

**Molekulargenetische Veränderungen  
auf Chromosom 7q11 als strahlenspezifische Marker  
in papillären Schilddrüsenkarzinomen  
nach dem Reaktorunfall von Tschernobyl**

**Dissertation**

der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von

**Julia Heß**

**Dezember 2011**

Angefertigt am Helmholtz Zentrum München  
in der Abteilung für Strahlenzytogenetik  
unter der Leitung von Prof. Dr. Horst Zitzelsberger

**Erstgutachten:** Prof. Dr. Thomas Cremer

**Zweitgutachten:** Prof. Dr. Johannes Wienberg

**Datum der mündlichen Prüfung:** 27.07.2012

~ Für René ~

**INHALTSVERZEICHNIS**

**INHALTSVERZEICHNIS .....IV**

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....X**

**TABELLENVERZEICHNIS .....XIII**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS ..... XV**

**A EINLEITUNG..... 1**

**B MATERIAL & METHODEN ..... 12**

B.1 Patientenmaterial..... 12

    B.1.1 PTC-Kollektiv der Chernobyl Tissue Bank ..... 12

    B.1.2 Schilddrüsen-Gewebe-Arrays..... 20

        B.1.2.1 Gewebe-Array mit Schilddrüsennormalgewebe von Erwachsenen..... 20

        B.1.2.2 Gewebe-Array mit kindlichen PTC aus Weißrussland ..... 22

B.2 Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH) ..... 25

    B.2.1 Tumor-DNA ..... 26

        B.2.1.1 Isolation der Tumor-DNA ..... 26

        B.2.1.2 Konzentrationsbestimmung der Tumor-DNA ..... 28

    B.2.2 Qualitätskontrolle der DNA vor der Array-CGH ..... 28

        B.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese ..... 28

        B.2.2.2 Multiplex-PCR ..... 29

    B.2.3 1 Mb BAC-Arrays ..... 31

        B.2.3.1 Verwendeter 1 Mb BAC-Array ..... 31

        B.2.3.2 Random Prime Labeling ..... 32

        B.2.3.3 Aufreinigung der markierten DNA ..... 33

        B.2.3.4 Bestimmung der Inkorporationsrate ..... 34

        B.2.3.5 Fällung und Denaturierung der markierten DNA ..... 34

        B.2.3.6 Hybridisierung mit der TECAN HS 400 ..... 35

        B.2.3.7 Scannen und Analyse der Arrays..... 38

        B.2.3.8 Datenauswertung mit MANOR, DNACopy und CGHcall ..... 41

    B.2.4 Hochauflösende Oligonukleotid-Arrays ..... 44

        B.2.4.1 Verwendeter 180k Oligonukleotid-Array ..... 44

B.2.4.2	Random Prime Labeling .....	44
B.2.4.3	Aufreinigung der markierten DNA .....	45
B.2.4.4	Bestimmung der Inkorporationsrate .....	46
B.2.4.5	Hybridisierung.....	46
B.2.4.6	Waschen der Arrays .....	47
B.2.4.7	Scannen der Arrays .....	48
B.2.4.8	Datenextraktion .....	49
B.2.4.9	Datenauswertung mit MANOR, DNACopy und CGHcall .....	51
B.2.5	Statistische Methoden .....	51
B.2.5.1	Hierarchische Clusteranalyse .....	51
B.2.5.2	Exakter Fisher-Test.....	51
B.2.5.3	Multipler Chi-Quadrat-Test und FDR .....	52
B.2.5.4	Maximum-Likelihood-Methode .....	52
B.3	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	53
B.3.1	Bacterial Artificial Chromosomes (BACs).....	54
B.3.1.1	Anzucht der BACs.....	54
B.3.1.2	Isolation der Plasmid-DNA .....	56
B.3.1.3	Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA.....	58
B.3.1.4	Markierung der BACs durch <i>Nick Translation</i> .....	59
B.3.1.5	Fällung und Denaturierung der BAC-Sonde .....	60
B.3.2	Testhybridisierung auf Metaphasen .....	62
B.3.2.1	Denaturierung der Metaphasepräparate .....	62
B.3.2.2	Testhybridisierung .....	63
B.3.2.3	Waschen und Detektion .....	63
B.3.3	Interphase FISH auf Tumor-Gewebeschnitten .....	65
B.3.3.1	Entparaffinierung der Gewebeschnitte .....	65
B.3.3.2	Hitzebehandlung und Pronase E Verdau der Gewebeschnitte .....	66
B.3.3.3	Denaturierung der Gewebeschnitte .....	67
B.3.3.4	Hybridisierung.....	67
B.3.3.5	Waschen und Detektion .....	68
B.3.4	Auswertung der FISH.....	68
B.3.4.1	Auswertung der Testhybridisierung.....	68
B.3.4.2	Auswertung der Gewebe-FISH .....	68

B.4	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	70
B.4.1	RNA-Isolation .....	70
B.4.1.1	RNA-Isolation aus Gefriergewebe .....	70
B.4.1.2	Konzentrationsmessung der RNA .....	72
B.4.2	Reverse Transkription (RT-PCR).....	72
B.4.3	TaqMan®-qRT-PCR .....	73
B.4.4	Auswertung der TaqMan®-qRT-PCR.....	76
B.5	Immunhistochemie (IHC).....	78
B.5.1	Automatisierte Immunfärbung .....	79
B.5.1.1	Etablierung der automatisierten Immunfärbung.....	79
B.5.1.2	IHC an FFPE-Gewebeschnitten.....	80
B.5.1.3	IHC an fixierten Zellen.....	81
B.5.2	Auswertung der IHC-Färbungen.....	82
B.5.2.1	Einscannen der gefärbten Objektträger .....	82
B.5.2.2	Semiquantitative Auswertung .....	82
B.5.2.3	Relative Quantifizierung .....	83
B.6	Zellkultur .....	84
B.6.1	Allgemeine Methoden: Kultivierung von Zellen.....	84
B.6.2	Verwendete Zelllinien .....	86
B.6.2.1	Zelllinie TPC-1.....	86
B.6.2.2	Schilddrüsen-Primärkulturen .....	86
B.6.3	DNA-Isolation aus Zellpellets .....	88
B.6.4	RNA-Isolation aus Zellpellets.....	89
B.6.5	Charakterisierung von Zelllinien.....	90
B.6.5.1	Array-CGH .....	90
B.6.5.2	Spektrale Karyotypisierung (SKY).....	90
B.6.5.2.1	Herstellung von Metaphasepräparaten.....	90
B.6.5.2.2	Pepsinverdau der Metaphasepräparate .....	91
B.6.5.2.3	Hybridisierung.....	92
B.6.5.2.4	Waschen und Detektion .....	93
B.6.5.2.5	Auswertung der SKY.....	95
B.6.5.3	IHC an fixierten Zellen.....	95
B.6.5.3.1	Anzüchten der Zellen auf Objektträgern.....	95

B.6.5.3.2	Zellfixierung .....	96
B.6.5.3.3	IHC.....	96
B.6.6	Immortalisierung von Zellen .....	97
B.6.6.1	Ernten des retroviralen Überstands.....	98
B.6.6.2	Retrovirale Infektion (Transduktion).....	99
B.7	Herstellung transgener Zelllinien .....	100
B.7.1	Selektive Amplifikation des CLIP2 Gens aus cDNA .....	100
B.7.1.1	Reverse Transkription (RT-PCR) .....	100
B.7.1.2	PCR-Amplifikation von CLIP2.....	101
B.7.1.3	Agarosegel-Extraktion von DNA-Fragmenten.....	103
B.7.2	Klonierung .....	103
B.7.2.1	Verdau von DNA-Fragment und Vektor .....	104
B.7.2.1.1	Aufreinigung des Verdaus.....	105
B.7.2.2	Ligation und Transformation .....	106
B.7.3	Plasmidpräparation.....	107
B.7.3.1	Mini-Präparation.....	107
B.7.3.2	Maxi-Präparation .....	108
B.7.4	Restriktionsanalyse des Plasmids.....	109
B.7.5	Sequenzierung.....	110
B.7.6	Linearisierung des Vektors .....	113
B.7.7	Transfektion der Zelllinien.....	114
B.7.8	Konzentrationstest der Antibiotika Blastocidin und Puromycin.....	115
B.7.9	Selektion mit Blastocidin .....	116
B.7.10	Überprüfung der Transfektionseffizienz - FACS-Analyse.....	116
<b>C</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>118</b>
C.1	Array-CGH.....	119
C.1.1	Qualitätskontrolle der DNA vor der Array-CGH .....	119
C.1.2	1 Mb BAC Array-CGH.....	120
C.1.2.1	Qualitätsbeurteilung eines Array-CGH-Experiments .....	121
C.1.2.2	Kontrollhybridisierung .....	122
C.1.2.3	Ergebnisse der Array-CGH-Analysen von 52 PTC (Untersuchungskollektiv) .....	123
C.1.2.3.1	Häufigkeitsverteilung chromosomaler Aberrationen .....	123

C.1.2.3.2	Hierarchische Clusteranalyse .....	126
C.1.2.3.3	Korrelation der hierarchischen Cluster mit klinischen Daten und Tumorphänotypen .....	128
C.1.2.3.4	Korrelation von Kopienzahlveränderungen mit klinischen Daten und Tumorphänotypen .....	131
C.1.2.4	Ergebnisse der Array-CGH-Analysen von 28 PTC (Validierungskollektiv) .....	134
C.1.3	Ergebnisse der hochauflösenden Oligo Array-CGH-Analysen .....	135
C.2	Identifizierung von Kandidatengenen .....	137
C.2.1	Tumorassoziierte Kandidatengene aus der Literatur .....	137
C.2.2	<i>Gene Ontology</i> Analyse .....	140
C.3	Validierung von Kopienzahlveränderungen mittels FISH-Analysen .....	141
C.3.1	Testhybridisierung auf Metaphasen .....	141
C.3.2	Interphase-FISH auf Tumor-Gewebeschnitten.....	143
C.3.2.1	Validierung wiederkehrender Kopienzahlveränderungen in PTC .....	143
C.3.2.2	Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 .....	146
C.4	Bestimmung der mRNA-Expression von Kandidatengenen mittels qRT-PCR.....	150
C.4.1	mRNA-Expression von Kandidatengenen auf Chromosom 7q11.22-11.23..	150
C.4.1.1	Differentielle mRNA-Expression von Kandidatengenen in exponierten PTC mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 und Tumoren mit normaler Kopienzahl.....	150
C.4.1.2	Differentielle mRNA-Expression von CLIP2 in exponierten und nicht exponierten PTC.....	152
C.4.2	mRNA-Expression von Kandidatengenen aus einem Mausmodell .....	154
C.5	Immunhistochemische Untersuchung der Proteinexpression an Schilddrüsengewebe .....	157
C.5.1	Etablierung der Immunhistochemie an normalem Schilddrüsengewebe ....	157
C.5.2	Immunhistochemischer Nachweis von CLIP2.....	159
C.5.2.1	Differentielle Proteinexpression von CLIP2 in exponierten und nicht exponierten PTC-Fällen .....	159
C.5.2.2	Immunhistochemische Untersuchungen an einem Gewebe-Array ...	162
C.5.3	Immunhistochemischer Nachweis von CLDN4.....	164
C.5.4	Immunhistochemischer Nachweis von LIMK1 .....	166



---

C.6	Etablierung von Schilddrüsen-Zellkulturmodellen für funktionelle Studien ausgewählter Kandidatengene.....	168
C.6.1	Charakterisierung der Zelllinie TPC-1 .....	168
C.6.1.1	Hochauflösende Array-CGH .....	168
C.6.1.2	SKY .....	172
C.6.1.3	Cytokeratin-Nachweis .....	174
C.6.2	Immortalisierung von Schilddrüsen-Primärzelllinien .....	175
C.6.2.1	Ergebnisse der Immortalisierung von 13 Schilddrüsen-Primärzelllinien.. .....	175
C.6.2.2	Charakterisierung der Zelllinie S22N hTERT .....	176
C.6.2.2.1	1 Mb BAC Array-CGH .....	176
C.6.2.2.2	Morphologische Charakterisierung.....	179
C.6.2.2.3	Cytokeratin-Nachweis.....	180
C.6.3	Herstellung transgener Zelllinien .....	181
C.6.3.1	Selektive Amplifikation von CLIP2 aus cDNA und Ligation in den Vektor pForGene .....	181
C.6.3.2	Restriktionsanalyse und Sequenzierung des Vektors .....	182
C.6.3.3	Transfektion der Zelllinie TPC-1 .....	184
<b>D</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>186</b>
<b>E</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>210</b>
<b>F</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>213</b>
<b>G</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>225</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Veränderungen des MAPK-Signalwegs in Schilddrüsentumoren ..... 7

Abbildung 2: Histologische Varianten des papillären Schilddrüsenkarzinoms (PTC) ..14

Abbildung 3: Normalgewebe der Schilddrüse.....21

Abbildung 4: Prinzip der Array-CGH .....26

Abbildung 5: Prinzip der Amplifizierung durch *strand displacement* .....32

Abbildung 6: Programm für die Hybridisierung mit der TECAN HS 400 .....37

Abbildung 7: Gescannter 1 Mb BAC-Array .....39

Abbildung 8: Spot-Gitter (*Grid*) auf Grundlage des Array List File in GenePix™ Pro ..40

Abbildung 9: Gescannter 180k Oligonukleotid-Array .....49

Abbildung 10: Kontrollspots des 180k Oligonukleotid-Arrays .....50

Abbildung 11: Detektion indirekt markierter FISH-Sonden .....53

Abbildung 12: Bestimmung der Sondengröße nach der *Nick Translation* mittels Gelelektrophorese .....60

Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips von TaqMan®-Sonden .....74

Abbildung 14: LSAB-Methode (*Labelled-Strept-Avidin-Biotin*).....78

Abbildung 15: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pForGene.....104

Abbildung 16: Schematische Darstellung des Vektors pForGene\_eqFP615 .....116

Abbildung 17: Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Amplifikate nach Multiplex-PCR.....119

Abbildung 18: Analyse der Drosophila-Kontroll-Klone auf dem 1 Mb Array .....121

Abbildung 19: Kontrollhybridisierung normaler Referenz-DNA.....122

Abbildung 20: Häufigkeitsprofil der mittels 1 Mb BAC Array-CGH nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen in 52 PTC .....123

Abbildung 21: Hierarchische Clusteranalyse der Array-CGH-Profile von 52 PTC .....127

Abbildung 22: Korrelation hierarchischer Cluster mit dem RET/PTC-Status .....129

Abbildung 23: Korrelation hierarchischer Cluster mit der Tumorgröße .....129

Abbildung 24: Korrelation hierarchischer Cluster mit dem Lymphknotenstatus.....129

Abbildung 25: Häufigkeitsprofile der Kopienzahlveränderungen in 19 nicht exponierten und 33 exponierten PTC .....133

Abbildung 26: Chromosomale Veränderungen auf Chromosom 7 in 52 PTC .....133

Abbildung 27: Häufigkeitsprofile der Kopienzahlveränderungen auf Chromosom 7 in 12 nicht exponierten und 16 exponierten PTC (Validierungskollektiv)	134
Abbildung 28: Charakterisierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 mittels hochauflösender 180k Oligo Array-CGH und 1 Mb BAC Array-CGH	136
Abbildung 29: Testhybridisierung von Biotin- und Digoxigenin-markierten BAC-Sonden auf Metaphasepräparate	142
Abbildung 30: Interphase-FISH auf Tumorgewebeschnitten mit genspezifischen BAC-Sonden zur Validierung wiederkehrender Kopienzahlveränderungen in PTC	145
Abbildung 31: Ergebnisse der FISH-Analysen für Chromosom 7q11.22-11.23 mit der genspezifischen BAC-Sonde für das Gen RFC2	148
Abbildung 32: Ergebnisse der FISH-Analysen für Chromosom 7q11.22-11.23 mit der genspezifischen BAC-Sonde für das Gen CLIP2	148
Abbildung 33: FISH-Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23	149
Abbildung 34: mRNA-Expression von Kandidatengenen in exponierten PTC mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 und exponierten Tumoren mit normaler Kopienzahl	151
Abbildung 35: mRNA-Expression des Kandidatengens CLIP2 in exponierten und nicht exponierten PTC	153
Abbildung 36: mRNA-Expression von Kandidatengenen aus transgenen TRK-T1-Mäusen in humanen PTC und Schilddrüsennormalgewebe	156
Abbildung 37: Etablierung der IHC an normalem Schilddrüsen Gewebe	158
Abbildung 38: Immunhistochemische Analyse an 34 PTC mit Anti-CLIP2	159
Abbildung 39: Immunhistochemischer Nachweis von CLIP2 in exponierten und nicht exponierten PTC-Fällen	161
Abbildung 40: Immunhistochemischer Nachweis von CLIP2 an einem Gewebe-Array mit kindlichen PTC-Fällen	163
Abbildung 41: Immunhistochemischer Nachweis von CLDN4	165
Abbildung 42: Immunhistochemischer Nachweis von LIMK1	167
Abbildung 43: Gesamtgenomisches Array-CGH-Profil der Zelllinie TPC-1	169
Abbildung 44: Array-CGH-Profil der Zelllinie TPC-1 für Chromosom 7	171
Abbildung 45: SKY-Analyse der Zelllinie TPC-1	173
Abbildung 46: Zelllinie TPC-1	174
Abbildung 47: Positiver Nachweis von Cytokeratin an der Zelllinie TPC-1	174

Abbildung 48: Gesamtgenomisches Array-CGH-Profil der Zelllinie S22N .....	178
Abbildung 49: Array-CGH-Profil der Zelllinie S22N für Chromosom 7 .....	178
Abbildung 50: hTERT-Immortalisierung der Zelllinie S22N .....	179
Abbildung 51: Positiver Nachweis von Cytokeratin an der Zelllinie S22N hTERT.....	180
Abbildung 52: Selektive Amplifikation des Gens CLIP2 aus cDNA.....	181
Abbildung 53: Schematische Darstellung des Vektors pForGene CLIP2 .....	182
Abbildung 54: Restriktionsverdau zur Identifikation von Vektoren mit korrekt insertertem Gen CLIP2 .....	183
Abbildung 55: Restriktionsanalyse des Vektors pForGene CLIP2.....	183
Abbildung 56: Effekt des Antibiotikums Blasticidin auf das Zellwachstum der Zelllinie TPC-1 .....	184
Abbildung 57: Transfektionseffizienz der Zelllinie TPC-1 .....	185
Anhang 3: Sequenzierung des Vektors pForGene CLIP2 .....	221

---

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Schilddrüsenkarzinomen .....	13
Tabelle 2: Patientendaten des Untersuchungskollektivs .....	15
Tabelle 3: Patientendaten des Validierungskollektivs .....	16
Tabelle 4: RET/PTC- und BRAF-Status der 80 untersuchten PTC .....	18
Tabelle 5: Charakteristika des Untersuchungs- und Validierungskollektivs.....	19
Tabelle 6: Gewebe-Array mit 30 Schilddrüsennormalgewebe-Fällen von Erwachsenen .....	21
Tabelle 7: Patientendaten für den Schilddrüsennormalgewebe-Array mit 30 Fällen..	22
Tabelle 8: Gewebe-Array mit 58 kindlichen PTC aus Weißrussland .....	23
Tabelle 9: Patientendaten für den Gewebe-Array mit 58 kindlichen PTC aus Weißrussland.....	23
Tabelle 10: Antikörperschichten für die Detektion der Metaphase-FISH .....	65
Tabelle 11: Antikörperschichten für die Detektion der Interphase-FISH .....	68
Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Antikörperverdünnungen und Färbeprogramme.....	80
Tabelle 13: Patientendaten der Primärkulturen aus Normalgewebe der Schilddrüse ..	87
Tabelle 14: Antikörperschichten für die Detektion der SKY .....	95
Tabelle 15: Wiederkehrende DNA-Zugewinne in mindestens 70 % der 52 PTC (38 Bereiche) .....	124
Tabelle 16: Wiederkehrende DNA-Verluste in mindestens 50 % der 52 PTC (25 Bereiche) .....	125
Tabelle 17: Gemeinsame Kopienzahlveränderungen in 52 PTC dieser Studie und einer vorangegangenen Studie mit kindlichen PTC (Unger et al., 2008) .....	126
Tabelle 18: Mit der Tumorgröße, dem Geschlecht und dem Expositionsstatus assoziierte Kopienzahlveränderungen in 52 PTC (Untersuchungskollektiv).... .....	131
Tabelle 19: Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7 in 28 PTC (Validierungskollektiv) .....	135
Tabelle 20: Tumorassoziierte Kandidatengene in wiederkehrend veränderten chromosomalen Bereichen in PTC.....	138
Tabelle 21: Tumorassoziierte Kandidatengene in chromosomalen Bereichen assoziiert mit der Tumorgröße (TNM) und dem Geschlecht .....	139

---

Tabelle 22: Tumorassoziierte Kandidatengene in dem strahlenassoziierten Veränderungsbereich auf Chromosom 7q11.22-11.23 .....	139
Tabelle 23: Ergebnisse der <i>Gene Ontology (GO)</i> Analyse für Chromosom 7q11.22-11.23 .....	140
Tabelle 24: BAC-Klone für FISH-Analysen .....	141
Tabelle 25: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Validierung wiederkehrender Kopienzahlveränderungen in PTC.....	144
Tabelle 26: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 in PTC .....	147
Tabelle 27: Hinsichtlich differentieller mRNA-Expression von Kandidatengenen auf Chromosom 7q11.22-11.23 untersuchte PTC-Fälle.....	151
Tabelle 28: Hinsichtlich der mRNA-Expression von CLIP2 untersuchte PTC-Fälle.....	152
Tabelle 29: Hinsichtlich differentieller mRNA-Expression von Kandidatengenen in Tumor- und Normalgewebe untersuchte Schilddrüsenfälle .....	155
Tabelle 30: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an 34 PTC für das Protein CLIP2 .....	160
Tabelle 31: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung an einem Gewebe-Array mit 22 PTC für das Protein CLIP2 .....	162
Tabelle 32: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an 10 exponierten PTC-Fällen für das Protein CLDN4 .....	164
Tabelle 33: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an 10 exponierten PTC-Fällen für das Protein LIMK1 .....	166
Tabelle 34: Kopienzahlveränderungen der Zelllinie TPC-1.....	170
Tabelle 35: Nachgewiesene DNA-Verluste der Zelllinie S22N.....	177
Anhang 1: Kopienzahlveränderungen in 52 PTC.....	213
Anhang 2: Patientendaten von 13 PTC von Kindern aus der Ukraine und Weißrussland .....	220

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ak	autoklaviert
AK	Antikörper
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
bidest.	bidestilliert
Bio	Biotin
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridisation</i>
Chr	Chromosom
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C <sub>T</sub>	<i>Threshold Cycle</i>
CTB	Chernobyl Tissue Bank
Cy3, Cy5	Cyanin 3, 5
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-2-HCl
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
del	Deletion
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
Dig	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DOP	<i>Degenerated oligonucleotide primed</i>
DTAF	4,6-Dichlorotriazinyl-aminofluorescein
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZ	extrazellulär

F	follikulär
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FFPE	<i>Formalin-fixed Paraffin-embedded</i>
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FITC	Fluorescein
g	Gramm
G	Guanin
x g	Erdbeschleunigung
GO	<i>Gene Ontology</i>
Gy	Gray
h	Stunde
HCl	Hydrogenchlorid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HM	Hybridisierungsmix
H <sub>2</sub> O	Wasser
HRP	Horseradish Peroxidase
Hz	Hertz
I	Iod
IHC	Immunhistochemie
inv	Inversion
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
k	Tausend
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
l	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
m	männlich
M	Mol
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter



mM	Millimol
µm	Mikrometer
MM 1.0	Mastermix 1.0
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MW	Mittelwert
n	numerus (Anzahl)
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bekannt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanoMol
n.v.	nicht verfügbar
n.z.	nicht zutreffend
OT	Objektträger
P	papillär
p.a.	per analysis
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen	Penicillin
pmol	pikoMol
PN	Phosphat-Nonidet
PNM	Phosphat-Nonidet mit Magermilchpulver
PTC	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S	solid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SKY	Spektrale Karyotypisierung
SSC	Standard Saline-Citrat-Puffer
Strep	Streptomycin
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TE	Tris-EDTA

TES	Tris-EDTA-Saline
TK	Tyrosinkinase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Units
UV	Ultraviolet
V	Volt
v.a.	vor allem
Vol.	Volumen
w	weiblich
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel

## A EINLEITUNG

Am 26. April 2011 jährte sich die Reaktorkatastrophe von Tschernobyl zum 25. Mal. Zahlreiche Studien befassen sich mit den gesundheitlichen Folgen des Nuklearunfalls, insbesondere mit erhöhten Krebsrisiken infolge der Strahlenexposition (Cardis et al., 2006; Cardis und Hatch, 2011). Epidemiologische Untersuchungen zu potentiell erhöhtem Leukämie- und Brustkrebsrisiko lieferten bislang teils widersprüchliche, kontrovers diskutierte und nur schwer interpretierbare Ergebnisse (Cardis und Hatch, 2011). Hinweise auf erhöhte Raten von Brustkrebs müssen weiter verfolgt werden, da aufgrund der langen Latenzzeit noch keine definitiven Aussagen über Langzeitfolgen getroffen werden können (Pukkala et al., 2006; Cardis et al., 2007; Bogdanova et al., 2010; Cardis und Hatch, 2011). Im Gegensatz dazu ist der dramatische Anstieg vor allem von kindlichen Schilddrüsenkarzinomen nach interner Strahlenexposition die am besten dokumentierte und untersuchte Gesundheitsfolge des Tschernobyl-Unfalls (Cardis et al., 2006).

Bei Schilddrüsenkarzinomen handelt es sich um die häufigste maligne Erkrankung des endokrinen Systems. Für das Jahr 2008 wurde die weltweite altersstandardisierte Inzidenzrate bei Frauen auf 4,7 und bei Männern auf 1,5 pro 100.000 Einwohner geschätzt (Ferlay et al., 2010). Bezogen auf diese Daten machen Schilddrüsenkarzinome weltweit etwa 2,7 % aller malignen Erkrankungen bei Frauen und 0,7 % bei Männern aus. Frauen sind insgesamt zwei- bis viermal häufiger betroffen als Männer; allerdings sind die Tumorinzidenzen bei Männern und Frauen vor der Pubertät und nach der Menopause relativ ausgeglichen (Nagataki und Nystrom, 2002). Die Sterblichkeitsraten sind relativ gering und lagen 2008 weltweit für Frauen bei 0,6/100.000 (24.177 Fälle) und für Männer bei 0,3/100.000 (11.206 Fälle) (Ferlay et al., 2010). Die Inzidenzraten variieren beträchtlich zwischen verschiedenen geographischen Regionen und sind in entwickelten Ländern tendenziell höher als in weniger entwickelten Ländern (Ferlay et al., 2010). In den meisten Ländern der Welt wird in den letzten 30 Jahren ein deutlicher Anstieg der Inzidenzraten beobachtet (Kilfoy et al., 2009). In den USA weisen Schilddrüsenkarzinome bei Frauen sogar die am schnellsten ansteigende Inzidenz aller Krebsarten auf (Al-Brahim und Asa, 2006). In der Literatur wird intensiv darüber disku-

tiert, inwiefern dieser Inzidenzanstieg auf eine verbesserte Diagnostik von Mikrokarzinomen zurückzuführen ist, wobei auch bei größeren Schilddrüsentumoren eine ansteigende Neuerkrankungsrate beobachtet wird (Burgess und Tucker, 2006). Es wird spekuliert, dass dies zum Teil durch veränderte Umweltfaktoren, einschließlich erhöhter Strahlenbelastung durch radioaktiven Fallout, medizinische Diagnostik und therapeutische Behandlung benignen und malignen Erkrankungen, erklärt werden kann (Zhu et al., 2009; Ward et al., 2010; Schonfeld et al., 2011).

Maligne Tumore der Schilddrüse sind überwiegend epithelialen Ursprungs. In der WHO-Klassifikation der epithelialen Karzinome werden differenzierte Karzinome mit Follikelzellursprung (follikuläre und papilläre Karzinome) oder C-Zell-Ursprung (medulläres Schilddrüsenkarzinom) von undifferenzierten (anaplastischen) Karzinomen unterschieden (Hedinger et al., 1988). Während das anaplastische Karzinom mit einer Überlebensrate von nur 13 % eine relativ schlechte Prognose zeigt (Sherman, 2003), liegt die 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom (PTC) bei 80-90 % (Schmid et al., 2003). Das papilläre Schilddrüsenkarzinom ist mit einem Anteil von 54-68 % der häufigste aller Schilddrüsentumore (Nair et al., 2001). Darüber hinaus waren über 95 % der nach dem Tschernobyl-Unfall aufgetretenen Schilddrüsentumore papilläre Karzinome (Tuttle et al., 2011).

Die histologische Diagnose des PTC basiert auf charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zellkerne. Typisch veränderte Zellkerne können Einkerbungen (*grooves*) sowie Zelleinschlüsse aufweisen, sind vergrößert und dicht überlappend nebeneinander angeordnet. Zusätzlich treten so genannte Milchglaskerne auf, die aufgrund einer randlichen Verdichtung und zentralen Auflockerung des Chromatins aufgehellert erscheinen (Schmid et al., 2003; Al-Brahim und Asa, 2006). Es existieren verschiedene histologische Subtypen des PTC, die alle die charakteristischen neoplastischen Zellkernveränderungen aufweisen, sich jedoch in der architektonischen Anordnung der neoplastisch transformierten follikulären Epithelzellen unterscheiden. Während die klassische (papilläre) Form des PTC verzweigte papillenförmige Zellformationen mit zentralen fibrovaskulären Stromastielen und/oder Follikeln aufweist (Schmid et al., 2003), liegt bei der follikulären Variante des papillären Karzinoms architektonisch ein follikuläres Wachstum vor. Im Gegensatz zu normalem Schilddrüsengewebe, wo die unterschiedlich großen Follikel von flachen Epithelzellen ausgekleidet werden,

sind die neoplastischen Follikel hier allerdings von Zellen mit der typischen Morphologie des PTC ausgekleidet (Salajegheh et al., 2008). Bei der soliden Variante handelt es sich um einen seltenen Subtyp des PTC, der vorwiegend bei Kindern und Jugendlichen diagnostiziert wird. Histologisch sind solide Zellverbände mit den typischen zytologischen Merkmalen der klassischen Form zu erkennen. Diese aggressivere Tumorform des PTC weist eine vergleichsweise schlechtere Prognose auf (Nikiforov et al., 2001; Troncone et al., 2008). Häufig kommen auch Kombinationen der histologischen Subtypen vor. Papilläre Karzinome metastasieren vor allem lymphogen; Gefäßeinbrüche und Fernmetastasen in Lunge und Knochen sind eher selten (Schmid et al., 2003; Al-Brahim und Asa, 2006).

Die Ursachen für die Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen sind nicht eindeutig geklärt. Angesichts des höheren Anteils weiblicher Patienten zwischen Pubertät und Menopause, werden Östrogen und schwangerschaftsspezifische hormonelle Faktoren als mögliche Auslöser für die Schilddrüsenkarzinogenese betrachtet (Rossing et al., 2000). Außerdem geht man von einer genetischen Prädisposition für PTC aus, da bei familiärer Krebserkrankung ein erhöhtes PTC-Risiko für Kinder und Geschwister besteht (Hemminki et al., 2005).

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass Exposition durch interne oder externe ionisierende Strahlung, vor allem im frühen Kindesalter, bei der Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen eine sehr große Rolle spielt. Bereits 1950 wurde in einer Studie an 28 kindlichen Schilddrüsenkarzinomen beobachtet, dass die externe therapeutische Bestrahlung des Kopf-Hals-Bereichs im Kindesalter zu einer malignen Entartung der Schilddrüse führen kann (Duffy und Fitzgerald, 1950). Eine zusammenfassende und vergleichende Analyse von sieben Studien zeigte den Einfluss externer ionisierender Strahlung ( $\gamma$ - und Röntgenstrahlung) auf die Entwicklung von Schilddrüsenkarzinomen und die extreme Strahlensensibilität der kindlichen Schilddrüse (Ron et al., 1995). Die Studien bezogen sich auf durch externe Strahlung exponierte Kollektive u.a. von Patienten nach Röntgenbestrahlung mit *Tinea capitis*, lymphoider Hyperplasie und vergrößerter Thymusdrüse sowie Überlebenden der Atombombenexplosionen von Hiroshima und Nagasaki (Ron et al., 1989; Pottern et al., 1990; Shore et al., 1993; Thompson et al., 1994). Für eine externe Strahlenexposition im Kindesalter (< 15 Jahre) konnte selbst für geringe Dosen von 0,1 Gy eine lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgewie-

sen werden, wohingegen Bestrahlungen ab einem Alter von 20 Jahren das Risiko für Schilddrüsenkarzinome kaum erhöhten (Ron et al., 1995).

Der Einfluss einer internen Strahlenexposition durch Radioiod auf die Entwicklung von Schilddrüsenkarzinomen wurde zuerst in Tierversuchen bestätigt. Untersuchungen an Ratten und Mäusen zeigten, dass sich Tumore der Schilddrüse durch  $^{131}\text{I}$  Injektion induzieren lassen. In den Studien wurde deutlich, dass bei erwachsenen Tieren eine Proliferationsstimulation des Schilddrüsengewebes nötig ist, um eine kanzerogene Wirkung inkorporierter Radioiod-Isotope beobachten zu können. Dahingegen führte die Radioiod-Exposition der noch im Entwicklungsstatus befindlichen Schilddrüse beim Fötus oder des neugeborenen Tieres auch ohne Stimulation der Proliferation zur Karzinomentwicklung (Doniach, 1957; Walinder, 1971, 1972; Walinder und Sjoden, 1972, 1973). Diese Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass interne Radioiod-Exposition genauso wie externe Strahlenexposition zu einer Induktion von Schilddrüsenkarzinomen beim Menschen führen kann, sofern die Exposition im Kindesalter erfolgt.

Auf tragische Weise lieferte der Tschernobyl-Unfall erstmals umfangreiches Datenmaterial über die Auswirkungen einer internen Strahlenbelastung durch Radioiod. Infolge der Explosion von Reaktorblock 4 sowie des anschließenden Graphitbrands gelangten radioaktive Gase und Partikel in große Höhen der Erdatmosphäre und wurden über tausende Kilometer transportiert. Die radioaktive Wolke breitete sich über die gesamte nördliche Hemisphäre aus. Innerhalb der ersten 10 Tage nach dem Unfall wurden Aktivitäten von mehreren Trillionen Becquerel freigesetzt; darunter waren  $\sim 1,76 \times 10^{18}$  Bq  $^{131}\text{I}$  und eine Reihe weiterer kurzlebiger Iodisotope (UNSCEAR, 2008). Das radioaktive Material verseuchte die nähere Umgebung und kontaminierte als radioaktiver Fallout am stärksten Gebiete in den ehemaligen Sowjetrepubliken Weißrussland, Ukraine und Russland. Neben den Beschäftigten des Kernkraftwerks Tschernobyl und den bei den Aufräumarbeiten am Reaktor eingesetzten Liquidatoren, wurden in den kontaminierten Gebieten auch große Teile der Bevölkerung (evakuierte und nicht evakuierte Personengruppen) durch erhebliche externe und interne Strahlenexposition belastet.  $^{131}\text{I}$  ist ein  $\beta$ -/ $\gamma$ -Strahler mit einer kurzen Halbwertszeit von 8,04 Tagen. Über die Atemluft und die Nahrung (v.a. radioaktiv verseuchte Kuhmilch) kam es zu einer Aufnahme des Radioiods in den menschlichen Körper und speziell bei Kindern zu einer

verstärkten Anreicherung von  $^{131}\text{I}$  in der sich noch im Wachstum befindlichen Schilddrüse, was zum Teil zu beträchtlichen Schilddrüsendosen führte.

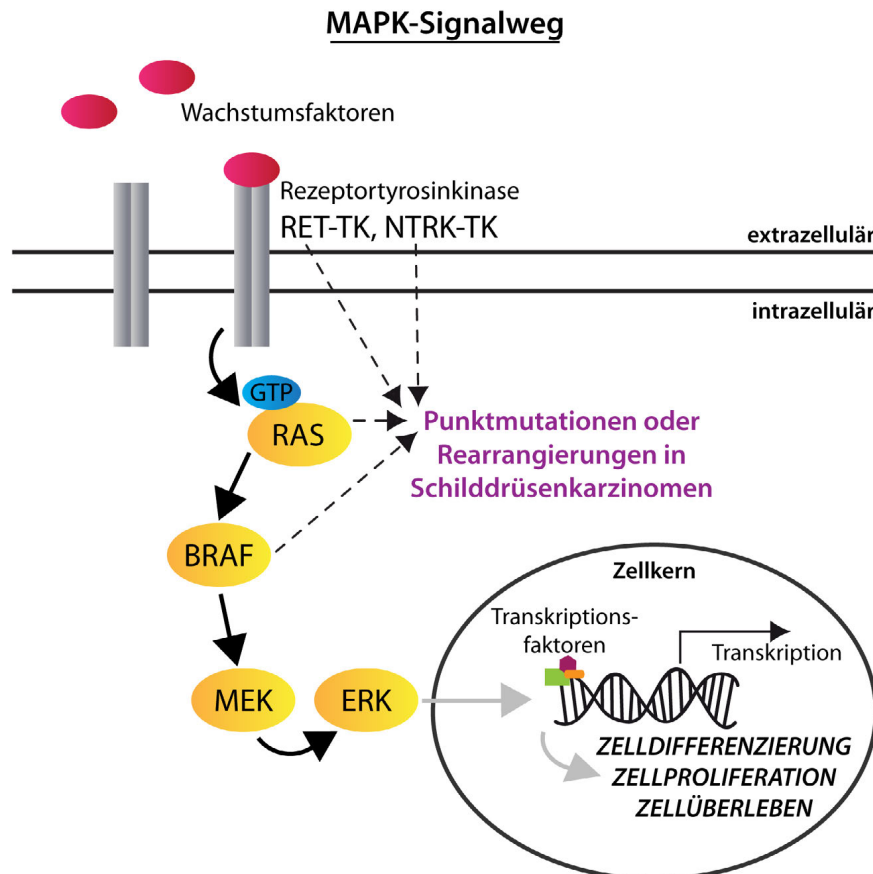
Bereits vier Jahre nach dem Reaktorunfall wurde in Weißrussland ein beispielloser Anstieg in der Inzidenz von kindlichen Schilddrüsenkarzinomen verzeichnet. In der stark kontaminierten weißrussischen Region Gomel stieg die Anzahl diagnostizierter kindlicher Schilddrüsenkarzinome von ein bis zwei pro Jahr zwischen 1986 und 1989 auf 14 im Jahr 1990 und 38 im Jahr 1991 (Baverstock et al., 1992; Kazakov et al., 1992). Zwischenzeitliche Zweifel, ob es sich bei den diagnostizierten Tumoren tatsächlich um strahleninduzierte Schilddrüsenkarzinome mit sehr kurzen Latenzzeiten oder vielmehr um okkulte Schilddrüsenkarzinome, die erst durch verstärkte *Screening*-Aktivitäten entdeckt wurden, handelt, konnten schnell ausgeräumt werden (Beral und Reeves, 1992; Rojas-Burke, 1992; Ron et al., 1992; Shigematsu und Thiessen, 1992). Bis heute, 25 Jahre nach dem Unfall von Tschernobyl, wurden über 6.000 strahlenassoziierte Schilddrüsentumore bei jungen Patienten in Weißrussland, Russland und der Ukraine diagnostiziert. Hierbei handelte es sich zu über 95 % um papilläre Karzinome; die meisten Patienten waren zur Zeit des Reaktorunfalls jünger als 14 Jahre (UNSCEAR, 2008; Tuttle et al., 2011). Die Inzidenz von Schilddrüsentumoren bei Kindern unter 15 Jahren lag vor dem Fallout bei jährlich unter einem Fall pro 1 Million Kinder. 1995 wurde in Weißrussland eine um das 30-fache erhöhte Neuerkrankungsrate beobachtet (Williams, 2002). In der mit am stärksten kontaminierten Region Gomel stieg die Inzidenz sogar um den Faktor 100 an. In der Ukraine wurde 1996/1997 insgesamt ein Anstieg um den Faktor 10 beobachtet, wobei die am stärksten kontaminierten Regionen Rovno, Kiev, Chernigov, Chercassy und Zhytomyr einen höheren Inzidenzanstieg zeigten (Tronko et al., 1999).

Die ersten pathologischen Berichte nach dem Tschernobyl-Unfall zu kindlichen strahlenassoziierten Karzinomen mit sehr kurzen Latenzzeiten beschrieben eine hohe Aggressivität der aufgetretenen Tumore hinsichtlich invasiven Wachstums und frühzeitiger Metastasierung (Kazakov et al., 1992). Tuttle et al. (2011) lieferten eine vergleichende Analyse klinischer Daten von sporadischen und strahlenassoziierten kindlichen Karzinomen sowie differenzierten Schilddrüsenkarzinomen von Erwachsenen aus vorangegangenen Studien. Die bei Tuttle et al. (2011) beschriebene Zusammenfassung von acht Studien zu insgesamt ca. 2.000 nach Tschernobyl diagnostizierten strahlenas-

soziierten kindlichen Schilddrüsenkarzinomen (Kazakov et al., 1992; Pacini et al., 1997; Tronko et al., 1999; Rybakov et al., 2000; Spinelli et al., 2004; Demidchik et al., 2006; Rogounovitch et al., 2006; Rumyantsev et al., 2011) ergab, dass bei etwa 60 % der Patienten regionäre Lymphknotenmetastasen (N1) und bei 8 % Fernmetastasen (M1) auftraten. Somit zeigte sich für nach Tschernobyl entstandene kindliche Karzinome eine signifikant höhere Rate an regionären Lymphknotenmetastasen sowie Fernmetastasen im Vergleich zu sporadischen Schilddrüsenkarzinomen bei Erwachsenen. Bei insgesamt 457.556 in vier Studien untersuchten sporadischen Schilddrüsenkarzinomen von Erwachsenen (Hundahl et al., 1998; Hay et al., 2002; Altekruse SF, 2010; Elisei et al., 2010) zeigten sich nur in etwa 31 % der Fälle regionäre Lymphknotenmetastasen (N1) sowie in lediglich 4 % der Fälle Fernmetastasen (M1). Allerdings ist das Risiko eines krankheitsbedingten Todes mit 5 % bei Erwachsenen ohne Strahlenexposition deutlich höher als bei kindlichen Patienten; hierbei liegt die krankheitsbedingte Todesrate bei lediglich 1 %, unabhängig davon, ob es sich um ein sporadisches oder strahlenassoziertes Schilddrüsenkarzinom handelt (Tuttle et al., 2011). Vergleicht man jedoch strahlenassozierte und sporadische kindliche Schilddrüsenkarzinome so ergeben sich ähnliche Raten für das Auftreten von regionären Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen. Hieraus folgt, dass der beschriebene aggressivere Krankheitsverlauf von nach dem Tschernobyl-Unglück aufgetretenen Schilddrüsenkarzinomen auf das Patientenalter und nicht auf die Strahlenexposition zurückzuführen ist (Tuttle et al., 2011).

Auf molekularer Ebene sind Schilddrüsenkarzinome häufig mit genetischen Aberrationen assoziiert, die zu einer konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs führen (Abb. 1). Dieser führt über eine Kaskade von Signaltransduktionen zu kontrollierter Differenzierung, Proliferation und Überleben von Zellen (Robinson und Cobb, 1997). In Schilddrüsenkarzinomen sind verschiedene Komponenten des MAPK-Signalwegs verändert. Hierzu gehören Punktmutationen oder chromosomale Rearrangierungen der Rezeptortyrosinkinasen RET und NTRK1 sowie der intrazellulären Effektoren RAS und BRAF (Kondo et al., 2006). Dabei wird die Koexistenz mehrerer Genveränderungen in einem Tumor nur sehr selten beobachtet (Soares et al., 2003; Frattini et al., 2004; Lima et al., 2004). Die zwei häufigsten Genveränderungen in PTC sind BRAF-Mutationen und RET/PTC-Rearrangierungen.





**Abbildung 1: Veränderungen des MAPK-Signalwegs in Schilddrüsentumoren**

Rezeptortyrosinkinasen sind Transmembranproteine, deren intrazellulärer Teil eine Tyrosinkinaseaktivität aufweist. Durch die Bindung von Wachstumsfaktoren auf der extrazellulären Seite wird eine Dimerisierung des Rezeptors hervorgerufen; die Tyrosinkinase katalysiert daraufhin die Phosphorylierung von Zielproteinen. Hierdurch wird eine Signalkaskade eingeleitet, die am Ende zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt, die an der Differenzierung, Proliferation und am Überleben von Zellen beteiligt sind. In Schilddrüsenkarzinomen sind häufig Komponenten des MAPK-Signalwegs verändert. Hierzu gehören Punktmutationen oder chromosomale Rearrangierungen der Rezeptortyrosinkinasen RET und NTRK1 sowie der intrazellulären Effektoren RAS und BRAF.

Das RET-Proto-Onkogen ist in PTC häufig durch chromosomale Umlagerungen (Translokationen oder Inversionen) verändert (RET/PTC) (Jhiang, 2000). RET ist auf Chromosom 10, Bande 10q11.2 lokalisiert und kodiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor. Es existieren mindestens 15 verschiedene RET-Umlagerungen, bei denen die RET-Tyrosinkinase-Domäne durch Translokation oder Inversion mit anderen Genen fusioniert wird (Imkamp et al., 2007). Hierdurch kommt es zu einer konstitutiven Aktivierung des Onkogens. Am häufigsten findet man Rearrangierungen von RET mit den Genen H4 (RET/PTC1) und ELE1 (RET/PTC3), die auch auf Chromosom 10 liegen und durch paracentrische Inversionen mit RET fusioniert werden. RET/PTC-Umlagerungen

treten in sporadischen papillären Schilddrüsenkarzinomen mit einer Häufigkeit von 5-30 % auf (Jhiang und Mazzaferri, 1994). Nach dem Tschernobyl-Fallout diagnostizierte kindliche strahlenassoziierte PTC wiesen dagegen in 60-70 % der Fälle RET/PTC-Veränderungen auf (Fugazzola et al., 1995; Klugbauer et al., 1995; Smida et al., 1999). Vorwiegend handelte es sich dabei um die RET/PTC3-Rearrangierung. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass es sich bei der RET/PTC-Rearrangierung um einen Marker für strahleninduzierte Tumore handeln könnte. In neueren Veröffentlichungen wird die hohe Prävalenz von RET/PTC3 in PTC, die nach dem Tschernobyl-Unfall aufgetreten sind, allerdings eher mit dem soliden Subtyp und dem Alter der Patienten als mit der Ätiologie der Tumore in Verbindung gebracht. Des Weiteren wurde eine ähnliche Prävalenz von RET/PTC-Umlagerungen in sporadischen kindlichen PTC beobachtet (Nikiforov et al., 1997; Fenton et al., 2000; Powell et al., 2005; Tuttle et al., 2008). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass RET/PTC-Umlagerungen keine strahlenspezifischen Veränderungen darstellen. Darüber hinaus haben Untersuchungen von nach Tschernobyl entstandenen PTC auf Einzelzell-Ebene gezeigt, dass RET/PTC-Rearrangierungen in einzelnen Tumoren sehr heterogen verteilt sind. Dabei wies in vielen Tumoren nur ein subklonaler Anteil der Zellen RET/PTC-Umlagerungen auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass entweder RET/PTC-Veränderungen nicht den ersten Schritt in der Schilddrüsenkarzinogenese darstellen oder dass bei einigen Tumoren eine multiklonale Tumorentstehung vorliegt (Unger et al., 2004).

Die BRAF-Punktmutation V600E (Austausch von Valin an der Position 600 gegen Glutamat) stellt mit 36-69 % die häufigste Veränderung in PTC von Erwachsenen dar (Cohen et al., 2003; Kimura et al., 2003). Die Häufigkeit von Veränderungen des BRAF-Onkogens in kindlichen strahlenassoziierten PTC ist dagegen mit < 10 % sehr gering und unterscheidet sich damit nicht von der in sporadischen kindlichen PTC (Kumagai et al., 2004; Lima et al., 2004; Powell et al., 2005).

Die Ergebnisse der vorangegangenen Studien lassen die Schlussfolgerung zu, dass weder RET-Rearrangierungen noch BRAF-Mutationen in Zusammenhang mit einer Strahlenexposition stehen, jedoch eine deutliche Assoziation mit dem Patientenalter aufweisen. Wie bereits im Zusammenhang mit dem Auftreten von Metastasen gezeigt, unterscheiden sich kindliche PTC auch auf molekularer Ebene deutlich von PTC bei Erwachsenen. Außerdem legen die oben angeführten Ergebnisse nahe, dass neben

RET/PTC-Rearrangierungen und BRAF-Mutationen noch andere Genveränderungen an der Entwicklung von papillären Schilddrüsenkarzinomen beteiligt sein müssen, um eine maligne Entartung der epithelialen Schilddrüsenzellen hervorzurufen. Aus diesen Befunden wird auch deutlich, dass die genauen Mechanismen insbesondere der strahleninduzierten Karzinogenese noch weitestgehend ungeklärt sind. Es ist bekannt, dass ionisierende Strahlung DNA-Schäden wie Einzel- und Doppelstrangbrüche hervorruft. Als Folge fehlgeschlagener DNA-Reparatur können chromosomale Aberrationen wie Translokationen (reziproke und nicht-reziproke) sowie Kopienzahlveränderungen in Form von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten auftreten, welche wiederum zu einer malignen Entartung von Zellen führen können (Tanaka et al., 2007; Mondello et al., 2010).

Diese Erkenntnisse gaben Veranlassung nach weiteren, bisher unbekanntem Genveränderungen zu suchen, die allgemein an der Entwicklung von PTC beteiligt sind. Darüber hinaus sollten PTC, die nach dem Tschernobyl-Unglück entstanden sind, auf die Existenz strahlenspezifischer Genveränderungen überprüft werden, um die Mechanismen der Strahlenkarzinogenese papillärer Schilddrüsenkarzinome aufzuklären.

Hierfür stand im Rahmen dieser Arbeit ein angeglichenes Tumorkollektiv von exponierten und nicht exponierten Patienten (< 25 Jahre) von der Chernobyl Tissue Bank (CTB; [www.chernobyltissuebank.com](http://www.chernobyltissuebank.com)) zur Verfügung (Thomas et al., 2011). In dieser Tumorbank werden seit 1998 Schilddrüsentumore zusammengeführt, die Bewohner in kontaminierten Gebieten Russlands und der Ukraine nach dem Tschernobyl-Reaktorunfall entwickelt haben. Die strahlenassoziierten Tumorproben stammen von jungen Patienten, die zum Zeitpunkt des Reaktorunfalls < 19 Jahre waren (geboren nach dem 26. April 1967). Inzwischen beinhaltet das CTB-Kollektiv auch eine bedeutende Anzahl sporadischer Schilddrüsenkarzinome von Patienten, die erst nach dem 1. Januar 1987 geboren wurden und aufgrund der kurzen <sup>131</sup>Iod-Halbwertszeit von nur 8,04 Tagen keiner Radioiod-Strahlung (auch nicht *in utero*) ausgesetzt waren. Bei jeder Studie, die sich mit an der Entwicklung strahlenassoziiierter PTC beteiligten genetischen Veränderungen befasst, ist es für den Vergleich exponierter und nicht exponierter Tumorkohorten entscheidend, dass diese für möglichst viele Faktoren wie Alter, Geschlecht, Herkunft und Histologie angeglichen sind. Durch diese Vorgehensweise wird

der Einfluss möglicher Störfaktoren (wie z.B. das Patientenalter) auf die Versuchsergebnisse minimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 80 PTC der CTB mittels *Array Comparative Genomic Hybridisation* (Array-CGH), einer molekularzytogenetischen Methode zum genomweiten Nachweis von DNA-Kopienzahlveränderungen, untersucht. Bei der Array-CGH handelt es sich um eine Weiterentwicklung der konventionellen vergleichenden genomischen Hybridisierung (*Comparative Genomic Hybridisation*, CGH), bei der gesamtgenomische Tumor- und normale Referenz-DNA mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf Metaphasepräparate eines gesunden Spenders hybridisiert werden (Kallioniemi et al., 1992). Anstelle von Metaphasen kommen bei der Array-CGH Microarrays zum Einsatz, die einen Teil oder das komplette humane Genom in Form von DNA-Fragmenten repräsentieren (Pinkel et al., 1998). In dieser Arbeit wurden 1 Mb BAC-Arrays (*Bacterial Artificial Chromosome*) und Oligonukleotid-Arrays verwendet, die das gesamte Genom in einer Auflösung von 1 Mb bzw. 13 kb abdecken (Fiegler et al., 2003; Carvalho et al., 2004; Ishkanian et al., 2004; Coe et al., 2007). Durch eine Messung der Fluoreszenzintensitätsverhältnisse (*Ratios*) von Test- und Referenz-DNA können Bereiche mit DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten im Tumorgenom ermittelt werden. Bei einem DNA-Zugewinn überwiegt die Fluoreszenzintensität der markierten Tumor-DNA, da im Verhältnis mehr Tumor- als Referenz-DNA an die Ziel-DNA bindet. Im Falle eines DNA-Verlusts überwiegt dagegen die Fluoreszenzintensität der Referenz-DNA.

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war der Nachweis und Vergleich von Kopienzahlveränderungen in PTC von strahlenexponierten und nicht exponierten Patienten. Die resultierenden Daten wurden auf Korrelation mit der Strahlenexposition der Patienten getestet, um mögliche strahlenassoziierte genomische Veränderungen identifizieren zu können. Signifikante Veränderungen wurden anschließend mittels höher auflösender Oligonukleotid Array-CGH näher untersucht und mit Hilfe von Interphase-FISH-Analysen verifiziert. Chromosomale Veränderungsbereiche, die eine Assoziation mit der Strahlenexposition der Patienten oder anderen klinischen Daten aufwiesen, wurden sodann nach tumorassoziierten Kandidatengen durchsucht. Für ausgewählte Kandidatengene sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob eine Veränderung auf DNA-Ebene auch zu einer erhöhten Expression auf mRNA- und Proteinebene

führt. Schließlich sollten Schilddrüsen-Zellkulturmodelle für funktionelle Studien etabliert werden, um die phänotypische Auswirkung einer gezielten Überexpression von Kandidatengenen untersuchen zu können.

## B MATERIAL & METHODEN

### B.1 Patientenmaterial

#### B.1.1 PTC-Kollektiv der Chernobyl Tissue Bank

Im Rahmen des EU-Projektes GENRISK-T wurden in dieser Arbeit 80 humane papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC) von Patienten <25 Jahre (Altersmedian: 16,9 Jahre; Altersspanne: 7,7-24,6 Jahre) untersucht. Das Patientenmaterial stammte von der Chernobyl Tissue Bank (CTB) (<http://www.chernobyltissuebank.com>). In dieser Tumorbank werden Schilddrüsentumore von Patienten aus der Ukraine und Russland zusammengeführt, die nach dem Tschernobyl-Reaktorunfall entstanden sind. Das zur Verfügung stehende Tumorkollektiv von exponierten und nicht exponierten Patienten war hinsichtlich des Alters bei der Operation, des Geschlechts und der Herkunft der Patienten angeglichen. Alle Tumorproben stammten von jungen Patienten, die in Gebieten der Ukraine lebten, welche durch den Reaktorunfall von Tschernobyl am 26. April 1986 kontaminiert wurden. Patienten der exponierten Gruppe wurden vor dem Tschernobyl-Unfall geboren und somit durch den Radioiod-Fallout exponiert. Die Patienten der zweiten Gruppe wurden dagegen erst nach dem 1. Januar 1987 geboren und waren somit keiner Radioiod-Strahlung (auch nicht *in utero*) ausgesetzt, da <sup>131</sup>Iod eine Halbwertszeit von nur 8 Tagen aufweist.

#### HISTOPATHOLOGISCHE KLASSIFIZIERUNG

Alle Tumore wurden vom *International Pathology Panel* der CTB gemäß der TNM-Klassifikation maligner Tumore (6. Auflage) der *International Union against Cancer* (Sobin et al., 2002; Wittekind et al., 2002) als PTC diagnostiziert. Das TNM-System beschreibt die anatomische Ausbreitung der Erkrankung in einer Art Kurzschrift und beruht auf der Feststellung der drei Komponenten T (Ausbreitung des Primärtumors), N (Regionäre Lymphknotenmetastasen) und M (Fernmetastasen). Durch Hinzufügen von Ziffern zu den einzelnen Komponenten wird die Ausdehnung des malignen Tumors angezeigt. Eine detaillierte Beschreibung der TNM-Klassifikation von Schilddrüsenkarzinomen ist Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Schilddrüsenkarzinomen**

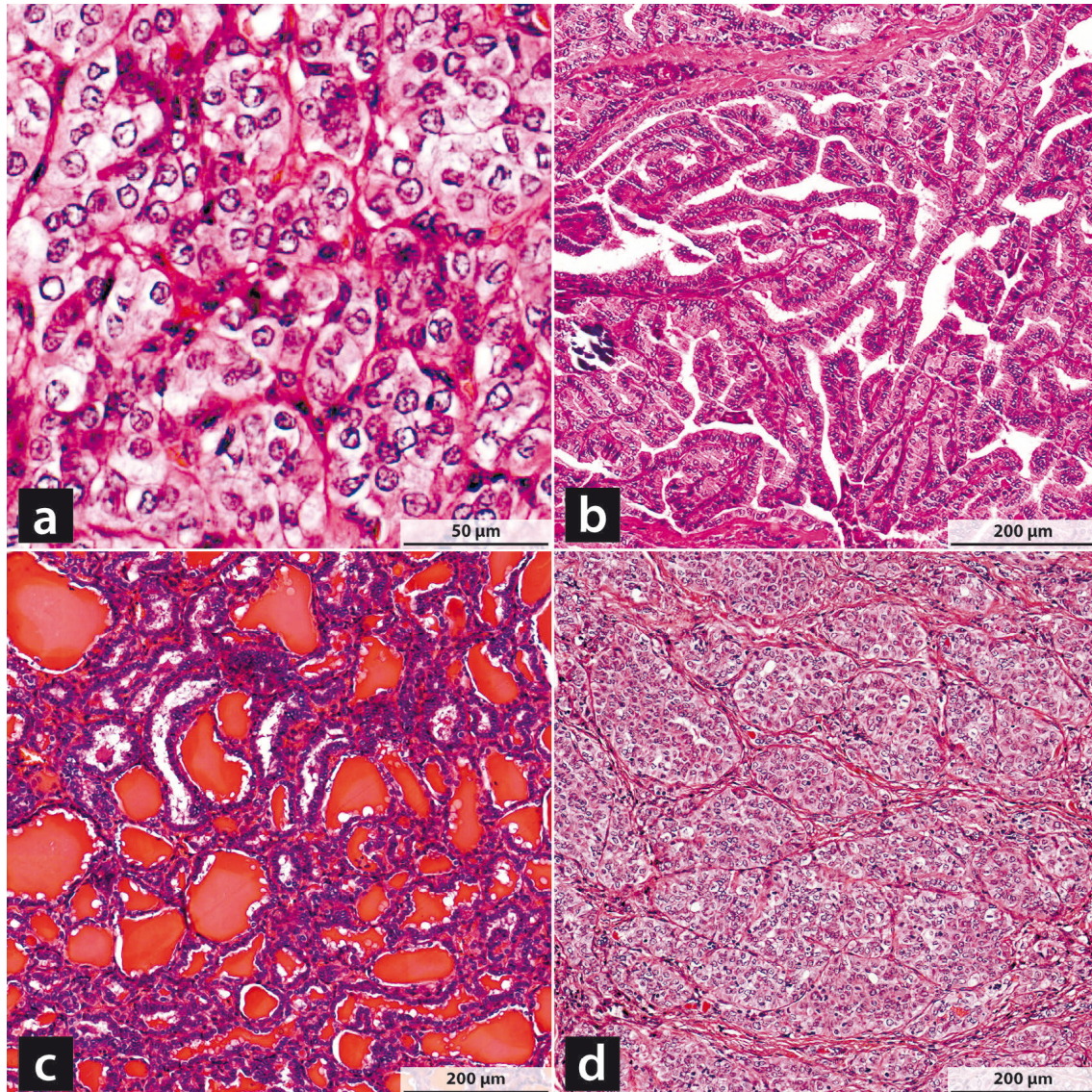
<b>T – Ausbreitung des Primärtumors</b>	
<b>T1</b>	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse
<b>T2</b>	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse
<b>T3</b>	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse oder Tumor mit minimaler extrathyroidaler Ausbreitung (d.h. Ausbreitung in den M. sternothyroideus und/oder das perithyroidale Weichgewebe)
<b>T4a</b>	Tumor mit Ausbreitung jenseits der Schilddrüsenkapsel und Invasion einer oder mehrerer der folgenden Strukturen: subkutanes Weichgewebe, Larynx, Trachea, Ösophagus, N. recurrens
<b>T4b</b>	Tumor infiltriert prävertebrale Faszie, mediastinale Gefäße oder umschließt die A. carotis
<b>T4a*</b>	(nur undifferenziertes Karzinom) Tumor (unabhängig von der Größe) auf die Schilddrüse beschränkt
<b>T4b*</b>	(nur undifferenziertes Karzinom) Tumor (unabhängig von der Größe) mit Ausbreitung jenseits der Schilddrüsenkapsel
* Alle undifferenzierten/anaplastischen Karzinome werden als T4 klassifiziert	
<b>N – Regionäre Lymphknotenmetastasen</b>	
<b>NX</b>	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
<b>N0</b>	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>N1</b>	Regionäre Lymphknotenmetastasen
<b>N1a</b>	Metastasen in Lymphknoten des Levels VI (prätracheal und paratracheal, eingeschlossen präälaryngeale und Delphi-Lymphknoten)
<b>N1b</b>	Metastasen in anderen unilateralen, bilateralen oder kontralateralen zervikalen oder oberen mediastinalen Lymphknoten
<b>M – Fernmetastasen</b>	
<b>MX</b>	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
<b>M0</b>	Keine Fernmetastasen
<b>M1</b>	Fernmetastasen

(Wittekind et al., 2002)

Die weitere Unterteilung der PTC in histologische Subtypen (papillär, follikulär und solid; siehe Abb. 2) wurde von Dr. Tatjana Bogdanova (Mitglied des *International Pathology Panel* der CTB; Research Institute of Endocrinology & Metabolism, Academy of Medical Sciences of the Ukraine) vorgenommen. Hierbei wurden auch Mischformen in der histologischen Architektur berücksichtigt. Im Folgenden wird stets der dominante Subtyp an erster Stelle genannt.

Die Untersuchung der PTC auf Kopienzahlveränderungen erfolgte zuerst an einem Untersuchungskollektiv von 52 Fällen (*Discovery Set*) und anschließend an einem zweiten unabhängigen Validierungskollektiv von 28 PTC-Fällen (*Validation Set*). Die Patienten-

daten für das Untersuchungs- und Validierungskollektiv sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt.



**Abbildung 2: Histologische Varianten des papillären Schilddrüsenkarzinoms (PTC)**  
(a) PTC mit charakteristischer Zellkernmorphologie; die typischen Milchglaskerne sind zu sehen; (b) Klassisches PTC mit papillenförmigem Wachstum & fibrovaskulären Stromastielen; (c) Follikuläre Variante des PTC; die Follikel sind durch neoplastische Zellen mit typischer Morphologie ausgekleidet; (d) Solide Variante des PTC mit typischen Zellclustern. (a)-(d) Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung).



Tabelle 2: Patientendaten des Untersuchungskollektivs

Fall	Geburtsdatum	Geschlecht <sup>1</sup>	Oblast	Alter bei OP [Jahre]	TNM <sup>2</sup>	Histologischer Subtyp <sup>3</sup>	Exposition <sup>4</sup>
UA0103	19.10.1984	W	Zhytomyr	15,0	T3N1abM1	FS	ja
UA0135	15.06.1984	M	Zhytomyr	15,6	T1N1aM0	SP	ja
UA0138	27.01.1986	M	Zhytomyr	14,0	T3N1abM0	S (P Bereiche)	ja
UA0139	29.12.1985	W	Kiev	14,1	T3N1abM0	S	ja
UA0144	25.05.1985	W	Chernigov	14,7	T1N1aM0	F	ja
UA0145	14.05.1984	M	Zhytomyr	15,8	T1N1aM0	F (P Bereiche)	ja
UA0147	22.08.1983	W	Zhytomyr	16,5	T2N0M0	P	ja
UA0162	12.07.1991	W	Zhytomyr	8,8	T3N1abM1	P	nein
UA0165	07.09.1983	W	Chernigov	16,7	T1N0M0	F	ja
UA0180	12.02.1984	W	Kiev	16,3	T1N0M0	P	ja
UA0192	17.07.1985	W	Sumy	15,0	T1N1aM1	PF	ja
UA0208	23.08.1985	M	Chernigov	15,1	T3N1abM1	F (S Bereiche)	ja
UA0242	19.03.1983	W	Kiev	17,7	T3N1aM0	P	ja
UA0249	09.03.1984	W	Rovno	16,8	T2N1aM0	F	ja
UA0286	10.04.1982	W	Zhytomyr	18,9	T1N1aM0	F	ja
UA0307	04.03.1988	W	Zhytomyr	13,1	T1N0M0	F	nein
UA0312	29.11.1989	M	Chernigov	11,4	T3N1abM0	PS	nein
UA0343	12.12.1982	W	Kiev	18,5	T2N1aM0	PFS	ja
UA0363	08.11.1985	M	Chernigov	15,9	T1N1abM0	PF	ja
UA0366	11.03.1986	M	Sumy	15,6	T1N0M0	P	ja
UA0368	14.06.1991	M	Sumy	10,3	T3N1abM1	F	nein
UA0400	20.01.1985	W	Zhytomyr	16,9	T1N0M0	FP	ja
UA0421	14.03.1988	M	Rovno	13,8	T3N1aM0	SP	nein
UA0436	22.01.1985	W	Zhytomyr	17,1	T3N0M0	PF	ja
UA0456	28.06.1984	W	Chercassy	17,7	T1N0M0	P (S Bereiche)	ja
UA0463	20.08.1983	W	Chernigov	18,6	T3N0M0	PF	ja
UA0465	29.05.1988	M	Chernigov	13,9	T3N0M0	S	nein
UA0469	02.04.1985	M	Rovno	17,0	T3N1abM1	PF	ja
UA0484	02.01.1986	W	Rovno	16,4	T2N1aM0	F (P Bereiche)	ja
UA0496	12.04.1988	W	Chercassy	14,1	T3N1abM0	P (F Bereiche)	nein
UA0502	19.08.1985	W	Zhytomyr	16,9	T3N1abM1	PS	ja
UA0503	10.11.1983	W	Kiev	18,6	T1N0M0	F (S Bereiche)	ja
UA0515	08.11.1984	W	Chernigov	17,7	T1N0M0	P (F Bereiche)	ja
UA0574	07.05.1989	W	Kiev	13,6	T2N1aM0	P (S Bereiche)	nein
UA0580	03.02.1986	W	Rovno	16,9	T3N1abM1	S	ja
UA0583	17.01.1984	W	Kiev	19,0	T2N0M0	FS	ja
UA0597	25.12.1985	W	Rovno	17,1	T3N0M0	FS	ja
UA0601	22.03.1986	M	Kiev	16,9	T3N1abM0	F (S Bereiche)	ja
UA0615	28.10.1987	W	Sumy	15,4	T3N1abM0	FS	nein
UA0616	28.03.1985	M	Kiev	18,0	T3N0M0	S	ja
UA0648	20.01.1986	W	Chernigov	17,4	T1N1aM0	S (P, F Bereiche)	ja
UA0686	09.09.1985	M	Chernigov	18,1	T3N1aM0	P	ja
UA0691	20.02.1996	W	Chercassy	7,7	T3N0M0	P (F Bereiche)	nein
UA0692	25.06.1987	W	Zhytomyr	16,4	T3N1aM0	P (S Bereiche)	nein
UA0710	16.03.1987	W	Chernigov	16,7	T1N1aM0	P (F Bereiche)	nein

Fall	Geburtsdatum	Geschlecht <sup>1</sup>	Oblast	Alter bei OP [Jahre]	TNM <sup>2</sup>	Histologischer Subtyp <sup>3</sup>	Exposition <sup>4</sup>
UA0796	15.05.1987	W	Chercassy	17,1	T3N0M0	FP	nein
UA0939	10.09.1987	W	Sumy	17,7	T1N0M0	PF	nein
UA0991	04.06.1987	W	Kiev	18,4	T1N0M0	SP	nein
UA1005	10.03.1987	W	Chernigov	18,7	T1N1aM0	SP	nein
UA1030	01.04.1993	M	Sumy	12,8	T3N1aM0	S	nein
UA1053	26.01.1990	W	Sumy	16,1	T1N0M0	F (P, S Bereiche)	nein
UA1091	15.12.1987	W	Kiev	18,5	T2N0M0	P	nein

<sup>1</sup>W: weiblich, M: männlich; <sup>2</sup>TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage (Sobin et al., 2002; Wittekind et al., 2002); <sup>3</sup>P: papillär, F: follikulär; S: solid; <sup>4</sup>Exponiert durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl.

**Tabelle 3: Patientendaten des Validierungskollektivs**

Fall	Geburtsdatum	Geschlecht <sup>1</sup>	Oblast	Alter bei OP [Jahre]	TNM <sup>2</sup>	Histologischer Subtyp <sup>3</sup>	Exposition <sup>4</sup>
UA0053	04.11.1982	W	Kiev	16,4	T1N0M0	P	ja
UA0173	08.08.1980	W	Kiev	19,8	T3N1abM0	FP	ja
UA0216	16.07.1981	M	Kiev	19,2	T3N1abM0	F (S Bereiche)	ja
UA0329	25.12.1977	M	Sumy	23,4	T1N1aM0	PF	ja
UA0374	12.06.1983	M	Kiev	18,3	T3N1abM0	S (P Bereiche)	ja
UA0417	24.12.1981	W	Kiev	20,0	T3N0M0	PF	ja
UA0482	23.05.1985	W	Kiev	17,0	T1N1aM0	P	ja
UA0672	09.01.1986	W	Chernigov	17,7	T3N0M0	F (S Bereiche)	ja
UA0679	09.02.1985	W	Chernigov	18,7	T3N0M0	F	ja
UA0693	28.03.1984	W	Kiev	19,6	T2N0M0	PS	ja
UA0756	08.04.1983	W	Zhytomyr	20,9	T3N1aM0	P	ja
UA0771	18.04.1984	W	Kiev	20,0	T1N0M0	FP	ja
UA0886	06.08.1980	W	Chercassy	24,5	T3N0M0	SP	ja
UA0905	05.02.1984	W	Sumy	21,1	T1N0M0	PF	ja
UA0954	01.09.1985	W	Kiev	19,8	T3N1aM0	F (S Bereiche)	ja
UA1126	13.05.1985	W	Sumy	21,4	T1N0M0	F	ja
UA1175	29.05.1990	M	Kiev	16,6	T1N0M0	F	nein
UA1190	21.07.1990	W	Kiev	16,6	T1N0M0	PS	nein
UA1208	23.01.1992	W	Kiev	15,2	T2N1aM0	P	nein
UA1224	17.04.1990	W	Chernigov	17,0	T3N0M0	PF	nein
UA1240	27.05.1996	W	Chernigov	11,0	T2N1aM0	PF	nein
UA1243	18.03.1989	W	Chernigov	18,2	T3N1abM0	S (P Bereiche)	nein
UA1247	21.11.1991	W	Zhytomyr	15,6	T1N0M0	P	nein
UA1319	30.06.1995	W	Zhytomyr	12,4	T3N1abM0	PS	nein
UA1328	25.11.1989	W	Sumy	18,0	T3N1abM0	SP	nein
UA1367	23.05.1990	W	Kiev	17,7	T1N0M0	F (S Bereiche)	nein
UA1423	29.09.1988	W	Kiev	19,6	T3N1abM0	F	nein
UA1486	13.02.1988	W	Chercassy	20,7	T1N1aM0	F	nein

<sup>1</sup>W: weiblich, M: männlich; <sup>2</sup>TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage (Sobin et al., 2002; Wittekind et al., 2002); <sup>3</sup>P: papillär, F: follikulär; S: solid; <sup>4</sup>Exponiert durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl.

## RET/PTC- UND BRAF-STATUS

In PTC ist das RET-Proto-Onkogen häufig durch chromosomale Umlagerungen (Translokationen oder Inversionen) verändert (Jhiang, 2000). Neben RET/PTC-Umlagerungen sind Veränderungen des Onkogens BRAF in PTC am häufigsten, wobei die Koexistenz beider Veränderungen in einem Tumor nur sehr selten beobachtet wird (Lima et al., 2004).

Die Charakterisierung des RET/PTC- und BRAF-Status der 80 untersuchten Schilddrüsenkarzinome (Tabelle 4) wurde im Rahmen des GENRISK-T-Projektes von Dr. Kristian Unger am Imperial College London durchgeführt.

Die häufigste BRAF-Punktmutation V600E (Austausch von Valin an der Position 600 gegen Glutamat) wurde mittels direkter Sequenzierung (Powell et al., 2005) in 15 der 80 Schilddrüsenkarzinome nachgewiesen.

Für die Bestimmung des RET/PTC-Status wurde die mRNA-Expression der Tyrosinkinase(TK)- und der Extrazellulär(EZ)-Domäne des RET-Gens mittels quantitativer RT-PCR (TaqMan<sup>®</sup>-Analyse) bestimmt. Im Fall einer RET-Umlagerung (RET/PTC-positiv) kommt es zur Überexpression der TK-Domäne, während die EZ-Domäne nur schwach oder gar nicht exprimiert wird. Für 67 der 80 untersuchten PTC-Fälle wurde der RET/PTC-Status bestimmt, wobei eine Einteilung der Fälle in vier Kategorien erfolgte: 1) *BAL*: Balancierte Expression von EZ- und TK-Domäne (RET/PTC-negativ); 2) *EZ*: Unbalancierte RET-Expression, wobei die EZ-Domäne deutlich stärker exprimiert wird als die TK-Domäne (RET/PTC-negativ); 3) *NRE* (*nonRET-Expressor*): Keine RET-Expression (RET/PTC-negativ); 4) *TK*: Unbalancierte RET-Expression, wobei die TK-Domäne deutlich stärker exprimiert wird als die EZ-Domäne (RET/PTC-positiv).

Darüber hinaus wurden die zwei häufigsten RET/PTC-Umlagerungen RET/PTC1 (Fusionspartner H4) und RET/PTC3 (Fusionspartner ELE1) in 20 Schilddrüsenkarzinomen mittels genspezifischer PCR nachgewiesen. Hierfür wurde ein *Reverse*-Primer verwendet, der in der TK-Domäne des RET-Gens bindet. Als *Forward*-Primer kommt hierbei der RET/PTC1-Primer mit Bindestelle im H4-Gen bzw. der RET/PTC3-Primer, welcher im ELE1-Gen bindet, zum Einsatz. Es entsteht nur dann ein Amplifikationsprodukt, wenn eine RET/PTC1- bzw. RET/PTC3-Umlagerung vorliegt (Smida et al., 1999).

Tabelle 4: RET/PTC- und BRAF-Status der 80 untersuchten PTC

Fall	RET-Expression <sup>1</sup>	RET/PTC-Variante	BRAF-Status <sup>2</sup>
UA0053	NRE	-	negativ
UA0103	TK	RET/PTC3	negativ
UA0135	BAL	-	negativ
UA0138	TK	RET/PTC3	n.v.
UA0139	TK	RET/PTC1/3	negativ
UA0144	TK	RET/PTC1	negativ
UA0145	BAL	-	negativ
UA0147	NRE	-	positiv
UA0162	NRE	-	positiv
UA0165	NRE	-	negativ
UA0173	TK	RET/PTC1	negativ
UA0180	TK	RET/PTC1	negativ
UA0192	n.v.	-	negativ
UA0208	TK	RET/PTC3	negativ
UA0216	n.v.	-	negativ
UA0242	TK	-	negativ
UA0249	NRE	-	negativ
UA0286	NRE	-	n.v.
UA0307	TK	-	negativ
UA0312	NRE	-	negativ
UA0329	NRE	-	positiv
UA0343	TK	-	negativ
UA0363	NRE	-	negativ
UA0366	NRE	-	n.v.
UA0368	TK	-	n.v.
UA0374	TK	RET/PTC3	n.v.
UA0400	NRE	-	n.v.
UA0417	NRE	-	negativ
UA0421	TK	-	n.v.
UA0436	NRE	-	n.v.
UA0456	NRE	-	positiv
UA0463	NRE	-	positiv
UA0465	TK	RET/PTC3	negativ
UA0469	n.v.	-	negativ
UA0482	NRE	-	positiv
UA0484	NRE	-	negativ
UA0496	TK	RET/PTC3	n.v.
UA0502	TK	RET/PTC3	negativ
UA0503	NRE	-	negativ
UA0515	n.v.	-	positiv
UA0574	BAL	-	negativ
UA0580	TK	RET/PTC3	negativ
UA0583	TK	RET/PTC3	negativ
UA0597	TK	RET/PTC3	negativ
UA0601	n.v.	-	positiv
UA0615	TK	RET/PTC3	negativ
UA0616	NRE	-	negativ
UA0648	TK	RET/PTC3	negativ
UA0672	TK	RET/PTC1	negativ
UA0679	BAL	-	positiv
UA0686	n.v.	-	negativ
UA0691	NRE	-	negativ
UA0692	TK	-	negativ

Fall	RET-Expression <sup>1</sup>	RET/PTC-Variante	BRAF-Status <sup>2</sup>
UA0693	NRE	-	negativ
UA0710	NRE	-	negativ
UA0756	NRE	-	positiv
UA0771	EZ	-	negativ
UA0796	TK	-	n.v.
UA0886	n.v.	-	negativ
UA0905	NRE	-	positiv
UA0939	NRE	-	positiv
UA0954	n.v.	-	negativ
UA0991	NRE	-	negativ
UA1005	TK	RET/PTC1	n.v.
UA1030	TK	RET/PTC3	n.v.
UA1053	TK	-	n.v.
UA1091	EZ	-	n.v.
UA1126	n.v.	-	negativ
UA1175	NRE	-	negativ
UA1190	n.v.	-	negativ
UA1208	n.v.	-	negativ
UA1224	n.v.	-	n.v.
UA1240	NRE	-	positiv
UA1243	NRE	-	negativ
UA1247	NRE	-	positiv
UA1319	TK	RET/PTC1	negativ
UA1328	NRE	-	negativ
UA1367	NRE	-	negativ
UA1423	n.v.	-	n.v.
UA1486	NRE	-	positiv

<sup>1</sup>BAL: Balancierte Expression von EZ- und TK-Domäne; EZ: Unbalancierte RET-Expression, wobei die EZ-Domäne deutlich stärker exprimiert wird als die TK-Domäne; NRE (*nonRET-Expressor*): Keine RET-Expression; TK: Unbalancierte RET-Expression, wobei die TK-Domäne deutlich stärker exprimiert wird als die EZ-Domäne; n.v.: nicht verfügbar; <sup>2</sup>BRAF-Punktmutation V600E.

Die Charakteristika des Untersuchungs- und Validierungskollektivs sind in Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 5: Charakteristika des Untersuchungs- und Validierungskollektivs**

	Untersuchungskollektiv		Validierungskollektiv	
	exponiert	nicht exponiert	exponiert	nicht exponiert
Anzahl der Fälle	33	19	16	12
Alter bei Exposition (Jahre)	1,26 (0,095 - 4,04)	n.z.	2,55 (0,29 - 8,33)	n.z.
Alter bei Operation (Jahre)	16,87 (13,99 - 18,99)	14,15 (7,70 - 18,66)	19,83 (16,37 - 24,55)	16,82 (11,01 - 20,65)
Tumorgröße (cm)	2,0 (0,7 - 5,0)	1,8 (0,6 - 7,5)	1,5 (0,5 - 3,8)	2,45 (0,8 - 3,8)
BRAF V600E positiv	5/27 (18,5 %)	3/15 (20 %)	5/15 (33,33 %)	3/10 (30 %)
RET/PTC positiv	15/28 (53,6 %)	13/19 (68,4 %)	5/12 (41,67 %)	1/8 (12,5 %)
Lymphknoten positiv	20/33 (60,60 %)	11/19 (57,89 %)	7/16 (43,75 %)	7/12 (58,33 %)

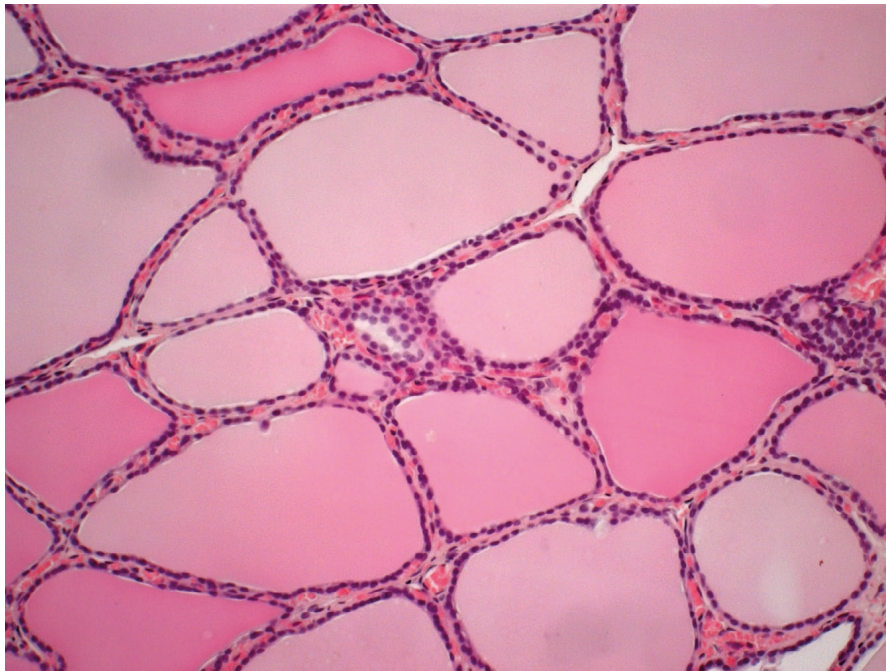
Angegeben sind die Mediane (Minimum - Maximum) bzw. die Anzahl (Prozent)  
n.z.: nicht zutreffend

### **B.1.2 Schilddrüsen-Gewebe-Arrays**

Für die immunhistochemische Untersuchung ausgewählter Kandidatengene standen zwei Schilddrüsen-Gewebe-Arrays zur Verfügung, die in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Axel Walch (Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München) hergestellt wurden. Ein Gewebe-Array ermöglicht die gleichzeitige Analyse vieler Gewebeproben, deren Positionen auf dem Array eindeutig durch Koordinaten festgelegt sind (Kononen et al., 1998). Dabei sind auf einen Objektträger Formalinfixierte Paraffin-eingebettete Gewebeproben in 4 µm dicken Stanzen (1,0 mm Durchmesser) aufgebracht. Es handelt sich dabei um malignes Tumorgewebe und Normalgewebe der Schilddrüse nach einseitiger oder vollständiger Thyreoidektomie. Alle Gewebeproben stammen aus Minsk (Weißrussland) und wurden von Prof. Dr. Lengfelder (Strahlenbiologisches Institut, Fakultät für Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.

#### **B.1.2.1 Gewebe-Array mit Schilddrüsennormalgewebe von Erwachsenen**

Der Normalgewebe-Array enthält insgesamt 30 Schilddrüsennormalgewebe-Proben (exemplarische Darstellung in Abb. 3) von Erwachsenen sowie zwei Lebergewebe-Proben zu Kontrollzwecken. In Tabelle 6 ist die Anordnung der Proben auf dem Gewebearray dargestellt. Die zugehörigen Patientendaten sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die operative Entnahme der Schilddrüse erfolgte im Alter von 30 bis 42 Jahren.



**Abbildung 3: Normalgewebe der Schilddrüse**

Unterschiedlich große Follikel, ausgekleidet durch flache Epithelzellen. Das Lumen ist gefüllt mit dunkel gefärbtem Kolloid; Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), 20-fache Vergrößerung.

**Tabelle 6: Gewebe-Array mit 30 Schilddrüsennormalgewebe-Fällen von Erwachsenen**

	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>A</b>	M504/98N	M513/98N	M533/98N	M537/98N	M780/00N	M420/98N	Leber	Leber
<b>B</b>	M471/98N	M460/98N	M408/98N	M704/99N	M655/99N	M440/98N	leer	leer
<b>C</b>	M483/98N	M157/96N	M342/97N	M441/98N	M814/00N	M388/97N	leer	leer
<b>D</b>	M380/97N	M549/98N	M877/00N	M640/99N	M345/97N	M443/98N	leer	leer
<b>E</b>	M726/99N	M797/00N	M318/97N	M881/00N	M578/98N	M407/98N	leer	leer

Tabelle 7: Patientendaten für den Schilddrüsennormalgewebe-Array mit 30 Fällen

Fall	Geburtsdatum	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter bei OP [Jahre]
M157/96N	14.11.1963	W	32
M318/97N	19.03.1961	W	36
M342/97N	03.05.1967	W	30
M345/97N	08.10.1958	W	38
M380/97N	05.07.1962	W	35
M388/97N	12.11.1955	W	42
M407/98N	30.04.1960	W	37
M408/98N	11.03.1959	W	38
M420/98N	21.03.1959	W	38
M440/98N	22.12.1965	W	32
M441/98N	11.04.1956	n.b.	41
M443/98N	18.02.1965	W	33
M460/98N	01.01.1965	W	33
M471/98N	20.06.1961	W	36
M483/98N	02.08.1964	M	33
M504/98N	02.10.1965	W	32
M513/98N	08.09.1958	M	39
M533/98N	07.09.1962	W	35
M537/98N	01.07.1961	W	37
M549/98N	20.01.1959	W	39
M578/98N	30.10.1965	M	33
M640/99N	09.02.1964	W	35
M655/99N	07.12.1959	W	39
M704/99N	28.05.1960	W	39
M726/99N	20.03.1959	W	40
M780/00N	23.10.1965	W	34
M797/00N	13.12.1965	W	34
M814/00N	25.04.1963	W	36
M877/00N	28.03.1967	W	33
M881/00N	10.02.1965	W	35

<sup>1</sup>W: weiblich, M: männlich;

n.b.: nicht bekannt.

### B.1.2.2 Gewebe-Array mit kindlichen PTC aus Weißrussland

Der Gewebe-Array mit kindlichen PTC beinhaltet 58 Fälle aus Weißrussland. Zusätzlich sind zwei Lebergewebe-Proben als Kontrolle aufgebracht. Die Anordnung der Gewebeproben auf dem Array ist Tabelle 8 zu entnehmen. Die zugehörigen Patientendaten sind in Tabelle 9 aufgelistet. 54 Patienten wurden vor dem Tschernobyl-Reaktorunfall am 26.04.1986 geboren und durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl exponiert. Die restlichen vier Patienten wurden nach dem 01.01.1987 geboren und waren keiner Radioiod-Strahlung ausgesetzt (auch nicht *in utero*). Die operative Entnahme der Schilddrüse erfolgte im Alter von 7 bis 16 Jahren.



