

Aus der Abteilung für Strahlenzytogenetik  
Helmholtz Zentrum München  
Leiter: Prof. Dr. Horst Zitzelsberger

*Analyse histologischer und transkriptomischer Veränderungen in murinen  
Schilddrüsengeweben zu verschiedenen Zeitpunkten nach  $\gamma$ -Bestrahlung*

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Elena Stauffer

aus

Wien

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Zitzelsberger

Mitberichterstatter: PD Dr. Jörg Kumbrink  
apl. Prof. Dr. Christine Spitzweg  
Prof. Dr. Hans Arnholdt

-----  
Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2023

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Makroskopische Anatomie und Physiologie der menschlichen Schilddrüse.....	1
1.2	Mikroskopische Anatomie der menschlichen Schilddrüse.....	2
1.3	Neoplasien der Schilddrüse.....	2
1.4	Maligne Tumoren der humanen Schilddrüse.....	3
1.4.1	Papilläres Schilddrüsenkarzinom.....	4
1.4.2	Follikuläres Karzinom.....	4
1.4.3	Gering differenziertes Karzinom.....	5
1.4.4	Differenzierte Tumoren aus C-Zellen.....	5
1.4.5	Undifferenziertes (anaplastisches) Karzinom.....	5
1.5	Schilddrüsentumoren im Mausmodell - eine Gegenüberstellung.....	5
1.5.1	Die Schilddrüse der Maus.....	5
1.5.2	Klassifikation.....	6
1.5.3	Folliuläre Hyperplasie.....	6
1.5.4	Follikuläres Adenom.....	6
1.5.5	Follikuläres Karzinom.....	7
1.6	Karzinogenese.....	7
1.7	Molekulare Genetik des humanen Schilddrüsenkarzinoms.....	8
1.7.1	PI3K-AKT Signalweg.....	8
1.7.2	MAP Kinase (MAPK)-Signalweg.....	9
1.8	Strahleninduzierte Karzinogenese.....	10
1.9	Zielsetzung.....	11
2	Material und Methoden.....	13
2.1	Studiendesign.....	13
2.2	Mausmodell.....	13
2.3	Herstellung der Schnitte.....	14
2.3.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	14

2.4	Histologie .....	15
2.5	Laser Capture Mikrodisektion .....	15
2.6	RNA Isolation.....	16
2.7	Quantifikation und Qualitätskontrolle der isolierten RNA.....	17
2.8	Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels Next Generation Sequencing.....	17
2.9	Definition der Vergleichsgruppe .....	18
2.10	Statistische Datenanalyse .....	18
3	Ergebnisse .....	19
3.1	Ergebnisse der histologischen Auswertung .....	25
	A) Follikuläre Hyperplasie.....	27
	B) Follikuläres Adenom.....	28
3.2	Statistische Auswertung der histologischen Ergebnisse.....	29
3.3	Auswertung der Immunzellen in den untersuchten Geweben .....	30
3.4	Molekulare Charakterisierung der proliferativen Veränderungen .....	33
3.5	Differenzielle Genexpressionsanalyse zwischen verschiedenen experimentellen Gruppen .....	34
4	Diskussion .....	38
4.1	Histologische Veränderungen nach Strahlenexposition .....	40
4.2	Immunzellinfiltration in histologischen Subgruppen .....	41
4.3	Molekulargenetische Veränderungen in histologischen Subgruppen .....	42
5	Zusammenfassung.....	45
6	Summary .....	47
7	Abbildungsverzeichnis.....	49
8	Abkürzungsverzeichnis.....	50
9	Tabellenverzeichnis .....	52
10	Literaturverzeichnis.....	53
11	Danksagung.....	59
12	Lebenslauf .....	60

# 1 Einleitung

Die Schilddrüse ist sowohl bei der Maus als auch beim Menschen ein zentrales endokrines Organ, das den Stoffwechsel und die Entwicklung steuert. Die menschliche Hormondrüse hat ähnliche morphologische und physiologische Eigenschaften wie die Mausschilddrüse, die in der vorliegenden Arbeit als Modellsystem untersucht wurde. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wird zunächst auf die Eigenschaften der Schilddrüse beim Menschen eingegangen.

## 1.1 Makroskopische Anatomie und Physiologie der menschlichen Schilddrüse

Die menschliche Schilddrüse befindet sich ventral der Trachea unterhalb des Kehlkopfs (Abbildung 1). Sie besteht aus zwei schmetterlingsförmigen Lappen und einem mittig gelegenen Isthmus, der die beiden seitlichen Lappen verbindet. Eine zweischichtige Bindegewebskapsel umschließt die Schilddrüse, die äußere Schicht grenzt die Schilddrüse von den umliegenden Strukturen, wie Muskeln, Faszien und Gefäßen ab, die innere Kapsel ist mit dem Schilddrüsengewebe verbunden. Zwischen den verschiedenen Schichten liegen die Nebenschilddrüsen (Schünke et al., 2012). Das Gewicht einer Schilddrüse beim Erwachsenen beträgt zwischen 20-25 g (Lüllmann-Rauch, 2012).

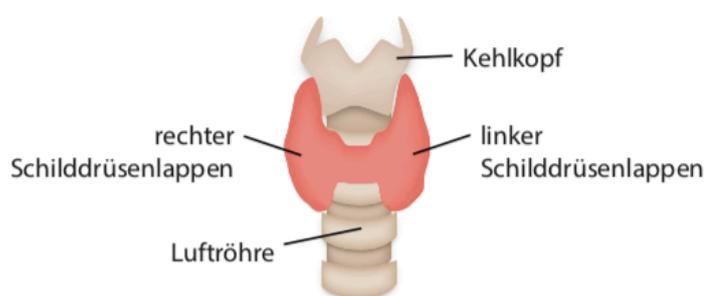


Abbildung 1 Schematischer Aufbau einer menschlichen Schilddrüse

Die menschliche Schilddrüse produziert neben Calcitonin die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T<sub>3</sub>) und Thyroxin (T<sub>4</sub>), die in vielfältigen Vorgängen wie Wachstum, Entwicklung, Grundumsatz, Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel bedeutsam sind. Diese Hormonfunktion der Schilddrüse unterliegt einem Regelkreis, in dem das aus der Hypophyse stammende Thyroid

stimulating Hormone (Wiltshire et al., 2016) und das vom Hypothalamus produzierte Thyrotropin-releasing Hormone (TRH) regulierend in die Ausschüttung dieser Schilddrüsenhormone eingreifen (Klinke et al., 2009).

## 1.2 Mikroskopische Anatomie der menschlichen Schilddrüse

Das Schilddrüsengewebe besteht mikroskopisch mehrheitlich aus Follikeln, welche kugelförmige Hohlräume bilden. Diese sind durch ein einschichtiges Epithel, den Thyreozyten ausgekleidet, welches abhängig von seinem Aktivitätszustand hoch oder flach erscheinen kann. Die Thyreozyten sind verantwortlich für die Bildung und Sekretion von T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> und Globuline (Jodthyreoglobulin) in die Follikelhohlräume, in denen auch die Speicherung erfolgt. Dies zeigt sich mikroskopisch als homogen färbbare strukturlose Masse, dem sogenannten Kolloid. Eine Basalmembran und ein Kapillarnetz umschließen die Follikel. Der Durchmesser der Follikel kann unterschiedlich lang sein und variiert durchschnittlich zwischen 50-900µm (Lüllmann-Rauch, 2012).

Die andere endokrin aktive Zellart sind die sogenannten C-Zellen, die parafollikulär liegen und ohne Bezug zu dem Follikellumen sind. Sie können einzeln oder in Gruppen vorliegen. Die C-Zellen produzieren das Hormon Calcitonin, welches eine wichtige Rolle im Calcium Haushalt spielt (Lüllmann-Rauch, 2012).

## 1.3 Neoplasien der Schilddrüse

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wird hauptsächlich auf Schilddrüsenveränderungen im Mausmodell eingegangen, um wissenschaftliche Grundlagen zu schaffen, deren Relevanz beim Menschen überprüft wird. Deshalb werden im Folgenden die Grundlagen der humanen Schilddrüsenneoplasien vorgestellt.

Hyperplasien der Follikelepithelien sind beim Menschen die am häufigsten anzutreffenden Veränderungen der Schilddrüse (Sheu et al., 2003). Diese können multiple Ursachen haben, wie zum Beispiel eine Mangelversorgung mit Jod in der Ernährung, die zur Entstehung des endemischen Kropfs (Struma) führen kann.

Ebenfalls wird das follikuläre Adenom sehr häufig in der Schilddrüse nachgewiesen. Es wird als gutartiger gekapselter Tumor mit Follikelzellendifferenzierung definiert, welcher aber weder Kernmerkmale des papillären Schilddrüsenkarzinoms noch Zeichen der Invasion (Kapseldurchbruch, Gefäßinvasion) aufweist. Es handelt sich meist um einen solitären Tumor mit einer vollständigen dünnen Bindegewebskapsel, der unterschiedliche histologische Muster

aufweisen kann (Rosai and Ackerman, 1996). Im Folgenden werden die wichtigsten Typen der Schilddrüsentumoren vorgestellt.

## 1.4 Maligne Tumoren der humanen Schilddrüse

Schilddrüsenkarzinome machen 1% aller Malignome weltweit aus und sind die häufigsten Tumoren des endokrinen Systems (DeLellis RA, 2004). Im Jahr 2017 erkrankten in Deutschland laut Daten des Robert Koch Instituts 2.192 Männer und 5.040 Frauen neu an Schilddrüsenkrebs (Robert Koch Insitut,2018).

Die Einteilung der Schilddrüsentumoren erfolgt anhand der WHO Klassifikation in differenzierte Tumore mit Follikelzell- oder C-Zell-Ursprung, gering differenzierte und undifferenzierte Tumore. Etwa 95-97% aller Schilddrüsenkarzinome differenzieren sich aus den Follikelzellen, 3% aus den C-Zellen, die anderen seltenen Karzinome entstammen verschiedenen metaplastischen Läsionen, entwicklungsgeschichtlichen Resten oder ektopen Geweben (Schmid et al., 2003).

Zu den verschiedenen Typen der differenzierten Tumoren gehört das papilläre Karzinom und das follikuläre Karzinom. Beide differenzieren sich aus Follikelzellen und machen etwa 88-97% aller Schilddrüsenkarzinome aus (Schmid et al., 2003).

*Tabelle 1 Übersicht über die humane Schilddrüsentumoren*

<b>Differenzierte Tumoren</b>	<b>Gering differenzierte Tumoren</b>	<b>Nicht differenzierte Tumoren</b>
<u>Follikuläres Karzinom</u> <i>minimal invasiver Typ</i> <i>grob invasiver Typ</i>	<u>Gering differenziertes Karzinom</u>	<u>Anaplastisches Karzinom</u>
<u>Papilläres Karzinom</u> <i>follikulärer Typ</i> <i>diffus sklerosierender Typ</i> <i>kolumnärzelliger Typ</i> <i>onkozytärer Typ</i> <i>papilläres Mikrokarzinom</i> <i>gekapselter Typ</i> <i>großzelliger Typ</i>		
<u>Medulläres Karzinom (C-Zell Ursprung)</u>		

### 1.4.1 Papilläres Schilddrüsenkarzinom

Das invasiv wachsende papilläre Schilddrüsenkarzinom hat das höchste Vorkommen mit >80% aller Schilddrüsenkarzinome in ausreichend jodversorgten Gebieten. Mit einer Überlebensrate von über 90% hat das papilläre Karzinom eine sehr gute Prognose (La Vecchia et al., 2015).

Beim papillären Karzinom ist histologisch die klassische papilläre Architektur zu beobachten, die in verschiedenen Varianten vorliegen kann. Die einzelnen Papillen sind komplex verzweigte Verästelungen die mit einem Epithel mit gestörter Polarität überzogen sind. Neben der Zellform sind bestimmte Kernmerkmale wie unregelmäßige Zellkernmembranen mit Einkerbungen, „Milchglaskerne“, Pseudoinklusionen oder Überlappungen der Kerne für das papilläre Schilddrüsenkarzinom charakteristisch und zwingend für eine Diagnose. Psamomkörperchen, welche Kalzifizierungen darstellen, sind typisch und häufig in der Histologie darstellbar. Das papilläre Schilddrüsenkarzinom metastasiert größtenteils lymphogen.

Das Gewebe besteht meistens aus mehreren histologischen Mustern und selten ausschließlich aus papillärer Struktur. Es werden mehrere Subtypen des papillären Karzinoms unterschieden, die Diagnose richtet sich nach der dominant vorkommenden histologischen Architektur (DeLellis RA, 2004, Jokinen and Botts, 1994, Baloch and LiVolsi, 2018, Rosai and Ackerman, 1996). Diese Subtypen werden im Folgenden nicht im Detail beschrieben, da sie in den untersuchten Mausmodellen eine geringe Relevanz haben.

### 1.4.2 Follikuläres Karzinom

Das follikuläre Karzinom wird als maligner Tumor mit Differenzierung der Follikelzellen definiert, aber im Gegensatz zu dem papillären Karzinom ohne die charakteristischen Kernmerkmale (DeLellis RA, 2004).

In Iodmangelgebieten ist das follikuläre Karzinom gleich oft oder häufiger als das papilläre Karzinom zu beobachten. Es tritt häufiger bei Frauen als bei Männern auf. Die Metastasierung erfolgt hämatogen in die Lunge, das Skelettsystem und das Gehirn (Sheu et al., 2003). Das follikuläre Karzinom kann in der Histologie als hochdifferenziertes follikelbildendes Karzinom auftreten oder aber auch trabekuläre oder insuläre Strukturen aufweisen. Das invasive Wachstum des follikulären Karzinoms spielt eine essentielle Rolle in der Abgrenzung zum Adenom, da beim Karzinom keine charakteristischen Kernmerkmale wie beim papillären Karzinom vorliegen.

Es werden zwei relevante Subtypen des follikulären Karzinoms unterschieden, der minimal invasive und der grob invasive Typus. Der minimal invasive Typus zeichnet sich durch einzelne

Gefäßeinbrüche und/oder Kapseleinbrüche aus, während der grob invasive multiple Invasionen ins benachbarte Gewebe und Gefäße aufweist (DeLellis RA, 2004).

### 1.4.3 Gering differenziertes Karzinom

Das gering differenzierte Karzinom nimmt eine Position zwischen den differenzierten Tumoren und den undifferenzierten (anaplastischen) Tumoren ein. Zu den Malignitätskriterien gehört das Auftreten von überwiegend in gemischten Anteilen spindelförmigen, trabekulären oder insulären Mustern, das Fehlen von Kernmerkmalen des papillären Schilddrüsenkarzinoms und Nekrosen und einem erhöhten Mitose-Index (Volante et al., 2008).

### 1.4.4 Differenzierte Tumoren aus C-Zellen

Das medulläre Karzinom geht aus differenzierten C- Zellen hervor und macht circa 5-10% aller Schilddrüsenkarzinome aus. 20% der medullären Schilddrüsenkarzinome entstehen im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN) Erkrankung, die übrigen treten sporadisch auf (Cabanillas et al., 2016). In dieser Arbeit wird das medulläre Karzinom nur der Vollständigkeit halber aufgeführt und hat im untersuchten Kontext - ebenso wie das nachfolgende anaplastische Karzinom - keine Bedeutung.

### 1.4.5 Undifferenziertes (anaplastisches) Karzinom

2-15% aller Schilddrüsenkarzinome sind undifferenzierte Karzinome (Schmid et al., 2003). Die WHO definiert diese Karzinome als „hochmaligne Tumoren, welche ganz oder teilweise aus undifferenzierten Zellen zusammengesetzt sind“. Die häufigsten histologischen Zellformen sind Riesenzellen und Spindelzellen (Ragazzi et al., 2014).

## 1.5 Schilddrüsentumoren im Mausmodell - eine Gegenüberstellung

### 1.5.1 Die Schilddrüse der Maus

Für diese Arbeit, die sich mit Mausmodellen der strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinogenese beschäftigt, sind die histologischen und biologischen Eigenschaften der Schilddrüse in der Maus am relevantesten und werden im Folgenden im Detail näher beleuchtet.

Sowohl anatomisch (Aufbau und Lokalisation) als auch histologisch unterscheidet sich die Schilddrüse der Maus von der des Menschen nur unwesentlich. Sie besteht ebenfalls aus zwei

Lappen, die durch einen Isthmus verbunden sind und ist vor der Trachea lokalisiert. Es erfolgt, wie beim Menschen, die Produktion und Sekretion von T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> und Calcitonin.

Aufgrund dieser histologischen und biologischen Ähnlichkeiten zwischen menschlichen und murinen Schilddrüsen, kann anhand der Schilddrüse der Maus die Pathogenese der Schilddrüsenkarzinome untersucht und deren zugrunde liegenden molekulare Mechanismen besser verstanden werden (Perlman, 2016).

### 1.5.2 Klassifikation

In der histologischen Einteilung der murinen Schilddrüsenkarzinome werden alle differenzierten Karzinome unter dem Begriff follikuläres Karzinom zusammengefasst. Es existiert keine weitere Klassifizierung in papilläre, follikuläre oder gering differenzierte Karzinome. Die Invasion in Lymphgefäße oder in umliegendes Gewebe dient als eines der Hauptkriterien zur Abgrenzung eines Karzinoms. Oft ist eine klare Trennung der verschiedenen Läsionen nicht möglich, die Größe der Läsion sollte kein Kriterium zur Unterteilung zwischen Hyperplasie, Adenom und Karzinom sein (Capen, 2001b).

### 1.5.3 Follikuläre Hyperplasie

Die follikuläre Hyperplasie definiert die Zunahme der Zellzahl und damit verbunden eine Vergrößerung des Gewebes. Follikuläre Hyperplasien können fokal oder diffus auftreten, und sind meist schlecht abgrenzbar zu dem benachbarten Gewebe. Die hyperplastischen Zellen können kleine abnorm geformte Follikel, die wenig oder kein Kolloid einschließen, oder papilläre Formationen bilden. Aufgrund dieser Diversität ist der Übergang zu einem Adenom oft fließend und eine Abgrenzung nicht möglich (Jones et al., 2012). Kriterien, die zur Unterscheidung dienen sind: Hyperplasien sind nicht von einer Kapsel umgeben und eine Kompression zu dem umliegenden Gewebe ist nur minimal. Außerdem handelt es sich beim papillären Muster einer Hyperplasie um sogenannte Pseudopapillen ohne Bindegewebsstock (Radovsky et al., 1999).

### 1.5.4 Follikuläres Adenom

Das follikuläre Adenom wird als gut umschriebener Knoten differenzierter Follikelzellen beschrieben. Die Zellen können normal groß bis etwas vergrößert sein und haben eine kuboidale oder kolumnäre Form (Jones et al., 2012). Eine Kapsel ist oft Bestandteil des Adenoms, aber im Unterschied zu humanen Adenomen nicht obligat, kann aber auch unvollständig sein. Im Gegensatz zur follikulären Hyperplasie ist eine Kompression zu beobachten, jedoch nie eine

Infiltration des umliegenden Gewebes. Die Architektur des Adenoms kann verschiedene Muster zeigen, dabei wird ein follikuläres, papilläres oder solides Wachstum unterschieden. Es können aber auch alle Formen simultan vorkommen. Das papilläre Wachstum zeichnet sich durch komplexe verästelte Strukturen, die sich in das Lumen stülpen, und ein einschichtiges Epithel, das einen Bindegewebsstock überzieht, aus. Die Zellkerne sind oval vergrößert und Mitosefiguren sind selten (Capen, 2001a).

