

# Entwicklung neuer Therapiekonzepte im myxoiden Liposarkom

---

*Die Rolle von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren und microRNAs*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Helen Sarah Pasternack, geb. Künstlinger

aus

Bonn

Bonn, Januar 2015

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Büttner

2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Famulok

Tag der Promotion: 14.03.2016

Erscheinungsjahr: 2016

Die vorliegende Arbeit wurde in den Instituten für Pathologie der Universitätskliniken Bonn und Köln angefertigt.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Wörtlich oder indirekt übernommenes Gedankengut wurde als solches kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass diese Dissertation an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Bonn, den

---

Helen Sarah Künstlinger

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	V
Vorabveröffentlichung von Ergebnissen .....	XI
1 Einleitung .....	1
1.1 Liposarkome .....	1
1.1.1 Subtypen des Liposarkoms .....	1
1.1.2 Pathologie des myxoiden Liposarkoms .....	1
1.1.3 Molekularpathologie des myxoiden Liposarkoms .....	2
1.1.4 Prognose und Therapie des myxoiden Liposarkoms.....	5
1.2 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren.....	6
1.2.1 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren und ihre Liganden.....	7
1.2.2 Intrazelluläre Signalkaskade von Fibroblastenwachstumsfaktor- Rezeptoren .....	8
1.2.3 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in der Tumorigenese.....	10
1.2.4 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren als Zielstrukturen in der Tumorthherapie .....	11
1.3 microRNA .....	12
1.3.1 Biogenese von microRNA und Regulation von Zielgenen .....	13
1.3.2 Rolle von microRNA in der Tumorigenese.....	14
1.4 Vorarbeiten .....	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 Material .....	18
2.1 Laborgeräte .....	18
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	19
2.3 Chemikalien und Reagenzien .....	21
2.4 Reaktionskits .....	23
2.5 Puffer und Lösungen.....	23

2.6	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur.....	27
2.7	Nukleinsäuren.....	27
2.8	Tyrosinkinaseinhibitoren und Trabectedin .....	30
2.9	Antikörper .....	30
2.10	Zelllinien.....	30
2.11	Patientenkollektiv.....	31
2.12	Software und Datenbanken .....	32
3	Methoden.....	34
3.1	Molekularbiologie.....	34
3.1.1	DNA-Extraktion und -Konzentrationsbestimmung .....	34
3.1.2	RNA-Extraktion und -Konzentrationsbestimmung .....	34
3.1.3	Sangersequenzierung .....	35
3.1.4	Parallelsequenzierung.....	37
3.1.5	Quantitative Echtzeit-PCR.....	40
3.1.6	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	41
3.2	Zellbiologie.....	45
3.2.1	Kultivierungsbedingungen .....	45
3.2.2	Transiente Transfektion.....	45
3.2.3	Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren und Trabectedin .....	46
3.2.4	MTT-Assay .....	48
3.2.5	ApoTox-Glo™ Triplexassay.....	48
3.2.6	Scratch-Assay .....	49
3.3	Biochemie .....	50
3.3.1	Proteinisolation.....	50
3.3.2	Westernblot .....	50
3.4	Immunhistochemie.....	52
3.5	Bioinformatik: BIRTA.....	52

4	Ergebnisse .....	54
4.1	Die Rolle von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in myxoiden Liposarkomen .....	54
4.1.1	<i>FGFR2</i> -Expression in myxoiden Liposarkomen .....	54
4.1.2	Charakterisierung der myxoiden Liposarkomzelllinien.....	56
4.1.3	Ausschaltung von FGF-Rezeptoren durch spezifische siRNAs .....	58
4.1.4	Inhibition des FGFR-Signalwegs durch Tyrosinkinaseinhibitoren.....	61
4.1.5	Kombinationsbehandlung mit FGFR-Inhibitoren und Trabectedin .....	66
4.2	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in Sarkomzelllinien anderer Entitäten.....	69
4.2.1	Expression von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in Sarkomzelllinien .....	69
4.2.2	Genstatus von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in Sarkomzelllinien .....	71
4.2.3	Einfluss von FGFR-Inhibition auf die Viabilität von Sarkomzelllinien .....	72
4.3	Integration von Gen- und microRNA-Expression .....	74
4.3.1	microRNAs mit differentieller Aktivität und Expression .....	74
4.3.2	Funktionelle Charakterisierung ausgewählter microRNAs.....	75
5	Diskussion.....	79
5.1	Die Rolle von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren im myxoiden Liposarkom .....	79
5.2	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in Sarkomzelllinien anderer Entitäten.....	84
5.3	Integration von Gen- und microRNA-Expression .....	88
5.4	Ausblick .....	93
6	Zusammenfassung.....	95
7	Anhang.....	98
8	Abbildungsverzeichnis .....	114
9	Tabellenverzeichnis .....	116

## Inhaltsverzeichnis

---

10	Literaturverzeichnis .....	117
11	Danksagung .....	133
12	Aktive Konferenzbeiträge .....	135
13	Publikationen.....	136

## Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Beta-Actin
AKT	engl. v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
ALK	anaplastisches Lymphom-Rezeptortyrosinkinase
Aqua dest	destilliertes Wasser
B2M	Beta-2-Mikroglobulin
BAC	künstlich entwickeltes bakterielles Chromosom (engl. bacterial artificial chromosome)
Bcl2	B-Zell CLL/Lymphom 2 (engl. B-cell CLL/lymphoma 2)
BIRTA	bioinformatisches Modell (engl. Bayesian inference of regulation of transcriptional activity)
BSA	bovines Serumalbumin
C/EBP	CCAAT-enhancerbindende Proteinfamilie
CBL	Cbl-Protoonkogen
CDK4	cyclinabhängige Kinase 4 (engl. cyclin-dependent kinase 4)
cDNA	komplementäre DNA (engl. complementary DNA)
CHOP	frühere Bezeichnung für DDIT3
Chr.	Chromosom
CLL	chronisch-lymphatische Leukämie
COL1A1	Kollagen Typ I, Alpha 1
C <sub>T</sub>	Zyklus, an dem der Schwellenwert überschritten wird (engl. cycle threshold)
CTAG	engl. cancer/testis antigen
DAG	Diacylglycerin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDIT3	engl. DNA-damage-inducible transcript 3



## Abkürzungsverzeichnis

---

DDLS	dedifferenziertes Liposarkom
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Zellkulturmedium (engl. Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Ethylendiamintetraacetat
ERK	Synonym für MAPK
ET-743	Trabectedin (Ecteinascidin-743)
EWSR1	EWS RNA-bindendes Protein 1
FBS	fetales Rinderserum (engl. fetal bovine serum)
FFPE	formalinfixiert, paraffineingebettet
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (engl. fibroblast growth factor)
FGFR	FGF-Rezeptor
FGFRi	FGF-Inhibitor
FGFRL1	FGFR-ähnliches Protein 1 (engl. FGFR-like 1)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FLI1	Fli-1-Protoonkogen
for	vorwärts (engl. forward)
FRS2	FGFR-Substrat 2
FUS	FUS RNA-bindendes Protein
GAB1	GRB2-assoziiertes Bindeprotein 1
GEO	engl. Gene Expression Omnibus
GRB2	wachstumsfaktorrezeptorgebundenen Protein 2 (engl. growth factor receptor-bound protein 2)
HE	Hämatoxylin-Eosin

## Abkürzungsverzeichnis

---

HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration, Konzentration, die 50%-ige Hemmung bewirkt
Ig	Immunglobulin
IGF1R	insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1-Rezeptor (engl. insulin-like growth factor 1 receptor)
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPO8	Importin 8
k.A.	kein Ansprechen
KRAS	engl. Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MDM2	MDM2-Protoonkogen
MEK	MAPK-Kinase
MET	MET-Protoonkogen
MCL1	Myeloidzelleukämie 1 (engl. myeloid cell leukemia 1)
miR	microRNA
MKP	MAPK-spezifische Phosphatase
MLS	myxoides Liposarkom
mRNA	engl. messenger-RNA
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
MYC	engl. v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NaVan	Natriumorthovanadat
ncRNA	nicht-kodierende RNA (engl. non-coding RNA)
NF- $\kappa$ B	engl. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells

## Abkürzungsverzeichnis

---

NFKBIZ	NF- $\kappa$ B-Inhibitor Zeta
NY-ESO-1	Synonym für CTAG1B
OD	optische Dichte
P53	Tumorsuppressorprotein P53, Produkt des <i>TP53</i> -Gens
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor-1
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PBST	PBS-Tween
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PDGF	engl. platelet-derived growth factor
PDGFB	PDGF Beta-Polypeptid
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat 3-Kinase
PIK3CA	katalytische Untereinheit von PI3K
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLS	pleomorphes Liposarkom
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPAR	Peroxisomproliferator-aktivierter Rezeptor
PRAME	in Melanomen bevorzugt exprimiertes Antigen (engl. preferentially expressed antigen in melanoma)
Pre-miRNA	Vorläufer-microRNA (engl. precursor microRNA)
Pri-miRNA	primäre microRNA
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RAF	RAF-Protoonkogen
RAS	RAS-Protoonkogen
RCLS	rundzelliges Liposarkom (engl. round cell liposarcoma)
REST	relative Expressionssoftware (engl. relative expression software tool)
RET	RET-Protoonkogen

## Abkürzungsverzeichnis

---

rev	rückwärts (engl. reverse)
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten (engl. relative fluorescence units)
RIN	Wert der RNA-Integrität (engl. RNA integrity number)
RLU	relative Lumineszenzeinheiten (engl. relative luminescence units)
RNU44	kleine nukleoläre RNA, C/D Box 44
RNU48	kleine nukleoläre RNA, C/D Box 48
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulfate)
SEF	IL-17-Rezeptor D
SH2	Proteindomäne (engl. Src-homology 2)
siRNA	kleine Interferenz-RNA (engl. small interfering RNA)
Sos	engl. son of sevenless homolog
SOX11	engl. SRY (sex determining region Y)-box 11
SPRY	engl. Sprouty homolog
Src	Tyrosinkinase c-Src (zusammengesetzt aus engl. cellular und sarcoma)
SSC	Natriumchlorid + Natriumcitrat (engl. sodium chloride + sodium citrate)
STAT	signaltransduzierendes und transkriptionsaktivierendes Protein (engl. signal transducer and activator of transcription)
Stk.	Stück
STR	kurze sich wiederholende DNA-Sequenz (engl. short tandem repeat)
TACC	engl. transforming acidic coiled-coil containing protein
Tbl.	Tablette
TCL1A	T-Zell Leukämie/Lymphom 1A (engl. T-cell leukemia/lymphoma 1A)
TK	Tyrosinkinase
TLS	frühere Bezeichnung für FUS
TP53	Tumorprotein p53
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

## Abkürzungsverzeichnis

---

UTR	nicht translatierte Region (engl. untranslated region)
VEGF	Gefäßendothelwachstumsfaktor (engl. vascular endothelial growth factor)
WDLS	gut-differenziertes Liposarkom (engl. well-differentiated liposarcoma)

## Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden vorab an folgender Stelle veröffentlicht:

Künstlinger, H., J. Fassunke, H.-U. Schildhaus, B. Brors, C. Heydt, M. A. Ihle, G. Mechtersheimer, E. Wardelmann, R. Büttner, und S. Merkelbach-Bruse. 2015. FGFR2 is overexpressed in myxoid liposarcoma and inhibition of FGFR signaling impairs tumor growth *in vitro*. *Oncotarget*.in Revision (*acceptable, subject to major revision*).

Diese Vorabveröffentlichung bezieht sich auf Teilergebnisse aus Abschnitt 4.1 und betrifft die folgenden Abbildungen und Tabellen:

- Abbildung 4.1 *FGFR2*-Genexpression in myxoiden Liposarkomen
- Abbildung 4.2 *FGFR2*-Proteinexpression in myxoiden Liposarkomen
- Abbildung 4.6 Apoptoseinduktion durch *FGFR*-siRNAs in MLS 402 Zellen
- Abbildung 4.7 Apoptoseinduktion durch *FGFR*-siRNAs in MLS 1765 Zellen
- Abbildung 4.8 Reduktion der Viabilität von MLS-Zellen durch *FGFR*-Inhibitoren
- Abbildung 4.9 Apoptoseinduktion durch *FGFR*-Inhibitoren in MLS-Zelllinien
- Abbildung 4.10 Auswirkung von *FGFR*-Inhibitoren auf den nachgeschalteten Signalweg
- Abbildung 4.11 Auswirkung von *FGFR*-Inhibitoren auf die Migration von MLS-Zelllinien
- Abbildung 4.13 Kombinationsbehandlung mit *FGFR*-Inhibitoren und Trabectedin
- Tabelle 4.1 Überexpression von Mitgliedern der FGF/*FGFR*-Familie
- Tabelle 4.2 Kombination von *FGFR*-Inhibitoren und Trabectedin

Aufgrund dieser Aufführung wird auf die genannte Vorabveröffentlichung an den entsprechenden Stellen nicht zusätzlich verwiesen.

## 1 Einleitung

### 1.1 Liposarkome

Etwa 1% der humanen Malignome sind Weichgewebstumoren. Dabei ist das Liposarkom mit einem Anteil von 20% das häufigste Weichteilsarkom des Erwachsenen (Conyers et al. 2011). Liposarkome entstehen nicht aus gesundem Fettgewebe, weisen aber morphologische Ähnlichkeiten mit sich entwickelndem Fettgewebe auf und enthalten Fettzellen oder Fettzellenvorläufer.

#### 1.1.1 Subtypen des Liposarkoms

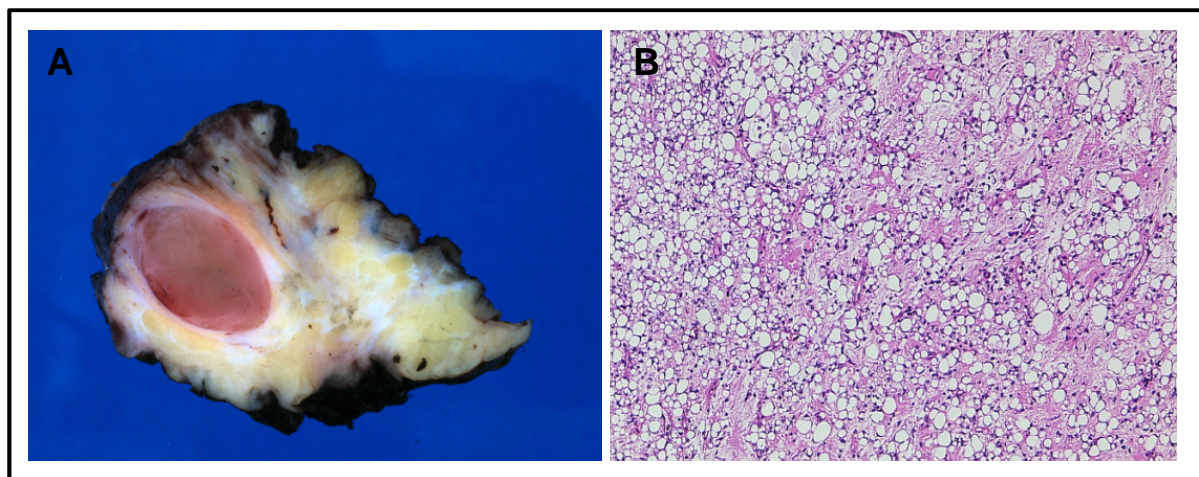
Liposarkome lassen sich in fünf histologische Subtypen einteilen: gut-differenziertes (WDLS), dedifferenziertes (DDLs), myxoides (MLS), rundzelliges (RCLS) sowie pleomorphes (PLS) Liposarkom. Die Subtypen reichen von nicht-metastasierenden Neoplasien (WDLS) bis hin zu high-grade Sarkomen (z.B. PLS). Anhand von zytogenetischen Charakteristika werden die histologischen Subtypen drei Entitäten zugeordnet. So werden WDLS und DDLs sowie MLS und RCLS jeweils als eine Entität mit unterschiedlichem Dedifferenzierungsgrad aufgefasst. WDLS / DDLs sind charakterisiert durch eine Amplifikation auf Chromosom 12, die u.a. die Gene *MDM2* und *CDK4* umfasst (Coindre et al. 2010). MLS und RCLS zeigen spezifische Translokationen des *DDIT3* (ehemals *CHOP*)-Gens (Aman et al. 1992; Antonescu et al. 2000). Pleomorphe Liposarkome weisen keine rekurrenten genetischen Aberrationen auf, sondern haben komplexe unbalancierte Karyotypen. Sie bilden somit eine eigene Entität des Liposarkoms (Dodd 2012).

#### 1.1.2 Pathologie des myxoiden Liposarkoms

Über ein Drittel aller Liposarkome sind myxoide Liposarkome (Dalal et al. 2008), die damit fast 10% aller adulten Weichteilsarkome ausmachen. Ihre Inzidenz in Europa liegt bei etwa einer Neuerkrankung pro einer Million Einwohner pro Jahr, wobei die meisten Patienten in der vierten und fünften Dekade erkranken (Mastrangelo et al. 2012). Es zeigt sich keine geschlechtsspezifische Präferenz (Antonescu und Ladanyi 2002). Die häufigste Lokalisation myxoider Liposarkome liegt mit etwa 75% im tiefen Weichgewebe der unteren Extremitäten (Loubignac et al. 2009).

Makroskopisch sind MLS meist klar umrissene, multinoduläre intramuskuläre Tumoren, die eine hellbraune, gallertartige Schnittfläche aufweisen (Antonescu und Ladanyi 2002). In ihrer Histologie zeigen sie ein prominentes myxoides Stroma, das von einem charakteristischen Kapillarnetz durchzogen ist. Es finden sich sowohl gleichförmige runde oder ovale primitive mesenchymale Zellen als auch monovakuoläre Lipoblasten (Weiss und Goldblum 2008). Abbildung 1.1 zeigt das typische Erscheinungsbild eines myxoiden Liposarkoms.

Neben der histologischen Charakterisierung durch den Pathologen ist für die Differentialdiagnose des myxoiden Liposarkoms v.a. der zytogenetische Nachweis einer *DDIT3*-Translokation maßgeblich (Bovee und Hogendoorn 2010). Dabei dient zumeist die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung als Methode der Wahl.



**Abbildung 1.1 Makroskopie und Histologie des myxoiden Liposarkoms**

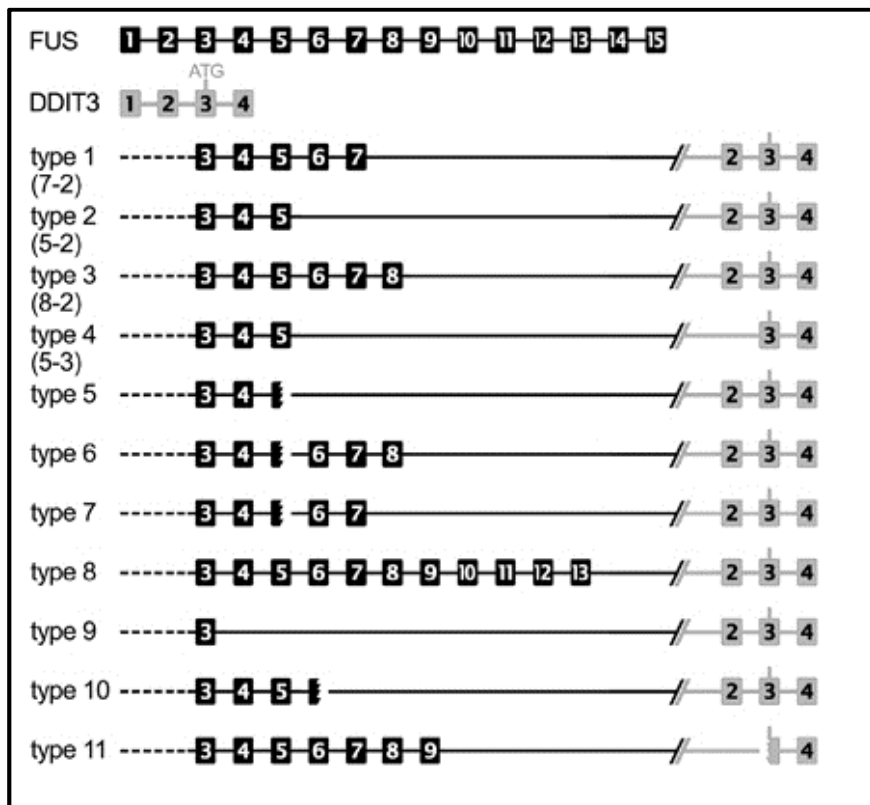
(A) Makroskopisches Bild eines resezierten myxoiden Liposarkoms. (B) Typische Histologie eines myxoiden Liposarkoms (HE-Färbung). Es sind sowohl mesenchymale Zellen als auch Lipoblasten zu erkennen. Die Zellen sind eingebettet in ein myxoides Stroma mit einem feinen geflechtartigen Kapillarnetz.

### 1.1.3 Molekularpathologie des myxoiden Liposarkoms

Molekularpathologisch ist das myxoide Liposarkom gekennzeichnet durch reziproke Translokationen des *DDIT3*-Gens (Chromosom 12). Der Translokationspartner ist dabei in über 90% der Fälle *FUS* (ehemals *TLS*, Chromosom 16), seltener ist das *FUS*-verwandte Gen *EWSR1* (Chromosom 22) beteiligt (Croizat et al. 1993; Panagopoulos et al. 1996; Rabbitts et al. 1993). Die Translokationen



t(12;16)(q13;p11) bzw. t(12;22)(q13;p12) sind spezifisch für diese Tumorentität und können daher zur Differentialdiagnose herangezogen werden (Antonescu et al. 2000). Sie führen jeweils zur Fusion der beiden beteiligten Gene und somit zur Bildung eines Fusionsproteins. Dabei wird die C-terminale RNA-Bindungsdomäne von *FUS* oder *EWSR1* ersetzt durch den gesamten kodierenden Bereich des *DDIT3*-Gens. Abbildung 1.2 zeigt die 11 bislang beschriebenen Typen von *FUS/DDIT3*-Fusionstranskripten. Zu den seltenen *EWSR1/DDIT3*-Fusionen gibt es bislang nur wenige Beschreibungen des genauen Fusionstranskripts, so dass hier keine umfassende Zusammenstellung der Typen möglich ist. Da das *EWSR1*-Gen aber eine ausgeprägte Homologie zum *FUS*-Gen aufweist und bisher keine histologischen oder klinisch-pathologischen Unterschiede zwischen den myxoiden Liposarkomen mit *FUS*- bzw. *EWSR1*-Translokationen gefunden wurden, werden *EWSR1/DDIT3*-Fusionen als analog zu *FUS/DDIT3*-Fusionen betrachtet (Dal Cin et al. 1997; Panagopoulos et al. 1996).



**Abbildung 1.2 Beschriebene Typen von *FUS/DDIT3*-Fusionstranskripten**

Im oberen Teil der Abbildung sind die Exonstrukturen des *FUS*- und *DDIT3*-Gens in ihrem Wildtypstatus gezeigt, darunter sieht man die verschiedenen Fusionstypen der beiden Gene in MLS. Es kommt zu der Fusion verschieden langer Abschnitte von *FUS* mit dem kompletten kodierenden Bereich von *DDIT3*, dessen Transkriptionsstart in Exon 3 (ATG) markiert ist. (Powers et al. 2010)

DDIT3 gehört zu den C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding protein family*)-Transkriptionsfaktoren und wird bei DNA-Schäden sowie in der Adipozyten-differenzierung exprimiert (Ron und Habener 1992). Es besitzt eine DNA-Bindungsdomäne sowie eine Leucinzipper-Dimerisierungsdomäne, deren Funktionalität auch nach der Translokation erhalten bleibt. Zusammen mit der N-terminalen FUS-Domäne, die die Funktion eines transkriptionellen Aktivators besitzt, wird so ein Fusionsprotein gebildet, das vermutlich als aberranter Transkriptionsfaktor agiert. Es bildet Heterodimere mit anderen C/EBP-Transkriptionsfaktoren und reguliert so deren Aktivität. Diese Proteinfamilie spielt zusammen mit dem Peroxisomproliferator-aktivierten Rezeptor (PPAR) $\gamma$  eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Adipozyten. In der Pathogenese des myxoiden Liposarkoms kommt es zu einem Differenzierungsstopp der Zellen und es werden Marker von unreifen Adipozyten, wie C/EBP $\beta$  und  $\delta$ , exprimiert (Cheng et al. 2009; Perez-Mancera et al. 2008). Die Expression von Markern der späten Adipogenese sowie von reifen Adipozyten wird hingegen unterdrückt. Die Inaktivierung von C/EBP $\alpha$  und PPAR $\gamma$  durch das FUS/DDIT3-Fusionsprotein ist für die Entstehung von Liposarkomen essentiell (Perez-Mancera et al. 2007; Wu et al. 2012).

Weiterhin kann FUS/DDIT3 an NFKBIZ binden und so die Regulation NF- $\kappa$ B-kontrollierter Gene verändern. Dabei kommt es z.B. zur Hochregulation von IL-6 und IL-8, die dann als autokriner Wachstumsfaktor bzw. in der Angiogenese wirken (Goransson et al. 2005; Goransson et al. 2009).

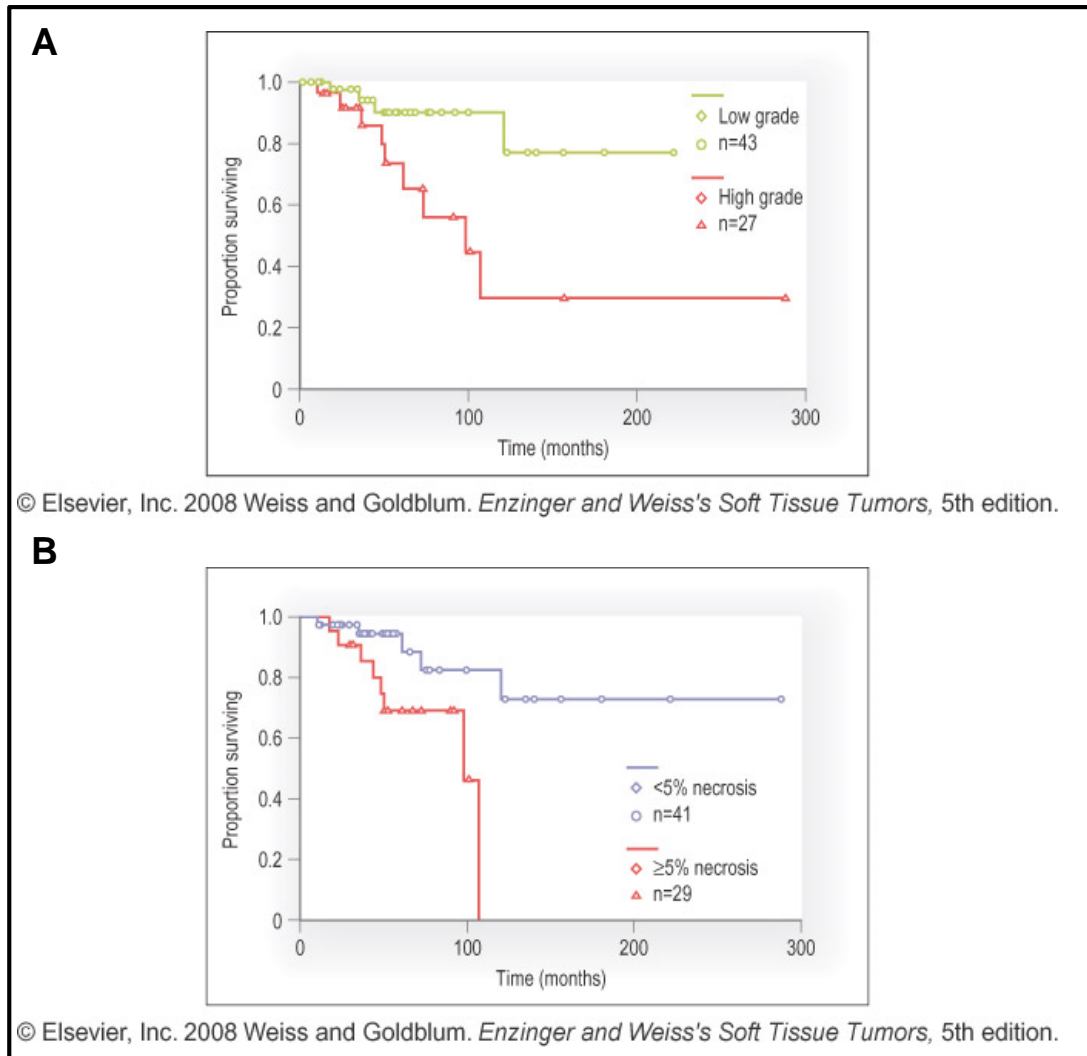
Die *DDIT3*-Translokationen scheinen das tumorinitiierende Ereignis zu sein, da die transgene Expression des Fusionsproteins in mesenchymalen Vorläuferzellen einen Liposarkomphänotyp induziert und den Zellen eine Tumorigenität *in vivo* verleiht (Engstrom et al. 2006; Perez-Losada et al. 2000; Riggi et al. 2006; Rodriguez et al. 2013). Neben diesem initialen Ereignis sind bislang nur wenige Schlüsselstellen der MLS-Pathogenese beschrieben. Eine Rolle scheint die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs zu spielen (Demicco et al. 2012; Sanfilippo et al. 2013). Der Signalweg wird dabei durch überexprimierte Rezeptortyrosinkinasen, wie RET und MET, oder Mutationen im *PIK3CA*-Gen aktiviert (Barretina et al. 2010; Negri et al. 2010). Weiterhin ist die spezifische Expression von Mitgliedern der CTAG (cancer-testis antigen)-Familie, wie z.B. NY-ESO-1, CTAG2 oder PRAME, beschrieben (Hemminger et al. 2013; Hemminger und Iwenofu 2013; Hemminger et al. 2014).

#### 1.1.4 Prognose und Therapie des myxoiden Liposarkoms

Myxoide Liposarkome rezidivieren häufig lokal und ein Drittel der Patienten entwickelt Fernmetastasen. Die Metastasierung erfolgt dabei im Vergleich zu anderen Weichteilsarkomen untypisch und betrifft häufig andere Weichgewebe oder Knochen, bevor die Lunge befallen ist (Antonescu und Ladanyi 2002). Die Prognose für MLS-Patienten ist abhängig vom Rundzellgehalt des Tumors, dem Auftreten von Nekrosen sowie dem Mutationsstatus des *TP53*-Gens. Wie in Abbildung 1.3 dargestellt, ist der Krankheitsverlauf bei hohem histologischen Grad (Rundzellgehalt > 5%) oder dem Vorliegen von Nekrosen signifikant verschlechtert. Zudem wurde gezeigt, dass eine Überexpression von P53 im Zellkern, die mit einer Genmutation von *TP53* assoziiert ist, einen weiteren negativen prognostischen Marker darstellt. Der Typ des *FUS/DDIT3*-Fusionstranskripts scheint hingegen keinen Einfluss auf den klinischen Verlauf der Erkrankung zu haben (Antonescu et al. 2001).

Die den meisten Erfolg versprechende Therapie des myxoiden Liposarkoms ist die vollständige chirurgische Entfernung des Tumors unter Einhaltung eines ausreichenden Resektionsabstandes. Des Weiteren werden lokale Radiotherapie sowie Chemotherapie mit Anthrazyklinen und Ifosfamid angewendet (Katz et al. 2012; Schwartz et al. 2009). Das myxoide Liposarkom scheint im Vergleich zu anderen Liposarkomen chemosensitiver zu sein (Jones et al. 2005). In den letzten Jahren wurden bei MLS-Patienten zudem gute Ergebnisse mit dem neuen Chemotherapeutikum Trabectedin erzielt, das in Europa seit 2007 für die Zweitlinientherapie von Weichteilsarkomen zugelassen ist (Demetri et al. 2009; Grosso et al. 2007; Samuels et al. 2013). Trabectedin (Ecteinascidin-743, ET-743) ist ein Tetrahydroisochinolin-Alkaloid aus dem marinen Manteltier *Ecteinascidia turbinata*, das inzwischen synthetisch hergestellt wird (Molinski et al. 2009). Es gehört zu den alkylierenden Zytostatika und interagiert durch Bindung an die kleine Furche direkt mit der DNA (Pommier et al. 1996). Trabectedin besitzt in myxoiden Liposarkomen eine gewisse Spezifität und interagiert mit dem *FUS/DDIT3*-Fusionsprotein, wodurch es eine lipogene Differenzierung auslöst (Di Giandomenico et al. 2014; Forni et al. 2009). Weiterhin scheint Trabectedin antiinflammatorische sowie antiangiogenetische Aktivität zu besitzen (Dossi et al. 2015; Germano et al. 2010). Für Therapeutika mit definierten molekularen Zielstrukturen gibt es in MLS bislang nur wenige Ansätze, z.B. mit PPAR $\gamma$ -Agonisten oder Tyrosinkinaseinhibitoren, die nur in

kleinen Patientenkohorten getestet wurden (Tseng et al. 2013). Es stehen somit zurzeit keine zugelassenen zielgerichteten Therapien zur Verfügung.



**Abbildung 1.3 Prognostische Marker für das krankheitsspezifische Überleben bei myxoiden Liposarkomen**

(A) Überlebensraten bei hohem (Rundzellgehalt > 5%) bzw. niedrigem histologischen Grad.  
 (B) Überlebensraten bei Vorliegen von mehr oder weniger als 5% Nekrosen.  
 (nach Antonescu et al. 2001)

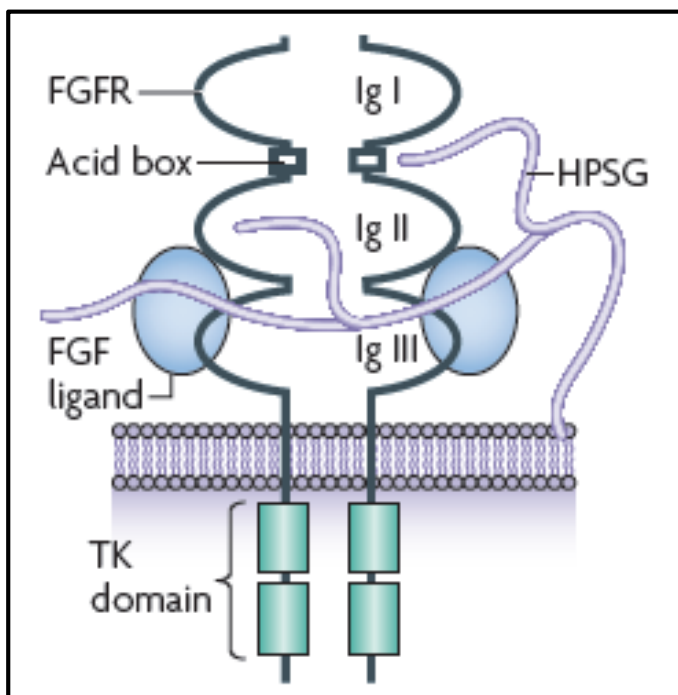
## 1.2 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren

Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren (*fibroblast growth factor receptor*, FGFR) gehören zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Gemeinsam mit ihren Liganden, den Fibroblastenwachstumsfaktoren (*fibroblast growth factor*, FGF), sind sie an der Regulation zahlreicher Prozesse im menschlichen Organismus beteiligt. Dabei

reichen ihre Funktionen von der Embryonalentwicklung hin zur Regulation von Angiogenese und Wundheilung im adulten Organismus (Powers et al. 2000). Da FGF/FGFR zentrale zelluläre Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung und Zellüberleben steuern, spielt ihre Signalübertragung in der Pathogenese vieler Tumoren eine Rolle (Wesche et al. 2011).

### 1.2.1 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren und ihre Liganden

Zur FGFR-Familie gehören die vier hochkonservierten homologen Rezeptoren FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 (Givol und Yayon 1992; Johnson et al. 1990). Sie sind transmembranäre Rezeptortyrosinkinasen und bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne, einer Transmembrandomäne und einer zyttoplasmatischen Domäne, welche die katalytische Tyrosinkinasedomäne enthält (Schlessinger et al. 2000). Der extrazelluläre Teil des Rezeptors besteht aus drei Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domänen, wobei die Ligandenbindungsstelle von Ig II und Ig III gebildet wird (siehe Abbildung 1.4).



**Abbildung 1.4 FGF/FGFR-Struktur**

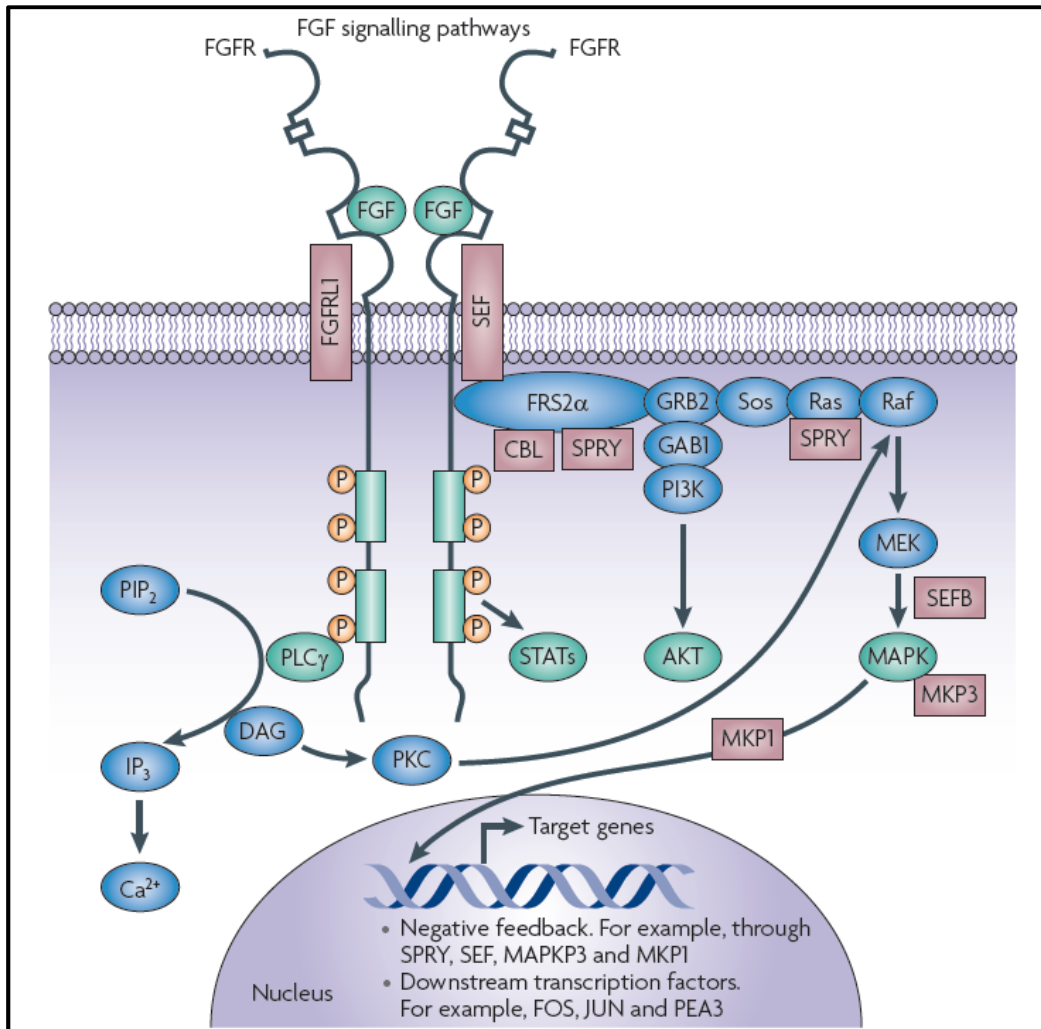
Schematische Darstellung eines FGFR-Dimers mit gebundenen FGF-Liganden. Ig: Immunglobulin; HPSG = HSPG: Heparansulfatproteoglykan; TK: Tyrosinkinase. (Turner und Grose 2010)

Bislang sind als Liganden für die vier FGF-Rezeptoren 18 FGFs bekannt, die übrigen der 23 FGF-Familienmitglieder binden nicht an FGF-Rezeptoren (Gong 2014; Turner und Grose 2010). FGFs sind sekretierte Glykoproteine, die neben den FGF-Rezeptormolekülen extrazellulär an Heparansulfatproteoglykane an der Zelloberfläche oder extrazellulären Matrix binden (Ornitz und Itoh 2001). Die unterschiedliche Ligandenspezifität wird bei FGFR1-3 durch alternatives Splicen der Ig III-Domäne reguliert (Johnson et al. 1991). In diesen drei Rezeptoren wird die Ig III-Domäne durch die Exons IIIa, IIIb und IIIc kodiert. Der N-terminale Teil von Ig III wird durch IIIa formiert, während der C-terminale Abschnitt entweder durch IIIb oder IIIc gebildet wird (Johnson und Williams 1993). Epitheliale Zellen exprimieren hauptsächlich die IIIb-Variante, während in mesenchymalen Zellen die IIIc-Isoform exprimiert wird (Ornitz et al. 1996). FGFR4 gibt es im Gegensatz zu den drei anderen FGF-Rezeptoren nur in einer der IIIc-Isoform entsprechenden Variante, da hier die C-terminale Hälfte der Ig III-Domäne von nur einem Exon kodiert wird (Kostrzewa und Muller 1998; Turner und Grose 2010). Auch wurden lösliche Varianten der FGF-Rezeptoren gefunden, die entweder trunkiert sind oder durch alternatives Splicen entstehen (Hanneken 2001).

### **1.2.2 Intrazelluläre Signalkaskade von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren**

Wie in Abbildung 1.4 und Abbildung 1.5 dargestellt ist, werden bei Aktivierung des FGFR-Signalwegs FGF/FGFR-Komplexe gebildet, die aus zwei Rezeptormolekülen, zwei FGFs und einer Heparansulfatproteoglykan (HSPG)-Kette bestehen (McKeehan und Kan 1994; Nugent und Edelman 1992). Durch diese Rezeptordimerisierung gelangen die Tyrosinkinasedomänen in dichte Nähe zueinander und es kommt zur Transphosphorylierung von Tyrosinresten (Klint und Claesson-Welsh 1999). An diese Reste binden daraufhin Adapterproteine mit SH2 (*Src-homology 2*)-Domänen. Eines der wichtigsten Adapterproteine ist FRS2 (*FGFR substrate 2*), welches durch die Bindung an aktivierte FGF-Rezeptoren selbst an Tyrosinresten phosphoryliert wird und so über weitere Adapterproteine die zentralen nachgeschalteten Signalwege RAS/RAF/MAPK und PI3K/AKT aktiviert (Eswarakumar et al. 2005). Ein weiteres Adapterprotein ist die Phospholipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), die Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$ ) hydrolysiert, wodurch Calcium aus intrazellulären Speichern freigesetzt und die Proteinkinase C (PKC) aktiviert wird (Mohammadi et al. 1991). Die aktive PKC führt

wiederum über RAF zu einer verstärkten Aktivierung des MAPK-Wegs. Auch *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Proteine werden durch FGF-Rezeptoren aktiviert (Hart et al. 2000).



**Abbildung 1.5 Intrazelluläre Signalkaskade von FGF-Rezeptoren**

Durch die Bindung von Liganden kommt es zur Rezeptordimerisierung und Signaltransduktion ins Innere der Zelle. Die Kinasedomänen transphosphorylieren sich gegenseitig und setzen über Adapterproteine die Signalkaskade in Gang. Es werden die vier wichtigen Signalwege RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT, STAT und PLCγ aktiviert. (Turner und Grose 2010)

Durch die von FGF-Rezeptoren aktivierten Signalwege werden zentrale zelluläre Prozesse wie Proliferation, Apoptose oder Migration gesteuert, so dass eine exakt abgestimmte Regulation entscheidend ist. Daher wird die FGFR-Signaltransduktion durch verschiedene negative Regulationsmechanismen kontrolliert. Zum einen

kommt es nach der Rezeptoraktivierung zur Internalisierung und lysosomalen Degradation der Rezeptoren (Wong et al. 2002). Zum anderen gibt es verschiedene inhibitorische Moleküle, wie die Sprouty Proteine (SPRY) oder FGFR1 (*FGFR-like 1*), einen Rezeptor für FGFs ohne Tyrosinkinasedomäne (Hacohen et al. 1998; Wiedemann und Trueb 2000). Zum Teil werden inhibitorische Vorgänge durch einen negativen Feedbackmechanismus in Gang gesetzt. So werden MAPK-Phosphatasen (MKP) induziert oder FRS2 an Threonin- oder Serinresten phosphoryliert, so dass die aktive Signalkaskade abgeschwächt wird (Gotoh 2008; Zhao und Zhang 2001).

### 1.2.3 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in der Tumorigenese

Eine Deregulation des FGFR-Signalwegs ist in der Pathogenese vieler Tumoren beschrieben. Ursächlich dafür können Rezeptorüberexpression, aktivierende Genmutationen, genomische Amplifikationen oder Translokationen sowie ein verändertes Splicen sein (Wesche et al. 2011). Da die nachgeschalteten Signalwege u.a. Proliferation, Apoptose sowie Migration und Invasion beeinflussen, hat eine Deregulation des Signalwegs direkten Einfluss auf die Tumorigenese (Turner und Grose 2010).

Die FGFR-Signalwege gehören zu den am häufigsten in Tumoren mutierten Signalwegen (Greenman et al. 2007). Dabei können Mutationen in den Rezeptorgenen zur ligandenunabhängigen Dimerisierung oder zur konstitutiven Aktivierung der Kinasedomäne führen. Aktivierende Mutationen von *FGFR3* wurden in Urothelkarzinomen der Blase detektiert, wobei v.a. der nicht-invasive Typ betroffen war (The-Cancer-Genome-Atlas-Research-Network 2014). Auch in anderen Tumor-entitäten, wie dem Zervix- oder Prostatakarzinom, wurden Mutationen im *FGFR3*-Gen gefunden (Hernandez et al. 2009; Rosty et al. 2005). Für *FGFR2* wurden aktivierende Mutationen im Endometriumkarzinom beschrieben (Byron et al. 2010; Dutt et al. 2008). In Rhabdomyosarkomen wurden *FGFR4*-Mutationen nachgewiesen (Taylor et al. 2009). Neben aktivierenden Mutationen sind auch inaktivierende Mutationen in *FGFR*-Genen beschrieben, so dass FGF-Rezeptoren offensichtlich unter bestimmten Umständen auch als Tumorsuppressoren wirken können (Gartside et al. 2009).

Genomische Amplifikationen wurden v.a. für *FGFR1* und *FGFR2* beschrieben. So tragen etwa 10% der Magenkarzinome *FGFR2*-Amplifikationen (Kunii et al. 2008). In



Mammakarzinomen wurden Amplifikationen der Region um *FGFR1* detektiert, wobei hier nicht klar ist, ob *FGFR1* das entscheidende Onkogen ist (Bernard-Pierrot et al. 2008; Turner et al. 2010). Auch in Osteosarkomen finden sich *FGFR1*-Amplifikationen. Hier konnte eine Assoziation zu schlechterem Ansprechen auf neoadjuvante Chemotherapie gezeigt werden (Fernanda Amary et al. 2014). *FGFR1*-Amplifikationen wurden zudem in oralen und pulmonalen Plattenepithelkarzinomen nachgewiesen (Freier et al. 2007; Weiss et al. 2010).

Translokationen mit der Beteiligung von *FGFR*-Genen können ebenfalls zu einer konstitutiven Aktivierung des Signalwegs führen. Dabei kommt es entweder zu einer Überexpression aufgrund eines starken Promoters oder zu der Bildung von Fusionsproteinen, die durch Oligomerisierung die FGFR-Kinasedomäne aktivieren (Wesche et al. 2011). Nachdem *FGFR*-Translokationen in hämatologischen Neoplasien schon länger bekannt waren, wurden inzwischen auch aktivierende Fusionen mit *FGFR*-Genen in verschiedenen soliden Tumoren identifiziert (Chesi et al. 1997; Wu et al. 2013; Xiao et al. 1998). Ein Beispiel für FGFR-aktivierende Translokationen ist die Fusion von *FGFR1* oder *FGFR3* mit TACC-Proteinen. Solche Fusionen wurden in Glioblastomen, Blasenkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Lunge nachgewiesen (Singh et al. 2012; Williams et al. 2013; Wu et al. 2013).

Neben den beschriebenen genetischen Aberrationen, die zur Aktivierung des FGFR-Signalwegs führen, kann dieser auch autokrin oder parakrin durch veränderte Expression der Liganden aktiviert werden. Ein autokriner Mechanismus ist beispielsweise für FGF5 in verschiedenen Tumoren oder diverse FGFs in hepatozellulären Karzinomen beschrieben worden (Gauglhofer et al. 2011; Hanada et al. 2001; Kin et al. 1997; Uematsu et al. 2005). Parakrin kann die Expression von FGFs z.B. Neoangiogenese über die endothelialen Rezeptoren *FGFR1* oder *FGFR2* fördern und so zur Tumorprogression beitragen (Presta et al. 2005).

### **1.2.4 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren als Zielstrukturen in der Tumorthherapie**

Aufgrund der Beteiligung des FGFR-Signalwegs an der Pathogenese vieler Tumoren ist die Entwicklung therapeutischer Strategien, die gegen FGF-Rezeptoren gerichtet sind, Gegenstand der aktuellen klinischen Forschung. Dabei werden im Wesentlichen zwei Ansätze verfolgt. Zum einen gibt es inzwischen verschiedene Tyrosin-

kinaseinhibitoren, die die intrazelluläre FGFR-Signalübertragung hemmen, und zum anderen werden Antikörper entwickelt, die den Signalweg extrazellulär inhibieren (Wesche et al. 2011).

Verschiedene FGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren befinden sich derzeit in klinischen Studien. Ein vielversprechender Inhibitor ist dabei BGJ398 (Novartis), der sehr spezifisch für FGF-Rezeptoren ist. Er wird erfolgreich in verschiedenen Malignomen mit *FGFR*-Aberrationen, wie *FGFR1*-amplifizierten Plattenepithelkarzinomen der Lunge oder *FGFR3*-mutierten Blasenkarzinomen, angewendet (CancerDiscovery 2014; Guagnano et al. 2012). Ein weiterer potenter und selektiver FGFR-Inhibitor ist AZD4547 (AstraZeneca), der u.a. in *FGFR2*-amplifizierten Magenkarzinomen zum Einsatz kommt (Gavine et al. 2012; Xie et al. 2013). Andere FGFR-Inhibitoren zeigen ein breiteres Wirkspektrum und sind aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Rezeptoren z.B. auch aktiv gegenüber VEGF- oder PDGF-Rezeptoren. Beispiele für solche unspezifischeren Tyrosinkinaseinhibitoren sind Dovitinib (Novartis), Ponatinib (Ariad Pharmaceuticals) oder Lucitanib (Clovis Oncology).

Bei der Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen FGF-Rezeptoren wird das Ziel verfolgt, eine im Vergleich zu Tyrosinkinaseinhibitoren bessere Spezifität für bestimmte Liganden oder Isoformen zu erreichen (Brooks et al. 2012). In prä-klinischen Studien konnten beispielsweise Effekte mit anti-FGFR2-Antikörpern in Magenkarzinomzellen oder mit anti-FGFR3-Antikörpern im multiplen Myelom und Blasenkarzinom erzielt werden (Qing et al. 2009; Zhao et al. 2010). Klinische Daten zum Einsatz von FGFR-Antikörpern liegen bislang nicht vor.

### 1.3 microRNA

microRNAs sind kleine, nicht kodierende, einzelsträngige RNA-Moleküle, die endogen exprimiert werden. Sie sind evolutionär hochkonserviert und spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Expression vieler Gene (Bartel 2004; Zhang et al. 2007). Erstmals beschrieben wurden sie bereits 1993 in *C. elegans* (Lee et al. 1993), wobei die Bezeichnung microRNA erst seit 2001 verwendet wird (Ambros 2001; Eddy 2001; Lee und Ambros 2001; Ruvkun 2001). In der microRNA-Datenbank miRBase Version 21 aus Juni 2014 (<http://www.mirbase.org>) werden 1881 humane microRNA-Vorläufergene, die in 2588 reife microRNAs prozessiert werden, annotiert (Griffiths-Jones et al. 2006). Dementsprechend kodieren etwa 3 –

4% der menschlichen Gene microRNAs, wobei die Funktion vieler microRNAs bislang unbekannt ist (Valinezhad Orang et al. 2014).

### 1.3.1 Biogenese von microRNA und Regulation von Zielgenen

microRNAs sind die Transkripte zelleigener Gene, die innerhalb von Exons oder Introns proteinkodierender Gene oder in nicht-kodierenden Bereichen lokalisiert sind. Ihre Expression ist meist gewebespezifisch zusammen mit angrenzenden Genen organisiert, einige microRNAs haben auch eigene Promoter (Johnson et al. 2003; Martinez et al. 2008). Es gibt zudem Gencluster mit mehreren microRNAs, die gemeinsam transkribiert werden (Lee et al. 2002). Das primäre Genprodukt einer microRNA ist mehrere hundert Nukleotide lang und wird als „Pri-microRNA“ bezeichnet. Noch im Zellkern wird dieses Primärtranskript durch einen Mikroprozessorkomplex zu einer ca. 70 bis 80 Nukleotide großen „Pre-microRNA“ prozessiert (Denli et al. 2004; Gregory et al. 2004; Tomari und Zamore 2005). Die Pre-microRNA bildet eine charakteristische Haarnadelstruktur und wird aktiv ins Zytoplasma transportiert (Yi et al. 2003). Dort erfolgt die weitere Prozessierung in eine 17 bis 24 Nukleotide lange doppelsträngige microRNA, die entwunden und einzelsträngig wird (Chendrimada et al. 2005). Ein microRNA-Strang bildet die reife microRNA und wird in einen Ribonukleoproteinkomplex aufgenommen, um die Aktivität von Zielgenen zu regulieren (Gregory et al. 2005).

Die Erkennung von Zielgenen durch microRNAs erfolgt über die Komplementarität ihrer sogenannten seed-Region, die die 5'-Nukleotide 2 – 8 umfasst (Lewis et al. 2005). Die entsprechenden Erkennungssequenzen liegen dabei meist in der 3'-UTR (*untranslated region*) des Zielgens, wobei auch Regulationen über die 5'-UTR oder kodierende Bereiche beschrieben sind (Brummer und Hausser 2014; Lai 2002; Lee et al. 2009). Neben der bekannten Bindung über die seed-Region wurden kürzlich für mehr als 35% der microRNA/mRNA-Duplexe zusätzliche Bindungsmuster identifiziert (Helwak et al. 2013).