**Tabelle 8: Gewebe-Array mit 58 kindlichen PTC aus Weißrussland**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
<b>A</b>	S41T	S46T	S47T	S84T	S256T	S259T	S261T	S262T	S271T	S272T	S274T	S275T	Leber
<b>B</b>	S276T	S278T	S279T	S283T	S284T	S285T	S287T	S289T	S290T	S292T	S294T	S299T	Leber
<b>C</b>	S300T	S303T	S304T	S307T	S308T	S310T	S314T	S316T	S327T	S328T	S330T	S331T	leer
<b>D</b>	S333T	S336T	S339T	S340T	S341T	leer	S347T	S349T	S350T	S355T	S356T	S357T	leer
<b>E</b>	S358T	S359T	S361T	S362T	S366T	S372T	S374T	S375T	S379T	S380T	S390T	leer	leer

**Tabelle 9: Patientendaten für den Gewebe-Array mit 58 kindlichen PTC aus Weißrussland**

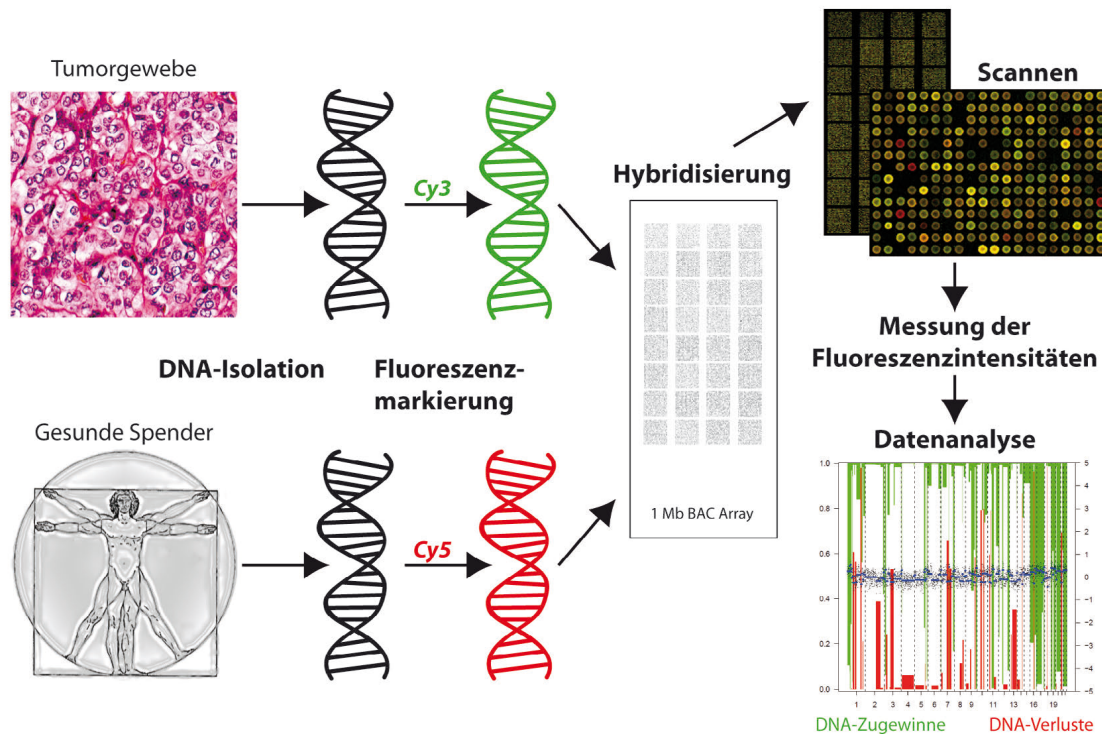
Fall	Geburtsdatum	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter bei OP [Jahre]	TNM <sup>2</sup>	Histologischer Subtyp <sup>3</sup>	Exposition <sup>4</sup>
S41T	21.04.1993	W	11	T4N1bM0	S	nein
S46T	11.05.1993	M	10	T4N1bM0	Mischform	nein
S47T	12.05.1993	W	13	T1N1aM0	P	nein
S84T	17.06.1980	W	13	T4N1bM0	n.b.	ja
S256T	16.02.1980	W	15	T4N1aM0	P	ja
S259T	21.06.1985	M	10	T4N1bM0	P	ja
S261T	01.07.1980	M	15	T2aN2aM0	P	ja
S262T	06.04.1984	M	11	T4bN2bM0	P	ja
S271T	14.04.1982	W	13	T4bN1bM0	P	ja
S272T	20.04.1985	M	10	T4bN1bM0	P	ja
S274T	19.04.1981	M	14	T4N1bM0	F	ja
S275T	05.11.1983	W	12	T4N1bM0	P	ja
S276T	26.09.1984	W	11	T2aN1aM0	Mischform	ja
S278T	18.01.1985	M	10	T2aN1aM0	P	ja
S279T	14.06.1984	W	11	T4aN1aM0	S	ja
S283T	06.12.1981	W	14	T4aN1bM0	F	ja
S284T	25.09.1983	W	12	T4aN1aM0	S	ja
S285T	25.04.1980	W	15	T4aN1aM0	S	ja
S287T	13.08.1984	W	11	T4N1aM0	P	ja
S289T	30.09.1984	W	12	T4N1aM0	P	ja
S290T	27.12.1985	W	11	T4N1aM0	P	ja
S292T	20.08.1984	W	12	T1aN1aM0	P	ja
S294T	11.05.1981	W	15	T1aN1aM0	P	ja
S299T	31.01.1982	M	14	T4aN1bM0	SF	ja
S300T	16.10.1980	W	15	T4aN1bM0	S	ja
S303T	20.06.1983	M	7	T2aN1aMx	F	ja
S304T	20.08.1985	W	11	T1bN1Mx	P	ja

Fall	Geburtsdatum	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter bei OP [Jahre]	TNM <sup>2</sup>	Histologischer Subtyp <sup>3</sup>	Exposition <sup>4</sup>
S307T	19.06.1983	W	13	T2aN?M0	P	ja
S308T	10.07.1982	W	14	T2bN1M0	Mischform	ja
S310T	07.04.1986	M	10	T4aN1Mx	SF	ja
S314T	10.12.1984	M	12	T2aN1aM0	P	ja
S316T	29.05.1985	W	11	T1aN1Mx	FP	ja
S327T	20.12.1984	M	12	T4aN1bM0	FP	ja
S329T	28.10.1981	W	14	T4aN1aM0	P	ja
S330T	08.07.1984	W	12	T2aN1aM0	FS	ja
S331T	27.02.1985	W	11	T4aN1Mx	P	ja
S333T	26.11.1985	M	10	T4bN1M0	SF	ja
S336T	22.04.1982	W	14	T4aN1aMx	P	ja
S339T	29.05.1983	W	13	T4bN1bMx	P	ja
S340T	16.12.1979	W	16	T4aN1Mx	SF	ja
S341T	19.11.1983	M	13	T4bN1bMx	P	ja
S347T	07.04.1985	W	11	T2aN1aM0	F	ja
S349T	20.06.1984	W	12	T2aN1aM0	F	ja
S350T	25.04.1984	M	12	T2bN1bMx	P	ja
S355T	13.11.1983	W	14	T4aN1aM0	F	ja
S356T	21.02.1987	W	10	T4aN1bMx	FP	nein
S357T	26.10.1981	M	16	T2bN1aMx	P	ja
S358T	29.06.1985	M	12	T4bN1bM0	P	ja
S359T	08.05.1985	W	12	T4bN1bM0	PF	ja
S361T	16.02.1984	M	13	T2aN1aMx	P	ja
S362T	16.01.1983	W	14	T4N1bMx	P	ja
S366T	15.04.1983	M	13	T2aN1bMx	PF	ja
S372T	02.09.1984	W	12	T4aN1bMx	F	ja
S374T	05.01.1981	W	16	T2bN1bMx	P	ja
S375T	26.03.1985	M	12	T2aN1aMx	P	ja
S379T	04.01.1984	W	13	T2bN1Mx	PF	ja
S380T	06.03.1983	W	14	T2bN1bMx	P	ja
S390T	17.02.1982	M	15	T2aN1bMx	PF	ja

<sup>1</sup>W: weiblich, M: männlich; <sup>2</sup>TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage (Sobin et al., 2002; Wittekind et al., 2002); Mx: keine Aussage über Fernmetastasierung möglich; <sup>3</sup>P: papillär, F: follikulär, S: solid, Mischform: keine genauere Klassifizierung bekannt, n.b.: nicht bekannt; <sup>4</sup>Exponiert durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl.

## B.2 Array-basierte vergleichende genomische Hybridisierung (Array-CGH)

Bei der vergleichenden genomischen Hybridisierung (*Comparative Genomic Hybridisation*, CGH) handelt es sich um eine molekularzytogenetische Methode zum genomweiten Nachweis von DNA-Kopienzahlveränderungen, die vielfach Anwendung in der Untersuchung isolierter DNA aus Tumoren findet (Kallioniemi et al., 1992). Hierzu werden gesamtgenomische Tumor- und normale Referenz-DNA (gepoolt von mehreren gesunden Spendern) mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Tumor: Cy3 – grün, Referenz: Cy5 – rot) und auf Metaphasenpräparate eines gesunden Spenders hybridisiert. Die Zugabe nicht markierter Cot-1 DNA verhindert die Hybridisierung an hochrepetitive Sequenzen. Durch eine Messung der Fluoreszenzintensitäten von Test- und Referenz-DNA entlang der Chromosomen können Bereiche mit DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten im Tumorgenom nachgewiesen werden. Bei einem DNA-Zugewinn überwiegt die Fluoreszenzintensität der markierten Tumor-DNA, da im Verhältnis mehr Tumor- als Referenz-DNA an die Metaphasenchromosomen bindet. Im Falle eines DNA-Verlustes überwiegt dagegen die Fluoreszenzintensität der Referenz-DNA. Diese Verhältnisse der Fluoreszenzintensitäten werden in Quotienten (*Ratios*) angegeben. Bei der Array-CGH (*Array Comparative Genomic Hybridisation*) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der konventionellen CGH (Abb. 4). Markierte Tumor- und Referenz-DNA werden hier auf einen Microarray hybridisiert (Pinkel et al., 1998). Als Ziel-DNA können auf einem Array verschiedene DNA-Fragmente (z. B. BAC-Klone - *Bacterial Artificial Chromosome*, Oligonukleotide, ausgewählte PCR-Produkte, SNPs - *Single Nucleotide Polymorphisms* oder cDNA) aufgebracht sein, die einen Teil oder das komplette humane Genom repräsentieren (Pinkel und Albertson, 2005b, a). Im Gegensatz zur CGH auf Metaphasenpräparaten, bei der die Auflösung auf 5-10 Mb beschränkt ist (Snijders et al., 2003; Inazawa et al., 2004; Davies et al., 2005), kann bei der Array-CGH je nach Anzahl, Größe und genomischem Abstand der DNA-Fragmente eine Auflösung von 1 Mb bis zu wenigen kb erreicht werden (Fiegler et al., 2003; Carvalho et al., 2004; Ishkanian et al., 2004; Coe et al., 2007). In dieser Arbeit werden BAC-Arrays mit einer Auflösung von 1 Mb und Oligonukleotid-Arrays mit einer Auflösung von 13 kb verwendet. Ein weiterer Vorteil der Array-CGH besteht darin, dass die veränderten Bereiche direkt einer physikalischen Position im Genom zugeordnet werden können.



**Abbildung 4: Prinzip der Array-CGH**

Gesamtgenomische Tumor- und normale Referenz-DNA werden mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Tumor: Cy3 – grün, Referenz: Cy5 – rot) markiert und anschließend zusammen auf einen Microarray (z.B. 1 Mb BAC-Array oder Oligonukleotid-Array) hybridisiert. Nach der Hybridisierung wird der Array gescannt sowie die roten und grünen Fluoreszenzintensitäten gemessen. Es folgt die Datenanalyse, welche die Normalisierung der Daten, die Segmentierung und das *Calling* der DNA-Zugewinne und DNA-Verluste beinhaltet. Bei einem DNA-Zugewinn im Tumor überwiegt die Fluoreszenzintensität der grün markierten Tumor-DNA. Da im Verhältnis mehr Tumor- als Referenz-DNA an die Ziel-DNA bindet, zeigt der Spot eine Grünfärbung. Im Falle eines DNA-Verlustes im Tumor überwiegt dagegen die rote Fluoreszenzintensität der Referenz-DNA und es kommt zu einer Rotfärbung des Spots. Gelbe Spots repräsentieren Bereiche ohne Kopienzahlveränderungen.

## B.2.1 Tumor-DNA

### B.2.1.1 Isolation der Tumor-DNA

Das von der Chernobyl Tissue Bank erhaltene Tumormaterial lag in Form von Gefrierewebe vor. Die Isolation der Tumor-DNA wurde im Rahmen des EU-Projektes GENRISK-T am Imperial College London durchgeführt.

## MATERIAL

- Ethanol, 96-100 % (Fisher)
- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)
  - AL-Puffer
  - Proteinase K
  - AW1-Puffer (Waschpuffer 1)
  - AW2-Puffer (Waschpuffer 2)
  - AE-Puffer
  - QIAamp Mini Spin Säulchen
- RLT-Puffer (Lysepuffer) aus dem RNeasy® Mini Kit (Qiagen)  
1 ml RLT-Puffer wird mit 10µl β-Mercaptoethanol versetzt
- Stainless steel beads, 5 mm Durchmesser (Qiagen)
- TissueLyser II (Qiagen)

## DURCHFÜHRUNG

Für die DNA-Isolation wird das Gefrierewebe zusammen mit einer 5 mm Stahlkugel in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 500 µl Lysepuffer RLT wird die Gewebeprobe 2 min bei 30 Hz im TissueLyser homogenisiert. 180 µl des Lysats werden sodann für die DNA-Isolation in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit 30 µl RLT-Puffer und 20 µl Proteinkinase K versetzt. Die Probe wird über Nacht bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert. Der Ansatz wird kurz abzentrifugiert, danach werden 200 µl AL-Puffer dazugegeben und gut gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 70°C erfolgt die Zugabe von 200 µl Ethanol. Im Anschluss wird das Gemisch vorsichtig auf ein QIAamp Mini Spin Säulchen gegeben und für 1 min (6.000 x g) zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Es werden 500 µl AW1-Puffer auf das Säulchen gegeben und für 1 min (6.000 x g) zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen und das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer wird das Säulchen 3 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird wiederholt. Danach wird das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und 50 µl AE-Puffer dazugegeben. Die DNA wird nach 2-minütiger Inkubation in einem 1-minütigen Zentrifugationsschritt (6.000 x g) eluiert. Der Elutionsschritt wird wiederholt, um die noch auf dem Säulchen verbliebene, gebundene DNA komplett zu eluieren.

### **B.2.1.2 Konzentrationsbestimmung der Tumor-DNA**

#### MATERIAL

- NanoDrop® Spektrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies)

#### DURCHFÜHRUNG

Die Konzentrationsbestimmung der Tumor-DNA erfolgt mit dem NanoDrop®-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Für die Absorptionsmessung werden lediglich 1-2 µl DNA-Lösung benötigt. Die Eichung des Gerätes erfolgt mit 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> als Referenz. Die Reinheit der gemessenen DNA wird durch die Verhältnisse der Absorptionen bei 260/280 nm und 260/230 nm bestimmt. Eine proteinfreie Nukleinsäurelösung weist ein Verhältnis von 1,8 des Quotienten der Absorptionen bei 260 nm/280 nm auf. Pufferkontaminationen werden durch ein Verhältnis aus den Wellenlängen 260 nm/230 nm von < 2 angezeigt. Die Konzentrationsangabe der DNA erfolgt in ng/µl.

### **B.2.2 Qualitätskontrolle der DNA vor der Array-CGH**

#### **B.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese**

Mit der Agarose-Gelelektrophorese werden Moleküle in einem elektrischen Feld nach Ladung und Größe aufgetrennt. DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode. Erfolgt die Wanderung in einem Agarosegel, so wird die Wanderungsgeschwindigkeit mit zunehmender Größe des DNA-Fragments verringert. Zur Anfärbung der DNA wird die interkalierende Substanz 3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiniumbromid (Ethidiumbromid) verwendet, die nach Anregung mit UV-Licht (360 nm) längerwelliges Licht im sichtbaren Bereich emittiert.

#### MATERIAL

- Agarose (Univeral Agarose, Bio&Sell)
- Auftragspuffer (6x Loading Dye Solution, MBI Fermentas)
- Ethidiumbromid, 10 mg/ml (Sigma)
- Geldokumentationssystem BioDoc Analyze (Biometra)
- Größenstandard 100 bp (GeneRuler™, MBI Fermentas)

- Größenstandard 1 kb (GeneRuler™, MBI Fermentas)
- Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer), 50 x
 

2 M Tris(Merck)	243,0 g
0,25 M Natriumacetat (Merck)	20,5 g
0,05 M EDTA (Merck)	18,6 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 600 ml
mit Eisessig pH 8 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
autoklavieren	
- TAE-Puffer, 1 x
 

TAE-Puffer, 50 x	3 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	147 ml

### DURCHFÜHRUNG

Es wird ein 1%iges Agarosegel gegossen und mit Elektrophoresepuffer (100 ml 1x TAE-Puffer + 50 µl Ethidiumbromid) überschichtet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 65-100 V.

Um einen ersten Eindruck von der Qualität der isolierten Tumor-DNA zu bekommen, werden je nach DNA-Konzentration 0,2-9 µl der jeweiligen Tumor-DNA auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

#### **B.2.2.2 Multiplex-PCR**

Um sicherzustellen, dass die in ein Array-CGH-Experiment eingesetzte Tumor-DNA spezifisch hybridisiert, wird im Anschluss an die DNA-Isolation eine Multiplex-PCR zur Qualitätskontrolle durchgeführt. Die Multiplex-PCR wird vorwiegend zur Qualitätskontrolle von DNA aus FFPE (*Formalin-fixed Paraffin-embedded*) Gewebe angewendet, da die daraus isolierte DNA oftmals eine schlechte Qualität aufweist (van Beers et al., 2006). DNA aus FFPE-Gewebe kann durch die Fixierung des Gewebes eine große Anzahl an DNA-Quervernetzungen aufweisen. Außerdem liegt die DNA oft in stark fragmentierter Form vor. In dieser Arbeit wird die aus Gefriergewebe isolierte DNA auf den Grad ihrer Fragmentierung getestet. Die PCR-Reaktion wird mit vier Primerpaaren durchgeführt, welche jeweils 100, 200, 300 oder 400 bp lange Fragmente von nicht überlappenden Bereichen innerhalb des *housekeeping* Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) auf Chromosom 12 amplifizieren.

MATERIAL

- AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase, 5 U/µl (Applied Biosystems)  
 AmpliTaq Gold® PCR Puffer, 10 x  
 MgCl<sub>2</sub>, 25 mM
- dNTPs, 1 mM  
 dNTPs, 10 mM (Fermentas) 10 µl  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 90 µl
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Primer-Mix (100-400 bp), 0,133 µM/Primer 10 µl  
 100 bp fwd: 5'-GTT CCA ATA TGA TTC CAC CC-3' 100 mM (Metabion) 10 µl  
 100 bp rev: 5'-CTC CTG GAA GAT GGT GAT GG -3' 100 mM (Metabion) 10 µl  
 200 bp fwd: 5'-AGG TGG AGC GAG GCT AGC -3' 100 mM (Metabion) 10 µl  
 200 bp rev: 5'-TTT TGC GGT GGA AAT GTC CT-3' 100 mM (Metabion) 10 µl  
 300 bp fwd: 5'-AGG TGA GAC ATT CTT GCT GG -3' 100 mM (Metabion) 10 µl  
 300 bp rev: 5'-TCC ACT AAC CAG TCA GCG TC -3' 100 mM (Metabion) 10 µl  
 400 bp fwd: 5'-ACA GTC CAT GCC ATC ACT GC-3' 100 mM (Metabion) 10 µl  
 400 bp rev: 5'-GCT TGA CAA AGT GGT CGT TG -3' 100 mM (Metabion) 10 µl  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 720 µl
- Referenz-DNA (Promega)
- Sterilbank (BDK)

DURCHFÜHRUNG

Auf Eis werden 3 µl AmpliTaq® Gold PCR-Puffer, 3,2 µl Primermix, 1,8 µl MgCl<sub>2</sub>, 6 µl dNTPs, 100 ng Tumor-DNA, 0,2 µl AmpliTaq® Gold DNA-Polymerase und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 30 µl zusammenpipettiert. Als Positivkontrolle werden in einen Ansatz 100 ng Referenz-DNA eingesetzt, die Negativkontrolle enthält H<sub>2</sub>O anstelle von DNA. Vor der Inkubation werden die Ansätze vorsichtig gemischt und abzentrifugiert.

Die Hotstart-PCR wird folgendermaßen durchgeführt:

Schritt 1	95°C für 10 min	Schritte 3-5 werden in 34 Zyklen wiederholt (Insgesamt 35 Zyklen)
Schritt 2	94°C für 4 min	
Schritt 3	94°C für 1 min	
Schritt 4	56°C für 1 min	
Schritt 5	72°C für 3 min	
Schritt 6	72°C für 7 min	
Schritt 7	4°C ∞	

Im Anschluss werden die PCR-Amplifikate in einem 1,5%igem Agarosegel aufgetrennt.



### B.2.3 1 Mb BAC-Arrays

#### B.2.3.1 Verwendeter 1 Mb BAC-Array

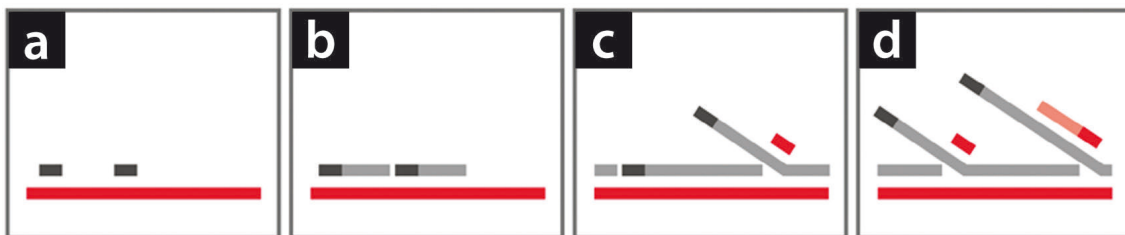
Auf einem 1 Mb BAC-Array wird das gesamte humane Genom in 1 Mb Abständen durch ca. 3.400 BAC-Klone (*Bacterial Artificial Chromosome*, siehe B.3.1) abgedeckt (Fiegler et al., 2003). Der in dieser Arbeit verwendete **CMR Hs 1 Mb BAC Array** stammt vom *Centre for Microarray Resources* des Instituts für Pathologie der Universität Cambridge. Auf diesem Array ist jeder einzelne BAC-Klon (Insertgröße 100-150 kb) in vierfacher Ausführung (Quadruplets) vertreten. Zusätzlich werden zur Kontrolle der Hybridisierungsspezifität *Drosophila*-Klone auf den Array aufgebracht, sodass sich auf einem OT insgesamt ca. 15.400 Spots befinden. Die Herstellung dieser Arrays erfolgt wie bei Fiegler et al. (2007) beschrieben.

Aus den ca. 3.400 *E. coli*-Kulturen wird die Plasmid-DNA isoliert und aufgereinigt. Die humane DNA der BACs wird in einer DOP-PCR (*Degenerate Oligonucleotide Primed*) spezifisch amplifiziert. Die hier verwendeten Primer sind ca. 20 Basen lang und besitzen am 3'-Ende nach sechs degenerierten Basen noch eine Sequenz von weiteren sechs Basen. Die Basenkombination des Hexamers ist so gewählt, dass sie im humanen Genom besonders häufig, im *E. coli*-Genom dagegen in nur sehr geringer Anzahl vorkommt. Die DOP-PCR ist zweistufig aufgebaut. In der *Primary DOP-PCR* werden drei PCR-Reaktionen (DOP1/2/3 Primer) parallel angesetzt. Die PCR-Zyklen werden mit einer niedrigen Annealing-Temperatur von 30°C durchgeführt. Dadurch wird eine relativ unspezifische Primerbindung erreicht, welche statistisch über die komplette humane Sequenz verteilt ist. Die Amplifikate der drei Reaktionen werden vereint und dienen in der *Secondary DOP-PCR* als Matrize. In dieser PCR-Reaktion wird durch Amino-Primer jeweils eine Aminogruppe an das 5'-Ende der DNA-Stücke angehängt. Dies ermöglicht beim *Spotting* die kovalente, einzelsträngige Bindung der DNA-Fragmente an die speziell beschichtete, aminoreaktive Glasoberfläche der Arrays (CodeLink™-Slides). Das PCR-Programm der *Secondary DOP-PCR* wird mit einer auf 60°C erhöhten Annealing-Temperatur durchgeführt. Hiermit wird eine spezifische Primerbindung erreicht, welche eine exponentielle Vermehrung der zuvor amplifizierten humanen DNA-Fragmente ermöglicht. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte werden die Proben in einem definier-

ten Raster punktförmig auf die OT aufgebracht. Zum Schutz vor Feuchtigkeit werden die Arrays in einem speziellen Schrank mit Trockenperlen gelagert.

### B.2.3.2 Random Prime Labeling

Die Markierung der DNA für die Array-CGH erfolgt durch das so genannte *Random Prime Labeling*, wobei Tumor- und Referenz-DNA direkt mit Fluorochromen markiert werden. Dazu werden degenerierte Zufallsoktamere (*random primers*) verwendet, die nach Denaturierung der Template-DNA an diese binden und im Anschluss von der Klenow-Polymerase (große Untereinheit der DNA-Polymerase I von *E. coli*) verlängert werden. Dabei werden auch die dazugegebenen Cy3- bzw. Cy5-markierten dCTP in die DNA eingebaut. Durch so genanntes *strand displacement* kommt es bei der Reaktion zusätzlich zu einer Amplifikation der DNA, da bereits synthetisierte Stränge von der jeweils nachfolgenden Polymerase verdrängt werden und die neu entstehenden einzelsträngigen DNA-Bereiche Ausgangsstellen für neue Elongationen bilden (Abb. 5).



**Abbildung 5: Prinzip der Amplifizierung durch *strand displacement***

(a) Nach der Hybridisierung von Zufallsoktameren (b) bewegt sich die Klenow-Polymerase entlang des DNA-Templates und (c) verdrängt dabei den komplementären Strang, (d) der nach Anlagerung eines weiteren Primers wiederum als Template für eine erneute Replikation dient (Schock et al., 2005).

## MATERIAL

- BioPrime® DNA Labeling System (Invitrogen)
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
  - Random Primer Lösung 2,5 x
  - Klenow-Fragment, 40 U/μl
- Cyanine 3-dCTP, 25 nM (Perkin Elmer Life Sciences)
- Cyanine 5-dCTP, 25 nM (Perkin Elmer Life Sciences)
- dNTP-Mix (1 μM dCTP, 2 μM dGTP, 2 μM dATP, 2 μM dTTP)
 

dCTP, 100 mM (MBI Fermentas)	10 μl
dGTP, 100 mM (MBI Fermentas)	20 μl
dATP, 100 mM (MBI Fermentas)	20 μl
dTTP, 100 mM (MBI Fermentas)	20 μl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	930 μl

- Heizblock, HBT 130 (Haep Labor Consult)
- Humane Referenz-DNA, weiblich oder männlich, gepoolt, von mehreren gesunden anonymen Spendern (Promega), 450 ng
- NaCl, 1 M  
NaCl (Merck) 29,22 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 500 ml
- PCR-Maschine PTC-200 (MJ Research)

### DURCHFÜHRUNG

In eine *Random Prime Labeling* Reaktion werden 450 ng Tumor- und 450 ng Referenz-DNA eingesetzt. Hierzu werden in zwei separaten Reaktionsgefäßen 450 ng DNA, 60 µl Random Primer Lösung, 3 µl NaCl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 130 µl gemischt. Die beiden Ansätze werden für 5 min bei 100°C im Heizblock denaturiert und im Anschluss für 3 min auf Eis gekühlt. Danach werden auf Eis 15 µl dNTP-Mix, 2 µl Cy3-dCTP (Tumor-DNA) oder 2 µl Cy5-dCTP (Referenz-DNA) und 3 µl Klenow-Polymerase dazugegeben. Nach vorsichtigem Mischen werden die Ansätze in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und für 17-20 h bei 37°C im PCR-Block inkubiert.

### **B.2.3.3           Aufreinigung der markierten DNA**

#### MATERIAL

- MicroSpin™ G-50 Sephadex™-Säulchen (GE Healthcare)
- Zentrifuge 5415D (Eppendorf)

#### DURCHFÜHRUNG

Nach der Markierung werden die Proben über MicroSpin™ G-50 Sephadex™-Säulchen aufgereinigt. Pro Ansatz werden drei Aufreinigungssäulchen benötigt. Nach kurzem Durchmischen des Sephadex™-Gels wird der Puffer für 1 min bei 735 x g aus dem Säulchen zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss werden jeweils 50 µl der markierten DNA auf drei Säulchen aufgetragen und 2 min bei 735 x g zentrifugiert. Dabei werden überschüssige Nukleotide, Primer und Enzyme entfernt und die markierte DNA aufgereinigt.

#### B.2.3.4 Bestimmung der Inkorporationsrate

Im Anschluss werden Konzentration und Cy3-/Cy5-Inkorporation der aufgereinigten DNA mit Hilfe des NanoDrop® Spektrophotometers (siehe B.2.1.2) bestimmt. Dafür wird neben der Extinktion bei 260 nm auch die Extinktion bei 532 nm (Cy3) und 635 nm (Cy5) gemessen. Die DNA-Konzentration sollte mindestens 100 ng/μl betragen. Außerdem wird eine Inkorporationsrate der Fluorochrome von ≥ 3 pmol/μl benötigt.

#### B.2.3.5 Fällung und Denaturierung der markierten DNA

##### MATERIAL

- Ethylendiamintetraacetic acid (EDTA), 0,5 mM  
 EDTA (Sigma) 186,1 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 500 ml  
 mit NaOH pH 8 einstellen  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
 autoklavieren
- Ethanol, 100 %, 70 % (Merck)
- Hefe-tRNA, 100 μg/μl (Invitrogen)
- Heizblock, HBT 130 (Haep Labor Consult)
- Heringssperma-DNA ultraschallfragmentiert, 1 mg/ml (Invitrogen)
- Humane Cot-1 DNA, 1 μg/μl (Roche)
- Hybridisierungsmix (50 % FA, 7 % Dextransulfat, 0,1 % Tween 20, 2 x SSC, 10mM Tris, 25mM EDTA)  
 Formamid deionisiert (AppliChem) 25 ml  
 Dextransulfat, 50 % (Eppendorf) 7 ml  
 Tween 20 (Sigma) 0,05 ml  
 20 x SSC 5 ml  
 Tris, 1 M, pH 7,4 0,5 ml  
 EDTA, 0,5 M, pH 8 2,5 ml  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 9,95 ml
- Zentrifuge 17 RS (Heraeus Sepatech)
- Natriumacetat, 3 M  
 Natriumacetat (Merck) 246 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 600 ml  
 mit Eisessig pH 4,8 einstellen  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
 autoklavieren
- Schüttelblock Thermomixer Compact (Eppendorf)
- 20 x SSC  
 3 M NaCl (Merck) 175,3 g  
 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) 88,2 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
 mit HCl pH 7 einstellen

- Tris, 1 M  
Trizma Base (Sigma) 121,1 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
mit HCl pH 7,4 einstellen  
autoklavieren

### DURCHFÜHRUNG

Die Fällung der markierten Tumor- und Referenz-DNA erfolgt mit Ethanol. Dafür wird die Cy5-markierte Referenz-DNA mit der Cy3-markierten Tumor-DNA gemischt. Anschließend werden 135 µl Cot-1 DNA, 46,8 µl Natriumacetat und 1000 µl 100%iges Ethanol (-20°C) dazugegeben. Die Fällung erfolgt wahlweise über Nacht bei -20°C oder für 20 min bei -80°C. Die ausgefällte DNA wird 30 min bei 15.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das violette Pellet mit 500 µl 70%igem eiskalten Ethanol bei 15.000 x g und 4°C für 10 min gewaschen. Überschüssige Salze werden bei diesem Waschschritt entfernt. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet 10-15 min bei RT (Raumtemperatur) getrocknet. Danach wird die DNA in 6 µl Hefe-tRNA und 68 µl Hybridisierungsmix aufgenommen und für mindestens 3 h bei 37°C im Schüttelblock gelöst. Für die Hybridisierung wird zusätzlich ein Prähybridisierungsmix benötigt. Hierfür werden 50 µl Heringssperma-DNA, 5 µl Natriumacetat und 500 µl absolutes Ethanol (-20°C) zusammengegeben. Der Ansatz wird wahlweise über Nacht bei -20°C oder für 20 min bei -80°C gefällt. Die folgenden Zentrifugationsschritte sowie das Trocknen und Lösen des Pellets erfolgen wie oben beschrieben. Im Anschluss werden die gelöste Sonde und der Prähybridisierungsmix für 10 min bei 70°C denaturiert.

### **B.2.3.6 Hybridisierung mit der TECAN HS 400**

#### MATERIAL

- 1 Mb BAC-Arrays
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, DNase/RNase-frei (Gibco)
- Hybridisierungsstation HS 400 (TECAN)
- Lösung 1: 50 % Formamid/2 x SSC, pH 7,0  
Formamid (Fluka) 50 ml  
20 x SSC 10 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (MilliQ) 40 ml  
mit HCl auf pH 7,0 einstellen

• Lösung 2: 40 % Formamid/2 x SSC, pH 7,0	
Formamid (Fluka)	80 ml
20 x SSC	20 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> (MilliQ)	100 ml
mit HCl auf pH 7,0 einstellen	
• Lösung 3: 2 x SSC/0,1 % SDS	
20 x SSC	40 ml
25 % SDS	1,6 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> (MilliQ)	358,4 ml
• Lösung 4: 0,1 x SSC	
20 x SSC	2 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> (MilliQ)	398 ml
• SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz), 25 %	
SDS (Merck)	250 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 600 ml
bei 40°C lösen, auf RT abkühlen lassen	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
• 20 x SSC	
3 M NaCl (Merck)	175,3 g
0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck)	88,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
mit HCl pH 7 einstellen	

#### DURCHFÜHRUNG

Die Hybridisierung eines 1 Mb BAC-Arrays und die darauf folgenden Waschschriffe werden automatisiert in der Hybridisierungsstation HS 400 der Firma TECAN durchgeführt, für deren Hybridisierungsmodule (21 mm x 50 mm) das Protokoll angepasst ist. Die Hybridisierungsstation wird durch das Computerprogramm *HS Control Manager* gesteuert. Die Hybridisierungsstation HS 400 verfügt über sechs Kanäle, an die verschiedene Lösungen angeschlossen werden können. Um eine Hybridisierung vorzubereiten, ist es notwendig, das Leitungssystem und die Hybridisierungsmodule der Hybridisierungsstation mit H<sub>2</sub>O zu reinigen. Hierfür werden die Injektionsventile und die Injektionslöcher der Hybridisierungsmodule mit H<sub>2</sub>O gewaschen und danach mit Stickstoff getrocknet. Anschließend aktiviert man das Reinigungsprogramm *Rinse* der Station, wofür alle Schläuche der sechs Kanäle in ein Becherglas mit 1 Liter H<sub>2</sub>O getaucht werden. Nach der Reinigung werden alle Schläuche aus der Flüssigkeit entfernt, damit das System die Apparatur mit Stickstoff (Stickstoffdruck 2,7 bar) trocknen kann (*Final System Drying*).

Danach werden fünf Lösungen (Herstellung siehe oben) wie folgt an die Kanäle der Station angeschlossen:

Kanal 1	Lösung 1 (50 % Formamid/2 x SSC, pH 7,0)
Kanal 2	Lösung 2 (40 % Formamid/2 x SSC, pH 7,0)
Kanal 3	Lösung 3 (2 x SSC/0,1 % SDS)
Kanal 4	Lösung 4 (0,1 x SSC)
Kanal 5	frei
Kanal 6	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> , DNase/RNase-frei

Die Lösungen werden auf der Heizplatte bei 37°C warm gehalten. Es können bis zu vier Arrays in einem Durchlauf gleichzeitig hybridisiert werden. Jeder Array wird in die jeweilige Hybridisierungskammer eingelegt. Unter dem Programmschritt *Prime* wird die Lösung aus Kanal 1 luftblasenfrei in das Leitungssystem der Hybridisierungsstation gezogen. In der Zwischenzeit erfolgt die Denaturierung von DNA-Sonde(n) und Prähybridisierungsmix(en) (B.2.3.5). Ca. 4 min vor Ende der Denaturierungszeit wird das Hybridisierungsprogramm der HS 400 gestartet (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Programm für die Hybridisierung mit der TECAN HS 400

Das Programm setzt sich aus mehreren Teilschritten zusammen, für die einzelne Parameter wie Temperatur und Dauer definiert werden können. Bei Waschschritten (*WASH*) wird der Kanal (*Channel*) für die zu verwendende Lösung ausgewählt, die Dauer bestimmt, mit der die gewählte Waschlösung über den Array fließt (*Wash time*), und die Zeitspanne definiert, während der die Waschlösung auf dem OT ruht (*Soak time*). Die Anzahl der Wiederholungen eines solchen Waschschrilles wird mit *Runs* angegeben. Mit *Probe injection* lässt sich der Zeitpunkt der Probeninjektion bestimmen. Nach erfolgter Hybridisierung und den anschließenden Waschschrillen wird der OT mit Stickstoff getrocknet (*SLIDE DRYING*).

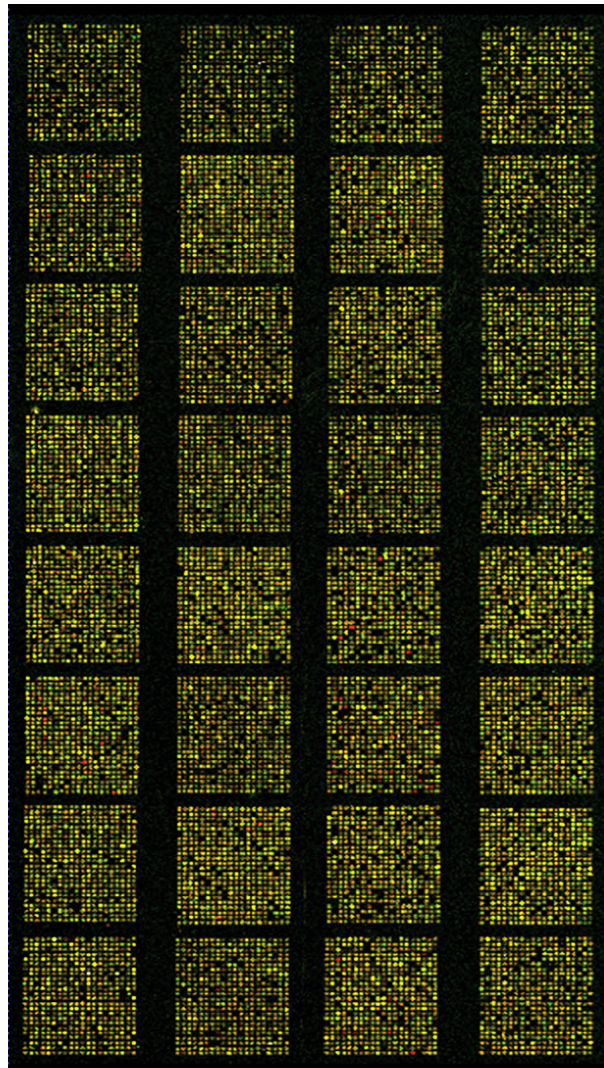
Nach dem ersten Waschschrift werden jeweils 70 µl des denaturierten Prähybridisierungsmixes in die Hybridisierungskammer(n) injiziert und für 45 min hybridisiert. Der Array wird dadurch vorgepuffert und die eigentliche DNA-Sonde kann sich später gleichmäßig über den OT verteilen, was zu einer Reduzierung von Hybridisierungsartefakten führt. Die denaturierte DNA-Sonde prähybridisiert bis zur Injektion für 45 min bei 37°C ohne Schütteln im Heizblock. Nach der Prähybridisierung werden je 70 µl der Sondenlösung in die Hybridisierungskammer(n) injiziert und bei 37°C für 40 h hybridisiert. Um die Effizienz der Hybridisierung zu erhöhen, wird die Sonde während der Hybridisierung auf dem OT hin und her bewegt.

Nach erfolgter Hybridisierung und nach den anschließenden Waschschriften befinden sich die Arrays in einer Stickstoff-Schutzatmosphäre. Die Arrays werden aus den Hybridisierungskammern entfernt und möglichst umgehend gescannt, um einen Einfluss der oxidierenden Wirkung von Sauerstoff und Ozon zu minimieren.

#### **B.2.3.7 Scannen und Analyse der Arrays**

Die hybridisierten Arrays werden mit dem Microarray-Scanner GenePix™ Personal 4100A (Axon Instruments, Molecular Devices) gescannt. Beim Scannen wird der Array gleichzeitig von zwei Lasern unterschiedlicher Wellenlängen abgetastet. Dabei werden die Fluorochrome Cy3 bei 532 nm und Cy5 bei 635 nm angeregt. Das emittierte Licht dieser Fluorochrome wird durch Emissionsfilter (550-600 nm für Cy3 und 655-695 nm für Cy5) mit so genannten Photomultipliern (PMT) detektiert. Ein ausgewählter Bereich wird gescannt und als TIF-Datei mit den zwei Ebenen der Fluoreszenzkanäle gespeichert (Abb. 7).



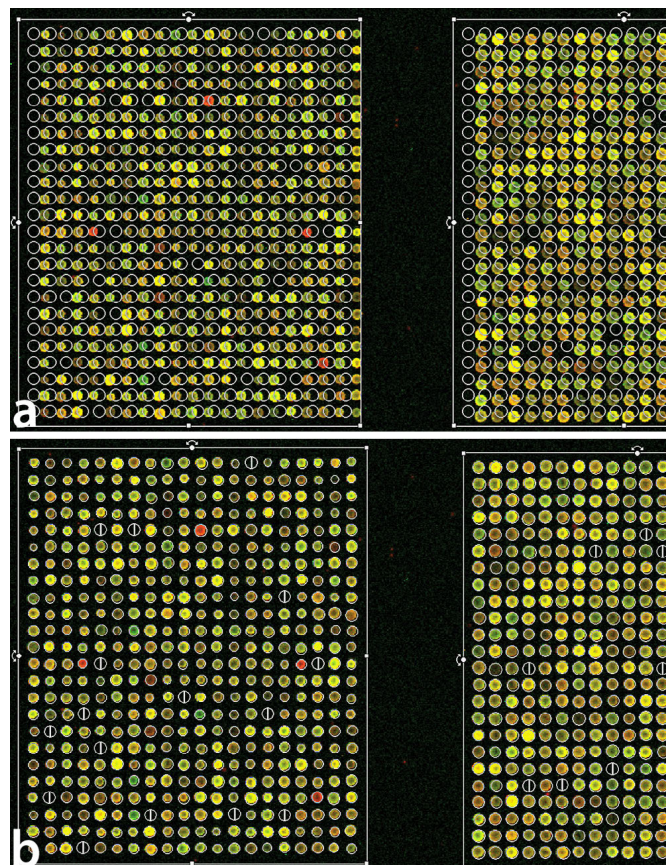


**Abbildung 7: Gescannter 1 Mb BAC-Array**

Die Abbildung zeigt das Bild eines gescannten 1 Mb BAC-Arrays, bei dem die Bilder der roten (Cy5) und grünen (Cy3) Fluoreszenzsignale übereinander gelegt sind. Dadurch kommt es zur gelben Mischfarbe der Spots. Der Array besteht aus 32 (4 x 8) Blöcken, wobei jeder Block aus 20 Spalten und 24 Reihen besteht.

Die TIF-Bilder werden mit der Software GenePix<sup>TM</sup> Pro 6.0 (Axon Instruments, Molecular Devices) geöffnet und analysiert. Dafür wird zunächst das so genannte *Array List File* geladen. Diese Datei enthält Informationen über den Aufbau des Arrays; die Positionen, der Abstand und der Durchmesser der einzelnen Spots in den Blöcken werden genau beschrieben. Zusätzlich werden jedem Spot mit definierter Position ein BAC und damit ein Abschnitt im Genom zugeordnet. Das Computerprogramm erstellt mit Hilfe dieser Informationen ein Positionsgitter (*Grid*), das dem theoretischen Aussehen des Arrays entspricht und über diesen gelegt wird (Abb. 8a). Mit Hilfe der Funktion *Find Array, Align Features* kann das Programm das theoretische Gitter des *Array List Files* automatisch auf die Position, Größe und Form jedes einzelnen Spots anpassen

und so mit dem gesamten gescannten Bild zur Deckung bringen (Abb. 8b). Jeder Kreis des angepassten Gitters um einen Spot entspricht dabei einem so genannten *Feature*. Der Median aller Pixel innerhalb eines *Features* wird in die Analyse der Fluoreszenzintensitäten einbezogen. Mit der *Analyze*-Funktion werden sowohl die Mediane der Vordergrund-Fluoreszenzintensitäten innerhalb eines Spots als auch die Mediane der Hintergrund-Fluoreszenzintensitäten in einem ringförmigen Bereich um einen jeden Spot herum ermittelt. Dabei werden die Fluoreszenzintensitäten für Cy3 und Cy5 einzeln gemessen. In so genannten *Flag Features* sind Parameter als Kriterien festgelegt, mit denen entschieden wird, wann ein Spot nicht in die Analyse einbezogen und somit als negativ *geflaggt* wird. Die Ergebnisse der Analyse werden im GenePix-Result-File (.gpr) Format abgespeichert.



**Abbildung 8: Spot-Gitter (*Grid*) auf Grundlage des Array List File in GenePix™ Pro**

Das Positionsgitter (*Grid*) ist vor (a) und nach (b) der automatischen Anpassung durch GenePix™ Pro 6.0 gezeigt. Es wird mit jedem einzelnen Spot zur Deckung gebracht. Im Bild unten sind auch die Spots zu sehen, die aufgrund eines negativen *Flaggings* (siehe B.2.3.8) nicht in die weitere Analyse eingehen (gekennzeichnet durch einen Kreis mit senkrechtem Strich).

### B.2.3.8 Datenauswertung mit MANOR, DNACopy und CGHcall

Ziel der weiteren Datenauswertung ist die Ermittlung von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten der untersuchten Tumor-DNA durch den Vergleich balancierter Referenz-DNA. Die Auswertung der mit GenePix™ Pro 6.0 generierten gpr-Dateien erfolgt mit den R-Paketen MANOR, DNACopy und CGHcall (Olshen et al., 2004; Neuvial et al., 2006; van de Wiel et al., 2007). Die R-Software (R Development Core Team, 2011) sowie die R-Pakete sind unter den Internetadressen <http://cran.raknu.com/> und <http://www.bioconductor.org/> frei erhältlich. Die Datenauswertung setzt sich aus insgesamt drei Schritten zusammen: der Normalisierung des Datensatzes, der anschließenden Segmentierung und dem so genannten *Calling*.

Zunächst muss die mit GenePix™ Pro 6.1 erstellte Ergebnisdatei (*result file*) zusammen mit der so genannten *Clone list* Datei geladen werden. Letztere enthält relevante Informationen über die verwendeten BAC-Klone wie Name, Lokalisation im Genom und physikalische Position. Im Anschluss daran werden alle Klone aus dem Datensatz gefiltert, die nicht den festgesetzten Qualitätskriterien entsprechen (*Flagging*), damit lediglich biologische Veränderungen in die Auswertung aufgenommen werden und experimentelle Artefakte eliminiert werden.

Die wichtigsten Parameter hierbei sind zum einen der Hintergrundschwellenwert (*background threshold*), durch den sämtliche Klone aus dem Datensatz entfernt werden, deren Quotient aus Vordergrund- und Hintergrundsignal den Wert 3 unterschreitet. Zum anderen werden durch den Schwellenwert der Standardabweichung (*standard deviation threshold*) alle Klone ausgeschlossen, bei denen die Werte der Replikate um  $\geq 10\%$  abweichen.

Die nach dem *Flagging* im Datensatz verbliebenen Werte werden anschließend durch den Algorithmus MANOR (**M**icro**a**r**r**ay **N**ormalization) räumlich normalisiert (Neuvial et al., 2006). Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten von Tumor- und Referenz-DNA wird als zur Basis 2 logarithmierter Quotient ( $\log_2$ -Ratio) angegeben. Durch die Normalisierung wird der Gesamtmedian der Daten auf die Nulllinie verschoben.

Der räumliche Normalisierungsalgorithmus (*spatial normalization*) erfolgt in drei Schritten:

1. Abschätzung eines räumlichen Trends der Fluoreszenzintensitäten der Fluorochrome Cy3 und Cy5 auf dem Array
2. Segmentierung des Arrays in Bereiche mit ähnlichen Trend-Werten
3. Median-Normalisierung der Datenuntermengen der jeweiligen Segmente

Dabei wird der Array (zweidimensional) in eine bestimmte Anzahl von Bereichen unterteilt, die bezogen auf das Mittel der Fluoreszenzintensitäten einheitlich sind. Da die BAC-Klone in zufälliger Reihenfolge auf den Array aufgebracht werden, kann eine biologische Ursache für ein Überwiegen der Intensität eines Fluoreszenzfarbstoffes in einem bestimmten räumlichen Bereich ausgeschlossen werden. Lokale Artefakte, die beispielsweise beim Waschen oder durch Verunreinigungen des Arrays entstehen, können durch diese Art der Normalisierung ausgeglichen werden. Die Werte der eingeteilten Bereiche werden jeweils für sich normalisiert. Neuvial et al., 2006 beschreiben in ihrer Veröffentlichung zwei distinkte Arten von räumlichen Artefakten. Einmal können lokale räumliche Verzerrungen (*local spatial bias*) auftreten; hierbei weisen Spots in einem abgegrenzten Bereich Signalveränderungen auf, während die restlichen Spots des Arrays unverändert bleiben. Des Weiteren kann ein kontinuierlicher räumlicher Gradient (*continuous spatial gradient*) auf dem Array entstehen, wodurch alle Spots in unterschiedlichem Ausmaß davon betroffen sind. Abschließend werden den  $\text{Log}_2$ -Ratios anhand der *Clone list* Datei die physikalischen Positionen im Genom zugeordnet. Wenn der Tumorgehalt einer Probe nicht 100 % entspricht, wird das Profil mit Hilfe des Algorithmus *cellularity correction* in Abhängigkeit des tatsächlichen Tumorgehalts korrigiert (van de Wiel et al., 2007).

Mit Hilfe des R-Pakets DNACopy werden die normalisierten Daten segmentiert (Olshen et al., 2004). Der in DNACopy implementierte CBS (*Circular Binary Segmentation*)-Algorithmus erlaubt eine Einteilung der  $\text{Log}_2$ -Ratios entlang der genomischen Skala in einzelne Abschnitte, um Start- und Endpunkte von veränderten Regionen (*breakpoints*) im Genom zu detektieren. Allen BAC-Klonen innerhalb eines Segments wird der gleiche geglättete  $\text{Log}_2$ -Ratio Wert zugeordnet (Median der  $\text{Log}_2$ -Ratios).

Der nächste Schritt der Auswertung erfolgt mit Hilfe des R-Pakets CGHcall (van de Wiel et al., 2007). Im Gegensatz zur konventionellen Analyse, in der den einzelnen Segmen-

ten einer von vier Zuständen (DNA-Zugewinn; Amplifikation; DNA-Verlust; unverändert) zugeordnet wird, werden in der Auswertung mit CGHcall sechs Klassen (einfacher DNA-Zugewinn; doppelter DNA-Zugewinn; Amplifikation; einfacher DNA-Verlust; doppelter DNA-Verlust; unverändert) verwendet. Durch die zusätzliche Diskriminierung zwischen DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten kann eine präzisere Aussage über chromosomale Aberrationen getroffen werden. Jedem Segment wird mit Hilfe mathematischer Berechnungen für alle sechs Klassen ein Wahrscheinlichkeitswert zugeordnet (*call probability*). Überschreitet die Wahrscheinlichkeit den Wert 0,5, dann wird dem Segment statistisch signifikant einer der sechs Erwartungszustände zugeordnet (*call*). Zur endgültigen Klassifizierung werden die beiden Zugewinn- und Deletionszustände zu jeweils einer Klasse fusioniert, sodass sich am Ende drei Erwartungszustände ergeben (Zugewinn-Amplifikation; Normal; Verlust). Der CGHcall-Algorithmus zeichnet sich außerdem durch eine hohe Genauigkeit bezüglich der veränderten Segmente aus (*high calling accuracy*).

Abschließend werden mit Hilfe des R-Pakets CGHregions (van de Wiel und van Wieringen, 2007) innerhalb des zu analysierenden Tumorkollektives die einzelnen Klonwerte zu gemeinsamen Veränderungsbereichen zusammengefasst. Dies führte bei maximal 1 % Informationsverlust zu einer enormen Reduktion der Datenkomplexität und aufgrund der geringeren Testanzahl zu einer höheren statistischen *Power* in den nachfolgenden statistischen Tests.

## B.2.4 Hochauflösende Oligonukleotid-Arrays

### B.2.4.1 Verwendeter 180k Oligonukleotid-Array

Für eine hochauflösende Array-CGH-Analyse wird in dieser Arbeit der 180k Oligonukleotid-Array der Firma Agilent Technologies verwendet. Der Array ist im 4x180k Format erhältlich, was bedeutet, dass vier 180k Arrays auf einen Glasobjektträger gedruckt sind. Auf einem Array befinden sich ca. 180.000 hochspezifische 60mer-Oligonukleotide, die das gesamte menschliche Genom mit einem medianen Abstand von 13 kb repräsentieren, wobei bekannte Gene durch mehrere Proben abgedeckt werden. Die *in situ* Synthese der Oligonukleotide erfolgt über die einzigartige *Sure-Print*-Technologie, welche auf dem Tintenstrahl-Druckverfahren der Firma Hewlett Packard basiert. Auf die aktivierte Oberfläche eines Glasträgers werden so freie Nukleotide in kleinen Volumina (Picoliter) aufgebracht und über das Phosphoramiditverfahren Base für Base zu 60mer-Oligonukleotiden synthetisiert. Im Gegensatz zur enzymatischen DNA-Synthese, verläuft die Oligonukleotid-Synthese in 3'→5'-Richtung. Hierbei bindet in jedem Oligonukleotid-Syntheszyklus des Phosphoramiditverfahrens ein freies Nukleotid über eine Phosphodiesterbindung an die 5'-Gruppe der wachsenden Nukleotidkette. Das nun gebundene Nukleotid ist am 5'-Ende mit einer säurelabilen Dimethoxytrityl-Schutzgruppe versehen und kann seinerseits erst nach Entfernen der Schutzgruppe (Detritylation) und Aktivierung des 5'-Endes durch Oxidation eine Bindung mit dem 3'-Ende des nächsten Nukleotids eingehen. Um unerwünschte Reaktionen zu verhindern, werden die überschüssigen Reagenzien zwischen jedem Schritt gewaschen. Die Schritte Nukleotid-Aufdruck, Detritylation, Oxidation und Waschen werden 60mal wiederholt. Nach Anhängen der letzten Base folgt auf einen letzten Detritylationsschritt eine strenge Qualitätskontrolle der Arrays.

### B.2.4.2 Random Prime Labeling

Die Markierung der DNA für die Oligo-Array-CGH erfolgt durch das so genannte *Random Prime Labeling*, wobei Tumor- und Referenz-DNA direkt mit Fluorochromen markiert werden. Das Prinzip des *Random Prime Labelings* ist unter B.2.3.2 beschrieben.

MATERIAL

- CGH Labeling Kit for Oligo Arrays (Enzo)  
Primers/Reaction Buffer  
Cyanine 3-dUTP Nucleotide Mix  
Cyanine 5-dUTP Nucleotide Mix  
Klenow DNA-Polymerase  
Stop Buffer  
H<sub>2</sub>O nuclease-free
- Humane Referenz-DNA, weiblich oder männlich, gepoolt, von mehreren gesunden anonymen Spendern (Promega), 500 ng
- PCR Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

DURCHFÜHRUNG

In eine *Random Prime Labeling* Reaktion werden 500 ng Test- und 500 ng Referenz-DNA eingesetzt. Hierzu werden in zwei separaten Reaktionsgefäßen 500 ng DNA, 20 µl Primer/Reaktionspuffer-Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 39 µl gemischt. Die Ansätze werden für 10 min bei 99°C im PCR-Block denaturiert und im Anschluss für 2 min auf Eis gekühlt. Danach werden auf Eis 10 µl Cy3-dUTP (Tumor-DNA) oder 10 µl Cy5-dUTP (Referenz-DNA) und 1 µl Klenow-Polymerase dazugegeben. Nach vorsichtigem Mischen werden die Ansätze für 4h bei 37°C im PCR-Block inkubiert. Durch die Zugabe von 5 µl Stopp-Puffer wird die Reaktion beendet. Die Proben können bis zur Aufreinigung bei -20°C gelagert werden.

**B.2.4.3           Aufreinigung der markierten DNA**MATERIAL

- Amicon® Ultra-0.5-Filter (Millipore)
- Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)
 

10 mM Tris (Merck)	1,2 g
1 mM EDTA (Merck)	0,37 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
mit HCl pH 7,5 einstellen	
autoklavieren	
- Zentrifuge 5415D (Eppendorf)

DURCHFÜHRUNG

Nach der Markierung werden die Proben mit Amicon®-Filtern aufgereinigt. Hierzu wird die markierte DNA mit 430 µl TE-Puffer versetzt und anschließend auf ein Filtersäul-

chen überführt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 14.000 x g (RT). Der Durchfluss, der überschüssige Nukleotide, Primer, Enzyme und Salze enthält, wird verworfen. Danach wird der Filter invertiert in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und 1 min bei 1.000 x g (RT) zentrifugiert. Das Volumen der markierten DNA beträgt nach der Aufreinigung ca. 21 µl.

#### **B.2.4.4 Bestimmung der Inkorporationsrate**

Im Anschluss werden Konzentration und Cy3-/Cy5-Inkorporation der aufgereinigten DNA mit Hilfe des NanoDrop®-Spektrophotometers (siehe B.2.1.2) bestimmt. Dafür wird neben der Extinktion bei 260 nm auch die Extinktion bei 532 nm (Cy3) und 635 nm (Cy5) gemessen. Die Eichung des Gerätes erfolgt mit 1,5 µl TE-Puffer als Referenz. Aus den Messdaten wird die spezifische Aktivität der markierten DNA bestimmt (pmol Fluorochrom pro µg DNA). Hierzu wird ein Quotient aus gemessener Inkorporationsrate des Fluorochroms und gemessener DNA-Konzentration gebildet:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \text{pmol}/\mu\text{l Fluorochrom} / \mu\text{g}/\mu\text{l DNA}$$

Für eine erfolgreiche Hybridisierung sollte die spezifische Aktivität der markierten Probe mindestens 20 (Cy5), bzw. 25 (Cy3) betragen.

#### **B.2.4.5 Hybridisierung**

- Agilent 10 x Blocking Agent (Agilent Technologies)  
Vor dem ersten Gebrauch 1350 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> zum lyophilisierten 10 x Blocking Agent hinzugeben und für 60 min bei RT lösen; Lagerung bei -20°C
- Agilent 2 x Hi-RPM Buffer (Agilent Technologies)
- Agilent Hybridisierungssofen, G2545A (Agilent Technologies)
- Agilent Microarray Hybridization Chamber Kit, G2534A (Agilent Technologies)
- Agilent Gasket slide, 4 microarrays/slide format (Agilent Technologies)
- Humane Cot-1 DNA, 1 µg/µl (Roche)
- SurePrint G3 Human CGH Microarray, 4x180k (Agilent Technologies)
- Vakuumentrifuge Concentrator 5302 (Eppendorf)

#### DURCHFÜHRUNG

Zuerst wird das Volumen der aufgereinigten und markierten DNA bestimmt und auf 19,5 µl in der Vakuumentrifuge eingeeengt. Anschließend wird die Cy5-markierte Referenz-DNA mit der Cy3-markierten Test-DNA gemischt.



Um eine spezifische und Hintergrund-reduzierte Hybridisierung auf dem Array zu gewährleisten, wird jede Probe mit Cot-1-DNA (siehe Kapitel B.3.1.5), Blocking-Reagenz und Hybridisierungspuffer versetzt. Hierzu wird ein Hybridisierungs-Mastermix (Volumenangabe pro *Slide*, d.h. für 4 Proben) mit 21,25 µl Cot-1 DNA, 46,75 µl Agilent 10 x Blocking Reagenz und 233,75 µl Agilent 2 x Hi-RPM Puffer hergestellt. Jede Probe wird mit 71 µl Mastermix auf ein Endvolumen von 110 µl gebracht. Die Proben werden 3 min bei 95°C denaturiert und 30 min bei 37°C vorinkubiert. Durch die Denaturierung und anschließende Vorinkubation bei 37°C werden repetitive DNA-Sequenzen geblockt. In der Zwischenzeit wird der Hybridisierungssofen auf 65°C geheizt. Nach erfolgter Vorinkubation, werden 100 µl der Probe auf ein in der Hybridisierungskammer (Stahlträger) liegendes *gasket slide* aufgetragen ohne die Gummiummantelung des einzelnen Array-Areals zu berühren. Der 180k Microarray wird anschließend mit der aktiven Seite nach unten (Barcode mit „Agilent“) vorsichtig luftblasenfrei auf das *gasket slide* gelegt. Die Hybridisierungskammer wird mit einer Stahlzwinge verschlossen. Das fertige „Array-Sandwich“ wird von Hand langsam gedreht und möglichst zeitnah in den Rotator im Hybridisierungssofen eingespannt. Die Hybridisierung erfolgt für 24 h bei 65°C und 20 rpm.

#### **B.2.4.6 Waschen der Arrays**

##### MATERIAL

- Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 1, 4l (Agilent Technologies)
- Oligo aCGH/ChIP-on-chip Wash Buffer 2, 4l (Agilent Technologies)
- Glasküvetten mit Objektträgerhalter

##### DURCHFÜHRUNG

Das stringente Waschen erfolgt mit zwei Puffern in Glasküvetten. Die Küvetten werden vor und nach Gebrauch ausschließlich mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ausgespült und an der Luft getrocknet. Der Waschpuffer 2 wird über Nacht auf 37°C vorgewärmt.

Nach 24 h Hybridisierung wird die Stahlzwinge der Hybridisierungskammer geöffnet und das „Array-Sandwich“ in einer Küvette mit Waschpuffer 1 (RT) mit Hilfe einer Pinzette geöffnet, so dass das *gasket slide* auf den Küvettenboden sinkt. Der Array-Slide wird in den Objektträgerhalter einer zweiten mit Waschpuffer 1 gefüllten Küvette ge-

setzt und bei RT 5 min unter Rühren (Magnetrührer) inkubiert. Der Objektträgerhalter wird in den auf 37°C erwärmten Waschpuffer 2 in Küvette 3 überführt und 1 min unter Rühren inkubiert. Zum Schluss wird der Objektträgerhalter langsam aus der Küvette herausgezogen. Aufgrund seiner Oberflächenspannung ist der Array-Objektträger nun trocken (ohne jegliche Tropfen) und bereit zum Scannen.

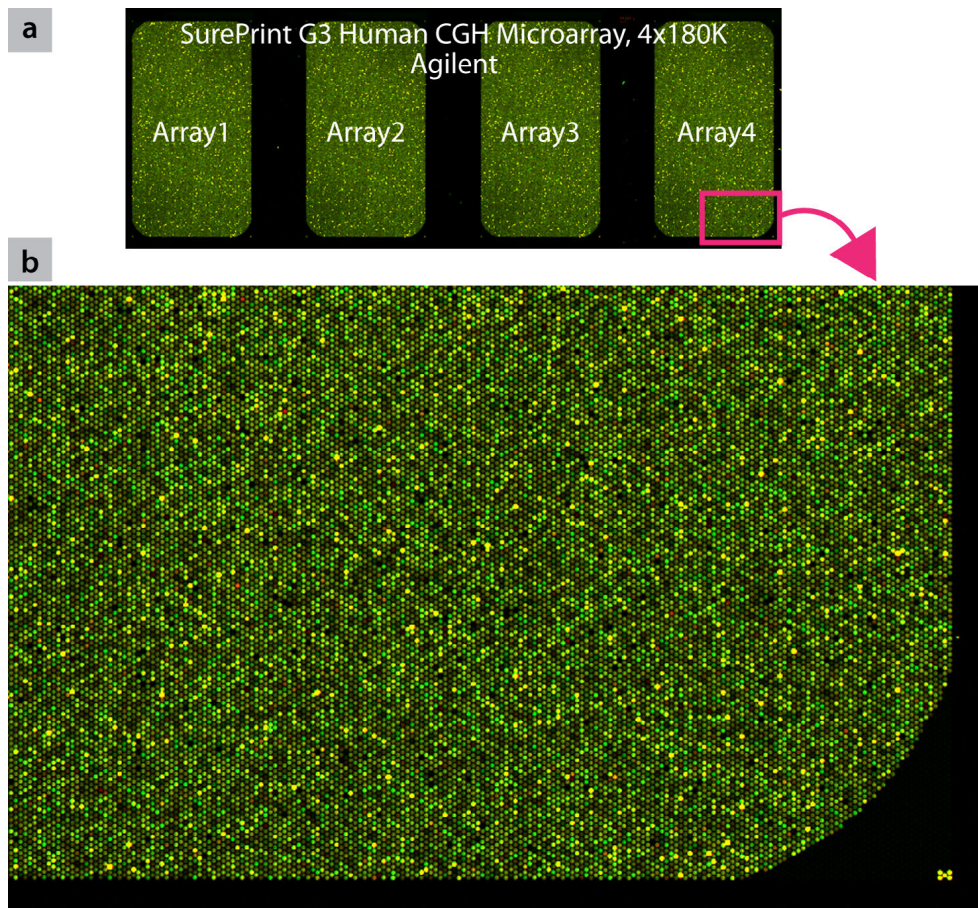
#### **B.2.4.7 Scannen der Arrays**

##### MATERIAL

- Ozone-Barrier Slide Cover (Agilent Technologies)
- Slide Holders (Agilent Technologies)
- G2505C Microarray Scanner (Agilent Technologies)

##### DURCHFÜHRUNG

Zum Scannen wird der Array mit der aktiven Seite nach oben (Barcode mit „Agilent“) in einen *slide holder* gesetzt. Da vor allem Cy5 empfindlich gegenüber der Degradation durch Ozon ist, wird der Array mit einem *Ozone-Barrier Slide Cover* versehen. Das Scannen der Arrays erfolgt mit dem Agilent Mikroarray Scanner unter Verwendung der Software *Agilent Scan Control*. 180k Arrays werden mit den Voreinstellungen des Profils „Agilent G3\_CGH“ gescannt (*Slide ID: Auto Detect, Channels: R + G, Scan Region: Agilent HD 61 x 21.6 mm, Resolution: 3 µm, Tiff: 16 bit, Red PMT: 100 %, Green PMT: 100 %, XDR: No XDR*). Die entstandene Bild-Datei (.tif) kann im Anschluss mit der Software *Feature Extraction* (Version 10.10.1.1) geöffnet und auf eine gleichmäßige Hybridisierung kontrolliert werden (Abb. 9).



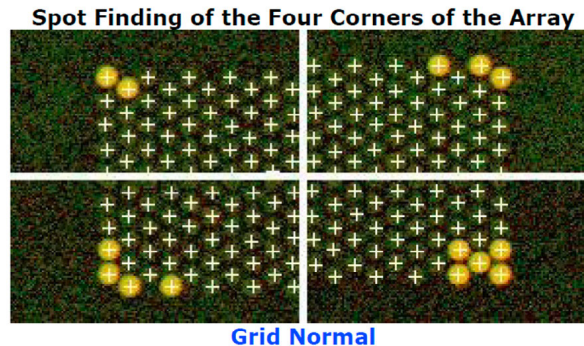
**Abbildung 9: Gescannter 180k Oligonukleotid-Array**

(a) Gezeigt ist ein gescannter „SurePrint G3 Human CGH Microarray“ im 4x180k Format der Firma Agilent, bei dem vier 180k Arrays auf einem Glasobjektträger aufgebracht sind. Die Bilder der roten (Cy5) und grünen (Cy3) Fluoreszenzsignale sind übereinander gelegt, wodurch es zur gelben Mischfarbe der Spots kommt. Ein Ausschnitt von Array 4 ist in (b) vergrößert dargestellt. Rechts unten sind die Kontrollspots (*corner spots*) zu sehen, die sich in allen vier Ecken eines Arrays befinden und von der Auswertesoftware für die automatische Ausrichtung des Positionsgitters (*Grid*) verwendet werden.

#### B.2.4.8 Datenextraktion

Die Extraktion der Daten in eine Textdatei (.txt) erfolgt mit der Software *Feature Extraction* (Version 10.10.1.1). Es wird ein neues *Feature Extraction (FE)* Projekt angelegt, dem die Scan-Bild-Datei(en) zugeordnet werden. Zusätzlich werden das aktuelle *FE* Auswerteprotokoll (hier: CGH\_1010\_Sep10), das Arrayformat-spezifische Positionsgitter (*Grid Template*) und das passende Protokoll für die Qualitätskontrolle (*Quality Control Metric Set*) geladen. Die *FE* Software erkennt das Format des Arrays über den eingelesenen Array-Strichcode und lädt über die Online Datenbank *eArray* (Agilent) die benötigten Dateien automatisch in das Programm. Das *Grid Template* enthält die Information über die Zuordnung der Oligonukleotidproben zu den entsprechenden Spot-

Positionen auf dem Array. Bei der Extraktion der Fluoreszenzintensitäten wird im ersten Schritt das *Grid* automatisch über den Array gelegt (*Place Grid*) und bezüglich genauer Position und Form an die einzelnen Spots angepasst (*Optimize Grid Fit*). Ausschlaggebend für die Positionierung des Gitters sind die Kontrollspots in den vier Ecken außerhalb des Arrays (Abb. 9b und Abb. 10). Das angepasste Gitter legt die Messpunkte für die anschließende Datenanalyse entsprechend des gewählten *FE Protocols* fest.



**Abbildung 10: Kontrollspots des 180k Oligonukleotid-Arrays**

Gezeigt sind die Kontrollspots (*corner spots*) in den vier Ecken des Arrays, welche ausschlaggebend für eine genaue Anpassung des Gitters (*Grid*) sind. Das *Grid* wird automatisch über den Array gelegt und an die einzelnen Spots angepasst. Die Kreuze werden mit jedem einzelnen Spot in Deckung gebracht.

Der darauffolgende Algorithmus *Find Spots* lokalisiert die exakte Größe und den Mittelpunkt der einzelnen Spots. Die Gesamtheit der Pixel, die einem Spot zugeordnet werden und in die Auswertung eingehen, werden als *Feature* bezeichnet. Mit Hilfe des *CookieCutter*-Algorithmus wird die lokale Hintergrundfluoreszenz eines jeden Spots in einem definierten Radius bestimmt. Des Weiteren werden Ausreißer Pixel (*outlier pixels*) bestimmt und von der Auswertung ausgeschlossen. Der Algorithmus *Flag Outliers* legt basierend auf festgelegten Kriterien (z.B. Vordergrund/Hintergrund Quotient, Anteil an gesättigten Pixeln pro Spot und Standardabweichung zwischen Replikaten) fest, wann ein Spot nicht in die Analyse einbezogen und somit als *outlier geflaggt* wird.

Neben der Extraktion der Daten in eine Textdatei, wird von der FE-Software zusätzlich ein Projekt- und Qualitätsreport generiert, welcher der Qualitätsbeurteilung der Experimente dient.

#### **B.2.4.9 Datenauswertung mit MANOR, DNACopy und CGHcall**

Die extrahierten Daten (.txt-Datei) werden anschließend wie unter B.2.3.8 beschrieben in der Statistikplattform R unter Verwendung der *Bioconductor* Pakete MANOR, DNACopy und CGHcall ausgewertet.

#### **B.2.5 Statistische Methoden**

Zur weiteren Analyse der Ergebnisse der Array-CGH-Untersuchungen werden verschiedene statistische Methoden angewendet.

##### **B.2.5.1 Hierarchische Clusteranalyse**

Die hierarchische Clusteranalyse ist ein multivariates Analyseverfahren zur Ermittlung von Gruppen (Clustern) von Daten oder Objekten mit ähnlichen Eigenschaften. Bei der Clusteranalyse von Array-CGH-Daten werden Kopienzahlprofile mit ähnlichem Veränderungsmustern einander zugeordnet. Die Clusteranalyse wird mit der R-Statistik-Software (<http://www.r-project.org>) durchgeführt (R Development Core Team, 2011). Für die Berechnungen werden die über die Segmente (DNA-Verlust-/DNA-Zugewinn/Normal) gemittelten  $\log_2$ -Ratios verwendet. Ausgehend von der obersten Hierarchiestufe werden die Profile hinsichtlich ihrer Korrelationsdistanz (Pearson-Korrelationskoeffizient) geordnet. Die Distanz zwischen zwei Clustern wird mit der Ward-Methode (*Ward linkage*) berechnet. Dabei entsteht eine Familienstammbaum ähnliche Struktur, das Dendrogramm, welches eine visuelle Zuordnung der Profile zu Gruppen (Clustern) erlaubt.

##### **B.2.5.2 Exakter Fisher-Test**

Beim Exakten Fisher-Test handelt es sich um einen statistischen Test auf Unabhängigkeit zweier Merkmale einer Stichprobe (Sachs und Hedderich, 2009). Bei kleinen Merkmalshäufigkeiten liefert er zuverlässigere p-Werte als der zum gleichen Zweck verwendete Chi-Quadrat-Test. In dieser Arbeit dient der Exakte Fisher-Test dazu, die Korrelation der durch die Clusteranalyse definierten Tumorgruppen mit klinischen Patientendaten oder Tumorphänotypen zu testen. Ein signifikanter Zusammenhang wird bei einem p-Wert  $< 0,05$  angenommen.

**B.2.5.3 Multipler Chi-Quadrat-Test und FDR**

Beim multiplen Testen wird derselbe Test auf eine Vielzahl von Ergebnissen aus demselben Experiment angewandt. In dieser Arbeit wird der Chi-Quadrat-Test ( $\chi^2$ -Test) im multiplen Testverfahren verwendet (Sachs und Hedderich, 2009), um bezüglich einer nicht-zufälligen Häufung von Kopienzahlveränderungen in definierten Gruppen zu testen. Die Gruppen (z.B. exponierte und nicht exponierte Fälle) werden mithilfe von klinischen Patientendaten und Daten zu den Tumorphänotypen definiert.

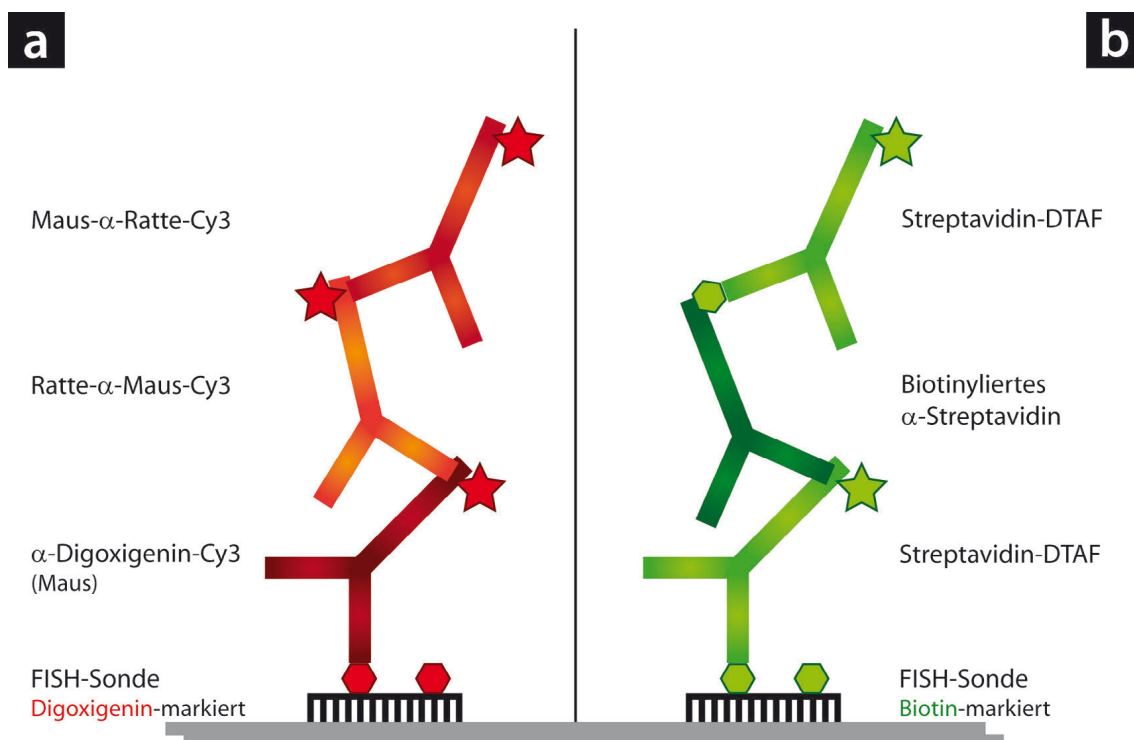
Aufgrund der Natur des p-Wertes und seiner Verteilung, kommt es bei einer höheren Anzahl von Tests zufällig zu p-Werten die unterhalb der Signifikanzgrenze von 0,05 liegen. Um die sogenannte FDR (*False Discovery Rate*) gering zu halten, werden die p-Werte nach einem FDR-Verfahren adjustiert (Manduchi et al., 2000), so dass unter den schließlich verworfenen Null-Hypothesen die falsch-positive Rate klein bleibt. Für die Berechnung der adjustierten p-Werte wird das R-Skript *CGHtest* (<http://www.few.vu.nl/~mavdwiel/CGHtest.html>) benutzt (van de Wiel et al., 2005). In *CGHtest* werden die adjustierten p-Werte mit einem Permutationsverfahren bestimmt, wobei hier 10.000 Permutationen durchgeführt werden. Korrelationen mit FDR-Werten  $< 0,05$  werden als signifikant angenommen.

**B.2.5.4 Maximum-Likelihood-Methode**

Bei der Maximum-Likelihood-Methode handelt es sich um ein statistisches Verfahren zur Schätzung bestimmter Parameter, welche in einer vorliegenden Stichprobe unbekannt sind (Quinn und Keough, 2002). Das Schätzverfahren wird in dieser Arbeit verwendet, um einen unabhängigen Einfluss zweier Patientenfaktoren in einem bivariaten Test zu überprüfen.

### B.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Technik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ermöglicht die Lokalisation und den Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen direkt an der jeweiligen biologischen Struktur (*in situ*). Mit Hilfe der FISH können ganze Chromosomen, subchromosomale Regionen sowie DNA-Abschnitte von wenigen kb farbig dargestellt werden. Der Nachweis erfolgt durch eine spezifische Hybridisierung direkt oder indirekt Fluorochrommarkierter DNA-Sonden an definierte DNA-Sequenzen des Präparates. Um eine Hybridisierung zu ermöglichen, werden die DNA-Sonden sowie die DNA in den fixierten Präparaten separat denaturiert. Bei der anschließenden Hybridisierung kommt es zu einer Anlagerung der DNA-Sonden an komplementäre DNA-Abschnitte des Präparates. Die entstandenen Hybridmoleküle können mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. In dieser Arbeit erfolgt der Einsatz indirekt markierter DNA-Sonden, die zunächst mit Biotin oder Digoxigenin gekoppelt werden. Der visuelle Nachweis erfolgt dann mittels gegen Biotin und Digoxigenin gerichteter Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff verknüpft sind (Abb. 11).



**Abbildung 11: Detektion indirekt markierter FISH-Sonden**

Die Detektion hybridisierter DNA-Sonden erfolgt mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern. **(a)** Digoxigenin-markierte Sonden werden über drei Cy3-markierte Antikörper detektiert. **(b)** Der Nachweis Biotin-markierter Sonden erfolgt auch über drei Antikörper, wobei nur zwei Antikörper an DTAF gekoppelt sind.

Mit FISH-Experimenten sollen in dieser Arbeit die mittels Array-CGH nachgewiesenen genomischen Aberrationen verifiziert werden.

### **B.3.1 Bacterial Artificial Chromosomes (BACs)**

BAC (*Bacterial Artificial Chromosome*)-Vektoren sind künstlich erzeugte Bakterienchromosomen, die auf den *single-copy* F-Plasmiden, den natürlich vorkommenden Sexfaktor-Plasmiden von *E. coli*, basieren. Ein solcher Klonierungsvektor kann humane genomische DNA-Fragmente mit einer Länge von bis zu 300 kb aufnehmen und ist über sehr viele (> 100) Generationen stabil. Neben regulatorischen Genen wie *oriS* und *repE* für die unidirektionale Replikation sowie den Kopienzahl beschränkenden Genen *parA* und *parB* enthält ein BAC-Vektor (pBAC) zusätzlich eine Klonierungsstelle (*Multiple Cloning Site*) und einen Antibiotikum-Resistenzmarker. Nach Transformation dieser Vektoren in Bakterienzellen werden die transgenen Bakterienstämme kultiviert und selektiv angezüchtet, um ausreichende Mengen an klonierter humaner Fremd-DNA zu gewinnen (Shizuya et al., 1992).

In dieser Arbeit werden BAC-Klone verwendet, um chromosomale Veränderungen verifizieren zu können. Hierfür steht die so genannte Human 32k Re-Array BAC Library (BACPAC Resources Center, Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA, USA) zur Verfügung. Diese Bibliothek besteht aus ca. 32.000 BAC-Klonen, die das gesamte humane Genom überlappend zu 99 % abdecken (Krzywinski et al., 2004). Des Weiteren liegt das Wellcome Trust Sanger Institute 1Mb Klon-Set (The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK) mit ca. 3.400 BAC-Klonen vor, welches das humane Genom in ca. 1 Mb Abständen abdeckt (Fiegler et al., 2003; Fiegler et al., 2007). Die Auswahl geeigneter BAC-Klone erfolgt mit Hilfe der genomischen Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org>).

#### **B.3.1.1 Anzucht der BACs**

##### MATERIAL

- BAC-Klone in Glycerinkultur
  - Human 32k Re-Array BAC Library  
BACPAC Resources Center, Children's Hospital Oakland Research Institute, Oakland, CA, USA
  - Wellcome Trust Sanger Institute 1Mb Clone Set  
The Wellcome Trust Sanger Institute, Hinxton, Cambridge, UK



- Chloramphenicol, 2 mg (Sigma)  
Lösen in 2 ml Ethanol = Stammlösung 10 mg/ml
- Gewindepräparatglas (35 x 12 mm) mit Aluminiumschraubkappe (Schütt)
- Glycerin steril (Sigma)
- LB-Agarplatten mit Chloramphenicol (20 µg/ml)
 

LB Broth (USB)	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
Agar solidifying agent (Difco)	15 g
autoklavieren	
Chloramphenicol, 10 mg/ml (Sigma)	2 ml
Gut mischen, zu je 20 ml in Petrischalen (Greiner Bio One) abfüllen	
- LB-Flüssigmedium mit Chloramphenicol (20 µg/ml)
 

LB Broth (USB)	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
autoklavieren	
Chloramphenicol, 10 mg/ml (Sigma)	2 ml
- Schüttler (Innova™ 2000 Platform Shaker, New Brunswick Scientific GmbH)
- Brutschrank (Sanyo)
- Zentrifuge J2-21 (Beckman)

### DURCHFÜHRUNG

Die Bakterienklone der zur Verfügung stehenden BAC-Bibliotheken befinden sich in Glycerin-Erhaltungskulturen in 96er- bzw. 384er-Mikrotiterplatten, welche bei -80°C gelagert werden. Die Anzucht der benötigten Bakterien erfolgt zunächst auf LB-Agarplatten mit Chloramphenicol (20 µg/ml). Hierzu werden die Bakterien mit einer Impföse als Verdünnungsausstrich ausgestrichen und für 16 h bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Anschließend werden pro Klon 35 ml LB-Flüssigmedium mit Chloramphenicol (20 µg/ml) mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Kultur wird für 16 h bei 37°C im Schüttler inkubiert und das Wachstum möglichst vor Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase gestoppt. Hierbei erfolgt die Vermehrung der einzelnen transgenen Bakterienkolonien. Nach der Inkubationszeit werden die Kulturen in Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgt eine 15-minütige Zentrifugation bei 6.000 x g und 4°C. Der Überstand wird sodann verworfen und das Pellet kann bis zur Isolation der Plasmid-DNA bei -20°C gelagert werden.

Um ein ständiges Auftauen der BAC-Bibliothek zu verhindern, wird zusätzlich 1 ml jeder BAC-Kultur mit 1 ml sterilem Glycerin in einem Gewindepräparatglas bei -80°C eingefroren. Falls die Anzucht wiederholt werden muss, kann auf diese einzelnen Glycerinkulturen der BACs zurückgegriffen werden.

### B.3.1.2 Isolation der Plasmid-DNA

Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgt durch die alkalische Lyse der Zellen nach einem abgewandelten Protokoll von Birnboim/Doly (Birnboim und Doly, 1979). Die Bakterien werden durch Zugabe von NaOH-SDS (Lysepuffer) lysiert. NaOH denaturiert aufgrund der Alkalisierung chromosomale und Plasmid-DNA; das Detergens SDS denaturiert Proteine und die Zellmembranen. Die darauf folgende Neutralisierung des Lysats mit Kaliumacetat führt zu einer schnellen Renaturierung der Plasmid-DNA. Der größte Teil der chromosomalen DNA und der Proteine kann danach präzipitiert werden, ebenso das SDS, welches mit Kalium einen Komplex bildet und ausfällt. Die Plasmid-DNA befindet sich nach der Zentrifugation im Überstand und wird anschließend mit Alkohol gefällt und weiter aufgereinigt.

#### MATERIAL

- Cell Strainer, 40 µm (BD Falcon™)
- Chloroform/Isoamylalkohol Gemisch (24:1)
 

Chloroform (Merck)	96 ml
Isoamylalkohol (Merck)	4 ml
- Ethanol, 70 % (Merck)
- Glucose-Puffer
 

50 mM Glucose (Sigma)	6 g
10 mM EDTA (Merck)	3,73 g
25mM Tris (Merck)	3,03 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
mit HCl pH 8 einstellen	
- Heizblock, HBT 130 (Haep Labor Consult)
- Lysozym-Lösung, 5 mg/ml (Sigma)
- NaOH(0,2 M)-SDS(1 %)-Lösung (Lysepuffer)
 

NaOH, 1 M (Merck)	200 ml
SDS, 25 %	40 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
- Natriumacetat, 3 M
 

Natriumacetat (Merck)	246 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 600 ml
mit Eisessig pH 4,8 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
autoklavieren	
- Phase Lock Gel Heavy 2 ml (Eppendorf)
- Phenol:Chloroform:Isoamyl Alkohol 25:24:1, gesättigt mit 10 mM Tris, pH 8.0, 1mM EDTA (Sigma)
- Ribonuklease A-Lösung, 10 mg/ml (Roche)

- SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz), 25 %  
 SDS (Merck) 250 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 600 ml  
 bei 40°C lösen, auf RT abkühlen lassen  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml
- Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)  
 10 mM Tris (Merck) 1,2 g  
 1 mM EDTA (Merck) 0,37 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
 mit HCl pH 7,5 einstellen  
 autoklavieren
- Tris-EDTA-Saline-Puffer (TES-Puffer)  
 10 mM Tris (Merck) 1,21 g  
 10 mM NaCl (Merck) 0,58 g  
 1 mM EDTA (Merck) 0,37 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
 mit HCl pH 7,6 einstellen  
 autoklavieren
- Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus)
- Zentrifuge 17 RS (Heraeus Sepatech)
- Zentrifuge J2-21 (Beckman)

#### DURCHFÜHRUNG

Zunächst wird das aufgetaute Zellpellet in 5 ml TES-Puffer resuspendiert und für 10 min bei 6.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen werden vorsichtig in 2 ml Glucose-Puffer resuspendiert. Anschließend werden 2 ml der Lysozym-Lösung dazugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT erfolgt die Zugabe von 4 ml NaOH/SDS-Lösung (Lysepuffer). Nach kurzem Mischen werden sofort 3 ml eiskalte Natriumacetat-Lösung dazugegeben und die Probe mit dem Vortex gemischt. Danach folgt eine 15-minütige Inkubation auf Eis. Das Präzipitat aus Proteinen und chromosomaler DNA wird für 15 min bei 6.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit der sich darin befindenden Plasmid-DNA wird durch einen Nylonfilter (40 µm) in ein neues Gefäß überführt. Wenn die überführte Lösung noch trüb erscheint, wird ein zweites Mal für 15 min bei 6.000 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand erneut gefiltert. Die klare Lösung wird mit dem doppelten Volumen eiskalten Ethanols versetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Hierbei erfolgt die Fällung der Plasmid-DNA in der Lösung. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 16.000 x g. Der Überstand wird vorsichtig verworfen und das Pellet bei RT getrocknet. Das Pellet wird über Nacht bei 4°C im Kühlschrank in 1 ml TE-Puffer gelöst.

