTCAAATCCCCAGA	57,53 57,09
<i>EPHB1</i>	EPHB1 for EPHB1 rev	AAACTCTACTGCAACGGGGA GCCTTGAATGTCCCTGCAG	58,95 58,81
<i>FBN2</i>	FBN2 for FBN2 rev	GGTTTCTAGCGCCCGAGTAT GGCAGCAGTAGGAGTGAAT	59,61 59,46
<i>FN1</i>	FN1 for FN1 rev	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG AAACCTCGGCTTCCTCCATAA	58,76 59,09
<i>FZD1</i>	FZD1 for FZD1 rev	GCCCTCCTACCTCAACTACC AGCACAGCACTGACCAAATG	58,88 59,04
<i>FZD8</i>	FZD8 for FZD8 rev	TCTACCTCTTCATCGGCACC CCTGTTGCTTGATGACCGAG	58,98 58,92
<i>GAS1</i>	GAS1 for GAS1 rev	CCCTCATTGACTCAACCAC GTGGACTTGCAGTTCTCGTC	58,54 58,86
<i>KDR</i>	KDR for KDR rev	CCCAGGCTCAGCATACAAAA ACTCAGTCACCTCCACCCTT	58,16 60,1
<i>NELL2</i>	NELL2 for NELL2 rev	TGCATAATGGGACGAAAGCC GGGTCTGTTTTAGGGTCACC	58,61 57,8
<i>NKX2-2</i>	NKX2-2 qPCR for NKX2-2 qPCR rev	CGAGGGCCTTCAGTACTCC TCCTTGTCATTGTCCGGTGA	59,18 58,95
<i>NRP2</i>	NRP-2 for NRP-2 rev	GAGTGGATTGTTTACGCCCC GGATTCACTGTCCCCATCCC	58,91 59,82
<i>NTSR1</i>	NTSR1 for NTSR1 rev	CGTCAAGGTCGTCATACAGG GCGATGATGGTGTTCAGGAC	58,09 58,99
<i>SEMA6A</i>	SEMA6A for SEMA6A rev	TGGAAATCTAGACAGGCCGA TCTGCAGGAAGGGTTGAAGG	58,14 59,6
<i>SOX11</i>	SOX11 for SOX11 rev	CCAGGACAGAACCACCTGAT CCCCACAAACCACTCAGACT	59,01 59,53
<i>SOX4</i>	SOX4 qPCR01 for SOX4 qPCR01 rev	GGTCTCTAGTTCTTGACGCTC CGGAATCGGCACTAAGGAG	60,99 57,73
<i>SYK</i>	SYK for SYK rev	TGTGAAGCAGACATGGAACC TGCTCAGATTCTCCCGAGA	58,1 58,15
<i>THBS1</i>	THBS1 for THBS1 rev	CTCAGGAACAAAGGCTGCTC GGCCAATGTAGTTAGTGCGG	58,84 58,99
<i>TMSB15A</i>	TMSB15A qPCR for TMSB15A qPCR rev	GGTCTCAGCCCCGGAACAG CAGGTAATGTCGAAATCTGCTGTTG	65,54 60,67
<i>TRIB2</i>	TRIB2 for TRIB2 rev	GCATTGCGTTTCTTGATCGG GGATTCTGGTAGCAGCTGA	58,56 59,17
<i>VANGL2</i>	VANGL2 for	ACAATGAGTCCACACGAGGG	59,68

VANGL2 rev

ATCATGGGAGATGCTGTGCT

59,16

Tabelle 20: Reaktionsansatz qPCR.

Die Tabelle zeigt den Reaktionsansatz für eine qPCR-Reaktion.

Reagenz	Volumen für eine Reaktion	finale Konzentration
cDNA	5,0 µl	
primaQUANT CYBR qPCR-Mastermix (2X)	7,5 µl	1X
Primer forward (10 µM)	0,45 µl	0,3 µM
Primer reverse (10 µM)	0,45 µl	0,3 µM
dH ₂ O	ad 15,0 µl	

Tabelle 21: qPCR-Programm mit dem QuantStudio™ 3 System.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initialisierung		
1	95 °C	15 min
40 Zyklen		
2	95 °C	15 s
3	60 °C	1 min
Schmelzkurvenanalyse		
4	95 °C	15 s
5	60 °C	1 min
6	95 °C	15 s

3.2.5 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

3.2.5.1 Isolierung von Gesamt-RNA und Qualitätskontrolle

Für die genomweite RNA-Sequenzierung habe ich zunächst die Gesamt-RNA subkonfluent kultivierter Zellen (S462^{SOX11-KO-}, S462^{NTC-}, POE^{SOX11-KO-} und POE^{NTC-}-Zellen) von jeweils einer frühen und einer späten Zellpassage (drei bis zehn Passagen dazwischen) wie in Abschnitt 3.2.4.1 beschrieben isoliert. Die Qualitätskontrolle der RNA-Proben wurde am Zentrum für Medizinische Forschung der medizinischen Fakultät Mannheim durch Frau Dr. Carolina De la Torre durchgeführt. Hierbei wurde die *RNA integrity number* (RIN) mittels dem *Agilent 2100 Bioanalyzer* und dem *Eukaryote total RNA Nano Assay* bestimmt. RNA-Proben mit einer RIN > 8,0 wurden für die nachfolgende RNA-Sequenzierung verwendet.

3.2.5.2 RNA-Sequenzierung und Datenauswertung

Die RNA-Sequenzierung der Proben wurde durch BGI Genomics (Hongkong) durchgeführt. Hierbei wurde unter Verwendung der BGI DNBSEQ™-Technologie die RNA-Transkriptom-Sequenzierung mit 100 bp *paired-end sequencing* durchgeführt.

Die bioinformatische Auswertung der Rohdaten der RNA-Sequenzierung wurde an der NGS Core Facility der medizinischen Fakultät Mannheim von Herrn Dr. Carsten Sticht durchgeführt. Hierzu wurden die Programme R und *bioconductor* mit dem NGS-Analyse-Paket *systempipeR* verwendet (Backman & Girke, 2016). Die Qualitätskontrolle der Sequenzierungsreads wurde mit *FastQC* (Babraham Bioinformatics) durchgeführt und Reads mit geringer Qualität wurden mittels *trim galore* (Version 0.6.4) entfernt. Die erhaltenen Reads wurden mit dem humanen Genom GRCh38.p13 von *GeneCode* aligned und mit *kallisto* (Version 0.46.1) quantifiziert (Bray et al., 2016). Die Anzahl der Reads (Counts) wurden in log₂-Counts pro Million (logCPM) mit der voom-Funktion des *limma*-Pakets umgewandelt (Ritchie et al., 2015). Mit dem *limma*-Paket wurde in R die Analyse zur differentiellen Expression durchgeführt. Eine Falsch-Positiv-Rate (*false discovery rate*, FDR) von $\alpha = 0,05$ mit FDR-Korrektur wurde als Signifikanzlevel gewählt.

3.2.6 SDS-PAGE und Western Blot

3.2.6.1 Proteinlyse und -quantifizierung

Subkonfluente kultivierte Zellen habe ich auf Eis mit eiskaltem 1X DPBS ohne Ca²⁺/Mg²⁺ zweimal gewaschen und auf der Platte mit dem Proteinlysepuffer RIPA (*Santa Cruz*), inklusive Protease-Inhibitoren und Phosphatase-Inhibitor, lysiert und mit einem Zellschaber geerntet. Die Lysate wurden für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert, anschließend für 10 min bei 4 °C bei 10.000 xg in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration habe ich kolorimetrisch mit dem *Pierce BCA Protein Assay Kit* (*Thermo Scientific*) bestimmt. Als Standard diente eine in RIPA-Lysepuffer (einschließlich der Inhibitoren) angesetzte Verdünnungsreihe mit BSA. Die Absorption bei 562 nm wurde mit einem Luminometer (*BMG Labtech*) detektiert.

3.2.6.2 SDS-PAGE

Proteinlysate wurden mit 4X Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Im Anschluss habe ich jeweils 20 µg Protein sowie ein Größenstandard auf SDS-Polyacrylamidgele (8 oder 10 %) zur Gelelektrophorese geladen und unter Verwendung eines Tris-Glycin-Laufpuffers aufgetrennt.

3.2.6.3 Western Blotting

Die mit SDS-PAGE aufgetrennten Proteine habe ich im *wet-blot*-Transferverfahren unter Verwendung eines mit Methanol versetzten Tris-Glycin-Transferpuffers auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Anschließend wurden die Membranen für 1 h in 5 % Milchpulver geblockt und mit den entsprechenden primären Antikörpern (Tabelle 22) in der jeweiligen Verdünnung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Nitrocellulose-Membranen mit 1X TBS-T (*Tris-buffered saline* + 1 % *Tween*[®] 20) dreimal für 5 min gewaschen und für 1 h mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (Tabelle 23) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit 1X TBS-T für jeweils 10 min erfolgte die Detektion der Signale mit dem LI-COR Odyssey CLx und der Software *Image Studio Lite*. Als Ladekontrolle habe ich ein gegen beta-Tubulin gerichteter Primärantikörper verwendet.

Tabelle 22: Im Western Blot verwendete Primärantikörper.

Protein	Bezeichnung Antikörper	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller
SOX11	Recombinant Anti-SOX11 antibody [EPR8192], #ab134107	Kaninchen, monoklonal	1:500 in 5 % Milchpulver	Abcam (Cambridge, UK)
Cas9	Cas9 antibody (mAb), 7A9-3A3, # 61577	Maus, monoklonal	1:500 in 5 % Milchpulver	Active Motif Inc. (Carlsbad, USA)
Beta-Tubulin	beta-Tubulin Antikörper (TUB 2.1), # sc-58886	Maus, monoklonal	1:300 in 3 % BSA	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland)
NKX2-2	Purified mouse anti-Nkx2.2 clone 74.5A5, #564731	Maus, monoklonal	1:1000 in 5 % Milchpulver	BD (Becton Dickinson) (Heidelberg, Deutschland)
VEGFR2	VEGF Receptor 2 (55B11) Rabbit mAb, #2479S	Kaninchen, monoklonal	1:200 in 5 % Milchpulver	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)
pVEGFR2 Y1054/1059	Anti-VEGF Receptor 2 (phospho Y1054+Y1059) antibody, #ab5473	Kaninchen, polyklonal	1:500 in 5 % Milchpulver	Abcam (Cambridge, UK)
pVEGFR2 Y1059	Phospho-VEGF Receptor 2 (Tyr1059) (D5A6) Rabbit mAb, #3817	Kaninchen, monoklonal	1:200 in 5 % Milchpulver	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)
pVEGFR2 Y1214	Anti-VEGF Receptor 2 (phospho Y1214) antibody, #ab131241	Kaninchen, polyklonal	1:500 in 5 % Milchpulver	Abcam (Cambridge, UK)
SYK	SYK Antibody, #2712-S	Kaninchen, polyklonal	1:500 in 5 % Milchpulver	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)
pSYK Y525/526	Phospho-Syk (Tyr 525/526) (C87C1) Rabbit mAb, #2710-S	Kaninchen, monoklonal	1:500 in 5 % Milchpulver	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)
Src	Src (36D10) Rabbit mAb, #2109-S	Kaninchen, monoklonal	1:500 in 5 % Milchpulver	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)
pSrc Y418	Phospho-Src Family (Tyr416) Antibody, #2101-S	Kaninchen, polyklonal	1:500 in 5 % Milchpulver	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)

pSrc Y529	Phospho-Src Family (Tyr527) Antibody, #2105-S	Kaninchen, polyklonal	1:500 in 5 % Milchpulver	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)
CASP4	Caspase-4 Antibody, #4450	Kaninchen, polyklonal	1:300 in 3 % BSA	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)

Tabelle 23: Im Western Blot verwendete Sekundärantikörper.

Bezeichnung Antikörper	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller
IRDye® 800CW Donkey anti-rabbit IgG (H + L), #926-32213	Kaninchen	1:20.000 in 5 % Milchpulver	Li-Cor Biosciences GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
IRDye® 800CW Donkey anti-mouse IgG (H + L), #926-32212	Maus	1:20.000 in 5 % Milchpulver	Li-Cor Biosciences GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
IRDye® 680LT Donkey anti-mouse IgG (H + L), #926-68022	Maus	1:20.000 in 5 % Milchpulver	Li-Cor Biosciences GmbH (Bad Homburg, Deutschland)

3.2.7 Immunhistochemische Färbemethoden

Es wurden 14 in Formalin-fixierte und in Paraffin eingebettete (FFPE)-Gewebeproben von Patienten mit diagnostizierten MPNST und 21 FFPE-Gewebeproben von Patienten mit diagnostizierten Schwannom von der Gewebekbank des Nationales Centrum für Tumorerkrankungen (NCT, Heidelberg, Deutschland) in Übereinstimmung mit den Regulatoren der Gewebekbank und der Zustimmung des Ethikkomitees (Ethikantragsnr. 206/2005) der Universität Heidelberg zur Verfügung gestellt. Von den FFPE-Gewebeproben wurden 4 µm dünne Gewebeschnitte mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica SM 2000 R) durch Frau Andrea Müller angefertigt. Sechs *Tissue Microarrays* (TMA) bestehend aus insgesamt 97 ES-Gewebeproben von Patienten der *Cooperative Ewing Sarcoma Study* (CESS-Studie) (Steinestel et al., 2020) in Duplikaten wurde von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hartmann (Gerhard-Domagk-Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Münster) zur Verfügung gestellt. Das Einverständnis der Patienten der CESS-Studie liegt vor.

Die immunhistochemischen Färbungen der Antigene von SOX11 und VEGFR2 (Tabelle 24) wurden unter der Verwendung des Ventana-Färbesystems durch die Gewebekbank durchgeführt. Das Einscannen der gefärbten Gewebeschnitte und der TMAs erfolgte auf dem Aperio AT2 (Leica) durch die Gewebekbank. Die Begutachtung der Gewebeschnitte sowie die Auswertung nach dem Allred-Score erfolgten durch Herrn Dr. Marcus Renner. Für die Auswertung der TMAs verwendete ich die Software QuPath, die die Intensität der Färbung und den Anteil positiver Zellen nach dem Allred-Score kalkuliert. Der totale Allred-Score (AS, 0 – 8) wurde durch die Addition der beiden Scores erhalten. Ein AS von 0 – 3 wurde als negativ, ein AS von 4 und 5 wurde als moderat und ein AS von 6 – 8 als stark positiv definiert. Bei Duplikaten mit unterschiedlichen Allred-Scores, wurde der mittlere Score ermittelt.

Tabelle 24: In der immunhistochemischen Färbung verwendete Antikörper. RTU = *ready to use*.

Protein	Bezeichnung Antikörper	Reaktivität	Verdünnung	Hersteller
SOX11	SOX11 (MRQ-58) #760-4868	Maus, monoklonal	RTU	Roche (Mannheim, Deutschland)
VEGFR2	VEGF Receptor 2 (55B11) Rabbit mAb, #2479S	Kaninchen, monoklonal	1:200	Cell Signaling (Frankfurt am Main, Deutschland)

3.2.8 Chromatin-Immunpräzipitation

S462^{SOX11-KO}- und S462^{NTC}- Zellen wurden in 15 cm Standardzellkulturschalen bis zur Subkonfluenz in Standardmedium kultiviert. Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) habe ich mit dem *SimpleChIP Enzymatic IP Kit (Magnetic Beads)* von *Cell Signaling* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für jede Immunpräzipitation wurden 4×10^6 Zellen eingesetzt. Dabei wurden zuerst die S462^{SOX11-KO}- bzw. S462^{NTC}- Zellen mit 37 % Formaldehyd fixiert, lysiert und das Chromatin isoliert. Anschließend wurde das Chromatin mit 0,125 μ l *Micrococcal Nuklease* (2000 Gel Units/ μ l) enzymatisch in 150 – 900 bp große DNA/Protein-Fragmente verdaut und die Fragmentgrößen mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. 500 μ l Chromatin wurden jeweils mit 2 μ g SOX11-spezifischem Antikörper (ab134107), 10 μ l Histon-H3 Antikörper (Positivkontrolle) oder 2 μ g normalem Kaninchen IgG-Antikörper (Negativkontrolle) über Nacht bei 4 °C inkubiert und im Anschluss über magnetische *Beads* aufgereinigt. Nach der Immunpräzipitation wurden die Protein-DNA *cross-links* rückgängig gemacht und die DNA aufgereinigt.

3.2.8.1 ChIP-qPCR

Die immunpräzipitierte Chromatin-DNA habe ich mittels qPCR mit den *SimpleChIP Human RPL30 Exon 3 Primers 1* (Kontroll-Primer Set) analysiert. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde eine serielle Verdünnung einer nicht-immunpräzipitierten 2 % Input Chromatin-DNA von S462^{SOX11-KO}- und S462^{NTC}- Zellen verwendet. Jede qPCR-Reaktion wurde in *Applied Biosystems MicroAmp Fast 96-well Reaction Plates* als *SYBR Green*-basierte Reaktion angesetzt (Tabelle 25) und mit *QuantStudio™ 3* unter Verwendung eines qPCR-Programms mit anschließender Schmelzkurvenanalyse (Tabelle 26) detektiert. Das experimentelle Setup beinhaltete NTC-(*non-template control*)-Kontrollen. Alle Proben wurden als technische Duplikate gemessen. Die C_T -Werte der immunpräzipitierten Chromatin-DNA wurden als prozentualer Anteil der unverdünnten 2 % Input-Kontrolle ausgewertet sowie als *fold enrichment* relativ zu der IgG-Negativkontrolle angegeben.

Tabelle 25: Reaktionsansatz CHIP-qPCR.

Die Tabelle zeigt den Reaktionsansatz für eine CHIP-qPCR-Reaktion.

Reagenz	Volumen für eine Reaktion	Finale Konzentration
Chromatin-DNA	2 µl	
primaQUANT CYBR qPCR-Mastermix (2X)	5,0 µl	1X
RPL30 Primers (5 µM)	1,0 µl	0,5 µM
ddH ₂ O	2,0 µl	
Total	10 µl	

Tabelle 26: CHIP-qPCR-Programm mit QuantStudio™ 3.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initialisierung		
1	95 °C	15 min
40 Zyklen		
2	95 °C	15 s
3	60 °C	1 min
Schmelzkurvenanalyse		
4	95 °C	15 s
5	60 °C	1 min
6	95 °C	15 s

3.2.8.2. CHIP-qPCR SOX11 Kandidaten

3.2.8.2.1 *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)), *NKX2-2* auf Chromosom 20p11 (-1000 bp vor ATG bis 100 bp nach ATG), *KDR* auf Chromosom 4q12 (-5000 bp vor ATG bis 1000 bp nach ATG) und *SYK* auf Chromosom 9q22.2 (-5000 bp vor ATG bis 1000 bp nach ATG) habe ich mit der JASPAR-Datenbank (Fornes et al., 2020) auf potenzielle SOX11-Bindestellen analysiert. Hierbei wurde der Algorithmus MA0084.1 SRY für die Spezies *Homo sapiens* 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* sechzehn, für *NKX2-2* zehn, für *KDR* achtzig und für *SYK* 92 (Promoter 1) bzw. 78 (Promoter 2) potenzielle SOX11-Bindestellen.

Für die Bindestellen mit den höchsten Scores habe ich Primer designed (Tabelle 27) und eine qPCR mit DNA von S462^{NTC} durchgeführt. Für *NKX2-2* konnten zwei, für *CD24* sechs, für *KDR* vier und für *SYK* drei (Promoter 1) bzw. fünf (Promoter 2) Bindestellen erfolgreich amplifiziert werden. Anschließend führte ich eine qPCR (siehe Abschnitt 3.2.8.1) mit DNA von S462^{NTC} durch, die zuvor mit dem SOX11-

Antikörper bzw. mit dem IgG-Antikörper als Negativkontrolle immunpräzipitiert wurde. Als Kontrolle diente mit den jeweiligen Antikörpern immunpräzipitierte DNA von S462^{SOX11-KO}.

Tabelle 27: Primer für die ChIP-qPCR.

Bezeichnung Primer	Sequenz 5'→3'	Tm [°C]	Potenzielle Bindesequenz	Score
CD24 ChIP-qPCR_-1221 for	AGGCACAAACCAATTCAGTCA	58,33	GTCAACAAA	6,75
CD24 ChIP-qPCR_-1221 rev	GCGTGGCAGTCTCATTAAAC	58,15	GTCAACAAA	6,75
CD24 ChIP-qPCR_-1530 for	CGAGAGTGTCTGCAAACTGA	59,13	TTAAACAAA	10,09
CD24 ChIP-qPCR_-1530 rev	AGCAAACAGCAGAGACCAAA	57,94	TTAAACAAA	10,09
CD24 ChIP-qPCR_-1709 for	GACCTTGAAGGCACAAACCA	58,6	TAAACAAA	9,47
CD24 ChIP-qPCR_-1709 rev	CTTTTGCCTGGCAGTCTCAT	59,12	TAAACAAA	9,47
CD24 ChIP-qPCR_-1784 for	ACTGAGCTAAAGTGACTGACCT	58,76	CAAACCAAT	5,89
CD24 ChIP-qPCR_-1784 rev	TCAGGGAAGCAAAGTGACAA	57,27	CAAACCAAT	5,89
CD24 ChIP-qPCR_-1854 for	GAAAGTCCACTGGTGCTCGA	59,97	GAACACAAG	6,27
CD24 ChIP-qPCR_-1854 rev	TGACTGAATTGTTTGTGCCT	58,33	GAACACAAG	6,27
CD24 ChIP-qPCR_-1894 for	ACGCCCCGCCAAAGTATT	59,65	TTAACAGT	7,25
CD24 ChIP-qPCR_-1894 rev	ATTTCTGTGAGCACCAGTG	58,2	TTAACAGT	7,25
KDR ChIP-qPCR_-1960 for	TGAGACATGGAAGAGGAAGTGT	58,76	CCAAACAAT	9,09
KDR ChIP-qPCR_-1960 rev	TGGAACCTGTTTGGAGAGG	59,23	CCAAACAAT	9,09
KDR ChIP-qPCR_-273 for	GGACCGCAAGCGATTAAT	58,98	AGAAACAAA	8,11
KDR ChIP-qPCR_-273 rev	GGAGAGAACATCCCAGAGCA	58,8	AGAAACAAA	8,11
KDR ChIP-qPCR_-2824 for	TTAAATTTGTCTTGGGTGAGGC	57,14	TATTACAAT	8,37
KDR ChIP-qPCR_-2824 rev	ACTGGGGTTACGATGGTGAA	58,65	TATTACAAT	8,37
KDR ChIP-qPCR_-513 for	GCAAGTGCCTTTCTGATTAAGA	58,22	TTATACAAA	8,23
KDR ChIP-qPCR_-513 rev	GCGACTCCTGCCAGTAGTTT	60,04	TTATACAAA	8,23
NKX2-2 ChIP-qPCR_-687 for	GCACTCATCCTTAAGCCTCAA	58,01	CTAAACAAG	8,20
NKX2-2 ChIP-qPCR_-687 rev	GAAATCTCTCTTCCATCGTTG	57,52	CTAAACAAG	8,20
NKX2-2 ChIP-qPCR_-794 for	AGCTCTCTCTGGGTTTTGG	59,3	GGAATCAAT	7,62
NKX2-2 ChIP-qPCR_-794 rev	TGAGGCTTAAGGATGAGTGC	57,3	GGAATCAAT	7,62
SYK.1 ChIP-qPCR_-2987 for	CTCACACATGCACAGCCTTT	59,04	TGTAACAAA	8,14
SYK.1 ChIP-qPCR_-2987 rev	AAACTTCAGGCTTTGGGTGA	57,55	TGTAACAAA	8,14
SYK.1 ChIP-qPCR_-4354 for	GCAAACCTTTGGGCTTTGGGT	59,82	AAACACAAT	8,04
SYK.1 ChIP-qPCR_-4354 rev	CACACCCGGCCATCTTTTAT	58,24	AAACACAAT	8,04
SYK.1 ChIP-qPCR_861 for	TTTTGTTGGAATGTTCAAGGACT	57,07	AAAGACAAT	8,04
SYK.1 ChIP-qPCR_861 rev	TGCAACACTGTTTCCAACGT	58,83	AAAGACAAT	8,04
SYK.2 ChIP-qPCR_-1133 for	CTCCTGAGGCTCGATGACC	59,26	GATAACAAT	10,51
SYK.2 ChIP-qPCR_-1133 rev	GGCCATGATGATGAAGGTGA	57,65	GATAACAAT	10,51
SYK.2 ChIP-qPCR_-2991 for	CCAAAACCAGTTAAGGCATTACA	57,54	GAAAACAAA	9,75
SYK.2 ChIP-qPCR_-2991 rev	GCTCTTTTCATACGTTGTTGGG	58,18	GAAAACAAA	9,75
SYK.2 ChIP-qPCR_-321 for	CAATTAGCATCTTGAGGTCTCCA	58,23	TAAACAAT	10,76
SYK.2 ChIP-qPCR_-321 rev	TGGAATGGGTATAGCGAGGT	57,9	TAAACAAT	10,76
SYK.2 ChIP-qPCR_-4216 for	CAGAATGGTAAAGGGGTCGAA	57,66	CATAACAAT	9,67
SYK.2 ChIP-qPCR_-4216 rev	TCTTACCAGTGTGTTGCTTGCA	58,12	CATAACAAT	9,67
SYK.2 ChIP-qPCR_-4256 for	TCCAGCACCTCATCACTTT	58,93	TGTAACAAT	9,43
SYK.2 ChIP-qPCR_-4256 rev	TGGATATTCGACCCCTTACCA	58,61	TGTAACAAT	9,43

3.2.9 Antibody Array Assays

Zur Überprüfung einer Aktivierung des VEGF-Signalweges nach *SOX11*-Knockout wurden die *S462^{SOX11-KO}*- und *S462^{NTC}*-Zellen mit dem *VEGF Phospho Antibody Array* der Firma *Full Moon BioSystems* analysiert. Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Es wurden konfluente *S462^{SOX11-KO}*- und *S462^{NTC}*-Zellen ($1 \cdot 5 \times 10^6$ Zellen) mit eiskaltem 1X DPBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ fünf Mal gewaschen, Extraktionspuffer inklusive Protease- und Phosphatase-Inhibitoren hinzugegeben und lysiert. Anschließend wurden die Proteinlysate über Säulen aufgereinigt, quantifiziert mittels Messung der UV-Absorption (A280) am Nanodrop und 80 – 100 OD Protein pro Lysat für die Biotinylierung eingesetzt. Die biotinylierte Probe wurde mit 6 ml *Coupling Solution* vermischt, auf die zuvor mit Milch geblockten Antikörper-Arrays gegeben und bei RT für 90 min bei 35 rpm auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Objektträger mit Waschpuffer und MilliQ-Wasser wurden die Objektträger in 30 ml Cy3-Streptavidin-Detektionspuffer für 20 min im Dunkeln bei 35 rpm inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit Waschpuffer und MilliQ-Wasser habe ich die Array-Objektträger abzentrifugiert (1300xg, 10 min) und mit dem *Agilent Scanner G2505C* der *Core Facility Genomics and Proteomics* am DKFZ Heidelberg gescannt. Für die Auswertung habe ich die Signalintensität (Pixeldichte) für jeden Spot des Arrays mit der Software *ImageJ* und dem *Protein Array Analyzer Plugin* gemessen, den Mittelwert der Antikörper-Replikate bestimmt und den Hintergrund (Negativkontrolle = leere Spots) subtrahiert. Die für jeden Antikörper gemittelten Signalintensitäten habe ich mit dem medianen Signal aller Antikörper normalisiert und die *Fold Change* zwischen der *S462^{SOX11-KO}*- und *S462^{NTC}*-Probe ermittelt. Für die Phospho-Antikörper Arrays wurde zudem das Verhältnis (Ratio) der Signalintensität Phospho-spezifischer Antikörper zu der Signalintensität spezifischer Antikörper berechnet und die *Ratio Change* zwischen der *S462^{SOX11-KO}*- und *S462^{NTC}*-Probe ermittelt. Hierbei wurde ein *Cutoff* von $< 0,5$ für eine um die Hälfte verringerte Proteinmenge und > 2 für die verdoppelte Proteinmenge gesetzt.

3.2.9.1 Ingenuity Pathway Analysis der Antibody Arrays

Um die durch *SOX11* beeinflussten Proteine zu interpretieren und visualisieren habe ich die Ergebnisse der VEGF Phospho-Arrays in die web-basierte Software *QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA)* hochgeladen und auf aktivierte bzw. inhibierte Signalwege analysiert. Für die Phosphorylierungs-Arrays wurde die zuvor errechnete *Phospho-Ratio* von der Software in *Phospho-Fold Change* unter Verwendung der Formel $(-1/x)$ für alle Werte $< 0,5$ umgewandelt. Als *Cutoff* wählte ich daher < -2 für eine um 50 % verringerte Proteinmenge und > 2 für die verdoppelte Proteinmenge und ein *p*-Wert von $< 0,05$. Für Proteine mit mehreren Phosphorylierungsstellen wurde die Stelle mit dem dominanten

Effekt des Maximalwertes für die Analyse herangezogen, da eine gleichzeitige Betrachtung aller Phosphorylierungsstellen einer Kinase mit IPA nicht möglich ist.

3.2.10 Statistische Analysen und Software

Für das Erstellen von Plots habe ich die R-Version 4.0.4 mit der RStudio-Version 1.4.1103 und Rtools 4.0 verwendet. Zur Erstellung der Blasendiagramme führte ich zunächst mittels der DAVID-Datenbank eine funktionelle Anreicherungsanalyse durch. Hierzu wurden die nach *SOX11*-Knockout signifikant runter- und hochregulierten Protein-kodierenden Gene ($FC (\log_2) \leq -1,0$ bzw. $\geq 1,0$, $p \leq 0,05$) auf angereicherte biologische Funktionen (*GO terms*) hin analysiert. Anschließend habe ich das Ergebnis dieser funktionellen Analyse zusammen mit der Genliste verwendet um ein Blasendiagramm der angereicherten *GO terms* zu erstellen. Dazu verwendete ich das R-Paket GOplot mit der Funktion GOBubble nach dem Skript von Walter et al. (<https://wencke.github.io/>) (Walter et al., 2015). Zur Erstellung des Plots nutzt das R-Paket GOplot den negativen logarithmischen *adjusted p-value* (*false discovery rate*, FDR) und den kalkulierten z-score. Der Schwellenwert (*threshold*) für die signifikante Anreicherung eines *GO terms* wurde bei einem *adjusted p-value* $< 0,05$ und die minimale Genanzahl (*labels*) > 3 gewählt.

Die Genexpressionsdaten einer unabhängigen ES-Kohorte (Postel-Vinay et al., 2012) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Grünewald (Abteilung Translationale Pädiatrische Sarkomforschung, Hopp Kindertumorzentrum Heidelberg) und Herrn Dr. Dr. Martin Franz Orth zur Verfügung gestellt. Um den Zusammenhang zwischen *SOX11* und dem Überleben von Patienten zu untersuchen habe ich mit dem Genexpressionsdatensatz unter Verwendung des Wilcoxon-Tests eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve in GraphPad Prism erstellt. Für hohe intratumorale *SOX11*-Expressionslevel wurde ein *Cutoff* ab einem \log_2 -Wert $\geq 8,5$ und für niedrige *SOX11*-Expression $< 8,5$ gewählt.

Die Korrelation der *SOX11*-Expression mit den klinischen Daten der ES-Patienten aus der CESS-Studie, wurde von Frau Susanne Jabar (Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 SOX11 in MPNSTs

4.1.1 SOX11-Expression in MPNSTs und in MPNST-Zelllinien

In einem ersten Schritt wurde die SOX11-Expression in einem Kollektiv bestehend aus 14 Patienten mit diagnostiziertem MPNST sowie in 21 Patienten mit diagnostiziertem Schwannom immunhistochemisch bestimmt und mittels Allred-Score quantifiziert. Von 13 auswertbaren Patienten mit MPNST zeigten fünf eine starke (Allred-Score 6 – 8), drei eine moderate (Allred-Score 4 + 5) und fünf keine (Allred-Score 0 – 3) nukleäre Expression von SOX11 (Abbildung 3A, C). Somit konnte in diesem Kollektiv bei insgesamt 61,5 % der MPNST-Patienten eine SOX11-Expression detektiert werden. Im Vergleich zu dem MPNST-Kollektiv zeigten lediglich 9,5 % der Patienten mit einem Schwannom eine moderate SOX11-Expression (Abbildung 3B, C).

Mit dem Ziel der funktionellen Charakterisierung von SOX11 habe ich zusätzlich zur immunhistochemischen Analyse die SOX11-Expression auf RNA- und Proteinebene mittels qPCR bzw. Western Blotting in vier bereits etablierten MPNST-Zelllinien (STS26T, 1507.2, S462, 1844.1) untersucht (Abbildung 3D). Die DDLS-Zelllinie FU-DDLS mit bekannt hohen SOX11-Expressionsleveln diente als Positivkontrolle. Hierbei zeigte die MPNST-Zelllinie S462 die höchsten SOX11-Expressionslevel auf RNA- und Proteinebene. Die Zelllinie 1507.2 zeigte sehr geringe SOX11-Expressionslevel und die Zelllinien STS26T und 1844.1 waren negativ für SOX11.