Da die mRNA-Bindung durch microRNAs meist durch imperfekte Komplementarität erreicht wird, kann eine microRNA eine Vielzahl von Zielgenen regulieren. Generell ist die Art der Regulation dabei abhängig vom Grad der Komplementarität zwischen microRNA und mRNA des Zielgens sowie von RNA-Bindeproteinen der Argonautfamilie (Chendrimada et al. 2005). Bei hoher Komplementarität wird die Ziel-mRNA

direkt enzymatisch abgebaut. In Säugerzellen liegt allerdings meist nur eine teilweise Übereinstimmung der Bindesequenz vor und es kommt zu einer Destabilisation der mRNA sowie zur Inhibition der Translation (Guo et al. 2010). Neben dieser klassischen negativen posttranskriptionellen Regulation durch microRNAs ist inzwischen bekannt, dass microRNAs unter bestimmten Umständen auch eine Hochregulation der Genexpression bewirken können (Valinezhad Orang et al. 2014; Vasudevan et al. 2007).

### **1.3.2 Rolle von microRNA in der Tumorigenese**

Schätzungen zufolge werden mehr als die Hälfte aller humanen proteinkodierenden Gene durch microRNAs reguliert (Friedman et al. 2009). Dadurch sind microRNAs an zentralen zellulären Prozessen wie Differenzierung, Proliferation, Apoptose oder Angiogenese beteiligt und spielen auch in der Tumorigenese eine entscheidende Rolle (Adams et al. 2014; Cheng et al. 2005; Friedman und Jones 2009; Urbich et al. 2008). Sie können dabei sowohl onkogene als auch tumorsuppressorische Wirkung haben (Lotterman et al. 2008; Vandenboom li et al. 2008). Die Gene vieler microRNAs liegen in Genbereichen, die mit der Entwicklung von Tumoren assoziiert sind, oder in besonders instabilen genomischen Regionen (Calin et al. 2005). In vielen Tumoren konnte eine im Vergleich zum Normalgewebe veränderte microRNA-Expression nachgewiesen werden (Gregory und Shiekhattar 2005; Lu et al. 2005). Neben den microRNAs kann auch die veränderte Expression von Molekülen, die an der microRNA-Biogenese beteiligt sind, zu einer Deregulation der microRNA/mRNA-Interaktion führen (Adams et al. 2014).

Erstmals wurde die Rolle von microRNAs in der humanen Tumorigenese bei der chronisch lymphatischen Leukämie (CLL) gezeigt. Hier ist die häufigste chromosomale Aberration eine Deletion im Lokus 13q14, der u.a. die Gene für die microRNAs miR-15 und miR-16 umfasst (Calin et al. 2002). Seitdem wurde die Beteiligung von microRNAs an der Pathogenese verschiedener Tumoren beschrieben (Vandenboom li et al. 2008). In Sarkomen konnten durch Expressionsprofiling veränderte microRNA-Expressionsmuster nachgewiesen werden, die z.B. eine verbesserte Subklassifizierung der Tumoren erlauben (Fountzilias et al. 2012; Renner et al. 2012; Subramanian et al. 2008).

Ein Beispiel für eine microRNA mit zentraler Bedeutung in verschiedenen humanen Karzinomen und Sarkomen ist miR-34a, die ein direktes Zielgen von P53 ist (Hermeking 2010; Kofman et al. 2013; Yamakuchi und Lowenstein 2009; Yan et al. 2012). Durch die negative Regulation bekannter Onkogene, zu denen u.a. c-MYC und c-MET gehören, wirkt miR-34a der Tumorigenese entgegen (Li et al. 2009; Yamamura et al. 2012). Auf der Basis dieser tumorsuppressorischen Funktion von miR-34a wurde die erste microRNA-Ersatztherapie für Tumorerkrankungen entwickelt, die den Einzug in die klinische Testung erreicht hat (MRX34, NCT01829971). Ein weiteres Beispiel für therapeutisch nutzbare microRNAs ist die let-7-Familie. Zu den Zielgenen dieser microRNAs gehört das RAS-Protoonkogen, durch dessen negative Regulation let-7-microRNAs als starke Tumorsuppressoren wirken (Johnson et al. 2005). Derzeit befinden sich let-7-Imitatoren in der präklinischen Entwicklung.

Ein zweiter Ansatz in der Tumorthherapie ist der Einsatz von microRNA-Antagonisten, wobei diese vorwiegend aus antisense Oligonukleotiden bestehen (Saumet et al. 2014). Hier werden microRNAs mit onkogener Funktion geblockt. Es gibt derzeit aber noch keine Substanzen, die klinisch in der Tumorthherapie angewendet werden.

### 1.4 Vorarbeiten

Im Rahmen einer vorangegangenen Diplomarbeit wurden Expressionsanalysen in myxoiden Liposarkomen durchgeführt, um die molekulare Pathogenese dieser Tumoren zu charakterisieren (Künstlinger 2010). Dazu wurde ein Kollektiv von humanen Tumorproben und Fettgewebeproben als Referenzkollektiv zusammengestellt (siehe Abschnitt 2.11). Die Fälle wurden histologisch begutachtet und zur Bestätigung der Differentialdiagnose erfolgte der Nachweis der *DDIT3*-Translokation mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung sowie durch RT-PCR und Sequenzierung. Eine Auswahl von sieben Tumorproben sowie ein RNA-Pool aus acht Fettgewebeproben mit guter RNA-Qualität (RIN  $\geq 7$ ) wurden für whole-genome Microarrays und microRNA Microarrays eingesetzt. So konnte eine Vielzahl von signifikant differentiell exprimierten Genen ausfindig gemacht werden. Zudem wurden achtzehn microRNAs identifiziert, die in allen sieben Tumorproben eine im Vergleich zum Fettgewebe signifikant veränderte Expression aufwiesen. Für die anschließende Validierung der Microarrayanalysen wurden als geeignete Referenzen die Gene *IPO8* und *B2M* sowie die beiden ncRNAs RNU44 und RNU48 ermittelt. Die Microarrays wurden

exemplarisch an zwölf Genen sowie sechs microRNAs mittels qPCR im gesamten Tumorkollektiv validiert.

Diese vorab gewonnenen Expressionsdaten stellen die Grundlage für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien dar. Die Rohdaten der whole-genome Microarrayanalysen wurden in der *Gene Expression Omnibus* (GEO)-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) hinterlegt und sind über die GEO-Serienzugangsnummer GSE62747 abrufbar.

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Molekularpathologie des myxoiden Liposarkoms ist bislang nur unvollständig verstanden und es stehen keine zielgerichteten Therapien mit spezifischen Zielstrukturen zur Verfügung. Die für myxoide Liposarkome spezifische Translokation führt zu der Bildung eines Fusionsproteins, das als aberranter Transkriptionsfaktor agiert, so dass in dieser Tumorentität viele Gene differentiell exprimiert vorliegen. Auf Grundlage der oben beschriebenen Vorarbeiten werden nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit Kandidatengene und -microRNAs ausgewählt, validiert und funktionell charakterisiert.

Die whole-genome Microarrays weisen u.a. auf eine Überexpression von *FGFR2* in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe hin. Aufgrund der hohen klinischen Bedeutung dieses Gens werden zur Überprüfung der Relevanz dieser Ergebnisse zusätzliche Experimente angeschlossen. So wird zunächst die Überexpression mittels qPCR und Immunhistochemie in Primärtumoren validiert. Die Microarrayanalysen zeigen auch eine Überexpression anderer Mitglieder der FGF/FGFR-Familie auf, was eine potentielle Rolle des FGFR-Signalwegs in myxoiden Liposarkomen weiter unterstreicht. Um diese Hypothese zu überprüfen, werden myxoide Liposarkomzelllinien funktionell untersucht. Zunächst werden sie dazu mit spezifischen, gegen die vier FGF-Rezeptoren gerichteten, siRNAs transfiziert und die Effekte durch Messung von Zellviabilität, Zytotoxizität und Apoptose analysiert. Im Folgenden kommen spezifische FGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren zum Einsatz, die sich für andere Tumorentitäten zum Teil bereits in der klinischen Erprobung befinden. Die Inhibition des FGFR-Signalwegs wird anhand des Phosphorylierungsstatus nachgeschalteter Proteine überprüft. Die Funktionalität der Inhibitoren wird in Proliferations- und Apoptoseassays analysiert sowie ihr Einfluss

auf die Migration der myxoiden Liposarkomzellen untersucht. In einer Kombinationsbehandlung werden die FGFR-Inhibitoren zusätzlich zusammen mit dem Chemotherapeutikum Trabectedin angewendet. Der Effekt der Kombinationsbehandlung wird im Vergleich zur Gabe von Trabectedin alleine analysiert.

Bei nachgewiesener Rolle des FGFR-Signalwegs im myxoiden Liposarkom werden auch in anderen Sarkomentitäten Untersuchungen zu FGF-Rezeptoren angeschlossen. Hier werden Zelllinien verschiedener Sarkome auf die Expression sowie genetische Aberrationen von FGF-Rezeptoren analysiert. Zudem werden die Sarkomzellen mit FGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt und der Einfluss auf die Viabilität der Zellen gemessen.

Des Weiteren werden die Daten der whole-genome und microRNA Microarrays integriert und mit bioinformatischen Methoden gemeinsam ausgewertet. Dadurch werden microRNAs mit differentieller Aktivität identifiziert. Die differentielle Expression von ausgewählten microRNAs wird mittels qPCR validiert. Für microRNAs mit nachgewiesener differentieller Aktivität und Expression werden funktionelle Studien mit microRNA-Imitatoren in myxoiden Liposarkomzelllinien durchgeführt und die Effekte durch Messung von Zellviabilität, Zytotoxizität und Apoptose analysiert.

So werden im Rahmen dieser Arbeit neue Kandidatengene und -microRNAs in myxoiden Liposarkomen untersucht, die zur Pathogenese der Tumoren beitragen und prognostische oder diagnostische Biomarker oder therapeutische Zielstrukturen in diesen Tumoren darstellen. Über die Beteiligung von microRNAs an der Entstehung und Progression dieser Tumoren liegen bislang kaum Daten vor, so dass diese Arbeit einen Beitrag leistet, um hier neue Schlüsselstellen in der Molekularpathologie myxoider Liposarkome aufzudecken. Zudem wird erstmals eine funktionelle Rolle des FGFR-Signalwegs im myxoiden Liposarkom geprüft, um so die Basis für neue zielgerichtete Therapieansätze zu schaffen.

## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Tabelle 2.1 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Absaugpumpe	vacuum gas pump PM 20405-86	VWR, Radnor PA / US
Autoklav	LABOKLAV 160-B	VWR, Radnor PA / US
Bioanalyzer	2100 Bioanalyzer	Agilent, Santa Clara / US
Brutschrank	Galaxy 170S, New Brunswick	Eppendorf, Hamburg
Eismaschine	RF0385A	Manitowoc Ice, Manitowoc WI / US
Fluoreszenzreader	FLUOstar OPTIMA	BMG Labtech, Ortenberg
Fluorometer	Qubit® 2.0	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Geldokumentationssystem, Westernblot	ChemiDoc™ XRS+	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA / US
Gelelektrophoresekammer, Westernblot	Xcell SureLock™	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Hybridisierungskammern	ThermoBrite™	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Immunfärbeautomat	BOND Max	A. Menarini Diagnostics, Florenz / IT
Kapillarelektrophorese, PCR-Produkte	QIAxcel	Qiagen, Hilden
Kapillarelektrophorese, Sequenzierung	3500 Genetic Analyzer	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Kryostat	CM 3050 S	Leica Microsystems, Wetzlar
Kühlplatte	EG1150 C	Leica Microsystems, Wetzlar
Luminometer	Centro LB 960	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Magnetplatte	96well Magnetic-Ring Stand	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Magnetrührer	RH basic 2	IKA®-Werke, Staufen
Mikroskop, FISH und IHC	DM 5500 B	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikroskop, Scratch-Assay	PALM MicroBeam	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop, Zellkultur	DM IL LED	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrotom	SM2400	Leica Microsystems, Wetzlar
Neubauer-Zählkammer	0.0025 mm <sup>2</sup>	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Paraffingießstation	TBS 88 + TE899	MEDITE, Burgdorf
Parallelsequenzierer	MiSeq™	Illumina, San Diego CA / US
PCR-Cycler, allgemein	T3000 Thermocycler	Biometra, Göttingen
PCR-Cycler, Parallelsequenzierung	C1000™ Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA / US
PCR-Cycler, Platte	T Professional Thermocycler	Biometra, Göttingen
PCR-Werkbänke	NuAire	INTEGRA Biosciences, Fernwald



## 2 Material

Gerät	Modell	Hersteller
pH-Meter	FiveEasy Plus	Mettler-Toledo, Schwerzenbach / CH
Pipettierhilfe, Combitips	Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, Stripetten	Easypet 421	Eppendorf, Hamburg
qPCR-System, LightCycler	LightCycler® 480 II	Roche Diagnostics, Rotkreuz / CH
qPCR-System, TaqMan	7900HT	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Spannungsgerät	EV243	Consort bvba, Turnhout / BE
Spektrophotometer, Einzelproben	ND-1000, NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Waltham MA / US
Spektrophotometer, Platte	infinite F50	TECAN, Männedorf / CH
Sterilbank	Mars Safety Class 2, ScanLaf	LaboGene, Lyngø / DK
Thermoschüttler, Analytik Jena	BioShake iQ	Analytik Jena, Jena
Thermoschüttler, Eppendorf	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermoschüttler, Platte	Incubating Microplate Shaker	VWR, Radnor PA / US
Transferkammer, Westernblot	Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA / US
Trockenschränke	HERAEUS Oven	Thermo Scientific, Waltham MA / US
Vorbehandlungsautomat, FISH	VP2000 Processor	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Vortexmischer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York / US
Waage, fein	Sartorius research ECN 611-2606	Sartorius, Göttingen
Waage, grob	SE 1501	VWR, Radnor PA / US
Wasserbäder	SUB Aqua 12 Plus	Grant Instruments, Shepreth / GB
Wasserfilteranlage	PURELAB Classic	ELGA, LabWater, Celle
Zentrifuge, gekühlt	HERAEUS Fresco 17	Thermo Scientific, Waltham MA / US
Zentrifuge, Mini	SPROUT™	Heathrow Scientific® LLC, Vernon Hills IL / US
Zentrifuge, Platte	5430 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Raumtemperatur	HERAEUS Pico 17	Thermo Scientific, Waltham MA / US
Zentrifuge, Zellkultur	HERAEUS Megafuge16	Thermo Scientific, Waltham MA / US

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien**

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Abdeckfolien	MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Combitips	Combitips advanced® 0.5 ml, 1 ml, 5 ml, 10 ml	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser	LABSOLUTE®	Th. Geyer, Renningen

## 2 Material

Bezeichnung	Spezifikation	Hersteller
Filtereinheit, Sterilfiltration	Whatman, Rotrand 0.2 µm, cellulose acetat	GE Healthcare, Chalfont St. Giles / GB
Filterpapier	Whatman, 3 mm CHR	GE Healthcare, Chalfont St. Giles / GB
Handschuhe	Peha-soft® nitrile	Paul Hartmann, Heidenheim
Kryoröhrchen	2 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Mikrotiterplatten	384well qPCR	Life Technologies, Carlsbad CA / US
	96well nunc™, Rund- bzw. Flachboden	Thermo Scientific, Waltham MA / US
	96well weiß, Luminometer	Greiner bio-one, Frickenhausen
	MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Mikrotomklingen	Microtome Blades	Feather, Osaka / JP
Objektträger	Menzel-Gläser SUPERFROST® PLUS	Thermo Scientific, Waltham MA / US
	Objektträger	Engelbrecht, Edermünde
	Surgipath X-tra™ Adhesive	Leica Biosystems, Nussloch
Pasteurpipetten	230 mm	VWR International, West Chester PA / US
Pipetten	Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	10 µl	Axygen, Union City CA / US
	100 µl	Sarstedt, Nümbrecht
	1.000 µl	BRAND, Wertheim
	Filtertips 10 µl, 100 µl, 1.000 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	0.2 ml	Axygen, Union City CA / US
	0.5 ml, 1.5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	2 ml, 5 ml	Eppendorf, Hamburg
	15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
	DNA LoBind Tubes, 1.5 ml	Eppendorf, Hamburg
	Qubit® Assay Tubes	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Skalpell	Disposable Scalpel No. 11	Feather, Osaka / JP
Spritzen	Injekt®, 5 ml	Braun, Melsungen
Stripetten	2 ml	Thermo Scientific, Waltham MA / US
	5 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	25 ml	Corning, Corning NY / US
Verschlusskleber	Fixogum	Marabu, Tamm
Westernblotgele	NuPAGE® Novex 4-12% BisTris	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Westernblotmembran	Nitrozellulose, 0,45 µm	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA / US
Zellkulturflaschen	25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Corning, Corning NY / US
Zellkulturplatten	6 well, 12 well, 24 well, 96 well	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber	25 cm	Sarstedt, Nümbrecht

## 2.3 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 2.3 Chemikalien und Reagenzien**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Agar	Merck, Darmstadt
Agencourt AMPure XP beads	Beckman Coulter, Brea CA / US
Aprotinin	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
BOND Epitope Retrieval Solution 1	Leica Biosystems, Nussloch
BSA, Albumin from bovine serum	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Camptothecin, (S)-(+)-	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
DAPI I Counterstain	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Desoxynukleosidtriphosphat-Mix	Thermo Scientific, Waltham MA / US
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
EDTA	Applichem, Darmstadt
Essigsäure, zur Analyse	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	VWR International, West Chester PA / US
Exonuklease I	Thermo Scientific, Waltham MA / US
FastAP, Thermo sensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific, Waltham MA / US
Formalin, 10% neutral gepuffert	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Gelatine	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Glycin	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Human COT-1® DNA	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Human Placental DNA	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Hybridization Buffer, Vysis LSI / WCP	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Incidin® perfekt	Ecolab, Saint Paul MN / US
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Leupeptin hydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Lipofectamine® RNAi Max	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Magermilchpulver, für Mikrobiologie	Merck, Darmstadt
Methanol, zur Analyse	Merck, Darmstadt
MTT	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Natriumacetat, zur Analyse	Applichem, Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Natriumhydroxid, 1 M	Applichem, Darmstadt
Natriummolybdat	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Natriumpyrophosphat decahydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
NEXTflex-96™ DNA Barcodes	BIOO Scientific, Austin TX / US

## 2 Material

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
NEXTflex™ Adenylation Mix	BIOO Scientific, Austin TX / US
NEXTflex™ Primer Mix	BIOO Scientific, Austin TX / US
NP-40™	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies, Carlsbad CA / US
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20x)	Life Technologies, Carlsbad CA / US
NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)	Life Technologies, Carlsbad CA / US
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, Waltham MA / US
Paraffin, Paraplast® Tissue Embedding Medium	Leica Biosystems, Nussloch
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Pepsin	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
PCR-Puffer (10x, 15 mM MgCl <sub>2</sub> )	Qiagen, Hilden
Phenylmethansulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
PhiX Control v3	Illumina, San Diego CA / US
Ponceau S-Lösung	Applichem, Darmstadt
POP-7™ (384) Performance Optimized Polymer	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Pretreatment Reagent, VP2000	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Protease I, Vysis	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Protease Buffer, VP2000	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Protease inhibitor cocktail tablets, Complete Mini	Roche Diagnostics, Rotkreuz / CH
Qiazol	Qiagen, Hilden
RNAse away™	Molecular Bioproducts, San Diego / US
Salzsäure, 1M	Merck, Darmstadt
SDS	Merck, Darmstadt
SpectrumGreen™-dUTP	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
SpectrumOrange™-dUTP	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
SSC (20x)	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Stickstoff, flüssig	Linde, Pullach
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Tissue-Tek®	Sakura, Zoeterwoude / NL
TRIS	Merck, Darmstadt
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Wasser, distilled, DNase/RNase free	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Wasser, HPLC-aufgereinigt	Merck, Darmstadt
Wasser, nukleasefrei	Qiagen, Hilden
Xylol	Merck, Darmstadt

## 2.4 Reaktionskits

**Tabelle 2.4 Reaktionskits**

Kit	Hersteller
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	Promega, Madison WI / US
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies, Carlsbad CA / US
BigDye XTerminator® Purification Kit	Life Technologies, Carlsbad CA / US
High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 - 96 LV	Life Technologies, Carlsbad CA / US
miRNeasy FFPE Kit	Qiagen, Hilden
miRNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
MiSeq v2 Reagent Kit	Illumina, San Diego CA / US
Nick Translation Reagent Kit	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Waltham MA / US
Pierce™ SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific, Waltham MA / US
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Life Technologies, Carlsbad CA / US
QIAamp DNA mini Kit	Qiagen, Hilden
Qubit® dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad CA / US
RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Santa Clara CA / US
TaqMan® Gene Expression Assays	Life Technologies, Carlsbad CA / US
TaqMan® MicroRNA Expression Assays	Life Technologies, Carlsbad CA / US
TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit	Life Technologies, Carlsbad CA / US
TaqMan® Universal Master Mix II, -UNG	Life Technologies, Carlsbad CA / US

## 2.5 Puffer und Lösungen

### DEPC-Wasser

0,1% DEPC

→ Übernacht rühren, anschließend autoklavieren

### SSC-Waschpuffer FISH

Stock (20x): 20x SSC      132 g

H<sub>2</sub>O                      500 ml

→ pH auf 5,3 einstellen

Pepsinlösung FISH

Pepsin        5 mg  
HCL (1 M)    1 ml  
H<sub>2</sub>O            @ 100 ml

Post-Hybridisierungspuffer FISH (Paraffinschnitte)

20x SSC (pH 5,3) 50 ml  
NP-40            1,5 ml  
H<sub>2</sub>O              @ 500 ml  
→ pH auf 7 – 7,5 einstellen

Post-Hybridisierungspuffer FISH (Zytospinpräparate)

20x SSC (pH 5,3) 5 ml  
NP-40            0,75 ml  
H<sub>2</sub>O              @ 250 ml  
→ pH auf 7 – 7,5 einstellen

Proteinisolationspuffer (RIPA)

Stock: NaCl	150 mM	Gebrauchslösung: Puffer-Stock	10 ml
TRIS (pH 7,2)	10 mM	Proteaseinh.	1 Tbl.
SDS	0,1%	→ mit Vortexmischer	
Triton X-100	1%	mischen, einige Tage	
Deoxycholat	1%	haltbar bei -20°C	
EDTA	5 mM		

Proteinisolationspuffer (für Phosphoproteine)

Stock: NP-40	1%	Gebrauchslösung: Puffer-Stock	1 ml
TRIS-HCl (pH 8)	50 mM	NaVan-Stock	10 µl
NaFluorid	100 mM	Aprotinin-Stock	1 µl
NaPyrophosphat	30 mM	Leupeptin-Stock	1 µl
NaMolybdat	2 mM	PMSF-Stock	10 µl
EDTA	5 mM		

Zusätze Proteinisolationspuffer (für Phosphoproteine)

NaVan	200 mM	370 mg auf 10 ml H <sub>2</sub> O
Aprotinin	10 mg/ml	50 mg auf 5 ml H <sub>2</sub> O
Leupeptin	10 mg/ml	25 mg auf 2,5 ml H <sub>2</sub> O
PMSF	200 mM	690 mg auf 20 ml Isopropanol

→ Aliquotieren, Lagerung bei -20°C

- Aktivierung NaVan: pH auf 10 einstellen (mit HCl, NaOH)  
 Lösung wird bei Zugabe von HCl gelb  
 Lösung aufkochen, bis farblos (ca. 10 Min.)  
 pH wieder auf 10 einstellen (mit HCl, NaOH)  
 → Ablauf wiederholen, bis pH stabil bei 10 bleibt

Transferpuffer Westernblot

Stock (10x): TRIS	250 mM	Gebrauchslösung: Puffer-Stock	100 ml
Glycin	1.920 mM	Methanol	200 ml
SDS	1%	H <sub>2</sub> O	@ 1.000 ml

Stripping-Puffer Westernblot

SDS (10%)	2 ml
TRIS-HCl (1 M, PH 6,8)	625 µl
β-Mercaptoethanol	160 µl
H <sub>2</sub> O	@ 20 ml

PBST

PBS-Tabletten	5 Stk.
Tween	1 ml
H <sub>2</sub> O	@ 1.000 ml

MTT-Lösung

MTT 5 mg/ml in PBS

→ Sterilfiltration (0,2 µm)

→ Aliquotieren, Lagerung bei -20°C

MTT-Solvent

SDS 10% in 0,01 M HCl

→ Lagerung bei Raumtemperatur



## 2.6 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Tabelle 2.5 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Substanz	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 4.5 g/l D-Glukose, mit L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad CA / US
F-12 Nutrient Mixture (Ham), mit L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Fetales Kälberserum (FBS), aus Südamerika (CE)	Life Technologies, Carlsbad CA / US
L-Glutamin, 200 mM (100x)	Life Technologies, Carlsbad CA / US
McCoy's 5A Medium (modified), mit L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Opti-MEM	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Phosphate Buffered Saline, mit Ca <sup>2+</sup> & Mg <sup>2+</sup>	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Phosphate Buffered Saline, ohne Ca <sup>2+</sup> & Mg <sup>2+</sup>	Life Technologies, Carlsbad CA / US
RPMI 1640, mit L-Glutamin	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Trypanblau-Lösung (0.4 %)	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
Trypsin / EDTA (0.05 %)	Life Technologies, Carlsbad CA / US

## 2.7 Nukleinsäuren

Tabelle 2.6 Primer

Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Verwendung	Hersteller
Ion AmpliSeq™ Custom Panel	Siehe Anhang (Tabelle 7.1)	Parallel- sequenzierung	LifeTechnologies, Carlsbad CA / US
Random Hexamers	Zufällige 6 bp lange Sequenzen	cDNA-Synthese	LifeTechnologies, Carlsbad CA / US
B2M for	CAGCAAGGACTGGTCTTTCTATCT	Referenzgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
B2M rev	CCATGATGCTGCTTACATGTCT	Referenzgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
IPO8 for	TACTATGTGGAGATGCAGGAGAAG	Referenzgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
IPO8 rev	AACAAGTTGAACGAAGAGTGGAAT	Referenzgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR1 for	CTCGGAGGATGATGATGATG	Zielgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR1 rev	TTCCATCTTTTCTGGGGATG	Zielgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR2 for	GTGAAACTTGGTACTTCATGGTGA	Zielgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR2 rev	GAGATGGCATTCTTGTTGTTACTG	Zielgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 for	ATCCTCGGGAGATGACGAA	Zielgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 rev	CAGCAGCTTCTTGCCATCC	Zielgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR4 for	CTGGGCCTCCAGTCTTGTC	Zielgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR4 rev	GGCTACTGTCAGCTCCTGCT	Zielgen qPCR	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US

2 Material

Bezeichnung	Sequenz [5'-3']	Verwendung	Hersteller
FGFR1 Exon 10 for	TGAGCCCACCCCTCTTTAG	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR1 Exon 10 rev	TCTGGACATAAGGCAGGTTG	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR1 Exon 14 for	GGTGCCTCTCAAGGTTTGAA	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR1 Exon 14 rev	TGCTTGGAAATGGGACAAGAT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR1 Exon 18 for	CCAGTCCCTTCCCACCTGT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR1 Exon 18 rev	TCAGTCCAGGGAGAAAGCAG	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR2 Exon 8 for	GGTCTCTCATTCTCCCATCC	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR2 Exon 8 rev	TCCTCACCTTGAGAACCTTGA	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR2 Exon 13 for	CCTCACTACACCCCATCACC	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR2 Exon 13 rev	GCCACAAAAGGAACTTTCTTGA	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 7 for	AGTGGCGGTGGTGGTGAG	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 7 rev	AGCACGGTAACGTAGGGTGT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 10 for	CCTCAACGCCCATGTCTTT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 10 rev	AGGCAGCTCAGAACCTGGTA	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 11 for	TGTACCTCCACGCCCTGT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 11 rev	AAGCCCCCTACAGCCAAC	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 12 for	TGCACACTCATGGTCCCTCT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 12 rev	CAGTGGCATCGTCTGTGC	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 15 for	CCTGAGATGCTGGGAGCAG	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 15 rev	AGGCGTCCTACTGGCATGA	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 17 for	CAGGTGTCTGTCCCTGGGAGT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR3 Exon 17 rev	CACCCCTGAGGACCCAGT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR4 Exon 11 for	GCAGGAGTGA CT CGGAGGT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR4 Exon 11 rev	AAAGTGCTGGCGTTACAGGT	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR4 Exon 16 for	GTCCTAGCCCCGGTCGTC	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR4 Exon 16 rev	AGGAGGAGGAGGACTGGAAA	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR4 Exon 18 for	AGGCTGACCAGCTCCGTTC	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
FGFR4 Exon 18 rev	GTGTCAGGCTGTGGCTGAG	Sanger- sequenzierung	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US

Tabelle 2.7 siRNA

siRNA	Verwendung	Hersteller
AllStars Hs Cell Death Control siRNA	Kontrolle der Transfektionseffizienz / Positivkontrolle	Qiagen, Hilden
AllStars Negative Control siRNA	Negativkontrolle microRNA-Transfektion	Qiagen, Hilden
Stealth RNAi™ Negative Control Duplexes	Negativkontrolle FGFR-Knock-down	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Stealth RNAi™ siRNA FGFR1 (Set aus 3)	Knock-down FGFR1	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Stealth RNAi™ siRNA FGFR2 (Set aus 3)	Knock-down FGFR2	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Stealth RNAi™ siRNA FGFR3 (Set aus 3)	Knock-down FGFR3	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Stealth RNAi™ siRNA FGFR4 (Set aus 3)	Knock-down FGFR4	Life Technologies, Carlsbad CA / US

Tabelle 2.8 microRNA

microRNA	Verwendung	Hersteller
Syn-hsa-miR-29a-3p	microRNA-Imitator	Qiagen, Hilden
Syn-hsa-miR-96-5p	microRNA-Imitator	Qiagen, Hilden
Syn-hsa-miR-141-3p	microRNA-Imitator	Qiagen, Hilden
Syn-hsa-miR-145-5p	microRNA-Imitator	Qiagen, Hilden
Syn-hsa-miR-181a-5p	microRNA-Imitator	Qiagen, Hilden
Syn-hsa-miR-200a-3p	microRNA-Imitator	Qiagen, Hilden

Tabelle 2.9 FISH-Sonden

FISH-Sonde	Hersteller
Vysis LSI DDIT3 Probe	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Vysis LSI EWS R1 Probe	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
Vysis LSI FUS Breakapart Probe	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US
ZytoLight SPEC FGFR1/CEN 8 Dual Color Probe	ZytoVision, Bremerhaven
ZytoLight SPEC FGFR2/CEN 10 Dual Color Probe	ZytoVision, Bremerhaven
ZytoLight SPEC FGFR3/CEN 4 Dual Color Probe	ZytoVision, Bremerhaven
FGFR4-Sonde (hergestellt aus BAC RP11-1008G19)	Source BioScience imaGenes, Berlin
Zentromersonde Chr. 5 (hergestellt aus BAC RP11-879C10)	Source BioScience imaGenes, Berlin

## 2.8 Tyrosinkinaseinhibitoren und Trabectedin

Tabelle 2.10 Tyrosinkinaseinhibitoren und Trabectedin

Substanz	Hersteller
BGJ398	Novartis, Basel / CH
PD173074	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US
TKI258 (Dovitinib)	Novartis, Basel / CH
Trabectedin (ET-743)	PharmaMar, Madrid / ES

## 2.9 Antikörper

Tabelle 2.11 Antikörper

Antigen	Spezies	Klonalität	Hersteller	Verwendung
FGFR2	Kaninchen	polyklonal	ZYTOMED Systems, Berlin	IHC
ACTB	Maus	monoklonal, AC-15	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US	Westernblot
Anti-Kaninchen, sekundär	Ziege	polyklonal, HRP-konjugiert	DAKO, Glostrup / DK	Westernblot
Anti-Maus, sekundär	Ziege, F(ab') <sub>2</sub> Fragment	polyklonal, HRP-konjugiert	LifeTechnologies, Carlsbad CA / US	Westernblot
ERK1/2	Kaninchen	polyklonal	Cell Signaling Technology, Danvers MA / US	Westernblot
FGFR1	Kaninchen	polyklonal	Acris Antibodies, San Diego CA / US	Westernblot
FGFR2	Kaninchen	polyklonal	Sigma-Aldrich, St. Louis MO / US	Westernblot
FGFR3	Kaninchen	monoklonal, D2G7E	Cell Signaling Technology, Danvers MA / US	Westernblot
FGFR4	Maus	monoklonal, AM11076PU-N	Acris Antibodies, San Diego CA / US	Westernblot
HPRT	Kaninchen	polyklonal	abcam, Cambridge / GB	Westernblot
phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	monoklonal, 20G11	Cell Signaling Technology, Danvers MA / US	Westernblot

## 2.10 Zelllinien

Tabelle 2.12 Zelllinien

Zelllinie	Entität	Bezugsquelle
1273/99	Synovialsarkom	Olle Larsson, Karolinska Institut / SE
FuDDLS-1	dedifferenziertes Liposarkom	Jun Nishio, Universität Fukuoka / JP
HepG2	hepatozelluläres Karzinom	Cell Lines Service, Eppelheim
HS-SY	Synovialsarkom	Hiroshi Sonobe, Zentralkrankenhaus Chugoku / JP
Kato-III	Magenkarzinom	Cell Lines Service, Eppelheim
MLS 402	myxoides Liposarkom	Pierre Åman, Universität Göteborg / SE

## 2 Material

Zelllinie	Entität	Bezugsquelle
MLS 1765	myxoides Liposarkom	Pierre Åman, Universität Göteborg / SE
RT-112	Blasenkarzinom	Cell Lines Service, Eppelheim
SK-ES-1	Ewingsarkom	Institut für Pathologie, RWTH Aachen
SK-NMC	Ewingsarkom	Institut für Pathologie, RWTH Aachen
SW872	Liposarkom / Fibrosarkom	Cell Lines Service, Eppelheim
SW982	Synovialsarkom / Liposarkom	Cell Lines Service, Eppelheim
T449	gut-differenziertes Liposarkom	Florence Pedeutour, Universität Nizza / FR
T778	gut-differenziertes Liposarkom	Florence Pedeutour, Universität Nizza / FR

### 2.11 Patientenkollektiv

**Tabelle 2.13 Patientenkollektiv**

Fall	Entität / Lokalisation	Material	Translokation
MLS 1	myxoides Liposarkom	Kryo + FFPE	FUS/DDIT3
MLS 2	myxoides Liposarkom	Kryo + FFPE	FUS/DDIT3
MLS 3	myxoides Liposarkom	Kryo + FFPE	FUS/DDIT3
MLS 4	myxoides Liposarkom	Kryo + FFPE	FUS/DDIT3
MLS 5	myxoides Liposarkom	Kryo + FFPE	FUS/DDIT3
MLS 6	myxoides Liposarkom	FFPE	FUS/DDIT3
MLS 7	myxoides Liposarkom	FFPE	EWSR1/DDIT3
MLS 8	myxoides Liposarkom	FFPE	FUS/DDIT3
MLS 9	myxoides Liposarkom	FFPE	FUS/DDIT3
MLS 10	myxoides Liposarkom	FFPE	FUS/DDIT3
MLS 11	myxoides Liposarkom	Kryo	FUS/DDIT3
MLS 12	myxoides Liposarkom	Kryo	FUS/DDIT3
MLS 13	myxoides Liposarkom	Kryo	FUS/DDIT3
MLS 14	myxoides Liposarkom	Kryo	FUS/DDIT3
MLS 15	myxoides Liposarkom	Kryo	FUS/DDIT3
MLS 16	myxoides Liposarkom	Kryo	FUS/DDIT3
Fett 1	Fett, normal perikolisch (Sigmaresektat)	Kryo	—
Fett 2	Fett, normal perikolisch	Kryo	—
Fett 3	Fett, normal retroperitoneal/perirenal	Kryo	—
Fett 4	Fett, normal perikolisch	Kryo	—
Fett 5	Fett, normal perikolisch	Kryo	—
Fett 6	Fett, normal perikolisch	Kryo	—
Fett 7	Fett, normal perikolisch	Kryo	—
Fett 8	Fett, normal mamma	Kryo	—

## 2 Material

Fall	Entität / Lokalisation	Material	Translokation
Fett 9	Fett, normal mamma	Kryo	—
Fett 10	Fett, normal perikolisch	Kryo	—
Fett 11	Fett, normal mamma	Kryo	—
Fett 12	Fett, normal pelvine Lymphknoten	Kryo	—
Fett 13	Fett, normal pelvine Lymphknoten	Kryo	—
Fett 14	Fett, normal perikolisch	Kryo	—
Fett 15	Fett, normal mamma	Kryo	—

## 2.12 Software und Datenbanken

**Tabelle 2.14 Software und Datenbanken**

Bezeichnung	Version	Bezugsquelle
3500 Data Collection Software	1.0	Life Technologies, Carlsbad CA / US
AxioVision	4.8	Carl Zeiss, Oberkochen
Bioanalyzer 2100 Expert Software	B.02.08	Agilent, Santa Clara CA / US
BIRTA		AG Tresch, MPI für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln
ClinicalTrials.gov		<a href="http://clinicaltrials.gov">http://clinicaltrials.gov</a>
COSMIC		<a href="http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic">http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic</a>
DISKUS	32	Carl H. Hilgers Technisches Büro, Königswinter
EndNote	X5	Thomson Reuters, Toronto / CA
Ensembl Genome Browser	Release 77	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
FileMaker Pro	13.0v3	FileMaker, Santa Clara CA / US
GraphPadPrism	5.01	GraphPad Software, San Diego CA / US
igv	2.3	Broad Institute, Cambridge MA / US
ImageLab™	4.0.1	Bio-Rad Laboratories, Hercules CA / US
LightCycler® 480 Gene Scanning Software	1.5	Roche Diagnostics, Rotkreuz / CH
LightCycler® 480 Software	1.5.1.62	Roche Diagnostics, Rotkreuz / CH
Mikrowin	2000	Berthold Technologies, Bad Wildbad
miRBase	Release 21	<a href="http://www.mirbase.org">http://www.mirbase.org</a>
MiSeq Control Software	2.4.1.3	Illumina, San Diego CA / US
NanoDrop 2000/2000c	1.4.2	Thermo Scientific, Waltham MA / US
NCBI		<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
Office Softwarepaket	2010	Microsoft, Redmond WA / US
OPTIMA	2.20R2	BMG Labtech, Ortenberg
Primer3	4.0.0	<a href="http://primer3.ut.ee">http://primer3.ut.ee</a>

## 2 Material

<b>Bezeichnung</b>	<b>Version</b>	<b>Bezugsquelle</b>
QIAxcel BioCalculator	3.2	Qiagen, Hilden
REST	2008 V2.0.7	<a href="http://www.gene-quantification.net/rest.html">http://www.gene-quantification.net/rest.html</a>
SDS	2.3	Life Technologies, Carlsbad CA / US
Sequencing Analysis Software	v5.4	Life Technologies, Carlsbad CA / US
TargetScanHuman	Release 6.2	<a href="http://www.targetscan.org">www.targetscan.org</a>
UCSC Genome Browser	hg19	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
VP2000 Processor	1.1	Abbott Molecular, Des Plaines IL / US

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologie

#### 3.1.1 DNA-Extraktion und -Konzentrationsbestimmung

Die Extraktion genomischer DNA aus kultivierten Zellen wird mit dem QIAamp DNA mini Kit durchgeführt. Dazu werden die Zellen einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche pelletiert und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Zur Extraktion wird das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl AL-Lysepuffer und 25 µl Proteinase K (im Kit enthalten) lysiert. Die weitere Aufreinigung erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Die DNA wird mit 200 µl TRIS (auf 70°C erwärmt) eluiert.

Für die Parallelsequenzierung werden die DNA-Proben mit dem Qubit® Fluorometer quantifiziert. Es wird das Qubit® dsDNA HS Assay Kit nach den Angaben des Herstellers verwendet.

#### 3.1.2 RNA-Extraktion und -Konzentrationsbestimmung

Die Extraktion von RNA aus Gewebeproben und kultivierten Zellen erfolgt mit den miRNeasy Kits, die gleichzeitig eine effiziente Isolation der mRNA und der kürzeren microRNAs ermöglichen.

Für formalinfixiertes, paraffineingebettetes (FFPE) Gewebe kommt dabei das miRNeasy FFPE Kit zum Einsatz. Es werden je Fall sechs 10 µm Paraffinschnitte verwendet. Die Schnitte werden zunächst über eine absteigende Alkoholreihe (2x Xylol, 2x 100% Ethanol, 96% Ethanol, 80% Ethanol, 70% Ethanol, DEPC-Wasser) für jeweils zehn Minuten entparaffiniert und rehydriert. Anschließend wird durch Vergleich mit einem vom Pathologen markierten HE-Schnitt nur das Tumorgewebe mit einem Skalpell vom Objektträger abgenommen und in 240 µl Puffer PKD mit 10 µl Proteinase K (im Kit enthalten) überführt. Die weitere Extraktion erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wird mit 30 µl nukleasefreiem Wasser eluiert, sofort auf Eis gekühlt und bei -80°C gelagert.

Für kryokonserviertes Gewebe und Zellkulturen erfolgt die RNA-Extraktion mit dem miRNeasy mini Kit. Dazu werden Kryoraspeln bzw. ein Zellpellet direkt in 700 µl Qiazol (im Kit enthalten) aufgenommen und durch Homogenisierung mit dem



Vortexmischer gelöst. Die weitere Isolation wird nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wird zweimal mit je 30 µl nukleasefreiem Wasser eluiert, sofort auf Eis gekühlt und bei -80°C gelagert.

Die isolierte RNA wird sowohl quantitativ als auch qualitativ mit Hilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop) untersucht. Dabei wird ein Absorptionsspektrum der Probe im Vergleich zum Leerwert (nukleasefreies Wasser) gemessen. Die Extinktion ist direkt proportional zur Nukleinsäurekonzentration und kann daher zur Konzentrationsbestimmung dienen. RNA hat ein Absorptionsmaximum bei 260 nm, während Proteine und viele organische Lösemittel bei 280 bzw. 230 nm absorbieren. Deshalb sind die Quotienten  $OD_{260}/OD_{280}$  und  $OD_{260}/OD_{230}$  ein Maß für den Reinheitsgrad der RNA-Lösung. Sie sollten möglichst bei  $1,8 < OD_{260}/OD_{280} < 2,2$  bzw.  $OD_{260}/OD_{230} > 1,8$  liegen.

Der Degradationsgrad der RNA wird mit Hilfe des Bioanalyzers und dem RNA 6000 Nano Kit nach Herstellerangaben bestimmt. Dabei wird die farbstoffmarkierte RNA kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und über einen Laser detektiert. Der Vergleich mit einem RNA-Größenstandard erlaubt Rückschlüsse auf die RNA-Menge verschiedener Fragmentlängen. Die Integrität einer RNA-Probe wird aus dem Verhältnis von 18S zu 28S rRNA bestimmt und als RIN-Wert (*RNA Integrity Number*) ausgegeben. Die Skala reicht dabei von eins bis zehn, wobei ein Wert von zehn eine völlig intakte RNA beschreibt.

### 3.1.3 Sangersequenzierung

Für die Sangersequenzierung relevanter Genabschnitte der vier *FGFR*-Gene werden diese zunächst mittels PCR amplifiziert. Die entsprechenden Primersequenzen sind Tabelle 2.6 zu entnehmen. Die PCR-Reaktionen werden nach folgendem Protokoll durchgeführt:

### 3 Methoden

---

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Programm</u>
5 µl 10x Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	94°C 3 Min.
1 µl dNTP-Mix (10 mM)	
1 µl Primer Forward (10 pmol/µl)	94°C 40 Sek.
1 µl Primer Reverse (10 pmol/µl)	60°C 40 Sek. 40 Zyklen
0,2 µl Taq DNA-Polymerase	72°C 35 Sek.
40,8 µl H <sub>2</sub> O	
+ 1 µl DNA-Template	72°C 5 Min.

Die entstandenen PCR-Produkte werden anschließend durch Kapillarelektrophorese im QIAxcel überprüft. Bei Bildung von Fragmenten in den erwarteten Größen werden die PCR-Produkte aufgereinigt. Dazu werden 5 µl des jeweiligen PCR-Produkts mit 0,5 µl Exonuklease I und 1 µl Fast AP 15 Min. bei 37°C sowie weitere 15 Min. bei 85°C im Schüttler inkubiert. Anschließend werden unter Verwendung des BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits für jedes PCR-Produkt zwei Sequenzier-PCRs (vorwärts und rückwärts) nach folgendem Protokoll angesetzt:

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Programm</u>
1 µl Terminator Ready Reaction Mix	96°C 1 Min.
2 µl 5x Sequencing Buffer	
1 µl Primer Forward (10 pmol/µl)	96°C 15 Sek.
oder Primer Reverse (10 pmol/µl)	60°C 15 Sek. 25 Zyklen
15 µl H <sub>2</sub> O	60°C 4 Min.
+ 1 µl PCR-Produkt	

Die Produkte der Sequenzier-PCR werden im Anschluss mit Hilfe des BigDye XTerminator® Purification Kits aufgereinigt. Dabei werden sie mit 90 µl Sam Solution und 20 µl XTerminator Solution 30 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt. Abschließend werden die aufgereinigten Produkte durch Kapillarelektrophorese im 3500 Genetic Analyzer analysiert. Die detektierten Basenabfolgen werden zur Auswertung mit den Wildtypsequenzen der jeweiligen Exons verglichen.

### 3.1.4 Parallelsequenzierung

Die Parallelsequenzierung ermöglicht die gleichzeitige Mutationsanalyse vieler Genabschnitte in mehreren Proben. Im Rahmen dieser Arbeit werden die beiden myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 mittels Parallelsequenzierung von 632 Amplikons charakterisiert. Die entsprechende Panelübersicht mit den zugehörigen Primersequenzen ist im Anhang (Tabelle 7.1) aufgeführt. Die Primer werden als Ion AmpliSeq™ Custom Panel bezogen. Sie sind in zwei Pools aufgeteilt und es wird für jede Probe zunächst je Primerpool eine Multiplex-PCR durchgeführt. Dafür werden die DNA-Proben auf eine Konzentration von 7 ng/µl verdünnt und je Reaktion 21 ng eingesetzt. Es wird das Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 nach folgendem Protokoll verwendet:

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Programm</u>
2 µl 5x Ion AmpliSeq™ HiFi Master Mix	99°C 2 Min.
5 µl 2x Ion AmpliSeq™ Primerpool	
+ 3 µl DNA-Probe (21 ng)	99°C 15 Sek.
	60°C 4 Min.      29 Zyklen

Anschließend werden die in der PCR entstandenen Überhänge durch Zugabe von je 1 µl FuPa-Reagenz entfernt. Die Inkubationsschritte betragen dabei 10 Min. bei 50°C, 10 Min. bei 55°C sowie 20 Min. bei 65°C. Die Produkte der beiden Multiplex-PCRs werden im Anschluss für jede Probe gepoolt und nach folgendem Protokoll mit Agencourt AMPure XP Beads aufgereinigt:

- Überführen der Produkte (je 22 µl) in eine 96well-Rundbodenplatte,
- Zugabe von 35,2 µl Beads (1,6x), Mischen durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren,
- 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur,
- Platte 5 Min. auf einem 96well-Magnetständer inkubieren bis der Überstand klar ist,
- Überstand abnehmen,
- Beads 2x mit je 200 µl frisch angesetztem 80% Ethanol waschen,
- Überstand abnehmen und Beads ca. 3 Min. trocknen lassen,

- Zugabe von 38 µl H<sub>2</sub>O, anschließend Platte von Magnetständer entfernen,
- Mischen durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren,
- 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur,
- Platte 5 Min. auf 96well-Magnetständer inkubieren bis der Überstand klar ist und
- 17 µl des Überstands in folgende Adenylierung einsetzen, restlicher Überstand wird als Backup bei -20°C aufbewahrt.

Die Adenylierung fügt an die DNA-Fragmente einen A-Überhang an. Dazu werden jeweils 17 µl eluierte DNA mit 4 µl NEXTflex™ Adenylation Mix 30 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Produkte jeder DNA-Probe mit einem spezifischen molekularen Barcode versehen. Dazu wird eine Ligation an NEXTflex-96™ DNA Barcodeadapter nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Programm</u>
4 µl Switch Solution	22°C 30 Min.
2 µl DNA-Ligase	75°C 10 Min.
2 µl H <sub>2</sub> O	
2 µl Barcodeadapter	
+ 20 µl Adenylierungsprodukt	

Anschließend werden die Produkte in eine Rundbodenplatte überführt und erneut mit Agencourt AMPure XP Beads aufgereinigt. Dabei werden im ersten Schritt 54 µl Beads (1,8x) eingesetzt, die weitere Aufreinigung erfolgt wie auf den Seiten 37 – 38 beschrieben. Die Proben werden zum Schluss jeweils mit 42 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Davon werden 40 µl in die folgende Größenselektion eingesetzt. Diese dient der Auswahl von DNA-Fragmenten in der gewünschten Größe, d.h. der Fragmente, die erfolgreich an Adapter ligiert wurden. Die Größenselektion erfolgt ebenfalls in einer Rundbodenplatte mit Agencourt AMPure XP Beads nach folgendem Protokoll:

- Zugabe von 32 µl Beads (0,8x), Mischen durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren,
- 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur,
- Platte 5 Min. auf einem 96well-Magnetständer inkubieren bis der Überstand klar ist,
- Überstand abnehmen und in neue wells überführen (Beads verwerfen),

### 3 Methoden

---

- Zugabe von 13 µl Beads (0,2x), Mischen durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren,
- 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur,
- Platte 5 Min. auf 96well-Magnetständer inkubieren bis der Überstand klar ist,
- Überstand abnehmen,
- Beads 2x mit je 200 µl frisch angesetzttem 80% Ethanol waschen,
- Überstand abnehmen und Beads für ca. 3 Min. trocknen lassen,
- Zugabe von 25 µl H<sub>2</sub>O, anschließend Platte von Magnetständer entfernen,
- Mischen durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren,
- 5 Min. Inkubation bei Raumtemperatur,
- Platte 5 Min. auf 96well-Magnetständer inkubieren bis der Überstand klar ist und
- 23 µl des Überstands in folgende PCR-Amplifikation einsetzen.

Die Produkte werden anschließend in einer zweiten PCR nach folgendem Protokoll erneut amplifiziert:

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Programm</u>
25 µl Platinum® PCR SuperMix High Fidelity	98°C 2 Min.
2 µl NEXTflex™ Primer Mix	
+ 23 µl DNA-Probe	98°C 15 Sek.
	60°C 1 Min. 10 Zyklen

Die PCR-Produkte werden abschließend erneut in einer Rundbodenplatte mit Agencourt AMPure XP Beads aufgereinigt. Dabei werden im ersten Schritt 50 µl Beads (1,0x) eingesetzt, die weitere Aufreinigung erfolgt wie auf den Seiten 37 – 38 beschrieben. Die Proben werden zum Schluss jeweils mit 22 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Davon werden 20 µl für die folgende Bibliotheksvorbereitung abgenommen. Die Konzentrationen der einzelnen Proben werden mit dem Qubit® Fluorometer und dem Qubit® dsDNA HS Assay Kit bestimmt. Danach werden sie jeweils auf eine Konzentration von 3 nM eingestellt und äquimolar gepoolt. 10 µl dieses DNA-Pools werden mit 10 µl frisch verdünnter NaOH-Lösung (0,2 N) gefällt. Dazu wird die Lösung 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis überführt.

Anschließend wird die Lösung durch Zugabe von 980 µl vorgekühltem HT1-Puffer auf 30 pM verdünnt. 400 µl dieser Bibliothek werden mit 600 µl HT1-Puffer weiter auf eine Endkonzentration von 12 pM verdünnt.

Parallel zur Probenbibliothek wird auch eine PhiX-Bibliothek gefällt und auf eine Konzentration von 12 pM verdünnt. Diese PhiX-Bibliothek dient der zusätzlichen Diversifizierung der Probenbibliothek und wird zu 3% in die Probe gegeben. Dazu werden 30 µl der Probenbibliothek durch 30 µl der PhiX-Bibliothek ersetzt.

Die Parallelsequenzierung der fertigen Bibliothek erfolgt mit dem MiSeq-System. Es wird das MiSeq Reagent Kit v2 nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Analyse der generierten FASTQ-Dateien wird über eine intern entwickelte Analysepipeline erreicht. Dabei wird die erzielte Coverage für die einzelnen Amplikons berechnet sowie durch Alignment mit den Wildtypsequenzen des humanen Genoms (hg19, UCSC Genome Browser) enthaltene Varianten detektiert.

#### **3.1.5 Quantitative Echtzeit-PCR**

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) wird zur Untersuchung der Gen- und microRNA-Expression verwendet. Dazu wird zunächst die RNA in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Es erfolgen sowohl für die Gen- als auch für die microRNA-Expressionsanalysen jeweils immer zwei getrennte cDNA-Synthesen, deren Produkte gepoolt werden, um Schwankungen in der Syntheseeffizienz auszugleichen.

Die cDNA-Synthese erfolgt für die Analyse der *FGFR*-Genexpression mit unspezifischen Hexamerprimern und dem Omniscript RT Kit. Dabei werden je Reaktion 500 ng Gesamt-RNA nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Beim Nachweis des siRNA-vermittelten Knock-downs von FGF-Rezeptoren wird für die cDNA-Synthese das High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit verwendet. Hier werden je Reaktion 1.000 ng Gesamt-RNA nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Für die Analyse der microRNA-Expression erfolgt die cDNA-Synthese mit spezifischen microRNA Assays und dem TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit. Pro Reaktion werden 50 ng Gesamt-RNA nach Herstellerangaben eingesetzt.

Die qPCR für die *FGFR*-Genexpressionsanalyse wird mit dem Power SYBR® Green PCR Master Mix mit spezifischen Primern für Ziel- und Referenzgene durchgeführt. Die Spezifität wird dabei durch anschließende Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Für den Nachweis des siRNA-vermittelten Knock-downs von FGF-Rezeptoren wird die qPCR mit TaqMan® Gene Expression Assays für *FGFR1-4* sowie die Referenzgene *IPO8* und *B2M* durchgeführt. Die qPCR zur microRNA-Expressionsanalyse erfolgt mit TaqMan® MicroRNA Assays. Die verschiedenen TaqMan® Assays werden in Kombination mit dem TaqMan® Universal Master Mix II nach Angaben des Herstellers verwendet.

Als Plattform für die qPCR-Analysen dient entweder das 7900HT-System oder das LightCycler 480-System. Mit Hilfe der jeweiligen gerätespezifischen Software werden die  $C_T$ -Werte gewonnen, die anschließend mittels  $\Delta\Delta C_T$ -Methode bzw. der REST-Software (Pfaffl et al. 2002) weiterverarbeitet werden. Geeignete Referenzen für die Normalisierung der Daten wurden vorab etabliert (Künstlinger 2010). Als Referenzgene dienen *IPO8* und *B2M*. Die microRNA-Expressionsdaten werden mit den ncRNAs RNU44 und RNU48 normalisiert.