Am nächsten Tag erfolgt der RNase-Verdau. Dazu wird die Probe in zwei Reaktionsgefäße à 500 µl überführt und jeweils 5 µl RNase A dazugegeben. Um störende RNA zu verdauen, wird der Ansatz 1 h unter leichtem Schütteln bei 37°C im Heizblock inkubiert. In der Zwischenzeit werden die Phase Lock Gel Reaktionsgefäße für 3 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die Proben werden in die Phase Lock Gel Gefäße überführt, mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch ausgeschüttelt und für 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Danach werden die Proben nochmals mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch ausgeschüttelt und erneut für 5 min bei 16.000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase über dem Phase Lock Gel wird vorsichtig abgenommen, in ein neues Phase Lock Gel Gefäß überführt und mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch ausgeschüttelt. Um die Phenolreste zu beseitigen wird bei 16.000 x g für 5 min zentrifugiert. Anschließend wird die obere Phase wie oben beschrieben in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgt durch die Zugabe von 2 Volumen eiskalten Ethanol bei -20°C über Nacht. Am nächsten Tag folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 15.000 x g und 4°C. Der Überstand wird vorsichtig verworfen. Das Pellet wird mit 500 µl 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen und erneut 10 min bei 15.000 x g und 4°C zentrifugiert. Zuletzt wird das DNA-Pellet bei RT getrocknet, in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen und bei 4°C über Nacht gelöst.

### **B.3.1.3           Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA**

#### MATERIAL

- DNA Clean & Concentrator™-25 Aufreinigungs Kit (Zymo Research)
- Ethanol, absolut p.a. (Merck)
- Zentrifuge 5415D (Eppendorf)

#### DURCHFÜHRUNG

Die isolierte Plasmid-DNA wird mit Hilfe des DNA Clean & Concentrator™-25 Aufreinigungs Kits aufgereinigt und konzentriert. Dabei werden störende Salz- und Phenolreste entfernt.

Die in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöste Plasmid-DNA wird jeweils mit dem zweifachen Volumen DNA-Bindungspuffer versetzt und auf ein Säulchen überführt. Es wird für 30 sec bei

16.000 x g zentrifugiert und anschließend der Durchfluss verworfen. In zwei Waschschrritten wird die auf dem Säulchen gebundene DNA mit jeweils 200 µl Waschpuffer und anschließender Zentrifugation (30 sec) gereinigt. Zuletzt werden 32 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> auf das Säulchen gegeben und für 6 min bei RT inkubiert. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgt durch Zentrifugation (30 sec) bei 16.000 x g. Der Elutionsschritt wird wiederholt, um die noch auf dem Säulchen verbliebene gebundene DNA komplett zu eluieren. Im Anschluss an die Aufreinigung wird die Konzentration der Plasmid-DNA am Nano-Drop<sup>®</sup>-Spektrophotometer bestimmt (siehe B.2.1.2).

#### **B.3.1.4 Markierung der BACs durch *Nick Translation***

Mit Hilfe der *Nick Translation* wird die isolierte BAC-DNA indirekt mit Biotin-16-dUTP und Digoxigenin-11-dUTP markiert. Das Prinzip der *Nick Translation* beruht darauf, dass die Endonuklease DNase I in niedriger Konzentration und bei niedrigen Temperaturen statistisch verteilte Einzelstrangbrüche (*Nicks*) in die doppelsträngige DNA einführt. Die so entstehenden freien 3'-Enden werden von der *E. coli* DNA-Polymerase I verlängert, wobei Nukleotide mit Reportermolekülen wie Biotin oder Digoxigenin in den neuen Strang eingebaut werden können. Gleichzeitig wird der ursprüngliche DNA-Strang durch die 5'→3'-Exonukleaseaktivität desselben Enzyms vom 5'-Ende des Einzelstrangbruchs abgebaut. Dies führt zu einer Verschiebung der Bruchstelle (*Translation*). Da die Reaktion an beiden Strängen der DNA stattfindet, kommt es durch gegenüberliegende *Nicks* zu Doppelstrangbrüchen und damit zu einer Fragmentierung der DNA. Es entstehen markierte DNA-Fragmente, die auch aufgrund ihrer Größe für eine FISH gut geeignet sind (Rigby et al., 1977).

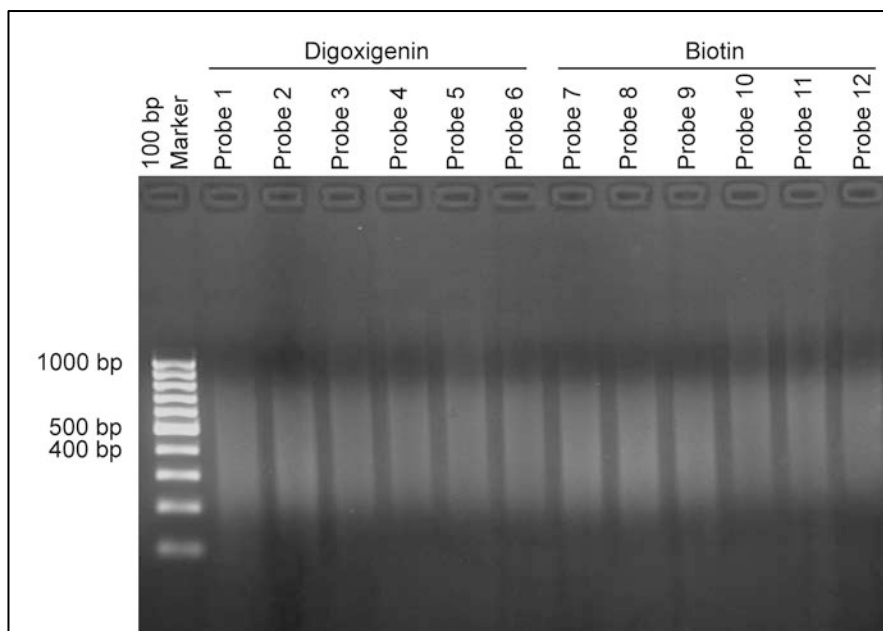
#### MATERIAL

- Biotin-Nick Translation Mix (Roche)
- DIG-Nick Translation Mix (Roche)
- PCR Maschine GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied Biosystems)

#### DURCHFÜHRUNG

Die *Nick Translation* wird in einem Volumen von 20 µl angesetzt. Um eine vorzeitige Enzymaktivität auszuschließen, werden alle Schritte auf Eis durchgeführt. Pro Ansatz

werden 1 µg zu markierende DNA, 4 µl des jeweiligen Translationsmixes (Biotin-Nick- oder Dig-Nick-Translationsmix) und H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> (ad 20 µl) eingesetzt. Die Markierung erfolgt für 45 min in der PCR-Maschine bei 15°C. Bei der niedrigen Inkubationstemperatur von 15°C soll ein Überverdau der DNA durch die DNase I vermieden werden. Um die Reaktion vorläufig zu beenden, werden die markierten Proben nach der *Nick Translation* auf Eis gestellt. Die Größe der markierten DNA-Fragmente wird mittels Gelelektrophorese (Abb. 12) bestimmt. Die ideale Sondengröße liegt zwischen 400 bp und 1000 bp. Ist die richtige Fragmentgröße erreicht, wird die Enzymreaktion durch Deaktivierung der Enzyme gestoppt. Hierzu werden die Ansätze für 10 min bei 65°C in der PCR-Maschine inkubiert. Bei zu großen DNA-Fragmenten werden die Proben bei 15°C nachinkubiert.



**Abbildung 12: Bestimmung der Sondengröße nach der *Nick Translation* mittels Gelelektrophorese**

Zur Abschätzung der Fragmentlängen werden die DNA-Sonden mit einem Längenstandard in einem Agarosegel aufgetrennt. Der Hauptanteil der DNA-Fragmente aller aufgetragenen BAC-Sonden (Proben 1-6 Digoxigenin-markiert und Proben 7-12 Biotin-markiert) liegt bei der Idealgröße von 400-1000 bp.

### B.3.1.5 Fällung und Denaturierung der BAC-Sonde

Die Digoxigenin- und Biotin-markierten BAC-Sonden werden paarweise in Gegenwart von humaner Cot-1 DNA und Heringssperma-DNA gefällt. Cot-1 DNA wird aus humaner Plazenta-DNA gewonnen und enthält hochrepetitive DNA-Sequenzen, die in Abhängigkeit von der Reassoziationszeit nach Denaturierung der DNA angereichert werden. Die

Prähybridisierung der Sonde mit humaner Cot-1 DNA dient dem Abblocken von repetitiven Sequenzen und führt zu einer Reduzierung unspezifischer Bindungen. Heringssperma-DNA erhöht als zusätzlich eingesetzte DNA, die kaum bzw. nicht homolog zu humaner DNA ist, die DNA-Gesamtkonzentration. Die dadurch veränderte Reaktionskinetik führt dann zu einer schneller ablaufenden Reaktion.

### MATERIAL

- Ethanol, -20°C (Merck)
- Heringssperma-DNA, 10 mg/ml (Invitrogen)
- Heizblock, HBT 130 (Haep Labor Consult)
- Schüttelblock Thermomixer Compact (Eppendorf)
- Humane Cot-1 DNA, 1 µg/µl (Roche)
- Hybridisierungsmix: Mastermix 1.0 (MM 1.0)
 

Formamid deionisiert (AppliChem)	5 ml
Dextransulfat (Serva)	1 g
20 x SSC	1 ml
mischen, einige Stunden auf 70°C erwärmen, um das Dextransulfat zu lösen	
pH 7,0 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 7 ml
autoklavieren	
- Zentrifuge 17 RS (Heraeus Sepatech)
- Natriumacetat, 3 M
 

Natriumacetat (Merck)	246 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 600 ml
mit Eisessig pH 4,8 einstellen	
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
autoklavieren	
- 20 x SSC
 

3 M NaCl (Merck)	175,3 g
0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck)	88,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
mit HCl pH 7 einstellen	

### DURCHFÜHRUNG

Für die Fällung der Sonden werden je 1 µg Digoxigenin- und Biotin-markierte DNA mit 60 µg Cot-1 DNA und 100 µg Heringssperma-DNA gemischt. Die DNA wird mit 1/10 Volumen Natriumacetat und 2,5 Volumen absolutem Ethanol (-20°C) versetzt und über Nacht bei -20°C präzipitiert. Die ausgefällte DNA wird bei 15.000 x g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Pellet mit 500 µl 70%igem eiskalten Ethanol gewaschen und erneut 10 min bei 15.000 x g und 4°C zentrifugiert.

Das bei RT getrocknete DNA-Pellet wird in 14 µl MM 1.0 und 6 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgenommen und für 2 h bei 37°C im Schüttler gelöst. Die Denaturierung erfolgt für 7 min bei 76°C im Heizblock. Danach werden die Proben für 45 bis 90 min bei 37°C ohne Schütteln bis zur Hybridisierung vorinkubiert.

### B.3.2 Testhybridisierung auf Metaphasen

Bevor genomische Aberrationen an Tumorgewebeschnitten überprüft werden können, erfolgt eine Testhybridisierung der BAC-Sonden auf Metaphasen eines gesunden Spenders. Hierbei wird die Spezifität der BAC-Sonden überprüft.

#### B.3.2.1 Denaturierung der Metaphasepräparate

##### MATERIAL

- Ethanol, absolut p.a. (Merck)
- Ethanolreihe: 70 % (-20°C), 90 % (4°C), 100 % (4°C) (Merck)
- Formamid 70 %/2 x SSC  
 Formamid deionisiert (AppliChem) 70 ml  
 20 x SSC 10 ml  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 20 ml  
 mit HCl pH 7,0 einstellen
- Heizplatte (LGH)
- Metaphase Präparate von Vysis (Abbott Molecular)
- 20 x SSC  
 3 M NaCl (Merck) 175,3 g  
 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) 88,2 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
 mit HCl pH 7 einstellen
- Wasserbad (GFL)

##### DURCHFÜHRUNG

Für die Denaturierung der Metaphasepräparate wird 70%iges Formamid/2 x SSC in einer Glasküvette auf 72°C erwärmt. Es sollten nicht mehr als 5 OT gleichzeitig denaturiert werden. Die Denaturierungszeit der Metaphasepräparate der Firma Vysis beträgt 2 min. Um die Denaturierung zu stoppen, werden die OT in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) für je 2 min dehydriert. Vor Auftragen der Sondenlösung werden die OT 5 min auf einer 37°C warmen Heizplatte getrocknet.



**B.3.2.2 Testhybridisierung**MATERIAL

- Deckgläser rund, Ø 10 mm (Superior)
- Fixogum (Marabu)
- Wasserbad (GFL)

DURCHFÜHRUNG

Nach erfolgter Prähybridisierung werden 2,5 µl Sondenlösung pro Hybridisierungsbereich auf die denaturierten Metaphasepräparate aufgetragen und mit Deckgläsern luftblasenfrei abgedeckt. Die Deckgläser werden mit Fixogum abgedichtet, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach Trocknen des Klebers werden die Objektträger für 48-72 h in einer Metallbox bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

**B.3.2.3 Waschen und Detektion**MATERIAL

- Antikörper
  - Anti-Digoxigenin-Cy3, 1,7 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)  
4 µl Antikörperlösung mit 496 µl PNM verdünnen
  - Biotinyliertes-anti-Streptavidin, 0,5 mg/ml (Vector)  
10 µl Antikörperlösung mit 240 µl PNM verdünnen
  - Streptavidin-DTAF, 1,54 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)  
10 µl Antikörperlösung mit 240 µl PNM verdünnen
  - Maus-anti-Ratte-Cy3, 1,4 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)  
10 µl Antikörperlösung mit 240 µl PNM verdünnen
  - Ratte-anti-Maus-Cy3, 0,9 mg/ml (Jackson ImmunoResearch)  
10 µl Antikörperlösung mit 240 µl PNM verdünnen
- DAPI/Vectashield  
4,6-Diamidino-2-phenylindol-2-HCl, 1 mg/ml (DAPI, Sigma) 1 µl  
Vectashield Eindeckmedium (Vector) 999 µl
- Deckgläser, 24 x 50 mm (IDL)
- Feuchte Kammer
- Formamid 50 %/2 x SSC, pH 7  
Formamid deionisiert (AppliChem) 125 ml  
20 x SSC 25 ml  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 100 ml
- Lichtschutzbeutel (NeoLab)

- PN-Puffer (Phosphat-Nonidet P40-Puffer)  
Lösung 1:  
 0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck) 142,39 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 8 l
- Lösung 2:  
 0,1 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck) 6,9 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 500 ml  
 Lösung A mit Lösung B auf pH 8 einstellen  
 0,1 % Nonidet P-40 (Fluka) zugeben
- Plastikfolie, auf Objektträgergröße zurechtgeschnitten
- PNM-Puffer (PN-Magermilch-Puffer)  
 Magermilchpulver (Biorad) 25 g  
 Natriumazid (Merck) 0,1  
 PN-Puffer ad 500 ml  
 über Nacht bei 37°C rühren, einige Stunden bei RT stehen lassen, steril filtrieren (0,45 µm-Filter)
- Quadriperm Zellkulturschalen - Slide Tray Plates (PAA)
- 20 x SSC  
 3 M NaCl (Merck) 175,3 g  
 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck) 88,2 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
 mit HCl pH 7 einstellen
- 2 x SSC  
 20 x SSC 40 ml  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 360 ml
- Wärmeschrank (Memmert)
- Wasserbad (Haake)

### DURCHFÜHRUNG

Nach der Hybridisierung wird der hybridisierte Bereich mit einem Diamantschreiber markiert und das Fixogum vorsichtig mit der Pinzette entfernt. Zur Entfernung der Deckgläser werden die Objektträger für ca. 5 min in 2 x SSC gestellt. Danach werden überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden in mehreren Schritten von den OT entfernt. Alle Waschschriffe werden bei 42°C durchgeführt. Zunächst werden die OT dreimal für je 15 min in 50%igem Formamid/2 x SSC gewaschen. Um Formamidreste in den folgenden Waschlösungen zu vermeiden, werden die Präparate kurz in 2 x SSC gespült. Es folgt ein je 15-minütiger Waschschriff in 2 x SSC und in PN-Puffer. Der letzte Waschschriff findet nochmals für 15 min in PN Puffer bei RT statt. Während des Waschens werden die verdünnten Antikörperlösungen im Verhältnis 1:1 gemischt (Tabelle 10) und bis zum Gebrauch bei 4°C unter Lichtschutz aufbewahrt. Außerdem wird eine feuchte Kammer bei 37°C vorgewärmt.

**Tabelle 10: Antikörperschichten für die Detektion der Metaphase-FISH**

<b>Antikörperschicht</b>	<b>1:1 verdünnte Antikörperlösungen</b>
Schicht 1	Anti-Digoxigenin-Cy3 + Streptavidin-DTAF
Schicht 2	Ratte-anti-Maus-Cy3 + Biotinyliertes-anti-Streptavidin
Schicht 3	Maus-anti-Ratte-Cy3 + Streptavidin-DTAF

Anschließend erfolgt die Detektion der hybridisierten Sonden mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern, die spezifisch an die BAC-Sonden gekoppelten Haptene Biotin oder Digoxigenin binden. Mit der zweiten und dritten Antikörperschicht wird eine Verstärkung der Fluoreszenzsignale erreicht.

Um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper abzublocken, werden die OT zuerst mit 100 µl PNM überschichtet, mit einer zurechtgeschnittenen Plastikfolie bedeckt und für 20 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Blocken werden 80 µl der 1. Antikörperschicht aufgetragen und die abgedeckten OT für 20 min bei 37°C inkubiert. Um überschüssige Antikörperlösung zu entfernen, werden die OT im Anschluss zweimal für 4 min in PN-Puffer im Dunkeln gewaschen. Der Auftrag der 2. und 3. Antikörperschicht erfolgt wie oben beschrieben. Nachdem die Antikörper der letzten Schicht abgewaschen sind, werden die OT 3 x kurz in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gespült, an der Luft getrocknet und mit DAPI/Vectashield eingedeckt. Die Präparate werden bis zur Auswertung am Mikroskop in Quadriperm-Schalen in Lichtschutzbeuteln aufbewahrt.

### **B.3.3 Interphase FISH auf Tumor-Gewebeschnitten**

Um Gewebeschnitte aus Formalin-fixiertem Paraffingewebe für eine FISH verwenden zu können, müssen sie zunächst entparaffiniert und mit Pronase E verdaut werden. Hierdurch werden die Zellen für die Sonde zugänglich gemacht. Die Gewebeschnitte wurden aus Tumormaterial der Chernobyl Tissue Bank am Imperial College London angefertigt.

#### **B.3.3.1 Entparaffinierung der Gewebeschnitte**

##### MATERIAL

- Ethanol, 100 % & 70 % (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- OT mit Formalin-fixiertem Paraffingewebe

- PBS-Puffer, 1x (PBS Dulbecco ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ), Instamed 9,55 g / l (Biochrom) ad 10 l  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$   
autoklavieren
- Xylol (Merck)

### DURCHFÜHRUNG

Die Entparaffinierung der FFPE (*Formalin-fixed Paraffin-embedded*) Tumor-Gewebeschnitte erfolgt unter einem Abzug für jeweils zweimal 20 min in Xylol. Um Xylol-Reste zu entfernen, werden die OT kurz in Isopropanol geschwenkt. Anschließend werden die OT für 5 min in Isopropanol gestellt. Darauf folgt eine Inkubationszeit von jeweils 5 min in 100%igem und 70%igem Ethanol. Zuletzt werden die OT kurz in 1 x PBS gewaschen. Wenn die Gewebeschnitte nicht sofort weiterbehandelt werden, können sie getrocknet und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren werden.

### **B.3.3.2 Hitzebehandlung und Pronase E Verdau der Gewebeschnitte**

#### MATERIAL

- Citratpuffer, 20 mM  
Stammlösung A: 0,1 M Citronensäure (Merck) 3,84 g  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  ad 200 ml  
Stammlösung B: 0,1 M Natriumcitratdihydrat (Merck) 17,65 g  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  ad 600 ml  
  
Stammlösung A 18 ml  
Stammlösung B 82 ml  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  ad 480 ml  
mit NaOH pH 6,0 einstellen  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  ad 480 ml
- Glycin-Lösung  
Glycin (Sigma) 200 mg  
1 x PBS 100 ml
- Mikroskop (Zeiss Axioplan)
- Paraformaldehyd/Sörensenpuffer  
Paraformaldehyd, 37 % (Merck) 10 ml  
Sörensenpuffer 80 ml
- PBS-Puffer, 1x (PBS Dulbecco ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ), Instamed 9,55 g / l (Biochrom) ad 10 l  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$   
autoklavieren
- Pronase E-Lösung  
Pronase (Merck) 50 mg  
1 x PBS 100 ml

- Sörensenpuffer  
Kaliumdihydrogenphosphatlösung (Merck) 28,8 ml  
Dinatriumhydrogenphosphatlösung (Merck) 61,2 ml
- Wasserbad, 37°C (GFL)

### DURCHFÜHRUNG

Die Schnitte werden für 15 min in Citratpuffer gekocht, wodurch die Permeabilität der Zellen erhöht wird. Dies ermöglicht die Hybridisierung der Sonden an die DNA. Um ein Ablösen der Gewebeschnitte durch zu starke Blasenbildung beim Erhitzen zu verhindern, sollte der Citratpuffer nur leicht köcheln. Danach werden die OT kurz in 1x PBS gewaschen.

Im Anschluss werden die Gewebeschnitte für 3 min bei 37°C mit Pronase E verdaut. Hierbei werden die Zellmembranen perforiert. Um den Verdau zu stoppen, werden die OT in 1 x PBS gewaschen. Unter dem Mikroskop wird der Zustand der Schnitte kontrolliert und gegebenenfalls werden die Schnitte erneut mit Pronase E behandelt. Die notwendige Verdauzeit hängt von der Beschaffenheit und Dicke eines Gewebeschnittes ab. Um die Reaktion endgültig zu stoppen, werden die Präparate für 5 min in Glycin gestellt und anschließend kurz in 1 x PBS gespült. Fixiert werden die Schnitte für 5 min in einem Paraformaldehyd/Sörensenpuffer-Gemisch. Zuletzt erfolgt ein abschließender Waschschrift in 1 x PBS für 5 min. Die Gewebeschnitte werden an der Luft oder mit Stickstoff getrocknet und können bei -20°C gelagert werden.

#### **B.3.3.3 Denaturierung der Gewebeschnitte**

Die Denaturierung der Gewebeschnitte erfolgt wie unter B.3.2.1 beschrieben. Die Denaturierungszeit beträgt jedoch 12-15 min.

#### **B.3.3.4 Hybridisierung**

Die Hybridisierung der Gewebeschnitte wird wie unter B.3.2.2 beschrieben durchgeführt. Es werden je nach Größe des Gewebeschnittes 6-14 µl Sondenlösung aufgetragen.

### B.3.3.5 Waschen und Detektion

Das Waschen und die Detektion der Gewebeschnitte erfolgt mit einigen Abweichungen wie unter B.3.2.3 beschrieben. Bei der Detektion hybridisierter Gewebeschnitte wird nach jeder Antikörperschicht und dem anschließenden Waschen für 10 min mit 100 µl PNM geblockt. Dies führt zu einer Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz. Nach dem Blocken wird ohne erneutes Waschen jeweils die nächste der fünf Antikörperschichten aufgetragen (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Antikörperschichten für die Detektion der Interphase-FISH**

Antikörperschicht	1:1 verdünnte Antikörperlösungen
Schicht 1	Anti-Digoxigenin-Cy3 + Streptavidin-DTAF
Schicht 2	Ratte-anti-Maus-Cy3 + Biotinyliertes-anti-Streptavidin
Schicht 3	Maus-anti-Ratte-Cy3 + Streptavidin-DTAF
Schicht 4	Ratte-anti-Maus-Cy3 + Biotinyliertes-anti-Streptavidin
Schicht 5	Maus-anti-Ratte-Cy3 + Streptavidin-DTAF

### B.3.4 Auswertung der FISH

#### B.3.4.1 Auswertung der Testhybridisierung

An einem Fluoreszenzmikroskop mit CCD (*Charge Coupled Device*)-Kamera (Zeiss) werden mindestens zehn Metaphasen jeder Testhybridisierung aufgenommen. Zusätzlich erfolgt die Aufnahme einiger intakter Interphase-Zellkerne. Anschließend werden die Bilder mit der Software ISIS (Metasystems) ausgewertet. Es werden Karyogramme gelegt und die Lokalisation der hybridisierten BAC-Klone überprüft. Wenn die BACs eine spezifische chromosomale Bindung ohne intra- oder interchromosomale Kreuzhybridisierungen zeigen, erfolgt im Anschluss die Hybridisierung der Gewebeschnitte.

#### B.3.4.2 Auswertung der Gewebe-FISH

In einem Gewebeschnitt können Fluoreszenzsignale übereinanderliegender Zellen nur schwer einer bestimmten Zelle zugeordnet werden. Um dieses Problem zu lösen, erfolgt die Aufnahme der Gewebe-FISH an einem Epifluoreszenzmikroskop mit strukturierter Beleuchtung. Zu diesem Zweck enthält das Mikroskop ein zusätzliches Einschub-Modul für den Fluoreszenzstrahlengang – das ApoTome (Zeiss). Im ApoTome-Modus wird eine Gitterstruktur in die Ebene der Leuchtblende des Auflichtstrahlengangs

projiziert. Die Gitterstruktur wird in der Fokusebene scharf abgebildet und bewegt sich in drei definierten Schritten lateral in der Probe. Eine CCD-Kamera nimmt an jeder Position des Gitters ein Bild auf, wobei die Bildanteile oberhalb und unterhalb der Fokusebene jeweils herausgerechnet werden. Die drei Bilder pro Ebene werden dann zu einem Ergebnisbild verrechnet. So werden quer durch das Gewebepräparat virtuelle optische Schnitte in z-Richtung erzeugt und als Einzelbilder aufgenommen. Mit der entsprechenden Computersoftware (Axiovision, Zeiss) können diese Aufnahmen zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden. Auf diese Weise entstehen Bildstapel, die einen dreidimensionalen Blick durch den Gewebeschnitt und eine eindeutige Zuordnung der Fluoreszenzsignale zu den entsprechenden Zellkernen ermöglichen. Es werden mindestens zehn Bildstapel pro Gewebeschnitt aufgenommen.

## B.4 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) ist eine Amplifizierungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion beruht und zusätzlich eine Quantifizierung der gebildeten Amplifikat-Menge ermöglicht. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Fluoreszenz am Ende oder während eines PCR-Zyklus. Die Fluoreszenz steigt dabei proportional mit der Amplifikat-Menge an. Es existieren verschiedene Nachweismethoden, bei denen jeweils ein fluoreszierender Reporterfarbstoff zum Einsatz kommt, der unspezifisch oder spezifisch mit der Ziel-DNA interagiert. Als Maß für die Quantifizierung des Amplifikats werden dabei immer die so genannten  $C_T$  (*Threshold Cycle*)-Werte herangezogen, die derjenigen Anzahl an PCR-Zyklen entsprechen, bei der die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz und damit einen bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwert signifikant übersteigt. Die  $C_T$ -Werte werden während der exponentiell verlaufenden Amplifikat-Zunahme (lineare Log-Phase) ermittelt und korrelieren mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden Nukleinsäure-Sequenz. In der vorliegenden Arbeit kommt die qRT-PCR zur relativen Quantifizierung der mRNA-Expression ausgewählter Kandidatengene zum Einsatz.

### B.4.1 RNA-Isolation

#### B.4.1.1 RNA-Isolation aus Gefriergewebe

Das von der Chernobyl Tissue Bank erhaltene Tumormaterial lag in Form von Gefriergewebe vor. Die Isolation der RNA aus Tumor- und Normalgewebe wurde im Rahmen des EU-Projektes GENRISK-T am Imperial College London durchgeführt.

#### MATERIAL

- Ethanol, 100 % (Merck)
- RNase-Free DNase Set (Qiagen)
  - RNase-freie DNaseI
  - RNase-freies  $H_2O_{bidest}$
  - RNase-freier RDD-Puffer



- RNeasy®Mini Kit (Qiagen)  
Proteinase K  
RLT-Puffer (Lysepuffer), 1 ml RLT-Puffer wird mit 10µl β-Mercaptoethanol (14,3 M) versetzt  
RW1-Puffer  
RNase- freies H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
RNeasy Mini Spin Columns  
RPE-Puffer, mit 4 Volumen Ethanol (100 %) versetzt
- Stainless steel beads, 5 mm Durchmesser (Qiagen)
- TissueLyser II (Qiagen)

### DURCHFÜHRUNG

Für die RNA-Isolation wird das Gefriergewebe zusammen mit einer 5 mm Stahlkugel in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 500 µl Lysepuffers RLT wird die Gewebeprobe 2 min bei 30 Hz im TissueLyser homogenisiert. 320 µl des Lysats werden für die RNA-Isolation in ein neues Reaktionsgefäß überführt, anschließend mit 150 µl RLT-Puffer, 590 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O und 10 µl Proteinase K versetzt. Die Probe wird gemischt und für 10 min bei 56°C inkubiert. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 13.000 x g wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 530 µl Ethanol (100 %) versetzt. 550 µl der Probe werden auf ein RNeasy Mini Spin Säulchen überführt. Nach 15-sekündiger Zentrifugation (8.000 x g) wird der Durchfluss verworfen. Dieser Schritt wird mit dem Rest der Probe zweifach wiederholt. Danach werden 350 µl RW1-Puffer auf das Säulchen gegeben und für 15 sec (8.000 x g) zentrifugiert. Der Durchfluss wird anschließend verworfen. Für die DNase-Lösung werden 840 µl RDD-Puffer und 120 µl DNase-Stocklösung vorsichtig vermischt. Nach Zugabe von 80 µl DNase-Lösung wird die Probe 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss werden 350 µl RW1-Puffer auf das Säulchen gegeben. Nach 15-sekündiger Zentrifugation (8.000 x g) wird der Durchfluss verworfen und das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Als Nächstes werden 500 µl RPE-Puffer auf das Säulchen gegeben, 15 sec (8.000 x g) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Anschließend erfolgt die erneute Zugabe von 500 µl RPE-Puffer. Um die Membran zu trocknen, wird das Säulchen danach 2 min (8.000 x g) zentrifugiert. Das Säulchen wird sodann in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und 1 min bei (8.000 x g) zentrifugiert. Danach wird das Säulchen erneut in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und 50 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O dazugegeben. Die RNA wird dann nach 1-minütiger Inkubation in einem 1-minütigen Zentrifugationsschritt eluiert.

### B.4.1.2 Konzentrationsmessung der RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der isolierten RNA erfolgt wie in Kapitel B.2.1.2 beschrieben mit dem NanoDrop®-Spektrophotometer. Die Reinheit der gemessenen DNA wird auch hier durch die Verhältnisse der Absorptionen bei 260/280 nm und 260/230 nm bestimmt. Im Gegensatz zu DNA sollte der 260/280-Wert bei RNA um den Wert 2 liegen, was auf den Unterschied in der Basenzusammensetzung (Uracil statt Thymin) zurückzuführen ist.

### B.4.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

Mit Hilfe von RNA-abhängigen DNA-Polymerasen (reverse Transkriptasen) wird einzelsträngige RNA in einer reversen Transkription zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgewandelt. In dieser Arbeit wird das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* Kit der Firma Applied Biosystems verwendet, welches eine Abwandlung der Mo-MuLV-reversen-Transkriptase (Moloney-Maus-Leukämie-Virus) beinhaltet.

#### MATERIAL

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)
- PCR Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

#### DURCHFÜHRUNG

In die Reverse Transkription werden pro Ansatz 1 µg RNA eingesetzt. Auf Eis werden 2 µl 10 x RT Puffer, 0,8 µl 25 x dNTP Mix (100mM), 2 µl 10 x RT Random Primer, 1 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase, 1 µg RNA und RNase-freies H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 20 µl zusammenpipettiert. Vor der Inkubation werden die Ansätze gemischt und abzentrifugiert.

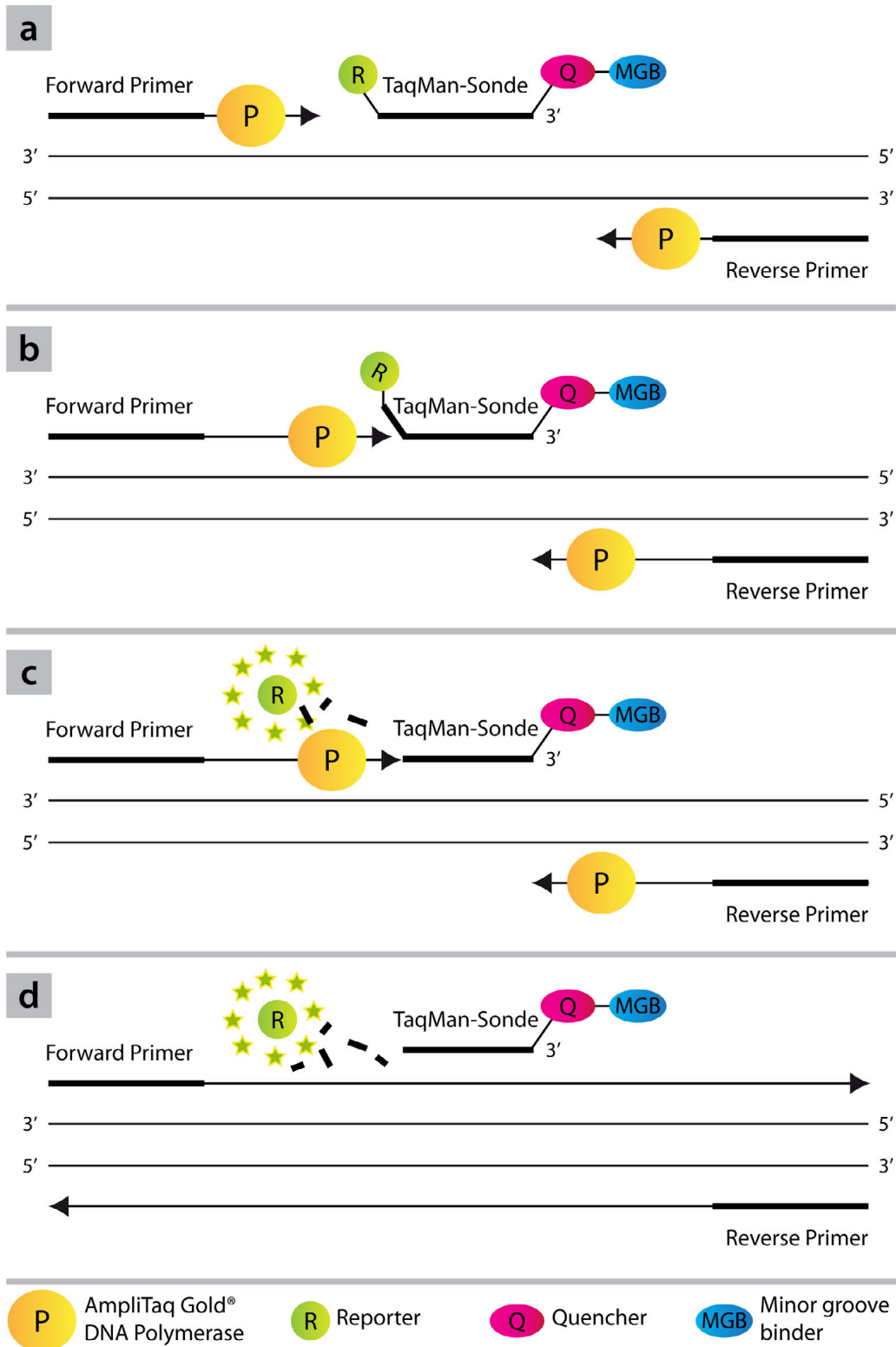
Die RT-PCR wird folgendermaßen durchgeführt:

Schritt 1	25°C für 10 min
Schritt 2	37°C für 120 min
Schritt 3	85°C für 5 sec
Schritt 4	4°C ∞

Die cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

### B.4.3 TaqMan®-qRT-PCR

Für die Bestimmung der relativen mRNA-Expression mittels qRT-PCR wird das TaqMan®-System (Applied Biosystems) mit sogenannten FAM™-dye-TaqMan®-MGB-Sonden verwendet. (Abb. 13) Dabei handelt es sich um kurze DNA-Oligonukleotide, welche am 5'-Ende mit dem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff FAM™ (6-Carboxyfluorescein) gekoppelt sind. Am 3'-Ende besitzen die Sonden einen nicht-fluoreszierenden *Quencher*, der eine präzisere Messung des emittierenden Reporterfarbstoffes erlaubt. Zusätzlich ist am 3'-Ende ein *minor groove binder* lokalisiert, der zu einer Schmelztemperatur-Erhöhung der Sonden führt und daher den Einsatz kürzerer Sonden ermöglicht (Afonina et al., 1997; Kutuyavin et al., 1997). Die Wirkungsweise der TaqMan®-Sonden beruht auf dem so genannten *Förster resonance energy transfer*-Prinzip (FRET), bei dem ein Donor-Fluorochrom (Reporter) einen Teil seiner Energie an ein Akzeptor-Fluorochrom (*Quencher*) abgibt (Förster, 1948). Bei intakter Sonde befinden sich Reporter und *Quencher* in räumlicher Nähe, weshalb durch das Abfangen der Reporterfluoreszenz des *Quenchers* keine Fluoreszenz messbar ist. Die TaqMan®-Gensonde wird zusätzlich zu den beiden genspezifischen Primern eingesetzt und bindet zum Zeitpunkt des *Primer Annealings* an eine DNA-Sequenz zwischen den Primern (Abb. 13 a-b). In der Elongationsphase synthetisiert die Taq-Polymerase von den Primern ausgehend den DNA-Neustrang und bewirkt durch ihre 5'→3'-Exonukleaseaktivität den Abbau der Sonde. Dadurch kommt es zu einer räumlichen Trennung von Reporter und *Quencher*, weshalb der FRET-Effekt abnimmt und messbare Fluoreszenz definierter Wellenlänge vom Reporter emittiert wird (Abb. 13 c-d). Auf diese Weise erhöht sich mit jedem Zyklus die Gesamt-Fluoreszenz, deren Signalstärke direkt proportional zur ursprünglichen Template-Menge ist. Für die Normalisierung des Reporter-Fluoreszenzsignals ist der Fluoreszenzfarbstoff ROX (Carboxy-X-rhodamine - Passive Referenz) in definierter Menge im verwendeten TaqMan®-Mastermix enthalten. Als endogene Kontrolle wurde das nicht regulierte Haushaltsgen  $\beta$ -Actin (Referenzgen - aktive Referenz) verwendet. Hierdurch kann die gemessene Ziel-cDNA normalisiert werden, was Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten cDNA ausgleicht.



**Abbildung 13: Schematische Darstellung des Prinzips von TaqMan<sup>®</sup>-Sonden**

(a) Polymerisation – Die TaqMan<sup>®</sup>-Sonde ist am 5'-Ende mit einem Reporter (FAM<sup>™</sup>) und am 3'-Ende mit einem Quencher sowie einem *minor groove binder* gekoppelt. Solange sich Reporter und Quencher in räumlicher Nähe befinden, ist aufgrund des FRET-Effektes keine Fluoreszenz messbar. (b) Strangverdrängung – Während der Elongationsphase trifft die Taq-Polymerase auf die Sonde und führt (c) durch ihre 5'-3'-Exonucleolyseaktivität zur Abspaltung des Reporters. Durch die räumliche Trennung von Reporter und Quencher nimmt der FRET-Effekt ab und die Fluoreszenz wird messbar. (d) Die Polymerisation wird abgeschlossen. (Applied Biosystems)

MATERIAL

- 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)
- Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems)
- TaqMan® Gene Expression Assays - jeweils aus Reverse-Primer, Forward-Primer und FAM-markierter MGB-Sonde bestehend (Applied Biosystems)
  - Assay ACTB: Hs99999903\_m1
  - Assay BMPR1B: Hs00176144\_m1
  - Assay CLIP2: Hs00185593\_m1
  - Assay CLDN3: Hs00265816\_s1
  - Assay CLDN4: Hs00533616\_s1
  - Assay LIMK1: Hs00242731\_m1
  - Assay PDE6D: Hs00267467\_m1
  - Assay PDLIM5: Hs00179051\_m1
  - Assay PMS2L2: Hs03989376\_mH
  - Assay PMS2L3: Hs00389106\_m1
  - Assay PMS2L11: Hs03653709\_mH
  - Assay PTMA: Hs02339492\_g1
  - Assay RFC2: Hs00267983\_m1
  - Assay SLITRK5: Hs00397559\_m1
  - Assay SRM: Hs00162307\_m1
  - Assay STAG3L3: Hs00219216\_m1
  - Assay TAF12: Hs00194578\_m1
  - Assay TP73: Hs01065727\_m1
  - Assay UNC5C: Hs00186620\_m1
  - Assay YTHDF2: Hs00212357\_m1
- TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG (Applied Biosystems)  
 AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase  
 dNTPs mit dUTP  
 Passive Referenz  
 Optimierte Puffer-Reagenzien
- Thermo-Fast 96 Detection Plate (Applied Biosystems)

DURCHFÜHRUNG

Zu Beginn wird mit der *Sequence Detection System (SDS)* Software von Applied Biosystems ein so genanntes *Plate Setup* erstellt, nach dessen Schema die qRT-PCR-Reagenzien in eine 96er-Mikrotiterplatte pipettiert werden. Für eine genauere Quantifizierung wird jede Probe in Duplikaten angesetzt. Pro Platte wird zusätzlich eine Negativkontrolle (*no template control* - H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>) angesetzt. Pro Ansatz werden 7 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, 10 µl TaqMan® Universal PCR Mastermix und 1 µl des jeweiligen TaqMan® Gene Expression Assays in die Reaktion eingesetzt. Mit diesen Komponenten wird ein Mastermix hergestellt, da sich schon kleinste Pipettier-Ungenauigkeiten negativ auf die Quantifizierung auswirken. 18 µl des Mastermix werden in der entsprechenden Position der 96er-Mikrotiterplatte vorgelegt. Im Anschluss werden 2 µl der Template-cDNA

hinzupipettiert. Die Platte wird mit einer *Optical Adhesive Covers*-Folie möglichst blasenfrei versiegelt, kurz gevortext und abzentrifugiert. Die Platte wird im Thermocycler positioniert und das Laufprogramm über die SDS-Software gestartet.

Die TaqMan<sup>®</sup>-qRT-PCR wird folgendermaßen durchgeführt:

Schritt 1	50°C für 2 min
Schritt 2	95°C für 10 min
Schritt 3	95°C für 15 sec
Schritt 4	60°C für 1 min
Schritt 5	Schritte 3-4 werden in 39 Zyklen wiederholt (Insgesamt 40 Zyklen)

#### B.4.4 Auswertung der TaqMan<sup>®</sup>-qRT-PCR

Da es in dieser Arbeit immer um die Untersuchung quantitativer Expressionsunterschiede zwischen zwei Gruppen (z.B. Tumor- versus Normalgewebe, exponierte versus nicht exponierte Patienten) geht, wird für die Auswertung der qRT-PCR-Daten die so genannte  $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) verwendet, die eine relative Quantifizierung der Expression ermöglicht. Als Maß für die relative Quantifizierung des Amplifikats werden die so genannten  $C_T$  (*Threshold Cycle*)-Werte herangezogen, die derjenigen Anzahl an PCR-Zyklen entsprechen, bei der die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz und damit einen bestimmten Fluoreszenz-Schwellenwert signifikant übersteigt. Die  $C_T$ -Werte werden während der exponentiell verlaufenden Amplifikat-Zunahme (lineare Log-Phase) ermittelt und korrelieren mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden Nukleinsäuren-Sequenz. Je niedriger der  $C_T$ -Wert ist, desto mehr Kopien des Zielgens sind zu Beginn in der Probe enthalten.

In einem ersten Schritt werden die  $C_T$ -Werte aller Duplikate gemittelt. Danach wird der  $\Delta C_T$ -Wert gebildet, indem der  $C_T$ -Wert des nicht regulierten Referenzgens (hier: Haushaltsgen  $\beta$ -Actin) vom  $C_T$ -Wert des Zielgens subtrahiert wird (endogene Normalisierung).

$$\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$$

Aus den  $\Delta C_T$ -Wert zweier zu vergleichender Gruppen A (z.B. Tumorgewebe) und B (z.B. Normalgewebe) wird anschließend der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert gebildet.

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Gruppe A} - \Delta C_T \text{ Gruppe B}$$

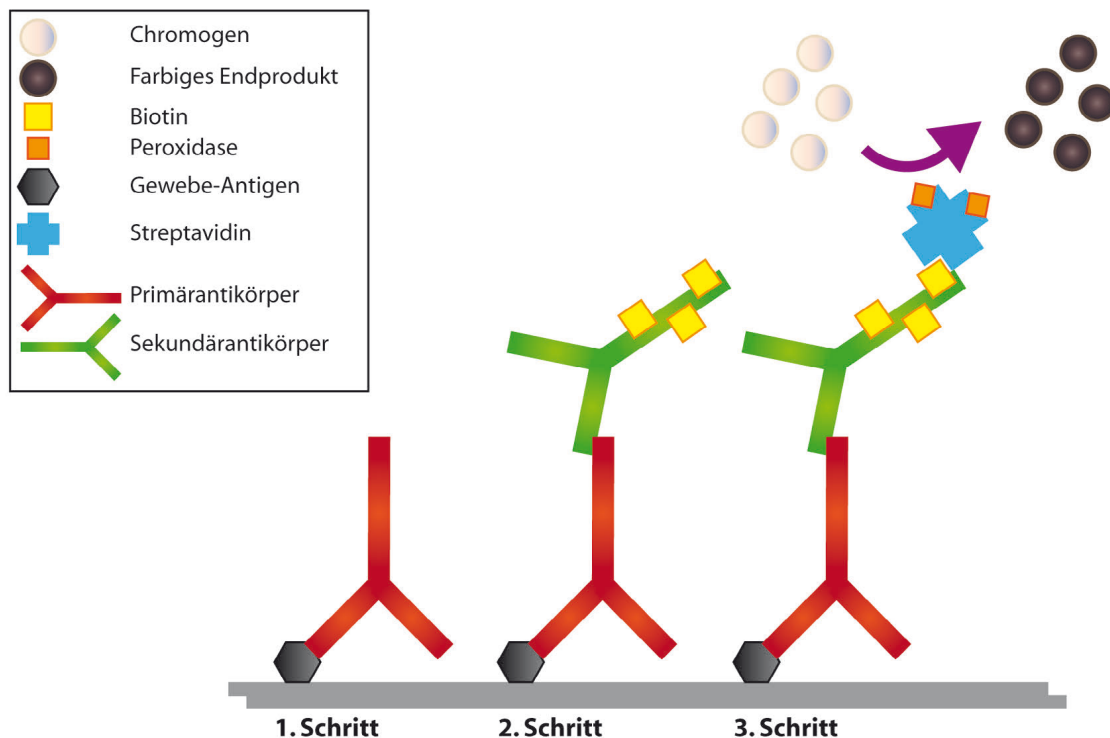
Um den Expressionsunterschied zwischen beiden Gruppen (n-fache Expression Gruppe A zu Gruppe B) zu ermitteln, wird der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert anschließend in die Formel  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  eingesetzt.

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Mit dem Mann-Whitney-Test wird die relative Expression eines Gens anschließend auf differentielle Expression zwischen zwei Gruppen (z.B. exponierte versus nicht exponierte Patienten) getestet. Eine signifikant unterschiedliche Expression wird bei p-Werten  $< 0,05$  angenommen.

## B.5 Immunhistochemie (IHC)

Die Immunhistochemie (IHC) ist ein Verfahren, mit dem Proteine *in situ* mittels Antikörpern nachgewiesen werden können. Für den Proteinnachweis werden Antikörper (Primärantikörper) eingesetzt, die in einer Antigen-Antikörper-Reaktion spezifisch an einen bestimmten Bereich (Epitop) des nachzuweisenden Proteins binden. Der Antikörper ist mit einem Detektionssystem gekoppelt und kann entweder direkt (Fluorochrom- oder Enzymmarkierung) oder indirekt über markierte Sekundär- oder Tertiärantikörper nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wird die indirekte Nachweismethode LSAB (*Labelled-Strept-Avidin-Biotin*) angewandt (Abb. 14), bei der die starke Affinität zwischen Biotin und Streptavidin ausgenutzt wird. Es kommt ein mehrfach biotinylierter Sekundärantikörper zum Einsatz, an den enzymkonjugiertes-Streptavidin bindet. Das Enzym Meerrettichperoxidase oxidiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid als Substrat das Chromogen Diaminobenzidin (DAB) zu einem farbigen Endprodukt (Lang, 2006).



**Abbildung 14: LSAB-Methode (*Labelled-Strept-Avidin-Biotin*)**

1. Schritt: Der Primärantikörper bindet spezifisch an das Gewebeantigen. 2. Schritt: An den Primärantikörper bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper. 3. Schritt: Peroxidase-gekoppeltes Streptavidin bindet an Biotin. Die Reaktion der Peroxidase mit dem Chromogen erzeugt ein braunes Endprodukt, welches das vom Primärantikörper erkannte Gewebeantigen lokalisiert.



Am Ort der Reaktion entsteht ein unlösliches, stabiles, braunes Farbprodukt, das die histologische, zelluläre und subzelluläre Lokalisation des Proteins dargestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit werden IHC-Untersuchungen an Formalin-fixiertem Paraffingewebe durchgeführt, um die Proteinexpression ausgewählter Kandidatengene in der Schilddrüsenkarzinogenese zu untersuchen. Des Weiteren kommt die IHC zur Charakterisierung von Schilddrüsenzelllinien zum Einsatz. Hierbei soll mit Hilfe eines Antikörpers gegen Cytokeratine, die als Intermediärfilamente einen wichtigen Teil des Zytoskeletts von Epithelzellen ausmachen, überprüft werden, ob es sich um epitheliale Zellen handelt.

### **B.5.1 Automatisierte Immunfärbung**

Bei der manuellen Handhabung großer Objektträgerzahlen ergeben sich gewisse Schwierigkeiten bei der gleichmäßigen Behandlung aller Objektträger (z.B. das Einhalten von Inkubationszeiten). Da dies für die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit von Daten jedoch besonders wichtig ist, wird die Immunfärbung in dieser Arbeit automatisiert im Discovery XT Färbemodul (Ventana) durchgeführt. Pro Lauf können 30 Objektträger zeitgleich gefärbt werden.

#### **B.5.1.1 Etablierung der automatisierten Immunfärbung**

Bevor eine IHC an FFPE-Gewebeschnitten oder fixierten Zellen durchgeführt werden kann, müssen zunächst die optimalen Bedingungen für die automatisierten Immunfärbung eines jeden Primärantikörpers bestimmt werden. Für die Etablierung der IHC an FFPE-Gewebe werden verschiedene Antikörperverdünnungen mit unterschiedlichen Vorbehandlungsmethoden an einem Gewebe-Array mit Schilddrüsennormalgewebe-Proben (siehe B.1.2.1) getestet. Die Färbung fixierter Zellen wird an bereits charakterisierten Cytokeratin-positiven und -negativen Zelllinien etabliert. Auch hier werden unterschiedliche Antikörperverdünnungen und Ventana-Programme erprobt. Lediglich Versuchsbedingungen, bei denen ein differenziertes Färbebild erzielt werden kann, werden für weitere Färbungen angewandt. Hierbei wird auch die aus der Literatur bekannte Zelllokalisierung der nachzuweisenden Proteine überprüft. Die für die einzelnen Primärantikörper gewählten Verdünnungen und Färbeprogramme sind in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Antikörperverdünnungen und Färbeprogramme**

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Ventana-Programm</b>
Anti-CLDN4	1:200	998 mit Vorbehandlung XTrem 1h
Anti-CLIP2	1:100	998 mit Vorbehandlung XTrem 1h
Anti-LIMK1	1:750	998 mit Vorbehandlung XTrem 1h
Anti-Cytokeratin Clones AE1/AE3	1:50	990 ohne Vorbehandlung
Anti-Cytokeratin Clones AE1/AE3/5D3	1:100	990 ohne Vorbehandlung

**B.5.1.2 IHC an FFPE-Gewebeschnitten**MATERIAL

- Bluing Reagent (Ventana / Roche)
- Cell Conditioning 1 (Ventana / Roche)
- DAB Map™ Detection Kit - Streptavidin Horseradish Peroxidase Detection Kit (Ventana / Roche)
- Inhibitor D™
- DAB D™
- DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> D™
- Copper D
- Blocker D™
- SA-HRP D
- Dako REAL™ Antibody Diluent (Dako)
- Deckgläser 24 x 60 mm (Chance Propper)
- Discovery XT – Automated Slide-Stainer (Ventana)
- Ethanolreihe, aufsteigend: 70 %, 90 %, 100 % (Merck)
- EZ Prep™ (10 x) (Ventana / Roche)
- Hematoxylin Counterstaining (Ventana / Roche)
- Liquid Coverslip (LCS) High Temperature (Ventana / Roche)
- Pertex® (Medite)
- Primärantikörper
  - Anti-CLIP2, HPA020430 (Sigma Prestige Antibodies - powered by Atlas Antibodies)
  - Anti-LIMK1, HPA028516 (Sigma Prestige Antibodies - powered by Atlas Antibodies)
  - Anti-CLDN4, PAB11624 (Abnova)
- Reaction Buffer (Ventana / Roche)
- Universal Secondary Antibody (Ventana / Roche)
- Xylol (Merck)

DURCHFÜHRUNG

Zuerst werden alle wichtigen Informationen (Datum, Ventana-Programm, AK, Probenname) auf Barcode-Etiketten gedruckt und auf die OT geklebt. Das Discovery XT Färbemodul wird über den PC gesteuert, Reagenzien und Proben werden mit Barcodes

identifiziert. Die OT werden auf dem Rondell horizontal aufgelegt. Um ein Austrocknen der Schnitte während der Inkubationszeiten zu verhindern, werden die OT immer mit einem Ölfilm (Liquid Coverslip) überschichtet. Zwischen den einzelnen Schritten wird mit Reaktionspuffer gespült. Für Formalin-fixierte, Paraffin-eingebettete (FFPE) Gewebeschnitte wird das Ventana-Programm „998 mit Vorbehandlung XTrem 1h“ gewählt. Die Entparaffinierung der FFPE-Gewebeschnitte erfolgt mit der Lösung *EZ Prep*. Danach wird das Gewebe mit einer leicht basischen Tris-EDTA-Lösung (*Cell Conditioning 1*) bei 95°C und 100°C vorbehandelt. Die Hitzebehandlung mit der Tris-EDTA-Lösung ist notwendig, um fixierungsbedingte Proteinvernetzungen (Maskierung des Antigens) aufzubrechen und die Permeabilität des Gewebes zu erhöhen. Dadurch werden Epitope freigelegt (Demaskierung) und für die Bindung des Primärantikörpers zugänglich gemacht.

Der Primärantikörper (150 µl pro OT) wird wie in Tabelle 12 aufgeführt in Antibody Diluent verdünnt eingesetzt und 1 h lang inkubiert. Anschließend wird der universelle Sekundärantikörper, der ein biotinyliertes Antikörpergemisch aus Ziege-anti-Maus IgG, Ziege-anti-Maus IgM und Ziege-anti-Kaninchen IgG darstellt, aufgetragen und für 32 min inkubiert. Die Detektion der Antikörper erfolgt mit dem DAB Map Detection Kit. Die Zellkerne werden mit Hämatoxylin blau gegengefärbt. Nach der Immunfärbung werden die OT durch kurzes Spülen in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70 %, 90 %, 100 %) und Xylol dehydriert, mit Pertex® eingedeckt und bei 60°C ca. 24 h im Brutschrank getrocknet.

### B.5.1.3 IHC an fixierten Zellen

#### MATERIAL

- Siehe B.5.1.2
- Primärantikörper
  - Anti-Cytokeratin Clones AE1/AE3/5D3, CI620R06 (DCS Innovative Diagnostik-Systeme)
  - Anti-Cytokeratin Clones AE1/AE3, M3515 (DAKO)
- TBS-Puffer, 1x - Tris Buffered Saline, pH 8, powder (Sigma) in 1 l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> lösen
- 0,1 % Triton X-100
 

TBS-Puffer	200 ml
Triton X-100 (Merck)	200 µl

### DURCHFÜHRUNG

Die Färbung fixierter, kultivierter Zellen erfolgt mit einigen Abweichungen wie unter B.5.1.2 beschrieben. Die leichte Vorbehandlung der fixierten Zellen (siehe B.6.5.3) erfolgt manuell für 3 min in 0,1%igem Triton X-100. Danach werden die OT dreimal für je 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Für die automatisierte Färbung wird anschließend das Ventana-Programm „990 ohne Vorbehandlung“ gewählt, da eine Entparaffinierung und Hitzebehandlung der OT mit Tris-EDTA wegfallen.

## **B.5.2 Auswertung der IHC-Färbungen**

### **B.5.2.1 Einscannen der gefärbten Objektträger**

#### MATERIAL

- MIRAX DESK Scanner & Scan-Software (Carl Zeiss)

#### DURCHFÜHRUNG

Die gefärbten OT werden mit dem MIRAX DESK Scanner eingescannt. Um einheitliches Bildmaterial zu produzieren, werden alle OT mit den gleichen Einstellungen gescannt.

### **B.5.2.2 Semiquantitative Auswertung**

#### MATERIAL

- MIRAX VIEWER Visualisierungssoftware (Carl Zeiss)

#### DURCHFÜHRUNG

Die semiquantitative Auswertung der IHC erfolgt mit der MIRAX Viewer Visualisierungssoftware (Zeiss). Zuerst wird das entstandene digitale Bild, der *Virtual Slide*, virtuell in mehreren Vergrößerungen kontrolliert. Die einzelnen Tumorgewebe werden je nach Färbeintensität des Markers in die Gruppen 0 (keine Färbung) bis 3 (sehr starke Färbung) eingeteilt.

### B.5.2.3 Relative Quantifizierung

#### MATERIAL

- Definiens Developer 1.5.2 Software (Definiens)

#### DURCHFÜHRUNG

Färbungen mit dem Primärantikörper gegen CLIP2 werden mit der *Definiens Developer* Software halbautomatisch relativ quantifiziert. Neben Zellkernmarkern (automatische Zellkernerkennung) können auch Marker, die das Zytoplasma färben mit der Software gemessen werden. Die IHC-Färbung wird hierbei als Fläche detektiert. Zuerst werden manuell diejenigen Geweberegionen ausgewählt, die in die Analyse einbezogen werden sollen. Bei einer heterogenen Färbung des Gewebes, werden die zu analysierenden Bereiche so ausgewählt, dass unterschiedliche Färbegrade repräsentativ vertreten sind. Der Algorithmus *Marker Area Detection* ordnet danach jedem analysierten Fall einen Wert für die *Average Marker Intensity* zu.

Mit dem Mann-Whitney-Test werden die relativen Färbeintensitäten des Markers anschließend auf Unterschiede zwischen zwei Gruppen getestet. Signifikanz wird bei p-Werten  $< 0,05$  angenommen.

## B.6 Zellkultur

### B.6.1 Allgemeine Methoden: Kultivierung von Zellen

#### MATERIAL

- Ampullen 1,0 ml Cryotube™ Vials (Nunc A/S)
- Brutschrank (Heraeus)
- Bunsenbrenner Fuego SCS
- Coulter Counter Z1 (Beckman Coulter)
- Countess™ automated cell counter (Invitrogen)
- Countess™ cell counting chamber slide (Invitrogen)
- Einfriermedium 30 ml (10 % FBS, 10 % DMSO), 4°C
 

Fetal Bovine Serum - FBS (Sigma)	3 ml
RPMI/10 % FBS	24 ml
DMSO (Sigma)	3 ml
- Einfriermodul mit Isopropanol: Nalgene™ Cryo 1°C (Nalge Nunc International)
- Kulturmedium RPMI/10 % FBS
 

RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA)	500 ml
Fetal Bovine Serum - FBS (Sigma)	55 ml
PenStrep - Penicillin 10.000 Units/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml (Gibco)	2,5 ml
- Invert-Mikroskop IMT2 (Olympus)
- NaCl 0,9%
 

NaCl	9 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> (Gibco)	ad 1000 ml
Steril filtrieren (0,2 µm)	
- PBS-Puffer, 1x (PBS Dulbecco ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>), Instamed 9,55 g / l (Biochrom)
 

H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 10 l
autoklavieren	
- Sterilbank Laminair® HBB 2472S (Heraeus)
- Trypan Blue Stain 0,4 % (Gibco)
- TrypLE™ Express (Gibco)
- Stickstofftank biostor5 (Statebourne)
- Wasserbad (GFL)
- Zählröhrchen (Coulter Beckman) mit 9,9 ml 0,9%iger NaCl-Lösung
- Zellkulturflaschen (Greiner-bioone Cellstar®/Becton Dickinson)
- Zentrifuge 3-15 (Sigma Laboratory Centrifuges)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml (BD Falcon™)

### DURCHFÜHRUNG

Die Schilddrüsenzellen werden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die erfolgreiche Kultivierung der Schilddrüsenzellen ist ein regelmäßiger Mediumwechsel (RPMI/10 % FBS) und bei entsprechender Dichte das Ernten der Zellen nötig. Alle Arbeiten finden unter der Sterilbank statt.

### TRYPsinIEREN DER ZELLEN

Da es sich bei Schilddrüsenzellen um adhärenente Zellen handelt, müssen die Zellen mit Trypsin behandelt werden, um sie ernten zu können. Hierfür wird das Kulturmedium abgenommen und die Zellen erst mit PBS (T25-Kulturflasche: 5 ml, T75-Kulturflasche: 10 ml, T175-Kulturflasche: 20 ml), dann mit Trypsin (T25-Kulturflasche: 1,5 ml, T75-Kulturflasche: 2,5 ml, T175-Kulturflasche: 5 ml) kurz gewaschen. Nach erneuter Trypsin-Zugabe (T25-Kulturflasche: 1,5 ml, T75-Kulturflasche: 2,5 ml, T175-Kulturflasche: 5 ml) werden die Zellen solange im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vollständig vom Flaschenboden abgelöst haben (4-10 min, Kontrolle unter dem Mikroskop). Anschließend werden die Zellen mit einer möglichst kleinlumigen Pipette vereinzelt. Durch die Zugabe serumhaltigen Kulturmediums wird die Wirkung des Trypsins abgestoppt (T25-Kulturflasche: 3 ml, T75-Kulturflasche: 5 ml, T175-Kulturflasche: 6 ml). Die Zellsuspension wird durchmischt und in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

### BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Für die Bestimmung der Zellzahl in der Zellsuspension werden

- a) 0,1 ml der Zellsuspension zu 9,9 ml 0,9%iger NaCl-Lösung in ein Zählröhrchen gegeben und die Zellzahl im *Coulter Counter* gemessen.
- b) 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt, auf einen *Countess™ cell counting chamber slide* aufgetragen und die Zellzahl im *Countess™ automated cell counter* gemessen.

Die in b) beschriebene Variante eignet sich vorwiegend für kugelförmige Zellen. Je nach Zellzahl werden die Zellen dann weiterverarbeitet.

### PASSAGIEREN VON ZELLEN

Die Zellen werden durch Zentrifugation (350 x g, 5 min) pelletiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wird in frischem Kulturmedium aufgenommen, suspendiert und in Abhängigkeit von der Zellzahl auf neue mit Medium gefüllte Zellkulturflaschen verteilt. Die Kulturflaschen werden zum Durchmischen geschwenkt.

### ZELLELLET FÜR DIE ISOLATION VON RNA/DNA

Es wird eine entsprechende Zellzahl in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (350 x g, 5 min). Das Pellet wird zweimal mit 2 ml PBS gewaschen und anschließend bei -80°C gelagert.

### KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN

Um die Zellen langfristig zu lagern, werden Ampullen einer jeden Zelllinie (ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/Ampulle) in flüssigem Stickstoff bei -196°C eingefroren. Dafür werden die Zellen durch Zentrifugation (350 x g, 5 min) pelletiert, der Überstand abgenommen, das Pellet in einer entsprechenden Menge Einfriermedium aufgenommen und in jede Ampulle 1 ml Medium gegeben. Bevor die Zellampullen in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert werden können, müssen sie zunächst für einige Stunden in einem speziellen Einfriermodul bei -80°C heruntergekühlt werden.

## **B.6.2      Verwendete Zelllinien**

### **B.6.2.1      Zelllinie TPC-1**

Die Zelllinie TPC-1 wurde aus operativ entferntem Gewebe eines papillären Schilddrüsenkarzinoms einer weiblichen Patientin etabliert und weist die RET/PTC1-Veränderung auf (Tanaka et al., 1987; Ishizaka et al., 1989; Jhiang et al., 1992).

### **B.6.2.2      Schilddrüsen-Primärkulturen**

Für funktionelle Studien an ausgewählten Kandidatengenen der Schilddrüsenkarzinogenese sollen permanente Zelllinien mit normalen epithelialen Schilddrüsenzellen etabliert werden. Hierfür werden Schilddrüsen-Primärkulturen, welche bereits in vorangegangenen Arbeiten aus operativ entfernten Schilddrüsenengeweben angelegt wur-



den, immortalisiert. Bei den 13 Gewebeproben handelt es sich um Normalgewebe der Schilddrüse nach einseitiger oder vollständiger Thyreoidektomie. In Tabelle 13 sind die Patientendaten der einzelnen Fälle aufgelistet. Fall S27N stammt aus Minsk (Weißrussland) und wurde von Prof. Dr. Lengfelder (Strahlenbiologisches Institut, Fakultät für Medizin, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt. Die vier Proben S399N - S403N kommen aus Kiew (Ukraine) und wurden von Dr. Tatjana Bogdanova (Research Institute of Endocrinology & Metabolism, Academy of Medical Sciences of the Ukraine) erhalten. Proben S27N und S402N stammen von Patienten, die einer Strahlenexposition durch den Tschernobyl-Fallout ausgesetzt waren. Alle anderen Patienten waren keiner Strahlung ausgesetzt. Die restlichen acht Gewebeproben wurden vom Martha-Maria-Krankenhaus in München-Solln erhalten. Die Patienten wurden alle im Jahr 1992 von Prof. Dr. Spelsberg operiert.

Die Gewebeproben wurden unmittelbar nach der operativen Entnahme in Nährmedium gegeben und möglichst umgehend für die Gewebekultivierung weiterverarbeitet. Dazu wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert oder enzymatisch vorbehandelt und in Kulturmedium aufgenommen. Angewachsene Zellen wurden weiterkultiviert und möglichst in frühen Primärkultur-Passagen in flüssigem Stickstoff konserviert.

**Tabelle 13: Patientendaten der Primärkulturen aus Normalgewebe der Schilddrüse**

Fall	Geburtsjahr	Alter bei OP [Jahre]	Geschlecht <sup>1</sup>	Herkunft
S10N	1949	43	W	Deutschland
S11N	1910	82	W	Deutschland
S13N	1939	53	M	Deutschland
S17N	1945	47	W	Deutschland
S22N	1916	76	W	Deutschland
S24N	1926	66	W	Deutschland
S27N*	1931	61	M	Weißrussland
S31N	1956	36	W	Deutschland
S33N	1941	51	M	Deutschland
S399N	1988	14	M	Ukraine
S401N	1990	12	M	Ukraine
S402N*	1968	34	M	Ukraine
S403N	1990	12	M	Ukraine

<sup>1</sup>W: weiblich, M: männlich; \*Exponiert durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl.

### B.6.3 DNA-Isolation aus Zellpellets

#### MATERIAL

- Ethanol, 100 % (Merck)
- PBS-Puffer, 1x (PBS Dulbecco ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ), Instamed 9,55 g / l (Biochrom) ad 10 l  
 $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$   
autoklavieren
- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)  
AL-Puffer  
Proteinase K  
AW1-Puffer (Waschpuffer 1)  
AW2-Puffer (Waschpuffer 2)  
QIAamp Mini Spin Säulchen

#### DURCHFÜHRUNG

Für die DNA-Isolation wird das Zellpellet (siehe B.6.1) in 200 µl PBS resuspendiert und mit 20 µl Proteinkinase K versetzt. Danach werden 200 µl AL-Puffer dazugegeben und der Ansatz für eine effiziente Lyse der Zellen gut gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 56°C erfolgt die Zugabe von 400 µl Ethanol. Im Anschluss wird das Gemisch vorsichtig auf ein QIAamp Mini Spin Säulchen gegeben und für 1 min (6.000 x g) zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Es werden 500 µl AW1-Puffer auf das Säulchen gegeben und für 1 min (6.000 x g) zentrifugiert. Der Durchfluss wird erneut verworfen und das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. Nach Zugabe von 500 µl AW2-Puffer wird das Säulchen 3 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen, das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und nochmals 1 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Danach wird das Säulchen in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und 100 µl  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  hinzugegeben. Die DNA wird nach 5-minütiger Inkubation in einem 1-minütigen Zentrifugationsschritt (6.000 x g) eluiert. Der Elutionsschritt wird wiederholt, um die noch auf dem Säulchen verbliebene, gebundene DNA komplett zu eluieren. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA erfolgt wie unter B.2.1.2 beschrieben.

## B.6.4 RNA-Isolation aus Zellpellets

### MATERIAL

- Ethanol, 70 % (Merck)
- RNase-Free DNase Set (Qiagen)  
RNase-freie DNase I  
RNase-freies H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>  
RNase-freier RDD-Puffer
- RNeasy® Mini Kit (Qiagen)  
Proteinase K  
RLT-Puffer (Lysepuffer), 1 ml RLT-Puffer wird mit 10µl β-Mercaptoethanol (14,3 M) versetzt  
RW1-Puffer  
RNase- freies H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>.  
RNeasy Mini Spin Columns  
RPE-Puffer, mit 4 Volumen Ethanol (100 %) versetzt

### DURCHFÜHRUNG

Für die RNA-Isolation wird das Zellpellet mit 600 µl Lysepuffer RLT und 600 µl Ethanol (70 %) versetzt. Die Probe wird durchmischt und auf ein RNeasy Mini Spin Säulchen überführt. Nach 15-sekündiger Zentrifugation (8.000 x g) wird der Durchfluss verworfen. Danach werden 700 µl RW1-Puffer auf das Säulchen gegeben und für 15 sec (8.000 x g) zentrifugiert. Der Durchfluss wird anschließend verworfen. Als Nächstes werden 500 µl RPE-Puffer auf das Säulchen gegeben, 15 sec (8.000 x g) zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin werden erneut 500 µl RPE-Puffer dazugegeben. Um die Membran zu trocknen, wird das Säulchen danach 2 min (8.000 x g) zentrifugiert. Das Säulchen wird nun in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und 1 min bei (8.000 x g) zentrifugiert. Danach wird das Säulchen erneut in ein neues Reaktionsgefäß gestellt und 30 µl RNase-freies H<sub>2</sub>O dazugegeben. Die RNA wird sodann nach 1-minütiger Inkubation in einem 1-minütigen Zentrifugationsschritt eluiert. Der Elutionschritt wird wiederholt, um die noch auf dem Säulchen verbliebene, gebundene RNA komplett zu eluieren. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgt wie unter B.4.1.2 beschrieben.

## B.6.5 Charakterisierung von Zelllinien

### B.6.5.1 Array-CGH

Die 1 Mb BAC Array-CGH wird wie unter B.2.3 und die hochauflösende Oligo Array-CGH wie unter B.2.4 beschrieben durchgeführt.

### B.6.5.2 Spektrale Karyotypisierung (SKY)

Bei der Spektralen Karyotypisierung (SKY) handelt es sich um eine molekularzytogenetische Methode, mit der alle 24 humanen Chromosomen gleichzeitig differenziell angefärbt werden können (Schröck et al., 1996). Die chromosomenspezifische Anfärbung erfolgt durch die Hybridisierung von WCP (*whole chromosome paint*)-Sonden, welche mit einer für jedes Chromosom eigenen Kombination aus fünf Fluoreszenzfarbstoffen (Rhodamine, Texas-Red, Cy5, FITC und Cy5,5) markiert sind. Aufgrund der ermittelten Fluoreszenzspektren wird jeder kombinatorischen Mischfarbe dann eine eindeutige Fehlfarbe zugeordnet. Anhand von Farbsprüngen werden chromosomale Aberrationen wie Aneuploidien, Translokationen, Insertionen, Amplifikationen und Deletionen ermittelt. Der Nachweis intrachromosomaler Veränderungen ist nur bedingt möglich, da hier keine Farbsprünge auftreten.

#### B.6.5.2.1 Herstellung von Metaphasepräparaten

##### MATERIAL

- Carnoy's Fixativ, vor Gebrauch frisch hergestellt
 

Methanol (Merck)	3 Teile
Eisessig (Merck)	1 Teil
- Colcemid, 10 µg/ml (Roche)
- Hypotone Lösung (0,075 M KCl)
 

KCl (Merck)	5,59 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
- Kulturmedium RPMI/10 % FBS
 

RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA)	500 ml
Fetal Bovine Serum - FBS (Sigma)	55 ml
PenStrep - Penicillin 10.000 Units/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml (Gibco)	2,5 ml
- Objektträger, steril (Menzel Superfrost Color)
- Quadriperm Zellkulturschalen - Slide Tray Plates (PAA)

DURCHFÜHRUNG

Für die Metaphasepräparation werden vier sterile Objektträger in eine Quadriperm-Zellkulturschale gelegt und mit 4 ml Zellsuspension (ca.  $2 \times 10^5$  Zellen pro OT) über-schichtet. Die Schalen werden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist. Um die Zellen in der Metaphase zu stoppen, wer-den jeweils 40 µl Colcemid zur Zellsuspension gegeben und der Ansatz 4 h im Brut-schrank inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und es erfolgt die hypotone Behand-lung der Zellen mit 4 ml 0,075 M KCl-Lösung für 20 min im Brutschrank. Die hypotone Lösung erhöht durch den Osmose-Effekt das Zellvolumen und führt folglich zu einem Quellen der mitotischen Zellen. Auf Eis werden 4 ml Carnoy's Fixativ zur hypotonen Lösung dazugegeben. Die Inkubation erfolgt für 20 min im Dunkeln. Die Lösung wird abgesaugt und es folgen zwei weitere 20-minütige Fixierungsschritte mit 4 ml Carnoy's Fixativ. Am Ende der Fixierung kommt es zur Spreitung der Metaphasechromosomen auf dem OT. Die fertigen Präparate werden an der Luft getrocknet und für ca. eine Woche bei RT gealtert.

**B.6.5.2.2 Pepsinverdau der Metaphasepräparate**

Durch die Vorbehandlung der Metaphasepräparate mit Pepsin werden störende Zellbestandteile wie Proteine und Membranen durch enzymatischen Verdau entfernt.

MATERIAL

- Ethanolreihe, aufsteigend: 70 %, 90 %, 100 % (Merck)
- Formaldehyd-Lösung – Post-Fix (1 %)
 

MgCl <sub>2</sub> /PBS-Lösung, 0,05 M	72 ml
37% Paraformaldehydlösung (Sigma/Aldrich)	2 ml
- MgCl<sub>2</sub>/PBS-Lösung, 0,05 M
 

MgCl <sub>2</sub> -Lösung, 1M (AppliChem)	10 ml
1 x PBS	190 ml
- PBS-Puffer, 1x (PBS Dulbecco ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>), Instamed 9,55 g / l (Biochrom)
 

H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 10 l
autoklavieren	
- Pepsin-Stammlösung
 

Pepsin (Sigma-Aldrich)	250 mg
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 2,5 ml

- Pepsin-Lösung
 

H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	99 ml
Pepsin-Stammlösung	10 µl
HCl, 1M (Merck)	1 ml

### DURCHFÜHRUNG

Die Objektträger werden solange bei 37°C in eine Küvette mit Pepsinlösung inkubiert, bis unter dem Phasenkontrastmikroskop keine Verunreinigungen mehr sichtbar sind. Danach werden die Objektträger einmal kurz in PBS gespült, zweimal für 5 min in PBS und einmal für 5 min in MgCl<sub>2</sub>/PBS-Lösung bei RT gewaschen. Für die Nachfixierung werden die Präparate 4 min in der Formaldehyd-Lösung bei RT inkubiert. Anschließend werden die Objektträger einmal kurz in PBS gespült und zweimal für 5 min in PBS gewaschen. Zum Schluss werden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 % und 100 %) für jeweils 2 Minuten dehydriert und mit Stickstoff getrocknet.

### **B.6.5.2.3            Hybridisierung**

#### MATERIAL

- Deckgläser, 24 x 24 mm (Menzel-Gläser)
- Ethanolreihe: 70 % (-20°C), 90 % (4°C), 100 % (4°C) (Merck)
- Fixogum (Marabu)
- Formamid 70 %/2 x SSC
 

Formamid deionisiert (AppliChem)	70 ml
20 x SSC	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	20 ml
mit HCl pH 7,0 einstellen	
- Heizblock, HBT 130 (Haep Labor Consult)
- Heizplatte (LGH)
- Schüttelblock Thermomixer Compact (Eppendorf)
- 20 x SSC
 

3 M NaCl (Merck)	175,3 g
0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck)	88,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
mit HCl pH 7 einstellen	
- SKY Paint™DNA Kit H-10 für menschliche Chromosomen (Applied Spectral Imaging)
- Wasserbad (GFL)

DURCHFÜHRUNG

Vor der Hybridisierung der SKY-Sonde auf ein Metaphasepräparat werden SKY-Sonde und Metaphasepräparat getrennt voneinander denaturiert. Die SKY-Sonde wird für 7 min bei 80°C im Heizblock denaturiert und anschließend mindestens für 1 h bei 37°C bis zur Hybridisierung vorinkubiert. Die Denaturierung des Metaphasepräparats (Zelllinie TPC-1: 5 min) erfolgt bei 72°C in 70%igem Formamid/2 x SSC. Um die Denaturierung zu stoppen, werden die OT in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 90 %, 100 %) für je 2 min dehydriert. Vor Auftragen der Sondenlösung werden die OT 5 min auf einer 37°C warmen Heizplatte getrocknet. Danach werden 10 µl der Sonde auf das denaturierte Metaphasepräparat aufgetragen und mit Deckgläsern luftblasenfrei abgedeckt. Um ein Austrocknen zu verhindern, werden die Deckgläser mit Fixogum abgedichtet. Nach Trocknen des Klebers werden die Objektträger für 48-72 h in einer Metallbox bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

**B.6.5.2.4 Waschen und Detektion**MATERIAL

- Antikörper
  - Anti-Digoxigenin, monoklonaler Antikörper, 0,1 mg/ml (Roche)  
5 µl Antikörperlösung mit 1245 µl PNM verdünnen
  - Cy5-konjugiertes Avidin 1 mg/ml (Biomol)  
5 µl Antikörperlösung mit 245 µl PNM verdünnen
  - Cy5,5-konjugiertes Avidin 1 mg/ml (Biomol)  
5 µl Antikörperlösung mit 245 µl PNM verdünnen
- DAPI/Vectashield  
4,6-Diamidino-2-phenylindol-2-HCl, 1 mg/ml (DAPI, Sigma) 1 µl  
Vectashield Eindeckmedium (Vector) 999 µl
- Deckgläser, 24 x 50 mm (IDL)
- Feuchte Kammer
- Lichtschutzbeutel (NeoLab)
- PN-Puffer (Phosphat-Nonidet P40-Puffer)
  - Lösung 1:  
0,1 M Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Merck) 142,39 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 8 l
  - Lösung 2:  
0,1 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (Merck) 6,9 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 500 ml  
Lösung A mit Lösung B auf pH 8 einstellen  
0,1 % Nonidet P-40 (Fluka) zugeben
- Plastikfolie, auf Objektträgergröße zurechtgeschnitten

- PNM-Puffer (PN-Magermilch-Puffer)
 

Magermilchpulver (Biorad)	25 g
Natriumazid (Merck)	0,1
PN-Puffer	ad 500 ml

 über Nacht bei 37°C rühren, einige Stunden bei RT stehen lassen, steril filtrieren (0,45 µm-Filter)
- Quadriperm Zellkulturschalen - Slide Tray Plates (PAA)
- 20 x SSC
 

3 M NaCl (Merck)	175,3 g
0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck)	88,2 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml

 mit HCl pH 7 einstellen
- 0,5 x SSC
 

SSC 20 x	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	390 ml
- 2 x SSC
 

20 x SSC	40 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	360 ml
- 4 x SSC/0,1 % Tween
 

SSC 20 x	100 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	400 ml
Tween 20 (Sigma)	500 µl
- Wärmeschrank (Memmert)
- Wasserbad (Haake)

### DURCHFÜHRUNG

Nach der Hybridisierung wird das Fixogum vorsichtig entfernt und das Deckglas in 2 x SSC bei RT abgelöst. Es folgen drei Waschschrte: 5 min in 0,5 x SSC bei 75°C im Wasserbad, 2 min in 4 x SSC/0,1 % Tween bei RT und 2 min in H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> bei RT. Während des Waschens werden die verdünnten Antikörperlösungen im Verhältnis 1:1 gemischt (Tabelle 14) und eine feuchte Kammer bei 37°C vorgewärmt. Um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper abzublocken, wird der OT mit 100 µl PNM-Puffer überschichtet, mit einer zurechtgeschnittenen Plastikfolie bedeckt und für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach dem Blocken werden 50 µl der ersten Antikörperschicht aufgetragen und der abgedeckte OT für 45 min in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Bevor 50 µl der zweiten Antikörperschicht für 45 min aufgetragen werden, erfolgen zwei 5-minütige Waschschrte in PN-Puffer bei 37°C im Dunkeln. Nach der Detektion wird der OT erneut zweimal 5 min in PN-Puffer gewaschen, an der Luft getrocknet und mit DAPI/Vectashield eingedeckt. Die Präparate werden bis zur Auswertung am Mikroskop in Quadriperm-Schalen in Lichtschutzbeuteln aufbewahrt.



Tabelle 14: Antikörperschichten für die Detektion der SKY

Antikörperschicht	1:1 verdünnte Antikörperlösungen
Schicht 1	Anti-Digoxigenin
Schicht 2	Cy5-Avidin + Cy5,5-Avidin

### B.6.5.2.5 Auswertung der SKY

Die Aufnahme der Metaphasen im SKY-Präparat erfolgt an einem Epifluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss) mit einer Interferometer-CCD-Kamera-Kombination (Spectra-Cube, Applied Spectral Imaging) und nachgeschaltetem Rechner mit der Auswertesoftware SkyView (Applied Spectral Imaging). Das Mikroskop ist mit einem DAPI-Filtersatz und einen SKY1-Multibandpassfilter (Chroma Technology) ausgerüstet. Pro zu untersuchendem Fall werden mindestens 10 Metaphasen aufgenommen und analysiert. Im spektralen Bild werden pro Pixel die Spektren gemessen und anschließend mit den Referenzspektren der verwendeten Fluorochrome verglichen, um dann bei der automatisierten Karyotypisierung jeder chromosomalen Mischfarbe eine für das menschliche Auge eindeutig wahrnehmbare Falschfarbe zuzuordnen. Als Ergebnis der SKY erhält man ein Karyogramm, welches für jedes Chromosom die G-Bänderung (inverse DAPI-Bänderung), das spektrale Bild und das Falschfarbenbild enthält. Auftretende chromosomale Veränderungen werden anhand von Farbsprüngen in diesem Karyogramm identifiziert.

### B.6.5.3 IHC an fixierten Zellen

#### B.6.5.3.1 Anzüchten der Zellen auf Objektträgern

#### MATERIAL

- Kulturmedium RPMI/10 % FBS  
RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA) 500 ml  
Fetal Bovine Serum - FBS (Sigma) 55 ml  
PenStrep - Penicillin 10.000 Units/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml (Gibco) 2,5 ml
- Objektträger, steril (Menzel Superfrost Color)
- Quadriperm Zellkulturschalen - Slide Tray Plates (PAA)

### DURCHFÜHRUNG

Für die IHC werden vier sterile Objektträger in eine Quadriperm-Zellkulturschale gelegt und mit 4 ml Zellsuspension (ca.  $2 \times 10^5$  Zellen pro OT) überschichtet. Die Schalen werden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist.

#### **B.6.5.3.2 Zellfixierung**

### MATERIAL

- PBS-Puffer, 1x (PBS Dulbecco ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>), Instamed 9,55 g / l (Biochrom) ad 10 l  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>  
autoklavieren
- Formalin, 10 %, Neutral Buffered (Sigma)

### DURCHFÜHRUNG

Das Medium wird von den Objektträgern abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgt für 10 min in 10%igem Formalin. Danach werden die Zellen 5 x in PBS gewaschen.

#### **B.6.5.3.3 IHC**

Die IHC an den fixierten Zellen wird wie unter B.5.1.3 beschrieben durchgeführt.

### B.6.6 Immortalisierung von Zellen

Normale humane Zellen können sich *in vitro* nur einer begrenzten Anzahl an Zellteilungen unterziehen, bevor die Zellalterung einsetzt und der programmierte Zelltod eingeleitet wird (Hayflick und Moorhead, 1961; Hayflick, 1965). Die Ursache hierfür liegt in der Verkürzung der Telomere mit jeder Zellteilung (Harley, 1991). Für eine permanente Zellkultur primärer Zellen ist es notwendig diese zu immortalisieren (Schmitz, 2007). Hierzu werden die Zellen mit dem Gen hTERT (humane Telomerase reverse Transkriptase), das für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert, transfiziert. Das Einführen der Telomerase in die Zellen verhindert das Verkürzen der Chromosomenenden bei der Zellteilung und ermöglicht damit eine unbegrenzte Teilung der Zellen (Bodnar et al., 1998; Piao et al., 2005).

Die Immortalisierung bereits etablierter epithelialer Schilddrüsenzellen mit hTERT erfolgt in dieser Arbeit mit einem retroviralen Gentransfersystem bestehend aus einem retroviralen Vektor auf Basis des Moloney-Maus-Leukämievirus und einer Verpackungszelllinie. Das Gen hTERT (Nakamura et al., 1997) wurde in den retroviralen Vektor pBABE-puro (Morgenstern und Land, 1990) kloniert. Der resultierende retrovirale Vektor pBABEpuro-hTERTsense, welcher neben dem zu übertragenden Gen hTERT sowie dem Puromycin-Resistenzgen auch über ein Verpackungssignal und retrovirale LTR (*long terminal repeat*)-Sequenzen verfügt, wurde transient in die Verpackungszelllinie  $\Psi$ -CRIP (Danos und Mulligan, 1988) transfiziert.  $\Psi$ -CRIP stellt retrovirale Proteine für die Verpackung der Vektor-RNA in replikationsdefekte Virionen zur Verfügung, welche von der Zelllinie abgegeben werden. Der so gewonnene retrovirale Überstand wird zur Infektion der normalen humanen epithelialen Schilddrüsenzellen verwendet, in deren Genom sich das von der retroviralen RNA umgeschriebene DNA-Intermediat stabil integrieren kann. Durch die Zugabe von Puromycin werden transduzierte Zellen, welche hTERT und den Selektionsmarker exprimieren, selektioniert. Die Zelllinien  $\Psi$ -CRIP-pBABEpuro-hTERTsense und  $\Psi$ -CRIP-LXSN-wtcdk4sense wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Andrew Riches (Bute Medical School, University of St Andrews, St Andrews, UK) zur Verfügung gestellt. Die Verpackungszelllinie  $\Psi$ -CRIP-LXSN-wtcdk4sense beinhaltet den retroviralen Vektor LXSN, in den das Wildtyp-Gen CDK4 und das Geneticin (G418)-Resistenzgen inseriert sind. Die Überexpression von CDK4 verhindert den vom

CDK4-Inhibitor p16<sup>INK4a</sup>-vermittelten Wachstumsarrest der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus (Ramirez et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Transduktion mit CDK4 erfolgreich zur Immortalisierung von Primärkulturen führt (Ramirez et al., 2004; Weaver et al., 2011).