### 1.5.5 Follikuläres Karzinom

Das follikuläre Karzinom wird als schlecht abgrenzbarer, aggressiv invasiv wachsender maligner Tumor definiert. Meistens bilden die Zellen ein solides Wachstumsmuster, es kann aber auch durch follikuläres oder papilläres Muster gekennzeichnet sein. Das dominante erkennbare Muster führt zur histologischen Diagnose und definiert den Subtyp. Eine Bindegewebskapsel ist oft präsent, aber kein obligates Diagnosekriterium, die häufig mit einer vermehrten Fibrose der Kapsel und des Bindegewebes einhergeht. Im Gegensatz zu Hyperplasien und Adenomen sind Karzinome von einem mehrschichtigen Epithel charakterisiert. Die Zellkerne erscheinen atypisch und pleomorph und sind meistens vergrößert (Capen, 2001a). Mitotische Figuren sind variabel, und regelmäßig in großer Zahl zu finden (Radovsky et al., 1999).

## 1.6 Karzinogenese

Bei dem komplexen Prozess der Karzinogenese handelt es sich um ein mehrstufiges Ereignis. Dies bedeutet, nicht ein, sondern mehrere aufeinanderfolgende Veränderungen führen zu einer Krebserkrankung (Barrett and Wiseman, 1987).

Es wird postuliert, dass eine Reihe von Mutationen für die Progression von normalen Zellen zu ungebremst invasiv wachsenden bösartigen Zellen nötig sind (Vogelstein and Kinzler, 1993). Es wurden unter den „Hallmarks of cancer“ charakteristische Eigenschaften der Krebszellen zusammengefasst. Die Unabhängigkeit von exogenen Wachstumssignalen, eine fehlende Sensitivität gegenüber wachstumsinhibierenden Signalen, das eigenständige Erhalten der Proliferation, und ein unbegrenztes replikatives Potential bei Vermeidung des programmierten Zelltods (Apoptose) zählen zu den beschriebenen Mechanismen der Krebszellen (Hanahan and Weinberg, 2011).

Die Autoren Hanahan und Weinberg beschreiben außerdem einen deregulierten Metabolismus, die Fähigkeit zur Angiogenese, Gewebsinvasion und Metastasierung, und die Umgehung des

Immunsystems. Diese Kennzeichen der neoplastischen Zellen sind auf genetische und epigenetische Veränderungen zurückzuführen (Hanahan and Weinberg, 2000).

Mutationen im genetischen Code können vererbt, spontan, oder durch Umweltfaktoren (UV-Licht, ionisierende Strahlung, Metalle) und virale Onkogene ausgelöst werden. Eine Schlüsselrolle kommt den Onkogenen zu, welche durch eine Mutation, Amplifikation oder Translokation aus Protoonkogenen entstehen. Protoonkogene sind wichtig für Zellwachstum und Zellzyklus und nur durch deren Mutation ist eine Entkoppelung von Wachstumssignalen und ein ungebremstes Wachstum der Zelle möglich (Anderson et al., 1992).

## 1.7 Molekulare Genetik des humanen Schilddrüsenkarzinoms

Der Großteil der Schilddrüsenkarzinome ist klonalen Ursprungs und entwickelt sich aus einer genetisch mutierten, somatischen Vorläuferzelle (Lehnert, 2012).

Die Identifikation einiger genetischer Alterationen ermöglicht es heute, die molekularen Mechanismen der Schilddrüsenkrebsentstehung besser zu verstehen. Diese genetischen Veränderungen, die vor allem den MAPK-Signalweg oder den PI3K/AKT-Signalweg aktivieren, spielen eine zentrale Rolle bei der Schilddrüsenkarzinogenese (Nikiforova and Nikiforov, 2008, Kondo et al., 2006, Murugan and Xing, 2011).

Die molekulare Genetik der humanen Schilddrüsenkarzinome ist vergleichbar in den murinen Schilddrüsenkarzinomen und somit in dieser Arbeit übertragbar. Im folgenden Abschnitt werden die einzelnen Signalwege mit ihren Mutationen näher beleuchtet.

### 1.7.1 PI3K-AKT Signalweg

Der komplexe PI3K-AKT Weg spielt eine fundamentale Rolle beim Zellwachstum, bei der Proliferation, der Apoptose und beim Stoffwechsel der Zelle.

Veränderungen im PI3K-AKT Weg finden sich typischerweise in follikulären Adenomen und Karzinomen, während bei papillären Schilddrüsenkarzinomen der MAP Kinase Weg aktiviert ist (Saji and Ringel, 2010). Studien konnten zeigen, dass beide Signalwege häufig simultan aktiviert sind. Genveränderungen, die beide Signalwege aktivieren, sind wichtige Prozesse in der Tumorgenese des anaplastischen Karzinoms in der Schilddrüse (Abbildung 2) (Liu et al., 2008) (Xing, 2013).

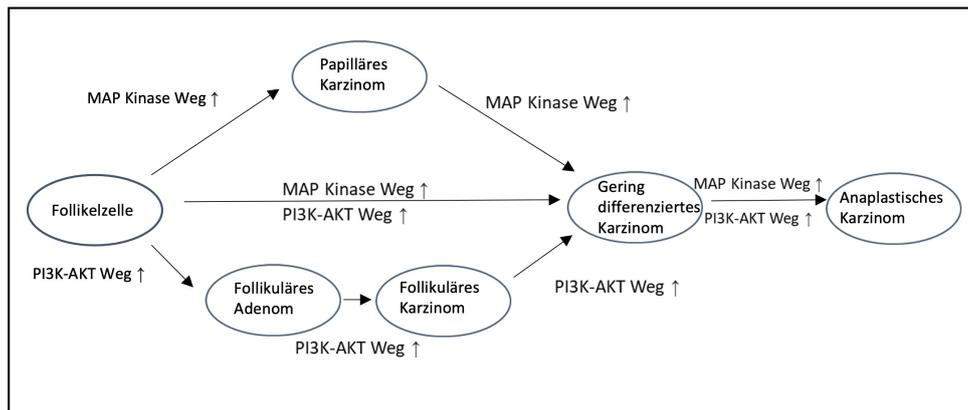


Abbildung 2 Zusammenhänge der Signalwege in der Schilddrüsenkarzinogenese modifiziert nach Xing et al. (Xing, 2013)

### 1.7.2 MAP Kinase (MAPK)-Signalweg

Die MAPK Kaskade ist bei der Signaltransduktion zwischen extrazellulären Signalen zum Zellkern von Bedeutung, sie reguliert zelluläre Prozesse wie Genexpression, Zellzyklus, Zellstoffwechsel, Motilität, Apoptose und Differenzierung (Krishna and Narang, 2008) (Abbildung 3).

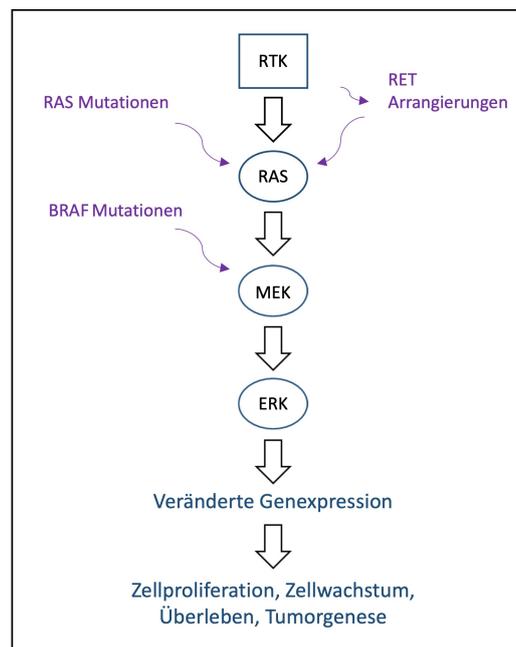


Abbildung 3 MAP Kinase Kaskade modifiziert nach Xing et al. (Xing, 2013)

Der klassische MAP Kinase Weg wird dargestellt, der von einem extrazellulären Stimulus über eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) in der Zellmembran aktiviert wird und zu RAS, MEK und ERK Aktivierungen führt. RET Arrangierungen können eine unabhängig von extrazellulären Signalen den Signalweg aktivieren, ebenso BRAF Mutationen.

BRAF ist ein Protoonkogen, gehört zu den RAF Kinasen und stellt ein intrazelluläres Glied des MAPK Signalwegs dar (Zhu and Cheng, 2009). Als Konsequenz einer Mutation wird die für das Gen codierte Serin-Threonin-Kinase aktiviert und der MAP Kinase Weg dauerhaft aktiviert. In der

Tumorgenese des Schilddrüsenkarzinoms ist das BRAF-V600E Protein, welches aus einer T1799A Punktmutation hervorgeht, die bekannteste Mutation und konnte in ca. 45% der papillären Karzinome gefunden werden (Cohen et al., 2003) (Xing, 2005).

Neben BRAF Mutationen sind RAS Mutationen verbreitet. RAS ist ein Guanin bindendes Protein, das eine Kontrollfunktion in der zellulären Signaltransduktion besitzt. RAS kann in zwei Formen vorliegen, einmal als inaktives GDP gebundenes, oder als aktives GTP gebundenes, bei einer mutierten Form kommt es zur dauerhaften Aktivierung von RAS und der nachgeschalteten Signalwege (Zhu and Cheng, 2009). RAS ist typischerweise ein Aktivator des MAP Kinase Wegs aber auch des PI3K-AKT Signalwegs (Abubaker et al., 2008). Das Vorkommen von RAS Mutationen in follikulären Adenomen kann in der malignen Entartung von Bedeutung sein (Xing, 2013). Studien im Tiermodell haben gezeigt, dass zusätzliche Mutationen nötig sein müssen, um Karzinome aus Adenomen mit einer RAS Mutation zu entwickeln (Miller et al., 2009).

Beim papillären Schilddrüsenkarzinom ist eine der häufigsten genetischen Veränderungen die RET Translokation, auch bekannt als das RET/PTC-Rearrangement. Karzinome mit einem RET/PTC-Rearrangement werden gehäuft bei Kindern und nach Strahlenbelastung in der Literatur beschrieben. RET ist eine Rezeptortyrosin Kinase in der Zellmembran, welche extrazelluläre Wachstumssignale an die Zelle weiterleitet. Eine RET Translokation führt zu einer konstitutiven Tyrosin Kinase Aktivität und aktiviert im weiteren Schritt den MAPKinase Signalweg.

Es entstehen intrachromosomale Umlagerungen, die aus der Fusion der Tyrosinkinase-Domäne von RET mit dem 5'-Teil verschiedener Gene resultieren. Es bestehen mehr als zehn verschiedene Typen der RET-PTC Translokationen, die häufigsten sind RET-PTC1 und RET-PTC3 (Rabes et al., 2000) (Klugbauer et al., 1998). Andere RET/PTC-Varianten entstehen dagegen durch Translokationen zwischen verschiedenen Chromosomen.

## 1.8 Strahleninduzierte Karzinogenese

Die Schilddrüse ist bei Kindern und Heranwachsenden ein strahlensensitives Organ. Nach Strahlenexposition kommt es in den Thyreozyten zu DNA Schäden (Mutationen und DNA Doppelstrangbrüche). Die Schädigungen der DNA können einerseits direkt durch die Interaktion von Strahlung und DNA, oder indirekt durch Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen verursacht werden und können in einer malignen Zelltransformation und daraus entstehenden Tumoren resultieren (Gerok, 2007). Die Strahlenexposition der Schilddrüse kann durch eine externe Strahlenquelle oder durch eine Anreicherung von aufgenommenen radioaktivem Iodisotopen erfolgen, die beispielsweise durch einen Reaktorunfall freigesetzt wurden.

Als Folge des Reaktorunfalls in Tschernobyl 1986 wurden umfassende Studien über die epidemiologischen Auswirkungen der Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und die

molekularen Charakteristika strahleninduzierter Malignome durchgeführt. In diesen Studien konnte eine Zunahme der Inzidenz der Schilddrüsenkarzinome bei exponierten Menschen beobachtet werden. Besonders betroffen waren Kinder und Jugendlichen, da das stetige Wachstum der kindlichen Schilddrüse zu einer besonders starken Dosisbelastung geführt hat. Die hohe Dosisbelastung in Verbindung mit der hohen Strahlenempfindlichkeit der kindlichen Schilddrüse wurde für die höchste Inzidenzrate bei Kindern und Jugendlichen unter allen untersuchten Altersgruppen verantwortlich gemacht (Cahoon et al., 2017) (Efanov et al., 2018) (Nikiforov, 2006, Kazakov et al., 1992) (Zablotska et al., 2008). Dabei wurde das papilläre Karzinom nach Strahlenexposition bei Kindern am häufigsten beobachtet. In diesem Zusammenhang werden dem RET Rearrangement eine wichtige Rolle zugeschrieben (Hamatani et al., 2008).

Es wurden noch eine Reihe weiterer strahlenspezifische Veränderungen in kindlichen Schilddrüsenkarzinomen beschrieben: der DNA Zugewinn 7q11 und die Überexpression des CLIP2-Gens als strahlenbedingte molekulare Marker (Selmansberger et al., 2015, Hess et al., 2011). Morton et al. charakterisierten eine große PTC Kohorte aus der Ukraine und konnten zeigen, dass durch ionisierende Strahlung verursachte DNA-Schäden, insbesondere Doppelstrangbrüche, ein frühes karzinogenes Ereignis bei der Schilddrüsentumorigenese nach Strahlenbelastung darstellen. Die Doppelstrangbrüche werden nicht durch die Strahlenbelastung, sondern durch spezifische Treibermutationen bestimmt (Morton et al., 2021).

## 1.9 Zielsetzung

Frühe Veränderungen in der Schilddrüse nach Strahlenexposition sind wenig erforscht und daher überwiegend unbekannt. Ziel dieser Arbeit sollte es deshalb sein, histologische und molekulare Prozesse in den frühen Stadien der Karzinogenese in der Schilddrüse zu untersuchen und zu charakterisieren.

Zu diesem Zweck wurde ein zur Verfügung gestelltes Mausmodell verwendet, in welchem Mäuse eine einmalige Bestrahlung niedriger Dosis (0,063 Gy – 0,5 Gy), erhielten und mit einer unbestrahlten Kontrollgruppe verglichen wurden. Die Versuchstiere wurden an vorbestimmten Zeitpunkten exekutiert und dann histologisch aufgearbeitet.

Das erste Teilziel war auf die histologische Ebene fokussiert. Das Gewebe sollte mikroskopisch insbesondere auf Entzündungs-, Dysplasie- und bereits sichtbare Neoplasiezeichen untersucht werden, und entsprechend den Klassifikationen eingeteilt werden. Auch das Tumor-umgebende Gewebe sollte in diese Untersuchung einbezogen werden.

Als weiteres Ziel sollte eine Methode etabliert werden, die es erlaubt mikrodisektierte Tumorareale zu isolieren und die daraus gewonnene RNA zu sequenzieren. Die histologisch identifizierten

Läsionen sollten mittels Laser Mikrodisektion separiert werden. Die besondere Herausforderung war, die geeignete Bedingungen zu schaffen um eine Probenqualität zu erhalten, sodass trotz zu erwartender geringer Materialmenge eine nutzbare Datenqualität in der anschließenden RNA Isolation und Sequenzierung erreicht werden kann.

Des Weiteren wurde das Ziel verfolgt, die gemessenen Transkriptomdaten bioinformatisch auszuwerten und unterschiedliche Genexpressionen und Signalwege zwischen bestrahlten und unbestrahlten sowie zwischen verschiedenen Gewebeläsionen zu bestimmen. Dadurch sollten Erkenntnisse über die frühen molekularen Prozesse erhalten werden. Die Genexpressionsanalysen sollten insbesondere die Signalwege beleuchten, die bei der Schilddrüsenkarzinogenese hoch- oder herunterreguliert sind und Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Läsionen anzeigen.

Zusammenfassend sollten die molekularen Mechanismen der strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinogenese im Mausmodell aufgeklärt werden und erste Strategien zur Translation der Ergebnisse auf menschliche Schilddrüsenkarzinome entwickelt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Um die Effekte von Low Dose Bestrahlung in der Schilddrüse zu untersuchen, sind die Versuchstiere in verschiedene Gruppen eingeteilt worden. Es wurden drei verschiedene Gray Stärken (0.063 Gy, 0.125 Gy und 0.5 Gy) gewählt und eine Kontrollgruppe, welche nicht bestrahlt wurde. Es wurden verschiedene Zeitpunkte bestimmt, um Effekte möglichst früh zu erfassen (Abbildung 4).

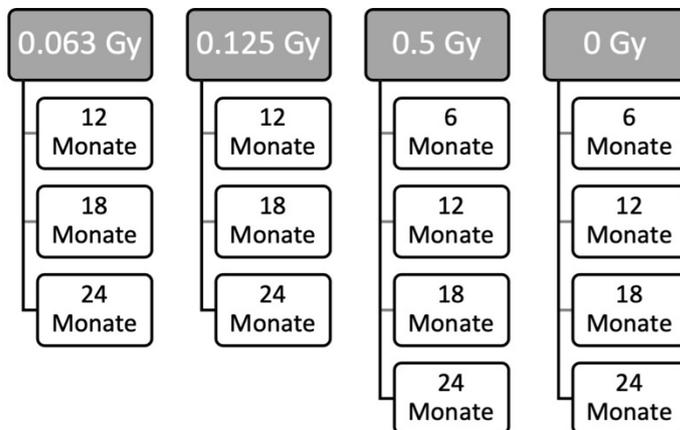


Abbildung 4 Experimentelle Gruppen

### 2.2 Mausmodell

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere stammten aus eigener Zucht. Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Oberregierung Bayern genehmigt (55.2-1-54-2532-161-12). Insgesamt 246 Mäuse wurden eingeschlossen, bei einer Aufteilung von 122 männlichen zu 124 weiblichen Mäusen. Es wiesen circa 50% der in die Studie einbezogenen Mäuse eine heterozygote Mutation des ERCC2-Gens auf. Allerdings wurde keine Assoziation zwischen Schilddrüsenneoplasien und ERCC2-Genmutation beschrieben. Eine detaillierte Beschreibung des genetischen Hintergrunds dieser Mäuse wurde von Dalke et al. veröffentlicht (Dalke et al., 2018).

Im Alter von 10( $\pm$ 10 Tage) Wochen erhielten alle Tiere eine einmalige Ganzkörperbestrahlung mit jeweils 0.063 Gy, 0.125 Gy und 0.5 Gy und eine Kontrollgruppe mit 0 Gy. Die Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Tierstall des Helmholtz Zentrum München gehalten und durch geschultes Personal gepflegt. Die Tiere wurden an festgelegten Zeitpunkten,

nämlich nach 6,12, 18 und 24 Monaten durch Kohlendioxid getötet. In der Sektion wurden die Organe und umliegendes Gewebe entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.3 Herstellung der Schnitte

Die Präparate wurde in Cryogel (Leica) eingebettet und bei einer Kryostat Temperatur von -20 Grad Celsius einerseits für die Histologie 12µm dicke und andererseits 30µm dicke Schnitte für die weitere RNA Isolation angefertigt. Jeweils nach zwei 30µm dicken Schnitten erfolgte ein 12µm dicker Schnitt, welche anschließend auf Objektträger (SUPERFROST) aufgezogen wurden. Die Objektträger wurden anschließend bis zur weiteren Weiterverarbeitung bei -80 Grad Celsius gelagert. Die Präparate wurden vollständig aufgeschnitten und es wurden transversale Schnitte erstellt um die beiden Schilddrüsenlappen im Vergleich und das umgebenden Gewebe besser beurteilen zu können. Auf einem Objektträger befanden sich immer 3-4 Schnitte.