#### **3.1.6 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung**

Bei der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) wird eine fluoreszenzmarkierte Sonde mit komplementären Abschnitten der genomischen DNA hybridisiert. Sie ermöglicht so den Nachweis von Translokationen, Deletionen und Amplifikationen. In dieser Arbeit werden FISH-Analysen zur Detektion von *FGFR*-Amplifikationen durchgeführt. Die verwendeten Sonden für *FGFR1*, *FGFR2* und *FGFR3* wurden kommerziell erworben. Für *FGFR4* wurde hingegen aus entsprechender BAC-DNA (siehe Abschnitt 2.7) mittels Nick-Translation eine Sonde hergestellt und diese mit einer ebenso hergestellten Zentromersonde für Chromosom 5 kombiniert.

In der Nick-Translation werden durch Zugabe des Enzyms DNase I in die doppelsträngige BAC-DNA Einzelstrangbrüche (*nicks*) eingeführt. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase I werden weitere Nukleotide entfernt. Zusätzlich baut die Polymerase I neue Nukleotide ein. Dabei enthält der Reaktionsansatz neben dATP, dCTP, dGTP und dTTP auch SpectrumOrange™- bzw. SpectrumGreen™-gekoppeltes dUTP. So erfolgt die Markierung der DNA durch den Einbau von fluoreszenzmarkierten dUTPs. Die *FGFR4*-Sonde wird mit SpectrumOrange™, die

Zentromersonde mit SpectrumGreen™ markiert. Die Reaktion wird mit dem Nick Translation Reagent Kit nach folgendem Protokoll durchgeführt:

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>Programm</u>
5 µl 10x Nick Translation Buffer	16°C 8 h
10 µl Nick Translation Enzyme	85°C 15 Min.
10 µl dNTP-Mix (0,1 mM)	
5 µl dTTP (0,1 mM)	
2,5 µl SpectrumOrange™- bzw. SpectrumGreen™-dUTP (0,2 mM)	
+ 1 µg BAC-DNA (max. 10 µl)	
+ H <sub>2</sub> O @ 50 µl	

Die Markierungseffizienz der Sonden wird gelelektrophoretisch überprüft. Bei einer guten Markierungseffizienz sollte die Fragmentlänge zwischen 100 bp und 500 bp liegen.

Anschließend erfolgt eine Natriumacetat/Ethanol-Fällung der Sonden. Dazu werden jeweils 5 µl Sonde mit 1 µl humaner COT-1® DNA, 2 µl *human placental* DNA und 4 µl nukleasefreiem Wasser gemischt. Die COT-1® DNA enthält repetitive Sequenzen und soll unspezifische Bindungsstellen abdecken; die *human placental* DNA deckt ebenfalls repetitive Sequenzen ab, dient aber gleichzeitig auch als Träger-DNA für die Fällung. Die Fällung erfolgt über die Zugabe von 1,2 µl 3 M Natriumacetat und 30 µl 100% Ethanol. Der Ansatz wird kurz gemischt und 30 Min. bei -80°C inkubiert. Nach anschließender 30 Min. Zentrifugation bei 4°C und 12.000 rpm wird der Überstand abgenommen. Das Sondenpellet wird lichtgeschützt unter dem Abzug für 10 bis 15 Min. getrocknet. Danach werden das *FGFR4*-Sondenpellet sowie das Zentromersondenpellet gemeinsam in insgesamt 3 µl nukleasefreiem Wasser resuspendiert und 7 µl Hybridisierungspuffer hinzugefügt. Die gefällte Sonde kann so bei -20°C gelagert werden.

Zur FISH-Analyse werden die kultivierten Zelllinien entweder als Zellpellets mit Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet oder als Zytospinpräparate eingesetzt.



#### Fixierte und eingebettete Zellpellets

Zur Fixierung und Einbettung von Zellpellets werden die Zellen einer 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche trypsiniert und in ein 15 ml Reaktionsgefäß geerntet. Durch Zentrifugation (5 Min., 1.500 rpm) wird ein Zellpellet erzeugt, das zunächst mit PBS gewaschen wird. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen des PBS wird das Pellet mit Formalin (10%, gepuffert) überschichtet und über Nacht fixiert. Am folgenden Tag wird das Formalin abgenommen und das Zellpellet herausgelöst. Es wird zunächst in Agar (2%) eingebettet und über Nacht entwässert. Abschließend wird das Zellpellet dann in einen Paraffinblock eingebettet. Von diesem Paraffinblock werden für die FISH-Analyse möglichst dünne Schnitte am Mikrotom hergestellt. Diese werden dann nach folgendem Protokoll weiterverarbeitet:

- Vorbehandlung im VP2000: 3x 10 Min. Xylol,
- 2x 5 Min. 100 % Ethanol,
- 1 Min. 96 % Ethanol,
- 1 Min. 80 % Ethanol,
- 1 Min. 70 % Ethanol,
- Trocknen,
- 20 Min. 0,2 M HCl,
- 3 Min. Aqua dest,
- 3 Min. 2x SSC-Waschpuffer,
- 30 Min. Pretreatment Solution (80°C),
- 1 Min. Aqua dest,
- 2x 5 Min. 2x SSC-Waschpuffer,
- 1,5 h Protease Solution (37°C),
- 2x 5 Min. 2x SSC-Waschpuffer,
- 10 Min. Formalin (10%, gepuffert),
- 2x 5 Min. 2x SSC-Waschpuffer,
- Trocknen,
- 10 µl Sonde auf den Schnitt geben,

- mit Deckgläschen versehen und mit Fixogum abdichten,
- Hybridisierung in der Hybridisierungskammer: 10 Min. bei 85°C denaturieren,  
über Nacht 37°C,
- Fixogum vom Objektträger entfernen und Deckgläschen abnehmen,
- 2 Min. vorgewärmter Post-Hybridisierungs-Puffer (siehe Abschnitt 2.5) bei 72°C,
- kurz in 2x SSC-Waschpuffer und
- Objektträger mit DAPI eindeckeln.

#### Zytospinpräparate

Eine Alternative zu den Paraffinschnitten stellen Zytospinpräparate dar. Für die Herstellung von Zytospinpräparaten werden die Zellen ebenfalls zunächst mit Trypsin geerntet. Die vorhandene Zellsuspension wird auf eine Konzentration von 25.000 Zellen pro 100 µl eingestellt. Von dieser Suspension werden nun jeweils 100 µl in die Zytospin-Trichtervorrichtung pipettiert und anschließend 10 Min. bei 1.000 rpm in einer entsprechenden Zentrifuge auf den Objektträger aufgebracht. Die so erhaltenen Zytospinpräparate werden nach folgendem Protokoll fixiert:

- 20 Min. Methanol (-20°C),
- 30 Min. Methanol/Eisessig (3:1, -20°C),
- 30 Min. 2xSSC-Waschpuffer (pH 7,5, 37°C),
- aufsteigende Alkoholreihe 70%, 80%, 96%, 100% Ethanol (jeweils 2 Min.) und
- 2 Min. Trocknen (45°C – 50°C).

Anschließend erfolgt die Vorbehandlung der Präparate nach folgendem Protokoll:

- 3 Min. Pepsinlösung (siehe Abschnitt 2.5),
- 1 Min. Aqua dest,
- 10 Min. Paraformaldehyd (1%),
- 1 Min. Aqua dest und
- Trocknen.

Die Hybridisierung sowie die weitere Bearbeitung erfolgt analog zu der FISH-Analyse an Paraffinschnitten, es werden aber jeweils nur 3 µl der Sonden eingesetzt sowie ein anderer Post-Hybridisierungspuffer (siehe Abschnitt 2.5) verwendet.

## 3.2 Zellbiologie

### 3.2.1 Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Zelllinien werden in Kulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in Kultur gehalten. Die jeweiligen Kultivierungsbedingungen sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Bei Erreichen einer Konfluenz von 80 – 90% werden die Zellen durch Trypsinierung passagiert (ca. 2x pro Woche).

**Tabelle 3.1 Kultivierungsbedingungen**

Zelllinie	Verwendetes Medium	Wachstum
MLS 402	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
MLS 1765	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
HepG2	DMEM, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
Kato-III	F-12, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	lose adhärent
RT-112	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
FuDDLS-1	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
T449	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
T778	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
SW872	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
SW982	DMEM, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
HS-SY	DMEM, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
1273/99	F-12, 15% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent, auf 0,1% Gelatine
SK-ES-1	McCoy's, 15% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent
SK-NMC	RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-Glutamin	adhärent

### 3.2.2 Transiente Transfektion

In funktionellen Studien werden kultivierte myxoide Liposarkomzellen transient mit siRNA-Molekülen und microRNA-Imitatoren transfiziert. Dabei wird die Nukleinsäure jeweils unter der Verwendung von Lipofectamine® RNAi Max mittels Lipofektion in die Zellen eingebracht. Dazu werden sowohl das Lipofectamine® als auch die

jeweilige Nukleinsäure in Opti-MEM® verdünnt und 5 Min. bei Raumtemperatur vorinkubiert. Danach werden beide Ansätze gemischt und 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Lipofektionsansatz auf die Zellen (60 – 80% Konfluenz) mit vorgelegtem Kultivierungsmedium gegeben. Tabelle 3.2 zeigt die jeweils verwendeten Volumina für die transiente Transfektion in verschiedenen Formaten. Die si- und microRNAs werden in einer Endkonzentration von 100 nM eingesetzt. Es kommen *FGFR*-spezifische Stealth RNAi™ siRNAs (jeweils Set von 3 siRNAs) sowie als Negativkontrollen die zugehörigen Stealth RNAi™ siRNA Negative Control Duplexes mit dem entsprechenden GC-Gehalt zum Einsatz. Des Weiteren werden die microRNA-Imitatoren miScript miRNA Mimics verwendet. Hier dient die AllStars Negative Control siRNA als Negativkontrolle. Als Transfektionskontrolle sowie als Positivkontrolle für Apoptoseinduktion und Reduktion der Viabilität wird die AllStars Hs Cell Death Control siRNA verwendet.

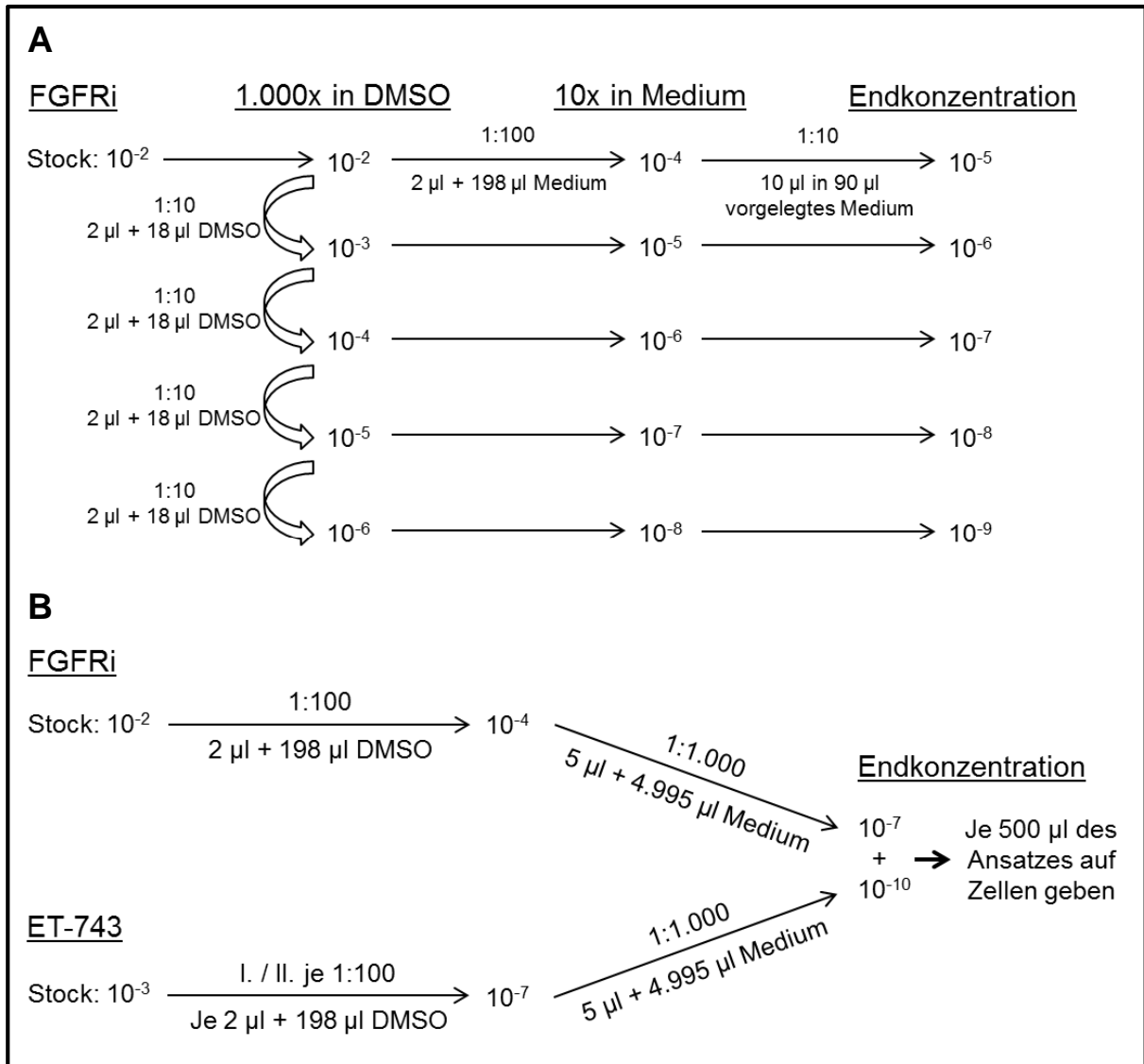
**Tabelle 3.2 Volumina für die transiente Transfektion in verschiedenen Formaten**

Format	Kulturmedium [µl]	Opti-MEM® [µl]	Lipofectamine® [µl]	RNA [µl]
25 cm <sup>2</sup> - Kulturflasche	5.000	2x 500	10	30
6well-Platte	2.500	2x 250	5	15
12well-Platte	1.000	2x 100	2	6
24well-Platte	500	2x 50	1	3
96well-Platte	100	2x 10	0,2	0,6

### 3.2.3 Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren und Trabectedin

Zur Hemmung des FGFR-Signalwegs in Sarkomzelllinien werden die FGFR-Inhibitoren PD173074, BGJ398 und TKI258 verwendet. In einer Kombinationsbehandlung werden die Inhibitoren zusätzlich zusammen mit dem Chemotherapeutikum Trabectedin angewendet. Dazu werden die Substanzen in DMSO gelöst und vorverdünnt. Die Endkonzentration von DMSO im Assay beträgt 0,1% in der Einzelsubstanzbehandlung bzw. 0,2% in der Kombinationsbehandlung. Als Kontrolle werden jeweils Zellen mit der entsprechenden DMSO-Konzentration

behandelt. Abbildung 3.1 zeigt exemplarische Verdünnungsschemata für FGFR-Inhibitoren und Trabectedin.



**Abbildung 3.1 Verdünnung von FGFR-Inhibitoren und Trabectedin für verschiedene Anwendungen**

(A) Typisches Verdünnungsschema für FGFR-Inhibitoren im MTT- oder ApoTox-Glo™ Triplexassay (96well-Format). (B) Typisches Verdünnungsschema für FGFR-Inhibitoren und Trabectedin bei der Kombinationsbehandlung im Scratch-Assay (24well-Format). FGFRi: FGFR-Inhibitoren, ET-743: Trabectedin.

### **3.2.4 MTT-Assay**

Der MTT-Assay dient der Bestimmung der Zellviabilität und wird im Rahmen dieser Arbeit angewendet, um die Effekte von FGFR-Inhibition und microRNAs auf Sarkomzelllinien zu detektieren. Der Nachweis beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid (MTT) in das blaue, wasserunlösliche Formazan. Diese Reduktion wird nur in vitalen Zellen durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums oder in den Mitochondrien katalysiert und ist daher ein Maß für ihre Viabilität.

Die Zellen werden für den MTT-Assay im 96well-Format ausgesät, bei einer Konfluenz von 60 – 80% in Fünffachbestimmung mit den Inhibitoren behandelt bzw. mit regulatorischen RNA-Molekülen transfiziert und die Effekte nach 48 oder 72 h detektiert. Dazu werden den Zellen mit 100 µl Kulturmedium 10 µl der gelben MTT-Lösung (siehe Abschnitt 2.5) zugegeben. Die Zellen werden 5 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. In dieser Periode wird in den lebenden Zellen das blaue Formazan gebildet, welches anschließend durch Lyse der Zellen mit 100 µl MTT-Solvent (siehe Abschnitt 2.5) über Nacht gelöst wird. Die Detektion des gebildeten Farbstoffs erfolgt spektrophotometrisch bei 550 nm abzüglich der Absorption bei 690 nm.

### **3.2.5 ApoTox-Glo™ Triplexassay**

Die im MTT-Assay gemessenen Veränderungen der Zellviabilität werden mit Hilfe des ApoTox-Glo™ Triplexassays weiter differenziert. Dieser Assay kombiniert drei Verfahren, um Viabilität, Zytotoxizität und Apoptoseinduktion parallel zu analysieren. Dabei werden im ersten Schritt zwei Proteaseaktivitäten simultan gemessen. Die erste dient als Marker für intakte lebende Zellen. Sie wird durch Verwendung eines fluorogenen Peptids, das in lebende Zellen eindringt, gemessen. Die zweite Proteaseaktivität ist ein Maß für die Zytotoxizität. Dazu wird ein zweites fluorogenes Peptid, welches die Zellmembran nicht durchdringt, eingesetzt. Es dient der Detektion von toten, nicht mehr intakten Zellen, die die entsprechende Protease in den Überstand freisetzen. Da die beiden gebildeten Fluoreszenzfarbstoffe unterschiedliche Exzitations- und Emissionsspektren haben, können Viabilität und Zelltoxizität parallel durch Fluoreszenzmessung detektiert werden. In einem zweiten Schritt wird dann in den gleichen Zellen die Apoptose gemessen. Dies erfolgt über die Lyse der Zellen, die Spaltung eines Substrats durch aktive Caspasen 3 und 7 und die anschließende Umsetzung des Produkts durch eine Luciferase. Die entstehende

Lumineszenz wird im Luminometer detektiert und ist ein Maß für die Apoptose-induktion in den untersuchten Zellen.

Der ApoTox-Glo™ Triplexassay wird analog zum MTT-Assay in Fünffachbestimmung im 96well-Format durchgeführt. Dazu werden den Zellen mit 100 µl Kulturmedium 20 µl des Viabilität/Zytotoxizität-Substrates (2,5 µl jedes Substrates pro 1 ml Puffer) zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C wird die Fluoreszenz im Fluoreszenzreader gemessen. Die Viabilität der Zellen wird bei einer Wellenlänge [nm] von 400<sub>Ex</sub>/505<sub>Em</sub> detektiert, während die Messung der Zytotoxizität bei 485<sub>Ex</sub>/520<sub>Em</sub> erfolgt. Anschließend werden je well 50 µl des Apoptosesubstrats zugegeben und die Platte für 1 h bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Danach werden die Zelllysate in weiße 96well-Platten überführt und die Lumineszenz im Luminometer gemessen. Als Positivkontrolle für die Zytotoxizität werden Zellen 15 – 30 Min. vor der Zugabe des Viabilität/Zytotoxizität-Substrates mit Digitonin behandelt (300 µg/ml). AllStars Hs Cell Death Control siRNA-transfizierte Zellen bzw. mit Camptothecin behandelte Zellen (5 µM, über Nacht) dienen als Positivkontrollen für die Induktion von Apoptose.

#### **3.2.6 Scratch-Assay**

Der Scratch-Assay wird für die Messung der Migration von myxoiden Liposarkomzelllinien unter Therapie mit FGFR-Inhibitoren und/oder Trabectedin verwendet. Dazu werden die Zellen in 24well-Platten ausgesät und wachsen zunächst bei Medium mit vollem Serumgehalt (10%) bis zu einer Konfluenz von 100%. Dann wird in jedem well mit einer 100 µl Pipettenspitze kreuzweise ein Kratzer (*scratch*) in den Zellrasen gesetzt. Der Überstand wird abgenommen und abschwimmende Zellen mit PBS gewaschen. Von jedem well wird ein Foto mit dem zentralisierten Scratch aufgenommen. Anschließend wird den Zellen die jeweilige Behandlung in Medium mit 2% FBS zugegeben und die Platte für 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Es werden dabei nur Inhibitorkonzentrationen verwendet, die nach 24 h keinen Effekt auf die Viabilität der Zellen zeigen. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die wells erneut mit dem Scratch in der Mitte fotografiert. Mit Hilfe der AxioVision Software wird die von Zellen unbedeckte Fläche vor und nach der betrachteten Zeitspanne bestimmt. Die Schließung des Kratzers wird als Anteil der zuvor unbedeckten Fläche, die während der Behandlung von Zellen besiedelt wird, berechnet. Daraus wird die migratorische Aktivität der Zellen

als relative Schließung des Kratzers im Vergleich zur Kontrolle bestimmt. Kontrollzellen werden mit der der Behandlung entsprechenden DMSO-Konzentration behandelt.

### **3.3 Biochemie**

#### **3.3.1 Proteinisolation**

Zur Untersuchung der Expression von FGF-Rezeptoren sowie zur Analyse des Phosphorylierungsstatus nachgeschalteter Proteine werden Proteinlysate aus myxoiden Liposarkomzelllinien gewonnen. Die Proteinisolation erfolgt im 6well-Format mit zwei verschiedenen Puffern. Für den Nachweis der FGFR-Rezeptorproteine wird ein RIPA-Puffer (siehe Abschnitt 2.5) verwendet, während zur effektiven Isolation von phosphorylierten Proteinen ein spezieller Isolationspuffer mit Phosphataseinhibitoren (siehe Abschnitt 2.5) eingesetzt wird. Die Proteinisolation wird auf Eis durchgeführt. Dabei werden die Zellen zunächst zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend werden je well 100 µl des geeigneten Isolationspuffers zugegeben und die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Die Lysate werden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und zunächst 5 Min. bei 4°C im Inkubationsschüttler leicht geschüttelt. Danach werden durch Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 30 Min. die Zelltrümmer sedimentiert und die Proteinlysate als Überstand abgenommen und zu 30 – 50 µl aliquotiert. Die Proteinkonzentration in den gewonnenen Lysaten wird mit dem BCA Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers bestimmt, die Proteinlysate werden bei -80°C gelagert.

Der Nachweis von FGF-Rezeptorproteinen erfolgt aus unbehandelten MLS-Zellen, während die Zellen zur Analyse des Phosphorylierungsstatus nachgeschalteter Proteine vor der Proteinisolation für 5 h mit der jeweiligen Behandlung inkubiert werden.

#### **3.3.2 Westernblot**

Der spezifische Nachweis von Proteinen aus den Lysaten von unbehandelten und mit FGFR-Inhibitoren behandelten myxoiden Liposarkomzellen erfolgt mittels Westernblot. Dazu werden die Proteinlysate mit 4x Sample Buffer, 10x Sample Reducing Agent und H<sub>2</sub>O auf gleiche Proteinmengen verdünnt und 10 Min. bei 70°C inkubiert. Die so vorbereiteten Proben werden in die Taschen von NuPAGE®



Novex® 4-12% Bis-Tris Proteingelen pipettiert. Zusätzlich wird zur Größenabschätzung der Proteinstandard PageRuler Prestained Protein Ladder geladen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt in NuPAGE-Laufpuffer bei 80 – 120 V. Anschließend werden die Gele aus ihrer Einfassung gelöst und das Sammelgel mit den Taschen entfernt. Die aufgetrennten Proteine werden in einem nassen Blotverfahren mit 1x Transferpuffer (siehe Abschnitt 2.5) bei 100 V 1,5 h auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer wird mittels Ponceau Rotfärbung kontrolliert und die Membran anschließend mit PBS wieder entfärbt. Nach diesem Schritt kann die Membran für die Detektion verschiedener Proteine anhand des Größenstandards in entsprechende Abschnitte geteilt werden. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wird die Membran 1 h bei Raumtemperatur in 5% Milch/PBST inkubiert. Nach Waschen in PBST (3x 5 Min.) wird die Membran in der Regel über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Die jeweiligen Bedingungen für die verschiedenen Primärantikörper sind Tabelle 3.3 zu entnehmen.

**Tabelle 3.3 Bedingungen für die verschiedenen Primärantikörper im Westernblot**

Antigen	Verdünnung	Inkubation	Anwendung
FGFR1	1:500 in 5% BSA/PBST	4°C, über Nacht	Nachweis FGFR-Rezeptorprotein
FGFR2	1:500 in 5% BSA/PBST	4°C, über Nacht	Nachweis FGFR-Rezeptorprotein
FGFR3	1:500 in 5% BSA/PBST	4°C, über Nacht	Nachweis FGFR-Rezeptorprotein
FGFR4	1:500 in 5% BSA/PBST	4°C, über Nacht	Nachweis FGFR-Rezeptorprotein
ACTB	1:5.000 in 5% Milch/PBST	Raumtemperatur, 1 h	Referenzgen für FGFR1-4
ERK1/2	1:1.000 in 5% BSA/PBST	4°C, über Nacht	Analyse FGFR-Signalweg
Phospho-ERK1/2	1:1.000 in 5% BSA/PBST	4°C, über Nacht	Analyse FGFR-Signalweg
HPRT	1:1.000 in 5% BSA/PBST	4°C, über Nacht	Referenzgen für ERK1/2

Nach erneutem Waschen in PBST (3x 5 Min.) erfolgt die Inkubation der Membran mit dem jeweiligen Sekundärantikörper (anti-Maus IgG bzw. anti-Kaninchen IgG) 1 h bei Raumtemperatur. Der Sekundärantikörper wird dafür 1:1.000 in 5% Milch/PBST

verdünnt. Danach wird die Membran abschließend in PBST gewaschen (3x 5 Min.) und es erfolgt die Proteindetektion mit Hilfe des SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrats nach Herstellerangaben. Die Erfassung der Proteinbanden wird im ChemiDoc-Geldokumentationssystem und mit der ImageLab™ Software durchgeführt.

Zur erneuten Detektion von Proteinen auf einer bereits entwickelten Membran wird diese gestrippt. Dazu wird sie im Wasserbad 30 Min. bei 50°C in Stripping-Puffer (siehe Abschnitt 2.5) inkubiert und anschließend mit PBST gewaschen (3x 5 Min.). Mit der erneuten Proteindetektion wird dann wieder beim Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen begonnen. Dieser Ablauf wird im Rahmen dieser Arbeit zur Detektion von ERK1/2 und phospho-ERK1/2 an der gleichen Membran angewendet.

### 3.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie wird in dieser Arbeit zur Detektion des FGFR2-Proteins an Paraffinschnitten (2 – 4 µm) von primären myxoiden Liposarkomen sowie formalinfixierten, paraffineingebetteten MLS-Zellpellets verwendet. Die Schnitte werden dazu auf silanisierte Objektträger aufgebracht. Sowohl die Vorbehandlung als auch die Färbung der Schnitte wird automatisiert im BOND Max Immunfärbeautomaten nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Dabei erfolgt die Epitopdemaskierung mit Hilfe der BOND Epitope Retrieval Solution 1 (Citratpuffer, pH 6). Der gegen FGFR2 gerichtete Antikörper wird in einer Verdünnung von 1:200 eingesetzt.

### 3.5 Bioinformatik: BIRTA

Die vorab gewonnenen Daten der whole-genome und microRNA Microarrays (Künstlinger 2010) werden im Rahmen dieser Arbeit integriert und gemeinsam ausgewertet. Dazu wird in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Achim Tresch „Computational Biology and Regulatory Networks“ am MPI für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln das bioinformatische Modell BIRTA angewendet (Zacher et al. 2012). Die Bezeichnung BIRTA steht dabei für *Bayesian inference of regulation of transcriptional activity*. Grundlage dieses statistischen Ansatzes ist also ein Bayessches Netz, ein gerichteter azyklischer Graph, der ein Set von Zufallsvariablen mit ihren bedingten Abhängigkeiten beschreibt. Im Fall von BIRTA sind damit die

mRNA- und microRNA-Expressionslevel gemeint, die über die posttranskriptionelle Regulation durch microRNAs voneinander abhängen. Das Modell nutzt die regulatorischen Netzwerke von microRNAs zusammen mit den mRNA- und microRNA-Expressionsdaten, um auf Aktivitätsunterschiede zwischen zwei Bedingungen zurückzuschließen. Im vorliegenden Projekt werden so die Genexpressionsdaten mit korrespondierenden microRNA-Expressionsleveln kombiniert, um microRNAs mit differentieller Aktivität in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe zu identifizieren. Als aktiv wird eine microRNA dabei bezeichnet, wenn die Mehrheit der jeweiligen Zielgene in die gleiche Richtung differentiell exprimiert vorliegt.

## 4 Ergebnisse

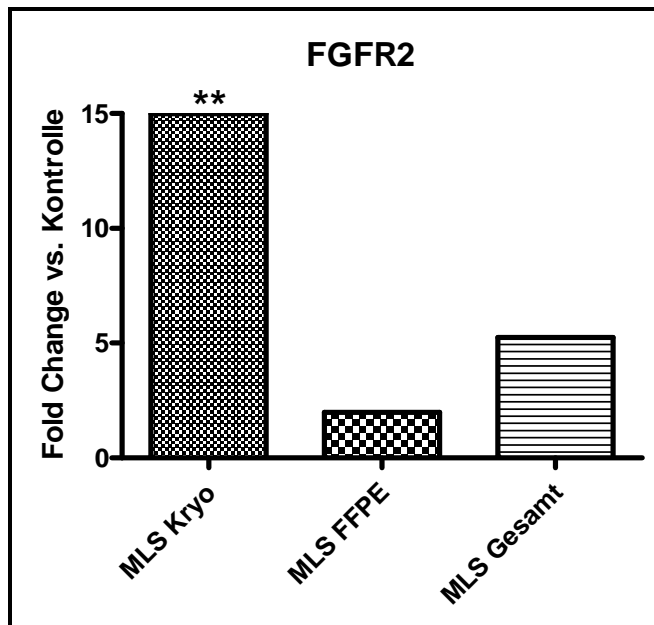
Myxoide Liposarkome sind seltene maligne Tumoren des Weichteilgewebes, deren Tumorigenese bislang nur unvollständig verstanden ist. Es stehen demnach keine Therapien mit spezifischen Zielstrukturen zur Verfügung. Die Tumoren sind charakterisiert durch eine spezifische Translokation, die zur Bildung eines Fusionsproteins führt, das als aberranter Transkriptionsfaktor agiert. Daher sind in dieser Tumorentität viele Gene differentiell exprimiert. In Vorarbeiten wurden Gen- und microRNA-Expressionsanalysen durchgeführt, um diese zu identifizieren (Künstlinger 2010). Diese Expressionsdaten dienten als Grundlage für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Studien.

### 4.1 Die Rolle von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in myxoiden Liposarkomen

Die whole-genome Microarrays haben u.a. eine Überexpression des Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptors *FGFR2* in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe aufgedeckt (Künstlinger 2010). Da die FGFR-Genfamilie eine hohe klinische Bedeutung aufweist, wurden zusätzliche Experimente angeschlossen, um die Relevanz des FGFR-Signalwegs in diesen Tumoren zu überprüfen. Dabei wurden sowohl primäre myxoide Liposarkome (siehe Abschnitt 2.11) als auch die myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 untersucht.

#### 4.1.1 *FGFR2*-Expression in myxoiden Liposarkomen

Zunächst wurde die Überexpression des *FGFR2*-Gens in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe mittels qPCR im gesamten Tumorkollektiv validiert. Zur Normalisierung wurden die zuvor etablierten Referenzgene *IPO8* und *B2M* verwendet (Künstlinger 2010). Als Kontrolle diente jeweils ein RNA-Pool aus acht kryokonservierten bzw. formalinfixierten Fettgewebeproben. Es zeigte sich eine signifikante Überexpression von *FGFR2* in den kryokonservierten Tumorproben sowie eine schwächer ausgeprägte Überexpression in den formalinfixierten Proben (Abbildung 4.1).

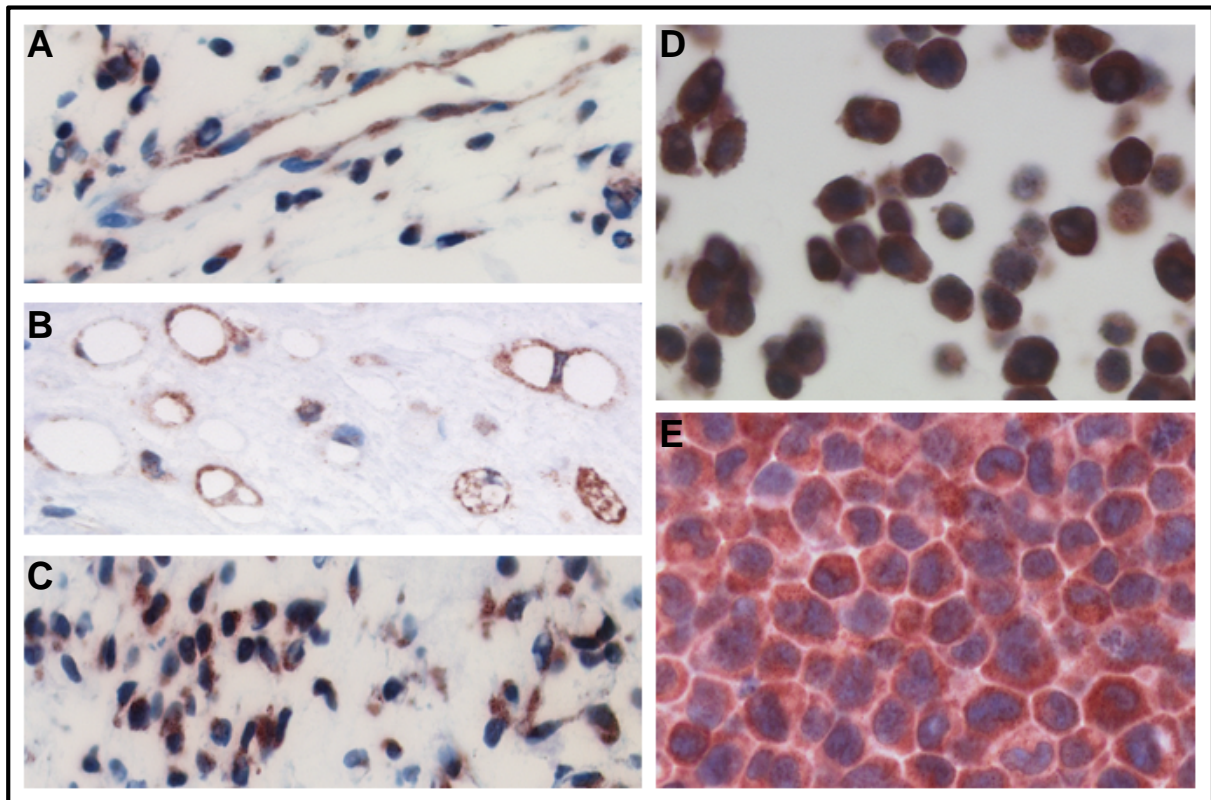


**Abbildung 4.1 *FGFR2*-Genexpression in myxoiden Liposarkomen**

Relative Genexpression von *FGFR2* in Primärtumoren im Vergleich zu Fettgewebeproben. Die Expression wurde mittels qPCR in kryokonservierten (Kryo) sowie in formalinfixierten (FFPE) myxoiden Liposarkomen (MLS) gemessen. \*:  $p \leq 0,05$  / \*\*:  $p \leq 0,01$  / \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

Weiterhin wurde die *FGFR2*-Expression in myxoiden Liposarkomen auch auf Proteinebene untersucht. Dazu wurde *FGFR2* in Primärtumoren sowie den myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 immunhistochemisch analysiert (Abbildung 4.2). In den Primärtumoren waren sowohl die Tumorzellen selbst als auch die Zellen der Gefäßendothelien positiv für *FGFR2*. Ebenso zeigten beide Zelllinien eine starke *FGFR2*-Proteinexpression.

Neben der Überexpression von *FGFR2* zeigten die Daten der whole-genome Microarrays auch eine gesteigerte Expression anderer Mitglieder der FGF/*FGFR*-Familie auf (Tabelle 4.1). Dies unterstreicht eine potentielle Rolle des *FGFR*-Signalwegs in myxoiden Liposarkomen zusätzlich. Zur Bestätigung der Hypothese wurden daher funktionelle Studien in den myxoiden Liposarkomzelllinien abgeschlossen.



**Abbildung 4.2 FGFR2-Proteinexpression in myxoiden Liposarkomen**

FGFR2-Immunhistochemie in Primärtumoren (A – C) sowie den myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 (D) und MLS 1765 (E). In den Primärtumoren zeigt sich die FGFR2-Proteinexpression in Gefäßendothelzellen (A), monovakuolären Lipoblasten (B) und mesenchymalen Zellen (C).

**Tabelle 4.1 Überexpression von Mitgliedern der FGF/FGFR-Familie**

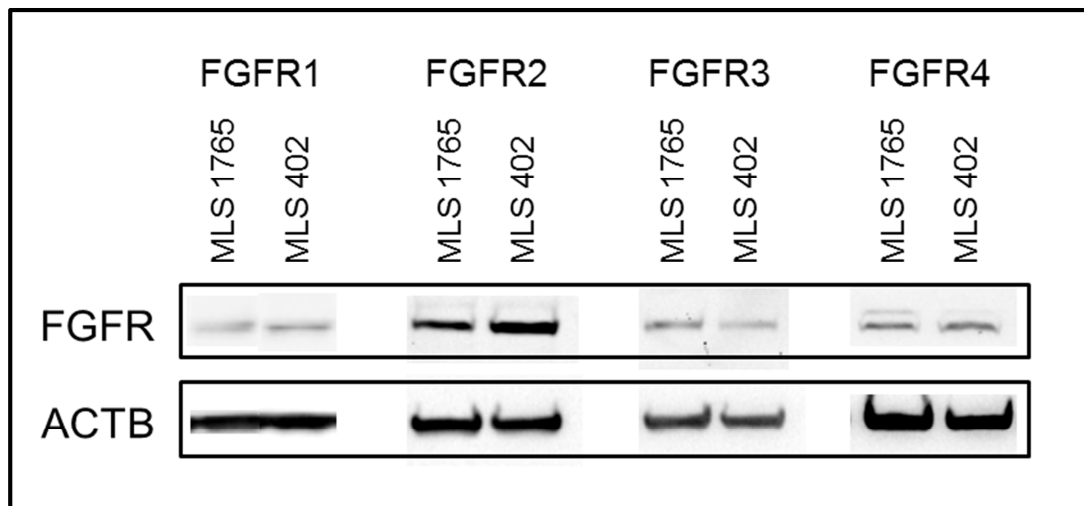
Whole-genome Microarrays zeigen eine erhöhte Expression mehrerer FGF-Rezeptoren und ihrer Liganden in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe.

Gen	Log (Ratio)	Fold Change	P-value
<i>FGFR2</i>	1,61278	41,00008	1,06E-17
<i>FGFR4</i>	0,41018	2,57147	2,04E-09
<i>FGF5</i>	1,83121	67,79663	1,08E-23
<i>FGF11</i>	0,70091	5,02241	0,00031
<i>FGF18</i>	1,22752	16,88562	9,28E-16

#### 4.1.2 Charakterisierung der myxoiden Liposarkomzelllinien

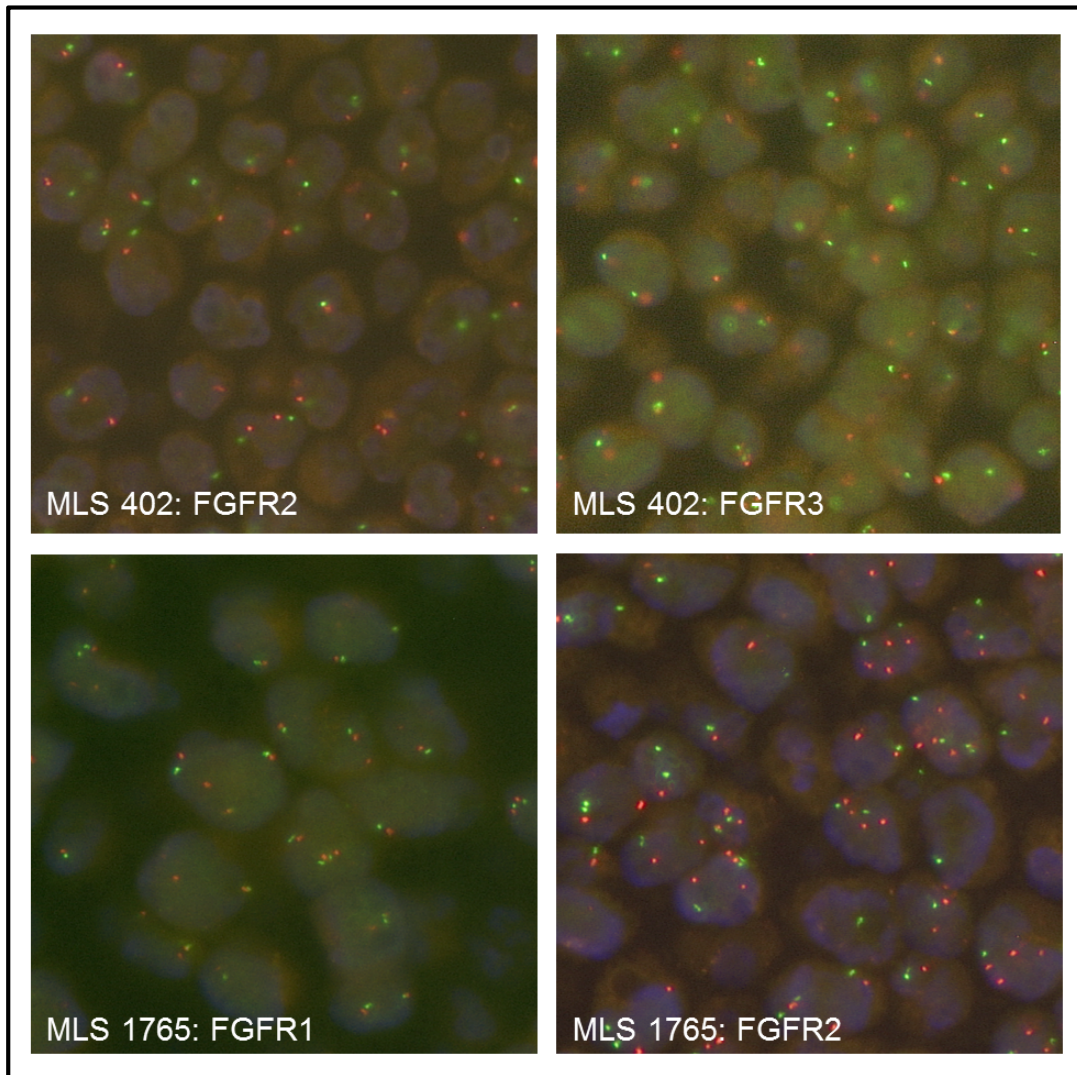
Die funktionelle Relevanz des FGFR-Signalwegs wurde in den myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 überprüft. Die Identität der beiden Zelllinien war vorab durch den Nachweis der *FUS/DDIT3*-Translokation mittels

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und RT-PCR gesichert worden (Künstlinger 2010). Zudem wurde ihre Authentizität durch STR (*short tandem repeat*)-Typisierung bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen des Leibniz-Instituts bestätigt. Zur weiteren Charakterisierung wurde der Status der FGFR-Familie in den Zellen analysiert. Wie in Abbildung 4.3 gezeigt ist, exprimieren beide Zelllinien alle vier FGF-Rezeptorproteine. Mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden die Zellen auf das Vorliegen von FGFR-Genamplifikationen untersucht. Dabei zeigten beide Zelllinien keine Amplifikation eines FGF-Rezeptors (exemplarisch dargestellt in Abbildung 4.4). Zusätzlich wurde mittels Sangersequenzierung sowie Parallelsequenzierung der Mutationsstatus relevanter Genabschnitte aller FGF-Rezeptoren untersucht (siehe Abschnitt 3.1.3 bzw. 3.1.4). Für beide Zelllinien wurde ein Wildtypstatus der FGF-Rezeptorgene nachgewiesen. Durch die Parallelsequenzierung wurde auch der Mutationsstatus anderer Onkogene überprüft, wie z.B. die den FGF-Rezeptoren nachgeschalteten Signalmoleküle *KRAS*, *BRAF* oder *PIK3CA*. In beiden Zelllinien lagen dabei alle untersuchten Genabschnitte im Wildtypstatus vor.



**Abbildung 4.3 FGFR-Proteinexpression in MLS-Zelllinien**

Der Westernblot zeigt die Proteinexpression aller vier FGF-Rezeptoren in den myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 1765 und MLS 402.



**Abbildung 4.4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von FGF-Rezeptoren in myxoiden Liposarkomzellen**

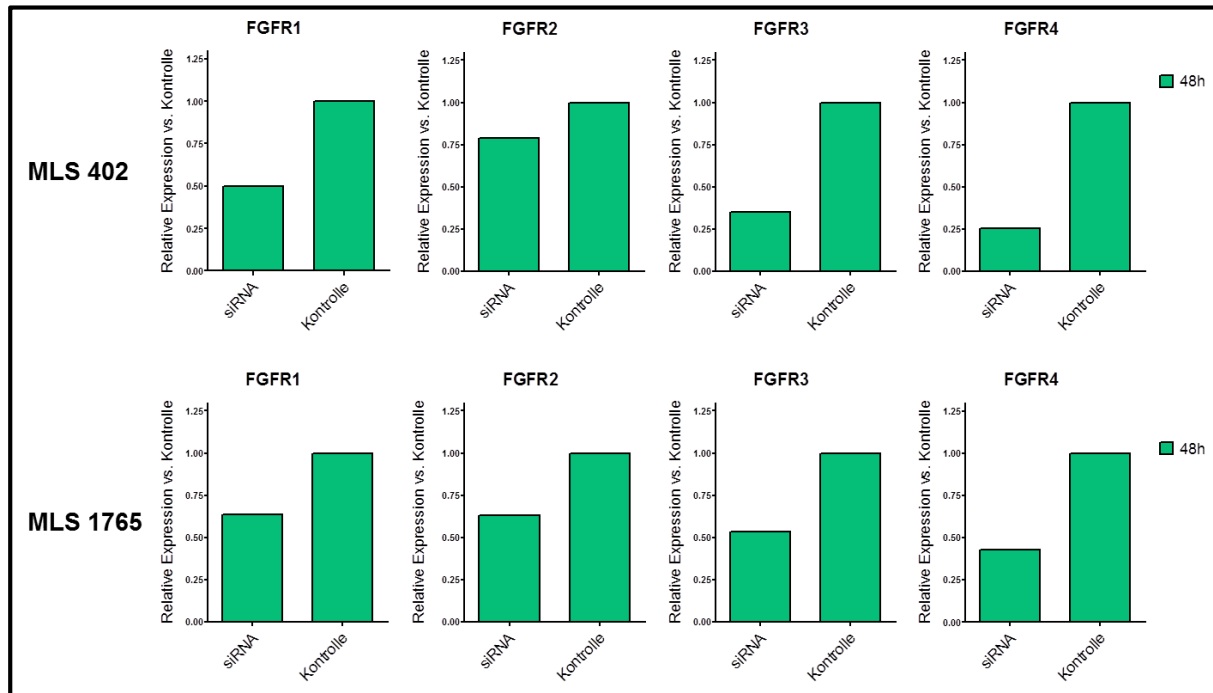
*FGFR*-FISH an Paraffinschnitten von MLS-Zelllinien. Die Zentromersonde ist jeweils orange markiert, die Zielgensonde grün.

#### 4.1.3 Ausschaltung von FGF-Rezeptoren durch spezifische siRNAs

Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz der FGF-Rezeptoren wurden die myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 zunächst mit spezifischen siRNAs transfiziert. Der erfolgte Knock-down und damit die Funktionalität der siRNAs wurden mittels qPCR nachgewiesen (Abbildung 4.5). 48 h nach Transfektion der siRNAs zeigte sich in beiden Zelllinien eine Reduktion der Expression des jeweiligen FGF-Rezeptors.



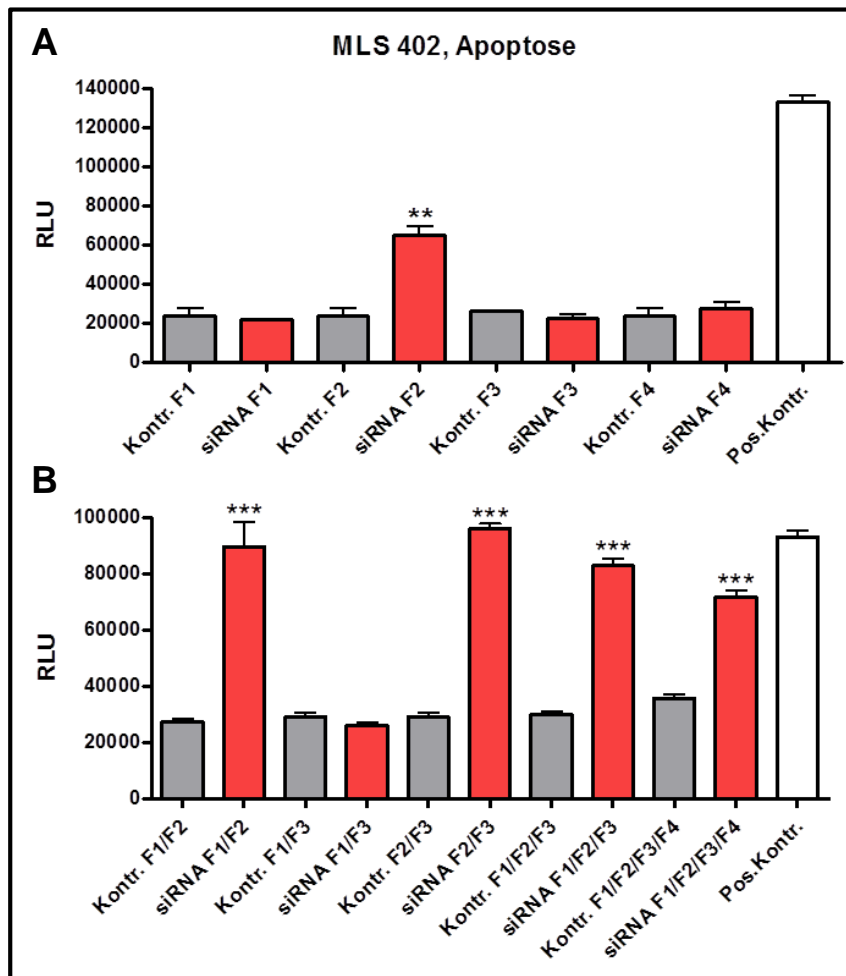
## 4 Ergebnisse



**Abbildung 4.5 Knock-down von FGF-Rezeptoren in MLS-Zelllinien**

Nachweis des siRNA-vermittelten Knock-downs von FGF-Rezeptoren in myxoiden Liposarkomzelllinien 48 h nach der Transfektion. Die relative Expression der Rezeptoren wurde in mit der jeweiligen siRNA transfizierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit entsprechenden Kontroll-siRNAs transfiziert wurden, gemessen.

Die funktionellen Effekte des FGFR Knock-downs wurden 48 h nach der Transfektion untersucht. Da beide Zelllinien alle vier FGF-Rezeptoren exprimieren, wurden die Rezeptoren einzeln sowie in verschiedenen Kombinationen parallel ausgeschaltet. Es wurde die Viabilität der Zellen, eine zytotoxische Wirkung der siRNAs sowie eine Apoptoseinduktion mittels ApoTox-Glo™ Assay quantifiziert. Dabei wirkte in beiden Zelllinien keine der siRNAs zytotoxisch. Vielmehr kam es zu einer spezifischen Induktion von Apoptose, die mit einer leichten Abnahme der Zellviabilität einherging. Wie in Abbildung 4.6 A zu sehen ist, führte in MLS 402 Zellen der alleinige Knock-down von FGFR2 zur Induktion von Apoptose. Der einzelne Knock-down anderer FGF-Rezeptoren zeigte hingegen keinen Effekt. Dementsprechend wurde auch bei der parallelen Ausschaltung mehrerer FGF-Rezeptoren nur dann Apoptose ausgelöst, wenn FGFR2 beteiligt war (Abbildung 4.6 B).

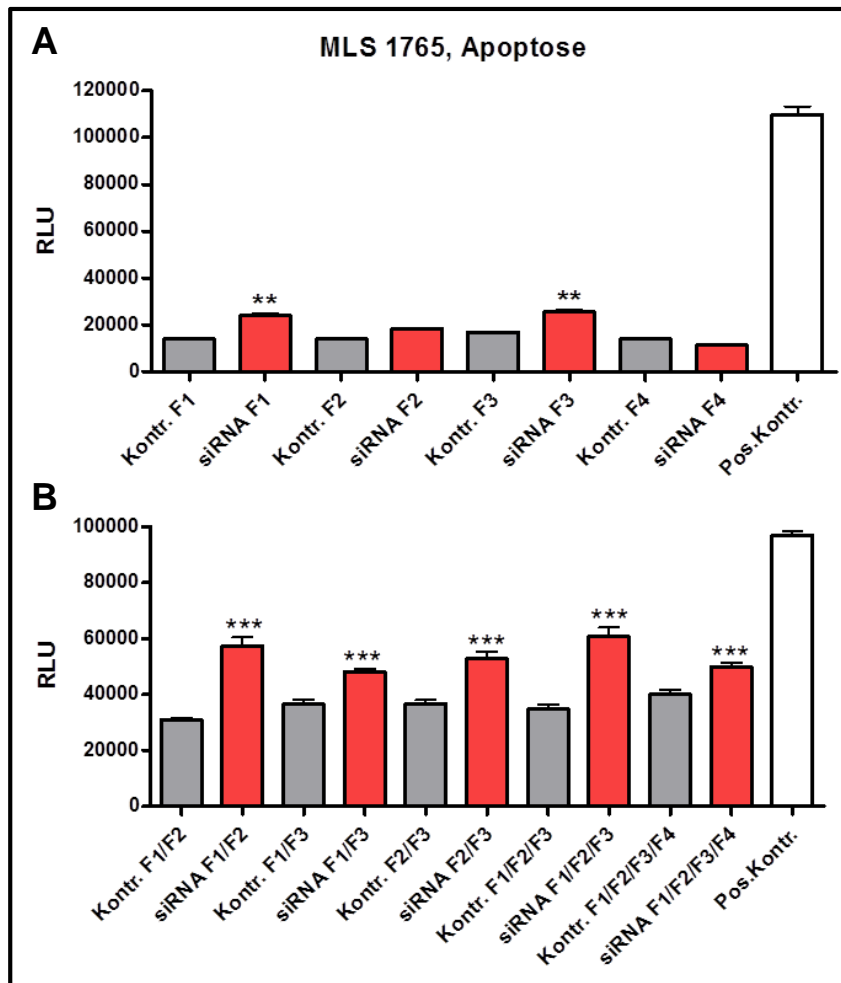


**Abbildung 4.6 Apoptoseinduktion durch FGFR-siRNAs in MLS 402 Zellen**

Die Apoptoseinduktion wurde 48 h nach Transfektion der Zellen gemessen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Kontroll-siRNAs mit dem entsprechenden GC-Gehalt transfiziert, als Positivkontrolle dienten mit CellDeath siRNA transfizierte Zellen. Die FGF-Rezeptoren wurden dabei sowohl einzeln (A) als auch in Kombination (B) ausgeschaltet. \*:  $p \leq 0,05$  / \*\*:  $p \leq 0,01$  / \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . RLU: relative Lumineszenzeinheiten, F1: FGFR1, F2: FGFR2, F3: FGFR3, F4: FGFR4.