### B.6.6.1 Ernten des retroviralen Überstands

#### MATERIAL

- Filter 0,45 µm, Minisart® Spritzenvorsatz (Sartorius)
- Geneticin (G418), Stocklösung 100 mg/ml (PAA)
- HBSS (Gibco)
- Kulturmedium DMEM/ 10 % Calf Serum  
DMEM, High Glucose (4,5 g/l), with L-Glutamine (PAA) 500 ml  
Calf Serum (PAA) 55 ml
- Kulturmedium RPMI/10 % FBS  
RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA) 500 ml  
Fetal Bovine Serum - FBS (Sigma) 55 ml
- Puromycin, Stocklösung 1 mg/ml (PAA)
- Spritze 20 ml, Omnifix® (B.Braun)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml (BD Falcon™)

#### DURCHFÜHRUNG

Die Kultivierung der Verpackungszelllinien Ψ-CRIP-pBABEpuro-hTERTsense und Ψ-CRIP-LXSN-wtcdk4sense erfolgt im Selektionsmedium DMEM/ 10 % Kälberserum mit Antibiotikum (hTERT: 2,5 µg/ml Puromycin; CDK4: 400 µg/ml G418) bis ein Konfluenzgrad von ca. 95 % erreicht ist. Das Selektionsmedium wird abgenommen und die Zellen werden zweimal mit vorgewärmten HBSS gewaschen. Danach erfolgt die Zugabe des Erntemediums RPMI/ 10 % FBS (ohne Antibiotika), in dem die Zellen weitere 12-18 h inkubiert werden. Das Medium wird abgenommen, in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 180 x g zentrifugiert. Der retrovirale Überstand wird mit einem Spritzenfilter der Porengröße 0,45 µm filtriert und aliquotiert. Der retrovirale Überstand wird möglichst umgehend für die Transduktion verwendet, wenn eine zeitliche Synchronisierung mit den zu infizierenden Primärkulturen möglich ist. Anderenfalls wird der Überstand in flüssigem Stickstoff gelagert.

**B.6.6.2 Retrovirale Infektion (Transduktion)**MATERIAL

- Geneticin (G418), Stocklösung 100 mg/ml (PAA)
- Kulturmedium RPMI/10 % FBS  
RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA) 500 ml  
Fetal Bovine Serum - FBS (Sigma) 55 ml
- Polybren (Hexadimethrine bromide) (Sigma), Stocklösung 200 mg/ml  
Polybren 0,04 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, DNase/RNase-frei (Gibco) ad 200 ml  
Frisch für Transduktion ansetzen: Verdünnung mit Kulturmedium auf 2 mg/ml
- Puromycin, Stocklösung 1 mg/ml (PAA)
- 96-Well-Zellkulturplatten Cellstar® (Greiner Bio One)

DURCHFÜHRUNG

Primärkulturen, die transduziert werden sollen, werden 24 h vor der retroviralen Infektion mit CDK4 oder hTERT in T25-Zellkulturflaschen ausgesät. Dabei wird die kultivierte Zellzahl zwischen  $3 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  variiert. Die Zellen werden mit frischem Kulturmedium mit 8 µg/ml Polybren überschichtet. Polybren ist ein Polykation, das durch Abschirmen von Ladungen auf der Zellmembranoberfläche das Eindringen der Virionen in die Zellen erleichtert (Davis et al., 2004). Nach 1 h Inkubation im Brutschrank wird das Medium abgenommen und 3 ml des filtrierten retroviralen Überstands CDK4 oder hTERT (siehe B.6.6.1) versetzt mit 8 µg/ml Polybren auf die Zellen gegeben. Es folgt eine 4-stündige Inkubation im Brutschrank, nach der 2 ml frisches Kulturmedium zu den Zellen gegeben werden. Nach 24 h wird der retrovirale Überstand von den Zellen abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. 48 h nach der Transduktion werden die Zellen trypsiniert (siehe B.6.1) und auf mindestens zwei T25-Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Selektion mit 1 µg/ml Puromycin (hTERT) bzw. 200 µg/ml G418 (CDK4) erfolgt dann nach weiteren 24 h. Um eine stabile Transduktion der Zellen zu erreichen, erfolgt ca. wöchentlich ein Mediumwechsel mit neuer Antibiotika-Zugabe.

Um eine klonierte Zelllinie zu erhalten, bei der alle Zellen von einer einzelnen Zelle abstammen, erfolgt nach erfolgreicher Transduktion ein Vereinzeln der Zellen in 96-Well-Zellkulturplatten. Angewachsene vereinzeltete Klone werden weiter kultiviert.

## B.7 Herstellung transgener Zelllinien

Für funktionelle Studien am Kandidatengen CLIP2 sollen transgene Schilddrüsenzelllinien durch stabile Transfektion eines CLIP2-Expressionsvektors generiert werden. Hierfür wird das Gen CLIP2 zunächst selektiv aus cDNA amplifiziert und in einen Vektor integriert. Es folgt die Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien, die Selektion und Analyse einzelner Bakterienklone. Für die Isolation großer Mengen Plasmid-DNA werden Klone mit gewünschtem Vektor-Insert weiter kultiviert. Nach erfolgreicher Restriktionsanalyse und Sequenzierung des Expressionsvektors erfolgt die Transfektion der Zelllinien.

### B.7.1 Selektive Amplifikation des CLIP2 Gens aus cDNA

Die selektive Amplifikation des Kandidatengens CLIP2 erfolgt aus cDNA. Hierfür wird RNA aus einer normalen Schilddrüsenzelllinie wie unter B.6.4 beschrieben isoliert und in cDNA umgeschrieben (Reverse Transkription - RT-PCR). Die nachfolgende PCR-Amplifikation von CLIP2 wird in zwei Ansätzen mit unterschiedlichen DNA-Polymerasen ausgetestet.

#### B.7.1.1 Reverse Transkription (RT-PCR)

##### MATERIAL

- SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)
  - Oligo(dT)<sub>20</sub> (50 µM)
  - 10x RT buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl)
  - 25 mM MgCl<sub>2</sub>
  - 0.1 M DTT
  - 10 mM dNTP mix
  - SuperScript™ III RT (200 U/µl)
  - RNaseOUT™ (40 U/µl)
  - E. coli* RNase H (2 U/µl)
  - DEPC-treated water
- Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)
 

10 mM Tris (Merck)	1,2 g
1 mM EDTA (Merck)	0,37 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
mit HCl pH 7,5 einstellen	
autoklavieren	
- PCR Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)

## DURCHFÜHRUNG

In die Reverse Transkription werden 5 µg RNA in 8 µl DEPC-Wasser eingesetzt. Auf Eis werden 1 µl Oligo(dt)<sub>20</sub>-Primer und 1 µl dNTPs hinzugegeben. Der Ansatz wird für 5 min bei 65°C denaturiert und anschließend mindestens 1 min auf Eis abgekühlt. Danach wird der cDNA-Synthese-Mix folgendermaßen auf Eis pipettiert und zur Probe hinzugegeben:

10x RT buffer	2 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 µl
0.1 M DTT	2 µl
RNaseOUT™	1 µl
SuperScript™ III RT	1 µl
	<u>10 µl</u>

Die cDNA-Synthese erfolgt bei 50°C für 50 min. Anschließend wird die Reaktion durch eine 5-minütige Inkubation bei 85°C beendet und es werden 80 µl RNase-Mix (79 µl 1 x TE und 1 µl *E. coli* RNase H) auf Eis hinzugegeben. Der Verdau überschüssiger RNA erfolgt für 20 min bei 37°C. Die cDNA kann bei -20°C gelagert werden.

### **B.7.1.2 PCR-Amplifikation von CLIP2**

#### MATERIAL

- Cresol Red, 10 x  
Ficoll 400 (Fluka) 10 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 100 ml
- dNTP Mix, 10 mM (Fermentas)
- Expand Long Template PCR System (Roche)  
Expand Long Template buffer 1, 10 x mit 17,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
Expand Long Template Enzyme mix (Thermostabile Taq DNA-Polymerase und thermostabile Tgo DNA-Polymerase mit 3'-5'-exonuclease-*proofreading*-Aktivität)
- Größenstandard  
λ DNA-HindIII, 500 ng/µl (New England Biolabs)  
φX174 DNA-HaeIII, 1.000 ng/µl (New England Biolabs)
- PCR Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Pfu Ultra Hotstart DNA-Polymerase (Stratagene)
- 10 x Pfu Ultra HF Reaction Buffer (Agilent)
- Primer für CLIP2-Gen, lyophilisiert, Sequenz(5'-3') (Sigma)  
Stocklösung: 100 µM (gelöst in TE-Puffer); 1:4 Verdünnung mit TE-Puffer: 25 µM
  - Clip2\_f\_001 5' GTGACTAGTGCCACCATG CAGAAGCCCAGCGGCCTGAAG 3'
  - Clip2\_r\_002 5' GGCCTAGTTCAGTGCTTGTCTCTTGTCTGAGC 3'

- Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)
  - 10 mM Tris (Merck) 1,2 g
  - 1 mM EDTA (Merck) 0,37 g
  - H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml
  - mit HCl pH 7,5 einstellen
  - autoklavieren

DURCHFÜHRUNG

Die Amplifikation von CLIP2 wird in zwei unterschiedlichen PCR-Ansätzen (5 x Ansatz) ausgetestet, die folgendermaßen pipettiert werden:

Amplifikation mit dem *Expand Long Template* Enzym-Mix

	1 x Ansatz	5 x Ansatz
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	6,33 µl	31,65 µl
Expand Long Template buffer 1	1 µl	5 µl
Cresol Red 10 x	1 µl	5 µl
dNTP Mix 10 mM	0,2 µl	1 µl
Expand Long Template Enzyme mix	0,07 µl	0,35 µl
Primer forward (25 mM)	0,2 µl	1 µl
Primer reverse (25 mM)	0,2 µl	1 µl
cDNA	1 µl	5 µl
<b>Gesamt</b>	<b>10 µl</b>	<b>50 µl</b>

Amplifikation mit der *Pfu Ultra Hotstart* DNA-Polymerase

	1 x Ansatz	5 x Ansatz
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	7,7 µl	38,5 µl
10 x Pfu Ultra HF Reaction Buffer	1 µl	5 µl
dNTP Mix 10 mM	0,2 µl	1 µl
Pfu Ultra Hotstart DNA-Polymerase	0,2 µl	1 µl
Primer forward (25 mM)	0,2 µl	1 µl
Primer reverse (25 mM)	0,2 µl	1 µl
cDNA	1 µl	5 µl
<b>Gesamt</b>	<b>10,5 µl</b>	<b>52,5 µl</b>

Die PCR wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt 1	93°C für 2 min	
Schritt 2	93°C für 30 sec	Schritte 2-4 werden in 34 Zyklen wiederholt (Insgesamt 35 Zyklen)
Schritt 3	65°C für 30 sec	
Schritt 4	68°C für 5 min*	*Schritt je Zyklus 20 sec länger
Schritt 5	72°C für 7 min	
Schritt 6	4°C ∞	

Die PCR-Amplifikate werden anschließend in einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt (120 V, 1 h). Die DNA-Bande von Interesse wird unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das DNA-Fragment kann bei -20°C gelagert werden.



### B.7.1.3 Agarosegel-Extraktion von DNA-Fragmenten

#### MATERIAL

- GeneJET™ Gel Extraction Kit (Fermentas)
  - Binding Buffer
  - Wash Buffer – vor der Benutzung mit dem 5-fachen Volumen Ethanol (100 %) versetzt
  - Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)
  - GeneJET™ Purification Columns
- Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus)

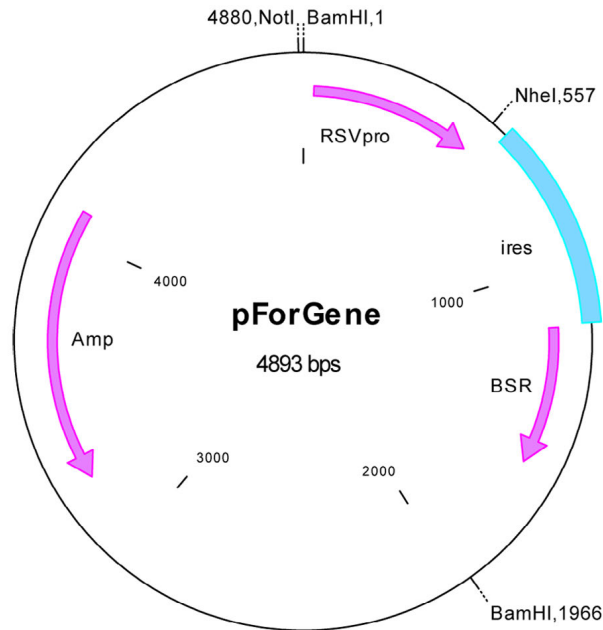
#### DURCHFÜHRUNG

Die ausgeschnittene Gelbande wird gewogen und mit demselben Volumen (Volumen:Gewicht) an Bindepuffer versetzt. Das Gel-Gemisch wird bei 50-60°C für 10 min inkubiert. Wenn das Gel komplett aufgelöst ist, werden bis zu 800 µl der Lösung auf ein GenJET™-Aufreinigungssäulchen überführt und 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Dieser Schritt wird solange wiederholt, bis die gesamte Gellösung auf das Säulchen aufgetragen ist. Als Nächstes werden 700 µl Waschpuffer auf das Säulchen gegeben und für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wird mit 50 µl Elutionspuffer in einem 1-minütigen Zentrifugationsschritt (12.000 x g) eluiert.

### B.7.2 Klonierung

Das amplifizierte DNA-Fragment, welches das Gen CLIP2 enthält, sowie der Vektor pForGene, in den CLIP2 integriert werden soll, werden mit Restriktionsenzymen verdaut und danach aufgereinigt. Die so erzeugten kompatiblen überhängenden Enden von DNA-Fragment und Vektor werden ligiert. Anschließend erfolgt die Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien.

Der verwendete Vektor pForGene (Abb. 15) ist 4893 bp groß und ermöglicht die konstitutive Überexpression eines inserierten Gens durch den RSV(Rous-Sarkom-Virus)-Promotor. Der Vektor besitzt ein Ampicillin- und ein Balstacidin-Resistenzgen, wodurch transformierte *E. coli*-Zellen und stabil transfizierte Zelllinien selektioniert werden.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pForGene**

Die Charakteristika des pForGene-Vektors sind vereinfacht dargestellt. Der RSV (Rous-Sarkom-Virus)-Promotor wird für die effiziente Überexpression der inserierten cDNA in eukaryotischen Zellen benötigt. Die Ampicillin- und Blasticidin-Resistenzgene ermöglichen die Selektion transformierter *E. coli*-Zellen und stabil transfizierter Zelllinien. Des Weiteren besitzt der Vektor eine IRES (*internal ribosome entry site*)-Sequenz, welche die Co-Expression eines Reportergens ermöglicht. Aufgelistet sind wichtige Restriktionsschnittstellen, die für die Insertion des gewünschten DNA-Fragments und die Linearisierung des Vektors benötigt werden.

### B.7.2.1 Verdau von DNA-Fragment und Vektor

Der Verdau von DNA-Fragment (Insert) und Vektor erfolgt mit den Restriktionsenzymen SpeI und NheI, wodurch kompatible Enden für die Ligation entstehen.

#### MATERIAL

- BSA 100 x (New England Biolabs)
- Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP) (New England Biolabs)
- H<sub>2</sub>O Milli-Q (Millipore)
- NEBuffer 2 10 x (New England Biolabs)
- Restriktionsenzyme (New England Biolabs)

DURCHFÜHRUNG

Für den Verdau von Insert und Vektor werden folgende Ansätze pipettiert:

	<b>Verdau Insert</b>	<b>Verdau Vektor</b>
DNA	Aufgereinigtes DNA-Fragment 40 µl	Vektor-DNA (1 µg/µl) 10 µl
NEB-Puffer 2	5 µl	5 µl
BSA	0,5 µl	0,5 µl
Enzym	SpeI 1 µl	NheI 1 µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q	3,5 µl	33,5 µl

Die Ansätze werden über Nacht bei 37°C inkubiert. Um freie 5'-Enden des Vektors zu dephosphorylieren, werden am Folgetag 1 µl CIAP zum Vektor-Ansatz gegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. Dies verhindert eine Selbstligation des Vektors.

**B.7.2.1.1           Aufreinigung des Verdaus**MATERIAL

- GeneJET™ PCR Purification Kit  
Binding Buffer  
Wash Buffer – vor der Benutzung mit dem 5-fachen Volumen Ethanol (100 %) versetzt  
Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)  
GeneJET™ Purification Columns
- Zentrifuge Biofuge pico (Heraeus)

DURCHFÜHRUNG

Der verdaute Vektor und das verdaute DNA-Fragment werden jeweils mit demselben Volumen Bindepuffer versetzt. Die Probe wird auf ein GenJET™-Aufreinigungssäulchen überführt und 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Als Nächstes werden 700 µl Waschpuffer auf das Säulchen gegeben und für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Um Rückstände des Waschpuffers zu beseitigen, wird das leere Säulchen erneut für 1 min zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wird zweimal mit jeweils 35 µl Elutionspuffer in einem 1-minütigen Zentrifugationsschritt (12.000 x g) eluiert. Vor der Zentrifugation wird für 5 min bei RT inkubiert.

### B.7.2.2 Ligation und Transformation

#### MATERIAL

- DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (TaKaRa)  
Solution I: Enzyme Solution
- *E. coli*-DH5 $\alpha$  – kompetente Zellen
- LB-Platten mit Ampicillin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
 

LB Broth Base (Sigma)	18 g
Bacto™ Agar (BD)	13,5 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q (Millipore)	ad 900 ml
autoklavieren	
X-Gal (Sigma)	900 g
Ampicillin, 250 mg/ml (Sigma)	180 $\mu\text{l}$
Ca. 20 Petrischalen (Greiner Bio One) befüllen	
- 2YT Broth Medium
 

Bacto Tryptone (BD)	80 g
Select Yeast Extract (Sigma)	50 g
NaCl (Merck)	25 g
NaOH, 10N (Merck)	1250 g
H <sub>2</sub> O Milli-Q (Millipore)	ad 5000 ml
autoklavieren	

#### DURCHFÜHRUNG

Für die Ligation der kompatiblen Enden von DNA-Fragment und Vektor wird 1 Volumen Vektor-DNA mit 9 Volumen Insert-DNA und 10 Volumen Ligation-Kit eingesetzt. Auf Eis werden 0,5  $\mu\text{l}$  Vektor-DNA (100 ng/ $\mu\text{l}$ ), 4,5  $\mu\text{l}$  Insert-DNA (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) und 5  $\mu\text{l}$  Ligation-Lösung Nr.1 pipettiert. Zusätzlich werden eine Insert-Kontrolle (4,5  $\mu\text{l}$  Insert, 0,5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O und 5  $\mu\text{l}$  Ligation-Lösung Nr.1) und eine Vektor-Kontrolle (4,5  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu\text{l}$  Vektor und 5  $\mu\text{l}$  Ligation-Lösung Nr.1) angesetzt. Die Inkubation erfolgt für 30 min bei 16°C im Wasserbad. Für die Transformation werden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. Zu jedem Ansatz werden 50  $\mu\text{l}$  *E. coli*-DH5 $\alpha$  zugefügt und vorsichtig gemischt. Es folgt eine 20-minütige Inkubation auf Eis. Danach erfolgt ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C. Bevor die transformierten Zellen auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert werden, wird der Transformations-Mix 2 min auf Eis gekühlt. Die Platten werden sodann über Nacht bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag werden Einzelkolonien gepickt und in eine 96-Well-Platte mit 100  $\mu\text{l}$  2YT Broth Medium pro Well überimpft. Von dieser Kultur werden 20  $\mu\text{l}$  in 2 ml 2YT Broth Medium mit Ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) gegeben und für eine Plasmid-Mini-Präparation angezüchtet. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37°C.

### B.7.3 Plasmidpräparation

Zuerst erfolgt eine Plasmid-Mini-Präparation der angezüchteten Einzelkolonien. Die isolierte Plasmid-DNA wird anschließend einer Restriktionsanalyse unterzogen, um zu überprüfen, ob die Klone das CLIP2-Gen in korrekter Richtung inseriert haben. Von einem ausgewählten positiven Klon wird danach eine größere Bakterienkultur angesetzt werden. Hierzu werden 80 µl eines Klons aus dem 96-Well-Stock (siehe B.7.2.2) in 400 ml 2YT Broth Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) überimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Plasmid-DNA wird dann in einer Maxi-Präparation isoliert und anschließend einer ausführlicheren Restriktionsanalyse unterzogen.

#### B.7.3.1 Mini-Präparation

##### MATERIAL

- GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas)  
Resuspension Solution versetzt mit RNase  
Lysis Solution  
Neutralization Solution  
Wash Solution – vor der Benutzung mit dem 1,75-fachen Volumen Ethanol (100 %) versetzt  
Elution Buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5)  
GeneJET™ Spin Columns  
Collection Tubes (2 ml)
- Zentrifuge Multifuge 3 S-R (Heraeus)
- Zentrifuge BicoFuge pico (Heraeus)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (BD Falcon™)

##### DURCHFÜHRUNG

Die Übernachtskultur der Bakterien wird in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 3425 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird in 250 µl Resuspensions-Lösung resuspendiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 250 µl Lysis Solution, wobei die Lösung gut durchmischt wird. Um die Lyse zu stoppen wird die Probe in ein Reaktionsgefäß mit 350 µl Neutralisierungslösung überführt und gut durchmischt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g für 5 min. Der Überstand wird auf ein GeneJET-Säulchen überführt und für 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Danach wird die auf dem Säulchen gebundene DNA zweimal mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Hierbei wird jeweils 1 min bei 12.000 x g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Das leere Säulchen wird anschließend nochmals für 1 min

bei 12.000 x g zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Schluss werden 100 µl Elutionspuffer auf das Säulchen gegeben und für 5 min inkubiert. Die Elution der DNA erfolgt in einem letzten Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g für 1 min.

### B.7.3.2 Maxi-Präparation

#### MATERIAL

- Ethanol, 70 % (Merck)
- Isopropanol (Merck)
- LyseBlue reagent (Qiagen)
- QIAGEN® Plasmid Purification Maxi Kit (Qiagen)
  - Puffer P1
  - Puffer P2 (versetzt mit LyseBlue reagent)
  - Puffer P3
  - Puffer QBT
  - Puffer QC
  - Puffer QF
- Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer)
 

10 mM Tris (Merck)	1,2 g
1 mM EDTA (Merck)	0,37 g
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 1000 ml
mit HCl pH 7,5 einstellen	
autoklavieren	
- Zentrifuge Multifuge 3 S-R (Heraeus)
- Zentrifuge BicoFuge pico (Heraeus)
- Zentrifugengefäße
- Zentrifugenröhrchen 50 ml (BD Falcon™)

#### DURCHFÜHRUNG

Die 400 ml Übernachtskultur der Bakterien wird in ein Zentrifugengefäß überführt und 30 min bei 3425 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und in ein Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zugabe von 10 ml Lysepuffer P2 (versetzt mit LyseBlue Reagenz) wird die Lösung gut geschüttelt bis sie gleichmäßig blau gefärbt ist. Es folgt eine 5-minütige Inkubation bei RT. Danach werden 10 ml Neutralisationspuffer P3 zugegeben, die Lösung gut durchmischt (wobei die Lösung wieder farblos wird) und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein 30-minütiger Zentrifugationsschritt bei 3425 x g und 4°C. 5 min vor Ende der Zentrifugation werden die Säulen in einen Ständer mit Auffangbehälter gestellt und mit 10 ml Puffer QBT equilibriert. Der Überstand aus dem Zentrifugationsröhrchen wird vorsich-

tig auf die equilibrierte Säule gekippt und durch die Säule laufen gelassen. Anschließend lässt man zweimal je 30 ml Waschpuffer QC durch die Säule laufen. In ein neues Zentrifugationsröhrchen werden 12,5 ml Isopropanol vorgelegt. Die DNA wird sodann mit 15 ml Elutionspuffer QF in das Röhrchen mit Isopropanol eluiert. Nach Mischen der Lösung wird die gefällte DNA 30 min bei 3425 x g und 4°C zentrifugiert. Daraufhin wird der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgt ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 3425 x g und 4°C wonach der Überstand abgekippt wird. Das Pellet wird an der Luft getrocknet und über Nacht bei 4°C in 300 µl TE-Puffer gelöst. Am nächsten Tag erfolgt die Bestimmung der DNA-Konzentration wie unter B.2.1.2 beschrieben. Die DNA wird mit TE-Puffer auf 1 µg/µl verdünnt.

#### **B.7.4 Restriktionsanalyse des Plasmids**

##### MATERIAL

- BSA 100 x (New England Biolabs)
- Größenstandard  
λ DNA-HindIII, 500 ng/µl (New England Biolabs)  
φX174 DNA-HaeIII, 1.000 ng/µl (New England Biolabs)
- H<sub>2</sub>O Milli-Q (Millipore)
- NEBuffer 1-4 10 x (New England Biolabs)
- Restriktionsenzyme (New England Biolabs)  
BamHI, BglII, EcoRV, HindIII, NcoI, NheI, NotI, SpeI, Sall, XmnI
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- 96-Well-Platten (ABgene)

##### DURCHFÜHRUNG

Für einen Restriktionsenzymverdau werden die optimalen Pufferbedingungen anhand der *Activity Chart for Restriction Enzymes* (New England Biolabs) ausgewählt.

Die Ansätze für den Verdau werden folgendermaßen pipettiert:

	Restriktionsverdau nach Mini-Präparation	Restriktionsverdau nach Maxi-Präparation
NEB-Puffer	2 µl	2 µl
(BSA)	0,2 µl	0,2 µl
Enzym 1	0,2 µl	0,25 µl
(Enzym 2)	0,2 µl	0,25 µl
(Enzym 3)	0,2 µl	0,25 µl
DNA	5 µl	0,5 µl
H <sub>2</sub> O Milli-Q	ad 20 µl	ad 20 µl

Der Restriktionsverdau erfolgt bei 37°C für 2 h nach Mini-Präparation und über Nacht nach Maxi-Präparation. Anschließend werden die erhaltenen DNA-Fragmente in einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt (100 V, 1 h) und überprüft.

### B.7.5 Sequenzierung

Die Sequenz des im Vektor inserierten Kandidatengens CLIP2 wird überprüft, um eventuelle Fehler der DNA-Polymerase bei der selektiven Amplifizierung des Gens (siehe B.7.1.2) auszuschließen. Die Sequenzierung erfolgt nach der Didesoxymethode von Sanger (Sanger et al., 1977), welche auf der enzymatischen PCR-Synthese unterschiedlich langer DNA-Fragmente beruht. Durch den Einsatz Fluoreszenzfarbstoffgekoppelter Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP), die keine 3'-Hydroxylgruppe besitzen, kommt es im neusynthetisierten Strang zu einem Kettenabbruch. Es entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die in einer Sequenziermaschine in dünnen Kapillaren gelelektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch einen Laser werden die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe der vier Basen angeregt und das emittierte Licht verschiedener Wellenlängen detektiert. Die Abfolge der Fluoreszenzfarbstoffe am Detektor gibt direkt die Sequenz der analysierten DNA wieder. Die Aufzeichnungen des Detektors werden gespeichert und in einem sogenannten Chromatogramm dargestellt.

### MATERIAL

- DNA Sequencer ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems & Hitachi)
- DMSO (Sigma)
- DEPC H<sub>2</sub>O
- Ethanol, 100%, 70% (Merck)



- Ethylendiamintetraacetic acid (EDTA), 0,5 mM  
 EDTA (Sigma) 186,1 g  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 500 ml  
 mit NaOH pH 8 einstellen  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
 autoklavieren
- EDTA, 125 mM  
 EDTA, 0,5 M 2,5 ml  
 H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> 7,5 ml
- 96-Well-Platten (ABgene)
- PCR-Maschine GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Primer für CLIP2-Gen, lyophilisiert, Sequenz(5'-3') (Sigma)  
 Stocklösung: 100 µM (gelöst in TE-Puffer); 1:4 Verdünnung: 25 µM
  - Clip2\_f\_001 5' GTGACTAGTGCCACCATG CAGAAGCCCAGCGGCCTGAAG 3'
  - Clip2\_r\_002 5' GGCCTAGTTCAGTGCTTGTCTCTTGTCTGAGC 3'
  - Clip2\_f\_003 5' CCCCATGGGCGGACATCTACTGGGT 3'
  - Clip2\_f\_004 5' GGGCTCGGGGAGTGATGCCACTCCG 3'
  - Clip2\_f\_005 5' CCATCCACAAAGTGATCCGTATCGGC 3'
  - Clip2\_f\_006 5' CGAGGTGGAGAAGGAGATTGCCCTGC 3'
  - Clip2\_f\_007 5' GGAGGAGGAGCTCACCTGCGCCGAG 3'
  - Clip2\_f\_008 5' CCTCGGACCACCAGAAGTCCCTGGAG 3'
  - Clip2\_f\_009 5' GGATGCCGAGCTGCGTGTGCACGAGC 3'
  - Clip2\_f\_010 5' GAGATGCTCAGGGCCCAAGTAAGTGC 3'
  - Clip2\_f\_011 5' CCCTGTCGGATCAGAGGCGCTACTCC 3'
  - Clip2\_r\_012 5' GCTGGTGGATGCCGTTTGAGAACCG 3'
  - Clip2\_r\_013 5' ACCCAGTAGATGTCCGGCCCATGGGG 3'
  - Clip2\_r\_014 5' CGGAGTGGGCATCACTCCCCGAGCCC 3'
  - Clip2\_r\_015 5' GCCGATACGGATCACTTTGTGGATGG 3'
  - Clip2\_r\_016 5' GCAGGGCAATCTCCTTCTCCACCTCG 3'
  - Clip2\_r\_017 5' CTCGGCGCAGGGTGAGCTCCTCTCC 3'
  - Clip2\_r\_018 5' CTCCAGGGACTTCTGGTGGTCCGAGG 3'
  - Clip2\_r\_019 5' GCTCGTGACACGCAGCTCGGCATCC 3'
  - Clip2\_r\_020 5' GCACTTACTTGGGCCCTGAGCATCTC 3'
  - Clip2\_r\_021 5' GGAGTAGCGCCTCTGATCCGACAGGG 3'
  - Clip2\_f\_022 5' CGGTTCTGCAAACGGCATCCACCAGC 3'
- Sequenzierplatten mit Barcode (Thermo Fisher)
- The BigDye® Terminator (BDT) v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)  
 Ready Reaction Mix BigDye  
 BigDye Terminator v1.1/3.1 Sequencing Buffer (5x)
- Zentrifuge Multifuge 3 S-R (Heraeus)

## DURCHFÜHRUNG

Die in der Sequenzierung eingesetzten Primer werden vorher in PCR-Analysen durch Kombination verschiedener *forward* und *reverse* Primer auf ihre Spezifität getestet. Die PCR erfolgt mit Hilfe des *Expand Long Template Systems* wie unter B.7.1.2 beschrieben.

Für die Sequenzierung mit 22 Primern wird zunächst ein 24 x Mastermix angesetzt:

	1 x Ansatz	24 x Ansatz
DMSO	0,5 µl	12 µl
DEPC H <sub>2</sub> O	4,1 µl	98,4 µl
BDT Sequencing Buffer 5x	1 µl	24 µl
Ready Reaction Mix BigDye	2 µl	48 µl
<b>Gesamt</b>	<b>7,6 µl</b>	<b>182,4 µl</b>

Pro Reaktion werden 7,6 µl des Mastermix in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Dann werden 0,4 µl Primer (0,25 µM) und 2 µl DNA-Template (100 ng/µl) hinzugegeben und die Platte kurz zentrifugiert.

Die Sequenzierungs-PCR wird nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt 1	96°C für 4 min	Schritte 2-4 werden in 44 Zyklen wiederholt (Insgesamt 45 Zyklen)
Schritt 2	95°C für 30 sec	
Schritt 3	50°C für 20 sec	
Schritt 4	60°C für 4 min	
Schritt 5	4°C ∞	

Die DNA-Amplifikate werden nach der Sequenzierungs-PCR mit einer EDTA/Ethanol-Fällung aufgereinigt. Hierfür werden in jedes Well 2,5 µl EDTA (125 mM) pipettiert und mit der Probe gemischt. Die Platte wird 2 min bei 900 x g abzentrifugiert. Danach werden 30 µl 100%iges Ethanol zu jedem Ansatz pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wird die DNA durch Zentrifugation der Platte bei 3425 x g für 30 min präzipitiert. Der Überstand wird durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (maximal 9 x g), bei dem die Platte kopfüber auf ein Papiertuch gelegt wird, entfernt. Um das Pellet zu waschen, werden zu jedem Ansatz 50 µl 70%iges Ethanol pipettiert und die Platte für 3 min bei 3425 x g zentrifugiert. Der Überstand wird wie oben beschrieben entfernt. Die DNA-Pellets werden abschließend 10 min bei 70°C getrocknet und in 30 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst. Da im DNA-Sequenzierer nur komplette Platten analysiert werden können, werden leere Wells ebenfalls mit 30 µl H<sub>2</sub>O gefüllt.

Die Sequenzierung der Platten wird am GAC (Genome Analysis Center) des Helmholtz Zentrum München durchgeführt. Der ABI 3730 DNA-Sequenzierer mit 48 Kapillaren wird vom Personal des GAC bedient. Die Auswertung der Sequenzierung, welche die manuelle Korrektur der Sequenzen und den Vergleich mit der Referenzsequenz beinhaltet, erfolgt mit Hilfe der Programme *Staden Package* und *BioEdit*.

## B.7.6 Linearisierung des Vektors

### MATERIAL

- BSA, 100 x (New England Biolabs)
- Chloroform (Merck)
- Ethanol, 80 % (Merck)
- H<sub>2</sub>O Milli-Q (Millipore)
- Isopropanol (Merck)
- Natriumacetat, 3 M  
Natriumacetat (Merck) 246 g  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 600 ml  
mit Eisessig pH 4,8 einstellen  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 1000 ml  
autoklavieren
- NEBuffer 3, 10 x (New England Biolabs)
- Phenol-Chloroform-Gemisch  
Phenol (Merck) und Chloroform (Merck) im Verhältnis 1:1 gemischt
- Restriktionsenzym NotI (New England Biolabs)

### DURCHFÜHRUNG

Für die Linearisierung des Vektors wird folgender Ansatz pipettiert:

	<b>Vektor-Linearisierung</b>
H <sub>2</sub> O Milli-Q	54 µl
NEB-Puffer 3	40 µl
BSA	4 µl
Enzym NotI	2 µl
DNA aus Maxipräp (1 µg/µl)	300 µl

Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag mittels Gelelektrophorese kontrolliert. Nach erfolgreicher Linearisierung werden zum Verdau 400 µl Phenol-Chloroform gegeben. Der Ansatz wird gut durchmischt und 5 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Chloroform versetzt, gut durchmischt und 5 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere Phase wird erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt und es erfolgt die Zugabe von 400 µl Isopropanol und 40 µl 3M Natriumacetat. Die DNA wird in einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 80%igem Ethanol gewaschen. Nach 5-minütiger Zentrifugation wird das Pellet 10-20 min bei RT getrocknet und in 300 µl H<sub>2</sub>O Milli-Q gelöst.

### B.7.7 Transfektion der Zelllinien

In dieser Arbeit wird die Fremd-DNA über kationische Lipidvesikel in die Zellen eingebracht. Das zugrunde liegende Prinzip ist hierbei die Komplexbildung positiv geladener Liposomen mit der negativ geladenen DNA (DNA-Lipidkomplex). Diese Komplexe sind in der Lage mit der Zellmembran zu fusionieren, woraufhin es zur Freisetzung der DNA in das Zytoplasma der Zelle kommt.

#### MATERIAL

- Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent (Invitrogen)
- Kulturmedium RPMI/10 % FBS  
 RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA) 500 ml  
 Fetal Bovine Serum - FBS (Sigma) 55 ml  
 PenStrep - Penicillin 10.000 Units/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml (Gibco) 2,5 ml
- RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA)
- Zellkulturplatten, 6-Well (BD Falcon™)

#### DURCHFÜHRUNG

24 h vor der Transfektion wird die Zelllinie in 6-Well-Zellkulturplatten angezüchtet. Pro Well werden  $6,5 \times 10^5$ - $1 \times 10^6$  Zellen angezüchtet, so dass am nächsten Tag möglichst ein Konfluenzgrad von 90 % erreicht wird. Für die Transfektion werden Komplexe aus DNA (µg) und Lipofectamine (µl) im Verhältnis 1:1 bis 1:5 hergestellt. Für jedes Well wird ein solcher Transfektionsansatz vorbereitet. Hierzu werden in zwei separaten Reaktionsgefäßen vorsichtig a) 6, 10 oder 20 µl Lipofectamine und b) 4, 6 oder 8 µg Vektor-DNA mit 250 µl serumfreiem Medium gemischt. Es erfolgt eine 5-minütige Inkubation bei RT. Danach werden die zwei Ansätze gemischt und für die Bildung der DNA-Lipidkomplexe 20 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit werden das Medium in den 6-Well-Zellkulturplatten abgesaugt und 2 ml frisches Medium in jedes Well gegeben. Anschließend werden 500 µl des Transfektionsansatzes zu den Zellen gegeben und durch Schwenken der Platten gut gemischt. Nach 6 h Inkubation im Brutschrank, wird das Transfektionsgemisch abgenommen und die Zellen mit 2 ml normalem Kulturmedium (RPMI/10 % FBS) überschichtet.

### B.7.8 Konzentrationstest der Antibiotika Blastacidin und Puromycin

Die Selektion stabil transfizierter Zelllinien erfolgt durch die Zugabe von Antibiotika. In Konzentrationstests soll die Menge der einzusetzenden Antibiotika ermittelt werden, bei der alle nicht transfizierten Zellen in einem Zeitraum von einer Woche absterben.

#### MATERIAL

- Blastacidin S HCl, Stocklösung 6 mg/ml (Invitrogen)
- Kulturmedium RPMI/10 % FBS
 

RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA)	500 ml
Fetal Bovine Serum - FBS (Sigma)	55 ml
PenStrep - Penicillin 10.000 Units/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml (Gibco)	2,5 ml
- PBS-Puffer, 1x (PBS Dulbecco ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>), Instamed 9,55 g / l (Biochrom)
 

H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>	ad 10 l
autoklavieren	
- Puromycin, Stocklösung 1 mg/ml (PAA)
- TrypLE™ Express (Gibco)
- Zellkulturplatten, 12-Well (BD Falcon™)

#### DURCHFÜHRUNG

Der Effekt der Antibiotika Blastacidin und Puromycin auf das Zellwachstum der Zelllinie TPC-1 wird anhand von Wachstumskurven bestimmt. Hierfür werden die Zellen in 12-Well-Platten kultiviert (10.000-20.000 Zellen/Well) und mit unterschiedlichen Blastacidin- bzw. Puromycin-Konzentrationen versetzt. Jede Konzentration wird für die Messung als Duplikat angesetzt. Blastacidin wird in sechs verschiedenen Endkonzentrationen eingesetzt: 0 µg/ml (Kontrolle), 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml und 15 µg/ml. Der Puromycin-Konzentrationstest erfolgt mit folgenden acht Konzentrationen: 0 µg/ml (Kontrolle), 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 5 µg/ml und 7,5 µg/ml. Um die Zellzahl an einem Messpunkt zu bestimmen, wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen und mit 300 µl Trypsin ca. 5 min trypsinisiert (Kontrolle unter dem Mikroskop). Die Zellsuspension wird gut gemischt und wie unter B.6.1 beschrieben mit dem *Coulter Counter* gezählt. Anhand der Messergebnisse wird eine Wachstumskurve erstellt.

### B.7.9 Selektion mit Blasticidin

#### MATERIAL

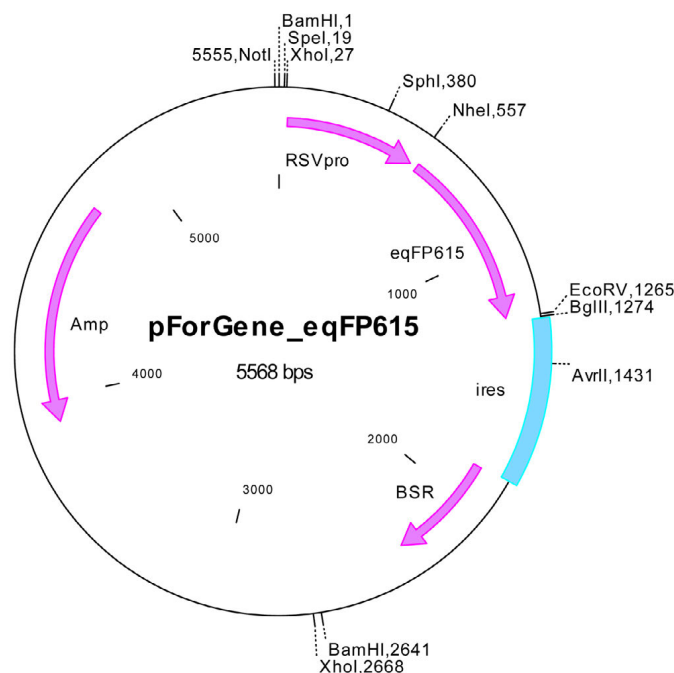
- Blasticidin S HCl, Stocklösung 6 mg/ml (Invitrogen)

#### DURCHFÜHRUNG

48 h nach der Transfektion erfolgt die Selektion mit Blasticidin bei einer Konzentration von 5 µg/ml. Um eine stabile Transfektion der Zellen zu erreichen erfolgt ca. jeden zweiten Tag ein Mediumwechsel mit neuer Blasticidin-Zugabe.

### B.7.10 Überprüfung der Transfektionseffizienz - FACS-Analyse

Um die Transfektionseffizienz zu überprüfen, wird die Zelllinie zusätzlich mit dem Vektor pForGene\_eqFP615 (Abb. 16) transfiziert. Im Vektor ist das proteinkodierende Gen eqFP615 unter der Kontrolle des RSV-Promotors inseriert.



**Abbildung 16: Schematische Darstellung des Vektors pForGene\_eqFP615**

Die Charakteristika des pForGene\_eqFP615-Vektors sind vereinfacht dargestellt. Das für ein rotfluoreszierendes Protein kodierende Gen eqFP615 ist unter der Kontrolle des RSV(Rous-Sarkom-Virus)-Promotors inseriert. Die Ampicillin- und Blasticidin-Resistenzgene ermöglichen die Selektion transformierter *E. coli*-Zellen und stabil transkribierter Zelllinien. Einige Restriktionsschnittstellen sind gezeigt.

EqFP615 ist ein rotfluoreszierendes Protein mit Extinktionsmaximum bei 559 nm und Emissionsmaximum bei 615 nm (unpublizierte Daten; das Protein wurde zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe von S. Lukyanov, Moskau, Russland). Es handelt sich um eine Mutante (Austausch von 8 Aminosäuren) des Wildtyp-Proteins eqFP578 aus der Seeanemone *Entacmaea quadricolor* (Merzlyak et al., 2007). Bei einer Anregung mit 575 nm kann bei erfolgreich transfizierten, also EqFP615-exprimierenden Zellen rote Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Fluoreszenzmessung erfolgt mittels Durchflusssyztometrie im FACS (*Fluorescence activated cell sorter*). Die Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und passieren dabei einen Laserstrahl.

### MATERIAL

- FACS-Gerät BD™ LSRII Flow Cytometer (Becton Dickinson)
- FACS-Röhrchen Falcon Round-Bottom Tube (BD Falcon™)
- PBS-Puffer, 1x (PBS Dulbecco ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>), Instamed 9,55 g / l (Biochrom)  
H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> ad 10 l  
autoklavieren
- Zentrifuge 5415D (Eppendorf)

### DURCHFÜHRUNG

Die transfizierten Zellen sowie eine nicht transfizierte Kontroll-Zelllinie werden wie unter B.6.1 beschrieben trypsiniert. Die entsprechende Zellzahl ( $2 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$  Zellen) wird in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (350 x g, 5 min). Das Pellet wird mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 400 µl PBS gelöst. Danach wird die Zellsuspension gut durchmischt, in ein FACS-Röhrchen überführt und im FACS gemessen.

## C ERGEBNISSE

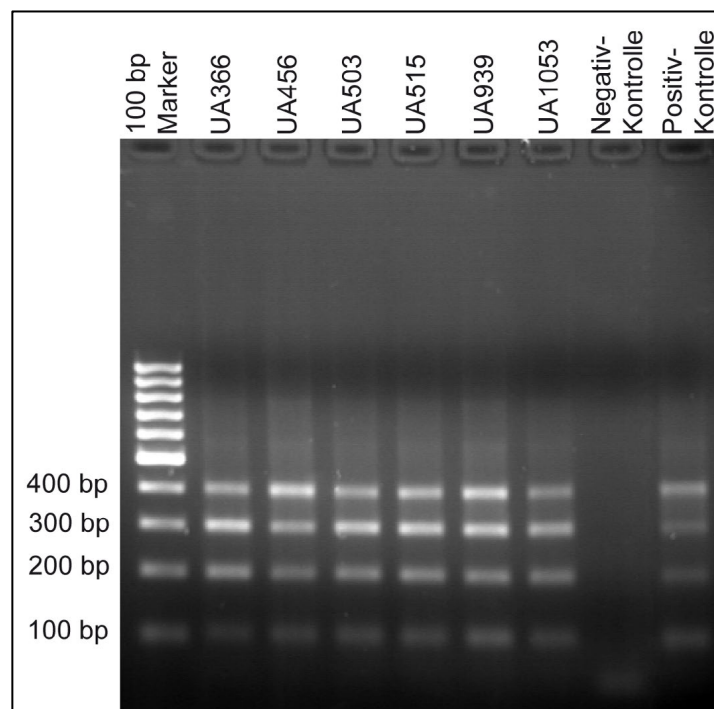
Im Rahmen des EU-Projektes GENRISK-T wurden in dieser Arbeit Array-CGH-Analysen an 80 humanen papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC) exponierter und nicht exponierter Patienten (<25 Jahre) durchgeführt. Dabei wurde zuerst ein Untersuchungskollektiv von 52 Fällen (*Discovery Set*) und anschließend ein zweites unabhängiges Validierungskollektiv von 28 PTC-Fällen (*Validation Set*) auf Kopienzahlveränderungen untersucht. Die resultierenden Daten wurden statistisch ausgewertet und auf Korrelation mit klinischen Daten oder Tumorphänotypen getestet. Dabei sollten mögliche strahlenassoziierte genomische Veränderungen identifiziert werden, die eine Korrelation mit der Strahlenexposition der Patienten aufweisen. Signifikante Veränderungen wurden anschließend mittels höher auflösender Oligonukleotid Array-CGH näher untersucht und mit Hilfe von Interphase-FISH-Analysen verifiziert. In interessanten Veränderungsbereichen wurden sodann tumorassoziierte Kandidatengene identifiziert. Für ausgewählte Kandidatengene wurde in einem nächsten Schritt die Expression auf mRNA- und Proteinebene mittels qRT-PCR-Experimenten und Immunhistochemie untersucht. Darüber hinaus wurden Arbeiten zur Etablierung von Schilddrüsen-Zellkulturmodellen für funktionelle Studien ausgewählter Kandidatengene durchgeführt.



## C.1 Array-CGH

### C.1.1 Qualitätskontrolle der DNA vor der Array-CGH

Vor den Array-CGH-Experimenten wurde die Qualität der isolierten Tumor-DNA mittels Multiplex-PCR überprüft. Hierbei kommt es zu einer Amplifikation vier nicht überlappender Bereiche des *housekeeping* Gens GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) mit Fragmentlängen von 100, 200, 300 oder 400 bp (van Beers et al., 2006). Die DNA-Qualität von Proben mit allen vier Amplifikaten wurde als *sehr gut*, mit drei Amplifikaten als *gut* und mit 2 Amplifikaten als *ausreichend* klassifiziert. DNA-Proben mit einem oder keinem Amplifikat wurden als qualitativ *nicht ausreichend* eingestuft. Alle 80 mit Hilfe der Multiplex-PCR untersuchten Tumorproben zeigten nach elektrophoretischer Auftrennung vier Banden und damit eine sehr gute DNA-Qualität (Abb. 17). Daher konnte die DNA von allen 80 Tumorproben für die nachfolgenden Array-CGH-Analysen eingesetzt werden.



**Abbildung 17: Elektrophoretische Auftrennung der DNA-Amplifikate nach Multiplex-PCR**

Die in der Multiplex-PCR generierten DNA-Amplifikate (Spur 2-7) wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Alle Proben weisen die vier DNA-Amplifikate mit den Längen 100, 200, 300 und 400 bp auf. Die DNA-Qualität der Proben wird dementsprechend als *sehr gut* klassifiziert.

### C.1.2 1 Mb BAC Array-CGH

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 80 PTC von Patienten <25 Jahre mittels 1 Mb BAC Array-CGH untersucht. Die methodischen Grundlagen wurden bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit „Nachweis chromosomaler Kopienzahlveränderungen in kindlichen papillären Schilddrüsenkarzinomen“ gelegt, die in der Arbeitsgruppe Zytogenetik am Institut für Molekulare Strahlenbiologie am Helmholtz Zentrum München angefertigt wurde. Die Daten für das gesamte PTC-Kollektiv wurden im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit erhoben.

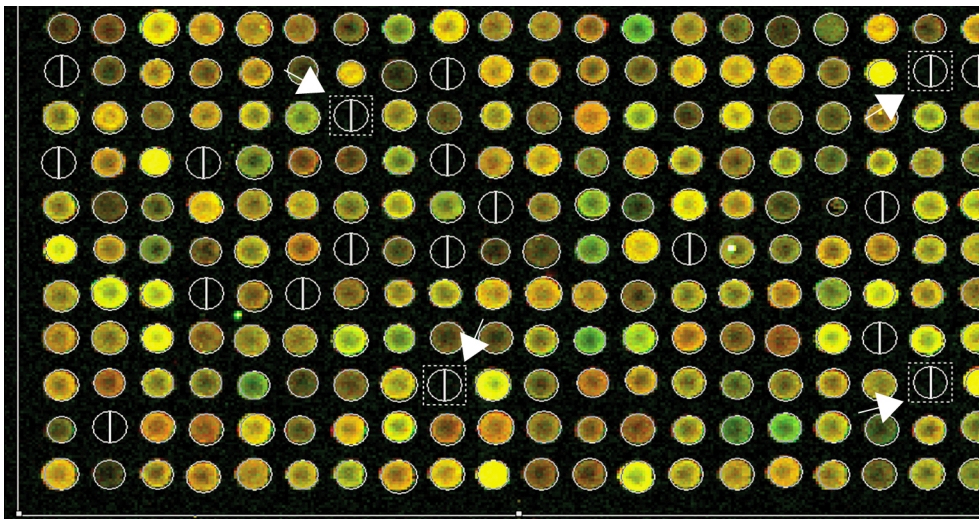
Die Untersuchung der PTC auf Kopienzahlveränderungen erfolgte zuerst an einem Untersuchungskollektiv (*Discovery Set*) von 52 Fällen (Patientendaten siehe Tabelle 2) und anschließend an einem zweiten unabhängigen Validierungskollektiv (*Validation Set*) von 28 PTC-Fällen (Patientendaten siehe Tabelle 3). Zur Kontrolle des Experiments wurde als Referenz-DNA genomische DNA des jeweils anderen Geschlechts eingesetzt (*Sex-Mismatch*). Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Arrays gescannt. Ziel der weiteren Datenauswertung war die Ermittlung von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten der untersuchten Tumor-DNA durch den Vergleich mit balancierter Referenz-DNA. Abschließend wurden innerhalb des zu analysierenden Tumorkollektives gemeinsame Veränderungsbereiche bestimmt. Aufgrund der *Sex-Mismatch*-Hybridisierung wurden die Geschlechtschromosomen in die Auswertungen nicht einbezogen.

### C.1.2.1 Qualitätsbeurteilung eines Array-CGH-Experiments

Im Anschluss an jedes Array-CGH-Experiment wurde dessen Qualität beurteilt.

Die Spezifität der Hybridisierung wurde nach dem Scannen der Arrays kontrolliert. Hierzu wurden die *Drosophila*-Kontroll-Klone auf dem Array analysiert, an welche bei spezifischer Hybridisierung keine humane DNA bindet (Abb. 18). Bei allen durchgeführten Array-CGH-Experimenten konnte eine spezifische Hybridisierung gezeigt werden.

Des Weiteren wurden nur hybridisierte Arrays in die Auswertung einbezogen, die nach erfolgter Datenauswertung mit MANOR (Neuvial et al., 2006) mindestens 80 % der BAC-Klone beinhalteten. Die Profile der durchgeführten Array-CGH-Analysen wiesen insgesamt relativ starke Schwankungen in den  $\log_2$ -Ratios auf. Dies kann auf die Heterogenität der Tumor-DNA zurückgeführt werden. Die Isolation der Tumor-DNA erfolgte aus Gefriergewebe, welches nicht mikrodisektiert wurde und daher neben Tumorzellen auch einen gewissen Anteil normaler Zellen enthielt. Die Standardabweichung eines Experiments, welche aus allen  $\log_2$ -Ratios der geglätteten Werte eines Arrays berechnet wird, gibt das Ausmaß des Rauschens des Datensatzes wieder. Array-CGH-Experimente mit einer Standardabweichung von über 0,55 wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

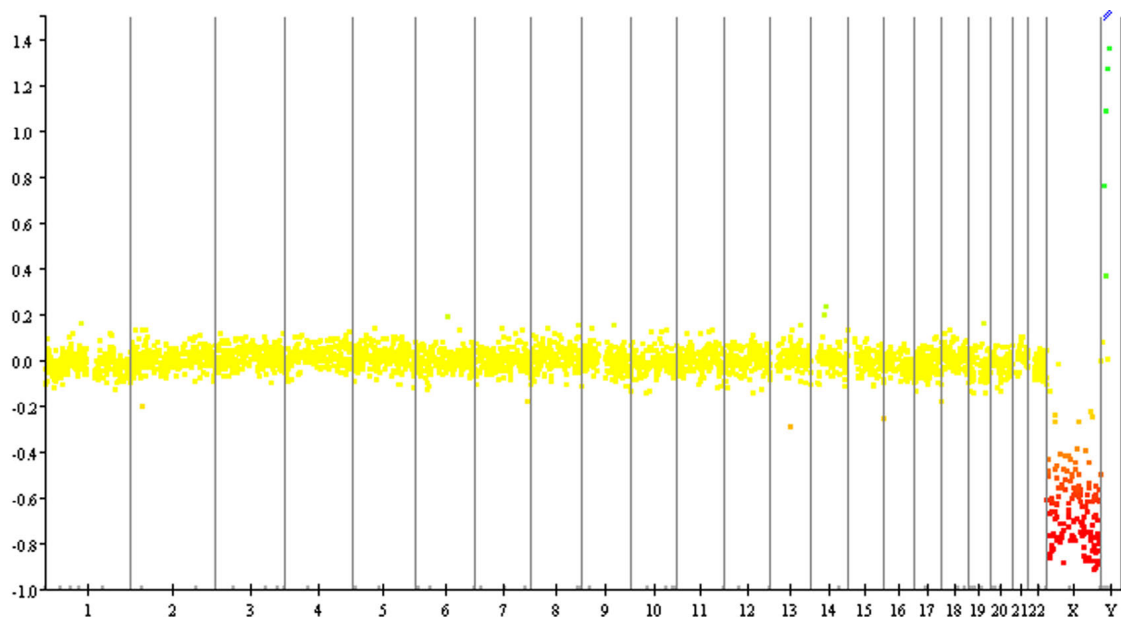


**Abbildung 18: Analyse der *Drosophila*-Kontroll-Klone auf dem 1 Mb Array**

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines gescannten 1 Mb BAC-Arrays, bei dem die Bilder der roten (Cy5) und grünen (Cy3) Fluoreszenzsignale übereinander gelegt sind. Dadurch kommt es zur Mischfarbe der Spots. Spots, die aufgrund eines negativen *Flaggings* nicht in die weitere Analyse eingehen, sind durch einen Kreis mit senkrechtem Strich gekennzeichnet. Darunter sind auch *Drosophila*-Kontroll-Klone (gestrichelte Umrandung um einen Spot, siehe Pfeile). Es ist deutlich zu erkennen, dass dort keine DNA gebunden hat. Dies zeigt die Spezifität der Hybridisierung.

### C.1.2.2 Kontrollhybridisierung

Um die Qualität der 1 Mb BAC-Arrays sowie der normalen Referenz-DNA zu kontrollieren, wurden Hybridisierungen mit normaler humaner Referenz-DNA (gepoolt von mehreren gesunden Individuen) durchgeführt. Hierbei wurden Cy3-markierte männliche normale Referenz-DNA und Cy5-markierte weibliche normale Referenz-DNA gemeinsam auf einen BAC-Array hybridisiert. Die Kontrollhybridisierungen mit normaler Referenz-DNA wiesen bis auf den zu erwartenden *Sex-Mismatch* ein unverändertes Profil auf (Abb. 19).



**Abbildung 19: Kontrollhybridisierung normaler Referenz-DNA**

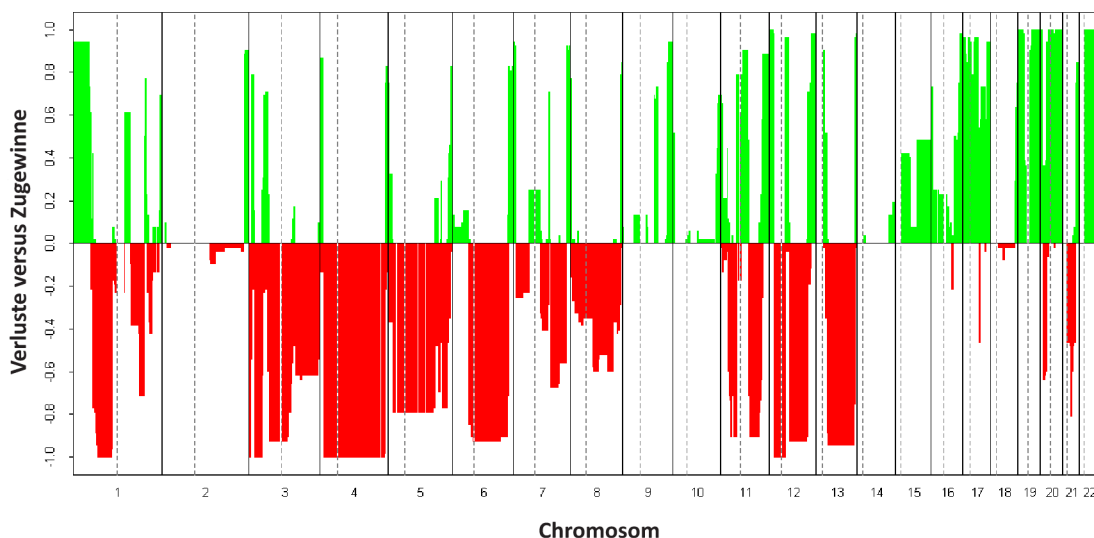
Gezeigt ist das genomweite Array-CGH-Profil eines 1 Mb BAC-Arrays nach Hybridisierung normaler humaner Referenz-DNA (männliche Referenz-DNA Cy3-markiert und weibliche Referenz-DNA Cy5-markiert). Die X-Achse gibt die physikalischen Positionen der einzelnen BAC-Klone entlang der Chromosomen 1-22, X und Y von pter nach qter an. Auf der Y-Achse sind die logarithmierten Werte der Intensitätsquotienten aus Cy3- und Cy5-Fluoreszenz ( $\log_2$ -Ratios) für jeden BAC-Klon gezeigt. Normale Bereiche sind in gelb, DNA-Zugewinne in grün, Amplifikationen in blau und DNA-Verluste in rot dargestellt. Die Kontrollhybridisierung mit normaler Referenz-DNA zeigt bis auf den zu erwartenden *Sex-Mismatch* ein unverändertes Profil.

### C.1.2.3 Ergebnisse der Array-CGH-Analysen von 52 PTC (Untersuchungskollektiv)

#### C.1.2.3.1 Häufigkeitsverteilung chromosomaler Aberrationen

Insgesamt konnte in den 52 PTC des Untersuchungskollektivs (Patientendaten siehe Tabelle 2) eine große Anzahl an Kopienzahlveränderungen nachgewiesen werden. Aufgrund der *Sex-Mismatch*-Hybridisierung wurden die Geschlechtschromosomen X und Y nicht in die Auswertung einbezogen. Die Gesamtheit der ermittelten chromosomalen Veränderungen ist in Anhang 1 für die einzelnen Fälle aufgelistet.

Für die Berechnung der Häufigkeitsverteilung der chromosomalen Aberrationen wurden die Häufigkeiten von DNA-Zugewinnen bzw. -Verlusten für jeden BAC-Klon eines Arrays ermittelt. Das Häufigkeitsprofil der Kopienzahlveränderungen ist in Abbildung 20 für die Gesamtzahl der 52 PTC dargestellt. Es wurden insgesamt 112 gemeinsame Veränderungsbereiche bestimmt. Allgemein traten DNA-Zugewinne (81 veränderte Bereiche) häufiger auf als DNA-Verluste (63 veränderte Bereiche).



**Abbildung 20: Häufigkeitsprofil der mittels 1 Mb BAC Array-CGH nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen in 52 PTC**

Auf der X-Achse wird für jeden BAC-Klon die physikalische Position auf dem jeweiligen Chromosom (1-22) von pter nach qter angegeben. Die Kopienzahlveränderungen werden entlang der Chromosomen von 1pter bis 22qter entsprechend ihrer Häufigkeiten (+/- 1,0 = 100 %) im Untersuchungskollektiv dargestellt. DNA-Zugewinne sind in grün, DNA-Verluste in rot angezeigt. Die gestrichelten Linien geben die Lage der Zentromere an.

Fünf Bereiche auf den Chromosomen 1p32.3-13.3, 3p26.3-26.1, 3p25.1-22.2, 4p16.1-q34.3 und 12p13.1-q13.11 zeigten in allen 52 PTC DNA-Verluste. Die sechs chromosomalen Bereiche 12p13.33-13.1, 19p13.3-13.11, 19q12-13.43, 20p13, 20p12.1-q13.33 und 22cen-q13.33 wiesen in allen Fällen DNA-Zugewinne auf.

Die häufigsten wiederkehrenden DNA-Zugewinne (in  $\geq 70\%$  der untersuchten Fälle) befanden sich auf den Chromosomen 1, 2, 3p, 4, 5, 6q, 7, 8, 9q, 11, 12, 13q, 16, 17, 19, 20p, 21q und 22q wohingegen die häufigsten DNA-Verluste (in  $\geq 50\%$  der untersuchten Fälle) auf den Chromosomen 1p, 3, 4p, 5, 6, 7q, 8q, 11, 12, 13q, 20p und 21q auftraten. Die genauen chromosomalen Lokalisationen dieser Veränderungen sowie deren Größe können den Tabellen 15 und 16 entnommen werden.

**Tabelle 15: Wiederkehrende DNA-Zugewinne in mindestens 70 % der 52 PTC (38 Bereiche)**

Chromosom	Banden	Beginn (BAC)	Beginn (bp)*	Ende (BAC)	Ende (bp)*	Größe des Bereichs [Mb]
1	p36.33-34.1	RP11-465B22	929301	RP11-182I23	44835173	43,9
1	p34.1-33	RP11-420M12	45577278	RP11-330M19	48429018	2,9
1	q32.1	RP11-572A16	202153138	RP11-534L20	206755096	4,6
2	p25.3	GS1-68F18	235263	RP11-168K7	1803280	1,6
2	q37.1-37.3	RP11-419H23	232079655	RP11-556H17	242146436	10,1
3	p25.3-25.1	RP11-439F4	9829852	RP11-316A10	15071971	5,2
3	p22.1-21.1	RP11-437N10	42524397	RP11-122D19	54212394	11,7
4	p16.3-16.1	RP11-296G16	1076598	RP11-117J13	8261577	7,2
4	q35.1-35.2	RP11-451F20	184129856	CTC-963K6	190782221	6,7
5	p15.33	CTD-2265D9	2518762	RP11-20K9	3286431	0,8
5	q35.2-35.3	CTC-355H1	175208164	CTC-240G13	180693002	5,5
6	q25.3-27	RP11-266C7	158325868	CTB-57H24	170885075	12,6
7	p22.3-22.1	CTB-164D18	94136	RP11-425P5	6480088	6,4
7	q22.1	RP4-550A13	98867726	RP11-333G13	101602962	2,7
7	q36.1-36.3	RP11-24N19	148595274	CTB-3K23	158932231	10,3
8	p23.3-23.2	RP11-338B22	488653	RP11-104F14	2422798	1,9
8	q24.3	RP11-65A5	141327724	CTC-489D14	146195298	4,9
9	q33.3-34.3	RP11-101K10	127089109	GS1-135I17	140997194	13,9
11	p11.2	RP11-70A24	44198762	RP11-465I24	48089538	3,9
11	q12.1-13.5	RP11-9A4	57111691	RP11-30J7	76553748	19,4
11	q23.3-25	RP11-35P15	117518653	RP11-469N6	134650277	17,1
12	p13.33-13.1	RP11-283I3	282465	RP11-59H1	13069035	12,8
12	q13.11-14.1	RP5-1057I20	48164846	RP11-571M6	58210332	10,0
12	q24.11-24.23	RP11-256L11	109695428	RP11-322N7	119752625	10,1
12	q24.23-24.33	RP11-144B2	120578976	CTC-221K18	133761858	13,2
13	q12.11-12.12	RP11-76K19	20109659	RP11-556N21	25204118	5,1
13	q34	RP11-40E6	110413634	CTB-163C9	114909878	4,5
16	p13.3	RP11-344L6	72088	RP11-35P16	4657877	4,6

Chromosom	Banden	Beginn (BAC)	Beginn (bp)*	Ende (BAC)	Ende (bp)*	Größe des Bereichs [Mb]
16	q23.3-24.3	RP11-483P21	83805115	CTB-121I4	90114955	6,3
17	p13.3-q21.33	RP11-216P6	856239	RP11-506D12	49024474	48,2
17	q22-25.1	RP11-112J9	54639141	RP11-155C2	72127170	17,5
17	q25.1-25.3	RP11-478P5	72268412	RP11-567O16	80781537	8,5
19	p13.3-13.11	CTD-3113P16	233116	CTD-3149D2	17925502	17,7
19	q12-13.43	CTD-2057D4	30265912	GS1-1129C9	59078905	28,8
20	p13	RP5-852M4	328014	RP4-599I11	4817293	4,5
20	p12.1-q13.33	RP11-504H3	17852943	CTB-81F12	62922571	45,1
21	q22.13-22.3	RP11-102E10	37844789	CTB-63H24	48100495	10,3
22	cen-q13.33	XX-p8708	17242248	CTB-99K24	51173581	33,9

\*Positionen der BAC-Klone gemäß Homo sapiens high-coverage assembly GRCh37, Genome Reference Consortium.

**Tabelle 16: Wiederkehrende DNA-Verluste in mindestens 50 % der 52 PTC (25 Bereiche)**

Chromosom	Banden	Beginn (BAC)	Beginn (bp)*	Ende (BAC)	Ende (bp)*	Größe des Bereichs [Mb]
1	p32.3-13.3	RP5-1070D5	55875826	RP11-28P8	108710444	52,8
3	p26.3-26.1	PAC1186B18	212817	RP11-329A2	7784313	7,6
3	p25.3	RP11-105K13	8895825	RP11-334L22	9260123	0,4
3	p25.1-22.2	RP11-305L22	15654041	RP11-134C18	36768614	21,1
3	p22.2-22.1	RP11-129K12	36892875	RP11-527M19	41378696	4,5
3	p14.3-14.2	RP11-554O1	54638414	RP11-356B18	59072292	4,4
3	p14.2-q13.33	RP11-170K19	59727302	RP11-480B17	121057493	61,3
3	q22.1-29	RP11-129J11	129975567	RP11-23M2	197674706	67,7
4	p16.1-q34.3	RP11-61G19	10599780	RP11-62B7	182418137	171,8
5	p15.2-q23.3	RP11-44C2	12078086	RP11-114H7	130383632	118,3
5	q31.3-32	CTD-2185H17	142525913	CTB-107A22	147108495	4,6
5	q33.1-34	CTC-209K13	151340486	RP11-511M9	165991817	14,7
6	p21.1-q25.2	RP11-554O14	44880799	RP11-495B4	154180965	109,3
6	q25.2-25.3	RP1-66H9	155248142	RP11-100E6	156079969	0,8
7	q22.1-35	RP11-401L13	102728048	RP11-302C22	147627247	44,9
8	q12.3-24.12	RP11-227F6	62249646	RP11-72M5	119890997	57,6
11	p15.1-14.2	RP11-6K5	20251084	RP11-430L3	26445366	6,2
11	p14.1-12	RP11-541L7	27267990	RP11-108L12	43063365	15,8
11	q14.1-22.3	RP11-46D24	79960179	RP11-569A20	106579547	26,6
11	q22.3-23.3	RP11-531F16	107793124	RP1-312P4	115751183	8,0
12	p13.1-q13.11	RP11-4N23	13615341	RP3-432E18	48012712	34,4
12	q14.1-23.3	RP11-150C16	59385903	RP11-1C11	108537141	49,2
13	q13.1-33.3	RP11-95N14	32170305	RP11-513N16	108683924	76,5
20	p12.3-12.1	RP5-959I16	6262827	RP3-348M17	16722907	10,5
21	q21.2-21.3	RP11-25F24	24570573	RP11-15H6	27875390	3,3

\*Positionen der BAC-Klone gemäß Homo sapiens high-coverage assembly GRCh37, Genome Reference Consortium.

Um Aussagen über wiederkehrende Veränderungen in PTC aus verschiedenen Kollektiven treffen zu können, wurden die im Untersuchungskollektiv nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen mit den Ergebnissen einer vorangegangenen Array-CGH-Studie an kindlichen PTC verglichen (Unger et al., 2008). Es handelte sich hierbei um 13 PTC von Kindern aus der Ukraine und Weißrussland (Patientendaten, siehe Anhang 2). Die gemeinsamen Veränderungen sind in Tabelle 17 aufgeführt, wobei für den Vergleich lediglich Kopienzahlveränderungen berücksichtigt wurden, die in mindestens 30 % der Fälle auftraten.

**Tabelle 17: Gemeinsame Kopienzahlveränderungen in 52 PTC dieser Studie und einer vorangegangenen Studie mit kindlichen PTC (Unger et al., 2008)**

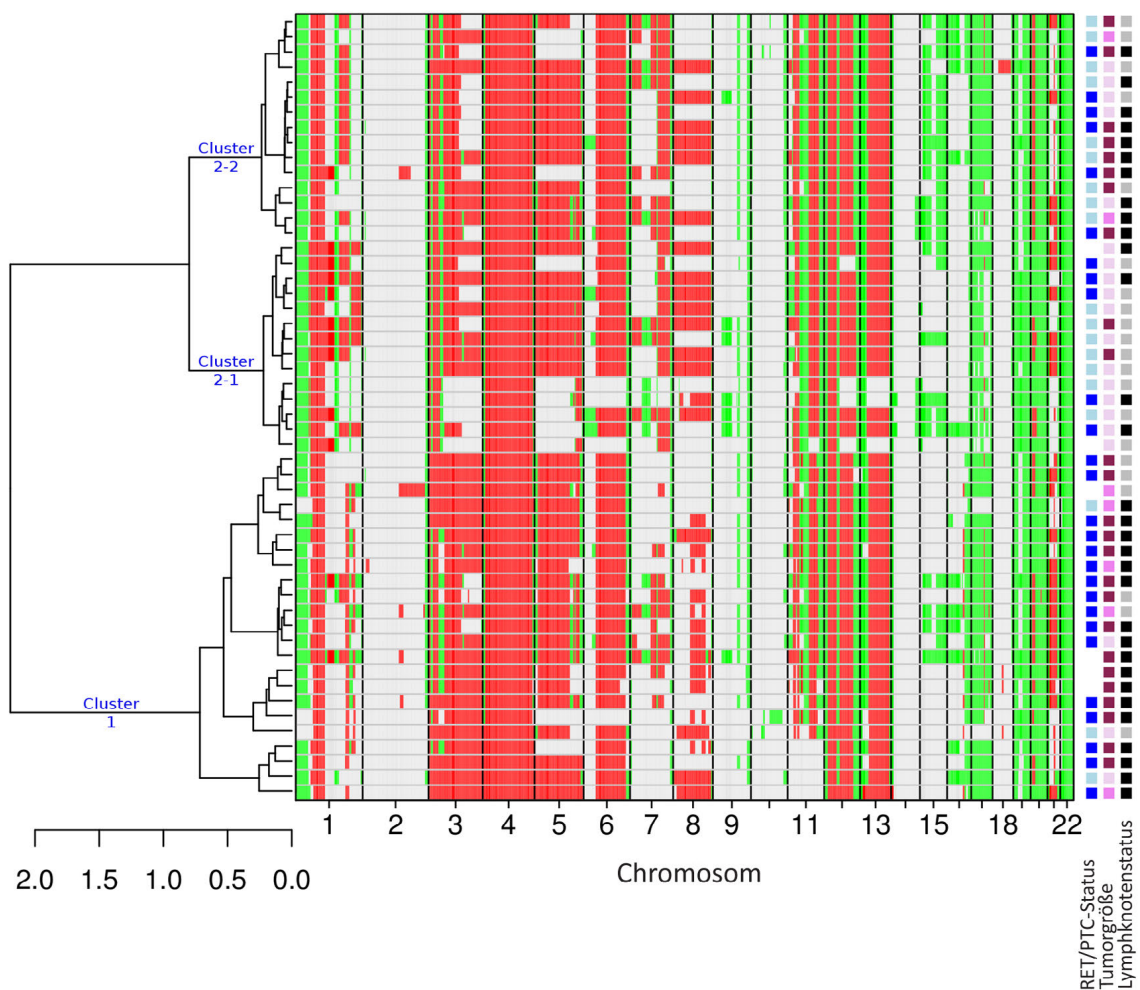
Chromosomaler Bereich	Chromosomale Veränderung	Beginn (BAC)	Ende (BAC)	Beginn (bp)*	Ende (bp)*	Größe [Mb]
1p31.3-13.3	DNA-Verlust	RP4-700A9	RP5-1077K16	65599782	107676036	42,1
1q23.3-32.1	DNA-Verlust	RP11-430G6	RP11-152M20	162947338	199646074	36,7
1q32.3-41	DNA-Verlust	RP11-286E7	RP11-308L13	213239930	221893823	8,7
6p21.1-q25.2	DNA-Verlust	RP3-441A12	RP11-495B4	44880799	154180965	109,3
9q33.3-34.3	DNA-Zugewinn	RP11-101K10	GS1-135I17	127089109	140997194	13,9
10q26.13-26.3	DNA-Zugewinn	RP13-238F13	CTB-137E24	126018441	135396841	9,4
11p14.1-12	DNA-Verlust	RP11-541L7	RP11-108L12	27267990	43063365	15,8
11q14.2-21	DNA-Verlust	RP11-320L11	RP11-338H14	85935688	95384834	9,4
13q13.1-33.3	DNA-Verlust	RP11-95N14	RP11-513N16	32170305	108683924	76,5
16p13.3	DNA-Zugewinn	RP11-344L6	RP11-35P16	72088	4657877	4,6
16q23.3-24.3	DNA-Zugewinn	RP11-483P21	CTB-121I4	83805115	90025221	6,2
19p13.3-q13.43	DNA-Zugewinn	CTD-3113P16	GS1-1129C9	233116	59078905	58,8
20q13.33	DNA-Zugewinn	RP13-152O15	CTB-81F12	62639242	62922571	0,3
21q22.13-22.3	DNA-Zugewinn	RP11-102E10	CTB-63H24	37844789	48100495	10,3

\*Positionen der BAC-Klone gemäß Homo sapiens high-coverage assembly GRCh37, Genome Reference Consortium.

### C.1.2.3.2 Hierarchische Clusteranalyse

Um PTC-Fälle mit ähnlichen chromosomalen Aberrationsmustern zu identifizieren, wurden die Array-CGH-Profile aller 52 Fälle einer *unsupervised* hierarchischen Clusteranalyse unterzogen. Die Berechnungen basierten auf dem Vergleich der segmentierten und geglätteten Log<sub>2</sub>-Ratios aller BAC-Klone der Arrays. Das Ergebnis der Clusteranalyse (Abb. 21) zeigte eine deutliche Aufteilung der Fälle in zwei Hauptcluster (Cluster 1 und 2). Cluster 2 wies eine zusätzliche Unterteilung in zwei Subcluster (Cluster 2.1 und 2.2) auf. Dabei beinhaltete Cluster 1 23 Fälle, Subcluster 2.1 14 Fälle und Subcluster 2.2 15 Fälle.





**Abbildung 21: Hierarchische Clusteranalyse der Array-CGH-Profile von 52 PTC**

Die *unsupervised* hierarchische Clusteranalyse der Array-CGH-Profile von 52 PTC zeigt eine Aufteilung in zwei Hauptcluster (Cluster 1 und Cluster 2), wobei sich Cluster 2 in die zwei Subcluster Cluster 2.1 und Cluster 2.2 auftrennt. Die Array-CGH-Profile sind entlang der Chromosomen 1-22 von pter nach qter angeordnet. DNA-Zugewinne sind in grün, DNA-Verluste in rot und unveränderte Bereiche in grau angezeigt. Auf der linken Seite ist das Dendrogramm der Clusteranalyse gezeigt, das die Clusterhierarchie und die Abstände wiedergibt. Die farbigen Kästen auf der rechten Seite repräsentieren von links nach rechts den RET/PTC-Status, die Tumorgöße (TNM) und den Lymphknotenstatus (TNM) der einzelnen PTC-Fälle. Farbkodierung – RET/PTC-Status: Hellblau, RET/PTC-negativ; dunkelblau, RET/PTC-positiv. Tumorgöße: Hellrosa, T1; rosa, T2; violett, T3; Lymphknotenstatus: Grau, Lymphknoten-negativ (kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen); schwarz, Lymphknoten-positiv (regionäre Lymphknotenmetastasierung); weiße Kästen zeigen nicht verfügbare Daten an.

### **C.1.2.3.3 Korrelation der hierarchischen Cluster mit klinischen Daten und Tumorphänotypen**

Der exakte Fisher-Test wurde verwendet, um eine Korrelation der Cluster mit klinischen Daten und Tumorphänotypen zu testen. Getestet wurden Korrelationen der Cluster mit dem RET/PTC-Status (RET/PTC-positiv/-negativ), der TumorgroÙe (T1/T2/T3), der Lymphknotenmetastasierung (N0/N1), dem Geschlecht (männlich/weiblich), dem Alter bei Operation ( $\leq 15$  Jahre/ $> 15$  Jahre), dem BRAF-Status (BRAF-positiv/-negativ), dem dominierenden histologischen Subtyp (follikulär/papillär/solid) und der Strahlenexposition (exponiert/nicht exponiert). Ein signifikanter Zusammenhang wurde bei p-Werten  $< 0,05$  angenommen.

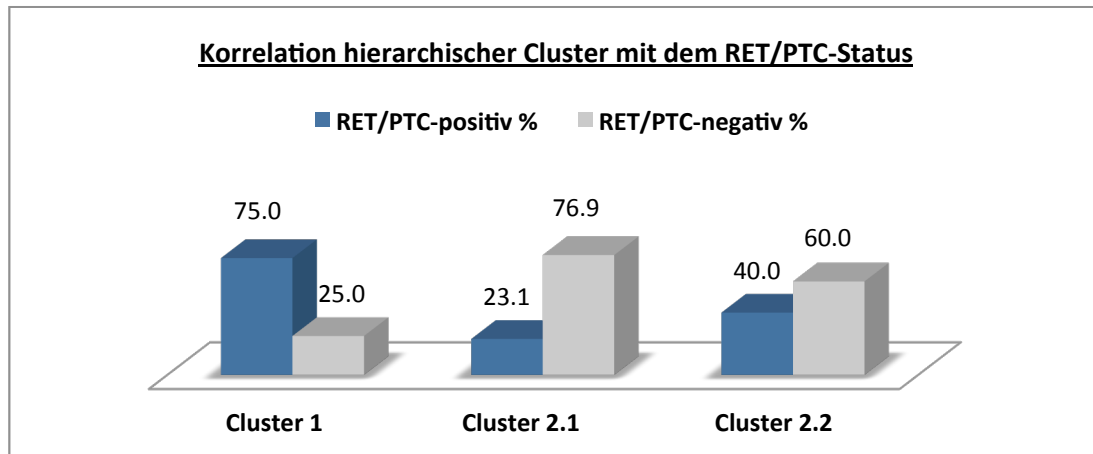
#### **C.1.2.3.3.1. Korrelation der hierarchischen Cluster mit RET/PTC-Status, TumorgroÙe und Lymphknotenmetastasierung**

Die Ergebnisse zeigten eine Korrelation ( $p = 0,0096$ ) der Cluster mit dem RET/PTC-Status. 15 der 20 PTC-Fälle (75 %) in Cluster 1 waren RET/PTC-positiv, während 76,9 % der Fälle (10/13) in Cluster 2.1 und 60 % der Fälle (9/15) in Cluster 2.2 einen negativen RET/PTC-Status aufwiesen (Abb. 22).

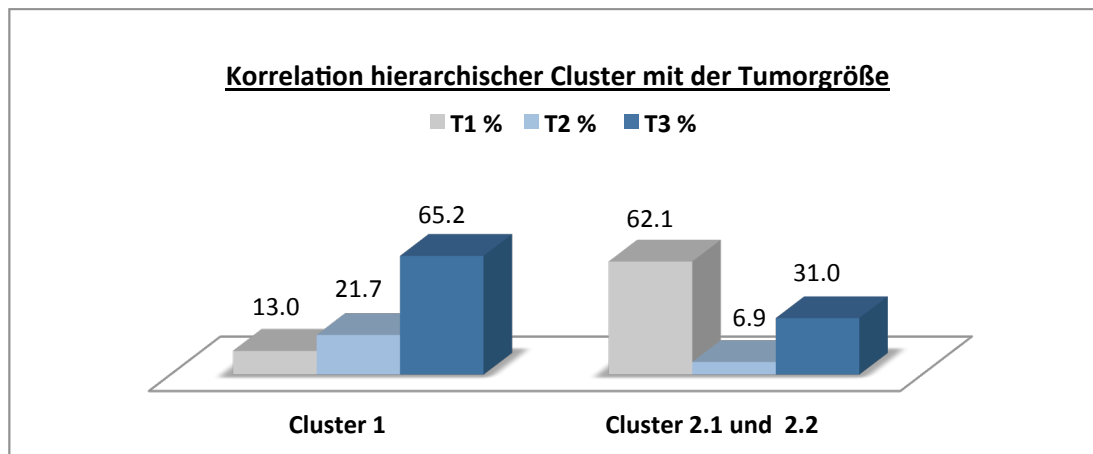
Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine Korrelation ( $p = 0,00087$ ) zwischen der TumorgroÙe und den beiden Hauptclustern besteht (Abb. 23). In Cluster 1 traten 65,2 % (15/23) PTC mit Klassifikation T3 und 21,7 % (5/23) mit Klassifikation T2 auf. Dagegen waren 62,1 % (18/29) der PTC in Cluster 2 T1-klassifizierte Tumore.

Darüber hinaus war eine Korrelation ( $p = 0,04$ ) der Aberrationsmuster der PTC-Fälle mit der Lymphknotenmetastasierung zu beobachten. Während in Cluster 1 69,6 % der Tumore (16/23) und in Cluster 2.2 66,7 % der Tumore (10/15) in regionäre Lymphknoten metastasiert hatten (N1), traten in Cluster 2.2 vermehrt (71,4 %, 10/14) Lymphknoten-negative Tumore (N0) auf (Abb. 24).

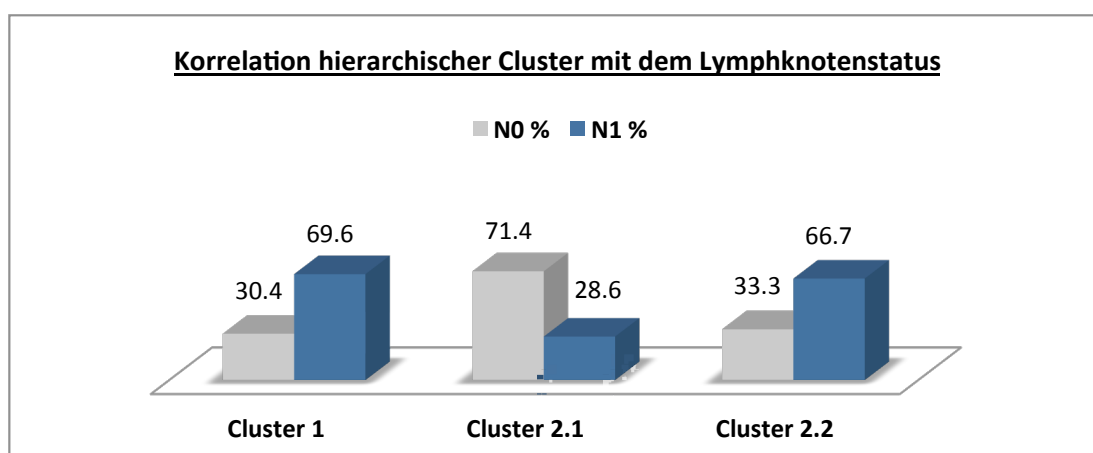
Für die Parameter Geschlecht, Alter bei Operation, Strahlenexposition, BRAF-Status und dominanter histologischer PTC-Subtyp konnte keine Korrelation mit den Clustern nachgewiesen werden.



**Abbildung 22: Korrelation hierarchischer Cluster mit dem RET/PTC-Status**  
 p = 0,0096 (Exakter Fisher-Test)



**Abbildung 23: Korrelation hierarchischer Cluster mit der Tumorgröße**  
 p = 0,00087 (Exakter Fisher-Test)



**Abbildung 24: Korrelation hierarchischer Cluster mit dem Lymphknotenstatus**  
 p = 0,04 (Exakter Fisher-Test);  
 N0: Lymphknoten-negativ, kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen;  
 N1: Lymphknoten-positiv, regionäre Lymphknotenmetastasierung.

---

**C.1.2.3.3.2. Unabhängiger Einfluss von RET/PTC-Status und Tumorgröße auf die Clusterbildung**

Die nachgewiesene Korrelation der beiden Hauptcluster mit den Parametern RET/PTC-Status und Tumorgröße wurde im Anschluss genauer untersucht, da sich in einem weiteren statistischen Test gezeigt hatte, dass eine Korrelation (Exakter Fisher-Test;  $p = 0,039$ ) zwischen der Tumorgröße und dem RET/PTC-Status besteht. Es waren 14 RET/PTC-negative und 6 RET/PTC-positive T1-Karzinome im Untersuchungskollektiv vorhanden. Dagegen wiesen 16/26 der mit T2 oder T3 klassifizierten PTC einen positiven RET/PTC-Status auf.

Wenn zwei verschiedene Parameter (klinische Daten bzw. Tumorphänotypen) keinen voneinander unabhängigen Einfluss auf ein Ereignis haben, kann dies zu einer ungewollten Beeinflussung eines statistischen Tests führen. Um dies zu überprüfen, wurden die beiden Parameter RET/PTC-Status und Tumorgröße bivariat getestet. Für den bivariaten Test wurde die Maximum-Likelihood-Methode angewandt. Es konnte ein unabhängiger Einfluss beider Parameter RET/PTC-Status und Tumorgröße (RET/PTC-Status,  $p = 0,033$ ; Tumorgröße,  $p = 0,016$ ) auf die Clusterbildung gezeigt werden.