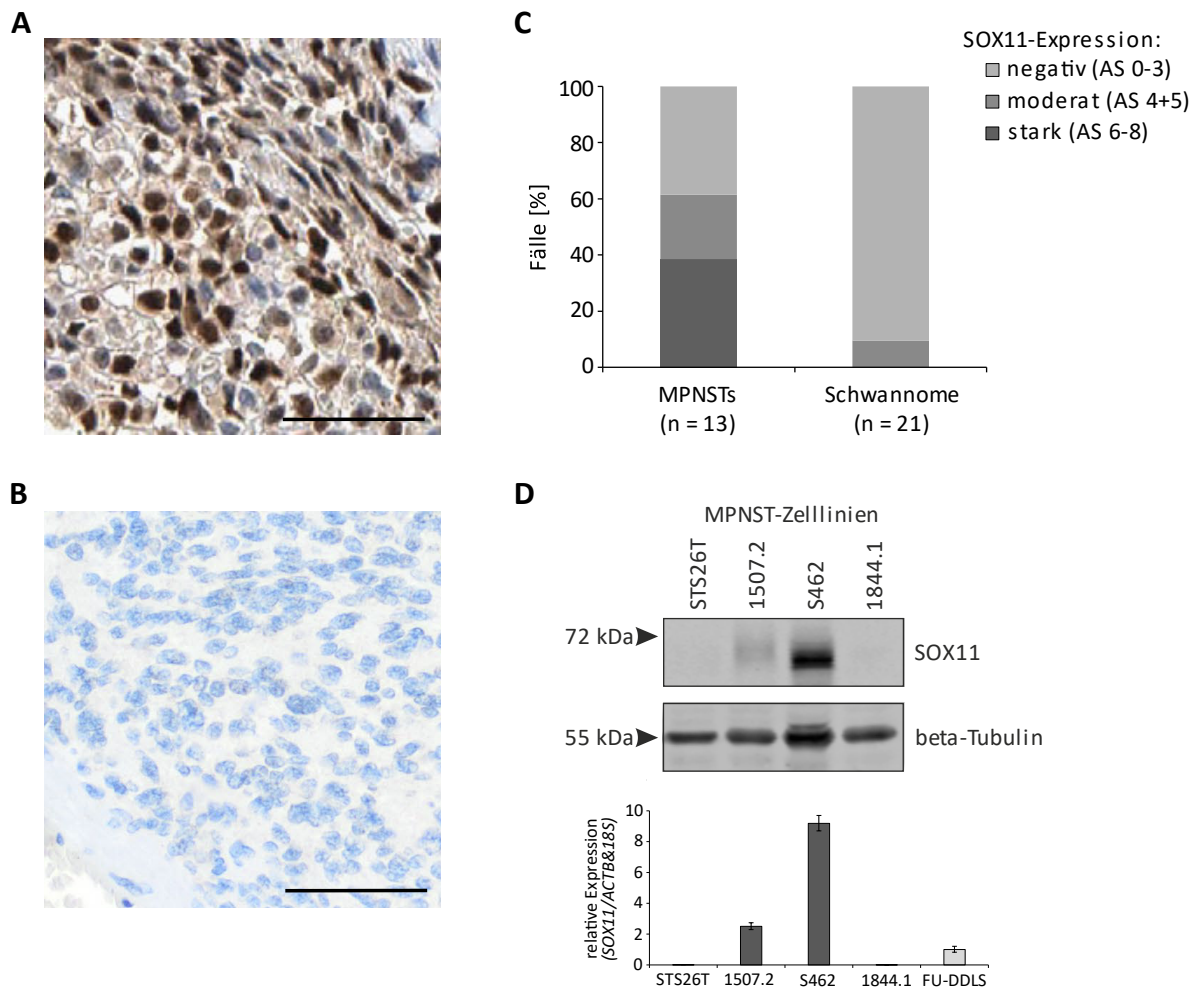


Abbildung 3: SOX11-Expression in MPNSTs, Schwannomen und in MPNST-Zelllinien. (A, B) Repräsentative immunhistochemische Färbung von SOX11 in MPNSTs (n = 13) und Schwannomen (n = 21). Gezeigt ist in (A) ein MPNST mit intensiver nukleärer Färbung von SOX11 (Allred-Score 8) sowie in (B) ein SOX11-negatives Schwannom (Allred-Score 0, schwarze Balken jeweils 50 µm). (C) Prozentualer Anteil an MPNST- und Schwannom-Fällen mit starker (Allred-Score 6 – 8), moderater (Allred Score 4 + 5) und negativer (Allred-Score 0 – 3) nukleärer Expression von SOX11. (D, oben) Expression von SOX11 in vier MPNST-Zelllinien sowie (D, unten) die relativen mRNA-Expressionslevel von *SOX11* in den vier MPNST-Zelllinien (dunkelgrau) und der DDLS-Zelllinie FU-DDLS (hellgrau) als Positivkontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*). AS = Allred-Score, n = Anzahl der Fälle.

4.1.2 Generierung einer MPNST-Zelllinie mit *SOX11*-Knockout

Zu Beginn der Analysen zur funktionellen Charakterisierung von *SOX11* in MPNSTs war das Ziel die Expression von *SOX11* in einer MPNST-Zelllinie stabil auszuschalten. Da die MPNST-Zelllinie S462 die höchsten *SOX11*-Expressionslevel auf RNA- und Proteinebene zeigte, wurde diese Zelllinie für die weitere funktionelle Evaluierung von *SOX11* in MPNSTs herangezogen. Hierzu wurde *SOX11* mittels *Genome-Editing* (CRISPR/Cas9-System) in S462 stabil ausgeschaltet. In einem ersten Schritt habe ich Cas9 mittels lentiviraler Transduktion überexprimiert (S462^{Cas9}, Parentalzelllinie). In einem zweiten

kann. Dabei konnte ich keinen signifikanten Effekt in der Proliferationsrate der S462^{SOX11-KO}-Zellen im Vergleich zu S462^{NTC}-Zellen feststellen (Abbildung 5B).

Zur Bestimmung des Einflusses von SOX11 auf die Apoptose habe ich den Caspase-Glo[®] 3/7-Assay (Promega) verwendet. Dieser Assay nutzt die Aktivität der Caspasen 3 und 7 und das Prinzip der Luciferase-Reaktion. Die S462^{SOX11-KO}-Zellen zeigten eine verstärkte Apoptose ($p < 0,001$; Abbildung 5C). Zudem zeigte sich nach Knockout von SOX11 im Klonogenitätsassay über einen Zeitraum von 13 Tagen eine signifikant verminderte Anzahl an Kolonien (48 %, $p < 0,05$; Abbildung 5D).

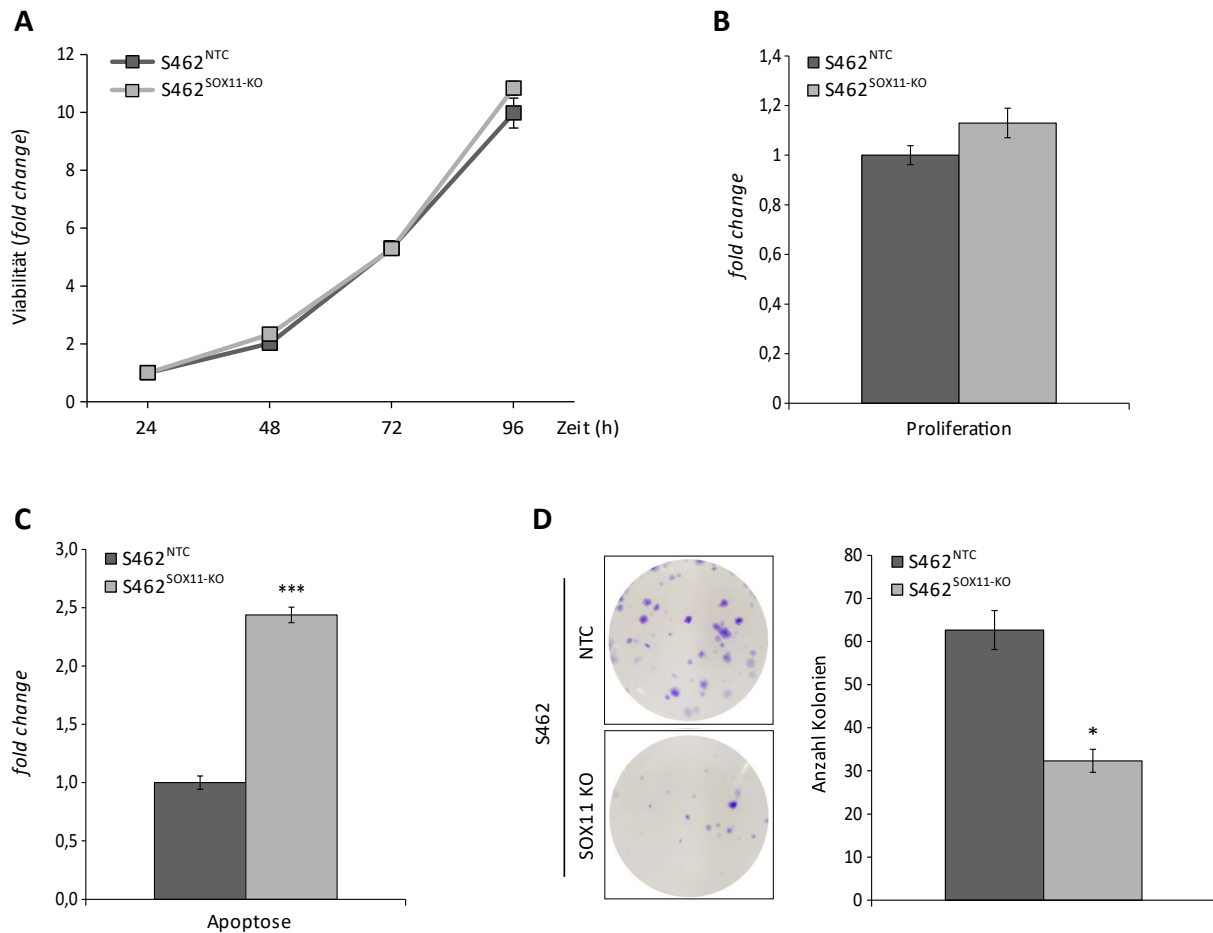


Abbildung 5: Funktionelle Charakterisierung der MPNST-Zelllinie S462 (Klon #5) nach SOX11-Knockout. (A) Das Ergebnis eines repräsentativen CTB-Assays ($n = 6$) aus drei unabhängigen Experimenten sowie (B) das Ergebnis eines repräsentativen BrdU-Proliferations-Assays ($n = 6$) aus drei unabhängigen Experimenten zeigten keinen Effekt von SOX11 auf die Viabilität bzw. Proliferation der S462-Zellen nach SOX11-Knockout. (C) Das Ergebnis eines repräsentativen Caspase-Glo[®] 3/7-Assays ($n = 3$) aus fünf unabhängigen Experimenten zeigte eine signifikant erhöhte Induktion von Apoptose nach Knockout von SOX11. Als Positivkontrolle wurden S462^{NTC}-Zellen mit Staurosporin für 6 h behandelt. (D) Im Klonogenitätsassay ($n = 3$) aus zwei unabhängigen Experimenten zeigte sich eine signifikant verminderte Fähigkeit der Kolonienbildung nach SOX11-Knockout. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*). (* p -Wert $< 0,05$; *** p -Wert $< 0,001$). NTC = *non-targeting control*; KO = Knockout, n = Anzahl der Replikate pro Experiment.

Um einen Eindruck der Migrationsfähigkeit der Zellen nach *SOX11*-Knockout zu erhalten habe ich einen Wundheilungsassay durchgeführt und die Zellmigration mittels *Life Cell Imaging* detektiert. Bereits nach 11 h zeigten die $S462^{SOX11-KO}$ -Zellen eine signifikante verminderte Migration im Vergleich zu $S462^{NTC}$ -Zellen (Abbildung 6A). Nach 24 h zeigten $S462^{SOX11-KO}$ -Zellen eine um 23 % verminderte Migration ($p < 0,05$) im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 6A, B). Die beobachtete verminderte Migration gab Anlass, den Einfluss auf die Zelladhäsion näher zu untersuchen. Dazu wurde der *CytoSelect™ Cell Adhesion Assay ECM Array* verwendet. Mit diesem Assay kann die Zelladhäsion an verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix quantifiziert werden. Hierbei zeigten die $S462^{SOX11-KO}$ -Zellen im Vergleich zu den $S462^{NTC}$ -Zellen keine Veränderung im Adhäsionsverhalten an Collagen I, Collagen IV und Fibrinogen. Im Vergleich zu den $S462^{NTC}$ -Zellen zeigten die $S462^{SOX11-KO}$ -Zellen eine leicht verminderte Adhäsion an Fibronectin und Laminin I (Abbildung 6C).

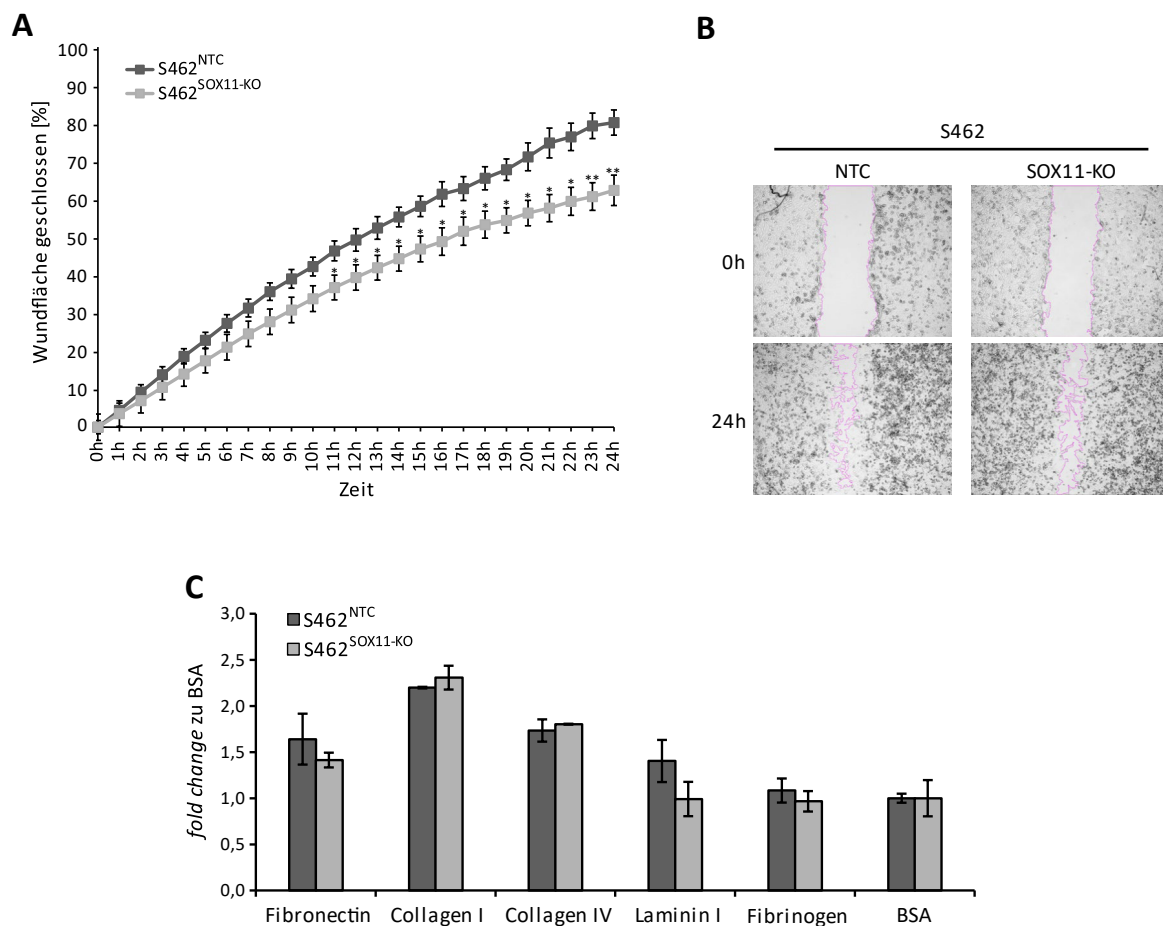


Abbildung 6: Der Einfluss von *SOX11* auf die Zellmigration und Zelladhäsion. (A) Das Ergebnis eines repräsentativen Wundheilungsassays ($n = 6$) aus drei unabhängigen Experimenten zeigt eine verminderte Migration der $S462$ -Zellen nach *SOX11*-Knockout über die Zeit im Vergleich zur Kontrolle. (B) Repräsentative lichtmikroskopische Darstellung des Wundheilungsassays nach 24 h. (C) Im Adhäsionsassay zeigten $S462$ -Zellen nach *SOX11*-Knockout kein abweichendes Adhäsionsverhalten gegenüber Komponenten der extrazellulären Matrix. Der Assay wurde aufgrund des Assaydesigns mit Duplikaten durchgeführt, daher konnte keine Berechnung zur Signifikanz erfolgen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM

(standard error of the mean). (* p -Wert $< 0,05$; ** p -Wert $< 0,01$). BSA = bovine serum albumin ; NTC = non-targeting control; KO = Knockout, n = Anzahl der Replikate pro Experiment.

4.1.4 Transkriptomanalyse nach SOX11-Knockout

Da es sich bei SOX11 um einen Transkriptionsfaktor handelt, der die Expression von Zielgenen durch direkte Promoter-Bindung oder über Interaktion mit anderen Faktoren moduliert, ist die Regulation der Expression diverser Effektorgene in MPNSTs durch SOX11 zu erwarten. Zur Identifizierung dieser Gene wurde eine RNA-Sequenzierung von S462^{SOX11-KO}- und S462^{NTC}-Zellen mit jeweils zwei Replikaten durchgeführt. Von den insgesamt 20.206 detektierbaren Transkripten waren im Vergleich zu den S462^{NTC}-Zellen in den S462^{SOX11-KO}-Zellen 815 Transkripte herunter- und 590 hochreguliert ($FC(\log_2) \leq -1,0$ bzw. $\geq 1,0$; $p \leq 0,05$). Hiervon waren 652 Protein-kodierende Gene, 126 lncRNAs (*long non-coding RNA*), 31 Pseudogene und sechs weitere, nicht-kodierende Transkripte herunterreguliert (Abbildung 7A) sowie 422 Protein-kodierende Gene, 146 lncRNAs, 17 Pseudogene und fünf weitere, nicht-kodierende Transkripte hochreguliert (Abbildung 7B).

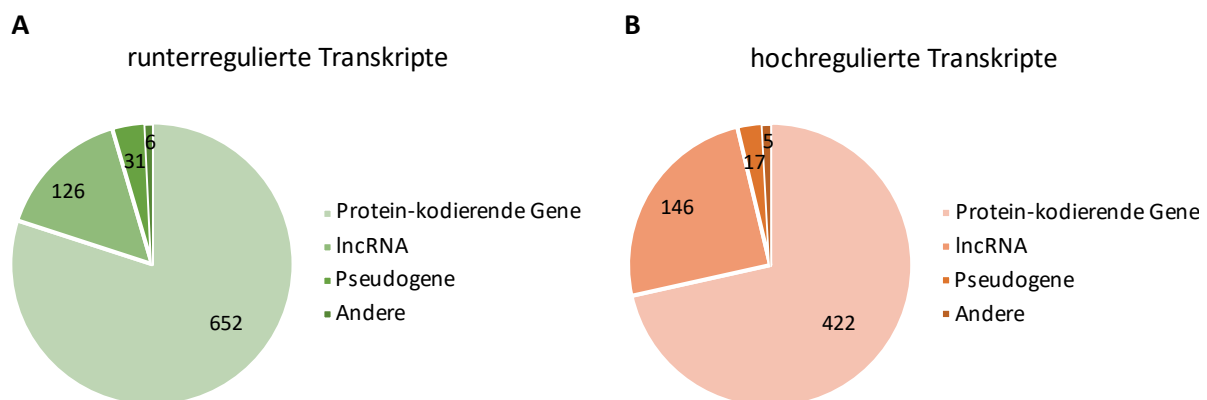


Abbildung 7: Übersicht der differentiell exprimierten Transkripte nach SOX11-Knockout in S462. Anzahl der differentiell exprimierten Transkripte, die in S462^{SOX11-KO}- im Vergleich zu den S462^{NTC}-Zellen (A) runter- (grün) und (B) hochreguliert (rot) waren ($FC(\log_2) \leq -1,0$ bzw. $\geq 1,0$; $p \leq 0,05$).

4.1.4.1 Funktionelle Annotation differentiell exprimierter Gene

Es ist zu erwarten, dass potenzielle SOX11-Zielgene nach SOX11-Knockout eine verminderte Expression zeigen. Daher habe ich zunächst die nach SOX11-Knockout signifikant ($p \leq 0,05$) runterregulierten Protein-kodierenden Gene mit der Datenbank DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*, (Huang da et al., 2009)) charakterisiert. Mit Hilfe der Datenbank UP_tissue (*Uniprot tissue annotation database*) kann ein guter Eindruck zur gewebespezifischen Expression der Gene gewonnen werden. Hierbei zeigte sich unter den nach SOX11-Knockout runterregulierten Genen interessanterweise eine deutliche und signifikante Anreicherung von Genen, die im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert werden. Hierzu zählten Gehirn (314 Gene), fötales Gehirn (42

Gene), Amygdala (36 Gene), Retina (21 Gene), PNS (24 Gene) und Hippocampus (24 Gene, Abbildung 8A). Für die hochregulierten Gene nach *SOX11*-Knockout zeigte sich keine signifikante Anreicherung von Genen, die im neuronalen Gewebe exprimiert werden.

Für die Detektion überrepräsentierter konservierter Transkriptionsfaktor-Bindestellen in den runterregulierten Genen nach *SOX11*-Knockout wurde das DAVID-Tool *UCSC_TFBS* verwendet. Hierbei zeigte sich mit 362 Genen eine signifikante Anreicherung der Konsensus-Bindestelle SRY (Abbildung 8B). Zudem konnte in DAVID mittels der *UP_keywords*-Datenbank eine signifikante Anreicherung von runterregulierten Genen ($n = 61$) detektiert werden, die eine Rolle bei der Zelladhäsion spielen.

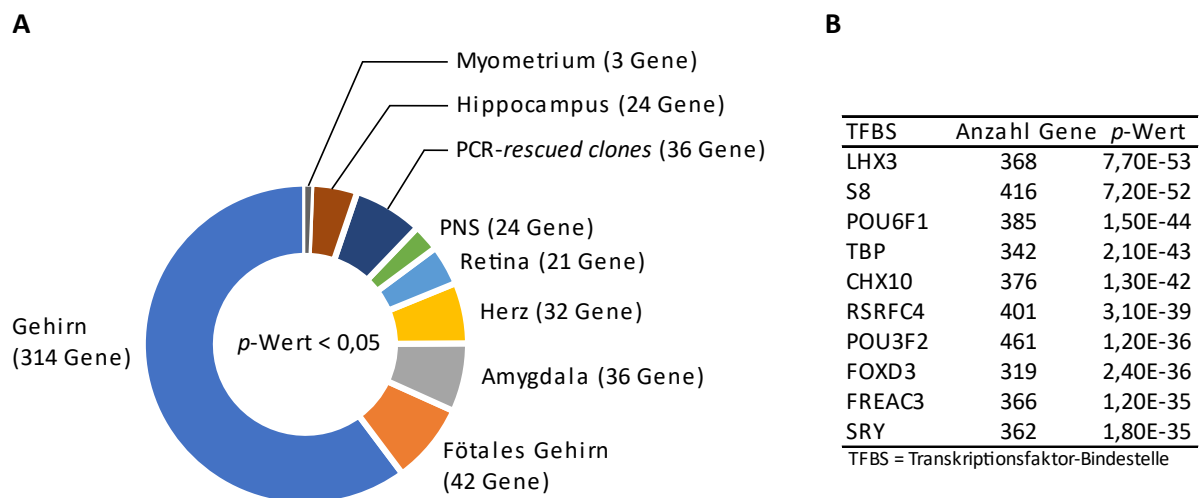
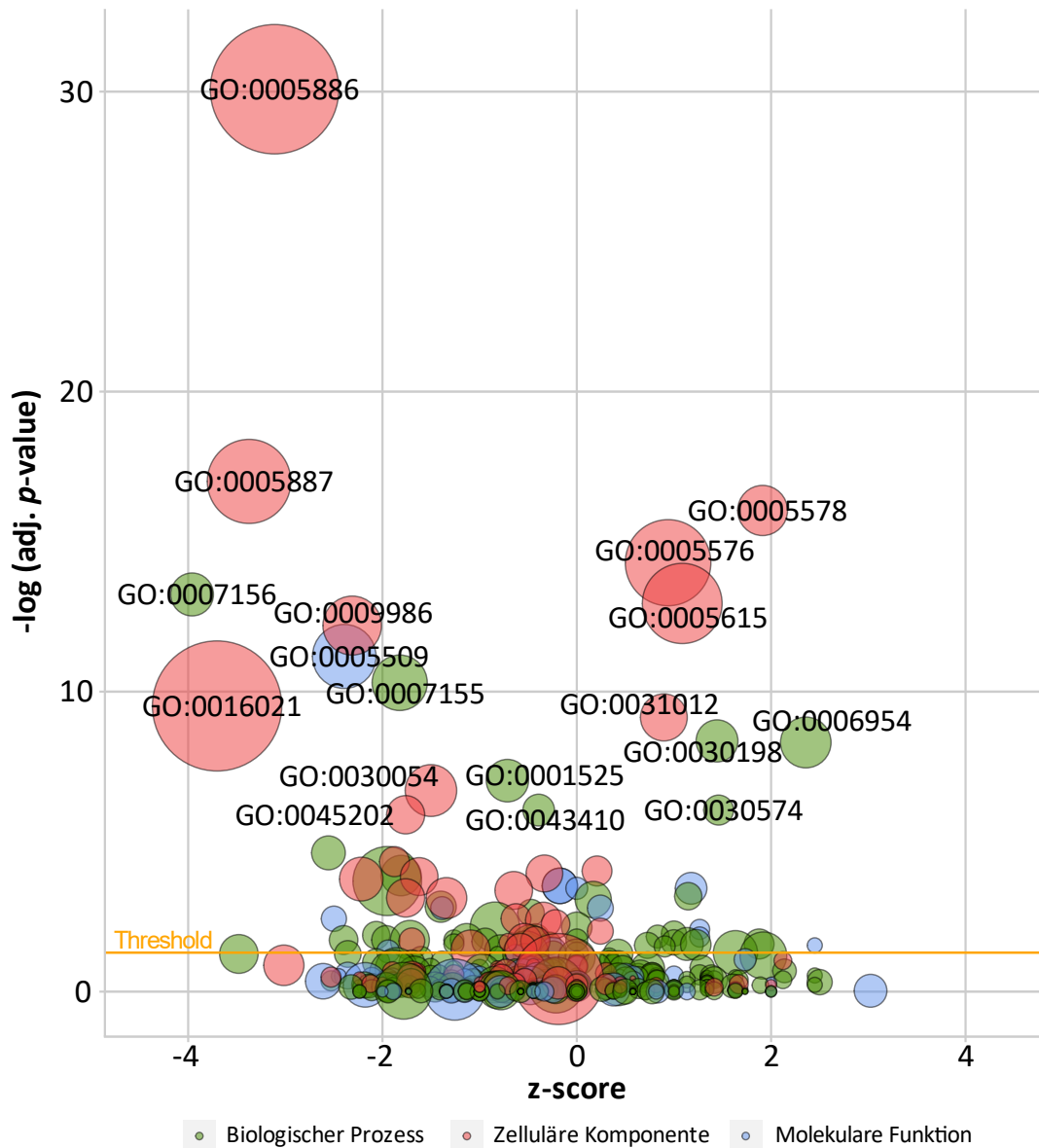


Abbildung 8: Datenbank-Analyse mit DAVID der runterregulierten Gene nach *SOX11*-Knockout in S462. (A) Kreisdiagramm der Annotation runterregulierter Gene in S462^{SOX11-KO}-Zellen auf Gewebespezifität mittels der DAVID *Uniprot tissue* (*UP_tissue*)-Datenbank. Es sind die neun signifikanten ($p < 0,05$) Gewebe und die Anzahl der Gene dargestellt. (B) Tabelle der zehn signifikantesten ($p < 0,05$) Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die in den runterregulierten Genen nach *SOX11*-Knockout angereichert waren. Angegeben sind die Transkriptionsfaktor-Bindestellen mit dem *p*-Wert und die Anzahl der Gene. Für die Analyse wurde das DAVID-Tool *UCSC_TFBS* verwendet. PNS = peripheres Nervensystem.

Um einen Eindruck der biologischen Funktion der nach *SOX11*-Knockout deregulierten Gene zu erhalten, habe ich mittels der DAVID-Datenbank eine funktionelle Annotation durchgeführt. Dazu wurden alle nach *SOX11*-Knockout signifikant ($p \leq 0,05$) runter- und hochregulierten Proteinkodierenden Gene auf angereicherte biologische Funktionen (*GO terms*) hin analysiert. Insgesamt waren 35 *GO terms* angereichert (*adjusted p-value* $< 0,05$; minimale Genanzahl > 3). Davon waren zwölf biologische Prozesse, 18 zelluläre Komponenten und fünf molekulare Funktionen signifikant angereichert. In Abbildung 9 sind die angereicherten *GO terms* in einem Blasendiagramm visualisiert und die signifikantesten *GO terms* in der Tabelle angegeben. Interessanterweise zeigte sich nach *SOX11*-Knockout eine signifikante Runterregulierung von *GO terms* mit Bezug zur Zelladhäsion und Angiogenese. Weitere runterregulierte *GO terms* waren zelluläre Komponenten wie Plasmamembran

und Zellkontakte. Zu den in S462^{SOX11-KO} hochregulierten *GO terms* zählten vorwiegend biologische Prozesse und zelluläre Komponenten mit Bezug zur extrazellulären Matrix.



runterreguliert in S462^{SOX11-KO}

ID	Beschreibung
GO:0005886	Plasmamembran
GO:0005587	integrale Komponente der Plasmamembran
GO:0007156	homophile Zelladhäsion via Plasmamembran-Adhäsion
GO:0005509	Calciumionenbindung
GO:0009986	Zelloberfläche
GO:0007155	Zelladhäsion
GO:0016021	integrale Komponente der Membran
GO:0001525	Angiogenese
GO:0043410	positive Regulation der MAPK-Kaskade
GO:0030054	Zellkontakte
GO:0045202	Synapse

hochreguliert in S462^{SOX11-KO}

ID	Beschreibung
GO:0005578	proteinhaltige extrazelluläre Matrix
GO:0005576	extrazelluläre Region
GO:0005615	extrazellulärer Raum
GO:0030198	extrazelluläre Matrixorganisation
GO:0006954	Entzündungsreaktion
GO:0031012	extrazelluläre Matrix
GO:0030574	Collagen katoboler Prozess

Abbildung 9: Blasendiagramm mit signifikant angereicherten GO terms der runter- und hochregulierten Gene in S462^{SOX11-KO}. Die Größe der Blasen ist proportional zur Anzahl der Gene, die einer der drei Kategorien zugeordnet sind und die Farbe entspricht der Kategorie. GO terms die zur Kategorie biologische Prozesse gehören sind grün, zelluläre Komponenten sind rot

und molekulare Funktionen sind blau dargestellt. Die y-Achse gibt den negativen logarithmischen *adjusted p-value* (*false discovery rate*, FDR) an. Die x-Achse zeigt den durch das R-Paket GOplot (Walter et al., 2015) kalkulierten z-score. Ein negativer z-score zeigt eine Runter- und ein positiver z-score eine Hochregulierung des *GO terms* an. Der Schwellenwert (*threshold*) für die signifikante Anreicherung eines *GO terms* liegt bei einem *adjusted p-value* < 0,05. KO = Knockout.

Um potenzielle SOX11-Zielgene zu identifizieren habe ich in einem nächsten Schritt die aus der RNA-Sequenzierung erhaltenen deregulierten Protein-kodierenden Gene auf zwei Arten ausgewertet: (I) im Kontext mit einer positiven Korrelation in primären MPNSTs und (II) im Kontext mit Sarkomen und bekannten SOX11-Zielgenen.

4.1.4.2 Identifikation potenzieller SOX11-Zielgene mit einer positiven Korrelation in primären MPNSTs

Zur Identifikation potenzieller SOX11-Zielgene, die auch in primären MPNSTs exprimiert werden und mit der *SOX11*-Expression korrelieren, habe ich zunächst die differentiell exprimierten Protein-kodierende Gene ($FC(\log_2) \leq -1,0$ bzw. $\geq 1,0$; $p \leq 0,05$) mit bereits vorhanden Expressionsdaten von 11 primären MPNSTs verglichen (Renner et al., 2013). Hierbei fand ich 26 runter- und 23 hochregulierte Gene, die eine positive Korrelation mit der *SOX11*-Expression in primären MPNSTs zeigten (Abbildung 10A, B). Exemplarisch wurden neun runterregulierte Gene (*CDH2*, *TRIB2*, *FBN2*, *SEMA6A*, *VANGL2*, *TMSB15A*, *GAS1*, *FZD1* und *SOX4*) für die Verifizierung selektiert und die Expressionslevel mittels qPCR bestimmt (Abbildung 10B, C). Alle neun Transkripte zeigten eine verminderte Expression in den S462^{SOX11-KO}- im Vergleich zu den S462^{NTC}-Zellen (Abbildung 10C). Hervorzuheben ist hier *CDH2* (N-Cadherin), welches die Zell-Zell-Adhäsion vermittelt und in der RNA-Sequenzierung eine um den Faktor 23 und in der qPCR eine um den Faktor 55 verringerte Expression zeigte. Darüber hinaus korreliert die Expression von *CDH2* und *SOX11* in den primären MPNSTs mit einem Korrelationseffizient von 0,3.