Auch in MLS 1765 Zellen kam es durch den Knock-down von FGF-Rezeptoren zu einer Induktion von Apoptose, allerdings war der Effekt schwächer ausgeprägt (Abbildung 4.7). Zudem zeigte das Ausschalten der einzelnen FGF-Rezeptoren hier andere Wirkungen. So löste in dieser Zelllinie der alleinige Knock-down von FGFR2 keine Apoptose aus, während die einzelne Ausschaltung von FGFR1 und FGFR3 jeweils zur Induktion von Apoptose führte (Abbildung 4.7 A). Demgemäß wurde auch nach parallelem Knock-down mehrerer FGF-Rezeptoren in MLS 1765 Zellen immer dann Apoptose ausgelöst, wenn FGFR1 und/oder FGFR3 beteiligt waren (Abbildung

4.7 B). In beiden myxoiden Liposarkomzelllinien konnte also eine essentielle Rolle des FGFR-Signalwegs für das Überleben der Zellen nachgewiesen werden.



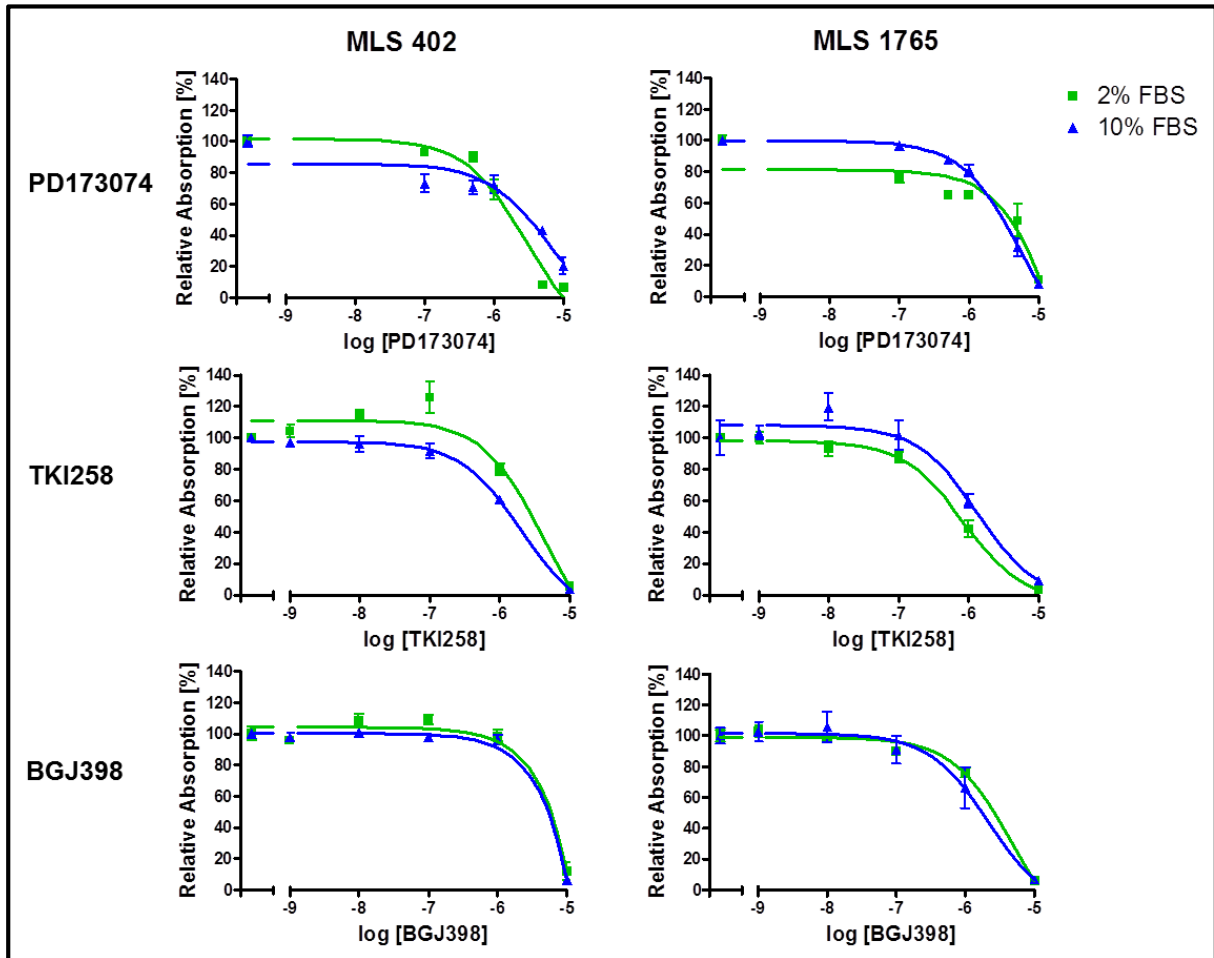
**Abbildung 4.7 Apoptoseinduktion durch FGFR-siRNAs in MLS 1765 Zellen**

Die Apoptoseinduktion wurde 48 h nach Transfektion der Zellen gemessen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit Kontroll-siRNAs mit dem entsprechenden GC-Gehalt transfiziert, als Positivkontrolle dienten mit CellDeath siRNA transfizierte Zellen. Die FGF-Rezeptoren wurden dabei sowohl einzeln (A) als auch in Kombination (B) ausgeschaltet. \*:  $p \leq 0,05$  / \*\*:  $p \leq 0,01$  / \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . RLU: relative Lumineszenzeinheiten, F1: FGFR1, F2: FGFR2, F3: FGFR3, F4: FGFR4.

#### 4.1.4 Inhibition des FGFR-Signalwegs durch Tyrosinkinaseinhibitoren

Da über die spezifische Ausschaltung von FGF-Rezeptoren mit siRNAs eine funktionelle Rolle des FGFR-Signalwegs in myxoiden Liposarkomzellen bestätigt werden konnte, wurden Versuche mit FGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren abgeschlossen. Dabei kamen die *in vitro* Substanz PD173074 sowie die klinisch anwendbaren FGFR-Inhibitoren TKI258 und BGJ398 zum Einsatz. Zunächst wurde im MTT-Assay der Effekt der FGFR-Inhibitoren auf die Viabilität der Zellen analysiert.

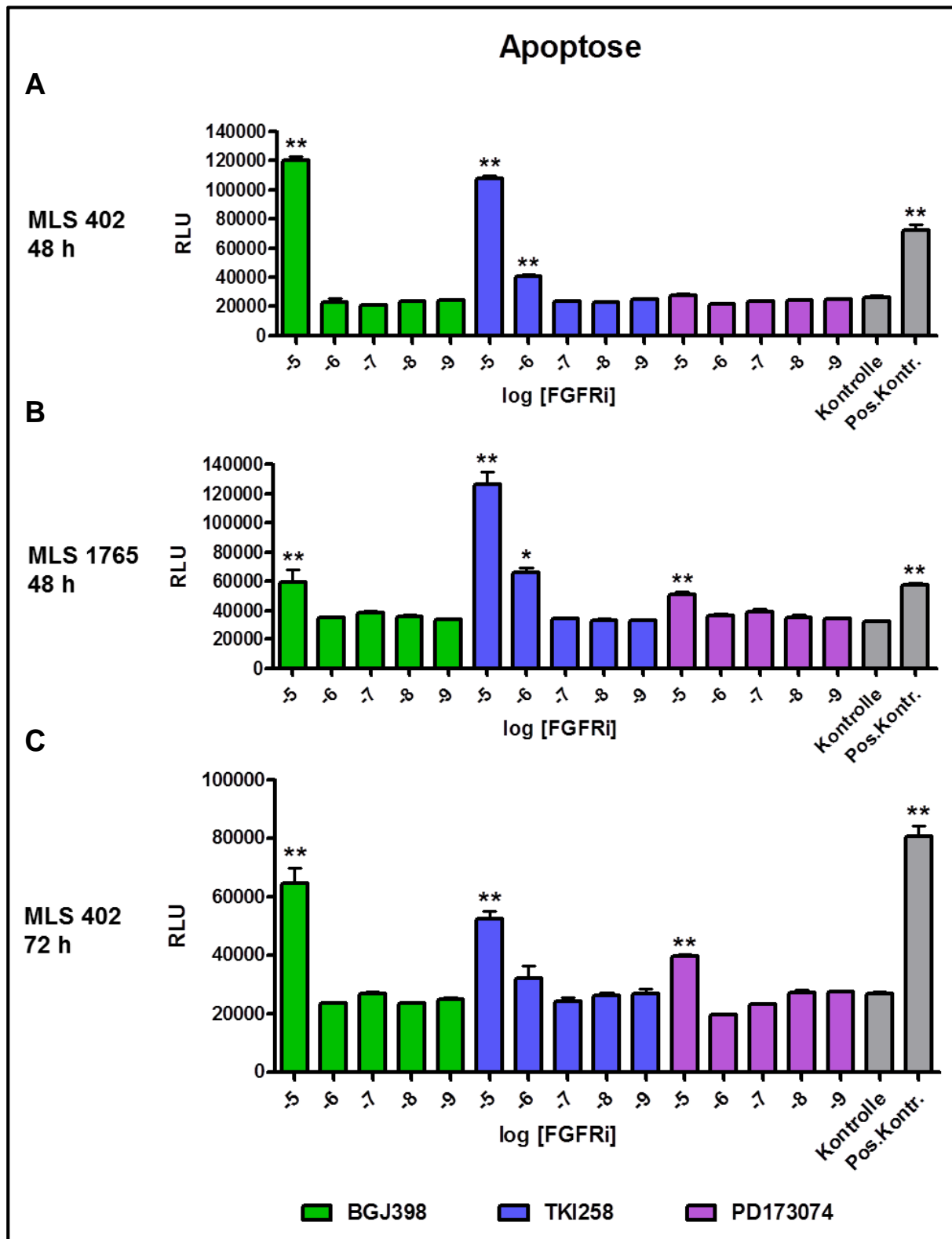
Dabei führten alle drei Inhibitoren in beiden Zelllinien zu einer dosisabhängigen Reduktion der Viabilität (Abbildung 4.8). Die  $IC_{50}$ -Werte lagen jeweils im mikromolaren Bereich. Der Effekt konnte sowohl unter serumreduzierten (2% FBS) Bedingungen als auch in Anwesenheit von 10% Serum nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.8 Reduktion der Viabilität von MLS-Zellen durch FGFR-Inhibitoren**

MTT-Assay in myxoiden Liposarkomzellen 48 h nach Behandlung mit verschiedenen FGFR-Inhibitoren. FBS: fetales Rinderserum.

Die beobachteten Effekte der FGFR-Inhibitoren auf die Viabilität der Zellen wurden mit Hilfe des ApoTox-Glo™ Assays weiter differenziert. Dabei zeigte sich, dass die Inhibitoren in den wirksamen Konzentrationen nicht zytotoxisch wirken, sondern spezifisch Apoptose induzieren (Abbildung 4.9). BGJ398 und TKI258 lösten in beiden Zelllinien bereits nach 48 h Apoptose aus, während PD173074 in MLS 402 Zellen erst nach 72 h zu einer signifikanten Apoptoseinduktion führte.



**Abbildung 4.9 Apoptoseinduktion durch FGFR-Inhibitoren in MLS-Zelllinien**

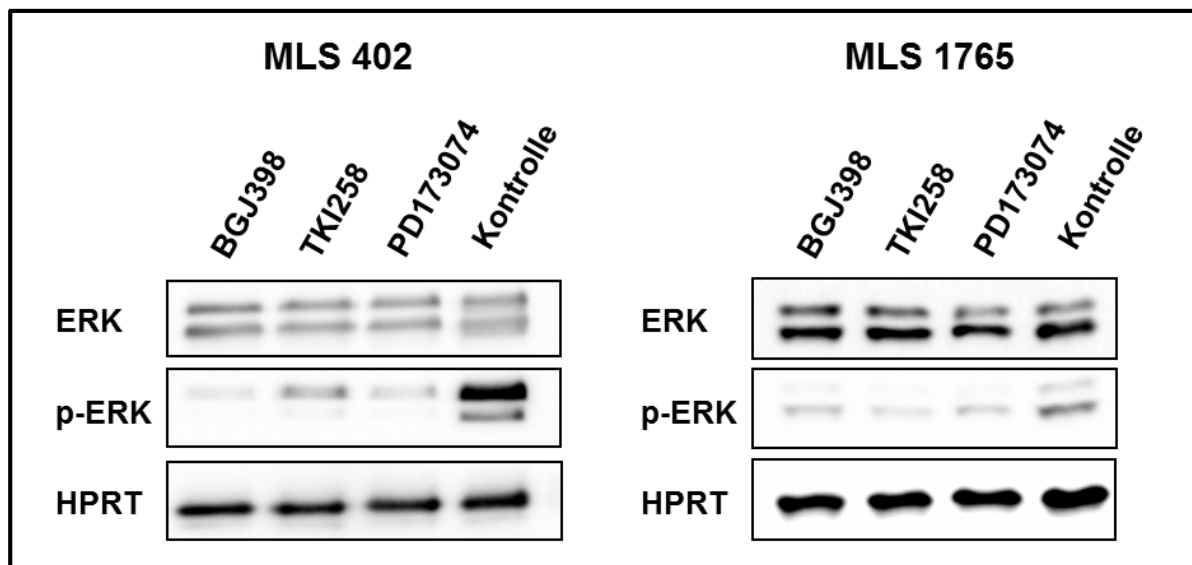
(A) Apoptoseinduktion in MLS 402 Zellen 48 h nach Behandlung mit FGFR-Inhibitoren.

(B) Apoptoseinduktion in MLS 1765 Zellen 48 h nach Behandlung mit FGFR-Inhibitoren.

(C) Apoptoseinduktion in MLS 402 Zellen 72 h nach Behandlung mit FGFR-Inhibitoren.

Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 0,1% DMSO behandelt. In den Zellen der Positivkontrollen wurde mit Camptothecin Apoptose ausgelöst. \*:  $p \leq 0,05$  / \*\*:  $p \leq 0,01$  / \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . RLU: relative Lumineszenzeinheiten, FGFRi: FGFR-Inhibitoren.

Die Inhibition von FGF-Rezeptoren wirkte sich auch auf die nachgeschalteten Signalwege aus. Dies wurde exemplarisch anhand des Phosphorylierungsstatus von ERK, einem der zentralen nachgeschalteten Signalmoleküle von FGF-Rezeptoren, überprüft. Im Westernblot zeigte sich eine deutliche Abnahme der ERK1/2-Phosphorylierung, während die Gesamtmenge von ERK1/2 konstant blieb (Abbildung 4.10).

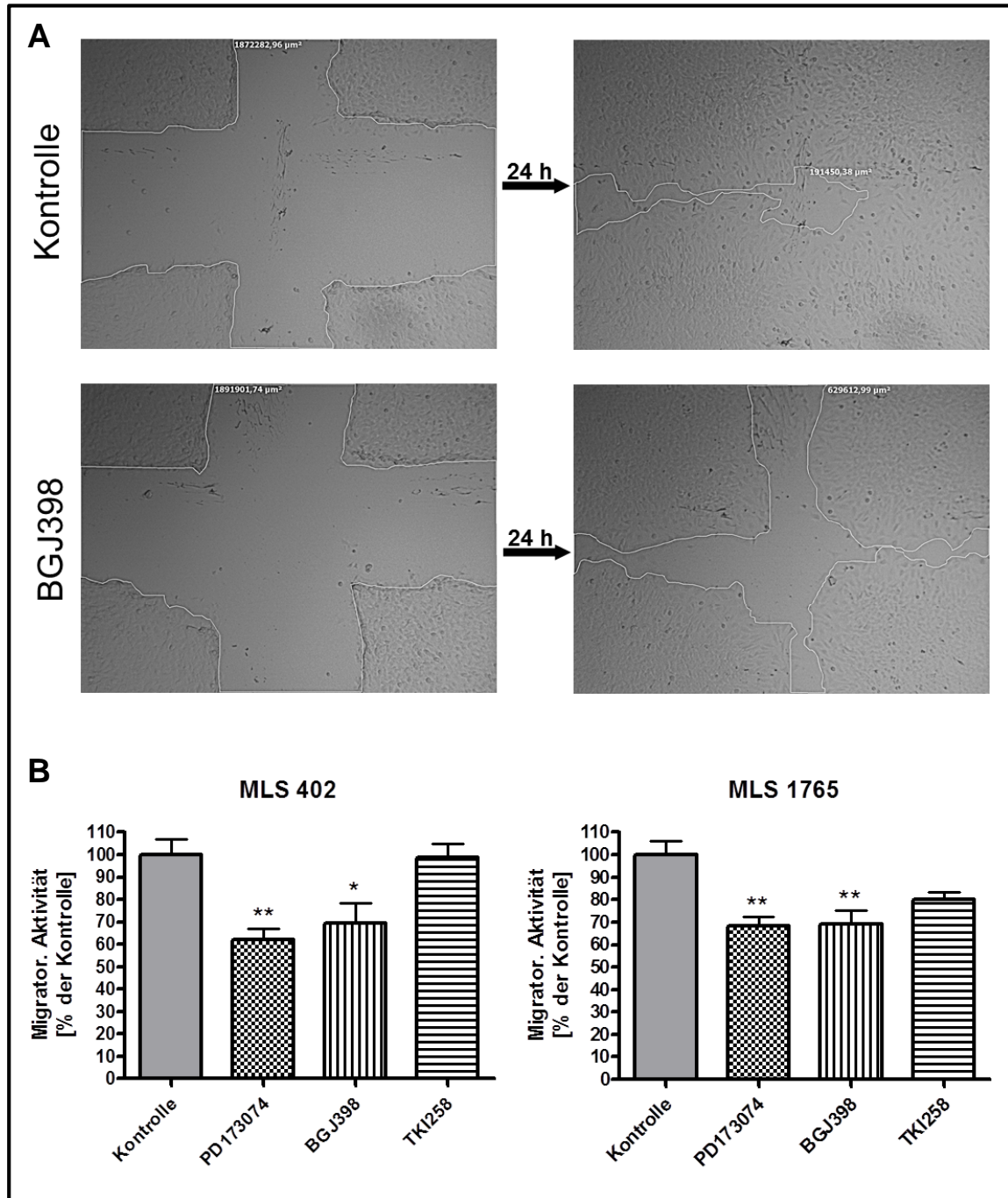


**Abbildung 4.10 Auswirkung von FGFR-Inhibitoren auf den nachgeschalteten Signalweg**

Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 5 h nach Behandlung mit FGFR-Inhibitoren [1  $\mu$ M]. Als Kontrolle dienten Lysate von Zellen, die mit 0,1% DMSO behandelt wurden. p-ERK: phosphoryliertes ERK-Protein.

Zusätzlich wurde der Einfluss der FGFR-Inhibitoren auf die Migration von myxoiden Liposarkomzellen untersucht. Abbildung 4.11 A zeigt exemplarisch die verringerte Migration von MLS 1765 Zellen unter der Wirkung von BGJ398. Eine Verlangsamung der zellulären Migration wurde in beiden Zelllinien durch alle drei Inhibitoren beobachtet (Abbildung 4.11 B). Dabei war der Effekt durch PD173074 und BGJ398 stärker ausgeprägt als der durch TKI258. In MLS 1765 Zellen war die Wirkung von TKI258 auf die Migration der Zellen zwar größer als in MLS 402 Zellen, es wurde aber in beiden Zelllinien keine signifikante Verlangsamung der Migration detektiert.

Die FGFR-Inhibitoren bewirkten also in beiden myxoiden Liposarkomzelllinien eine Verringerung der Viabilität, induzierten Apoptose und verlangsamten die Migration der Zellen. Die funktionelle Relevanz des FGFR-Signalwegs in myxoiden Liposarkomen konnte somit weiter bestätigt werden.

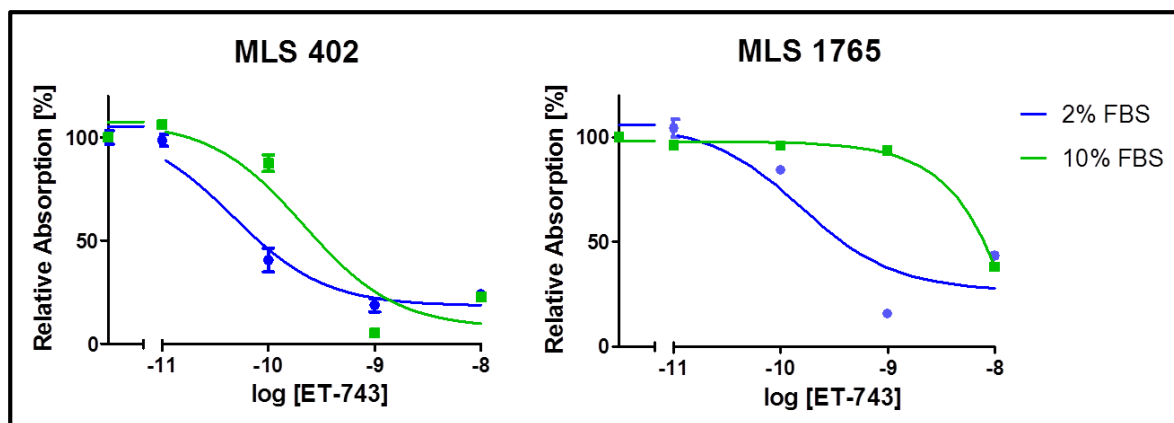


**Abbildung 4.11 Auswirkung von FGFR-Inhibitoren auf die Migration von MLS-Zelllinien** (A) BGJ398 [0,1  $\mu\text{M}$ ] verlangsamt die Migration von MLS 1765 Zellen. (B) Effekte von FGFR-Inhibitoren auf die migratorische Aktivität von myxoiden Liposarkomzelllinien. Kontrollzellen wurden mit 0,1% DMSO behandelt. \*:  $p \leq 0,05$  / \*\*:  $p \leq 0,01$  / \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

#### 4.1.5 Kombinationsbehandlung mit FGFR-Inhibitoren und Trabectedin

In einer Kombinationsbehandlung wurden die FGFR-Inhibitoren zusammen mit dem Chemotherapeutikum Trabectedin angewendet. Dazu wurde zunächst der Effekt von Trabectedin (ET-743) als Einzelsubstanzbehandlung auf die Viabilität der myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 untersucht (Abbildung 4.12). Trabectedin führte dabei in beiden Zelllinien zu einer dosisabhängigen Reduktion der Viabilität. In MLS 1765 Zellen war der Effekt aber schwächer ausgeprägt und konnte vor allem unter serumreduzierten Bedingungen (2% FBS) beobachtet werden. Daher wurden die anschließenden Kombinationsbehandlungen ausschließlich unter serumreduzierten Bedingungen durchgeführt.

Die FGFR-Inhibitoren PD173074, BGJ398 und TKI258 wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit Trabectedin kombiniert. Tabelle 4.2 zeigt dazu das zugehörige Kombinationsschema.



**Abbildung 4.12** Effekt von Trabectedin auf die Viabilität von MLS-Zellen

MTT-Assay in myxoiden Liposarkomzelllinien 48 h nach Behandlung mit Trabectedin (ET-743).

**Tabelle 4.2** Kombination von FGFR-Inhibitoren und Trabectedin

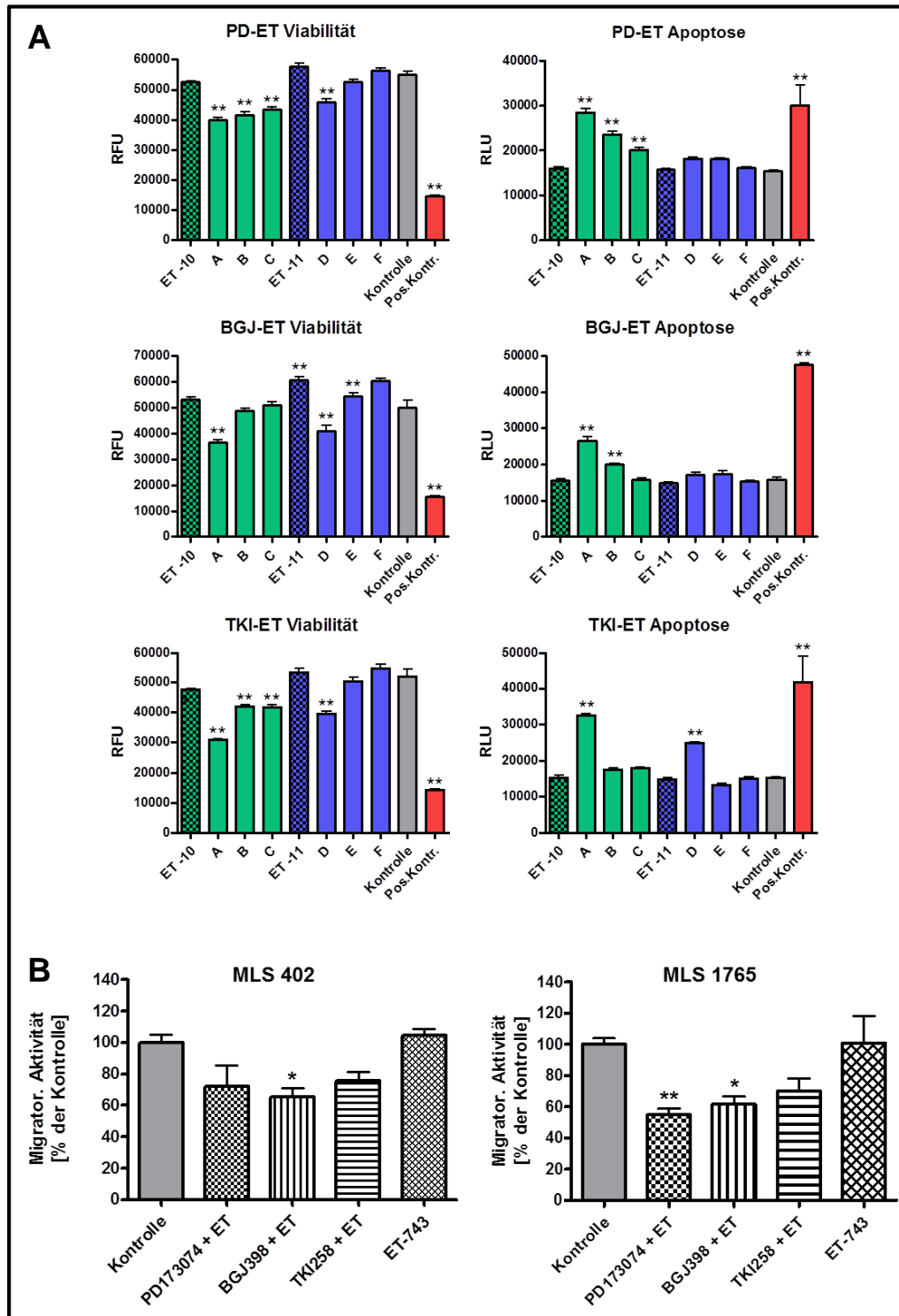
FGFRi: FGFR-Inhibitoren, ET-743: Trabectedin.

ET-743 \ FGFRi	0,1 nM	0,01 nM
1 $\mu$ M	A	D
0,1 $\mu$ M	B	E
0,01 $\mu$ M	C	F



Der Effekt der Kombinationsbehandlung auf die myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 wurde im Vergleich zur alleinigen Gabe von Trabectedin analysiert. Dabei wurden in beiden Zelllinien vergleichbare Ergebnisse erzielt. Dargestellt sind exemplarisch die Daten für MLS 1765 (Abbildung 4.13 A). 48 h nach Behandlung der Zellen wurden mit Hilfe des ApoTox-Glo™ Assays Zellviabilität und Apoptose gemessen (Abbildung 4.13 A). Dabei zeigte sich, dass die zusätzliche Gabe von FGFR-Inhibitoren die Wirkung von Trabectedin im Vergleich zur Einzelsubstanzbehandlung signifikant erhöht. So wurde durch Kombination mit FGFR-Inhibitoren die Viabilität der Zellen bei Trabectedinkonzentrationen reduziert, die alleine keinen Effekt zeigten. Ebenso wurde in Kombination mit den FGFR-Inhibitoren Apoptose induziert bei Trabectedinkonzentrationen, die alleine keinen Effekt hervorriefen.

Zusätzlich zur Auswirkung auf Viabilität und Apoptoseinduktion wurde auch der Effekt der Kombinationsbehandlung auf die Migration von myxoiden Liposarkomzellen analysiert (Abbildung 4.13 B). Dabei zeigte sich, dass die zusätzliche Gabe von FGFR-Inhibitoren auch die Wirkung von Trabectedin auf die Migration der Zellen verstärkt. Wie in der Einzelsubstanzbehandlung beobachtet, war auch in der Kombination mit Trabectedin die hemmende Wirkung von PD173074 und BGJ398 auf die zelluläre Migration höher als die von TKI258.



**Abbildung 4.13** Kombinationsbehandlung mit FGFR-Inhibitoren und Trabectedin

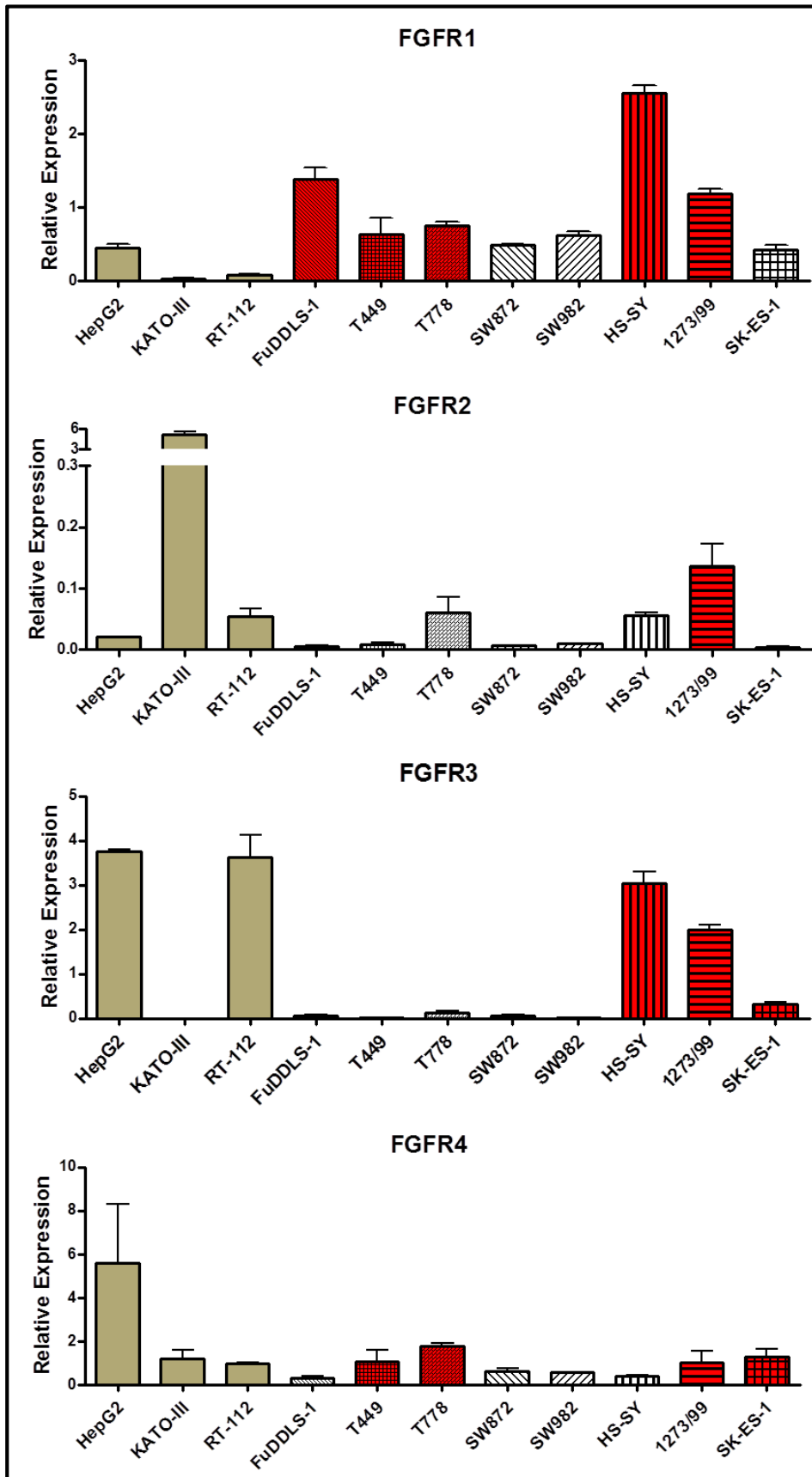
(A) Effekte der Kombinationsbehandlung von FGFR-Inhibitoren und Trabectedin auf MLS 1765 Zellen im Vergleich zu Trabectedin alleine. Die Zellen wurden mit verschiedenen Kombinationen von Substanzkonzentrationen behandelt (A – F, siehe Tabelle 4.2) und die Effekte auf Zellviabilität sowie Apoptoseinduktion nach 48 h gemessen. Kontrollzellen wurden mit 0,2% DMSO behandelt, als Positivkontrollen dienten Digitonin- bzw. Camptothecin-behandelte Zellen. RFU: relative Fluoreszenzeinheiten, RLU: relative Lumineszenzeinheiten, ET -10: Trabectedin [0,1 nM], ET -11: Trabectedin [0,01 nM]. (B) Migratorische Aktivität von myxoiden Liposarkomzellen unter der Behandlung mit Trabectedin [0,1 nM] alleine oder in Kombination mit FGFR-Inhibitoren [jeweils 0,1 µM]. Kontrollzellen wurden mit 0,2% DMSO behandelt. \*:  $p \leq 0,05$  / \*\*:  $p \leq 0,01$  / \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

## 4.2 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in Sarkomzelllinien anderer Entitäten

Bei nachgewiesener Rolle des FGFR-Signalwegs im myxoiden Liposarkom wurden auch in anderen Sarkomentitäten Untersuchungen zu FGF-Rezeptoren abgeschlossen. Dazu wurden Zelllinien verschiedener Sarkome auf die Expression sowie genetische Aberrationen von FGF-Rezeptoren überprüft. Zudem wurden die Sarkomzellen mit FGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt und der Einfluss auf die Viabilität der Zellen gemessen.

### 4.2.1 Expression von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in Sarkomzelllinien

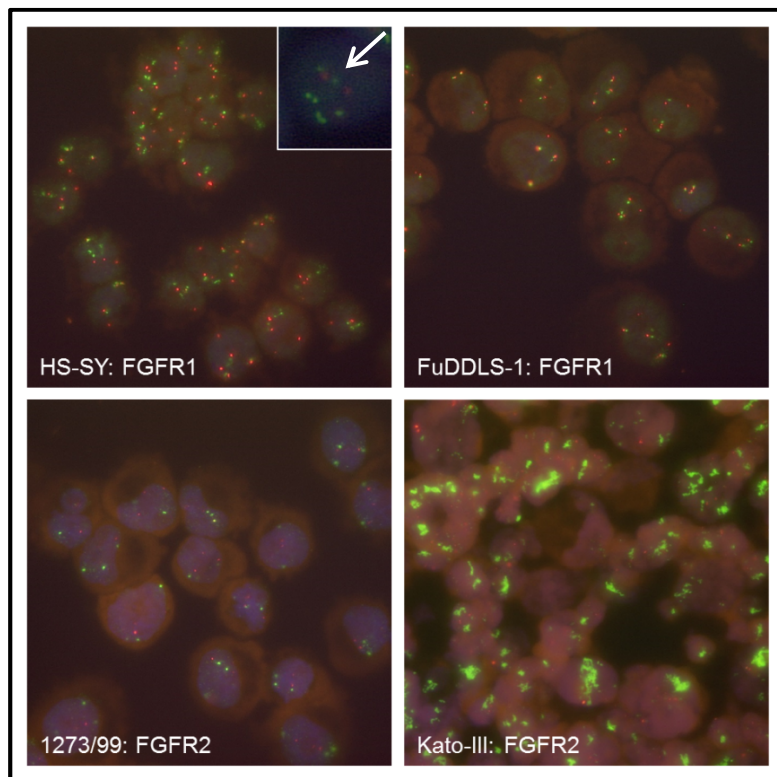
Zunächst wurde die *FGFR*-Expression mittels qPCR in verschiedenen Sarkomzelllinien gemessen. Es handelte sich um Zelllinien von dedifferenzierten und gut-differenzierten Liposarkomen, Fibrosarkomen, Synovialsarkomen sowie Ewingsarkomen. Die Expression wurde auf die beiden Referenzgene *IPO8* und *B2M* normalisiert, um die relative Expression in verschiedenen Zelllinien vergleichen zu können. Neben den Sarkomzelllinien wurden auch drei Karzinomzelllinien als Referenzzelllinien mitgeführt. HepG2 ist eine Zelllinie aus einem hepatozellulären Karzinom, für die eine Expression von *FGFR1* und *FGFR4* bekannt ist. Kato-III ist eine Magenkarzinomzelllinie mit *FGFR2*-Amplifikation und -Überexpression. Die Zelllinie RT-112 entstammt einem Blasenkarzinom und weist eine *FGFR3*-Translokation und -Überexpression auf. Abbildung 4.14 zeigt die relative FGFR-Expression in Sarkom- und Referenzzelllinien. Für einige Zelllinien konnte eine im Vergleich zu den übrigen Zelllinien gesteigerte Expression einzelner FGF-Rezeptoren detektiert werden. So wurde für *FGFR1* in den Synovialsarkomzelllinien HS-SY und 1273/99 sowie den Liposarkomzelllinien FuDDL-1, T449 und T778 eine starke Expression nachgewiesen. Die beiden Synovialsarkomzelllinien HS-SY und 1273/99 sowie die gut-differenzierte Liposarkomzelllinie T778 wiesen zudem eine hohe *FGFR2*-Expression auf. Auch *FGFR3* wurde in HS-SY und 1273/99 Zellen stark exprimiert. SK-ES-1 Ewingsarkomzellen zeigten eine leicht gesteigerte *FGFR3*-Expression. Für *FGFR4* wurde in den gut-differenzierten Liposarkomzelllinien T449 und T778 sowie der Synovialsarkomzelllinie HS-SY und der Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1 eine leicht erhöhte Expression detektiert. Die insgesamt auffälligste *FGFR*-Überexpression zeigten die beiden Synovialsarkomzelllinien HS-SY und 1273/99.



**Abbildung 4.14 Relative Expression von FGF-Rezeptoren in Sarkomzelllinien**  
 qPCR von FGFR1-4 in Zelllinien verschiedener Sarkomentitäten und Referenzzelllinien. In Zelllinien mit rot markiertem Expressionsbalken wurde der Amplifikationsstatus des entsprechenden FGF-Rezeptors mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung überprüft.

#### 4.2.2 Genstatus von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in Sarkomzelllinien

In Sarkomzelllinien, die im Vergleich zu den übrigen Zelllinien eine Überexpression von FGF-Rezeptoren zeigten, wurde der Amplifikationsstatus des entsprechenden FGF-Rezeptors überprüft. Dazu wurden Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) in den in Abbildung 4.14 rot markierten Zelllinien durchgeführt. In keiner Sarkomzelllinie wurde eine eindeutige *FGFR*-Amplifikation nachgewiesen. FuDDLS-1 und HY-SY Zellen zeigten zwar in der FISH an fixierten und in Paraffin eingebetteten Zellpellets fokale Amplifikationen bzw. Mikrocluster für *FGFR1*, dies konnte allerdings in FISH-Analysen an Zytospinpräparaten nicht bestätigt werden (siehe Abbildung 4.15 oben). Für die Synovialsarkomzelllinie 1273/99 wurden in über 45% der Zellen fünf oder mehr Genkopien von *FGFR2* detektiert. Wie der Vergleich mit der hochgradig *FGFR2*-amplifizierten Magenkarzinomzelllinie Kato-III zeigt, ist dieser Befund allerdings nur als geringfügig amplifiziert einzustufen (siehe Abbildung 4.15 unten).



**Abbildung 4.15 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung von FGF-Rezeptoren**

*FGFR1*- bzw. *FGFR2*-FISH an Zytospinpräparaten verschiedener Zelllinien. Die Zentromersonde ist jeweils orange markiert, die Zielsonde grün. Im Insert mit dem Pfeil ist eine HS-SY Zelle mit *FGFR1*-Mikroclustern dargestellt (FISH am FFPE-Schnitt).

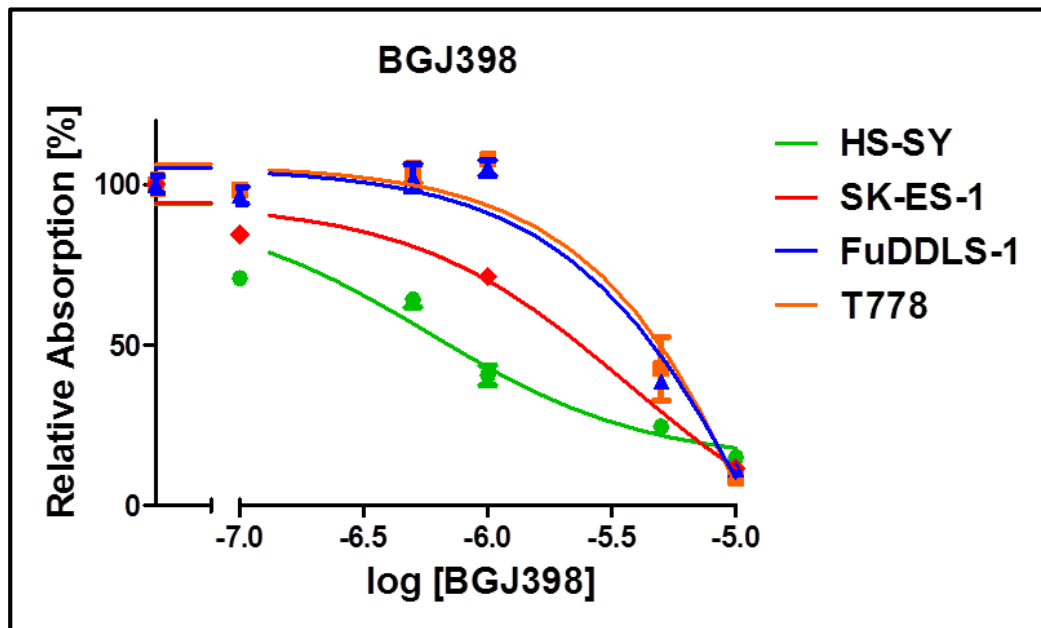
Weiterhin wurden relevante Genabschnitte der vier FGF-Rezeptorgene (siehe Abschnitt 3.1.3) durch Sangersequenzierung in allen Sarkomzelllinien untersucht. Dabei zeigte keine der Zelllinien eine Mutation, die zu einem Aminosäureaustausch in einem FGF-Rezeptor führt.

Die in dieser Studie untersuchten Sarkomzelllinien wiesen allesamt einen Wildtypstatus der vier FGF-Rezeptorgene auf. Es wurden weder Genmutationen noch genetische Amplifikationen gefunden. Bei der in Abschnitt 4.2.1 detektierten starken FGFR-Expression in einzelnen Zelllinien handelt es sich somit um Überexpressionen der Wildtyprezeptoren.

### **4.2.3 Einfluss von FGFR-Inhibition auf die Viabilität von Sarkomzelllinien**

Es wurde weiterhin der Einfluss von FGFR-Inhibition auf die Viabilität der Sarkomzelllinien untersucht, um zu überprüfen, ob die Expression von FGF-Rezeptoren in den Zelllinien mit einer funktionellen Relevanz des FGFR-Signalwegs einhergeht. Dafür wurden die Sarkomzelllinien mit den FGFR-Inhibitoren PD173074, TKI258 und BGJ398 behandelt und die Effekte im MTT-Assay detektiert. Abbildung 4.16 zeigt dazu exemplarisch das unterschiedliche Ansprechen verschiedener Sarkomzelllinien mit starker FGFR-Expression auf die Behandlung mit BGJ398. Die Synovialsarkomzelllinie 1273/99 hatte ebenfalls eine starke Expression mehrerer FGF-Rezeptoren gezeigt. Sie ist in Abbildung 4.16 nicht dargestellt, da aufgrund des fehlenden Ansprechens auf BGJ398 keine Dosis-Wirkungskurve für diese Zelllinie berechnet werden konnte.

Das jeweilige Ansprechen einer Zelllinie auf einen Inhibitor lässt sich durch den entsprechenden  $IC_{50}$ -Wert ausdrücken. In Tabelle 4.3 sind sämtliche detektierten  $IC_{50}$ -Werte zu den untersuchten Sarkomzelllinien aufgeführt. Für resistente Zelllinien, deren Daten nicht konvergieren, kann kein  $IC_{50}$ -Wert berechnet werden (k.A.: kein Ansprechen). Das beste Ansprechen zeigten insgesamt die Synovialsarkomzelllinie HS-SY sowie die Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1. Demgegenüber reagierte die Synovialsarkomzelllinie 1273/99 kaum auf die Behandlung mit FGFR-Inhibitoren. Generell war der Effekt durch PD173074 mit vielen  $IC_{50}$ -Werten von über 200  $\mu$ M deutlich schwächer ausgeprägt als der durch BGJ398 und TKI258. Für diese beiden Inhibitoren wurden jeweils mehrere  $IC_{50}$ -Werte im einstelligen mikromolaren Bereich detektiert.



**Abbildung 4.16 Einfluss von BGJ398 auf die Viabilität von Sarkomzelllinien**  
MTT-Assay in vier verschiedenen Sarkomzelllinien 48 h nach Behandlung mit BGJ398.

**Tabelle 4.3 IC<sub>50</sub>-Werte der FGFR-Inhibitoren in verschiedenen Sarkomzelllinien**

Die IC<sub>50</sub>-Werte wurden aus MTT-Assays nach 48 h Behandlung mit dem jeweiligen Inhibitor bestimmt. Farblich markiert sind die IC<sub>50</sub>-Werte von Zelllinien, für die Abbildung 4.16 den zugehörigen MTT-Assay zeigt. k.A.: kein Ansprechen.

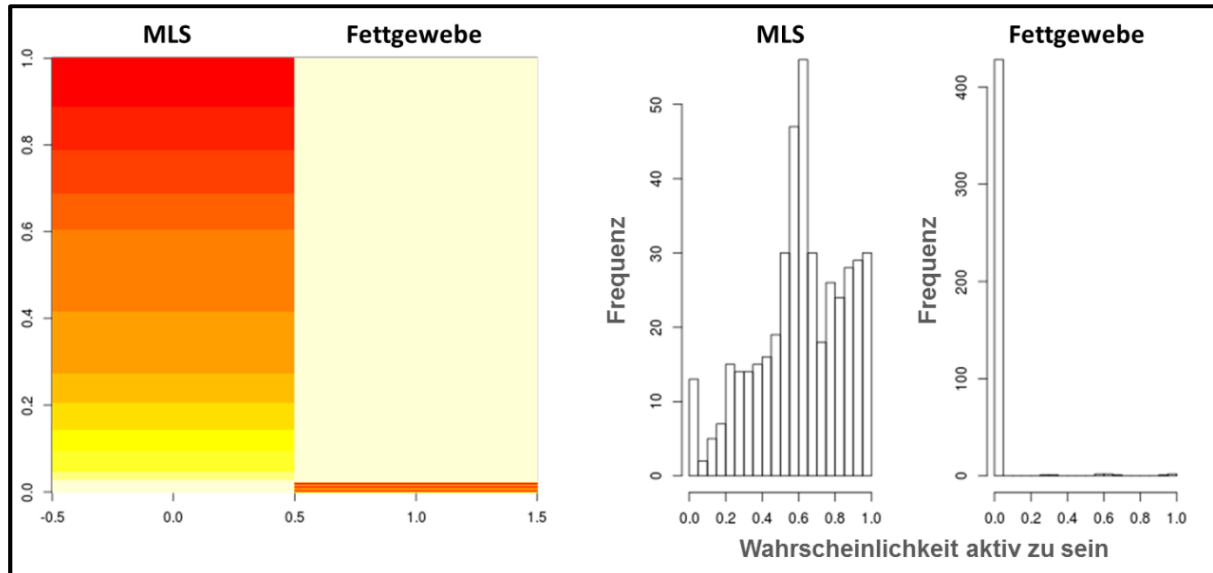
Linie	Entität	PD173074	TKI258	BGJ398
FuDDLS-1	dedifferenziertes Liposarkom	k.A.	10 µM	<b>20 µM</b>
T449	gut-differenziertes Liposarkom	700 µM	3 µM	20 µM
T778	gut-differenziertes Liposarkom	k.A.	5 µM	<b>30 µM</b>
SW872	Liposarkom / Fibrosarkom	900 µM	9 µM	20 µM
SW982	Synovialsarkom / Liposarkom	300 µM	2 µM	3 µM
HS-SY	Synovialsarkom	200 µM	0,5 µM	<b>0,6 µM</b>
1273/99	Synovialsarkom	k.A.	1.000 µM	k.A.
SK-ES-1	Ewingsarkom	3 µM	0,7 µM	<b>4 µM</b>
SK-NMC	Ewingsarkom	2.000 µM	200 µM	2.000 µM

### 4.3 Integration von Gen- und microRNA-Expression

Die Daten der whole-genome Microarrays wurden weiterhin mit denen der microRNA Microarrays integriert. Dazu wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Achim Tresch am MPI für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln das bioinformatische Modell BIRTA angewendet (Zacher et al. 2012). Dabei wurden die Genexpressionsdaten mit den korrespondierenden microRNA-Expressionsleveln kombiniert und so microRNAs mit differentieller Aktivität in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe identifiziert (siehe Abschnitt 3.5).

#### 4.3.1 microRNAs mit differentieller Aktivität und Expression

Mit Hilfe der BIRTA-Analyse konnten microRNAs mit differentieller Aktivität in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe auffindig gemacht werden (Abbildung 4.17). Dabei zeigten viele microRNAs eine hohe Wahrscheinlichkeit im Tumorgewebe aktiv zu sein, während nur sehr wenige microRNAs mit mutmaßlicher Aktivität im Fettgewebe detektiert wurden.

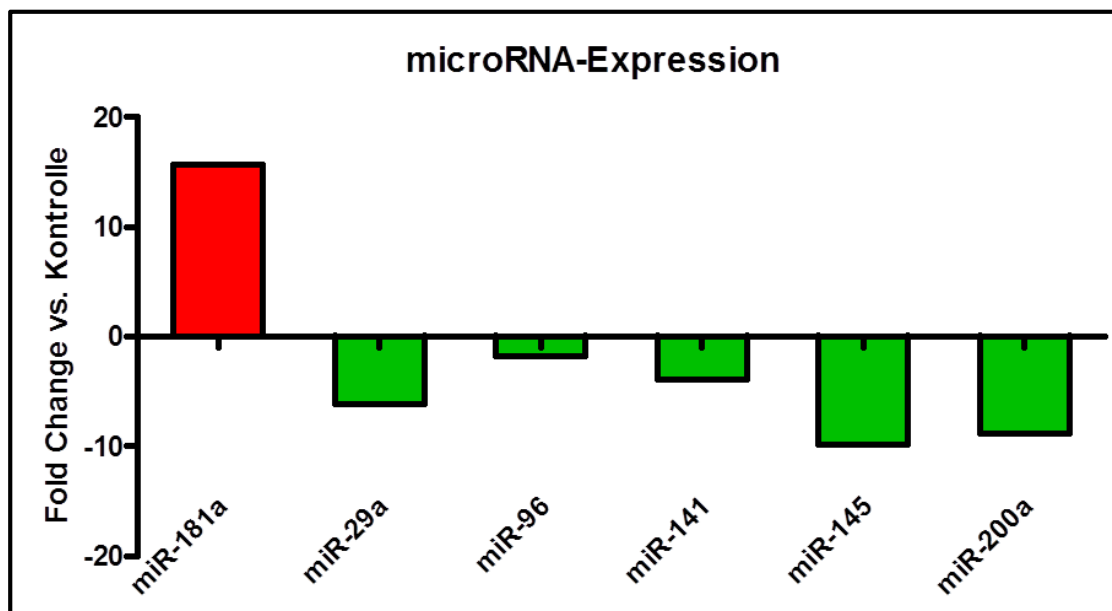


**Abbildung 4.17** Differentielle Aktivität von microRNAs

Aktivitätsschätzung von microRNAs in myxoiden Liposarkomen und Fettgewebeproben. Sowohl Heatmap (links, rot: Wahrscheinlichkeit = 1) als auch die Wahrscheinlichkeitsverteilung (rechts) zeigen die differentielle Aktivität vieler microRNAs.



Aus den microRNAs mit differentieller Aktivität in der bioinformatischen Analyse sowie differentieller Expression in den Microarrayanalysen wurden sechs microRNAs ausgewählt, für die bereits in anderen Tumorentitäten eine Rolle in der Tumorigenese beschrieben wurde. Die sechs Kandidaten-microRNAs waren miR-181a, miR-29a, miR-96, miR-141, miR-145 und miR-200a. Dabei war miR-181a im Tumorgewebe überexprimiert, während die anderen microRNAs herunterreguliert vorlagen. Für diese microRNAs wurde zunächst ihre differentielle Expression mittels qPCR validiert (Abbildung 4.18). Zur Normalisierung wurden die beiden etablierten Referenzen RNU44 und RNU48 eingesetzt. Für alle sechs microRNAs konnte die differentielle Expression bestätigt werden (Jonas 2013; Künstlinger 2010).