**C.1.2.3.4 Korrelation von Kopienzahlveränderungen mit klinischen Daten und Tumorphänotypen**

In einem weiteren Schritt wurden alle Kopienzahlveränderungen auf Korrelation mit klinischen Patientendaten bzw. Tumorphänotypen getestet (Chi-Quadrat-Test). Die p-Werte nach den multiplen Tests wurden mit Hilfe von *CGHtest* (van de Wiel et al., 2005) nach einem FDR (*False Discovery Rate*)-Verfahren adjustiert (Manduchi et al., 2000). Korrelationen mit FDR-Werten < 0,05 wurden als signifikant angenommen. Getestet wurden Korrelationen der Kopienzahlveränderungen mit dem RET/PTC-Status, der Tumorgröße, der Lymphknotenmetastasierung, dem Geschlecht, dem BRAF-Status, dem histologischen Subtyp und der Strahlenexposition.

Es konnten insgesamt 10 Kopienzahlveränderungen identifiziert werden, die eine Korrelation mit den getesteten Parametern Tumorgröße, Geschlecht und Expositionsstatus zeigten (Tabelle 18).

**Tabelle 18: Mit der Tumorgröße, dem Geschlecht und dem Expositionsstatus assoziierte Kopienzahlveränderungen in 52 PTC (Untersuchungskollektiv)**

Chr	Banden	Beginn (BAC/ bp Beginn <sup>1</sup> )	Ende (BAC/ bp Ende <sup>1</sup> )	Größe des Bereichs [Mb]	Status Array-CGH	Assoziation	p-Wert	FDR
1	q21.1-23.3	RP11-315120/ 145440576	RP11-15G16/ 161929198	16,5	Zugewinn	TNM T1	0,0076	0,028
5	q23.3-31.3	RP1-247F3/ 130546647	CTD-2332G20/ 142017094	11,5	Verlust	Weiblich	0,0023	0,046
7	p14.1-q11.23	RP5-1032B10/ 43183638	RP11-107L23/ 75314803	32,1	Zugewinn	Exposition <sup>2</sup>	0,0015	0,035
7	q22.1	RP4-550A13/ 98867726	RP11-333G13/ 101602962	2,7	Zugewinn	TNM T1	0,0195	0,040
9	p24.3	GS1-41L13/ 11190	GS1-77L23/ 345203	0,3	Zugewinn	TNM T1	0,0076	0,028
10	p15.3-15.1	CTC-306F7/ 270607	RP11-336A10/ 5803775	5,5	Zugewinn	TNM T1	0,006	0,028
10	q26.13-26.3	RP13-238F13/ 126018441	CTB-137E24/ 135396841	9,4	Zugewinn	TNM T1	0,0075	0,028
11	p11.12-cen	RP11-227P3/ 50057493	RP11-100N3/ 56640040	6,6	Zugewinn	TNM T1	0,0089	0,029
12	q24.11-24.23	RP11-256L11/ 109695428	RP11-322N7/ 119752625	10,1	Zugewinn	TNM T3	0,0071	0,028
16	q22.1-23.3	RP11-63M22/ 66596260	RP11-2L4/ 82721053	16,1	Zugewinn	TNM T3	0,0173	0,036

<sup>1</sup>Positionen der BAC-Klone gemäß *Homo sapiens high-coverage assembly GRCh37, Genome Reference Consortium*; <sup>2</sup>Exponiert durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl.

**C.1.2.3.4.1. Korrelation von acht Kopienzahlveränderungen mit der TumorgroÙe**

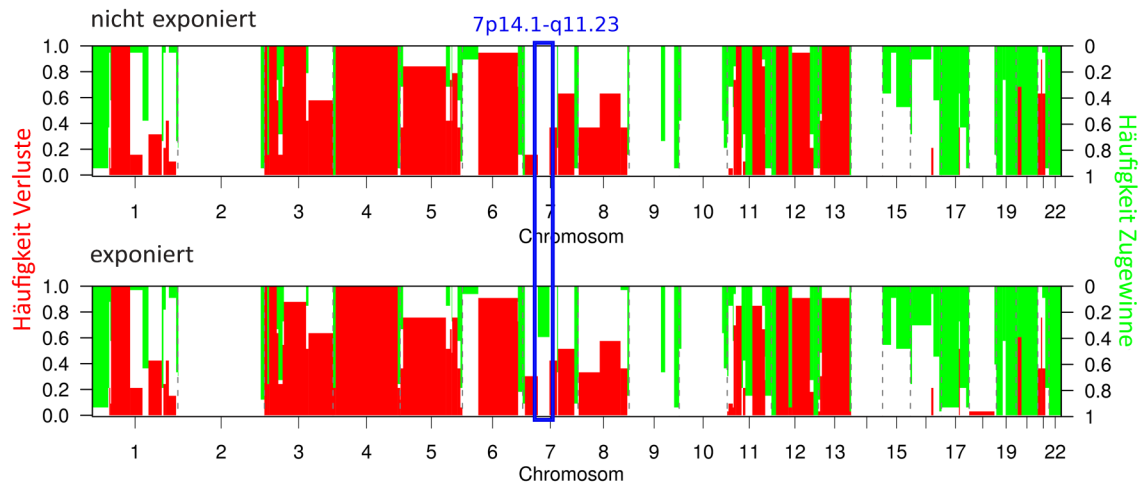
Es wurden insgesamt acht mit der TumorgroÙe korrelierende chromosomale Veränderungen identifiziert, wobei es sich ausschließlich um DNA-Zugewinne handelte (Tabelle 18). Dabei zeigten DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 1q21.1-23.3, 7q22.1, 9p24.3, 10p15.3-15.1, 10q26.13-26.3 und 11p11.12-cen eine Korrelation mit der TumorgroÙe T1. DNA-Zugewinne auf den Chromosomen 12q24.11-24.23 und 16q22.1-23.3 waren dagegen mit T3 klassifizierten PTC assoziiert.

**C.1.2.3.4.2. Korrelation einer Kopienzahlveränderung mit dem Geschlecht**

Des Weiteren konnte die Korrelation eines DNA-Verlusts auf Chromosom 5q23.3-31.3 mit dem weiblichen Geschlecht gezeigt werden (Tabelle 18).

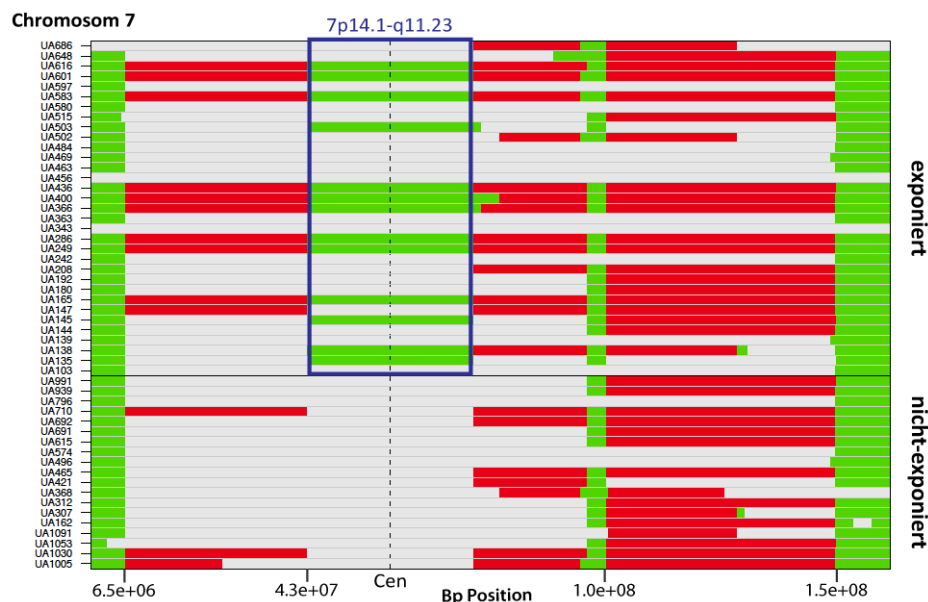
**C.1.2.3.4.3. Korrelation einer Kopienzahlveränderung mit der Strahlenexposition**

Die statistischen Tests ergaben darüber hinaus die Korrelation ( $p = 0,0015$ ,  $FDR = 0,035$ ) eines DNA-Zugewinns auf Chromosom 7 mit der Strahlenexposition der Patienten (Tabelle 18, lila markiert). 39 % (13/33) der Schilddrüsenkarzinome von Patienten, die dem Radioiod-Fallout von Tschernobyl ausgesetzt waren, zeigten einen DNA-Zugewinn auf Chromosom 7p14.1-q11.23. In der nicht exponierten Gruppe wies dagegen kein Fall (0/19) diesen DNA-Zugewinn auf (Abb. 25). Der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7 mit der GröÙe von 32,1 Mb ist in Abbildung 26 detaillierter dargestellt. Der Abbildung sind auch die 13 Fälle zu entnehmen, die den DNA-Zugewinn auf Chromosom 7p14.1-q11.23 aufwiesen.



**Abbildung 25: Häufigkeitsprofile der Kopienzahlveränderungen in 19 nicht exponierten und 33 exponierten PTC**

Gezeigt sind die Häufigkeitsprofile der Kopienzahlveränderungen in nicht exponierten (oben; n = 19) und exponierten PTC-Fällen (unten; n = 33). Bereiche mit Kopienzahlveränderungen werden entlang der Chromosomen 1-22 von pter bis qter entsprechend ihrer Häufigkeiten (Anteil der Fälle von 0 bis 1) dargestellt. Grüne Balken (aufgetragen von oben nach unten) geben die Häufigkeiten einzelner DNA-Zugewinne wieder, während rote Balken (aufgetragen von unten nach oben) die Häufigkeiten einzelner DNA-Verluste darstellen. Der blaue Rahmen markiert den DNA-Zugewinn auf Chromosom 7p14.1-q11.23, der ausschließlich in exponierten Fällen auftritt und eine Assoziation mit der Strahlenexposition der Patienten aufweist.

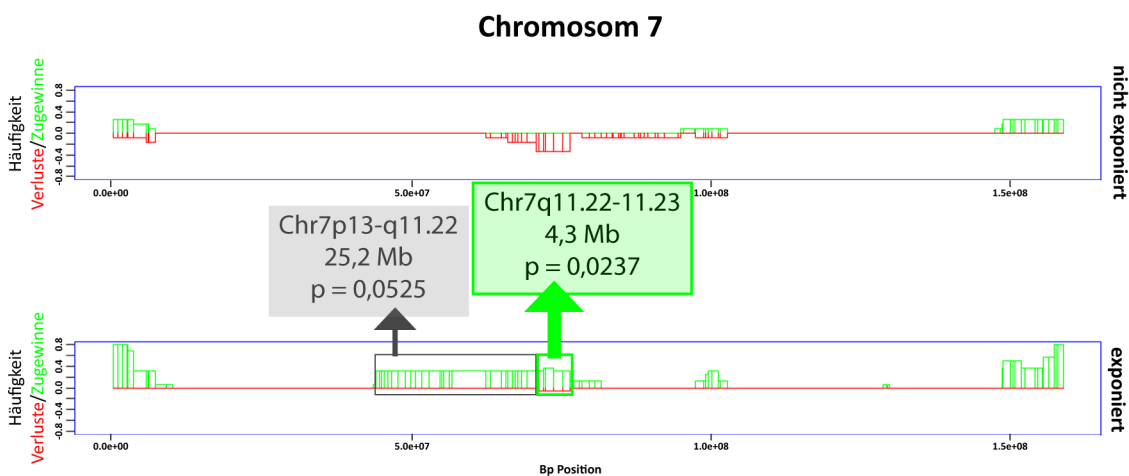


**Abbildung 26: Chromosomale Veränderungen auf Chromosom 7 in 52 PTC**

Gezeigt sind die Array-CGH-Profile von 52 PTC-Fällen (Untersuchungskollektiv) für Chromosom 7. Die Array-CGH-Profile sind nach den Gruppen exponiert (oben; n = 33) und nicht exponiert (unten; n = 19) angeordnet. Links sind die Fallnummern der einzelnen Fälle angegeben. Chromosom 7 ist von pter nach qter angezeigt; die senkrechte gestrichelte Linie gibt die Lage des Centromers an. DNA-Zugewinne sind in grün, DNA-Verluste in rot und unveränderte Bereiche in grau dargestellt. Der mit der Strahlenexposition korrelierende und ausschließlich in exponierten Fällen auftretende DNA-Zugewinn auf Chromosom 7p14.1-q11.23 ist blau umrandet.

### C.1.2.4 Ergebnisse der Array-CGH-Analysen von 28 PTC (Validierungskollektiv)

Aus den Array-CGH-Daten von 52 PTC (Untersuchungskollektiv) konnte ein DNA-Zugewinn auf Chromosom 7p14.1-q11.23 ermittelt werden, der eine signifikante Korrelation mit dem Strahlenexpositionsstatus der Patienten aufwies (siehe Abschnitt C.1.2.3.4.3). Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde ein unabhängiges Validierungskollektiv von 28 PTC (Patientendaten siehe Tabelle 3) mittels 1 Mb BAC Array-CGH untersucht. Die Assoziation des DNA-Zugewinns auf Chromosom 7 mit der Strahlenexposition konnte im Validierungskollektiv bestätigt werden. Zusätzlich konnte die strahlenassoziierte Veränderung auf einen 4,3 Mb großen Bereich auf Chromosom 7q11.22-11.23 eingegrenzt werden (Exakter Fisher-Test,  $p = 0,024$ ; Abb. 27 und Tabelle 19). Sechs (UA905, UA417, UA771, UA954, UA374 und UA886) der 16 exponierten Fälle (37,5 %) zeigten einen DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23, während kein Fall der nicht exponierten Gruppe ( $n = 12$ ) einen DNA-Zugewinn dieses chromosomalen Bereiches aufwies.



**Abbildung 27: Häufigkeitsprofile der Kopienzahlveränderungen auf Chromosom 7 in 12 nicht exponierten und 16 exponierten PTC (Validierungskollektiv)**

Gezeigt sind die Häufigkeitsprofile der Kopienzahlveränderungen auf Chromosom 7 in nicht exponierten (oben;  $n = 12$ ) und exponierten PTC-Fällen (unten;  $n = 16$ ). Die Kopienzahlveränderungen sind entlang des Chromosoms 7 von pter nach qter entsprechend ihrer Häufigkeiten (Anteil der Fälle) angezeigt. Grüne Balken geben die Häufigkeiten einzelner DNA-Zugewinne wieder, während rote Balken die Häufigkeiten einzelner DNA-Verluste darstellen. Die exklusive Korrelation eines DNA-Zugewinns auf Chromosom 7 mit der Strahlenexposition der Patienten konnte bestätigt werden. Der strahlenassoziierte DNA-Zugewinn wurde auf den chromosomalen Bereich 7q11.22-11.23 eingegrenzt (4,3 Mb;  $p = 0,0237$ ), wobei auch der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7p13-q11.22 ( $p = 0,0525$ ) ausschließlich in der exponierten Gruppe auftrat.



**Tabelle 19: Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7 in 28 PTC (Validierungskollektiv)**

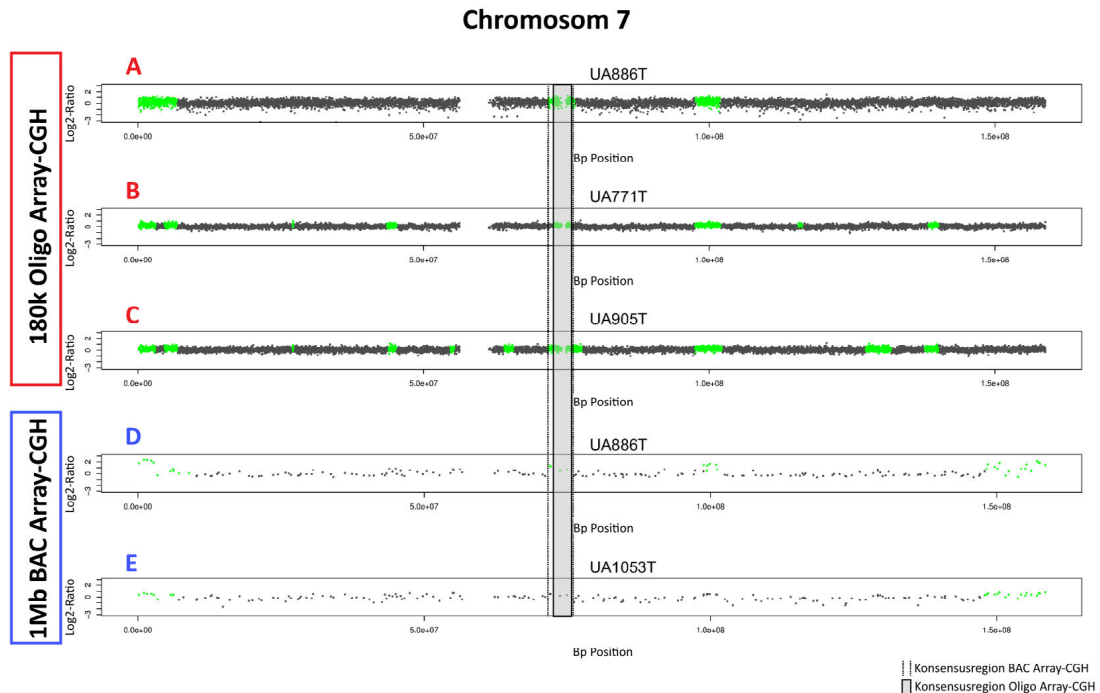
Chr	Banden	Beginn (BAC/bp Beginn <sup>1</sup> )	Ende (BAC/bp Ende <sup>1</sup> )	Größe des Bereichs [Mb]	Status Array-CGH	Assoziation	p-Wert
7	q11.22-11.23	RP11-409J21/ 71050338	RP11-107L23/ 75314803	4,3	Zugewinn	Exposition <sup>2</sup>	0,024

<sup>1</sup>Positionen der BAC-Klone gemäß *Homo sapiens high-coverage assembly GRCh37, Genome Reference Consortium*; <sup>2</sup>Exponiert durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl.

Der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 zeigte keine weiteren Assoziationen mit den klinischen Daten bzw. Tumorphänotypen Geschlecht, Lymphknotenstatus, Tumorgröße, histologischer PTC-Subtyp, RET/PTC-Status oder BRAF-Mutationen. Der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 zeigte ausschließlich eine Korrelation mit der Strahlenexposition der Patienten durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl.

### C.1.3 Ergebnisse der hochauflösenden Oligo Array-CGH-Analysen

Um den strahlenassoziierten DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 genauer zu charakterisieren, wurden drei PTC-Fälle, die den DNA-Zugewinn nach 1 Mb BAC Array-CGH-Analysen zeigten, mittels hochauflösender Oligo Array-CGH untersucht. Die verwendeten 180k Oligonukleotid-Arrays (Agilent Technologies) ermöglichen eine theoretische Auflösung von durchschnittlich 13 kb, wohingegen die 1 Mb BAC-Arrays das menschliche Genom im Durchschnitt lediglich in Abständen von 1000 kb abdecken. Die Ergebnisse der hochauflösenden Oligo Array-CGH-Analysen sind in Abbildung 28 dargestellt. Der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 konnte in allen drei analysierten Fällen bestätigt werden. Die Basenpaarpositionen der Bruchpunkte, welche den veränderten chromosomalen Bereich flankieren, zeigten zwischen den drei untersuchten Fällen leichte Variationen, wobei der Konsensusbereich des DNA-Zugewinns mit der hochauflösenden Oligo Array-CGH (Chromosom 7: 73096427-76001049 bp; 2,9 Mb) um ca. 1,4 Mb kleiner war als der Konsensusbereich, der mit der BAC Array-CGH-Analyse gefunden wurde. Dies konnte auf die geringere Auflösung der 1 Mb BAC-Arrays zurückgeführt werden, durch die es beim Nachweis von Kopienzahlveränderungen zu einem Unsicherheitsintervall von 1 Mb kommt. Die Oligo Array-CGH-Ergebnisse konnten daher die BAC Array-CGH-Ergebnisse in einer deutlich höheren Auflösung bestätigen.



**Abbildung 28: Charakterisierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 mittels hochauflösender 180k Oligo Array-CGH und 1 Mb BAC Array-CGH**

Gezeigt sind die hochauflösenden 180k Oligo Array-CGH-Profile der PTC-Fälle UA886T (A), UA771T (B) und UA905T (C) für Chromosom 7. Alle drei Fälle zeigten bereits in der 1 Mb BAC Array-CGH-Analyse einen DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23, wobei das 1 Mb BAC Array-CGH-Profil von Fall UA886T für Chromosom 7 in (D) exemplarisch dargestellt ist. In (E) ist darüber hinaus exemplarisch das 1 Mb BAC Array-CGH-Profil eines Falls (UA1053T) gezeigt, der keinen DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 aufweist. Entlang von Chromosom 7 (X-Achse: Bp Position von pter nach qter) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Fluoreszenzintensitätsquotienten aus Cy3- und Cy5-Fluoreszenz ( $\text{Log}_2\text{-Ratios}$ ) für jedes Oligonukleotid bzw. jeden BAC-Klon angezeigt. DNA-Zugewinne sind in grün, unveränderte Bereiche in schwarz dargestellt. Die schwarz gepunktete Linie markiert die Konsensusregion des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 nach 1 Mb BAC Array-CGH. Der graue Bereich markiert die Konsensusregion der drei untersuchten Fälle nach Oligo Array-CGH, die um ca. 1,4 Mb kleiner ist als die Konsensusregion nach BAC Array-CGH. Die Lücke (~280 kb) innerhalb der Konsensusregion der 180k Oligo Array-CGH-Profile hängt mit dem Design des Arrays zusammen, wodurch der chromosomale Bereich nicht komplett durch Oligonukleotide abgedeckt ist.

## C.2 Identifizierung von Kandidatengen

### C.2.1 Tumorassoziierte Kandidatengene aus der Literatur

Die mittels Array-CGH nachgewiesenen wiederkehrend veränderten chromosomalen Bereiche (Tabellen 15 und 16) sowie die mit der TumorgroÙe, dem Geschlecht (Tabelle 18) und dem Expositionstatus assoziierten Veränderungsbereiche (Tabelle 19) wurden nach tumorassoziierten Kandidatengen durchsucht. Dabei wurden die Basenpaarpositionen einer Kopienzahlveränderung verwendet, um mit Hilfe der genomischen Datenbank Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) alle Gene des jeweiligen Bereichs zu extrahieren. Die Genlisten wurden anschließend nach tumorassoziierten Kandidatengen durchsucht, welche anhand ihrer bereits in der Literatur beschriebenen funktionellen Rolle im Zusammenhang mit Karzinomen (im Speziellen mit Schilddrüsenkarzinomen) ausgewählt wurden.

Insgesamt konnten 231 tumorassoziierte Kandidatengene identifiziert werden. Darunter waren auch häufig beschriebene Onkogene (z.B. WNT1) sowie bekannte Tumorsuppressorgene (z.B. RB1).

Bei den wiederkehrenden Kopienzahlveränderungen wurden ausschließlich chromosomale Veränderungsbereiche < 15 Mb analysiert. In Tabelle 20 sind die 158 tumorassoziierten Kandidatengene in wiederkehrend veränderten chromosomalen Bereichen aufgelistet. 10 der Gene wurden bereits in einer vorangegangenen Array-CGH-Studie an 33 PTC identifiziert (Unger et al., 2008).

In chromosomalen Bereichen, die eine Assoziation mit der TumorgroÙe (TNM) bzw. dem Geschlecht zeigten, wurden 68 tumorassoziierte Kandidatengene bestimmt (Tabelle 21).

Darüber hinaus konnten sechs tumorassoziierte Kandidatengene in dem strahlenassoziierten Veränderungsbereich auf Chromosom 7q11.22-11.23 identifiziert werden. Die Kandidatengene sowie deren in der Literatur beschriebene Funktionen sind in Tabelle 22 aufgelistet.

**Tabelle 20: Tumorassoziierte Kandidatengene in wiederkehrend veränderten chromosomalen Bereichen in PTC**

Chromosomaler Bereich	Kandidatengene	Chromosomale Veränderung (Array-CGH)
1p36.33-34.1	AGRN, DVL1, SKI, HES5, TP73, PARK7, PIK3CD, FGR, CDC42, CDC20, SNIP1, HDAC1, ASAP3	DNA-Zugewinn
1p34.1-33	PRDX1, TSPAN1	DNA-Zugewinn
1q32.1	PIK3C2B	DNA-Zugewinn
2p25.3	TMEM18	DNA-Zugewinn
2q37.1-37.3	GPC1	DNA-Zugewinn
3p25.3-25.1	RAF1	DNA-Zugewinn
3p22.2-22.1	MLH1, DLEC1, ITGA9, CSRNP1, CTDSPL, C3orf35	DNA-Verlust
3p22.1-21.1	RASSF1, ZNF197, TDGF1, PTH1R, CDC25A, RHOA, CDCP1, DUSP7	DNA-Zugewinn
4p16.3-16.1	TACC3, S100P	DNA-Zugewinn
4q35.1-35.2	TLR3	DNA-Zugewinn
5p15.33	IRX2	DNA-Zugewinn
5q33.1-34	ADAM19	DNA-Verlust
5q35.2-35.3	GNB2L1, FLT4	DNA-Zugewinn
6q25.3-27	MAS1, MAP3K4, CCR6, EZR	DNA-Zugewinn
7p22.3-22.1	FSCN1, GNA12, RAC1	DNA-Zugewinn
7q22.1	ARPC1A, SERPINE1, CUX1, MCM7, EPHB4	DNA-Zugewinn
7q36.1-36.3	CDK5, RHEB, SHH	DNA-Zugewinn
8q24.3	MAFA, PTP4A3, GPAA1, EEF1D, PTK2	DNA-Zugewinn
11p15.1-14.2	FANCF, HTATIP2	DNA-Verlust
11p14.1-12	PAX6, EHF, WIT1	DNA-Verlust
11p11.2	MDK, F2, MADD	DNA-Zugewinn
11q12.1-13.5	FOSL1, CD248, MYEOV, CCND1, ORAOV1, FGF3, FGF4, ANO1, CTTN, WNT11	DNA-Zugewinn
11q22.3-23.3	ZBTB16, PPP2R1B, ATM, BTG4, SDHD, CADM1	DNA-Verlust
12p13.33-13.1	WNT5B, FOXM1, CCND2, FGF6, CDCA3	DNA-Zugewinn
12q13.11-14.1	SEN1, WNT10B, WNT1, HCCR1, KRT6A, KRT5, KRT8, GLI1, AGAP2, SAS, CDK4, ERBB3, SP1	DNA-Zugewinn
12q24.23-24.33	RPLP0, PXN, TRIAP1, RNF34, CLIP1, RSRC2, PIWIL1, MMP17	DNA-Zugewinn
13q12.11-12.12	GJB2, FGF9	DNA-Zugewinn
13q13.1-33.3	FOXO1A, FAM48A, RB1, KLF5, SLITRK5, SLITRK6, SLITRK1	DNA-Verlust
13q34	IRS2, TFDP1, CUL4A, GAS6, CDC16	DNA-Zugewinn
16p13.3	MMP25, CLUAP1	DNA-Zugewinn
16q23.3-24.3	SLC7A5, RPL13, TUBB3, FANCA	DNA-Zugewinn
17p13.3-q21.33	PPP1R1B, ERBB2, TOP2A	DNA-Zugewinn
17q25.1-25.3	RAC3, TK1, GRB2, LGALS3BP, BIRC5	DNA-Zugewinn
19p13.3-13.11	JUNB, NOTCH3	DNA-Zugewinn
19q12-13.43	MIA, NUMBL	DNA-Zugewinn
20p13	TRIB3, CSNK2A1, PTPRA, CDC25B, PRNP	DNA-Zugewinn
20p12.3-12.1	BMP2	DNA-Verlust
20p12.1-q13.33	EEF1A2, DCR3, BIRC7	DNA-Zugewinn
21q22.13-22.3	ERG, ETS2, COL18A1, PTTG1IP	DNA-Zugewinn
22cen-q13.33	TYMP, PIM3, PDGFB	DNA-Zugewinn

Lila hinterlegt: Kandidatengene, die bereits in einer vorangegangenen Array-CGH-Studie an 33 PTC identifiziert wurden (Unger et al., 2008).

**Tabelle 21: Tumorassoziierte Kandidatengene in chromosomalen Bereichen assoziiert mit der TumorgroÙe (TNM) und dem Geschlecht**

Chromosomaler Bereich	Kandidatengene	Chromosomale Veränderung (Array-CGH)	Assoziation
1q21.1-23.3	PVRL4, F11R, VANGL2, COPA, TAGLN2, CRP, NTRK1, CCT3, RAB25, CKS1B, SHC1, RAB13, JTB, S100A1, S100A13, S100A4, S100A6, S100A7, S100A10, S100A11, PRUNE, CTSK, MCL1, BCL9, CHD1L, PIAS3, EFNA4, PLEKHO1, PMF1	DNA-Zugewinn	TNM T1
5q23.3-31.3	SPRY4, CTNNA1, EGR1, JMJD1B, TGFBI, CXCL14, PITX1, PPP2CA, GDF9, IRF1, PDLIM4	DNA-Verlust	Weiblich
7q22.1	ARPC1A, MCM7, EPHB4, TRIP6, SERPINE1, CUX1	DNA-Zugewinn	TNM T1
9p24.3	KANK1	DNA-Zugewinn	TNM T1
10p15.3-15.1	AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, NET1	DNA-Zugewinn	TNM T1
10q26.13-26.3	MMP21, BCCIP, DHX32, ADAM12, MKI67	DNA-Zugewinn	TNM T1
11p11.12-cen	Keine tumorassoziierten Kandidatengene	DNA-Zugewinn	TNM T1
12q24.11-24.23	TBX3, PTPN11	DNA-Zugewinn	TNM T3
16q22.1-q23.3	NOL3, CTCF, NFATC3, CDH3, HAS3, TERF2, NQO1, KIAA0174, BCAR1, MAF	DNA-Zugewinn	TNM T3

**Tabelle 22: Tumorassoziierte Kandidatengene in dem strahlenassoziierten Veränderungsbe- reich auf Chromosom 7q11.22-11.23**

Tumorassoziierte Kandidatengene auf Chr 7q11.22-11.23	Funktion
<b>CLIP2</b>	Cytoplasmatisches Linkerprotein, verbindet Zellorganelle mit Mikrotubuli; amplifiziert in Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen (Hoogenraad et al., 2004; Suzuki et al., 2004; Lassmann et al., 2007).
<b>CLDN3</b> <b>CLDN4</b>	Integrale Membranproteine, Komponenten des <i>Tight Junction</i> Komplexes; überexprimiert in verschiedenen humanen Tumoren (Rangel et al., 2003; Kominsky et al., 2004; de Oliveira et al., 2005; Santin et al., 2007; Mees et al., 2009).
<b>RFC2</b>	Teil eines Proteinkomplexes, der für die DNA-Replikation und -Reparatur benötigt wird; amplifiziert in Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen (Suzuki et al., 2004; Lassmann et al., 2007; Tomida et al., 2008).
<b>STAG3L3</b>	Kodiert für ein Protein mit bisher unbekannter Funktion; STAG3 agiert als Element des synaptonemalen Komplexes bei der Kohäsion von Schwesterchromatiden (Pezzi et al., 2000; Prieto et al., 2001).
<b>LIMK1</b>	LIM Kinase, reguliert Aktin-Dynamik und ist kritisch für akkurate Spindel-Orientierung; spielt eine Rolle bei der Tumorzellinvasion und Metastasierung (Davila et al., 2003; Yoshioka et al., 2003; Kaji et al., 2008).

### C.2.2 Gene Ontology Analyse

Um Aussagen über den funktionellen Zusammenhang der Gene in dem strahlenassoziierten Veränderungsbereich auf Chromosom 7q11.22-11.23 treffen zu können, wurde eine *Gene Ontology (GO) Enrichment* Analyse mit dem Online-Analyse-Tool DAVID (*The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) durchgeführt (Huang da et al., 2009). Die 68 Ensembl annotierten Gene des Bereichs wurden unter Standardeinstellungen analysiert.

Es konnten drei signifikant überrepräsentierte *GO-Terms* identifiziert werden, die in Tabelle 23 aufgeführt sind, wobei die korrespondierenden Kandidatengene auf der rechten Seite aufgelistet sind.

**Tabelle 23: Ergebnisse der *Gene Ontology (GO)* Analyse für Chromosom 7q11.22-11.23**

Signifikant überrepräsentierte <i>GO-Terms</i>	Kandidatengene
<i>DNA repair</i> (p = 0,047)	PMS2L3, PMS2L5
<i>Response to DNA damage stimulus</i> (p =0,034)	BAZ1B, PMS2L3, PMS2L5, RFC2
<i>Cell-cell adhesion</i> (p = 0,041)	CLDN3, CLDN4

### C.3 Validierung von Kopienzahlveränderungen mittels FISH-Analysen

Um die mittels Array-CGH identifizierten chromosomalen Aberrationen zu verifizieren, wurden FISH-Analysen auf FFPE (*Formalin-fixed Paraffin-embedded*)-Gewebeschnitten durchgeführt. Dazu erfolgte die Auswahl geeigneter BAC-Klone mit Hilfe der genomischen Datenbank Ensembl ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Die Bestätigungs-Experimente wurden auf Genebene durchgeführt, weshalb BAC-Klone gewählt wurden, die Kandidatengene in veränderten chromosomalen Bereichen repräsentieren. Zusätzlich wurden solche BAC-Klone als Referenz-Sonden ausgewählt, die eine Lokalisation in unveränderten chromosomalen Bereichen aufwiesen.

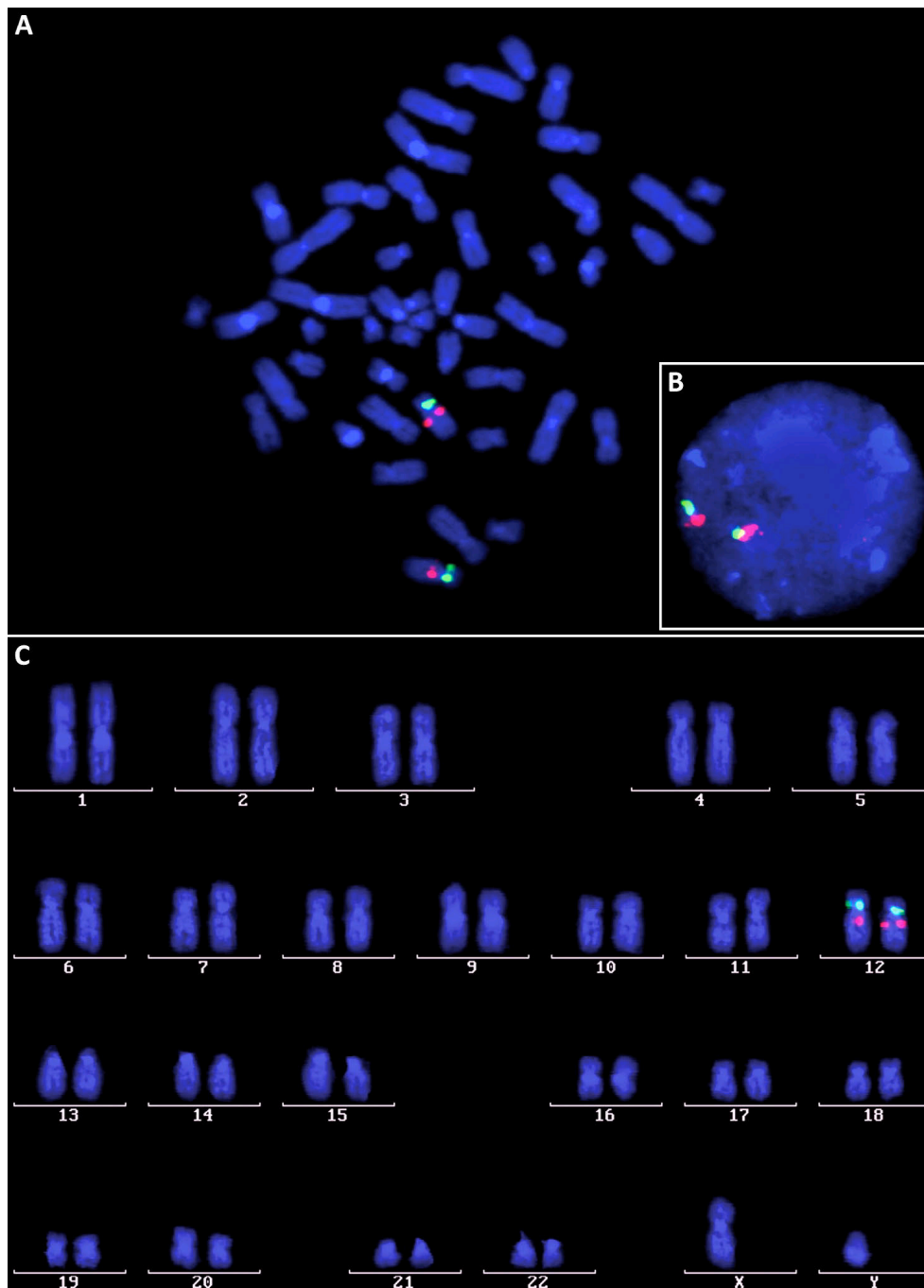
#### C.3.1 Testhybridisierung auf Metaphasen

Für die FISH-Analysen wurden 10 genspezifische BAC-Klone (Markierung mit Digoxigenin-11-dUTP) sowie fünf Referenz-Klone (Markierung mit Biotin-16-dUTP) als FISH-Sonden verwendet (aufgelistet in Tabelle 24). Alle BAC-Klone zeigten in einer Testhybridisierung auf Metaphasepräparate eine spezifische Hybridisierung (exemplarische Darstellung in Abb. 29) ohne inter- oder intrachromosomale Kreuzhybridisierungen.

**Tabelle 24: BAC-Klone für FISH-Analysen**

BAC-Klon	Kandidatengen(e)	Chromosomale Lokalisation	BAC-Klon Beginn – Ende (bp)*
RP11-631K06	TP73	1p36.32	3531105-3679535
RP11-391P21	TP73	1p36.32	3564673-3739404
RP11-331N10	RFC2	7q11.23	73557156-73708066
RP11-422O01	CLIP2	7q11.23	73700114-73819245
RP11-119F18	CDK5	7q36.1	150736204-150911875
RP11-124K14	CCND1	11q13.3	69424682-69587478
RP11-347I13	CTTN	11q13.3	70172684-70330045
RP11-66M13	WNT1	12q13.12	49259560-49457555
RP11-66N19	AGAP2	12q14.1	58077708-58226319
RP11-144B02	PXN, RPLP0	12q24.23	120578966-120727603
<b>Referenz-Klone</b>			
RP11-109H10	-	1q32.1	199154642-199346395
RP11-136K15	-	2p11.2	90098405-90265836
RP11-769C10	-	7p11.2	54051017-54199428
RP11-770L06	-	11q22.1	100266631-100415119
RP11-751A15	-	12p11.22	30494127-30660415

\*Positionen der BAC-Klone gemäß *Homo sapiens high-coverage assembly GRCh37, Genome Reference Consortium*.



**Abbildung 29: Testhybridisierung von Biotin- und Digoxigenin-markierten BAC-Sonden auf Metaphasepräparate**

Spezifische Hybridisierung der Biotin-markierten (grüne Signale) Referenz-Sonde RP11-751A15 (12p11.2; bp 30494127-30660415) und der Digoxigenin-markierten (rote Signale) BAC-Sonde RP11-66N19 (12q13.3-14.1; bp 58077708-58226319) dargestellt **(A)** in der Metaphase, **(B)** im Interphase-Zellkern und **(C)** im gelegten Karyogramm.



### **C.3.2 Interphase-FISH auf Tumor-Gewebeschnitten**

Nach der Testhybridisierung wurden Tumorgewebeschnitte mit den BAC-Klonen hybridisiert. Es handelte sich hierbei um FFPE-Gewebeschnitte der gleichen PTC-Fälle, die bereits mittels Array-CGH untersucht wurden. Die Gewebeschnitte wurden aus Tumormaterial der Chernobyl Tissue Bank am Imperial College London angefertigt und für die FISH-Analysen zur Verfügung gestellt. Die Bildaufnahme der hybridisierten Gewebeschnitte erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop mit ApoTome-Modul. Bei der anschließenden Auswertung der Präparate wurden Zellen mit zwei grünen Referenzsignalen und mehr als zwei roten Signalen (Kandidatengen-repräsentierender BAC-Klon) als amplifiziert/aberrant bewertet. Zellen wurden als normal/unverändert gewertet, wenn sie zwei rote und zwei grüne Signale aufwiesen.

#### **C.3.2.1 Validierung wiederkehrender Kopienzahlveränderungen in PTC**

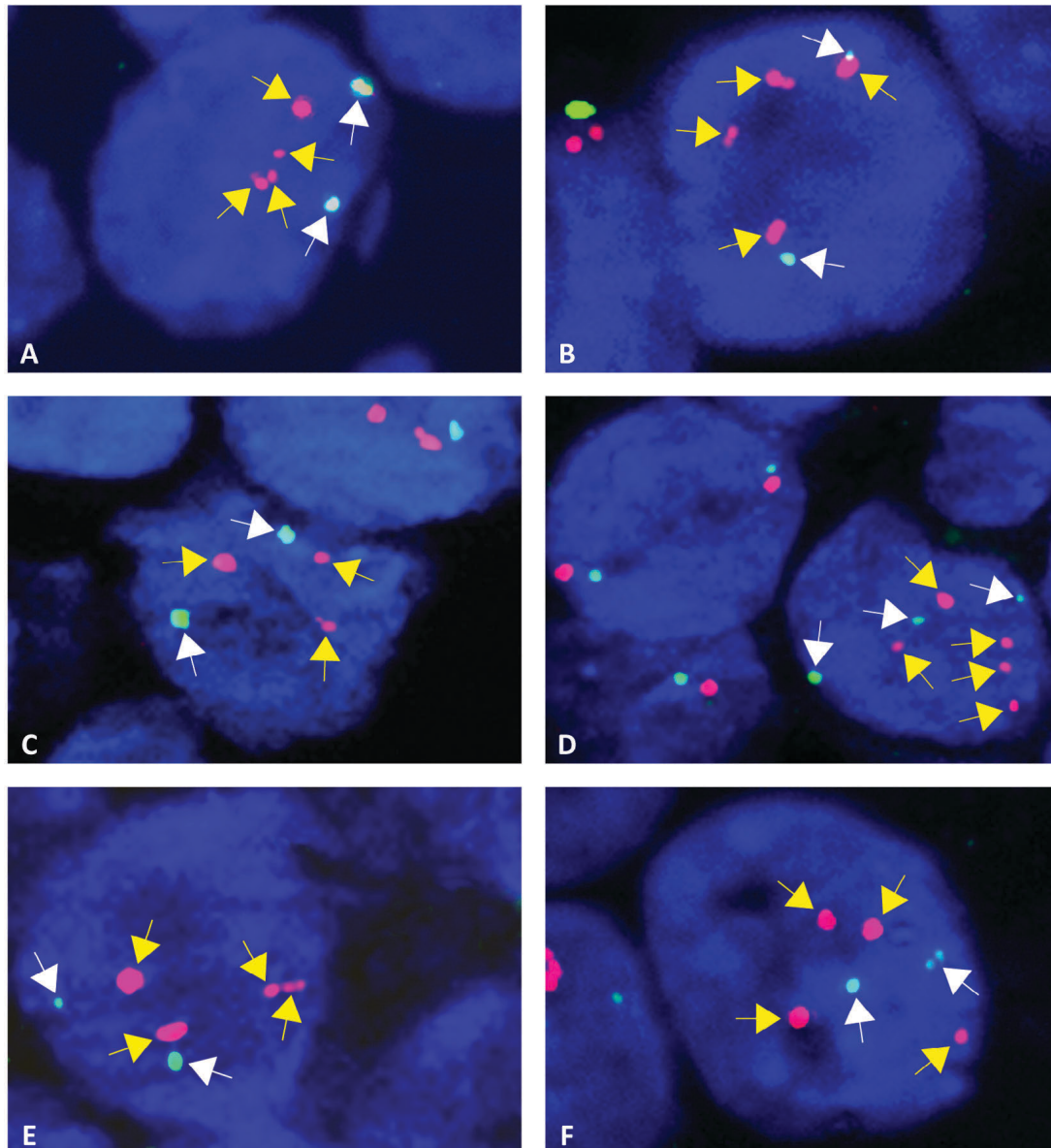
Die FISH-Validierung wiederkehrender Kopienzahlveränderungen in PTC erfolgte exemplarisch an ausgewählten Veränderungen mit Kandidatengen aus Tabelle 20, wobei Tumorgewebeschnitte von PTC-Fällen hybridisiert wurden, die in der Array-CGH die jeweilige Kopienzahlveränderung aufwiesen.

Die Ergebnisse der FISH-Analysen zur Validierung wiederkehrend veränderter chromosomaler Bereiche sind in Tabelle 25 zusammengefasst. In allen 14 untersuchten Tumorgeweben konnten die chromosomalen Veränderungen (DNA-Zugewinne auf Chromosomen 1p36.32, 7q36.1, 11q13.3, 12q13.12, 12q14.1 und 12q24.23) bestätigt werden. Da die FISH-Analysen mit genspezifischen BAC-Klonen durchgeführt wurden, konnten damit auch Amplifikationen der Kandidatengene TP73, CDK5, CTTN, CCND1, WNT1, AGAP2, PXN und RPLP0 nachgewiesen werden (exemplarisch in Abb. 30 dargestellt). Die Häufigkeit aberranter Zellen pro Tumorgewebe lag bei 15-29 % (Median: 22 %), wobei Zellen mit veränderter Kopienzahl eine relativ uneinheitliche Anzahl von FISH-Signalen aufwiesen, die von drei Signalen bis teilweise sechs Signalen pro Zelle reichte. Dies deutete auf eine Heterogenität der Tumore hin, bei der sich die Zellen innerhalb eines Tumorgewebes hinsichtlich ihrer zytogenetischen Veränderungen unterscheiden.

**Tabelle 25: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Validierung wiederkehrender Kopienzahlveränderungen in PTC**

PTC-Fall	Kandidatengen(e)	chromosomale Lokalisation	BAC-Klon(e)	Referenz-Klon	% aberrante Zellen*
UA180	<b>TP73</b>	1p36.32	RP11-631K06, RP11-391P21	RP11-109H10	24
UA138	<b>TP73</b>	1p36.32	RP11-631K06, RP11-391P21	RP11-109H10	25
UA162	<b>TP73</b>	1p36.32	RP11-631K06, RP11-391P21	RP11-109H10	29
UA165	<b>TP73</b>	1p36.32	RP11-631K06, RP11-391P21	RP11-109H10	18
UA165	<b>CDK5</b>	7q36.1	RP11-119F18	RP11-769C10	15
UA208	<b>CTTN</b>	11q13.3	RP11-347I13	RP11-770L06	21
UA145	<b>CCND1</b>	11q13.3	RP11-124K14	RP11-770L06	23
UA208	<b>CCND1</b>	11q13.3	RP11-124K14	RP11-770L06	29
UA192	<b>WNT1</b>	12q13.12	RP11-66M13	RP11-751A15	17
UA400	<b>AGAP2</b>	12q14.1	RP11-66N19	RP11-751A15	25
UA366	<b>AGAP2</b>	12q14.1	RP11-66N19	RP11-751A15	17
UA363	<b>PXN, RPLP0</b>	12q24.23	RP11-144B02	RP11-751A15	21
UA436	<b>PXN, RPLP0</b>	12q24.23	RP11-144B02	RP11-751A15	20
UA463	<b>PXN, RPLP0</b>	12q24.23	RP11-144B02	RP11-751A15	23

\*Anteil (%) aberranter Zellen (Zellen mit amplifizierten FISH-Signalen: zwei grüne Referenzsignale und mehr als zwei rote Signale des Kandidatengen-repräsentierenden BAC-Klons) in 100 ausgewerteten Zellen.



**Abbildung 30: Interphase-FISH auf Tumorgewebeschnitten mit genspezifischen BAC-Sonden zur Validierung wiederkehrender Kopienzahlveränderungen in PTC**

Gezeigt sind Zellen mit amplifizierten FISH-Signalen (Zellkerne mit DAPI gegengefärbt). **(A)** PTC-Fall UA436: Amplifizierte FISH-Signale auf Chr 12q24.23; genspezifischer BAC-Klon RP11-144B02 für die Kandidatengene PNX und RPLP0 (rot, gelbe Pfeile) und Referenz-Klon RP11-751A15 (grün, weiße Pfeile); **(B)** PTC-Fall UA400: Amplifizierte FISH-Signale auf Chr 12q14.1; genspezifischer BAC-Klon RP11-66N19 für das Kandidatengen AGAP2 (rot, gelbe Pfeile) und Referenz-Klon RP11-751A15 (grün, weiße Pfeile); **(C)** PTC-Fall UA208: Amplifizierte FISH-Signale auf Chr 11q13.3; genspezifischer BAC-Klon RP11-347113 für das Kandidatengen CTTN (rot, gelbe Pfeile) und Referenz-Klon RP11-770L06 (grün, weiße Pfeile); **(D)** PTC-Fall UA165: Amplifizierte FISH-Signale auf Chr 7q36.1; genspezifischer BAC-Klon RP11-119F18 für das Kandidatengen CDK5 (rot, gelbe Pfeile) und Referenz-Klon RP11-769C10 (grün, weiße Pfeile); **(E)** PTC-Fall UA145: Amplifizierte FISH-Signale auf Chr 11q13.3; genspezifischer BAC-Klon RP11-124K14 für das Kandidatengen CCND1 (rot, gelbe Pfeile) und Referenz-Klon RP11-770L06 (grün, weiße Pfeile); **(F)** PTC-Fall UA138: Amplifizierte FISH-Signale auf Chr 1p36.32; überlappende genspezifische BAC-Klone RP11-631K06 und RP11-391P21 für das Kandidatengen TP73 (rot, gelbe Pfeile) und Referenz-Klon RP11-109H10 (grün, weiße Pfeile).

### **C.3.2.2 Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23**

Die Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 erfolgte mit zwei genspezifischen BAC-Klonen für die Kandidatengene RFC2 und CLIP2, die in der Mitte des veränderten chromosomalen Bereichs lokalisiert sind. Als Referenz-Klon wurde ein centromernaher BAC-Klon auf Chromosom 2 kohybridisiert, der in der Array-CGH-Analyse keine Kopienzahlveränderungen aufwies. Chromosom 7 war für die Wahl eines Referenz-Klons ungeeignet, da es in der Array-CGH sehr viele chromosomale Veränderungen aufwies (siehe Abbildung 26).

Die Ergebnisse der FISH-Analysen zur Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 sind in Tabelle 26 zusammengefasst sowie in den Abbildungen 31 und 32 genspezifisch für RFC2 und CLIP2 dargestellt.

Der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 konnte in allen untersuchten exponierten PTC-Fällen (n = 14), die den DNA-Zugewinn bereits in den Array-CGH-Analysen zeigten, bestätigt werden. Die Häufigkeit aberranter Zellen mit amplifizierten FISH-Signalen lag bei 12-24 % pro Tumorgewebe (Median: 16 %), wobei Zellen mit veränderter Kopienzahl mehrheitlich 3-4 FISH-Signale pro Zelle aufwiesen. In Abbildung 33 ist exemplarisch die Interphase-FISH auf Tumorgewebe des PTC-Falls UA135 dargestellt, wobei vier Zellen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 und drei Zellen mit normaler Kopienzahl gezeigt sind.

Exponierte PTC-Fälle mit normaler Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 nach Array-CGH (n = 6) wiesen auch in den FISH-Analysen eine normale Kopienzahl des chromosomalen Bereichs auf (0-5 % aberrante Zellen pro Tumorgewebe; Median: 3 %). Entsprechend konnte dies für nicht exponierte PTC-Fälle (n = 10) gezeigt werden, die in der Array-CGH-Analyse eine normale Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 aufwiesen (0-3 % aberrante Zellen pro Tumorgewebe; Median: 1 %).

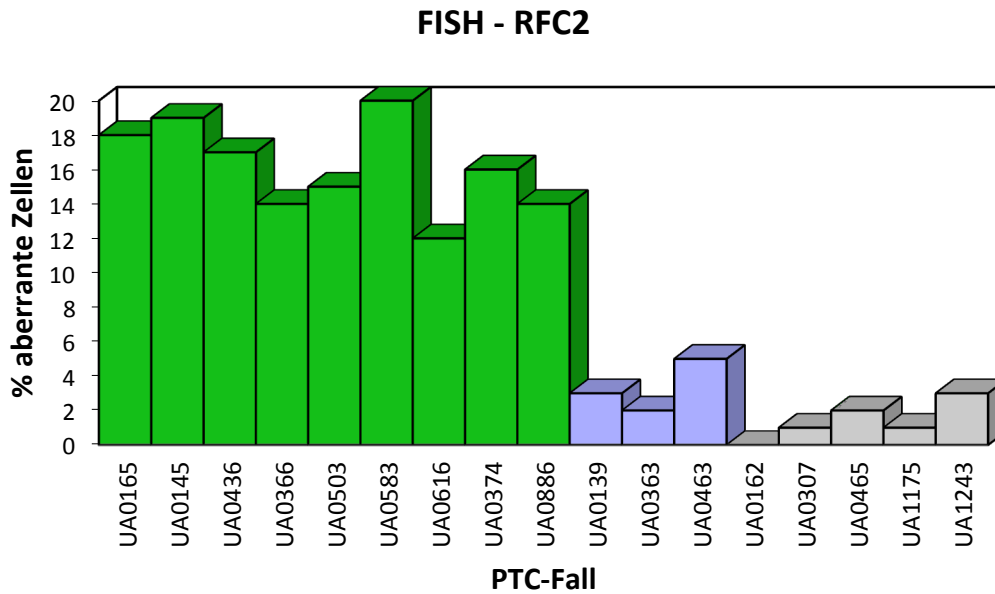
**Tabelle 26: Ergebnisse der FISH-Analysen zur Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 in PTC**

PTC-Fall	Kandidatengen	Chromosomale Lokalisation	BAC-Klon	Referenz-Klon	% aberrante Zellen*
UA0165	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	18
UA0145	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	19
UA0436	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	17
UA0366	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	14
UA0503	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	15
UA0583	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	20
UA0616	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	12
UA0374	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	16
UA0886	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	14
UA0249	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	22
UA0135	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	24
UA0400	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	17
UA0138	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	14
UA0286	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	23
UA0601	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	13
UA0417	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	14
UA0771	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	14
UA0139	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	3
UA0363	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	2
UA0463	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	5
UA0180	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	3
UA0192	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	0
UA0208	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	3
UA0307	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	1
UA0465	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	2
UA1175	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	1
UA1243	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	3
UA0162	RFC2	7q11.23	RP11-331N10	RP11-136K15	0
UA0307	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	1
UA0465	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	0
UA1175	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	0
UA0162	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	0
UA1243	CLIP2	7q11.23	RP11-422O01	RP11-136K15	2

**Farbkodierung:**

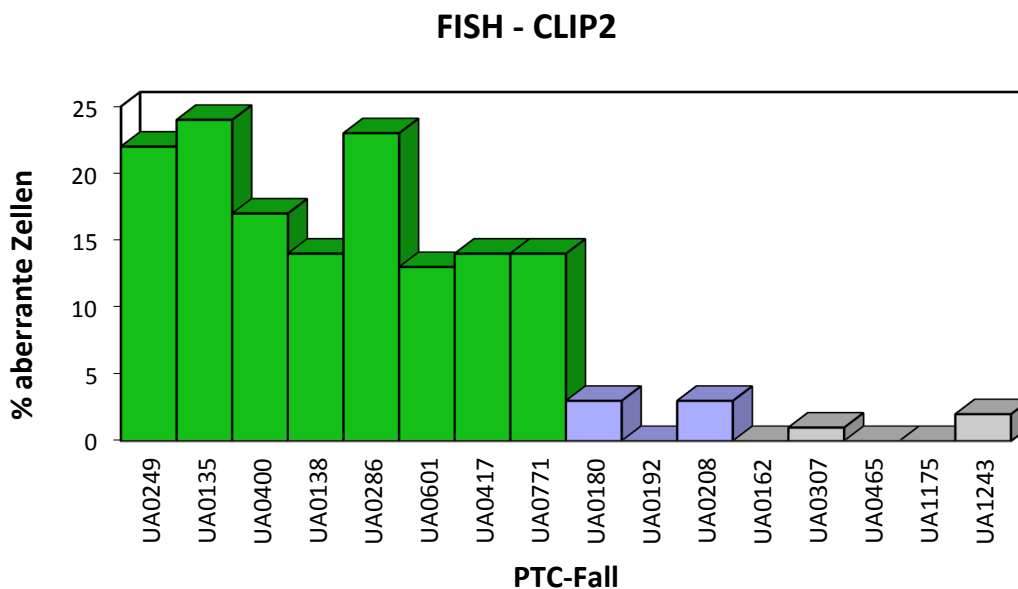
- Exponierte PTC-Fälle, die einen DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 aufwiesen (Array-CGH)
- Exponierte PTC-Fälle, die keinen DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 aufwiesen (Array-CGH)
- Nicht exponierte PTC-Fälle, die keinen DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 aufwiesen (Array-CGH)

\*Anteil (%) aberranter Zellen (Zellen mit amplifizierten FISH-Signalen: zwei grüne Referenzsignale und mehr als zwei rote Signale des Kandidatengen-repräsentierenden BAC-Klons) in 100 ausgewerteten Zellen.



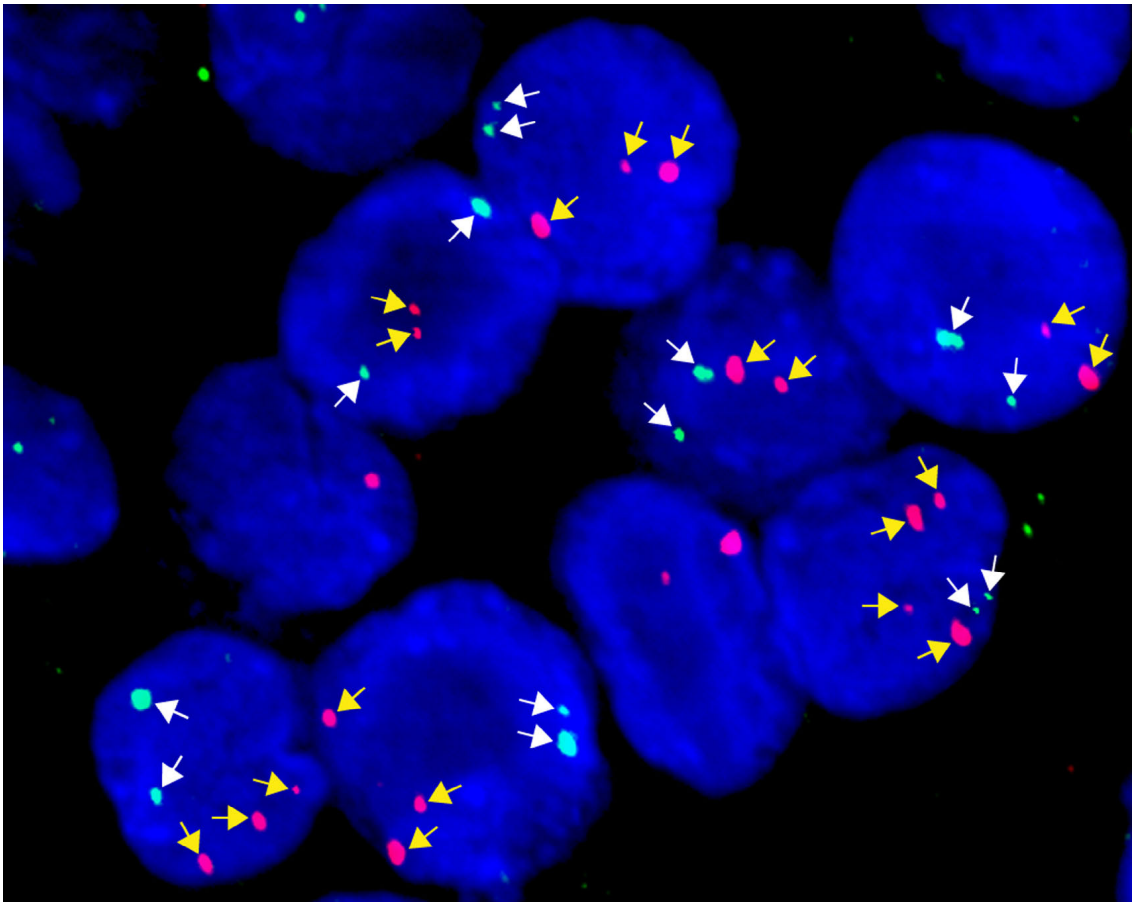
**Abbildung 31: Ergebnisse der FISH-Analysen für Chromosom 7q11.22-11.23 mit der genspezifischen BAC-Sonde für das Gen RFC2**

Dargestellt ist für jeden untersuchten PTC-Fall der Anteil (%) der ermittelten aberranten Zellen. Farbkodierung: grün - exponierte PTC-Fälle mit DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 (Array-CGH); helllila - exponierte PTC-Fälle, die keinen DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 aufwiesen (Array-CGH); grau - nicht exponierte PTC-Fälle, die keinen DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 aufwiesen (Array-CGH).



**Abbildung 32: Ergebnisse der FISH-Analysen für Chromosom 7q11.22-11.23 mit der genspezifischen BAC-Sonde für das Gen CLIP2**

Dargestellt ist für jeden untersuchten PTC-Fall der Anteil (%) der ermittelten aberranten Zellen. Farbkodierung: grün - exponierte PTC-Fälle mit DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 (Array-CGH); helllila - exponierte PTC-Fälle, die keinen DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 aufwiesen (Array-CGH); grau - nicht exponierte PTC-Fälle, die keinen DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 aufwiesen (Array-CGH).



**Abbildung 33: FISH-Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23**

Interphase-FISH auf einem Tumorgewebeschnitt des PTC-Falls UA135 mit amplifizierten FISH-Signalen auf Chr 7q11.22-11.23. Hybridisierung des genspezifischen BAC-Klons RP11-422O01 für das Kandidatengen CLIP2 auf Chr 7q11.23 (rote Signale, markiert durch gelbe Pfeile) und Referenz-Klon RP11-136K15 (grüne Signale, markiert durch weiße Pfeile). Zellen mit zwei grünen und mehr als zwei roten Signalen repräsentieren den strahlenassoziierten DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 (4 Zellen), während Zellen mit zwei grünen und zwei roten Signalen eine normale Kopienzahl aufweisen (3 Zellen).

## **C.4 Bestimmung der mRNA-Expression von Kandidatengenem mittels qRT-PCR**

### **C.4.1 mRNA-Expression von Kandidatengenem auf Chromosom 7q11.22-11.23**

In den Array-CGH-Analysen von 80 PTC konnte ein strahlenassoziierter DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 identifiziert werden (C.1.2). In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 zu einer erhöhten Expression ausgewählter Kandidatengene (siehe C.2) auf mRNA-Ebene führt. Hierzu wurde die mRNA-Expression der neun auf Chromosom 7q11.22-11.23 lokalisierten Kandidatengene CLDN3, CLDN4, CLIP2, LIMK1, PMS2L2, PMS2L3, PMS2L11, RFC2 und STAG3L3 mittels quantitativer Real-Time-PCR (qRT-PCR) untersucht. Dabei wurde die RNA der gleichen PTC-Fälle analysiert, die bereits mittels Array-CGH untersucht wurden.

#### **C.4.1.1 Differentielle mRNA-Expression von Kandidatengenem in exponierten PTC mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 und Tumoren mit normaler Kopienzahl**

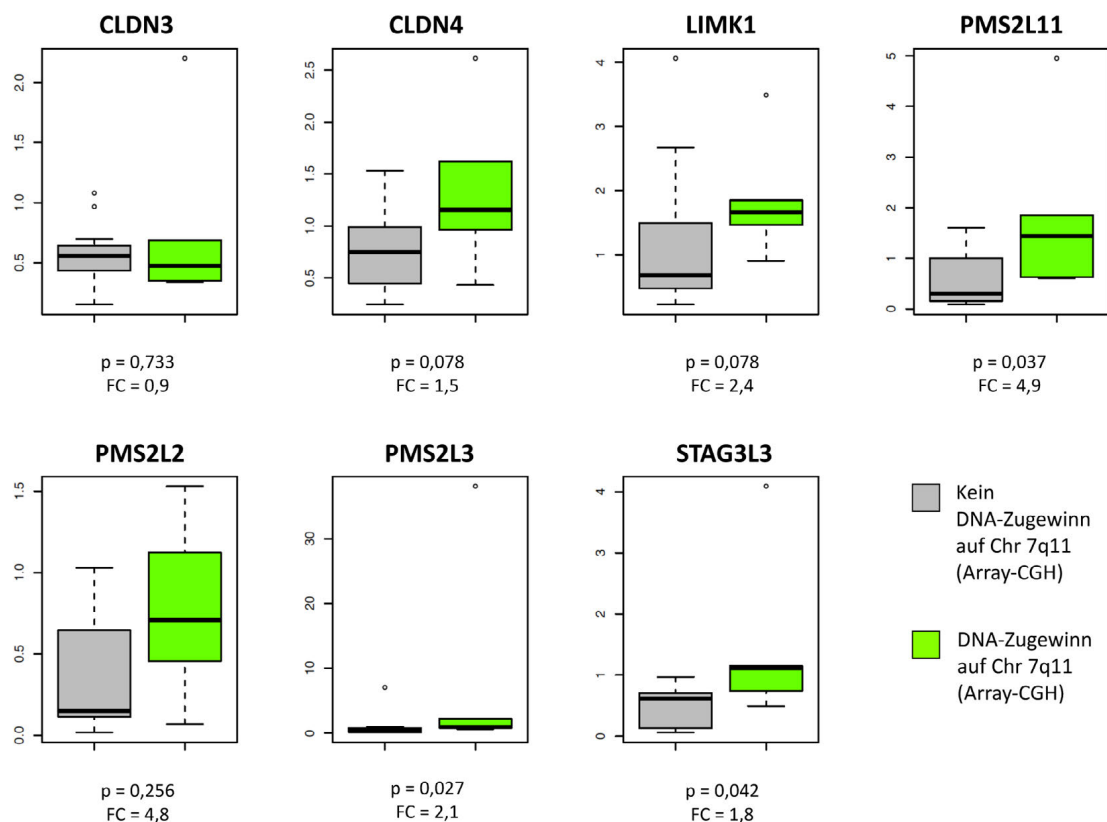
Es wurden sechs exponierte PTC-Fälle, die in der Array-CGH-Analyse einen DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 aufwiesen, sowie 10 exponierte PTC-Fälle mit normaler Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 nach Array-CGH mittels qRT-PCR untersucht (Tabelle 27; Patientendaten siehe Tabellen 2 und 3). Mit dem Mann-Whitney-Test wurde die relative Expression der Gene anschließend auf differentielle Expression zwischen den zwei Gruppen getestet.

Die mRNA-Expression der drei Gene PMS2L3, PMS2L11 und STAG3L3 war in exponierten PTC-Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 im Vergleich zu exponierten PTC-Fällen mit normaler Kopienzahl signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test; Abb. 34). Darüber hinaus konnte für die Kandidatengene CLDN4, LIMK1 und PMS2L2 eine mindestens 1,5-fach erhöhte mRNA-Expression in Tumoren mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 im Vergleich zu Tumoren mit normaler Kopienzahl gezeigt werden (Abb. 34).



**Tabelle 27: Hinsichtlich differentieller mRNA-Expression von Kandidatengenen auf Chromosom 7q11.22-11.23 untersuchte PTC-Fälle**

PTC-Fall mit normaler Kopienzahl auf Chr 7q11.22-11.23 (Array-CGH)	PTC-Fall mit DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 (Array-CGH)
UA0103T	UA0165T
UA0147T	UA0286T
UA0208T	UA0366T
UA0343T	UA0400T
UA0456T	UA0583T
UA0463T	UA0616T
UA0597T	
UA0648T	
UA0671T	
UA0758T	



**Abbildung 34: mRNA-Expression von Kandidatengenen in exponierten PTC mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 und exponierten Tumoren mit normaler Kopienzahl**

Gezeigt ist die mRNA-Expression von sieben im strahlenassoziierten chromosomalen Bereich 7q11.22-11.23 lokalisierten Kandidatengenen in exponierten PTC-Fällen mit normaler Kopienzahl auf Chr 7q11.22-11.23 (graue *Boxplots*) und exponierten PTC-Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 (grüne *Boxplots*). Eine Box beinhaltet jeweils 50 % der Daten (unteres bis oberes Quartil); der Median ist als schwarzer horizontaler Balken angezeigt. Des Weiteren sind das Minimum und das Maximum der Verteilung dargestellt, wobei Ausreißer als einzelne Datenpunkte gezeigt werden. Die Veränderung der Expression (*Fold-change*: FC) wurde aus den Medianen der Genexpression in den zwei Gruppen berechnet. Die p-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt.

**C.4.1.2 Differentielle mRNA-Expression von CLIP2 in exponierten und nicht exponierten PTC**

Um eine Korrelation der mRNA-Expression von Kandidatengen auf Chromosom 7q11.22-11.23 mit dem Expositionsstatus zu überprüfen, wurden 26 exponierte und 14 nicht exponierte PTC-Fälle mittels qRT-PCR untersucht (Tabelle 28; Patientendaten siehe Tabellen 2 und 3). Mit dem Mann-Whitney-Test wurde die relative Expression der Gene anschließend auf differentielle Expression in exponierten und nicht exponierten PTC getestet.

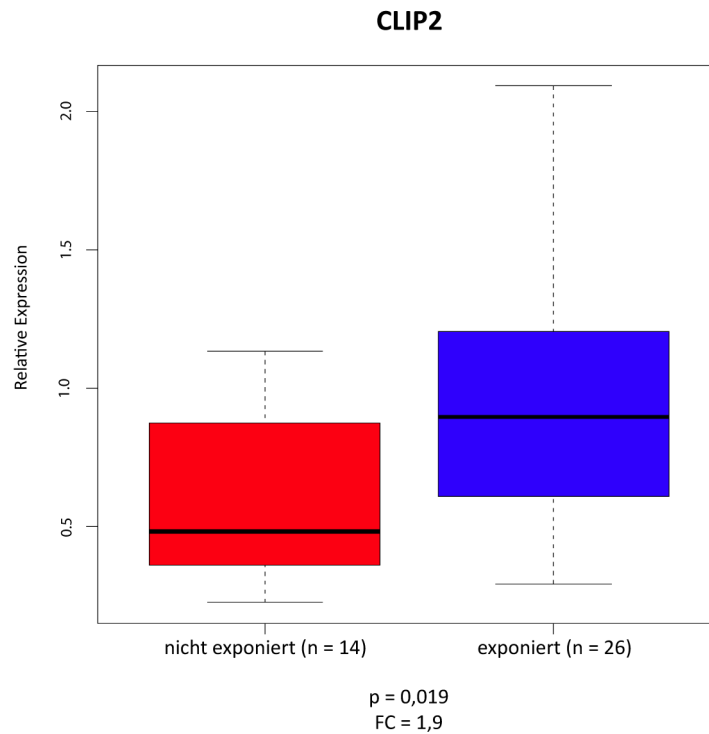
Nur das Kandidatengen CLIP2 zeigte eine signifikant höhere mRNA-Expression in den exponierten Fällen im Vergleich zu den nicht exponierten Fällen ( $p = 0,019$ ; Mann-Whitney-Test; Abb. 35).

**Tabelle 28: Hinsichtlich der mRNA-Expression von CLIP2 untersuchte PTC-Fälle**

PTC-Fall	Strahlenexposition*	PTC-Fall	Strahlenexposition*
UA1005T	nein	UA053T	ja
UA1050T	nein	UA1126T	ja
UA1053T	nein	UA138T**	ja
UA1328T	nein	UA139T	ja
UA1367T	nein	UA144T	ja
UA1426T	nein	UA147T	ja
UA1502T	nein	UA208T	ja
UA162T	nein	UA243T	ja
UA312T	nein	UA249T**	ja
UA421T	nein	UA286T**	ja
UA574T	nein	UA363T	ja
UA692T	nein	UA400T**	ja
UA710T	nein	UA436T**	ja
UA991T	nein	UA463T	ja
		UA482T	ja
		UA502T	ja
		UA503T**	ja
		UA580T	ja
		UA583T**	ja
		UA597T	ja
		UA616T**	ja
		UA648T	ja
		UA671T	ja
		UA693T	ja
		UA756T	ja
		UA905T**	ja

\* Exponiert durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl.

\*\*PTC-Fälle mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 (Array-CGH).



**Abbildung 35: mRNA-Expression des Kandidatengens CLIP2 in exponierten und nicht exponierten PTC**

Gezeigt ist die mRNA-Expression für das im strahlenassoziierten chromosomalen Bereich 7q11.22-11.23 lokalisierte Kandidatengens CLIP2 in nicht exponierten (roter *Boxplot*) und exponierten (blauer *Boxplot*) PTC-Fällen. Eine Box beinhaltet jeweils 50 % der Daten (unteres bis oberes Quartil); der Median ist als schwarzer horizontaler Balken angezeigt. Des Weiteren sind das Minimum und das Maximum der Verteilung dargestellt. Die Gruppe der exponierten PTC-Fälle ( $n = 26$ ) zeigt eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von CLIP2 ( $p = 0,019$ ; Mann-Whitney-Test) im Vergleich zur Gruppe der nicht exponierten PTC-Fälle ( $n = 14$ ). Die Veränderung der Expression (*Fold-change*: FC) wurde aus den Medianen der Genexpression in den zwei Gruppen berechnet.

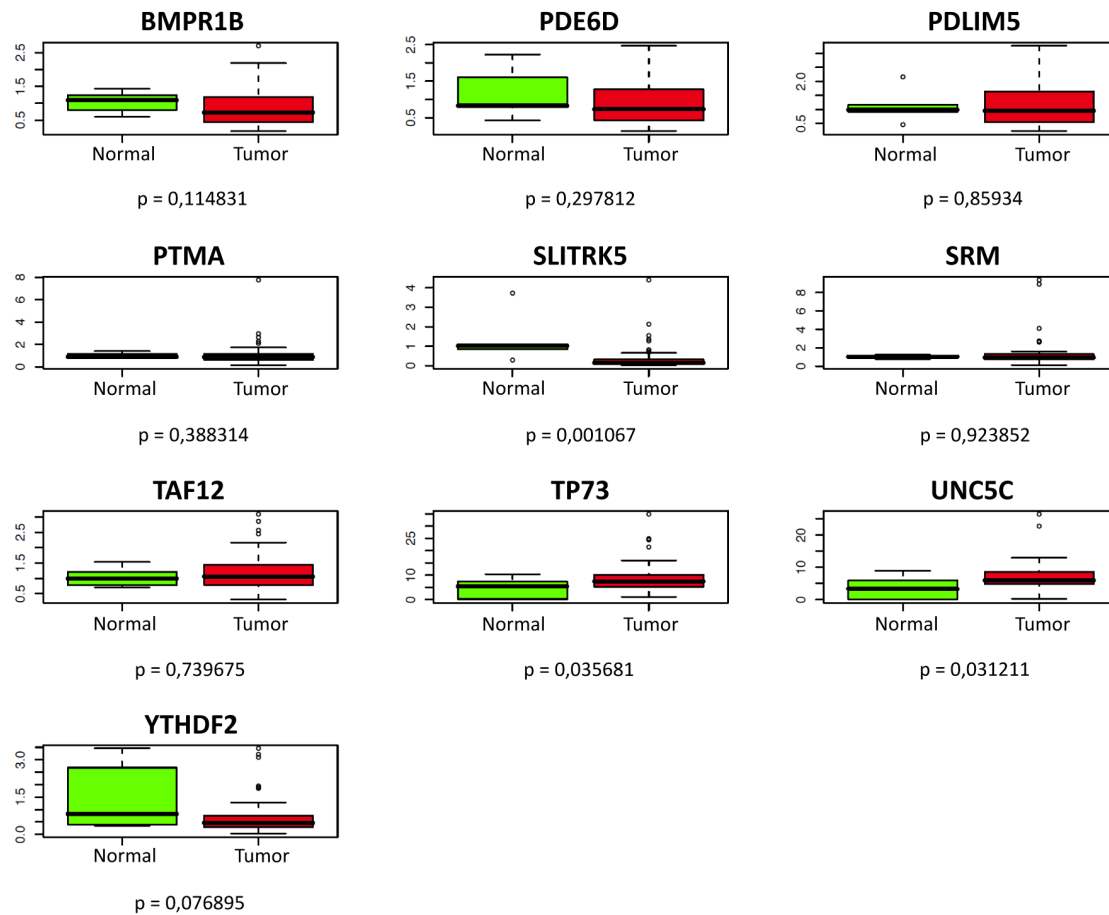
#### C.4.2 mRNA-Expression von Kandidatengen aus einem Mausmodell

Im Rahmen des EU-Projekts GENRISK-T wurden auch Untersuchungen an transgenen Mausmodellen zur Aufklärung der Schilddrüsenkarzinogenese durchgeführt. Die in den Array-CGH-Analysen von transgenen TRK-T1-Mäusen identifizierten Kandidatengene (Heiliger et al., submitted). sollten in dieser Arbeit auf ihre Beteiligung in humanen Schilddrüsenkarzinomen untersucht werden. Hierzu wurde die mRNA-Expression der zehn tumorassoziierten Kandidatengene BMPR1B, PDE6D, PDLIM5, PTMA, SLITRK5, SRM, UNC5C, TAF12, TP73 und YTHDF2 in 67 PTC des CTB-Kollektivs (Tabelle 29; Patientendaten siehe Tabellen 2 und 3) mittels qRT-PCR analysiert. Eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression erfolgte im Vergleich zu fünf normalen Schilddrüsenorganen. Mit dem Mann-Whitney-Test wurde die relative Expression der Gene anschließend auf differentielle Expression in Tumor- und Normalgewebe getestet.

Die drei Kandidatengene SLITRK5, TP73 und UNC5C zeigten eine signifikant unterschiedliche mRNA-Expression in Tumor- und Normalgewebe ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitney-Test; Abb. 36). Im Vergleich zu normalem Schilddrüsenorgan konnte eine deutliche Überexpression des Kandidatengens UNC5C in PTC nachgewiesen werden ( $p = 0,031$ ). Das Gen TP73 zeigte ebenfalls eine Überexpression im Tumorgewebe ( $p = 0,036$ ), wobei sich diese Beobachtung zusätzlich mit den Ergebnissen der Array-CGH-Analysen von 52 humanen PTC (siehe C.1.2.3) deckte. TP73 ist in einem wiederkehrend veränderten Bereich auf Chromosom 1p36.32 lokalisiert, dessen DNA-Zugewinn auch in FISH-Analysen verifiziert wurde (siehe C.3.2.1). Des Weiteren konnte für das Kandidatengene SLITRK5 eine signifikant verminderte mRNA-Expression im Tumorgewebe ermittelt werden ( $p = 0,001$ ). Auch dies stand im Einklang mit den Array-CGH-Ergebnissen von 52 PTC (siehe C.1.2.3), da SLITRK5 in einem häufig von DNA-Verlusten betroffenen Bereich auf Chromosom 13q31.2 liegt.

**Tabelle 29: Hinsichtlich differentieller mRNA-Expression von Kandidatengenen in Tumor- und Normalgewebe untersuchte Schilddrüsenfälle**

Fall	Gewebe	Fall	Gewebe
UA053	Tumorgewebe (PTC)	UA363	Tumorgewebe (PTC)
UA1005	Tumorgewebe (PTC)	UA374	Tumorgewebe (PTC)
UA103	Tumorgewebe (PTC)	UA400	Tumorgewebe (PTC)
UA1030	Tumorgewebe (PTC)	UA417	Tumorgewebe (PTC)
UA1050	Tumorgewebe (PTC)	UA421	Tumorgewebe (PTC)
UA1053	Tumorgewebe (PTC)	UA436	Tumorgewebe (PTC)
UA1126	Tumorgewebe (PTC)	UA446	Tumorgewebe (PTC)
UA1144	Tumorgewebe (PTC)	UA456	Tumorgewebe (PTC)
UA1175	Tumorgewebe (PTC)	UA463	Tumorgewebe (PTC)
UA1208	Tumorgewebe (PTC)	UA465	Tumorgewebe (PTC)
UA1240	Tumorgewebe (PTC)	UA482	Tumorgewebe (PTC)
UA1243	Tumorgewebe (PTC)	UA502	Tumorgewebe (PTC)
UA1247	Tumorgewebe (PTC)	UA503	Tumorgewebe (PTC)
UA1253	Tumorgewebe (PTC)	UA574	Tumorgewebe (PTC)
UA1319	Tumorgewebe (PTC)	UA580	Tumorgewebe (PTC)
UA1328	Tumorgewebe (PTC)	UA583	Tumorgewebe (PTC)
UA1337	Tumorgewebe (PTC)	UA597	Tumorgewebe (PTC)
UA1367	Tumorgewebe (PTC)	UA616	Tumorgewebe (PTC)
UA1375	Tumorgewebe (PTC)	UA648	Tumorgewebe (PTC)
UA138	Tumorgewebe (PTC)	UA671	Tumorgewebe (PTC)
UA139	Tumorgewebe (PTC)	UA679	Tumorgewebe (PTC)
UA1416	Tumorgewebe (PTC)	UA692	Tumorgewebe (PTC)
UA144	Tumorgewebe (PTC)	UA693	Tumorgewebe (PTC)
UA147	Tumorgewebe (PTC)	UA710	Tumorgewebe (PTC)
UA1486	Tumorgewebe (PTC)	UA756	Tumorgewebe (PTC)
UA1502	Tumorgewebe (PTC)	UA771	Tumorgewebe (PTC)
UA162	Tumorgewebe (PTC)	UA886	Tumorgewebe (PTC)
UA173	Tumorgewebe (PTC)	UA905	Tumorgewebe (PTC)
UA180	Tumorgewebe (PTC)	UA954	Tumorgewebe (PTC)
UA192	Tumorgewebe (PTC)	UA964	Tumorgewebe (PTC)
UA208	Tumorgewebe (PTC)	UA991	Tumorgewebe (PTC)
UA243	Tumorgewebe (PTC)	UA1243	Normalgewebe
UA249	Tumorgewebe (PTC)	UA1375	Normalgewebe
UA286	Tumorgewebe (PTC)	UA758	Normalgewebe
UA312	Tumorgewebe (PTC)	UA886	Normalgewebe
UA329	Tumorgewebe (PTC)	UA905	Normalgewebe



**Abbildung 36: mRNA-Expression von Kandidatengenen aus transgenen TRK-T1-Mäusen in humanen PTC und Schilddrüsennormalgewebe**

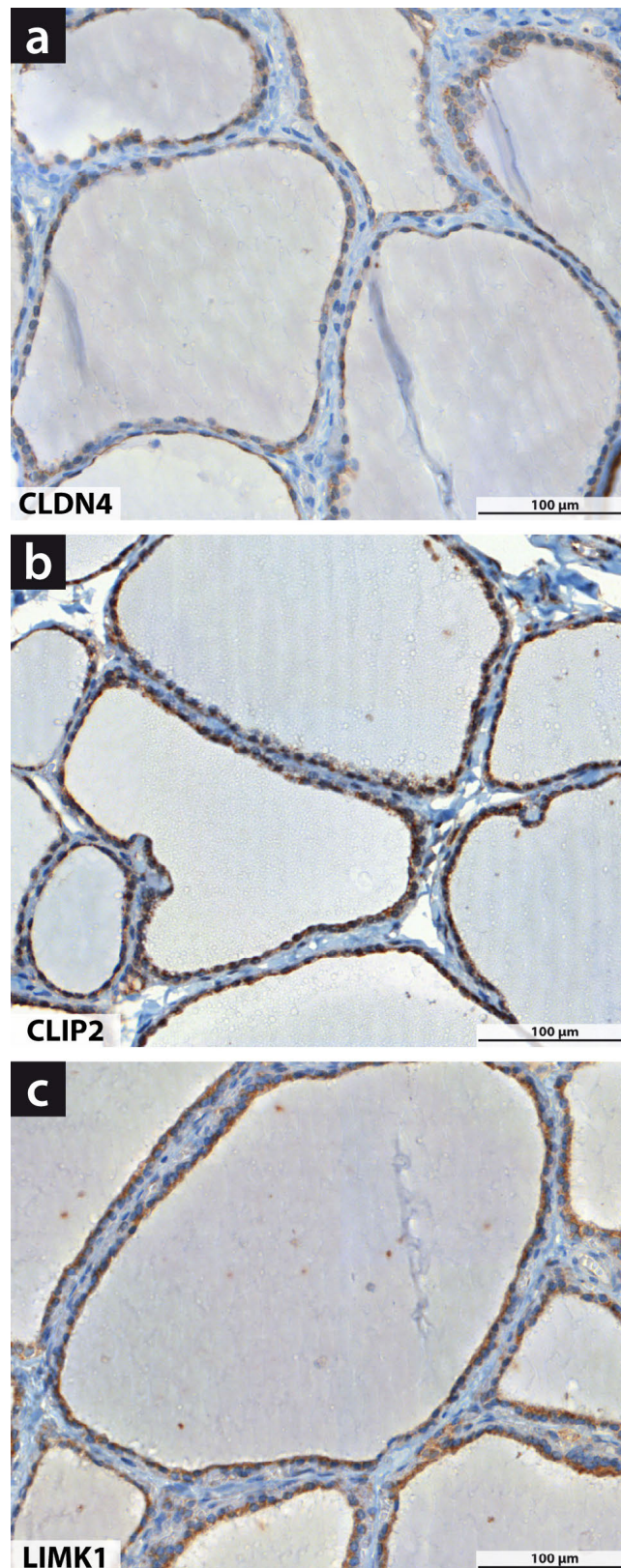
Gezeigt ist die mRNA-Expression von 10 Kandidatengenen in PTC (rote *Boxplots*) im Vergleich zu Schilddrüsennormalgewebe (grüne *Boxplots*). Eine Box beinhaltet jeweils 50 % der Daten (unteres bis oberes Quartil); der Median ist als schwarzer horizontaler Balken angezeigt. Des Weiteren sind das Minimum und das Maximum der Verteilung dargestellt, wobei Ausreißer als einzelne Datenpunkte gezeigt werden. Die p-Werte wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt. Die der Gene SLITRK5, TP73 und UNC5C zeigen in Tumor- und Normalgewebe eine signifikant unterschiedliche mRNA-Expression.

## **C.5 Immunhistochemische Untersuchung der Proteinexpression an Schilddrüsengewebe**

Auf mRNA-Ebene konnte für sechs auf Chromosom 7q11.22-11.23 lokalisierte Kandidatengene (CLDN4, LIMK1, PMS2L2, PMS2L3, PMS2L11 und STAG3L3) gezeigt werden, dass ein DNA-Zugewinn desselben Bereichs zu einer erhöhten mRNA-Expression führt. Darüber hinaus konnte eine differentielle mRNA-Expression von CLIP2 in exponierten und nicht exponierten Fällen nachgewiesen werden (siehe C.4.1). Um die Expression der Kandidatengene auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden immunhistochemische Untersuchungen *in situ* an Schilddrüsengewebe durchgeführt. Die immunhistochemischen Analysen wurden auf die Kandidatengene CLDN4, LIMK1 und CLIP2 beschränkt, da für die restlichen Gene keine Primärantikörper kommerziell erhältlich waren.