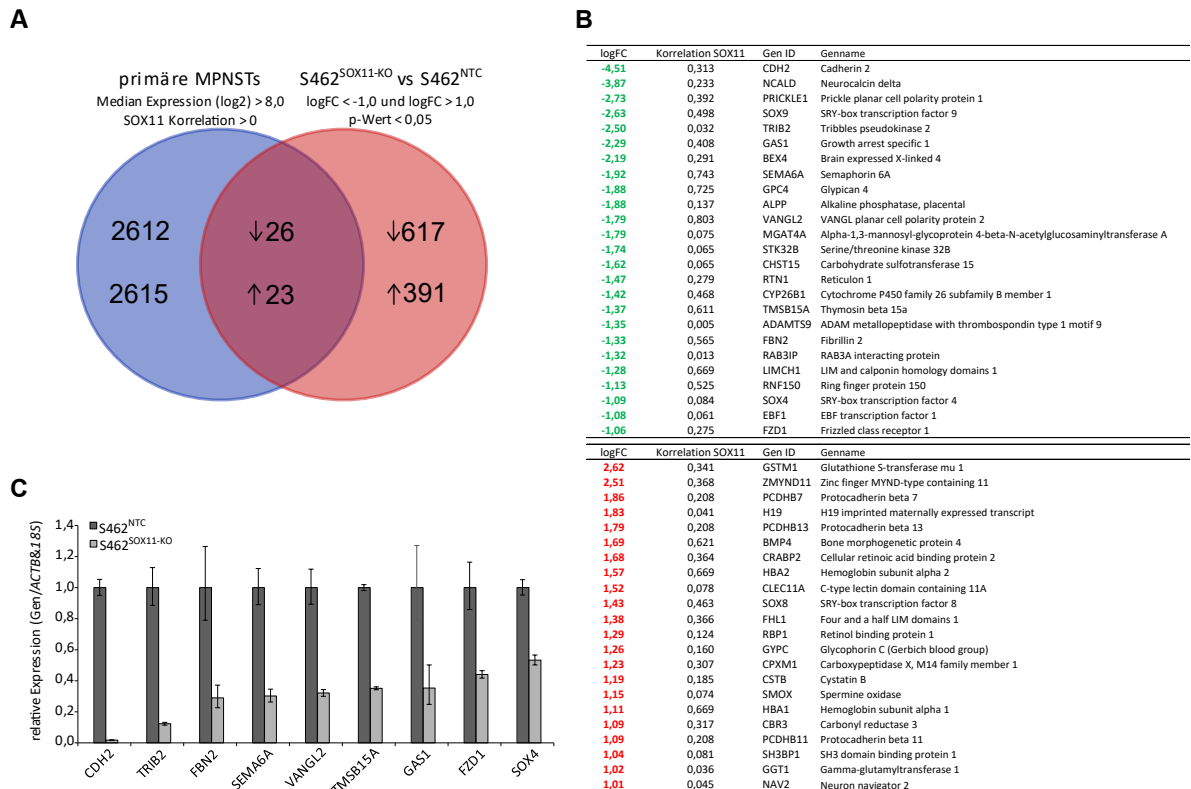


Abbildung 10: Potenzielle SOX11-Zielgene mit positiver Korrelation zu primären MPNSTs. (A) Venn-Diagramm der überlappenden exprimierten Transkripte zwischen primären MPNSTs (blau) und den differentiell exprimierten Transkripte von S462^{SOX11-KO} versus S462^{NTC} (rot). (B) Potenzielle SOX11-Zielgene aus der Überlappung der RNA-Seq-Daten nach SOX11-Knockout in S462 und der SOX11-Expression in primären MPNST. Selektiert wurden herunter (grün)- und hochregulierte (rot) Transkripte die eine positive Korrelation mit der SOX11-Expression in primären MPNST zeigen. (C) Verifizierung von neun Transkripten mittels qPCR, die nach SOX11-Knockout in S462 verringert exprimiert wurden (logFC ≤ -1,0) und in den primären MPNSTs eine hohe Expression (Median Expression (log₂) > 8,0) zeigten. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*). NTC = *non-targeting control*; KO = Knockout.

4.1.4.3 Identifikation potenzieller SOX11-Zielgene im Kontext mit Sarkomen und bekannten SOX11-Zielgenen

In einem nächsten Schritt habe ich die runter- und hochregulierten Protein-kodierenden Gene betrachtet und nach Genen gefiltert, die bereits im Kontext mit Sarkomen oder als potenzielle SOX11-Zielgene beschrieben wurden. Unter diesen runterregulierten Genen waren unter anderem *NKX2-2* und *CD24*. *NKX2-2* kodiert für einen Transkriptionsfaktor und wurde bereits als ein Zielgen des in Ewing-Sarkomen pathognomonischen *EWSR1-/FLI1-Fusionsproteins* beschrieben (Smith et al., 2006). *CD24* ist ein Oberflächenprotein, das über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI-)Anker in der Zellmembran verankert ist und war in Vorarbeiten von Dr. Marcus Renner und Dr. Patrick Neubert nach Überexpression von *SOX11* in der MLS-Zelllinie MLS-1765 hochreguliert (Neubert, 2016).

Exemplarisch habe ich weitere Gene (*EPHB1*, *KDR*, *NELL2*, *FZD8*, *THBS1*, *FN1*, *CDH5*, *SYK*, *NTSR1*, *NRP2*, *CASP4*) für die Verifizierung der Ergebnisse aus der RNA-Sequenzierung selektiert und die Expressionslevel mittels qPCR bestimmt (Abbildung 11B, C). Die qPCR-Analyse bestätigte die Runterregulierung der zehn Transkripte in S462^{SOX11-KO} im Vergleich zu S462^{NTC} (Abbildung 11B), sowie die Hochregulierung der drei Transkripte (Abbildung 11C). Hierbei fiel insbesondere *KDR* auf, welches in der RNA-Sequenzierung eine um den Faktor 30 und in der qPCR eine um den Faktor 40 verringerte Expression zeigte. *KDR* kodiert für die Rezeptor-Tyrosinkinase VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), die eine maßgebliche Rolle bei der Angio- und Vaskulogenese spielt (Wang et al., 2020). In Abbildung 11A sind die selektierten Transkripte mit dem jeweiligen log FC- (*fold change*) und *p*-Wert tabellarisch dargestellt. Zur Verifizierung der Ergebnisse habe ich die Proteinexpression einiger Kandidaten mittels Western Blotting überprüft. Das potenzielle Zielgen *NKX2-2* zeigte dabei in den S462^{SOX11-KO}-Zellen eine schwächere Proteinbande als in den S462-Kontrollzellen (Abbildung 11D). Eine schwächere Proteinbande nach *SOX11*-Knockout konnte auch für *SYK* detektiert werden (Abbildung 11E). Zudem zeigten die S462^{SOX11-KO}-Zellen eine erhöhte Phosphorylierung für *SYK* an der Position Tyr525/526 im Vergleich zu S462^{NTC}-Zellen. *SYK* ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase und eine erhöhte Phosphorylierung mit resultierender Hyperaktivierung von *SYK* wurde bereits in Ewing Sarkomen beschrieben (Sun et al., 2017). Nach *SOX11*-Knockout in den S462-Zellen konnte eine erhöhte Proteinexpression an *CASP4* detektiert werden (Abbildung 11F). Im Vergleich zu den S462^{NTC}-Zellen, die eine kräftige Expression von VEGFR2 zeigten, konnte in den S462-Zellen nach *SOX11*-Knockout kein VEGFR2 mehr nachgewiesen werden (Abbildung 11G). Dieses Ergebnis entspricht somit den Ergebnissen aus der RNA-Sequenzierung bzw. der qPCR. Nach Knockout von *SOX11* in den S462-Zellen wird demnach neben *KDR* auch das Proteinprodukt VEGFR2 stark vermindert exprimiert. Um einen Eindruck der Expression von VEGFR2 in MPNSTs zu erhalten, wurde das Kollektiv mit 14 MPNST-Patienten immunhistochemisch analysiert. Hierbei zeigten die Tumorzellen überwiegend um die Gefäße herum fokal eine teilweise kräftige Expression von VEGFR2 (Abbildung 11H).

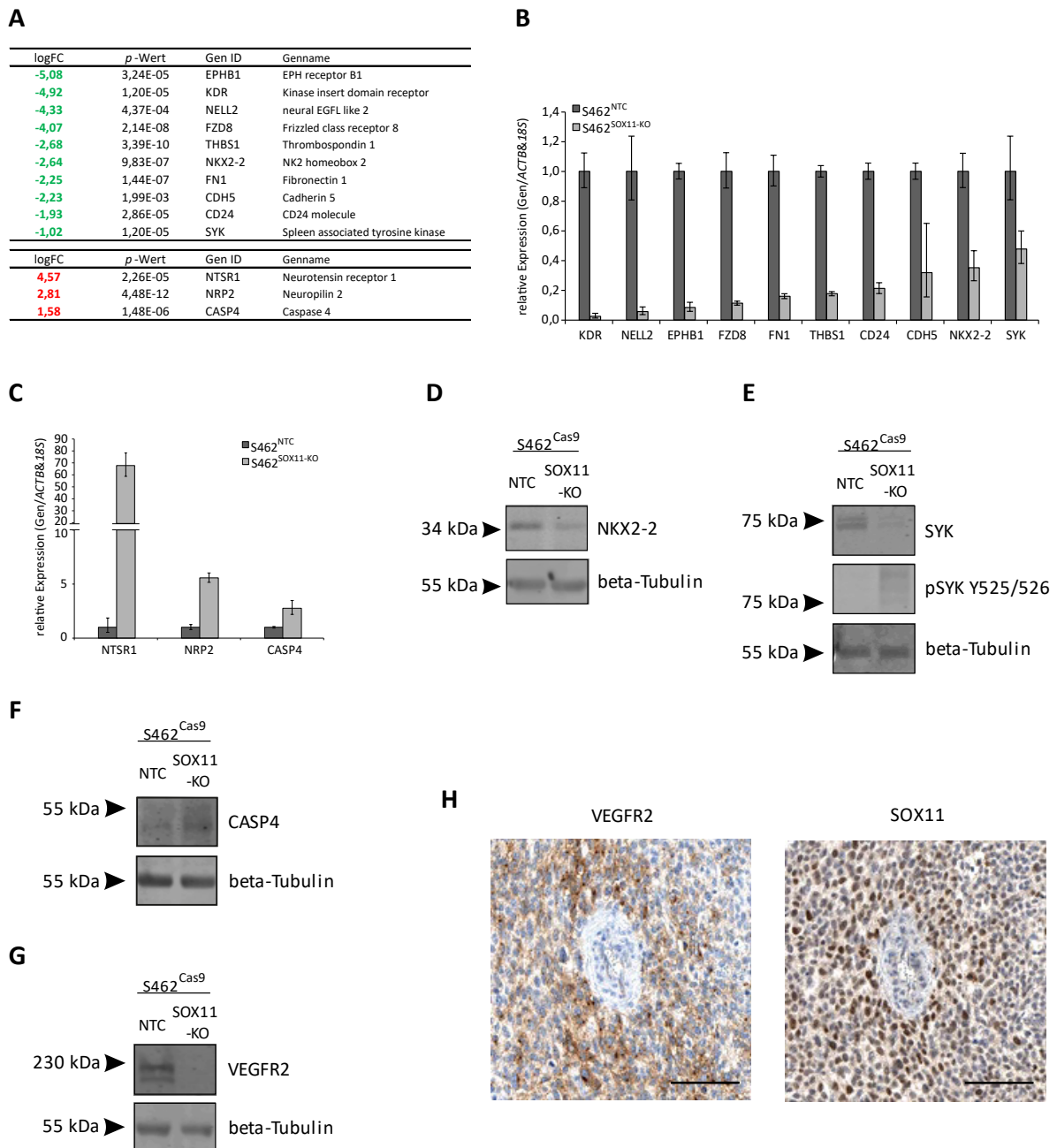


Abbildung 11: Verifizierung potenzieller SOX11-Zielgene in MPNSTs. (A) Potenzielle SOX11-Zielgene aus den RNA-Sequenzierungsdaten, die nach SOX11-Knockout in S462 im Vergleich zur Kontrolle (S462^{NTC}) runter- oder hochreguliert waren. Selektiert wurden Transkripte mit negativem logFc $\leq -1,0$ (grün) bzw. mit positivem logFc $\geq 1,0$ (rot) und einem p-Wert $\leq 0,05$. Verifizierung von Transkripten mittels qPCR, die nach SOX11-Knockout in S462 (B) verstärkt bzw. (C) vermindert exprimiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*). (D) Verifizierung der Proteinexpression von NKX2-2 mittels Western Blotting sowie von (E) SYK und phosphoryliertem SYK (Tyr525/526). (F) Nach SOX11-Knockout zeigte sich eine verstärkte Proteinexpression von CASP4. (G) Im Western Blotting ist in den S462-Zellen nach SOX11-Knockout keine Expression von VEGFR2 mehr detektierbar. (H) Immunhistochemisch zeigen in einem MPNST die Tumorzellen in Nachbarschaft eines Gefäßes (zentral) fokal eine kräftige VEGFR2-Expression bei gleichzeitig vorliegender kräftiger nukleärer SOX11-Expression (schwarze Balken jeweils 100 μm). FC = *fold change*; NTC = *non-targeting control*; KO = Knockout.

4.1.4.4 Verifizierung von *NKX2-2*, *CD24*, *KDR* und *SYK* als *SOX11*-Zielgene in MPNSTs

Um einen Hinweis über die Protein-DNA-Interaktion von *SOX11* mit den regulatorischen DNA-Abschnitten von *NKX2-2*, *SYK*, *KDR* und *CD24* zu erhalten, habe ich mit den S462^{NTC}-Zellen eine Chromatinimmunpräzipitation mit anschließender qPCR (ChIP-qPCR) durchgeführt. Aufgrund der sehr hohen Sequenzhomologie der *SOX*-Familienmitglieder *SOX4*, *SOX11* und *SOX12* wurde zunächst ein Antikörper gesucht, der spezifisch *SOX11* erkennt. Insgesamt wurden 10 Antikörper zuvor in eigenen Vorarbeiten unter Verwendung von rekombinantem *SOX4*-, *SOX11*- und *SOX12*-Protein mittels Western Blotting auf ihre Spezifität für *SOX11* überprüft. Hierbei zeigte der *SOX11*-Antikörper EPR8192 (ab134107) eine sehr hohe Spezifität für *SOX11* ohne Kreuzreaktivität für *SOX4* oder *SOX12*. Zur Identifizierung von *SOX11*-Bindestellen habe ich die Promotorregionen von *NKX2-2*, *SYK*, *KDR* und *CD24* *in silico* mittels der JASPAR-Datenbank (<http://jaspar.genereg.net>) auf Konsensusbindestellen für *SOX11* (humanes *SRY*) untersucht. Für die Bindestellen mit den höchsten Scores wurden Primer designed und eine qPCR mit DNA aus S462^{NTC} durchgeführt. Für *NKX2-2* konnten zwei, für *CD24* sechs, für *KDR* vier und für *SYK* drei (Promoter 1) bzw. fünf (Promotor 2) Bindestellen erfolgreich amplifiziert werden (grüne Dreiecke in Abbildung 12A – D, oben). Anschließend habe ich eine qPCR mit DNA von S462^{NTC} durchgeführt, die zuvor mit dem *SOX11*-Antikörper bzw. mit dem IgG-Antikörper als Negativkontrolle immunpräzipitiert wurde. Als Kontrolle diente mit den jeweiligen Antikörpern immunpräzipitierte DNA von S462^{SOX11-KO}. Im Vergleich zur IgG-Kontrolle zeigte sich für alle untersuchten *SOX11*-Bindestellen in den Promotoren von *NKX2-2*, *SYK*, *KDR* und *CD24* eine verstärkte Anreicherung der *SOX11*-Bindestellen in der Promotorregion von *NKX2-2*, *SYK*, *KDR* und *CD24* (Abbildung 12A – D). Die immunpräzipitierte DNA von S462^{SOX11-KO} zeigte keine Anreicherung.

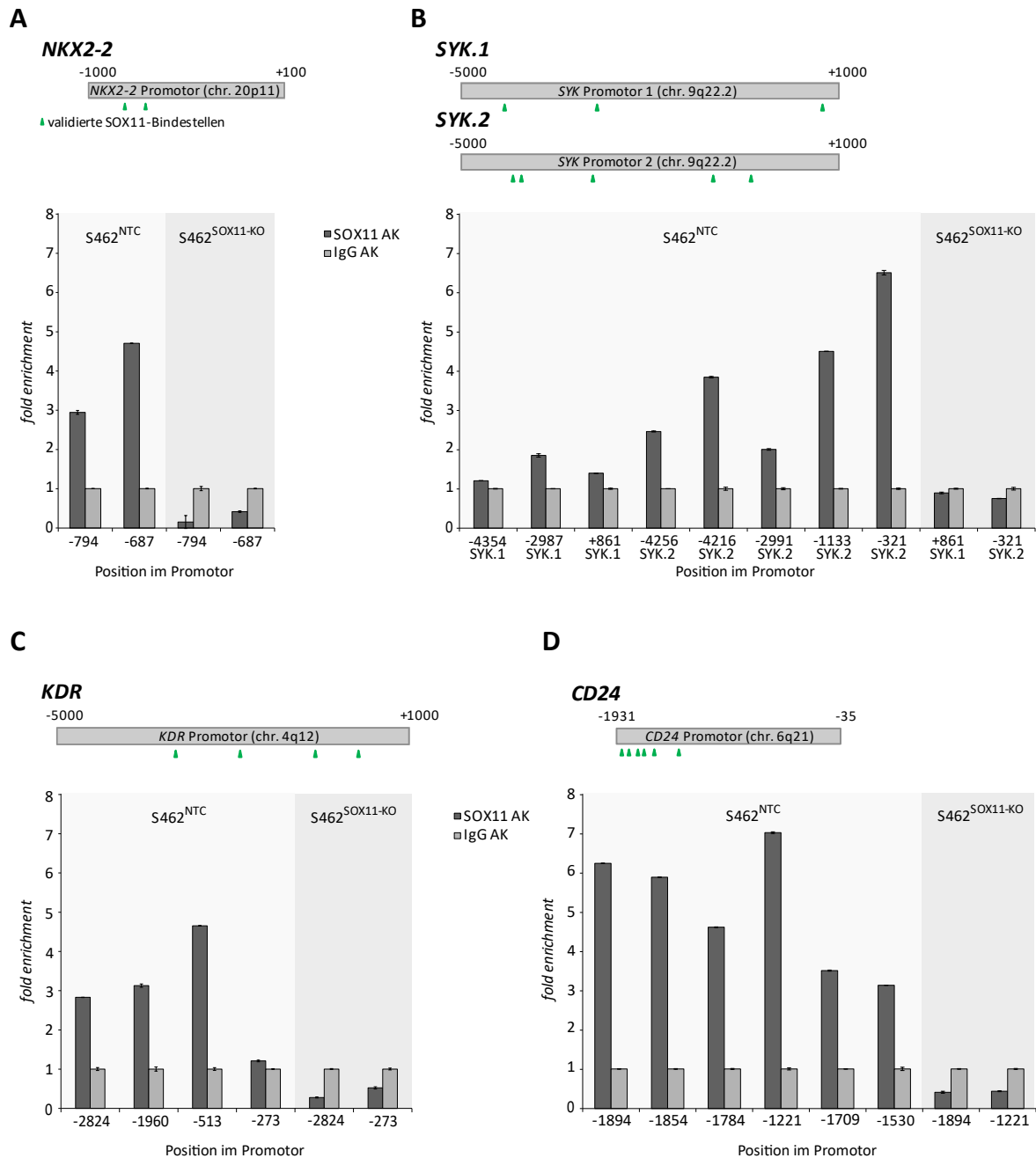


Abbildung 12: ChIP-qPCR-Ergebnisse der SOX11-Zielgene *NKX2-2*, *SYK*, *KDR* und *CD24* in der MPNST-Zelllinie S462. Verifizierung von (A, unten) *NKX2-2*, (B, unten) *SYK*, (C, unten) *KDR* und (D, unten) *CD24* mittels ChIP-qPCR von S462^{NTC}. Als Kontrolle wurde immunpräzipitierte DNA von S462^{SOX11-KO} verwendet. Schematische Darstellung der validierten SOX11-Bindestellen (grüne Dreiecke) in der Promotorregion von (A, oben) *NKX2-2*, (B, oben) *SYK*, (C, oben) *KDR* und (D, unten) *CD24*. Die grünen Dreiecke repräsentieren die zur Verifizierung verwendeten SOX11-Bindestellen. AK = Antikörper; NTC = *non-targeting control*; KO = Knockout.

4.1.5 Der Einfluss von SOX11 auf den VEGF-Signalweg

Mit der Identifizierung von *KDR* als direktes Zielgen von SOX11 in MPNSTs stellte sich die Frage nach einer Aktivitätsänderung des VEGFR2-Signalwegs durch SOX11. Hierfür habe ich den *VEGF Pathway*

Phospho Antibody Array (Full Moon BioSystems) verwendet, welcher neben Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von VEGFR2 auch den Phosphorylierungsstatus von 46 weiteren Faktoren des VEGF-Signalweges detektiert. Nach *SOX11*-Knockout zeigten 18 Phosphorylierungsstellen eine erhöhte (*Ratio Change* > 2,0) und 25 Phosphorylierungsstellen eine verringerte (*Ratio Change* < 0,5) Phosphorylierung (Tabelle 28). Von den insgesamt fünf VEGFR2-Phosphorylierungsstellen, die durch den Array detektiert werden konnten, zeigte sich nach *SOX11*-Knockout interessanterweise eine um den Faktor 50 (*Ratio Change*: 0,02) verringerte Phosphorylierung an der Position Tyr1059, die in der Literatur als aktivierend beschrieben wurde (Dougher & Terman, 1999). Weiterhin war VEGFR2 verstärkt phosphoryliert an den beiden Stellen Tyr1054 (*Ratio Change*: 2,63) und Tyr1214 (*Ratio Change*: 3,13). Src, ein bekanntes Proto-Onkogen, war verstärkt an der Position Tyr529 phosphoryliert. Die stärkste Phosphorylierung auf dem Array konnte für Raf1 an der Position Ser338 (*Ratio Change*: 17,70) detektiert werden.

Tabelle 28: Einfluss von *SOX11* auf den Phosphorylierungsstatus von Faktoren des VEGF-Signalwegs. Nach *SOX11*-Knockout zeigte sich eine erhöhte Phosphorylierung (*Ratio Change* > 2,0; rot) an 18 und eine verringerte Phosphorylierung (*Ratio Change* < 0,5; grün) an 25 Phosphorylierungsstellen. Angegeben ist zudem für jede Phosphorylierungsstelle der Einfluss der Phosphorylierung auf das Protein (aktiviert oder inhibiert) mit dazugehöriger Referenz.

Antikörper (Phosphorylierungsstelle)	<i>Ratio Change</i> S462 ^{SOX11-KO} /S462 ^{NTC}	Phosphorylierung aktiviert/inhibiert	Referenz
AKT (Phospho-Thr308)	0,46	aktiviert	(Alessi et al., 1996)
AKT2 (Phospho-Ser474)	3,28	aktiviert	(Alessi et al., 1996)
Caspase 9 (Phospho-Tyr153)	0,27	aktiviert	(Raina et al., 2005)
Elk1 (Phospho-Ser389)	0,45	aktiviert	(Yang et al., 1999)
eNOS (Phospho-Ser1177)	2,13	aktiviert	(Chen et al., 1999)
eNOS (Phospho-Ser615)	0,23	aktiviert	(Michell et al., 2002)
eNOS (Phospho-Thr495)	4,70	inhibiert	(Chen et al., 1999)
FAK (Phospho-Tyr397)	6,09	aktiviert	(Schaller et al., 1994)
FAK (Phospho-Tyr407)	0,43	inhibiert	(Lim et al., 2007)
FAK (Phospho-Tyr861)	3,17	aktiviert	(Lim et al., 2007)
FKHR (Phospho-Ser256)	0,47	inhibiert	(Zhang et al., 2002)
GAB2/GRB2-associated binding protein 2 (Phospho-Ser159)	0,41	inhibiert	(Lynch & Daly, 2002)
GTPase activating protein (Phospho-Ser387)	9,24	aktiviert	(Minoshima et al., 2003)
HSP27 (Phospho-Ser78)	0,07	aktiviert	(Landry et al., 1992)
HSP90 co-chaperone Cdc37 (Phospho-Ser13)	4,59	aktiviert	(Shao et al., 2003)
HSP90B (Phospho-Ser254)	0,27	inhibiert	(Ogiso et al., 2004)
MEK1 (Phospho-Ser217)	4,01	aktiviert	(Alessi et al., 1994)
MEK1 (Phospho-Thr286)	0,34	inhibiert	(Sharma et al., 2002)
MEK1 (Phospho-Thr291)	0,23	inhibiert	(Mansour et al., 1994)
MEK2 (Phospho-Thr394)	0,13	aktiviert	(Annunziata et al., 2020)
MKK3 (Phospho-Ser189)	0,28	aktiviert	(Raingeaud et al., 1995)

MKK3/MAP2K3 (Phospho-Thr222)	0,46	aktiviert	(Raingeaud et al., 1995)
P38 MAPK (Phospho-Tyr182)	0,15	aktiviert	(New et al., 1998)
p44/42 MAP Kinase (Phospho-Tyr204)	0,23	aktiviert	(Kinoshita et al., 2008)
PKC alpha (Phospho-Tyr657)	2,66	aktiviert	(Kawakami et al., 2003)
PKC alpha/beta II (Phospho-Thr638)	0,27	aktiviert	(Keranen et al., 1995)
PKC beta/PKCB (Phospho-Ser661)	2,39	aktiviert	(Keranen et al., 1995)
PKC theta (Phospho-Ser676)	0,24	aktiviert	(Liu et al., 2002)
PKC zeta (Phospho-Thr410)	0,27	aktiviert	(Standaert et al., 1999)
PLC-gamma 1 (Phospho-Tyr771)	0,39	aktiviert	(Wahl et al., 1990)
PLC-gamma 1 (Phospho-Tyr783)	3,91	aktiviert	(Kim et al., 1990)
PLC-gamma 2 (Phospho-Tyr753)	0,14	aktiviert	(Rodriguez et al., 2001)
Raf1 (Phospho-Ser259)	0,41	inhibiert	(Zimmermann & Moelling, 1999)
Raf1 (Phospho-Ser338)	17,70	aktiviert	(Chong et al., 2001)
Raf1 (Phospho-Tyr341)	2,92	aktiviert	(Chong et al., 2001)
Raf1(Phospho-Ser621)	2,57	inhibiert	(Sprenkle et al., 1997)
Ras-GRF1 (Phospho-Ser916)	0,33	aktiviert	(Mattingly, 1999)
Shc (Phospho-Tyr349)	0,09	aktiviert	(van der Geer et al., 1996)
Src (Phospho-Tyr529)	4,66	inhibiert	(Hunter, 1987)
VEGFR1 (Phospho-Tyr1333)	2,33	aktiviert	(Ito et al., 1998)
VEGFR2 (Phospho-Tyr1054)	2,63	aktiviert	(Dougher & Terman, 1999)
VEGFR2 (Phospho-Tyr1059)	0,02	aktiviert	(Dougher & Terman, 1999)
VEGFR2 (Phospho-Tyr1214)	3,13	aktiviert	(Takahashi et al., 2001)

Zur Bestätigung der Ergebnisse des VEGF Phospho-Arrays habe ich exemplarisch für VEGFR2 und Src den Phosphorylierungsstatus ausgewählter Positionen mittels Western Blotting detektiert. Wie bereits in Abschnitt 4.1.4.3 beschrieben, wiesen die S462-Zellen nach *SOX11*-Knockout kein VEGFR2-Protein mehr auf. Im Hinblick auf die Phosphorylierungsstellen von VEGFR2 zeigten die Zellen nach *SOX11*-Knockout eine verstärkte Phosphorylierung von VEGFR2 an Position Tyr1054 (Abbildung 13A). Die S462^{SOX11-KO}-Zellen zeigten keine Phosphorylierung an Position Tyr1059 im Vergleich zu den Kontrollzellen, die eine schwache Proteinbande zeigten. Sowohl in den S462^{SOX11-KO}- als auch in den S462^{NTC}-Zellen konnte ich mit dem verwendeten Antikörper keine Phosphorylierung an Position Tyr1214 detektieren. Für Src konnte eine verstärkte Phosphorylierung an den beiden Positionen Tyr529 und Tyr418 in S462^{SOX11-KO}- im Vergleich zu S462^{NTC}-Zellen detektiert werden (Abbildung 13B). Auch zeigte Src eine geringfügig schwächere Proteinbande nach *SOX11*-Knockout. In den RNA-Sequenzierungsdaten war *SRC* jedoch nicht differentiell exprimiert.

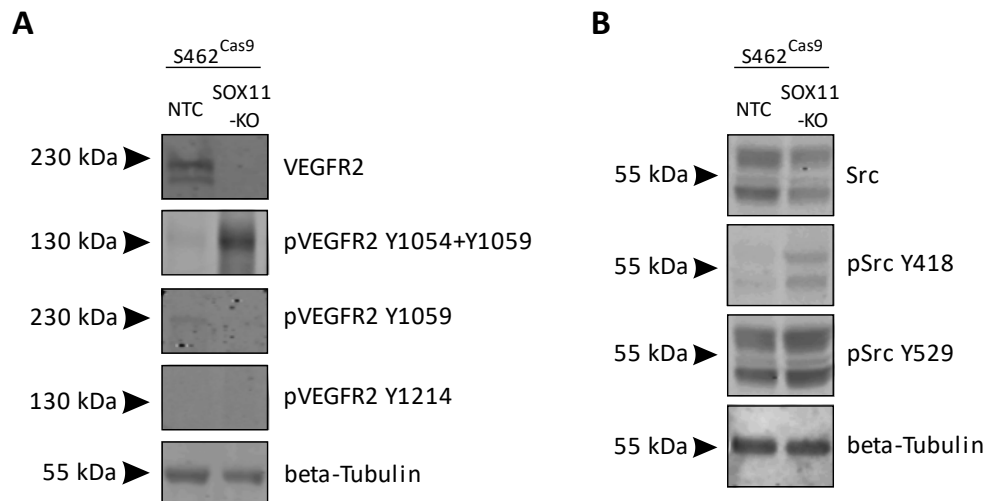


Abbildung 13: Phosphorylierungsstatus von VEGFR2 und Src nach SOX11-Knockout. (A) Im Western Blot bestätigte sich zunächst eine verminderte Expression von VEGFR2 nach SOX11-Knockout. An Position Tyr1054 zeigte sich eine verstärkte und an Position Tyr1059 eine verminderte Phosphorylierung. Es konnte keine Phosphorylierung an Position Tyr1214 in S462^{SOX11-KO}- oder S462^{NTC}-Zellen detektiert werden. (B) Bei Src konnte in S462^{SOX11-KO}-Zellen eine deutlich verstärkte Phosphorylierung an Position Tyr418 und eine leicht verstärkte Phosphorylierung an Position Tyr529 detektiert werden. NTC = *non-targeting control*; KO = Knockout; Y = Tyrosin (Tyr); p = phosphoryliert.

Da Proteine durch Phosphorylierung sowohl aktiviert als auch inhibiert werden können, stellte sich die Frage, welchen Einfluss die verschiedenen Phosphorylierungsänderungen nach SOX11-Knockout in Summe auf die Aktivität des VEGF-Signalweges ausüben. Um alle Phosphorylierungsänderungen zu integrieren, zu interpretieren und zu visualisieren habe ich die Ergebnisse des VEGF-Phospho-Arrays mit QIAGEN *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) analysiert. Es konnte dabei eine Inhibition des kanonischen VEGF-Signalweges (*VEGF Family Ligand-Receptor Interactions*) festgestellt werden. Hierbei fallen vor allem die verringerte Phosphorylierung von SHC (Tyr349), MEK1 (Thr291), MEK2 (Thr394), ERK1/2 (Tyr204) und VEGFR2 (Tyr1059) ins Gewicht. Eine Visualisierung der durch IPA vorhergesagten Inhibition des VEGF-Signalweges ist in Abbildung 14 dargestellt. Zu beachten ist jedoch, dass bei der IPA-Analyse für Proteine mit mehreren Phosphorylierungsstellen nur die Stelle mit dem dominanten Maximalwert herangezogen wird.