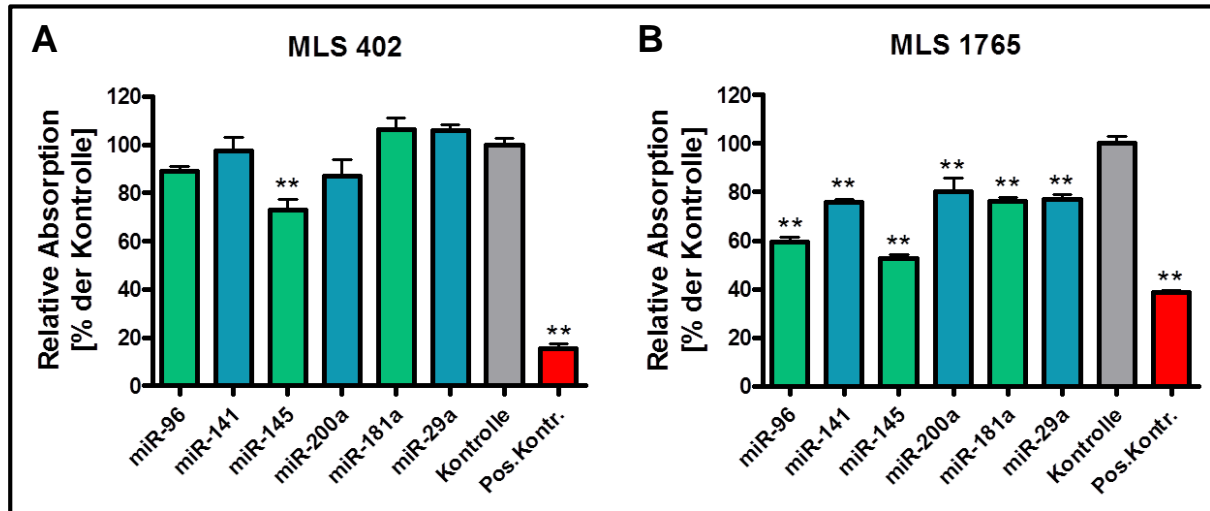


**Abbildung 4.18 Differentielle microRNA-Expression in myxoiden Liposarkomen**  
qPCR in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe als Kontrolle. Rot markiert sind microRNAs mit Überexpression im Tumorgewebe, herunterregulierte microRNAs sind grün markiert.

#### 4.3.2 Funktionelle Charakterisierung ausgewählter microRNAs

Für die sechs microRNAs mit nachgewiesener differentieller Aktivität und differentieller Expression wurden zudem funktionelle Studien angeschlossen. Dazu wurden die myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 mit entsprechenden microRNA-Imitatoren transfiziert und die Effekte durch Messung von Zellviabilität, Zytotoxizität und Apoptose analysiert. Im MTT-Assay 48 h nach der

Transfektion zeigte sich in MLS 402 Zellen eine signifikante Abnahme der Viabilität nur in miR-145 transfizierten Zellen (Abbildung 4.19 A). In MLS 1765 Zellen hingegen war die Viabilität auch nach Transfektion der anderen microRNAs signifikant verringert (Abbildung 4.19 B). Den stärksten Effekt zeigten hier miR-145 sowie miR-96.

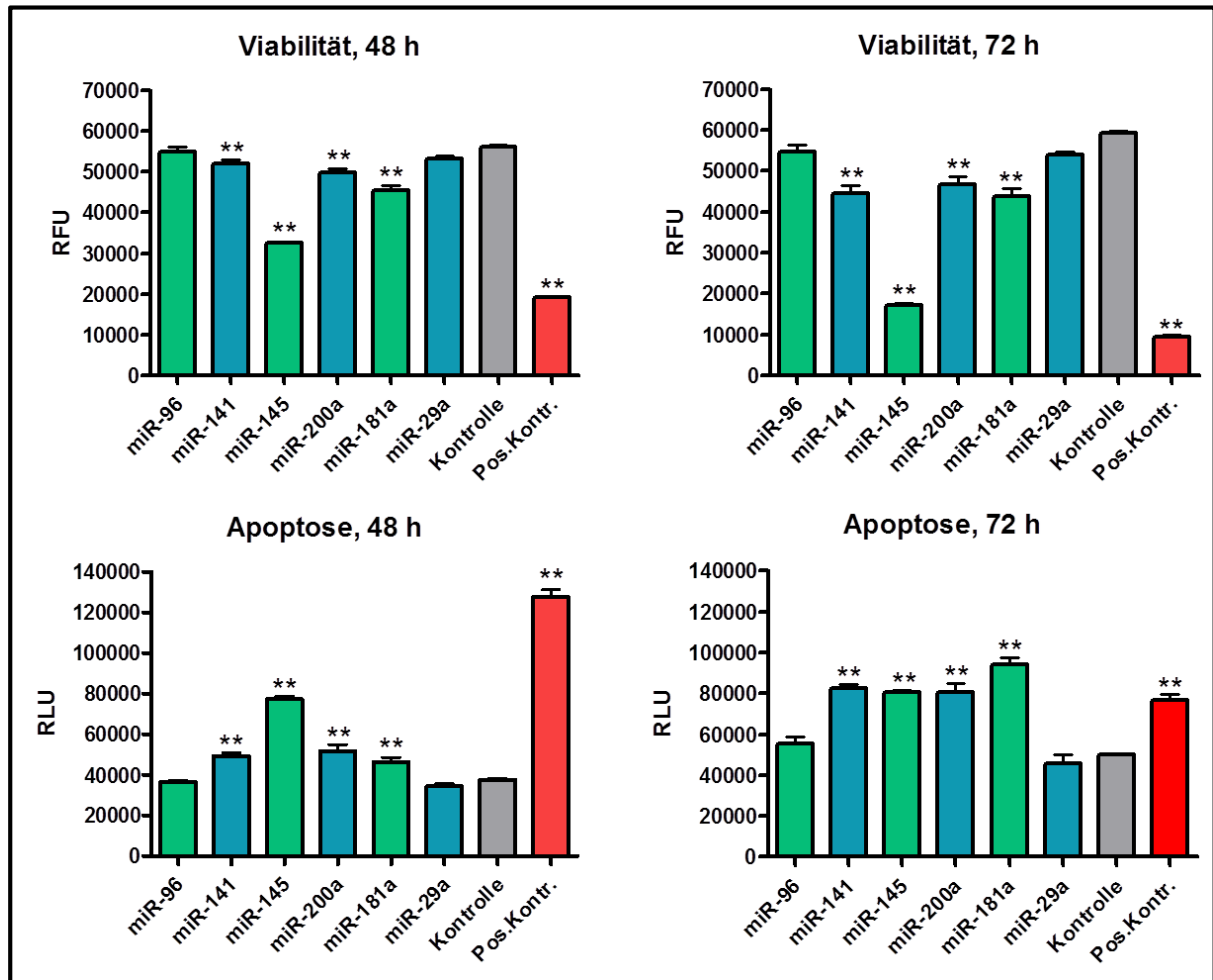


**Abbildung 4.19 Einfluss von microRNA-Imitatoren auf die Viabilität von myxoiden Liposarkomzellen**

MTT-Assay in MLS 402 (A) und MLS 1765 (B) Zellen 48 h nach Transfektion der microRNA-Imitatoren. Als Kontrolle wurden die Zellen mit AllStars Negative Kontroll-siRNA transfiziert. Als Positivkontrolle dienen CellDeath siRNA-transfizierte Zellen. \*:  $p \leq 0,05$  / \*\*:  $p \leq 0,01$  / \*\*\*:  $p \leq 0,001$ .

Die weitere Differenzierung der Effekte im ApoTox-Glo™ Assay machte deutlich, dass in beiden Zelllinien keine der microRNAs zytotoxisch wirkte. Vielmehr induzierten die microRNAs spezifisch Apoptose.

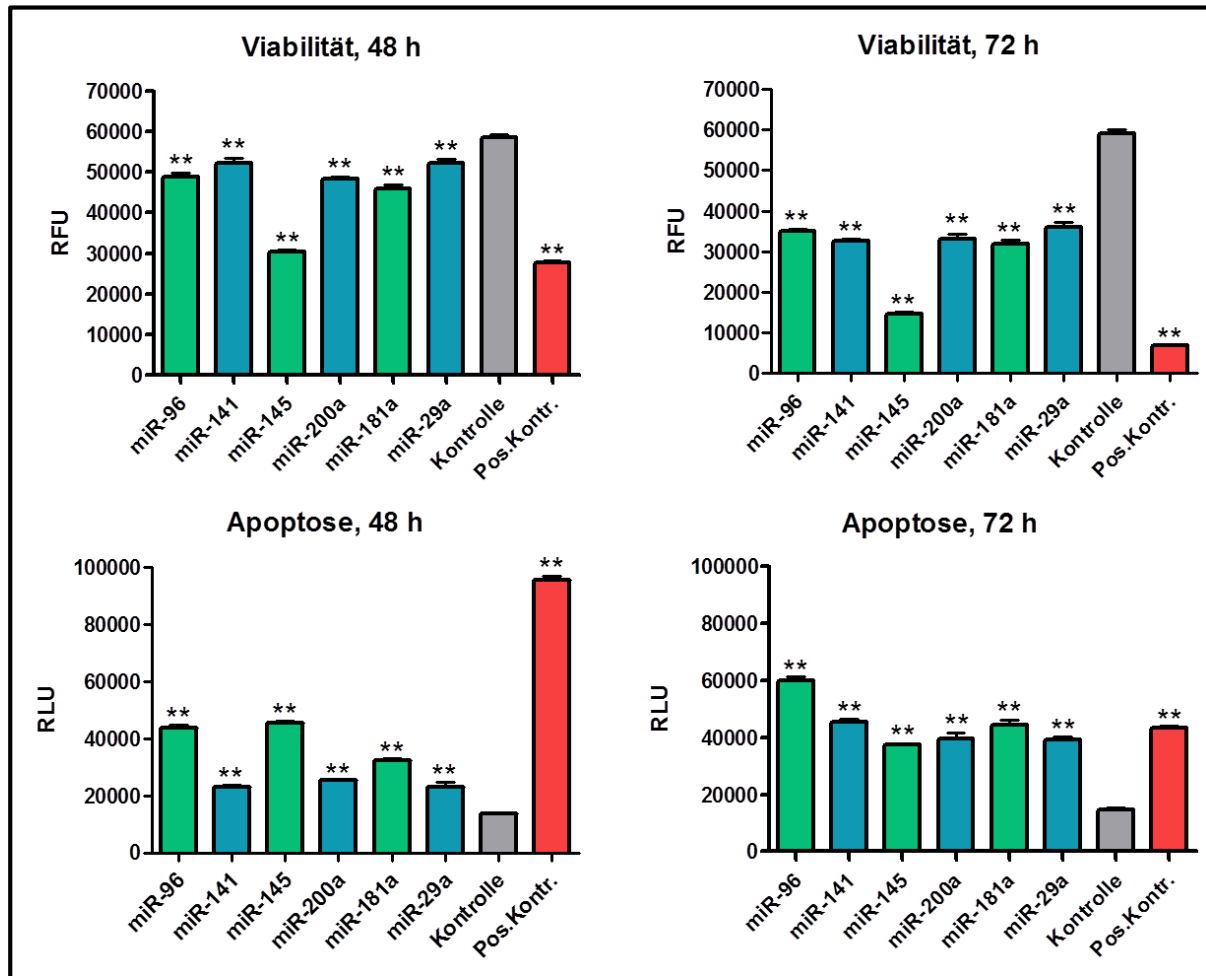
In MLS 402 Zellen bestätigte die Analyse der Viabilität die Ergebnisse des MTT-Assays (Abbildung 4.20). Den stärksten Effekt zeigte miR-145, wobei v.a. nach 72 h deutlich wurde, dass auch miR-141, miR-200a und miR-181a die Viabilität von MLS 402 Zellen signifikant verringerten. Die Transfektion von miR-145 induzierte bereits nach 48 h stark Apoptose, während dieser Effekt in mit miR-141, miR-200a oder miR-181a transfizierten Zellen erst nach 72 h voll ausgeprägt war. Bei Transfektion von miR-96 oder miR-29a wurde kein Effekt auf MLS 402 Zellen festgestellt.



**Abbildung 4.20 Funktionelle Effekte von microRNA-Imitatoren auf MLS 402 Zellen**

ApoTox-Glo™ Assay 48 h bzw. 72 h nach Transfektion der microRNA-Imitatoren. Als Kontrolle wurden die Zellen mit AllStars Negative Kontroll-siRNA transfiziert. Als Positivkontrolle dienten CellDeath siRNA-transfizierte Zellen. \*:  $p \leq 0,05$  / \*\*:  $p \leq 0,01$  / \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . RFU: relative Fluoreszenzeinheiten, RLU: relative Lumineszenzeinheiten.

Auch in MLS 1765 Zellen bestätigten sich im ApoTox-Glo™ Assay die Ergebnisse des MTT-Assays (Abbildung 4.21). Den stärksten Effekt auf die Viabilität zeigte hier erneut miR-145, wobei in dieser Zelllinie auch alle anderen microRNAs die Viabilität signifikant verringerten. Der Effekt war bei allen microRNAs nach 72 h deutlicher ausgeprägt als nach 48 h. Die Transfektion von miR-145 und miR-96 induzierte nach 48 h in MLS 1765 Zellen am stärksten Apoptose, aber auch die mit den übrigen microRNAs transfizierten Zellen wiesen zu diesem Zeitpunkt bereits eine signifikante Apoptoseinduktion auf. Nach 72 h zeigten in MLS 1765 Zellen alle sechs microRNAs eine deutliche Induktion von Apoptose. In dieser Zelllinie war der Effekt bei mit miR-96 transfizierten Zellen am stärksten ausgeprägt.



**Abbildung 4.21 Funktionelle Effekte von microRNA-Imitatoren auf MLS 1765 Zellen**

ApoTox-Glo™ Assay 48 h bzw. 72 h nach Transfektion der microRNA-Imitatoren. Als Kontrolle wurden die Zellen mit AllStars Negative Kontroll-siRNA transfiziert. Als Positivkontrolle dienten CellDeath siRNA-transfizierte Zellen. \*:  $p \leq 0,05$  / \*\*:  $p \leq 0,01$  / \*\*\*:  $p \leq 0,001$ . RFU: relative Fluoreszenzeinheiten, RLU: relative Lumineszenzeinheiten.

## 5 Diskussion

Myxoide Liposarkome gehören zu den häufigsten Weichgewebssarkomen (Dalal et al. 2008). Ihre Molekularpathologie ist allerdings bislang nur unvollständig verstanden und es stehen keine Therapien, die gegen spezifische Zielmoleküle gerichtet sind, zur Verfügung. Da die Tumoren aber häufig rezidivieren und sich bei einem Drittel der Patienten Fernmetastasen bilden (Antonescu und Ladanyi 2002), ist die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien dringend erforderlich. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* Studien zur FGFR-Inhibition sowie zur funktionellen Rolle von microRNAs in myxoiden Liposarkomen durchgeführt. Des Weiteren ist das Konzept der FGFR-Inhibition auch auf Zelllinien anderer Sarkomentitäten übertragen worden.

### 5.1 Die Rolle von Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren im myxoiden Liposarkom

Die Therapieoptionen beim myxoiden Liposarkom beschränken sich derzeit neben der anzustrebenden kompletten Resektion des Tumors auf unspezifische Chemotherapien. Es ist daher essentiell, neue zielgerichtete therapeutische Konzepte zu entwickeln. Myxoide Liposarkome zeigen im Gegensatz zu vielen Karzinomen kaum Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen, die als Grundlage für neue therapeutische Konzepte dienen können. Sie sind charakterisiert durch spezifische Translokationen des *DDIT3*-Gens, die zur Bildung von aberranten Transkriptionsfaktoren führen. Die Grundlage der Entstehung dieser Tumoren liegt daher mutmaßlich in einer veränderten Genexpression. Im vorliegenden Projekt wurde deshalb die Identifikation von differentiell exprimierten Genen als Ansatz gewählt, um geeignete therapeutische Zielstrukturen zu finden. Durch diese Vorgehensweise konnten auch in anderen Sarkomentitäten bereits neue therapeutische Konzepte entwickelt werden. So identifizierten Edris et al. auf der Grundlage von Genexpressionsstudien in Leiomyosarkomen Proteasominhibitoren als mögliche Behandlungsstrategie für diese Tumoren (Edris et al. 2012). In einer Genexpressionsstudie in verschiedenen Liposarkomen zeigte sich eine Aktivierung von Signalwegen zur Zellzykluskontrolle in dedifferenzierten/gut-differenzierten Liposarkomen (Singer et al. 2007). Die Autoren identifizierten MDM2 als vielversprechendes therapeutisches Zielmolekül und stellten in *in vitro* Versuchen den möglichen Einsatz des MDM2-Inhibitors Nutlin-3a in diesen Tumoren dar.

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurden whole-genome Microarrayanalysen durchgeführt und u.a. eine Überexpression von *FGFR2* in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe festgestellt (Künstlinger 2010). Neben der Überexpression von *FGFR2* wurde auch eine Überexpression von *FGFR4* sowie der Liganden *FGF5*, *FGF11* und *FGF18* detektiert. Die parallele Expression mehrerer Mitglieder der FGF/FGFR-Familie unterstreicht die Rolle dieses Signalwegs im myxoiden Liposarkom. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Expressionsstudie in verschiedenen Sarkomen, die eine im Vergleich zu anderen Sarkomentitäten gesteigerte Genexpression von *FGFR2*, *FGFR4* und *FGF18* in Liposarkomen darstellte (Baird et al. 2005). Weiterhin ist der FGFR-Signalweg essentiell für die Adipozytendifferenzierung (Patel et al. 2005). Patel et al. zeigten, dass FGF2 autokrin über FGFR1 die Differenzierung von Preadipozyten positiv reguliert. Die Autoren vermuten neben dieser FGF2/FGFR1-Achse auch eine Rolle weiterer FGFs und FGF-Rezeptoren in der Fettzellentwicklung. Dies stellt einen möglichen Zusammenhang mit der Pathogenese von Liposarkomen, die durch eine unvollständige Adipogenese charakterisiert ist, dar.

Eine konstitutive Aktivierung des FGFR-Signalwegs wird häufig durch Mutationen in den Rezeptorgenen oder Genamplifikationen hervorgerufen. Blasenkarzinome und Zervixkarzinome zeigen beispielsweise aktivierende *FGFR3*-Mutationen (Cappellen et al. 1999). In bis zu 10% der Magenkarzinome finden sich Amplifikationen des *FGFR2*-Gens (Kunii et al. 2008). Neben diesen genetischen Aberrationen kann aber auch eine Überexpression des Rezeptors zur Aktivierung des Signalwegs führen (Wesche et al. 2011). Die vermehrt exprimierten FGF-Rezeptoren werden dabei entweder parakrin oder autokrin durch FGFs aktiviert oder es kann aufgrund der hohen FGFR-Dichte zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung kommen (Turner und Grose 2010). Daher wurde in dieser Arbeit zunächst die *FGFR2*-Überexpression in myxoiden Liposarkomen validiert. Expressionsanalysen mittels qPCR und Immunhistochemie bestätigten die in den Microarrayanalysen detektierte Überexpression.

In den beiden untersuchten myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 wurde die Expression aller vier FGF-Rezeptorproteine nachgewiesen sowie gezeigt, dass weder Genmutationen noch -amplifikationen vorlagen. Um die funktionelle Rolle der FGF-Rezeptoren zu überprüfen, wurden sie zunächst mit FGFR-spezifischen

siRNA-Molekülen transfiziert. Der so erreichte Knock-down führte zu einer signifikanten Induktion von Apoptose, wobei die beiden Zelllinien unterschiedlich reagierten. Während für das Überleben von MLS 402 Zellen FGFR2 essentiell war, zeigten MLS 1765 Zellen eine Abhängigkeit von FGFR1 und FGFR3. In myxoiden Liposarkomen scheint es demnach keinen einzelnen FGF-Rezeptor zu geben, der die Tumorigenese treibt. Da die verschiedenen FGF-Rezeptoren die gleichen intrazellulären Signalwege aktivieren, können in einer Entität die gleichen Effekte durch unterschiedliche Rezeptoren hervorgerufen werden. So wurde z.B. im Blasenkarzinom neben den bekannten *FGFR3*-Mutationen auch eine Überexpression von *FGFR1* nachgewiesen, die mit einer Steigerung der Zellproliferation und einer Abnahme von Apoptose einhergeht (Tomlinson et al. 2009). Ähnlich wie bei den hier untersuchten myxoiden Liposarkomzelllinien waren verschiedene Blasenkarzinomzelllinien dabei unterschiedlich stark abhängig von der *FGFR1*-Expression. In den myxoiden Liposarkomzellen konnte eine funktionelle Rolle der FGFR-Signalübertragung *in vitro* nachgewiesen werden. Die Zelllinien waren daher als Modellsystem geeignet für die Untersuchung der Effekte von FGFR-Inhibition auf myxoide Liposarkome mit Expression von FGFR-Wildtyprezeptoren.

Wie andere Rezeptortyrosinkinasen sind FGF-Rezeptoren vielversprechende therapeutische Zielstrukturen. Sie sind an der Pathogenese vieler Tumoren beteiligt und können effektiv mit spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren gehemmt werden (Byron et al. 2010; Gavine et al. 2012; Guagnano et al. 2011; Kunii et al. 2008; Pardo et al. 2009; Weiss et al. 2010). Daher wurden in weiteren funktionellen Studien in den myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 spezifische FGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren eingesetzt. Dabei wurden neben der *in vitro* Substanz PD173074 auch die klinisch einsetzbaren Inhibitoren BGJ398 und TKI258 verwendet. Die Inhibitoren führten zu einer Reduktion der Zellviabilität, induzierten Apoptose und verlangsamten die Migration der myxoiden Liposarkomzelllinien. Die funktionelle Bedeutung des FGFR-Signalwegs in dieser Tumorentität konnte also weiter bestätigt werden. Der Einfluss auf das Zellüberleben und die Migration war dabei stärker als der auf die Proliferation. So lösten zum Teil Inhibitorkonzentrationen von 1  $\mu$ M bereits deutlich Apoptose aus, während die Proliferation der Zellen bei dieser Konzentration kaum beeinflusst wurde. Im Vergleich zu anderen Zelllinien waren die Inhibitorkonzentrationen, die benötigt wurden, um eine signifikante Reduktion der Zellviabilität zu erreichen, relativ hoch. In einer großen Studie zum Ansprechen von

Zelllinien verschiedener Tumorentitäten auf BGJ398 wurde beispielsweise der Grenzwert für die Sensitivität bei einem  $IC_{50}$ -Wert von  $\leq 500$  nM gesetzt (Guagnano et al. 2012). MLS 402 und MLS 1765 gehören nach den Effekten auf ihre Proliferation demnach nicht zu den BGJ398-sensitiven Zelllinien. Die Einzelsubstanzaktivität der FGFR-Inhibitoren in Bezug auf die Viabilität der myxoiden Liposarkomzellen ist begrenzt und rechtfertigt noch keinen *in vivo* Einsatz.

Signifikante Effekte auf die Migration der myxoiden Liposarkomzelllinien wurden hingegen bereits bei Inhibitorkonzentrationen von unter 100 nM detektiert. Die FGFR-spezifischen Inhibitoren PD173074 und BGJ398 zeigten dabei stärkere Effekte auf die zelluläre Migration als der Multityrosinkinaseinhibitor TKI258. Dies unterstreicht neben den für die Migrationshemmung benötigten geringen Inhibitorkonzentrationen zusätzlich, dass die FGFR-Signalübertragung besonders für die Migration von myxoiden Liposarkomzellen entscheidend ist. In anderen Studien zu FGFR-Inhibitoren in Sarkomzellen wurden hauptsächlich die Effekte auf die Proliferation und das Überleben der Zellen betrachtet (Ishibe et al. 2005; Zhang et al. 2013). Taylor et al. konnten aber in Rhabdomyosarkomen zeigen, dass der durch Mutationen in der Tyrosinkinasedomäne aktivierte FGFR4 die Metastasierung der Tumoren verstärkt (Taylor et al. 2009). Die FGFR-Signalübertragung kann zur Steigerung der zellulären Migration beitragen, indem der Src-Signalweg aktiviert wird (LaVallee et al. 1998). Möglicherweise wird also der starke Effekt von FGFR-Inhibitoren auf die Migration von myxoiden Liposarkomzellen über die Hemmung des FGFR-vermittelten Src-Signalwegs hervorgerufen.

Die hier verwendeten FGFR-Inhibitoren BGJ398 und TKI258 werden bereits erfolgreich angewendet in klinischen Studien anderer Tumorentitäten, wie Blasenkarzinomen mit *FGFR3*-Mutationen oder *FGFR1*-amplifizierten Plattenepithelkarzinomen der Lunge (z.B. NCT01004224 oder NCT01831726). Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun die Überexpression von FGF-Rezeptoren in myxoiden Liposarkomen sowie der effektive Einsatz von FGFR-Inhibition *in vitro* demonstriert. Dies deutet auf einen möglichen neuen zielgerichteten Ansatz für die Therapie dieser Tumoren hin. Signifikante Effekte auf die Viabilität der Zellen wurden dabei aber erst ab Inhibitorkonzentrationen von  $> 1$   $\mu$ M detektiert. Daher wurden die Inhibitoren zur Steigerung der Effekte in Kombination mit der chemotherapeutischen Substanz Trabectedin angewendet. Dabei wurde deutlich, dass MLS 402 Zellen deutlich



sensitiver gegenüber Trabectedin sind als MLS 1765 Zellen, die nur unter serumreduzierten Bedingungen auf die Behandlung reagierten. Dieser Unterschied kann auf das Vorliegen von verschiedenen *FUS/DDIT3*-Fusionstypen in den beiden Zelllinien zurückzuführen sein. MLS 402 Zellen tragen die Variante I, während in MLS 1765 Zellen die seltene Variante VIII vorliegt (Künstlinger 2010). Sensitiv für Trabectedin sind besonders die Translokationstypen I und II. Verantwortlich dafür scheint eine längere Blockade der transaktivierenden Funktion dieser Fusionsproteine zu sein (Di Giandomenico et al. 2014). In beiden myxoiden Liposarkomzelllinien konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von FGFR-Inhibitoren die Effekte von Trabectedin alleine verstärkt. Dies gilt sowohl für die Reduktion der Viabilität, die Induktion von Apoptose als auch für die Verlangsamung der Migration. Ein positiver Effekt von FGFR-Inhibition auf das Ansprechen von Tumorzellen gegenüber einer Chemotherapie wurde bereits im Ovarialkarzinom gezeigt (Cole et al. 2010). Hier steigerte die gleichzeitige Ausschaltung von FGFR2 die Sensitivität der Zellen für eine Therapie mit Cisplatin. Ein Zusammenhang des FGFR-Signalwegs mit dem Ansprechen auf weitere Therapien wurde auch in anderen Tumorentitäten gezeigt. In Osteosarkomen ist die *FGFR1*-Amplifikation assoziiert mit einem schlechten Ansprechen gegenüber neoadjuvanter Chemotherapie (Fernanda Amary et al. 2014). Ebenso führt eine *FGFR1*-Amplifikation und -Überexpression in Mammakarzinomzellen zu einer Resistenz gegenüber der Hormontherapie mit Tamoxifen (Turner et al. 2010).

Zur Untersuchung der Wirksamkeit von FGFR-Inhibitoren, v.a. in Kombination mit einer Chemotherapie, sind weiterführende *in vivo* Studien erforderlich. Die Kombination mit Trabectedin stellt dabei in myxoiden Liposarkomen einen vielversprechenden Ansatz dar. Trabectedin ist in Europa für die Behandlung von Ovarialkarzinomen und Weichgewebssarkomen zugelassen und zeigt besonders in myxoiden Liposarkomen gute Effekte (Carter und Keam 2007). Die Wirksamkeit ist assoziiert mit einer Rückbildung des Kapillarnetzes und demzufolge u.a. zurückzuführen auf eine antiangiogenetische Wirkung von Trabectedin. Diese wird vermutlich durch verschiedene Mechanismen vermittelt, z.B. durch die Hochregulation von Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren in Endothelzellen sowie die Hochregulation von Thrombospondin-1 in den Tumorzellen selbst (Dossi et al. 2015). In der Kombinationsbehandlung mit Trabectedin wird daher auch die Rolle des FGFR-Signalwegs in der Neoangiogenese relevant sein. Verschiedene FGFs haben

eine angiogenesefördernde Wirkung, darunter neben FGF2 auch FGF5 und FGF18 (Allerstorfer et al. 2008; Antoine et al. 2005; Kilvaer et al. 2011), deren Überexpression in myxoiden Liposarkomen in dieser Arbeit gezeigt wurde. Vor dem Hintergrund, dass myxoide Liposarkome durch ein typisches Kapillarnetz charakterisiert sind, könnte gerade die Kombination von Trabectedin mit einem Inhibitor, der auch angiogene Signalwege hemmt, in dieser Tumorentität wirksam sein. Da in dieser Arbeit insbesondere die Bedeutung des FGFR-Signalwegs auf die Migration von myxoiden Liposarkomzellen deutlich wurde, sollte im *in vivo* Modell zusätzlich zur Angiogenese auch der Einfluss von FGFR-Inhibition auf die Invasivität und Metastasierung von myxoiden Liposarkomen untersucht werden.

## **5.2 Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptoren in Sarkomzelllinien anderer Entitäten**

Sarkome stellen eine heterogene Gruppe seltener maligner Weichgewebstumoren dar. Sie sind häufig mit spezifischen chromosomalen Aberrationen, wie z.B. bestimmten Translokationen, assoziiert. Im Laufe der letzten Jahre wurden Sarkome zunehmend charakterisiert und werden inzwischen in molekular distinkte Subgruppen unterteilt (Bovee und Hogendoorn 2010). Obwohl bei vielen Tumoren die zugrunde liegenden genetischen Veränderungen bekannt sind und sie somit prädestiniert für zielgerichtete Therapien sind, gibt es für Sarkome bislang erst wenige Ansätze mit definierten molekularen Zielstrukturen.

Die meisten spezifischen Therapieansätze beschäftigen sich mit verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen. So wird beispielsweise die Wirkung des Tyrosinkinaseinhibitors Imatinib beim *Dermatofibrosarcoma protuberans* berichtet, welches eine Fusion der Gene *COL1A1* und *PDGFB* aufweist (Rutkowski et al. 2010). In Klarzellsarkomen kommt es zu einer Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase MET, so dass hier möglicherweise MET-Inhibitoren eingesetzt werden können (Davis et al. 2010). Inflammatorische myofibroblastische Tumoren zeigen in 50% der Fälle chromosomale Translokationen mit dem *ALK*-Gen und es konnten vielversprechende Ergebnisse durch die Behandlung einzelner positiver Tumoren mit dem ALK-Inhibitor Crizotinib erzielt werden (Butrynski et al. 2010). Eine weitere Rezeptortyrosinkinase, deren Signalweg in der Pathogenese vieler Weichgewebssarkome eine Rolle zu spielen scheint, ist der *insulin-like growth factor 1 receptor* (IGF1R). Er ist beispielsweise in Ewingsarkomen sowie in Synovialsarkomen aktiviert (Friedrichs et al. 2008;

Toretsky et al. 1997). In klinischen Studien zur therapeutischen Nutzbarkeit inhibierender monoklonaler Antikörper wie Figitumumab oder Cixutumumab zeigte sich aber nur in einer kleinen Subgruppe von Tumoren eine Aktivität der Einzelsubstanzen (Olmos et al. 2010). Die Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen findet auch im Rahmen der Angiogenesehemmung Anwendung. Beispielsweise konnte der Multikinase-Angiogeneseinhibitor Pazopanib das progressionsfreie Überleben von Patienten mit Synovial- und Leiomyosarkomen verlängern, bei adipozytischen Sarkomen blieb diese Wirkung hingegen aus (Sleijfer et al. 2009).

Da es in der Sarkomtherapie bislang nur wenige zielgerichtete Ansätze gibt, ist die Identifikation neuer molekularer Zielstrukturen essentiell. FGF-Rezeptoren könnten solche Zielstrukturen sein, da in verschiedenen Weichgewebssarkomen bereits eine Funktion von FGF-Rezeptoren beschrieben wurde. In Synovialsarkomzelllinien ist der FGFR-Signalweg durch die Expression verschiedener FGFs und FGF-Rezeptoren aktiviert und stimuliert das Wachstum der Zellen (Ishibe et al. 2005). Die Inhibition der FGFR-Signalübertragung führt zu einem Zellzyklusarrest und hemmt die Proliferation *in vitro* und *in vivo*. In Ewingsarkomzellen ist der FGFR-Signalweg essentiell für den Erhalt der Malignität, indem er die Expression des EWSR1/FLI1-Fusionsproteins aufrechterhält (Girnit et al. 2000). Kürzlich stellte eine Studie in humanen und Hunde-Sarkomen eine Ko-Expression mehrerer FGF-Rezeptoren fest und demonstrierte wachstumshemmende Effekte durch FGFR-Inhibition *in vitro* (Schweiger et al. 2014). Weiterhin wurden in Osteosarkomen *FGFR1*-Amplifikationen detektiert, die mit einem schlechten Ansprechen auf Chemotherapie korreliert sind (Fernanda Amary et al. 2014). Aktivierende Mutationen von *FGFR4* wurden in Rhabdomyosarkomen nachgewiesen (Taylor et al. 2009). Die Tumoren weisen eine Überexpression von *FGFR4* auf, die mit fortgeschrittenen Tumorstadien und einem schlechten Patientenüberleben assoziiert ist. Die *FGFR4*-Mutationen fördern das Wachstum von Rhabdomyosarkomzellen *in vitro* und *in vivo* und führen zu einer Sensitivität der Zellen gegenüber FGFR-Inhibitoren. In gut-differenzierten und dedifferenzierten Liposarkomen ist der FGFR-Signalweg häufig durch eine Amplifikation von *FRS2* aktiviert (Zhang et al. 2013).

Aufgrund der potentiellen Rolle des FGFR-Signalwegs in verschiedenen Weichgewebssarkomen wurden zusätzlich zu den Versuchen in den beiden myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 auch in Sarkomzelllinien anderer

Entitäten Untersuchungen zur Charakterisierung von FGF-Rezeptoren durchgeführt. Die Sarkomzelllinien wurden zunächst auf die Expression von FGF-Rezeptoren untersucht. Dabei zeigten verschiedene Zelllinien eine im Vergleich zu den übrigen Sarkomzelllinien erhöhte Expression einzelner FGF-Rezeptoren. Die stärkste Überexpression wurde in den Synovialsarkomzelllinien HS-SY und 1273/99 für *FGFR1* und *FGFR3* detektiert. 1273/99 Zellen zeigten zudem eine vergleichsweise starke *FGFR2*-Expression. Eine hohe *FGFR1*-Expression wurde auch in den Liposarkomzelllinien FuDDLS-1, T449 und T778 gemessen. Wie die entsprechenden FISH-Analysen zeigten, waren diese Überexpressionen nicht auf *FGFR*-Amplifikationen zurückzuführen. Insgesamt wurde in keiner der untersuchten Zelllinien eine Mutation oder Amplifikation von FGF-Rezeptorgenen nachgewiesen. Dabei wurden auch nur Zelllinien solcher Entitäten untersucht, in denen bislang keine Mutationen oder Amplifikationen von *FGFR*-Genen beschrieben wurden. In anderen Zelllinien aus Entitäten mit bekannten genetischen Aberrationen von FGF-Rezeptoren, wie Osteosarkomen oder Rhabdomyosarkomen, wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Untersuchungen durchgeführt (Fernanda Amary et al. 2014; Taylor et al. 2009).

Aufgrund der detektierten Unterschiede in der *FGFR*-Expression scheint der *FGFR*-Signalweg in den verschiedenen Sarkomentitäten von unterschiedlicher Bedeutung zu sein. Eine mögliche funktionelle Relevanz des *FGFR*-Signalwegs wurde daher in den Sarkomzelllinien mittels MTT-Assay nach Behandlung mit den *FGFR*-Inhibitoren PD173074, BGJ398 und TKI258 analysiert. Dabei zeigten die untersuchten Zelllinien eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber den *FGFR*-Inhibitoren. Das beste Ansprechen zeigten die Synovialsarkomzelllinie HS-SY sowie die Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1. In einer anderen Ewingsarkomzelllinie (RD-ES) hängt die Expression des onkogenen Fusionsproteins *EWSR1/FLI1* von der Aktivität des *FGFR*-Signalwegs ab (Girnit et al. 2000). Die hier detektierte wachstumshemmende Wirkung von *FGFR*-Inhibitoren in den ebenfalls *EWSR1/FLI1*-translozierten SK-ES-1 Zellen könnte daher auf diese Funktion des *FGFR*-Signalwegs zurückzuführen sein. Die andere untersuchte Ewingsarkomzelllinie SK-NMC trägt auch eine *EWSR1/FLI1*-Translokation, zeigte aber keine Sensitivität für *FGFR*-Inhibition. Der beschriebene Zusammenhang gilt daher offenbar nicht für alle *EWSR1/FLI1*-translozierten Ewingsarkomzellen.

Auch für die zweite Entität mit zum Teil gutem Ansprechen auf FGFR-Inhibition, das Synovialsarkom, zeigte sich in den hier durchgeführten Analysen ein sehr divergentes Bild. Während in HS-SY Zellen ein deutlicher wachstumshemmender Einfluss festgestellt wurde, waren 1273/99 Zellen kaum sensitiv gegenüber den FGFR-Inhibitoren. Beide Zelllinien wiesen aber eine erhöhte FGFR-Expression, v.a. von *FGFR1* und *FGFR3*, auf. Diese FGFR-Expression in Synovialsarkomzelllinien wurde auch durch Ishibe et al. beschrieben. In dieser Studie zeigten aber sowohl HS-SY als auch 1273/99 Zellen ein Ansprechen auf FGFR-Inhibition (Ishibe et al. 2005). Dabei wurden mit SU5402 und PD166866 zwar andere, aber ebenso spezifische FGFR-Inhibitoren verwendet. Die Daten lassen demnach keine generelle Aussage zur Rolle des FGFR-Signalwegs in Synovialsarkomen zu.

Die dritte Entität, für die Literaturdaten zur Funktion des FGFR-Signalwegs vorliegen, bilden gut-differenzierte und dedifferenzierte Liposarkome. Hier liegt der FGFR-Adapter *FRS2* häufig amplifiziert vor (Zhang et al. 2013). Zudem zeigten Zhang et al. für die dedifferenzierte Liposarkomzelllinie FuDDLS-1 ein gutes Ansprechen auf FGFR-Inhibition, während SW872 Zellen kaum sensitiv reagierten. In beiden Zelllinien detektierten die Autoren eine starke *FGFR1*-Expression. Eine solche Überexpression von *FGFR1* wurde auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt. Die hier gewonnenen funktionellen Daten zur Auswirkung von FGFR-Inhibitoren auf die Zellviabilität weichen allerdings von den bei Zhang et al. beschriebenen Effekten ab. So zeigten FuDDLS-1 und SW872 Zellen ein vergleichbares mittleres Ansprechen auf TKI258 und BGJ398 und waren beide kaum sensitiv gegenüber PD173074. Die spezifische Abhängigkeit vom FGFR-Signalweg in FuDDLS-1 Zellen konnte also im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Insgesamt zeigten in der vorliegenden Untersuchung zwar einzelne Sarkomzelllinien eine Sensitivität gegenüber den verwendeten FGFR-Inhibitoren, es konnte aber keine Entität mit einem generell guten Ansprechen identifiziert werden. PD173074 war dabei im Allgemeinen deutlich weniger effektiv als TKI258 und BGJ398, so dass für weiterführende Studien v.a. die beiden letzteren Inhibitoren herangezogen werden sollten. Das sehr unterschiedliche Ansprechen von Zelllinien der gleichen Sarkomentitäten auch auf diese beiden Inhibitoren macht deutlich, dass in diesem Zusammenhang die Identifizierung von geeigneten prädiktiven Biomarkern essentiell ist. Zunehmend wird hier allerdings klar, dass eine wirklich personalisierte

Behandlung von Krebspatienten nicht allein auf der Basis von histologischer Charakterisierung und einzelnen genetischen Biomarkeranalysen erfolgen kann. Ein innovatives Verfahren ist beispielsweise die Kultivierung von Tumorzellen, um so *in vitro* die passende Therapie für den jeweiligen Patienten zu finden (Crystal et al. 2014). Ein solcher Ansatz könnte die individuelle Identifikation von den Sarkompatienten ermöglichen, die von einer FGFR-inhibitorbasierten Therapie profitieren würden.

### 5.3 Integration von Gen- und microRNA-Expression

Die vorab gewonnenen Daten der whole-genome und microRNA Microarrayanalysen (Künstlinger 2010) wurden im Rahmen dieser Arbeit integriert und gemeinsam ausgewertet. Dazu wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Achim Tresch am MPI für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln das bioinformatische Modell BIRTA angewendet (Zacher et al. 2012). So wurden microRNAs mit differentieller Aktivität in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe identifiziert.

Aus den microRNAs mit differentieller Aktivität und Expression wurden sechs für die weitere Charakterisierung ausgewählt, die bereits im Zusammenhang mit anderen Tumorentitäten beschrieben wurden. Zunächst wurde ihre differentielle Expression validiert. Dabei zeigten die microRNAs miR-29a, miR-96, miR-141, miR-145 und miR-200a eine Herunterregulation in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe. Die microRNA-181a war hingegen im Tumorgewebe überexprimiert. Eine differentielle Expression konnte also für alle untersuchten microRNAs bestätigt werden. Da microRNAs durch die Regulation ihrer Zielgene an der Steuerung zentraler zellulärer Prozesse wie Proliferation, Apoptose und Differenzierung beteiligt sind, spielen ihre Expressionslevel auch in der Tumorigenese eine Rolle (Drakaki und Iliopoulos 2009). Dabei können sie entweder als Tumorsuppressoren oder Onkogene wirken.

Die charakteristische Expression bestimmter microRNAs in einzelnen Sarkomentitäten wurde bereits in früheren Expressionsstudien deutlich (Renner et al. 2012; Subramanian et al. 2008). Während bei Subramanian et al. keine myxoiden Liposarkome untersucht wurden, konnten Renner et al. ein distinktes Expressionsprofil für myxoide Liposarkome erstellen. Sie detektierten u.a. eine Überexpression

von miR-9. Die differentielle Expression dieser microRNA bestätigte sich in den dieser Arbeit zugrundeliegenden Daten nicht, so dass miR-9 nicht in weiteren Versuchen untersucht wurde. Im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen zeigte die Studie von Renner et al. aber auch eine Unterrepräsentation von miR-29a im Vergleich zu normalem Fettgewebe. Renner et al. zeigten, dass microRNA-Expressionsprofile zur sicheren Subklassifikation von Sarkomen beitragen können, funktionelle Studien zur Rolle von differentiell exprimierten microRNAs wurden aber nicht durchgeführt.

Zur Rolle von microRNAs im myxoiden Liposarkom liegen weitergehende funktionelle Studien bislang kaum vor. Beschrieben ist die Herunterregulation der miR-486 durch das FUS/DDIT3-Fusionsprotein, wodurch das an der Tumormetastasierung beteiligte Protein PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-1*) überexprimiert wird (Borjigin et al. 2012). Eine verringerte Expression von miR-486 ist auch in den dieser Arbeit zugrunde liegenden Expressionsdaten erkennbar. Dieser Unterschied war aber nicht in allen Tumorproben signifikant, so dass zu dieser microRNA keine weiteren Untersuchungen angeschlossen wurden. Die microRNA miR-26a-2 ist in DDLS/WDLS häufig amplifiziert, zeigt aber auch in myxoiden Liposarkomen eine Überexpression, die mit einem schlechten Patientenüberleben einhergeht (Lee et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit hat sich die differentielle Expression dieser microRNA in myxoiden Liposarkomen aber nicht bestätigt. Andere Studien sind meist auf dedifferenzierte Liposarkome fokussiert und beschreiben z.B. eine Überexpression von miR-155 sowie eine Herunterregulation von miR-143/-145 (Ugras et al. 2011; Zhang et al. 2012a).

Die microRNA miR-145 zeigte in den hier ausgewerteten Microarrayanalysen eine Herunterregulation in myxoiden Liposarkomen. Sie wurde im Rahmen dieser Arbeit auch funktionell in myxoiden Liposarkomzellen untersucht. Dabei führte die Transfektion dieser microRNA nach 48 h in beiden MLS-Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der Zellviabilität sowie zur Induktion von Apoptose. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Studie von Gits et al., die eine proliferationshemmende und apoptoseauslösende Wirkung von miR-145 auf MLS 1765 Zellen zeigt (Gits et al. 2014). Die Autoren beschreiben für miR-145 zusammen mit miR-451 eine tumorsuppressorische Aktivität in Liposarkomen. Dies deckt sich mit den in

dieser Arbeit ausgewerteten Expressionsdaten, in denen neben miR-145 auch miR-451 eine Herunterregulation in myxoiden Liposarkomen zeigt.

Auch in anderen Sarkomentitäten besitzt miR-145 eine tumorsuppressorische Funktion (Ban et al. 2011; Li et al. 2014). Die microRNA wird in einem Cluster zusammen mit miR-143 kodiert, d.h. beide microRNAs entstehen aus einer gemeinsamen Vorläufer-microRNA. Das miR-143/-145-Cluster wird allgemein in Tumorgeweben im Vergleich zu gesunden Normalgeweben schwächer exprimiert (Akao et al. 2006). Außerdem spielt dieses microRNA-Cluster eine Rolle in der Adipozytenentwicklung. Dabei wurde für die microRNAs zum einen eine Herunterregulation in der Differenzierung von Adipozyten gezeigt (Ortega et al. 2010). Zum anderen wurden sie aber als adipozytenassoziierte Transkripte mit einer Hochregulation während der Differenzierung beschrieben (Esau et al. 2004; Neville et al. 2011). Esau et al. zeigten, dass miR-143 essentiell für die Entwicklung von Adipozyten ist und es bei Verlust dieser microRNA zu einem Differenzierungsstopp der Zellen kommt. Dieser Zusammenhang würde eine mögliche Rolle von miR-143/-145 in Liposarkomen, deren Tumorigenese durch eine unvollständige Adipogenese charakterisiert ist, zusätzlich stützen.

Ein bekanntes Zielgen von miR-145, das im hier untersuchten Tumorkollektiv überexprimiert vorliegt, ist *IGF1R*. Dieses Gen könnte aufgrund der fehlenden Regulation durch miR-145 in myxoiden Liposarkomen überexprimiert sein und zur Tumorigenese beitragen. Eine onkogene Funktion von *IGF1R* wurde z.B. bereits im Zusammenhang mit Blasenkarzinomen beschrieben (Zhu et al. 2014a). Zudem gehören zu vorhergesagten Zielgenen von miR-145 (TargetScanHuman, Release 6.2) u.a. *SOX11* und *FGF5*, die beide ebenfalls in den vorliegenden Expressionsdaten eine Überexpression zeigen. Die genannten Zielgene könnten bei fehlender Regulation durch die herunterregulierte miR-145 an der Tumorigenese von myxoiden Liposarkomzellen beteiligt sein.

Neben miR-145 wurden in dieser Arbeit weitere herunterregulierte microRNAs funktionell in myxoiden Liposarkomzellen analysiert. Dabei bewirkten miR-141 und miR-200a in beiden MLS-Zelllinien jeweils eine Induktion von Apoptose nach 48 und 72 h. Die beiden microRNAs gehören zur gleichen microRNA-Familie. Ihre Gene sind nicht gemeinsam chromosomal lokalisiert, aber sie tragen dieselbe Seed-Sequenz (Feng et al. 2014). Im Einklang mit der hier festgestellten Herunterregulation und pro-



apoptotischen Wirkung in myxoiden Liposarkomen wirkt die miR-200-Familie auch in anderen Tumorentitäten als Tumorsuppressor. Diese Rolle zeigt sich z.B. im Pankreaskarzinom, im Magenkarzinom sowie im Osteosarkom (Chen et al. 2014a; Song et al. 2014; Xu et al. 2014; Zhu et al. 2014b). In den genannten Tumorentitäten wurde jeweils eine Herunterregulation von Mitgliedern der miR-200-Familie nachgewiesen. *In vitro* führten die microRNAs in den entsprechenden Tumorzellen u.a. zu einer Abnahme der Viabilität und Induktion von Apoptose. In Magen- und Pankreaskarzinomen konnte zudem gezeigt werden, dass die verringerten microRNA-Level als prognostische Marker dienen können und mit einem kürzeren Patientenüberleben korrelieren (Song et al. 2014; Zhu et al. 2014b). *In vivo* Daten im Mausmodell bestätigten die antitumorigenen Eigenschaften im Magenkarzinom und lieferten erste Evidenzen für einen möglichen therapeutischen Einsatz dieser microRNAs (Song et al. 2014).

SOX11 ist ein gemeinsames potentiell Zielgen von miR-141, miR-200a und miR-145 (TargetScanHuman, Release 6.2), das in den hier ausgewerteten Microarraydaten stark überexprimiert vorliegt. Möglicherweise führt die parallele Herunterregulation dieser microRNAs im myxoiden Liposarkom zu verstärkter Expression von SOX11. Der Transkriptionsfaktor SOX11 fördert z.B. die Tumorangiogenese (Palomero et al. 2014) und könnte so zur Pathogenese von myxoiden Liposarkomen beitragen.

In den Expressionsanalysen zeigte die microRNA miR-181a eine deutliche Überexpression in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Studien kam es aber zu einer Induktion von Apoptose in beiden myxoiden Liposarkomzelllinien. Diese kontroversen Ergebnisse decken sich mit der ambivalenten Rolle von miR-181a in der Pathogenese verschiedener Tumoren. Zum einen ist diese microRNA in der chronisch lymphatischen Leukämie herunterreguliert und wirkt in oralen Plattenepithelkarzinomen sowie in hepatozellulären Karzinomen tumorsuppressorisch (Korhan et al. 2014; Pekarsky et al. 2006; Shin et al. 2011). Die anti-tumorigenen Eigenschaften werden dabei z.B. über die Regulation der Onkogene *KRAS* und *MET* vermittelt. Zum anderen zeigt miR-181a in Magen- und kolorektalen Karzinomen sowie Osteosarkomen onkogene Eigenschaften (Ji et al. 2014; Jianwei et al. 2013; Pichler et al. 2014; Zhang et al. 2012b).

Um die Rolle von miR-181a im myxoiden Liposarkom aufzuklären, sind daher weitere Untersuchungen erforderlich. Dabei müssen v.a. die beteiligten Zielgene der microRNA identifiziert werden. Zum einen scheint es Zielgene zu geben, die nach der Transfektion der microRNA in myxoiden Liposarkomzellen zur Induktion von Apoptose beitragen. Zum anderen sollte die hier detektierte Überexpression von miR-181a in den Primärtumoren aber zu einer Deregulation von Zielgenen führen, die wiederum eher tumorsuppressorische Eigenschaften besitzen.

Die microRNAs miR-29a und miR-96 zeigten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein ambivalentes Bild. Zwar ist ihre Expression in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe herunterreguliert, aber nach der Transfektion in myxoide Liposarkomzellen zeigte sich nach 48 und 72 h nur ein Effekt auf MLS 1765 Zellen. Anders als in MLS 402 Zellen führten die microRNAs in dieser Zelllinie zu einer signifikanten Abnahme der Viabilität und Induktion von Apoptose. Während miR-96 in kolorektalen, Mamma-, Prostata- sowie nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen als onkogene microRNA beschrieben wurde (Guo et al. 2014; Ress et al. 2014; Yu et al. 2014; Zhang et al. 2014), gilt miR-29a als tumorsuppressorische microRNA. Sie reduziert die Invasivität und Proliferation von Lungenkarzinomzellen (Muniyappa et al. 2009). Auch in der chronisch lymphatischen Leukämie oder im hepatozellulären Karzinom zeigt sie anti-tumorigene Eigenschaften (Pekarsky et al. 2006; Xiong et al. 2010). In Magenkarzinomzellen wirkt miR-29a tumorsuppressorisch indem sie *VEGFA* reprimiert (Chen et al. 2014b). Andere interessante Zielgene dieser microRNA sind z.B. die anti-apoptotischen Mitglieder der Bcl2-Familie *MCL1* und *TCL1A* (Mott et al. 2007; Pekarsky et al. 2006). Eine Herunterregulation von miR-29a in myxoiden Liposarkomen wurde, wie in der vorliegenden Arbeit, auch von Gits et al. beobachtet (Gits et al. 2014). Funktionelle Studien zu miR-29a wurden durch diese Arbeitsgruppe allerdings nicht durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse für diese microRNA in den funktionellen Experimenten der vorliegenden Arbeit lässt sich keine generelle tumorsuppressorische Rolle ableiten. miR-29a scheint aber in Abhängigkeit vom zellulären Kontext, so wie in MLS 1765 Zellen, durchaus tumorsuppressorisch wirken zu können.

Auch miR-96 konnte in myxoiden Liposarkomen weder eindeutig als Tumorsuppressor noch als Onkogen charakterisiert werden. Bei dieser microRNA war die differentielle Expression nicht stark ausgeprägt, was eine neutrale Rolle in der

Pathogenese dieser Tumoren unterstreicht. Zudem führte die Transfektion in myxoiden Liposarkomzellen nur in MLS 1765 Zellen zu einer Reduktion der Viabilität und Induktion von Apoptose. miR-96 wurde im Rahmen dieser Arbeit für weiterführende Untersuchungen ausgewählt, da Bindungsstellen in der 3'-UTR von *DDIT3* vorhergesagt werden (TargetScanHuman, Release 6.2). Da *DDIT3* nach der Translokation in myxoiden Liposarkomen den 3'-Partner des Fusionsgens darstellt, wird auch die 3'-UTR des Fusionsgens durch das *DDIT3*-Gen gebildet. Daher könnte miR-96 über die 3'-UTR von *DDIT3* die Expression des onkogenen Fusionsproteins herunterregulieren. Dieser Zusammenhang würde die antitumorigenen Effekte in MLS 1765 Zellen erklären, lässt sich aber offenbar nicht auf *FUS/DDIT3*-translozierte Zellen, wie MLS 402, im Allgemeinen übertragen. Die microRNA-vermittelte Regulation eines sarkomspezifischen Fusionsgens wurde auch im Ewingsarkom beschrieben (Ban et al. 2011). Hier wird die Expression von miR-145 durch das EWSR1/FLI1-Fusionsprotein reprimiert und die microRNA führt ihrerseits in einem positiven Feedbackmechanismus zur Herunterregulation von EWSR1/FLI1.

Ziel dieser Arbeit war es u.a., neue Ansatzpunkte für zielgerichtete Therapiekonzepte im myxoiden Liposarkom zu identifizieren. Zusätzlich zur beschriebenen FGFR-Inhibition zeigen die microRNA-Studien weitere Möglichkeiten auf. Mit MRX34 befindet sich bereits die erste Substanz für eine microRNA-Ersatztherapie bei Lebertumoren in der klinischen Testung (NCT01829971). Daher könnten auch die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Tumorsuppressoren miR-145 und miR-141/200a Ausgangspunkte für die Entwicklung neuer Therapien darstellen. Die weitere Charakterisierung dieser microRNAs in der Pathogenese des myxoiden Liposarkoms sowie der Nachweis ihrer beteiligten Zielgene sind dafür allerdings essentiell.