### 2.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Material

EtOH 70%, 90%, 100%

Eosin

Eukitt

Hämalaun Lösung

2-Propanol

Xylol

Prinzip und Durchführung

Die HE Färbung ist eine Standardfärbung zur Übersichtsdarstellung von histologischen Schnitten. Die Kernstrukturen färben sich blauviolett an, das umliegende Gewebe stellt sich rosa bis rot dar. Die für die Histologie vorgesehenen Schnitte wurden zunächst bei Raumtemperatur ein paar Minuten angewärmt. Im ersten Schritt wurden die Objektträger 10 Minuten in eine 10% Formalin-Lösung gebracht. Anschließend verweilten die Objektträger 5 Minuten in Hämatoxylin (Mayer) und wurden dann 15 min unter kaltem fließendem Leitungswasser gebläut. Im nächsten Schritt

wurden sie 1 Minute in Eosin gelegt und dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Im Anschluss wurden die Objektträger je 5 Minuten in Xylol gelegt.

Zum Schutz vor mechanischer Destruktion wurden die Objektträger mit einem Eindickmedium (Eukitt) und einem Deckplättchen fixiert. Die Objektträger wurden dann mindestens 24 Stunden getrocknet.

## 2.4 Histologie

Die Beurteilung erfolgte an einem Lichtmikroskop (Zeiss, Axiophot, Objektiv:40x) nach morphologischen Kriterien.

## 2.5 Laser Capture Mikrodisektion

Laser Capture Mikrodisektion ist eine Methode um selektive Zellen/ Zellverbände aus histologischen Schnitten herauszulösen.

Insgesamt wurde das Material von 18 Tieren verwendet, welche sich in drei Gruppen gliedern. Die erste Gruppe umfasste die in der Lichtmikroskopie in neun Tieren gefundenen proliferativen Läsionen, die zweite Gruppe das vermeintlich gesunde Schilddrüsengewebe angrenzend an die proliferativen Läsionen und als das Material für die dritte Gruppe diente das Schilddrüsengewebe aus neun Kontrollieren.

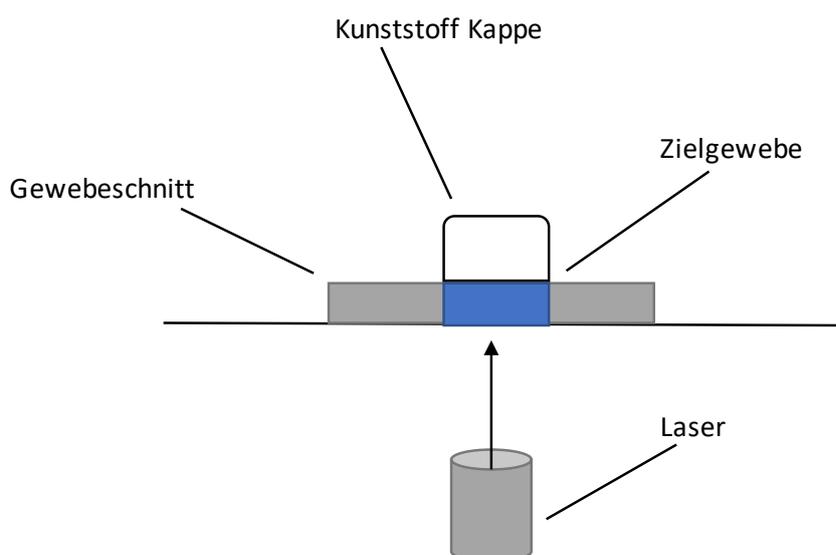


Abbildung 5 Schemazeichnung: Aufbau eines Laser Mikrodisektion Systems

Um eine RNase Kontamination vorzubeugen, wurden alle Geräte- und Arbeitsflächen mit RNase Zap (Sigma-Aldrich) gereinigt. Jeder Objektträger wurde bei Raumtemperatur etwa 2-3 Minuten angewärmt. Anschließend wurde das ausgewählte Areal unter mikroskopischer Kontrolle markiert und mittels „Auto LPC (Automated laser pressure catapulting) Modus“ der Software (Zeiss, Palm Beam) das gewünschte Gewebe mikrodissiziert und direkt in kleinen Bruchstücken direkt in eine oberhalb des Gewebeschnittes befestigte Kappe eines Reaktionsgefäß katapultiert (Abbildung 5). In die Kappe der Reaktionsgefäße wurden zuvor jeweils 50ml Lysepuffer aus dem RNA-Isolations-Kit pipettiert, um das gewonnene Material zu schützen. Um die Quantität der Proben zu steigern, wurden jeweils 3 Objektträger für eine Probe verwendet. In Bild a ist zu dissekierendes Schilddrüsengewebe zu sehen. Das Bild b zeigt den Auto LPC Modus, nachdem bereits das Zielgewebe dissektiert wurde. Bild c zeigt das Gewebe mit dem herausgeschnittenen Gewebearéal.

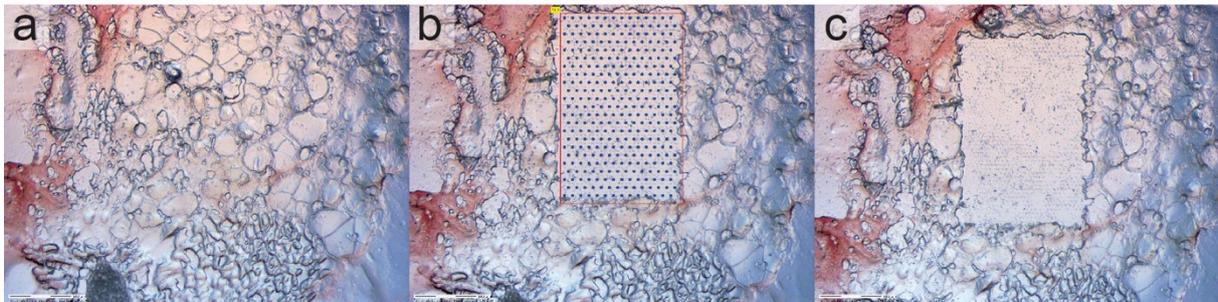


Abbildung 6 Murines Schilddrüsengewebe vor und nach der Laser Capture Dissection

## 2.6 RNA Isolation

Die Gewinnung von RNA erfolgte anhand des Protokolls des Quiagen RNeasy Micro Kits. Die in RLT-Puffer mit 1%  $\beta$ -Mercaptopurin versetzten lysierten Zellen wurden mit 70% Ethanol versetzt. Die Proben wurden auf die vorgesehenen RNeasy Minelute-Spin- Säule überführt und wurden bei 15 Sekunden lang bei  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000 \text{ U / min}$ ) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden 350ml RWI Puffer zugefügt und anschließend wieder bei  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000 \text{ U / min}$ ) 15 Sekunden lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden 10 ml DNase Stammlösung zu 70 ml Puffer-RDD hinzugefügt. Diese DNase-Puffer-Lösung wurde direkt auf die Säulenmembran transferiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Es erfolgte ein weiterer Wachschriff mit 350ml Puffer RWI und der Überstand wurde wieder verworfen. Die RNeasy Min Elute-Spin-Säule wurde in ein neues Auffanggefäß gelegt und es wurden zwei Schritte durchgeführt um die Säulenmembran zu waschen. Einmal wurden 500ml RPE Puffer hinzugefügt, die Zentrifugation erfolgte wie zuvor bei  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq$

10.000 U / min) 15 Sekunden lang und der Überstand wurde verworfen. Dann wurden 500ml des 70% Ethanol hinzugefügt und 2 Minuten bei  $\geq 8000 \times g$  ( $\geq 10.000$  U / min) zentrifugiert. Um die Quiagen Säule zu trocknen, wurden sie bei höchster Geschwindigkeit 5 Minuten lang zentrifugiert. Die Eluation als letzter Schritt erfolgte nach Zugabe von 14ml RNase freies Wasser und anschließendes Zentrifugieren bei voller Geschwindigkeit für 1 Minute. Die isolierte RNA wurde bei -80 Grad gelagert.

## 2.7 Quantifikation und Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Vor den molekulargenetischen Analysen wurde eine Mengenbestimmung und Qualitätskontrolle durchgeführt. Die RNA Konzentrationen wurden für alle Proben mittels eines Nanodrop Photometers gemessen. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip eines Spektralphotometers, bei dem Nukleinsäuren ultraviolettes Licht absorbieren. Für die Messung entscheidend ist die Messung bei 260 nm, weil diese spezifische Wellenlänge von Nukleinsäuren absorbiert wird. Die ermittelte Konzentration wurde in ng/ $\mu$ l angegeben.

Zusätzlich wurde die Qualität der RNA im Sinne der Integrität bestimmt. Dazu wurden Pico-Chips auf dem Agilent Bioanalyzer verwendet und gemessen (Agilent RNA 6000 Pico Kit (#5067-1513, Agilent Technologies, Inc., USA). Von diesem System wurde die RIN (RNA integrative number) berechnet, die sich auf einer Skala von 1 (völlig degradierte RNA) bis 10 (intakte RNA) erstreckt, und somit Aussagen über die Integrität erlaubt. Die Messung basiert auf einer Kapillarelektrophorese im Chip Format.

## 2.8 Erstellung von Genexpressionsprofilen mittels Next Generation Sequencing

Aus der RNA Probe muss zur Vorbereitung der Sequenzierung eine Molekülbibliothek hergestellt werden (Library Prep). In der durchgeführten Arbeit steht eine limitierte RNA Menge zur Verfügung, deren Qualität durch die aufwändige Prozessierung zusätzlich eingeschränkt ist. Deswegen wurde ein spezialisiertes Verfahren gewählt, dass sich 3' Prime Tag Sequenzierung nennt. Dazu wurden 50ng Gesamt RNA eingesetzt und mit dem Kit QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD for Illumina (SKU: 015.96, Lexogen GmbH, Austria) prozessiert. In dem genutzten Protokoll wird ein Fragment jedes polyadenylierten Transkriptmoleküls mit Adaptoren

versehen und vervielfältigt. Die dazu benötigte Anzahl der PCR Zyklen wurde experimentell mit dem PCR Add-on Kit for Illumina (SKU: 020.96, Lexogen GmbH, Austria) ermittelt und schließlich 17 Zyklen für die Library verwendet. Qualitätskontrolle und Quantifikation erfolgte über Quanti-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (P7589, Invitrogen, USA) und Bioanalyzer High Sensitivity DNA Analysis Kit (#5067-4626, Agilent Technologies, Inc., USA).

Die Sequenzierung erfolgte in der Core Facility Unit des Helmholtz Zentrum München und umfasste eine 150 Basenpaare Sequenzierung auf einem Illumina HiSeq4000 System (Illumina, Inc., USA).

Die bioinformatische Datenanalyse wurde von Dr. Martin Selmansberger und PD Dr. Kristian Unger durchgeführt und Details finden sich in Stauffer et al (Stauffer et al., 2021).

## 2.9 Definition der Vergleichsgruppe

Proliferative Läsionen (PL)

Von den Schilddrüsen wurden Gefrierschnitte angefertigt, HE gefärbt und nach morphologischen Kriterien klassifiziert. Anhand der Capen Klassifikation werden in dieser Gruppe die Hyperplasien und Adenome zu proliferativen Läsionen (PL) zusammengefasst.

Histologisches Normalgewebe (NG)

Histologisch unauffälliges Gewebe angrenzend an die proliferativen Läsionen (PL) dient hier als Vergleichsgruppe um in den anschließenden molekulargenetischen Untersuchungen mögliche Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den definierten histologischen Gruppen auszuarbeiten.

Unbestrahlte Kontrollgruppe (NKG)

Eine Gruppe von Tieren mit identischer Verteilung von Alter und Geschlecht wird als Kontrollgruppe verwendet.

## 2.10 Statistische Datenanalyse

Die Auswertung aller erfassten Daten erfolgte mit Hilfe von Excel und SPSS 25 .Der zweiseitige Fisher Test wurde angewendet und das Signifikanzniveau wurde auf 0.05 festgelegt.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation wurden zentrale Fragestellungen zum molekularen Mechanismus der strahleninduzierten Karzinogenese in der Schilddrüse anhand eines Mausmodells und der Tumorentstehung im zeitlichen Verlauf nach Bestrahlung bearbeitet. Um solche Fragestellungen der Karzinogenese beantworten zu können, war eine Histologie-basierte Probengewinnung unerlässlich. Mit nachfolgendem Forschungsansatz, der technisch erst etabliert werden musste, sollten aus definierten Geweberealen molekulare Profile erstellt werden (Abbildung 7).

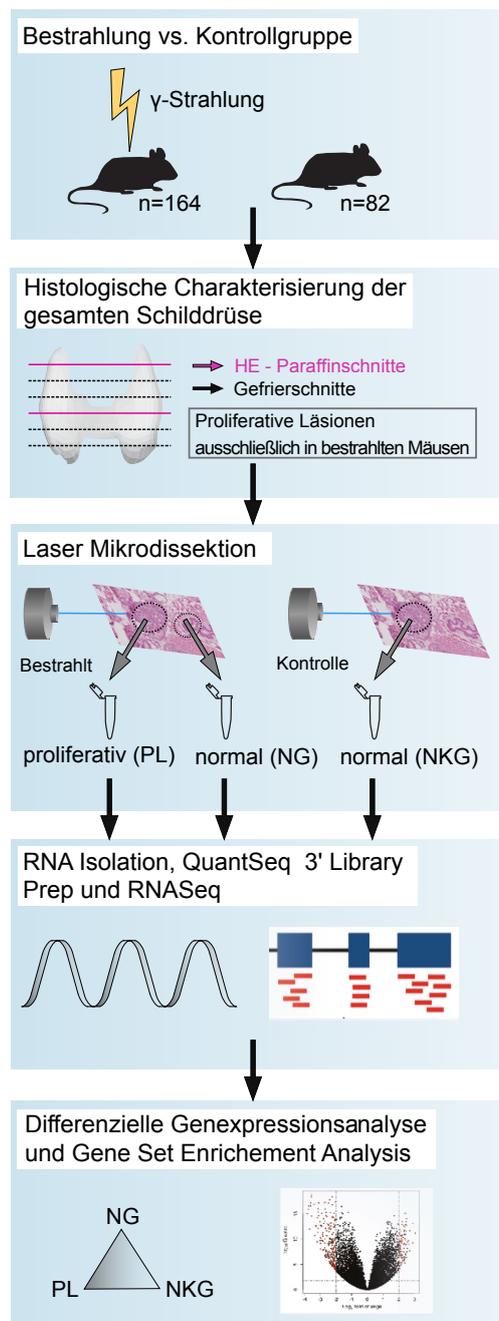


Abbildung 7 Workflow modifiziert nach Stauffer et al. (Stauffer, 2021)

Als Ausgangsmaterial diente eine Mausekohorte, die im Rahmen des BMBF-finanzierten INSTRA Projekts zusammengestellt und bestrahlt wurde. Ein Teil der Mäuse (n=164) erhielt zu definierten Zeitpunkten eine Ganzkörperbestrahlung mit verschiedenen Dosen (0,063/0,125/0,5 Gy.) im niedrigen Dosisbereich. Der andere Teil erhielt eine Scheinbehandlung ohne Strahlenexposition als Kontrollgruppe (n=82). Die Mäuse wurden nach verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung (6 Monate, 12 Monate, 18 Monate, 24 Monate) seziiert und für dieses Dissertationsprojekt die kompletten Schilddrüsen entnommen. Es erfolgte eine umfassende histologische Aufarbeitung und Klassifizierung der murinen Schilddrüsen mittels seriellen Gefrierschnitten. Es wurde alternierend 12µm Schnitte mit HE gefärbt, die zur histologischen Analyse genutzt wurden. Zwischen diesen histologischen Schnitten wurden auch 30µm Schnitte hergestellt, aus denen dann das Material zur molekularen Charakterisierung gewonnen wurde. Dabei wurde das gesamte Organ aufgearbeitet, um auch sehr kleine Tumorerläsionen aufspüren zu können. Mit Hilfe mikroskopischer Analyse wurden proliferative Läsionen im Gewebe detektiert. Dabei wurden drei histologische Gruppen definiert: Proliferative Läsion (PL), histologisches Normalgewebe (NG) angrenzend zu dem PL-Gewebe und das Normalgewebe aus der unbestrahlten Kontrollgruppe (NKG). Im nächsten Schritt wurde aus den gewählten Geweberegionen mikroskopisch kleine Areale durch Anwendung von Laser Capture Mikrodissektion isoliert.

Um daraus eine hochwertige RNA-Sequenzierungsbibliothek zu generieren, wurde zunächst die RNA mit Hilfe eines kommerziellen Kits für sehr kleine Gewebemengen (von Einzelzellen bis 100µg Gesamt RNA) isoliert und aufgereinigt. Ausgehend vom Ende des Transkriptes (3' Ende) wurde aus der RNA über cDNA Synthese und spezielle PCR-Methoden ein einzelnes Fragment (tag) vervielfältigt mit Adaptoren versehen, die für die nachfolgende Sequenzierung benötigt wurden. Die daraus resultierende Molekülbibliothek wurde anschließend sequenziert. Zur Charakterisierung der histologisch definierten Regionen wurden differentielle Genexpressionsanalysen zwischen verschiedenen Subgruppen (bestrahlt vs. unbestrahlt, PL vs. NG oder NKG) durchgeführt, die die Grundlage für nachfolgende Gene Set Enrichment Analysen (GSEA) und Analyse veränderter Signalwege bildeten.

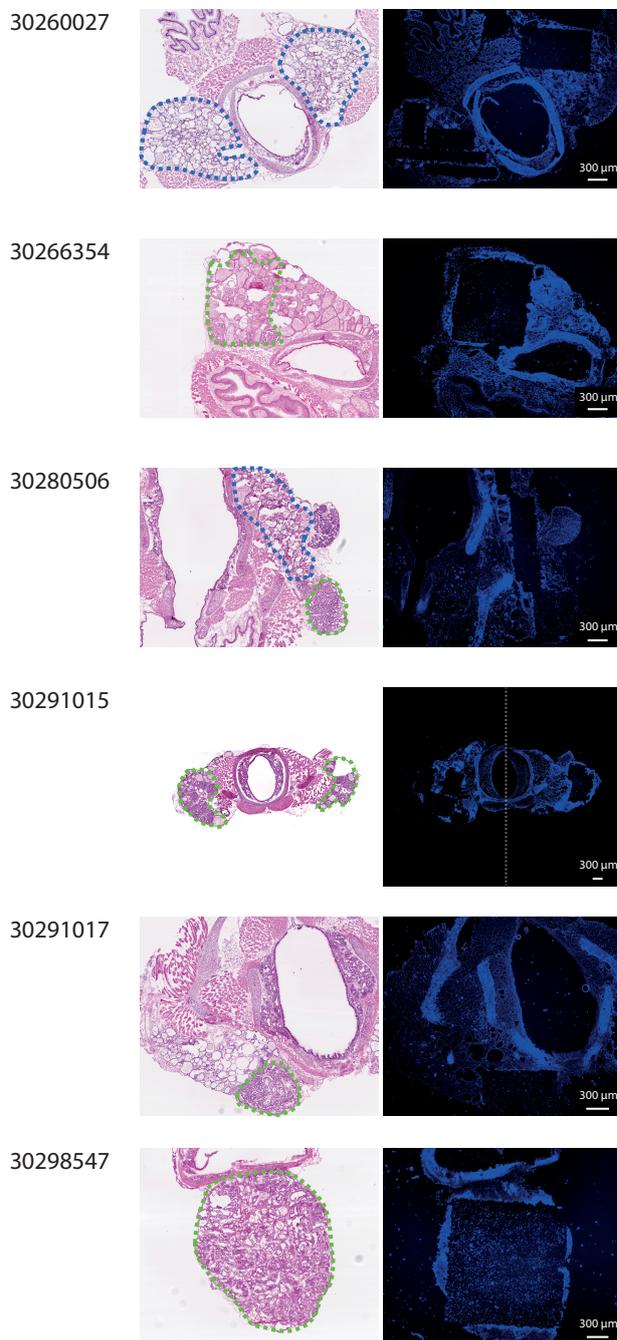


Abbildung 8 Illustration der Probengewinnung mittels Laser Capture Microdissection

In Abbildung 8 sind beispielhaft Schnitte vor und nach der Laser Capture Mikrodisektion dargestellt. Auf der linken Seite sind in den HE Schnitten die Regionen eingezeichnet, die für die weitere Analyse isoliert werden soll. (Grün=proliferative Veränderungen; Blau=normales Schilddrüsengewebe), auf der rechten Seite sind die verbleibenden Regionen auf dem Schnitt nach der Mikrodisektion mit Hilfe von DAPI Färbung dargestellt. Die markierte Region wurde mit einem Laser ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß katapultiert (Detail in Material & Methoden, Laser Capture Mikrodisektion). Man erkennt die akkurate Isolation der gewünschten Gewebeareale, die im Weiteren der Sequenzierung zugeführt wurden. Die Besonderheit bei dem oben beschriebenen Vorgehen ist die Isolation von intakter RNA aus sehr kleinen Gewebemengen (von Einzelzellen bis 100µg Gesamt RNA). Auch das Verfahren der Laser Capture Mikrodisektion stellte eine zusätzliche Herausforderung dar, weil die Kombination aus Raumtemperatur und längerer Verweildauer im Bereich von wenigen Minuten zu einer Degradierung der RNA beitragen kann.