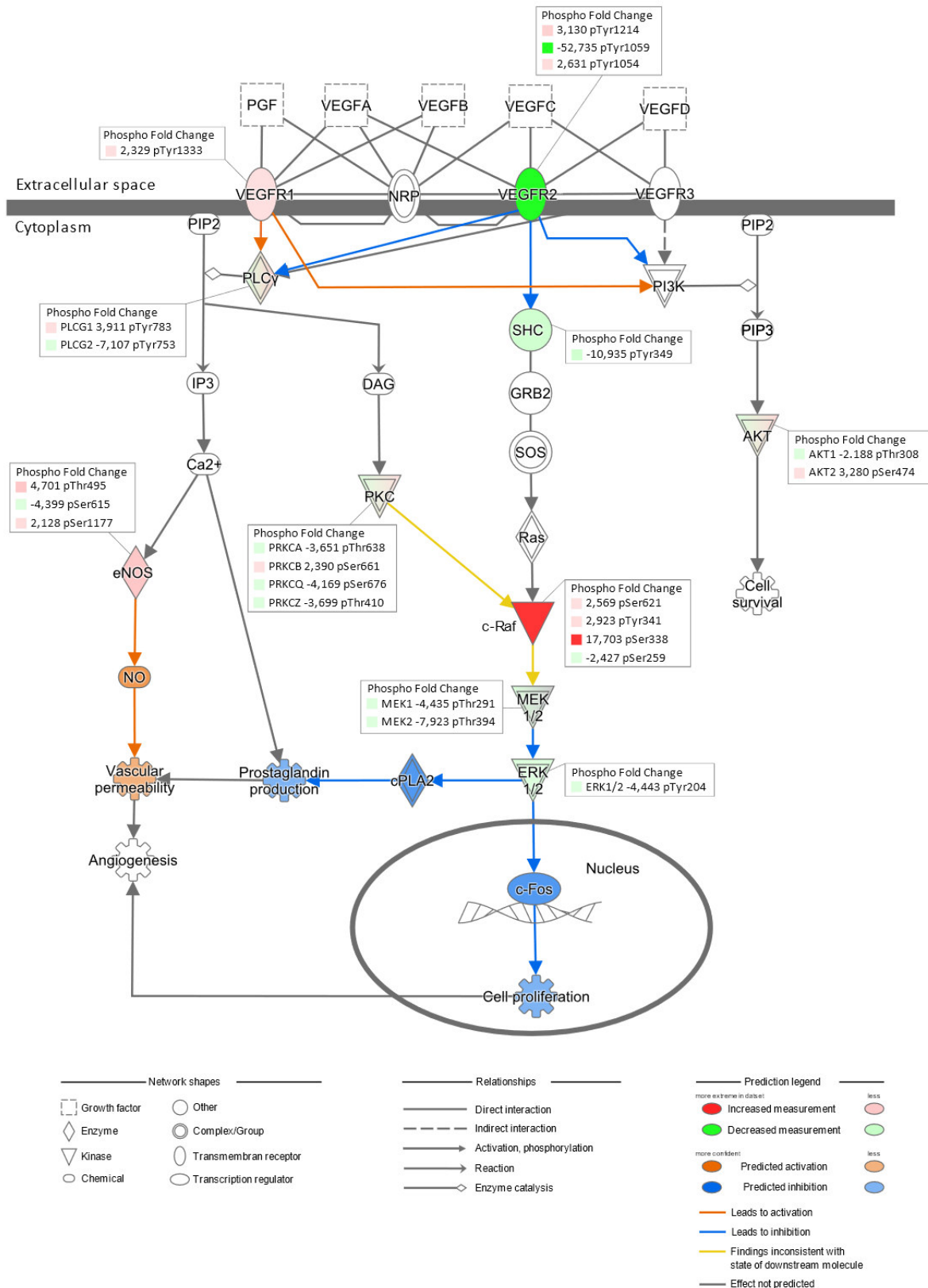


Abbildung 14: Inhibierung des VEGF-Signalweges nach SOX11-Knockout. Die kanonische Signalweg-Analyse der Daten des VEGF-Phospho-Arrays ergab eine Inhibierung des VEGF Family Ligand-Receptor Interactions Signalwegs nach Knockout von SOX11 in S462. Die errechnete Phospho-Ratio wurde von der Software QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (IPA) in Phospho-

Fold Change unter Verwendung der Formel $(-1/x)$ für alle Werte $< 0,5$ umgewandelt. Der kanonische Signalweg wurde in IPA generiert und anschließend modifiziert.

4.1.5.1 Der Einfluss von SOX11 auf die Sensitivität gegenüber Multikinase-Inhibitoren in MPNSTs

Die Identifizierung von *KDR* als potenzielles SOX11-Zielgen und der aktivierende Einfluss von SOX11 auf den VEGF-Signalweg, waren Anlass VEGFR2 im Hinblick auf dessen therapeutische Relevanz für Patienten mit MPNST näher zu untersuchen. Es wurden mit Sunitinib, Cabozantinib und Pazopanib drei anti-angiogenetische Multikinase-Inhibitoren (MKIs) ausgewählt, bei denen sich VEGFR2 im Wirkspektrum befindet und die in Deutschland für die Behandlung diverser Tumoren (u. a. Pazopanib in WGS) zugelassen sind. Nach Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der drei MKIs und Bestimmung der Viabilität zeigten die S462^{SOX11-KO}-Zellen im Vergleich zu den S462^{NTC}-Zellen leicht höhere IC₅₀-Werten gegenüber Sunitinib (IC₅₀ = 2,5 vs. 1,0; Abbildung 15A) und Pazopanib (IC₅₀ = 3,6 vs. 1,4; Abbildung 15C) und keinen Effekt bei Cabozantinib (IC₅₀ = 1,9 vs. 1,4; Abbildung 15B). Ich konnte somit zeigen, dass in der MPNST-Zelllinie S462 nach SOX11-Knockout bei geringerer Aktivität des VEGF-Signalweges eine leicht verminderte Sensitivität gegenüber den klinisch relevanten MKIs Sunitinib und Pazopanib vorliegt.

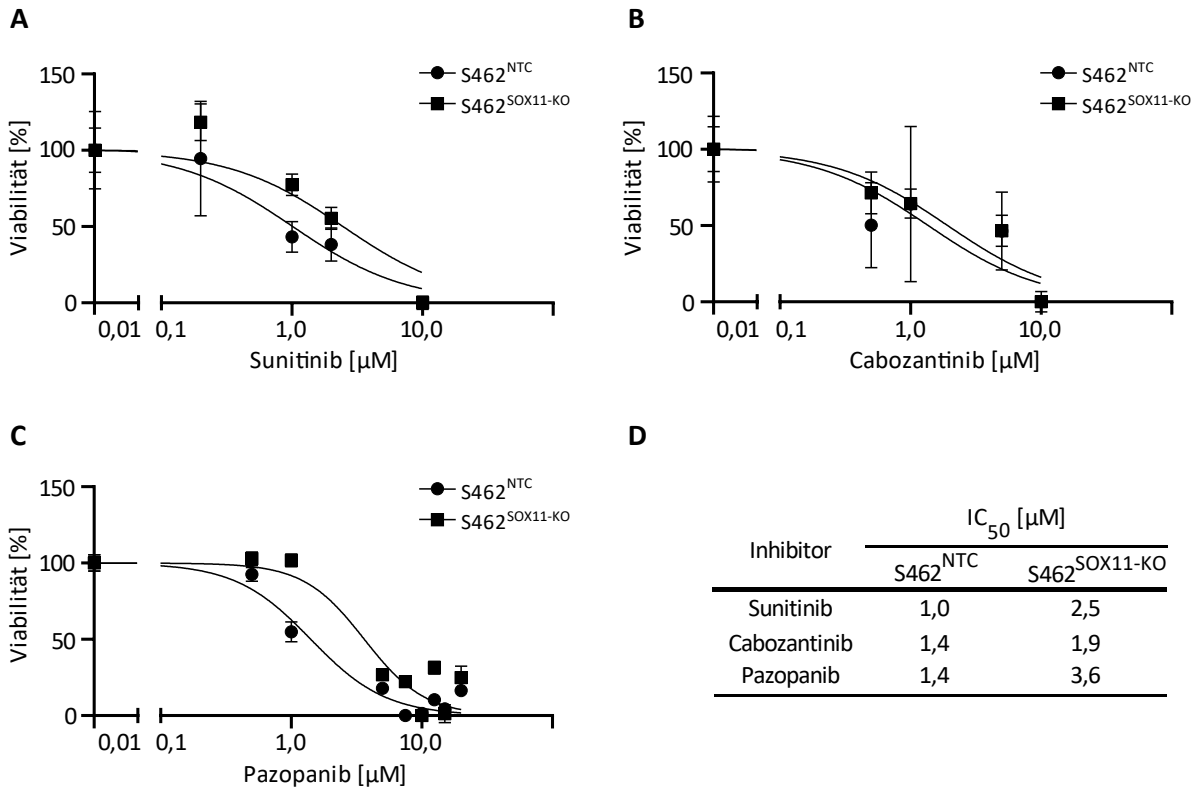


Abbildung 15: Der Effekt von verschiedenen VEGFR2-Inhibitoren auf die Viabilität in S462^{SOX11-KO}- und S462^{NTC}-Zellen und Bestimmung des IC₅₀-Wertes. Dosis-Wirkungs-Kurven für den Effekt der VEGFR2-Inhibitoren auf die Viabilität, angepasst durch nicht-lineare Regression. Dazu wurde das Ergebnis eines repräsentativen CTB-Assays (n = 6) aus drei unabhängigen Experimenten nach 72 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von (A) Sunitinib, (B) Cabozantinib und (C) Pazopanib verwendet. Die S462^{SOX11-KO}- Zellen zeigten im Vergleich zu den S462^{NTC}-Zellen leicht höhere IC₅₀-Werte gegenüber Sunitinib und Pazopanib. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*). (D) Übersicht der IC₅₀-Werte. IC₅₀ = mittlere inhibitorische Konzentration; NTC = *non-targeting control*; KO = Knockout.

Überlebenswahrscheinlichkeit der 77 ES-Patienten in Abhängigkeit von der SOX11-Expression. Die Überlebenswahrscheinlichkeit zwischen den drei Gruppen (Allred-Score 0 – 3: negativ, blau; Allred-Score 4 + 5: moderat, rot; Allred-Score: 6 – 8: stark, grün) war nicht signifikant (p -Wert = 0,84). Für jede Kurve der drei Gruppen sind 95 %-Hall-Wellner-Konfidenzbanden dargestellt. Die Korrelation der SOX11-Expression mit den klinischen Daten der ES-Patienten und die Erstellung der Überlebenskurve wurden von Frau Susanne Jabar (Klinik für Kinderheilkunde III, Universitätsklinikum Essen) durchgeführt. AS = Allred-Score, n = Anzahl der Fälle.

Zur Analyse, ob in ES die SOX11-Expression mit dem Überleben korreliert standen ein Genexpressionsdatensatz und klinische Daten einer zweiten, unabhängigen Kohorte von 196 ES-Patienten zur Verfügung (Postel-Vinay et al., 2012). Basierend auf den SOX11-Genexpressionsdaten habe ich die Patienten in zwei Gruppen unterteilt. Die Gruppe mit hoher Expression von SOX11 wurde ab einem \log_2 -Wert von $\geq 8,5$ definiert. Von den 196 ES-Patienten zeigten demnach 52 (27 %) der Patienten hohe ($\geq 8,5$) und 144 (73 %) der Patienten eine niedrige bzw. keine intratumorale Expression von SOX11. Die Korrelation der beiden Gruppen mit dem Überleben zeigte, dass hohe Expressionslevel von SOX11 mit einer ungünstigen Prognose (p -Wert = 0,006; Abbildung 17A) korrelieren. Das mediane Überleben betrug dabei für ES-Patienten mit hoher SOX11-Expression 57 Monate. Bei den ES-Patienten mit niedriger bzw. keiner SOX11-Expression wurde das mediane Überleben über den maximalen Beobachtungszeitraum (192 Monate) noch nicht erreicht.

Mit dem Ziel der funktionellen Charakterisierung von SOX11 in ES habe ich zusätzlich zur immunohistochemischen Analyse die SOX11-Expression in einer Auswahl von acht bereits etablierten Ewing-Sarkom-Zelllinien (RD-ES, POE, SK-ES, MHH-ES1, A673, TC-71, RH1, CHLA-57) auf RNA-Ebene mittels qPCR untersucht (Abbildung 17B). Die DDLS-Zelllinie FU-DDLS mit bekannt hohem SOX11-Expressionsleveln diene als Positivkontrolle. Hierbei zeigten die ES-Zelllinien RD-ES und POE die höchsten SOX11-Expressionslevel auf RNA- und Proteinebene. Die Zelllinien SK-ES, MHH-ES-1, A673 und TC-71 zeigten moderate und die Zelllinie RH1 zeigte sehr geringe SOX11-Expressionslevel. Die Zelllinie CHLA-57 war negativ für SOX11.

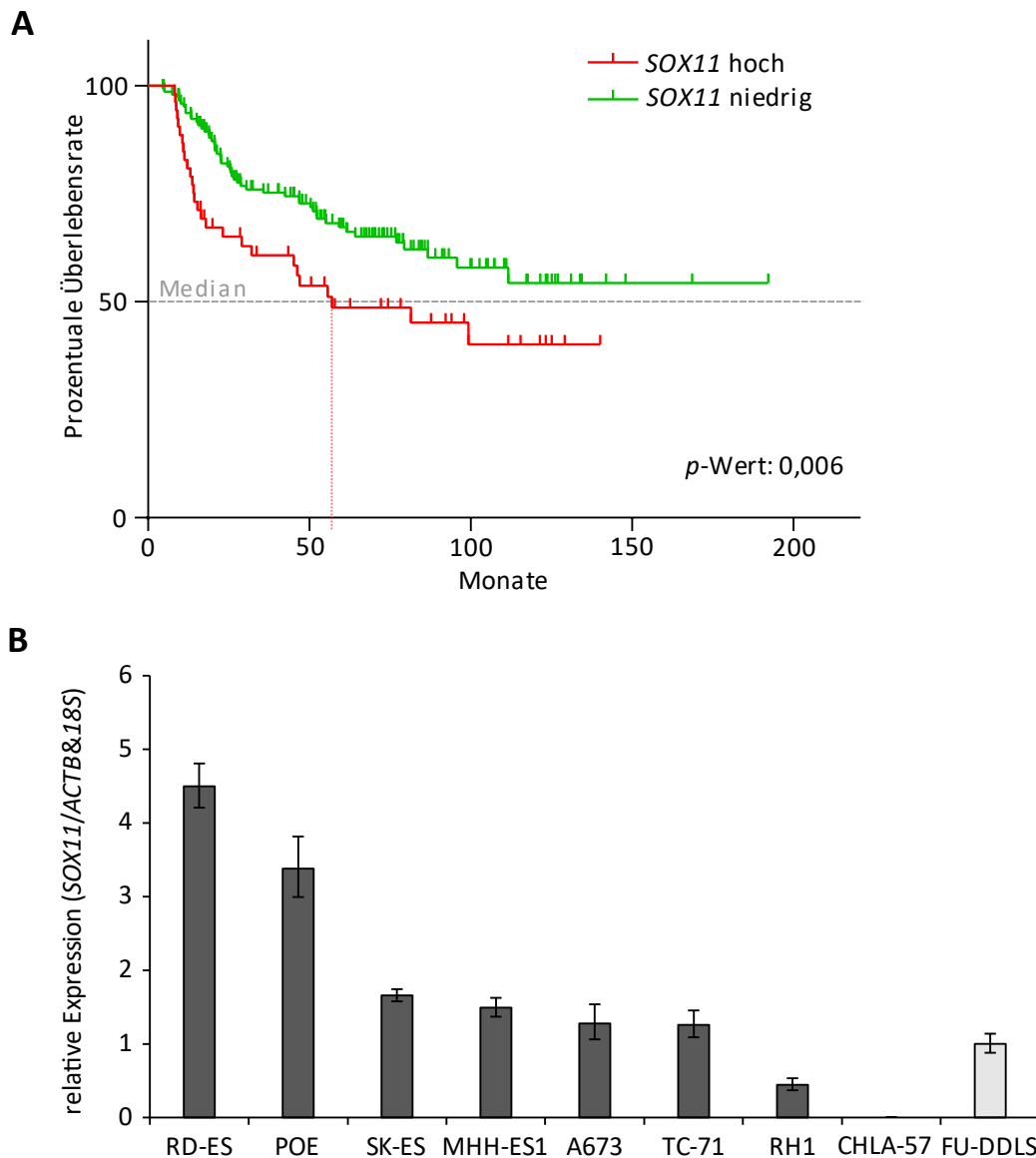


Abbildung 17: SOX11-Expression in Ewing-Sarkomen und in ES-Zelllinien: (A) Im Vergleich zu ES-Patienten mit einer geringen bzw. keinen intratumoralen Expression von *SOX11* (grüne Kurve) zeigten Patienten mit einer hohen intratumoralen *SOX11*-Expression (rote Kurve) ein vermindertes Gesamtüberleben (p -Wert: 0,006). Das mediane Überleben betrug für ES-Patienten mit hoher *SOX11*-Expression 57 Monate (rote gepunktete Linie). (B) Relative mRNA-Expressionslevel von *SOX11* in acht ES-Zelllinien (dunkelgrau) und der DDLS-Zelllinie FU-DDLS (hellgrau) als Positivkontrolle. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (standard error of the mean).

4.2.2 Generierung einer ES-Zelllinie mit *SOX11*-Knockout

Zu Beginn der Analysen zur funktionellen Bedeutung von *SOX11* in Ewing-Sarkomen war das Ziel die Expression von *SOX11* in einer ES-Zelllinie stabil auszuschalten. Die Generierung einer monoklonalen ES-Zelllinie mit *SOX11*-Knockout habe ich daher äquivalent zur MPNST-Zelllinie S462 durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2.1). Aufgrund ihrer hohen *SOX11*-Expressionslevel und ihrer Fähigkeit Einzelklone

auszubilden wurde dazu die ES-Zelllinie POE verwendet. Um eine Zellpopulation mit homogenem und stabilem *SOX11*-Knockout zu erhalten, habe ich insgesamt 35 Zellklone separiert und die *SOX11*-Expression über Western Blotting überprüft. Hierbei zeigte der Zellklon Nr. 28 (sgRNA3 Klon #28) im Vergleich zu der Negativkontrolle (POE^{NTC}) einen vollständigen Expressionsverlust von *SOX11* (Abbildung 18A). Zur Bestimmung der Effizienz des *Genome-Editings* durch das CRISPR/Cas9-System wurde zusätzlich eine Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Dabei zeigte der Zellklon (POE^{SOX11-KO}) eine biallelische Deletion von 239 Nukleotiden im Bereich der Zielsequenz von sgRNA3 (Abbildung 18B). Dieser Zellklon wurde für die nachfolgende funktionelle Charakterisierung von *SOX11* in ES herangezogen.

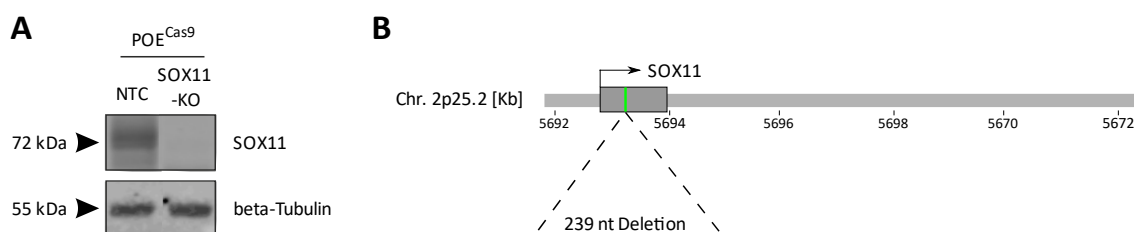


Abbildung 18: Stabiler Knockout von *SOX11* im monoklonalen ES-Zellklon POE (Klon #28). (A) Im Western Blot war nach stabilem Knockout von *SOX11* im Zellklon POE^{SOX11-KO} im Vergleich zur Kontrollzelllinie (POE^{NTC}) kein Protein mehr detektierbar. (B) Der Einzelklon zeigte in der Sanger-Sequenzierung an der entsprechenden Zielsequenz von sgRNA3 (*Target Site*, grün) eine biallelische Deletion von 293 Nukleotiden. NTC = *non-targeting control*; KO = Knockout; nt = Nukleotide.

4.2.3 Funktionelle Charakterisierung von *SOX11* nach Knockout in der ES-Zelllinie POE

Äquivalent wie bei der MPNST-Zelllinie wurden zunächst zellbasierte Assays mit der Zelllinie POE^{SOX11-KO} zur funktionellen Charakterisierung durchgeführt. Im Viabilitäts-Assay (*CellTiter Blue Assay*, CTB, Promega) über einen Zeitverlauf von 96 h durchgeführt, zeigte sich eine deutlich verminderte Viabilität der POE^{SOX11-KO}-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 19A). Zudem konnte ich im BrdU-Proliferationsassay eine reduzierte Proliferationsrate ($p < 0,01$) der POE^{SOX11-KO}-Zellen beobachten (Abbildung 19B).

Zur Bestimmung des Einflusses von *SOX11* auf die Apoptose habe ich den Caspase-Glo[®] 3/7-Assay (Promega) verwendet. Die POE^{SOX11-KO}-Zellen zeigten hierbei eine um 58 % verminderte Apoptose ($p < 0,001$; Abbildung 19C). Im Klonogenitätsassay über einen Zeitraum von 14 Tagen zeigte sich nach Knockout von *SOX11* eine um 53 % signifikant verringerte Anzahl an Kolonien ($p < 0,001$; Abbildung 19D).

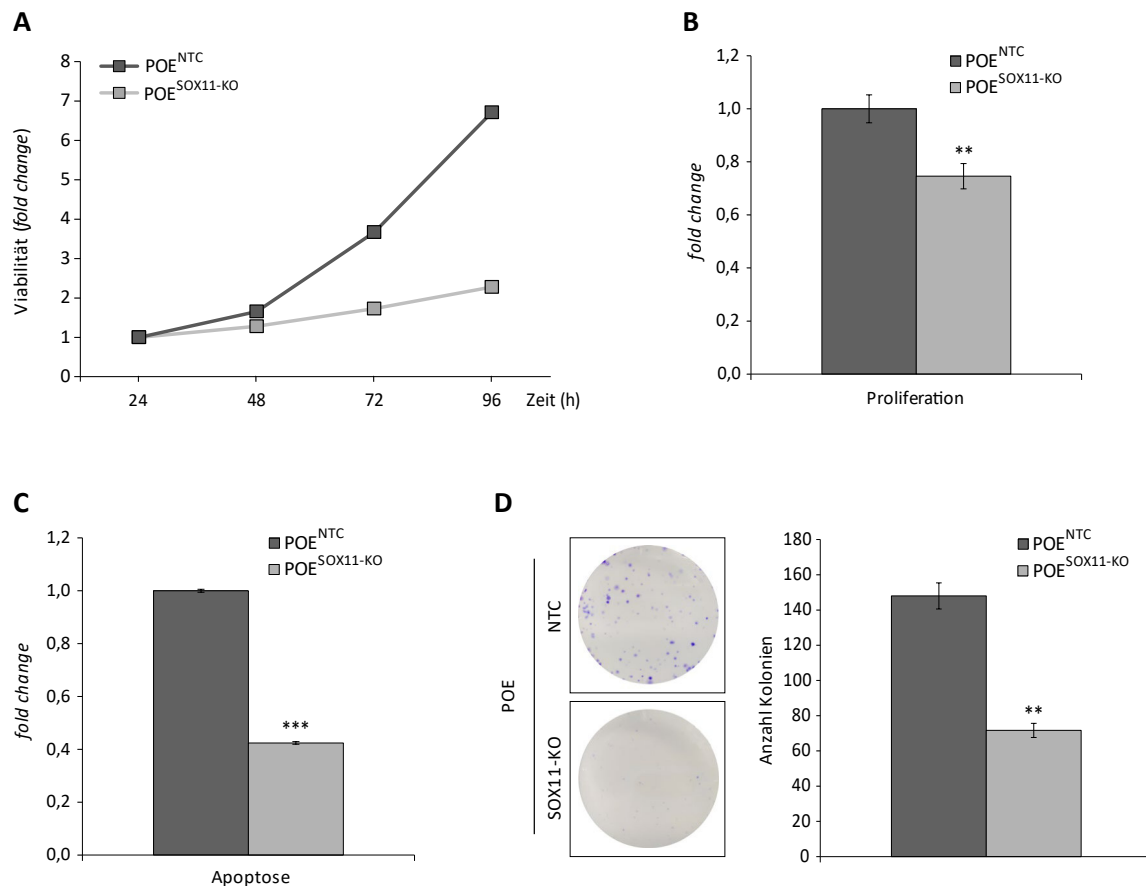


Abbildung 19: Funktionelle Charakterisierung der ES-Zelllinie POE (Klon #28) nach *SOX11*-Knockout. (A) Das Ergebnis eines repräsentativen CTB-Assays ($n = 6$) aus drei unabhängigen Experimenten sowie (B) das Ergebnis des repräsentativen BrdU-Proliferations-Assays ($n = 6$) zeigten eine verminderte Viabilität bzw. Proliferation der POE-Zellen nach *SOX11*-Knockout. (C) Das Ergebnis eines repräsentativen Caspase-Glo[®] 3/7-Assays ($n = 3$) aus drei unabhängigen Experimenten detektierte eine signifikante Reduzierung der Apoptose nach Knockout von *SOX11*. Als Positivkontrolle wurden POE^{NTC}-Zellen mit Staurosporin für 6 h behandelt. (D) Im Klonogenitätsassay ($n = 3$) aus drei unabhängigen Experimenten zeigte sich eine signifikant verminderte Fähigkeit der Kolonienbildung nach *SOX11* Knockout. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*). (** p -Wert < 0,01; *** p -Wert < 0,001). NTC = *non-targeting control*; KO = Knockout, n = Anzahl der Replikate pro Experiment.

Nach *SOX11*-Knockout in den POE-Zellen fiel auf, dass sich die Zellen bei der Trypsinierung leichter von der Oberfläche ablösten als POE^{NTC}-Zellen. Diese Beobachtung gab Anlass, den Einfluss von *SOX11* auf die Zelladhäsion näher zu untersuchen. Dazu habe ich den *CytoSelect™ Cell Adhesion Assay ECM Array* mit verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix verwendet. Hierbei zeigten die POE^{SOX11-KO}- im Vergleich zu den POE^{NTC}-Zellen eine verringerte Zelladhäsionsfähigkeit an Fibronectin 1, Collagen I und Collagen IV. Zudem ließen POE^{SOX11-KO}-Zellen eine leicht verminderte Adhäsion an Laminin I und Fibrinogen im Vergleich mit den POE^{NTC}-Zellen erkennen (Abbildung 20).

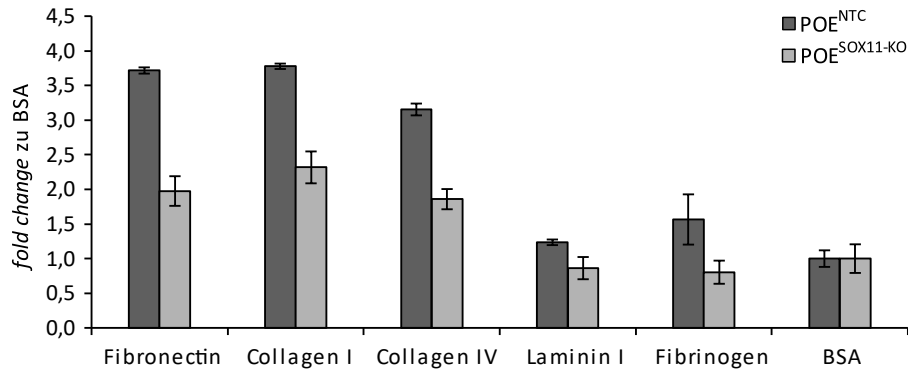


Abbildung 20: Der Einfluss von SOX11 auf die Zelladhäsion. Im Adhäsionsassay zeigten POE-Zellen nach SOX11-Knockout eine verringerte Adhäsion an Fibronectin 1, Collagen I und Collagen IV. Der Assay wurde aufgrund des Assaydesigns mit Duplikaten durchgeführt, daher konnte keine Berechnung zur Signifikanz erfolgen. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (standard error of the mean). BSA = bovine serum albumin; NTC = non-targeting control; KO = Knockout.

4.2.4 Transkriptomanalyse nach SOX11-Knockout

Zur Identifizierung potenzieller SOX11-Zielgene wurde eine RNA-Sequenzierung von POE^{SOX11-KO}- und POE^{NTC}-Zellen mit jeweils zwei Replikaten durchgeführt. Von den insgesamt 18.381 detektierbaren Transkripten waren im Vergleich zu den POE^{NTC}-Zellen in den POE^{SOX11-KO}-Zellen 1.639 Transkripte runter- und 1.373 hochreguliert ($FC(\log_2) \leq -1,0$ bzw. $\geq 1,0$; $p \leq 0,05$). Davon waren 1.271 Protein-kodierende Gene, 265 lncRNAs, 78 Pseudogene und 23 weitere, nicht-kodierende Transkripte runterreguliert (Abbildung 21A) sowie 1.119 Protein-kodierende Gene, 193 lncRNAs, 48 Pseudogene und 13 weitere, nicht-kodierende Transkripte hochreguliert (Abbildung 21B).

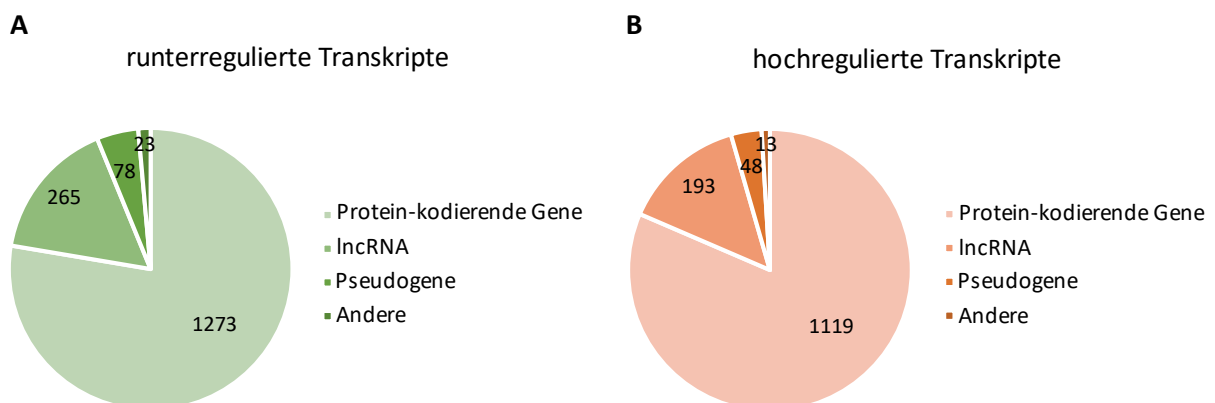


Abbildung 21: Übersicht der differentiell exprimierten Transkripte nach SOX11-Knockout in POE. Anzahl der differentiell exprimierten Transkripte, die in POE^{SOX11-KO} im Vergleich zu den POE^{NTC} (A) runter- (grün) und (B) hochreguliert (rot) waren ($FC(\log_2) \leq -1,0$ bzw. $\geq 1,0$, $p \leq 0,05$).

4.2.4.1 Funktionelle Annotation differentiell exprimierter Gene

Äquivalent wie bei der MPNST-Zelllinie S462 wurden zunächst die signifikant ($p \leq 0,05$) runterregulierten Protein-kodierenden Gene nach *SOX11*-Knockout herangezogen und mit Hilfe der Datenbank DAVID hinsichtlich Gewebeexpression und konservierter Transkriptionsfaktor-Bindestellen untersucht. Hierbei konnte ich mit Hilfe der *Uniprot tissue annotation database (UP_tissue)* eine signifikante Anreicherung in 11 spezifischen Gewebetypen identifizieren. Es zeigte sich unter den nach *SOX11*-Knockout runterregulierten Genen interessanterweise eine deutliche und signifikante Anreicherung von Genen, die im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert werden. Hierzu zählten Gehirn (611 Gene), fötales Gehirn (73 Gene), Kleinhirn (63 Gene), Endothel des Gehirns (3 Gene), Amygdala (52 Gene), Frontaler Cortex (6 Gene), PNS (20 Gene) und Gehirncortex (14 Gene, Abbildung 22A). Weitere, nicht Nervensystem-assoziierte Gewebetypen waren Testikel (7 Gene) und die glatte Muskulatur der Aorta (3 Gene). Für die hochregulierten Gene nach *SOX11*-Knockout zeigte sich keine signifikante Anreicherung von Genen, die in neuronalen Geweben exprimiert werden.

Für die Detektion überrepräsentierter konservierter Transkriptionsfaktor-Bindestellen in den runterregulierten Genen in den $POE^{SOX11-KO}$ -Zellen habe ich das DAVID-Tool *UCSC_TFBS* verwendet. Hierbei zeigte sich mit 568 Genen eine signifikante Anreicherung der Konsensus-Bindestelle SRY (Abbildung 22B). Wie auch bei der $S462^{SOX11-KO}$ -Zelllinie konnte in DAVID mittels der *UP_keywords*-Datenbank eine signifikante Anreicherung von 67 runterregulierten Genen detektiert werden, die eine Rolle bei der Zelladhäsion spielen.