### **C.5.1 Etablierung der Immunhistochemie an normalem Schilddrüsengewebe**

Bevor eine Immunfärbung der PTC-Gewebe erfolgen konnte, wurden die Primärantikörper an normalem Schilddrüsengewebe getestet. Für die Etablierung der Immunhistochemie (IHC) an FFPE-Gewebe wurden verschiedene Antikörperverdünnungen mit unterschiedlichen Vorbehandlungsmethoden an einem Gewebe-Array mit Schilddrüsennormalgewebe-Proben (siehe B.1.2.1) getestet. Antikörperverdünnungen von 1:200 für Anti-CLDN4, 1:100 für Anti-CLIP2 und 1:750 für Anti-LIMK1 lieferten optimale Färbeergebnisse. Wie Abbildung 37 zeigt, konnte in normalen Schilddrüsengeweben eine mäßige Expression der drei Kandidatengene beobachtet werden. Alle drei Antikörper lieferten Färbeprodukte im Cytoplasma, wobei auch eine schwache Färbung des Zellkerns zu sehen war. Immunfärbungen mit Anti-CLDN4 zeigten darüber hinaus eine membranständige Färbung. Diese Beobachtung deckte sich mit den Erwartungen, da es sich bei CLDN4 um ein integrales Membranprotein handelt.



**Abbildung 37: Etablierung der IHC an normalem Schilddrüsengewebe**

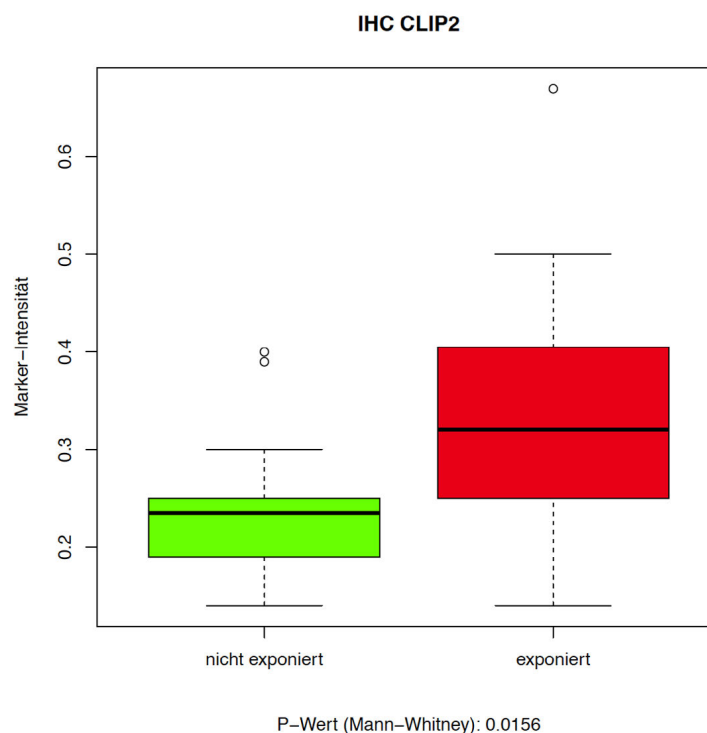
Gezeigt sind repräsentative Immunfärbungen an Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem normalem Schilddrüsengewebe mit **(A)** Anti-CLDN4 (Fall UA758) **(B)** Anti-CLIP2 (Fall UA1175) und **(C)** Anti-LIMK1 (Fall UA456).



## C.5.2 Immunhistochemischer Nachweis von CLIP2

### C.5.2.1 Differentielle Proteinexpression von CLIP2 in exponierten und nicht exponierten PTC-Fällen

Für das Kandidatengen CLIP2 wurde auf mRNA-Ebene eine signifikant höhere Expression in exponierten Fällen im Vergleich zu nicht exponierten Fällen gezeigt. Um zu überprüfen, ob auch auf Proteinebene eine differentielle Expression von CLIP2 vorliegt, wurden 16 exponierte und 18 nicht exponierte PTC-Fälle mittels IHC untersucht. Mit Hilfe der Definiens Software wurde die Färbeintensität des Markers relativ quantifiziert. Die durchschnittlichen Marker-Färbeintensitäten der 34 Fälle sind in Tabelle 30 aufgelistet. Die Gruppe der exponierten PTC-Fälle zeigte auch auf Proteinebene eine signifikant erhöhte Expression von CLIP2 ( $p = 0,0156$ ; Mann-Whitney-Test) im Vergleich zur Gruppe der nicht exponierten PTC-Fälle (Abb. 38). In Abbildung 39 sind repräsentative Immunfärbungen mit Anti-CLIP2 für die zwei Gruppen dargestellt.



**Abbildung 38: Immunhistochemische Analyse an 34 PTC mit Anti-CLIP2**

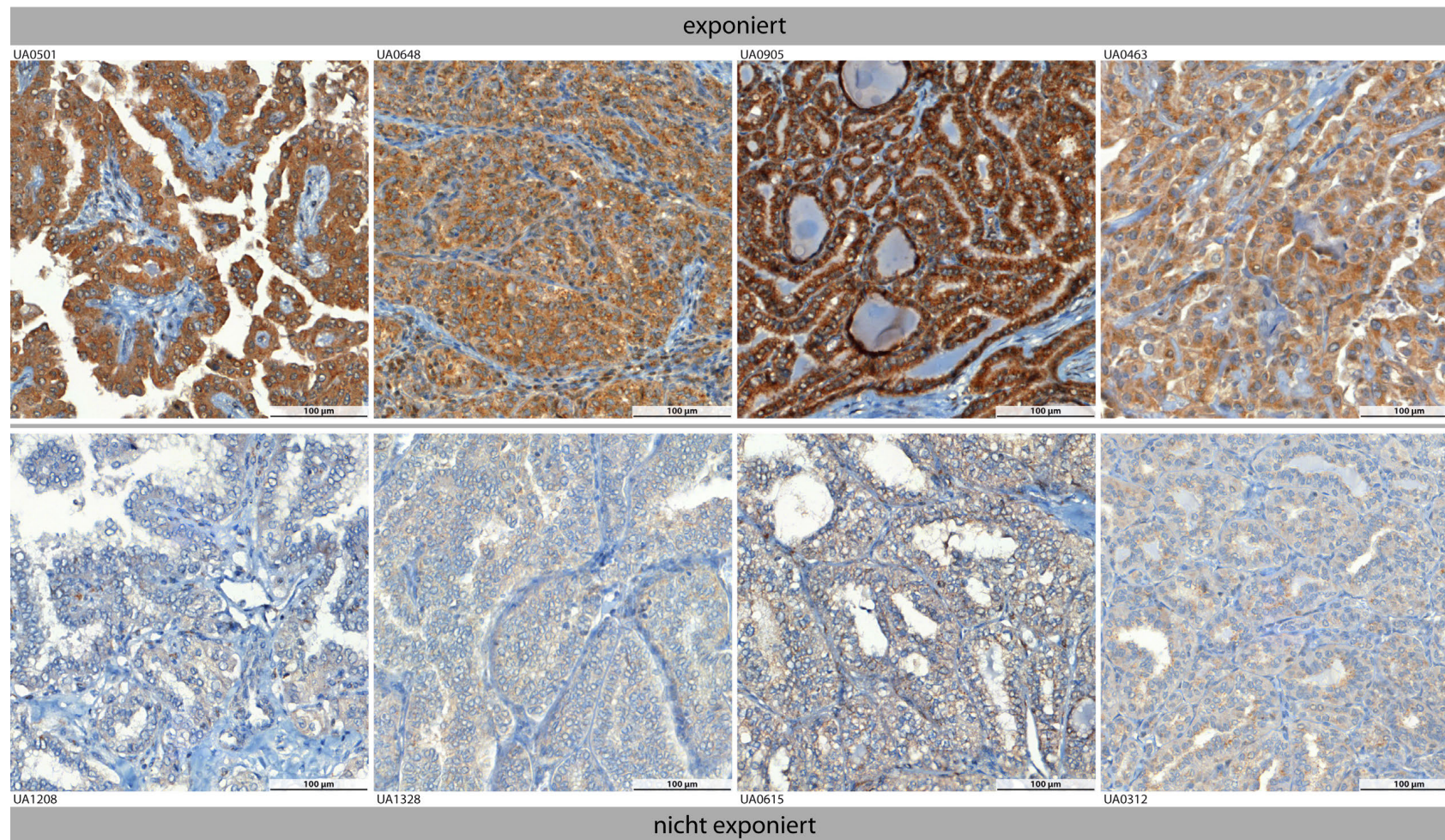
Die relativ quantifizierten Marker-Färbeintensitäten von Anti-CLIP2 in 34 PTC sind als *Boxplots* dargestellt. Eine Box beinhaltet jeweils 50 % der Daten (unteres bis oberes Quartil); der Median ist als schwarzer horizontaler Balken angezeigt. Des Weiteren sind das Minimum und das Maximum der Verteilung dargestellt, wobei Ausreißer als einzelne Datenpunkte gezeigt werden. Die Gruppe der exponierten PTC-Fälle ( $n = 16$ ) zeigt eine signifikant erhöhte Proteinexpression von CLIP2 ( $p = 0,0156$ ; Mann-Whitney-Test) im Vergleich zur Gruppe der nicht exponierten PTC-Fälle ( $n = 18$ ).

**Tabelle 30: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an 34 PTC für das Protein CLIP2**

PTC-Fall	Durchschnittliche Färbeintensität des Markers <sup>1</sup>	Strahlenexposition <sup>2</sup>
UA0130	0,29	ja
UA0139	0,19	ja
UA0144	0,32	ja
UA0145	0,37	ja
UA0162	0,20	nein
UA0242	0,44	ja
UA0243	0,30	ja
UA0312	0,14	nein
UA0366	0,34	ja
UA0400	0,26	ja
UA0463	0,32	ja
UA0465	0,24	nein
UA0501	0,36	ja
UA0557	0,25	nein
UA0574	0,40	nein
UA0597	0,24	ja
UA0607	0,19	nein
UA0615	0,20	nein
UA0648	0,44	ja
UA0758	0,15	ja
UA0771	0,14	ja
UA0886	0,50	ja
UA0905	0,67	ja
UA1030	0,25	nein
UA1175	0,15	nein
UA1190	0,22	nein
UA1208	0,16	nein
UA1224	0,23	nein
UA1243	0,24	nein
UA1247	0,29	nein
UA1319	0,24	nein
UA1328	0,14	nein
UA1337	0,30	nein
UA1367	0,39	nein

<sup>1</sup>Die Marker-Färbeintensität wurde mit Hilfe der Definiens Software relativ quantifiziert; <sup>2</sup>Exponiert durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl.

## IHC CLIP2



**Abbildung 39: Immunhistochemischer Nachweis von CLIP2 in exponierten und nicht exponierten PTC-Fällen**

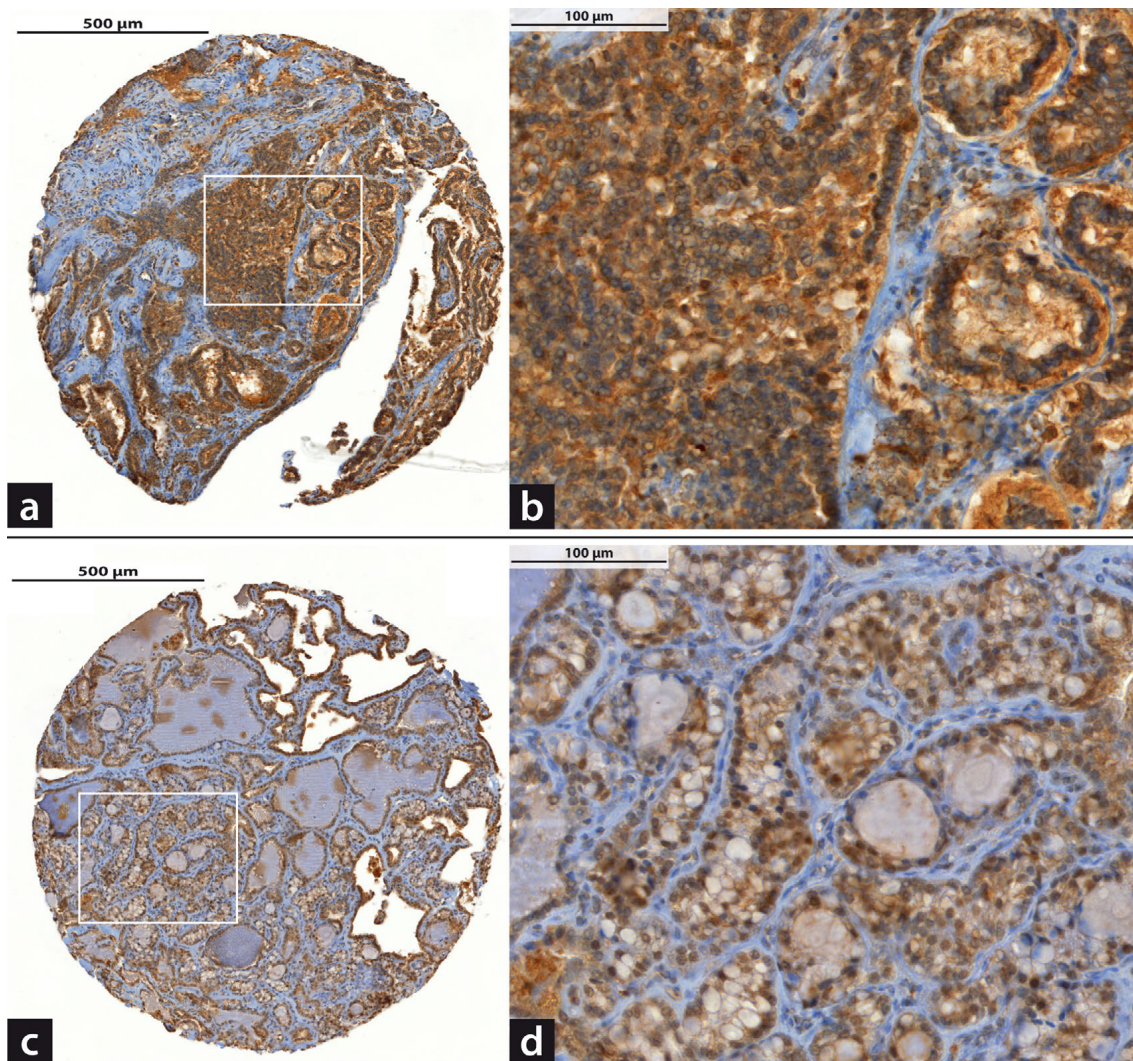
Gezeigt sind repräsentative Immunfärbungen an Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Schilddrüsengewebe mit Anti-CLIP2. Die Antikörperfärbung ist in der Gruppe der exponierten PTC-Fälle (4 Fälle oben) im Vergleich zur Gruppe der nicht exponierten PTC-Fälle (4 Fälle unten) deutlich stärker ausgeprägt.

**C.5.2.2 Immunhistochemische Untersuchungen an einem Gewebe-Array**

Die Proteinexpression von CLIP2 wurde auch an einem Gewebe-Array mit kindlichen PTC aus Weißrussland (siehe Tabellen 8 und 9) immunhistochemisch untersucht. Je nach Färbeintensität des Markers wurden die einzelnen Tumorgewebe in die Gruppen 0 (keine Färbung) bis 3 (sehr starke Färbung) eingeteilt. Ein Fall wurde einer Kategorie zugeordnet, wenn mehr als 60 % der Zellen diese Färbeintensität aufwiesen. Die Einteilung der 22 ausgewerteten PTC-Fälle in die Färbekategorien ist Tabelle 31 zu entnehmen. Es handelt sich ausschließlich um durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl exponierte Patienten. Insgesamt konnte in den 22 exponierten PTC-Fällen eine starke bis sehr starke Proteinexpression von CLIP2 nachgewiesen werden. 23 % der Fälle zeigten eine starke (Färbegrad 2) und 68 % der Fälle eine sehr starke (Färbegrad 3) Immunfärbung mit Anti-CLIP2. Lediglich bei zwei Fällen wurde eine schwache Expression (Färbegrad 1) des Proteins CLIP2 beobachtet. Repräsentative Immunfärbungen mit Anti-CLIP2 an zwei Fällen mit Färbegrad 2 und 3 sind in Abbildung 40 dargestellt.

**Tabelle 31: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung an einem Gewebe-Array mit 22 PTC für das Protein CLIP2**

PTC-Fall	Färbegrad	PTC-Fall	Färbegrad
S261T	3	S328T	3
S271T	3	S331T	3
S275T	3	S336T	1
S276T	2	S339T	2
S283T	3	S341T	3
S284T	3	S355T	2
S290T	3	S357T	3
S292T	3	S358T	1
S308T	2	S362T	2
S310T	3	S375T	3
S314T	3	S390T	3



**Abbildung 40: Immunhistochemischer Nachweis von CLIP2 an einem Gewebe-Array mit kindlichen PTC-Fällen**

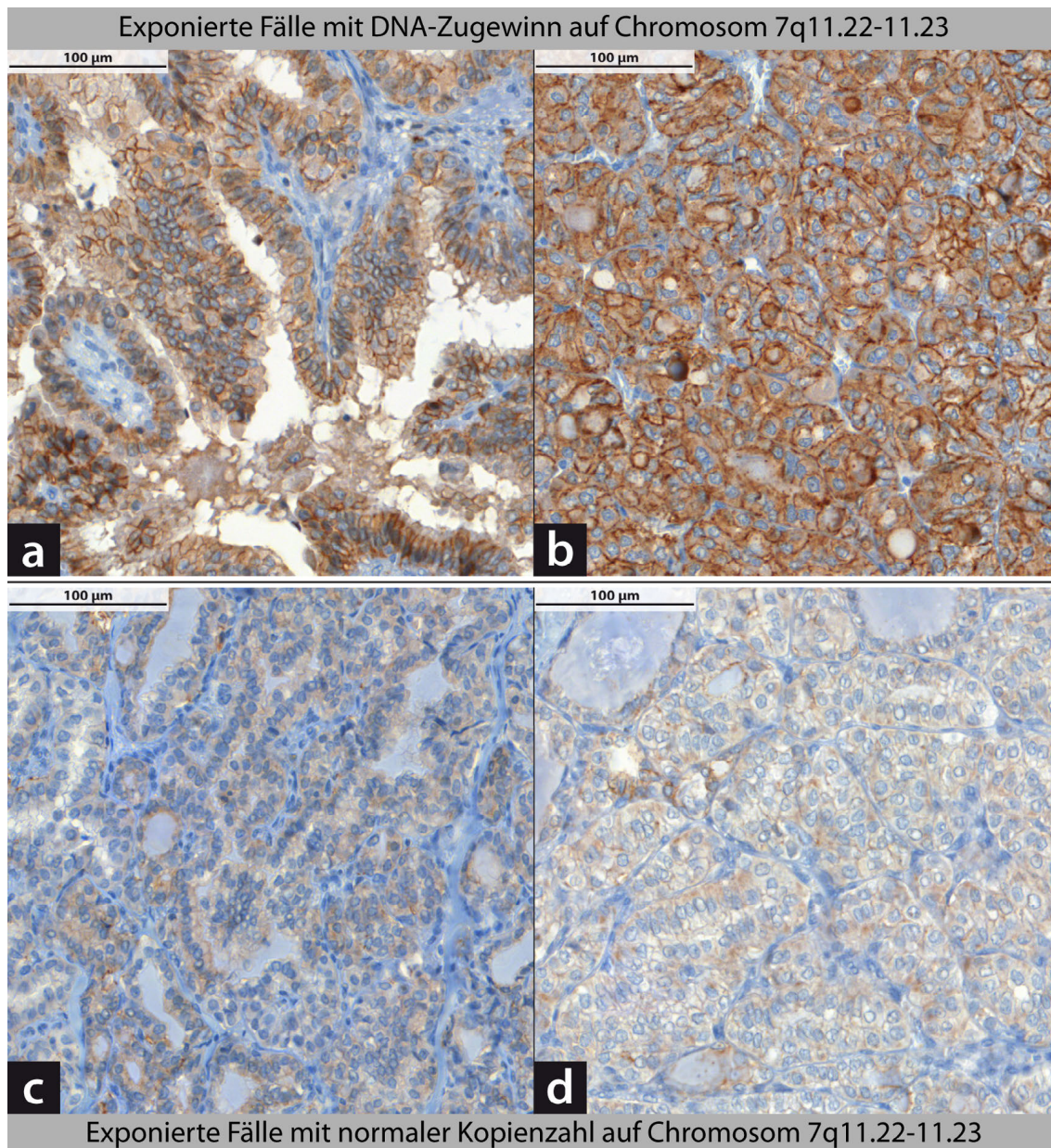
Gezeigt sind repräsentative Immunfärbungen an Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem Schilddrüsengewebe mit Anti-CLIP2. In **(A)-(B)** ist PTC-Fall S329T mit Färbegrad 3 und in **(C)-(D)** PTC-Fall S276T mit Färbegrad 2 zu sehen. Ein Ausschnitt der Gewebestanze aus (A) bzw. (C) (markiert durch den weißen Rahmen) ist in (B) bzw. (D) vergrößert dargestellt.

**C.5.3 Immunhistochemischer Nachweis von CLDN4**

Auf mRNA-Ebene konnte für das Kandidatengen CLDN4 eine 1,5-fache Expression in PTC-Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 im Vergleich zu Tumoren mit normaler Kopienzahl desselben Bereichs gezeigt werden. Für die Untersuchung der CLDN4-Expression auf Proteinebene wurden daher immunhistochemische Analysen an fünf exponierten Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 (nachgewiesen mittels Array-CGH und verifiziert durch FISH) und fünf exponierten Fällen mit normaler Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 durchgeführt. Für die semiquantitative Auswertung erfolgte eine Einteilung der einzelnen Tumorgewebe je nach Färbekategorie des Markers in die Gruppen 0 (keine Färbung) bis 3 (sehr starke Färbung). Ein Fall wurde einer Kategorie zugeordnet, wenn mehr als 60 % der Zellen diese Färbekategorie aufwiesen. Die Einteilung der 10 ausgewerteten exponierten PTC-Fälle in die Färbekategorien ist Tabelle 32 zu entnehmen. Vier der fünf PTC-Fälle mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 zeigten eine sehr starke (Färbegrad 3) Proteinexpression von CLDN4; der fünfte Fall wies eine starke (Färbegrad 2) CLDN4-Expression auf. Bei den PTC-Fällen mit normaler Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 zeigten ein Fall keine (Färbegrad 0), zwei Fälle eine schwache (Färbegrad 1), ein Fall eine starke und ein Fall eine sehr starke Proteinexpression von CLDN4. Insgesamt war die Antikörperfärbung von exponierten PTC-Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 im Vergleich zu exponierten PTC-Fällen mit normaler Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 deutlich stärker ausgeprägt. In Abbildung 41 sind repräsentative Immunfärbungen des integralen Membranproteins CLDN4 für die zwei Gruppen gezeigt.

**Tabelle 32: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an 10 exponierten PTC-Fällen für das Protein CLDN4**

PTC-Fall mit DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 (Array-CGH)	Färbegrad	PTC-Fall mit normaler Kopienzahl auf Chr 7q11.22-11.23 (Array-CGH)	Färbegrad
UA286	3	UA103	1
UA366	3	UA208	3
UA400	3	UA597	1
UA583	3	UA648	2
UA616	2	UA758	0



**Abbildung 41: Immunhistochemischer Nachweis von CLDN4**

Gezeigt sind repräsentative Immunfärbungen an Formalin-fixiertem Paraffin-  
eingebettetem Schilddrüsengewebe mit Anti-CLDN4. Die Antikörperfärbung von expo-  
nierten PTC-Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 (2 PTC-Fälle  
oben: **(A)** UA366 und **(B)** UA583) ist im Vergleich zu exponierten PTC-Fällen mit norma-  
ler Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 (2 PTC-Fälle unten: **(C)** UA103 und **(D)**  
UA597) deutlich stärker ausgeprägt.

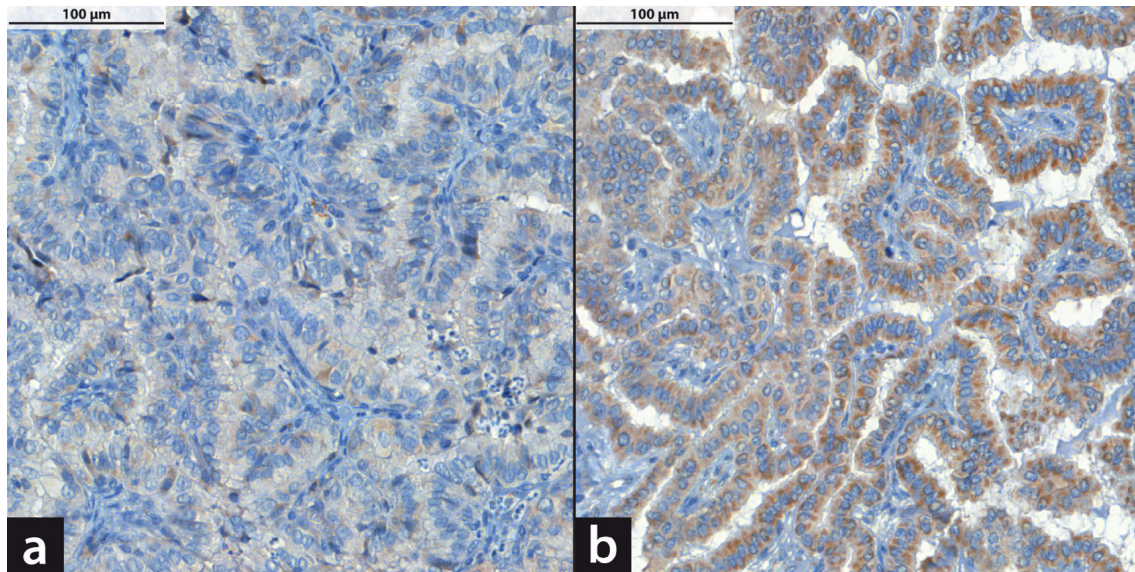
**C.5.4 Immunhistochemischer Nachweis von LIMK1**

In PTC mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 konnte im Vergleich zu Tumoren mit normaler Kopienzahl desselben Bereichs eine 2,4-fach erhöhte mRNA-Expression des Kandidatengens LIMK1 nachgewiesen werden. Um die Überexpression von LIMK1 auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden immunhistochemische Analysen an fünf exponierten Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 (nachgewiesen mittels Array-CGH und verifiziert durch FISH) und fünf exponierten Fällen mit normaler Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 durchgeführt. Die Einteilung der 10 exponierten PTC-Fälle erfolgte je nach Färbeintensität des Markers in die Färbekategorien 0 (keine Färbung) bis 3 (sehr starke Färbung) und ist Tabelle 33 zu entnehmen. Es konnten keine Unterschiede in der Immunfärbung mit Anti-LIMK1 an exponierten PTC-Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 im Vergleich zu exponierten PTC-Fällen mit normaler Kopienzahl festgestellt werden. Repräsentative Immunfärbungen mit Anti-LIMK1 an zwei Fällen mit Färbegrad 1 und 2 sind in Abbildung 42 dargestellt.

**Tabelle 33: Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen an 10 exponierten PTC-Fällen für das Protein LIMK1**

PTC-Fall mit DNA-Zugewinn auf Chr 7q11.22-11.23 (Array-CGH)	Färbegrad	PTC-Fall mit normaler Kopienzahl auf Chr 7q11.22-11.23 (Array-CGH)	Färbegrad
UA286	2	UA103	1
UA366	1	UA147	2
UA400	3	UA343	1
UA583	2	UA456	3
UA616	1	UA648	2





**Abbildung 42: Immunhistochemischer Nachweis von LIMK1**

Gezeigt sind repräsentative Immunfärbungen an Formalin-fixiertem Paraffin-  
eingebettetem Schilddrüsengewebe mit Anti-LIMK1. In **(A)** ist PTC-Fall UA366 mit Färbegrad 1 und in **(B)** PTC-Fall UA147 mit Färbegrad 2 zu sehen.

## **C.6 Etablierung von Schilddrüsen-Zellkulturmodellen für funktionelle Studien ausgewählter Kandidatengene**

### **C.6.1 Charakterisierung der Zelllinie TPC-1**

Die aus dem papillären Schilddrüsenkarzinom einer weiblichen Patientin etablierte Zelllinie TPC-1 (Tanaka et al., 1987; Ishizaka et al., 1989; Jhiang et al., 1992) wurde mittels Array-CGH-, SKY- und Cytokeratin-Expressions-Analysen charakterisiert.

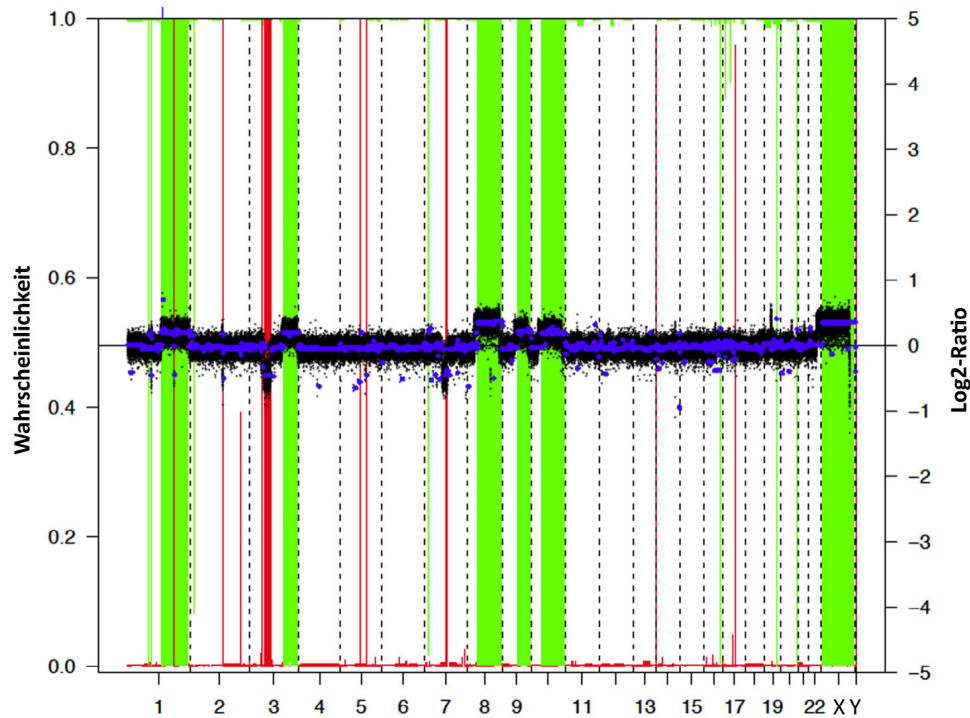
#### **C.6.1.1 Hochauflösende Array-CGH**

Die Zelllinie TPC-1 wurde unter Verwendung eines 180k Oligonukleotid-Arrays (Agilent) auf chromosomale Veränderungen in Form von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten untersucht. Als Referenz-DNA wurde normale männliche genomische DNA (*Sex-Mismatch*) eingesetzt.

Die Gesamtheit der ermittelten chromosomalen Veränderungen ist in Abbildung 43 dargestellt und kann Tabelle 34 entnommen werden. Aus dem Verhältnis der Geschlechtschromosomen X und Y konnte das bekannte weibliche Geschlecht der Tumorzelllinie bestätigt werden. Die Zelllinie TPC-1 wies in der Array-CGH-Analyse eine große Anzahl chromosomaler Veränderungen auf (insgesamt 71 Kopienzahlveränderungen), wobei außer den Chromosomen 18 und 21 alle übrigen Chromosomen betroffen waren. Es wurden 30 DNA-Zugewinne (Chromosomen 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 19, 20 und 22), eine Amplifikation (Chromosom 1) und 40 DNA-Verluste (Chromosomen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 16, 17 und 20) nachgewiesen. Dabei wiesen 13 DNA-Zugewinne und 6 DNA-Verluste eine Größe von mehr als 1000 kb auf.

In den Array-CGH-Analysen von 80 PTC konnte ein strahlenassoziierter DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 (bp 71050338-75314803) identifiziert werden (C.1.2). Das im veränderten Bereich lokalisierte Kandidatengene CLIP2 sollte in funktionellen Studien durch stabile Transfektion von Schilddrüsenzelllinien (auch Zelllinie TPC-1) mit einem CLIP2-Expressionsvektor genauer untersucht werden. Hierzu wurde überprüft, ob in der Zelllinie TPC-1 bereits chromosomale Veränderungen auf Chromosom 7q11.22-11.23 vorliegen, die zu einer Beeinflussung der funktionellen Studien führen könnten. In Abbildung 44 ist das Array-CGH-Profil für Chromosom 7 dargestellt. Es wurden acht chromosomale Veränderungen auf Chromosom 7 nachgewiesen, wobei

es sich um zwei DNA-Zugewinne und sechs DNA-Verluste handelt (Details siehe Tabelle 34). Die Bande 7q11.22 zeigte einen DNA-Verlust; der veränderte Bereich (bp 69269039-69415683) zeigte aber keine Überschneidung mit dem strahlenassoziierten Veränderungsbereich auf Chromosom 7q11.22-11.23.



**Abbildung 43: Gesamtgenomisches Array-CGH-Profil der Zelllinie TPC-1**

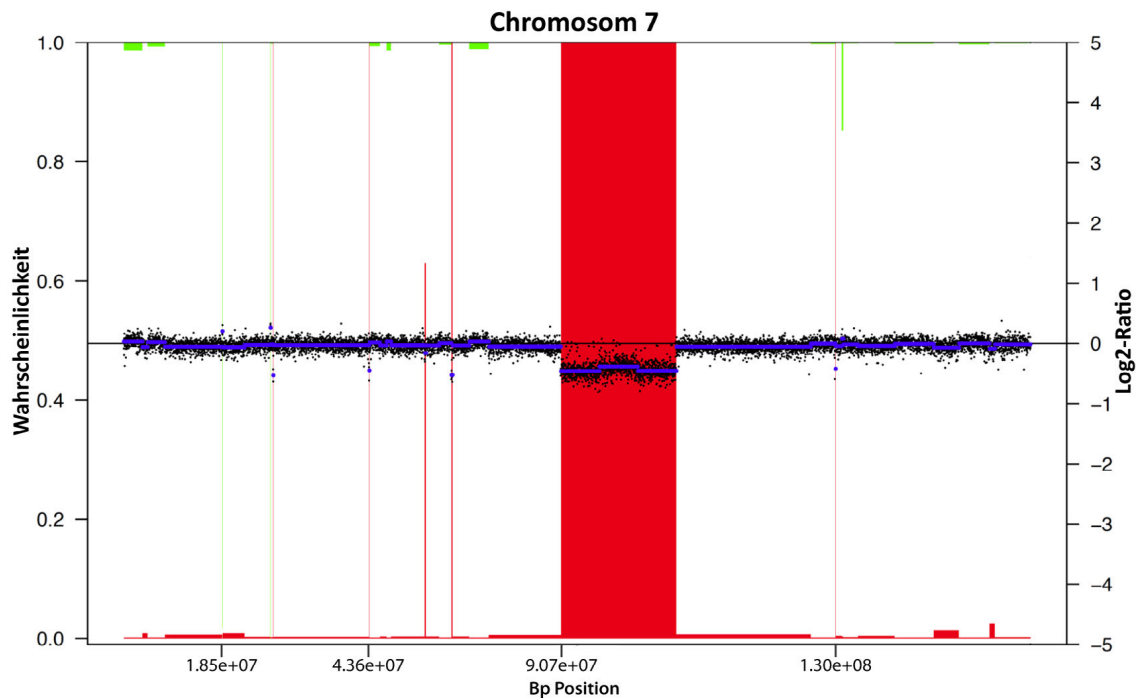
Gezeigt ist das gesamtgenomische Kopienzahlveränderungsprofil der Zelllinie TPC-1, welches mit hochauflösender Oligo Array-CGH (180.000 60mer Oligonukleotide) bestimmt wurde. Der logarithmierte Quotient (*Log<sub>2</sub>-Ratio*) aus Cy3- (Zelllinien-DNA) und Cy5-Fluoreszenz (Referenz-DNA) wird für jedes Oligonukleotid durch einen schwarzen Punkt angezeigt (Y-Achse), wobei die Werte entsprechend der genomischen Position von Chromosom 1 pter bis Chromosom Y qter auf der X-Achse aufgetragen sind. Eine Kopienzahlveränderung liegt vor, wenn die Zuordnungswahrscheinlichkeit für DNA-Verluste (rote Balken von unten nach oben) oder -Zugewinne (grüne Balken von oben nach unten) den Grenzwert von 0,5 (Mittellinie) überschreitet.

**Tabelle 34: Kopienzahlveränderungen der Zelllinie TPC-1**

Chromosom	Banden	Beginn (bp)*	Ende (bp)*	Größe des Bereichs [kb]	Status Array-CGH
1	p36.21	12846933	12912568	65,6	DNA-Verlust
1	p31.1	71886434	72275233	388,8	DNA-Zugewinn
1	p31.1	81977510	82029357	51,8	DNA-Verlust
1	p31.1	83965175	84280913	315,7	DNA-Verlust
1	p31.1-22.3	84305137	85123940	818,8	DNA-Zugewinn
1	q21.1-21.3	145264629	152556448	7291,8	DNA-Zugewinn
1	q21.3	152573129	152586233	13,1	Amplifikation
1	q21.3-31.1	152595099	189957274	37362,2	DNA-Zugewinn
1	q31.1-31.2	190106998	191882705	1775,7	DNA-Zugewinn
1	q31.2	191896985	192138866	241,9	DNA-Verlust
1	q31.3-44	192150484	247524388	55373,9	DNA-Zugewinn
1	q44	247593941	248702394	1108,5	DNA-Zugewinn
1	q44	248835846	249212608	376,8	DNA-Zugewinn
2	p24.2	17192737	17447797	255,1	DNA-Zugewinn
2	p24.1	20412663	20458757	46,1	DNA-Zugewinn
2	q22.1-22.2	139450100	142843779	3393,7	DNA-Zugewinn
2	q22.2	142908097	143970406	1062,3	DNA-Verlust
3	p21.31	50265625	50547178	281,6	DNA-Verlust
3	p14.2-12.2	57728567	84402702	26674,1	DNA-Verlust
3	q12.1	98558385	98568350	10,0	DNA-Verlust
3	q22.3-29	135649100	197845194	62196,1	DNA-Zugewinn
4	q22.1	91310603	91351185	40,6	DNA-Verlust
5	q35.3	72742058	72742416	0,4	DNA-Verlust
5	q15	92922774	92925292	2,5	DNA-Verlust
5	q15	93037225	93063486	26,3	DNA-Verlust
5	q21.1	100334470	100751943	417,5	DNA-Zugewinn
5	q23.2	126141278	126270034	128,8	DNA-Verlust
6	p25.3	266078	362230	96,2	DNA-Verlust
6	q14.1	78979171	79001824	22,7	DNA-Verlust
7	p21.1	18510965	18535441	24,5	DNA-Zugewinn
7	p15.2	26990384	27029581	39,2	DNA-Zugewinn
7	p15.2	27236592	27237811	1,2	DNA-Verlust
7	p13	43641522	43664372	22,9	DNA-Verlust
7	p11.2	56593100	57238312	645,2	DNA-Verlust
7	q11.22	69269039	69415683	146,6	DNA-Verlust
7	q21.2-31.1	90718311	108105648	17387,3	DNA-Verlust
7	q32.3	130402836	130417850	15,0	DNA-Verlust
8	p23.1	7169489	7786648	617,2	DNA-Verlust
8	p11.22	39237437	39374729	137,3	DNA-Zugewinn
8	11.21-23.3	46943456	113236650	66293,2	DNA-Zugewinn
8	q23.3	113256579	113409524	152,9	DNA-Verlust
8	q23.3-24.3	113420575	146294041	32873,5	DNA-Zugewinn
9	p13.1-11.2	38768231	45469330	6701,1	DNA-Verlust
9	q22.31-34.3	94499504	141018924	46519,4	DNA-Zugewinn
10	q11.21-21.1	43593364	61592307	17998,9	DNA-Zugewinn
10	q21.2-26.3	61764824	135434118	73669,3	DNA-Zugewinn
11	cen	55377909	55438413	60,5	DNA-Verlust
11	q23.3	120083627	120100567	16,9	DNA-Zugewinn
11	q24.2	133268418	133339432	71,0	DNA-Verlust
12	p13.32	3357963	3412418	54,5	DNA-Zugewinn
12	p12.1	24074320	24173172	98,9	DNA-Verlust
13	q31.3	94686680	94776441	89,8	DNA-Zugewinn
14	q11.2	19376761	20479887	1103,1	DNA-Verlust
14	q12	29258558	29276138	17,6	DNA-Verlust
14	q21.1	43111150	43222698	111,5	DNA-Verlust
14	q32.33	106785926	106803247	17,3	DNA-Verlust

Chromosom	Banden	Beginn (bp)*	Ende (bp)*	Größe des Bereichs [kb]	Status Array-CGH
15	q11.2	22318596	22558696	240,1	DNA-Zugewinn
15	q15.1	41992940	42000251	7,3	DNA-Verlust
16	p13.11	15048750	15131722	83,0	DNA-Verlust
16	p11.2	32471624	33651705	1180,1	DNA-Verlust
16	p11.2-cen	34493205	34625121	131,9	DNA-Verlust
16	q12.2	55807883	55822332	14,4	DNA-Verlust
16	q23.1	74398017	74407281	9,3	DNA-Verlust
16	q23.1	78995088	79143268	148,2	DNA-Zugewinn
17	q12	34437474	34832401	394,9	DNA-Verlust
17	q21.31	44159802	44297083	137,3	DNA-Verlust
19	q13.31-13.32	44864498	46406730	1542,2	DNA-Zugewinn
20	p13	1568965	1580898	11,9	DNA-Verlust
20	q11.22	32650045	32695582	45,5	DNA-Verlust
20	q13.33	60430655	60746581	315,9	DNA-Zugewinn
22	q11.22	22297776	22458409	160,6	DNA-Zugewinn
22	q11.22	22510524	22549657	39,1	DNA-Zugewinn

\*Positionen der BAC-Klone gemäß *Homo sapiens high-coverage assembly GRCh37, Genome Reference Consortium*.



**Abbildung 44: Array-CGH-Profil der Zelllinie TPC-1 für Chromosom 7**

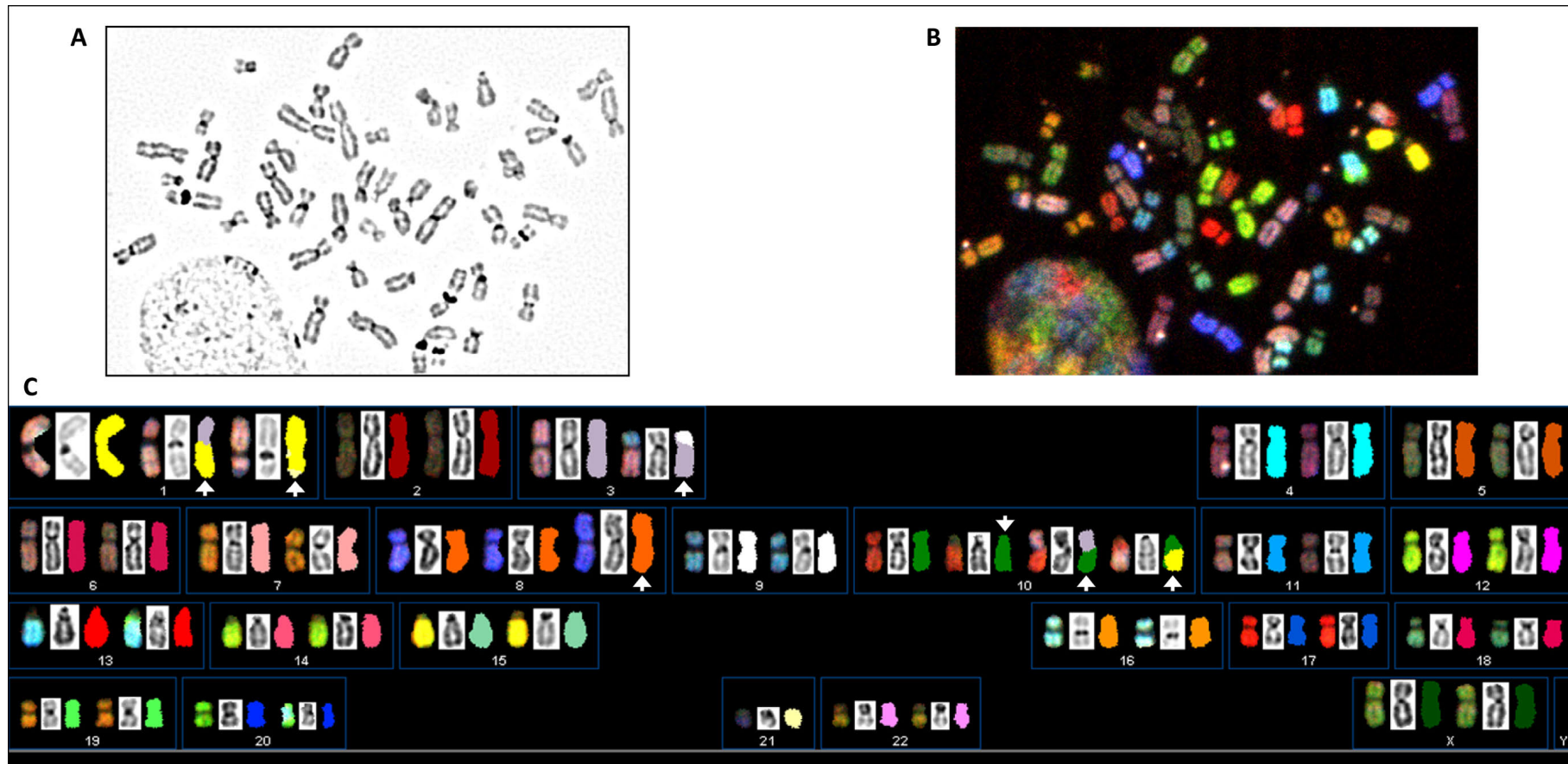
Gezeigt ist das 180k Oligo Array-CGH-Profil der Zelllinie TPC-1 für Chromosom 7. Von pter nach qter entlang von Chromosom 7 (X-Achse) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Fluoreszenzintensitätsquotienten ( $\text{Log}_2\text{-Ratios}$ ) aus Cy3- (Zelllinien-DNA) und Cy5-Fluoreszenz (Referenz-DNA) für jedes Oligonukleotid durch einen schwarzen Punkt angezeigt. Eine Kopienzahlveränderung liegt vor, wenn die Zuordnungswahrscheinlichkeit für DNA-Verluste (rote Balken von unten nach oben) oder -Zugewinne (grüne Balken von oben nach unten) den Grenzwert von 0,5 (Mittellinie) überschreitet. Es sind acht chromosomale Veränderungen auf Chromosom 7 zu sehen, wobei es sich um zwei DNA-Zugewinne und sechs DNA-Verluste handelt.

**C.6.1.2 SKY**

Die Zelllinie TPC-1 wurde auch auf interchromosomale Umlagerungen mit Hilfe einer SKY-Analyse untersucht.

Bei 49 Chromosomen ließen sich interchromosomale Umlagerungen (+der(1)t(3;1), +der(10)t(3;10)(?;q), der(1)t(1;21), der(3)t(9;3), der(10)t(10;1)(q;q)), ein Isochromosom (i(8q)), eine Deletion (del(10p)) und der Verlust von Chromosom 21 nachweisen. Nach Auswertung der SKY ergab sich für die Zelllinie TPC-1 folgender Karyotyp:

49,XX,-21,+i(8q),+der(1)t(3;1),+der(10)t(3;10)(?;q),del(10p),der(1)t(1;21),der(3)t(9;3), der(10)t(10;1)(q;q) (Abb. 45).

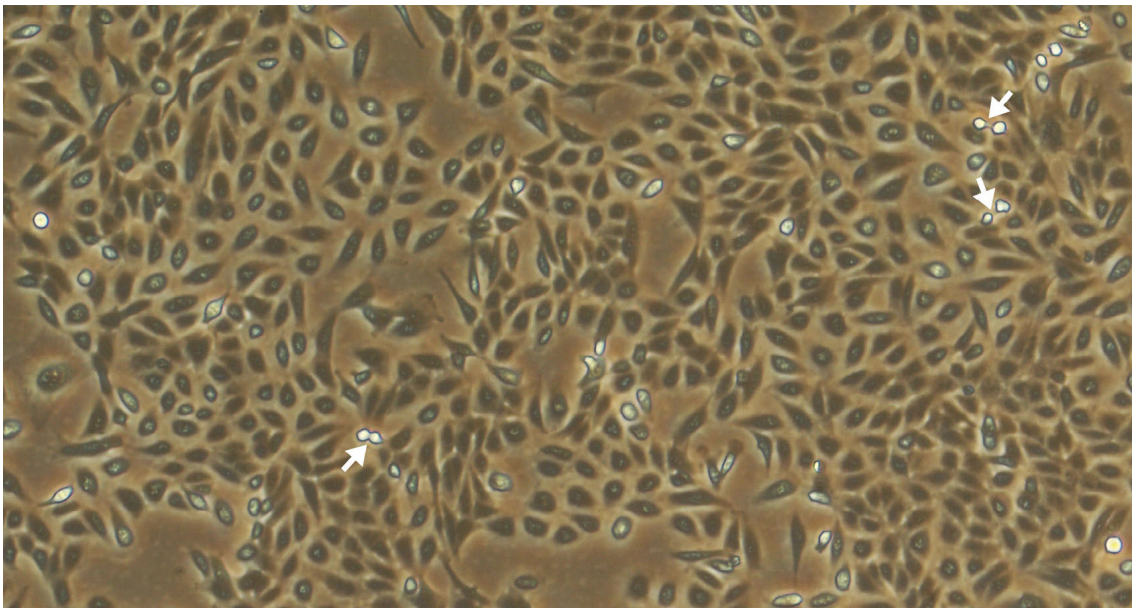


**Abbildung 45: SKY-Analyse der Zelllinie TPC-1**

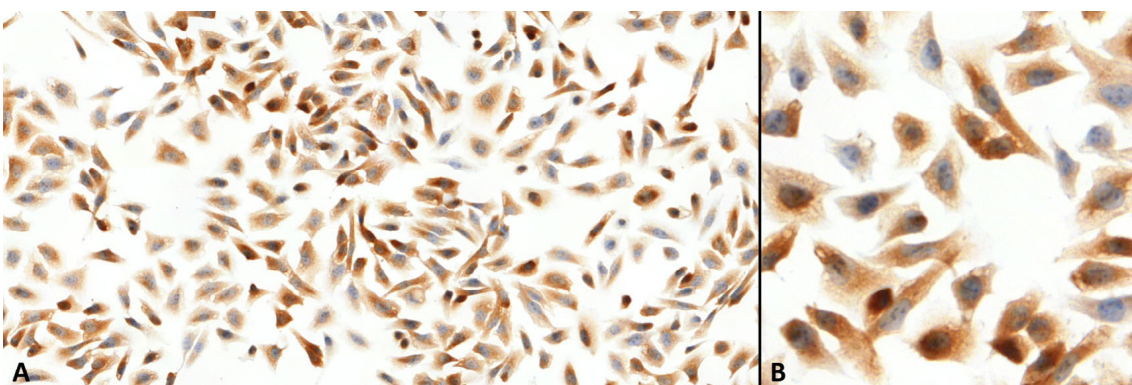
Gezeigt ist eine mit dem SKY-System aufgenommene Metaphase **(A)** als inverse DAPI-Färbung und **(B)** als spektrales Bild. **(C)** SKY-Karyogramm - Für jedes Chromosom ist von links nach rechts das spektrale Bild, die DAPI-Bänderung und das Falschfarbenbild zu sehen; aufgrund von Farbsprüngen lassen sich chromosomale Veränderungen identifizieren (gekennzeichnet durch weiße Pfeile). Es ergibt sich für die Zelllinie TPC-1 folgender Karyotyp: 49,XX,-21,+i(8q),+der(1)t(3;1),+der(10)t(3;10)(?;q),del(10p),der(1)t(1;21),der(3)t(9;3),der(10)t(10;1)(q;q).

### C.6.1.3 Cytokeratin-Nachweis

Cytokeratine machen als Intermediärfilamente einen wichtigen Teil des Zytoskeletts epithelialer Zellen aus. Um zu überprüfen, ob es sich um Zellen epithelialen Ursprungs handelt, erfolgten immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen Cytokeratine an fixierten, kultivierten Zellen der Zelllinie TPC- 1 (Abb. 46). Der positive Nachweis der Cytokeratin-Expression bestätigte die epitheliale Herkunft der Zelllinie TPC-1 (Abb. 47).



**Abbildung 46: Zelllinie TPC-1**  
Gezeigt ist ein Zellrasen mit mitotischen Zellen (gekennzeichnet durch weiße Pfeile).



**Abbildung 47: Positiver Nachweis von Cytokeratin an der Zelllinie TPC-1**  
Immunfärbung an fixierten Zellen der Zelllinie TPC-1 mit einem Antikörper gegen Cytokeratine. In (B) ist ein Ausschnitt aus (A) vergrößert dargestellt.



## C.6.2 Immortalisierung von Schilddrüsen-Primärzelllinien

### C.6.2.1 Ergebnisse der Immortalisierung von 13 Schilddrüsen-Primärzelllinien

Für funktionelle Studien an ausgewählten Kandidatengenen der Schilddrüsenkarzinogenese sollten permanente Zelllinien aus normalen epithelialen Schilddrüsenzellen etabliert werden. Da normale humane Zellen *in vitro* nur eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen durchführen, bevor die Zellalterung einsetzt und der programmierte Zelltod eingeleitet wird (Hayflick und Moorhead, 1961; Hayflick, 1965), wurden normale humane epitheliale Schilddrüsen-Primärkulturen, welche bereits in vorangegangenen Arbeiten aus operativ entfernten Schilddrüsenengewebe angelegt wurden (siehe Tabelle 13), immortalisiert. Hierzu wurden die Zellen mit dem Gen hTERT (humane Telomerase reverse Transkriptase), das für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert, transduziert. Da bereits gezeigt wurde, dass eine zusätzliche Transduktion mit CDK4 erfolgreich zur Immortalisierung von Primärkulturen führt (Ramirez et al., 2004; Weaver et al., 2011), wurden auch Transduktions-Experimente mit CDK4 durchgeführt. Die Überexpression von CDK4 verhindert den vom CDK4-Inhibitor p16<sup>INK4a</sup>-vermittelten Wachstumsarrest der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus (Ramirez et al., 2003).

Durch die Zugabe von Puromycin bzw. Geneticin (G418) wurden transduzierte Zellen, welche hTERT bzw. CDK4 und den Selektionsmarker exprimieren, selektioniert. Die Immortalisierung von 13 Schilddrüsen-Primärzelllinien mit den Genen CDK4 und hTERT brachte eine erfolgreich transduzierte Zelllinie S22N hTERT hervor, welche im Weiteren genauer charakterisiert wurde.

## C.6.2.2 Charakterisierung der Zelllinie S22N hTERT

### C.6.2.2.1 1 Mb BAC Array-CGH

Die Ursprungszelllinie S22N wurde unter Verwendung eines 1 Mb BAC-Arrays auf chromosomale Veränderungen in Form von DNA-Zugewinnen und DNA-Verlusten untersucht. Als Referenz-DNA wurde normale männliche genomische DNA (*Sex-Mismatch*) eingesetzt.

Die Gesamtheit der ermittelten chromosomalen Veränderungen kann Tabelle 35 entnommen werden und ist in Abbildung 48 dargestellt. Aus dem Verhältnis der Geschlechtschromosomen X und Y konnte das bekannte weibliche Geschlecht der Zelllinie bestätigt werden. Die Zelllinie S22N wies in der Array-CGH-Analyse 20 chromosomale Veränderungen auf, wobei es sich ausschließlich um DNA-Verluste handelte. Es wurden DNA-Verluste auf den Chromosomen 1, 3p, 7, 9p, 11p, 12q, 16, 17, 19p, 20q und 22q nachgewiesen.

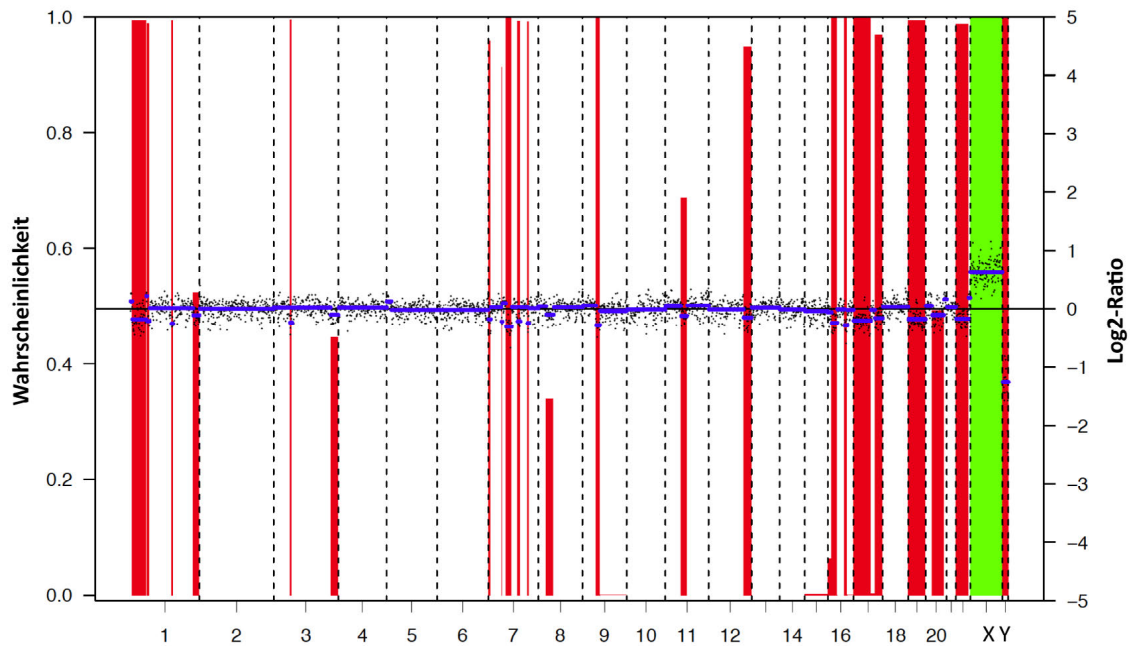
In den Array-CGH-Analysen von 80 PTC konnte ein strahlenassoziierter DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 (bp 71050338-75314803) identifiziert werden (C.1.2). Das in dem veränderten Bereich lokalisierte Kandidatengen CLIP2 sollte in funktionellen Studien durch stabile Transfektion von Schilddrüsenzelllinien mit einem CLIP2-Expressionsvektors genauer untersucht werden. Hierzu wurde überprüft, ob in der Zelllinie S22N bereits chromosomale Veränderungen auf Chromosom 7q11.22-11.23 vorliegen, die zu einer Beeinflussung der funktionellen Studien führen könnten. In Abbildung 49 ist das Array-CGH-Profil für Chromosom 7 dargestellt. Es wurden fünf DNA-Verluste auf Chromosom 7 nachgewiesen (siehe Tabelle 35). Dabei zeigte der DNA-Verlust auf Chromosom 7p11.2-q11.23 (bp 56164148-77278246) eine Überschneidung mit dem strahlenassozierten Bereich auf Chromosom 7q11.22-11.23.

Im Rahmen dieser Arbeit war es leider nicht mehr möglich die mit hTERT immortalisierte Zelllinie S22N hTERT auf Kopienzahlveränderungen zu untersuchen.

**Tabelle 35: Nachgewiesene DNA-Verluste der Zelllinie S22N**

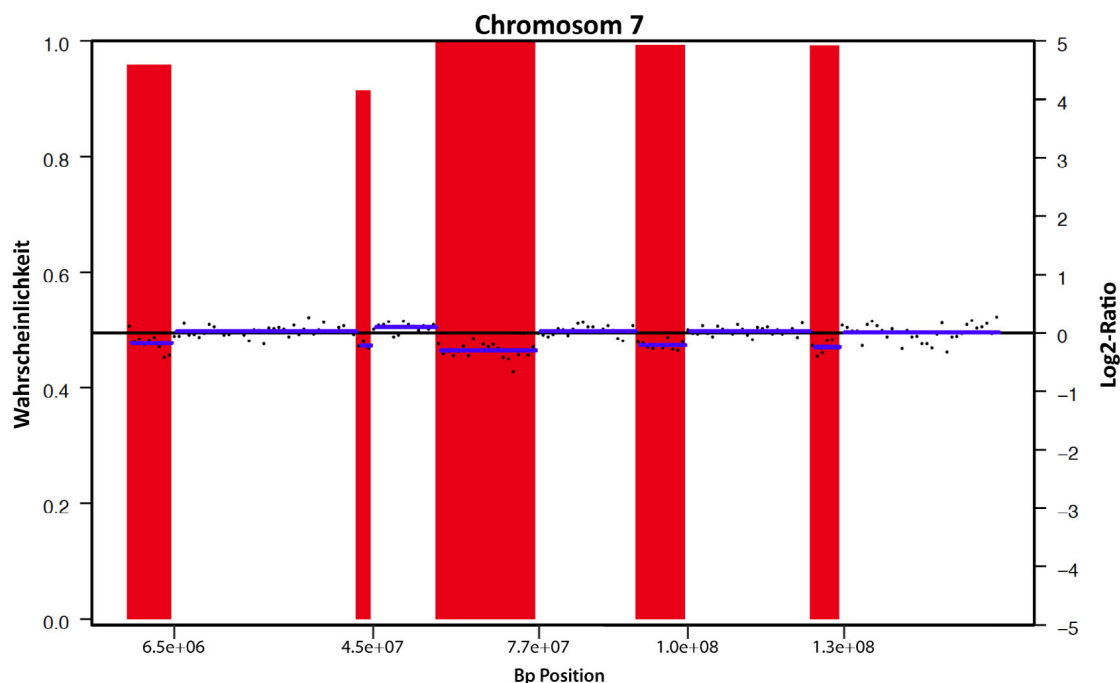
Chromosomaler Bereich	Beginn (BAC)	Ende (BAC)	Beginn (bp)*	Ende (bp)*	Größe des Bereichs [Mb]
1p36.23-33	RP11-338N10	RP11-8J9	7719963	47268308	39,5
1p32.3	RP1-86A18	RP4-631H13	50823002	53420010	2,6
1q21.3-22	RP11-98D18	RP11-172I6	153689068	156131493	2,4
1q41-44	RP11-105I12	CTB-160H23	223824356	249196418	25,4
3p21.31-21.1	RP4-544D10	RP11-447A21	47396980	52766985	5,4
7p22.3-22.1	CTB-164D18	RP11-425P5	94136	6480088	6,4
7p13	RP5-1022I14	RP4-647J21	43953525	45082154	1,1
7p11.2-q11.23	RP4-725G10	RP4-562A11	56164148	77278246	21,1
7q21.3-22.1	RP5-1145A22	RP11-401L13	97264652	102917752	5,7
7q32.1-32.3	RP11-128A6	RP11-329I5	128624043	131141360	2,5
9p13.2-q21.11	RP11-117L21	RP11-250H24	36488584	69568815	33,1
11p11.2-q13.3	RP11-164L18	RP11-569N5	46260653	68521009	22,3
12q24.11-24.33	RP11-256L11	RP11-46H11	109695428	133525399	23,8
16p13.13-11.2	RP11-27M24	RP11-408D2	10526193	32436685	21,9
16q21-22.2	RP11-63M22	RP11-70E3	66596260	72229592	5,6
17p13.3-q21.32	RP11-216P6	RP1-62O9	856239	47397671	46,5
17q22-25.3	RP11-579A4	RP11-567O16	56795949	80781537	24,0
19p13.3-q13.43	CTC-546C11	GS1-1129C9	259784	59078905	58,8
20q11.21-q13.31	RP11-348I14	RP11-46O3	29456636	55514394	26,1
22cen-q13.31	XX-p8708	CTA-29F11	17242248	47238958	30,0

\*Positionen der BAC-Klone gemäß *Homo sapiens high-coverage assembly GRCh37, Genome Reference Consortium*.



**Abbildung 48: Gesamtgenomisches Array-CGH-Profil der Zelllinie S22N**

Gezeigt ist das gesamtgenomische 1 Mb BAC Array-CGH-Profil der Zelllinie S22N. Entlang der Chromosomen 1-22, X und Y (X-Achse; angegeben von pter nach qter) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Fluoreszenzintensitätsquotienten (*Log<sub>2</sub>-Ratios*) aus Cy3- und Cy5-Fluoreszenz für jeden BAC-Klon als schwarzen Punkt angezeigt. Eine Kopienzahlveränderung liegt vor, wenn die Zuordnungswahrscheinlichkeit für DNA-Verluste (rote Balken von unten nach oben) oder -Zugewinne (grüne Balken von oben nach unten) den Grenzwert von 0,5 (Mittellinie) überschreitet.



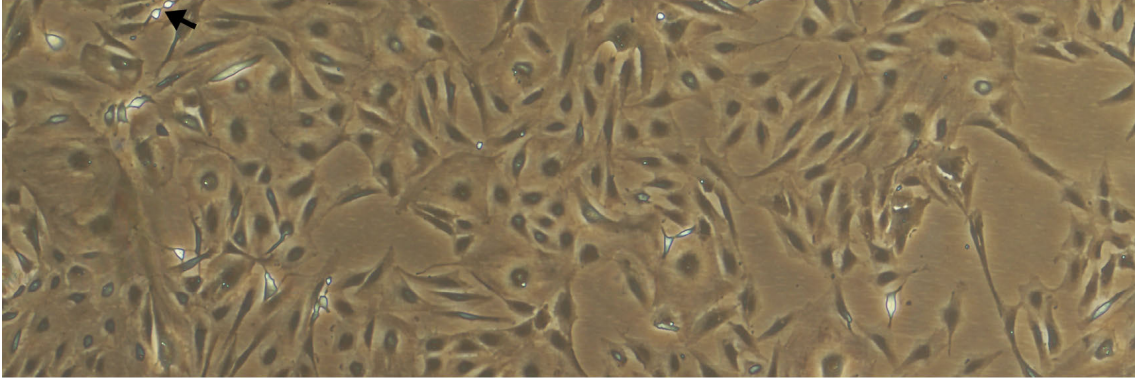
**Abbildung 49: Array-CGH-Profil der Zelllinie S22N für Chromosom 7**

Gezeigt ist das 1 Mb BAC Array-CGH-Profil der Zelllinie S22N für Chromosom 7. Von pter nach qter entlang von Chromosom 7 (X-Achse) sind in Y-Richtung die logarithmierten Werte der Fluoreszenzintensitätsquotienten aus Cy3- und Cy5-Fluoreszenz (*Log<sub>2</sub>-Ratios*) für jeden BAC-Klon als schwarzen Punkt angezeigt. Es sind fünf DNA-Verluste auf Chromosom 7 zu sehen (dargestellt in rot).

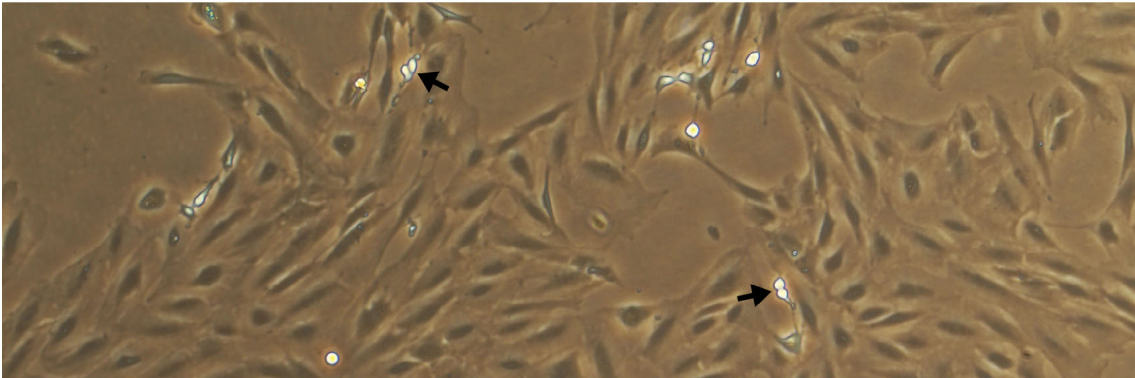
### C.6.2.2.2 Morphologische Charakterisierung

Nach der Transduktion mit hTERT waren bei der Zelllinie S22N hTERT keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zur Ursprungszelllinie S22N festzustellen (Abb. 50).

A



B

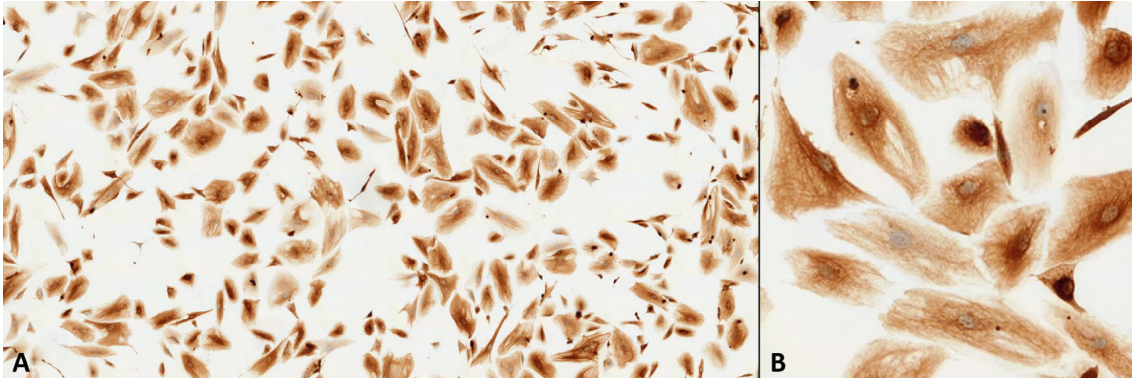


**Abbildung 50: hTERT-Immortalisierung der Zelllinie S22N**

Gezeigt ist die Zelllinie S22N **(A)** vor und **(B)** nach der Immortalisierung mit hTERT. Zu sehen sind Zellrasen mit mitotischen Zellen (gekennzeichnet durch schwarze Pfeile). Die mit hTERT transduzierte Zelllinie S22N hTERT zeigt einen gesunden Phänotyp und unterscheidet sich morphologisch nicht von der Ursprungszelllinie.

### C.6.2.2.3 Cytokeratin-Nachweis

Der positive Nachweis der Cytokeratin-Expression nach immunhistochemischer Färbung bestätigte die epitheliale Herkunft der hTERT-immortalisierten Zelllinie S22N hTERT (Abb. 51).



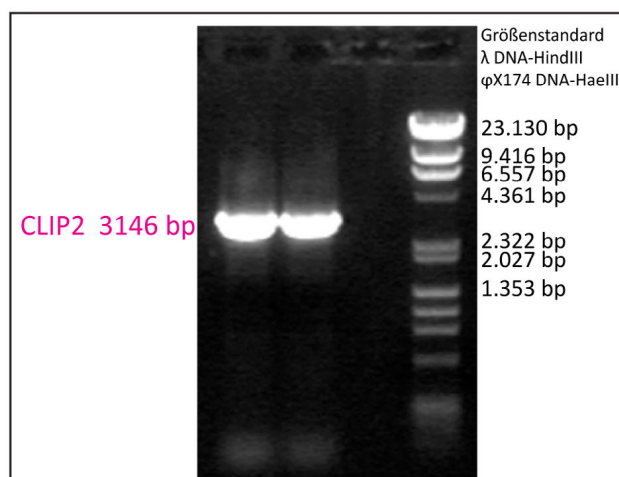
**Abbildung 51: Positiver Nachweis von Cytokeratin an der Zelllinie S22N hTERT**  
Immunfärbung an fixierten Zellen der Zelllinie S22N hTERT mit einem Antikörper gegen Cytokeratin. In **(B)** ist ein Ausschnitt aus **(A)** vergrößert dargestellt.

### C.6.3 Herstellung transgener Zelllinien

In den Array-CGH-Analysen von 80 PTC konnte ein strahlenassoziierter DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 identifiziert werden (C.1.2). Auf mRNA- und Proteinebene konnte für das in dem veränderten chromosomalen Bereich lokalisierte Kandidatengens CLIP2 eine signifikant höhere Expression in exponierten Fällen im Vergleich zu nicht exponierten Fällen gezeigt werden (C.4.1 und C.5.2). Um phänotypische Auswirkungen einer gezielten Überexpression des Gens CLIP2 in funktionellen Studien untersuchen zu können, sollten transgene Schilddrüsenzelllinien durch stabile Transfektion eines CLIP2-Expressionsvektors generiert werden.

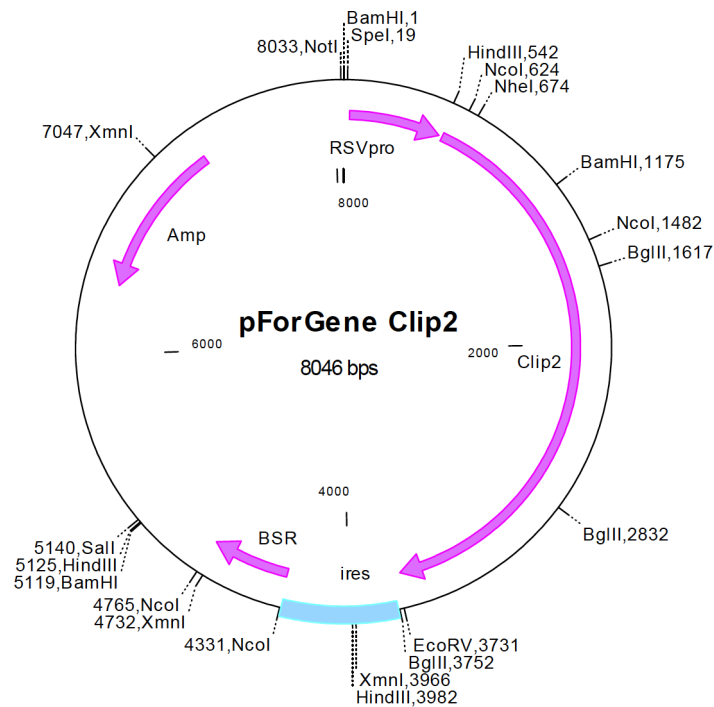
#### C.6.3.1 Selektive Amplifikation von CLIP2 aus cDNA und Ligation in den Vektor pForGene

Das Gen CLIP2 wurde zunächst mit genspezifischen Primern selektiv aus der cDNA einer normalen Schilddrüsenzelllinie (S399N) amplifiziert. Das identifizierte DNA-Fragment von 3146 bp (Abb. 52) wurde aus der spezifischen Gelbande aufgereinigt und in den Vektor pForGene ligiert (Abb. 53).



**Abbildung 52: Selektive Amplifikation des Gens CLIP2 aus cDNA**

Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt eine spezifische Amplifikation des Gens CLIP2. Das identifizierte DNA-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.



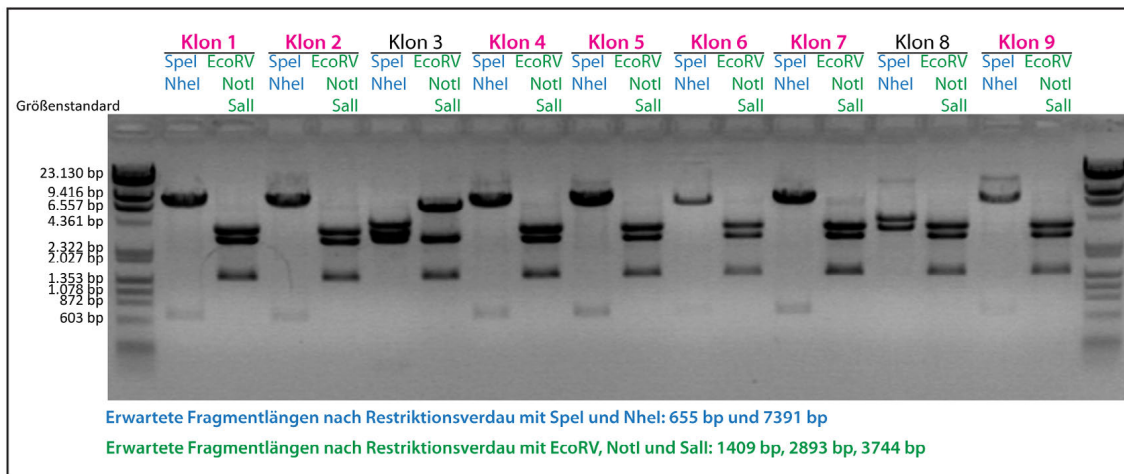
**Abbildung 53: Schematische Darstellung des Vektors pForGene CLIP2**

Die Charakteristika des Vektors pForGene CLIP2 sind vereinfacht dargestellt. Das Gen CLIP2 ist unter der Kontrolle des RSV(Rous-Sarkom-Virus)-Promotors inseriert. Die Ampicillin- und Blastocidin-Resistenzgene ermöglichen die Selektion transformierter *E. coli*-Zellen und stabil transfizierter Zelllinien. Aufgelistet sind einige Restriktionsschnittstellen, die für die Insertion des gewünschten DNA-Fragments, die Linearisierung des Vektors und die Restriktionsanalysen verwendet wurden.

### C.6.3.2 Restriktionsanalyse und Sequenzierung des Vektors

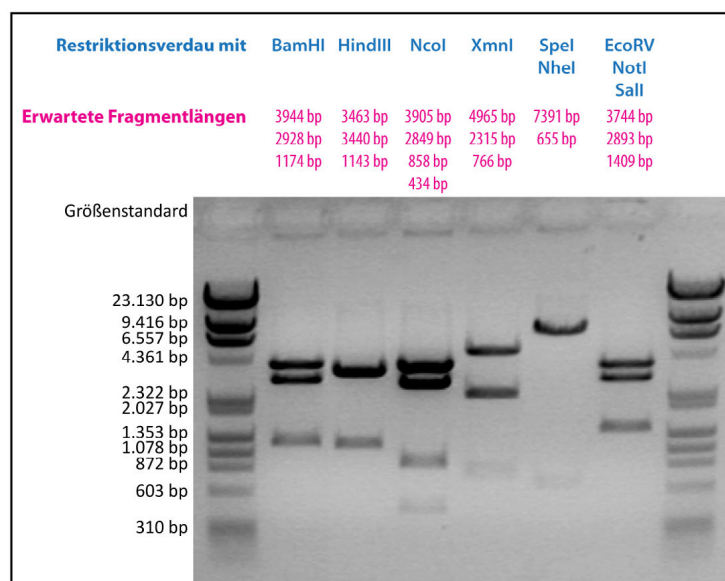
Nach der Transformation des Vektors pForGene in kompetente *E. coli* Bakterien wurde die isolierte Plasmid-DNA von neun zufällig ausgewählten Klonen einer Restriktionsanalyse unterzogen. Anhand der entstandenen DNA-Fragmente konnten sieben Klone identifiziert werden, die das Gen CLIP2 in korrekter Richtung inseriert hatten (Abb. 54). Klon 1 wurde anschließend in großem Maßstab weiter kultiviert und die isolierte Plasmid-DNA erneut einer ausführlicheren Restriktionsanalyse unterzogen. Die entstandenen DNA-Fragmente wiesen alle die erwarteten Basenpaarlängen auf (Abb. 55). Das im Vektor inserierte Kandidatengen CLIP2 wurde anschließend sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind Anhang 3 zu entnehmen. Der Vergleich mit der Referenzsequenz (NCBI Referenzsequenz NM\_032421.2) zeigte an vier Stellen (bp 140, 1078, 1097 und 1181) Substitutionen in einzelnen Basenpaaren.





**Abbildung 54: Restriktionsverdau zur Identifikation von Vektoren mit korrekt inseriertem Gen CLIP2**

Gelelektrophoretische Auftrennung der verdauten Vektoren. Die Vektoren der Klone 1, 2, 4-7 und 9 (gekennzeichnet in pink) zeigen nach Restriktionsverdau mit SpeI und NheI bzw. EcoRV, NotI und Sall die für eine korrekte Insertion des Gens CLIP2 spezifischen DNA-Fragmentlängen.



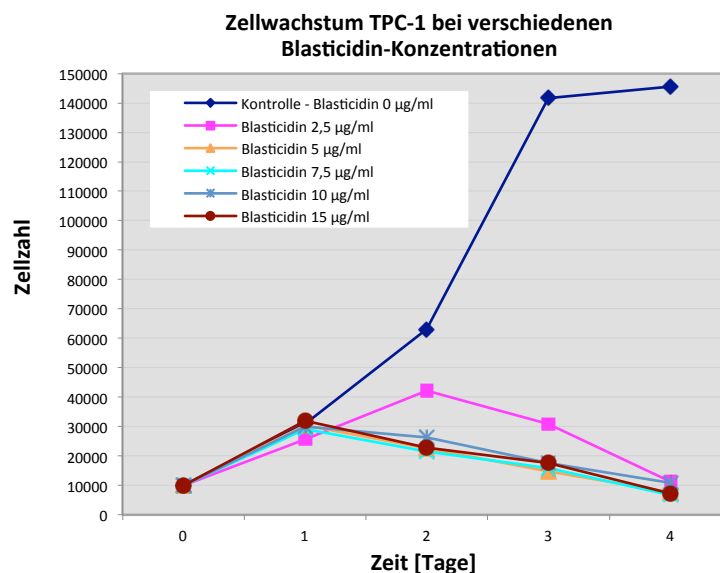
**Abbildung 55: Restriktionsanalyse des Vektors pForGene CLIP2**

Gelelektrophoretische Auftrennung des mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdauten Vektors pForGene CLIP2. Die entstandenen DNA-Fragmente weisen alle die jeweils erwarteten Längen (in bp) auf.

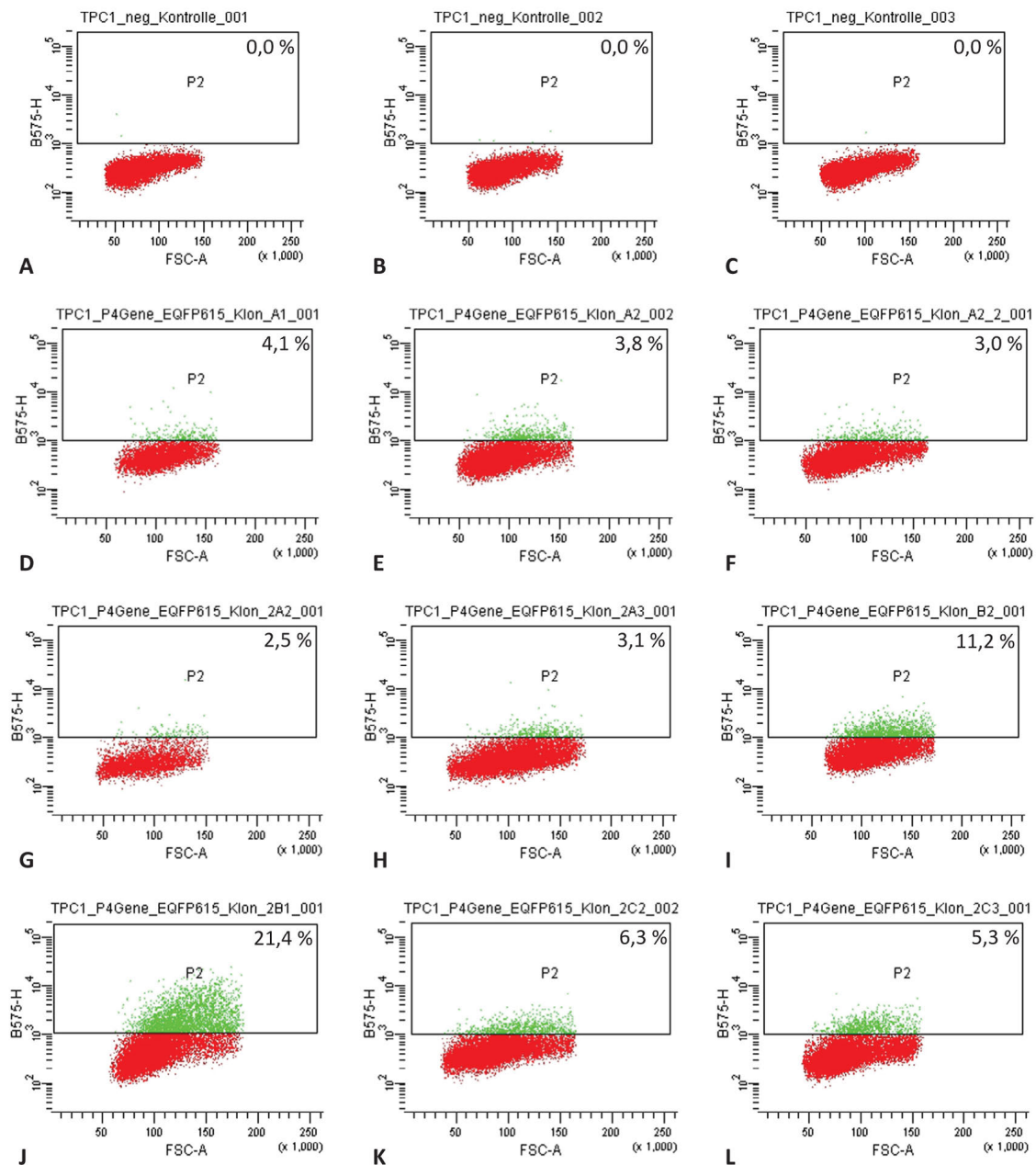
### C.6.3.3 Transfektion der Zelllinie TPC-1

Die Zelllinie TPC-1 wurde mit den NotI-linearisierten Vektoren pForGene, pForGene\_eqFP615 und pForGene CLIP2 transfiziert. Dabei wurde die Vektor-DNA über kationische Lipidvesikel in die Zellen eingebracht. Im Vorfeld konnte in Blastidicin-Konzentrationstests an TPC-1 die Blastidicin-Konzentration von 5 µg/ml für die Selektion ermittelt werden (Abb. 56). 48 h nach der Transfektion erfolgte die Selektion stabil transfizierter Zellen mit Blastidicin. Um die Transfektionseffizienz zu bestimmen, wurden neun mit pForGene\_eqFP615 transfizierte Zellklone sowie nicht transfizierte Kontrollzellen im FACS-Gerät analysiert. Bei einer Wellenlänge von 575 nm konnte bei erfolgreich transfizierten EqFP615-exprimierenden Zellen eine Fluoreszenz nachgewiesen werden (Abb. 57). Die nicht transfizierten TPC-1-Negativkontrollen zeigten wie erwartet keine Fluoreszenz-Signale. Die Transfektionseffizienz der Zelllinie TPC-1 lag bei 2,5 % bis 21,4 %, wobei der Klon EQFP615\_2B1 mit 21,4 % die höchste Transfektionseffizienz aufwies (siehe Abb. 57, J).

Leider war im Rahmen dieser Arbeit keine erfolgreiche Transfektion von TPC-1 mit dem Vektor pForGene CLIP2 möglich.



**Abbildung 56: Effekt des Antibiotikums Blastidicin auf das Zellwachstum der Zelllinie TPC-1**  
 Darstellung der Zellzahl gegen die Inkubationszeit [Tage] für verschiedene Blastidicin-Konzentrationen. Während die Negativkontrolle ohne Blastidicin eine stetige Zunahme der Zellzahl zeigt, nimmt die Zellzahl der mit Blastidicin behandelten Zellen konstant ab. Nach fünf Tagen konnten bei den Konzentrationen 5 - 15 µg/ml unter dem Lichtmikroskop keine lebenden Zellen mehr festgestellt werden. Die Konzentration für eine Selektion der transfizierten Zellen wurde daher auf 5 µg/ml festgelegt.



**Abbildung 57: Transfektionseffizienz der Zelllinie TPC-1**

Graphisch dargestellt sind die Ergebnisse der FACS-Analyse (A)-(C) für die nicht transfizierte Zelllinie TPC-1 (Negativkontrolle) und (D)-(L) für pForGene\_EQFP615 transfizierte Zellen. Die gesamte Zellpopulation wird durch das Vorwärtsstreulicht nach der Größe der Zellen aufgetrennt. Bei einer Wellenlänge von 575 nm kann nur bei erfolgreich transfizierten EqFP615-exprimierenden Zellen Fluoreszenz detektiert werden (Population P2 mit Prozentangabe – dargestellt in grün). Die nicht transfizierten TPC-1-Negativkontrollen zeigen wie erwartet keine Fluoreszenz-Signale.