Tabelle 2 Übersicht über die RNA Proben

Sample ID	Probe	Nanodrop [ng/ul] <sup>a</sup>	Qubit [ng/ul] <sup>b</sup>	Menge in 5ul [ng] <sup>c</sup>	DV200 [%] <sup>d</sup>	RIN <sup>e</sup>	Experimentelle Gruppe <sup>f</sup>
288	30260011	17,27	15,8	86,35	99	6,8	normal
289	30260026	19,91	18,4	99,55	97	5,4	normal
290	30260027	8,81	10	44,05	98	7,6	normal
291	30266354	13,78	14,8	68,9	98	7,1	normal
292	30266354 P	10,44	10,8	52,2	97	6	proliferative Läsion
293	30280477 P	17,18	14	85,9	96	5,1	proliferative Läsion
294	30280477	8,4	11,2	42	96	4	normal
295	30268844	37,08	34	185,4	95	8,2	normal
296	30280506	10,28	10	51,4	95	3,3	normal
297	30280506 P	9,9	10	49,5	96	5,2	proliferative Läsion
298	30280511 P	15,47	13,8	77,35	97	4,8	proliferative Läsion
299	30280511	8,44	11	42,2	96	4	normal
300	30280522	29,69	20,2	148,45	98	N/A	normal
301	30280559	10,41	13,2	52,05	97	5,1	normal
302	30280559 P	17,02	15	85,1	96	4,3	proliferative Läsion
303	30291015 P	28,71	25,2	143,55	94	7,2	proliferative Läsion
304	30291015	14,98	17,2	74,9	97	5,5	normal
305	30291017	10,11	11	50,55	93	4,7	normal
306	30291017 P	22,26	25,2	111,3	94	7,4	proliferative Läsion
307	30291061 P	6,15	10	30,75	98	7,1	proliferative Läsion
308	30291061	19,9	10	99,5	97	6,7	normal
309	30291035	9,35	11,2	46,75	96	6,4	normal
310	30291040	26,61	25	133,05	97	7,9	normal
311	30291105	14,86	15,8	74,3	96	4,8	normal
312	30298547	7,86	10	39,3	96	5,7	normal
313	30298547 P	92,15	96,2	460,75	96	6,4	proliferative Läsion
314	30298559	10,78	13	53,9	96	5,4	normal

<sup>a</sup>RNA Quantifikation; photometrisch; Konzentrationsangabe in Nanogramm pro Mikroliter (ng/µl)

<sup>b</sup>RNA Quantifikation; fluorometrisch; Konzentrationsangabe in Nanogramm pro Mikroliter (ng/µl)

<sup>c</sup>RNA Gesamtmenge; rechnerisch; Angabe in Nanogramm (ng)

<sup>d</sup>RNA Qualitätsmerkmal; Anteil der RNA Fragmente die länger als 200 Basen sind; Angabe in %

<sup>e</sup>RNA Qualitätsmerkmal; RNA Integrity Number (RIN); algorithmische Berechnung von Agilent Bioanalyzer; einheitslos Wertebereich 0-10

<sup>f</sup>Einteilung der Gruppen anhand der morphologischen Kriterien eingeteilt. Details in Definition der Vergleichgruppen (siehe Material & Methoden)

---

Eine Quantifizierung und Qualitätskontrolle der RNA ist in Tabelle 2 dargestellt und zeigt die erhaltene Menge und Qualität der RNA. Sie zeigt die Probebezeichnung aus der Tiernummer und ggf. dem Suffix P (bei Vorliegen einer proliferativen Veränderung). Darüber hinaus wurde durch zwei Methoden die Quantität ermittelt, einmal photometrisch (Nanodrop\_ng\_μl) und zum anderen fluorometrisch (Qubit\_ng\_μl). Die Spalte „Menge\_in\_5μl“ stellt die Gesamtmenge, die für die Herstellung der Molekülbibliothek (Library Prep) eingesetzt wurde dar. Alle Proben hatten eine Menge von mehr als 30ng RNA in 5μl Probenvolumen, die als ausreichend für die gewählte Sequenzierungstechnologie angesehen wurde. Die nächsten beiden Spalten sind ein Maß für die RNA Qualität und werden aus den Bioanalyzer Messungen ermittelt. Die DV200 ist der Anteil der RNA in Prozent mit mehr als 200 Nukleotiden Länge. Ein weiterer wichtiger Faktor für den Sequenzierungserfolg ist die RNA Integrität, die über die gemessene RNA Integrity Number (RIN) kontrolliert wurde. Die Ergebnisse haben eine große Spannbreite von 4-8,2, wobei 4 eingeschränkte Qualität und 8 sehr gute Qualität bedeutet. Gemäß dem Sequenzierungsprotokoll (Lexogen's QuantSeq™ 3' mRNA-Seq Kit FWD HT) und laborinternen Erfahrungswerten hat eine RNA Probe mit einer RIN Zahl ab 4 gute Aussichten auf eine erfolgreiche Sequenzierung, weil durch das gewählte 3'prime tag Verfahren keine Sequenzierung über die gesamte Fragmentlänge der mRNA erfolgt. In der letzten Spalte werden die histologisch definierten Gruppen genannt, die bewusst bei der RNA Isolation und RNA Sequenzierung randomisiert wurden, um Batch-Effekte zu vermeiden. Zusammenfassend scheinen alle Proben aus Tabelle 1 aussichtsreich für die Library Prep und Sequenzierung.

Tabelle 3 Übersicht über die hergestellten Molekülbibliotheken für die Sequenzierung

Sample ID	Probe	Konzentration [ng/ $\mu$ l]	Fragmentlänge [Basen]	Molarität [nM] <sup>a</sup>	Experimentelle Gruppe <sup>b</sup>
288	30260011	1,15	350	5,04	normal
289	30260026	1,25	370	5,20	normal
290	30260027	0,93	409	3,52	normal
291	30266354	3,12	391	12,29	normal
292	30266354 P	2,76	353	12,03	proliferativ
293	30280477 P	2,59	370	10,77	proliferativ
294	30280477	2,36	329	11,05	normal
295	30268844	4,03	384	16,15	normal
296	30280506	2,68	356	11,57	normal
297	30280506 P	2,56	384	10,25	proliferativ
298	30280511 P	3,35	420	12,26	papillär
299	30280511	3,03	349	13,37	normal
300	30280522	4,93	355	21,39	normal
301	30280559	4,03	370	16,74	normal
302	30280559 P	5,36	325	25,41	proliferativ
303	30291015 P	3,69	331	17,13	proliferativ
304	30291015	3,35	290	17,73	normal
305	30291017	1,71	326	8,07	normal
306	30291017 P	3,39	346	15,07	proliferativ
307	30291061 P	1,27	337	5,82	proliferativ
308	30291061	2,92	321	14,01	normal
309	30291035	2,75	335	12,62	normal
310	30291040	3,54	324	16,80	normal
311	30291105	1,15	329	5,38	normal
312	30298547	1,87	355	8,12	normal
313	30298547 P	2,76	310	13,68	proliferativ
314	30298559	0,93	382	3,73	normal

<sup>a</sup>Konzentrationsangabe in nanomolar (Yapa et al.)

<sup>b</sup>Einteilung der Gruppen anhand der morphologischen Kriterien. Details in Definition der Vergleichgruppen (siehe Material & Methoden)

Die Tabelle 3 zeigt analoge Mengenbestimmung und Qualitätskontrolle nach Herstellung der Molekülbibliothek (Library Prep). Mit Hilfe eines kommerziellen Kits wurde von jedem mRNA Molekül ein kurzes Fragment aus der 3'Region vermehrt und mit Adaptoren versehen, die Primer für die Sequenzierungsreaktion dienen.

Nach Herstellerangaben kann man aus einer erfolgreichen Library Prep durchschnittliche Moleküllängen von 335-456 Basenpaare erreichen, die hier erhaltene Fragmentlänge liegt somit in diesem Bereich (291-420 Basenpaare) und ist auffallend homogen. Trotz der limitieren RNA Ausbeute ist die erhaltene Menge an Library Molekülen mit 3,52nM bis 25,41nM ausreichend (siehe Tabelle 3).

### 3.1 Ergebnisse der histologischen Auswertung

Die Bewertung der histologischen Ergebnisse erfolgte nach allgemeinen morphologischen Kriterien und in Bezug auf maligne Veränderungen entsprechend der WHO Kriterien modifiziert für Mausschilddrüsen. Hierzu wurde die International Classification of Rodent Tumors angewendet (Capen, 2001b) . Die Parameter, die zur Klassifikation herangezogen worden sind, sowie die Ergebnisse der Einteilung, sind in der Tabelle 4 zusammengefasst.

Es zeigten sich insgesamt neun proliferative Veränderungen in Form von follikulären Hyperplasien und Adenomen, es konnten aber nach den genannten Kriterien (siehe auch Einleitung, Schilddrüsentumore im Mausmodell - eine Gegenüberstellung) keine gesicherten Karzinome festgestellt werde

Tabelle 4 Histologische Charakteristika der Mäuse, die molekular charakterisiert wurden

Mouse ID	Geschlecht	Genotyp*	Dosis [Gy]	Alter[Monate]	Histologische Charakteristika									Klassifikation	
					abgrenzbar	Kompression	Kapsel	Infiltration	Muster	Zellform	Kern	Epithel	Follikel		
30280477	m	wildtype	0.125 Gy	24	nein	kein	teilweise	keine	papillär	hochprismatisch	rund	einschichtig/pseudostratifiziert	vergrößert	Hyperplasie	
30280506	w	wildtype	0.125 Gy	24	ja	keine	teilweise	keine	papillär	kubisch	oval	einschichtig	variabel	Adenom	Adenom
30291015	w	wildtype	0.063 Gy	24	teilweise	teilweise	teilweise	keine	papillär	kubisch	oval	einschichtig	variabel	Hyperplasie	
30291017	w	wildtype	0.063 Gy	24	ja	keine	ja	keine	papillär	kubisch	rund	einschichtig/pseudostratifiziert	variabel		Adenom
30298547	m	B6RCF1 (het mut)	0.125 Gy	18	ja	teilweise	teilweise	keine	solide	kubisch	rund	einschichtig/pseudostratifiziert	/		Adenom
30266354	w	wildtype	0.5 Gy	18	nein	keine	keine	keine	papillär	hochprismatisch	oval	einschichtig	vergrößert	Hyperplasie	
30280511	w	wildtype	0.125 Gy	24	ja	keine	teilweise	keine	papillär/solide	kubisch	oval	einschichtig	variabel	Hyperplasie	
30280559	w	B6RCF1 (het mut)	0.125 Gy	24	nein	keine	keine	keine	papillär	kubisch	rund	einschichtig	variabel	Hyperplasie	
30291061	m	B6RCF1 (het mut)	0.063 Gy	24	nein	keine	teilweise	keine	papillär	hochprismatisch	oval	einschichtig	variabel	Hyperplasie	
30260011	w	B6RCF1 (het mut)	sham (0 Gy)	24		keine		keine		kubisch	oval	einschichtig	variabel	Normales Gewebe	
30260026	w	wildtype	sham (0 Gy)	24		keine		keine		kubisch	rund	einschichtig	variabel	Normales Gewebe	
30260027	w	wildtype	sham (0 Gy)	24		keine		keine		hochprismatisch		einschichtig	variabel	Normales Gewebe	
30266844	w	wildtype	sham (0 Gy)	18		keine		keine		flach	oval	einschichtig	variabel/vergrößert	Normales Gewebe	
30280522	w	wildtype	sham (0 Gy)	24		keine		keine		kubisch	rund	einschichtig	variabel	Normales Gewebe	
30291035	m	wildtype	sham (0 Gy)	24		keine		keine		flach	oval	einschichtig	variabel	Normales Gewebe	
30291040	w	wildtype	sham (0 Gy)	24		keine		keine		kubisch	oval	einschichtig	variabel	Normales Gewebe	
30291105	m	B6RCF1 (het mut)	sham (0 Gy)	24		keine		keine		kubisch	rund	einschichtig	variabel	Normales Gewebe	
30298559	m	B6RCF1 (het mut)	sham (0 Gy)	18		keine		keine		kubisch		einschichtig	normal	Normales Gewebe	

\*50 % Mäuse weisen eine heterozygote Mutation des ERCC2-Gens auf. Diese Mutation wurde in einer früheren Studie (Dalke et al.) untersucht, Katarakte der Augenlinse nach Exposition gegenüber ionisierender Strahlung zu fördern. Dabei wurde keine Assoziation von Schilddrüsenaberrationen und ERCC2-Genmutation gefunden.

## A) Follikuläre Hyperplasie

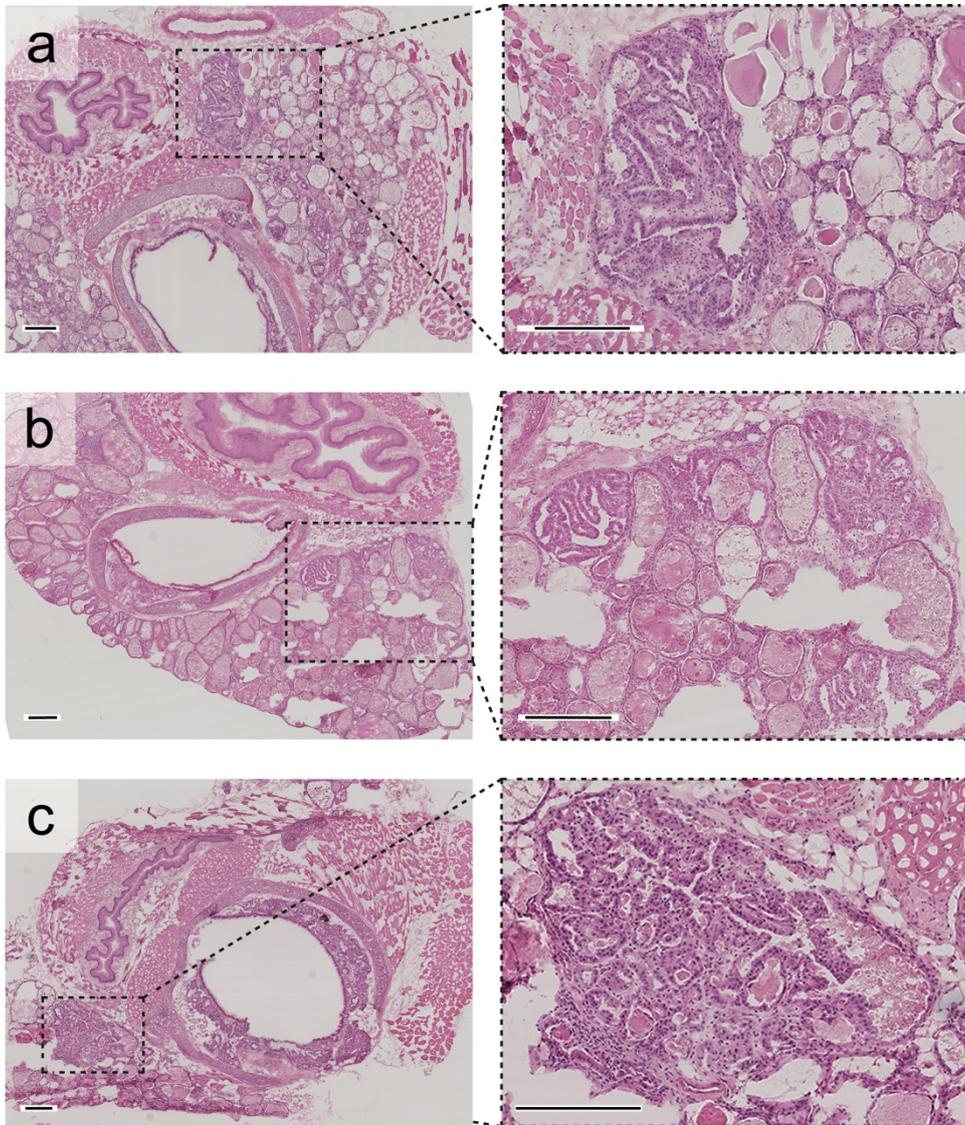


Abbildung 9 Beispiele der follikulären Hyperplasie in der Mausschilddrüse

HE-Färbung, Maßstab=200 $\mu$ m

In sechs Fällen konnten Hyperplasien klassifiziert werden. In der Abbildung 9 sind exemplarisch drei Hyperplasien gezeigt. Die Hyperplasien haben überwiegend ein papilläres Muster. Das verzweigte Stroma ist von einem einschichtigen Epithel bedeckt.