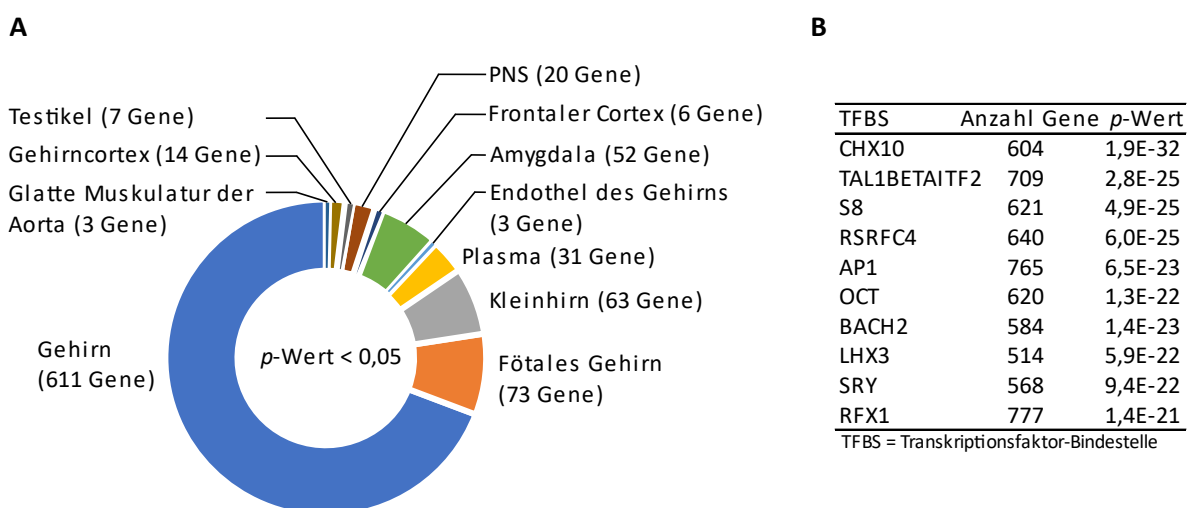
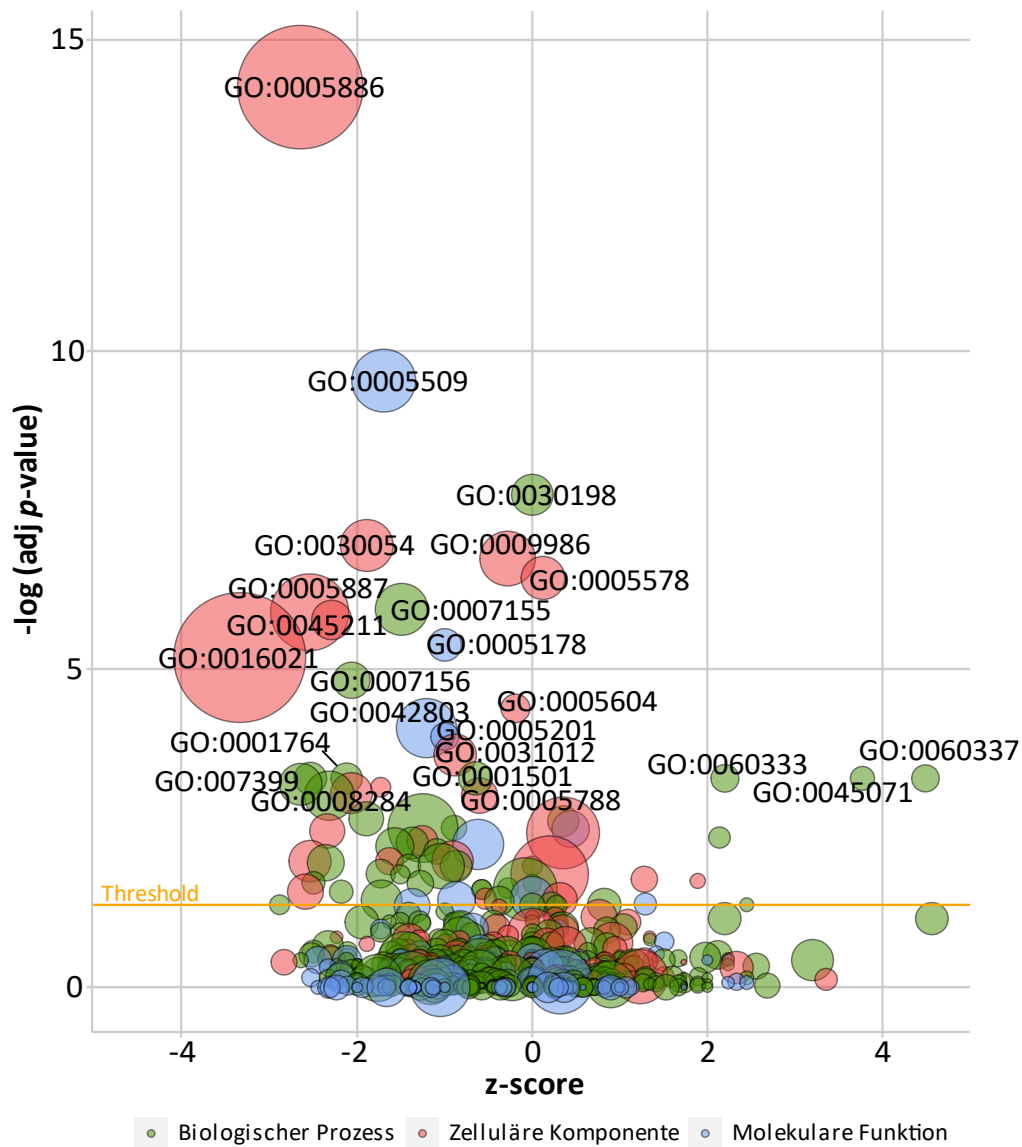


Abbildung 22: Datenbank-Analyse mit DAVID der runterregulierten Gene nach *SOX11*-Knockout in POE. (A) Kreisdiagramm der Annotation runterregulierter Gene in $POE^{SOX11-KO}$ -Zellen auf Gewebespezifität mittels der DAVID *Uniprot tissue (UP_tissue)*-Datenbank. Es sind die 11 signifikanten ($p < 0,05$) Gewebetypen und die Anzahl der Gene dargestellt. (B) Tabelle der zehn signifikantesten ($p < 0,05$) Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die in den runterregulierten Genen nach *SOX11*-Knockout angereichert waren. Angegeben sind die Transkriptionsfaktor-Bindestellen mit $p\text{-Wert}$ und die Anzahl der Gene. Für die Analyse wurde das DAVID-Tool *UCSC_TFBS* verwendet. PNS = peripheres Nervensystem.

Um einen Eindruck der biologischen Funktion der nach *SOX11*-Knockout deregulierten Gene zu erhalten, habe ich mittels der DAVID-Datenbank eine funktionelle Annotation durchgeführt. Dazu wurden alle nach *SOX11*-Knockout signifikant ($p \leq 0,05$) runter- und hochregulierten Proteinkodierenden Gene auf angereicherte biologische Funktionen (*GO terms*) hin analysiert. Insgesamt waren 27 *GO terms* angereichert (*adjusted p-value* < 0,05; minimale Genanzahl > 3). Davon waren elf biologische Prozesse, zwölf zelluläre Komponenten und vier molekulare Funktionen signifikant angereichert. In Abbildung 23 sind die angereicherten *GO terms* in einem Blasendiagramm visualisiert und die signifikantesten *GO terms* in der Tabelle angegeben. Nach *SOX11*-Knockout zeigte sich interessanterweise eine signifikante Runterregulierung von *GO terms* mit Bezug zur Zelladhäsion, Zellproliferation und der Entwicklung des Nerven- und Skelettsystems. Weitere runterregulierte *GO terms* waren zelluläre Komponenten wie Plasmamembran und Zellkontakte. Zu den in $POE^{SOX11-KO}$ hochregulierten *GO terms* zählten vorwiegend biologische Prozesse und zelluläre Komponenten mit Bezug zur extrazellulären Matrix und dem Interferon-Signalweg.



runterreguliert in POE^{SOX11-KO}

ID	Beschreibung
GO:0005886	Plasmamembran
GO:0005509	Calciumionenbindung
GO:0030054	Zellkontakte
GO:0009986	Zelloberfläche
GO:0007155	Zelladhäsion
GO:0005887	integrale Komponente der Plasmamembran
GO:0045211	postsynaptische Membran
GO:0005178	Integrinbindung
GO:0016021	integrale Komponente der Membran
GO:0007156	homophile Zelladhäsion via Plasmamembran-Adhäsion
GO:0005604	Basalmembran
GO:0042803	Proteinhomodimerisierung-Aktivität
GO:0005201	Strukturbestandteil der extrazellulären Matrix

GO:0031012	extrazelluläre Matrix
GO:0001764	Neuronen-Migration
GO:0001501	Entwicklung des Skelettsystems
GO:0007399	Entwicklung des Nervensystems
GO:0005788	Lumen des endoplasmatisches Retikulum
GO:0008284	positive Regulation der Zellproliferation

hochreguliert in POE^{SOX11-KO}

ID	Beschreibung
GO:0030198	extrazelluläre Matrixorganisation
GO:0005578	proteinhaltige extrazelluläre Matrix
GO:0060337	Typ I Interferon Signalweg
GO:0060333	Interferon-gamma-vermittelter Signalweg
GO:0045071	neg. Regulation der viralen Genomreplikation

Abbildung 23: Blasendiagramm mit signifikant angereicherten GO terms der runter- und hochregulierten Gene in POE^{SOX11-KO}. Die Größe der Blasen ist proportional zur Anzahl der Gene, die einer der drei Kategorien zugeordnet sind und die Farbe entspricht der Kategorie. GO terms die zur Kategorie biologische Prozesse gehören sind grün, zelluläre Komponenten sind rot

und molekulare Funktionen sind blau dargestellt. Die y-Achse gibt den negativen logarithmischen *adjusted p-value* (*false discovery rate*, FDR) an. Die x-Achse zeigt den durch das R-Package GOplot (Walter et al., 2015) kalkulierten z-score. Ein negativer z-score zeigt eine Runter- und ein positiver z-score eine Hochregulierung des *GO terms* an. Der Schwellenwert (*threshold*) für die signifikante Anreicherung eines *GO terms* liegt bei einem *adjusted p-value* < 0,05. KO = Knockout.

4.2.4.2 Identifikation potenzieller SOX11-Zielgene

Zunächst habe ich die runter- und hochregulierten Protein-kodierenden Gene betrachtet und nach Genen gefiltert, die bereits nach *SOX11*-Knockout in den S462-Zellen dereguliert waren und deren Expressionslevel mittels qPCR bestätigt wurden. Unter den runterregulierten Genen waren unter anderem *SYK* und *CD24*. Im Gegensatz zu den S462-Zellen, die nach *SOX11*-Knockout eine Runterregulation gezeigt haben, war *KDR* in den POE^{SOX11-KO}-Zellen hochreguliert. Exemplarisch habe ich weitere Gene (*EMB*, *EPHB1*, *FBN2*, *NELL2*, *CASP4*) für die Verifizierung der Ergebnisse aus der RNA-Sequenzierung selektiert und die Expressionslevel mittels qPCR bestimmt (Abbildung 24B, C). Die qPCR-Analyse bestätigte die Runterregulierung der sechs Transkripte *EMB*, *SYK*, *EPHB1*, *CD24*, *NELL2* und *FBN2* in POE^{SOX11-KO} im Vergleich zu POE^{NTC} (Abbildung 24B), sowie die Hochregulierung der zwei Transkripte *CASP4* und *KDR* (Abbildung 24C). In Abbildung 24A sind die selektierten Transkripte mit dem jeweiligen log FC-*(fold change)* und *p*-Wert tabellarisch dargestellt. Zur Verifizierung der Ergebnisse habe ich die Proteinexpression einiger Kandidaten mittels Western Blotting überprüft. Nach *SOX11*-Knockout in den POE-Zellen konnte ich dabei eine erhöhte Proteinexpression an *CASP4* detektieren (Abbildung 24F). *VEGFR2* zeigte in den POE^{SOX11-KO}-Zellen eine stärkere Proteinbande als in den POE-Kontrollzellen (Abbildung 24D). Zudem konnte in POE^{SOX11-KO}-Zellen eine verringerte Phosphorylierung für *VEGFR2* an Position Tyr1054 im Vergleich zu POE^{NTC}-Zellen detektiert werden. Eine schwächere Proteinbande nach *SOX11*-Knockout konnte für *SYK* nicht detektiert werden (Abbildung E), die POE^{SOX11-KO}-Zellen zeigten jedoch eine verringerte Phosphorylierung für *SYK* an Position Tyr525/526 im Vergleich zu POE^{NTC}-Zellen.

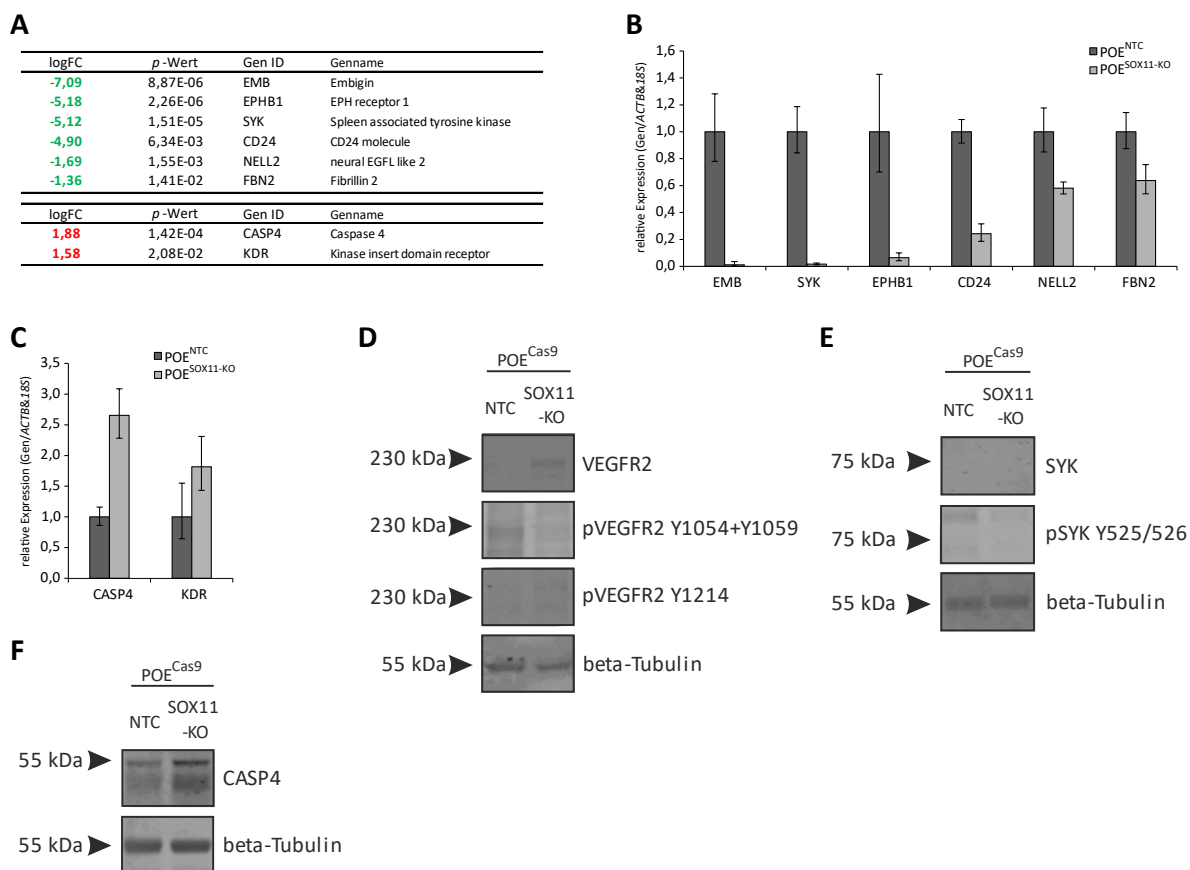


Abbildung 24: Verifizierung potenzieller SOX11-Zielgene in ES. (A) Potenzielle SOX11-Zielgene aus den RNA-Sequenzierungsdaten, die nach SOX11-Knockout in POE im Vergleich zur Kontrolle (POE^{NTC}) herunter- oder hochreguliert waren. Selektiert wurden Transkripte mit negativem logFC $\leq -1,0$ (grün) bzw. mit positivem logFC $\geq 1,0$ (rot) und einem p -Wert $\leq 0,05$. Verifizierung von Transkripten mittels qPCR, die nach SOX11-Knockout in POE (B) vermindert bzw. (C) verstärkt exprimiert wurden. Die Fehlerbalken zeigen den SEM (*standard error of the mean*). (D) Verifizierung mittels Western Blotting von VEGFR2 und phosphoryliertem VEGFR2 (Tyr1054+1059, Try1214), von (E) SYK und phosphoryliertem SYK (Tyr525/526) sowie von (F) CASP4. FC = fold change; NTC = non-targeting control; KO = Knockout.

4.3 Identifikation übereinstimmender deregulierter Gene nach *SOX11*-Knockout in der MPNST-Zelllinie S462 und in der ES-Zelllinie POE

Um weitere potenzielle *SOX11*-Zielgene zu identifizieren, die sowohl in der MPNST-Zelllinie S462 als auch in der ES-Zelllinie POE nach *SOX11*-Knockout dereguliert waren, habe ich die signifikant hoch- und runterregulierten ($FC(\log_2) \leq -1,0$ bzw. $\geq 1,0$; $p \leq 0,05$) Protein-kodierenden Gene beider Zelllinien miteinander verglichen. Hierbei fand ich 125 runter- und 67 hochregulierte Gene, die sowohl in den S462- als auch in den POE-Zellen nach Knockout von *SOX11* dereguliert waren (Abbildung 25). Somit waren 6,5 % aller runterregulierten und 4,3 % aller hochregulierten Protein-kodierender Gene sowohl in MPNSTs als auch in ES runter- bzw. hochreguliert. Unter den übereinstimmenden runterregulierten Genen waren unter anderem *CD24*, *EMB*, *EPHB1* und *SYK*, deren verringerte Expression nach *SOX11*-Knockout in den S462- und POE-Zellen bereits in der qPCR bestätigt wurde (siehe Abschnitte 4.1.4 und 4.2.4.). Die hier nach *SOX11*-Knockout runterregulierten Gene *CD24*, *SYK* und *TMSB15A* waren nach Überexpression von *SOX11* in der MLS-Zelllinie MLS-1765 hochreguliert (Neubert, 2016). Zu den gemeinsamen hochregulierten Genen gehörte unter anderem *CASP4*, dessen erhöhte Expression nach *SOX11*-Knockout ich bereits in den beiden Zelllinien mittels qPCR und auch auf Proteinebene bestätigen konnte (siehe Abschnitte 4.1.4 und 4.2.4.). In den MLS-1765-Zellen war *CASP4* nach *SOX11*-Überexpression nicht runterreguliert (Neubert, 2016). Bei der Analyse der in beiden Zelllinien signifikant runterregulierten Gene mit der Datenbank DAVID und der *Uniprot tissue annotation database (UP_tissue)* zeigte sich lediglich eine signifikante Anreicherung von Genen, die im Gehirn (64 Gene) exprimiert werden. Bei der Analyse der hochregulierten Gene zeigte sich keine signifikante Anreicherung von Genen, die in neuronalen Geweben exprimiert werden.

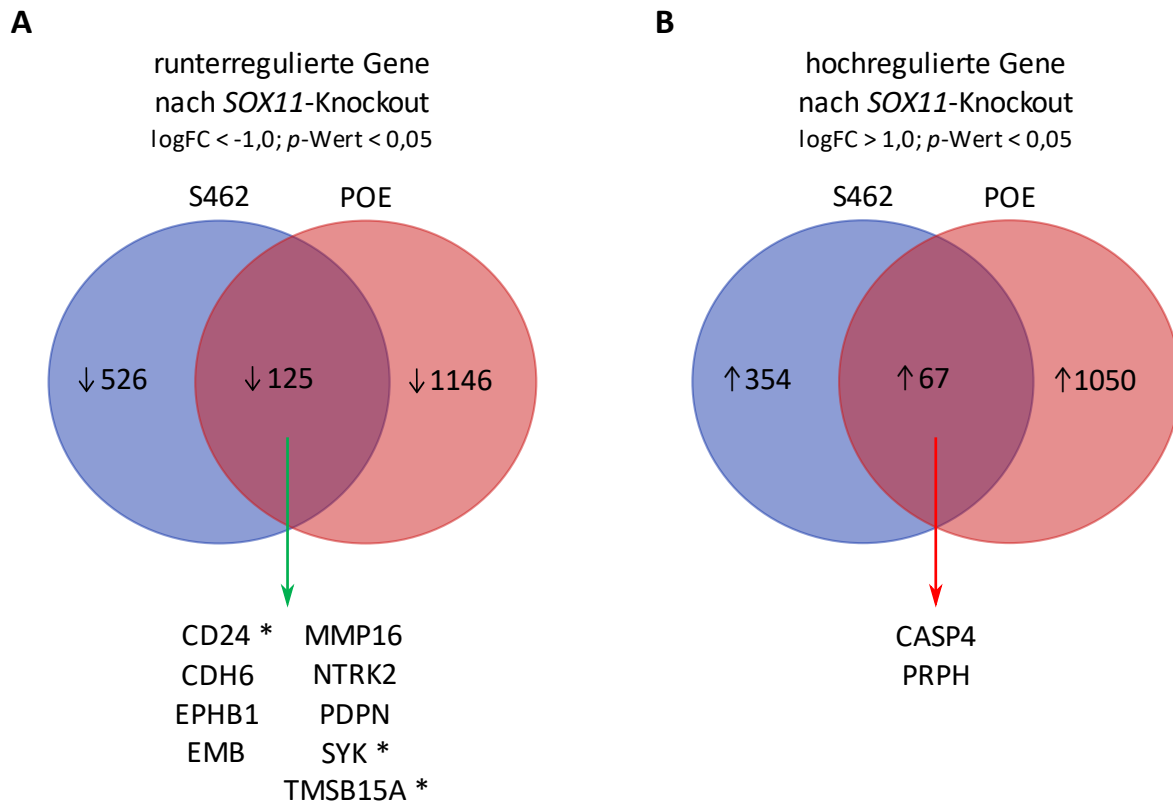


Abbildung 25: Überlappende deregulierte Gene nach *SOX11*-Knockout in der MPNST-Zelllinie S462 und in der ES-Zelllinie POE. Potenzielle *SOX11*-Zielgene aus den RNA-Sequenzierungsdaten, die nach *SOX11*-Knockout in der MPNST-Zelllinie S462 und in der ES-Zelllinie POE im Vergleich zur Kontrolle (S462^{NTC} bzw. POE^{NTC}) (A) herunter- oder (B) hochreguliert waren. Selektiert wurden Transkripte mit negativem $\log_{2}FC \leq -1,0$ bzw. mit positivem $\log_{2}FC \geq 1,0$ und einem p -Wert $\leq 0,05$. Unter den gemeinsamen (A) runterregulierten Genen befanden sich unter anderem *CD24*, *CDH6*, *EMB*, *EPHB1*, *MMP16*, *NTRK2*, *PDPN*, *SYK* und *TMSB15A* und unter den (B) hochregulierten Genen befanden sich unter anderem *CASP4* und *PRPH*. * = hochreguliert nach *SOX11*-Überexpression in MLS (Neubert, 2016); FC = fold change.

5. Diskussion

Weichgewebe- und Knochensarkome sind seltene, hoch aggressive, histologisch und genetisch heterogene maligne Neoplasien. Trotz multimodaler Therapieoptionen mit chirurgischer Resektion, Radiatio und medikamentöser Therapie ist die tumorbedingte Letalität weiterhin eine große Herausforderung (Mendenhall et al., 2009). Daher ist es von großer Bedeutung in dieser seltenen Tumorentität prognostisch und therapeutisch relevante Faktoren zu identifizieren. Der Transkriptionsfaktor SOX11 ist ein Mitglied der SOX-Gruppe C, wird vor allem während der frühen Embryogenese exprimiert und ist in die embryonale Neuro- und Organogenese involviert (Penzo-Mendez, 2010; Wegner, 2010). Während adulte Gewebe unter physiologischen Bedingungen SOX11 kaum exprimieren (Weigle et al., 2005), wurde in diversen Tumorentitäten eine aberrante Expression von SOX11 gefunden. Hierbei scheint SOX11 je nach Tumorentität eine tumorsuppressive oder onkogene Rolle zu spielen. So wurde SOX11 im Mantelzellymphom als Onkogen beschrieben (Mozos et al., 2009), während tumorsuppressive Eigenschaften von SOX11 in Ovarial-, Prostata- und Magenkarzinomen beschrieben wurden (Brennan et al., 2009; Qu et al., 2014; Yao et al., 2015). Auch in Sarkomen wurden hohe SOX11-Expressionslevel nachgewiesen (Seok et al., 2021; Xu et al., 2018). Eine hohe SOX11-Expression wurde in myxoiden Liposarkomen (MLS) gefunden und die funktionelle Charakterisierung von SOX11 ergab starke Hinweise auf eine tumorsuppressive Rolle von SOX11 in MLS (Neubert, 2016). Hohe Expressionslevel von SOX11 wurden auch in malignen peripheren Nervenscheidentumoren und in Ewing-Sarkomen beschrieben (Xu et al., 2018). Welche funktionelle Bedeutung von SOX11 in diesen beiden Sarkomentitäten zukommt und welchen Einfluss SOX11 hier auf das transkriptionelle Netzwerk ausübt ist noch völlig unbekannt und war daher Fokus dieser Arbeit.

5.1 Die Bedeutung von SOX11 in MPNSTs

Bei der immunhistochemischen Analyse eines MPNST-Kollektivs konnte ich in 61,5 % der MPNST-Fälle eine SOX11-Expression nachweisen. Dies ist in Übereinstimmung mit der immunhistochemischen Studie von Xu und Kollegen zur Frage nach der SOX11-Expression in verschiedenen Sarkomentitäten. Hierbei konnte ebenfalls eine SOX11-Expression in MPNST-Fällen beobachtet werden (Xu et al., 2018). Ob es während der Tumorigenese von MPNSTs zu einer Über- oder Unterexpression von SOX11 kommt kann bei unbekannter Ursprungszelle nicht sicher beantwortet werden. Da adulte Gewebe unter physiologischen Bedingungen jedoch kaum SOX11 exprimieren (Weigle et al., 2005) und diverse maligne Tumorentitäten eine Überexpression von SOX11 zeigen, ist bei den MPNSTs jedoch am ehesten von einer *de novo*-Expression von SOX11 auszugehen. Dafür spricht auch meine Beobachtung, dass nur sehr wenige der untersuchten Schwannome eine SOX11-Expression zeigten. MPNSTs entstehen nur sehr selten aus einem Schwannom (Berner et al., 2021). Geht man von einer

beginnenden SOX11-Expression während der Tumorigenese aus wäre eine interessante Fragestellung, ob SOX11-exprimierenden Schwannomen ein erhöhtes Risiko für eine maligne Erkrankung innewohnt.

Die Anzahl der Zelllinien, die von NF1-assoziierten MPNSTs oder sporadischen MPNSTs stammen und die als experimentelle Modellsysteme für die funktionelle Charakterisierung von *SOX11* oder anderer Gene etabliert sind, ist limitiert (Miller et al., 2006). Die MPNST-Zelllinie S462 zeigte hohe SOX11-Expressionslevel auf RNA- und Proteinebene und wurde daher zur Generierung des stabilen Knockouts von *SOX11* herangezogen. Bei der funktionellen Charakterisierung von SOX11 in der MPNST-Zelllinie S462 nach *SOX11*-Knockout zeigte sich eine erhöhte Apoptose, eine verminderte Kolonienbildung und eine verminderte Migrationsfähigkeit. Demnach scheint SOX11 möglicherweise einen Einfluss auf die Kolonienbildung der Zellen zu haben, die nicht im direkten Zusammenhang mit der Proliferation steht. Eine weitere mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch die verstärkte Apoptose weniger vitale und proliferierende Zellen vorhanden sind, die Kolonien ausbilden können. Eine verminderte Migrationsfähigkeit nach *SOX11*-Knockout wurde auch in MCL- und Mammakarzinom-Zelllinien beobachtet (Balsas et al., 2017; Oliemuller et al., 2020). Bei der Migration von Zellen spielt auch die Zelladhäsion eine wichtige Rolle. Interessanterweise fand ich in der RNA-Sequenzierung auch biologische Prozesse mit Bezug zur Zelladhäsion nach *SOX11*-Knockout signifikant runterreguliert. In MCL-Zellen führte die Inhibition von *SOX11* zu einer verminderten Zelladhäsion an FN1 (Yang et al., 2020). Murines *Sox11* reguliert die Expression der mesenchymalen Marker Fibronectin 1 (*Fn1*) und N-Cadherin (*Cdh2*) in verschiedenen sich entwickelnden Organen, wie Leber, Darm, Lunge und Haut positiv (Dong et al., 2018). *FN1*, welches für das ECM-Protein Fibronectin kodiert, war in der RNA-Sequenzierung nach *SOX11*-Knockout runterreguliert. Zudem konnte ich im Adhäsionsassay eine leicht verminderte Adhäsion an Fibronectin und Laminin I feststellen. Demnach könnte die runterregulierte Expression von *FN1* einen Einfluss auf die hier beobachtete verminderte Migration haben. Zudem könnten neben *FN1* auch weitere Faktoren der Zelladhäsions-Prozesse die Migrationsfähigkeit der Zellen nach *SOX11*-Knockout beeinflussen.

Weiterhin konnte ich nach *SOX11*-Knockout in den S462-Zellen eine verstärkte Expression von *CASP4* auf RNA- und Proteinebene detektieren. Caspase 4 (*CASP4*) gehört zu den inflammatorischen Caspasen und aktiviert durch Bindung von intrazellulären LPS das nicht-kanonische Inflammasom, welches dadurch die Pyroptose induziert (Matikainen et al., 2020). Die verstärkte Expression von *CASP4* ist zwar nicht ursächlich für die nach *SOX11*-Knockout beobachtete verstärkte Apoptose, da der Assay die Aktivität der beiden Apoptose-relevanten Caspasen 3 und 7 misst. In einer Studie zur Expression von Pyroptose-relevanter Gene war *CASP4* in den TCGA-Daten von Weichgewebesarkomen im Vergleich zu Normalgewebe runterreguliert (Qi et al., 2021). Eine Runterregulierung von *CASP4* wurde auch in metastasierten synovialen Sarkomen (SS) im Vergleich zu nicht-metastasierten SS beschrieben (Song

et al., 2020). Im ösophagealen Plattenepithelkarzinom ist der Verlust der *CASP4*-Expression mit einer schlechten Prognose assoziiert (Shibamoto et al., 2017). Meine Daten deuten darauf hin, dass *CASP4* durch *SOX11* reguliert wird. Da bisher eine direkte Inhibition der Genexpression durch *SOX11* noch nicht beschrieben wurde, ist jedoch von einer indirekten Inhibition der *CASP4*-Expression durch *SOX11* wahrscheinlich.

In der RNA-Sequenzierung fand ich unter den nach *SOX11*-Knockout runterregulierten Genen eine starke Anreicherung von Genen, die im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert werden. Hierbei zeigten die meisten runterregulierten Gene eine gewebespezifische Expression im Gehirn. Dies konnte ich auch in dieser Arbeit in der ES-Zelllinie POE nach *SOX11*-Knockout feststellen. In MLS konnte nach Überexpression von *SOX11* eine Anreicherung hochregulierter Gene mit gewebespezifischer Expression im Gehirn detektiert werden (Neubert, 2016). Diese Beobachtung stimmt mit der bekannten Funktion von *SOX11* bei der Neurogenese und der neuralen Differenzierung überein (Bergsland et al., 2011). *SOX11* könnte daher in diesen Tumorentitäten ursächlich für stark exprimierte Nervensystem-spezifische Gene sein.

Mit dem Ziel, potenzielle und funktionell relevante *SOX11*-Zielgene unter der großen Anzahl an deregulierten Genen nach *SOX11*-Knockout in der MPNST-Zelllinie zu identifizieren, habe ich die RNA-Sequenzierungsdaten unter verschiedenen Aspekten ausgewertet. Da es sich bei Zelllinien um ein Modellsystem handelt, habe ich mir die deregulierten Protein-kodierenden Genen nach *SOX11*-Knockout angesehen, die eine positive Korrelation mit der *SOX11*-Expression in primären MPNSTs zeigen. Das am stärksten runterregulierte Gen war *CDH2*.

N-Cadherin (*CDH2*) ist ein Zelladhäsions-Molekül, das hauptsächlich von neuronalen Zellen exprimiert wird (Alimperti & Andreadis, 2015). Eine Überexpression von *CDH2* wurde in verschiedenen Tumorentitäten beschrieben (Gao et al., 2018), unter anderem auch in Osteosarkomen (Han et al., 2014). Murines *Sox11* reguliert die Expression der mesenchymalen Marker *Cdh2* und *Fn1* in verschiedenen sich entwickelnden Organen, wie Leber, Darm, Lunge und Haut positiv (Dong et al., 2018). In einer Studie an murinen Mammakarzinom-Zelllinien führte der Knockdown von *Sox11* zur Reduktion der *Cdh2*- und *Fn1*-Expressionslevel (Tsang et al., 2021). Die Überexpression von *SOX11* in DCIS-Zellen führte zu einer erhöhten Expression von *CDH2* (Oliemuller et al., 2020). Zusammen mit der positiven Korrelation der *CDH2*- mit der *SOX11*-Expression in primären MPNSTs deuten diese Beobachtungen auf *CDH2* als *SOX11*-Zielgen hin. Ob *SOX11* direkt mit den regulatorischen Sequenzen von *CDH2* in MPNSTs interagiert muss jedoch noch überprüft werden. Aufgrund seiner Funktion in der Zelladhäsion und bei der Migration (Alimperti & Andreadis, 2015) könnte die Runterregulierung von *CDH2* einen Einfluss auf die hier beobachtete verringerte Migration haben. So könnte es in MPNSTs mit *SOX11*-Überexpression zu einer erhöhten Expression von *CDH2* und folglich zu einer verstärkten

Migration mit einem höheren Risiko einer Metastasierung kommen. Diese Annahme beruht auf der Beobachtung von Oliemuller und Kollegen, dass die *SOX11*-Überexpression in DCIS-Zellen mit einer hohen Expression von *CDH2* korreliert (Oliemuller et al., 2020).