## D DISKUSSION

In Weißrussland, Russland und der Ukraine wurde nach der Tschernobyl-Reaktorkatastrophe vom 26. April 1986 ein signifikanter Anstieg in der Inzidenz papillärer Schilddrüsenkarzinome (PTC) verzeichnet. So stieg die Anzahl der Neuerkrankungen in der mit am stärksten kontaminierten Region Gomel sogar um den Faktor 100 an (Williams, 2002). Auch nach therapeutisch bedingter Strahlenexposition wird ein Anstieg der kindlichen Schilddrüsenkrebsrate beobachtet (Ron et al., 1995). Die extreme Sensibilität der kindlichen Schilddrüse gegenüber ionisierender Strahlung auch bei niedrigen Dosen wirft die Frage nach den Mechanismen einer strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinogenese auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher ein Tumorkollektiv 80 humaner PTC von exponierten und nicht exponierten jungen Patienten (< 25 Jahre) untersucht, das für Patientenparameter, die Einfluss auf den Genotyp der Tumoren haben können (z.B. Patientenalter), angeglichen wurde. Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis und Vergleich von Kopienzahlveränderungen in strahlenassoziierten und sporadischen PTC mittels Array-CGH, wodurch mögliche strahlenassoziierte genomische Veränderungen identifiziert werden sollten. Strahlenspezifische Aberrationen auf genomischer Ebene wurden sodann mit mRNA- und Proteindaten integriert.

### RET/PTC- UND BRAF-VERÄNDERUNGEN IN PTC JUNGER PATIENTEN

Auf molekularer Ebene sind Schilddrüsenkarzinome häufig mit genetischen Aberrationen assoziiert, die zu einer konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs führen. In PTC ist das auf Chromosom 10q11.2 lokalisierte RET-Proto-Onkogen häufig durch chromosomale Umlagerungen (Translokationen oder Inversionen) verändert (Jhiang, 2000). Eine Beteiligung von RET an der Schilddrüsenkarzinogenese gilt als nachgewiesen (Santoro et al., 2006; Riesco-Eizaguirre und Santisteban, 2007). Neben RET/PTC-Umlagerungen sind Veränderungen des Onkogens BRAF in PTC am häufigsten, wobei die Koexistenz beider Veränderungen in einem Tumor nur sehr selten beobachtet wurde (Lima et al., 2004). Auch die in vorliegender Arbeit 80 untersuchten PTC waren hinsichtlich ihres RET/PTC- und BRAF-Status charakterisiert. Für die Bestimmung des RET/PTC-Status wurde die mRNA-Expression der Tyrosinkinase(TK)- und der Extrazellulär(EZ)-Domäne des RET-Gens analysiert, da es im Fall einer RET-Umlagerung

(RET/PTC-positiv) zur Überexpression der TK-Domäne kommt, während die EZ-Domäne nur schwach oder gar nicht exprimiert wird. Darüber hinaus wurden die zwei häufigsten RET/PTC-Umlagerungen RET/PTC1 (Fusionspartner H4) und RET/PTC3 (Fusionspartner ELE1) nachgewiesen (Smida et al., 1999). Es zeigte sich, dass das Auftreten der RET/PTC-Veränderungen in den 80 PTC nicht mit der Strahlenexposition der Patienten korreliert und somit keine strahlenassoziierte Veränderung darstellt. 40 % der strahlenassoziierten PTC sowie 44,4 % der sporadischen PTC-Fälle waren RET/PTC-positiv. Auch die lange Zeit als strahlenspezifisch angesehene strukturelle RET/PTC3-Umlagerung (Jhiang und Mazzaferri, 1994; Fugazzola et al., 1995; Klugbauer et al., 1995; Smida et al., 1999) trat mit ähnlichen Häufigkeiten in exponierten und nicht exponierten Fällen auf. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der aktuellen Annahme, dass das Auftreten von RET/PTC-Veränderungen (insbesondere RET/PTC3) eher im Zusammenhang mit dem soliden histologischen Subtyp und dem Alter der Patienten als mit der Ätiologie der Tumore steht (Nikiforov et al., 1997; Fenton et al., 2000; Powell et al., 2005; Tuttle et al., 2008). Auch das Auftreten der häufigsten BRAF-Punktmutation V600E (Austausch von Valin an der Position 600 gegen Glutamat) unterschied sich in strahlenassoziierten (23,3 %) und sporadischen PTC (23,8 %) nicht. Diese Befunde bestätigten, dass weder RET/PTC-Umlagerungen noch BRAF-Mutationen strahlenspezifische Veränderungen darstellen und gaben Veranlassung dazu, nach weiteren gesamtgenomischen Veränderungen zu suchen. Allerdings ist es eine große Herausforderung strahlenspezifische chromosomale Veränderungen in Karzinomen zu identifizieren, die erst viele Jahre nach der Strahlenexposition entstanden sind. Initiale strahlenassoziierte Aberrationen können durch zusätzliche Veränderungen, die im Laufe der Tumorentstehung akkumuliert werden, überdeckt sein. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Faktoren wie das Patientenalter und der genetische Hintergrund der Tumore (z.B. BRAF-Mutationen oder RET/PTC-Umlagerungen) Kopienzahlveränderungs-Profile in PTC beeinflussen (Finn et al., 2007; Unger et al., 2008). Für den Vergleich exponierter und nicht exponierter Tumorkohorten war es daher von entscheidender Bedeutung, dass diese für möglichst alle Störfaktoren wie Alter, Geschlecht, Herkunft und Histologie angeglichen sind, um so deren Einfluss auf die Versuchsergebnisse zu minimieren. Das angeglichene Tumorkollektiv exponierter und nicht exponierter Patienten wurde von der Chernobyl Tissue Bank (CTB) zur Verfügung

gestellt, in der seit 1998 Schilddrüsentumore zusammengeführt werden, die Bewohner von kontaminierten Gebieten Russlands und der Ukraine nach dem Tschernobyl-Reaktorunfall entwickelt haben (Thomas et al., 2011). Die strahlenassoziierten Tumoren stammen von jungen Patienten, die zum Zeitpunkt des Reaktorunfalls < 19 Jahre waren (geboren nach dem 26. April 1967), wohingegen die sporadischen Schilddrüsenkarzinome von Patienten stammten, die erst nach dem 1. Januar 1987 geboren wurden und aufgrund der kurzen <sup>131</sup>Iod-Halbwertszeit von nur 8,04 Tagen keiner Radioiod-Strahlung (auch nicht *in utero*) ausgesetzt waren.

#### GESAMTGENOMISCHE KOPIENZAHVERÄNDERUNGEN IN PTC

Die Array-CGH stellt eine effiziente *Screening*-Methode zum genomweiten Nachweis chromosomaler Kopienzahlveränderungen im Tumorgenom dar (Albertson und Pinkel, 2003; Inazawa et al., 2004). Tumore weisen typischerweise eine große Anzahl genetischer Veränderungen auf, die einen Einfluss auf die Entwicklung von Tumoren (z.B. Proliferation und Metastasierung) haben. Mittels Array-CGH können numerische Veränderungen (DNA-Zugewinne und DNA-Verluste) von Genomabschnitten mit bestimmten Tumorarten bzw. Tumor-Subtypen oder histologischen und klinischen Parametern in Verbindung gebracht werden. Die Identifikation potentieller diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Marker nimmt dabei eine bedeutende Rolle ein. Hieraus erhofft man sich Fortschritte in der Entwicklung neuer Krebstherapien und diagnostischer Tests (Davies et al., 2005; Kallioniemi, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde diese Methode eingesetzt, um PTC junger Patienten mittels genomweiter Array-CGH-Analysen auf chromosomale Imbalancen untersucht. Die nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen werden zunächst hinsichtlich der Häufigkeit ihres Auftretens und anschließend im Hinblick auf Korrelationen mit Tumor- und Patientenparametern diskutiert.

#### HÄUFIGE KOPIENZAHVERÄNDERUNGEN IN PTC VON JUNGEN PATIENTEN

In den 52 PTC des Untersuchungskollektivs wurden dabei über 140 Kopienzahlveränderungen nachgewiesen, wobei insgesamt mehr DNA-Zugewinne als DNA-Verluste auftraten. Im Gesamtkollektiv kamen am häufigsten DNA-Zugewinne (in  $\geq 70$  % der untersuchten Fälle) der Chromosomen 1, 2, 3p, 4, 5, 6q, 7, 8, 9q, 11, 12, 13q, 16, 17,

19, 20p, 21q und 22q vor, wohingegen die häufigsten DNA-Verluste (in  $\geq 50$  % der untersuchten Fälle) auf den Chromosomen 1p, 3, 4p, 5, 6, 7q, 8q, 11, 12, 13q, 20p und 21q auftraten (siehe Tabellen 15 und 16). Fünf Bereiche auf den Chromosomen 1p32.3-13.3, 3p26.3-26.1, 3p25.1-22.2, 4p16.1-q34.3 und 12p13.1-q13.11 zeigten in allen 52 PTC DNA-Verluste. Die sechs chromosomalen Bereiche 12p13.33-13.1, 19p13.3-13.11, 19q12-13.43, 20p13, 20p12.1-q13.33 und 22cen-q13.33 wiesen in 100 % der Fälle DNA-Zugewinne auf.

Zahlreiche Arbeiten wiesen bereits mittels CGH- und LOH-Analysen im Genom von PTC Kopienzahlveränderungen und Allelverluste nach (Califano et al., 1996; Chen et al., 1998; Hemmer et al., 1999; Zitzelsberger et al., 1999; Kitamura et al., 2000; Singh et al., 2000; Richter et al., 2004; Wreesmann et al., 2004; Kimmel et al., 2006; Finn et al., 2007; Rodrigues et al., 2007; Unger et al., 2008; Stein et al., 2010). In den meisten bisher veröffentlichten CGH-Studien an Schilddrüsentumoren wurden mehr DNA-Zugewinne als DNA-Verluste nachgewiesen (Chen et al., 1998; Richter et al., 2004; Kimmel et al., 2006; Finn et al., 2007; Rodrigues et al., 2007; Stein et al., 2010). Dieser Befund wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. Der Vergleich der im Untersuchungskollektiv nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen mit bereits publizierten Daten zeigte eine gute Übereinstimmung. In einer Studie von Kimmel et al. (2006) werden Veränderungen der Chromosomen 1p36.23, 1p34.2, 1q32.1, 5q35.3, 7p22.3, 7q22.1, 7q36.1-36.3, 9q33, 9q34.11, 9q34.3, 16p13.3, 16q24.3, 17p13.1-13.3, 17q21.2-21.33, 17q25.1, 17q25.3, 19p13.11, 19q13, 20q13.33, 21q22.3, 22q13.2 ebenso als häufigste DNA-Zugewinne in strahlenassoziierten PTC junger Patienten beschrieben. Auch die von Chen et al. (1998) in PTC beobachteten DNA-Zugewinne der chromosomalen Bereiche 1p36, 1p34, 9q33-34, 16q23-q24 sowie 19q13 stehen im Einklang mit den in vorliegender Arbeit nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen. Chromosomale Imbalancen wurden bei Richter et al. (2004) mittels konventioneller CGH an einem Kollektiv von 60 kindlichen strahlenassoziierten PTC nachgewiesen, wobei sich Übereinstimmungen bei DNA-Zugewinnen auf den Chromosomen 6q, 9, 11, 17q, 20, 21 und 22q ergaben. Auch die von Unger et al. (2008) untersuchten PTC von Kindern aus der Ukraine und Weißrussland wiesen häufig DNA-Zugewinne der chromosomalen Bereiche 9q33.3-34.3, 10q26.13.-26.3, 16p13.3, 16q23.3-24.3, 19p13.3-q13.43, 20q13.33 und 21q22.13-22.3 auf (siehe Tabelle 17). Zusätzlich beschreiben Unger et al. (2008) in

PTC die Korrelation des DNA-Zugewinns auf Chromosom 12q24.23-24.31 mit dem Vorliegen einer RET/PTC-Umlagerung in den Tumoren. Ein solcher Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da der betreffende Veränderungsbereich 12q24.23-23.31 auch in RET/PTC-negativen PTC nachgewiesen wurde. DNA-Zugewinne der chromosomalen Bereiche 1p36.33, 1p36.1, 3p21.3, 11q13, 12q13, 17q21, 20q13, 22q11.2 und 22q13.1 wurden bei Finn et al. (2007) ebenso als häufigste Veränderungen in PTC beschrieben. Stein et al. (2010) beschreiben Veränderungen der Chromosomen 1p, 5p, 9q, 12q, 13q, 16p, 21q und 22q auch als häufigste DNA-Zugewinne in nach dem Tschernobyl-Unfall entstandenen PTC junger Patienten. Des Weiteren konnten Übereinstimmungen mit den von Singh et al. (2000) in sporadischen PTC nachgewiesenen DNA-Zugewinnen der Chromosomen 4, 5q, 6q und 13q gezeigt werden. Auch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen DNA-Verluste wurden größtenteils in der Literatur für PTC beschrieben. Dazu zählen DNA-Verluste der Chromosomen 1p31.3-13.3, 1q23.3-32.1, 1q32.3-41, 6p21.1-q25.2, 11p14.1-12, 11q14.2-21, 13q13.1-33.3 (Unger et al., 2008), 3q26.3 und 12q23 (Finn et al., 2007). Auch Stein et al. (2010) konnten in ihren Array-CGH-Analysen an PTC junger Patienten neben DNA-Verlusten auf Chromosom 21q Verluste der Chromosomen 6q und 13q nachweisen. DNA-Verluste auf Chromosom 13q werden auch bei Richter et al. (2004) in kindlichen strahlenassoziierten PTC beobachtet.

Der Vergleich der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen mit früheren Studien legt somit den Schluss nahe, dass DNA-Zugewinne der chromosomalen Bereiche 1p36, 1p34, 9q33.3-34.3, 12q24, 16p13.3, 16q23.3-24.3, 17q21, 19p13, 19q13, 20q13.33, 21q22 und 22q13 sowie DNA-Verluste auf Chromosom 13q wiederkehrende Veränderungen in PTC darstellen. Dies lässt in den chromosomalen Bereichen die Lokalisation von Genen vermuten, die eine wichtige Rolle in der Karzino-genese von PTC spielen.

In „*The Hallmarks of Cancer*“ gehen Hanahan und Weinberg (2000) davon aus, dass eine neoplastische Zelle während der malignen Transformation schrittweise sechs essentielle Eigenschaften erlangen muss. Sie muss unabhängig von extrazellulären Wachstumssignalen und unempfindlich gegenüber wachstumshemmenden Signalen werden, dem programmierten Zelltod (Apoptose) entgehen, die uneingeschränkte Fähigkeit der Genomreplikation entwickeln, in anderes Gewebe infiltrieren und metas-



tasieren können und in der Lage sein, die Blutgefäßbildung zu veranlassen (Angiogenese) (Hanahan und Weinberg, 2000, 2011). Dementsprechend ist zu erwarten, dass auch in PTC Aberrationen von Genen nachgewiesen werden können, die in der Regulation oben genannter Prozesse involviert sind. Kopienzahlveränderungen im Genom einer Zelle können nachfolgend zu einer aberranten mRNA- und Proteinexpression der betroffenen Gene führen. Dabei werden Onkogene, deren Überexpression beispielsweise die Tumorpheriferation begünstigt, häufig in chromosomalen Bereichen mit DNA-Zugewinn gefunden, während in deletierten chromosomalen Bereichen hingegen häufig Tumorsuppressorgene lokalisiert sind (Albertson, 2006).

Die mittels Array-CGH nachgewiesenen wiederkehrend veränderten chromosomalen Bereiche in PTC dienten als Ausgangspunkt für die Identifizierung tumorassoziierter Kandidatengene, welche anhand ihrer bereits in der Literatur beschriebenen funktionellen Rolle bei der Karzinogenese (im Speziellen bei Schilddrüsenkarzinomen) ausgewählt wurden. Insgesamt konnten 158 tumorassoziierte Kandidatengene identifiziert werden (siehe Tabelle 20). Darunter waren auch häufig beschriebene Onkogene (z.B. WNT1) und Tumorsuppressorgene (z.B. RB1). Zehn Kandidatengene wurden bereits in einer vorangegangenen Array-CGH-Studie an 33 PTC identifiziert (Unger et al., 2008).

In chromosomalen Bereichen mit DNA-Zugewinnen konnten dabei Onkogene lokalisiert werden, die bereits im Zusammenhang mit verschiedenen Tumortypen publiziert wurden. So sind beispielsweise die Onkogene SKI in Melanomen (Chen et al., 2003) und JUNB in T-Zell-Lymphomen (Mao et al., 2003) involviert. Eine Überexpression wurde außerdem gezeigt für die Gene CTTN, NOTCH3 und PDGFB bei Brustkrebs (Schuurung et al., 1993; Zhu et al., 2006a; Zang et al., 2007), FOXM1 bei Prostata- und Lungentumoren (Kalin et al., 2006; Kim et al., 2006), PXN bei Plattenepithelkarzinomen (Conway et al., 2006), RNF34 bei Ösophagus- und Kolorektalkarzinomen (Sasaki et al., 2002; Sasaki et al., 2004), DVL1 bei Zervixkarzinomen (Okino et al., 2003), SHH bei Prostatakarzinomen (Yamazaki et al., 2008) sowie PIK3CD bei Neuroblastomen (Boller et al., 2008). Außerdem wurden vier Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (FGF3, FGF4, FGF6 und FGF9) nachgewiesen, von denen bekannt ist, dass sie in Schilddrüsenkarzinomen exprimiert werden und damit möglicherweise eine Rolle bei der Tumorentstehung spielen (Eggo et al., 1995; Barnard et al., 2005). Verschiedenste Studien haben die Bedeutung der Beteiligung von Zellzyklus-Regulatoren an der Krebsentstehung ge-

zeigt. Der Zellzyklus wird durch cyclinabhängige Protein-Kinasen (CDK) reguliert, welche zeitlich aufeinander folgend aktiviert werden. Die Regulation der Zellproliferation ist jedoch komplex und steht unter der Kontrolle von Cyclinen, CDK-Inhibitoren und Phosphorylierungsmechanismen. So kommt es beispielsweise in der G1-Phase des Zellzyklus zur Aktivierung der CDK4 durch Wechselwirkungen mit den Cyclinen D1 und D2. Diese sowie ein weiterer Zellzyklus-Regulator (CDK5) wurden in wiederkehrenden Veränderungsbereichen der PTC identifiziert und auch schon in vorhergehenden Studien beschrieben. So wurde eine Überexpression der Cycline D1 und D2 (CCND1 und CCND2) und die damit einhergehende Zellzyklusprogression in Nieren-, Mamma-, Hals-Kopf-, Plattenepithel- und Pankreaskarzinomen beobachtet (Izzo et al., 1998; Liu et al., 2002; Sutherland und Musgrove, 2004; Yue und Jiang, 2005; Husdal et al., 2006; Nauman et al., 2007; Elsheikh et al., 2008). Bei Schilddrüsenkarzinomen wurde bereits eine CDK5-, bei Magentumoren und Sarkomen eine CDK4-Überexpression gezeigt (Ragazzini et al., 2004; Lin et al., 2007; Kishimoto et al., 2008). Eine Kontrolle von Zellzyklusregulatoren wird wiederum von WNT-Proteinen bewirkt. In Bereichen mit DNA-Zugewinnen befanden sich vier Mitglieder der WNT-Familie, die Zellproliferation und Zelldifferenzierung über Signalketten kontrollieren (Seidensticker und Behrens, 2000). Eine Überexpression der Gene WNT11, WNT10B, WNT1 und WNT5B wurden bereits in verschiedenen Tumoren beschrieben (Kirikoshi et al., 2001; Nagataki und Nystrom, 2002; Ricken et al., 2002; Saitoh et al., 2002; Katoh, 2005; Railo et al., 2008). Auch die in Sarkomen, Prostata-, Magen- und Brusttumoren amplifizierten und überexprimierten Gene MCM7, TOP2A, ERBB2 (HER-2) und SAS konnten in den veränderten chromosomalen Bereichen der PTC identifiziert werden (Ragazzini et al., 2004; Varis et al., 2004; Allouche et al., 2008; Arriola et al., 2008).

In den von DNA-Verlusten betroffenen chromosomalen Bereichen konnten Tumorsuppressorgene identifiziert werden, welche mit verschiedenen Tumortypen in Verbindung gebracht werden. Dabei spielen KLF5 und HTATIP2 (TIP30) bei Brustkrebs (Chen et al., 2002; Zhao et al., 2007) und FOXO1A bei Gebärmutter- und Prostatakarzinomen (Dong et al., 2006; Goto et al., 2008) eine Rolle. Auch das bekannte Tumorsuppressorgen RB1, welches als essentieller negativer Regulator des Zellzyklus agiert, befindet sich unter den Kandidatengenen. RB1 inhibiert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F, dessen Zielgene G1-S-Phase-Regulatoren darstellen. Der Verlust der Kontrolle

von E2F steht in Zusammenhang mit genetischer Instabilität und Tumorigenese (Harbour und Dean, 2000b, a; Knudson, 2001; Pickering und Kowalik, 2006; Corson und Gallie, 2007).

Der in den PTC nachgewiesene DNA-Verlust des chromosomalen Bereichs 13q13.1-q33.3 enthält das Kandidatengen SLITRK5, dessen Deletion auch in den Array-CGH-Analysen von transgenen TRK-T1-Mäusen identifiziert wurde (Heiliger et al., submitted). SLITRK5 und neun weitere tumorassoziierte Kandidatengene aus dem transgenen Mausmodell zur Aufklärung der Schilddrüsenkarzinogenese wurden auch in vorliegender Arbeit auf ihre Beteiligung in humanen Schilddrüsenkarzinomen untersucht. Hierzu wurde die mRNA-Expression der zehn Gene mittels qRT-PCR in humanen PTC analysiert. Im Vergleich zu normalem Schilddrüsengewebe konnte eine deutliche Überexpression des Kandidatengens UNC5C in PTC nachgewiesen werden ( $p = 0,031$ ). Veränderungen des UNC5C-Gens wurden bereits in kolorektalen Karzinomen nachgewiesen (Shin et al., 2007; Hibi et al., 2009). Auch für das Gen TP73 konnte in den qRT-PCR-Analysen eine Überexpression im Tumorgewebe gezeigt werden ( $p = 0,036$ ). TP73 ist im chromosomalen Bereich 1p36.32 lokalisiert, der in den Array-CGH-Analysen von 52 humanen PTC häufig DNA-Zugewinne aufwies. Eine Überexpression von TP73 wurde bereits in kolorektalen Karzinomen nachgewiesen (Toumi et al., 2010). Des Weiteren konnte für das Kandidatengen SLITRK5 eine signifikant verminderte mRNA-Expression im Tumorgewebe ermittelt werden ( $p = 0,001$ ). Auch dies stand im Einklang mit den Array-CGH-Ergebnissen von 52 PTC, da SLITRK5 in einem häufig von DNA-Verlusten betroffenen Bereich auf Chromosom 13q31.2 liegt. Die genaue Funktion des integralen Membranproteins der SLITRK-Familie ist zwar unklar (Aruga et al., 2003), allerdings wurde eine Expression der SLITRK-Gene in Leukämie- und Lymphomzellen beobachtet (Milde et al., 2007).

Die nachgewiesenen wiederkehrenden Kopienzahlveränderungen wurden exemplarisch mittels FISH-Experimenten bestätigt. Durch FISH-Analysen mit fluoreszenzmarkierten Sonden ist es möglich, chromosomale Aberrationen auf Einzelzell-Ebene direkt an Formalin-fixierten Paraffin-eingebetteten Tumor-Gewebeschnitten zu untersuchen. Die chromosomalen Veränderungen konnten in allen untersuchten Tumorgeweben bestätigt werden. Da die FISH-Analysen mit genspezifischen BAC-Klonen durchgeführt

wurden, konnten damit auch Amplifikationen der Kandidatengene TP73, CDK5, CTTN, CCND1, WNT1, AGAP2, PXN und RPLP0 nachgewiesen werden. Die Häufigkeit aberranter Zellen pro Tumorgewebe lag bei 15-29 %, wobei Zellen mit veränderter Kopienzahl eine relativ uneinheitliche Anzahl von FISH-Signalen aufwiesen, die von drei Signalen bis teilweise sechs Signalen pro Zelle reichte. Dies deutete auf eine Heterogenität der Tumore hin, bei der sich die Zellen innerhalb eines Tumorgewebes hinsichtlich ihrer zytogenetischen Veränderungen unterscheiden. Eine solche intratumorale Heterogenität wurde bereits bei Brustkrebs und papillären Schilddrüsenkarzinomen beobachtet (Aubele et al., 1999; Unger et al., 2004; Unger et al., 2006; Unger et al., 2008; Almendro und Fuster, 2011). PTC weisen histologisch ein sehr heterogenes Muster in der Anordnung der neoplastischen Zellen auf, was sich auch auf der genomischen Ebene widerspiegelt. So wurde in PTC bereits die heterogene Verteilung von RET/PTC-Rearrangierungen beschrieben (Unger et al., 2004; Unger et al., 2006; Zhu et al., 2006b). Als eine Ursache für Tumorheterogenität wird die genomische Instabilität in Tumorzellen angesehen, die zur Entstehung verschiedener Zellpopulationen mit unterschiedlichen Aberrationsmustern führen kann (Bayani et al., 2007; Ruiz et al., 2011).

#### KORRELATION ZYTOGENETISCHER ABERRATIONEN MIT KLINISCHEN PARAMETERN UND TUMORPHÄNOTYPEN

Eine hierarchische Clusteranalyse aller 52 PTC-Fälle zeigte eine deutliche Auftrennung der Tumor-Fälle in zwei Hauptcluster (Cluster 1 und 2; siehe Abbildung 21). Hierbei war ein bedeutender Aspekt, dass die beiden Cluster mit dem RET/PTC-Status ( $p = 0,0096$ ) der Karzinome korrelierten. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit der PTC-Studie von Unger et al. (2008), in welcher ebenfalls eine Clusteraufspaltung der Schilddrüsenkarzinome nach dem RET/PTC-Status beobachtet wurde. Zusätzlich konnten dort Kopienzahlveränderungen nachgewiesen werden, die hauptsächlich in RET/PTC-positiven bzw. -negativen Karzinomen auftreten. Diese Daten deuten darauf hin, dass RET/PTC-positive und RET/PTC-negative Schilddrüsenkarzinome unterschiedliche Wege der Tumorentstehung einschlagen. Untersuchungen von RET/PTC-positiven PTC auf Einzelzell-Ebene haben darüber hinaus gezeigt, dass RET/PTC-Rearrangierungen in einzelnen Tumoren sehr heterogen verteilt sind. Dabei wies in vielen Tumoren nur ein subklonaler Anteil der Zellen RET/PTC-Umlagerungen auf

(Unger et al., 2004; Unger et al., 2006; Zhu et al., 2006b). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben RET-Rearrangierungen zusätzliche Genveränderungen an der Entwicklung von RET/PTC-positiven Schilddrüsenkarzinomen beteiligt sein müssen, und von der Existenz alternativer Wege der Tumorentstehung ausgegangen werden kann. Diese können durch die Untersuchung von chromosomalen Aberrationen, die vorwiegend in RET/PTC-negativen Tumoren auftreten, genauer aufgeklärt werden.

Neben einer Korrelation der Cluster mit dem RET/PTC-Status, wurde eine Assoziation der Cluster mit der Tumorgroße ( $p = 0,00087$ ) und der Lymphknotenmetastasierung ( $p = 0,04$ ) gefunden. Diese Beobachtung wurde durch den direkten Vergleich der Kopienzahlveränderung in T3-, T2- und T1-Tumoren untermauert, da sich insgesamt acht mit der Tumorgroße korrelierende chromosomale Veränderungen identifizieren ließen (T1-PTC: DNA-Zugewinne auf Chromosom 1q21.1-23.3, 7q22.1, 9p24.3, 10p15.3-15.1, 10q26.13-26.3 und 11p11.12-cen; T3-PTC: DNA-Zugewinne auf Chromosom 12q24.11-24.23 und 16q22.1-23.3). Die Erkenntnis, dass sich PTC aufgrund der Parameter „Tumorgroße“ oder „Lymphknotenmetastasierung“ unterscheiden lassen, kann durch den mehrstufigen Prozess der Karzinogenese erklärt werden. Man nimmt an, dass mehrere aufeinander folgende Mutationen nötig sind, um eine normale Epithelzelle in eine maligne Zelle zu transformieren, was beispielhaft in einem mehrstufigen Modell für die Entwicklung von Darmkrebs gezeigt wurde (Fearon und Vogelstein, 1990; Vogelstein und Kinzler, 1993). Im Laufe der Tumorprogression kommt es zu einer Akkumulation genetischer Veränderungen, die verschiedene Gene und Signalwege betreffen (Stratton et al., 2009). Das vermehrte Auftreten von Kopienzahlveränderungen in einem bestimmten Tumorstadium könnte auch darauf hindeuten, dass von der jeweiligen Veränderung Gene betroffen sind, die den malignen Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt während der Tumorentwicklung einen Wachstumsvorteil verschaffen. So ist beispielsweise das Kandidatengene HAS3 in einem mit T3-Tumoren assoziierten Veränderungsbereich lokalisiert. Eine Überexpression von HAS3 neben HAS1 und HAS2 wurde bei Kolonkarzinomen nachgewiesen (Bullard et al., 2003). HAS3 kodiert für eine Hyaluronsäure (Glykosaminoglykan), die einen wichtigen Bestandteil des Bindegewebes darstellt und auch eine Rolle bei der Zellproliferation, Zellmigration und Tumorentstehung spielt.

### KORRELATION EINES DNA-ZUGEWINNS AUF CHROMOSOM 7 MIT DER STRAHLENEXPOSITION DER PATIENTEN

Der Nachweis einer strahlenassoziierten Kopienzahlveränderung auf Chromosom 7 ist das bedeutendste Ergebnis der vorliegenden Arbeit. Es konnte ein strahlenspezifischer DNA-Zugewinn ( $p = 0,0015$ ,  $FDR = 0,035$ ) auf Chromosom 7p14.1-q11.23 ermittelt werden, der mit der Strahlenexposition der Patienten im Untersuchungskollektiv ( $n = 52$ ) korrelierte. Der DNA-Zugewinn mit der Größe von 32,1 Mb trat bei 39 % der durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl exponierten Patienten auf, wohingegen kein einziger Fall der nicht exponierten Gruppe die Veränderung aufwies (siehe Abb. 25). Die Assoziation des DNA-Zugewinns auf Chromosom 7p14.1-q11.23 mit der Strahlenexposition der Patienten konnte für den chromosomalen Bereich 7q11.22-11.23 im Validierungskollektiv von 28 PTC bestätigt werden und auch auf einen 4,3 Mb großen Bereich eingegrenzt werden ( $p = 0,024$ ; siehe Abb. 27). Dabei trat der DNA-Zugewinn erneut ausschließlich in exponierten PTC-Fällen und mit ähnlicher Häufigkeit wie im Untersuchungskollektiv auf (37,5 % der exponierten Fälle). Es handelt sich daher um ein sehr robustes Resultat.

Die Tatsache, dass in beiden Tumorkollektiven nur ungefähr 40 % der exponierten Fälle den DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 aufwiesen, kann unterschiedlich interpretiert werden. Wenn man allerdings davon ausgeht, dass im exponierten Kollektiv ca. 85 % der Fälle auch tatsächlich strahleninduziert sind (Abschätzungen nach Jacob et al. (2006a,b) mit Korrekturfaktoren für Alter bei Exposition von  $\leq 2$  Jahre), dann deutet dieser Befund darauf hin, dass sich die Gruppe der exponierten PTC-Fälle aus mehreren unterschiedlichen molekularen Subgruppen zusammensetzt und vermutlich mehrere Wege der strahleninduzierten Karzinogenese existieren. Denkbar ist auch, dass diese molekularen Mechanismen der Strahlenkarzinogenese dosisabhängig sind. Über die Genveränderungen des chromosomalen Bereichs 7q11.22-11.23 lassen sich wichtige Rückschlüsse auf einen dieser molekularen Mechanismen ziehen. Dabei ist auch zu betrachten, wie ionisierende Strahlung diese 7q11 Veränderung hervorrufen könnte.

Es ist bekannt, dass ionisierende Strahlung DNA-Schäden induziert. So werden z.B. durch 1 Gy Röntgenstrahlung neben Basenschäden und DNA-Protein-Quervernetzungen pro Zelle etwa 500-1000 DNA-Einzelstrangbrüche sowie 20-40 DNA-

Doppelstrangbrüche hervorgerufen (Goodhead, 1989; Ward, 1994). DNA-Doppelstrangbrüche werden hierbei als wesentliche Primärläsion für eine Vielzahl biologischer Endpunkte wie Zelltod, chromosomale Aberrationen und maligne Zelltransformation angesehen (Bryant und Riches, 1989; Winegar et al., 1992). Bereits ein einzelner Doppelstrangbruch kann in seiner unmodifizierten Form zum Zelltod führen, wenn er nicht zuvor bereits durch die DNA-Reparaturmechanismen der Zelle beseitigt wurde (Olive, 1998). Als Folge fehlgeschlagener DNA-Reparatur (*misrepair*) können chromosomale Aberrationen wie Translokationen (reziproke und nicht-reziproke), Inversionen sowie Kopienzahlveränderungen in Form von DNA-Zugewinnen (Amplifikationen) und DNA-Verlusten auftreten (Obe et al., 1992; Pipiras et al., 1998; Obe et al., 2002). Dabei kann die Funktion von Genen zerstört, inhibiert oder verstärkt werden, was wiederum Ausgangspunkt einer malignen Zelltransformation sein kann. Darüber hinaus ist bekannt, dass bereits niedrige Strahlendosen zur Entstehung chromosomaler Aberrationen führen (Mullenders et al., 2009).

Es wird angenommen, dass DNA-Doppelstrangbrüche auch eine notwendige Voraussetzung für die Initiation genomischer Amplifikationen darstellen (Obe et al., 1992; Pipiras et al., 1998; Obe et al., 2002; Tanaka et al., 2007; Hastings et al., 2009; Mondello et al., 2010). Die genauen Mechanismen zur Entstehung von Amplifikationen ausgehend von strahleninduzierten Doppelstrangbrüchen werden bislang noch nicht vollständig verstanden. Die hohe Diversität und Komplexität in Struktur, Lage und Aufbau amplifizierter genomischer Bereiche lässt die Existenz mehrerer unabhängiger oder verknüpfter Mechanismen vermuten (Hastings et al., 2009). Im Laufe der Zeit wurden mehrere Theorien zum Entstehungsmechanismus intrachromosomaler Amplifikationen aufgestellt, wobei das *Breakage-Fusion-Bridge*-Modell, das bereits vor 70 Jahren erstmals von Barbara McClintock beschrieben wurde (McClintock, 1941), das anerkannteste ist. Bei diesem Mechanismus kommt es zur Formation langer palindromischer DNA-Sequenzen an den Bruchpunkten (Tanaka et al., 2005; Tanaka et al., 2007; Tanaka und Yao, 2009; Mondello et al., 2010).

Obwohl eine Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen bereits bei sehr geringen Strahlendosen beobachtet wird (Löbrich et al., 2005), ist es denkbar, dass die fehlerhafte Reparatur primärer DNA-Läsionen dosisabhängig variiert. Auf diese Weise könnten verschiedene Genotypen entstehen, die sich anhand ihrer Kopienzahlveränderungen

und chromosomalen Rearrangierungen unterscheiden. Eine solche Dosisabhängigkeit der genomischen Amplifikation könnte auch die Tatsache erklären, dass nur eine Subgruppe der exponierten PTC-Fälle den strahlenassoziierten DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 aufwies. Leider war es im Rahmen vorliegender Arbeit nicht möglich dies zu überprüfen, da keine individuellen Strahlendosen für die exponierten Patienten verfügbar waren.

Die Schilddrüsendosen der exponierten Patienten konnten lediglich mit Hilfe bekannter Ortsdosen abgeschätzt werden. Hierfür wurden ortsspezifische Dosen herangezogen, die für zwischen 1968 und 1985 geborene Bewohner kontaminierter Gebiete abgeschätzt wurden (Jacob et al., 2006a). Da die exponierten Patienten des im Rahmen vorliegender Arbeit untersuchten Kollektivs erheblich jünger waren (Altersmedian bei Exposition 1,52 Jahre) als die Geburtskohorte 1968-1985, für die Dosisabschätzungen publiziert wurden, wurden die abgeschätzten Schilddrüsendosen um den Faktor zwei korrigiert (Jacob et al., 2006b). Die resultierende durchschnittliche Schilddrüsendosis der Patienten der vorliegenden Arbeit lag somit bei 150 mGy.

Um auszuschließen, dass die Veränderungen auf 7q11 mit anderen Faktoren außer ionisierender Strahlung in Verbindung stehen könnte, wurde zunächst abgeschätzt, wie hoch der Anteil strahleninduzierter Tumore in der exponierten Gruppe ist. Die Inzidenz sporadisch auftretender papillärer Schilddrüsenkarzinome bei jungen Patienten beträgt jährlich etwa einen Fall pro 1 Million (Muir et al., 1987). Nach dem Tschernobyl-Unfall stieg die Inzidenz in dieser Altersgruppe um den Faktor 10-30 an, wobei in den am stärksten kontaminierten Regionen sogar ein Anstieg um den Faktor 100 beobachtet werden konnte (Tronko et al., 1999; Williams, 2002; Cardis et al., 2006). Wie bereits oben erwähnt, konnte mit Hilfe einer von Jacob et al. (2006b) veröffentlichten Kurvenschätzung der Anteil strahleninduzierter PTC in der untersuchten exponierten Tumorkohorte auf ca. 85 % geschätzt werden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass sich unter den Fällen der exponierten Gruppe eine signifikante Anzahl sporadischer PTC befand.

Darüber hinaus wurden Korrelationen des DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 mit anderen Faktoren in Betracht gezogen. Der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 wies ausschließlich eine Korrelation mit der Strahlenexposition der Patienten durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl auf. Weitere Assoziationen mit



klinischen Daten bzw. Tumorphänotypen wie z.B. Geschlecht, Lymphknotenstatus, Tumorgroße, histologischer PTC-Subtyp, RET/PTC-Status oder BRAF-Mutationen konnten ausgeschlossen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Betrachtungen wurde der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 als ein Marker für Strahlenexposition in PTC nachgewiesen.

Der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 wurde bislang noch nicht als potentieller Strahlenmarker in PTC identifiziert. Richter et al. (2004) wiesen allerdings mittels konventionellen CGH-Analysen an einem Tumorkollektiv von 60 kindlichen PTC bereits DNA-Zugewinne auf Chromosom 7q11.2 nach. Es handelte sich dabei ausschließlich um strahlenassoziierte PTC, die nach dem Tschernobyl-Unglück in Weißrussland und der Ukraine entstanden sind. Auch in der Array-CGH-Studie von Kimmel et al. (2006) wurden DNA-Zugewinne auf Chromosom 7q11.23 in strahlenassoziierten PTC junger Patienten beschrieben. Dass die Veränderung bei Kimmel et al. nicht als strahlenspezifische Veränderung erkannt werden konnte, könnte an der suboptimal angeglichenen Vergleichskohorte sporadischer Schilddrüsenkarzinome liegen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten exponierten und nicht exponierten Fälle waren dahingegen für möglichst viele Faktoren wie Patientenalter, Geschlecht, Herkunft und RET/PTC-Status angeglichen. Durch diese Vorgehensweise wurde der Einfluss möglicher Störfaktoren auf die Versuchsergebnisse minimiert. Bereits veröffentlichte Studien, die eine strahlenspezifische Genexpressionssignatur in kindlichen strahlenassoziierten PTC nachwiesen, sollten daher mit Vorsicht betrachtet werden, da die kindlichen strahlenassoziierten PTC mit sporadischen PTC von Erwachsenen verglichen wurden (Detours et al., 2007; Port et al., 2007; Stein et al., 2010; Maenhaut et al., 2011).

Eine Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 erfolgte auf DNA-Ebene mittels Oligo Array-CGH-Analysen und FISH-Experimenten.

Der strahlenassoziierte DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 konnte mittels Oligo Array-CGH bestätigt und in einer deutlich höheren molekularen Auflösung charakterisiert werden. Die verwendeten 180k Oligonukleotid-Arrays (Agilent Technologies) mit ca. 180.000 hochspezifischen 60mer-Oligonukleotiden ermöglichen eine theoretische Auflösung von durchschnittlich 13 kb, wohingegen die 1 Mb BAC-Arrays das

humane Genom im Durchschnitt lediglich in Abständen von 1000 kb abdecken. Der ermittelte strahlenassoziierte DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 wurde in allen mittels Oligo Array-CGH untersuchten Fällen in höherer Auflösung bestätigt (siehe Abb. 28). Die Basenpaarpositionen der Bruchpunkte, welche den veränderten chromosomalen Bereich flankieren, zeigten zwischen den untersuchten Fällen leichte Variationen auf, wobei der Konsensusbereich des DNA-Zugewinns mit der hochauflösenden Oligo Array-CGH (Chromosom 7:73096427-76001049 bp; 2,9 Mb) um ca. 1,4 Mb kleiner war als der Konsensusbereich, der mit der BAC Array-CGH-Analyse gefunden wurde. Dies kann auf die geringere Auflösung der 1 Mb BAC-Arrays zurückgeführt werden, durch die es beim Nachweis von Kopienzahlveränderungen zu einem Unsicherheitsintervall von 1 Mb kommt. In dem veränderten chromosomalen Konsensusbereich konnten fünf tumorassoziierte Kandidatengene identifiziert werden (CLIP2, CLDN3, CLDN4, RFC2 und LIMK1), welche anhand ihrer bereits in der Literatur beschriebenen funktionellen Rolle im Zusammenhang mit Karzinomen und Strahlenexposition ausgewählt wurden.

Um weitere Aussagen über den funktionellen Zusammenhang der im strahlenassoziierten Veränderungsbereich auf Chromosom 7q11.22-11.23 lokalisierten Gene treffen zu können, wurde eine *Gene Ontology (GO) Enrichment* Analyse mit dem Online-Analyse-Tool DAVID durchgeführt (Huang da et al., 2009). Die Analyse ergab die drei signifikant überrepräsentierten *GO-Terms* „DNA repair“ ( $p = 0,047$ ), „response to DNA damage stimulus“ ( $p = 0,034$ ) und „cell-cell adhesion“ ( $p = 0,041$ ). Die Ergebnisse lassen eine Fehlsteuerung von DNA-Reparaturprozessen vermuten, was in der Folge zur Entstehung chromosomaler Aberrationen und chromosomaler Instabilität führen kann. Chromosomale Aberrationen und chromosomale Instabilität stellen typische Merkmale von Zellen nach Exposition durch ionisierende Strahlung dar und können nachfolgend einen Beitrag zu der Tumorentwicklung leisten (Huang et al., 2003; Mahaney et al., 2009). Der *GO-Term* „response to DNA damage stimulus“ bezieht alle Gene ein, denen eine Rolle in der DNA-Schadensantwort zugeschrieben wird. Daher spiegeln die im strahlenassoziierten Bereich auf Chromosom 7q11.22-11.23 lokalisierten und mit dem *GO-Term* „response to DNA damage stimulus“ assoziierten Gene BAZ1B, PMS2L3, PMS2L5 und RFC2 möglicherweise die DNA-Schadensantwort auf die ionisierende Strahlung des Tschernobyl-Fallouts wieder, der die Patienten ausgesetzt waren. Das

Kandidatengen RFC2 (*Replication factor C 2*) ist beispielsweise Teil eines Proteinkomplexes, der für die DNA-Replikation und -Reparatur benötigt wird (Tomida et al., 2008). Amplifikationen von RFC2 wurden bereits in Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen nachgewiesen (Suzuki et al., 2004; Lassmann et al., 2007). Einer abnormen Zell-Zell-Adhäsion wird eine große Rolle in der Invasion und Metastasierung maligner Tumore zugeschrieben (Moh und Shen, 2009). Die Kandidatengene CLDN3 und CLDN4 der Claudin-Familie sind auf Chromosom 7q11.22-11.23 lokalisiert und mit dem GO-Term „*cell-cell adhesion*“ assoziiert. Eine Überexpression der zwei integralen Membranproteine des *Tight Junction* Komplexes wurde bereits in verschiedenen humanen Tumoren wie Kolorektalkarzinomen, Ovarialkarzinomen, Karzinosarkomen des Uterus und bei Brustkrebs beobachtet (Rangel et al., 2003; Kominsky et al., 2004; de Oliveira et al., 2005; Santin et al., 2007; Mees et al., 2009).

Die FISH-Validierung des strahlenassoziierten DNA-Zugewinns auf Chromosom 7q11.22-11.23 auf Einzelzell-Ebene erfolgte mit zwei genspezifischen BAC-Klonen für die Kandidatengene RFC2 und CLIP2, die in der Mitte des veränderten chromosomalen Bereichs 7q11.22-11.23 lokalisiert sind. Der DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 konnte in allen untersuchten exponierten PTC-Fällen, bei denen der DNA-Zugewinn bereits in den Array-CGH-Analysen nachgewiesen wurde, bestätigt werden. Dabei lag die Häufigkeit aberranter Zellen mit amplifizierten FISH-Signalen bei 12-24 % pro Tumorgewebe, wobei Zellen mit veränderter Kopienzahl mehrheitlich 3-4 FISH-Signale pro Zelle aufwiesen. Die beobachtete intratumorale Heterogenität wurde bereits diskutiert. Exponierte und nicht exponierte PTC-Fälle, die in der Array-CGH-Analyse eine normale Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 aufwiesen, zeigten dagegen auch in den FISH-Analysen eine normale Kopienzahl des chromosomalen Bereichs.

Um zu überprüfen, ob der strahlenassoziierte DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 auch zu einer erhöhten mRNA-Expression von Kandidatengenen führt, wurden qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Die mRNA-Expression der drei Gene PMS2L3, PMS2L11 und STAG3L3 war in exponierten PTC-Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 im Vergleich zu exponierten PTC-Fällen mit normaler Kopienzahl signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ; siehe Abb. 34). Dieses Resultat deutet auf einen starken Einfluss des DNA-Zugewinns von 7q11.22-11.23 auf die mRNA-Expression der unter-

suchten Gene hin. Darüber hinaus konnte für die Kandidatengene CLDN4, LIMK1 und PMS2L2 eine mindestens 1,5-fach erhöhte mRNA-Expression in Tumoren mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 im Vergleich zu Tumoren mit normaler Kopienzahl desselben Bereichs gezeigt werden. Diese Ergebnisse waren zwar nicht statistisch signifikant, allerdings kann dennoch eine biologische Relevanz dieser drei Gene aufgrund der Expressionserhöhung angenommen werden. Die Beobachtung, dass keine absolute Korrelation zwischen Kopienzahlveränderung auf DNA-Ebene und der Expression von Genen auf mRNA-Ebene vorliegt, wurde bereits in der Literatur beschrieben. Es ist bekannt, dass die mRNA-Expression auch von anderen Faktoren abhängt und nicht mehr als ein Drittel der in einem veränderten chromosomalen Bereich lokalisierten Gene von einer Expressionsänderung betroffen sind (Järvinen et al., 2008; Santarius et al., 2010).

PMS2L2, PMS2L3 und PMS2L11 gehören zur Familie der PMS2-verwandten Gene. PMS2 (*Postmeiotic segregation increased 2*) kodiert für ein Protein, das mit MLH1 als Heterodimer an der DNA-Mismatch-Reparatur beteiligt ist. Heterozygote Keimbahnmutationen von DNA-Mismatch-Reparaturgenen einschließlich PMS2 sind mit dem Auftreten des hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinoms (HNPCC) assoziiert (Li und Modrich, 1995; Lynch und de la Chapelle, 1999). Da PMS2-verwandte Gene eine große Ähnlichkeit mit dem PMS2-Gen aufweisen und mehrere hochkonservierte Proteindomänen gemeinsam haben, wird eine funktionelle Rolle der Gene im DNA-Mismatch-Reparatursystem vermutet (Nicolaidis et al., 1995; Osborne et al., 1997; Kondo et al., 1999). Es ist bekannt, dass DNA-Mismatch-Reparaturproteine zu verschiedenen Typen von DNA-Schäden einschließlich DNA-Doppelstrangbrüchen rekrutiert werden (Hong et al., 2008). Eine veränderte Expression der PMS2L-Gene könnte daher zu einer Störung oder Effizienzminderung von DNA-Reparaturprozessen führen und damit einen Einfluss auf die Entartung von epithelialen Schilddrüsenzellen nehmen.

Das Gen STAG3L3 (*Stromal antigen 3-like 3*) kodiert für ein Protein mit bisher unbekannter Funktion. Es ist bekannt, dass STAG3 als Element des synaptonemalen Komplexes bei der Kohäsion von Schwesterchromatiden agiert (Pezzi et al., 2000; Prieto et al., 2001). Barber et al. (2008) gehen davon aus, dass Defekte bei der Schwesterchromatid-Kohäsion in Folge von Mutationen in Genen wie z.B. STAG3 die Hauptursache

für chromosomale Instabilität in kolorektalen Karzinomen darstellen (Barber et al., 2008). Wenn man vermutet, dass STAG3L3 eine ähnliche Funktion wie STAG3 aufweist, dann ist es naheliegend, eine funktionelle Verbindung zur Karzinogenese anzunehmen. Den Genen LIMK1 und CLDN4, für die ebenfalls eine erhöhte mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, wird eine Rolle bei der Invasion und Metastasierung maligner Tumore zugeschrieben (Davila et al., 2003; Yoshioka et al., 2003; Moh und Shen, 2009). LIMK1 (*LIM domain kinase 1*) ist in der Regulation der Aktin-Dynamik involviert und während der Mitose maßgeblich an einer akkuraten Ausrichtung der Spindelfasern beteiligt (Kaji et al., 2008).

Das integrale Membranprotein CLDN4 (*Claudin 4*) wurde bereits im Zusammenhang mit dem GO-Term „*cell-cell adhesion*“ ausführlich diskutiert. Um die Expression von CLDN4 auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurden immunhistochemische Analysen an Schilddrüsengewebe durchgeführt. Dabei wurde die CLDN4-Proteinexpression an exponierten PTC-Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 (nachgewiesen mittels Array-CGH und verifiziert durch FISH) sowie exponierten Fällen mit normaler Kopienzahl auf Chromosom 7q11.22-11.23 untersucht. Insgesamt war die Proteinexpression von CLDN4 in exponierten PTC-Fällen mit DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 im Vergleich zu exponierten PTC-Fällen mit normaler Kopienzahl desselben Bereichs deutlich stärker (siehe Abb. 41). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Kopienzahlveränderung auf Chromosom 7q11.22-11.23 sich bis zur Proteinebene auf die Expression der im chromosomalen Bereich lokalisierten Gene auswirkt.

Die mRNA-Expression von Kandidatengenen auf Chromosom 7q11.22-11.23 wurde auch hinsichtlich einer Korrelation mit dem Expositionsstatus der Patienten überprüft. Hierfür wurden exponierte und nicht exponierte PTC-Fälle mittels qRT-PCR untersucht. Das Kandidatengen CLIP2 wies in exponierten Fällen eine signifikant höhere (1,9-fach erhöht;  $p = 0,019$ ) mRNA-Expression im Vergleich zu nicht exponierten Fällen auf (siehe Abb. 35). Um zu überprüfen, ob auch auf Proteinebene eine differentielle Expression von CLIP2 vorliegt, wurden exponierte und nicht exponierte PTC-Fälle mittels IHC untersucht. Dabei ließen sich exponierte PTC-Fälle bereits optisch anhand einer stärkeren CLIP2-Proteinexpression von nicht exponierten Fällen unterscheiden (siehe Abb. 39). In einem nächsten Schritt wurde die Marker-Färbeintensität mit Hilfe der Definiens-Software auch relativ quantifiziert. Auch dabei zeigte die Gruppe der exponierten

Fälle eine signifikant erhöhte Proteinexpression von CLIP2 ( $p = 0,0156$ ; siehe Abb. 38) im Vergleich zur Gruppe der nicht exponierten Fälle, was eine Differenzierung zwischen exponierten und nicht exponierten PTC-Fällen erlaubte. Überraschenderweise wirkte sich demnach eine Veränderung des Gens CLIP2 vom Genom über das Transkriptom bis zum Proteom aus. Zur weiteren Validierung dieses Befundes wurde die Proteinexpression von CLIP2 an einem Gewebe-Array mit kindlichen PTC aus Weißrussland immunhistochemisch untersucht. Es handelte sich dabei ausschließlich um durch den Radioiod-Fallout von Tschernobyl exponierte Patienten. Auch in diesem zweiten PTC-Kollektiv konnte eine starke bis sehr starke Proteinexpression von CLIP2 nachgewiesen werden (siehe Abb. 40). Wenn sich diese Befunde in weiteren Tumorkollektiven bestätigen lassen, stellt CLIP2 einen genetischen Marker für die Überprüfung des Expositionstatus von PTC dar. Eine weitere interessante Fragestellung wäre darüber hinaus, ob dieser Marker auch in anderen strahlenassoziierten Tumortypen zu beobachten ist. Diese sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene gezeigte signifikante Überexpression von CLIP2 in strahlenassoziierten PTC, deutet darüber hinaus auf eine bisher unbekannt funktionelle Rolle des Gens CLIP2 in der Strahlenkarzinogenese papillärer Schilddrüsenkarzinome hin. Eine Analyse der Koexpression anderer Proteine mit CLIP2 könnte die Funktion von CLIP2 weiter aufklären.

CLIP2 (*CAP-GLY domain containing linker protein 2*) kodiert für ein cytoplasmatisches *Linker*-Protein, das Zellorganellen mit Mikrotubuli verknüpft. Amplifikationen von CLIP2 wurden auch bereits in Glioblastomen und kolorektalen Karzinomen nachgewiesen (Suzuki et al., 2004; Lassmann et al., 2007). Deletionen von CLIP2 (CLIP-115) sind dahingegen mit dem Williams-Beuren-Syndrom (WBS) assoziiert. Bei den meisten WBS-Patienten lässt sich eine 1,6 Mb große hemizygote Deletion im chromosomalen Bereich 7q11.23 nachweisen, durch die es zum Verlust mehrerer benachbarter Gene des Chromosomenabschnitts kommt (Hoogenraad et al., 1998; Hoogenraad et al., 2004; Meyer-Lindenberg et al., 2005a; Meyer-Lindenberg et al., 2005b; Ferrero et al., 2010). In CLIP2-*knockout*-Mäusen wird auch eine für WBS-Patienten typische Wachstumsdefizienz beobachtet (Hoogenraad et al., 2002).

CLIP2 bindet an die Plus-Enden wachsender Mikrotubuli und ist auf diese Weise an der Regulation des Cytoskeletts beteiligt (Hoogenraad et al., 2000; Akhmanova et al., 2001). Mikrotubuli sind für eine Vielzahl zellulärer Funktionen von Bedeutung. Dazu

gehören Bewegungsvorgänge in der Zelle, intrazellulärer Transport und die Zellteilung. Während der Mitose bilden Mikrotubuli den Spindelapparat, über welchen die Schwesterchromatiden zu den gegenüberliegenden Spindelpolen der Zelle gezogen werden.

CLIP2 und CLIP1 (CLIP-170) weisen große strukturelle Ähnlichkeiten auf und haben mehrere konservierte Proteindomänen gemeinsam. Beide Proteine besitzen je zwei CAP-GLY-Domänen (*cytoskeleton-associated protein-glycine-rich*) sowie eine SMC-Domäne (*structural maintenance of chromosomes*), die in Zusammenhang mit Chromosomensegregation und Zellteilung steht (Marchler-Bauer et al., 2009). CLIP2 fehlt jedoch das C-terminale Metall-Binde-Motiv, mit dem CLIP1 direkt mit dem Dynein-Dynactin-Komplex interagiert (Lansbergen et al., 2004). Dynein bildet zusammen mit Dynactin einen Proteinkomplex, der an den Kinetochoren, mitotischen Spindeln und Centrosomen lokalisiert ist (Pfarr et al., 1990; Steuer et al., 1990; Gill et al., 1991) und von entscheidender Wichtigkeit für die Ausbildung der Mitosespindel und die Stabilität des Spindelpols während der Mitose ist (Compton, 1998, 2000; Heald, 2000). Dynein-Motorproteine sind mit den Mikrotubuli assoziiert und für den Transport zellulärer Komponenten entlang der Mikrotubuli zuständig. Neben seiner Rolle als Motorprotein ist das cytoplasmatische Dynein auch an der Mitose beteiligt (Karki und Holzbaur, 1999). Dynactin spielt eine Schlüsselrolle in der Chromosomenausrichtung während der Mitose; dabei interagiert Dynactin nicht nur mit Dynein, sondern fungiert u.a. auch als Bindungspartner für Mikrotubuli-bindenden Proteine wie CLIP1 (Dujardin et al., 1998; Lansbergen et al., 2004). CLIP1 wird eine wichtige Rolle während der Mitose zugeschrieben, wo es unter Beteiligung des Dynein-Dynactin-Komplexes eine Anknüpfung der Mikrotubuli an die Kinetochore bewirkt (Wieland et al., 2004; Tanenbaum et al., 2006). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass CLIP1 essentiell für den G2/M-Übergang ist. Mutationen im CLIP1-Gen führen vor Eintritt in die Mitose zu einem Zellzyklus-Arrest. Des Weiteren bewirkt eine Verminderung von CLIP1 die Ausbildung multipler Centrosomen aufgrund fehlgeschlagener Centrosomenseparation in der späten G2-Phase (Yang et al., 2009). Da in *yeast-two-hybrid*-Experimenten eine Interaktion von CLIP2 mit BICD2 (Bicaudal D) gezeigt werden konnte (Hoogenraad et al., 2001) und BICD2 wiederum mit Dynein interagiert, wird eine indirekte Verbindung von CLIP2 mit dem Dynein-Dynactin-Komplex vermutet (Hoogenraad et al., 2001; Hoogenraad et al., 2003;

Fumoto et al., 2006). BICD2 wird eine G2-spezifische Rolle bei der relativen Positionierung von Nukleus und Centrosomen für die nachfolgende Mitose zugeschrieben (Splinter et al., 2010).

Durch Ausbildung einer bipolaren Mitosespindel sorgen die Centrosomen für eine gleichmäßige Verteilung des chromosomalen Materials auf die beiden entstehenden Tochterzellen. Eine akkurate Chromosomensegregation während der Mitose ist die Voraussetzung für chromosomale Stabilität und Aufrechterhaltung der genetischen Information. Centrosomen-Aberrationen wie die Formation multipler Centrosomen können zur Ausbildung multipolarer Spindeln und nachfolgend zu chromosomaler Fehlverteilung und genetischer Instabilität führen (Nigg, 2002). Aberrante Zellen mit aneuploidem oder polyploidem Erbgut können zur Entstehung und Progression maligner Tumore beitragen (Merlo et al., 2010). Centrosomen-Aberrationen wurden bereits bei verschiedensten Krebsformen einschließlich Gehirntumoren, Brustkrebs, Kopf-Hals-Tumoren, Lungenkrebs, Pankreaskarzinomen und Cervixkarzinomen nachgewiesen (Nigg, 2002). Die funktionelle Rolle von CLIP2 bei der Chromosomensegregation könnte daher eine Verbindung zur Karzinogenese darstellen. So könnte eine aberrante Expression des CLIP2-Gens, wie sie in vorliegender Arbeit bei strahlenassoziierten PTC beobachtet wurde, zu chromosomaler Instabilität und Chromosomen-Fehlsegregation führen, welche als typische Merkmale von Tumorzellen bekannt sind (Ricke et al., 2008). In der Literatur existieren verschiedene Modelle der strahleninduzierten Karzinogenese (Little et al., 2008). Eines geht davon aus, dass Strahlung indirekt zur Destabilisierung des Genoms und zu einer Erhöhung der sonst sehr niedrigen Mutationsrate ( $10^{-7}$ /Gen/Zellgeneration) führt (Loeb, 1991, 2001; Morgan, 2003a, b; Strachan und Read, 2005). Demnach könnte eine Veränderung des Gens CLIP2 zur Destabilisierung des Genoms führen, was in dem Modell von Nowak et al. (2002) als initiales Ereignis der Karzinogenese angenommen wird (Nowak et al., 2002). Instabilität auf genomischer Ebene kann durch die Akkumulation von Mutationen zu uneingeschränktem Zellwachstum und damit potentiell zu einer malignen Zellentartung führen. Die genaue funktionelle Rolle von CLIP2 in strahlenassoziierten PTC muss in weiteren zukünftigen Studien untersucht und aufgeklärt werden.



---

ETABLIERUNG VON SCHILDDRÜSEN-ZELLKULTURMODELLEN FÜR FUNKTIONELLE STUDIEN

In den Array-CGH-Analysen von 80 PTC konnte ein strahlenassoziierter DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 nachgewiesen werden. Des Weiteren konnte auf mRNA- und Proteinebene für das in dem veränderten chromosomalen Bereich lokalisierte Kandidatengen CLIP2 eine signifikant höhere Expression in exponierten Fällen im Vergleich zu nicht exponierten Fällen gezeigt werden. Um die phänotypischen Auswirkungen einer gezielten Überexpression des Gens CLIP2 untersuchen zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit auch Schilddrüsen-Zellkulturmodelle für funktionelle Studien etabliert werden.

Da normale humane Zellen *in vitro* nur eine begrenzte Anzahl an Zellteilungen durchführen, bevor die Zellalterung einsetzt und der programmierte Zelltod eingeleitet wird (Hayflick und Moorhead, 1961; Hayflick, 1965), wurden normale humane epitheliale Schilddrüsen-Primärkulturen, welche bereits in vorangegangenen Arbeiten aus operativ entfernten Schilddrüsengeweben angelegt wurden, immortalisiert. Hierzu wurden die Zellen mit dem Gen hTERT (humane Telomerase reverse Transkriptase), das für die katalytische Untereinheit der Telomerase kodiert, transduziert. Da bereits gezeigt wurde, dass eine zusätzliche Transduktion mit CDK4 erfolgreich zur Immortalisierung von Primärkulturen führt (Ramirez et al., 2004; Weaver et al., 2011), wurden auch Transduktions-Experimente mit CDK4 durchgeführt. Die Überexpression von CDK4 verhindert den vom CDK4-Inhibitor p16<sup>INK4a</sup>-vermittelten Wachstumsarrest der Zellen in der G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus (Ramirez et al., 2003). Im Zuge der Immortalisierung von 13 Schilddrüsen-Primärzelllinien mit den Genen CDK4 und hTERT wurde die Zelllinie S22N erfolgreich mit hTERT immortalisiert. Die epitheliale Herkunft der Zelllinie S22N hTERT konnte durch den positiven Nachweis der Cytokeratin-Expression mittels immunhistochemischer Färbung bestätigt werden (Karantza, 2011). Allerdings erwies sich die weitere Kultivierung der Zelllinie S22N hTERT aufgrund der sehr langsamen Zellteilung als sehr schwierig. Daher konnte die Zelllinie S22N hTERT bisher noch nicht für weitere Experimente eingesetzt werden. Die Untersuchung der Ursprungszelllinie S22N mittels Array-CGH ergab 20 chromosomale Veränderungen in Form von DNA-Verlusten (Chr 1, 3p, 7, 9p, 11p, 12q, 16, 17, 19p, 20q und 22q). Das Auftreten chromosomaler Aberrationen war nicht zu erwarten, da es sich um epitheliale Zellen aus Normalgewebe der

Schilddrüse handelt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der zytogenetischen Charakterisierung von Zelllinien und deutet darauf hin, dass entweder während der Kultivierung chromosomale Veränderungen entstanden sind oder das zugrunde liegende Schilddrüsen-Normalgewebe mit Tumorzellen kontaminiert war. Da keine weiteren Normalgewebe für die Immortalisierung zur Verfügung standen, wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Zelllinie TPC-1 auf ihre Eignung als Zellkulturmodell zur Überexpression von Kandidatengen untersucht.

Die aus dem papillären Schilddrüsenkarzinom einer weiblichen Patientin etablierte Zelllinie TPC-1 (Tanaka et al., 1987; Ishizaka et al., 1989; Jhiang et al., 1992) wurde mittels Array-CGH-, SKY- und Cytokeratin-Expressions-Analysen charakterisiert. Dabei wies die Zelllinie in der Array-CGH-Analyse eine große Anzahl (insgesamt 71) chromosomaler Kopienzahlveränderungen auf, wobei alle Chromosomen außer Chromosomen 18 und 21 betroffen waren. Eine SKY-Analyse der Zelllinie TPC-1 ergab vielfältige chromosomale Rearrangierungen, welche sehr gut mit dem Array-CGH-Profil zusammenpassten. Die Ergebnisse der Array-CGH- und SKY-Analysen zeigten große Übereinstimmungen mit den bereits in der Literatur beschriebenen Aberrationen der Zelllinie TPC-1 (van Staveren et al., 2007; Ribeiro et al., 2008; Hieber et al., 2011) was darauf hindeutet, dass es sich bei TPC-1 um eine relativ stabile Zelllinie handelt. Da diese Zelllinie im chromosomalen Bereich 7q11.22-11.23 nicht verändert ist, würde sie sich für funktionelle Untersuchungen einer CLIP2-Überexpression eignen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Grundlagen für die Etablierung von Schilddrüsen-Zellkulturmodellen gelegt, die in zukünftigen Arbeiten fortgeführt werden müssen. In weiteren Experimenten müssen die Zelllinien mit dem in vorliegender Arbeit generierten Vektor pForGene-CLIP2 transfiziert werden.

#### FAZIT

In der vorliegenden Arbeit konnte ein zytogenetischer Strahlenmarker in einem angeglichenen Tumorkollektiv papillärer Schilddrüsenkarzinome von exponierten und nicht exponierten jungen Patienten nachgewiesen werden. Da nur eine Subgruppe der exponierten Fälle den DNA-Zugewinn auf Chromosom 7q11.22-11.23 aufweist, ist die Existenz verschiedener molekularer Subgruppen und verschiedener Wege der strahleninduzierten Karzinogenese wahrscheinlich. Zusätzliche Validierungsexperimente in

einer weiteren unabhängigen Tumorkohorte mit individuellen Dosisabschätzungen sind nötig, um die Prävalenz des potentiellen Strahlenmarkers 7q11.22-11.23 in Abhängigkeit von der Dosis zu überprüfen. Der strahlenassoziierte DNA-Zugewinn des chromosomalen Bereichs 7q11.22-11.23 beinhaltet neue Kandidatengene, die bisher noch nicht im Zusammenhang mit PTC beschrieben wurden. Durch Integration mit mRNA- und Proteindaten konnte CLIP2 als besonders wichtiges Kandidatengen identifiziert werden, da es sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine signifikant höhere Expression in exponierten PTC-Fällen im Vergleich zu nicht exponierten Fällen zeigte. Dies deutet auf eine wichtige funktionelle Rolle von CLIP2 in der strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinogenese hin, die in weiteren zukünftigen Studien funktionell aufgeklärt werden muss.

## E ZUSAMMENFASSUNG

25 Jahre nach der Tschernobyl-Reaktorkatastrophe wurden insgesamt über 6.000 strahlenassoziierte Schilddrüsentumore bei jungen Patienten in Weißrussland, Russland und der Ukraine diagnostiziert. Über 95 % der aufgetretenen Tumore waren papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC). Komponenten des MAP-Kinase-Signalwegs sind in diesen Tumoren häufig verändert. Allerdings hat sich in vielen Studien gezeigt, dass die am häufigsten zu beobachtenden RET-Umlagerungen und BRAF-Mutationen nicht als strahlenassoziierte Veränderungen betrachtet werden können, da sie auch in sporadischen Tumoren auftreten. Somit sind die molekularen Mechanismen der strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinogenese weitgehend ungeklärt. Daher war es ein übergeordnetes Ziel dieser Arbeit, strahlenspezifische Genveränderungen in PTC nachzuweisen, um die Mechanismen der Strahlenkarzinogenese papillärer Schilddrüsenkarzinome aufklären zu können. Hierbei wurde ein integrativer Ansatz gewählt, bei dem die Zusammenhänge zwischen genomischen Kopienzahlveränderungen und Genexpressionsdaten auf mRNA- und Proteinebene sowie Patientendaten ermittelt wurden. Darüber hinaus sollten Schilddrüsen-Zellkulturmodelle für zukünftige funktionelle Studien etabliert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein Tumorkollektiv von strahlenexponierten und nicht exponierten Patienten mittels Array-CGH auf genomische Kopienzahlveränderungen hin untersucht. Die 80 PTC junger Patienten stammten von der Chernobyl Tissue Bank (CTB) und waren hinsichtlich des Geschlechts, der Herkunft und des Alters der Patienten angeglichen.

Die im Untersuchungskollektiv (n = 52) nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen stimmen gut mit bereits publizierten Daten über chromosomale Aberrationen bei PTC überein und legen den Schluss nahe, dass DNA-Zugewinne der chromosomalen Bereiche 1p36, 1p34, 9q33.3-34.3, 12q24, 16p13.3, 16q23.3-24.3, 17q21, 19p13, 19q13, 20q13.33, 21q22 und 22q13 sowie DNA-Verluste auf Chromosom 13q wiederkehrende Veränderungen in PTC darstellen. Eine hierarchische Clusteranalyse der nachgewiesenen Kopienzahlveränderungen ergab eine deutliche Auftrennung der PTC-Fälle in zwei Hauptcluster, die interessanterweise mit dem RET/PTC-Status, der Tumorgröße und

der Lymphknotenmetastasierung korrelierten. Die Korrelation spezifischer Aberrationsmuster mit dem RET/PTC-Status deutet auf unterschiedliche Wege der Tumorentwicklung bei RET/PTC-positiven und RET/PTC-negativen PTC hin. Bei der Korrelationsanalyse einzelner Kopienzahlveränderungen mit klinischen Daten und Tumorphänotypen ergaben sich interessante Befunde, u.a. auch acht mit der Tumorgröße (T1, T2, T3) korrelierende chromosomale Veränderungen. Allerdings ist das bedeutendste Ergebnis vorliegender Arbeit der Nachweis einer strahlenspezifischen Kopienzahlveränderung auf Chromosom 7. Der DNA-Zugewinn auf 7p14.1-q11.23 korrelierte mit der Strahlenexposition der Patienten und trat dabei ausschließlich bei Patienten auf, die dem Radioiod-Fallout von Tschernobyl ausgesetzt waren (39 % der Fälle). Die Assoziation des DNA-Zugewinns auf Chromosom 7 mit der Strahlenexposition der Patienten konnte im Validierungskollektiv (n = 28) bestätigt werden und darüber hinaus auf den chromosomalen Bereich 7q11.22-11.23 eingegrenzt werden. Dabei trat der DNA-Zugewinn erneut ausschließlich in exponierten PTC-Fällen und mit ähnlicher Häufigkeit wie im Untersuchungskollektiv auf. Dieser Befund deutet darauf hin, dass sich die Gruppe der exponierten PTC-Fälle aus mehreren unterschiedlichen molekularen Subgruppen zusammensetzt und vermutlich mehrere Wege der strahleninduzierten Karzinogenese existieren. Dabei ist auch eine Dosisabhängigkeit der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen wahrscheinlich. Der strahlenassoziierte DNA-Zugewinn wurde mittels Oligo Array-CGH in höherer molekularer Auflösung untersucht und in allen analysierten Fällen bestätigt. Der DNA-Zugewinn auf 7q11.22-11.23 konnte auch in FISH-Analysen auf Einzelzell-Ebene validiert werden. In dem strahlenspezifischen chromosomalen Bereich konnten fünf tumorassoziierte Kandidatengene identifiziert werden (CLIP2, CLDN3, CLDN4, RFC2 und LIMK1), die bisher noch nicht im Zusammenhang mit PTC beschrieben wurden. Darüber hinaus ergab eine *Gene Ontology (GO) Enrichment* Analyse der auf 7q11 lokalisierten Gene drei signifikant überrepräsentierte *GO-Terms* „DNA repair“, „response to DNA damage stimulus“ und „cell-cell adhesion“. Die strahlenspezifische Aberration auf genomischer Ebene wurde anschließend mit mRNA- und Proteindaten integriert. Dabei konnte CLIP2 als besonders wichtiges Kandidatengen identifiziert werden, da es sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine signifikant höhere Expression in exponierten PTC-Fällen im Vergleich zu nicht exponierten Fällen zeigte. Dies deutet auf eine wichtige funktionelle Rolle von CLIP2 in der strahlen-

induzierten Schilddrüsenkarzinogenese hin, die in weiteren zukünftigen Studien funktionell aufgeklärt werden muss. Darüber hinaus konnte für sechs weitere auf Chromosom 7q11.22-11.23 lokalisierte Kandidatengene (CLDN4, LIMK1, PMS2L2, PMS2L3, PMS2L11 und STAG3L3) gezeigt werden, dass der DNA-Zugewinn 7q11 zu einer erhöhten mRNA-Expression in den Tumoren führt. Diese Befunde liefern erste Hinweise auf veränderte Gene und Signalwege bei der strahleninduzierten Karzinogenese. Weitere Validierungsexperimente in unabhängigen Tumorkohorten mit individuellen Dosisabschätzungen sind nötig, um eine mögliche Dosisabhängigkeit des Strahlenmarkers 7q11.22-11.23 zu überprüfen. Für die Aufklärung der funktionellen Rolle von CLIP2 wurden im Rahmen vorliegender Arbeit Schilddrüsen-Zellkulturmodelle etabliert. Für zukünftige funktionelle Studien müssen diese Zelllinien transfiziert werden, um anschließend die phänotypischen Auswirkungen einer gezielten CLIP2-Überexpression analysieren zu können.

F ANHANG

Anhang 1: Kopienzahlveränderungen in 52 PTC

Fall	DNA-Zugewinne	DNA-Verluste
UA1005	1p36.33-34.1; 1p32.3; 1q32.1; 1q44; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 3q21.1-21.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q23.3-31.3; 5q32-33.1; 5q34-35.3; 6q25.2-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.1; 11q12.1-13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q22.2-26.3; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q13.33; 3q22.1-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q31.3-32; 5q33.1-34; 6p21.1-q25.2; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA1030	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-q21.1; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;
UA1053	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6p25.3-21.1; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-14.2; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-32.3; 1p32.3-13.3; 1q32.1-43; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p14.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3; 21q11.2-22.12;
UA1091	1p36.33-34.1; 1q32.1; 1q41-44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q23.3-31.3; 5q34-35.3; 6q25.2-27; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.1; 11q12.1-13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.1-41; 3p26.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q33.1-34; 6p21.1-q25.2; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 20p12.3-12.1; 21q11.2-21.3;
UA162	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-21.1; 3q21.1-21.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.2; 3p14.3-q13.33; 3q22.1-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p15.4-15.2; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;
UA307	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-q21.1; 1q23.3-32.1; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 6p21.1-q25.3; 11p14.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 13q12.13-33.3; 17q22; 21q11.2-22.12;
UA312	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6p25.3-21.1; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p15.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q12.13-33.3; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;

Fall	DNA-Zugewinne	DNA-Verluste
UA368	1p36.33-32.3; 1q32.1-32.3; 2q37.1-37.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5q23.3-31.3; 5q34-35.3; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 11q12.1-13.5; 11q22.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.3-41; 3p26.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q31.3-34; 6p21.1-q25.2; 7q11.23-21.3; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 17q22; 21q11.2-22.12;
UA421	1p36.33-33; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q23.3-31.3; 5q32-33.1; 5q34-35.3; 6q25.2-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.1-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q31.3-32; 5q33.1-34; 6p21.1-q25.2; 7q11.23-21.3; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA465	1p36.33-34.1; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5q32-33.1; 5q34-35.3; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 11q12.1-13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 1q32.3-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q31.3-32; 5q33.1-34; 6p21.1-q25.2; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA496	3p25.3-25.1; 4p16.3-16.1; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 11p11.2; 11q12.1-13.5; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.3-41; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q29; 4p16.1-q34.3; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11p11.12-q12.1; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 17q22; 20p12.3-12.1;
UA574	1p36.33-34.1; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 11p11.2; 11q12.1-13.5; 11q22.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.3-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 6p21.1-q25.3; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11p11.12-q12.1; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 17q22; 21q11.2-22.12;
UA615	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q21.3-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q12.13-33.3; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;
UA691	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 3q21.1-21.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-14.2; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-32.3; 1p32.3-q21.1; 1q23.3-32.1; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 3q22.1-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p14.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA692	1p36.33-34.1; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-21.1; 3q21.1-21.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q23.3-31.3; 5q32-33.1; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q31.3-32; 5q33.1-34; 6p21.1-q25.3; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q12.13-33.3; 20p12.3-12.1; 21q21.2-22.12;



Fall	DNA-Zugewinne	DNA-Verluste
UA710	1p36.33-33; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q23.3-31.3; 5q32-33.1; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q31.3-32; 5q33.1-34; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA796	1p36.33-34.1; 1p32.3; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 13q12.11-12.3; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q25.3; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q34; 6p21.1-q25.3; 11p14.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA939	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p15.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3; 21q11.2-22.12;
UA991	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q32-33.1; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-14.2; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-32.3; 1p32.3-13.3; 1q32.1-43; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q32; 5q33.1-35.2; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p14.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3;
UA103	1p36.33-32.3; 2q37.1-37.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q34-35.3; 6q25.2-27; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16p13.3; 16q21-24.3; 17p13.3-q25.3; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q34; 6p21.1-q25.2; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 21q21.2-21.3;
UA135	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q23.3-31.3; 5q32-33.1; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-32.3; 1p32.3-13.3; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 4p16.1-q34.3; 5q31.3-32; 5q33.1-35.2; 8q12.3-24.23; 11p14.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11;
UA138	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q41-44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 3q21.1-21.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q23.3-31.3; 5q32-33.1; 5q34-35.3; 6q25.2-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 11p15.5-15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-q21.1; 1q23.3-32.1; 1q32.1-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q31.3-32; 5q33.1-34; 6p21.1-q25.2; 7q11.23-21.3; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA139	1p36.33-33; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q25.3; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-q29; 4p16.3-q35.216.1; 5p15.33-q35.3; 6p21.1-q25.2; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;

Fall	DNA-Zugewinne	DNA-Verluste
UA144	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q34; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 20p12.3-12.1;
UA145	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-14.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6p25.3-21.1; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.331; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3-q24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-32.3; 1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 1q32.1-43; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 3p14.2-q13.33; 4p16.1-q34.3; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3; 20p12.3-12.1;
UA147	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5q34-35.3; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11q12.1-13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q22.2-26.3; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q29; 4p16.1-q34.3; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1;
UA165	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q21.3-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p15.4-15.2; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 17q22; 18p11.32-q22.3; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;
UA180	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q34; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p14.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA192	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-14.2; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-q21.1; 1q23.3-32.1; 1q32.1-43; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p14.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3; 21q11.2-22.12;
UA208	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.1; 3p14.2-q13.33; 4p16.1-q34.3; 6p21.1-q25.3; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;
UA242	1p36.33-33; 1q32.1; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 8q24.3; 9q33.3-34.3; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q25.3; 19p13.3-q13.43; 20p13-q13.33; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.1-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q29; 4p16.3-q35.2; 6p21.1-q25.3; 8q12.3-24.12; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 21q21.2-21.3;

Fall	DNA-Zugewinne	DNA-Verluste
UA249	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-21.1; 3q21.1-21.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q23.3-31.3; 5q32-33.1; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.2; 3p14.3-q13.33; 3q22.1-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q23.3; 5q31.3-32; 5q33.1-35.2; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p15.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q12.13-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA286	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q34; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q12.13-33.3; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;
UA343	1p36.33-32.3; 6q25.3-27; 8q24.3; 12p13.33-13.1; 12q24.11-24.33; 16q21-24.3; 17p13.3-q25.3; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-q29; 4p16.3-q35.2; 5p15.33-q35.3; 6p21.1-q25.3; 8p23.2-q24.23; 12p13.1-q13.11; 12q13.11-13.3; 12q14.1-23.3; 13q12.11-34; 16q21; 21q11.2-22.12;
UA363	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16p13.3-q24.3; 17p13.3-q25.3; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q21.3-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-q29; 4p16.3-q35.2; 5p15.33-q34; 6p21.1-q25.3; 8p23.2-q24.23; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;
UA366	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q32-33.1; 5q35.2-35.3; 6p25.3-21.1; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-32.3; 1p32.3-q21.1; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 4p16.1-q34.3; 5q33.1-35.2; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p15.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;
UA400	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 3q21.1-21.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q32-33.1; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q11.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-q21.1; 1q23.3-32.1; 1q32.1-43; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 3q22.1-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q32; 5q33.1-35.2; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 11p14.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA436	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-q21.1; 1q23.3-32.1; 1q32.1-43; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p15.4-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3; 20p12.3-12.1;
UA456	5p15.33-15.2; 6q25.3-27; 10p15.3-15.1; 11q22.3-25; 12p13.33-13.1; 12q24.11-24.33; 13q34; 19p13.3-q13.43; 20p13-q13.33; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.3-41; 3p26.3-q29; 4p16.3-q35.2; 5p15.2-q23.3; 6p21.1-q25.3; 8p23.2-q24.23; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q13.11-13.3; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 21q21.2-21.3;

Fall	DNA-Zugewinne	DNA-Verluste
UA463	1p36.33-34.1; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q44; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11q12.1-13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 15q22.2-26.3; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q21.3-22.12; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q34; 6p21.1-q25.3; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q12.13-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q21.2-21.3;
UA469	1p36.33-34.1; 1q32.1-32.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 4p16.3-16.1; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 9q33.3-34.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2; 11q12.1-13.5; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 6p21.1-q25.2; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11p11.12-q12.1; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-21.3;
UA484	1q32.1; 2q37.1-37.3; 5p15.33-15.2; 5q34-35.3; 6q25.2-27; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 8q24.3; 9q33.3-34.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2; 11q12.1-13.5; 11q22.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.1-41; 3p26.3-q29; 4p16.3-q35.2; 5p15.2-q34; 6p21.1-q25.2; 11p15.1-12; 11p11.12-q12.1; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 21q21.2-21.3;
UA502	1p36.33-34.1; 1q32.1-32.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3q21.1-21.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.1; 11p11.2; 11q12.1-13.5; 11q22.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.3-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q13.33; 3q22.1-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q34; 6p21.1-q25.3; 7q11.23-21.3; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11p11.12-q12.1; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 17q22; 21q21.2-21.3;
UA503	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q32-33.1; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 19p13.3-q13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p33-32.3; 1p32.3-13.3; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 4p16.1-q34.3; 5q33.1-35.2; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 17q22;
UA515	1p36.33-33; 1p32.3; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q32-33.1; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-15.4; 11p15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-q21.1; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 4p16.1-q34.3; 5q33.1-35.2; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 12p13.1-q13.11;
UA580	1p36.33-32.3; 1q32.1-32.3; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 5p15.33-15.2; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 11p11.2; 11q12.1-13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.3-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q29; 4p16.3-q35.2; 5p15.2-q34; 6p21.1-q25.3; 8p23.2-q24.23; 11p15.1-12; 11p11.12-q12.1; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 17q22; 21q11.2-22.12;
UA583	1p36.33-33; 1p32.3; 1q32.1-32.3; 1q41-44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 3q21.1-21.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q23.3-31.3; 5q32-33.1; 5q34-35.3; 6q25.2-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 11p15.5-15.1; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.3-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q13.33; 3q22.1-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q31.3-32; 5q33.1-34; 6p21.1-q25.2; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;

Fall	DNA-Zugewinne	DNA-Verluste
UA597	1p36.33-34.1; 1p32.3; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2; 11q12.1-13.5; 11q22.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 3p26.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q34; 6p21.1-q25.3; 11p15.1-12; 11p11.12-q12.1; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q21.2-22.12;
UA601	1p36.33-32.3; 1p13.3-q23.3; 1q32.1-32.3; 1q41-44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 5q23.3-31.3; 5q32-33.1; 5q34-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8q24.12-24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 11p11.2; 11q12.1-13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-26.3; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 1q32.3-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 5q31.3-32; 5q33.1-34; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 8q12.3-24.12; 11p15.5-12; 11p11.12-q12.1; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA616	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33-15.2; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7p14.1-q11.23; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9q21.33-22.33; 9q33.3-34.3; 10q26.11-26.3; 11p15.5-15.4; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 15q11.2-21.1; 15q22.2-26.3; 16p13.3-q21; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-13.11; 19q12-13.43; 20p13; 20p12.1-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q23.3-32.1; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.3-q13.33; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 6p21.1-q25.3; 7p22.1-14.1; 7q11.23-21.3; 7q22.1-35; 11p15.1-12; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 17q22; 20p12.3-12.1; 21q11.2-22.12;
UA648	1p36.33-33; 1q21.1-23.3; 1q32.1; 1q44; 2p25.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.1-21.1; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 5p15.33; 5q35.2-35.3; 6q25.3-27; 7p22.3-22.1; 7q22.1; 7q36.1-36.3; 8p23.3-23.2; 8q24.3; 9p24.3; 9q33.3-34.3; 10p15.3-15.1; 10q26.13-26.3; 11p15.5-14.2; 11p11.2-q13.5; 11q23.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.23-24.33; 13q12.11-12.12; 13q34; 16p13.3; 16q23.3-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q25.1-25.3; 18q22.3-23; 19p13.3-q13.43; 20p13-q13.33; 22q11.21-13.33;	1p33-q21.1; 1q23.3-32.1; 1q32.1-43; 3p26.3-25.3; 3p25.1-22.1; 3p14.3-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.33-q35.2; 6p21.1-q25.3; 7q22.1-35; 8p23.2-q24.23; 11p14.1-12; 11q14.1-23.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-24.23; 13q12.13-33.3;
UA686	1p36.33-34.1; 1q32.1-32.3; 2q37.1-37.3; 3p25.3-25.1; 3p22.2-14.3; 4p16.3-16.1; 4q35.1-35.2; 7q22.1; 9q33.3-34.3; 11p11.2; 11q12.1-13.5; 11q22.3-25; 12p13.33-13.1; 12q13.11-13.3; 12q24.11-24.33; 13q12.11-12.3; 13q34; 16q21-24.3; 17p13.3-q21.33; 17q22-25.3; 19p13.3-q13.43; 20p13-q13.33; 21q22.13-22.3; 22q11.21-13.33;	1p32.3-13.3; 1q32.3-41; 3p26.3-26.1; 3p25.1-22.2; 3p14.2-q29; 4p16.1-q34.3; 5p15.2-q23.3; 6p21.1-q25.3; 7q11.23-21.3; 8q12.3-24.12; 11p15.1-12; 11p11.12-q12.1; 11q14.1-22.3; 12p13.1-q13.11; 12q14.1-23.3; 13q13.1-33.3; 16q21; 17q22; 21q11.2-22.12;

---

**Anhang 2: Patientendaten von 13 PTC von Kindern aus der Ukraine und Weißrussland**


---

Fall	Geschlecht <sup>1</sup>	Alter bei OP [Jahre]	TNM <sup>2</sup>	Histologischer Subtyp <sup>3</sup>
N144-94A	M	8,6	T4N2M0	FS
131-2/95	M	10,4	T4N2M1	FS
224-5/96	W	15	T4N2M0	FS
38-5/97	W	11,8	T4N2M1	FS
64-4/97	W	15,6	T4N2M1	FS
12-1/97	W	14,9	T4N2M1	FS
S41/93	W	11	T4N1bM0	S
1-3/95	M	13,2	T4N2M1	FS
28-1/95	M	10	T4N1M0	FS
44-1/95	W	14	T4N0M0	FS
122-1/95	M	10,8	T4N1M1	FS
153-1/96	M	10,9	T4N1M1	FS
34-2/95	M	10	T4N0M0	FS

<sup>1</sup>W: weiblich, M: männlich; <sup>2</sup>TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Auflage (Sobin et al., 2002; Wittekind et al., 2002); <sup>3</sup>F: follikulär; S: solid.