## B) Follikuläres Adenom

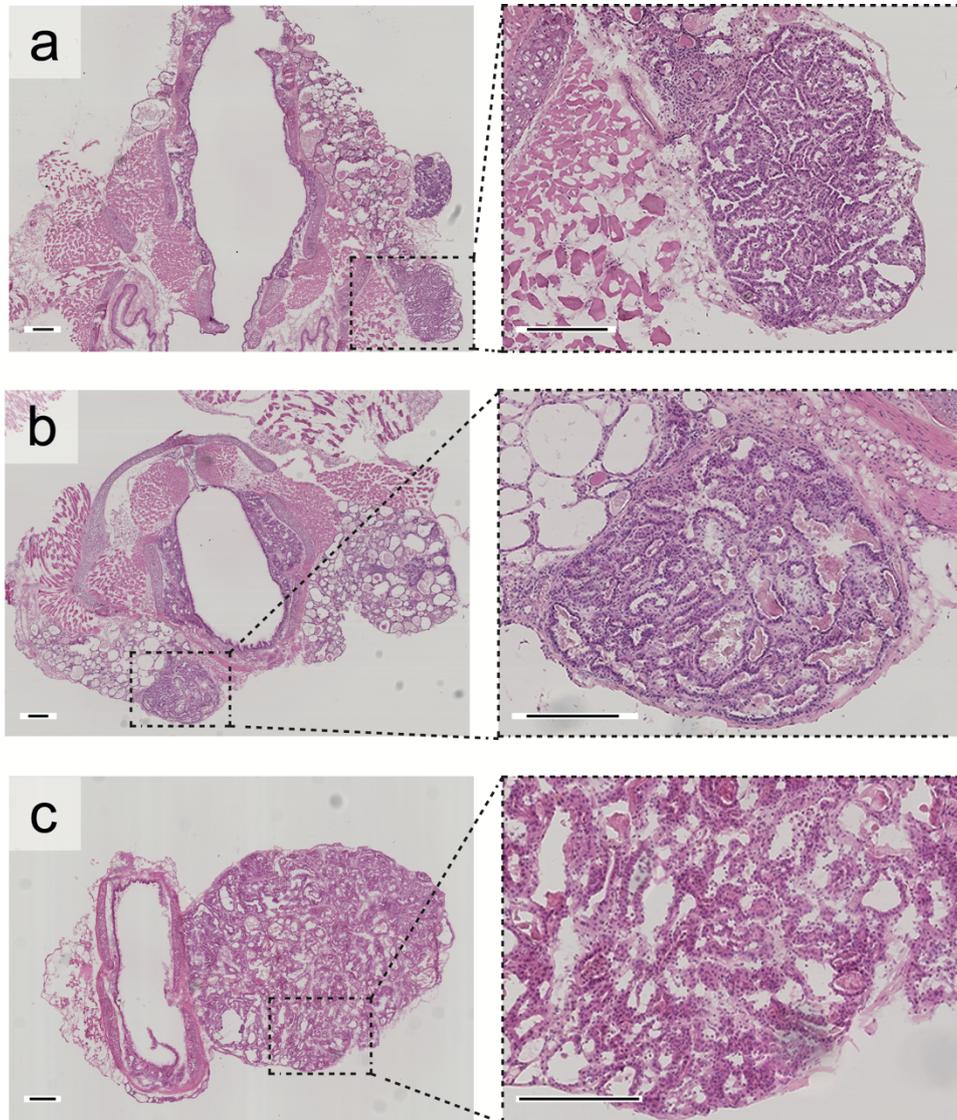


Abbildung 10 Follikuläres Adenome in der Mausschilddrüse

HE-Färbung, Maßstab=200µm

Es konnten insgesamt drei Adenome klassifiziert werden, die in Abbildung 10 dargestellt sind. Während die follikuläre Hyperplasie nicht gut abgegrenzt ist, weisen Adenome häufig eine komplexere Architektur auf und besitzen eine Kapsel. Bild a und b zeigen ein papilläres Muster, das Bild c eine solide Struktur.

### 3.2 Statistische Auswertung der histologischen Ergebnisse

Tabelle 5 Vierfeldertafel der Fallzahlen für die Faktoren „Strahlenexposition“ und „proliferative Veränderungen“

(n=246)

		strahlenexponiert		Gesamt
		nein	ja	
proliferative Veränderungen	nein	82	155	237
	ja	0	9	9
Gesamt		82	164	246

Die bestrahlten Tiere zeigten eine höhere Inzidenz für das Vorliegen proliferativer Veränderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Der zweiseitige Fisher Exakt Test war mit  $P=0,031$  kleiner als das vorgegebene Signifikanzniveau von 0,05 und damit signifikant.

Tabelle 6 Vierfeldertafel der Fallzahlen für die Faktoren „Strahlenexposition“ und „proliferative Veränderungen“-Stratifikation nach Geschlecht

(n=246)

männlich (n=122)		strahlenexponiert		Gesamt
		nein	ja	
proliferative Veränderungen	nein	42	77	119
	ja	0	3	3
Gesamt		42	80	122

weiblich (n=124)		strahlenexponiert		Gesamt
		nein	ja	
proliferative Veränderungen	nein	40	78	118
	ja	0	6	6
Gesamt		40	84	124

Bei drei von 122 männlichen Tieren und sechs von 124 weiblichen Tieren waren proliferative Veränderungen zu finden. Proliferative Veränderungen traten statistisch in weiblichen Tieren häufiger auf als in der Gesamtgruppe per Zufall zu erwarten gewesen wäre ( $p$ -Wert=0,041). Es deutet auf ein höheres Risiko für das weibliche Geschlecht wie beim Menschen hin (Li et al., 2020).

Tabelle 7 Vierfeldertafel der Fallzahlen für die Faktoren „Strahlenexposition“ und „proliferative Veränderungen“-Stratifikation nach Alter

(n=246)

		Zeit				Gesamt
		6 Monate	12 Monate	18 Monate	24 Monate	
Proliferative	nein	71	64	59	43	237
Veränderungen	ja	0	0	2	7	9
Gesamt		71	64	61	50	246

Von den neun proliferativ veränderten Tieren waren zwei in der Altersgruppe 18 Monate und die verbleibenden sieben Mäuse in der Altersgruppe 24 Monate. Statistisch zeigte sich keine signifikante Häufung in einer Altersgruppe (p-Wert=0,05 für 18 Monate, p-Wert=0,09 für 24 Monate).

### 3.3 Auswertung der Immunzellen in den untersuchten Geweben

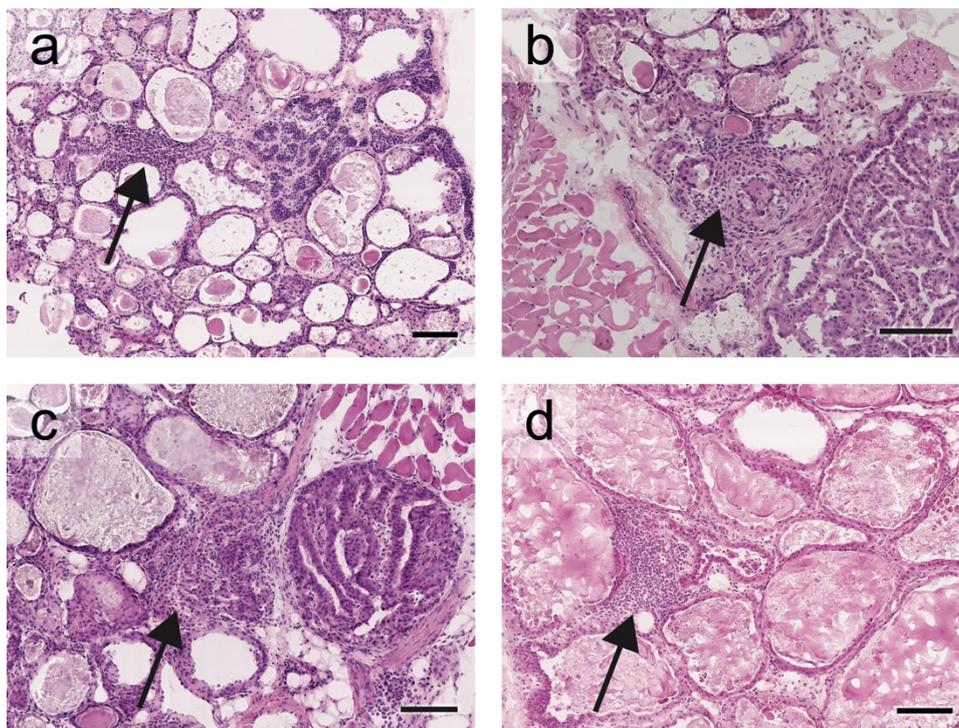


Abbildung 11 Immunzellinfiltration in dem murinen Schilddrüsengewebe HE-Färbung,

a-d zeigt Immunfiltration in verschiedenen Mäusen, Maßstab=200µm, Pfeile markieren beispielhaft Immunzellinfiltration

Immunzellen (Lymphozyten, Neutrophile, Plasmazellen und Makrophagen) wurden sowohl in bestrahlten als auch in unbestrahlten Geweben untersucht, indem die Immunzellen gezählt wurden, um das Ausmaß der Infiltration zu quantifizieren. Die höchste Dichte an Immunzellen

wurde in proliferativen Geweben festgestellt, gefolgt von normalen bestrahlten Geweben und nicht bestrahlten Normalgeweben. Abbildung 11 zeigt beispielhafte mikroskopische Bilder, die die Lage der Läsionen innerhalb der Schilddrüsen in verschiedenen Tieren ausweisen. Aus der Zählung gewonnen Quantifizierungen sind in der Tabelle 8 zusammengefasst.

*Tabelle 8 Immunzellen pro mm<sup>2</sup>*

Mouse ID	Immunzellinfiltration (Leukozyten pro mm <sup>2</sup> )	
	proliferative Veränderungen	normal
<b>30280477</b>	28,75	8,48
<b>30280506</b>	60	32,83
<b>30291015</b>	76,85	47,85
<b>30291017</b>	96	70,52
<b>30298547</b>	26,48	7,1
<b>30266354</b>	63,21	48,05
<b>30280511</b>	120	14,34
<b>30280559</b>	32,08	38
<b>30291061</b>	125	22,71
<b>30260011</b>		5,2
<b>30260026</b>		31,84
<b>30260027</b>		8,31
<b>30266844</b>		10,15
<b>30280522</b>		18,46
<b>30291035</b>		6,56
<b>30291040</b>		7,09
<b>30291105</b>		15,19
<b>30298559</b>		2,5

Die Immunzellinfiltration wurde als Anzahl der Immunzellen pro Fläche im histologischen Schnitt bestimmt. Es wurden für jeden vorliegenden Fall alle Schnitte, die Schilddrüsenewebe enthielten erfasst und gemittelt.

Statistisch signifikante Unterschiede in den Immunzellichten (Infiltration) wurden durch ANOVA ( $p < 0,01$ ) und post-hoc Tukey's Test zwischen proliferativen und normalen bestrahlten Geweben (PL im Vergleich zu NG  $p = 0,01$ ) und zwischen proliferativen und nicht bestrahlten Normalgeweben (PL im Vergleich zu NKG  $p = 0,001$ ) festgestellt. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlten Normalgeweben und nicht bestrahlten Normalgeweben beobachtet (NG im Vergleich zu NKG,  $p = 0,23$ , SI Abbildung 12).

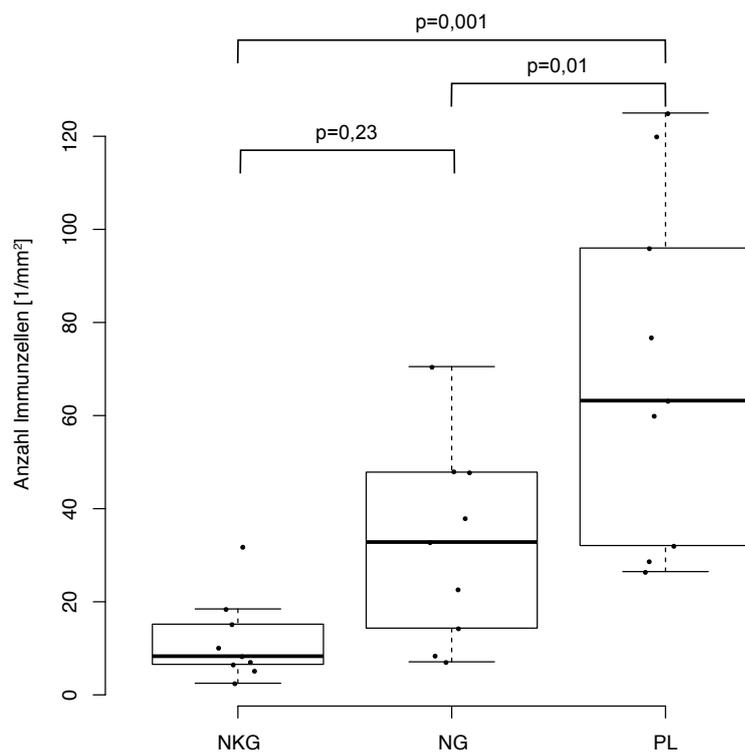


Abbildung 12 Vergleichende Statistik der Immunzellendichte zwischen den experimentellen Gruppen

Modifiziert nach Stauffer et al. (Stauffer et al., 2021)

### 3.4 Molekulare Charakterisierung der proliferativen Veränderungen

Mit der histologischen Charakterisierung konnten die Areale mit proliferativen Veränderungen identifiziert werden und mit Hilfe des Laser Capture Mikrodissektion Verfahren herausgeschnitten werden (Abbildung 8). Von den extrahierten Arealen wurden Transkriptom Profile mittels Next Generation Sequencing erstellt.

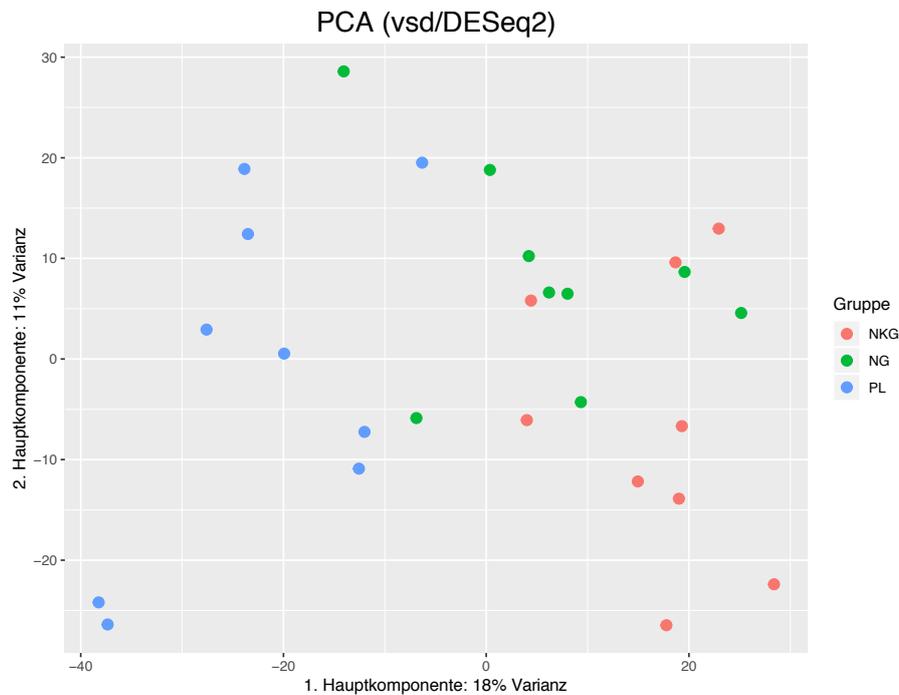


Abbildung 13 PCA Hauptkomponentenanalyse

Die Kreise repräsentieren transkriptomische Profile von den experimentellen Gruppen; rot: Normale Kontrollgruppe (unbestrahlt) (NKG), grün: Histologisches Normalgewebe (bestrahlt) (NG), blau: Proliferative Läsionen (PL) modifiziert nach Stauffer et al. (Stauffer et al., 2021)

Genomweite transkriptomische Profile sind hochdimensionale Daten, die auf vielfältige Arten ausgewertet werden können. Eine Möglichkeit, um die Gesamtvarianz in solchen Daten darzustellen und dadurch einen Gesamtüberblick auf die Daten zu gewinnen, stellt die Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis; PCA) dar. Dabei können die Daten auf zwei Dimensionen projiziert und wie in Abbildung 13 visualisiert werden. In dieser Abbildung entspricht jeder Punkt einem Transkriptom Profil einer Gewebeprobe, dabei zeigt die Farbcodierung die histologische Gruppeneffinition.

Die Hauptkomponentenanalyse des RNAseq-Transkriptom-Datensatzes zeigte eine Gruppierung der Proben entsprechend ihrer histologischen Klassifizierung und trennte die Proben mit proliferativen Läsionen (PL) sehr gut von den entsprechenden normalen Gewebeprobe (NG) und normalen Kontrollgewebeprobe (NKG). Die Trennung von NG und NKG war weniger stark ausgeprägt.

### 3.5 Differenzielle Genexpressionsanalyse zwischen verschiedenen experimentellen Gruppen

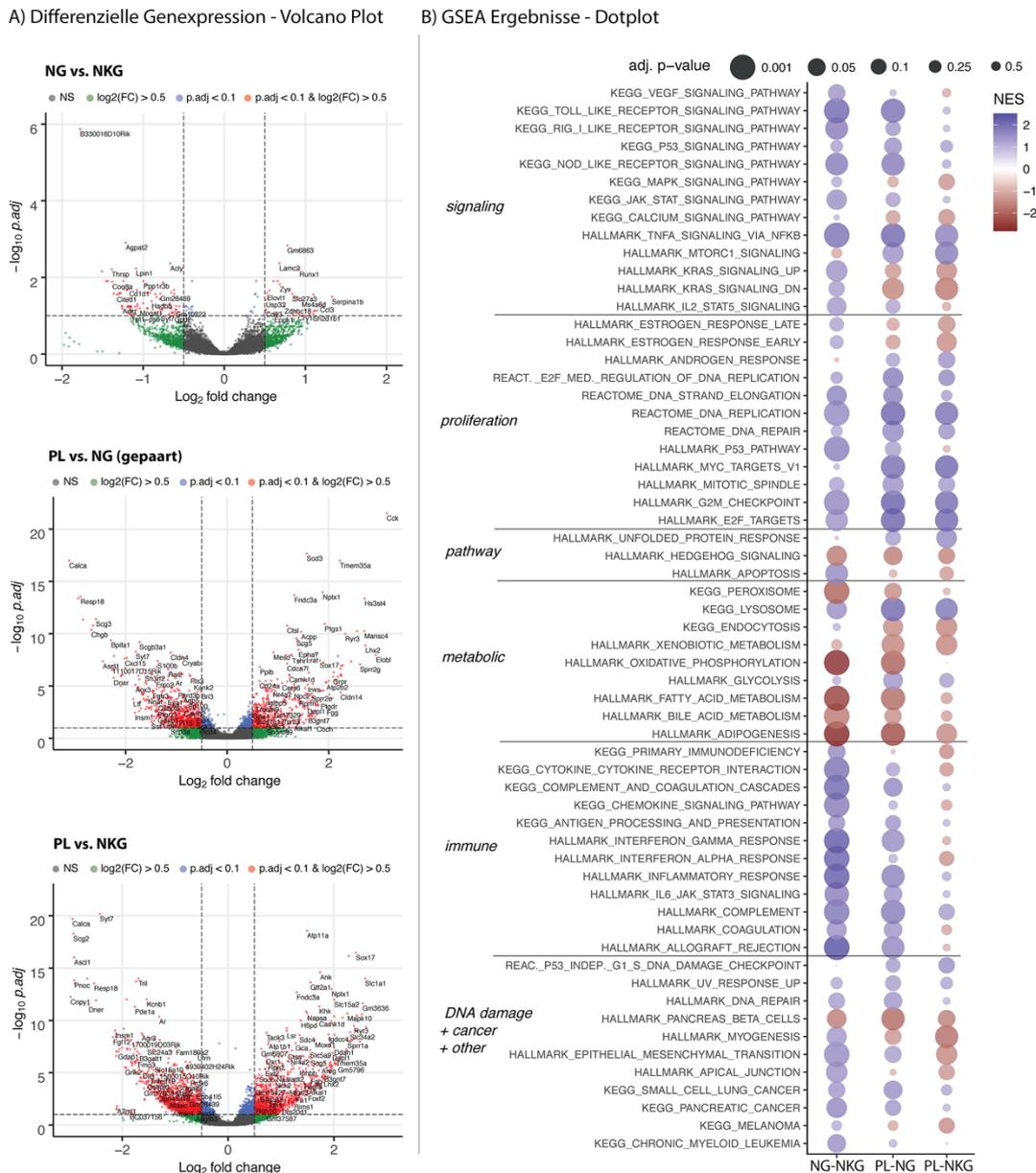


Abbildung 14 Differenzielle Genexpressionsanalyse und Pathwayanalyse

A) Volcanoplots der drei paarweisen Gruppen der differenziellen Genexpressionsanalyse. Auf der x-Achse ist der Expressionsunterschied zwischen den Vergleichsgruppen aufgetragen. Hierzu wird von den beiden Expressionshöhen die Differenz im logarithmischen Wertebereich gebildet und als „log<sub>2</sub>-fold-change“ (log<sub>2</sub>-FC) bezeichnet. Auf der y-Achse ist die statistische Signifikanz als negativer logarithmischer Wert der Signifikanz (-log<sub>10</sub>-p-adj) angegeben; die roten Kreise sind statistisch signifikant (p-adj < 0,1) und über einem log<sub>2</sub>-FC von 0,5, die blauen Kreise sind statistisch signifikant (p-adj < 0,1) und unter der log<sub>2</sub>-FC Grenze von 0,5, die grünen Kreise sind nicht statistisch signifikant (p-adj > 0,1), aber über einem log<sub>2</sub>-FC von 0,5, die grauen Kreise sind nicht statistisch signifikant (p-adj > 0,1) und unter der log<sub>2</sub>-FC Grenze von 0,5. B) Pathwayanalyse der Ergebnisse aus A. Die differenziell exprimierten Gene sind nicht zufällig verteilt, sondern zeigen Anreicherung in verschiedenen biologisch-funktionellen Bereichen. Die Punktgröße entspricht dem -log<sub>2</sub>(adj-p-Wert) (größerer Punkt = kleinerer adj-P-Wert), die Punktfarbe spiegelt den normalisierten Anreicherungs-Score (NES) wider (rot: herunterreguliert, blau: hochreguliert). Normale Kontrollgruppe (unbestrahlt) (NKG), Histologisches Normalgewebe (bestrahlt) (NG), Proliferative Läsionen (PL) modifiziert nach Stauffer et al. (Stauffer et al., 2021)

Im nächsten Schritt konnten die Gene identifiziert werden, die in den verschiedenen experimentellen Gruppen unterschiedlich reguliert waren. Hierfür wurde jedes Gen einzeln statistisch getestet und der resultierende p-Wert für multiples Testen korrigiert (FDR-Wert). Neben dem Signifikanzwert erhält man auch die Regulationsstärke (Unterschied in der Expressionshöhe oder „fold change“), die als logarithmischer Wert ( $\log_2$ -FC) ausgedrückt wird. Es wurden drei experimentelle Gruppen (PL, NG, NKG) definiert, die paarweise miteinander verglichen werden (Abbildung 14 A). Abbildung A stellt sogenannte Volcano Plots dar, in denen beide Parameter gegeneinander aufgetragen werden. Auf der x-Achse ist die Expressionshöhe eines jeden Gens als  $\log_2$ -FC dargestellt, auf der y-Achse die statistische Signifikanz für den Vergleich der beiden experimentellen Gruppen. Die genutzten Schwellenwerte sind als grau gestrichelte Linien eingezeichnet, die bei einem  $\log_2$ -FC von 0,5 und bei einem FDR korrigiertem P-Wert von 0,1 festgelegt wurden. Gene, die über beiden Schwellenwerte lagen, wurden als unterschiedlich reguliert betrachtet und sind rot markiert. Grün markiert sind Gene, die zwar über dem Grenzwert des  $\log_2$ -FC liegen jedoch unterhalb des Signifikanzniveaus. Blau markiert sind jene Gene, die überhalb des Signifikanzniveaus liegen, aber unterhalb des Grenzwerts des  $\log_2$ -FC.