Weiterhin wurde nach Genen gefiltert, die bereits im Kontext mit Sarkomen oder als *SOX11*-Zielgene beschrieben wurden. Mit *CD24*, *KDR*, *NKX2-2* und *SYK* konnte ich vier weitere potenzielle *SOX11*-Zielgene identifizieren. Hierbei führte der Knockout von *SOX11* zu einer Runterregulierung der Expression dieser vier Gene, was in der qPCR-Analyse und auch auf Proteinebene (*NKX2-2*, *SYK*, *VEGFR2*) bestätigt werden konnte. In der anschließend durchgeführten ChIP-qPCR konnte ich *CD24*, *KDR*, *NKX2-2*, und *SYK* als direkte Zielgene von *SOX11* verifizieren.

CD24 ist ein Oberflächenprotein, das über einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-(GPI-)Anker in der Zellmembran verankert ist. In Vorarbeiten von Dr. Marcus Renner und Dr. Patrick Neubert zeigte sich nach ektopter Überexpression von *SOX11* in der myxoiden Liposarkomzelllinie MLS-1765 eine deutliche Überexpression von *CD24* (Neubert, 2016). Im Luciferase-Assay nach transienter Transfektion des *CD24*-Promotors zeigte sich eine signifikant höhere Luciferase-Aktivität bei Überexpression von *SOX11* (Neubert, 2016). Auch in Mantelzelllymphomen stellt *CD24* ein potenzielles Zielgen von *SOX11* dar. Hier zeigten *SOX11*-positive MCL eine stärkere Expression von *CD24* im Vergleich zu *SOX11*-negativen MCL (Vegliante et al., 2013). Kuci et al. fanden ebenfalls eine Co-Regulation von *SOX11* mit *CD24* in MCL (Kuci et al., 2016). Eine induzierte *SOX11*-Expression in DCIS.com-Zellen führte zu einer Erhöhung der *CD24*-Level in Abhängigkeit der Expressionslevel von *SOX11* (Oliemuller et al., 2020). Eine Überexpression von *CD24* wurde auch in einer Vielzahl von Tumorentitäten beschrieben (Fang et al., 2010), unter anderem in *low-grade* fibromyxoiden Sarkomen (Moller et al., 2011) und in Osteosarkomen (Tang et al., 2013). *CD24* ist an der Immunantwort, der neuralen Entwicklung und der Zelladhäsion beteiligt (Altevogt et al., 2021). Die verminderte Expression von *CD24* nach *SOX11*-Knockout könnte daher ebenfalls einen Einfluss auf die hier beobachtete verringerte Migration haben. Basierend auf meinen eigenen Daten zusammen mit der umfangreichen Datenlage zur Assoziation von *CD24* und *SOX11* in unterschiedlichen Modellsystemen und Tumorentitäten kann *CD24* als ein direktes *SOX11*-Zielgen in MPNSTs betrachtet werden.

NK2 homeobox 2 (NKX2-2) ist in der neuralen Entwicklung und der neuroendokrinen Differenzierung involviert (Yoshida et al., 2012). *NKX2-2* wird bereits als immunhistochemischer Marker mit hoher Sensitivität für Ewing-Sarkome eingesetzt (Rooper et al., 2019). Interessanterweise wurde eine erhöhte Expression von *NKX2-2* in MPNSTs beschrieben (Luscan et al., 2014). Eine Assoziation von *SOX11* mit *NKX2-2* ist bisher noch nicht beschrieben worden.

Spleen tyrosine kinase (SYK) ist eine zytoplasmatische Tyrosinkinase, die stark in hämatopoetischen Zellen exprimiert ist und die die zelluläre adaptive Immunantwort reguliert (Mocsai et al., 2010). Wie für SOX11 wurden auch für SYK tumorfördernde als auch tumorsuppressive Eigenschaften in Abhängigkeit des Zelltyps beschrieben (Krisenko & Geahlen, 2015). SYK ist in MCL überexprimiert und konstitutiv aktiviert (Rinaldi et al., 2006). In Ewing-Sarkomen führte eine erhöhte Phosphorylierung der beiden Tyrosine (Y525/526) in der Aktivierungsschleife von SYK zu einer Hyperaktivierung der Kinase (Sun et al., 2017). Die Phosphorylierung dieser beiden Tyrosine ist dabei essentiell für die Funktion von SYK (Zhang et al., 2000). Daher habe ich den Phosphorylierungsstatus von SYK in S462^{SOX11-KO}- im Vergleich zu S462^{NTC}-Zellen überprüft. Nach SOX11-Knockout war SYK in der MPNST-Zelllinie runterreguliert, jedoch in der Aktivierungsschleife erhöht phosphoryliert. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass durch die Runterregulierung von SYK die Funktion der Kinase durch eine hyperaktive Form von SYK kompensiert wird.

KDR (*Kinase Insert Domain Receptor*) war nach SOX11 Knockout stark runterreguliert. In der ChIP-qPCR konnte *KDR* als direktes Zielgen von SOX11 identifiziert werden. In dem MPNST-Kollektiv konnte ich darüber hinaus durch Immunhistochemie zeigen, dass bei einzelnen MPNST-Fällen SOX11-exprimierende Tumorzellen überwiegend um die Gefäße herum fokal eine zum Teil kräftige Expression von VEGFR2, dem Proteinprodukt von *KDR*, zeigten. *KDR* kodiert für VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*), ist wie VEGFR1 und VEGFR3 eine Rezeptor-Tyrosinkinase für den Liganden VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und spielt eine wichtige Rolle in der Vaskulo- und Angiogenese (Wang et al., 2020). VEGFR2 wird hauptsächlich von vaskulären Endothelzellen exprimiert. Eine Expression von VEGFR2 wurde auch auf Tumorzellen verschiedener Tumorentitäten, unter anderem beim Osteosarkom (Liu et al., 2017) und Ewing-Sarkom (Englisch et al., 2020), beobachtet. Kampmann et al. fanden in ihrer immunhistochemischen Studie an einer Kohorte von 275 Patienten mit WGS eine hohe Expression von VEGFR2 in 11 % der Patienten (Kampmann et al., 2015). Interessanterweise ist eine hohe Expression von VEGFR2 mit einem schlechteren Überleben von Patienten mit WGS assoziiert (Kampmann et al., 2015). In MPNSTs konnten Jour et al. bei 8 % der Patienten aktivierende Mutationen in *KDR* identifizieren (Jour et al., 2018).

Mit der Identifizierung von *KDR* als direktes SOX11-Zielgen in MPNSTs stellte sich die Frage nach der Aktivitätsänderung des VEGFR2-Signalweges durch SOX11. Hierzu verwendete ich einen für den VEGF-Signalweg spezifischen Phospho-Array. Die Inhibition von SOX11 in S462 führte neben der verringerten Expression von VEGFR2 zu einer stark verminderten Phosphorylierung an der Position Tyr1059 von VEGFR2. Tyr1059 kann im phosphoryliertem Zustand die Kinaseaktivität von VEGFR2 verstärken (Wang et al., 2020). Das onkogene Protein Src war nach SOX11-Knockout verstärkt an der Position Tyr529 phosphoryliert, was zur Inhibition der Kinaseaktivität von Src führt (Hunter, 1987). Durch die

beobachtete Runterregulierung und die verminderte Kinaseaktivität von VEGFR2 sowie der Inhibition von Src nach *SOX11*-Knockout ist eine Auswirkung auf nachstehende Moleküle und zellulären Prozesse wahrscheinlich. Bei der Integration aller Daten aus dem Phospho-Array durch eine IPA-Analyse konnte ich eine Inhibition des VEGF-Signalweges nach *SOX11*-Knockout feststellen, woran vor allem die stark verringerte Phosphorylierung von VEGFR2 (Tyr1059) und SHC (Tyr349) maßgeblich beteiligt sind. Demnach scheint *SOX11* in MPNSTs eine Rolle bei der Aktivierung des VEGF-Signalweges zu spielen. Die Faktoren des VEGF-Signalweges sind in die Angiogenese und in die Vaskulogenese involviert (Wang et al., 2020). Dies stimmt auch mit dem Ergebnis der funktionellen Annotation der RNA-Sequenzierungsdaten überein, wobei biologische Prozesse mit Bezug zur Angiogenese (27 Gene) nach *SOX11*-Knockout signifikant runterreguliert waren. Es ist bekannt, dass *SOX11* die Angiogenese durch transkriptionelle Regulation des Wachstumsfaktors *PDGFA* im Mantelzelllymphom fördert (Palomero et al., 2014). Neben einer Überexpression angiogenetischer Gensignaturen hatten in dieser Studie *SOX11*-positive MCL eine höhere mikrovaskuläre Dichte im Vergleich zu *SOX11*-negativen MCL. Zusammenfassend deuten diese Daten auf einen Einfluss von *SOX11* auf die Angiogenese, der unter anderem durch die Regulation des VEGF-Signalweges vermittelt wird. Für *SOX11*-überexprimierende MPNSTs könnte demnach die erhöhte *SOX11*-Expression zu einer Förderung der Angiogenese führen und folglich durch erhöhte Migration und gegebenenfalls Metastasierung eine schlechtere Prognose für die Patienten bedeuten.

Die Rezeptortyrosin-Kinase VEGFR2 ist eine attraktive Zielstruktur auf Tumorzellen für eine zielgerichtete Therapie onkologischer Patienten. Um zu untersuchen, ob *SOX11* ein Biomarker für eine VEGFR2-gerichtete Therapie für Patienten mit MPNST darstellt, wurden die S462-Zellen mit den Multikinase-Inhibitoren Sunitinib, Cabozantinib und Pazopanib behandelt, die alle drei VEGFR2 in ihrem Wirkspektrum haben. Die S462-Zellen zeigten nach Knockout von *SOX11* eine leicht verringerte Sensitivität gegenüber den beiden MKIs Pazopanib und Sunitinib.

Während meine ermittelte inhibitorische Konzentration von 1,0 μM Sunitinib in S462^{NTC}-Zellen durchaus vergleichbar war zu den bei Zietsch et al. beschriebenem IC_{50} -Wert von 0,5 μM in S462-Zellen (Zietsch et al., 2010), zeigten die S462-Zellen bezüglich der Sensitivität gegenüber Pazopanib eine große Diskrepanz. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass die S462^{NTC}-Zellen sehr sensitiv gegenüber Pazopanib (IC_{50} -Wert = 1,4 μM) sind, während hingegen in einer kürzlich erschienen Publikation von Yamada et al. die S462-Zellen resistent gegenüber Pazopanib (IC_{50} -Wert > 20 μM) waren (Yamada et al., 2021). Diese Differenz kann mit der Verwendung unterschiedlicher Assays (Viabilität vs. Proliferation) sowie der unterschiedlichen Dauer der Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor (72 h vs. 96 h) begründet werden. Weitere potenzielle Faktoren sind die Authentifizierung der Zelllinie und die Zellpassagenzahl (Hughes et al., 2007). So besteht die Möglichkeit, dass Zelllinien bei mehrfachen

Passagieren durch SNPs (*single nucleotide polymorphism*) oder Mikrosatelliten-Instabilität Resistenzen gegenüber MKIs entwickeln können. Die Ergebnisse der Phase III Studie PALETTE führten in Europa zur Zulassung von Pazopanib in Patienten mit fortgeschrittenen WGS nach Progress unter Chemotherapie. In dieser Studie verbesserte Pazopanib das progressionsfreie Überleben von Patienten mit WGS gegenüber Placebo (van der Graaf et al., 2012). Bis heute sind nur wenige Biomarker für Pazopanib beschrieben worden. Yamada und Kollegen fanden in ihrer Studie die lncRNA *HAR1B* als potenzieller Biomarker für die Therapie mit Pazopanib bei Patienten mit Sarkom (Yamada et al., 2021). Genetische Alterationen, wie eine *GLI1*-Amplifikation und erhöhte Phosphorylierungslevel von PDGFRB, scheinen ebenfalls mit dem Ansprechen auf Pazopanib in WGS assoziiert zu sein und könnten für die Entwicklung neuer Biomarker von Bedeutung sein (Suehara et al., 2020). In 2020 wurden die Ergebnisse einer klinischen Phase II Studie zu dem VEGFR2-Inhibitor Apatinib für Patienten mit fortgeschrittenem WGS veröffentlicht (Liu et al., 2020). Apatinib zeigte dabei eine gute Effizienz mit einer höheren objektiven Ansprechrate (ORR, *objective response rate*) im Vergleich zu Pazopanib (Heudel et al., 2012) und Sunitinib (George et al., 2009) in WGS. Während Pazopanib und Sunitinib bereits für die Behandlung von WGS in Europa zugelassen sind, werden aktuell noch klinische Studien zur Therapie von WGS-Patienten mit Apatinib durchgeführt. Meine Daten deuten zusammenfassend darauf hin, dass SOX11 aufgrund der leicht erhöhten Sensitivität gegenüber Pazopanib und Sunitinib als potenzieller Biomarker für die Therapie dieser beiden MKIs in MPNSTs in Betracht kommt.

Zusammenfassend ergeben sich aus meinen Untersuchungen zur Bedeutung von SOX11 in MPNSTs Hinweise auf eine anti-apoptotische und somit onkogene Funktion. In dieser Arbeit konnte ich *CD24*, *NKX2-2*, *SYK* und *KDR* als direkte sowie *CDH2* und *CASP4* als potenzielle SOX11-Zielgene in MPNSTs identifizieren. SOX11 scheint dabei die Expression des Pyroptose-relevanten Gens *CASP4* zu unterdrücken und übt dadurch eine anti-apoptotische Funktion aus. Die Runterregulierung der in die Zelladhäsion involvierten Gene *CD24* und *CDH2* nach *SOX11*-Knockout kann ursächlich für die hier beobachtet verminderte Migrationsfähigkeit der S462-Zellen sein. Somit könnte die Expression von SOX11 in MPNSTs durch die positive Regulation von *CD24* und *CDH2* die Migrationsfähigkeit der Zellen verstärken. Weiterhin konnte ich zeigen, dass die Expression von *KDR* und seinem Proteinprodukt VEGFR2 durch SOX11 reguliert wird und dadurch auch die Angio- und Vaskulogenese beeinflusst werden. Basierend auf meinen Ergebnissen könnte SOX11 durch die Aktivierung des VEGF-Signalweges eine aktivierende Funktion auf die Angiogenese in MPNSTs ausüben. Dadurch kann es zu einer verstärkten Migration mit einem höheren Risiko einer Metastasierung kommen. Folglich könnten Patienten mit MPNST und einer hohen SOX11-Expression aufgrund der aktivierten Angiogenese eine schlechtere Prognose aufzeigen. Zudem konnte ich zeigen, dass SOX11 aufgrund der leicht erhöhten Sensitivität gegenüber Pazopanib und Sunitinib als potenzieller Biomarker für eine MKI-Therapie in MPNSTs in Betracht kommt. Zusammenfassend sind meine Ergebnisse starke Hinweise auf eine anti-

apoptotische und pro-angiogenetische Funktion von SOX11 in MPNSTs. Somit würde SOX11, unter der Annahme einer *de novo*-Expression, die Kriterien für ein Onkogen in MPNSTs erfüllen.

5.2 Die Bedeutung von SOX11 in ES

Bei der immunhistochemischen Analyse des ES-Kollektivs der CESS-Studie (Steinestel et al., 2020) konnte ich in 81 % der ES-Fälle eine nukleäre SOX11-Expression nachweisen. Die SOX11-Expressionslevel korrelierten in diesem Kollektiv jedoch nicht mit der Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten. Die Expression von SOX11 in ES wurde bereits in einer immunhistochemischen Studie an einem kleineren Kollektiv mit 38 ES-Patienten beschrieben. Hierbei zeigten alle ES-Fälle eine Expression von SOX11, wobei in dieser Studie keine Korrelation der SOX11-Expression mit den klinischen Daten der ES-Patienten gemacht wurde (Xu et al., 2018). Zusätzlich zur immunhistochemischen Analyse des ES-Kollektivs der CESS-Studie stand mir ein Genexpressionsdatensatz einer zweiten unabhängigen ES-Kohorte mit klinischen Daten zur Verfügung (Postel-Vinay et al., 2012). Hierbei konnte ich in 27 % der ES-Fälle eine hohe intratumorale SOX11-Expression detektieren. Interessanterweise korrelierten in dieser Kohorte hohe SOX11-Expressionslevel deutlich mit einer ungünstigen Prognose. Somit konnte ich SOX11 als prognostischer Marker in ES basierend auf Genexpressionsdaten, nicht jedoch basierend auf der Proteinexpression an einem zweiten Kollektiv identifizieren. Dies könnte mit der Verwendung der beiden unterschiedlichen Methoden zur Ermittlung der SOX11-Expressionslevel (Proteinexpression vs. Genexpression) erklärt werden. Hierbei kann der für die immunhistochemische Analyse verwendete SOX11-Antikörper mitunter eine Rolle spielen. Durch die Verwendung der RNA-Expressionsdaten ist außerdem eine bessere Auftrennung möglich, da die Werte nicht an eine Gruppeneinteilung nach dem Allred-Score gebunden sind. Im Vergleich zu den Daten aus der immunhistochemischen Analyse wurde der Genexpressionsdatensatz zudem von einem größeren ES-Kollektiv erstellt (196 vs. 77 ES-Patienten).

Bei den im Hinblick auf eine funktionelle Charakterisierung durchgeführten Expressionsanalysen in ES-Zelllinien, zeigten die beiden etablierten ES-Zelllinien POE und RD-ES hohe SOX11-Expressionslevel auf RNA- und Proteinebene. Da die POE-Zellen, nicht jedoch die RD-ES-Zellen, Einzelklonen bilden konnten, habe ich zur Generierung des stabilen Knockouts von *SOX11* die POE-Zelllinie verwendet. Nach dem Knockout von *SOX11* konnte ich eine verminderte Viabilität und Proliferation beobachten. Darüber hinaus zeigte sich eine verminderte Fähigkeit der Zellen Kolonien zu bilden. Beim MCL gibt es widersprüchliche Berichte zur Auswirkung des Knockdowns von *SOX11* auf die Zellproliferation und Viabilität. So führte beispielsweise die Runterregulierung von *SOX11* durch miR-223 in einer MCL-Zelllinie zu einer verminderten Proliferation und Viabilität (Zhou et al., 2018). Andere Studien berichteten hingegen von einer erhöhten Proliferation und Viabilität sowie von einer vermehrten

Kolonienbildung nach Inhibition von *SOX11* (Yang et al., 2020; Yang et al., 2017). Dem gegenüber steht eine verminderte Apoptose, die ich nach *SOX11*-Knockout in den POE-Zellen beobachten konnte. Der wachstumsinhibierende Effekt scheint demnach hauptsächlich auf der Reduktion der Proliferation zu beruhen und nicht durch den direkten Einfluss der Apoptose verursacht zu sein. Die beobachtete verminderte Proliferation spiegelt sich auch im Ergebnis der funktionellen Annotation der RNA-Sequenzierungsdaten wieder. Hierbei waren nach *SOX11*-Knockout biologische Prozesse mit Bezug zur Proliferation (90 Gene) signifikant runterreguliert. Es ist im Umkehrschluss davon auszugehen, dass diese durch *SOX11*-regulierten Gene in ihrer Summe zu einer verstärkten Proliferation bei *SOX11*-exprimierenden ES-Zellen führen.

Wie auch bei der MPNST-Zelllinie S462 konnte ich nach *SOX11*-Knockout in den POE-Zellen eine verstärkte Expression des Pyroptose-relevanten Gens *CASP4* auf RNA- und Proteinebene detektieren. Meine Daten deuten auf *CASP4* als potenzielles *SOX11*-Zielgen in MPNSTs und ES hin, wobei hier *SOX11* die *CASP4*-Expression unterdrückt. Da bisher eine direkte Inhibition der Genexpression durch *SOX11* noch nicht beschrieben wurde, ist jedoch von einer indirekten Inhibition der *CASP4*-Expression durch *SOX11* wahrscheinlich.

Der Einfluss von *SOX11* auf die Zelladhäsion zeigte sich nach Inhibition von *SOX11* durch eine verminderte Adhäsionsfähigkeit an die Komponenten der extrazellulären Matrix, insbesondere an Fibronectin 1 sowie an Collagen I und IV. Zudem war das bereits in MPNSTs identifizierte *SOX11*-Zielgen *CD24*, dessen Protein in die Zelladhäsion involviert ist, nach *SOX11*-Knockout runterreguliert. *CD24* stimuliert dabei indirekt die Zelladhäsion an die ECM-Komponenten durch Aktivierung der $\alpha_3\beta_1$ - und $\alpha_4\beta_1$ -Integrine, die die Bindung an die ECM-Komponenten fördern (Baumann et al., 2005). Weiterhin waren die beiden Ephrin-Rezeptoren *EPHA7* und *EPHB1*, die ebenfalls eine Rolle bei der Zelladhäsion spielen, nach *SOX11*-Knockout runterreguliert. Eine erhöhte Expression von *EPHB1* wurde bereits in metastasierten ES beschrieben und Patienten mit einem lokalisierten ES und einer hohen Expression von *EPHA7* haben eine ungünstigere Prognose (Potratz et al., 2016). Ebenfalls konnte ich eine Runterregulierung des Zelladhäsionsmolekül-Gens *Embigin* (*EMB*) detektieren. In einer Studie wurde in murinen ES-Tumorzellen, die *in vivo* nach ektopter Überexpression von *EWS-FLI1* von primären, aus dem Knochenmark-stammenden mesenchymalen Vorläuferzellen generiert wurden, eine induzierte Expression von *Embigin* gefunden (Riggi et al., 2005).

Diese Ergebnisse (verminderte Viabilität, Proliferation, Koloniebildung und Zelladhäsion) sind zusammen mit der schlechteren Prognose bei hoher *SOX11*-Expression starke Hinweise auf eine onkogene Rolle von *SOX11* in Ewing-Sarkomen.

Wie auch bei der MPNST-Zelllinie zeigte sich bei der ES-Zelllinie in der RNA-Sequenzierung unter den nach *SOX11*-Knockout runterregulierten Genen eine deutliche Anreicherung von Genen, die im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert werden. Ebenfalls zeigten dabei die meisten runterregulierten Gene eine gewebespezifische Expression im Gehirn. Wie bei den MPNSTs und bei myxoiden Liposarkomen könnte *SOX11* daher ursächlich für die hohe Expression Nervensystem-spezifischer Gene in Ewing-Sarkomen sein. Auch waren nach *SOX11*-Knockout biologischen Prozesse mit Bezug zur Zellproliferation, der Entwicklung des Nerven- und Skelettsystems und zur Zelladhäsion, nicht jedoch zur Angiogenese, signifikant runterreguliert.

Die bereits in dieser Arbeit in MPNSTs identifizierte *SOX11*-Zielgene *SYK* und *KDR* waren auch nach *SOX11*-Knockout in der ES-Zelllinie POE dereguliert. Hierbei war insbesondere *SYK* stark runterreguliert. Im Rahmen von *high-throughput* Screens war in der ES-Zelllinie TC71 die Expression von *SYK* und *SOX11* co-runterreguliert (Sun et al., 2017). Die POE^{NTC}-Zellen waren in der Aktivierungsschleife (Tyr525/526) von *SYK* phosphoryliert bei einer gleichzeitig geringen Proteinexpression von *SYK*. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Sun et al. überein. Sie fanden *SYK* relativ schwach in ES-Zelllinien exprimiert, während die Kinase im Vergleich zu Leukämie-Zellen, für die eine Hyperaktivierung von *SYK* bekannt ist, stark phosphoryliert war (Sun et al., 2017). Nach Knockout von *SOX11* in der POE-Zelllinie fand ich *SYK* in der Aktivierungsschleife verringert phosphoryliert. Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse daher auf eine geringe Aktivität der *SYK*-Tyrosinkinase nach *SOX11*-Knockout hin und unterstreichen nochmal die Identifikation von *SYK* als ein Zielgen von *SOX11* in MPNSTs und ES. In den POE-Zellen führte die Inhibition von *SOX11* im Gegensatz zu den S462-Zellen zu einer verstärkten Expression von *VEGFR2* auf RNA- und Proteinebene. In Ewing-Sarkomen ist *VEGFR2* auf den Endothelzellen des Tumorstromas konsistent exprimiert, die meisten ES-Zelllinien zeigen hingegen keine *VEGFR2*-Expression (Englich et al., 2020; Lowery et al., 2019). Nach Knockout von *SOX11* zeigte sich allerdings eine verringerte Phosphorylierung an der Position Tyr1054, was auf eine reduzierte Aktivität der Kinase deutet (Wang et al., 2020).

Zusammenfassend ergeben sich aus meinen Untersuchungen zur Bedeutung von *SOX11* in Ewing-Sarkomen Hinweise auf eine anti-apoptotische und somit onkogene Funktion. In dieser Arbeit fand ich interessanterweise, dass eine hohe mRNA-Expression von *SOX11* in ES-Patienten mit einem schlechteren Überleben korreliert. Meine Daten zeigen, dass *SOX11* zu einer verstärkten Zelladhäsion der POE-Zellen führt. So fand ich nach *SOX11*-Knockout zusätzlich zu einer beobachteten verminderten Zelladhäsion auch diverse, in die Zelladhäsion involvierte Gene runterreguliert. Eine verstärkte Fähigkeit zur Zelladhäsion könnte mit metastatischen Zellen assoziiert sein. Die durch *SOX11*-vermittelte verstärkte Viabilität, Proliferation und Zelladhäsion der Tumorzellen könnten daher mit ursächlich für die ungünstige Prognose der ES-Patienten mit hoher *SOX11*-Expression sein. Wie auch

bei den MPNSTs konnte ich *SYK* und *CD24* als SOX11-Zielgene in Ewing-Sarkomen identifizieren. Ebenfalls scheint SOX11 die Expression von *CASP4* in ES zu unterdrücken und dadurch eine anti-apoptotische Funktion auszuüben. Zusammengenommen sind die ungünstige Prognose der ES-Patienten mit hoher SOX11-Expression und die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung der POE-Zellen nach *SOX11*-Knockout starke Hinweise auf eine onkogene Rolle von SOX11 in Ewing-Sarkomen.

5.3 Die Sarkomtyp-spezifische Bedeutung von SOX11

Abschließend stellte sich die Frage, wie groß die Gemeinsamkeiten der durch SOX11 in ihrer Expression beeinflussten Gene und zellulären Prozesse in MPNSTs und Ewing-Sarkomen sind. Mittlerweile wurde eine große Anzahl an SOX11-Zielgenen in diversen Tumoren und Mausmodellen identifiziert und beschrieben (Bergsland et al., 2006; Bhattaram et al., 2010; Kuci et al., 2016; Vegliante et al., 2013; Wang et al., 2010). Bei den meisten Studien bleibt jedoch offen, ob SOX11 direkt an regulatorische Sequenzen bindet oder ob SOX11 indirekt durch die Aktivierung zwischengeschalteter Faktoren die Expression von Zielgenen beeinflusst. Auch bei den in meiner Arbeit identifizierten potenziellen SOX11-Zielgenen bleibt bis auf die durch ChIP-qPCR identifizierten direkten Zielgene *CD24*, *KDR*, *NKX2-2* und *SYK* offen, ob es sich um direkte oder indirekte SOX11-Zielgene handelt. Darüber hinaus konnte ich in meiner Arbeit beispielsweise mit *CD24*, *EPHB1*, *SYK* und *CASP4* Gene identifizieren, die sowohl in MPNSTs als auch in ES potenzielle SOX11-Zielgene darstellen. Vor allem *CD24* kann unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus dem MCL und Mammakarzinom (Kuci et al., 2016; Oliemuller et al., 2020; Vegliante et al., 2013) als validiertes, Tumortyp-übergreifendes SOX11-Zielgen betrachtet werden. Insgesamt waren in MPNSTs und ES jedoch nur wenige Gene gemeinsam dereguliert. SOX11 beeinflusst somit die Genexpression dieser Tumoren größtenteils spezifisch und charakteristisch für den jeweiligen Sarkomtyp. Bei der Regulation der Transkription handelt es sich um einen hochkomplexen Prozess, bei dem neben den eigentlichen Transkriptionsfaktoren auch eine Vielzahl von Coaktivatoren und Corepressoren eine Rolle spielen (Lee & Young, 2013). Weiterhin beeinflussen epigenetische Prozesse wie DNA-Methylierung oder Histonmodifikationen die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren. Das Sarkomtyp-spezifische DNA-Methylierungsmuster kann beispielsweise unterstützend zur Diagnose genutzt werden (Koelsche et al., 2021; Renner et al., 2013).

Dass SOX11 die Genexpression überwiegend Sarkomtyp-spezifisch beeinflusst spiegelt sich auch in den biologischen und zellulären Prozessen wieder. Während SOX11 in den MPNSTs die Angiogenese beeinflusst, gibt es basierend auf meinen Daten keinen Hinweis auf eine Regulation der Angiogenese durch SOX11 in ES. Selbst die Angiogenese an sich scheint in verschiedenen Tumoren wiederum auf unabhängigen Wegen beeinflusst zu werden. Dies zeigt sich beispielsweise daran, dass in MPNSTs und

im MCL unterschiedliche, an der Angiogenese beteiligte Gene durch SOX11 in ihrer Expression beeinflusst werden (Palomero et al., 2014). Die Ergebnisse meiner Arbeit sind starke Hinweise auf eine onkogene Funktion von SOX11 sowohl in MPNSTs als auch in ES. Zusammenfassend ergibt sich aus der integrierten Betrachtung, dass SOX11 in MPNSTs und ES sowie in weiteren Tumorentitäten sein onkogenes Potenzial durch eine Tumortyp-spezifische Modulation des Transkriptoms vermittelt.

6. Literatur

- Abràmoff, M. D., Magalhaes, J., & Ram, S. J. (2004). Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, *11*(7), 36-42.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., & Hemmings, B. A. (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, *15*(23), 6541-6551.
- Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J., & Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J*, *13*(7), 1610-1619.
- Alimperti, S., & Andreadis, S. T. (2015). CDH2 and CDH11 act as regulators of stem cell fate decisions. *Stem Cell Res*, *14*(3), 270-282.
- Altevogt, P., Sammar, M., Huser, L., & Kristiansen, G. (2021). Novel insights into the function of CD24: A driving force in cancer. *Int J Cancer*, *148*(3), 546-559.
- Annunziata, M. C., Parisi, M., Esposito, G., Fabbrocini, G., Ammendola, R., & Cattaneo, F. (2020). Phosphorylation Sites in Protein Kinases and Phosphatases Regulated by Formyl Peptide Receptor 2 Signaling. *Int J Mol Sci*, *21*(11).
- Backman, T. W. H., & Girke, T. (2016). systemPipeR: NGS workflow and report generation environment. *Bmc Bioinformatics*, *17*.
- Balsas, P., Palomero, J., Eguileor, A., Rodriguez, M. L., Vegliante, M. C., Planas-Rigol, E., Sureda-Gomez, M., Cid, M. C., Campo, E., & Amador, V. (2017). SOX11 promotes tumor protective microenvironment interactions through CXCR4 and FAK regulation in mantle cell lymphoma. *Blood*, *130*(4), 501-513.
- Bankhead, P., Loughrey, M. B., Fernandez, J. A., Dombrowski, Y., McArt, D. G., Dunne, P. D., McQuaid, S., Gray, R. T., Murray, L. J., Coleman, H. G., James, J. A., Salto-Tellez, M., & Hamilton, P. W. (2017). QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep*, *7*(1), 16878.
- Baumann, P., Cremers, N., Kroese, F., Orend, G., Chiquet-Ehrismann, R., Uede, T., Yagita, H., & Sleeman, J. P. (2005). CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res*, *65*(23), 10783-10793.
- Beekman, R., Amador, V., & Campo, E. (2018). SOX11, a key oncogenic factor in mantle cell lymphoma. *Curr Opin Hematol*, *25*(4), 299-306.
- Belakhoua, S. M., & Rodriguez, F. J. (2021). Diagnostic Pathology of Tumors of Peripheral Nerve. *Neurosurgery*, *88*(3), 443-456.
- Bergsland, M., Ramskold, D., Zaouter, C., Klum, S., Sandberg, R., & Muhr, J. (2011). Sequentially acting Sox transcription factors in neural lineage development. *Genes Dev*, *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 Dev*, *20*(24), 3475-3486.
- Berner, E. A., Hung, Y. P., Nielsen, G. P., & Lozano-Calderon, S. A. (2021). Malignant peripheral nerve sheath tumors arising from schwannomas: case series and literature review. *APMIS*, *129*(8), 524-532.
- Bhattaram, P., Penzo-Mendez, A., Sock, E., Colmenares, C., Kaneko, K. J., Vassilev, A., Depamphilis, M. L., Wegner, M., & Lefebvre, V. (2010). Organogenesis relies on SoxC transcription factors for the survival of neural and mesenchymal progenitors. *Nat Commun*, *1*, 9.