### 5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte neben der Überexpression von *FGFR2* in Primärtumoren eine funktionelle Rolle des FGFR-Signalwegs in myxoiden Liposarkomzellen *in vitro* gezeigt werden. Die durchgeführten Zellkulturversuche deuten einen möglichen Erfolg von FGFR-Inhibitoren in der Therapie dieser Tumoren an, dies sollte aber in weiterführenden *in vivo* Experimenten untersucht werden. Ein geeignetes Modell sind Xenotransplantate mit den hier analysierten Zelllinien. Auf Grundlage der hier gewonnenen *in vitro* Daten sollten die FGFR-Inhibitoren dabei in Kombination mit Trabectedin angewendet werden. So können auch Parameter

untersucht werden, die im Zellkulturmodell schwer nachstellbar sind. Zum einen zeigten die *in vitro* Daten vor allem eine Rolle des FGFR-Signalwegs in der Migration, so dass im Mausmodell z.B. die Metastasierung untersucht werden sollte. Zum anderen sollte *in vivo* auch die Neoangiogenese betrachtet werden, da sowohl Trabectedin als auch die FGFR-Inhibitoren diese effektiv hemmen können. Vor dem Hintergrund, dass myxoide Liposarkome durch ein ausgeprägtes Kapillarnetz charakterisiert sind, könnte gerade eine Wirkstoffkombination, die auch angiogenesehemmend wirkt, in dieser Tumorentität besonders effektiv sein.

In der Behandlung von verschiedenen Sarkomzelllinien mit FGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren zeigten einzelne Zelllinien eine Sensitivität gegenüber den FGFR-Inhibitoren. Es konnte aber keine Entität mit einem generell guten Ansprechen identifiziert werden. Die sehr unterschiedliche Sensitivität von Zelllinien der gleichen Sarkomentitäten und die fehlende Korrelation mit den detektierten FGFR-Expressionsleveln machten deutlich, dass die Identifizierung von geeigneten prädiktiven Biomarkern für das Ansprechen auf FGFR-Inhibitoren in Weichgewebssarkomen essentiell ist. In diesem Zusammenhang sind weiterführende Expressionsstudien in Sarkomzelllinien und Primärtumoren erforderlich.

Weiterhin wurden differentiell exprimierte microRNAs in myxoiden Liposarkomzellen funktionell charakterisiert. Dabei zeigten die microRNAs miR-141, miR-145 und miR-200a eindeutig tumorsuppressorische Eigenschaften. Zur Bestätigung dieser Funktion sowie zur Aufklärung der Rolle der anderen untersuchten microRNAs sind weitere Analysen erforderlich. Dabei wird es v.a. essentiell sein, die jeweils beteiligten Zielgene der microRNAs zu identifizieren. Dazu sollten in den myxoiden Liposarkomzellen umfassende Expressionsanalysen vor und nach der Transfektion der microRNA-Imitatoren durchgeführt werden. So identifizierte Kandidaten könnten dann in weitergehenden Reporterstudien näher untersucht werden. Insbesondere die weitere Charakterisierung von miR-145 sowie der aus einer microRNA-Familie stammenden miR-141 und miR-200a wird dabei interessant sein, da diese microRNAs bei einer bestätigten Funktion als Tumorsuppressoren mögliche Kandidaten für eine microRNA-Ersatztherapie in myxoiden Liposarkomen darstellen.

## 6 Zusammenfassung

Myxoide Liposarkome gehören zu den häufigsten Weichgewebssarkomen. Ihre Pathogenese ist aber bislang nur unvollständig verstanden und es stehen keine zielgerichteten Therapien zur Verfügung. Die für myxoide Liposarkome charakteristische Translokation führt zu der Bildung eines onkogenen Fusionsproteins, das als aberranter Transkriptionsfaktor wirkt, so dass in dieser Tumorentität die Expression vieler Gene verändert ist. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit auf der Grundlage von whole-genome und microRNA Microarrayanalysen differentiell exprimierte Kandidatengene und -microRNAs identifiziert, validiert und funktionell charakterisiert.

In den whole-genome Microarrays wurde u.a. eine Überexpression von *FGFR2* in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe detektiert. Da dieses Gen eine hohe klinische Bedeutung aufweist und bereits als therapeutische Zielstruktur in anderen Tumorentitäten genutzt wird, wurden zu seiner Relevanz im myxoiden Liposarkom weitere Studien angeschlossen. Zunächst wurde mittels qPCR und Immunhistochemie die *FGFR2*-Überexpression in Primärtumoren bestätigt. Eine potentielle Rolle des FGFR-Signalwegs wurde zusätzlich deutlich, da in den Microarrayanalysen eine Überexpression weiterer Mitglieder der FGF/FGFR-Familie nachgewiesen wurde. Neben *FGFR2* lagen in den myxoiden Liposarkomen auch *FGFR4* sowie die Liganden *FGF5*, *FGF11* und *FGF18* überexprimiert vor. Daher wurde die funktionelle Relevanz des FGFR-Signalwegs in den myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 untersucht. Die Transfektion spezifischer, gegen die vier FGF-Rezeptoren gerichteter siRNAs führte in den Zellen zu einer Induktion von Apoptose. Dabei war das Überleben von MLS 402 Zellen von *FGFR2* abhängig, während in MLS 1765 Zellen die Expression von *FGFR1* und *FGFR3* essentiell war.

Da durch die siRNA-Experimente eine funktionelle Relevanz des FGFR-Signalwegs in den myxoiden Liposarkomzellen bestätigt werden konnte, wurden die Zelllinien in weiteren Versuchen mit spezifischen FGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren behandelt. Dabei kamen neben der *in vitro* Substanz PD173074 auch die FGFR-Inhibitoren BGJ398 und TKI258, die sich in anderen Tumorentitäten bereits in der klinischen Erprobung befinden, zum Einsatz. Die Hemmung des FGFR-Signalwegs durch alle

drei Inhibitoren wurde durch die verringerte Phosphorylierung des nachgeschalteten ERK-Proteins mittels Westernblot nachgewiesen. In funktionellen Studien reduzierten die Inhibitoren die Zellviabilität, induzierten Apoptose und verlangsamten die zelluläre Migration. Dabei war der Effekt auf die Migration der myxoiden Liposarkomzellen am stärksten. Während für eine signifikante Abnahme der Proliferation Inhibitor-konzentrationen von über 1  $\mu\text{M}$  nötig waren, zeigte sich eine Verlangsamung der Migration bereits bei Konzentrationen von 100 nM. Um die Effekte der FGFR-Inhibitoren zu steigern, wurden diese auch in Kombination mit dem für myxoide Liposarkome zugelassenen Chemotherapeutikum Trabectedin angewendet. Dabei führte die zusätzliche Gabe von FGFR-Inhibitoren zu einer stärkeren Abnahme der Viabilität, Induktion von Apoptose und Verlangsamung der Migration als Trabectedin alleine.

Da in verschiedenen Sarkomentitäten bereits eine onkogene Funktion von FGF-Rezeptoren beschrieben wurde, wurden bei nachgewiesener Relevanz des FGFR-Signalwegs im myxoiden Liposarkom auch in Sarkomzelllinien anderer Entitäten Untersuchungen zu FGF-Rezeptoren angeschlossen. Dabei zeigte keine der analysierten Zelllinien eine Mutation oder Amplifikation eines FGF-Rezeptorgens. In qPCR-Analysen wurden erhebliche Unterschiede in der *FGFR*-Expression zwischen den verschiedenen Zelllinien festgestellt. Die stärkste Überexpression wurde dabei in den Synovialsarkomzelllinien HS-SY und 1273/99 für *FGFR1* und *FGFR3* detektiert.

Zur Untersuchung, ob die differentielle Expression der FGF-Rezeptoren mit einer unterschiedlichen funktionellen Relevanz in den verschiedenen Zelllinien einhergeht, wurden weitere Versuche mit den FGFR-Inhibitoren PD173074, BGJ398 und TKI258 angeschlossen. Dabei zeigten einzelne Zelllinien im MTT-Assay eine Sensitivität gegenüber den FGFR-Inhibitoren. Das beste Ansprechen zeigten die Synovialsarkomzelllinie HS-SY sowie die Ewingsarkomzelllinie SK-ES-1. Andere Zelllinien der gleichen Entitäten waren hingegen kaum sensitiv gegenüber der FGFR-Inhibition, so dass keine Entität mit einem generell guten Ansprechen identifiziert werden konnte.

Des Weiteren wurden die Daten der whole-genome und microRNA Microarrays integriert und mit Hilfe des bioinformatischen Modells BIRTA gemeinsam ausgewertet. Dadurch wurden microRNAs mit differentieller Aktivität identifiziert. Aus den microRNAs mit differentieller Expression und Aktivität wurden sechs für weiter-

gehende Versuche ausgewählt. Zunächst wurde ihre differentielle Expression mittels qPCR validiert. Dabei war miR-181a in myxoiden Liposarkomen im Vergleich zu normalem Fettgewebe hochreguliert, während miR-29a, miR-96, miR-141, miR-145 und miR-200a herunterreguliert vorlagen.

Für diese sechs microRNAs mit bestätigter differentieller Expression wurden funktionelle Studien mit entsprechenden microRNA-Imitatoren in den myxoiden Liposarkomzelllinien MLS 402 und MLS 1765 angeschlossen. Dabei führte im Einklang mit ihrer Herunterregulation in Primärtumoren die Transfektion von miR-141, miR-145 und miR-200a in beiden MLS-Zelllinien zu einer Abnahme der Viabilität sowie einer Induktion von Apoptose. Dieser Effekt war für die ebenfalls herunterregulierten microRNAs miR-29a und miR-96 hingegen nur in MLS 1765 Zellen nachweisbar. Die microRNA miR-181a zeigte entgegen ihrer Hochregulation in den Primärtumoren in beiden MLS-Zelllinien eine Induktion von Apoptose. In der Gesamtbetrachtung von Expressionsanalysen in primären myxoiden Liposarkomen sowie den funktionellen Studien in myxoiden Liposarkomzelllinien zeigten demnach die microRNAs miR-141, miR-145 und miR-200a eindeutig tumorsuppressorische Eigenschaften.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit neue Kandidatengene und -microRNAs in myxoiden Liposarkomen identifiziert, die zur Pathogenese der Tumoren beitragen und therapeutische Zielstrukturen darstellen können. Über die Beteiligung von microRNAs in dieser Tumorentität lagen bislang kaum Daten vor, so dass diese Arbeit hier neue Schlüsselstellen in der Molekularpathologie myxoider Liposarkome aufdecken konnte. Zudem wurde erstmals eine funktionelle Rolle des FGFR-Signalwegs im myxoiden Liposarkom dargestellt und so die Basis für neue zielgerichtete Therapieansätze mit FGFR-Inhibitoren geschaffen.

## 7 Anhang

**Tabelle 7.1 Primer für die Parallelsequenzierung**

Bei Genen, für die keine einzelnen Exons angegeben sind, wird jeweils der komplette kodierende Bereich sequenziert.

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
AKT	CTGAATCCCGAGAGGCCAAG	CGCTACTTCTCTCAAGAATGATG
AKT	CAGCCCGAAGTCTGTGATCTTA	ACTCGGAGAAGAACGTGGTG
AKT	GGAAGTCCATCTCTCTCTCTC	GGTGGAGCTCTGATCTGGTA
AKT	CCCACGTACCGCTCTC	GCAGAGTGCCAGCTGATGAA
AKT	CCACCTCGTCTGTAAAGCA	CGCTACTACGCCATGAAGATCC
AKT	AGGCCGCGAAGTCCATC	AGTCCAGCTCCCCTTCT
AKT	TCCATCCCTCCAAGCTATCGT	GAGGTGGCAGGGAGGTG
AKT	CCTTCTTCTCGTACACGTGCT	GTGGCGGTACCGACACT
AKT	GGCCGTGAAGTCTCATCAA	CTTGAGCACACTTGAGGGTGT
AKT	CCTGGCAGCGGGTACTA	CCTTGCTTCTCCAGAGGCT
AKT	CCTCCATGAGGATGAGCTCAAAA	CCCTTGATGCCGAGTCTG
AKT	CCAGCAGCTTCAGGACTCAA	TGTGAAGTGACGCCTCTC
AKT	CCAAACTGGGCTCTGAGGA	GCACCTCCATGTGGAGACT
AKT	GCTCCTTGTAGCCAATGAAGGT	GGGTCTGACGGGTAGAGGT
AKT	CACCTTGAGGTCCCGGTA	CGGCTGTGCCTCAGGTT
AKT	CAGCCCTCCACAGTCCAAG	CTGACGGCCTCAAGAAGCA
AKT	GCAGCAACGCGTATGCAC	GAACCTCATGCTGGACAAGGA
AKT	AAGACAGGACATCGTCCCCTA	CTCACCAGCCCTGCTTT
AKT	GCGAGTGTGTGGAAATCTGG	CGCTTCTTTGCCGGTATCGT
AKT	GCCTCTCTGAGTGTGGAGAGAAA	TCGGAGACTGACACCAGGTAT
AKT	GTGTAGCCTGTAGCTGGGATG	TTCTACAACCAGGACCATGAGAAG
AKT	GCCACGATGACTTCTTCTTGA	GCCCATAGACCATGAACGAGT
AKT	AGCGGATGATGAAGGTGTTGG	ACCTGGTGGGTGGTATGCAA
ALK Exon22	GGGTGAGGGTGTCTCTCTG	TTGGCTTGCAGACTCTGTAG
ALK Exon23	ACTGCAGCAAAGACTGGTTCTC	GCTCTGCAGCAAATCAACCAC
ALK Exon23	CCAATGCAGCGAACAATGTTCTG	AGCTGCTGAAAATGTAACCTTGTATCCT
BRAF Exon11	GATGCGAACAGTGAATATTTCTTTGA	TGGATCATTTGGAACAGTCTACAAGG
BRAF Exon11	CACATTACATACTTACCATGCCACTTTC	TCTGTTTGGCTTGACTTGACTTT
BRAF Exon15	ACACTGATTTTTGTGAATACTGGGAA	GTGGGTCCCATCAGTTTGAACA
BRAF Exon15	CATCCACAAAATGGATCCAGACAAC	GCTTGCTCTGATAGGAAAATGAGAT
CDK4	CAGGGATACATCTCGAGGCCA	CTGAACCCAGGATGGCAACT
CDK4	CCTCCAGTCGCCTCAGTAAAG	TGGCTGAAATTGGTGTCCGT
CDK4	TGGCAGCTTTTCTTCTTCCAT	TCTGTTTTCTCATGGTTTTCTGACCT



## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
CDK4	GAATCAAGGTAGTCCAGGGTATGT	CCCCATCCATTCTTCTATTCCC
CDK4	GGGTGCCTTGCCAGATATGTC	GGATTGAAAAGTGAGCATTTACTCTGGT
CDK4	GTTCCACCACTTGTCACCAGA	CATCTGTACCTCCCCTTTGAAACTA
CDK4	CTCAGGGTCCCCACTTCTCTA	CATCAGCACAGTTCGTGAGGT
CDK4	GGCCTTGACTACTGTCCCATAG	TGTAAGCGACTTTTGGTGATAGGAG
CDK4	CAGATGCACTGGAACTAGGCA	GAGCATGTAGACCAGGACCTAAG
CDK4	CCCACAGCCATCTCCAGTA	GCTGCCTCCAGAGGATGAC
CDK4	GGTTCAGCAGAAAAGAGGACTCA	GAAAATGACTGCTACCTTATATCCCTTCT
CDK4	GCTACGGGCAATCACTCTCCTA	CGAGATCTGAAGCCAGAGAACAT
cMET Exon13	ATTTGTCATTTTTAGTGGAAGCAAGCAA	CCCAAGTAGTAATAACAGTGCTGTTGAT
cMET Exon13	TGAAGGCAGTTATGCCATTTGTAGA	ACTTTTCCAAGGACGGTTGAAGAAA
cMET Exon13	TTGATTGCTGGTGTGTCTCAAT	ACAAGAATCGACGACAATCTTAACTGT
cMET Exon14	GGCCCATGATAGCCGTCTTT	CTTCGGGCACTTACAAGCCTAT
cMET Exon14	GCAAGAGTACACACTCCTCATTGG	TCACAACCCACTGAGGTATATGTATAGG
cMET Exon16	TGTTACGCAGTGCTAACCAAGTT	GCAAACCACAAAAGTATACTCCATGGT
cMET Exon17	CCAATGTCCTCTCGCTCCTG	AGTTAGTAAGCTTGGCAGTCAACTT
cMET Exon17	GAAGTTAATGTCTCCACCACTGGATTT	CTTCACTTCGCAGGCAGATTC
cMET Exon18	GCTTTTCTAACTCTCTTTGACTGCAGA	GGATTGTGGCACAGAGATTCTGATAC
cMET Exon19	AAATTATTCTATTTAGCCACGGGTAA	TCCAAAGCCATCCACTTCACTG
cMET Exon19	GTGTACACAACAAAACAGGTGCAAA	AGAGGAGAACTCAGAGATAACCAATACA
CREBBP	CAGTGAAAGTTATGGCTGTTGAATGT	GAATCAAGGATTATATTAATAACTAGGGTGGT
CREBBP	ACAAGAATTTTATTTCCTAGGGAGCCA	CCCGCTCAGAGCCAGTTTC
CREBBP	TGAAGAATCTCCCTGGCTCAGA	CGGCTCTAGTATCAACCCAGGA
CREBBP	GGTCCCAAGATGCCTTGTT	CACAGATCATTAGTTGCTTTTTACAGT
CREBBP	CACTGGCTCTGTGCAGAACT	TCTTGTGGTCCGTGTGCTTTA
CREBBP	CCGCGGTTAGGTAGGAAGTATT	GAATGCCGTACCCTACTCCAG
CREBBP	GCTTGGGTCTCCGTCTTCAT	CTGAAGTCAGTGCTTTCCGTTTTT
CREBBP	CTGAGGGCCAAGGGTAACTT	CTGGAGTGAACCCCAAGTTAG
CREBBP	GCCGGAAGGTAATGACTCTGG	AGGGATCTGAGCACCTTTTACAAAG
CREBBP	GGGAGTCCGAGAGCAGCATA	TTGTCTGTCTGTCTGTTTGTGCTTATAG
CREBBP	TGCCCTTGTAAGCCTGATTAA	CCAAGCACTGAATCCGCAAG
CREBBP	AAGCAGCATCTGGAACAAGGT	GCTGTAAAGGTTGCTTAGTTTCTCATTTTC
CREBBP	CAATTTAAGGTCACCCTCCCTCA	GATGGACCAGTTCACCCAAGTA
CREBBP	CTTTCATTCAGGTTTCTTTTCATCCAC	GTTGCGGTAACATAAAGGTGTTTGATAT
CREBBP	GCCGTCAATTTCTCAAAGCA	GTCAGCAACAGCCTTTGTAAATGTC
CREBBP	CTTGTTCTAGTTCCTTAATGCTCTCTTCT	CCTCATCTCACTGTTGTGCTTTG
CREBBP	GGCCAAGCTGTCCCATCT	CCAGTCCAGCAGCCTCA
CREBBP	AGTCATGTCGTGTGCAGTTCTT	TTAGGTATAATTGAAAGTGTGACGATTTGGA

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
CREBBP	GCTGTGCGCTGTTTGATGAAA	AGCGCTCTGCAAGACCTG
CREBBP	GACTCTGCTGAGGCAGTT	GCCCTCTGCTGCTACCAC
CREBBP	GCACCACCCGCTTCATCTT	CTGGGCCTGGATGACGAG
CREBBP	CCTGGGCCTGCATGGATA	CCCCGTGAGCCTGAATGTG
CREBBP	CGTAACATTCTCGGTA CTGTGGATT	CCAGCCTGCAGAACCTGA
CREBBP	GGCCTCACGCTCGATCTG	ACCCTCACCCGTGAGCAT
CREBBP	GAGCATTGCACTCTGTTCCG	CAGTCCCAGCCTCCACATT
CREBBP	GCCAGGCATTGTTGAACATGAG	GGGATTCCCTATACTGAGACATTTT
CREBBP	GGAGA ACTCCAGTGCTTGT	ACTAAAGCCCTCCTCTCCTG
CREBBP	ACTAAGGGACGTGGCGATCT	CAGCGGATTCTGCAGCAAC
CREBBP	ACGCCTTGCCAGCATCTTTT	GCACGTT CATCTGACGTGTGT
CREBBP	CGTACATGTCCCTTCCACTTT	CTGGACGAAACCCCATGTCTTTA
CREBBP	AGGGAAGTCGGAAGAGCTGAT	GCATGTTGGTTATCTGTCATCAAACT
CREBBP	GATTCTGGCGCCGCAAAAA	AGTCTCAGTCACTGTCTCAGCA
CREBBP	GCTGTTGCTGCGATGACTGA	CAGTGCTACCCAAACCCAGAG
CREBBP	GGATCTCATGGTAAACGGCTGTG	TCAGATTTGAGGGATACCCTGAGT
CREBBP	CATACAGCTTCTGGGACAGGT	CACAGCCTTGCGTGTGTGT
CREBBP	AGGAGTCATCCAGGTGGT	CTCAGGCCAGCCAGCTA
CREBBP	TGACAATGCGTCATGTGATTCAAAAC	GCAGATCCTGAAAAACGCAAACT
CREBBP	TTTCCTTACACCGGTGCTAGAAG	GTTTGAGTCACTTCAGTAGATGGATGA
CREBBP	CACCATCAGGTACAGACACCAA	TTTGTCTACACCTGCAACGAGT
CREBBP	GCACATATGCACTCCCAGTATACA	TTGACCCTGTCATGCAGTCC
CREBBP	GCATAACCCAAATTCAAAGGAACAAGAA	AGATGAACAGCATGGGCTCAG
CREBBP	AAGGGTTCTTACTAGTTCCAAATAATTTAATCC	TCATTTCTTCCGGCCAGTT
CREBBP	AAACAATGGACTCAGAAGTCACA	CTAGAAGCACTGTATCGACAGGAC
CREBBP	CAGGCTAAGGGATGGCAGTAG	AAACGGAGGTGCGTTTACATA
CREBBP	AAGCAGCATGCTTTAATAAGGTAATGA	AGAGCAGAAATCAGAACCAATGGAA
CREBBP	ACGAAGTTGAGAGTTCCTTCACCTA	CCAGCTCCATGCAGCGA
CREBBP	GATGACGGGA ACTGGTTCTGT	GGTGGTGCCTGTTGTCTCGTAG
CREBBP	GCTGGCGCTCACATTTCTAT	GAGAATTAGGCCTTTTAAACAGTGGGA
CREBBP	AAACCTGCGTTAGGGTCTCAG	CTCAATAGTAACTCTGGCCATAGCTTAA
CREBBP	TGTGCAGTCCAGGAAACAGAAA	CTGCATTTTGTGGTTTGACAATTTACA
CREBBP	GTTGACCATGCTCTGTTTGCTG	ACCACAGCTGATGTTACCTCTTTTT
CREBBP	GGTCTATCCTAACACGGCTCACT	CCCATATCGAACCAAAGCTCTGTT
CREBBP	CAGCCCCACTTGCTTTTGTG	TCAGTGCCATGGGCAAGAG
CREBBP	GGAGCTCAGAGAAGGGTCTGTA	GTGATTTCTGGCCAATGTGTT
CREBBP	AGAGAACACTTACCCCTGGCA	TGAACCGTTGTGGGTACATTTACAG
CREBBP	CAACTTCTATTCTCATCTCCAAGCTTCT	TCTTCACGACAAATCATCTCTCATTGG
CREBBP	TGCGTCCACAGCAATATCCAA	AGTACGTGGACGACGTCTG
CREBBP	GGGACCCAATCTGCTGCTT	AGCTCCATGGGCCAGATG
CREBBP	GGTAGCCTCCGGGCTCT	GTATGAATCCACAGTACCGAGAATGTT
CREBBP	GGGAAGCCAGCTGGTGA	CGGATGGCCACCATGAACA
CREBBP	GGGAAAAGGTGATGCTCTCACA	CCATAGATCAGGGACACTTGGG

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
CREBBP	CTGGGCGACTTCAGGGT	CTTGCCCAGGCCTGTGA
CREBBP	CCGCTCACCTGGTTGGG	CTCCTGCAGCGGTGGAA
CREBBP	GGTAATTAACAAGTATGCGAATGCAAGA	CAAAACGACTGCAGGAGTGTA
CREBBP	GCATTTGTTTTCTTGGCAGTGCTT	CAACTGCTCGCTGCCATC
CREBBP	GCCAGCCTGCATGGCAT	CAAATCAAACCCGCAGCTAATGG
CREBBP	CGTCTCCACGTGGTGCTT	CCTCACCCCTCGCCAGAG
CREBBP	GGGCTCTTTGACTGTGGCT	CCTGTCCCCTTTCTTGCTT
CREBBP	GGGCTGTATCCGTGGTGA	CCACAGGCCTCGCATCT
CREBBP	CTGCTCGCAGAGCACTGTA	ACTTGAAGACCGAGTGAACAAA
CREBBP	CCCACAACCCACTCCATAAGG	AACAAGGACAATTTCAAAGGATCAGTTTG
CREBBP	CGGAGCCTTATGAACCAGAGA	CGCATTGTGCAACCATGAAAAAC
CREBBP	CCTGGCCTGACACACAATTTTTAT	CCCGTCTGTGGCTACCC
CREBBP	ATGAACGTGCCTTGCCCTAA	TTGCAGTATGAGTTTTCCCACA
CREBBP	CGGACGCTCTCTTCAGGTG	AGCAGGTGAAAATGGCTGAGA
CREBBP	CAGCTGCGAGTCTTCCCT	CATGCCCAACGTGTCCAATG
CREBBP	GCTGCTGCCTGGACTGTAG	CCATCTCTCCAGCACACGA
CREBBP	GGTGCAGTGGTACTGTGT	ACCATACTCTGTCCATTTCTGGTA
CREBBP	GCCAATGGGCAACACAGGAATA	CACTATACCAACAGCAGCTCCTC
CREBBP	AGAACCAGCTGCTGCTGTATC	TGAATATGACTTGGAACCTCTGAGAGGTT
CREBBP	CGAGGACACCTGGGTAAAGTTG	CTGACGTACCTGTGCTGGAA
CREBBP	CCATTTAAACTATTTTCTCTGCCACACA	AGCCCCAAACTTGATTCAGA
CREBBP	AGTCTGTCCCACTACATAGATTCCA	GGAAAACCTGGTAGCCTATGCTAAG
CTNNB1 Exon3	AGACAGAAAAGCGGCTGTTAGT	GAGAAAATCCCTGTTCCCACTCAT
DDR2	GGTACTTTGTGGGAGACTTTCACC	ATCCATTTCATCCCCAACAGTTCTTAC
DDR2	CTTTCTCCTTGCTCTTCTCTTCCA	GGAAAGATGCGATCGTAAGTCGAG
DDR2	TGCTTGCCCTGTGAACCAGTAA	GCAGAAACTCCTTCAGGTCATCAG
DDR2	GAGTTTGCCCCATGTACAAGA	CCTTCTTCTCCTAGCCTAAGTCAAAT
DDR2	TCAGATTTCTCTCTCCTTTTCTCCT	CCATTGGTGGCACTCTCGTT
DDR2	ACCTTAGCAGGGCCAACCTA	TTGACGTCATCCAGGACAAGG
DDR2	GCATTATTGGTTGGTGGCAGACT	TGCTGGTCTTCTAGCATATAGCTGA
DDR2	AGCTGCTGGAGAAGAGATACGA	GGTCTTGTAGGGAGGACCTGAG
DDR2	CCCAAACATCATCCATCTATTAGCTGT	GAGAAGGAAGACCTGGCTTGTTTA
DDR2	AGGTGCTGGATGAAATAGTAACC	GCTTCCTGGGCTAGTGACCTA
DDR2	ACGAACTGTTTAGTGGGTAAGAACT	ACAGGGCTTTAAAATGCTGAGAACTTA
DDR2	AGTGCCATCAAGTGTCAATACCA	CATTCCTCCTTCATCACCTTGCT
DDR2	TGGAGGGAATGGAAAAATTCAAAGACA	AGGAGTATTCTGGTCTCAAAGATGAAA
DDR2	CCTCCTCTCAGAGTTCCTTCT	CTGTCACTCCTTGAGGTTTAC
DDR2	AGTTCCCCAGGAACTCCTAACTT	GAAGGGACTCTTTGTTCTACTGATCATT
DDR2	TAAGCAGAAGTATTAAGGTGGCATCT	CGAGTGTGCTGTCATCAACTTT
DDR2	AGCTGCAGATTATGAAATTTAACAGGGT	GGGAATAGGGCTGTTCTTGACAAA
DDR2	CACCTAGTGAACAAGGGTCCAA	TTGCTGAGGTTTCTCCCTTGAC
DDR2	GCCCTGAGATTCCAGTGGAAC	GTGCCATCCGACTGTAATTGA
DDR2	CCATGTCCTCTCTTTTCTCTTGGTTT	GAACATGGGCTTTCTTGATGTAACC

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
DDR2	GCCTTGGTGTGCATTCTTCTC	CAGAGAGGGTCATCAGTGATACAC
DDR2	ACTCACTTGGCTGTGTTTCCT	AGTGGCCAATTTCCCATTCTAATAAAGTT
DDR2	CCTGGTCACAGATCCAATGCTT	TTCTTATATCATGACCATTCTGCACCTC
DDR2	ACTAGCTGTCTGTCTTCTCCCT	ATCCCCCAGTAAGTCCCTTCA
DDR2	CCCCGTCTTTGTAATATTCTCTCTCT	CTTGGAATGAGGGACGGTTCT
DDR2	CTACCTTCTGTCTTCTGTCTATTTCCT	TTCCAAAGTCAGCTATCTTGATTGTGT
DDR2	CCACTATGCAGAGGCTGACATA	TCCTTCTCCCAGCTTCTCTTTGA
DDR2	GTAGATGCATTCTGCTCCTCGAA	TCCAAGTCCTTTAGGAAAATGTCATAGG
DDR2	TGTGGCCCCGGCTATGACTA	TCCTTAAAGAAGTTCCACCACACC
DDR2	GAACCTAATGCCATTTCCCTTCCC	TGAACATCATCCAGGTATCTGCAAAA
DDR2	CAGGAAATGCCAGCAAGAGTA	GCACTGACATCTAGGGCAAAAATCTT
EGFR Exon18	TGAGGTGACCCTTGTCTCTGT	CCAGCACTTTGATCTTTTTGAATTCAGT
EGFR Exon18	AGCTCTCTTGAGGATCTTGAAGGAA	AAATATACAGCTTGCAAGGACTCTG
EGFR Exon19	ACGTCTTCTTCTCTCTCTGTCA	CTGAGGTTTCAGAGCCATGGAC
EGFR Exon20	CTGGACTATGTCCGGGAACAC	TGAGGATCCTGGCTCCTTATCTC
EGFR Exon20	GCCTCTCCCTCCCTCCA	GGTACTGGGAGCCAATATTGTCTTT
EGFR Exon21	CAGGAACGTAAGTGGTGAACACAC	CTGACCTAAAGCCACCTCCTTAC
EGFR Exon21	TGAATTCGGATGCAGAGCTTCTT	CCAAAATCTGTGATCTTGACATGCTG
EP300	GTGGCTGTTGTATTTATTCTGTCTCCT	GTGACCCAGGGTATAAATCACGTT
EP300	TGGGACTAACCAATGGTGGTGATA	GGGCCACCAACTCCCATATTG
EP300	TGGTCAAAGCCCAATGACACA	CCAGGATTCATGCCCGCAT
EP300	GCCTCTGTGCTTTTTAACAAATGGT	CCCTGGACATGTGGACACA
EP300	TCAACTCCAATTGTGGTTTAAATGT	CAGGAGGATGGCAATGGAAGATATAATC
EP300	AGGCATTCAGATCTAACATTTTGTCTCAT	CGTCAAATAACCGGGTTGAGAG
EP300	GTTTTCTCACGCTGGCAAGG	CCACATGGTGTGCTTGCATTCATTG
EP300	AATGAAGCAGTTTGGTGATTTGTGTTT	GTTACATTCATTCCCTGTGATGGGA
EP300	CCTTTGGTTAGAACAGCAGTCAGA	AAGAAAAGCCAAAGCGTACTGACTA
EP300	CCTCGCTTGTATCTCCGAAAGAA	GAGTAGAAAAGATTAAAGGGAACGTGGAA
EP300	CTGGGAGAGTGAGAGGGTGTTA	ACTGCAGTCCTCAAGCATTTAG
EP300	AGAAGAACTACGACAGGCACTG	ACCACCAAATACTTACAGGGATTCTTA
EP300	AACAACCCCAATCCTTATGGTTCA	AGTACTCACCATGTTGGGCATTC
EP300	CCGGATCCTGCTGCTTTAAAAGA	CCACAACAGGTTCAATCTTGGCTATTAA
EP300	GCTTTCATGTTTCTTGTGAGCCAT	GGCCAGAAAATCACCTCGAAATAA
EP300	CTGGCCCAATGTTCTGGAAGA	ATGATAGAAGTTTCAAAGGAAACTCAATGC
EP300	GTTCTCCTTTTGCATGCTCACAA	GTAACCCTGTGGGTCCACTTAC
EP300	TTTATTAAGAAATAGCACATTATGACTCCTACC	TCAGCTGTATGTGCTCCAGAAC
EP300	TCTGTTCTGAATTGCTGTCTTGTATGT	GGTACAGGCGAGGGTGAATT
EP300	TGTTCTACACCTCCTGCCAT	AGGTGCAGCAGGAAGTGAAG
EP300	TGTTCTACCCCAACAGCAC	GAGAATGGAATGGCCAGAAAGTAATAT
EP300	CCTATGCCAACAGCAGCTCAA	ATGAGACGTGTCCACAATCTTACTTAC

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
EP300	CCATTGCTGAGAAGCAGCCTT	CTGAGGTCCTAACCAAATCAAACAGTA
EP300	CCAGAATTCATGCTTTCTCAGCTT	GCTCCCAAATACTACAAGGTGTCT
EP300	GTGTCCTTCACCATGAGATCATCTG	TATCGTGGCCAAACCCAAAG
EP300	ACTACCACCTTCTAGCTGAGAAAATCT	TGGATTCATGGAACTGGAACCAT
EP300	GGAGACAGCAAAAATGCTAAAAAGAAGA	CTCTGGGTGGCTGCATCTTA
EP300	CAGAATATGCAGTACCCAAACCCA	ATTGTGCACACAAACCAAACCTGT
EP300	GGTTTGTGTGTGCAGTGAGTTTT	CAGATTGTGGAGTTATTCGAGGCAT
EP300	TTGGACTTGAAATCCTAGCTCTCTA	TTGTGTGGCATCTGATTACTTGA
EP300	CTACCATTAAGAGGAAGTTAGACTGG	CATCACTGGGTCAATTTCTTGTTCAA
EP300	AAGAGAGAAGCACTGAGTTAAAACTGA	CCAGAACGAATGGCTTCAGAGA
EP300	GAGGTTGAACCTTAAGACTAACACAGT	CCTCAGAAAGTCATTCACACGATTCTC
EP300	ATTTCACTTTTCTCTCCTCGTGGAT	GGCTTTGGTTCCGTATGGAAAG
EP300	CCCCCTCAAAAATGCTGGTGATA	ACAGGTCCTCACATAATCAAGTAGT
EP300	GCATGCAGCGGACTGGT	GCTTGAGTCCTGGGCAAGT
EP300	CTTGAGAGTTTACGTGCACCT	GCTGGTTGTTGCTCTCATCATC
EP300	CAGGCTCAGCAGATGAACATGA	TGCTGGAACCTGGTTATGGTTGG
EP300	CAACTACAGTCTGGGATGCCAA	ACCTGAGAGTCCGCAAAAGG
EP300	GCAGCAGTGGAAATGGCAAT	AAATGCCCACTGGGACCTC
EP300	GGATGCAGCATCACATGCAA	CTGTTGCTGAAGGAGTCGCT
EP300	TGCTTGCCAGTGTCCGAAT	GCATTTGTTCTCCTGGCAGTG
EP300	GTTGGCTGCATTCATCAAGCA	CGCCTGCATTGGATTCATGTTC
EP300	GCCAGCAGATCCCTAATTCTCT	CAGCTACCAGTCCAGGATGTG
EP300	TGGTTTTGTACATACTTTGACCTTTGTCT	GCCAAGACTTGTCTGAAGCTGATTAA
EP300	CGATCTGGTAGTCCCTAACCT	CATGTTGGGAGAAGTCAAGCCT
EP300	CATGGGAATGAACACAGGGATGA	TCAGTAAGTTGCCAGCACTTCC
EP300	CATGGACAGTTGGCTCAACCT	CAGAAGAACTAGGAGTTATGGTCTGTTT
EP300	AGAGACTGTCTGTTTTTCAGGTCTTC	AAGAGAACTCCAGGTGCTTGTC
EP300	TGTCCACCAAGTGAGGGAGAT	GCCCCTATGTCCCAACTGAC
EP300	AGGACCGCTTTGTCTACACC	GCCTCTATAAAATACGTGGCTGCAT
EP300	CCAGTTCCTCCTCAGACTCAGT	GCCACTCTCCTATAAAAACCTACATC
EP300	CCTCGATAGTGTTCATTTCTTCCGT	CCAGAATGCCATGCTAGTTAAAGAAAAA
EP300	GGGACAGAGTGGTTAATTTTGTATTG	AGTGCCTCAAAGTTGGCAT
EP300	TTCCTTTGAACTGTCTTTGTGAACCTG	GCTGTCCAGGATTCTGAGTATATGG
EP300	AAAAAGGCAGTTCCTGGTGGA	CCAGCATATATAACAGAAGGGTGAAAGT
EP300	CGGAACAGTTCACCCAGTA	CTGGACAACAACTAATTAGCACTTTTCA
EP300	TTCCTCAACCAGCTCTTCATCAG	GGATGTAGAGCCTGGGACTGT
EP300	CAACACAACCTCCCAACAAGTG	TCTACTTACTGGAGTTGCAGGCT
EP300	AGTGTACAGTTGAATTAATGAGGTCTT	TTTCCGAATTCCAGTAGTGGATGG
EP300	ACTCTGCGTGTGTCTCACCTA	CATTTTGGCCTCCATCTTCACTTC
EP300	GTTTCCCACAGACAAGTTCC	TTGCCATGCCTGGATTGCTA
EP300	TCAGAAGTCATGGGAAATATTGCAAGT	ACAACGTTAAGACTTACCCAGCAG
EP300	TCTGTTACCTGGTGGTAGTTCCT	TGGTCTTCGTTTTTCTTCTAGTTCCTT
EP300	TGCAGCTCTGGACTACCCTA	TCATTTACTGACACAACCAATACCATGT

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
EP300	ATAGATTAACAAGTGCAAAGGAATTGCC	GCTGGTGTTCCTCTCGTTTTCT
EP300	CCAGTTGCCAAGGGATGG	ACTTCCCATTGGCCTGTT
EP300	TTTTCTTTCTCTATGTGTTCAAGTGT	GCAACTAGGTTTTCCATCCGCTCG
EP300	TACTATATCTTTTGCTTCTCTAGCAATTTTGA	GGGATCAATCTGACTAACAGTGCTTA
EP300	TCAACGGTTTATCTAAGTTGTGTAAGCA	TCTAGGCTTCAGATAAGTTTTGCCAAA
EP300	GGGAGATATTCTGTGCTATTCCCAAA	GCTGCTCTATTTTTGCTGGTTTTCTTA
EP300	TGGATGATACTCCATCTCCCGTAAA	GCCAGGGCTCCTGATACTGT
EP300	GCTCCAAGCTCTCTGAGGTCT	AAAGCCAGAAGCAGGATATTCTCTTATC
EP300	GCAGTGTGCCAAACCAGATG	GCATAAAGCGGGTGTTCAAGTA
EP300	TTGCATGAGAAAGGGTGTTTCTGAGA	GGCTGGTCTTCTCTCTTTTTATT
EP300	TCTACCAGACTTGGCACCTTTCTA	CGAGGAGAAGAAAAGTGAATGACTAGAT
EP300	TGTTTTCTTCTCTTTAGTGGCACACT	TTCATCACTTACGCTGTTGATTTCTCT
EP300	GACAGTGGAGAGATGGCAGAATC	GCTAGCCACTGTGAGCTAGTCATA
EP300	CCCAATAGCATGCCACCCT	TCTCCGCTGCTCTCTGAATCT
EP300	GGAGAACTAGGCCTTGGCTTA	GGATGGCAGTGAGCAATTGG
EP300	CAGGAATAGGCCCTGGAATGG	TGTCCCATATTTCTTGTTCATCT
EP300	GTATGAACCCACTCCCATGAC	GGCCACTGACATCATGGCT
EP300	ACTGTGTCTCAACAAGCCTTACAAAA	GGATTAGAGTTGGCATACTTGCA
EP300	TGCCAGTCTACAGGCCTATCA	GAGAGCGCACTTGATTGGAG
EP300	GTCCACTCCAATCCAGCCAT	AATTGTGAAGGCATGGTGTGTG
EP300	TCTGCTGCTACCATGCCAAG	CCTGTTGCTGCCCAACCA
EP300	GCAGAACATGCTACCAAATGCT	TCTCTCAAACAGAAATATAACAAAAACCACTTA
FGFR1	GCCTGAGCTCTGGCTCT	AGGAGACGTCCCTGACCTT
FGFR1	GCTGTGGGTGAGGGTTACA	GAGCTCTACGTGCTCCTCAG
FGFR1	CCTCCACTCCCAGGTAACCC	ACCAAAGTGGCTGTGAAGATGT
FGFR1	GACCCAAAGGGCAGTAAGATAGG	TCCCTAGGAGGAACCTCAGTG
FGFR1	CCCCTCTTCTTCTCAGAT	TGGTGACAGAGGACAATGTGATG
FGFR1	CCACCTCCTCCCCTGTGAT	GGAGTCCTTCTGGTCCAC
FGFR1	CAAGCCTGGAAATGCATGCTC	GTAACCTATCGGACTCTCCCATCA
FGFR1	AGTAGACTGGCCACGAAGA	GTAGCAACGTGGAGTTCATGTG
FGFR1	GGCACTTCCAGCTCCACATC	CCCTACCTAGACCCTCCTAACTTTT
FGFR1	CCTCTCTTAACCCCTTCCCTA	TGATGAAGATGATCGGGAAGCATAAG
FGFR1	CCTCCCCTGTTCCATTACTCTA	GGCTGCCAAGACAGTGAAGTT
FGFR1	GAGTGTGCAAATCCCCATCTA	GGGTCCGTCATCGTCTACAAG
FGFR1	CTGTTCCACCCCTGGCATTAA	GGCTGGAATACTGCTACAACCC
FGFR1	GCTATCCTGACTCTGCCCTAA	CAGCATCAACCACACATACCAG
FGFR1	GCAGTTACTGGGCTTGTCCAT	CTCTAACACCCTGTGGCTCTC
FGFR1	CCTTCAAAAAGTTGGGAGTCAAAGTAT	TCCAGTGCATCCATGAACTCTG
FGFR1	ACGTATTTTGGCTTTGAAATGGAAGT	CGAGAGTTGAGAGAAACACATTTTGG
FGFR1	CGAGGCCAAAGTCTGCTATCTT	ACAAGTCGGCTAGTTGCATGG
FGFR1	GCAGGGCTTGGCTACCAA	GTGCAGCTGGCGGAAAG
FGFR1	CGAAGCTGCAGCAGGTCA	CGTGTGGCCAGCGTAATT
FGFR1	AGAACGGTCAACCATGCAGAG	CCATTTTGTTCCTTGTCTCTTCTA

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
FGFR1	CCACACCTCCCTGGCAA	CCCACCTGTGCCCTCAT
FGFR1	GCGGGTCACTGTACACCTTA	CCTCTTTAGCCATGGCAAGGTC
FGFR1	CAGCCCATCCTGTTCCCAA	CACCAACCTCTAACTGCAGAACT
FGFR1	CCCCCAGCAGGTTGATGATATT	CAAGTAAATGAGTCTCAACGTGTTCTTT
FGFR1	GTCCCACTGGAAGGGCATT	CCTGTCTCTCTTGGCTTTCCC
FGFR1	GCTGCTCCTCTGGGTTGTG	CCCATGGCCTCTTCTCCTG
FGFR1	TCACTCTTCTTGGTACCACTCTTCAT	CTAACACCCTGTTTCGCACTGA
FGFR1	CCTCTTACCCACGACATCCAG	CCCTCAATGTATCCCTTTGGCATT
FGFR1	GGACAGAAGCATCACTTACACTTCA	AACTTATGCCACTCTCTGTTTCCC
FGFR1	CAGGGACGTCTCCTGGAGAT	GAACCTTTCAAGCTGCTGAAGGA
FGFR1	CGTGATGGCCGAACCAGAA	GACTAAGAATGGGAAGGAGTCACC
FGFR1	CATGCAGAGGTCCTCGGT	TGTATGTTGGATCAGTACTCCAGTGA
FGFR1	GGCTCATGAGAGAAGACGGAAAT	CTTCCTCTCGCCCATCACAG
FGFR2 Exon5	GCATGGTTGGCATTGGGTTCC	GGAAGCTGTCCATCAGTATACATTCTAA
FGFR2 Exon5	AATGTGATGTTCTGAAAGCTTAATTCTACCT	CGGCCAACACTGTCAAGTTTC
FGFR2 Exon6	GGCAAACCTACCCACAACATC	CCGCCTTTGCTTTGATCTTTTCA
FGFR2 Exon6	CTGAAACTTATGGGAGAAACAGGACTT	CCATCAATCACACGTACCACCTG
FGFR2 Exon7	GCATCACTGTAACCTTGCAGACA	CTTTCTTCCCTCTCTCCACCAG
FGFR2 Exon7	ACCCCAGTTGTGGGTACCTTTA	GGTCCGAGGAGACGTAGAGTT
FGFR2 Exon8	CCATGCAGAGTGAAAGGATATCCC	GCCTTTTCTTTTGCTTCCCTTGTT
FGFR2 Exon8	AGCTGTGTTAATTTTATAGCAGTCAACCA	CGTGCTTGGCGGGTAATTCTATT
FGFR2 Exon10	TGTCTGCCGTTGAAGAGAGG	CCTTCTCAGATGGAGCCAGGATTA
FGFR2 Exon10	TCCAATATCCCATTATAGCTGAGTCT	CGCTGGTGAGGATAACAACAC
FGFR2 Exon11	TGTCTTTGTCAATTCCCACTGCTT	CCCCATCACCAGATGCTATGTG
FGFR2 Exon11	GATAGAGTTCACATGCCACAAAAGG	CTTTGGGCAAGTGGTCATGG
FGFR2 Exon12	TTGGGCGAATGCAGTTTTTCC	AACTGATTTGTGAATATGCCTACTGT
FGFR2 Exon13	GAGCATGTCCAAATTGCCTGTT	TTCCTGAGGAGCAGATGACCT
FGFR2 Exon13	TGCATGACACCAAGTCCTTGA	GGAGCTTCTCTTCTCCTCAACAG
FGFR2 Exon14	GGCCTTTCTTCTGGAACATTCT	CAGCCAGAAATGTTTTGGTAACAGAAAA
FGFR2 Exon14	GTCCAAAGTCTGCTATTTTCATCACATTG	TTTGTCTGGCGGTGTTTTGAAAT
FGFR2 Exon15	GTGAAATGCAGCAGCCACTAAA	CAGTCAAGTGGATGGCTCCAG
FGFR2 Exon15	TGAGTGTATACTCTATCAAACAGGGCTT	AGCCCTATTGAGCCTGCTAAGATA
FGFR2 Exon16	CCAGAGAGCTTCAGCCATTCTT	CACAGAATGGATAAGCCAGCCA

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
FGFR2 Exon16	CCTTACAGTTCGTTGGTGCAGT	GCCGTGCTTTCTCCTTTTGTG
FGFR2 Exon17	AAAGAATAAACAAGACCACAGACTCC	GAAGACTTGGATCGAATTCTCACTCT
FGFR2 Exon17	AGGAAGTTCTTACCTCATTGGTTGTG	CCACGTACCCAGTGCATATGAAATTAA
FGFR3	GGTGTCCCTGGAGTCCAAC	GCCCTCAGCACCCTGA
FGFR3	CTCGGGTCATGGCCTTCA	GCCGTTCTTCAGCCAGGAG
FGFR3	GTCTGAGGAGCCCGTGC	TGCAGGTGTCGAAGGAGTAGT
FGFR3	TGGTGTCCCTGTGCCTACCA	TGAAGCCTCTCCACCTCTCC
FGFR3	GCTTCTTCTGTTTCATCCTGGTG	CAGCTCAGAACCTGGTATCTACTTT
FGFR3	GACGTGCACAACCTCGACTA	CTCGGTCAAACAAGGCCTCA
FGFR3	CGAGTACCTCTGTGAGCCA	CTTGGAGCTGGAGCTCTTGT
FGFR3	CCTTCAGGCTGTTCCCGAATAAG	CGGTGGACGTACGGTAAG
FGFR3	GGTGCCTGCCTCATGGTT	CAGCCCTGTGCCATCCT
FGFR3	GCTGCCTCCGCTCACTC	GCCGGATGCTGCCAAACT
FGFR3	ACGGCACACCCTACGTTAC	CCAACCCCTAGACCCAAATCCT
FGFR3	GCCTGGCGGGCAATTCTATT	CGGCCGTAAGTCACAGGATTC
FGFR3	GAGGTGGCTGTGCGAAGA	GTCCCCTGAGGAGCTGGA
FGFR3	GCTCCTGGGTGTGGTTTCTAC	GAAGATCTCCAGAGCAGGAC
FGFR3	CTGTACCCTGACCGTGAA	CATCATCTCCATCTCAGACACCAG
FGFR3	GCCCCTGAGCGTCATCT	TCACTGTACACCTTGCAGTGG
FGFR3	CGCGTACTGTGCCACTTC	CCATTTGGGCAGCACTTCCT
FGFR3	ACAGACGATGCCACTGACAA	GCCGCTACCGCACCTAC
FGFR3	CAACCCCACTCCCTCCAT	GTGAGTGAGCGGAGGCA
FGFR3	GGGTAACCTGCGGGAGTTT	CTTCTGGGAGGCCAAGTACTC
FGFR3	GGCCTCAACGCCCATGT	GGAGCCCAGGCCTTTCTTG
FGFR3	GGAGAGGTGGAGAGGCTTCA	CTCACGTTGGTCGTCTTCTTGTA
FGFR3	GCAGGTTGGGCATTGGTT	CTGGCCTGAACCCTGGAC
FGFR3	CTGAGCCGGGTCTCTTGTC	TCGGCCACGCCTATGAAATT
FGFR3	GGAGGACCTGGACCGTGT	CCCACACCTCAGCACTCT
FGFR3	GCCCACTGTCTGGGTCA	CCTGTCACCCGCACACT
FGFR3	CCTGCGTCGTGGAGAACA	GGGCAGATGACGCTCAGG
FGFR3	CCTTCCACACCCTCCCA	CGCCTCCACCCTGAAG
FGFR3	CGAGTTTGCACACTCATGGT	CCCTCCTCACCTTTCAGCATC
FGFR3	CCTATCGCTCTGCTCTCTTTGTA	ACGCAGAGTGATGAGAAAACCC
FGFR3	CGCCTTTCGAGCAGTACTCC	GCTAGGGACCCCTCACATTGT
FGFR3	CCCTGCAGCTGGTCCTTT	GCCAGGGATGCCACTCAC
FGFR3	TCATTCAATGCTGGTGAAGTCA	GGTGTGTTGGAGCTCATGGAC
FGFR3	GGCAGCGACGTGGAGTT	ACGGTGGCCACCTTGA
HER2 Exon19	GCTCTTCTCACTCATATCCTCCTCTT	TCCTTCTGTCTCCTTAGCAG
HER2 Exon20	GTGGTCTCCCATACCCTCTCA	GTCTAAGAGGCAGCCATAGGG
HER2 Exon20	CAGCTGGTGACACAGCTTATG	CCTAGCCCCTTGTGGACATAG



## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
HRAS Exon2	CGCCAGGCTCACCTCTATAGT	CAGGAGACCCTGTAGGAGGA
HRAS Exon3	GGATGTCCTCAAAGACTTGGTGTT	CTGCAGGATTCTACCGGAAG
KEAP1	CGATGTCATTCCGGTCCACCT	CAGCTGCATCTCTCTCTTTCTGT
KEAP1	GCTACGAAAGTCCACGTCTCT	CTTCTCTGCATGGTGCCTTTA
KEAP1	CTGGTGCAACTCCACACAG	CCATCTCCATGGGCGAGAAG
KEAP1	ACCTCCGCCTTGCACTC	GGTGGTGTGCTTATCTTCTGGAA
KEAP1	GAAGAATACCCGGATCTCAGTGT	TGCCCCGTAACCGCATC
KEAP1	CCGCTTCGGATGGTGTTTATT	TCCTCAATCGTCTCCTTTATGCC
KEAP1	TCCTCGAAGATCTTGACCAGGTA	CATCAACTGGGTCAAGTACGACT
KEAP1	GTCGGGCGAGTTGTTTCT	GCTACTTCCGACAGTCGCT
KEAP1	GCTGATGAGGGTACCAGTTG	CGGTCCTGCTTGGTGAGG
KEAP1	GCAGCCCGTTGGTGAACAT	TCATACCAAGCAGGCCTTTGG
KEAP1	CATTGGACTGTATTTTTGCCAAGA	AGTGTTACGACCCAGATACAGACA
KEAP1	GCAGTCCACAAAAGATGGGCTA	GAGCGCTACGATGTGGAAAC
KEAP1	CAGTGATGAGCACTCGTCCAT	CAACTTCGCTGAGCAGATTGG
KEAP1	GCCGCAGCTCGTTCATGAT	GGTGATGTACGCCTCCACT
KEAP1	GCATAGATGTGCCATCGATGA	GTGGGCGGGCTGTTGTA
KEAP1	GGGTTGTAAGCCTCCAGGTA	ACTCCCGCTGCAAGGAC
KEAP1	GTTTCATGACGTGGAGGACACA	CTCATCCAGCCCTGTCTTCAAG
KEAP1	GACGTAGAACCCTCGCTGTT	GGAGTCTTCAACCTGTCCCA
KEAP1	GCGGTTTGTCCCGTCAAAG	TGGCCATTGTCCCATTTTTCTTA
KEAP1	CTGTGGTTACCCAGCATGAG	AACGAGTGGCGAATGATCACA
KRAS Exon2	AAAGAATGGTCTGCACCAGTAA	AGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAA
KRAS Exon2	CCAGCTCCAACCTACCACAAGT	CTGGTGGAGTATTTGATAGTGATTAACCTT
KRAS Exon3	TTCAATTTAAACCCACCTATAATGGTGA	ACAGCAGGTCAAGAGGAGTACA
KRAS Exon3	ATGTACTGGTCCCTCATTGCAC	TCCAGACTGTGTTTCTCCCTTCT
MAP2K1 Exon1	GGAGTACTTCTTTGGGTTGACTTCT	TCAGTTCTCCACCTTCTGCT
MAP2K1 Exon1	CTTGAGGCCTTTCTTACCCAGA	CAATTACCTGTTAATCAAGGCAAACCTCA
NFE2L2	GAGATTCATTGACGGGACTTACATAGA	CCACATTCCCAAATCAGATGCTTT
NFE2L2	GGCTTCTGGACTTGAACCAT	CCTGAAGATAATGTGGGTAGGGAGTTTA
NFE2L2	TCTGGCTTCTTACTTTTGGGAACAA	TGACAAAAGCCTTCACCTACTGAAAAA
NFE2L2	GGTTTTCCGATGACCAGGACT	AGATAGTGGCCCTGGAAGTGT
NFE2L2	AGGAATGGATAATAGCTCCTCCCAA	CCCAGTCTTCATTGCTACTAATCAGG
NFE2L2	TGAGCAGCCACTTTATTCTTACCC	TCTCCATATCCCATTCCCTGTAGAAAAA
NFE2L2	GTGTTTTCTTAAACCTGCCATAACTTTC	GCCTTTTTCGCTCAGTTACAACCTAGAT
NFE2L2	CTCTTTCCGTCGCTGACTGA	AAACATGAGCTCTCTCCTTCTTTTT
NFE2L2	CACACTGGGACTTGTGTTTAGTG	CCTCACCTGCTACTTTAAGCCAT
NFE2L2	TGTGTTGACTGTGGCATCTGAA	CTCAATGGAAAAAGAAGTAGGTAACCTGT
NFE2L2	CCGCGGTTCCCTAGCTC	ACACACGGTCCACAGCTC