Wenn man die Gruppenvergleiche im Einzelnen betrachtet, fällt auf, dass in Bezug auf  $\log_2$ -FC und FDR-Wert die differenzielle Genexpression bei NG im Vergleich zu NKG am geringsten ausgeprägt war (insgesamt 128 differenziell exprimierte Gene). Eine höhere Anzahl von Genen war bei dem Vergleich PL zu NG (1355 Gene) bzw. PL im Vergleich zu NKG reguliert. (2379 Gene) (Abbildung 14 A).

Neben der Betrachtung der einzelnen Gene ist es auch besonders hilfreich, biologisch sinnvolle Gruppen von Genen (zum Beispiel „gene set“) zu analysieren. Eine gängige Methode hierfür wird Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) genannt. Dabei werden die Ergebnisse aus der differenziellen Genexpressionsanalyse nach  $\log_2$ -FC sortiert. In der sortierten Tabelle wird dann die Verteilung der Gene, die jeweils in einem „gene set“ enthalten sind, analysiert. Neben der Betrachtung der einzelnen Gene ist es auch besonders hilfreich, Gruppen von Genen ("gene set") mit einer vorab charakterisierten biologischen Aktivität (z.B. biomolekularer Pathway) zu analysieren. Die dabei betrachteten "gene sets" mit funktioneller Charakterisierung stammen aus öffentlich verfügbaren Datenbanken (z.B. KEGG, Hallmark, Reactome) (Kanehisa et al., 2002, Jassal et al., 2020). Bei dieser sog. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) wurde in der vorliegenden Arbeit die Analyse-Variante GSEAPreranked (v6.0.12) verwendet, bei der eine vorab sortierte Genliste verwendet wird. Diese Genliste stammt aus der differenziellen Genexpressionsanalyse zwischen zwei Gewebegruppen und beinhaltet eine Sortierung der differenziell exprimierten Gene nach absteigendem  $\log_2$ -FC ("fold change"). Der GSEAPreranked Enrichment Score für jedes analysierte "gene set" spiegelt wider, wie häufig einzelne Gene eines

bestimmten "gene sets" am Anfang (hoher "fold-change", hoch exprimiert) oder am Ende (niedriger "fold-change", niedrig exprimiert) stehen. Neben dem GSEA Preranked Enrichment Score wird über einen Permutationstest für jedes "gene set" ein p-Wert ermittelt. Auf diese Weise wurden in der vorliegenden Arbeit "gene sets" identifiziert, die zwischen untersuchten Gewebegruppen eine unterschiedliche Aktivität aufwiesen.

Die Ergebnisse der GSEA werden in Abbildung 14 B gezeigt. Die drei Spalten entsprechen den paarweisen Vergleichen der experimentellen Gruppen und jede Zeile entspricht einem Gen Set. Die „gene sets“ werden nach biologischen Gruppen zusammengefasst. Die Farbe der Kreise repräsentiert die Stärke der Anreicherung (Normalized Enrichment Score= NES). Die Größe der Kreise stellt das Signifikanzniveau dar.

Alle „gene sets“ mit einer FDR < 0,1 in mindestens einem der drei Vergleiche wurden in die Darstellung aufgenommen. Hauptsächlich wurden aktivierte Immun-Signalwege und herunterregulierte metabolische Signalwege in NG im Vergleich zu NKG gefunden, insbesondere die „gene sets“ mit den Bezeichnungen „allograft rejection“, „interferon alpha/gamma response“, „inflammatory response“ und „TNF $\alpha$  via NF- $\kappa$ B signaling“.

Im Gruppenvergleich PL zu NG wurden unterschiedlich regulierte Signalwege nachgewiesen, die mit Proliferation oder dem Metabolismus assoziiert sind. Ebenso sind Effekte in den Immunsignalwegen, die aber nicht so stark ausgeprägt sind wie im Vergleich NG zu NKG.

Beim Vergleich PL zu NKG wurden ebenfalls Signalwege identifiziert, die mit einer erhöhten proliferativen Aktivität verknüpft sind.

Zusätzlich wurde eine Deregulation von KRAS vermittelter Signaltransduktion in allen drei Gruppenvergleichen beobachtet. Es zeigt sich ein Unterschied zwischen NG-NKG und den beiden anderen Gruppen, was möglicherweise auf eine Mutation in diesem Signalweg hinweisen könnte.

In Abbildung 15 sind die differenziell exprimierten Gene aus allen paarweisen Vergleichen der drei experimentellen Gruppen (PL-NG, NG-NKG, PL-NKG) visualisiert und sowohl die Anzahl der gemeinsam differenziell exprimierten Gene (Schnittmengen im Venn Diagramm) als auch spezifisch differenziell exprimierte Gene (exklusiv für einen Gruppenvergleich) dargestellt.

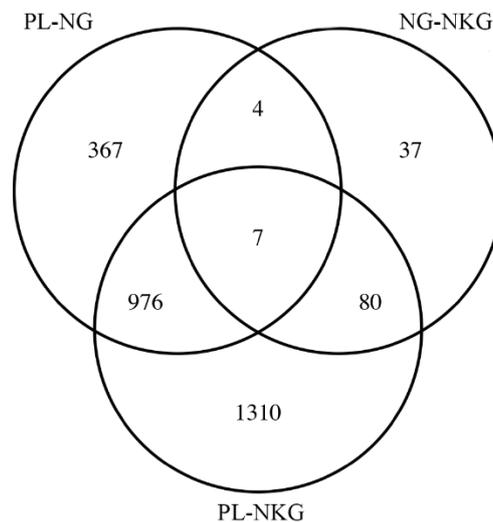


Abbildung 15 Venn Diagramm

Die eingetragenen Zahlen entsprechen den jeweils differenziell exprimierten Genen. Normale Kontrollgruppe (unbestrahlt) (NKG), Histologisches Normalgewebe (bestrahlt) (NG), Proliferative Läsionen (PL), modifiziert nach Stauffer et al. (Stauffer et al., 2021)

#### A) PROGENy Ergebnisse - Dotplot

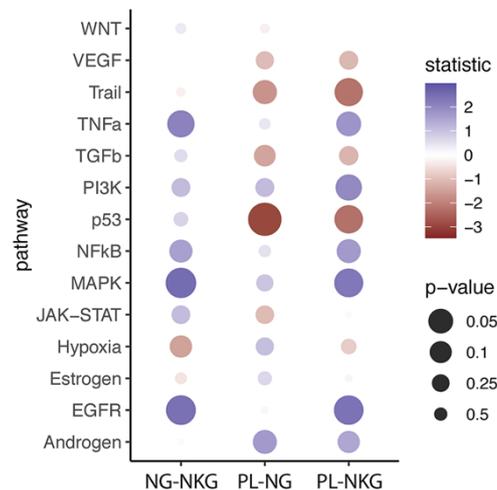


Abbildung 16 Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse

A) Visualisierung aller PROGENy-Ergebnisse mittels Dotplot. Die Punktgröße entspricht der Signalstärke (größer ist stärker), die Punktefarbe spiegelt die Richtung der Deregulierung wider (rot: herunterreguliert, blau: hochreguliert). modifiziert nach Stauffer et al. (Stauffer et al., 2021)

Während die GSEA eine Aussage über *a priori* definierte Sets von Genen, die bestimmte Pathways oder zelluläre Funktionen widerspiegeln, zwischen verschiedenen Phänotypen erlaubt, ermöglicht

eine PROGENy-Analyse einen Hinweis auf die Aktivierung bestimmter Pathways. Die PROGENy-Analyse zeigte im vorliegenden Datensatz eine aktivierte EGFR-, MAPK- und TNF $\alpha$ -Signaltransduktion in NG im Vergleich zu NKG. Der auffälligste Befund bei PL im Vergleich zu NG war ein herunterregulierter p53-Signalweg, während PL im Vergleich zu NKG einen erhöhten proliferationsassoziierten Signalweg (MAPK, PI3K, EGFR) und einen herunterregulierten p53-Signalweg zeigte (Abbildung 16 A). Damit konnten die unterschiedlich regulierten, Proliferationsassoziierten Signalwege aus der GSEA durch die PROGENy-Analyse besser eingegrenzt und charakterisiert werden.

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, molekulare Mechanismen in frühen Stadien der Schilddrüsenkarzinogenese nach Strahlenexposition im Mausmodell aufzuklären. Die Translation dieser Erkenntnisse auf den Menschen würde einen wesentlichen Beitrag in der molekularen Diagnostik und bei der Risikoabschätzung nach Strahlenexposition leisten, da beim häufigsten strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinom, dem papillären Karzinom, bislang keine histologischen und molekularen Vorstufen bekannt sind. Zur Aufklärung möglicher Tumorstufen nach Strahlenexposition wurden die histologischen und molekularen Veränderungen in den Schilddrüsen von Mäusen nach Strahlenexposition im zeitlichen Verlauf bis zu 24 Monaten vergleichend mit einer Kontrollgruppe analysiert.

Mausmodelle stellen heutzutage ein bestens etabliertes präklinisches Konzept zur Untersuchung der molekularen Mechanismen der Karzinogenese dar. Die Übereinstimmung vieler molekularer und zellulärer Merkmale der Schilddrüse bei Mensch und Maus bietet die Grundlage, um Gewebeproben im Zeitverlauf molekularbiologisch und histologisch untersuchen und geeignete Rückschlüsse für die medizinische Forschung am Menschen ziehen zu können (Perlman, 2016). Hinsichtlich der Schilddrüsen Pathologie existieren jedoch erhebliche Unterschiede in der Nomenklatur zwischen Maus und Mensch. Die Definitionen von präneoplastischen und neoplastischen Schilddrüsenläsionen unterscheiden sich zwischen Mensch und Maus auf teilweise erheblich (DeLellis RA, 2004) (Capen, 2001a). Anders als beim Menschen, wo eine Differenzierung zwischen follikulären, papillären und anaplastischen Karzinomen vorgenommen wird, werden bei der Maus sämtliche Subtypen unter dem Begriff „follikuläres Karzinom“ zusammengefasst. Diese unterschiedlichen Definitionen schränken eine vergleichende Analyse zwischen einzelnen Subtypen von Schilddrüsenkarzinomen deutlich ein. Für diese Studie wurden Gewebeproben auf

der Grundlage der „Capens International Classification of Rodent Tumors“ (Capen, 2001a) untersucht, die nicht zwischen den verschiedenen histologischen Subtypen unterscheidet. Dieses Klassifikationssystem wurde gewählt, da der Fokus dieser Arbeit auf histologische Anomalien im frühen Prozess der Schilddrüsenkarzinogenese liegt, unabhängig von deren weiterer Differenzierung in späteren Phasen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit keine vergleichende Untersuchung eines spezifischen Subtypus angestellt.

Die umfassende histologische Untersuchung von 164 exponierten und 82 nicht exponierten Schilddrüsen ergab neoplastische Veränderungen in neun ausschließlich exponierten Versuchstieren. Dies steht im Einklang mit der Hypothese, dass die ionisierende Strahlung in der Literatur als einer der Risikofaktoren für die Entwicklung eines Schilddrüsenkarzinoms beschrieben wird (Mullenders et al., 2009, Cardis et al., 2005, Ron, 2007, Williams, 2008). Die niedrige Bestrahlungsdosis von höchstens 0,5 Gy kann ein Grund für das zahlenmäßig geringe Auftreten der Vorstufen in der Kohorte sein.

Das Studiendesign ist auf die Untersuchung der direkten Wirkung der Bestrahlung ausgelegt. Eine Kohorte männlicher und weiblicher Tiere, die in zwei Studienarmen eingeteilt wurden, wurden über längstens zwei Jahre hinweg beobachtet und an verschiedenen Zeitpunkten histologisch aufgearbeitet. Die Versuchsgruppe wurde im Alter von 10 Wochen einmalig über den gesamten Körper bestrahlt und eine parallel scheinbehandelte Gruppe diente als Kontrolle (Material & Methoden 3.2). Alle Tiere waren den gleichen Umweltbedingungen ausgesetzt, deshalb können umweltbedingte Faktoren einer Tumorentstehung weitestgehend ausgeschlossen werden.

In der Transkriptomanalyse konnte eine interessante Übereinstimmung der hochregulierten Signalwege sowohl in der Läsion (PL) als auch im benachbarten Gewebe (NG) festgestellt werden. Aufgrund des vorgegebenen Settings kann daraus allerdings keine Aussage getroffen werden, ob diese Veränderung in der NG Gruppe direkt auf die Bestrahlung zurückzuführen oder als Folge der benachbarten Läsion zu werten ist. Hierzu hätte Gewebe von bestrahlten Mäusen ohne histologische Aberrationen molekularbiologisch untersucht werden müssen.

In der vorliegenden Dissertation war methodisch die größte Herausforderung, die lasergestützte Isolation von histologischen Gewebearealen mit der RNA Sequenzierung von sehr kleinen Zellzahlen zu verknüpfen. Es konnte aber durch ausführliche Qualitätsbetrachtung gezeigt werden, dass die gewählten Methoden und Parameter die Herstellung einer Molekülbibliothek (Library Prep) mit guter technischer Datenqualität ermöglicht (Tabelle 2 und Tabelle 3 in Ergebnisse). Die Datenanalyse nach Sequenzierung zeigte, dass man daraus biologische Signale (Abbildung 13, Abbildung 14 A) extrahieren und nachvollziehbare biologische Zusammenhänge aufklären kann (Abbildung 14B, Abbildung 15, Abbildung 16).

Der Umfang der molekulargenetischen Untersuchungen war begrenzt durch das geringe Probenvolumen der Mausschilddrüse. Weitere Untersuchungen auf Proteinebene und Daten über den BRAF V600E-Mutationsstatus, genomische Rearrangements, und RET/PTC-Rearrangements, die häufig bei Schilddrüsenkarzinomen beschrieben werden, wären wünschenswert, um die Schlussfolgerungen weiter zu untermauern.

#### 4.1 Histologische Veränderungen nach Strahlenexposition

In sämtlichen untersuchten Mäusen, in denen proliferative Veränderung nachgewiesen wurden, konnte kein einziges Karzinom festgestellt werden. Dies könnte auf die allgemein begrenzte Lebensdauer einer Maus im Forschungslabor zurückzuführen sein, zumal das Experiment nach längstens 24 Monaten beendet wurde. Es ist anzunehmen, dass die Entwicklung eines Karzinoms eine längere Latenzzeit erfordern würde. Dies wird zusätzlich erhärtet durch die Beobachtung, dass proliferative Veränderungen ausschließlich bei Tieren ab einem Alter von 18 Monaten auftraten. Es ist denkbar, dass zusätzliche Umweltfaktoren oder hormonelle Faktoren für die Entstehung eines Karzinoms notwendig sein könnten, um eine Promotion oder Progression von initiierten neoplastischen Zellen zu erreichen. In diesem Zusammenhang spielen insbesondere zusätzliche epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle (Hanahan and Weinberg, 2000).

Von besonderer Bedeutung ist, dass in der vorliegenden Studie ausschließlich Hyperplasien und Adenome nachgewiesen wurden, die als frühe Stufen während der Karzinogenese angesehen werden können. Für das häufigste strahleninduzierte Schilddrüsenkarzinom beim Menschen, das papilläre Schilddrüsenkarzinom, sind solche Vorstufen bislang nicht bekannt. In der humanmedizinischen Literatur ist die Hypothese eines mehrstufigen Karzinogenesemodells für follikuläre Schilddrüsenkarzinome formuliert, in der follikuläre Adenome als frühe Läsionen gelten und bereits deren charakteristische genetische Veränderungen aufweisen (Jung et al., 2016). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation war es deshalb möglich, gezielt solche vermeintlichen Vorstufen zu untersuchen und molekulare Veränderungen als Marker zu identifizieren, über die auch in menschlichen Schilddrüsen Geweben proliferative Veränderungen nachgewiesen werden können.

Aus epidemiologischen Daten zu Schilddrüsenkarzinomen in Deutschland, die eine erhöhte Inzidenz bei Frauen zeigen (Robert Koch Insitut, 2018), hätte man auch im Tierversuch eine erhöhte Prävalenz von neoplastischen Veränderungen in weiblichen Tieren erwartet. In einem Fisher Exakt Test konnte ein statistisch signifikante Überrepräsentation von weiblichen Geschlecht festgestellt werden. Dies stimmt mit der Literatur des humanen strahleninduzierten Schilddrüsenkarzinoms überein. Allerdings wird auch in strahleninduzierten

Schilddrüsenkarzinomen beim Menschen diese geschlechtsspezifische Prävalenz deutlich vermindert (Mahoney et al., 2004). Daher könnte auch im Mausmodell der Strahleneffekt dazu führen, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Tumorentstehung nicht auftreten.