- Bowles, J., Schepers, G., & Koopman, P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, 227(2), 239-255.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P., & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*, 34(5), 525-527.
- Brennan, D. J., Ek, S., Doyle, E., Drew, T., Foley, M., Flannelly, G., O'Connor, D. P., Gallagher, W. M., Kilpinen, S., Kallioniemi, O. P., Jirstrom, K., O'Herlihy, C., & Borrebaeck, C. A. (2009). The transcription factor Sox11 is a prognostic factor for improved recurrence-free survival in epithelial ovarian cancer. *Eur J Cancer*, 45(8), 1510-1517.
- Brohl, A. S., Solomon, D. A., Chang, W., Wang, J., Song, Y., Sindiri, S., Patidar, R., Hurd, L., Chen, L., Shern, J. F., Liao, H., Wen, X., Gerard, J., Kim, J. S., Lopez Guerrero, J. A., Machado, I., Wai, D. H., Picci, P., Triche, T., . . . Khan, J. (2014). The genomic landscape of the Ewing Sarcoma family of tumors reveals recurrent STAG2 mutation. *PLoS Genet*, 10(7), e1004475.
- Burningham, Z., Hashibe, M., Spector, L., & Schiffman, J. D. (2012). The epidemiology of sarcoma. *Clin Sarcoma Res*, 2(1), 14.
- Chen, Z. P., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., Witters, L. A., Power, D. A., Ortiz de Montellano, P. R., & Kemp, B. E. (1999). AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett*, 443(3), 285-289.
- Chong, H., Lee, J., & Guan, K. L. (2001). Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J*, 20(14), 3716-3727.
- Clark, M. A., Fisher, C., Judson, I., & Thomas, J. M. (2005). Soft-tissue sarcomas in adults. *N Engl J Med*, 353(7), 701-711.
- Cortes-Ciriano, I., Lee, J. J., Xi, R., Jain, D., Jung, Y. L., Yang, L., Gordenin, D., Klimczak, L. J., Zhang, C. Z., Pellman, D. S., Group, P. S. V. W., Park, P. J., & Consortium, P. (2020). Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nat Genet*, 52(3), 331-341.
- Crompton, B. D., Stewart, C., Taylor-Weiner, A., Alexe, G., Kurek, K. C., Calicchio, M. L., Kiezun, A., Carter, S. L., Shukla, S. A., Mehta, S. S., Thorner, A. R., de Torres, C., Lavarino, C., Sunol, M., McKenna, A., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Lawrence, M. S., Stojanov, P., . . . Stegmaier, K. (2014). The genomic landscape of pediatric Ewing sarcoma. *Cancer Discov*, 4(11), 1326-1341.
- Dictor, M., Ek, S., Sundberg, M., Warenholt, J., Gyorgy, C., Sernbo, S., Gustavsson, E., Abu-Alsoud, W., Wadstrom, T., & Borrebaeck, C. (2009). Strong lymphoid nuclear expression of SOX11 transcription factor defines lymphoblastic neoplasms, mantle cell lymphoma and Burkitt's lymphoma. *Haematologica*, 94(11), 1563-1568.
- Doench, J. G., Fusi, N., Sullender, M., Hegde, M., Vaimberg, E. W., Donovan, K. F., Smith, I., Tothova, Z., Wilen, C., Orchard, R., Virgin, H. W., Listgarten, J., & Root, D. E. (2016). Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol*, 34(2), 184-191.
- Dong, J., Hu, Y., Fan, X., Wu, X., Mao, Y., Hu, B., Guo, H., Wen, L., & Tang, F. (2018). Single-cell RNA-seq analysis unveils a prevalent epithelial/mesenchymal hybrid state during mouse organogenesis. *Genome Biol*, 19(1), 31.
- Dorfman, H. D., & Czerniak, B. (1995). Bone cancers. *Cancer*, 75(1 Suppl), 203-210.
- Dougher, M., & Terman, B. I. (1999). Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization. *Oncogene*, 18(8), 1619-1627.

- DuBridge, R. B., Tang, P., Hsia, H. C., Leong, P. M., Miller, J. H., & Calos, M. P. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol*, *7*(1), 379-387.
- Durer, S., & Shaikh, H. (2021). Ewing Sarcoma. In *StatPearls*.
- Edwards, D., Voronina, A., Attwood, K., & Grand'Maison, A. (2021). Association between occupational exposures and sarcoma incidence and mortality: systematic review and meta-analysis. *Syst Rev*, *10*(1), 231.
- Englisch, A., Altvater, B., Kailayangiri, S., Hartmann, W., & Rossig, C. (2020). VEGFR2 as a target for CAR T cell therapy of Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, *67*(10), e28313.
- Erdmann, F., Kaatsch, P., Grabow, D., & Spix, C. (2020). German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018). *Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz*.
- Fang, X., Zheng, P., Tang, J., & Liu, Y. (2010). CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol*, *7*(2), 100-103.
- Farid, M., Demicco, E. G., Garcia, R., Ahn, L., Merola, P. R., Cioffi, A., & Maki, R. G. (2014). Malignant peripheral nerve sheath tumors. *Oncologist*, *19*(2), 193-201.
- Farid, M., & Ngeow, J. (2016). Sarcomas Associated With Genetic Cancer Predisposition Syndromes: A Review. *Oncologist*, *21*(8), 1002-1013.
- Fletcher, C. D. M., Unni, K. K., & Mertens, F. (2002). World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Soft Tissue and Bone. *IARC Press*.
- Fornes, O., Castro-Mondragon, J. A., Khan, A., van der Lee, R., Zhang, X., Richmond, P. A., Modi, B. P., Correard, S., Gheorghe, M., Baranasic, D., Santana-Garcia, W., Tan, G., Cheneby, J., Ballester, B., Parcy, F., Sandelin, A., Lenhard, B., Wasserman, W. W., & Mathelier, A. (2020). JASPAR 2020: update of the open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res*, *48*(D1), D87-D92.
- Frahm, S., Mautner, V. F., Brems, H., Legius, E., Debiec-Rychter, M., Friedrich, R. E., Knofel, W. T., Peiper, M., & Kluwe, L. (2004). Genetic and phenotypic characterization of tumor cells derived from malignant peripheral nerve sheath tumors of neurofibromatosis type 1 patients. *Neurobiol Dis*, *16*(1), 85-91.
- Franceschi, S., & Serraino, D. (1992). Risk factors for adult soft tissue sarcoma in northern Italy. *Ann Oncol*, *3 Suppl 2*, S85-88.
- Froehner, M., & Wirth, M. P. (2001). Etiologic factors in soft tissue sarcomas. *Onkologie*, *24*(2), 139-142.
- Gao, S., Zhao, Z., Wu, R., Wu, L., Tian, X., & Zhang, Z. (2018). MicroRNA-194 regulates cell viability and apoptosis by targeting CDH2 in prostatic cancer. *Onco Targets Ther*, *11*, 4837-4844.
- George, S., Merriam, P., Maki, R. G., Van den Abbeele, A. D., Yap, J. T., Akhurst, T., Harmon, D. C., Bhuchar, G., O'Mara, M. M., D'Adamo, D. R., Morgan, J., Schwartz, G. K., Wagner, A. J., Butrynski, J. E., Demetri, G. D., & Keohan, M. L. (2009). Multicenter phase II trial of sunitinib in the treatment of nongastrointestinal stromal tumor sarcomas. *J Clin Oncol*, *27*(19), 3154-3160.
- Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., & Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, *51*(5), 1417-1423.

- Grimm, D., Bauer, J., Wise, P., Kruger, M., Simonsen, U., Wehland, M., Infanger, M., & Corydon, T. J. (2019). The role of SOX family members in solid tumours and metastasis. *Semin Cancer Biol.*
- Grunewald, T. G. P., Cidre-Aranaz, F., Surdez, D., Tomazou, E. M., de Alava, E., Kovar, H., Sorensen, P. H., Delattre, O., & Dirksen, U. (2018). Ewing sarcoma. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1), 5.
- Guillou, L., & Aurias, A. (2010). Soft tissue sarcomas with complex genomic profiles. *Virchows Arch*, 456(2), 201-217.
- Han, K., Zhao, T., Chen, X., Bian, N., Yang, T., Ma, Q., Cai, C., Fan, Q., Zhou, Y., & Ma, B. (2014). microRNA-194 suppresses osteosarcoma cell proliferation and metastasis in vitro and in vivo by targeting CDH2 and IGF1R. *Int J Oncol*, 45(4), 1437-1449.
- Hargrave, M., Wright, E., Kun, J., Emery, J., Cooper, L., & Koopman, P. (1997). Expression of the Sox11 gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and epithelio-mesenchymal induction. *Dev Dyn*, 210(2), 79-86.
- Harris, P. A., Bloor, A., Cheung, M., Kumar, R., Crosby, R. M., Davis-Ward, R. G., Epperly, A. H., Hinkle, K. W., Hunter, R. N., 3rd, Johnson, J. H., Knick, V. B., Laudeman, C. P., Luttrell, D. K., Mook, R. A., Nolte, R. T., Rudolph, S. K., Szewczyk, J. R., Truesdale, A. T., Veal, J. M., . . . Stafford, J. A. (2008). Discovery of 5-[[4-[(2,3-dimethyl-2H-indazol-6-yl)methylamino]-2-pyrimidinyl]amino]-2-methyl-benzenesulfonamide (Pazopanib), a novel and potent vascular endothelial growth factor receptor inhibitor. *J Med Chem*, 51(15), 4632-4640.
- Haslinger, A., Schwarz, T. J., Covic, M., & Lie, D. C. (2009). Expression of Sox11 in adult neurogenic niches suggests a stage-specific role in adult neurogenesis. *Eur J Neurosci*, 29(11), 2103-2114.
- Hassan, A., Pestana, R. C., & Parkes, A. (2021). Systemic Options for Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Curr Treat Options Oncol*, 22(4), 33.
- Heudel, P., Cassier, P., Derbel, O., Dufresne, A., Meeus, P., Thiesse, P., Ranchere-Vince, D., Blay, J. Y., & Ray-Coquard, I. (2012). Pazopanib for the treatment of soft-tissue sarcoma. *Clin Pharmacol*, 4, 65-70.
- Hide, T., Takezaki, T., Nakatani, Y., Nakamura, H., Kuratsu, J., & Kondo, T. (2009). Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation. *Cancer Res*, 69(20), 7953-7959.
- Howlader, N., Noone, A. M., Krapcho, M., Miller, D., Brest, A., Yu, M., Ruhl, J., Tatalovich, Z., Mariotto, A., Lewis, D. R., Chen, H. S., Feuer, E. J., & Cronin, K. A. (2021). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018, . https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/
- Huang da, W., Sherman, B. T., & Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4(1), 44-57.
- Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H., & Gelber, C. (2007). The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques*, 43(5), 575, 577-578, 581-572 passim.
- Hui, J. Y. (2016). Epidemiology and Etiology of Sarcomas. *Surg Clin North Am*, 96(5), 901-914.
- Hunter, T. (1987). A tail of two src's: mutatis mutandis. *Cell*, 49(1), 1-4.
- Huynh, D. P., & Pulst, S. M. (1996). Neurofibromatosis 2 antisense oligodeoxynucleotides induce reversible inhibition of schwannomin synthesis and cell adhesion in STS26T and T98G cells. *Oncogene*, 13(1), 73-84.

- Italiano, A., Mir, O., Mathoulin-Pelissier, S., Penel, N., Piperno-Neumann, S., Bompas, E., Chevreau, C., Duffaud, F., Entz-Werle, N., Saada, E., Ray-Coquard, I., Lervat, C., Gaspar, N., Marec-Berard, P., Pacquement, H., Wright, J., Toulmonde, M., Bessedé, A., Crombe, A., . . . Blay, J. Y. (2020). Cabozantinib in patients with advanced Ewing sarcoma or osteosarcoma (CABONE): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*, *21*(3), 446-455.
- Ito, N., Wernstedt, C., Engstrom, U., & Claesson-Welsh, L. (1998). Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J Biol Chem*, *273*(36), 23410-23418.
- Jain, S., Xu, R., Prieto, V. G., & Lee, P. (2010). Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications. *Int J Clin Exp Pathol*, *3*(4), 416-428.
- Jankowski, M. P., McIlwrath, S. L., Jing, X., Cornuet, P. K., Salerno, K. M., Koerber, H. R., & Albers, K. M. (2009). Sox11 transcription factor modulates peripheral nerve regeneration in adult mice. *Brain Res*, *1256*, 43-54.
- Jour, G., Andeen, N. K., Al-Rohil, R., Aung, P. P., Mehrotra, M., Duose, D., Hoch, B., Argyenyi, Z., Luthra, R., Wistuba, II, & Prieto, V. G. (2018). Novel enriched pathways in superficial malignant peripheral nerve sheath tumours and spindle/desmoplastic melanomas. *J Pathol*, *244*(1), 97-106.
- Judson, I., Verweij, J., Gelderblom, H., Hartmann, J. T., Schoffski, P., Blay, J. Y., Kerst, J. M., Sufliarsky, J., Whelan, J., Hohenberger, P., Krarup-Hansen, A., Alcindor, T., Marreud, S., Litiere, S., Hermans, C., Fisher, C., Hogendoorn, P. C., dei Tos, A. P., van der Graaf, W. T., . . . Bone Sarcoma, G. (2014). Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*, *15*(4), 415-423.
- Kamachi, Y., & Kondoh, H. (2013). Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development*, *140*(20), 4129-4144.
- Kampmann, E., Altendorf-Hofmann, A., Gibis, S., Lindner, L. H., Issels, R., Kirchner, T., & Knosel, T. (2015). VEGFR2 predicts decreased patients survival in soft tissue sarcomas. *Pathol Res Pract*, *211*(10), 726-730.
- Kang, Y., Pekmezci, M., Folpe, A. L., Ersen, A., & Horvai, A. E. (2014). Diagnostic utility of SOX10 to distinguish malignant peripheral nerve sheath tumor from synovial sarcoma, including intraneural synovial sarcoma. *Mod Pathol*, *27*(1), 55-61.
- Kawakami, Y., Kitaura, J., Yao, L., McHenry, R. W., Kawakami, Y., Newton, A. C., Kang, S., Kato, R. M., Leitges, M., Rawlings, D. J., & Kawakami, T. (2003). A Ras activation pathway dependent on Syk phosphorylation of protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(16), 9470-9475.
- Keranen, L. M., Dutil, E. M., & Newton, A. C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr Biol*, *5*(12), 1394-1403.
- Kim, J. W., Sim, S. S., Kim, U. H., Nishibe, S., Wahl, M. I., Carpenter, G., & Rhee, S. G. (1990). Tyrosine residues in bovine phospholipase C-gamma phosphorylated by the epidermal growth factor receptor in vitro. *J Biol Chem*, *265*(7), 3940-3943.
- Kinoshita, T., Yoshida, I., Nakae, S., Okita, K., Gouda, M., Matsubara, M., Yokota, K., Ishiguro, H., & Tada, T. (2008). Crystal structure of human mono-phosphorylated ERK1 at Tyr204. *Biochem Biophys Res Commun*, *377*(4), 1123-1127.
- Koelsche, C., Schrimpf, D., Stichel, D., Sill, M., Sahm, F., Reuss, D. E., Blattner, M., Worst, B., Heilig, C. E., Beck, K., Horak, P., Kreutzfeldt, S., Paff, E., Stark, S., Johann, P., Selt, F., Ecker, J., Sturm, D.,

- Pajtler, K. W., . . . von Deimling, A. (2021). Sarcoma classification by DNA methylation profiling. *Nat Commun*, 12(1), 498.
- Krebs in Deutschland für 2015/2016*. (2019). (12. Ausgabe ed.). Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg).
- Krisenko, M. O., & Geahlen, R. L. (2015). Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1853(1), 254-263.
- Kuci, V., Nordstrom, L., Conrotto, P., & Ek, S. (2016). SOX11 and HIG-2 are cross-regulated and affect growth in mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 57(8), 1883-1892.
- Kuhlbrodt, K., Herbarth, B., Sock, E., Enderich, J., Hermans-Borgmeyer, I., & Wegner, M. (1998). Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *J Biol Chem*, 273(26), 16050-16057.
- Kumar, P., & Mistri, T. K. (2020). Transcription factors in SOX family: Potent regulators for cancer initiation and development in the human body. *Semin Cancer Biol*, 67(Pt 1), 105-113.
- Kuo, P. Y., Leshchenko, V. V., Fazzari, M. J., Perumal, D., Gellen, T., He, T., Iqbal, J., Baumgartner-Wennerholm, S., Nygren, L., Zhang, F., Zhang, W., Suh, K. S., Goy, A., Yang, D. T., Chan, W. C., Kahl, B. S., Verma, A. K., Gascoyne, R. D., Kimby, E., . . . Parekh, S. (2015). High-resolution chromatin immunoprecipitation (ChIP) sequencing reveals novel binding targets and prognostic role for SOX11 in mantle cell lymphoma. *Oncogene*, 34(10), 1231-1240.
- Labun, K., Montague, T. G., Krause, M., Torres Cleuren, Y. N., Tjeldnes, H., & Valen, E. (2019). CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Res*, 47(W1), W171-W174.
- Lagrange, J. L., Ramaioli, A., Chateau, M. C., Marchal, C., Resbeut, M., Richaud, P., Lagarde, P., Rambert, P., Torteaux, J., Seng, S. H., de la Fontan, B., Reme-Saumon, M., Bof, J., Ghnassia, J. P., & Coindre, J. M. (2000). Sarcoma after radiation therapy: retrospective multiinstitutional study of 80 histologically confirmed cases. Radiation Therapist and Pathologist Groups of the Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer. *Radiology*, 216(1), 197-205.
- Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A., & Anderson, C. W. (1992). Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *J Biol Chem*, 267(2), 794-803.
- Lee, T. I., & Young, R. A. (2013). Transcriptional regulation and its misregulation in disease. *Cell*, 152(6), 1237-1251.
- Lefebvre, V. (2019). Roles and regulation of SOX transcription factors in skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol*, 133, 171-193.
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Mendez, A., Han, Y., & Pallavi, B. (2007). Control of Cell Fate and Differentiation by Sry-related High-mobility-group Box (Sox) Transcription Factors. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(12), 2195-2214.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie Adulte Weichgewebesarkome*. (2021).
- Lim, Y., Park, H., Jeon, J., Han, I., Kim, J., Jho, E. H., & Oh, E. S. (2007). Focal adhesion kinase is negatively regulated by phosphorylation at tyrosine 407. *J Biol Chem*, 282(14), 10398-10404.
- Liu, K., Ren, T., Huang, Y., Sun, K., Bao, X., Wang, S., Zheng, B., & Guo, W. (2017). Apatinib promotes autophagy and apoptosis through VEGFR2/STAT3/BCL-2 signaling in osteosarcoma. *Cell Death Dis*, 8(8), e3015.

- Liu, X., Xu, J., Li, F., Liao, Z., Ren, Z., Zhu, L., Shi, Y., Zhao, G., Bai, X., Zhao, J., Xing, R., Teng, S., Yang, Y., & Yang, J. (2020). Efficacy and safety of the VEGFR2 inhibitor Apatinib for metastatic soft tissue sarcoma: Chinese cohort data from NCT03121846. *Biomed Pharmacother*, *122*, 109587.
- Liu, Y., Graham, C., Li, A., Fisher, R. J., & Shaw, S. (2002). Phosphorylation of the protein kinase C-theta activation loop and hydrophobic motif regulates its kinase activity, but only activation loop phosphorylation is critical to in vivo nuclear-factor-kappaB induction. *Biochem J*, *361*(Pt 2), 255-265.
- Longo, J. F., Weber, S. M., Turner-Ivey, B. P., & Carroll, S. L. (2018). Recent Advances in the Diagnosis and Pathogenesis of Neurofibromatosis Type 1 (NF1)-associated Peripheral Nervous System Neoplasms. *Adv Anat Pathol*, *25*(5), 353-368.
- Lowery, C. D., Blosser, W., Dowless, M., Renschler, M., Perez, L. V., Stephens, J., Pytowski, B., Wasserstrom, H., Stancato, L. F., & Falcon, B. (2019). Anti-VEGFR2 therapy delays growth of preclinical pediatric tumor models and enhances anti-tumor activity of chemotherapy. *Oncotarget*, *10*(53), 5523-5533.
- Luscan, A., Shackleford, G., Maslah-Planchon, J., Laurendeau, I., Ortonne, N., Varin, J., Lallemand, F., Leroy, K., Dumaine, V., Hivelin, M., Borderie, D., De Raedt, T., Valeyrie-Allanore, L., Larousserie, F., Terris, B., Lantieri, L., Vidaud, M., Vidaud, D., Wolkenstein, P., . . . Pasmant, E. (2014). The activation of the WNT signaling pathway is a Hallmark in neurofibromatosis type 1 tumorigenesis. *Clin Cancer Res*, *20*(2), 358-371.
- Lynch, D. K., & Daly, R. J. (2002). PKB-mediated negative feedback tightly regulates mitogenic signalling via Gab2. *EMBO J*, *21*(1-2), 72-82.
- Mansour, S. J., Resing, K. A., Candi, J. M., Hermann, A. S., Gloor, J. W., Herskind, K. R., Wartmann, M., Davis, R. J., & Ahn, N. G. (1994). Mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphorylation of MAP kinase kinase: determination of phosphorylation sites by mass spectrometry and site-directed mutagenesis. *J Biochem*, *116*(2), 304-314.
- Marchetto, A., Ohmura, S., Orth, M. F., Knott, M. M. L., Colombo, M. V., Arrigoni, C., Bardinet, V., Saucier, D., Wehweck, F. S., Li, J., Stein, S., Gerke, J. S., Baldauf, M. C., Musa, J., Dallmayer, M., Romero-Perez, L., Holting, T. L. B., Amatruda, J. F., Cossarizza, A., . . . Grunewald, T. G. P. (2020). Oncogenic hijacking of a developmental transcription factor evokes vulnerability toward oxidative stress in Ewing sarcoma. *Nat Commun*, *11*(1), 2423.
- Martin, E., Acem, I., Grunhagen, D. J., Bovee, J., & Verhoef, C. (2020). Prognostic Significance of Immunohistochemical Markers and Genetic Alterations in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors: A Systematic Review. *Front Oncol*, *10*, 594069.
- Martin, E., Lamba, N., Flucke, U. E., Verhoef, C., Coert, J. H., Versleijen-Jonkers, Y. M. H., & Desar, I. M. E. (2019). Non-cytotoxic systemic treatment in malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST): A systematic review from bench to bedside. *Crit Rev Oncol Hematol*, *138*, 223-232.
- Martinez-Ramirez, A., Rodriguez-Perales, S., Melendez, B., Martinez-Delgado, B., Urioste, M., Cigudosa, J. C., & Benitez, J. (2003). Characterization of the A673 cell line (Ewing tumor) by molecular cytogenetic techniques. *Cancer Genet Cytogenet*, *141*(2), 138-142.
- Matikainen, S., Nyman, T. A., & Cypryk, W. (2020). Function and Regulation of Noncanonical Caspase-4/5/11 Inflammasome. *J Immunol*, *204*(12), 3063-3069.
- Mattingly, R. R. (1999). Phosphorylation of serine 916 of Ras-GRF1 contributes to the activation of exchange factor activity by muscarinic receptors. *J Biol Chem*, *274*(52), 37379-37384.
- Mechtersheimer, G., Otano-Joos, M., Ohl, S., Benner, A., Lehnert, T., Willeke, F., Moller, P., Otto, H. F., Lichter, P., & Joos, S. (1999). Analysis of chromosomal imbalances in sporadic and NF1-

- associated peripheral nerve sheath tumors by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*, 25(4), 362-369.
- Meis-Kindblom, J. M., Sjogren, H., Kindblom, L. G., Peydro-Mellquist, A., Roijer, E., Aman, P., & Stenman, G. (2001). Cytogenetic and molecular genetic analyses of liposarcoma and its soft tissue simulators: recognition of new variants and differential diagnosis. *Virchows Arch*, 439(2), 141-151.
- Mendenhall, W. M., Indelicato, D. J., Scarborough, M. T., Zlotecki, R. A., Gibbs, C. P., Mendenhall, N. P., Mendenhall, C. M., & Enneking, W. F. (2009). The management of adult soft tissue sarcomas. *Am J Clin Oncol*, 32(4), 436-442.
- Michell, B. J., Harris, M. B., Chen, Z. P., Ju, H., Venema, V. J., Blackstone, M. A., Huang, W., Venema, R. C., & Kemp, B. E. (2002). Identification of regulatory sites of phosphorylation of the bovine endothelial nitric-oxide synthase at serine 617 and serine 635. *J Biol Chem*, 277(44), 42344-42351.
- Miller, S. J., Rangwala, F., Williams, J., Ackerman, P., Kong, S., Jegga, A. G., Kaiser, S., Aronow, B. J., Frahm, S., Kluwe, L., Mautner, V., Upadhyaya, M., Muir, D., Wallace, M., Hagen, J., Quelle, D. E., Watson, M. A., Perry, A., Gutmann, D. H., & Ratner, N. (2006). Large-scale molecular comparison of human schwann cells to malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines and tissues. *Cancer Res*, 66(5), 2584-2591.
- Minoshima, Y., Kawashima, T., Hirose, K., Tonozuka, Y., Kawajiri, A., Bao, Y. C., Deng, X., Tatsuka, M., Narumiya, S., May, W. S., Jr., Nosaka, T., Semba, K., Inoue, T., Satoh, T., Inagaki, M., & Kitamura, T. (2003). Phosphorylation by aurora B converts MgcRacGAP to a RhoGAP during cytokinesis. *Dev Cell*, 4(4), 549-560.
- Miyagawa, Y., Okita, H., Nakajima, H., Horiuchi, Y., Sato, B., Taguchi, T., Toyoda, M., Katagiri, Y. U., Fujimoto, J., Hata, J., Umezawa, A., & Kiyokawa, N. (2008). Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. *Mol Cell Biol*, 28(7), 2125-2137.
- Mocsai, A., Ruland, J., & Tybulewicz, V. L. (2010). The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol*, 10(6), 387-402.
- Moller, 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. *Clin Cancer Res*, 17(9), 2646-2656.
- Mozos, A., Royo, C., Hartmann, E., De Jong, D., Baro, C., Valera, A., Fu, K., Weisenburger, D. D., Delabie, J., Chuang, S. S., Jaffe, E. S., Ruiz-Marcellan, C., Dave, S., Rimsza, L., Braziel, R., Gascoyne, R. D., Sole, F., Lopez-Guillermo, A., Colomer, D., . . . Campo, E. (2009). SOX11 expression is highly specific for mantle cell lymphoma and identifies the cyclin D1-negative subtype. *Haematologica*, 94(11), 1555-1562.
- Mu, L., Berti, L., Masserdotti, G., Covic, M., Michaelidis, T. M., Doberauer, K., Merz, K., Rehfeld, F., Haslinger, A., Wegner, M., Sock, E., Lefebvre, V., Couillard-Despres, S., Aigner, L., Berninger, B., & Lie, D. C. (2012). SoxC transcription factors are required for neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis. *J Neurosci*, 32(9), 3067-3080.
- Neubert, P. K. (2016). *The transcription factor SOX11 is a potential tumor suppressor in myxoid liposarcomas: Analysis of function, target genes and mutation* [Dissertation, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg]. Heidelberg.
- New, L., Jiang, Y., Zhao, M., Liu, K., Zhu, W., Flood, L. J., Kato, Y., Parry, G. C., & Han, J. (1998). PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *EMBO J*, 17(12), 3372-3384.

- Nishida, Y., Urakawa, H., Nakayama, R., Kobayashi, E., Ozaki, T., Ae, K., Matsumoto, Y., Tsuchiya, H., Goto, T., Hiraga, H., Naka, N., Takahashi, S., Ando, Y., Ando, M., Kuwatsuka, Y., Hamada, S., Ueda, T., & Kawai, A. (2021). Phase II clinical trial of pazopanib for patients with unresectable or metastatic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Int J Cancer*, *148*(1), 140-149.
- Ogiso, H., Kagi, N., Matsumoto, E., Nishimoto, M., Arai, R., Shirouzu, M., Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y., & Yokoyama, S. (2004). Phosphorylation analysis of 90 kDa heat shock protein within the cytosolic arylhydrocarbon receptor complex. *Biochemistry*, *43*(49), 15510-15519.
- Oliemuller, E., Kogata, N., Bland, P., Kriplani, D., Daley, F., Haider, S., Shah, V., Sawyer, E. J., & Howard, B. A. (2017). SOX11 promotes invasive growth and ductal carcinoma in situ progression. *J Pathol*, *243*(2), 193-207.
- Oliemuller, E., Newman, R., Tsang, S. M., Foo, S., Muirhead, G., Noor, F., Haider, S., Aurrekoetxea-Rodriguez, I., Vivanco, M. D., & Howard, B. A. (2020). SOX11 promotes epithelial/mesenchymal hybrid state and alters tropism of invasive breast cancer cells. *Elife*, *9*.
- Palomero, J., Vegliante, M. C., Eguileor, A., Rodriguez, M. L., Balsas, P., Martinez, D., Campo, E., & Amador, V. (2016). SOX11 defines two different subtypes of mantle cell lymphoma through transcriptional regulation of BCL6. *Leukemia*, *30*(7), 1596-1599.
- Palomero, J., Vegliante, M. C., Rodriguez, M. L., Eguileor, A., Castellano, G., Planas-Rigol, E., Jares, P., Ribera-Cortada, I., Cid, M. C., Campo, E., & Amador, V. (2014). SOX11 promotes tumor angiogenesis through transcriptional regulation of PDGFA in mantle cell lymphoma. *Blood*, *124*(14), 2235-2247.
- 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.
- Patodia, S., & Raivich, G. (2012). Role of transcription factors in peripheral nerve regeneration. *Front Mol Neurosci*, *5*, 8.
- Pemov, A., Li, H., Presley, W., Wallace, M. R., & Miller, D. T. (2020). Genetics of human malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neurooncol Adv*, *2*(Suppl 1), i50-i61.
- Penzo-Mendez, A. I. (2010). Critical roles for SoxC transcription factors in development and cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, *42*(3), 425-428.
- Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Bjorklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., & Parmar, M. (2011). Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(25), 10343-10348.
- Pietsch, T., Göttert, E., Feickert, H.-J., Riehm, H., Blin, N., & Kovacs, G. (1989). MHH-ES-1, A new Ewing sarcoma cell line. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *38*(2), 167.
- Pillai-Kastoori, L., Wen, W., Wilson, S. G., Strachan, E., Lo-Castro, A., Fichera, M., Musumeci, S. A., Lehmann, O. J., & Morris, A. C. (2014). Sox11 is required to maintain proper levels of Hedgehog signaling during vertebrate ocular morphogenesis. *PLoS Genet*, *10*(7), e1004491.
- Postel-Vinay, S., Veron, A. S., Tirode, F., Pierron, G., Reynaud, S., Kovar, H., Oberlin, O., Lapouble, E., Ballet, S., Lucchesi, C., Kontny, U., Gonzalez-Neira, A., Picci, P., Alonso, J., Patino-Garcia, A., de Pailleters, B. B., Laud, K., Dina, C., Froguel, P., . . . Delattre, O. (2012). Common variants near TARDBP and EGR2 are associated with susceptibility to Ewing sarcoma. *Nat Genet*, *44*(3), 323-327.
- Potratz, J., Dirksen, U., Jurgens, H., & Craft, A. (2012). Ewing sarcoma: clinical state-of-the-art. *Pediatr Hematol Oncol*, *29*(1), 1-11.

- Potratz, J., Tillmanns, A., Berning, P., Korsching, E., Schaefer, C., Lechtape, B., Schleithoff, C., Unland, R., Schafer, K. L., Muller-Tidow, C., Jurgens, H., & Dirksen, U. (2016). Receptor tyrosine kinase gene expression profiles of Ewing sarcomas reveal ROR1 as a potential therapeutic target in metastatic disease. *Mol Oncol*, *10*(5), 677-692.
- Prudner, B. C., Ball, T., Rathore, R., & Hirbe, A. C. (2020). Diagnosis and management of malignant peripheral nerve sheath tumors: Current practice and future perspectives. *Neurooncol Adv*, *2*(Suppl 1), i40-i49.
- Pugongchai, A., Bychkov, A., & Sampatanukul, P. (2017). Promoter hypermethylation of SOX11 correlates with adverse clinicopathological features of human prostate cancer. *Int J Exp Pathol*, *98*(6), 341-346.
- Qi, L., Xu, R., Wan, L., Ren, X., Zhang, W., Zhang, K., Tu, C., & Li, Z. (2021). Identification and Validation of a Novel Pyroptosis-Related Gene Signature for Prognosis Prediction in Soft Tissue Sarcoma. *Front Genet*, *12*, 773373.
- Qu, Y., Zhou, C., Zhang, J., Cai, Q., Li, J., Du, T., Zhu, Z., Cui, X., & Liu, B. (2014). The metastasis suppressor SOX11 is an independent prognostic factor for improved survival in gastric cancer. *Int J Oncol*, *44*(5), 1512-1520.
- Rad, E., Dodd, K., Thomas, L., Upadhyaya, M., & Tee, A. (2015). STAT3 and HIF1alpha Signaling Drives Oncogenic Cellular Phenotypes in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Mol Cancer Res*, *13*(7), 1149-1160.
- Raina, D., Pandey, P., Ahmad, R., Bharti, A., Ren, J., Kharbanda, S., Weichselbaum, R., & Kufe, D. (2005). c-Abl tyrosine kinase regulates caspase-9 autocleavage in the apoptotic response to DNA damage. *J Biol Chem*, *280*(12), 11147-11151.
- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., & Davis, R. J. (1995). Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*, *270*(13), 7420-7426.
- Randall, R. L., Lessnick, S. L., Jones, K. B., Gouw, L. G., Cummings, J. E., Cannon-Albright, L., & Schiffman, J. D. (2010). Is There a Predisposition Gene for Ewing's Sarcoma? *Journal of Oncology*, *2010*, 397632.
- Redini, F., & Heymann, D. (2015). Bone Tumor Environment as a Potential Therapeutic Target in Ewing Sarcoma. *Front Oncol*, *5*, 279.
- Renner, M., Wolf, T., Meyer, H., Hartmann, W., Penzel, R., Ulrich, A., Lehner, B., Hovestadt, V., Czwan, E., Egerer, G., Schmitt, T., Alldinger, I., Renker, E. K., Ehemann, V., Eils, R., Wardelmann, E., Buttner, R., Lichter, P., Brors, B., . . . Mechttersheimer, G. (2013). Integrative DNA methylation and gene expression analysis in high-grade soft tissue sarcomas. *Genome Biol*, *14*(12), r137.
- Reuss, D. E., Mucha, J., Hagenlocher, C., Ehemann, V., Kluwe, L., Mautner, V., & von Deimling, A. (2013). Sensitivity of malignant peripheral nerve sheath tumor cells to TRAIL is augmented by loss of NF1 through modulation of MYC/MAD and is potentiated by curcumin through induction of ROS. *PLoS One*, *8*(2), e57152.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., & Weissman, I. L. (2003). A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, *423*(6938), 409-414.
- Riggi, N., Cironi, L., Provero, P., Suva, M. L., Kaloulis, K., Garcia-Echeverria, C., Hoffmann, F., Trumpp, A., & Stamenkovic, I. (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res*, *65*(24), 11459-11468.