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
NFE2L2	AGCACCTCCAATCCTTCCTA	GTATGCAACAGGACATTGAGCAAG
NFE2L2	GCAGTCATCAAAGTACAAAGCATCTGA	ACATCAATTATTGAATATTTAGCTTGGCAATGG
NFE2L2	GCATTTACATCACAGTAGGAGCTT	CAAACAAGAGATGGCAATGTTTTCC
NFE2L2	CTTCGAGATATAAGGTGCTGAGTTGT	CTCAGAATTGCAGAAAAAGAAAAGCTGGA
NFE2L2	CCTCAAAAGCATTAAAGAAAATGTGGACT	TGAAAATGACAAGCTGGTTGAGACTA
NFE2L2	CAACAGAAGTTTCAGGTGACTGAG	CCTGTTGGTGGAAAGACTCATAAATCA
NFE2L2	TTGAAGTCAACAACAGGGAGGTTAAT	CACACCAGAGAAAGAATTGCCTGTA
NFE2L2	CTGGTGTITTAGGACCATTCTGTTTG	TCAATGATTCTGACTCCGGCATT
NFE2L2	GCCCATTTAGAAGTTCAGAGAGTGA	CAACCAGTTGACAGTGAAGTCAATAA
NFE2L2	ATTGGGAGAAAATTCACCTGTCTCTTC	TTGGAGTAAGTCGAGAAGTATTTGACT
NRAS Exon2	CCACTGGGCTCACCTCTAT	ACCCTGATTACTGGTTTCCAACAG
NRAS Exon3	GGCAAATACACAGAGGAAGCCTT	ACACCCCAGGATTCTTACAGA
p53	CTCTGGCATTCTGGGAGCTT	ACTGCTCTTTTCACCCATCTACAG
p53	GCCACTGACAACCACCTTAA	CGTGTGGAGTATTTGGATGACAGAAA
p53	TCAGCTGCCTTTGACCATGAA	GAGGCCTTGGAACTCAAGGAT
p53	GGGCCTGCCCTTCCAAT	GCAGCCAGACTGCCTTCC
p53	GTGCTTCTGACGCACACCTA	GTTCAAGACAGAAGGGCCTGA
p53	GGGATGTGATGAGAGGTGGAT	CCATCCTCACCATCATCACACTG
p53	GGATACGGCCAGGCATTGAAG	TCATCTTCTGTCCCTTCCAGA
p53	CGCTTCTGTCTGCTTGCTTA	TCCTATCCTGAGTAGTGGTAATCTACTG
p53	GCATCTGTATCAGGCAAAGTCATAGA	TAGCTAACTAAGTTCAGAACACCAACTTA
p53	GACCTAAGAGCAATCAGTGAGGAA	CATCTACAAGCAGTCACAGCAC
p53	CAAGAAGTGGAGAATGTGAGTCTGAG	CAGACCCTCTCACTCATGTGATG
p53	GGCTCCTGACCTGGAGTCTT	CATCTTGGGCCTGTGTTATCTCC
p53	CTGGAGTGAGCCCTGCT	TCCCCCTCCTCTGTTGCT
p53	GATGGGTGAAAAGAGCAGTCAGA	GGGAAGCGAAAATTCCATGGG
p53	GCATTTTGAGTGTTAGACTGGAACT	CCTCAGATTCACITTTATCACCTTCTCT
p53	GCACCTCAAAGCTGTTCCGT	CAAGGGTGGTTGGGAGTAGATG
p53	CGTAGCTGCCCTGGTAGGTTT	CTGAAGACCCAGGTCCAGATG
p53	ACCACCACACTATGTCGAAAAGTG	AGGCCTCTGATTCCTCACTGATT
p53	CGCCTCACAACTCCGTCAT	CTCTGTCTCCTTCTCTTCTTACA
PIK3CA Exon1	CCTTCGGCTTTTTCAACCCTTT	AGGGACAACAGTTAAGCTTTATGGTT
PIK3CA Exon1	CGACCATCATCAGGTGAAGTGT	CTTTATGGTTATTAATGTAGCCTCACGGA
PIK3CA Exon1	ACAACCATACATCTAATTCCTTAAAGTAGTTT	CGGAGGCATTCTAAAGTCACTATCATT
PIK3CA Exon1	TTCTTCAAGATGAATCTTCTTACATTTTCGT	GGTTGCCTACTGGTTCAATTACTTTTAA
PIK3CA Exon2	GCATGCCAGTGTGTGAATTTGAT	AGACATACATTGCTCTACTATGAGGTGA
PIK3CA Exon2	GTGATCTTCCAATCTACAGAGTTCCC	AGTCCTGTACTTCTGGATCTTTAACCAT
PIK3CA Exon2	CTGTGGATCTTAGGGACCTCAAT	ACAGGTAGAAGACTGCACTATAGTAATGA

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
PIK3CA Exon20	ATGTGTTACAAGGCTTATCTAGCTATTC	TGAAATACTCCAAAGCCTCTTGCTC
PIK3CA Exon20	TCGAAAGACCCTAGCCTTAGATAAAACT	CCAGAGTGAGCTTTCATTTTCTCAGTTA
PIK3CA Exon20	TTTGTCTACGAAAGCCTCTCTAATTTT	GATTTATGAAGAGATTGGCATGCTGTC
PIK3CA Exon9	CGAGATCCTCTCTCTGAAATCACTGA	AAACATGCTGAGATCAGCCAAATT
PIK3CA Exon9	TTCTGTAAATCATCTGTGAATCCAGAG	TGAGCTGTTCTTTGTCAATTTCCCTTAA
PIK3CA Exon9	AGAGTAACAGACTAGCTAGAGACAATGAA	GCACTTACCTGTGACTCCATAGAAA
PTEN	TAACCCACCACAGCTAGAACTTATC	TGCCCCGATGTAATAAATATGCACAT
PTEN	TCCAACATTATTGCTATGGGATTTCT	ATCTTTTTCTGTGGCTTAGAAATCTTTTC
PTEN	ACAGTTAAAGGCATTTCTGTGAA	GTAACGGCTGAGGGAACCTCAA
PTEN	ATTTTCTTTCTCTAGGTGAAGCTGTACTTC	ATCAGAGTCAGTGGTGTGAGAATATCTA
PTEN	TGGCTACGACCCAGTTACCAT	CCACTGGTCTATAATCCAGATGATTCTT
PTEN	GCCATCTCTCTCCTCTTTTCTT	GTGACAGAAAGGTAAAGAGGAGCA
PTEN	TGACTTTTTGCAAATGTTAACATAGGTG	AGGTTTCCTCTGGTCCTGGTA
PTEN	AGCGTGCAGATAATGACAAGGAATAT	CATACAAGTCAACAACCCCCACA
PTEN	AACTTTTCTTTTAGTTGTGCTGAAAGACATT	TCACTCGATAATCTGGATGACTCATT
PTEN	AGAATGAACCTTTTGATGAAGATCAGCA	TGTTCTATAACTGGTAATCTGACACA
PTEN	TTACAGTGCTTAAAAATTAATATGTTTCATCTGC	ATTTGACGGCTCCTCTACTGTTTT
PTEN	AAAGTATTCTTTTAGTTGATTGCTGCAT	CCTGTATACGCTTCAAGTCTTTCTG
PTEN	TGTTAATGGTGGCTTTTTGTTGTTTGT	TCTACCTCACTCTAACAAAGCAGATAACT
PTEN	AAGAAATCGATAGCATTTCAGTATAGA	TGGAGAAAAGTATCGGTTGGCTTT
PTEN	CAGTCAGAGGCGCTATGTGATTATTATA	TGGAAGGATGAGAATTTCAAGCACTT
PTEN	GAAAGGGACGAACTGGTGAATGAT	TCTCAGATCCAGGAAGAGGAAAG
PTEN	CGACGGGAAGACAAGTTCATGTA	CTGTCCTTATTTTGGATATTTCTCCCAA
PTEN	TGCAACATTTCTAAAGTTACCTACTTGT	TGGTCAAGATCTTCACAAAAGGGTTT
RB	GTAAGTCATCGAAAGCATCATAGTACT	TTCTGCCAGTTTCTGCTGAAATTTG
RB	TCTTGGACTTGTAACATCTAATGGACTTC	TGGCTAGATTCTTCTTGGGCAAAA
RB	CTGGGAAAATTATGCTTACTAATGTGGTTT	GAGGAAGATTAAGAGGACAAGCAGATTC
RB	CACGAAAAAGTAACCTTGATGAAGAGG	AAGAAACGTGAACAAATCTGAAACACTA
RB	TCTTCATGCAGAGACTGAAAACAA	GAATGTGAGGTATTGGTGACAAGGTA
RB	TCTACTGAAATAAATTCTGCATTGGTGCT	GGAATTTAGTCCAAAGGAATGCCAATT
RB	CCTTTAGCAAACCTTCTGAATGACAACAT	CTCTCCCCGACCAAAGAA
RB	CATTTTTAGGAAGTACATCTCAGAATCTTGATT	GCCTTCTGCTTTGATAAAACTTTTCGAT
RB	AGTAGAATGTTACCAAGATTATTTTGACCTA	CCGTGCACTCCTGTTCTGA
RB	GTGGTTCTAGGGTAGAGGTAACCTT	AAGAAAATACTCACCCGAATGATTCA
RB	GCGCTCCTCCACAGCTC	TGCTCTGGTCCTCCTCA
RB	ATTGATACCAGTACCAAAGTTGATAATGCT	TCCCAGAATCTAATTGTGAACAATGACA
RB	TCACAGTAGTGTATGTGCAAACCTATTGA	TGCAGTAAAATCAGGTTCTTCTGTTTCT
RB	CAACTTACCCAGTACCATCAATGCT	GACAATGAATCCAGAGGTGTACACA
RB	GCCAACCTGAAATGAAGACTTTTCT	GAAAGAGAGGTAGATTTCAATGGCTTCT
RB	TGTGAACGCCTTCTGTCTGAG	AAGTAGGGAGGAGAGAAGGTGAAG

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
RB	CATGTATGGCATATGCAAAGTGAAGAAT	AGATCAAATGAATTACCTATGTTATGTTATGGA
RB	AACCTGAGGTTGCTAACTATGAAACACT	CCTTCAGCACTTCTTTTGAGCAC
RB	AATACAGTTTTAACATAGTATCCAGTGTGTGAA	CAACTGCTGCAATAAAGATACAGATTCC
RB	GGGACAGGGTTGTGTCGAAAT	GCAGCAGGGATATAGTATCTGACAGTA
RB	AGAAGGCAACTTGACAAGAGAAATGATA	ATTTGTTAGCCATATGCACATGAATGAATTT
RB	CAGAATCTTAGTATCAATTGGTGAATCATTCCG	TAAAATTCTATGCAATATGCCTGGATGA
RB	CAGGAAGAAGAACGATTATCCATTCAA	CGCACGCCAATAAAGACATATGAA
RB	CGACATTGATTTCTGTTTTTACCTCCTA	ACAATGAATTCAAGTTACCTGTGATCCA
RB	GAACAAAACCATGTAATAAAATTCTGACTACTT	CCTACCTCCTGAACAGCATGAG
RB	CAGAACAGGAGTGACCGGATA	TTGTTAGGGAGAAGTTACATCTAAATCTACTTT
RB	TGAGACAACAGAAGCATTATACTGCTTT	CTGGAGTGTGTGGAGGAATTACATT
RB	ACAGTAAAAATGACTAATTTTTCTTATTCCCAC	GGAAAAGGGTCCAGATGATATGTTCTAA
RB	CGTCATGCCGCCAAAA	CGGCTCTGCTCGCTCAC
RB	ACCTTTCTACTGTTTTCTTTGTCTGAT	GAATCCATGGGAAAGACAAATCTGTTC
RB	CTCACATTCTCGAAGCCCTTA	ACTACTTCCCTAAAGAGAAAAACACACAC
RB	TGCGATTTTCTCTCATACAAAGATCTGA	TGGTTCTTTGAGCAACATGGGA
RB	TCATTTGGTAGGCTTGAGTTGAAGA	TCCACAGATGAAACTTTCTCCCAAG
RB	GATGGTATGTAACAGCGACCGT	GCTACTGGAAAACATTCAAAACTGGTT
RB	CTGTTCTTCTCAGACATTCAAACG	CCTGGTGGAAAGCATACTGCAAAATAT
RB	GTTCCAGGGAGGTTATATTCAAAGAA	CGTTTTCTTTTATGGCAGAGGCTTATAT
RB	GAGAAGGACCAACTGATCACCTT	AATCTATTTGCAGTTTGAATGGTCAACA
RB	GTCATAATGTTTTCTTTTTCAGGACATGTGA	AGCCTGCTATAATCGATCAAACCTAACC
RB	CAGTAAACATCTCCAGGAGAGTC	AACAAACCTGCCAACTGAAGAAATTATA
STK11	CCACTGCTTCTGGGCGTTT	GCAGGTCCCTCAAGTACGG
STK11	CCCTTAGGAGCGTCCAGGTAT	CTCTTGCCCGTTCTGACT
STK11	GACACCTTCTCCGGCTTCA	GTGGCCAGAGAGGGTCT
STK11	CCAGGTCCCTGTGGCTCT	CGCCTCTGTCCGTTCA
STK11	CAAGATCCGCCGGCTGT	TGACTAGCGCGGGCTATG
STK11	AGGAAATGCTGGACAGCGT	TCAATGAATATCAGGACAAGCAGTGT
STK11	CCCGCAGGTACTTCTGTCA	CCCCTAGCACGTGCCTAC
STK11	GCTGGTGGATGTGTTATACAACGA	CGTGTGCCAGTCTCCTTCAAG
STK11	AAATTTTGGAGAAGGGAAGTCGGAA	GGTGGATGAACGTGTCCATACC
STK11	GGGAAGGCTCTTACGGCAA	ACCCAGCAAGCCATACTTAC
STK11	TGGCGCAGCATGACTGT	CTGGCCGAGTCAGCAGAG
STK11	GCTTCTCCTCAGGGATGCTT	TCTAGCGCCCGCTCAAC
STK11	CCCCAAGGCCGTGTGTA	CAGCCTCACTGCTGCTTG
STK11	TCCCTCCAGAGCCCCTTTT	GCACACTGGGAAACGCTTCT
STK11	GTGCCTGGACTTCTGTGACTT	GTACTIONCAGCCGTCAATCAG
STK11	CCTTTCTTCCCTCCCCTCGAA	AGAGGGATGAGGCTCCCA
STK11	CAGGCCATCATCCTGACGTT	CCGGAAAGGATATATTTTCTGCTTCTCT
STK11	GGAGGGCGAGCTGATGTC	GAGTCCAGCACCTCCTTAC
STK11	CTCCCTGAGGGCTGCAC	GCCGACCAGATGTCCACCTT
TSC1	CTGGGAACAATGTCATCAGTGG	ATCCTGACCACCTTGAAGAG

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
TSC1	CAGCTATAAAAAGTCTACATGTCCATTCC	GACATTTTTGGCCGTCTGTCA
TSC1	GAGTGCTTCCAAGTGGACTGA	ACTGGATCCAAGGACCATGAAC
TSC1	TCCAGAGACAAAGTTGCAAAACAGATAA	CAGAAGCCTCATATGAAGATGGCTAT
TSC1	GGAACCATGTGGGCTGGATT	GCTGCAAATAAAAAGTCCAGATACGTTTT
TSC1	ATGGCAGCATTATGTTCTCTCA	TTGCTTTTACTGCACAACCAGTTAC
TSC1	GGTCAGTTTTATCAACTCATAGCAATC	TGACTTCAGTTGTCTTTGTTTCTCTTCA
TSC1	TCTTCCTCTGTGTTTCTTTTGCTT	TCACTCCCAGTCCTTGTAATAATCC
TSC1	AGCTTCCTTGCTTTAAGTTGCC	CATCTTGAAGCATAAGCTCTCTCA
TSC1	GTCTATGGGAGTAAAGGCTTGCT	CCCTTTTACCGAGACAGTCTCC
TSC1	CCAACCTAAGACATACATACCAGTTGT	CCACTGCTGATGTACTTTATTAACTTCC
TSC1	TCAAATTTCCCTGTCTGCCGTTA	TCCTTTTGCCTTCTCATTACAGTATGA
TSC1	TGCAAGTTAACTGATTGACCATCAT	AAAGACAGAACTGGGCAAAGACTT
TSC1	GTGGCTCTAAAAGTCAATCTCTTTTCT	AGAATGGCCCAACAAGCAAATG
TSC1	ACTGCCGCTCCGTCTTTTAG	AACTGCAGAACAAGCACTCAGA
TSC1	CAGACGAGCTGGATCGCA	GTTTCATATGTTCTGCCCTTGTCTCT
TSC1	GCAGATTCAGGTCTGCCTCAT	CTCAAATTCATGTCCACGTCTCT
TSC1	GCCTGGAGTTTGACATCCTCTAGATAT	CGCCTATCGAAAGAGCTAGAAAAA
TSC1	CGAAATAACTCTCGAGCCTTCATACC	GCGAGCTTCTACCCAGAGA
TSC1	TCTTGGTCTCACCGTTGTGG	AGTCCAATCACCAGCTCCTTTTT
TSC1	CTGCTTCTGCTTTTTCTTCTTCAAGT	CTATATTCTGGCTGGTCTGTATCTTTCA
TSC1	TCCTGGAGCTGATTGTATCTAGCTT	GTTGGAAGACAGCTAAAATGATGACATT
TSC1	GGTCTCCGCTGAGAACCTG	CCATTTCTTTGTTTCTCTCTTCTCT
TSC1	ATAACCCAATTAGAAGAGGCAAGCA	ACATGTGCAACATTTTTCGTCTTGT
TSC1	CTGCAGCTGTCCTCTGAAAGAT	AGACCACCTTCTTTTGAACAGA
TSC1	AAGCCCCAGGGATTTGCAATA	CACACCCTTACAGTAAAGTCTTTGGT
TSC1	GCTGAGATTTGGTGAGACACAGA	GTTTGCAATTTCTGACTTTTATTGCATT
TSC1	TGGTTTTCTCAGGCACCATGA	CGTTTTCTGTTTGACCTTTTCTCC
TSC1	CGGCTGCTGTGCTTTATAAGCTA	GGTGATCAAAGCAGCAGCTC
TSC1	CCCTGGCATACCTTTGTGGTA	TCGGATTTTTCACTTTGCTCATGTTTTT
TSC1	GCTGCCTCTAAAACGCTCATAGA	CATCTGTAAGGCAATTTCTGCCA
TSC1	TCAGCCATTACCTTGTCATGTGG	AGTATCATCCATTGCCCTTTTCTTGATT
TSC1	ATGGACCATTTAACACAGAAGAGAGTG	AGGAAGACTGAGGAGCTGTTAAAGA
TSC1	TTAGTAAAGAAGGCAAAGAGGTGCT	GACTGCCCTTGTCTTTTACATTTTCA
TSC1	CCCCTCTCGTCGGAGGT	TTGGCCTGACACACCAA
TSC1	ACTTCTTCAAAAAGTCTCCAGTTTTCTT	CTCTTCTCAACGGTTTCTTTTCTA
TSC1	GGAGTCCAGCATGGCAAGAAG	GGTAGTGGCCCAATGAAGAA
TSC1	GAGAGCAGGCACACTAGTTGA	CCCCTGTGTTCTTCTCTTCCA
TSC1	GCTGGAGAACATGGCTTCTGTT	CCTTCTCAGTCCTTCTTACATTGTCTTT
TSC1	CTAGTTTCTATACCTTCGAGGGTCCA	GTTCCACAAACATTACGCCCTTTATAAT
TSC1	GGGAATCTTGGCTTCCACACC	GGGCTCACTTCCAGTTCAAAA
TSC1	CCCACCGACTGCTGAATGG	GGCACAATGAAGAGGCATCTG
TSC1	CAGCCTGTCTAGTCAGCAGTAA	GGAGAAAGATGGCCTCTGAAAAA
TSC1	TGCCTGGTGTGTCAGTTTATA	TGGAAGTTAGTCTGCAGAAAGAAC

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
TSC2	CCCTCCGTCCCATAGCAAA	TGACAGGCAATACCGTCCAAG
TSC2	GTGACGGGTTTGGACACACT	GAATTTGACCAAGTTCACCAGCA
TSC2	TGTCCACGTGATCGTCACC	GCTCTTGGCGCCACACT
TSC2	GCAGAGGTGTTGCTCAGATGT	TCCCAACAGAATCTTAAACTTCTCCTTC
TSC2	CACTTCAGGGACTTCTTGGCA	GAAGGTCTTCGTTGGAAGGGTAA
TSC2	CGAAACCTGAGAAGGCCTCA	GTGGGTGACTGGCAGAAAGAT
TSC2	GGGCAACACCGGCTCTT	GTGCCAGGCAAGGCTACA
TSC2	TCTGTGGACCTCTCCTTCCA	AGCACTTTCCTCGTCCAG
TSC2	CATGTCCGAACGAGGTGGT	GCTGAAGGAGCCGTTTCGAT
TSC2	CGAGGTTACACCATCTCCGACT	CCGCAGGAGAGGTGTCA
TSC2	GAACACCAGCTGGCTGATGA	GGCACCGACAGTGACTTG
TSC2	GTGTTATTGACGTCATAGAGTGACTAGA	GCACTGACCTCTATGTCCACA
TSC2	GCCCCTGACACGCATTGT	GCAAGGGACACTGGAGCTG
TSC2	GGCAACGACTTTGTGTCCAT	CTCCTCGTGACCGAAGCTC
TSC2	CACCCTGTGCGTGGGATT	CCTGTGTGGAGGTGGCT
TSC2	GTCTGGACATGATGGCTCGATAC	CTAGAAGACAGGGAGCGTGAAA
TSC2	GAGATGCTGGTCAGCCACAT	TCTGCAGCTTCCAGGAACC
TSC2	GGCCTGAGGTGTCCTGTCT	CAGGCAGCGCCTTGATG
TSC2	CTAGCTTCCGCCTCTGTCT	GCTGGTCCACACTGCAAGG
TSC2	GTGTGTAAGTCTGGCCTTCTC	CAGAGGCCTCGTGCAGAA
TSC2	TGAGCACTGGCCCTTTTT	GAATAGTCTACGTGCCTCTCTAGTA
TSC2	CCAGCCGGACAAGGTGTA	GGTAGCAGGACTGGATGGGA
TSC2	CGGTTCCCTGAGGAATTGGAAGT	CTTTCGGACCTGGTGGTCTT
TSC2	GTGGAAGTCAGCCTGTGTCAT	GCACATCTCTCCACCAGTTCAAAG
TSC2	CCGTGGCCTTCTCTCCTCT	GCTCCGCGGCAAAGTTC
TSC2	CCCTTCTTTGGCGACGAGT	CTGCCACAGGGAGCTTAGG
TSC2	GCCCGGAGTACTAGTCTCAAC	GACCCATTTCCACTCACTGACTT
TSC2	CCCTGGGATGGAGGACAGAT	GGAGCGACTTCTCCTCCTG
TSC2	TGGAGTCGTGCGGTTTCAG	ACATCCCTCAGACATGCAAACAG
TSC2	CTTGTCTGCCTCAGGGATCAG	CGTGTACCTGTAGGAGCCAT
TSC2	GCAGCATCAGTGTGTCTGAACAT	GCAGACGATGAGGTCATGCAA
TSC2	CCGACATCTGTGTTGCCATCA	CTGGAAAGGCCTAGAAATGCCA
TSC2	CCCAGGTGCCACCTGAT	CGCTGAGGGAGCCCCATA
TSC2	GTTTCCCTGCTGCCAGGAT	CCTTACCGGCCCTGAG
TSC2	GGAGAGGTTTTCATGCCTGGATT	GTTTTGTCCAGGTAGTTATGGTAAGAGAT
TSC2	CCTCCTCTGCTGACGTG	ACAGCACCTATGAGGCAGAGT
TSC2	GCTTCTGCAGGGAGCCA	GCCCCACTCACCTGCTT
TSC2	CCAACAAGCAAAGATTGAGGCTT	CAAAGACACAGGTAGCTCACTCA
TSC2	TTGTCTCGGAATTCCTTCTGG	AGGACCATTATCAGAACAGGATCTCAA
TSC2	CGGGACACAGCCCTGTA	GCCACATTGCCGTCACC
TSC2	GAGGGCCTCAGCACTGG	CTCACCGGAGTCATTGTAGACA
TSC2	GGACAAGGGTGTGTCTTAGG	CTGTGCTTGTAGTGGAGCTGA
TSC2	CCCTCTTCTTAAGGTCATCAAGGA	TGATCGTCAAGGCCAGAGAAAC

## 7 Anhang

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
TSC2	GTTCTTGGAGAGCACATCCTCA	GTCGCCCTGGGCCTTAC
TSC2	CTCAGGCAGGGCTCTGT	GCCCTGTCCAGGCACCTA
TSC2	GCTCACATTCCGTCTCTCTGG	AGAAACCGCCTTACCTGGTAAAA
TSC2	CGTGGAGATGCCTGACATCAT	GTTACACAGCCCGAACCTCT
TSC2	TCGCCATCCTGTCCAATGAG	CCTCACCACACACGTCCAG
TSC2	GCAGTGTGGCGCCAAGA	CCAGCTCACGCCTGGAC
TSC2	TGCGCTATAAAGTGCTCATCTTTACTT	AGAGGCTCGCAGTCTTTTGG
TSC2	CCACGGGTCTCAGGAGAGATA	CTCAGAAAGCTGCACTTCACC
TSC2	CTCCACATCCCCGAGGATA	CGGGTACAACGGCTCTCA
TSC2	GCTGTTTGCATGTCTGAGGGAT	GGTCTTCTTCTCAGAGCCTCTCT
TSC2	GATGGCCAGGCTCTGTGTT	GCAGCAGGATTGGCTTGTTT
TSC2	CATCGTGGTCTGAGGATTGT	GGCTGAGCGGGTTCTCC
TSC2	GGTTCCAGTGCTGACAGCATTAA	GGCAGAAACTCGTTTATGAGAAAAATGT
TSC2	AGCTCTGTGCCCTGTGTG	AGCACGTCCAGCACCTT
TSC2	CGTCCTGCTGCAGTGCTT	AGGCTCAGCTCTGAGGGA
TSC2	AGCCCCGTCTGTGTCTT	CAGGCTCTGAGCCACACT
TSC2	CCACGCCTCCCAGACTTA	GCTCGGCTGGAGTCTGTG
TSC2	GGCTCCTTCTCACCCGATA	CGCTACCTGCGGACCAC
TSC2	GGTCACGGCCTCTCCCT	AGCCGTGAAGTTGGAGAAGAC
TSC2	TGTGGGCGAGTTCCTCCTA	AGGAAAGGAAGGTGCAGTCAC
TSC2	CATGGAGCTGACAGGTGTCTA	CAGGTTGCACTCGTAGTCCAG
TSC2	CCGTCTCCCTCTCCACCA	CTTCCAGAGCAGTTTCAGAAACC
TSC2	GTGCTACTCTCGGTCCCAA	GATGGACAGGACGATCTCATAGGA
TSC2	CTTTCACCATCCTCTTCTGACA	GTAGTCGCAGACGCAGTAGG
TSC2	CCAGTCCTCTGCCCTTTCTT	GTCTTCTCTGACAGGAACC
TSC2	CTCACTGTCTGGGTGTGCTC	GCCGTACCTTTGGGTCTCT
TSC2	GTCCTTTCTAGTCGTCCTCAGTCT	AGAGGAGCTGGACTTGCTCA
TSC2	GCTGCCGCACCTCTACAG	TTTCTGCCGCAAGGCCTA
TSC2	CCCGGTCACAGTCAGGGA	TCTTGCCCTGCGTGATG
TSC2	CGTGGGACATTCTGCTGAACAT	CCAAGGTACCATCTTCTGAGTGG

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Makroskopie und Histologie des myxoiden Liposarkoms .....	2
Abbildung 1.2	Beschriebene Typen von <i>FUS/DDIT3</i> -Fusionstranskripten.....	3
Abbildung 1.3	Prognostische Marker für das krankheitsspezifische Überleben bei myxoiden Liposarkomen.....	6
Abbildung 1.4	FGF/FGFR-Struktur.....	7
Abbildung 1.5	Intrazelluläre Signalkaskade von FGF-Rezeptoren.....	9
Abbildung 3.1	Verdünnung von FGFR-Inhibitoren und Trabectedin für verschiedene Anwendungen .....	47
Abbildung 4.1	<i>FGFR2</i> -Genexpression in myxoiden Liposarkomen.....	55
Abbildung 4.2	FGFR2-Proteinexpression in myxoiden Liposarkomen .....	56
Abbildung 4.3	FGFR-Proteinexpression in MLS-Zelllinien .....	57
Abbildung 4.4	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung von FGF-Rezeptoren in myxoiden Liposarkomzellen .....	58
Abbildung 4.5	Knock-down von FGF-Rezeptoren in MLS-Zelllinien.....	59
Abbildung 4.6	Apoptoseinduktion durch FGFR-siRNAs in MLS 402 Zellen .....	60
Abbildung 4.7	Apoptoseinduktion durch FGFR-siRNAs in MLS 1765 Zellen .....	61
Abbildung 4.8	Reduktion der Viabilität von MLS-Zellen durch FGFR- Inhibitoren .....	62
Abbildung 4.9	Apoptoseinduktion durch FGFR-Inhibitoren in MLS-Zelllinien.....	63
Abbildung 4.10	Auswirkung von FGFR-Inhibitoren auf den nachgeschalteten Signalweg.....	64
Abbildung 4.11	Auswirkung von FGFR-Inhibitoren auf die Migration von MLS- Zelllinien .....	65
Abbildung 4.12	Effekt von Trabectedin auf die Viabilität von MLS-Zellen .....	66
Abbildung 4.13	Kombinationsbehandlung mit FGFR-Inhibitoren und Trabectedin .....	68
Abbildung 4.14	Relative Expression von FGF-Rezeptoren in Sarkomzelllinien .....	70
Abbildung 4.15	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung von FGF-Rezeptoren.....	71
Abbildung 4.16	Einfluss von BGJ398 auf die Viabilität von Sarkomzelllinien.....	73
Abbildung 4.17	Differentielle Aktivität von microRNAs.....	74
Abbildung 4.18	Differentielle microRNA-Expression in myxoiden Liposarkomen.....	75



Abbildung 4.19 Einfluss von microRNA-Imitatoren auf die Viabilität von myxoiden Liposarkomzellen .....	76
Abbildung 4.20 Funktionelle Effekte von microRNA-Imitatoren auf MLS 402 Zellen .....	77
Abbildung 4.21 Funktionelle Effekte von microRNA-Imitatoren auf MLS 1765 Zellen .....	78

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Laborgeräte .....	18
Tabelle 2.2	Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 2.3	Chemikalien und Reagenzien.....	21
Tabelle 2.4	Reaktionskits .....	23
Tabelle 2.5	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur .....	27
Tabelle 2.6	Primer .....	27
Tabelle 2.7	siRNA .....	29
Tabelle 2.8	microRNA .....	29
Tabelle 2.9	FISH-Sonden.....	29
Tabelle 2.10	Tyrosinkinaseinhibitoren und Trabectedin .....	30
Tabelle 2.11	Antikörper .....	30
Tabelle 2.12	Zelllinien .....	30
Tabelle 2.13	Patientenkollektiv.....	31
Tabelle 2.14	Software und Datenbanken .....	32
Tabelle 3.1	Kultivierungsbedingungen .....	45
Tabelle 3.2	Volumina für die transiente Transfektion in verschiedenen Formaten .....	46
Tabelle 3.3	Bedingungen für die verschiedenen Primärantikörper im Westernblot .....	51
Tabelle 4.1	Überexpression von Mitgliedern der FGF/FGFR-Familie .....	56
Tabelle 4.2	Kombination von FGFR-Inhibitoren und Trabectedin .....	66
Tabelle 4.3	IC <sub>50</sub> -Werte der FGFR-Inhibitoren in verschiedenen Sarkomzelllinien .....	73
Tabelle 7.1	Primer für die Parallelesequenzierung.....	98

## 10 Literaturverzeichnis

- Adams, B. D., A. L. Kasinski, und F. J. Slack. 2014. Aberrant Regulation and Function of MicroRNAs in Cancer. *Curr Biol* 24 (16):R762-R776.
- Akao, Y., Y. Nakagawa, und T. Naoe. 2006. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep* 16 (4):845-850.
- Allerstorfer, S., G. Sonvilla, H. Fischer, S. Spiegl-Kreinecker, C. Gauglhofer, U. Setinek, T. Czech, C. Marosi, J. Buchroithner, J. Pichler, R. Silye, T. Mohr, K. Holzmann, B. Grasl-Kraupp, B. Marian, M. Grusch, J. Fischer, M. Micksche, und W. Berger. 2008. FGF5 as an oncogenic factor in human glioblastoma multiforme: autocrine and paracrine activities. *Oncogene* 27 (30):4180-4190.
- Aman, P., D. Ron, N. Mandahl, T. Fioretos, S. Heim, K. Arheden, H. Willen, A. Rydholm, und F. Mitelman. 1992. Rearrangement of the transcription factor gene CHOP in myxoid liposarcomas with t(12;16)(q13;p11). *Genes Chromosomes Cancer* 5 (4):278-285.
- Ambros, V. 2001. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell* 107 (7):823-826.
- Antoine, M., W. Wirz, C. G. Tag, M. Mavituna, N. Emans, T. Korff, V. Stoldt, A. M. Gressner, und P. Kiefer. 2005. Expression pattern of fibroblast growth factors (FGFs), their receptors and antagonists in primary endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Growth Factors* 23 (2):87-95.
- Antonescu, C., und M. Ladanyi. 2002. Myxoid Liposarcoma. In *Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone*: World Health Organization (WHO), 40-43.
- Antonescu, C. R., A. Elahi, M. Humphrey, M. Y. Lui, J. H. Healey, M. F. Brennan, J. M. Woodruff, S. C. Jhanwar, und M. Ladanyi. 2000. Specificity of TLS-CHOP rearrangement for classic myxoid/round cell liposarcoma: absence in predominantly myxoid well-differentiated liposarcomas. *J Mol Diagn* 2 (3):132-138.
- Antonescu, C. R., S. J. Tschernyavsky, R. Decuseara, D. H. Leung, J. M. Woodruff, M. F. Brennan, J. A. Bridge, J. R. Neff, J. R. Goldblum, und M. Ladanyi. 2001. Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. *Clin Cancer Res* 7 (12):3977-3987.
- Baird, K., S. Davis, C. R. Antonescu, U. L. Harper, R. L. Walker, Y. Chen, A. A. Glatfelter, P. H. Duray, und P. S. Meltzer. 2005. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer Res* 65 (20):9226-9235.
- Ban, J., G. Jug, P. Mestdagh, R. Schwentner, M. Kauer, D. N. Aryee, K. L. Schaefer, F. Nakatani, K. Scotlandi, M. Reiter, D. Strunk, F. Speleman, J. Vandesompele, und H. Kovar. 2011. Hsa-mir-145 is the top EWS-FLI1-repressed microRNA involved in a positive feedback loop in Ewing's sarcoma. *Oncogene* 30 (18):2173-2180.
- Barretina, J., B. S. Taylor, S. Banerji, A. H. Ramos, M. Lagos-Quintana, P. L. Decarolis, K. Shah, N. D. Socci, B. A. Weir, A. Ho, D. Y. Chiang, B. Reva, C. H. Mermel, G. Getz, Y. Antipin, R. Beroukhim, J. E. Major, C. Hatton, R. Nicoletti, M. Hanna, T. Sharpe, T. J. Fennell, K. Cibulskis, R. C. Onofrio, T. Saito, N. Shukla, C. Lau, S. Nelander, S. J. Silver, C. Sougnez, A. Viale, W. Winckler, R. G. Maki, L. A. Garraway, A. Lash, H. Greulich, D. E. Root, W. R. Sellers, G. K. Schwartz, C. R. Antonescu, E. S. Lander, H. E. Varmus, M.

- Ladanyi, C. Sander, M. Meyerson, und S. Singer. 2010. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nat Genet* 42 (8):715-721.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116 (2):281-297.
- Bernard-Pierrot, I., N. Gruel, N. Stransky, A. Vincent-Salomon, F. Reyat, V. Raynal, C. Vallot, G. Pierron, F. Radvanyi, und O. Delattre. 2008. Characterization of the recurrent 8p11-12 amplicon identifies PPAPDC1B, a phosphatase protein, as a new therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 68 (17):7165-7175.
- Borjigin, N., S. Ohno, W. Wu, M. Tanaka, R. Suzuki, K. Fujita, M. Takanashi, K. Oikawa, T. Goto, T. Motoi, T. Kosaka, K. Yamamoto, und M. Kuroda. 2012. TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 427 (2):355-360.
- Bovee, J. V., und P. C. Hogendoorn. 2010. Molecular pathology of sarcomas: concepts and clinical implications. *Virchows Arch* 456 (2):193-199.
- Brooks, A. N., E. Kilgour, und P. D. Smith. 2012. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clin Cancer Res* 18 (7):1855-1862.
- Brummer, A., und J. Hausser. 2014. MicroRNA binding sites in the coding region of mRNAs: extending the repertoire of post-transcriptional gene regulation. *Bioessays* 36 (6):617-626.
- Butrynski, J. E., D. R. D'Adamo, J. L. Hornick, P. Dal Cin, C. R. Antonescu, S. C. Jhanwar, M. Ladanyi, M. Capelletti, S. J. Rodig, N. Ramaiya, E. L. Kwak, J. W. Clark, K. D. Wilner, J. G. Christensen, P. A. Janne, R. G. Maki, G. D. Demetri, und G. I. Shapiro. 2010. Crizotinib in ALK-rearranged inflammatory myofibroblastic tumor. *N Engl J Med* 363 (18):1727-1733.
- Byron, S. A., M. G. Gartside, C. L. Wellens, P. J. Goodfellow, M. J. Birrer, I. G. Campbell, und P. M. Pollock. 2010. FGFR2 mutations are rare across histologic subtypes of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 117 (1):125-129.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Alder, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, und C. M. Croce. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (24):15524-15529.
- Calin, G. A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, und C. M. Croce. 2005. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353 (17):1793-1801.
- CancerDiscovery. 2014. FGFR inhibitor works in multiple cancers. *Cancer Discov* 4 (6):626.
- Cappellen, D., C. De Oliveira, D. Ricol, S. de Medina, J. Bourdin, X. Sastre-Garau, D. Chopin, J. P. Thiery, und F. Radvanyi. 1999. Frequent activating mutations of FGFR3 in human bladder and cervix carcinomas. *Nat Genet* 23 (1):18-20.
- Carter, N. J., und S. J. Keam. 2007. Trabectedin: a review of its use in the management of soft tissue sarcoma and ovarian cancer. *Drugs* 67 (15):2257-2276.

- Chen, B., T. Huang, J. Jiang, L. Lv, H. Li, and S. Xia. 2014a. miR-141 suppresses proliferation and motility of gastric cancer cells by targeting HDGF. *Mol Cell Biochem* 388 (1-2):211-218.
- Chen, L., H. Xiao, Z. H. Wang, Y. Huang, Z. P. Liu, H. Ren, and H. Song. 2014b. miR-29a suppresses growth and invasion of gastric cancer cells in vitro by targeting VEGF-A. *BMB Rep* 47 (1):39-44.
- Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, and R. Shiekhattar. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436 (7051):740-744.
- Cheng, A. M., M. W. Byrom, J. Shelton, and L. P. Ford. 2005. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 33 (4):1290-1297.
- Cheng, H., J. Dodge, E. Mehl, S. Liu, N. Poulin, M. van de Rijn, and T. O. Nielsen. 2009. Validation of immature adipogenic status and identification of prognostic biomarkers in myxoid liposarcoma using tissue microarrays. *Hum Pathol* 40 (9):1244-1251.
- Chesi, M., E. Nardini, L. A. Brents, E. Schrock, T. Ried, W. M. Kuehl, and P. L. Bergsagel. 1997. Frequent translocation t(4;14)(p16.3;q32.3) in multiple myeloma is associated with increased expression and activating mutations of fibroblast growth factor receptor 3. *Nat Genet* 16 (3):260-264.
- Coindre, J. M., F. Pedeutour, and A. Aurias. 2010. Well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Virchows Arch* 456 (2):167-179.
- Cole, C., S. Lau, A. Backen, A. Clamp, G. Rushton, C. Dive, C. Hodgkinson, R. McVey, H. Kitchener, and G. C. Jayson. 2010. Inhibition of FGFR2 and FGFR1 increases cisplatin sensitivity in ovarian cancer. *Cancer Biol Ther* 10 (5):495-504.
- Conyers, R., S. Young, and D. M. Thomas. 2011. Liposarcoma: molecular genetics and therapeutics. *Sarcoma* 2011:483154.
- Crozat, A., P. Aman, N. Mandahl, and D. Ron. 1993. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature* 363 (6430):640-644.
- Crystal, A. S., A. T. Shaw, L. V. Sequist, L. Friboulet, M. J. Niederst, E. L. Lockerman, R. L. Frias, J. F. Gainor, A. Amzallag, P. Greninger, D. Lee, A. Kalsy, M. Gomez-Caraballo, L. Elamine, E. Howe, W. Hur, E. Lifshits, H. E. Robinson, R. Katayama, A. C. Faber, M. M. Awad, S. Ramaswamy, M. Mino-Kenudson, A. J. Iafrate, C. H. Benes, and J. A. Engelman. 2014. Patient-derived models of acquired resistance can identify effective drug combinations for cancer. *Science* 346 (6216):1480-1486.
- Dal Cin, P., R. Sciot, I. Panagopoulos, P. Aman, I. Samson, N. Mandahl, F. Mitelman, H. Van den Berghe, and C. D. Fletcher. 1997. Additional evidence of a variant translocation t(12;22) with EWS/CHOP fusion in myxoid liposarcoma: clinicopathological features. *J Pathol* 182 (4):437-441.
- Dalal, K. M., C. R. Antonescu, and S. Singer. 2008. Diagnosis and management of lipomatous tumors. *J Surg Oncol* 97 (4):298-313.
- Davis, I. J., A. W. McFadden, Y. Zhang, A. Coxon, T. L. Burgess, A. J. Wagner, and D. E. Fisher. 2010. Identification of the receptor tyrosine kinase c-Met and its ligand, hepatocyte growth factor, as therapeutic targets in clear cell sarcoma. *Cancer Res* 70 (2):639-645.
- Demetri, G. D., S. P. Chawla, M. von Mehren, P. Ritch, L. H. Baker, J. Y. Blay, K. R. Hande, M. L. Keohan, B. L. Samuels, S. Schuetze, C. Lebedinsky, Y. A. Elsayed, M. A. Izquierdo, J. Gomez, Y. C. Park, and A. Le Cesne. 2009.

- Efficacy and safety of trabectedin in patients with advanced or metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of prior anthracyclines and ifosfamide: results of a randomized phase II study of two different schedules. *J Clin Oncol* 27 (25):4188-4196.
- Demico, E. G., K. E. Torres, M. P. Ghadimi, C. Colombo, S. Bolshakov, A. Hoffman, T. Peng, J. V. Bovee, W. L. Wang, D. Lev, und A. J. Lazar. 2012. Involvement of the PI3K/Akt pathway in myxoid/round cell liposarcoma. *Mod Pathol* 25 (2):212-221.
- Denli, A. M., B. B. Tops, R. H. Plasterk, R. F. Ketting, und G. J. Hannon. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432 (7014):231-235.
- Di Giandomenico, S., R. Frapolli, E. Bello, S. Ubaldi, S. A. Licandro, S. Marchini, L. Beltrame, S. Brich, V. Mauro, E. Tamborini, S. Pilotti, P. G. Casali, F. Grosso, R. Sanfilippo, A. Gronchi, R. Mantovani, R. Gatta, C. M. Galmarini, J. M. Sousa-Faro, und M. D'Incalci. 2014. Mode of action of trabectedin in myxoid liposarcomas. *Oncogene* 33 (44):5201-5210.
- Dodd, L. G. 2012. Update on liposarcoma: a review for cytopathologists. *Diagn Cytopathol* 40 (12):1122-1131.
- Dossi, R., R. Frapolli, S. Di Giandomenico, L. Paracchini, F. Bozzi, S. Brich, V. Castiglioni, P. Borsotti, D. Belotti, S. Ubaldi, R. Sanfilippo, E. Erba, R. Giavazzi, S. Marchini, S. Pilotti, M. D'Incalci, und G. Taraboletti. 2015. Antiangiogenic activity of trabectedin in myxoid liposarcoma: Involvement of host TIMP-1 and TIMP-2 and tumor thrombospondin-1. *Int J Cancer* 136 (3):721-729.
- Drakaki, A., und D. Iliopoulos. 2009. MicroRNA Gene Networks in Oncogenesis. *Curr Genomics* 10 (1):35-41.
- Dutt, A., H. B. Salvesen, T. H. Chen, A. H. Ramos, R. C. Onofrio, C. Hatton, R. Nicoletti, W. Winckler, R. Grewal, M. Hanna, N. Wyhs, L. Ziaugra, D. J. Richter, J. Trovik, I. B. Engelsen, I. M. Stefansson, T. Fennell, K. Cibulskis, M. C. Zody, L. A. Akslen, S. Gabriel, K. K. Wong, W. R. Sellers, M. Meyerson, und H. Greulich. 2008. Drug-sensitive FGFR2 mutations in endometrial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (25):8713-8717.
- Eddy, S. R. 2001. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2 (12):919-929.
- Edris, B., J. A. Fletcher, R. B. West, M. van de Rijn, und A. H. Beck. 2012. Comparative gene expression profiling of benign and malignant lesions reveals candidate therapeutic compounds for leiomyosarcoma. *Sarcoma* 2012:805614.
- Engstrom, K., H. Willen, C. Kabjorn-Gustafsson, C. Andersson, M. Olsson, M. Goransson, S. Jarnum, A. Olofsson, E. Warnhammar, und P. Aman. 2006. The myxoid/round cell liposarcoma fusion oncogene FUS-DDIT3 and the normal DDIT3 induce a liposarcoma phenotype in transfected human fibrosarcoma cells. *Am J Pathol* 168 (5):1642-1653.
- Esau, C., X. Kang, E. Peralta, E. Hanson, E. G. Marcusson, L. V. Ravichandran, Y. Sun, S. Koo, R. J. Perera, R. Jain, N. M. Dean, S. M. Freier, C. F. Bennett, B. Lollo, und R. Griffey. 2004. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem* 279 (50):52361-52365.
- Eswarakumar, V. P., I. Lax, und J. Schlessinger. 2005. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (2):139-149.
- Feng, X., Z. Wang, R. Fillmore, und Y. Xi. 2014. MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Lett* 344 (2):166-173.

- Fernanda Amary, M., H. Ye, F. Berisha, B. Khatri, G. Forbes, K. Lehovsky, A. M. Frezza, S. Behjati, P. Tarpey, N. Pillay, P. J. Campbell, R. Tirabosco, N. Presneau, S. J. Strauss, und A. M. Flanagan. 2014. Fibroblastic growth factor receptor 1 amplification in osteosarcoma is associated with poor response to neo-adjuvant chemotherapy. *Cancer Med* 3 (4):980-987.
- Forni, C., M. Minuzzo, E. Viridis, E. Tamborini, M. Simone, M. Tavecchio, E. Erba, F. Grosso, A. Gronchi, P. Aman, P. Casali, M. D'Incalci, S. Pilotti, und R. Mantovani. 2009. Trabectedin (ET-743) promotes differentiation in myxoid liposarcoma tumors. *Mol Cancer Ther* 8 (2):449-457.
- Fountzilas, E., A. D. Kelly, A. R. Perez-Atayde, J. Goldsmith, P. A. Konstantinopoulos, N. Francoeur, M. Correll, R. Rubio, L. Hu, M. C. Gebhardt, J. Quackenbush, und D. Spentzos. 2012. A microRNA activity map of human mesenchymal tumors: connections to oncogenic pathways; an integrative transcriptomic study. *BMC Genomics* 13:332.
- Freier, K., C. Schwaenen, C. Sticht, C. Flechtenmacher, J. Muhling, C. Hofele, B. Radlwimmer, P. Lichter, und S. Joos. 2007. Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Oral Oncol* 43 (1):60-66.
- Friedman, J. M., und P. A. Jones. 2009. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss Med Wkly* 139 (33-34):466-472.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge, und D. P. Bartel. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19 (1):92-105.
- Friedrichs, N., J. Kuchler, E. Endl, A. Koch, J. Czerwitzki, P. Wurst, D. Metzger, J. H. Schulte, M. I. Holst, L. C. Heukamp, O. Larsson, S. Tanaka, A. Kawai, E. Wardelmann, R. Buettner, T. Pietsch, und W. Hartmann. 2008. Insulin-like growth factor-1 receptor acts as a growth regulator in synovial sarcoma. *J Pathol* 216 (4):428-439.
- Gartside, M. G., H. Chen, O. A. Ibrahimi, S. A. Byron, A. V. Curtis, C. L. Wellens, A. Bengston, L. M. Yudt, A. V. Eliseenkova, J. Ma, J. A. Curtin, P. Hyder, U. L. Harper, E. Riedesel, G. J. Mann, J. M. Trent, B. C. Bastian, P. S. Meltzer, M. Mohammadi, und P. M. Pollock. 2009. Loss-of-function fibroblast growth factor receptor-2 mutations in melanoma. *Mol Cancer Res* 7 (1):41-54.
- Gaughhofer, C., S. Sagmeister, W. Schrottmaier, C. Fischer, C. Rodgarkia-Dara, T. Mohr, S. Stattner, C. Bichler, D. Kandioler, F. Wrba, R. Schulte-Hermann, K. Holzmann, M. Grusch, B. Marian, W. Berger, und B. Grasl-Kraupp. 2011. Up-regulation of the fibroblast growth factor 8 subfamily in human hepatocellular carcinoma for cell survival and neoangiogenesis. *Hepatology* 53 (3):854-864.
- Gavine, P. R., L. Mooney, E. Kilgour, A. P. Thomas, K. Al-Kadhimi, S. Beck, C. Rooney, T. Coleman, D. Baker, M. J. Mellor, A. N. Brooks, und T. Klinowska. 2012. AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res* 72 (8):2045-2056.
- Germano, G., R. Frapolli, M. Simone, M. Tavecchio, E. Erba, S. Pesce, F. Pasqualini, F. Grosso, R. Sanfilippo, P. G. Casali, A. Gronchi, E. Viridis, E. Tarantino, S. Pilotti, A. Greco, M. Nebuloni, C. M. Galmarini, J. C. Tercero, A. Mantovani, M. D'Incalci, und P. Allavena. 2010. Antitumor and anti-inflammatory effects of trabectedin on human myxoid liposarcoma cells. *Cancer Res* 70 (6):2235-2244.

- Girnita, L., A. Girnita, M. Wang, J. M. Meis-Kindblom, L. G. Kindblom, und O. Larsson. 2000. A link between basic fibroblast growth factor (bFGF) and EWS/FLI-1 in Ewing's sarcoma cells. *Oncogene* 19 (37):4298-4301.
- Gits, C. M., P. F. van Kuijk, M. B. Jonkers, A. W. Boersma, M. Smid, W. F. van Ijcken, J. M. Coindre, F. Chibon, C. Verhoef, R. H. Mathijssen, M. A. den Bakker, J. Verweij, S. Sleijfer, und E. A. Wiemer. 2014. MicroRNA expression profiles distinguish liposarcoma subtypes and implicate miR-145 and miR-451 as tumor suppressors. *Int J Cancer* 135 (2):348-361.
- Givol, D., und A. Yayon. 1992. Complexity of FGF receptors: genetic basis for structural diversity and functional specificity. *FASEB J* 6 (15):3362-3369.
- Gong, S. G. 2014. Isoforms of receptors of fibroblast growth factors. *J Cell Physiol* 229 (12):1887-1895.
- Goransson, M., M. K. Andersson, C. Forni, A. Stahlberg, C. Andersson, A. Olofsson, R. Mantovani, und P. Aman. 2009. The myxoid liposarcoma FUS-DDIT3 fusion oncoprotein deregulates NF-kappaB target genes by interaction with NFKBIZ. *Oncogene* 28 (2):270-278.
- Goransson, M., E. Elias, A. Stahlberg, A. Olofsson, C. Andersson, und P. Aman. 2005. Myxoid liposarcoma FUS-DDIT3 fusion oncogene induces C/EBP beta-mediated interleukin 6 expression. *Int J Cancer* 115 (4):556-560.
- Gotoh, N. 2008. Regulation of growth factor signaling by FRS2 family docking/scaffold adaptor proteins. *Cancer Sci* 99 (7):1319-1325.
- Greenman, C., P. Stephens, R. Smith, G. L. Dalglish, C. Hunter, G. Bignell, H. Davies, J. Teague, A. Butler, C. Stevens, S. Edkins, S. O'Meara, I. Vastrik, E. E. Schmidt, T. Avis, S. Barthorpe, G. Bhamra, G. Buck, B. Choudhury, J. Clements, J. Cole, E. Dicks, S. Forbes, K. Gray, K. Halliday, R. Harrison, K. Hills, J. Hinton, A. Jenkinson, D. Jones, A. Menzies, T. Mironenko, J. Perry, K. Raine, D. Richardson, R. Shepherd, A. Small, C. Tofts, J. Varian, T. Webb, S. West, S. Widaa, A. Yates, D. P. Cahill, D. N. Louis, P. Goldstraw, A. G. Nicholson, F. Brasseur, L. Looijenga, B. L. Weber, Y. E. Chiew, A. DeFazio, M. F. Greaves, A. R. Green, P. Campbell, E. Birney, D. F. Easton, G. Chenevix-Trench, M. H. Tan, S. K. Khoo, B. T. Teh, S. T. Yuen, S. Y. Leung, R. Wooster, P. A. Futreal, und M. R. Stratton. 2007. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446 (7132):153-158.
- Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch, und R. Shiekhattar. 2005. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123 (4):631-640.
- Gregory, R. I., und R. Shiekhattar. 2005. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res* 65 (9):3509-3512.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, und R. Shiekhattar. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432 (7014):235-240.
- Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, und A. J. Enright. 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34 (Database issue):D140-144.
- Grosso, F., R. L. Jones, G. D. Demetri, I. R. Judson, J. Y. Blay, A. Le Cesne, R. Sanfilippo, P. Casieri, P. Collini, P. Dileo, C. Spreafico, S. Stacchiotti, E. Tamborini, J. C. Tercero, J. Jimeno, M. D'Incalci, A. Gronchi, J. A. Fletcher, S. Pilotti, und P. G. Casali. 2007. Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study. *Lancet Oncol* 8 (7):595-602.



- Guagnano, V., P. Furet, C. Spanka, V. Bordas, M. Le Douget, C. Stamm, J. Brueggen, M. R. Jensen, C. Schnell, H. Schmid, M. Wartmann, J. Berghausen, P. Drueckes, A. Zimmerlin, D. Bussiere, J. Murray, und D. Graus Porta. 2011. Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J Med Chem* 54 (20):7066-7083.
- Guagnano, V., A. Kauffmann, S. Wohrle, C. Stamm, M. Ito, L. Barys, A. Pornon, Y. Yao, F. Li, Y. Zhang, Z. Chen, C. J. Wilson, V. Bordas, M. Le Douget, L. A. Gaither, J. Borawski, J. E. Monahan, K. Venkatesan, T. Brummendorf, D. M. Thomas, C. Garcia-Echeverria, F. Hofmann, W. R. Sellers, und D. Graus-Porta. 2012. FGFR genetic alterations predict for sensitivity to NVP-BGJ398, a selective pan-FGFR inhibitor. *Cancer Discov* 2 (12):1118-1133.
- Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman, und D. P. Bartel. 2010. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466 (7308):835-840.
- Guo, H., Q. Li, W. Li, T. Zheng, S. Zhao, und Z. Liu. 2014. MiR-96 downregulates RECK to promote growth and motility of non-small cell lung cancer cells. *Mol Cell Biochem* 390 (1-2):155-160.
- Hacohen, N., S. Kramer, D. Sutherland, Y. Hiromi, und M. A. Krasnow. 1998. sprouty encodes a novel antagonist of FGF signaling that patterns apical branching of the Drosophila airways. *Cell* 92 (2):253-263.
- Hanada, K., D. M. Perry-Lalley, G. A. Ohnmacht, M. P. Bettinotti, und J. C. Yang. 2001. Identification of fibroblast growth factor-5 as an overexpressed antigen in multiple human adenocarcinomas. *Cancer Res* 61 (14):5511-5516.
- Hanneken, A. 2001. Structural characterization of the circulating soluble FGF receptors reveals multiple isoforms generated by secretion and ectodomain shedding. *FEBS Lett* 489 (2-3):176-181.
- Hart, K. C., S. C. Robertson, M. Y. Kanemitsu, A. N. Meyer, J. A. Tynan, und D. J. Donoghue. 2000. Transformation and Stat activation by derivatives of FGFR1, FGFR3, and FGFR4. *Oncogene* 19 (29):3309-3320.
- Helwak, A., G. Kudla, T. Dudnakova, und D. Tollervey. 2013. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell* 153 (3):654-665.
- Hemminger, J. A., A. Ewart Toland, T. J. Scharschmidt, J. L. Mayerson, W. G. Kraybill, D. C. Guttridge, und O. H. Iwenofu. 2013. The cancer-testis antigen NY-ESO-1 is highly expressed in myxoid and round cell subset of liposarcomas. *Mod Pathol* 26 (2):282-288.
- Hemminger, J. A., und O. H. Iwenofu. 2013. NY-ESO-1 is a sensitive and specific immunohistochemical marker for myxoid and round cell liposarcomas among related mesenchymal myxoid neoplasms. *Mod Pathol* 26 (9):1204-1210.
- Hemminger, J. A., A. E. Toland, T. J. Scharschmidt, J. L. Mayerson, D. C. Guttridge, und O. H. Iwenofu. 2014. Expression of cancer-testis antigens MAGEA1, MAGEA3, ACRBP, PRAME, SSX2, and CTAG2 in myxoid and round cell liposarcoma. *Mod Pathol* 27 (9):1238-1245.
- Hermeking, H. 2010. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 17 (2):193-199.
- Hernandez, S., S. de Muga, L. Agell, N. Juanpere, R. Esgueva, J. A. Lorente, S. Mojal, S. Serrano, und J. Lloreta. 2009. FGFR3 mutations in prostate cancer: association with low-grade tumors. *Mod Pathol* 22 (6):848-856.

- Ishibe, T., T. Nakayama, T. Okamoto, T. Aoyama, K. Nishijo, K. R. Shibata, Y. Shima, S. Nagayama, T. Katagiri, Y. Nakamura, T. Nakamura, and J. Toguchida. 2005. Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy. *Clin Cancer Res* 11 (7):2702-2712.
- Ji, D., Z. Chen, M. Li, T. Zhan, Y. Yao, Z. Zhang, J. Xi, L. Yan, and J. Gu. 2014. MicroRNA-181a promotes tumor growth and liver metastasis in colorectal cancer by targeting the tumor suppressor WIF-1. *Mol Cancer* 13:86.
- Jianwei, Z., L. Fan, L. Xiancheng, B. Enzhong, L. Shuai, and L. Can. 2013. MicroRNA 181a improves proliferation and invasion, suppresses apoptosis of osteosarcoma cell. *Tumour Biol* 34 (6):3331-3337.
- Johnson, D. E., P. L. Lee, J. Lu, and L. T. Williams. 1990. Diverse forms of a receptor for acidic and basic fibroblast growth factors. *Mol Cell Biol* 10 (9):4728-4736.
- Johnson, D. E., J. Lu, H. Chen, S. Werner, and L. T. Williams. 1991. The human fibroblast growth factor receptor genes: a common structural arrangement underlies the mechanisms for generating receptor forms that differ in their third immunoglobulin domain. *Mol Cell Biol* 11 (9):4627-4634.
- Johnson, D. E., and L. T. Williams. 1993. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv Cancer Res* 60:1-41.
- Johnson, S. M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown, and F. J. Slack. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120 (5):635-647.
- Johnson, S. M., S. Y. Lin, and F. J. Slack. 2003. The time of appearance of the *C. elegans* let-7 microRNA is transcriptionally controlled utilizing a temporal regulatory element in its promoter. *Dev Biol* 259 (2):364-379.
- Jonas, C. 2013. Untersuchung von microRNAs in myxoiden Liposarkomen zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Bachelorarbeit, Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, RWTH Aachen.
- Jones, R. L., C. Fisher, O. Al-Muderis, and I. R. Judson. 2005. Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. *Eur J Cancer* 41 (18):2853-2860.
- Katz, D., P. Boonsirikamchai, H. Choi, A. J. Lazar, W. L. Wang, L. Xiao, M. S. Park, V. Ravi, R. S. Benjamin, and D. M. Araujo. 2012. Efficacy of first-line doxorubicin and ifosfamide in myxoid liposarcoma. *Clin Sarcoma Res* 2 (1):2.
- Kilvaer, T. K., A. Valkov, S. W. Sorbye, E. Smeland, R. M. Bremnes, L. T. Busund, and T. Donnem. 2011. Fibroblast growth factor 2 orchestrates angiogenic networking in non-GIST STS patients. *J Transl Med* 9:104.
- Kin, M., M. Sata, T. Ueno, T. Torimura, S. Inuzuka, R. Tsuji, K. Sujaku, M. Sakamoto, H. Sugawara, S. Tamaki, and K. Tanikawa. 1997. Basic fibroblast growth factor regulates proliferation and motility of human hepatoma cells by an autocrine mechanism. *J Hepatol* 27 (4):677-687.
- Klint, P., and L. Claesson-Welsh. 1999. Signal transduction by fibroblast growth factor receptors. *Front Biosci* 4:D165-177.
- Kofman, A. V., J. Kim, S. Y. Park, E. Dupart, C. Letson, Y. Bao, K. Ding, Q. Chen, D. Schiff, J. Lerner, and R. Abounader. 2013. microRNA-34a promotes DNA damage and mitotic catastrophe. *Cell Cycle* 12 (22):3500-3511.
- Korhan, P., E. Erdal, and N. Atabey. 2014. MiR-181a-5p is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses motility, invasion and branching-morphogenesis by directly targeting c-Met. *Biochem Biophys Res Commun* 450 (4):1304-1312.
- Kostrzewa, M., and U. Muller. 1998. Genomic structure and complete sequence of the human FGFR4 gene. *Mamm Genome* 9 (2):131-135.

- Kunii, K., L. Davis, J. Gorenstein, H. Hatch, M. Yashiro, A. Di Bacco, C. Elbi, und B. Lutterbach. 2008. FGFR2-amplified gastric cancer cell lines require FGFR2 and Erbb3 signaling for growth and survival. *Cancer Res* 68 (7):2340-2348.
- Künstlinger, H. 2010. Untersuchung der Genexpression und microRNA-Expression in myxoiden Liposarkomen. Diplomarbeit, Molekulare Biomedizin, Rheinische Friedrich-Wilhelms Universität Bonn.
- Lai, E. C. 2002. Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet* 30 (4):363-364.
- LaVallee, T. M., I. A. Prudovsky, G. A. McMahon, X. Hu, und T. Maciag. 1998. Activation of the MAP kinase pathway by FGF-1 correlates with cell proliferation induction while activation of the Src pathway correlates with migration. *J Cell Biol* 141 (7):1647-1658.
- Lee, D. H., S. Amanat, C. Goff, L. M. Weiss, J. W. Said, N. B. Doan, A. Sato-Otsubo, S. Ogawa, C. Forscher, und H. P. Koeffler. 2013. Overexpression of miR-26a-2 in human liposarcoma is correlated with poor patient survival. *Oncogenesis* 2:e47.
- Lee, I., S. S. Ajay, J. I. Yook, H. S. Kim, S. H. Hong, N. H. Kim, S. M. Dhanasekaran, A. M. Chinnaiyan, und B. D. Athey. 2009. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* 19 (7):1175-1183.
- Lee, R. C., und V. Ambros. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294 (5543):862-864.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, und V. Ambros. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75 (5):843-854.
- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim, und V. N. Kim. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21 (17):4663-4670.
- Lewis, B. P., C. B. Burge, und D. P. Bartel. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120 (1):15-20.
- Li, E., J. Zhang, T. Yuan, und B. Ma. 2014. MiR-145 inhibits osteosarcoma cells proliferation and invasion by targeting ROCK1. *Tumour Biol* 35 (8):7645-7650.
- Li, Y., F. Guessous, Y. Zhang, C. Dipierro, B. Kefas, E. Johnson, L. Marcinkiewicz, J. Jiang, Y. Yang, T. D. Schmittgen, B. Lopes, D. Schiff, B. Purow, und R. Abounader. 2009. MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. *Cancer Res* 69 (19):7569-7576.
- Lotterman, C. D., O. A. Kent, und J. T. Mendell. 2008. Functional integration of microRNAs into oncogenic and tumor suppressor pathways. *Cell Cycle* 7 (16):2493-2499.
- Loubignac, F., C. Bourtoul, und F. Chapel. 2009. Myxoid liposarcoma: a rare soft-tissue tumor with a misleading benign appearance. *World J Surg Oncol* 7:42.
- Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, und T. R. Golub. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435 (7043):834-838.
- Martinez, N. J., M. C. Ow, J. S. Reece-Hoyes, M. I. Barrasa, V. R. Ambros, und A. J. Walhout. 2008. Genome-scale spatiotemporal analysis of *Caenorhabditis elegans* microRNA promoter activity. *Genome Res* 18 (12):2005-2015.
- Mastrangelo, G., J. M. Coindre, F. Ducimetiere, A. P. Dei Tos, E. Fadda, J. Y. Blay, A. Buja, U. Fedeli, L. Cegolon, A. Frasson, D. Ranchere-Vince, C. Montesco, I. Ray-Coquard, und C. R. Rossi. 2012. Incidence of soft tissue sarcoma and

- beyond: A population-based prospective study in 3 European regions. *Cancer* 118 (21):5339-5348.
- McKeehan, W. L., und M. Kan. 1994. Heparan sulfate fibroblast growth factor receptor complex: structure-function relationships. *Mol Reprod Dev* 39 (1):69-82.
- Mohammadi, M., A. M. Honegger, D. Rotin, R. Fischer, F. Bellot, W. Li, C. A. Dionne, M. Jaye, M. Rubinstein, und J. Schlessinger. 1991. A tyrosine-phosphorylated carboxy-terminal peptide of the fibroblast growth factor receptor (Flg) is a binding site for the SH2 domain of phospholipase C-gamma 1. *Mol Cell Biol* 11 (10):5068-5078.
- Molinski, T. F., D. S. Dalisay, S. L. Lievens, und J. P. Saludes. 2009. Drug development from marine natural products. *Nat Rev Drug Discov* 8 (1):69-85.
- Mott, J. L., S. Kobayashi, S. F. Bronk, und G. J. Gores. 2007. mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis. *Oncogene* 26 (42):6133-6140.
- Muniyappa, M. K., P. Dowling, M. Henry, P. Meleady, P. Doolan, P. Gammell, M. Clynes, und N. Barron. 2009. MiRNA-29a regulates the expression of numerous proteins and reduces the invasiveness and proliferation of human carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 45 (17):3104-3118.
- Negri, T., E. Virdis, S. Brich, F. Bozzi, E. Tamborini, E. Tarantino, G. Jocolle, G. Cassinelli, F. Grosso, R. Sanfilippo, P. Casalini, A. Greco, M. A. Pierotti, und S. Pilotti. 2010. Functional Mapping of Receptor Tyrosine Kinases in Myxoid Liposarcoma. *Clin Cancer Res* 16 (14):3581-3593.
- Neville, M. J., J. M. Collins, A. L. Gloyn, M. I. McCarthy, und F. Karpe. 2011. Comprehensive human adipose tissue mRNA and microRNA endogenous control selection for quantitative real-time-PCR normalization. *Obesity (Silver Spring)* 19 (4):888-892.
- Nugent, M. A., und E. R. Edelman. 1992. Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: a mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 31 (37):8876-8883.
- Olmos, D., D. S. Tan, R. L. Jones, und I. R. Judson. 2010. Biological rationale and current clinical experience with anti-insulin-like growth factor 1 receptor monoclonal antibodies in treating sarcoma: twenty years from the bench to the bedside. *Cancer J* 16 (3):183-194.
- Ornitz, D. M., und N. Itoh. 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biol* 2 (3):REVIEWS3005.
- Ornitz, D. M., J. Xu, J. S. Colvin, D. G. McEwen, C. A. MacArthur, F. Coulier, G. Gao, und M. Goldfarb. 1996. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271 (25):15292-15297.
- Ortega, F. J., J. M. Moreno-Navarrete, G. Pardo, M. Sabater, M. Hummel, A. Ferrer, J. I. Rodriguez-Hermosa, B. Ruiz, W. Ricart, B. Peral, und J. M. Fernandez-Real. 2010. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One* 5 (2):e9022.
- Palomero, J., M. C. Vegliante, M. L. Rodriguez, A. Eguileor, G. Castellano, E. Planas-Rigol, P. Jares, I. Ribera-Cortada, M. C. Cid, E. Campo, und V. Amador. 2014. SOX11 promotes tumor angiogenesis through transcriptional regulation of PDGFA in mantle cell lymphoma. *Blood* 124 (14):2235-2247.
- Panagopoulos, I., M. Hoglund, F. Mertens, N. Mandahl, F. Mitelman, und P. Aman. 1996. Fusion of the EWS and CHOP genes in myxoid liposarcoma. *Oncogene* 12 (3):489-494.
- Pardo, O. E., J. Latigo, R. E. Jeffery, E. Nye, R. Poulosom, B. Spencer-Dene, N. R. Lemoine, G. W. Stamp, E. O. Aboagye, und M. J. Seckl. 2009. The fibroblast

- growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 69 (22):8645-8651.
- Patel, N. G., S. Kumar, und M. C. Eggo. 2005. Essential role of fibroblast growth factor signaling in preadipocyte differentiation. *J Clin Endocrinol Metab* 90 (2):1226-1232.
- Pekarsky, Y., U. Santanam, A. Cimmino, A. Palamarchuk, A. Efanov, V. Maximov, S. Volinia, H. Alder, C. G. Liu, L. Rassenti, G. A. Calin, J. P. Hagan, T. Kipps, und C. M. Croce. 2006. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res* 66 (24):11590-11593.
- Perez-Losada, J., B. Pintado, A. Gutierrez-Adan, T. Flores, B. Banares-Gonzalez, J. C. del Campo, J. F. Martin-Martin, E. Battaner, und I. Sanchez-Garcia. 2000. The chimeric FUS/TLS-CHOP fusion protein specifically induces liposarcomas in transgenic mice. *Oncogene* 19 (20):2413-2422.
- Perez-Mancera, P. A., C. Bermejo-Rodriguez, M. Sanchez-Martin, F. Abollo-Jimenez, B. Pintado, und I. Sanchez-Garcia. 2008. FUS-DDIT3 prevents the development of adipocytic precursors in liposarcoma by repressing PPARgamma and C/EBPalpha and activating eIF4E. *PLoS One* 3 (7):e2569.
- Perez-Mancera, P. A., C. Vicente-Duenas, I. Gonzalez-Herrero, M. Sanchez-Martin, T. Flores-Corral, und I. Sanchez-Garcia. 2007. Fat-specific FUS-DDIT3-transgenic mice establish PPARgamma inactivation is required to liposarcoma development. *Carcinogenesis* 28 (10):2069-2073.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, und L. Dempfle. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30 (9):e36.
- Pichler, M., E. Winter, A. L. Ress, T. Bauernhofer, A. Gerger, T. Kiesslich, S. Lax, H. Samonigg, und G. Hoefler. 2014. miR-181a is associated with poor clinical outcome in patients with colorectal cancer treated with EGFR inhibitor. *J Clin Pathol* 67 (3):198-203.
- Pommier, Y., G. Kohlhagen, C. Bailly, M. Waring, A. Mazumder, und K. W. Kohn. 1996. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry* 35 (41):13303-13309.
- Powers, C. J., S. W. McLeskey, und A. Wellstein. 2000. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocr Relat Cancer* 7 (3):165-197.
- Powers, M. P., W. L. Wang, V. S. Hernandez, K. S. Patel, D. C. Lev, A. J. Lazar, und D. H. Lopez-Terrada. 2010. Detection of myxoid liposarcoma-associated FUS-DDIT3 rearrangement variants including a newly identified breakpoint using an optimized RT-PCR assay. *Mod Pathol* 23 (10):1307-1315.
- Presta, M., P. Dell'Era, S. Mitola, E. Moroni, R. Ronca, und M. Rusnati. 2005. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16 (2):159-178.
- Qing, J., X. Du, Y. Chen, P. Chan, H. Li, P. Wu, S. Marsters, S. Stawicki, J. Tien, K. Totpal, S. Ross, S. Stinson, D. Dornan, D. French, Q. R. Wang, J. P. Stephan, Y. Wu, C. Wiesmann, und A. Ashkenazi. 2009. Antibody-based targeting of FGFR3 in bladder carcinoma and t(4;14)-positive multiple myeloma in mice. *J Clin Invest* 119 (5):1216-1229.
- Rabbitts, T. H., A. Forster, R. Larson, und P. Nathan. 1993. Fusion of the dominant negative transcription regulator CHOP with a novel gene FUS by translocation t(12;16) in malignant liposarcoma. *Nat Genet* 4 (2):175-180.

- Renner, M., E. Czwan, W. Hartmann, R. Penzel, B. Brors, R. Eils, E. Wardelmann, R. Buttner, P. Lichter, P. Schirmacher, und G. Mechtersheimer. 2012. MicroRNA profiling of primary high-grade soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 51 (11):982-996.
- Ress, A. L., V. Stiegelbauer, E. Winter, D. Schwarzenbacher, T. Kiesslich, S. Lax, S. Jahn, A. Deutsch, T. Bauernhofer, H. Ling, H. Samonigg, A. Gerger, G. Hoefler, und M. Pichler. 2014. MiR-96-5p influences cellular growth and is associated with poor survival in colorectal cancer patients. *Mol Carcinog*. epub ahead of print.
- Riggi, N., L. Cironi, P. Provero, M. L. Suva, J. C. Stehle, K. Baumer, L. Guillou, und I. Stamenkovic. 2006. Expression of the FUS-CHOP fusion protein in primary mesenchymal progenitor cells gives rise to a model of myxoid liposarcoma. *Cancer Res* 66 (14):7016-7023.
- Rodriguez, R., J. Tornin, C. Suarez, A. Astudillo, R. Rubio, C. Yauk, A. Williams, M. Rosu-Myles, J. M. Funes, C. Boshoff, und P. Menendez. 2013. Expression of FUS-CHOP fusion protein in immortalized/transformed human mesenchymal stem cells drives mixoid liposarcoma formation. *Stem Cells* 31 (10):2061-2072.
- Ron, D., und J. F. Habener. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev* 6 (3):439-453.
- Rosty, C., M. H. Aubriot, D. Cappellen, J. Bourdin, I. Cartier, J. P. Thiery, X. Sastre-Garau, und F. Radvanyi. 2005. Clinical and biological characteristics of cervical neoplasias with FGFR3 mutation. *Mol Cancer* 4 (1):15.
- Rutkowski, P., M. Van Glabbeke, C. J. Rankin, W. Ruka, B. P. Rubin, M. Debiec-Rychter, A. Lazar, H. Gelderblom, R. Sciot, D. Lopez-Terrada, P. Hohenberger, A. T. van Oosterom, und S. M. Schuetze. 2010. Imatinib mesylate in advanced dermatofibrosarcoma protuberans: pooled analysis of two phase II clinical trials. *J Clin Oncol* 28 (10):1772-1779.
- Ruvkun, G. 2001. Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294 (5543):797-799.
- Samuels, B. L., S. Chawla, S. Patel, M. von Mehren, J. Hamm, P. E. Kaiser, S. Schuetze, J. Li, A. Aymes, und G. D. Demetri. 2013. Clinical outcomes and safety with trabectedin therapy in patients with advanced soft tissue sarcomas following failure of prior chemotherapy: results of a worldwide expanded access program study. *Ann Oncol* 24 (6):1703-1709.
- Sanfilippo, R., A. P. Dei Tos, und P. G. Casali. 2013. Myxoid liposarcoma and the mammalian target of rapamycin pathway. *Curr Opin Oncol* 25 (4):379-383.
- Saumet, A., A. Mathelier, und C. H. Lecellier. 2014. The Potential of MicroRNAs in Personalized Medicine against Cancers. *Biomed Res Int* 2014:642916.
- Schlessinger, J., A. N. Plotnikov, O. A. Ibrahimi, A. V. Eliseenkova, B. K. Yeh, A. Yayon, R. J. Linhardt, und M. Mohammadi. 2000. Crystal structure of a ternary FGF-FGFR-heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol Cell* 6 (3):743-750.
- Schwartz, R. A., M. J. Trovato, und S. A. Centurion. 2009. Liposarcoma: Treatment and Medication: eMedicine Medscape.
- Schweiger, N., M. Hauck, H. Steinhoff, S. Sampl, M. Reifinger, I. Walter, T. Kreilmeier, B. Marian, M. Grusch, W. Berger, K. Holzmann, und M. Kleiter. 2014. Canine and human sarcomas exhibit predominant FGFR1 expression

- and impaired viability after inhibition of signaling. *Mol Carcinog*:epub ahead of print.
- Shin, K. H., S. D. Bae, H. S. Hong, R. H. Kim, M. K. Kang, und N. H. Park. 2011. miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. *Biochem Biophys Res Commun* 404 (4):896-902.
- Singer, S., N. D. Socci, G. Ambrosini, E. Sambol, P. Decarolis, Y. Wu, R. O'Connor, R. Maki, A. Viale, C. Sander, G. K. Schwartz, und C. R. Antonescu. 2007. Gene expression profiling of liposarcoma identifies distinct biological types/subtypes and potential therapeutic targets in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Cancer Res* 67 (14):6626-6636.
- Singh, D., J. M. Chan, P. Zoppoli, F. Niola, R. Sullivan, A. Castano, E. M. Liu, J. Reichel, P. Porrati, S. Pellegatta, K. Qiu, Z. Gao, M. Ceccarelli, R. Riccardi, D. J. Brat, A. Guha, K. Aldape, J. G. Golfinos, D. Zagzag, T. Mikkelsen, G. Finocchiaro, A. Lasorella, R. Rabadan, und A. Iavarone. 2012. Transforming fusions of FGFR and TACC genes in human glioblastoma. *Science* 337 (6099):1231-1235.
- Sleijfer, S., I. Ray-Coquard, Z. Papai, A. Le Cesne, M. Scurr, P. Schoffski, F. Collin, L. Pandite, S. Marreaud, A. De Brauwier, M. van Glabbeke, J. Verweij, und J. Y. Blay. 2009. Pazopanib, a multikinase angiogenesis inhibitor, in patients with relapsed or refractory advanced soft tissue sarcoma: a phase II study from the European organisation for research and treatment of cancer-soft tissue and bone sarcoma group (EORTC study 62043). *J Clin Oncol* 27 (19):3126-3132.
- Song, F., D. Yang, B. Liu, Y. Guo, H. Zheng, L. Li, T. Wang, J. Yu, Y. Zhao, R. Niu, H. Liang, H. Winkler, W. Zhang, X. Hao, und K. Chen. 2014. Integrated microRNA network analyses identify a poor-prognosis subtype of gastric cancer characterized by the miR-200 family. *Clin Cancer Res* 20 (4):878-889.
- Subramanian, S., W. O. Lui, C. H. Lee, I. Espinosa, T. O. Nielsen, M. C. Heinrich, C. L. Corless, A. Z. Fire, und M. van de Rijn. 2008. MicroRNA expression signature of human sarcomas. *Oncogene* 27 (14):2015-2026.
- Taylor, J. G. t., A. T. Cheuk, P. S. Tsang, J. Y. Chung, Y. K. Song, K. Desai, Y. Yu, Q. R. Chen, K. Shah, V. Youngblood, J. Fang, S. Y. Kim, C. Yeung, L. J. Helman, A. Mendoza, V. Ngo, L. M. Staudt, J. S. Wei, C. Khanna, D. Catchpoole, S. J. Qualman, S. M. Hewitt, G. Merlino, S. J. Chanock, und J. Khan. 2009. Identification of FGFR4-activating mutations in human rhabdomyosarcomas that promote metastasis in xenotransplanted models. *J Clin Invest* 119 (11):3395-3407.
- The-Cancer-Genome-Atlas-Research-Network. 2014. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* 507 (7492):315-322.
- Tomari, Y., und P. D. Zamore. 2005. MicroRNA biogenesis: drosha can't cut it without a partner. *Curr Biol* 15 (2):R61-64.
- Tomlinson, D. C., F. R. Lamont, S. D. Shnyder, und M. A. Knowles. 2009. Fibroblast growth factor receptor 1 promotes proliferation and survival via activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in bladder cancer. *Cancer Res* 69 (11):4613-4620.
- Toretzky, J. A., T. Kalebic, V. Blakesley, D. LeRoith, und L. J. Helman. 1997. The insulin-like growth factor-I receptor is required for EWS/FLI-1 transformation of fibroblasts. *J Biol Chem* 272 (49):30822-30827.
- Tseng, W. W., N. Somaiah, A. J. Lazar, D. C. Lev, und R. E. Pollock. 2013. Novel systemic therapies in advanced liposarcoma: a review of recent clinical trial results. *Cancers (Basel)* 5 (2):529-549.

- Turner, N., und R. Grose. 2010. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat Rev Cancer* 10 (2):116-129.
- Turner, N., A. Pearson, R. Sharpe, M. Lambros, F. Geyer, M. A. Lopez-Garcia, R. Natrajan, C. Marchio, E. Iorns, A. Mackay, C. Gillett, A. Grigoriadis, A. Tutt, J. S. Reis-Filho, und A. Ashworth. 2010. FGFR1 amplification drives endocrine therapy resistance and is a therapeutic target in breast cancer. *Cancer Res* 70 (5):2085-2094.
- Uematsu, S., T. Higashi, K. Nouse, K. Kariyama, S. Nakamura, M. Suzuki, H. Nakatsukasa, Y. Kobayashi, T. Hanafusa, T. Tsuji, und Y. Shiratori. 2005. Altered expression of vascular endothelial growth factor, fibroblast growth factor-2 and endostatin in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 20 (4):583-588.
- Ugras, S., E. Brill, A. Jacobsen, M. Hafner, N. D. Socci, P. L. Decarolis, R. Khanin, R. O'Connor, A. Mihailovic, B. S. Taylor, R. Sheridan, J. M. Gimble, A. Viale, A. Crago, C. R. Antonescu, C. Sander, T. Tuschl, und S. Singer. 2011. Small RNA sequencing and functional characterization reveals MicroRNA-143 tumor suppressor activity in liposarcoma. *Cancer Res* 71 (17):5659-5669.
- Urbich, C., A. Kuehbacher, und S. Dimmeler. 2008. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res* 79 (4):581-588.
- Valinezhad Orang, A., R. Safaralizadeh, und M. Kazemzadeh-Bavili. 2014. Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics* 2014:970607.
- Vandenboom II, T. G., Y. Li, P. A. Philip, und F. H. Sarkar. 2008. MicroRNA and Cancer: Tiny Molecules with Major Implications. *Curr Genomics* 9 (2):97-109.
- Vasudevan, S., Y. Tong, und J. A. Steitz. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318 (5858):1931-1934.
- Weiss, J., M. L. Sos, D. Seidel, M. Peifer, T. Zander, J. M. Heuckmann, R. T. Ullrich, R. Menon, S. Maier, A. Soltermann, H. Moch, P. Wagener, F. Fischer, S. Heynck, M. Koker, J. Schottle, F. Leenders, F. Gabler, I. Dabow, S. Querings, L. C. Heukamp, H. Balke-Want, S. Ansen, D. Rauh, I. Baessmann, J. Altmuller, Z. Wainer, M. Conron, G. Wright, P. Russell, B. Solomon, E. Brambilla, C. Brambilla, P. Lorimier, S. Sollberg, O. T. Brustugun, W. Engel-Riedel, C. Ludwig, I. Petersen, J. Sanger, J. Clement, H. Groen, W. Timens, H. Sietsma, E. Thunnissen, E. Smit, D. Heideman, F. Cappuzzo, C. Ligorio, S. Damiani, M. Hallek, R. Beroukhim, W. Pao, B. Klebl, M. Baumann, R. Buettner, K. Ernestus, E. Stoelben, J. Wolf, P. Nurnberg, S. Perner, und R. K. Thomas. 2010. Frequent and focal FGFR1 amplification associates with therapeutically tractable FGFR1 dependency in squamous cell lung cancer. *Sci Transl Med* 2 (62):62ra93.
- Weiss, S. W., und J. R. Goldblum, eds. 2008. *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*. Fifth ed. Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Wesche, J., K. Haglund, und E. M. Haugsten. 2011. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *Biochem J* 437 (2):199-213.
- Wiedemann, M., und B. Trueb. 2000. Characterization of a novel protein (FGFRL1) from human cartilage related to FGF receptors. *Genomics* 69 (2):275-279.
- Williams, S. V., C. D. Hurst, und M. A. Knowles. 2013. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum Mol Genet* 22 (4):795-803.
- Wong, A., B. Lamothe, A. Lee, J. Schlessinger, und I. Lax. 2002. FRS2 alpha attenuates FGF receptor signaling by Grb2-mediated recruitment of the ubiquitin ligase Cbl. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (10):6684-6689.



- Wu, Y. M., F. Su, S. Kalyana-Sundaram, N. Khazanov, B. Ateeq, X. Cao, R. J. Lonigro, P. Vats, R. Wang, S. F. Lin, A. J. Cheng, L. P. Kunju, J. Siddiqui, S. A. Tomlins, P. Wyngaard, S. Sadis, S. Roychowdhury, M. H. Hussain, F. Y. Feng, M. M. Zalupski, M. Talpaz, K. J. Pienta, D. R. Rhodes, D. R. Robinson, und A. M. Chinnaiyan. 2013. Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers. *Cancer Discov* 3 (6):636-647.
- Wu, Y. V., T. Okada, P. DeCarolis, N. Socci, R. O'Connor, R. C. Geha, C. Joy Somborg, C. Antonescu, und S. Singer. 2012. Restoration of C/EBPalpha in dedifferentiated liposarcoma induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis. *Genes Chromosomes Cancer* 51 (4):313-327.
- Xiao, S., S. R. Nalabolu, J. C. Aster, J. Ma, L. Abruzzo, E. S. Jaffe, R. Stone, S. M. Weissman, T. J. Hudson, und J. A. Fletcher. 1998. FGFR1 is fused with a novel zinc-finger gene, ZNF198, in the t(8;13) leukaemia/lymphoma syndrome. *Nat Genet* 18 (1):84-87.
- Xie, L., X. Su, L. Zhang, X. Yin, L. Tang, X. Zhang, Y. Xu, Z. Gao, K. Liu, M. Zhou, B. Gao, D. Shen, J. Ji, P. R. Gavine, J. Zhang, E. Kilgour, und Q. Ji. 2013. FGFR2 gene amplification in gastric cancer predicts sensitivity to the selective FGFR inhibitor AZD4547. *Clin Cancer Res* 19 (9):2572-2583.
- Xiong, Y., J. H. Fang, J. P. Yun, J. Yang, Y. Zhang, W. H. Jia, und S. M. Zhuang. 2010. Effects of MicroRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 51 (3):836-845.
- Xu, H., Q. Mei, C. Xiong, und J. Zhao. 2014. Tumor-suppressing effects of miR-141 in human osteosarcoma. *Cell Biochem Biophys* 69 (2):319-325.
- Yamakuchi, M., und C. J. Lowenstein. 2009. MiR-34, SIRT1 and p53: the feedback loop. *Cell Cycle* 8 (5):712-715.
- Yamamura, S., S. Saini, S. Majid, H. Hirata, K. Ueno, I. Chang, Y. Tanaka, A. Gupta, und R. Dahiya. 2012. MicroRNA-34a suppresses malignant transformation by targeting c-Myc transcriptional complexes in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* 33 (2):294-300.
- Yan, K., J. Gao, T. Yang, Q. Ma, X. Qiu, Q. Fan, und B. Ma. 2012. MicroRNA-34a inhibits the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells both in vitro and in vivo. *PLoS One* 7 (3):e33778.
- Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara, und B. R. Cullen. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17 (24):3011-3016.
- Yu, J. J., Y. X. Wu, F. J. Zhao, und S. J. Xia. 2014. miR-96 promotes cell proliferation and clonogenicity by down-regulating of FOXO1 in prostate cancer cells. *Med Oncol* 31 (4):910.
- Zacher, B., K. Abnaof, S. Gade, E. Younesi, A. Tresch, und H. Frohlich. 2012. Joint Bayesian inference of condition-specific miRNA and transcription factor activities from combined gene and microRNA expression data. *Bioinformatics* 28 (13):1714-1720.
- Zhang, B., Q. Wang, und X. Pan. 2007. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants. *J Cell Physiol* 210 (2):279-289.
- Zhang, J., X. Kong, J. Li, Q. Luo, X. Li, L. Shen, L. Chen, und L. Fang. 2014. miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer. *Oncol Rep* 31 (3):1357-1363.
- Zhang, K., K. Chu, X. Wu, H. Gao, J. Wang, Y. C. Yuan, S. Loera, K. Ho, Y. Wang, W. Chow, F. Un, P. Chu, und Y. Yen. 2013. Amplification of FRS2 and activation of FGFR/FRS2 signaling pathway in high-grade liposarcoma. *Cancer Res* 73 (4):1298-1307.

- Zhang, P., K. Bill, J. Liu, E. Young, T. Peng, S. Bolshakov, A. Hoffman, Y. Song, E. G. Demicco, D. L. Terrada, C. J. Creighton, M. L. Anderson, A. J. Lazar, G. G. Calin, R. E. Pollock, und D. Lev. 2012a. MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1alpha and enhances beta-catenin signaling. *Cancer Res* 72 (7):1751-1762.
- Zhang, X., Y. Nie, Y. Du, J. Cao, B. Shen, und Y. Li. 2012b. MicroRNA-181a promotes gastric cancer by negatively regulating tumor suppressor KLF6. *Tumour Biol* 33 (5):1589-1597.
- Zhao, W. M., L. Wang, H. Park, S. Chhim, M. Tanphanich, M. Yashiro, und K. J. Kim. 2010. Monoclonal antibodies to fibroblast growth factor receptor 2 effectively inhibit growth of gastric tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 16 (23):5750-5758.
- Zhao, Y., und Z. Y. Zhang. 2001. The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3. *J Biol Chem* 276 (34):32382-32391.
- Zhu, Z., T. Xu, L. Wang, X. Wang, S. Zhong, C. Xu, und Z. Shen. 2014a. MicroRNA-145 directly targets the insulin-like growth factor receptor I in human bladder cancer cells. *FEBS Lett* 588 (17):3180-3185.
- Zhu, Z. M., Y. F. Xu, Q. J. Su, J. D. Du, X. L. Tan, Y. L. Tu, J. W. Tan, und H. B. Jiao. 2014b. Prognostic significance of microRNA-141 expression and its tumor suppressor function in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mol Cell Biochem* 388 (1-2):39-49.

## 11 Danksagung

An dieser Stelle richte ich meinen Dank an alle Personen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Reinhard Büttner für die wissenschaftliche Betreuung, die stete Förderung und die angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael Famulok danke ich herzlich für das Interesse an meiner Doktorarbeit und die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Sabine Merkelbach-Bruse für ihre ständige Bereitschaft zur Diskussion, die vielen guten Ratschläge und das Vertrauen, das sie mir und meiner Arbeit entgegenbringt.

Herrn Prof. Dr. Hans-Ulrich Schildhaus danke ich für seine außerordentliche Hilfe bei allen pathologischen Fragestellungen. Ich bin sehr froh und dankbar über unsere Zusammenarbeit an vielen gemeinsamen Projekten.

Bei Frau Prof. Dr. Eva Wardelmann möchte ich mich ebenfalls ganz herzlich für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch Frau Dr. Jana Fassunke für ihre Unterstützung sowie den Erfahrungs- und Ideenaustausch. Carina Heydt und Michaela Angelika Ihle danke ich besonders für die gemeinsame Zeit im Labor und in unserem Büro. Ich bin froh über unsere tolle Zusammenarbeit, die vielen angeregten Diskussionen und unser freundschaftliches Verhältnis.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für molekularpathologische Diagnostik gilt mein besonderer Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie die gute und persönliche Zusammenarbeit in den letzten Jahren.

Auch bei allen anderen Kolleginnen und Kollegen in den Instituten für Pathologie der Universitätskliniken Bonn und Köln bedanke ich mich herzlich für die gute Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich den Kooperationspartnern am MPI für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln, am pathologischen Institut Heidelberg sowie an weiteren Instituten für die Unterstützung meines Projekts danken.

Für die finanzielle Förderung während meiner Promotion bedanke ich mich herzlich bei der Wilhelm Sander-Stiftung sowie dem SFB 832 der DFG.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meinen Eltern, Dr. Urte und Dr. Michael Künstlinger, danke ich für ihre liebevolle Unterstützung und Förderung auf meinem Lebensweg. Meinem Bruder Björn Künstlinger sowie meinen „Schwestern“ Nanja und Nika Boenisch danke ich für unser tolles Verhältnis und unseren Zusammenhalt. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei meinen Großeltern, Zdena und Prof. Dr. Rudolf Künstlinger sowie Gisela und Dr. Hans Schramm, die für mich da sind und jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung stehen. Meinem Partner, Prof. Dr. Nyls-Arne Pasternack, danke ich für sein Verständnis sowie seine stete Unterstützung und Aufmunterung. Ich freue mich sehr auf unseren gemeinsamen Lebensweg.

## 12 Aktive Konferenzbeiträge

- 12.06.2014 – 15.06.2014 98. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin: Vortrag „Funktionelle Analyse von FGFR-Inhibition und differentiell exprimierten microRNAs in myxoiden Liposarkomen“
- 17.06.2013 – 21.06.2013 Keystone Symposium „Human Genomics and Personalized Medicine“, Stockholm, Schweden: Poster „Identification of Molecular Target Structures in Myxoid Liposarcoma“
- 23.05.2013 – 26.05.2013 97. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Heidelberg: Vortrag „Identifizierung molekularer Zielstrukturen in myxoiden Liposarkomen zur Etablierung neuer Therapiestrategien“
- 18.03.2013 – 22.03.2013 qPCR & NGS Symposium, Freising: Poster „Identification of differentially expressed genes and microRNAs in myxoid liposarcoma in order to reveal new therapeutic target structures“, Posterpreis für das beste akademische Poster
- 31.05.2012 – 03.06.2012 96. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Berlin: Vortrag „Schmelzpunktanalyse zur schnellen und zuverlässigen Detektion von Mutationen in Exon 9 des KIT-Gens“
- 22.03.2012 – 24.03.2012 Sarkomkonferenz, Berlin: Vortrag „FGFR2-Überexpression in myxoiden Liposarkomen“
- 28.01.2012 Jahrestreffen der Pathologen NRW, Essen: Vortrag „Untersuchung der Gen- und microRNA-Expression in myxoiden Liposarkomen“
- 16.06.2011 – 19.06.2011 95. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Leipzig: Poster „Untersuchung der Gen- und microRNA-Expression in myxoiden Liposarkomen“, Poster wurde als eines der besten prämiert und in einem Kurzvortrag erneut vorgestellt

## 13 Publikationen

**Künstlinger, H.**, J. Fassunke, H.-U. Schildhaus, B. Brors, C. Heydt, M. A. Ihle, G. Mechttersheimer, E. Wardelmann, R. Büttner, und S. Merkelbach-Bruse. 2015. FGFR2 is overexpressed in myxoid liposarcoma and inhibition of FGFR signaling impairs tumor growth *in vitro*. *Oncotarget*.in Revision. (Impact Factor 2013: 6,63)

Heydt, C., N. Kumm, J. Fassunke, **H. Künstlinger**, M. A. Ihle, A. Scheel, H.-U. Schildhaus, F. Haller, R. Büttner, M. Odenthal, E. Wardelmann, und S. Merkelbach-Bruse. 2015. Sensitive methods for the detection of minor resistant subclones in tissue samples prior to tyrosine kinase inhibitor therapy. *BMC Cancer*.in Revision. (Impact Factor 2013: 3,32)

Ihle, M. A., M. Trautmann, **H. Künstlinger**, S. Huss, C. Heydt, J. Fassunke, E. Wardelmann, S. Bauer, H.-U. Schildhaus, R. Büttner; und S. Merkelbach-Bruse. 2015. miRNA-221 and miRNA-222 induce apoptosis via the KIT/AKT signalling pathway in gastrointestinal stromal tumours. *Molecular Oncology*.in Revision. (Impact Factor 2013: 5,94)

Kloth, M., V. Rüsseler, C. Engel, K. König, M. Peifer, E. Mariotti, **H. Künstlinger**, A. Florin, C. Wodtke, S. Holzapfel, S. Aretz, P. Propping, M. Löffler, M. Odenthal, S. Merkelbach-Bruse, N. Friedrichs, L. C. Heukamp, T. Zander, und R. Büttner. 2015. Activating Mutations in ERBB2/HER2 Define Vulnerability to Pan-HER Inhibitors in Lynch and Lynch-Like Colorectal Cancer. *Gut*.in Revision. (Impact Factor 2013: 13,32)

Scheffler, M., M. Bos, M. Gardizi, K. König, S. Michels, J. Fassunke, C. Heydt, **H. Künstlinger**, M. Ihle, F. Ueckerth, K. Albus, M. Serke, U. Gerigk, W. Schulte, K. Topelt, L. Nogova, T. Zander, W. Engel-Riedel, E. Stoelben, Y. D. Ko, W. Randerath, B. Kaminsky, J. Panse, C. Becker, M. Hellmich, S. Merkelbach-Bruse, L. C. Heukamp, R. Buttner, und J. Wolf. 2014. PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): Genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget*.*epub ahead of print*. (Impact Factor 2013: 6,63)

Heydt, C., J. Fassunke, **H. Künstlinger**, M. A. Ihle, K. König, L. C. Heukamp, H. U. Schildhaus, M. Odenthal, R. Büttner, und S. Merkelbach-Bruse. 2014. Comparison of pre-analytical FFPE sample preparation methods and their impact on massively parallel sequencing in routine diagnostics. *PLoS One* 9 (8):e104566. (Impact Factor 2013: 3,53)

**Künstlinger, H.**, E. Binot, S. Merkelbach-Bruse, S. Huss, E. Wardelmann, R. Büttner, und H. U. Schildhaus. 2014. High-resolution melting analysis is a sensitive diagnostic tool to detect imatinib-resistant and imatinib-sensitive PDGFRA exon 18 mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 45 (3):573-582. (Impact Factor 2013: 2,81)

Bos, M., L. Heukamp, M. Gardizi, K. Koenig, S. Merkelbach-Bruhse, T. Zander, M. Scheffler, K. Albus, H. U. Schildhaus, J. Fassunke, **H. Künstlinger**, M. Kleine, E. Binot, L. Nogova, C. Mattonet, M. Serke, J. Panse, R. Schnell, H. Schulz, K. Toepelt, A. Schlesinger, S. Krueger, K. Kambartel, M. Reiser, D. Behringer, U. Gerigk, W.

Schulte, F. Diet, W. J. Randerath, S. Brettner, Y. D. Ko, M. Buchenroth, J. Benz, K. Severin, S. Schmitz, T. Steinmetz, D. Mainka, L. Dietze, T. Kaufmann, F. Konrad, K. Hekmat, R. Thomas, R. Büttner, J. Wolf, und Netzwerk Genomische Medizin. 2013. Current development of the Network Genomic Medicine in lung cancer. *Onkologie* 36:177. (Impact Factor 2013: 0,84)

Huss, S., **H. Künstlinger**, E. Wardelmann, M. A. Kleine, E. Binot, S. Merkelbach-Bruse, T. Rudiger, J. Mittler, W. Hartmann, R. Büttner, und H. U. Schildhaus. 2013. A subset of gastrointestinal stromal tumors previously regarded as wild-type tumors carries somatic activating mutations in KIT exon 8 (p.D419del). *Mod Pathol* 26 (7):1004-1012. (Impact Factor 2013: 6,36)

Huss, S., J. Nehles, E. Binot, E. Wardelmann, J. Mittler, M. A. Kleine, **H. Künstlinger**, W. Hartmann, P. Hohenberger, S. Merkelbach-Bruse, R. Büttner, und H. U. Schildhaus. 2013. beta-catenin (CTNNB1) mutations and clinicopathological features of mesenteric desmoid-type fibromatosis. *Histopathology* 62 (2):294-304. (Impact Factor 2013: 3,30)

**Künstlinger, H.**, S. Huss, S. Merkelbach-Bruse, E. Binot, M. A. Kleine, H. Loeser, J. Mittler, W. Hartmann, P. Hohenberger, P. Reichardt, R. Büttner, E. Wardelmann, und H. U. Schildhaus. 2013. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 9 mutations: Update on genotype-phenotype correlation and validation of a high-resolution melting assay for mutational testing. *Am J Surg Pathol* 37 (11):1648-1659. (Impact Factor 2013: 4,59)

Seidel, D., T. Zander, L. C. Heukamp, M. Peifer, M. Bos, L. Fernández-Cuesta, F. Leenders, X. Lu, S. Ansén, M. Gardizi, C. Nguyen, J. Berg, P. Russell, Z. Wainer, H.-U. Schildhaus, T.-M. Rogers, B. Solomon, W. Pao, S. L. Carter, G. Getz, D. N. Hayes, M. D. Wilkerson, E. Thunnissen, W. D. Travis, S. Perner, G. Wright, E. Brambilla, F. Gabler, I. Wilkening, C. Mueller, I. Dahmen, R. Menon, K. Koenig, K. Albus, S. Merkelbach-Bruse, J. Fassunke, K. Schmitz, **H. Künstlinger**, M. Kleine, E. Binot, S. Querings, J. Altmueller, I. Bäßmann, P. Nürnberg, P. Schneider, M. Bogus, A. Soltermann, H. Moch, O. T. Brustugun, S. Solberg, M. Lund-Iversen, Å. Helland, T. Muley, H. Hoffmann, P. A. Schnabel, Y. Chen, H. Groen, W. Timens, H. Sietsma, J. H. Clement, W. Weder, J. Sängler, E. Stoelben, C. Ludwig, W. Engel-Riedel, E. Smit, D. A. M. Heideman, P. J. F. Snijders, L. Nogova, M. L. Sos, C. Mattonet, K. Töpelt, M. Scheffler, E. Goekkurt, R. Kappes, S. Krüger, K. Kambartel, D. Behringer, W. Schulte, W. Galetke, W. Randerath, M. Heldwein, A. Schlesinger, M. Serke, K. Hekmat, K. F. Frank, R. Schnell, M. Reiser, A.-N. Hünerlitürkoglu, S. Schmitz, L. Meffert, Y.-D. Ko, M. Litt-Lampe, U. Gerigk, R. Fricke, B. Besse, C. Brambilla, S. Lantuejoul, P. Lorimier, D. Moro-Sibilot, F. Cappuzzo, C. Ligorio, S. Damiani, J. K. Field, R. Hyde, P. Validire, P. Girard, L. A. Muscarella, V. M. Fazio, M. Hallek, J.-C. Soria, V. Achter, U. Lang, R. Büttner, J. Wolf, und R. K. Thomas. 2013. A Genomics-Based Classification of Human Lung Tumors. *Sci Transl Med* 5 (209):209ra153. (Impact Factor 2013: 14,41)

Bos, M. C. A., M. Gardizi, M. Scheffler, L. Heukamp, L. Nogova, K. Albus, K. Koenig, H. U. Schildhaus, K. Schmitz, S. Merkelbach-Bruse, J. Fassunke, E. Binot, C. Mattonet, **H. Künstlinger**, M. Kleine, E. Goekkurt, A. Schlesinger, R. Kappes, T. Geist, K. Kambartel, R. Schnell, H. Schulz, M. Reiser, I. Katay, D. Behringer, U. Gerigk, W. Schulte, W. Galetke, F. Diet, W. Randerath, S. Brettner, W. Engel-Riedel,

M. Brockmann, E. Stoelben, Y. D. Ko, M. Buchenroth, J. Benz, K. Severin, D. Mainka, S. Schmitz, T. Steinmetz, L. Dietze, M. Serke, P. Bernards, P. Schulte, U. Laskowski, S. Stier, M. Sieber, T. Heintges, A. N. Huenerlituerkoglu, K. Frank, K. Hekmat, M. Heldwein, R. Thomas, R. Büttner, J. Wolf, T. Zander, und Netzwerk Genomische Medizin. 2012. Evaluation of the clinical characteristics and natural history of patients with FGFR1 amplified squamous cell lung carcinoma. *Onkologie* 35:137-138. (Impact Factor 2013: 0,84)

Gardizi, M., M. Scheffler, M. Bos, L. Heukamp, L. Nogova, H. U. Schildhaus, K. Schmitz, S. Merkelbach-Bruse, J. Fassunke, E. Binot, K. Albus, **H. Künstlinger**, M. Kleine, C. Mattonet, E. Goekkurt, A. Schlesinger, R. Kappes, T. Geist, K. Kambartel, R. Schnell, H. Schulz, D. Behringer, U. Gerigk, W. Schulte, W. Galetke, F. Diet, W. Randerath, B. Kaminsky, S. Brettner, W. Engel-Riedel, M. Brockmann, E. Stoelben, Y. D. Ko, M. Buchenroth, J. Benz, K. Severin, S. Schmitz, T. Steinmetz, D. Mainka, L. Dietze, M. Serke, P. Bernards, P. Schulte, U. Laskowski, M. C. A. Reiser, I. Katay, S. Stier, M. Sieber, T. Heintges, A. Huenerlituerkoglu, K. C. A. Frank, K. Toepelt, K. Hekmat, M. Heldwein, R. Thomas, R. Büttner, J. Wolf, T. Zander, und Netzwerk Genomische Med. Lungenkrebs. 2012. Frequency and clinical characterization of NSCLC patients harbouring PIK3CA mutations screened in the Network Genomic Medicine Lung Cancer. *Onkologie* 35:37. (Impact Factor 2013: 0,84)

Zander, T., L. Heukamp, M. Bos, M. Gardizi, M. Scheffler, K. Albus, K. Koenig, H. U. Schildhaus, K. Schmitz, S. Merkelbach-Bruse, J. Fassunke, **H. Künstlinger**, M. Kleine, E. Binot, L. Nogova, C. Mattonet, E. Goekkurt, A. Schlesinger, R. Kappes, K. Kambartel, R. Schnell, H. Schulz, M. Reiser, D. Behringer, U. Gerigk, W. Schulte, W. Galetke, F. Diet, W. Randerath, S. Brettner, W. Engel-Riedel, M. Brockmann, E. Stoelben, Y. D. Ko, M. Buchenroth, J. Benz, K. Severin, S. Schmitz, T. Steinmetz, D. Mainka, L. Dietze, M. Serke, P. Bernards, P. Schulte, U. Laskowski, S. Stier, M. Sieber, T. Heintges, K. Frank, K. Hekmat, M. Heldwein, R. Thomas, R. Büttner, J. Wolf, und Netzwerk Genomic Med Lung Cancer. 2012. Implementation of real-time genetic diagnostics and personalized treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) in a regional screening network. *Onkologie* 35:138. (Impact Factor 2013: 0,84)

Merkelbach-Bruse, S., E. Wardelmann, **H. Künstlinger**, R. Büttner, und H. U. Schildhaus. 2011. Molekulare Methoden in der Sarkomdiagnostik [Molecular methods in the diagnosis of sarcoma.]. *Der Pathologe* 32 (1):24-31. (Impact Factor 2013: 0,64)

Fassunke, J., M. C. Blum, H. U. Schildhaus, M. Zapatka, B. Brors, **H. Künstlinger**, R. Büttner, E. Wardelmann, und S. Merkelbach-Bruse. 2010. qPCR in gastrointestinal stromal tumors: Evaluation of reference genes and expression analysis of KIT and the alternative receptor tyrosine kinases FLT3, CSF1-R, PDGFRB, MET and AXL. *BMC Mol Biol* 11 (1):100. (Impact Factor 2013: 2,06)