## 4.2 Immunzellinfiltration in histologischen Subgruppen

Es ist allgemein anerkannt, dass Entzündungen mit der Entstehung von Krebs in Verbindung stehen (Mantovani et al., 2008). Beim Schilddrüsenkrebs spielt die entzündliche Tumormikroumgebung, die Immunzellen und Mediatoren wie Chemokine enthält, eine zentrale Rolle in der Karzinogenese und gehört zu den Kennzeichen eines Tumors (Yapa et al., 2017). In den untersuchten Schilddrüsengeweben der vorliegenden Studie konnten vereinzelt Immunzellinfiltrate, aber keine großflächigen Entzündungsherde beobachtet werden. Bei statistischer Analyse der ermittelten Immunzellzahlen in den Infiltraten konnten aber Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden, denn die Zahl der Immunzellen nahm in den unterschiedlichen histologischen Gruppen von normalem Kontrollgewebe (NKG), normalem Gewebe (NG) bis hin zu proliferativen Läsionen (PL) stetig zu (Abbildung 12). Während in NKG Immunzellen mit etwa zehn Immunzellen pro  $\text{mm}^2$  nur sporadisch vorhanden waren, verdreifachte sich die Zahl in den normalen Geweben, die aus aberranten Schilddrüsen entnommen wurden (NG), und war in der Gruppe der proliferativen Läsionen (PL) sechsmal so hoch. Erhöhte Immunzellzahlen in NG- und PL-Geweben weisen auf eine deregulierte Expression von Chemokinen hin, die physiologische Veränderungen und Immunreaktionen durch die Rekrutierung spezifischer Immunzellpopulationen an den Ort der Neoplasie bewirken. Neoplastische Schilddrüsenzellen haben die Fähigkeit das Chemokin-System derart zu verändern, dass sie die Rekrutierung von Immunzellen in ihre Mikroumgebung fördern und dadurch die Progression der Karzinogenese begünstigen (Yapa et al., 2017).

Das auffälligste Ergebnis des molekulargenetischen Gruppenvergleichs zwischen normalen Schilddrüsengeweben (NG) assoziiert mit proliferativen Läsionen, normalen Schilddrüsengeweben ohne histologische Anomalien (NKG) und proliferativen Läsionen (PL) ist eine erhöhte Aktivierung der Immunantwort, die sich aus der Anreicherung verschiedener „gene sets“ der Immunantwort ableitet. Somit zeigen histologische Veränderung hin zu PL sowohl eine erhöhte Zahl infiltrierender Immunzellen als auch ein erhöhtes Immunsignaling auf molekularer Ebene. Die Vorteile einer integrativen Betrachtung von Histologie und molekularen Analysen auf Transkriptom Ebene werden hierbei sehr deutlich (Abbildung 12, Abbildung 14).

### 4.3 Molekulargenetische Veränderungen in histologischen Subgruppen

Nachdem im vorherigen Abschnitt im Zusammenhang mit der Immunzellinfiltration bereits molekulargenetische Befunde diskutiert wurden, die mit immunologischen Vorgängen in Verbindung stehen, soll in diesem Abschnitt der Fokus auf die Interpretation der Transkriptionsanalysen in den verschiedenen histologischen Subgruppen gelegt werden.

Wenn man zunächst als allgemeinen Überblick die Varianzstruktur der Genexpressionsprofile mittels Hauptkomponentenanalyse betrachtet, zeigt der Datensatz eine deutliche Gruppierung der Proben in ihre Vergleichsgruppen. Dies verdeutlicht ihre globalen unterschiedlichen Genexpressionen innerhalb der einzelnen Gruppen. Ebenso kann man dieses Ergebnis als technische Plausibilitätskontrolle interpretieren, die verdeutlicht, dass sowohl Probenvertauschung als auch Kontamination ausgeschlossen werden kann. Im Hinblick auf die methodische Herausforderung, sehr kleine, mikrodissesektierte Gewebeareale erfolgreich zu sequenzieren, war diese Plausibilitätsüberprüfung der mRNA Daten von großer Bedeutung.

Ein Vergleich der Genexpressionen zwischen den histologischen Subgruppen zeigte in den proliferativen Bereichen eine Hochregulierung von *gene sets* und Signalwegen, die mit Proliferation, Inflammation und Karzinogenese assoziiert sind (Abbildung 14). Im Normalgewebe assoziiert mit PL Arealen konnte interessanterweise auch eine Deregulierung einiger dieser Signalwege nachgewiesen werden. Obwohl sich also die PL-Gruppe und die NG-Gruppe histomorphologisch nicht ähnlich sind, konnten einige Übereinstimmungen auf Genexpressionsebene gefunden werden. Es ist eine wesentlich neue Erkenntnis dieser Dissertation, dass in Schilddrüsengeweben auf Genexpressionsebene bereits dynamische Prozesse ablaufen, die morphologisch unauffällig sind.

Auf Basis der zusätzlich zu den GSEA zusätzlich durchgeführten PROGENy Analysen wurde auch die Aktivierung einiger wichtiger Signalwege bei der Schilddrüsenkarzinogenese genauer betrachtet (Abbildung 16).

Der MAPK Signalweg, wie in der Einleitung schon angeführt, ist von großer Bedeutung in proliferativen Geweben und hat einen wichtigen Stellenwert in der Entwicklung von Schilddrüsenkarzinomen (Xing, 2013). Interessanterweise ist der MAPK Signalweg zwar in allen drei Vergleichen hochreguliert, jedoch im Vergleich zwischen PL und NG ist der Unterschied kaum ausgeprägt. Dies könnte wiederum bedeuten, dass auf Transkriptomebene eine höhere Ähnlichkeit zwischen diesen Geweben besteht und dass das proliferative Gewebe (PL) aus dem assoziierten normalen Gewebe (NG) hervorgeht. Gleichzeitig deutet dieser Befund darauf hin, dass die Aktivierung des MAPK Signalwegs ein sehr frühes Ereignis bei der Schilddrüsenkarzinogenese darstellt. Des Weiteren zeigte sich, dass die P53 Aktivität in beiden Vergleichen mit proliferativen

Gewebe negativ reguliert ist. Diese Beobachtungen lassen die Interpretation zu, dass die durch p53 vermittelten apoptotischen Prozesse im NG-Gewebe, die bereits eine aktivierte MAPK-Antwort aufwiesen, die Zellen vor einer übermäßigen Proliferation bewahrt haben, während die aktivierte MAPK-Antwort möglicherweise zu einer übermäßigen Proliferation in PL führte, da dort die p53-assoziierte Apoptose herunterreguliert wurde.

Mutationen von KRAS und anderen RAS Genen haben einen besonderen Stellenwert in der Schilddrüsenkarzinogenese, da sie auch Teil des MAPK Signalwegs und beim Menschen vor allem für follikuläre Tumoren typisch sind (Vasko et al., 2003, Santarpia et al., 2010). In den durchgeführten GSEA Analysen zeigten sich die KRAS assoziierten Signalwege dereguliert in den proliferativen Läsionen (PL) im Vergleich zu den Kontrollgeweben (Abbildung 14B). Im Vergleich zwischen den Normalgeweben assoziiert mit PL und den normalen Kontrollgeweben waren KRAS Signalwege ebenfalls aktiviert, während kein Unterschied zwischen PL und NG zu beobachten war. Auch dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, dass sich PL und NG auf molekularer Ebene sehr ähnlich sind und dass es sich bei den proliferativen Läsionen um mögliche Vorstufen eines Schilddrüsenkarzinoms handelt, die bereits im benachbarten Normalgewebe auf molekularer Ebene abgebildet sind. In follikulären Schilddrüsenkarzinomen beim Menschen wurde auch eine Deregulation des PI3K Signalwegs beschrieben (Xing, 2013). In dem Datensatz der vorliegenden Dissertation zeigte sich jedoch keine auffällige Veränderung dieses Signalwegs in einer der untersuchten histologischen Subgruppen. Das deutet auch darauf hin, dass PI3K Veränderungen erst später bei der Schilddrüsenkarzinogenese in den invasiven Karzinomen auftreten.

Im Rahmen der Pathwayanalysen für Immunfunktionen sollte auch der NF $\kappa$ B-Signalweg hervorgehoben und diskutiert werden. NF $\kappa$ B wird als regulatorisches Protein zu den spezifischen Transkriptionsfaktoren gezählt, die in allen Zelltypen vorkommt. NF $\kappa$ B und seine Signalwege wird eine besondere Rolle als „Mediator des Immunsystems“ zugeschrieben. NF $\kappa$ B als einer der wichtigsten Regulatoren der Expression von proinflammatorischen Genen, ist in Entzündungsprozessen von großer Bedeutung (Karin, 2009). Die Präsenz von NF $\kappa$ B in Thyreozyten deutet auch hier auf eine starke Beteiligung an Immunprozessen und an der Karzinogenese hin (Giuliani et al., 2018, Pacifico and Leonardi, 2010).

Tatsächlich zeigen die hier erhaltenen Resultate der molekulargenetischen Untersuchungen eine deutliche Hochregulierung dieses Signalwegs. Dieser Signalweg könnte daher auch eine zentrale Rolle bei der hier untersuchten Progression von histologischem Normalgewebe zu proliferativen Läsionen einnehmen.

Die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Transkriptionsfaktors kann sowohl die Krebsentstehung fördern als auch hemmen. Er ist einerseits eine potenzielle Verbindung zwischen Krebs und Entzündung in der Schilddrüsenkarzinogenese sowie ein erwiesener gemeinsamer Mechanismus zur Aktivierung

des Zellüberlebens, der Zellproliferation, der Zelldifferenzierung und Angiogenese. Der NF $\kappa$ B - Transkriptionsfaktor kann andererseits auch antikanzerogen wirken, indem er eine Immunantwort über die Rekrutierung von Immunzellen einleitet (Pires et al., 2018).

Die Ergebnisse aus den histologischen und molekulargenetischen Untersuchungen der vorliegenden Dissertation lassen die Schlussfolgerung zu, dass das weithin anerkannte Modell der schrittweisen Progression zu Krebs auch bei der Schilddrüsenkarzinogenese verwirklicht ist, bei der die Akkumulation von Mutationen zu einer sukzessiven klonalen Expansion und aberranten Phänotypen führt (Martincorena and Campbell, 2015, Laconi et al., 2020). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass histologisch normale Gewebe (NG) assoziiert mit proliferativen Läsionen, die keine morphologisch erkennbaren Anomalien aufweisen, ein sehr frühes Stadium der Schilddrüsenkarzinogenese darstellen und weiter zu proliferativen Läsionen fortschreiten. Es wurde zum ersten Mal gezeigt, dass solche histologisch normalen Strukturen Veränderungen in typischen Signalwegen wie MAPK aufweisen und damit frühe Veränderungen im karzinogenen Prozess darstellen. Dies wird durch den Befund untermauert, dass ähnliche Veränderungen im Transkriptom in menschlichen papillären Schilddrüsenkarzinomen (UKrAM Kohorte), die nach Strahlenexposition durch den Tschernobyl Reaktorunfall entstanden sind, zu beobachten waren (Stauffer et al., 2021).

## 5 Zusammenfassung

Die Inzidenz von Schilddrüsenkarzinomen nimmt in den letzten Jahrzehnten weltweit stark zu. Für die Entstehung von papillären Schilddrüsenkarzinomen ist ionisierende Strahlung ein möglicher Risikofaktor, der insbesondere bei Kindern in zahlreichen Studien nach dem Tschernobyl Kernreaktorunfall beschrieben wurde. Trotz dieser epidemiologischen Zusammenhänge sind auf molekularer Ebene frühe Veränderungen in der Schilddrüse nach Strahlenexposition weitgehend unbekannt. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit histologischen und molekularen Prozessen, die in frühen Stadien der Schilddrüsenkarzinogenese nach Strahlenexposition auftreten.

Grundlage für diese Untersuchungen und molekularen Charakterisierungen war eine tierexperimentelle Studie zur Wirkung niedriger Strahlendosen mit insgesamt 246 Mäusen, von denen 164 eine Ganzkörperbestrahlung mit verschiedenen Dosen (0.063 Gy, 0.125 Gy and 0.5 Gy Gammabestrahlung) erhielten und 82 Mäuse als unbestrahlte Kontrollgruppe dienten. Im Rahmen dieser Dissertation erfolgte eine umfassende histologische Untersuchung der entnommenen Schilddrüsen in Form von Serienschnitten durch das gesamte Organ. Ausschließlich neun bestrahlte Tiere der beiden höheren Dosisgruppen zeigten dabei proliferative Veränderungen, die entweder als Hyperplasie oder Adenom klassifiziert wurden.

Um die molekularen Veränderungen in diesen proliferativen Läsionen näher zu beleuchten, wurden mittels RNA Sequenzierung Transkriptomprofile erstellt. Eine wichtige Voraussetzung war die spezifische Analyse der histologisch veränderten Areale sowie die Isolation der RNA aus diesen Zellen. Dabei stellten diese ortsaufgelösten genomweiten Analysen an Gefrierschnitten eine hohe technische Herausforderung dar. Deshalb musste im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst eine methodische Verknüpfung von Laser-Capture-Mikrodissektion und anschließender RNA Isolation mit Sequenzierung aus Gefrierschnitten erfolgreich etabliert werden. Dies gelang unter Anpassung eines speziellen Protokolls, das mit geringen Ausgangsmengen an RNA eine zuverlässige Sequenzierung und eine erfolgreiche Qualitätskontrolle der Expressionsprofile ermöglichte, um anschließend eine differenzielle Genexpressionsanalyse zwischen verschiedenen experimentellen Gruppen sowie funktionelle Pathwayanalysen durchzuführen. Die experimentellen Vergleichsgruppen waren Schilddrüsen mit Arealen von proliferativen Veränderungen, mit daran angrenzenden, histologisch normalen Gewebearealen sowie Schilddrüsen mit Normalgewebsarealen aus der unbestrahlten Kontrollgruppe. Die proliferativen Läsionen zeigten dabei im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrollgruppe vor allem eine Deregulation von einem Satz proliferationsassoziiierter Gene. Interessanterweise zeigte auch der

Vergleich von Normalgeweben aus den benachbarten Arealen der proliferativen Läsionen mit der Kontrollgruppe eine Anreicherung von Genen für hauptsächlich proliferative Signalwege. Daneben zeigte sich bei den genannten Vergleichen auch eine Deregulation von Genen die an der Immunantwort beteiligt sind. Deshalb wurde zusätzlich eine Quantifizierung der Immunzellinfiltration an den HE-gefärbten Schnitten durchgeführt, um einen unabhängigen Nachweis für die Rekrutierung von Immunzellen in den verschiedenen Gewebegruppen zu erhalten. Die höchste Infiltration an Immunzellen zeigte sich in den proliferativen Veränderungen und in den benachbarten Normalgewebe Arealen. Die Normalgewebe der unbestrahlten Kontrollgruppe zeigte dagegen die niedrigste Immunzellinfiltration.

Diese Ergebnisse auf molekularer und histologischer Ebene deuten darauf hin, dass eine Deregulierung von proliferationsassoziierten Signalwegen und eine erhöhte Immunaktivität in bestrahlten Geweben auftritt.

## 6 Summary

There is a worldwide increase in the incidence of thyroid cancer in the last decades. Ionising radiation is a well-known risk factor for the development of papillary thyroid carcinomas and was particularly reported for childhood cancer in numerous studies after the Chernobyl reactor accident. Despite these epidemiological evidence early-stage molecular changes within the thyroid gland are largely unknown after radiation exposure. Therefore, the present thesis deals with histological and molecular processes in early stages of thyroid carcinogenesis after radiation exposure.

The present investigations are based on an animal study on the impact of low-dose irradiation using 246 mice. 164 mice obtained a whole-body irradiation with different doses (0.0063 Gy, 0.125 Gy, 0.5 Gy gamma irradiation) and 82 mice represented a non-irradiated control group. Within the scope of the thesis a comprehensive histological examination of the thyroid glands was performed by serial sections of each organ. Only thyroids of nine irradiated mice of the both higher dose groups showed proliferative lesions comprising either hyperplasia or adenoma.

To investigate molecular changes of these proliferative lesions transcriptomic profiles were generated by RNA sequencing. An important prerequisite was a specific analysis of histologically aberrant areas and a RNA isolation from cells thereof. Such spatially-resolved analyses of the whole transcriptome from frozen tissue sections were a major methodological challenge. Therefore, a methodology to combine laser capture microdissection and RNA isolation with subsequent sequencing had to be successfully established on frozen tissue sections. By adaptation of a protocol for sequencing of low-input RNA amounts reliable expression profiles with sufficient quality assurance measurements could be generated from the microdissected areas that allowed for a differential gene expression and functional pathway analysis between different experimental groups. These different experimental groups consisted of thyroid areas with proliferative lesions, of normal tissue areas adjacent to proliferative lesions and of normal tissue areas of non-irradiated thyroids. Compared to non-irradiated normal tissues a deregulation of proliferative gene sets pathways was observed in proliferative lesions and normal tissue areas adjacent to proliferative lesions. Moreover, a deregulation of gene sets of the immune response became apparent for the same comparisons. Based on this finding a quantification of infiltrated immune cells was performed on HE-stained tissue sections to provide evidence for immune cell infiltration within the different experimental tissue groups. The strongest immune cell infiltration was observed in proliferative lesions and adjacent normal tissue areas. The non-irradiated normal tissues showed the lowest infiltration of immune cells.