- Rinaldi, A., Kwee, I., Taborelli, M., Largo, C., Uccella, S., Martin, V., Poretti, G., Gaidano, G., Calabrese, G., Martinelli, G., Baldini, L., Pruneri, G., Capella, C., Zucca, E., Cotter, F. E., Cigudosa, J. C., Catapano, C. V., Tibiletti, M. G., & Bertoni, F. (2006). Genomic and expression profiling identifies the B-cell associated tyrosine kinase Syk as a possible therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol*, *132*(3), 303-316.
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res*, *43*(7), e47.
- Rodriguez, R., Matsuda, M., Perisic, O., Bravo, J., Paul, A., Jones, N. P., Light, Y., Swann, K., Williams, R. L., & Katan, M. (2001). Tyrosine residues in phospholipase Cgamma 2 essential for the enzyme function in B-cell signaling. *J Biol Chem*, *276*(51), 47982-47992.
- Rooper, L. M., Sharma, R., Gocke, C. D., & Belchis, D. A. (2019). The Utility of NKX2.2 and TLE1 Immunohistochemistry in the Differentiation of Ewing Sarcoma and Synovial Sarcoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, *27*(3), 174-179.
- Rosenberg, A. E. (2017). Bone Sarcoma Pathology: Diagnostic Approach for Optimal Therapy. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, *37*, 794-798.
- Sand, L. G., Szuhai, K., & Hogendoorn, P. C. (2015). Sequencing Overview of Ewing Sarcoma: A Journey across Genomic, Epigenomic and Transcriptomic Landscapes. *Int J Mol Sci*, *16*(7), 16176-16215.
- Sanjana, N. E., Shalem, O., & Zhang, F. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods*, *11*(8), 783-784.
- Sankar, S., & Lessnick, S. L. (2011). Promiscuous partnerships in Ewing's sarcoma. *Cancer Genet*, *204*(7), 351-365.
- Sano, K., Nakamura, H., Mabuchi, S., Tanaka, T., Nakagawara, A., & Takai, Y. (1990). Expression of the smg p25A (a ras p21-like GTP-binding protein) gene in human neuroblastoma cell lines and tumor tissues. *Cancer Res*, *50*(22), 7242-7245.
- Schaefer, I. M., Fletcher, C. D., & Hornick, J. L. (2016). Loss of H3K27 trimethylation distinguishes malignant peripheral nerve sheath tumors from histologic mimics. *Mod Pathol*, *29*(1), 4-13.
- Schaller, M. D., Hildebrand, J. D., Shannon, J. D., Fox, J. W., Vines, R. R., & Parsons, J. T. (1994). Autophosphorylation of the focal adhesion kinase, pp125FAK, directs SH2-dependent binding of pp60src. *Mol Cell Biol*, *14*(3), 1680-1688.
- 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. *Dev Cell*, *3*(2), 167-170.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, *9*(7), 676-682.
- Schock, E. N., & LaBonne, C. (2020). Sorting Sox: Diverse Roles for Sox Transcription Factors During Neural Crest and Craniofacial Development. *Front Physiol*, *11*, 606889.
- Schoffski, P., Cornillie, J., Wozniak, A., Li, H., & Hompes, D. (2014). Soft tissue sarcoma: an update on systemic treatment options for patients with advanced disease. *Oncol Res Treat*, *37*(6), 355-362.

- Seok, J., Gil, M., Dayem, A. A., Saha, S. K., & Cho, S. G. (2021). Multi-Omics Analysis of SOX4, SOX11, and SOX12 Expression and the Associated Pathways in Human Cancers. *J Pers Med*, 11(8).
- Shao, J., Prince, T., Hartson, S. D., & Matts, R. L. (2003). Phosphorylation of serine 13 is required for the proper function of the Hsp90 co-chaperone, Cdc37. *J Biol Chem*, 278(40), 38117-38120.
- Sharma, P., Veeranna, Sharma, M., Amin, N. D., Sihag, R. K., Grant, P., Ahn, N., Kulkarni, A. B., & Pant, H. C. (2002). Phosphorylation of MEK1 by cdk5/p35 down-regulates the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem*, 277(1), 528-534.
- Shibamoto, M., Hirata, H., Eguchi, H., Sawada, G., Sakai, N., Kajiyama, Y., & Mimori, K. (2017). The loss of CASP4 expression is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*, 13(3), 1761-1766.
- Smith, M. A., Morton, C. L., Phelps, D., Girtman, K., Neale, G., & Houghton, P. J. (2008). SK-NEP-1 and Rh1 are Ewing family tumor lines. *Pediatr Blood Cancer*, 50(3), 703-706.
- Smith, R., Owen, L. A., Trem, D. J., Wong, J. S., Whangbo, J. S., Golub, T. R., & Lessnick, S. L. (2006). Expression profiling of EWS/FLI identifies NKX2.2 as a critical target gene in Ewing's sarcoma. *Cancer Cell*, 9(5), 405-416.
- Sobczuk, P., Teterycz, P., Czarnecka, A. M., Switaj, T., Kosela-Paterczyk, H., Kozak, K., Falkowski, S., & Rutkowski, P. (2020). Systemic Treatment for Advanced and Metastatic Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors-A Sarcoma Reference Center Experience. *J Clin Med*, 9(10).
- 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. *Mol Cell Biol*, 24(15), 6635-6644.
- Song, Y., Liu, X., Wang, F., Wang, X., Cheng, G., & Peng, C. (2020). Identification of Metastasis-Associated Biomarkers in Synovial Sarcoma Using Bioinformatics Analysis. *Front Genet*, 11, 530892.
- Sprenkle, A. B., Davies, S. P., Carling, D., Hardie, D. G., & Sturgill, T. W. (1997). Identification of Raf-1 Ser621 kinase activity from NIH 3T3 cells as AMP-activated protein kinase. *FEBS Lett*, 403(3), 254-258.
- Stahl, M., Ranft, A., Paulussen, M., Bolling, T., Vieth, V., Bielack, S., Gortitz, I., Braun-Munzinger, G., Harges, J., Jurgens, H., & Dirksen, U. (2011). Risk of recurrence and survival after relapse in patients with Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 57(4), 549-553.
- Standaert, M. L., Bandyopadhyay, G., Perez, L., Price, D., Galloway, L., Poklepovic, A., Sajan, M. P., Cenni, V., Sirri, A., Moscat, J., Toker, A., & Farese, R. V. (1999). Insulin activates protein kinases C-zeta and C-lambda by an autophosphorylation-dependent mechanism and stimulates their translocation to GLUT4 vesicles and other membrane fractions in rat adipocytes. *J Biol Chem*, 274(36), 25308-25316.
- Steinestel, K., Trautmann, M., Jansen, E. P., Dirksen, U., Rehkemper, J., Mikesch, J. H., Gerke, J. S., Orth, M. F., Sannino, G., Arteaga, M. F., Rossig, C., Wardelmann, E., Grunewald, T. G. P., & Hartmann, W. (2020). Focal adhesion kinase confers pro-migratory and antiapoptotic properties and is a potential therapeutic target in Ewing sarcoma. *Mol Oncol*, 14(2), 248-260.
- Strauss, S. J., Frezza, A. M., Abecassis, N., Bajpai, J., Bauer, S., Biagini, R., Bielack, S., Blay, J. Y., Bolle, S., Bonvalot, S., Boukovinas, I., Bovee, J., Boye, K., Brennan, B., Brodowicz, T., Buonadonna, A., de Alava, E., Dei Tos, A. P., Garcia Del Muro, X., . . . clinicalguidelines@esmo.org, E. R. N. P. E. a. (2021). Bone sarcomas: ESMO-EURACAN-GENTURIS-ERN PaedCan Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*.

- Suehara, Y., Kohsaka, S., Yamaguchi, S., Hayashi, T., Kurihara, T., Sano, K., Sasa, K., Akaike, K., Ueno, T., Kojima, S., Ikegami, M., Mizuno, S., Okubo, T., Kim, Y., Kaneko, K., Saito, T., Kato, S., & Mano, H. (2020). Assessment of Predictive Biomarkers of the Response to Pazopanib Based on an Integrative Analysis of High-grade Soft-tissue Sarcomas: Analysis of a Tumor Sample from a Responder and Patients with Other Soft-tissue Sarcomas. *Clin Orthop Relat Res*, 478(11), 2461-2476.
- Sun, H., Lin, D. C., Cao, Q., Pang, B., Gae, D. D., Lee, V. K. M., Lim, H. J., Doan, N., Said, J. W., Gery, S., Chow, M., Mayakonda, A., Forscher, C., Tyner, J. W., & Koeffler, H. P. (2017). Identification of a Novel SYK/c-MYC/MALAT1 Signaling Pathway and Its Potential Therapeutic Value in Ewing Sarcoma. *Clin Cancer Res*, 23(15), 4376-4387.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., & Shibuya, M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J*, 20(11), 2768-2778.
- Tanaka, M., Yamazaki, Y., Kanno, Y., Igarashi, K., Aisaki, K., Kanno, J., & Nakamura, T. (2014). Ewing's sarcoma precursors are highly enriched in embryonic osteochondrogenic progenitors. *J Clin Invest*, 124(7), 3061-3074.
- Tang, J., Cai, H., Lin, L., Xie, P., Zhong, W., & Tang, M. (2013). Increased expression of CD24 is associated with tumor progression and prognosis in patients suffering osteosarcoma. *Clin Transl Oncol*, 15(7), 541-547.
- Taylor, B. S., Barretina, J., Maki, R. G., Antonescu, C. R., Singer, S., & Ladanyi, M. (2011). Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 11(8), 541-557.
- Teicher, B. A. (2012). Searching for molecular targets in sarcoma. *Biochem Pharmacol*, 84(1), 1-10.
- Thaler, M., & Khosravi, I. (2020). Therapy management in bone sarcoma. *memo*, 13, 185-188.
- Thomas, S., Harding, M. A., Smith, S. C., Overdevest, J. B., Nitz, M. D., Frierson, H. F., Tomlins, S. A., Kristiansen, G., & Theodorescu, D. (2012). CD24 is an effector of HIF-1-driven primary tumor growth and metastasis. *Cancer Res*, 72(21), 5600-5612.
- Thway, K., & Fisher, C. (2014). Malignant peripheral nerve sheath tumor: pathology and genetics. *Ann Diagn Pathol*, 18(2), 109-116.
- Tirode, F., Surdez, D., Ma, X., Parker, M., Le Deley, M. C., Bahrami, A., Zhang, Z., Lapouble, E., Grossetete-Lalami, S., Rusch, M., Reynaud, S., Rio-Frio, T., Hedlund, E., Wu, G., Chen, X., Pierron, G., Oberlin, O., Zaidi, S., Lemmon, G., . . . the International Cancer Genome, C. (2014). Genomic landscape of Ewing sarcoma defines an aggressive subtype with co-association of STAG2 and TP53 mutations. *Cancer Discov*, 4(11), 1342-1353.
- Tsang, S. M., Kim, H., Oliemuller, E., Newman, R., Boateng, N. A., Guppy, N., & Howard, B. A. (2021). Sox11 regulates mammary tumour-initiating and metastatic capacity in Brca1-deficient mouse mammary tumour cells. *Dis Model Mech*, 14(5).
- Turc-Carel, C., Aurias, A., Mugneret, F., Lizard, S., Sidaner, I., Volk, C., Thiery, J. P., Olschwang, S., Philip, I., Berger, M. P., & et al. (1988). Chromosomes in Ewing's sarcoma. I. An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet*, 32(2), 229-238.
- Usui, A., Mochizuki, Y., Iida, A., Miyauchi, E., Satoh, S., Sock, E., Nakauchi, H., Aburatani, H., Murakami, A., Wegner, M., & Watanabe, S. (2013). The early retinal progenitor-expressed gene Sox11 regulates the timing of the differentiation of retinal cells. *Development*, 140(4), 740-750.

- van der Geer, P., Wiley, S., Gish, G. D., & Pawson, T. (1996). The Shc adaptor protein is highly phosphorylated at conserved, twin tyrosine residues (Y239/240) that mediate protein-protein interactions. *Curr Biol*, *6*(11), 1435-1444.
- van der Graaf, W. T., Blay, J. Y., Chawla, S. P., Kim, D. W., Bui-Nguyen, B., Casali, P. G., Schoffski, P., Aglietta, M., Staddon, A. P., Beppu, Y., Le Cesne, A., Gelderblom, H., Judson, I. R., Araki, N., Ouali, M., Marreaud, S., Hodge, R., Dewji, M. R., Coens, C., . . . group, P. s. (2012). Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*, *379*(9829), 1879-1886.
- Van Mater, D., & Wagner, L. (2019). Management of recurrent Ewing sarcoma: challenges and approaches. *Onco Targets Ther*, *12*, 2279-2288.
- Vegliante, M. C., Palomero, J., Perez-Galan, P., Roue, G., Castellano, G., Navarro, A., Clot, G., Moros, A., Suarez-Cisneros, H., Bea, S., Hernandez, L., Enjuanes, A., Jares, P., Villamor, N., Colomer, D., Martin-Subero, J. I., Campo, E., & Amador, V. (2013). SOX11 regulates PAX5 expression and blocks terminal B-cell differentiation in aggressive mantle cell lymphoma. *Blood*, *121*(12), 2175-2185.
- von Levetzow, C., Jiang, X., Gwye, Y., von Levetzow, G., Hung, L., Cooper, A., Hsu, J. H., & Lawlor, E. R. (2011). Modeling initiation of Ewing sarcoma in human neural crest cells. *PLoS One*, *6*(4), e19305.
- Wahl, M. I., Nishibe, S., Kim, J. W., Kim, H., Rhee, S. G., & Carpenter, G. (1990). Identification of two epidermal growth factor-sensitive tyrosine phosphorylation sites of phospholipase C-gamma in intact HSC-1 cells. *J Biol Chem*, *265*(7), 3944-3948.
- Walter, W., Sanchez-Cabo, F., & Ricote, M. (2015). GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis. *Bioinformatics*, *31*(17), 2912-2914.
- Wang, X., Bjorklund, S., Wasik, A. M., Grandien, A., Andersson, P., Kimby, E., Dahlman-Wright, K., Zhao, C., Christensson, B., & Sander, B. (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, X., Bove, A. M., Simone, G., & Ma, B. (2020). Molecular Bases of VEGFR-2-Mediated Physiological Function and Pathological Role. *Front Cell Dev Biol*, *8*, 599281.
- Wegner, M. (2010). All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*, *42*(3), 381-390.
- Wegner, M. (2011). SOX after SOX: SOXession regulates neurogenesis. *Genes Dev*, *25*(23), 2423-2428.
- Weigle, B., Ebner, R., Temme, A., Schwind, S., Schmitz, M., Kiessling, A., Rieger, M. A., Schackert, G., Schackert, H. K., & Rieber, E. P. (2005). Highly specific overexpression of the transcription factor SOX11 in human malignant gliomas. *Oncol Rep*, *13*(1), 139-144.
- Whang-Peng, J., Triche, T. J., Knutsen, T., Miser, J., Kao-Shan, S., Tsai, S., & Israel, M. A. (1986). Cytogenetic characterization of selected small round cell tumors of childhood. *Cancer Genet Cytogenet*, *21*(3), 185-208.
- WHO Classification of Tumours Editorial Board. Soft tissue and bone tumours.* (2020). (5th ed., Vol. 3). International Agency for Research and Cancer.
- Xu, S., Dong, Y., Huo, Z., Yu, L., Xue, J., Wang, G., & Duan, Y. (2018). SOX11: a potentially useful marker in surgical pathology: a systematic analysis of SOX11 expression in epithelial and non-epithelial tumours. *Histopathology*.

- Yamada, H., Takahashi, M., Watanuki, M., Watanabe, M., Hiraide, S., Saijo, K., Komine, K., & Ishioka, C. (2021). lncRNA HAR1B has potential to be a predictive marker for pazopanib therapy in patients with sarcoma. *Oncol Lett*, *21*(6), 455.
- Yan, P., Huang, R., Hu, P., Liu, F., Zhu, X., Hu, P., Yin, H., Zhang, J., Meng, T., & Huang, Z. (2019). Nomograms for predicting the overall and cause-specific survival in patients with malignant peripheral nerve sheath tumor: a population-based study. *J Neurooncol*, *143*(3), 495-503.
- Yang, R., Huo, Z., Duan, Y., Tong, W., Zheng, Y., Su, Y., Lou, L., Zhang, Q., Xu, S., Peng, C., Kuang, D., & Wang, G. (2020). SOX11 inhibits tumor proliferation and promotes cell adhesion mediated-drug resistance via a CD43 dependent manner in mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, *61*(9), 2068-2081.
- Yang, S. H., Shore, P., Willingham, N., Lakey, J. H., & Sharrocks, A. D. (1999). The mechanism of phosphorylation-inducible activation of the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J*, *18*(20), 5666-5674.
- Yang, W., Wang, Y., Yu, Z., Li, Z., An, G., Liu, W., Lv, R., Ma, L., Yi, S., & Qiu, L. (2017). SOX11 regulates the pro-apoptosis signal pathway and predicts a favorable prognosis of mantle cell lymphoma. *Int J Hematol*, *106*(2), 212-220.
- Yang, Z., Jiang, S., Lu, C., Ji, T., Yang, W., Li, T., Lv, J., Hu, W., Yang, Y., & Jin, Z. (2019). SOX11: friend or foe in tumor prevention and carcinogenesis? *Ther Adv Med Oncol*, *11*, 1758835919853449.
- Yao, Z., Sun, B., Hong, Q., Yan, J., Mu, D., Li, J., Sheng, H., & Guo, H. (2015). The role of tumor suppressor gene SOX11 in prostate cancer. *Tumour Biol*, *36*(8), 6133-6138.
- Yoshida, A., Sekine, S., Tsuta, K., Fukayama, M., Furuta, K., & Tsuda, H. (2012). NKX2.2 is a useful immunohistochemical marker for Ewing sarcoma. *Am J Surg Pathol*, *36*(7), 993-999.
- Zahm, S. H., & Fraumeni, J. F., Jr. (1997). The epidemiology of soft tissue sarcoma. *Semin Oncol*, *24*(5), 504-514.
- Zhang, J., Billingsley, M. L., Kincaid, R. L., & Siraganian, R. P. (2000). Phosphorylation of Syk activation loop tyrosines is essential for Syk function. An in vivo study using a specific anti-Syk activation loop phosphotyrosine antibody. *J Biol Chem*, *275*(45), 35442-35447.
- Zhang, X., Gan, L., Pan, H., Guo, S., He, X., Olson, S. T., Mesecar, A., Adam, S., & Unterman, T. G. (2002). Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J Biol Chem*, *277*(47), 45276-45284.
- Zhou, K., Feng, X., Wang, Y., Liu, Y., Tian, L., Zuo, W., Yi, S., Wei, X., Song, Y., & Qiu, L. (2018). miR-223 is repressed and correlates with inferior clinical features in mantle cell lymphoma through targeting SOX11. *Exp Hematol*, *58*, 27-34 e21.
- Zhu, Z., Jin, Z., Deng, Y., Wei, L., Yuan, X., Zhang, M., & Sun, D. (2019). Co-expression Network Analysis Identifies Four Hub Genes Associated With Prognosis in Soft Tissue Sarcoma. *Front Genet*, *10*, 37.
- Zietsch, J., Ziegenhagen, N., Heppner, F. L., Reuss, D., von Deimling, A., & Holtkamp, N. (2010). The 4q12 amplicon in malignant peripheral nerve sheath tumors: consequences on gene expression and implications for sunitinib treatment. *PLoS One*, *5*(7), e11858.
- Zimmermann, S., & Moelling, K. (1999). Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, *286*(5445), 1741-1744.

Zucman, J., Melot, T., Desmaze, C., Ghysdael, J., Plougastel, B., Peter, M., Zucker, J. M., Triche, T. J., Sheer, D., Turc-Carel, C., & et al. (1993). Combinatorial generation of variable fusion proteins in the Ewing family of tumours. *EMBO J*, 12(12), 4481-4487.

Zvelebil, M., Oliemuller, E., Gao, Q., Wansbury, O., Mackay, A., Kendrick, H., Smalley, M. J., Reis-Filho, J. S., & Howard, B. A. (2013). Embryonic mammary signature subsets are activated in Brca1-/- and basal-like breast cancers. *Breast Cancer Res*, 15(2), R25.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Phylogenetische Beziehung der Sox-Proteine.	8
Abbildung 2: Struktur der SOX-Proteine.	9
Abbildung 3: SOX11-Expression in MPNSTs, Schwannomen und in MPNST-Zelllinien.....	42
Abbildung 4: Stabiler Knockout von <i>SOX11</i> im monoklonalen MPNST-Zellklon S462 (Klon #5).....	43
Abbildung 5: Funktionelle Charakterisierung der MPNST-Zelllinie S462 (Klon #5) nach <i>SOX11</i> - Knockout.....	44
Abbildung 6: Der Einfluss von SOX11 auf die Zellmigration und Zelladhäsion.	45
Abbildung 7: Übersicht der differentiell exprimierten Transkripte nach <i>SOX11</i> -Knockout in S462.	46
Abbildung 8: Datenbank-Analyse mit DAVID der runterregulierten Gene nach <i>SOX11</i> -Knockout in S462.	47
Abbildung 9: Blasendiagramm mit signifikant angereicherten GO terms der runter- und hochregulierten Gene in S462 ^{SOX11-KO}	49
Abbildung 10: Potenzielle SOX11-Zielgene mit positiver Korrelation zu primären MPNSTs.	51
Abbildung 11: Verifizierung potenzieller SOX11-Zielgene in MPNSTs.	53
Abbildung 12: ChIP-qPCR-Ergebnisse der SOX11-Zielgene <i>NKX2-2</i> , <i>SYK</i> , <i>KDR</i> und <i>CD24</i> in der MPNST- Zelllinie S462.....	55
Abbildung 13: Phosphorylierungsstatus von VEGFR2 und Src nach <i>SOX11</i> -Knockout.	58
Abbildung 14: Inhibierung des VEGF-Signalweges nach <i>SOX11</i> -Knockout.	59
Abbildung 15: Der Effekt von verschiedenen VEGFR2-Inhibitoren auf die Viabilität in S462 ^{SOX11-KO} - und S462 ^{NTC} -Zellen und Bestimmung des IC ₅₀ -Wertes.	61
Abbildung 16: SOX11-Expression in Ewing-Sarkomen.	62
Abbildung 17: SOX11-Expression in Ewing-Sarkomen und in ES-Zelllinien:.....	64
Abbildung 18: Stabiler Knockout von <i>SOX11</i> im monoklonalen ES-Zellklon POE (Klon #28).	65
Abbildung 19: Funktionelle Charakterisierung der ES-Zelllinie POE (Klon #28) nach <i>SOX11</i> -Knockout.	66
Abbildung 20: Der Einfluss von SOX11 auf die Zelladhäsion.....	67
Abbildung 21: Übersicht der differentiell exprimierten Transkripte nach <i>SOX11</i> -Knockout in POE. ...	67
Abbildung 22: Datenbank-Analyse mit DAVID der runterregulierten Gene nach <i>SOX11</i> -Knockout in POE.	68
Abbildung 23: Blasendiagramm mit signifikant angereicherten GO terms der runter- und hochregulierten Gene in POE ^{SOX11-KO}	70
Abbildung 24: Verifizierung potenzieller SOX11-Zielgene in ES.....	72
Abbildung 25: Überlappende deregulierte Gene nach <i>SOX11</i> -Knockout in der MPNST-Zelllinie S462 und in der ES-Zelllinie POE.	74
Abbildung 26: Plasmidkarte pLKO-U6sgRNA.....	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.	14
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.	14
Tabelle 3: Verwendete kommerzielle Kits.....	16
Tabelle 4: Verwendete biologische Reagenzien.....	16
Tabelle 5: Verwendete Plasmide.....	17
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien.	18
Tabelle 7: Verwendete Puffer und Lösungen.....	19
Tabelle 8: Verwendete Datenbanken und Software.....	19
Tabelle 9: Eigenschaften der Zelllinien und Kultivierungsbedingungen.	21
Tabelle 10: Reaktionsansatz für die lentivirale Transfektion von HEK293T-Zellen.....	23
Tabelle 11: sgRNA Sequenzen.	24
Tabelle 12: sgRNA Oligonukleotide.....	24
Tabelle 13: Vektorverdau mit BsmBI.....	25
Tabelle 14: Annealing der sgRNA Oligonukleotide.....	25
Tabelle 15: Annealing Programm.....	25
Tabelle 16: Ligationsansatz.	25
Tabelle 17: Sequenzierungs-Primer.....	27
Tabelle 18: Thermocycler Programm für die Reverse Transkription.	30
Tabelle 19: Eigenschaften der qPCR-Primer.....	30
Tabelle 20: Reaktionsansatz qPCR.....	32
Tabelle 21: qPCR-Programm mit dem QuantStudio™ 3 System.	32
Tabelle 22: Im Western Blot verwendete Primärantikörper.....	34
Tabelle 23: Im Western Blot verwendete Sekundärantikörper.	35
Tabelle 24: In der immunhistochemischen Färbung verwendete Antikörper.	36
Tabelle 25: Reaktionsansatz CHIP-qPCR.	37
Tabelle 26: CHIP-qPCR-Programm mit QuantStudio™ 3.	37
Tabelle 27: Primer für die CHIP-qPCR.....	38
Tabelle 28: Einfluss von SOX11 auf den Phosphorylierungsstatus von Faktoren des VEGF-Signalwegs.	56

Anhang

Plasmidkarte pLKO-U6sgRNA

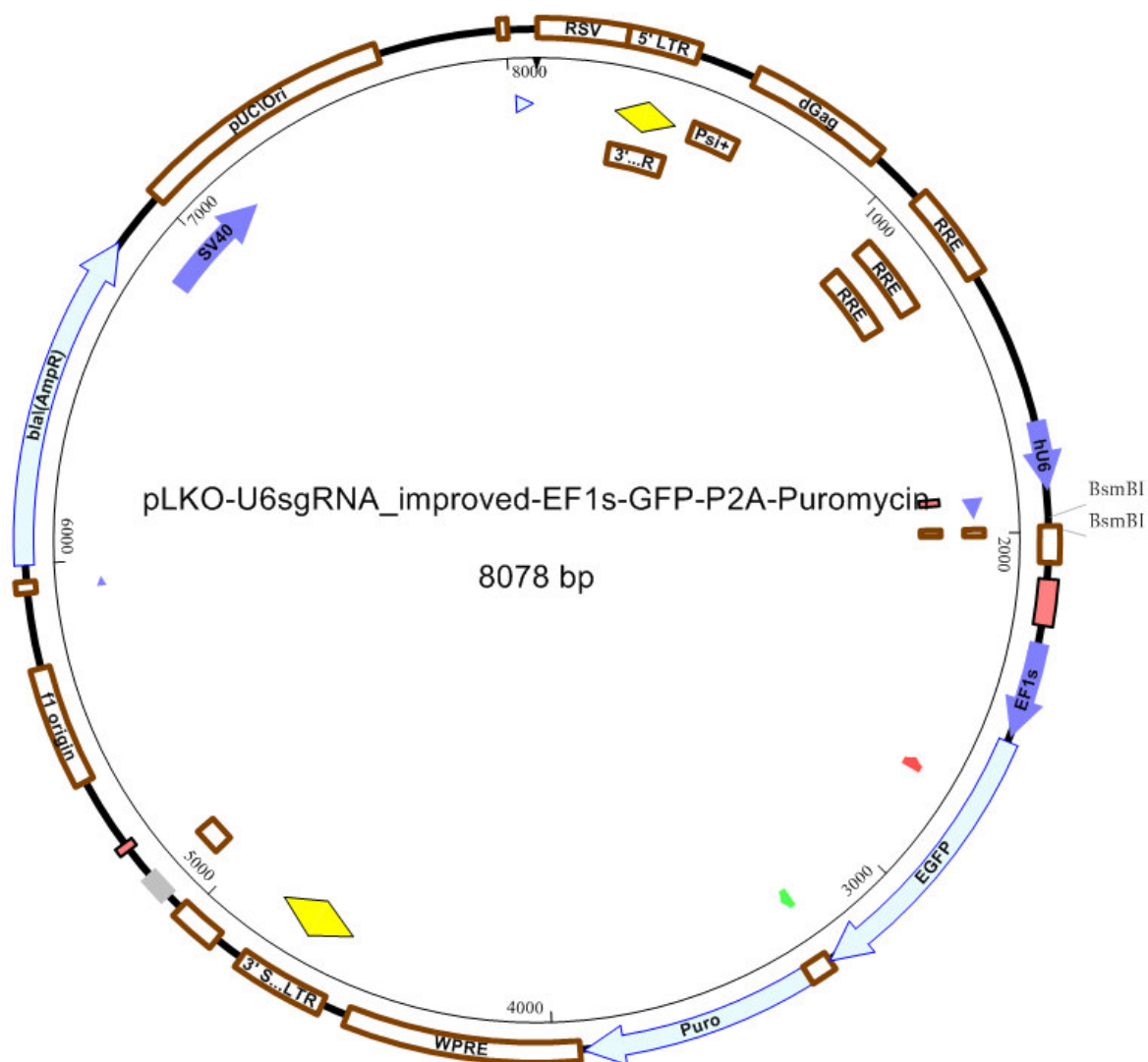


Abbildung 26: Plasmidkarte pLKO-U6sgRNA. Die Schnittschnellen für das Restriktionsenzym *BsmBI* zum Einbringen der sgRNA-Oligonukleotide sind eingezeichnet.

Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Peter Schirmacher und Frau Dr. Gunhild Mechtersheimer für die Möglichkeit bedanken meine Dissertation am Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Heidelberg anfertigen zu können.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Benedikt Brors für die Bereitschaft als Fakultätsgutachter meine Arbeit zu begutachten.

Großen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Kai Breuhahn für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Herrn Dr. Ralf Bischoff und Frau Dr. Christiane Opitz danke ich für ihre Bereitschaft Mitglieder der Prüfungskommission zu sein.

Besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Marcus Renner für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit, die motivierenden Gespräche und für die interessante Themenstellung. Seine Unterstützung und Engagement haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein weiterer Dank geht gleichermaßen an Frau Andrea Müller und Frau Marion Mook für die technische Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor.

Bei Frau Dr. Carolina De la Torre möchte ich mich für die Durchführung der Qualitätskontrolle meiner Proben für die RNA-Sequenzierung bedanken. Zudem danke ich Herrn Dr. Carsten Sticht für die bioinformatische Auswertung der Rohdaten der RNA-Sequenzierung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Olivier Delattre und Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Grünewald für die Ewing-Sarkom-Zelllinie POE bedanken. Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Thomas Grünewald und Herrn Dr. Dr. Martin Franz Orth für die zur Verfügung gestellten Genexpressionsdaten der ES-Kohorte danken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hartmann, Herrn Dr. Marcel Trautmann und Frau Prof. Dr. Uta Dirksen für die Ewing-Sarkom TMAs. Frau Susanne Jabar danke ich für die Korrelationsanalysen der SOX11-Expression mit den klinischen Daten.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Pathologischen Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Ein herzlicher Dank geht an alle Mitglieder der AG Breuhahn und der AG Rössler, die mir bei meinem Projekt geholfen haben. Ebenso möchte ich mich bei den Mitgliedern der AG Tschaharganeh für die Unterstützung bedanken sowie für die zur Verfügung gestellten Vektoren für die Lentivirusproduktion. Vielen Dank auch an die Mitarbeiter der NCT Gewebebank, insbesondere an Herrn Fabio Tabone, für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

Mein größter Dank geht an meinen Verlobten Jens für seine großartige Unterstützung und Motivation während der letzten Jahre. Besonders herzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mich immer unterstützt haben.