**Anhang 3: Sequenzierung des Vektors pForGene CLIP2**

	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	5	15	25	35	45	55
CLIP2 var2 human	ATGCAGAAGC	CCAGCGGCCT	GAAGCCCCC	GGCCGTGGG	GGAAGCACTC	CAGCCCCATG
Sequenzierung	ATGCAGAAGC	CCAGCGGCCT	GAAGCCCCC	GGCCGTGGG	GGAAGCACTC	CAGCCCCATG
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	65	75	85	95	105	115
CLIP2 var2 human	GGCCGGACAT	CTACTGGGTC	AGCTTCATCC	TCGGCGGCG	TGGCCGCTAG	CTCCAAGGAA
Sequenzierung	GGCCGGACAT	CTACTGGGTC	AGCTTCATCC	TCGGCGGCG	TGGCCGCTAG	CTCCAAGGAA
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	125	135	145	155	165	175
CLIP2 var2 human	GGCTCCCCAC	TGCACAAACA	GTCATCTGGA	CCCTCCTCCT	CCCCGGCCGC	AGCTGCTGCC
Sequenzierung	GGCTCCCCAC	TGCACAAACG	GTCATCTGGA	CCCTCCTCCT	CCCCGGCCGC	AGCTGCTGCC
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	185	195	205	215	225	235
CLIP2 var2 human	CCCAGAAAGC	CGGGCCCCAA	GGCGGCGGAA	GTGGGGGATG	ACTTCCTGGG	GGACTTTGTG
Sequenzierung	CCCAGAAAGC	CGGGCCCCAA	GGCGGCGGAA	GTGGGGGATG	ACTTCCTGGG	GGACTTTGTG
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	245	255	265	275	285	295
CLIP2 var2 human	GTGGGCGAGC	GGGTGTGGGT	GAACGGCGTG	AAGCCAGGCG	TGGTGCAGTA	TCTGGGAGAG
Sequenzierung	GTGGGCGAGC	GGGTGTGGGT	GAACGGCGTG	AAGCCAGGCG	TGGTGCAGTA	TCTGGGAGAG
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	305	315	325	335	345	355
CLIP2 var2 human	ACGCAGTTTC	CACCGGGCCA	GTGGGCTGGC	GTGGTGCTGG	ACGACCCGGT	GGCAAGAAT
Sequenzierung	ACGCAGTTTC	CACCGGGCCA	GTGGGCTGGC	GTGGTGCTGG	ACGACCCGGT	GGCAAGAAT
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	365	375	385	395	405	415
CLIP2 var2 human	GATGGCGCGG	TGGGCGGCGT	GCGCTACTTC	GAGTGCCCGG	CCCTCCAGGG	TATCTTCACG
Sequenzierung	GATGGCGCGG	TGGGCGGCGT	GCGCTACTTC	GAGTGCCCGG	CCCTCCAGGG	TATCTTCACG
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	425	435	445	455	465	475
CLIP2 var2 human	CGGCCCTCCA	AGCTGACCCG	GCAGCCCACG	GCCGAGGGCT	CGGGGAGTGA	TGCCCACTCC
Sequenzierung	CGGCCCTCCA	AGCTGACCCG	GCAGCCCACG	GCCGAGGGCT	CGGGGAGTGA	TGCCCACTCC
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	485	495	505	515	525	535
CLIP2 var2 human	GTGGAGTCGC	TGACTGCCCA	GAACCTGTCA	TTGCATTCGG	GCACGGCCAC	GCCCCCGCTG
Sequenzierung	GTGGAGTCGC	TGACTGCCCA	GAACCTGTCA	TTGCATTCGG	GCACGGCCAC	GCCCCCGCTG
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	545	555	565	575	585	595
CLIP2 var2 human	ACCAGCCGCG	TCATCCCCCT	GCGGGAGAGC	GTCCTCAACA	GCTCCGTGAA	GACTGGCAAC
Sequenzierung	ACCAGCCGCG	TCATCCCCCT	GCGGGAGAGC	GTCCTCAACA	GCTCCGTGAA	GACTGGCAAC
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	605	615	625	635	645	655
CLIP2 var2 human	GAGTCGGGAT	CCAACCTCTC	AGACAGCGGC	TCTGTGAAGC	GGGGCGAAAA	GGACCTGCCG
Sequenzierung	GAGTCGGGAT	CCAACCTCTC	AGACAGCGGC	TCTGTGAAGC	GGGGCGAAAA	GGACCTGCCG
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	665	675	685	695	705	715
CLIP2 var2 human	CTGGGGGACC	GCGTGCTGGT	TGGCGGGACG	AAGACTGGCG	TGGTGC GGTA	CGTGGGGGAG
Sequenzierung	CTGGGGGACC	GCGTGCTGGT	TGGCGGGACG	AAGACTGGCG	TGGTGC GGTA	CGTGGGGGAG
	.....	.....	.....	.....	.....	.....
	725	735	745	755	765	775
CLIP2 var2 human	ACAGACTTTG	CCAAGGGCGA	GTGGTGTGGC	GTGGAGCTGG	ACGAGCCCCT	TGGGAAGAAT
Sequenzierung	ACAGACTTTG	CCAAGGGCGA	GTGGTGTGGC	GTGGAGCTGG	ACGAGCCCCT	TGGGAAGAAT

	..... ..... ..... ..... ..... .....
	785 795 805 815 825 835
CLIP2 var2 human	GATGGGGCGG TGGCGGGCAC CAGGTACTTC CAGTGCCAC CCAAGTTTG TCTCTTCGCG
Sequenzierung	GATGGGGCGG TGGCGGGCAC CAGGTACTTC CAGTGCCAC CCAAGTTTG TCTCTTCGCG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	845 855 865 875 885 895
CLIP2 var2 human	CCCATCCACA AAGTGATCCG TATCGGCTTC CCATCTACCA GCCCAGCCAA GGCCAAGAAG
Sequenzierung	CCCATCCACA AAGTGATCCG TATCGGCTTC CCATCTACCA GCCCAGCCAA GGCCAAGAAG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	905 915 925 935 945 955
CLIP2 var2 human	ACCAAGCGTA TGGCCATGGG TGTGTCAGCA CTGACCCACA GTCCCAGCAG TTCCTCCATC
Sequenzierung	ACCAAGCGTA TGGCCATGGG TGTGTCAGCA CTGACCCACA GTCCCAGCAG TTCCTCCATC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	965 975 985 995 1005 1015
CLIP2 var2 human	AGTCCGTCA GCTCTGTGGC CTCCTCCGTG GGGGGTCGGC CCAGCCGAG TGGCTGTCTC
Sequenzierung	AGTCCGTCA GCTCTGTGGC CTCCTCCGTG GGGGGTCGGC CCAGCCGAG TGGCTGTCTC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1025 1035 1045 1055 1065 1075
CLIP2 var2 human	ACGGAGACCT CTTACGCTA CGCCCGCAAG ATCTCGGGCA CCACGGCCTT GCAGGAGGCA
Sequenzierung	ACGGAGACCT CTTACGCTA CGCCCGCAAG ATCTCGGGCA CCACGGCCTT GCAGGAGGCA
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1085 1095 1105 1115 1125 1135
CLIP2 var2 human	CTGAAGGAGA AGCAGCAGCA CATTGAGCAG CTGCTGGCTG AACGAGACCT GGAACGGGCT
Sequenzierung	CTGAAGGAGA AGCAGCAGCA CATTGAGCAG CTGCTGGCTG AACGAGACCT GGAACGGGCT
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1145 1155 1165 1175 1185 1195
CLIP2 var2 human	GAGGTGGCCA AGGCCACAAG CCACATCTGC GAGGTGGAGA AGGAGATTGC CCTGTCTAAG
Sequenzierung	GAGGTGGCCA AGGCCACAAG CCACATCTGC GAGGTGGAGA AGGAGATTGC CCTGTCTAAG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1205 1215 1225 1235 1245 1255
CLIP2 var2 human	GCACAGCATG AGCAGTATGT TGCAGAAGCC GAGGAGAAGC TGCAAGGAGC CCGGCTGTCTC
Sequenzierung	GCACAGCATG AGCAGTATGT TGCAGAAGCC GAGGAGAAGC TGCAAGGAGC CCGGCTGTCTC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1265 1275 1285 1295 1305 1315
CLIP2 var2 human	GTGGAGAGCG TGGCGAAAGA GAAGGTGGAC CTGTCCAACC AGCTGGAGGA GGAGAGGAGG
Sequenzierung	GTGGAGAGCG TGGCGAAAGA GAAGGTGGAC CTGTCCAACC AGCTGGAGGA GGAGAGGAGG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1325 1335 1345 1355 1365 1375
CLIP2 var2 human	AAGGTGGAGG ATCTGCAGTT CCGCGTGGAG GAGGAGTCCA TCACCAAGGG AGACCTGGAG
Sequenzierung	AAGGTGGAGG ATCTGCAGTT CCGCGTGGAG GAGGAGTCCA TCACCAAGGG AGACCTGGAG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1385 1395 1405 1415 1425 1435
CLIP2 var2 human	CTGACCACAG TGGCCGAGAA GTCGCGCGTG CTGCAGCTGG AGGAGGAGCT CACCTGCGC
Sequenzierung	CTGACCACAG TGGCCGAGAA GTCGCGCGTG CTGCAGCTGG AGGAGGAGCT CACCTGCGC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1445 1455 1465 1475 1485 1495
CLIP2 var2 human	CGAGGTGAAA TCGAGGAGCT CCAGCAGTGC CTGTTGCACT CGGGTCCCC ACCTCCGGAC
Sequenzierung	CGAGGTGAAA TCGAGGAGCT CCAGCAGTGC CTGTTGCACT CGGGTCCCC ACCTCCGGAC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1505 1515 1525 1535 1545 1555
CLIP2 var2 human	CACCCAGACG CCGCCGAGAT CCTGCGGCTA CGGGAGCGGC TGCTCTCGGC CAGCAAGGAA
Sequenzierung	CACCCAGACG CCGCCGAGAT CCTGCGGCTA CGGGAGCGGC TGCTCTCGGC CAGCAAGGAA
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1565 1575 1585 1595 1605 1615
CLIP2 var2 human	CACCAGAGGG AGAGTGGGGT GCTGCGGGAT AAATACGAGA AGGCCCTGAA GGCCTACCAG
Sequenzierung	CACCAGAGGG AGAGTGGGGT GCTGCGGGAT AAATACGAGA AGGCCCTGAA GGCCTACCAG



	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1625 1635 1645 1655 1665 1675
CLIP2 var2 human	GCGGAGGTGG ACAAGCTCCG CGCGGCCAAC GAGAAGTACG CACAGGAGGT GGCGGGCCTG
Sequenzierung	GCGGAGGTGG ACAAGCTCCG CGCGGCCAAC GAGAAGTACG CACAGGAGGT GGCGGGCCTG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1685 1695 1705 1715 1725 1735
CLIP2 var2 human	AAGGACAAGG TTCAGCAGGC CACCAGCGAG AACATGGGGC TAATGGACAA CTGGAATCC
Sequenzierung	AAGGACAAGG TTCAGCAGGC CACCAGCGAG AACATGGGGC TAATGGACAA CTGGAATCC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1745 1755 1765 1775 1785 1795
CLIP2 var2 human	AAGCTGGACT CGCTGGCCTC GGACCACCAG AAGTCCCTGG AGGACCTCAA AGCCACCCTG
Sequenzierung	AAGCTGGACT CGCTGGCCTC GGACCACCAG AAGTCCCTGG AGGACCTCAA AGCCACCCTG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1805 1815 1825 1835 1845 1855
CLIP2 var2 human	AACTCGGGCC CAGGCGCCCA GCAGAAGGAG ATCGGCGAGC TGAAGGCAGT GATGGAGGGC
Sequenzierung	AACTCGGGCC CAGGCGCCCA GCAGAAGGAG ATCGGCGAGC TGAAGGCAGT GATGGAGGGC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1865 1875 1885 1895 1905 1915
CLIP2 var2 human	ATCAAGATGG AGCACCAGCT GGAGCTGGGT AACCTGCAGG CCAAGCATGA CCTGGAGACC
Sequenzierung	ATCAAGATGG AGCACCAGCT GGAGCTGGGT AACCTGCAGG CCAAGCATGA CCTGGAGACC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1925 1935 1945 1955 1965 1975
CLIP2 var2 human	GCCATGCACG TGAAGGAGAA GGAGGCCCTG CGAGAGAAGC TGCAGGAGGC CCAGGAGGAG
Sequenzierung	GCCATGCACG TGAAGGAGAA GGAGGCCCTG CGAGAGAAGC TGCAGGAGGC CCAGGAGGAG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	1985 1995 2005 2015 2025 2035
CLIP2 var2 human	CTGGCTGGGC TGCAGCGGCA CTGGCGGGCC CAGCTGGAGG TGCAAGCCAG CCAGCACCGG
Sequenzierung	CTGGCTGGGC TGCAGCGGCA CTGGCGGGCC CAGCTGGAGG TGCAAGCCAG CCAGCACCGG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2045 2055 2065 2075 2085 2095
CLIP2 var2 human	CTGGAGCTGC AGGAGGCCCA GGACCAGCGC CGGGATGCCG AGCTGCGTGT GCACGAGCTG
Sequenzierung	CTGGAGCTGC AGGAGGCCCA GGACCAGCGC CGGGATGCCG AGCTGCGTGT GCACGAGCTG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2105 2115 2125 2135 2145 2155
CLIP2 var2 human	GAAAACTGG ACCTGGAGTA CCGGGGCCAG GCGCAGGCTA TCGAGTTCCT CAAGGAGCAG
Sequenzierung	GAAAACTGG ACCTGGAGTA CCGGGGCCAG GCGCAGGCTA TCGAGTTCCT CAAGGAGCAG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2165 2175 2185 2195 2205 2215
CLIP2 var2 human	ATCTCGCTGG CCGAGAAGAA GATGTTGGAC TACGAGCGGC TGCAAGCCAG AGAAGCCAG
Sequenzierung	ATCTCGCTGG CCGAGAAGAA GATGTTGGAC TACGAGCGGC TGCAAGCCAG AGAAGCCAG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2225 2235 2245 2255 2265 2275
CLIP2 var2 human	GGCAAACAGG AGGTTCGAGG TTTGCGGGAG AAGTCTCTGG TGGCTGAGAA CAGACTCCAG
Sequenzierung	GGCAAACAGG AGGTTCGAGG TTTGCGGGAG AAGTCTCTGG TGGCTGAGAA CAGACTCCAG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2285 2295 2305 2315 2325 2335
CLIP2 var2 human	GCGGTCGAGG CCCTGTGCTC CTCCCAGCAC ACCACATGA TTGAGTCGAA TGACATTTCA
Sequenzierung	GCGGTCGAGG CCCTGTGCTC CTCCCAGCAC ACCACATGA TTGAGTCGAA TGACATTTCA
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2345 2355 2365 2375 2385 2395
CLIP2 var2 human	GAGGAGACGA TCAGGACGAA GGAAACTGTG GAGGGCCTGC AGGACAAGCT GAACAAGAGG
Sequenzierung	GAGGAGACGA TCAGGACGAA GGAAACTGTG GAGGGCCTGC AGGACAAGCT GAACAAGAGG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2405 2415 2425 2435 2445 2455
CLIP2 var2 human	GACAAAGAGG TGACAGCCTT GACCTCCCAG ACCGAGATGC TCAGGGCCCA AGTAAGTGGC
Sequenzierung	GACAAAGAGG TGACAGCCTT GACCTCCCAG ACCGAGATGC TCAGGGCCCA AGTAAGTGGC

	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2465 2475 2485 2495 2505 2515
CLIP2 var2 human	CTGGAGAGCA AGTGTAAATC AGGCGAGAAG AAGGTGGACG CCCTCCTGAA GGAGAAGCGG
Sequenzierung	CTGGAGAGCA AGTGTAAATC AGGCGAGAAG AAGGTGGACG CCCTCCTGAA GGAGAAGCGG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2525 2535 2545 2555 2565 2575
CLIP2 var2 human	CGCCTGGAGG CAGAGCTGGA GACCGTGTCC CGGAAGACCC ATGACGCCTC GGGCCAGCTA
Sequenzierung	CGCCTGGAGG CAGAGCTGGA GACCGTGTCC CGGAAGACCC ATGACGCCTC GGGCCAGCTA
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2585 2595 2605 2615 2625 2635
CLIP2 var2 human	GTCCTCATCA GCCAGGAGCT GCTGCGGAAG GAGCGGAGCC TGAACGAACT GCGGGTGTGG
Sequenzierung	GTCCTCATCA GCCAGGAGCT GCTGCGGAAG GAGCGGAGCC TGAACGAACT GCGGGTGTGG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2645 2655 2665 2675 2685 2695
CLIP2 var2 human	CTGCTGGAGG CCAATCGTCA CTCCCCAGGG CCGGAGAGGG ACCTGAGCCG TGAGGTACAC
Sequenzierung	CTGCTGGAGG CCAATCGTCA CTCCCCAGGG CCGGAGAGGG ACCTGAGCCG TGAGGTACAC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2705 2715 2725 2735 2745 2755
CLIP2 var2 human	AAGGCTGAGT GGCGGATCAA GGAGCAGAAA CTCAAGGATG ACATCCGGGG CCTGCGTGAA
Sequenzierung	AAGGCTGAGT GGCGGATCAA GGAGCAGAAA CTCAAGGATG ACATCCGGGG CCTGCGTGAA
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2765 2775 2785 2795 2805 2815
CLIP2 var2 human	AAGCTGACCG GGCTGGACAA AGAGAAATCC CTGTCCGATC AGAGGGCCTA CTCCTCATC
Sequenzierung	AAGCTGACCG GGCTGGACAA AGAGAAATCC CTGTCCGATC AGAGGGCCTA CTCCTCATC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2825 2835 2845 2855 2865 2875
CLIP2 var2 human	GACCCGTCCT CGGCGCCCGA GCTTCTGCGG CTGCAGCACC AGCTGATGAG CACGGAGGAC
Sequenzierung	GACCCGTCCT CGGCGCCCGA GCTTCTGCGG CTGCAGCACC AGCTGATGAG CACGGAGGAC
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2885 2895 2905 2915 2925 2935
CLIP2 var2 human	GCCCTGCGGG ATGCGCTGGA CCAGGCTCAG CAGGTGGAGA AGCTGATGGA GGCCATGAGG
Sequenzierung	GCCCTGCGGG ATGCGCTGGA CCAGGCTCAG CAGGTGGAGA AGCTGATGGA GGCCATGAGG
	..... ..... ..... ..... ..... .....
	2945 2955 2965 2975 2985 2995
CLIP2 var2 human	AGCTGCCCTG ACAAGGCCCA GACCATCGGC AATTCCGGTT CTGCAAACGG CATCCACCAG
Sequenzierung	AGCTGCCCTG ACAAGGCCCA GACCATCGGC AATTCCGGTT CTGCAAACGG CATCCACCAG
	..... ..... ..... ..... .....
	3005 3015 3025 3035
CLIP2 var2 human	CAGGACAAAG CTCAGAAACA AGAGGACAAG CACTGA
Sequenzierung	CAGGACAAAG CTCAGAAACA AGAGGACAAG CACTGA

**G LITERATURVERZEICHNIS**

- Afonina, I.; Zivarts, M.; Kutuyavin, I.; Lukhtanov, E.; Gamper, H.; Meyer, R.B. (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res* 25, 2657-2660.
- Akhmanova, A.; Hoogenraad, C.C.; Drabek, K.; Stepanova, T.; Dortland, B.; Verkerk, T.; Vermeulen, W.; Burgering, B.M.; De Zeeuw, C.I.; Grosveld, F., *et al.* (2001). Clasps are CLIP-115 and -170 associating proteins involved in the regional regulation of microtubule dynamics in motile fibroblasts. *Cell* 104, 923-935.
- Al-Brahim, N.; Asa, S.L. (2006). Papillary thyroid carcinoma: an overview. *Arch Pathol Lab Med* 130, 1057-1062.
- Albertson, D.G. (2006). Gene amplification in cancer. *Trends Genet* 22, 447-455.
- Albertson, D.G.; Pinkel, D. (2003). Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 12 *Spec No 2*, R145-152.
- Allouche, A.; Nolens, G.; Tancredi, A.; Delacroix, L.; Mardaga, J.; Fridman, V.; Winkler, R.; Boniver, J.; Delvenne, P.; Begon, D.Y. (2008). The combined immunodetection of AP-2alpha and YY1 transcription factors is associated with ERBB2 gene overexpression in primary breast tumors. *Breast Cancer Res* 10, R9.
- Almendo, V.; Fuster, G. (2011). Heterogeneity of breast cancer: etiology and clinical relevance. *Clin Transl Oncol* 13, 767-773.
- Altekruse SF, K.C., Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Ruhl J, Howlader N, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Cronin K, Chen HS, Feuer EJ, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). (2010). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007. National Cancer Institute Bethesda, MD, Available at [http://seercancer.gov/csr/1975\\_2007/](http://seercancer.gov/csr/1975_2007/), based on November 2009 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2010.
- Arriola, E.; Marchio, C.; Tan, D.S.; Drury, S.C.; Lambros, M.B.; Natrajan, R.; Rodriguez-Pinilla, S.M.; Mackay, A.; Tamber, N.; Fenwick, K., *et al.* (2008). Genomic analysis of the HER2/TOP2A amplicon in breast cancer and breast cancer cell lines. *Lab Invest* 88, 491-503.
- Aruga, J.; Yokota, N.; Mikoshiba, K. (2003). Human SLITRK family genes: genomic organization and expression profiling in normal brain and brain tumor tissue. *Gene* 315, 87-94.
- Aubele, M.; Mattis, A.; Zitzelsberger, H.; Walch, A.; Kremer, M.; Hutzler, P.; Hofler, H.; Werner, M. (1999). Intratumoral heterogeneity in breast carcinoma revealed by laser-microdissection and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 110, 94-102.
- Barber, T.D.; McManus, K.; Yuen, K.W.; Reis, M.; Parmigiani, G.; Shen, D.; Barrett, I.; Nouhi, Y.; Spencer, F.; Markowitz, S., *et al.* (2008). Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3443-3448.
- Barnard, J.C.; Williams, A.J.; Rabier, B.; Chassande, O.; Samarut, J.; Cheng, S.Y.; Bassett, J.H.; Williams, G.R. (2005). Thyroid hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis. *Endocrinology* 146, 5568-5580.

- Baverstock, K.; Egloff, B.; Pinchera, A.; Ruchti, C.; Williams, D. (1992). Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 359, 21-22.
- Bayani, J.; Selvarajah, S.; Maire, G.; Vukovic, B.; Al-Romaih, K.; Zielenska, M.; Squire, J.A. (2007). Genomic mechanisms and measurement of structural and numerical instability in cancer cells. *Semin Cancer Biol* 17, 5-18.
- Beral, V.; Reeves, G. (1992). Childhood thyroid cancer in Belarus. *Nature* 359, 680-681.
- Birnboim, H.C.; Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Bodnar, A.G.; Ouellette, M.; Frolkis, M.; Holt, S.E.; Chiu, C.P.; Morin, G.B.; Harley, C.B.; Shay, J.W.; Lichtsteiner, S.; Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Bogdanova, N.V.; Antonenkova, N.N.; Rogov, Y.I.; Karstens, J.H.; Hillemanns, P.; Dork, T. (2010). High frequency and allele-specific differences of BRCA1 founder mutations in breast cancer and ovarian cancer patients from Belarus. *Clin Genet* 78, 364-372.
- Boller, D.; Schramm, A.; Doepfner, K.T.; Shalaby, T.; von Bueren, A.O.; Eggert, A.; Grotzer, M.A.; Arcaro, A. (2008). Targeting the phosphoinositide 3-kinase isoform p110delta impairs growth and survival in neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res* 14, 1172-1181.
- Bryant, P.E.; Riches, A.C. (1989). Oncogenic transformation of murine C3H 10T1/2 cells resulting from DNA double-strand breaks induced by a restriction endonuclease. *British journal of cancer* 60, 852-854.
- Bullard, K.M.; Kim, H.R.; Wheeler, M.A.; Wilson, C.M.; Neudauer, C.L.; Simpson, M.A.; McCarthy, J.B. (2003). Hyaluronan synthase-3 is upregulated in metastatic colon carcinoma cells and manipulation of expression alters matrix retention and cellular growth. *Int J Cancer* 107, 739-746.
- Burgess, J.R.; Tucker, P. (2006). Incidence trends for papillary thyroid carcinoma and their correlation with thyroid surgery and thyroid fine-needle aspirate cytology. *Thyroid* 16, 47-53.
- Califano, J.A.; Johns, M.M., 3rd; Westra, W.H.; Lango, M.N.; Eisele, D.; Saji, M.; Zeiger, M.A.; Udelsman, R.; Koch, W.M.; Sidransky, D. (1996). An allelotype of papillary thyroid cancer. *Int J Cancer* 69, 442-444.
- Cardis, E.; Hall, J.; Tavtigian, S.V. (2007). Identification of women with an increased risk of developing radiation-induced breast cancer. *Breast Cancer Res* 9, 106.
- Cardis, E.; Hatch, M. (2011). The Chernobyl accident--an epidemiological perspective. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23, 251-260.
- Cardis, E.; Howe, G.; Ron, E.; Bebeshko, V.; Bogdanova, T.; Bouville, A.; Carr, Z.; Chumak, V.; Davis, S.; Demidchik, Y., *et al.* (2006). Cancer consequences of the Chernobyl accident: 20 years on. *J Radiol Prot* 26, 127-140.
- Carvalho, B.; Ouwerkerk, E.; Meijer, G.A.; Ylstra, B. (2004). High resolution microarray comparative genomic hybridisation analysis using spotted oligonucleotides. *J Clin Pathol* 57, 644-646.
- Chen, C.; Bhalala, H.V.; Qiao, H.; Dong, J.T. (2002). A possible tumor suppressor role of the KLF5 transcription factor in human breast cancer. *Oncogene* 21, 6567-6572.
- Chen, D.; Xu, W.; Bales, E.; Colmenares, C.; Conacci-Sorrell, M.; Ishii, S.; Stavnezer, E.; Campisi, J.; Fisher, D.E.; Ben-Ze'ev, A., *et al.* (2003). SKI activates Wnt/beta-catenin signaling in human melanoma. *Cancer Res* 63, 6626-6634.

- Chen, X.; Knauf, J.A.; Gonsky, R.; Wang, M.; Lai, E.H.; Chisoe, S.; Fagin, J.A.; Korenberg, J.R. (1998). From amplification to gene in thyroid cancer: a high-resolution mapped bacterial-artificial-chromosome resource for cancer chromosome aberrations guides gene discovery after comparative genome hybridization. *Am J Hum Genet* **63**, 625-637.
- Coe, B.P.; Ylstra, B.; Carvalho, B.; Meijer, G.A.; Macaulay, C.; Lam, W.L. (2007). Resolving the resolution of array CGH. *Genomics* **89**, 647-653.
- Cohen, Y.; Xing, M.; Mambo, E.; Guo, Z.; Wu, G.; Trink, B.; Beller, U.; Westra, W.H.; Ladenson, P.W.; Sidransky, D. (2003). BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **95**, 625-627.
- Compton, D.A. (1998). Focusing on spindle poles. *Journal of cell science* **111 ( Pt 11)**, 1477-1481.
- Compton, D.A. (2000). Spindle assembly in animal cells. *Annu Rev Biochem* **69**, 95-114.
- Conway, W.C.; Van der Voort van Zyp, J.; Thamilselvan, V.; Walsh, M.F.; Crowe, D.L.; Basson, M.D. (2006). Paxillin modulates squamous cancer cell adhesion and is important in pressure-augmented adhesion. *J Cell Biochem* **98**, 1507-1516.
- Corson, T.W.; Gallie, B.L. (2007). One hit, two hits, three hits, more? Genomic changes in the development of retinoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* **46**, 617-634.
- Danos, O.; Mulligan, R.C. (1988). Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 6460-6464.
- Davies, J.J.; Wilson, I.M.; Lam, W.L. (2005). Array CGH technologies and their applications to cancer genomes. *Chromosome Res* **13**, 237-248.
- Davila, M.; Frost, A.R.; Grizzle, W.E.; Chakrabarti, R. (2003). LIM kinase 1 is essential for the invasive growth of prostate epithelial cells: implications in prostate cancer. *J Biol Chem* **278**, 36868-36875.
- Davis, H.E.; Rosinski, M.; Morgan, J.R.; Yarmush, M.L. (2004). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophys J* **86**, 1234-1242.
- de Oliveira, S.S.; de Oliveira, I.M.; De Souza, W.; Morgado-Diaz, J.A. (2005). Claudins upregulation in human colorectal cancer. *FEBS Lett* **579**, 6179-6185.
- Demidchik, Y.E.; Demidchik, E.P.; Reiners, C.; Biko, J.; Mine, M.; Saenko, V.A.; Yamashita, S. (2006). Comprehensive clinical assessment of 740 cases of surgically treated thyroid cancer in children of Belarus. *Ann Surg* **243**, 525-532.
- Detours, V.; Delys, L.; Libert, F.; Weiss Solis, D.; Bogdanova, T.; Dumont, J.E.; Franc, B.; Thomas, G.; Maenhaut, C. (2007). Genome-wide gene expression profiling suggests distinct radiation susceptibilities in sporadic and post-Chernobyl papillary thyroid cancers. *Br J Cancer* **97**, 818-825.
- Dong, X.Y.; Chen, C.; Sun, X.; Guo, P.; Vessella, R.L.; Wang, R.X.; Chung, L.W.; Zhou, W.; Dong, J.T. (2006). FOXO1A is a candidate for the 13q14 tumor suppressor gene inhibiting androgen receptor signaling in prostate cancer. *Cancer Res* **66**, 6998-7006.
- Doniach, I. (1957). Sensitivity of the weanling rat thyroid to radiation. *British journal of cancer* **11**, 253-257.
- Duffy, B.J., Jr.; Fitzgerald, P.J. (1950). Cancer of the thyroid in children: a report of 28 cases. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **10**, 1296-1308.

- Dujardin, D.; Wacker, U.I.; Moreau, A.; Schroer, T.A.; Rickard, J.E.; De Mey, J.R. (1998). Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J Cell Biol* *141*, 849-862.
- Eggo, M.C.; Hopkins, J.M.; Franklyn, J.A.; Johnson, G.D.; Sanders, D.S.; Sheppard, M.C. (1995). Expression of fibroblast growth factors in thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* *80*, 1006-1011.
- Elisei, R.; Molinaro, E.; Agate, L.; Bottici, V.; Masserini, L.; Ceccarelli, C.; Lippi, F.; Grasso, L.; Basolo, F.; Bevilacqua, G., *et al.* (2010). Are the clinical and pathological features of differentiated thyroid carcinoma really changed over the last 35 years? Study on 4187 patients from a single Italian institution to answer this question. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *95*, 1516-1527.
- Elsheikh, S.; Green, A.R.; Aleskandarany, M.A.; Grainge, M.; Paish, C.E.; Lambros, M.B.; Reis-Filho, J.S.; Ellis, I.O. (2008). CCND1 amplification and cyclin D1 expression in breast cancer and their relation with proteomic subgroups and patient outcome. *Breast Cancer Res Treat* *109*, 325-335.
- Fearon, E.R.; Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* *61*, 759-767.
- Fenton, C.L.; Lukes, Y.; Nicholson, D.; Dinauer, C.A.; Francis, G.L.; Tuttle, R.M. (2000). The ret/PTC mutations are common in sporadic papillary thyroid carcinoma of children and young adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *85*, 1170-1175.
- Ferlay, J.; Shin, H.R.; Bray, F.; Forman, D.; Mathers, C.; Parkin, D.M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer Journal international du cancer* *127*, 2893-2917.
- Ferrero, G.B.; Howald, C.; Micale, L.; Biamino, E.; Augello, B.; Fusco, C.; Turturo, M.G.; Forzano, S.; Reymond, A.; Merla, G. (2010). An atypical 7q11.23 deletion in a normal IQ Williams-Beuren syndrome patient. *Eur J Hum Genet* *18*, 33-38.
- Fiegler, H.; Carr, P.; Douglas, E.J.; Burford, D.C.; Hunt, S.; Scott, C.E.; Smith, J.; Vetrie, D.; Gorman, P.; Tomlinson, I.P., *et al.* (2003). DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones. *Genes Chromosomes Cancer* *36*, 361-374.
- Fiegler, H.; Redon, R.; Carter, N.P. (2007). Construction and use of spotted large-insert clone DNA microarrays for the detection of genomic copy number changes. *Nat Protoc* *2*, 577-587.
- Finn, S.; Smyth, P.; O'Regan, E.; Cahill, S.; Toner, M.; Timon, C.; Flavin, R.; O'Leary, J.; Sheils, O. (2007). Low-level genomic instability is a feature of papillary thyroid carcinoma: an array comparative genomic hybridization study of laser capture microdissected papillary thyroid carcinoma tumors and clonal cell lines. *Arch Pathol Lab Med* *131*, 65-73.
- Förster, V.T. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annals of Physics* *2*, 55-75.
- Frattini, M.; Ferrario, C.; Bressan, P.; Balestra, D.; De Cecco, L.; Mondellini, P.; Bongarzone, I.; Collini, P.; Gariboldi, M.; Pilotti, S., *et al.* (2004). Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene* *23*, 7436-7440.

- Fugazzola, L.; Pilotti, S.; Pinchera, A.; Vorontsova, T.V.; Mondellini, P.; Bongarzone, I.; Greco, A.; Astakhova, L.; Butti, M.G.; Demidchik, E.P., *et al.* (1995). Oncogenic rearrangements of the RET proto-oncogene in papillary thyroid carcinomas from children exposed to the Chernobyl nuclear accident. *Cancer Res* *55*, 5617-5620.
- Fumoto, K.; Hoogenraad, C.C.; Kikuchi, A. (2006). GSK-3beta-regulated interaction of BICD with dynein is involved in microtubule anchorage at centrosome. *Embo J* *25*, 5670-5682.
- Gill, S.R.; Schroer, T.A.; Szilak, I.; Steuer, E.R.; Sheetz, M.P.; Cleveland, D.W. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* *115*, 1639-1650.
- Goodhead, D.T. (1989). The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int J Radiat Biol* *56*, 623-634.
- Goto, T.; Takano, M.; Albergaria, A.; Briese, J.; Pomeranz, K.M.; Cloke, B.; Fusi, L.; Feroze-Zaidi, F.; Maywald, N.; Sajin, M., *et al.* (2008). Mechanism and functional consequences of loss of FOXO1 expression in endometrioid endometrial cancer cells. *Oncogene* *27*, 9-19.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Harbour, J.W.; Dean, D.C. (2000a). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol* *2*, E65-67.
- Harbour, J.W.; Dean, D.C. (2000b). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev* *14*, 2393-2409.
- Harley, C.B. (1991). Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* *256*, 271-282.
- Hastings, P.J.; Lupski, J.R.; Rosenberg, S.M.; Ira, G. (2009). Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet* *10*, 551-564.
- Hay, I.D.; Thompson, G.B.; Grant, C.S.; Bergstralh, E.J.; Dvorak, C.E.; Gorman, C.A.; Maurer, M.S.; McIver, B.; Mullan, B.P.; Oberg, A.L., *et al.* (2002). Papillary thyroid carcinoma managed at the Mayo Clinic during six decades (1940-1999): temporal trends in initial therapy and long-term outcome in 2444 consecutively treated patients. *World J Surg* *26*, 879-885.
- Hayflick, L. (1965). The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* *37*, 614-636.
- Hayflick, L.; Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* *25*, 585-621.
- Heald, R. (2000). Motor function in the mitotic spindle. *Cell* *102*, 399-402.
- Hedinger, C.; Williams, E.D.; Sobin, L.H. (1988). Histological typing of thyroid tumors; International histological classification of tumours (Springer, Berlin Heidelberg New York Tokio).
- Heiliger, K.-J.; Vitagliano, D.; Heß, J.; Salerno, P.; Braselmann, H.; Salvatore, G.; Ugolini, C.; Summerer, I.; Unger, K.; Thomas, G., *et al.* (submitted). Novel candidate genes of thyroid carcinogenesis identified in TRK-T1 transgenic mice. *Endocr Relat Cancer*.

- Hemmer, S.; Wasenius, V.M.; Knuutila, S.; Franssila, K.; Joensuu, H. (1999). DNA copy number changes in thyroid carcinoma. *The American journal of pathology* *154*, 1539-1547.
- Hemminki, K.; Eng, C.; Chen, B. (2005). Familial risks for nonmedullary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 5747-5753.
- Hibi, K.; Mizukami, H.; Shirahata, A.; Goto, T.; Sakata, M.; Sanada, Y. (2009). Aberrant methylation of the netrin-1 receptor genes UNC5C and DCC detected in advanced colorectal cancer. *World J Surg* *33*, 1053-1057.
- Hieber, L.; Huber, R.; Bauer, V.; Schaffner, Q.; Braselmann, H.; Thomas, G.; Bogdanova, T.; Zitzelsberger, H. (2011). Chromosomal rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas: evaluation by spectral karyotyping and automated interphase FISH. *J Biomed Biotechnol* *2011*, 693691.
- Hong, Z.; Jiang, J.; Hashiguchi, K.; Hoshi, M.; Lan, L.; Yasui, A. (2008). Recruitment of mismatch repair proteins to the site of DNA damage in human cells. *J Cell Sci* *121*, 3146-3154.
- Hoogenraad, C.C.; Akhmanova, A.; Galjart, N.; De Zeeuw, C.I. (2004). LIMK1 and CLIP-115: linking cytoskeletal defects to Williams syndrome. *Bioessays* *26*, 141-150.
- Hoogenraad, C.C.; Akhmanova, A.; Grosveld, F.; De Zeeuw, C.I.; Galjart, N. (2000). Functional analysis of CLIP-115 and its binding to microtubules. *Journal of cell science* *113 (Pt 12)*, 2285-2297.
- Hoogenraad, C.C.; Akhmanova, A.; Howell, S.A.; Dortland, B.R.; De Zeeuw, C.I.; Willemsen, R.; Visser, P.; Grosveld, F.; Galjart, N. (2001). Mammalian Golgi-associated Bicaudal-D2 functions in the dynein-dynactin pathway by interacting with these complexes. *Embo J* *20*, 4041-4054.
- Hoogenraad, C.C.; Eussen, B.H.; Langeveld, A.; van Haperen, R.; Winterberg, S.; Wouters, C.H.; Grosveld, F.; De Zeeuw, C.I.; Galjart, N. (1998). The murine CYLN2 gene: genomic organization, chromosome localization, and comparison to the human gene that is located within the 7q11.23 Williams syndrome critical region. *Genomics* *53*, 348-358.
- Hoogenraad, C.C.; Koekkoek, B.; Akhmanova, A.; Krugers, H.; Dortland, B.; Miedema, M.; van Alphen, A.; Kistler, W.M.; Jaegle, M.; Koutsourakis, M., *et al.* (2002). Targeted mutation of Cyln2 in the Williams syndrome critical region links CLIP-115 haploinsufficiency to neurodevelopmental abnormalities in mice. *Nature genetics* *32*, 116-127.
- Hoogenraad, C.C.; Wulf, P.; Schiefermeier, N.; Stepanova, T.; Galjart, N.; Small, J.V.; Grosveld, F.; de Zeeuw, C.I.; Akhmanova, A. (2003). Bicaudal D induces selective dynein-mediated microtubule minus end-directed transport. *Embo J* *22*, 6004-6015.
- Huang da, W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* *4*, 44-57.
- Huang, L.; Snyder, A.R.; Morgan, W.F. (2003). Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis. *Oncogene* *22*, 5848-5854.
- Hundahl, S.A.; Fleming, I.D.; Fremgen, A.M.; Menck, H.R. (1998). A National Cancer Data Base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995 [see commetns]. *Cancer* *83*, 2638-2648.



- Husdal, A.; Bukholm, G.; Bukholm, I.R. (2006). The prognostic value and overexpression of cyclin A is correlated with gene amplification of both cyclin A and cyclin E in breast cancer patient. *Cell Oncol* 28, 107-116.
- Imkamp, F.; von Wasielewski, R.; Musholt, T.J.; Musholt, P.B. (2007). Rearrangement analysis in archival thyroid tissues: punching microdissection and artificial RET/PTC 1-12 transcripts. *J Surg Res* 143, 350-363.
- Inazawa, J.; Inoue, J.; Imoto, I. (2004). Comparative genomic hybridization (CGH)-arrays pave the way for identification of novel cancer-related genes. *Cancer Sci* 95, 559-563.
- Ishizaka, Y.; Itoh, F.; Tahira, T.; Ikeda, I.; Ogura, T.; Sugimura, T.; Nagao, M. (1989). Presence of aberrant transcripts of ret proto-oncogene in a human papillary thyroid carcinoma cell line. *Jpn J Cancer Res* 80, 1149-1152.
- Ishkanian, A.S.; Malloff, C.A.; Watson, S.K.; DeLeeuw, R.J.; Chi, B.; Coe, B.P.; Snijders, A.; Albertson, D.G.; Pinkel, D.; Marra, M.A., *et al.* (2004). A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. *Nat Genet* 36, 299-303.
- Izzo, J.G.; Papadimitrakopoulou, V.A.; Li, X.Q.; Ibarguen, H.; Lee, J.S.; Ro, J.Y.; El-Naggar, A.; Hong, W.K.; Hittelman, W.N. (1998). Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* 17, 2313-2322.
- Jacob, P.; Bogdanova, T.I.; Buglova, E.; Chepurniy, M.; Demidchik, Y.; Gavrilin, Y.; Kenigsberg, J.; Kruk, J.; Schotola, C.; Shinkarev, S., *et al.* (2006a). Thyroid cancer among Ukrainians and Belarusians who were children or adolescents at the time of the Chernobyl accident. *J Radiol Prot* 26, 51-67.
- Jacob, P.; Bogdanova, T.I.; Buglova, E.; Chepurniy, M.; Demidchik, Y.; Gavrilin, Y.; Kenigsberg, J.; Meckbach, R.; Schotola, C.; Shinkarev, S., *et al.* (2006b). Thyroid cancer risk in areas of Ukraine and Belarus affected by the Chernobyl accident. *Radiation research* 165, 1-8.
- Järvinen, A.K.; Autio, R.; Kilpinen, S.; Saarela, M.; Leivo, I.; Grenman, R.; Makitie, A.A.; Monni, O. (2008). High-resolution copy number and gene expression microarray analyses of head and neck squamous cell carcinoma cell lines of tongue and larynx. *Genes Chromosomes Cancer* 47, 500-509.
- Jhiang, S.M. (2000). The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene* 19, 5590-5597.
- Jhiang, S.M.; Caruso, D.R.; Gilmore, E.; Ishizaka, Y.; Tahira, T.; Nagao, M.; Chiu, I.M.; Mazzaferri, E.L. (1992). Detection of the PTC/retTPC oncogene in human thyroid cancers. *Oncogene* 7, 1331-1337.
- Jhiang, S.M.; Mazzaferri, E.L. (1994). The ret/PTC oncogene in papillary thyroid carcinoma. *J Lab Clin Med* 123, 331-337.
- Kaji, N.; Muramoto, A.; Mizuno, K. (2008). LIM kinase-mediated cofilin phosphorylation during mitosis is required for precise spindle positioning. *J Biol Chem* 283, 4983-4992.
- Kalin, T.V.; Wang, I.C.; Ackerson, T.J.; Major, M.L.; Detrisac, C.J.; Kalinichenko, V.V.; Lyubimov, A.; Costa, R.H. (2006). Increased levels of the FoxM1 transcription factor accelerate development and progression of prostate carcinomas in both TRAMP and LADY transgenic mice. *Cancer Res* 66, 1712-1720.
- Kallioniemi, A. (2008). CGH microarrays and cancer. *Curr Opin Biotechnol* 19, 36-40.

- Kallioniemi, A.; Kallioniemi, O.P.; Sudar, D.; Rutovitz, D.; Gray, J.W.; Waldman, F.; Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821.
- Karantza, V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene* 30, 127-138.
- Karki, S.; Holzbaur, E.L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol* 11, 45-53.
- Katoh, M. (2005). WNT2B: comparative integromics and clinical applications (Review). *Int J Mol Med* 16, 1103-1108.
- Kazakov, V.S.; Demidchik, E.P.; Astakhova, L.N. (1992). Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature* 359, 21.
- Kilfoy, B.A.; Zheng, T.; Holford, T.R.; Han, X.; Ward, M.H.; Sjodin, A.; Zhang, Y.; Bai, Y.; Zhu, C.; Guo, G.L., *et al.* (2009). International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes Control* 20, 525-531.
- Kim, I.M.; Ackerson, T.; Ramakrishna, S.; Tretiakova, M.; Wang, I.C.; Kalin, T.V.; Major, M.L.; Gusarova, G.A.; Yoder, H.M.; Costa, R.H., *et al.* (2006). The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer Res* 66, 2153-2161.
- Kimmel, R.R.; Zhao, L.P.; Nguyen, D.; Lee, S.; Aronszajn, M.; Cheng, C.; Troshin, V.P.; Abrosimov, A.; Delrow, J.; Tuttle, R.M., *et al.* (2006). Microarray comparative genomic hybridization reveals genome-wide patterns of DNA gains and losses in post-Chernobyl thyroid cancer. *Radiation research* 166, 519-531.
- Kimura, E.T.; Nikiforova, M.N.; Zhu, Z.; Knauf, J.A.; Nikiforov, Y.E.; Fagin, J.A. (2003). High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63, 1454-1457.
- Kirikoshi, H.; Sekihara, H.; Katoh, M. (2001). Molecular cloning and characterization of human WNT11. *Int J Mol Med* 8, 651-656.
- Kishimoto, I.; Mitomi, H.; Ohkura, Y.; Kanazawa, H.; Fukui, N.; Watanabe, M. (2008). Abnormal expression of p16(INK4a), cyclin D1, cyclin-dependent kinase 4 and retinoblastoma protein in gastric carcinomas. *J Surg Oncol* 98, 60-66.
- Kitamura, Y.; Shimizu, K.; Tanaka, S.; Ito, K.; Emi, M. (2000). Association of allelic loss on 1q, 4p, 7q, 9p, 9q, and 16q with postoperative death in papillary thyroid carcinoma. *Clin Cancer Res* 6, 1819-1825.
- Klugbauer, S.; Lengfelder, E.; Demidchik, E.P.; Rabes, H.M. (1995). High prevalence of RET rearrangement in thyroid tumors of children from Belarus after the Chernobyl reactor accident. *Oncogene* 11, 2459-2467.
- Knudson, A.G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 157-162.
- Kominsky, S.L.; Vali, M.; Korz, D.; Gabig, T.G.; Weitzman, S.A.; Argani, P.; Sukumar, S. (2004). Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol* 164, 1627-1633.
- Kondo, E.; Horii, A.; Fukushige, S. (1999). The human PMS2L proteins do not interact with hMLH1, a major DNA mismatch repair protein. *J Biochem* 125, 818-825.
- Kondo, T.; Ezzat, S.; Asa, S.L. (2006). Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* 6, 292-306.

- Kononen, J.; Bubendorf, L.; Kallioniemi, A.; Barlund, M.; Schraml, P.; Leighton, S.; Torhorst, J.; Mihatsch, M.J.; Sauter, G.; Kallioniemi, O.P. (1998). Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* 4, 844-847.
- Krzywinski, M.; Bosdet, I.; Smailus, D.; Chiu, R.; Mathewson, C.; Wye, N.; Barber, S.; Brown-John, M.; Chan, S.; Chand, S., *et al.* (2004). A set of BAC clones spanning the human genome. *Nucleic Acids Res* 32, 3651-3660.
- Kumagai, A.; Namba, H.; Saenko, V.A.; Ashizawa, K.; Ohtsuru, A.; Ito, M.; Ishikawa, N.; Sugino, K.; Ito, K.; Jeremiah, S., *et al.* (2004). Low frequency of BRAFT1796A mutations in childhood thyroid carcinomas. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89, 4280-4284.
- Kutyavin, I.V.; Lukhtanov, E.A.; Gamper, H.B.; Meyer, R.B. (1997). Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res* 25, 3718-3723.
- Lang, G. (2006). *Histotechnik Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik ; [für MTA und biomedizinische Analytikerinnen]* (Wien New York, Springer).
- Lansbergen, G.; Komarova, Y.; Modesti, M.; Wyman, C.; Hoogenraad, C.C.; Goodson, H.V.; Lemaitre, R.P.; Drechsel, D.N.; van Munster, E.; Gadella, T.W., Jr., *et al.* (2004). Conformational changes in CLIP-170 regulate its binding to microtubules and dynactin localization. *J Cell Biol* 166, 1003-1014.
- Lassmann, S.; Weis, R.; Makowiec, F.; Roth, J.; Danciu, M.; Hopt, U.; Werner, M. (2007). Array CGH identifies distinct DNA copy number profiles of oncogenes and tumor suppressor genes in chromosomal- and microsatellite-unstable sporadic colorectal carcinomas. *J Mol Med* 85, 293-304.
- Li, G.M.; Modrich, P. (1995). Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1950-1954.
- Lima, J.; Trovisco, V.; Soares, P.; Maximo, V.; Magalhaes, J.; Salvatore, G.; Santoro, M.; Bogdanova, T.; Tronko, M.; Abrosimov, A., *et al.* (2004). BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4267-4271.
- Lin, R.; Chiu, G.; Yu, Y.; Connolly, P.J.; Li, S.; Lu, Y.; Adams, M.; Fuentes-Pesquera, A.R.; Emanuel, S.L.; Greenberger, L.M. (2007). Design, synthesis, and evaluation of 3,4-disubstituted pyrazole analogues as anti-tumor CDK inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 4557-4561.
- Little, M.P.; Heidenreich, W.F.; Moolgavkar, S.H.; Schollnberger, H.; Thomas, D.C. (2008). Systems biological and mechanistic modelling of radiation-induced cancer. *Radiat Environ Biophys* 47, 39-47.
- Liu, S.C.; Bassi, D.E.; Zhang, S.Y.; Holoran, D.; Conti, C.J.; Klein-Szanto, A.J. (2002). Overexpression of cyclin D2 is associated with increased in vivo invasiveness of human squamous carcinoma cells. *Mol Carcinog* 34, 131-139.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Löbrich, M.; Rief, N.; Kuhne, M.; Heckmann, M.; Fleckenstein, J.; Rube, C.; Uder, M. (2005). In vivo formation and repair of DNA double-strand breaks after computed tomography examinations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 8984-8989.

- Loeb, L.A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51, 3075-3079.
- Loeb, L.A. (2001). A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61, 3230-3239.
- Lynch, H.T.; de la Chapelle, A. (1999). Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 36, 801-818.
- Maenhaut, C.; Detours, V.; Dom, G.; Handkiewicz-Junak, D.; Oczko-Wojciechowska, M.; Jarzab, B. (2011). Gene expression profiles for radiation-induced thyroid cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23, 282-288.
- Mahaney, B.L.; Meek, K.; Lees-Miller, S.P. (2009). Repair of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem J* 417, 639-650.
- Manduchi, E.; Grant, G.R.; McKenzie, S.E.; Overton, G.C.; Surrey, S.; Stoeckert, C.J., Jr. (2000). Generation of patterns from gene expression data by assigning confidence to differentially expressed genes. *Bioinformatics* 16, 685-698.
- Mao, X.; Orchard, G.; Lillington, D.M.; Russell-Jones, R.; Young, B.D.; Whittaker, S.J. (2003). Amplification and overexpression of JUNB is associated with primary cutaneous T-cell lymphomas. *Blood* 101, 1513-1519.
- Marchler-Bauer, A.; Anderson, J.B.; Chitsaz, F.; Derbyshire, M.K.; DeWeese-Scott, C.; Fong, J.H.; Geer, L.Y.; Geer, R.C.; Gonzales, N.R.; Gwadz, M., *et al.* (2009). CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res* 37, D205-210.
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* 26, 234-282.
- Mees, S.T.; Mennigen, R.; Spieker, T.; Rijcken, E.; Senninger, N.; Haier, J.; Bruewer, M. (2009). Expression of tight and adherens junction proteins in ulcerative colitis associated colorectal carcinoma: upregulation of claudin-1, claudin-3, claudin-4, and beta-catenin. *Int J Colorectal Dis* 24, 361-368.
- Merlo, L.M.; Wang, L.S.; Pepper, J.W.; Rabinovitch, P.S.; Maley, C.C. (2010). Polyploidy, aneuploidy and the evolution of cancer. *Adv Exp Med Biol* 676, 1-13.
- Merzlyak, E.M.; Goedhart, J.; Shcherbo, D.; Bulina, M.E.; Shcheglov, A.S.; Fradkov, A.F.; Gaintzeva, A.; Lukyanov, K.A.; Lukyanov, S.; Gadella, T.W., *et al.* (2007). Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nat Methods* 4, 555-557.
- Meyer-Lindenberg, A.; Hariri, A.R.; Munoz, K.E.; Mervis, C.B.; Mattay, V.S.; Morris, C.A.; Berman, K.F. (2005a). Neural correlates of genetically abnormal social cognition in Williams syndrome. *Nat Neurosci* 8, 991-993.
- Meyer-Lindenberg, A.; Mervis, C.B.; Sarpal, D.; Koch, P.; Steele, S.; Kohn, P.; Marenco, S.; Morris, C.A.; Das, S.; Kippenhan, S., *et al.* (2005b). Functional, structural, and metabolic abnormalities of the hippocampal formation in Williams syndrome. *J Clin Invest* 115, 1888-1895.
- Milde, T.; Shmelkov, S.V.; Jensen, K.K.; Zlotchenko, G.; Petit, I.; Rafii, S. (2007). A novel family of slitrk genes is expressed on hematopoietic stem cells and leukemias. *Leukemia* 21, 824-827.
- Moh, M.C.; Shen, S. (2009). The roles of cell adhesion molecules in tumor suppression and cell migration: a new paradox. *Cell Adh Migr* 3, 334-336.
- Mondello, C.; Smirnova, A.; Giulotto, E. (2010). Gene amplification, radiation sensitivity and DNA double-strand breaks. *Mutat Res* 704, 29-37.

- Morgan, W.F. (2003a). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro. *Radiat Res* 159, 567-580.
- Morgan, W.F. (2003b). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: II. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vivo, clastogenic factors and transgenerational effects. *Radiat Res* 159, 581-596.
- Morgenstern, J.P.; Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic acids research* 18, 3587-3596.
- Muir, C.S.; Waterhouse, J.; Mack, T.; Powell, J.; Whelan, S. (1987). Cancer incidence in five continents Volume V (IARC Scientific Publications ).
- Mullenders, L.; Atkinson, M.; Paretzke, H.; Sabatier, L.; Bouffler, S. (2009). Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nat Rev Cancer* 9, 596-604.
- Nagataki, S.; Nystrom, E. (2002). Epidemiology and primary prevention of thyroid cancer. *Thyroid* 12, 889-896.
- Nair, M.; Kapila, K.; Karak, A.K.; Verma, K. (2001). Papillary carcinoma of the thyroid and its variants: a cytohistological correlation. *Diagn Cytopathol* 24, 167-173.
- Nakamura, T.M.; Morin, G.B.; Chapman, K.B.; Weinrich, S.L.; Andrews, W.H.; Lingner, J.; Harley, C.B.; Cech, T.R. (1997). Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277, 955-959.
- Nauman, A.; Turowska, O.; Poplawski, P.; Master, A.; Tanski, Z.; Puzianowska-Kuznicka, M. (2007). Elevated cyclin E level in human clear cell renal cell carcinoma: possible causes and consequences. *Acta Biochim Pol* 54, 595-602.
- Neuvial, P.; Hupe, P.; Brito, I.; Liva, S.; Manie, E.; Brennetot, C.; Radvanyi, F.; Aurias, A.; Barillot, E. (2006). Spatial normalization of array-CGH data. *BMC Bioinformatics* 7, 264.
- Nicolaides, N.C.; Carter, K.C.; Shell, B.K.; Papadopoulos, N.; Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. (1995). Genomic organization of the human PMS2 gene family. *Genomics* 30, 195-206.
- Nigg, E.A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nature reviews Cancer* 2, 815-825.
- Nikiforov, Y.E.; Erickson, L.A.; Nikiforova, M.N.; Caudill, C.M.; Lloyd, R.V. (2001). Solid variant of papillary thyroid carcinoma: incidence, clinical-pathologic characteristics, molecular analysis, and biologic behavior. *Am J Surg Pathol* 25, 1478-1484.
- Nikiforov, Y.E.; Rowland, J.M.; Bove, K.E.; Monforte-Munoz, H.; Fagin, J.A. (1997). Distinct pattern of ret oncogene rearrangements in morphological variants of radiation-induced and sporadic thyroid papillary carcinomas in children. *Cancer Res* 57, 1690-1694.
- Nowak, M.A.; Komarova, N.L.; Sengupta, A.; Jallepalli, P.V.; Shih Ie, M.; Vogelstein, B.; Lengauer, C. (2002). The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16226-16231.
- Obe, G.; Johannes, C.; Schulte-Frohlinde, D. (1992). DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7, 3-12.

- Obe, G.; Pfeiffer, P.; Savage, J.R.; Johannes, C.; Goedecke, W.; Jeppesen, P.; Natarajan, A.T.; Martinez-Lopez, W.; Folle, G.A.; Drets, M.E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 504, 17-36.
- Okino, K.; Nagai, H.; Hatta, M.; Nagahata, T.; Yoneyama, K.; Ohta, Y.; Jin, E.; Kawanami, O.; Araki, T.; Emi, M. (2003). Up-regulation and overproduction of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 10, 1219-1223.
- Olive, P.L. (1998). The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiation research* 150, S42-51.
- Olshen, A.B.; Venkatraman, E.S.; Lucito, R.; Wigler, M. (2004). Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics* 5, 557-572.
- Osborne, L.R.; Herbrick, J.A.; Greavette, T.; Heng, H.H.; Tsui, L.C.; Scherer, S.W. (1997). PMS2-related genes flank the rearrangement breakpoints associated with Williams syndrome and other diseases on human chromosome 7. *Genomics* 45, 402-406.
- Pacini, F.; Vorontsova, T.; Demidchik, E.P.; Molinaro, E.; Agate, L.; Romei, C.; Shavrova, E.; Cherstvoy, E.D.; Ivashkevitch, Y.; Kuchinskaya, E., *et al.* (1997). Post-Chernobyl thyroid carcinoma in Belarus children and adolescents: comparison with naturally occurring thyroid carcinoma in Italy and France. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 3563-3569.
- Pezzi, N.; Prieto, I.; Kremer, L.; Perez Jurado, L.A.; Valero, C.; Del Mazo, J.; Martinez, A.C.; Barbero, J.L. (2000). STAG3, a novel gene encoding a protein involved in meiotic chromosome pairing and location of STAG3-related genes flanking the Williams-Beuren syndrome deletion. *FASEB J* 14, 581-592.
- Pfarr, C.M.; Coue, M.; Grissom, P.M.; Hays, T.S.; Porter, M.E.; McIntosh, J.R. (1990). Cytoplasmic dynein is localized to kinetochores during mitosis. *Nature* 345, 263-265.
- Piao, C.Q.; Liu, L.; Zhao, Y.L.; Balajee, A.S.; Suzuki, M.; Hei, T.K. (2005). Immortalization of human small airway epithelial cells by ectopic expression of telomerase. *Carcinogenesis* 26, 725-731.
- Pickering, M.T.; Kowalik, T.F. (2006). Rb inactivation leads to E2F1-mediated DNA double-strand break accumulation. *Oncogene* 25, 746-755.
- Pinkel, D.; Albertson, D.G. (2005a). Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet* 37 *Suppl*, S11-17.
- Pinkel, D.; Albertson, D.G. (2005b). Comparative genomic hybridization. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6, 331-354.
- Pinkel, D.; Seagraves, R.; Sudar, D.; Clark, S.; Poole, I.; Kowbel, D.; Collins, C.; Kuo, W.L.; Chen, C.; Zhai, Y., *et al.* (1998). High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 20, 207-211.
- Pipiras, E.; Coquelle, A.; Bieth, A.; Debatisse, M. (1998). Interstitial deletions and intrachromosomal amplification initiated from a double-strand break targeted to a mammalian chromosome. *Embo J* 17, 325-333.
- Port, M.; Boltze, C.; Wang, Y.; Roper, B.; Meineke, V.; Abend, M. (2007). A radiation-induced gene signature distinguishes post-Chernobyl from sporadic papillary thyroid cancers. *Radiat Res* 168, 639-649.

- Pottern, L.M.; Kaplan, M.M.; Larsen, P.R.; Silva, J.E.; Koenig, R.J.; Lubin, J.H.; Stovall, M.; Boice, J.D., Jr. (1990). Thyroid nodularity after childhood irradiation for lymphoid hyperplasia: a comparison of questionnaire and clinical findings. *J Clin Epidemiol* **43**, 449-460.
- Powell, N.; Jeremiah, S.; Morishita, M.; Dudley, E.; Bethel, J.; Bogdanova, T.; Tronko, M.; Thomas, G. (2005). Frequency of BRAF T1796A mutation in papillary thyroid carcinoma relates to age of patient at diagnosis and not to radiation exposure. *J Pathol* **205**, 558-564.
- Prieto, I.; Suja, J.A.; Pezzi, N.; Kremer, L.; Martinez, A.C.; Rufas, J.S.; Barbero, J.L. (2001). Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nat Cell Biol* **3**, 761-766.
- Pukkala, E.; Kesminiene, A.; Poliakov, S.; Ryzhov, A.; Drozdovitch, V.; Kovgan, L.; Kyyronen, P.; Malakhova, I.V.; Gulak, L.; Cardis, E. (2006). Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. *International journal of cancer Journal international du cancer* **119**, 651-658.
- Quinn, G.P.; Keough, M.J. (2002). *Experimental design and data analysis for biologists* (Cambridge University Press).
- R Development Core Team (2011). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (R Foundation for Statistical Computing).
- Ragazzini, P.; Gamberi, G.; Pazzaglia, L.; Serra, M.; Magagnoli, G.; Ponticelli, F.; Ferrari, C.; Ghinelli, C.; Alberghini, M.; Bertoni, F., *et al.* (2004). Amplification of CDK4, MDM2, SAS and GLI genes in leiomyosarcoma, alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Histol Histopathol* **19**, 401-411.
- Railo, A.; Nagy, I.; Kilpelainen, P.; Vainio, S. (2008). Wnt-11 signaling leads to down-regulation of the Wnt/beta-catenin, JNK/AP-1 and NF-kappaB pathways and promotes viability in the CHO-K1 cells. *Exp Cell Res* **314**, 2389-2399.
- Ramirez, R.D.; Herbert, B.S.; Vaughan, M.B.; Zou, Y.; Gandia, K.; Morales, C.P.; Wright, W.E.; Shay, J.W. (2003). Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon overexpression of Cdk4 in normal human epithelial cells. *Oncogene* **22**, 433-444.
- Ramirez, R.D.; Sheridan, S.; Girard, L.; Sato, M.; Kim, Y.; Pollack, J.; Peyton, M.; Zou, Y.; Kurie, J.M.; Dimaio, J.M., *et al.* (2004). Immortalization of human bronchial epithelial cells in the absence of viral oncoproteins. *Cancer Res* **64**, 9027-9034.
- Rangel, L.B.; Agarwal, R.; D'Souza, T.; Pizer, E.S.; Alo, P.L.; Lancaster, W.D.; Gregoire, L.; Schwartz, D.R.; Cho, K.R.; Morin, P.J. (2003). Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. *Clin Cancer Res* **9**, 2567-2575.
- Ribeiro, F.R.; Meireles, A.M.; Rocha, A.S.; Teixeira, M.R. (2008). Conventional and molecular cytogenetics of human non-medullary thyroid carcinoma: characterization of eight cell line models and review of the literature on clinical samples. *BMC Cancer* **8**, 371.
- Richter, H.; Braselmann, H.; Hieber, L.; Thomas, G.; Bogdanova, T.; Tronko, N.; Zitzelsberger, H. (2004). Chromosomal imbalances in post-chernobyl thyroid tumors. *Thyroid* **14**, 1061-1064.
- Ricke, R.M.; van Ree, J.H.; van Deursen, J.M. (2008). Whole chromosome instability and cancer: a complex relationship. *Trends Genet* **24**, 457-466.

- Ricken, A.; Lochhead, P.; Kontogiannia, M.; Farookhi, R. (2002). Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology* *143*, 2741-2749.
- Riesco-Eizaguirre, G.; Santisteban, P. (2007). New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* *14*, 957-977.
- Rigby, P.W.; Dieckmann, M.; Rhodes, C.; Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol* *113*, 237-251.
- Robinson, M.J.; Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* *9*, 180-186.
- Rodrigues, R.; Roque, L.; Espadinha, C.; Pinto, A.; Domingues, R.; Dinis, J.; Catarino, A.; Pereira, T.; Leite, V. (2007). Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas. *Oncol Rep* *18*, 917-926.
- Rogounovitch, T.I.; Saenko, V.A.; Ashizawa, K.; Sedliarou, I.A.; Namba, H.; Abrosimov, A.Y.; Lushnikov, E.F.; Roumiantsev, P.O.; Konova, M.V.; Petoukhova, N.S., *et al.* (2006). TP53 codon 72 polymorphism in radiation-associated human papillary thyroid cancer. *Oncol Rep* *15*, 949-956.
- Rojas-Burke, J. (1992). Scientists report surprise findings of thyroid cancer following Chernobyl. *J Nucl Med* *33*, 23N-24N, 33N-34N.
- Ron, E.; Lubin, J.; Schneider, A.B. (1992). Thyroid cancer incidence. *Nature* *360*, 113.
- Ron, E.; Lubin, J.H.; Shore, R.E.; Mabuchi, K.; Modan, B.; Pottern, L.M.; Schneider, A.B.; Tucker, M.A.; Boice, J.D., Jr. (1995). Thyroid cancer after exposure to external radiation: a pooled analysis of seven studies. *Radiat Res* *141*, 259-277.
- Ron, E.; Modan, B.; Preston, D.; Alfandary, E.; Stovall, M.; Boice, J.D., Jr. (1989). Thyroid neoplasia following low-dose radiation in childhood. *Radiation research* *120*, 516-531.
- Rossing, M.A.; Voigt, L.F.; Wicklund, K.G.; Daling, J.R. (2000). Reproductive factors and risk of papillary thyroid cancer in women. *Am J Epidemiol* *151*, 765-772.
- Ruiz, C.; Lenkiewicz, E.; Evers, L.; Holley, T.; Robeson, A.; Kiefer, J.; Demeure, M.J.; Hollingsworth, M.A.; Shen, M.; Prunkard, D., *et al.* (2011). Advancing a clinically relevant perspective of the clonal nature of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *108*, 12054-12059.
- Rumyantsev, P.O.; Saenko, V.A.; Ilyin, A.A.; Stepanenko, V.F.; Rumyantseva, U.V.; Abrosimov, A.Y.; Lushnikov, E.F.; Rogounovitch, T.I.; Shibata, Y.; Mitsutake, N., *et al.* (2011). Radiation exposure does not significantly contribute to the risk of recurrence of Chernobyl thyroid cancer. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* *96*, 385-393.
- Rybakov, S.J.; Komissarenko, I.V.; Tronko, N.D.; Kvachenyuk, A.N.; Bogdanova, T.I.; Kovalenko, A.E.; Bolgov, M.Y. (2000). Thyroid cancer in children of Ukraine after the Chernobyl accident. *World J Surg* *24*, 1446-1449.
- Sachs, L.; Hedderich, J. (2009). *Angewandte Statistik Methodensammlung mit R*, 13., aktual. und erweiterte Aufl. edn (Berlin, Springer).
- Saitoh, T.; Mine, T.; Katoh, M. (2002). Frequent up-regulation of WNT5A mRNA in primary gastric cancer. *Int J Mol Med* *9*, 515-519.



- Salajegheh, A.; Petcu, E.B.; Smith, R.A.; Lam, A.K. (2008). Follicular variant of papillary thyroid carcinoma: a diagnostic challenge for clinicians and pathologists. *Postgrad Med J* 84, 78-82.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Santarius, T.; Shipley, J.; Brewer, D.; Stratton, M.R.; Cooper, C.S. (2010). A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nature reviews Cancer* 10, 59-64.
- Santin, A.D.; Bellone, S.; Siegel, E.R.; McKenney, J.K.; Thomas, M.; Roman, J.J.; Burnett, A.; Tognon, G.; Bandiera, E.; Pecorelli, S. (2007). Overexpression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in uterine carcinosarcomas. *Clin Cancer Res* 13, 3339-3346.
- Santoro, M.; Melillo, R.M.; Fusco, A. (2006). RET/PTC activation in papillary thyroid carcinoma: European Journal of Endocrinology Prize Lecture. *Eur J Endocrinol* 155, 645-653.
- Sasaki, S.; Nakamura, T.; Arakawa, H.; Mori, M.; Watanabe, T.; Nagawa, H.; Croce, C.M. (2002). Isolation and characterization of a novel gene, hRFI, preferentially expressed in esophageal cancer. *Oncogene* 21, 5024-5030.
- Sasaki, S.; Watanabe, T.; Konishi, T.; Kitayama, J.; Nagawa, H. (2004). Effects of expression of hRFI on adenoma formation and tumor progression in colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Exp Clin Cancer Res* 23, 507-512.
- Schmid, K.W.; Sheu, S.-Y.; Görges, R.; Ensinger, C.; Tötsch, M. (2003). Tumoren der Schilddrüse. *Der Pathologe* 24, 357-372.
- Schmitz, S. (2007). Zellkultur (Heidelberg, Elsevier Spektrum Akademischer Verlag).
- Schock, G.; Gildehaus, N.; Lubenow, H.; Löffert, D.; Korfhage, C. (2005). Unbegrenzte DNA-Analysen durch Multiple Displacement Amplification. *BIOspektrum* 6, 781-782.
- Schonfeld, S.J.; Lee, C.; Berrington de Gonzalez, A. (2011). Medical exposure to radiation and thyroid cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23, 244-250.
- Schröck, E.; du Manoir, S.; Veldman, T.; Schoell, B.; Wienberg, J.; Ferguson-Smith, M.A.; Ning, Y.; Ledbetter, D.H.; Bar-Am, I.; Soenksen, D., *et al.* (1996). Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 273, 494-497.
- Schuuring, E.; Verhoeven, E.; Litvinov, S.; Michalides, R.J. (1993). The product of the EMS1 gene, amplified and overexpressed in human carcinomas, is homologous to a v-src substrate and is located in cell-substratum contact sites. *Mol Cell Biol* 13, 2891-2898.
- Seidensticker, M.J.; Behrens, J. (2000). Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta* 1495, 168-182.
- Sherman, S.I. (2003). Thyroid carcinoma. *Lancet* 361, 501-511.
- Shigematsu, I.; Thiessen, J.W. (1992). Childhood thyroid cancer in Belarus. *Nature* 359, 681.
- Shin, S.K.; Nagasaka, T.; Jung, B.H.; Matsubara, N.; Kim, W.H.; Carethers, J.M.; Boland, C.R.; Goel, A. (2007). Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology* 133, 1849-1857.
- Shizuya, H.; Birren, B.; Kim, U.J.; Mancino, V.; Slepak, T.; Tachiiri, Y.; Simon, M. (1992). Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA

- in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8794-8797.
- Shore, R.E.; Hildreth, N.; Dvoretzky, P.; Andresen, E.; Moseson, M.; Pasternack, B. (1993). Thyroid cancer among persons given X-ray treatment in infancy for an enlarged thymus gland. *American journal of epidemiology* 137, 1068-1080.
- Singh, B.; Lim, D.; Cigudosa, J.C.; Ghossein, R.; Shaha, A.R.; Poluri, A.; Wreesmann, V.B.; Tuttle, M.; Shah, J.P.; Rao, P.H. (2000). Screening for genetic aberrations in papillary thyroid cancer by using comparative genomic hybridization. *Surgery* 128, 888-893;discussion 893-884.
- Smida, J.; Salassidis, K.; Hieber, L.; Zitzelsberger, H.; Kellerer, A.M.; Demidchik, E.P.; Negele, T.; Spelsberg, F.; Lengfelder, E.; Werner, M., *et al.* (1999). Distinct frequency of ret rearrangements in papillary thyroid carcinomas of children and adults from Belarus. *Int J Cancer* 80, 32-38.
- Snijders, A.M.; Pinkel, D.; Albertson, D.G. (2003). Current status and future prospects of array-based comparative genomic hybridisation. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2, 37-45.
- Soares, P.; Trovisco, V.; Rocha, A.S.; Lima, J.; Castro, P.; Preto, A.; Maximo, V.; Botelho, T.; Seruca, R.; Sobrinho-Simoes, M. (2003). BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22, 4578-4580.
- Sobin, L.H.; Wittekind, C.; International Union against Cancer. (2002). TNM classification of malignant tumours, 6th edn (New York, Wiley-Liss).
- Spinelli, C.; Bertocchini, A.; Antonelli, A.; Miccoli, P. (2004). Surgical therapy of the thyroid papillary carcinoma in children: experience with 56 patients < or =16 years old. *J Pediatr Surg* 39, 1500-1505.
- Splinter, D.; Tanenbaum, M.E.; Lindqvist, A.; Jaarsma, D.; Flotho, A.; Yu, K.L.; Grigoriev, I.; Engelsma, D.; Haasdijk, E.D.; Keijzer, N., *et al.* (2010). Bicaudal D2, dynein, and kinesin-1 associate with nuclear pore complexes and regulate centrosome and nuclear positioning during mitotic entry. *PLoS Biol* 8, e1000350.
- Stein, L.; Rothschild, J.; Luce, J.; Cowell, J.K.; Thomas, G.; Bogdanova, T.I.; Tronko, M.D.; Hawthorn, L. (2010). Copy number and gene expression alterations in radiation-induced papillary thyroid carcinoma from chernobyl pediatric patients. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 20, 475-487.
- Steuer, E.R.; Wordeman, L.; Schroer, T.A.; Sheetz, M.P. (1990). Localization of cytoplasmic dynein to mitotic spindles and kinetochores. *Nature* 345, 266-268.
- Strachan, T.; Read, A.P. (2005). *Molekulare Humangenetik, Vol 3* (Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag).
- Stratton, M.R.; Campbell, P.J.; Futreal, P.A. (2009). The cancer genome. *Nature* 458, 719-724.
- Sutherland, R.L.; Musgrove, E.A. (2004). Cyclins and breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 95-104.
- Suzuki, T.; Maruno, M.; Wada, K.; Kagawa, N.; Fujimoto, Y.; Hashimoto, N.; Izumoto, S.; Yoshimine, T. (2004). Genetic analysis of human glioblastomas using a genomic microarray system. *Brain Tumor Pathol* 21, 27-34.
- Tanaka, H.; Bergstrom, D.A.; Yao, M.C.; Tapscott, S.J. (2005). Widespread and nonrandom distribution of DNA palindromes in cancer cells provides a

- structural platform for subsequent gene amplification. *Nature genetics* 37, 320-327.
- Tanaka, H.; Cao, Y.; Bergstrom, D.A.; Kooperberg, C.; Tapscott, S.J.; Yao, M.C. (2007). Intrastrand annealing leads to the formation of a large DNA palindrome and determines the boundaries of genomic amplification in human cancer. *Mol Cell Biol* 27, 1993-2002.
- Tanaka, H.; Yao, M.C. (2009). Palindromic gene amplification--an evolutionarily conserved role for DNA inverted repeats in the genome. *Nature reviews Cancer* 9, 216-224.
- Tanaka, J.; Ogura, T.; Sato, H.; Hatano, M. (1987). Establishment and biological characterization of an in vitro human cytomegalovirus latency model. *Virology* 161, 62-72.
- Tanenbaum, M.E.; Galjart, N.; van Vugt, M.A.; Medema, R.H. (2006). CLIP-170 facilitates the formation of kinetochore-microtubule attachments. *Embo J* 25, 45-57.
- Thomas, G.A.; Bethel, J.A.; Galpine, A.; Mathieson, W.; Krznaric, M.; Unger, K. (2011). Integrating research on thyroid cancer after Chernobyl--the Chernobyl Tissue Bank. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23, 276-281.
- Thompson, D.E.; Mabuchi, K.; Ron, E.; Soda, M.; Tokunaga, M.; Ochikubo, S.; Sugimoto, S.; Ikeda, T.; Terasaki, M.; Izumi, S., *et al.* (1994). Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part II: Solid tumors, 1958-1987. *Radiation research* 137, S17-67.
- Tomida, J.; Masuda, Y.; Hiroaki, H.; Ishikawa, T.; Song, I.; Tsurimoto, T.; Tateishi, S.; Shiomi, T.; Kameji, Y.; Kim, J., *et al.* (2008). DNA damage-induced ubiquitylation of RFC2 subunit of replication factor C complex. *J Biol Chem* 283, 9071-9079.
- Toumi, A.A.; El Hadj Oel, A.; Ben Mahmoud, L.K.; Ben Hmida Ael, M.; Chaar, I.; Gharbi, L.; Mzabi, S.; Bouraoui, S. (2010). The prognostic value of p73 overexpression in colorectal carcinoma: a clinicopathologic, immunohistochemical, and statistical study of 204 patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 18, 128-136.
- Troncone, G.; Russo, M.; Malapelle, U.; Accardo, M.; Ferraro, A.; Cozzolino, I.; Palombini, L. (2008). Cytological and molecular diagnosis of solid variant of papillary thyroid carcinoma: A case report. *Cytojournal* 5, 2.
- Tronko, M.D.; Bogdanova, T.I.; Komissarenko, I.V.; Epstein, O.V.; Oliynyk, V.; Kovalenko, A.; Likhtarev, I.A.; Kairo, I.; Peters, S.B.; LiVolsi, V.A. (1999). Thyroid carcinoma in children and adolescents in Ukraine after the Chernobyl nuclear accident: statistical data and clinicomorphologic characteristics. *Cancer* 86, 149-156.
- Tuttle, R.M.; Lukes, Y.; Onstad, L.; Lushnikov, E.; Abrosimov, A.; Troshin, V.; Tsyb, A.; Davis, S.; Kopecky, K.J.; Francis, G. (2008). *ret/PTC* activation is not associated with individual radiation dose estimates in a pilot study of neoplastic thyroid nodules arising in Russian children and adults exposed to Chernobyl fallout. *Thyroid* 18, 839-846.
- Tuttle, R.M.; Vaisman, F.; Tronko, M.D. (2011). Clinical presentation and clinical outcomes in Chernobyl-related paediatric thyroid cancers: what do we know now? What can we expect in the future? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 23, 268-275.
- Unger, K.; Malisch, E.; Thomas, G.; Braselmann, H.; Walch, A.; Jackl, G.; Lewis, P.; Lengfelder, E.; Bogdanova, T.; Wienberg, J., *et al.* (2008). Array CGH

- demonstrates characteristic aberration signatures in human papillary thyroid carcinomas governed by RET/PTC. *Oncogene* 27, 4592-4602.
- Unger, K.; Zitzelsberger, H.; Salvatore, G.; Santoro, M.; Bogdanova, T.; Braselmann, H.; Kastner, P.; Zurnadzhy, L.; Tronko, N.; Hutzler, P., *et al.* (2004). Heterogeneity in the distribution of RET/PTC rearrangements within individual post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 4272-4279.
- Unger, K.; Zurnadzhy, L.; Walch, A.; Mall, M.; Bogdanova, T.; Braselmann, H.; Hieber, L.; Tronko, N.; Hutzler, P.; Jeremiah, S., *et al.* (2006). RET rearrangements in post-Chernobyl papillary thyroid carcinomas with a short latency analysed by interphase FISH. *Br J Cancer* 94, 1472-1477.
- UNSCEAR (2008). Sources and effects of ionizing radiation : UNSCEAR 2008 report to the General Assembly, with scientific annexes (New York, United Nations).
- van Beers, E.H.; Joosse, S.A.; Ligtenberg, M.J.; Fles, R.; Hogervorst, F.B.; Verhoef, S.; Nederlof, P.M. (2006). A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *Br J Cancer* 94, 333-337.
- van de Wiel, M.A.; Kim, K.I.; Vosse, S.J.; van Wieringen, W.N.; Wilting, S.M.; Ylstra, B. (2007). CGHcall: calling aberrations for array CGH tumor profiles. *Bioinformatics* 23, 892-894.
- van de Wiel, M.A.; Smeets, S.J.; Brakenhoff, R.H.; Ylstra, B. (2005). CGHMultiArray: exact P-values for multi-array comparative genomic hybridization data. *Bioinformatics* 21, 3193-3194.
- van de Wiel, M.A.; van Wieringen, W.N. (2007). CGHregions: Dimension Reduction for Array CGH Data with Minimal Information Loss. *Cancer Inform* 3, 55-63.
- van Staveren, W.C.; Solis, D.W.; Delys, L.; Duprez, L.; Andry, G.; Franc, B.; Thomas, G.; Libert, F.; Dumont, J.E.; Detours, V., *et al.* (2007). Human thyroid tumor cell lines derived from different tumor types present a common dedifferentiated phenotype. *Cancer Res* 67, 8113-8120.
- Varis, A.; Zaika, A.; Puolakkainen, P.; Nagy, B.; Madrigal, I.; Kokkola, A.; Vayrynen, A.; Karkkainen, P.; Moskaluk, C.; El-Rifai, W., *et al.* (2004). Coamplified and overexpressed genes at ERBB2 locus in gastric cancer. *Int J Cancer* 109, 548-553.
- Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9, 138-141.
- Walinder, G. (1971). Determination of the 131 I dose to the mouse thyroid. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 10, 558-578.
- Walinder, G. (1972). Late effects of irradiation on the thyroid gland in mice. I. Irradiation of adult mice. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 11, 433-451.
- Walinder, G.; Sjoden, A.M. (1972). Late effects of irradiation on the thyroid gland in mice. II. Irradiation of mouse foetuses. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 11, 577-589.
- Walinder, G.; Sjoden, A.M. (1973). Late effects of irradiation on the thyroid gland in mice. III. Comparison between irradiation of foetuses and adults. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 12, 201-208.
- Ward, E.M.; Jemal, A.; Chen, A. (2010). Increasing incidence of thyroid cancer: is diagnostic scrutiny the sole explanation? *Future Oncol* 6, 185-188.
- Ward, J.F. (1994). The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol* 66, 427-432.

- Weaver, J.; Briscoe, C.; Kata, S.; Goodman, C.; Zitzelsberger, H.; Hieber, L.; Riches, A. (2011). Novel human prostate cell lines derived from the transition and peripheral zones of the prostate for carcinogenesis studies. *Oncol Rep* 25, 121-128.
- Wieland, G.; Orthaus, S.; Ohndorf, S.; Diekmann, S.; Hemmerich, P. (2004). Functional complementation of human centromere protein A (CENP-A) by Cse4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 24, 6620-6630.
- Williams, D. (2002). Cancer after nuclear fallout: lessons from the Chernobyl accident. *Nat Rev Cancer* 2, 543-549.
- Winegar, R.A.; Lutze, L.H.; Rufer, J.T.; Morgan, W.F. (1992). Spectrum of mutations produced by specific types of restriction enzyme-induced double-strand breaks. *Mutagenesis* 7, 439-445.
- Wittekind, C.; Meyer, H.J.; Bootz, F.; International Union against Cancer (2002). TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6. Aufl. edn (Berlin, Springer).
- Wreesmann, V.B.; Siczka, E.M.; Socci, N.D.; Hezel, M.; Belbin, T.J.; Childs, G.; Patel, S.G.; Patel, K.N.; Tallini, G.; Prystowsky, M., *et al.* (2004). Genome-wide profiling of papillary thyroid cancer identifies MUC1 as an independent prognostic marker. *Cancer Res* 64, 3780-3789.
- Yamazaki, M.; Nakamura, K.; Mizukami, Y.; Ii, M.; Sasajima, J.; Sugiyama, Y.; Nishikawa, T.; Nakano, Y.; Yanagawa, N.; Sato, K., *et al.* (2008). Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells. *Cancer Sci* 99, 1131-1138.
- Yang, X.; Li, H.; Liu, X.S.; Deng, A.; Liu, X. (2009). Cdc2-mediated phosphorylation of CLIP-170 is essential for its inhibition of centrosome reduplication. *The Journal of biological chemistry* 284, 28775-28782.
- Yoshioka, K.; Foletta, V.; Bernard, O.; Itoh, K. (2003). A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7247-7252.
- Yue, H.; Jiang, H.Y. (2005). Expression of cell cycle regulator p57kip2, cyclinE protein and proliferating cell nuclear antigen in human pancreatic cancer: an immunohistochemical study. *World J Gastroenterol* 11, 5057-5060.
- Zang, S.; Ji, C.; Qu, X.; Dong, X.; Ma, D.; Ye, J.; Ma, R.; Dai, J.; Guo, D. (2007). A study on Notch signaling in human breast cancer. *Neoplasma* 54, 304-310.
- Zhao, J.; Ni, H.; Ma, Y.; Dong, L.; Dai, J.; Zhao, F.; Yan, X.; Lu, B.; Xu, H.; Guo, Y. (2007). TIP30/CC3 expression in breast carcinoma: relation to metastasis, clinicopathologic parameters, and P53 expression. *Hum Pathol* 38, 293-298.
- Zhu, C.; Zheng, T.; Kilfoy, B.A.; Han, X.; Ma, S.; Ba, Y.; Bai, Y.; Wang, R.; Zhu, Y.; Zhang, Y. (2009). A birth cohort analysis of the incidence of papillary thyroid cancer in the United States, 1973-2004. *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association* 19, 1061-1066.
- Zhu, L.; Loo, W.T.; Cheng, C.W.; Chow, L.W. (2006a). Possible predictive markers related to micro-metastasis in breast cancer patients. *Oncol Rep* 15, 1217-1223.
- Zhu, Z.; Ciampi, R.; Nikiforova, M.N.; Gandhi, M.; Nikiforov, Y.E. (2006b). Prevalence of RET/PTC rearrangements in thyroid papillary carcinomas: effects of the detection methods and genetic heterogeneity. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 3603-3610.

Zitzelsberger, H.; Lehmann, L.; Hieber, L.; Weier, H.U.; Janish, C.; Fung, J.; Negele, T.; Spelsberg, F.; Lengfelder, E.; Demidchik, E.P., *et al.* (1999). Cytogenetic changes in radiation-induced tumors of the thyroid. *Cancer Res* 59, 135-140.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Dissertation wurde am Helmholtz Zentrum München in der Abteilung für Strahlenzytogenetik unter der Leitung von Prof. Dr. Horst Zitzelsberger durchgeführt. Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Horst Zitzelsberger für die Überlassung des Themas dieser Dissertation, seine sehr gute Betreuung und großartige Unterstützung sowie seinen fachlichen Rat in allen Phasen meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Thomas Cremer danke ich sehr für die Bereitschaft meine Dissertation vor der Fakultät zu vertreten und für die Erstellung des Erstgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Johannes Wienberg bedanke ich mich für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu erstellen.

Ein großer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Axel Walch, Dr. Annette Feuchtinger, Ulrike Buchholz und Claudia-Mareike Pflüger für ihre großartige Unterstützung bei den IHC-Experimenten.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen und Kollegen in der Abteilung für Strahlenzytogenetik für das angenehme Arbeitsklima, die gute Zusammenarbeit, ihre stete Hilfsbereitschaft sowie tatkräftige und moralische Unterstützung bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Kristian Unger für seine jederzeit gewährte und unverzichtbare Unterstützung. Ein besonderes Dankeschön geht an dieser Stelle auch an Herbert Braselmann, Randolph Caldwell, Steffen Heuer, Dr. Ludwig Hieber, Claire Innerlohinger, Elke Konhäuser, Dr. Ulrike Schötz, Aaron Selmeier und Dr. Verena Zangen.

Ein riesiges Dankeschön geht auch an meine lieben Kolleginnen Arundhathi Sriharshan und Isolde Summerer für ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinem Freund René und meiner Familie für die ausnahmslose Unterstützung auf meinem Weg bedanken.

### Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den .....

(Unterschrift)

### Erklärung

Hiermit erkläre ich, \*

- dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.
  
- dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.
  
- dass ich mich mit Erfolg der Doktorprüfung im Hauptfach .....  
und in den Nebenfächern .....  
bei der Fakultät für ..... der .....  
(Hochschule/Universität)  
unterzogen habe.
  
- dass ich ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich der Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den.....

(Unterschrift)

\*) Nichtzutreffendes streichen