The presented results on molecular and histological levels indicate a deregulation of proliferation-associated pathways and an increased immune activity yet in normal tissues of irradiated thyroids. Thus, they likely represent an initial step during the multi-step process of radiation-induced carcinogenesis. Moreover, the molecular findings from the mouse model showed similar changes as reported in human radiation-induced thyroid carcinomas such as a deregulation of the MAPK pathway.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematischer Aufbau einer menschlichen Schilddrüse .....	1
Abbildung 2 Zusammenhänge der Signalwege in der Schilddrüsenkarzinogenese modifiziert nach Xing et al. (Xing, 2013).....	9
Abbildung 3 MAP Kinase Kaskade modifiziert nach Xing et al. (Xing, 2013) .....	9
Abbildung 4 Experimentelle Gruppen.....	13
Abbildung 5 Schemazeichnung: Aufbau eines Laser Mikrodisektion Systems.....	15
Abbildung 6 Murines Schilddrüsengewebe vor und nach der Laser Capture Dissection.....	16
Abbildung 7 Workflow modifiziert nach Stauffer et al.(Stauffer, 2021).....	19
Abbildung 8 Illustration der Probengewinnung mittels Laser Capture Microdissection.....	21
Abbildung 9 Beispiele der follikulären Hyperplasie in der Mausschilddrüse .....	27
Abbildung 10 Follikuläres Adenome in der Mausschilddrüse.....	28
Abbildung 11 Immunzellinfiltration in dem murinen Schilddrüsengewebe HE-Färbung, .....	30
Abbildung 12 Vergleichende Statistik der Immunzellichte zwischen den experimentellen Gruppen .....	32
Abbildung 13 PCA Hauptkomponentenanalyse .....	33
Abbildung 14 Differenzielle Genexpressionsanalyse und Pathwayanalyse .....	34
Abbildung 15 Venn Diagramm.....	37
Abbildung 16 Ergebnisse aus der Transkriptomanalyse .....	37

## 8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ANOVA	analysis of variance
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FDR	false discovery rate
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
Gy	Gray
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
LPC	laser pressure catapulting
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
NF $\kappa$ B	Nuclear-factor $\kappa$ B
ng	Nanogramm
NG	Normalgewebe
NKG	Normales Kontrollgewebe
nM	nanomolar
PCA	principal component analysis
PCR	polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PL	Proliferative Läsionen
PTC	papillary thyroid cancer
RIN	RNA Integrity Number
RNA	Ribonukleinsäure
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin

TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- alpha
TRH	Thyreotropin-Releasing-Hormon
WHO	World Health Organization
$\mu\text{m}$	Mikrometer

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über die humane Schilddrüsentumoren .....	3
Tabelle 2 Übersicht über die RNA Proben .....	22
Tabelle 3 Übersicht über die hergestellten Molekülbibliotheken für die Sequenzierung.....	24
Tabelle 4 Histologische Charakteristika der Mäuse, die molekular charakterisiert wurden.....	26
Tabelle 5 Vierfeldertafel der Fallzahlen für die Faktoren „Strahlenexposition“ und „proliferative Veränderungen“ .....	29
Tabelle 6 Vierfeldertafel der Fallzahlen für die Faktoren „Strahlenexposition“ und „proliferative Veränderungen“-Stratifikation nach Geschlecht.....	29
Tabelle 7 Vierfeldertafel der Fallzahlen für die Faktoren „Strahlenexposition“ und „proliferative Veränderungen“-Stratifikation nach Alter.....	30
Tabelle 8 Immunkzellen pro mm <sup>2</sup> .....	31

## 10 Literaturverzeichnis

- ABUBAKER, J., JEHAN, Z., BAVI, P., SULTANA, M., AL-HARBI, S., IBRAHIM, M., AL-NUAIM, A., AHMED, M., AMIN, T., AL-FEHAILY, M., AL-SANEA, O., AL-DAYEL, F., UDDIN, S. & AL-KURAYA, K. S. 2008. Clinicopathological analysis of papillary thyroid cancer with PIK3CA alterations in a Middle Eastern population. *J Clin Endocrinol Metab*, 93, 611-8.
- ANDERSON, M. W., REYNOLDS, S. H., YOU, M. & MARONPOT, R. M. 1992. Role of proto-oncogene activation in carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, 98, 13-24.
- BALOCH, Z. W. & LIVOLSI, V. A. 2018. Special types of thyroid carcinoma. *Histopathology*, 72, 40-52.
- BARRETT, J. C. & WISEMAN, R. W. 1987. Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis: relevance to carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect*, 76, 65-70.
- CABANILLAS, M. E., MCFADDEN, D. G. & DURANTE, C. 2016. Thyroid cancer. *Lancet*, 388, 2783-2795.
- CAHOON, E. K., NADYROV, E. A., POLYANSKAYA, O. N., YAUSEYENKA, V. V., VEYALKIN, I. V., YEUDACHKOVA, T. I., MASKVICHEVA, T. I., MINENKO, V. F., LIU, W., DROZDOVITCH, V., MABUCHI, K., LITTLE, M. P., ZABLOTSKA, L. B., MCCONNELL, R. J., HATCH, M., PETERS, K. O., ROZHKO, A. V. & BRENNER, A. V. 2017. Risk of Thyroid Nodules in Residents of Belarus Exposed to Chernobyl Fallout as Children and Adolescents. *J Clin Endocrinol Metab*, 102, 2207-2217.
- CAPEN, C. 2001a. Endocrine System-Thyroid Gland. In: MOHR, U. (ed.) *International Classification of Rodent Tumours. The Mouse*. Springer.
- CAPEN, C. C. 2001b. Overview of structural and functional lesions in endocrine organs of animals. *Toxicol Pathol*, 29, 8-33.
- CARDIS, E., KESMINIENE, A., IVANOV, V., MALAKHOVA, I., SHIBATA, Y., KHROUCH, V., DROZDOVITCH, V., MACEIKA, E., ZVONOVA, I., VLASSOV, O., BOUVILLE, A., GOULKO, G., HOSHI, M., ABROSIMOV, A., ANOSHKO, J., ASTAKHOVA, L., CHEKIN, S., DEMIDCHIK, E., GALANTI, R., ITO, M., KOROBOVA, E., LUSHNIKOV, E., MAKSIOUTOV, M., MASYAKIN, V., NEROVNIA, A., PARSHIN, V., PARSHKOV, E., PILIPTSEVICH, N., PINCHERA, A., POLYAKOV, S., SHABEKA, N., SUONIO, E., TENET, V., TSYB, A., YAMASHITA, S. & WILLIAMS, D. 2005. Risk of thyroid cancer after exposure to <sup>131</sup>I in childhood. *J Natl Cancer Inst*, 97, 724-32.
- 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, 625-7.
- DALKE, C., NEFF, F., BAINS, S. K., BRIGHT, S., LORD, D., REITMEIR, P., ROSSLER, U., SAMAGA, D., UNGER, K., BRASELMANN, H., WAGNER, F., GREITER, M., GOMOLKA, M., HORNHARDT, S., KUNZE, S., KEMPF, S. J., GARRETT, L.,

- HOLTER, S. M., WURST, W., ROSEMAN, M., AZIMZADEH, O., TAPIO, S., AUBELE, M., THEIS, F., HOESCHEN, C., SLIJEPCEVIC, P., KADHIM, M., ATKINSON, M., ZITZELSBERGER, H., KULKA, U. & GRAW, J. 2018. Lifetime study in mice after acute low-dose ionizing radiation: a multifactorial study with special focus on cataract risk. *Radiat Environ Biophys*, 57, 99-113.
- DELELLIS RA, W. E. 2004. Tumors of the Thyroid and Parathyroid. In: DELELLIS RA, L. R. H. P., ENG C (ed.) *World Health Organization (WHO) Classification of Tumors-Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. Lyon: IARC Press.
- EFANOV, A. A., BRENNER, A. V., BOGDANOVA, T. I., KELLY, L. M., LIU, P., LITTLE, M. P., WALD, A. I., HATCH, M., ZURNADZY, L. Y., NIKIFOROVA, M. N., DROZDOVITCH, V., LEEMAN-NEILL, R., MABUCHI, K., TRONKO, M. D., CHANOCK, S. J. & NIKIFOROV, Y. E. 2018. Investigation of the Relationship Between Radiation Dose and Gene Mutations and Fusions in Post-Chernobyl Thyroid Cancer. *J Natl Cancer Inst*, 110, 371-378.
- GEROK, W. 2007. *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*, Schattauer Verlag.
- GIULIANI, C., BUCCI, I. & NAPOLITANO, G. 2018. The Role of the Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B in Thyroid Autoimmunity and Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 471.
- HAMATANI, K., EGUCHI, H., ITO, R., MUKAI, M., TAKAHASHI, K., TAGA, M., IMAI, K., COLOGNE, J., SODA, M., ARIHIRO, K., FUJIHARA, M., ABE, K., HAYASHI, T., NAKASHIMA, M., SEKINE, I., YASUI, W., HAYASHI, Y. & NAKACHI, K. 2008. RET/PTC rearrangements preferentially occurred in papillary thyroid cancer among atomic bomb survivors exposed to high radiation dose. *Cancer Res*, 68, 7176-82.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *cell*, 100, 57-70.
- HANAHAHAN, D. & WEINBERG, R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144, 646-74.
- HESS, J., THOMAS, G., BRASELMANN, H., BAUER, V., BOGDANOVA, T., WIENBERG, J., ZITZELSBERGER, H. & UNGER, K. 2011. Gain of chromosome band 7q11 in papillary thyroid carcinomas of young patients is associated with exposure to low-dose irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 9595-600.
- INSITUT, R. K. 2018. Zentrum für Krebsregisterdaten- Schilddrüsenkrebs.
- JASSAL, B., MATTHEWS, L., VITERI, G., GONG, C., LORENTE, P., FABREGAT, A., SIDIROPOULOS, K., COOK, J., GILLESPIE, M., HAW, R., LONEY, F., MAY, B., MILACIC, M., ROTHFELS, K., SEVILLA, C., SHAMOVSKY, V., SHORSER, S., VARUSAI, T., WEISER, J., WU, G., STEIN, L., HERMJAKOB, H. & D'EUSTACHIO, P. 2020. The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res*, 48, D498-d503.
- JOKINEN, M. & BOTTS, S. 1994. Tumours of the thyroid gland. *IARC scientific publications*, 565-594.
- JONES, T. C., CAPEN, C. C. & MOHR, U. 2012. *Endocrine system*, Springer Science & Business Media.

- JUNG, S. H., KIM, M. S., JUNG, C. K., PARK, H. C., KIM, S. Y., LIU, J., BAE, J. S., LEE, S. H., KIM, T. M., LEE, S. H. & CHUNG, Y. J. 2016. Mutational burdens and evolutionary ages of thyroid follicular adenoma are comparable to those of follicular carcinoma. *Oncotarget*, 7, 69638-69648.
- KANEHISA, M., GOTO, S., KAWASHIMA, S. & NAKAYA, A. 2002. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res*, 30, 42-6.
- KARIN, M. 2009. NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, a000141.
- KAZAKOV, V. S., DEMIDCHIK, E. P. & ASTAKHOVA, L. N. 1992. Thyroid cancer after Chernobyl. *Nature*, 359, 21.
- KLINKE, R., PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. 2009. *Physiologie*, Georg Thieme Verlag.
- KLUGBAUER, S., DEMIDCHIK, E. P., LENGFELDER, E. & RABES, H. M. 1998. Molecular analysis of new subtypes of ELE/RET rearrangements, their reciprocal transcripts and breakpoints in papillary thyroid carcinomas of children after Chernobyl. *Oncogene*, 16, 671-5.
- KONDO, T., EZZAT, S. & ASA, S. L. 2006. Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer*, 6, 292-306.
- KRISHNA, M. & NARANG, H. 2008. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3525-44.
- LA VECCHIA, C., MALVEZZI, M., BOSETTI, C., GARAVELLO, W., BERTUCCIO, P., LEVI, F. & NEGRI, E. 2015. Thyroid cancer mortality and incidence: A global overview. *Int J Cancer*, 136, 2187-95.
- LACONI, E., MARONGIU, F. & DEGREGORI, J. 2020. Cancer as a disease of old age: changing mutational and microenvironmental landscapes. *Br J Cancer*, 122, 943-952.
- LEHNERT, H. 2012. *Rationelle Diagnostik und Therapie in Endokrinologie, Diabetologie und Stoffwechsel*, Thieme.
- LI, M., DAL MASO, L. & VACCARELLA, S. 2020. Global trends in thyroid cancer incidence and the impact of overdiagnosis. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 8, 468-470.
- LIU, Z., HOU, P., JI, M., GUAN, H., STUDEMAN, K., JENSEN, K., VASKO, V., EL-NAGGAR, A. K. & XING, M. 2008. Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers. *J Clin Endocrinol Metab*, 93, 3106-16.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. 2012. *Taschenlebrbuch Histologie* Thieme.
- MAHONEY, M. C., LAWVERE, S., FALKNER, K. L., AVERKIN, Y. I., OSTAPENKO, V. A., MICHALEK, A. M., MOYSICH, K. B. & MCCARTHY, P. L. 2004. Thyroid cancer incidence trends in Belarus: examining the impact of Chernobyl. *Int J Epidemiol*, 33, 1025-33.

- MANTOVANI, A., ALLAVENA, P., SICA, A. & BALKWILL, F. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*, 454, 436-44.
- MARTINCORENA, I. & CAMPBELL, P. J. 2015. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*, 349, 1483-9.
- MILLER, K. A., YEAGER, N., BAKER, K., LIAO, X. H., REFETOFF, S. & DI CRISTOFANO, A. 2009. Oncogenic Kras requires simultaneous PI3K signaling to induce ERK activation and transform thyroid epithelial cells in vivo. *Cancer Res*, 69, 3689-94.
- MORTON, L. M., KARYADI, D. M., STEWART, C., BOGDANOVA, T. I., DAWSON, E. T., STEINBERG, M. K., DAI, J., HARTLEY, S. W., SCHONFELD, S. J., SAMPSON, J. N., MARUVKA, Y. E., KAPOOR, V., RAMSDEN, D. A., CARVAJAL-GARCIA, J., PEROU, C. M., PARKER, J. S., KRZANARIC, M., YEAGER, M., BOLAND, J. F., HUTCHINSON, A., HICKS, B. D., DAGNALL, C. L., GASTIER-FOSTER, J. M., BOWEN, J., LEE, O., MACHIELA, M. J., CAHOON, E. K., BRENNER, A. V., MABUCHI, K., DROZDOVITCH, V., MASIUK, S., CHEPURNY, M., ZURNADZHY, L. Y., HATCH, M., BERRINGTON DE GONZALEZ, A., THOMAS, G. A., TRONKO, M. D., GETZ, G. & CHANOCK, S. J. 2021. Radiation-related genomic profile of papillary thyroid carcinoma after the Chernobyl accident. *Science*, 372.
- MULLENDERS, L., ATKINSON, M., PARETZKE, H., SABATIER, L. & BOUFFLER, S. 2009. Assessing cancer risks of low-dose radiation. *Nat Rev Cancer*, 9, 596-604.
- MURUGAN, A. K. & XING, M. 2011. Anaplastic thyroid cancers harbor novel oncogenic mutations of the ALK gene. *Cancer Res*, 71, 4403-11.
- NIKIFOROV, Y. E. 2006. Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. *Endocr Pathol*, 17, 307-17.
- NIKIFOROVA, M. N. & NIKIFOROV, Y. E. 2008. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn*, 8, 83-95.
- PACIFICO, F. & LEONARDI, A. 2010. Role of NF-kappaB in thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 321, 29-35.
- PERLMAN, R. L. 2016. Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Health*, 2016, 170-6.
- PIRES, B. R. B., SILVA, R., FERREIRA, G. M. & ABDELHAY, E. 2018. NF-kappaB: Two Sides of the Same Coin. *Genes (Basel)*, 9.
- RABES, H. M., DEMIDCHIK, E. P., SIDOROW, J. D., LENGFELDER, E., BEIMFOHR, C., HOELZEL, D. & KLUGBAUER, S. 2000. Pattern of radiation-induced RET and NTRK1 rearrangements in 191 post-chernobyl papillary thyroid carcinomas: biological, phenotypic, and clinical implications. *Clin Cancer Res*, 6, 1093-103.
- RADOVSKY, A., MITSUMORI, K., CHAPIN, R., RR, M., GA, B. & BW, G. 1999. Pathology of the Mouse. Cache River Vienna.
- RAGAZZI, M., CIARROCCHI, A., SANCISI, V., GANDOLFI, G., BISAGNI, A. & PIANA, S. 2014. Update on anaplastic thyroid carcinoma: morphological, molecular, and genetic features of the most aggressive thyroid cancer. *Int J Endocrinol*, 2014, 790834.

- RON, E. 2007. Thyroid cancer incidence among people living in areas contaminated by radiation from the Chernobyl accident. *Health Phys*, 93, 502-11.
- ROSAI, J. & ACKERMAN, S. 1996. Surgical pathology. *Eighth edition, Mosby*, 1917-2020.
- SAJI, M. & RINGEL, M. D. 2010. The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol*, 321, 20-8.
- SANTARPIA, L., MYERS, J. N., SHERMAN, S. I., TRIMARCHI, F., CLAYMAN, G. L. & ELNAGGAR, A. K. 2010. Genetic alterations in the RAS/RAF/mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Cancer*, 116, 2974-83.
- SCHMID, K. W., SHEU, S. Y., GORGES, R., ENSINGER, C. & TOTSCH, M. 2003. [Thyroid tumors]. *Pathologe*, 24, 357-72.
- SCHÜNKE, M., SCHULTE, E., SCHUMACHER, U., VOLL, M. & WESKER, K. 2012. Prometheus: LernAtlas der Anatomie. Kopf, Hals und Neuroanatomie.
- SELMANSBERGER, M., FEUCHTINGER, A., ZURNADZHY, L., MICHNA, A., KAISER, J. C., ABEND, M., BRENNER, A., BOGDANOVA, T., WALCH, A., UNGER, K., ZITZELSBERGER, H. & HESS, J. 2015. CLIP2 as radiation biomarker in papillary thyroid carcinoma. *Oncogene*, 34, 3917-25.
- SHEU, S. Y., GÖRGES, R. & SCHMID, K. W. 2003. [Hyperplasia of the thyroid gland]. *Pathologe*, 24, 348-56.
- STAUFFER, E., WEBER, P., HEIDER, T., DALKE, C., BLUTKE, A., WALCH, A., BURGSTALLER, G., BRIX, N., LAUBER, K., ZITZELSBERGER, H., UNGER, K. & SELMANSBERGER, M. 2021. Transcriptomic landscape of radiation-induced murine thyroid proliferative lesions. *Endocr Relat Cancer*, 28, 213-224.
- VASKO, V., FERRAND, M., DI CRISTOFARO, J., CARAYON, P., HENRY, J. F. & DE MICCO, C. 2003. Specific pattern of RAS oncogene mutations in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 2745-52.
- VOGELSTEIN, B. & KINZLER, K. W. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, 9, 138-41.
- VOLANTE, M., RAPA, I. & PAPOTTI, M. 2008. Poorly differentiated thyroid carcinoma: diagnostic features and controversial issues. *Endocr Pathol*, 19, 150-5.
- WILLIAMS, D. 2008. Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl. *Oncogene*, 27 Suppl 2, S9-18.
- WILTSHIRE, J. J., DRAKE, T. M., UTTLEY, L. & BALASUBRAMANIAN, S. P. 2016. Systematic Review of Trends in the Incidence Rates of Thyroid Cancer. *Thyroid*, 26, 1541-1552.
- XING, M. 2005. BRAF mutation in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer*, 12, 245-62.
- XING, M. 2013. Molecular pathogenesis and mechanisms of thyroid cancer. *Nat Rev Cancer*, 13, 184-99.

- YAPA, S., MULLA, O., GREEN, V., ENGLAND, J. & GREENMAN, J. 2017. The Role of Chemokines in Thyroid Carcinoma. *Thyroid*, 27, 1347-1359.
- ZABLOTSKA, L. B., BOGDANOVA, T. I., RON, E., EPSTEIN, O. V., ROBBINS, J., LIKHTAREV, I. A., HATCH, M., MARKOV, V. V., BOUVILLE, A. C., OLIJNYK, V. A., MCCONNELL, R. J., SHPAK, V. M., BRENNER, A., TEREKHOVA, G. N., GREENEBAUM, E., TERESHCHENKO, V. P., FINK, D. J., BRILL, A. B., ZAMOTAYEVA, G. A., MASNYK, I. J., HOWE, G. R. & TRONKO, M. D. 2008. A cohort study of thyroid cancer and other thyroid diseases after the Chernobyl accident: dose-response analysis of thyroid follicular adenomas detected during first screening in Ukraine (1998-2000). *Am J Epidemiol*, 167, 305-12.
- ZHU, X. G. & CHENG, S. Y. 2009. Modeling thyroid cancer in the mouse. *Horm Metab Res*, 41, 488-99.

## 11 Danksagung

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Horst Zitzelsberger für die exzellente Betreuung meiner Promotion aussprechen. Insbesondere gilt mein Dank für die Unterstützung, die vielen Ratschläge und die konstruktive Kritik. Ich konnte durch ihn den bestmöglichen Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten finden.

Zudem möchte ich mich herzlichst bei Herrn PD Dr. Kristian Unger für die allumfassende Betreuung bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Martin Selmansberger und Dr. Peter Weber für die gute Zusammenarbeit, die Geduld und stete Motivationsgabe bedanken.

Ein besonderer Dank ergeht an das ganze Team der Zyto, die mir bei neuen Methoden und Experimenten stets Unterstützung, Hilfe und Geduld entgegenbrachten.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und Nikolaus für die liebevolle Unterstützung in den Jahren des Studiums und der Promotion danken.



LUDWIG-  
MAXIMILIANS-  
UNIVERSITÄT  
MÜNCHEN

Promotionsbüro  
Medizinische Fakultät



## Eidesstattliche Versicherung

**Stauffer, Elena**

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Analyse histologischer und transkriptomischer Veränderungen in murinen  
Schilddrüsengeweben zu verschiedenen Zeitpunkten nach  $\gamma$ -Bestrahlung**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, 19.03.2023**

Ort, Datum

**Elena Stauffer**

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand