

Aus dem Institut für Experimentelle Pädiatrische  
Endokrinologie der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genetische und epigenetische  
Veränderungen des *PAX8*-Gens in  
follikulären Schilddrüsenkarzinomen**

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor  
medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von

Carmen-Andrea Holz

aus Berlin

Gutachter: 1: Prof. Dr. med. H. Krude

2: Prof. Dr. M. Digweed

3: Prof. Dr. Dr. med. D. Führer-Sakel

Datum der Promotion: 14.06.2009

# Widmung

Gewidmet meinen beiden Großvätern Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Hildebrandt und Dr. med. Gerhard Holz.

---



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2</b>
1.1	Tumoren der Schilddrüse . . . . .	2
1.1.1	Klassifikation . . . . .	2
1.1.2	Inzidenz . . . . .	3
1.1.3	Genetische Veränderungen in follikulären und papillären Schilddrüsenkarzinomen . . . . .	3
1.1.4	Das <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgen . . . . .	5
1.1.5	Veränderungen der Expressionsmuster von <i>PAX8</i> , <i>TITF1</i> , <i>TG</i> , <i>TPO</i> und <i>TSHR</i> in Schilddrüsenkarzinomen . . . . .	6
1.2	Schilddrüsenfunktion und -entwicklung . . . . .	7
1.3	Das <i>PAX8</i> -Gen . . . . .	8
1.3.1	Aufbau und Funktion von Transkriptionsfaktoren . . . . .	8
1.3.2	Aufbau und Lokalisation des <i>PAX8</i> -Gens . . . . .	9
1.3.3	Funktion von <i>PAX8</i> . . . . .	10
1.3.4	Mutationen des <i>PAX8</i> -Gens . . . . .	11
1.4	DNA-Methylierung . . . . .	12
1.4.1	DNA-Methylierungsmuster und Funktion der DNA- Methylierung . . . . .	12
1.4.2	DNA-Methylierung und Tumorgenese . . . . .	13
1.5	Zielsetzung . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Material . . . . .	16
2.1.1	Geräte . . . . .	16
2.1.2	Chemikalien . . . . .	17
2.1.3	Enzyme und Enzypuffer . . . . .	18
2.1.4	Puffer und Lösungen . . . . .	19
2.1.5	Kulturmedien und Antibiotika . . . . .	19
2.1.6	Vektoren . . . . .	19
2.1.7	Kits . . . . .	20
2.1.7.1	Reverse-Transkriptase-Reaktion . . . . .	20
2.1.7.2	Sequenzierungskit . . . . .	20
2.1.7.3	Geextraktionskit . . . . .	20
2.1.7.4	Klonierungskit . . . . .	20
2.1.8	Oligonukleotide . . . . .	20
2.1.8.1	Amplifikation von <i>PAX8</i> und genomische Sequenzie- rung . . . . .	21

2.1.8.2	<i>PAX8</i> cDNA . . . . .	21
2.1.8.3	Positivkontrolle <i>GAPDH</i> . . . . .	21
2.1.8.4	<i>PAX8-PPARG1</i> Fusionsgen . . . . .	22
2.1.8.5	Positivkontrolle <i>PAX8-PPARG1</i> Fusionsgen . . . . .	22
2.1.8.6	Amplifikation der mit Bisulfit behandelten DNA . . . . .	22
2.1.9	Gewebeproben follikulärer Schilddrüsenkarzinome . . . . .	22
2.1.10	Gewebeprobe von Schilddrüsennormalgewebe . . . . .	23
2.2	Methoden . . . . .	23
2.2.1	Gewinnung des Untersuchungsmaterials . . . . .	23
2.2.1.1	DNA-Extraktion aus Tumorgewebeproben . . . . .	23
2.2.1.2	RNA-Extraktion aus Tumorgewebe und Umschreibung in cDNA . . . . .	23
2.2.2	Generierung der Positivkontrolle zum Nachweis des <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgens . . . . .	25
2.2.2.1	PCR-Bedingungen zur Amplifikation des <i>PPARG1</i> -Stu-Fragmentes . . . . .	26
2.2.2.2	Aufreinigung über Säulen mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen . . . . .	26
2.2.2.3	TOPO-Klonierung . . . . .	27
2.2.2.4	Minipräparation . . . . .	28
2.2.2.5	Enzymverdau mit Restriktionsenzymen . . . . .	28
2.2.2.6	Gelextraktion . . . . .	29
2.2.2.7	Ligation des <i>PPARG1</i> -Fragmentes und des pCS2+ <i>PAX8</i> -Vektors . . . . .	29
2.2.2.8	Transformation nach <i>E. coli</i> . . . . .	29
2.2.3	Nachweis des <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgens . . . . .	30
2.2.4	<i>PAX8</i> -Mutationscreening . . . . .	31
2.2.4.1	PCR-Bedingungen . . . . .	31
2.2.4.2	Exo-Sap-Enzymverdau . . . . .	33
2.2.4.3	Genomische Sequenzierung . . . . .	33
2.2.5	Untersuchung des Methylierungszustandes des <i>PAX8</i> -Gens . . . . .	34
2.2.5.1	Bisulfitbehandlung . . . . .	34
2.2.5.2	PCR-Bedingungen . . . . .	36
2.2.5.3	Direktsequenzierung . . . . .	37
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> . . . . .	<b>40</b>
3.1	Untersuchung der Tumorproben follikulärer Schilddrüsenkarzinome . . . . .	40
3.1.1	Nachweis des <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgens . . . . .	41
3.1.2	Untersuchung auf Punktmutationen im <i>PAX8</i> -Gen in follikulären Schilddrüsenkarzinomen . . . . .	42
3.1.3	Methylierung des <i>PAX8</i> -Gens . . . . .	43
3.1.3.1	Methylierungszustand der Region -1 . . . . .	44
3.1.3.2	Methylierungszustand des Fragments 1-1 . . . . .	45
3.1.3.3	Methylierungszustand des Fragments 1-3 . . . . .	46

<b>4 Diskussion</b>	<b>53</b>
4.1 Das <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgen . . . . .	53
4.2 Suche nach somatischen <i>PAX8</i> -Mutationen in follikulären Schilddrüsenkarzinomen . . . . .	56
4.3 Methylierungsmuster des <i>PAX8</i> -Gens in Proben follikulärer Schilddrüsenkarzinome . . . . .	57
4.4 Ausblick . . . . .	59
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>83</b>
<b>Danksagung</b>	<b>86</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>87</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>88</b>

---



---

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Bisher beschriebene Bruchpunkte des <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgens . . . . .	5
1.2	Aufbau der Paired-Domäne von PAX8 . . . . .	9
1.3	Lokalisation der Paired-Domäne, des Oktapeptids und der Homeodomäne von PAX8 . . . . .	10
1.4	Schematisch Darstellung der Lokalisation von bisher bekannten <i>PAX8</i> -Mutationen . . . . .	12
2.1	Schematische Darstellung des pCS2-Vektors, übernommen aus <a href="http://sitemaker.umich.edu/dlturner.vectors/home">http://sitemaker.umich.edu/dlturner.vectors/home</a> , University of Michigan . . . . .	25
2.2	Schematische Darstellung der Konversion von Cytosin zu Uracil durch Bisulfit . . . . .	35
2.3	Darstellung der verwendeten Methoden . . . . .	38
2.4	Schematische Darstellung der Generierung der <i>PAX8-PPARG1</i> -Positivkontrolle . . . . .	39
3.1	Ergebnisse der Amplifikation des <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgens mit verschiedenen Primerpaaren . . . . .	42
3.2	Sequenz des <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgens . . . . .	43
3.3	Lokalisation und Methylierungszustand der CpG-Inseln im <i>PAX8</i> -Gen in Schilddrüsennormalgewebe und Kontrollgewebe . . . . .	44
3.4	Schematische Darstellung des Methylierungsmusters der Region -1 in Direktsequenzen der Tumorproben . . . . .	45
3.5	Schematische Darstellung des Methylierungsmusters des Fragments 1-1 in Direktsequenzen der Tumorproben . . . . .	46
3.6	Schematische Darstellung des Methylierungsmusters des Fragments 1-3 in Direktsequenzen der Tumorproben . . . . .	47
3.7	Direktsequenzen der Region -1 sowie des Fragments 1-3 in den Tumorproben . . . . .	48
3.8	Direktsequenzen des Fragments 1-1 in Lymphozyten und Schilddrüsennormalgewebe . . . . .	49
3.9	Direktsequenzen des Fragments 1-1 verschiedener Proben follikulärer Schilddrüsenkarzinome . . . . .	50
3.10	Schematische Darstellung aller Untersuchungsergebnisse . . . . .	52

---

---

# Tabellenverzeichnis

3.1	Ergebnisse der Amplifikationen zum Nachweis des <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgens mit den verschiedenen Primerpaaren . . . . .	41
3.2	Ergebnisse der Nested-PCRs zum Nachweis des <i>PAX8-PPARG1</i> -Fusionsgens mit den verschiedenen Primerpaaren . . . . .	41
3.4	Histologie, Tumorstadium und Grading der Tumorproben . . . . .	51



# Kapitel 1

## Einleitung

### 1.1 Tumoren der Schilddrüse

#### 1.1.1 Klassifikation

Schilddrüsentumoren sind seltene Tumoren, die etwa 1% aller Malignome ausmachen (Gimm, 2001). 80% der Schilddrüsentumoren sind Adenome, 20% Karzinome. Grundsätzlich müssen von den Neoplasien der Schilddrüse Hyperplasien abgegrenzt werden. Hyperplasien manifestieren sich als Vermehrung von Schilddrüsennormalgewebe. Im Gegensatz hierzu zeigen benigne Neoplasien, wie das follikuläre Adenom, bereits erste histologische Veränderungen. Neoplasien der Schilddrüse werden in epitheliale und nichtepitheliale Tumoren unterteilt. Bei den epithelialen werden benigne von malignen Tumoren unterschieden. Wichtigster Vertreter der epithelialen benignen Tumoren ist das follikuläre Adenom. Zu den nichtepithelialen Schilddrüsentumoren gehören z.B. das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC), das von den C-Zellen ausgeht, maligne Lymphome, Schilddrüsenmetastasen, tumorähnliche Läsionen und verschiedene nichtklassifizierbare Tumoren.

Maligne Schilddrüsenkarzinome werden in gut differenzierte und schlecht differenzierte Neoplasien unterschieden. Zu den gut differenzierten Schilddrüsenkarzinomen gehört das follikuläre Karzinom (FTC), das papilläre Karzinom (PTC) und das Hürthle-Zell-Karzinom (HCC) zu den schlecht differenzierten Schilddrüsenkarzinomen das anaplastische (undifferenzierte) Karzinom (ATC).

Follikuläre Schilddrüsenkarzinome können zusätzlich in minimal-invasive und hoch-invasive FTCs unterteilt werden. Minimal-invasive FTCs zeichnen sich dadurch aus, dass sie von einer fibrösen Kapsel umgeben sind, hochgradig invasive FTCs zeigen sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch ausgebreitete Areale der Invasion. Das Hürthle-Zell-Karzinom, das durch eosinophiles Zytoplasma sowie follikuläres und trabekuläres Wachstumsmuster charakterisiert ist (Baloch et al., 2001), wird von

vielen Autoren als Untergruppe der FTCs gesehen. Es gibt jedoch Hinweise, dass es möglicherweise eher den PTCs zuzuordnen ist (Fagin, 2002).

### 1.1.2 Inzidenz

In Gebieten mit einer ausreichenden Jodversorgung ist das papilläre Schilddrüsenkarzinom das häufigste Schilddrüsenkarzinom. Es macht ca. 80% der Schilddrüsenmalignome aus. Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom tritt gehäuft in Jodmangelregionen auf und macht ca. 10 bis 20% der Schilddrüsenkarzinome aus (Gimm, 2001). Die Inzidenz des medullären Karzinoms ist unklar. Im allgemeinen wird sie mit 5 bis 10% angegeben. In verschiedenen Studien, in denen die Bedeutung der routinemäßigen präoperativen Calcitoninmessung im Serum untersucht wurde, wurden jedoch 16 bis 40% aller malignen Schilddrüsenkarzinome als medulläre Karzinome identifiziert (Pacini et al., 1994, Rieu et al., 1995, Vierhapper et al., 1997). Schilddrüsenkarzinome können in jedem Lebensalter vorkommen, typischerweise liegt der Erkrankungsbeginn jedoch im mittleren Erwachsenenalter. So tritt das FTC am häufigsten zwischen dem fünfzigsten und siebzigsten Lebensjahr, das undifferenzierte Schilddrüsenkarzinom insbesondere in der sechsten Lebensdekade auf. Das PTC hat seinen Häufigkeitsgipfel schon zwischen der dritten und der fünften Dekade. Auch Kinder können von Schilddrüsenkarzinomen betroffen sein. Während der Pubertät kann eine erhöhte Prävalenz von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen beobachtet werden. In dieser Altersgruppe am häufigsten sind papilläre Schilddrüsenkarzinome, gefolgt von follikulären Schilddrüsenkarzinomen. Medulläre Schilddrüsenkarzinome werden im Kindes- und Jugendalter hingegen nur extrem selten gefunden (Ceccarelli et al., 1988, Fassina et al., 1994, Merrick and Hansen, 1989, Tamez-Perez et al., 2004).

### 1.1.3 Genetische Veränderungen in follikulären und papillären Schilddrüsenkarzinomen

Follikuläre und papilläre Schilddrüsenkarzinome gehören in die Gruppe der differenzierten Schilddrüsenkarzinome und gehen von den follikulären Schilddrüsenzellen aus. Die genetischen Veränderungen, die bisher in FTCs und PTCs gefunden wurden, unterscheiden sich grundlegend. Sie treten jedoch beide in der Regel sporadisch auf. Ausnahme sind die seltenen familiären nichtmedullären Schilddrüsenkarzinome (Lote et al., 1980, Cooper et al., 1981, Gorson, 1992). Hier finden sich PTCs z.B. gehäuft bei der familiären Polyposis (Harach et al., 1994). Familiäre Fälle von FTCs sind im Rahmen des Cowden-Syndroms beschrieben (Dahia et al.,

1997). Das Cowden-Syndrom ist durch multiple Harmatome sowie ein gesteigertes Risiko Karzinome zu entwickeln gekennzeichnet. Marsh et al 1998 konnte in 81% der vom Cowden-Syndrom betroffenen Familien Keimbahnmutationen des *PTEN*-Tumorsuppressorgens (phosphatase and tensin homolog) nachweisen (Marsh et al., 1998). Somatische Mutationen des *PTEN*-Gens konnten hingegen in sporadischen Schilddrüsenkarzinomen nur in einer geringen Anzahl von Fällen gefunden werden. So wies Dahia et al. 1997 in nur 1 von 39 PTCs eine somatische Frameshiftmutation im *PTEN*-Gen nach, sowie insgesamt 2 allelische Deletionen (LOH, loss of heterozygoty) des *PTEN*-Gens in einer Gesamtzahl von 51 differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (Dahia et al., 1997).

In nicht familiären PTCs treten mit großer Häufigkeit genetische Veränderungen auf, die eine abnorme Aktivierung des mitogen activated protein kinase (MAPK)-Signalweges verursachen, häufig bedingt durch Punktmutationen des *BRAF*-Gens (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) (Kim et al., 2006, Nikiforova et al., 2003a). Mutationen des *RAS*-Onkogens können in FTCs und PTCs gefunden werden, in FTCs sind sie jedoch häufiger, als in PTCs zu finden (Namba et al., 1990, Esapa et al., 1999, Lemoine et al., 1989, Karga et al., 1991, Motoi et al., 2000, Pilotti et al., 1997).

Eine besondere Rolle scheinen jedoch Veränderungen auf chromosomaler Ebene zu spielen. Insbesondere follikuläre Schilddrüsenkarzinome sind von Aneuploidie und chromosomaler Aberration betroffen (Schelfhout et al., 1990, Oyama et al., 1994, Tung et al., 1997, Ward et al., 1998). Chromosomale Rearrangements finden sich sowohl in follikulären als auch papillären Schilddrüsenkarzinomen. So treten in 10 - 40% der PTCs Rearrangements auf, die das Protoonkogen *RET* mit einbeziehen (Gimm, 2001, Takahashi et al., 1985, Smanik et al., 1995). *RET* wird normalerweise in der Schilddrüse nicht exprimiert, erst durch Fusion der C-terminalen Region von *RET* mit einem anderen Gen kommt es zur Expression von *RET* (Fagin, 2002).

Ein häufiges *RET*-Rearrangement ist das *RET*/PTC-Fusionsgen, das insbesondere nach Strahlenbelastung auftritt. So findet sich bei einer großen Anzahl von untersuchten Patienten, die nach dem Reaktorunfall von Tschernobyl ein papilläres Schilddrüsenkarzinom entwickelten, ein *RET*/PTC-Rearrangement (Unger et al., 2004). Auch im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression bestimmter *RET*-Fusionsgene zur Entwicklung von PTCs führt (Santoro et al., 1996, Jhiang et al., 1996). In FTCs wiederum wird gehäuft das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen gefunden, das im Folgenden ausführlich besprochen wird.

### 1.1.4 Das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen

Das Auftreten des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens in follikulären Schilddrüsenkarzinomen ist inzwischen mehrfach publiziert (Cheung et al., 2003, Dwight et al., 2003, Kroll et al., 2000, Marques et al., 2004). Kroll et al. 2000 wies erstmalig das gehäufte Auftreten des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens in follikulären Schilddrüsenkarzinomen nach. In 5 von 8 FTCs konnte er das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen nachweisen, nicht jedoch in follikulären Adenomen, papillären Karzinomen oder multinodulären Hyperplasien (Kroll et al., 2000). In späteren Untersuchungen konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, jedoch wurde das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen auch in follikulären Adenomen nachgewiesen (Cheung et al., 2003, Dwight et al., 2003, Lacroix et al., 2004, Marques et al., 2002, Nikiforova et al., 2002, 2003b). Das Fusionsgen resultiert aus einer Translokation zwischen Chromosomen 2 und 3 (Kroll et al., 2000). Die ersten 6 bis 10 Exons des schilddrüsen-spezifischen Transkriptionsfaktors *PAX8* sind mit dem 5'-Ende des Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptors-Gamma 1 (*PPARG1*) fusioniert. Die bisher beschriebenen Varianten des Fusionsgens (Cheung et al., 2003, Kroll et al., 2000, Marques et al., 2004, Nikiforova et al., 2003b) sind in Abbildung 1.1 schematisch dargestellt.

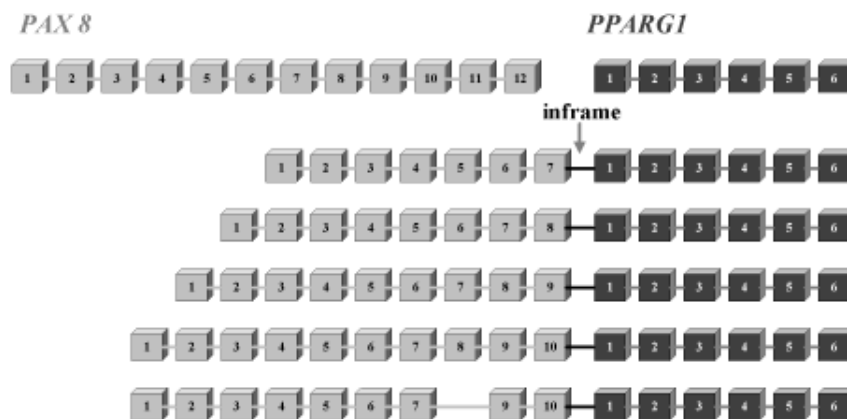


Abbildung 1.1: Bisher beschriebene Bruchpunkte des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens

Das am Fusionsgen beteiligte *PPARG1* ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Expression verschiedener Gene spielt (Forman et al., 1995, Kliewer et al., 1997, Krey et al., 1997, Lehmann et al., 1995). U. a. nimmt *PPARG1* Einfluss auf die Kontrolle des Zellzyklus (Auwerx, 1999). Die Besonderheit der *PAX8-PPARG1*-Fusion besteht darin, dass der Leserahmen der codierenden Aminosäuren für *PPARG1* trotz der Fusion nicht verändert wird (Kroll et al., 2000). Kroll et al. 2000 konnte in seiner Arbeit feststellen, dass die Fusion von *PPARG1* mit *PAX8* eine dominant negative supprimierende Funktion

auf den *PPARG1* Wildtyp ausübt. Dies ist insofern entscheidend, als dass Liganden des *PPARG1*, wie z.B. Thiazolidinedione, Troglitazone und Retinoide, Wachstum hemmen und Krebszelllinien zur Differenzierung anregen können (Demetri et al., 1999, Elstner et al., 1998, Kubota et al., 1998, Mueller et al., 1998, Sarraf et al., 1998, Tontonoz et al., 1997).

Insofern wäre es möglich, dass die dominant negative Wirkung des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens durch die Hemmung der Wachstumskontrolle des *PPARG1*-Wildtyps tumorprogressiv wirkt. Es konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass auch die Wildtypfunktion von *PAX8* durch das Fusionsgen beeinflusst wird (Au et al., 2005). Au et al. 2005 konnte zeigen, dass in Anwesenheit des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens die Expression von Thyreoglobulin (*TG*) gehemmt wird. Die Expression von *TG* wird normalerweise von *PAX8* und *TITF1* (thyroid transcriptionfactor 1) (*NKX2.1*) reguliert. Das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen hemmt jedoch sowohl die Stimulation der Expression durch *PAX8*-Wildtyp als auch durch *TITF1* (Au et al., 2005). *PAX8* spielt in der Aufrechterhaltung der funktionellen Differenzierung von Schilddrüsenzellen eine fundamentale Rolle. Pasca di Magliano et al. 2000 konnte zeigen, dass *PAX8* in Schilddrüsenzellen, die ihren schilddrüsenspezifischen Phänotyp durch Transfektion eines Polyoma-Virus verloren haben, in der Lage ist, die Expression von den schilddrüsenspezifischen Genen *TG*, *TPO* (thyroid peroxidase) und *NIS* (Natrium-Iodid-Symporter) wieder zu stimulieren. *PAX8* ist also fähig, zur Redifferenzierung von derart veränderten Schilddrüsenzellen zu führen.

### **1.1.5 Veränderungen der Expressionsmuster von *PAX8*, *TITF1*, *TG*, *TPO* und *TSHR* in Schilddrüsenkarzinomen**

In Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad von Schilddrüsenzellen findet sich ein verändertes Expressionsmuster des Transkriptionsfaktors *PAX8*. Zannini et al. 1997 konnte zeigen, dass in dedifferenzierten Schilddrüsenzellen keine *PAX8*-Expression vorliegt. Auch in Schilddrüsentumoren ist die *PAX8*-Expression abhängig vom Dedifferenzierungsgrad. So findet sich in follikulären Adenomen eine unveränderte *PAX8*-Expression gegenüber Schilddrüsennormalgewebe. In papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen ist die *PAX8*-Expression eingeschränkt, ein kompletter *PAX8*-Expressionsverlust wiederum ist für anaplastische Schilddrüsenkarzinome beschrieben (Ros et al., 1999, Fabbro et al., 1994, Lacroix et al., 2004). Neben *PAX8* ist auch das Expressionslevel von *TITF1* herabreguliert und parallel dazu findet sich eine verminderte Expression von Thyreoglobulin, Thyreoperoxidase und dem *TSH*-Rezeptor, die von den beiden Transkriptionsfaktoren *PAX8* und *TITF1* abhängig

sind (Ros et al., 1999).

## 1.2 Schilddrüsenfunktion und -entwicklung

Die Schilddrüse besteht aus zwei Lappen, die beiderseits vor der Trachea und dem Larynx liegen. Beide Schilddrüsenlappen werden durch den Isthmus miteinander verbunden. Die Schilddrüse setzt sich aus Follikeln und Bindegewebe zusammen. Die Follikel besitzen ein plattes bis hochprismatisches Epithel und einen mit Kolloid gefüllten Hohlraum. Im Verband der Follikel-epithelien und im Bindegewebe finden sich Gruppen von parafollikulären C-Zellen, die Calcitonin bilden.

In den follikulären Schilddrüsenzellen werden die jodhaltigen Hormone Tetrajodthyronin (Thyroxin, T<sub>4</sub>) und Trijodthyronin (T<sub>3</sub>) gebildet. Im Epithel der Follikel wird das Prohormon Thyreoglobulin synthetisiert. Jodid wird aus dem Blutplasma in die Zelle aufgenommen und durch eine Thyreoperoxidase zu Jod oxidiert. Anschließend wird Jod in Tyrosylreste des Thyreoglobulins eingebaut. Die Speicherung des Prohormons erfolgt im Kolloid des Follikels. Zur Freigabe von Schilddrüsenhormon ins Blut muss das Prohormon von der Epithelzelle erneut aufgenommen werden. Hier erfolgt eine Fusion mit Lysosomen. Thyreoglobulin wird vollständig abgebaut, so dass freigesetztes Schilddrüsenhormon ins Blut sezerniert werden kann.

Die Schilddrüsenentwicklung beginnt beim Menschen in der dritten Embryonalwoche (Fisher and Polk, 1989). In den folgenden Wochen kommt es zur Proliferation und Abwärtswanderung der Schilddrüsenanlage, bis sie ihre endgültige Position vor der Trachea einnimmt. Während der Abwärtswanderung teilt sie sich in zwei Lappen. Mit Erreichen der endgültigen Lage exprimiert die Schilddrüse typische Proteine wie TG, TSHR, TPO und NIS, die essentiell für die Synthese der Schilddrüsenhormone sind (DiLauro and DeFelice, 2001). Die beiden Zelltypen der Schilddrüse nehmen ihren Ursprung von unterschiedlichen embryonalen Strukturen. Die follikuläre Zellen gehen vom Boden des Schlunddarms aus, die parafollikulären Zellen von den Ultimobronchialkörpern. Für die Differenzierung der Zellen zu Schilddrüsenzellen ist die für die Schilddrüse spezifische Kombination der Transkriptionsfaktoren PAX8 (Plachov et al., 1990), TITF1 (Lazzaro et al., 1991) und FOXE1 (forkhead box E1) (TITF2) (Zannini et al., 1997) sowie HHEX (hematopoietically expressed homeobox) (Thomas et al., 1998) ausschlaggebend (Damante et al., 2001).

Ein Knockout von *PAX8*, *TITF1* oder *FOXE1* führt zu einer gestörten Schilddrüsenentwicklung. So konnte gezeigt werden, dass ein Knockout von *PAX8* bei Mäusen zu einer gestörten Schilddrüsenentwicklung mit fehlender follikulärer Struktur und fast ausschließlichem Vorliegen von C-Zellen führt (Mansouri et al., 1998). Ein Knockout von *TITF1* wiederum führt zu einer Degeneration der Schilddrüsenanlage am Tag

11 der Embryonalentwicklung (Kimura et al., 1999) und ein Knockout von *TITF2* zu einer ektop liegenden Schilddrüse und fehlender Schilddrüsenhormonentwicklung (De Felice et al., 1998).

Beim Menschen sind verschiedene Mutationen beschrieben, die mit einer gestörten Schilddrüsenentwicklung und -funktion einhergehen. Loss-of-function-Mutationen im *PAX8*-Gen führen zu einer congenitalen Hypothyreose (CH). Die Schilddrüsen der betroffenen Patienten können normal groß und normal lokalisiert oder aber auch dysplastisch sein. Athyreosen sind ebenfalls beschrieben (Congdon et al., 2001, de Sanctis et al., 2004, Grasberger et al., 2005, Komatsu et al., 2001, Krude et al., 2002, Macchia, 2000, Macchia et al., 1998, Meeus et al., 2004, Vilain et al., 2001, Al Taji et al., 2007). Eine CH mit gestörter Schilddrüsenentwicklung findet sich ebenfalls bei Mutationen des *TSHR*-Gens (Biebermann et al., 1997, Abramowicz et al., 1997) sowie des *TITF2*-Gens (Clifton-Bligh et al., 1998). Mutationen des *TPO*-Gens (Bakker et al., 2000) und des *NIS*-Gens (Pohlenz et al., 1998, Fujiwara et al., 1997) können zu einer CH bei normal großer und normal lokalisierter Schilddrüse führen.

## 1.3 Das *PAX8*-Gen

### 1.3.1 Aufbau und Funktion von Transkriptionsfaktoren

Die Familie der *PAX*-Gene umfasst neun verschiedene Gene, die für Transkriptionsfaktoren codieren. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die die Expression von Genen regulieren. Allgemeine Transkriptionsfaktoren werden von spezifischen regulatorischen Transkriptionsfaktoren unterschieden. Erstere bilden mit der RNA-Polymerase einen Komplex an dem sogenannten minimalen Promotor und ermöglichen somit der Polymerase die Transkription des entsprechenden Gens (Villard, 2004). Der minimale Promotor enthält häufig eine konservierte Sequenz mit dem TATA-Motiv und befindet sich 20 bis 30 Basenpaare vor dem Transkriptionsstart. Über diesen Weg kann die Transkription zwar initiiert werden, die fein abgestimmte Regulation der Expression eines Gens erfolgt jedoch über regulatorische Transkriptionsfaktoren (Young, 1991, Koleske and Young, 1994). Die spezifischen Transkriptionsfaktoren binden an proximale Promotorregionen, die dem minimalen Promotor vorgeschaltet sind. Neben den Promotoren können innerhalb eines Gens weitere DNA-Abschnitte vorliegen, an die die spezifischen Transkriptionsfaktoren binden können, sogenannte Enhancer oder Silencer. Sie können hunderte oder tausende Basenpaare 5' oder 3' von der Promotorregion entfernt liegen (Villard, 2004).

Transkriptionsfaktoren weisen im Allgemeinen mindestens zwei wichtige Domänen auf. Hierzu gehört zum einen die DNA-Bindungsdomäne, zum anderen die Transak-

tivierungsdomäne. Die Struktur der DNA-Bindungsdomäne ist entscheidend dafür, wie ein Transkriptionsfaktor an die Ziel-DNA bindet. Hier werden unterschiedliche Motive unterschieden, über die die Transkriptionsfaktoren verschiedenen Gruppen zugeordnet werden. Die Transaktivierungsdomäne aktiviert die Transkription des Gens, an dessen Promotor oder Enhancer der Transkriptionsfaktor bindet. Viele Transkriptionsfaktoren haben zusätzlich noch eine Protein-Interaktionsdomäne, über die die Transkriptionsfaktoren mit anderen Transkriptionsfaktoren oder Proteinen interagieren (Villard, 2004).

### 1.3.2 Aufbau und Lokalisation des *PAX8*-Gens

Die Familie der *PAX*-Gene (paired box gene) ist durch die Paired-Domäne, eine hoch konservierte DNA-bindende Region von etwa 128 Aminosäuren, charakterisiert (Treisman et al., 1991). Die Paired-Domäne besteht aus zwei unabhängigen DNA-bindenden Helix-Turn-Helix-(HTH) Untereinheiten (Xu et al., 1995), die PAI- und RED-Subdomäne (Jun and Desplan, 1996). Beide Subdomänen sind durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden (Chi and Epstein, 2002). Die PAI-Subdomäne ist N-terminal, die RED-Subdomäne C-terminal lokalisiert (Xu et al., 1995) (siehe Abbildung 1.2). Beide Subdomänen dienen der Erkennung von spezifischen DNA-Sequenzen (Jun and Desplan, 1996). Die PAI-Subdomäne kann als Monomer binden, jedoch ist auch eine Kooperation zwischen den beiden Subdomänen möglich. (Jun and Desplan, 1996). Durch alternatives Splicing kann die Funktion der PAI-Subdomäne verloren gehen. In diesem Fall werden die DNA-Sequenzen nur durch die RED-Subdomäne erkannt (Kozmik et al., 1997, Epstein et al., 1994).

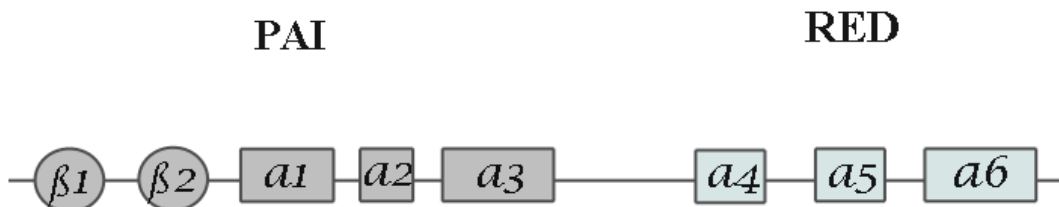


Abbildung 1.2: Aufbau der Paired-Domäne von PAX8

*PAX*-Gene werden in Abhängigkeit von Homologien ihrer Sequenz, und der Ab- bzw. Anwesenheit zusätzlich zur Paired-Domäne vorkommenden Domänen im Protein in unterschiedliche Subgruppen unterteilt. PAX8 weist wie PAX2 und PAX5, neben der Paired-Domäne zwei weitere spezifische Domänen auf, die Homeodomäne und das Oktapeptid (Walther et al., 1991) (siehe Abbildung 1.3). Die Homeodomäne bindet in Abhängigkeit von der Paired-Domäne ebenfalls an zu transkribierende



DNA-Abschnitte und nimmt möglicherweise Einfluss auf die Zielgenerkennung (Singh et al., 2000).

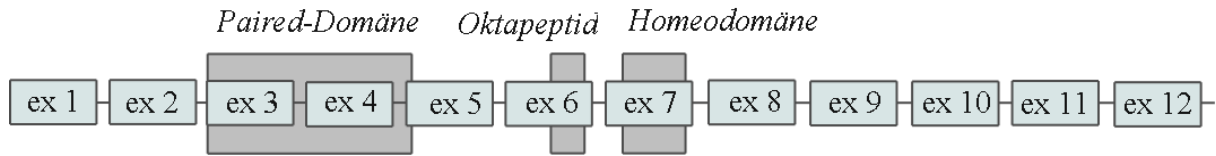


Abbildung 1.3: Lokalisation der Paired-Domäne, des Oktapeptids und der Homeodomäne von PAX8

Das *PAX8*-Gen ist auf dem Chromosom 2 an der Position 2q12-q14 lokalisiert und umfasst 12 Exons. Es bestehen verschiedene Splicevarianten, die aus Ein- oder Ausschluss von Exon 7 oder 8 resultieren (Kozmik et al., 1993). Die biologische Signifikanz dieser Varianten ist bisher unbekannt. Die Paired-Domäne befindet sich bei PAX8 im Bereich des Exons 3 und 4 (Kozmik et al., 1993, Plachov et al., 1990).

### 1.3.3 Funktion von PAX8

Alle *PAX*-Gene kodieren für Transkriptionsfaktoren, die die Expression von verschiedenen Genen regulieren (Mansouri et al., 1996). Die Expression der meisten *PAX*-Gene ist auf bestimmte Gewebe und streng definierte Zeiträume beschränkt. So findet die Expression von *PAX*-Genen hauptsächlich in der Embryogenese statt, was die kritische Rolle dieser Gene während der Entwicklung aufzeigt (Dahl et al., 1997). Persistiert die *PAX*-Expression in Geweben, in denen dies nicht vorgesehen ist, kann dies zur Hyperplasie der entsprechenden Gewebe führen (Morrison et al., 1998, Dressler et al., 1993). Eine Überexpression von *PAX*-Genen in ausdifferenzierten Geweben kann mit einer Proliferation des entsprechenden Gewebes assoziiert sein (Bernasconi et al., 1996, Winyard et al., 1996, Murer et al., 2002).

Wie Plachov et al. 1990 an Mäusen zeigen konnte, wird *PAX8* in der Embryonalperiode im sich entwickelnden ZNS, in der Niere und in der Schilddrüse exprimiert (Plachov et al., 1990). Trueba et al. 2005 konnte bestätigen, dass ähnliche *PAX8*-Expressionsmuster in menschlichen Embryonen vorliegen (Trueba et al., 2005). Sowohl in der Schilddrüse als auch in der Niere wird *PAX8* auch im adulten Gewebe physiologischer Weise exprimiert (Plachov et al., 1990).

*PAX8*-Knockout-Mäuse werden mit einer Hypoplasie der Schilddrüse mit fehlender follikulärer Struktur geboren. In den Schilddrüsen dieser Mäuse finden sich fast ausschließlich parafollikuläre Calcitonin-sezernierende-Zellen (Mansouri et al., 1998). Obwohl *PAX8* auch in der Niere und im ZNS exprimiert wird, finden sich in diesen Organen bei Knockout-Mäusen keine Veränderungen. Die Nierenentwicklung ist jedoch beeinträchtigt, wenn neben dem Knockout von *PAX8* auch ein Knockout

von PAX2 vorliegt (Bouchard et al., 2002). PAX8 nimmt demnach wichtigen Einfluss auf die Schilddrüsenmorphologie. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass PAX8 die Expression von *TG*, *TPO* und von *NIS* über die Bindung an die entsprechenden Promotorregionen reguliert (Ohno et al., 1999, Pasca di Magliano et al., 2000, Zannini et al., 1992). TPO katalysiert die Oxidation des Jodids und die Kopplungsreaktion an Thyreoglobulin, das in follikulären SD-Zellen als Vorläufer für Thyroxin synthetisiert wird. Der Natrium-Iodid-Symporter wiederum transportiert das für die Schilddrüsenhormonbiosynthese notwendige Jodid in die Schilddrüsenzellen. TPO, TG und NIS sind also für die Aufrechterhaltung der Schilddrüsenfunktion von großer Bedeutung.

### 1.3.4 Mutationen des *PAX8*-Gens

Loss-of-function-Mutationen im *PAX8*-Gen wirken sich schwerwiegend auf die Schilddrüsenentwicklung und -funktion aus. Beim Menschen sind bisher insgesamt zehn heterozygote Keimbahn-Mutationen des *PAX8*-Gens beschrieben (Congdon et al., 2001, de Sanctis et al., 2004, Grasberger et al., 2005, Komatsu et al., 2001, Macchia, 2000, Macchia et al., 1998, Meeus et al., 2004, Vilain et al., 2001, Al Taji et al., 2007). Die Mutationsträger leiden an einer congenitalen Hypothyreose, mit der Ausnahme der Mutation R52P, deren Mutationsträger an einer early-onset-Hypothyreose leiden (Al Taji et al., 2007). Die makroskopischen Veränderungen der Schilddrüse reichen von der Hypoplasie bis hin zur normal lokalisierten normal großen Schilddrüse. In einzelnen Fällen gelang bei den entsprechenden Patienten kein Nachweis von Schilddrüsengewebe (Grasberger et al., 2005, Komatsu et al., 2001). Wie in Abbildung 1.4 dargestellt, finden sich die meisten der bisher beschriebenen *PAX8*-Mutationen im Exon 3 und 4. Sie liegen somit im funktionell wichtigen Bereich der DNA-bindenden Paired-Domäne. Es handelt sich um autosomal dominante Mutationen, jedoch mit variabler Penetranz. So sind zwei Fälle beschrieben, in denen nicht alle Mutationsträger unter einer congenitalen Hypothyreose leiden, sondern einige der betroffenen Familienmitglieder eine vollkommen unauffällige Schilddrüsenfunktion haben (Congdon et al., 2001, de Sanctis et al., 2004). Obwohl *PAX8* auch in der sich entwickelnden Niere exprimiert wird, konnte in nur einem Fall eine Nierenbeteiligung berichtet werden (Meeus et al., 2004). Die entsprechende Mutation wurde in einer Familie beim Vater und seinen beiden Kindern gefunden. Alle drei Familienmitglieder leiden an einer Hypothyreose. Eine Beteiligung der Niere konnte jedoch nur beim Vater in Form einer rechtsseitigen Nierenagenesie und einer Hyperkalziurie gefunden werden.

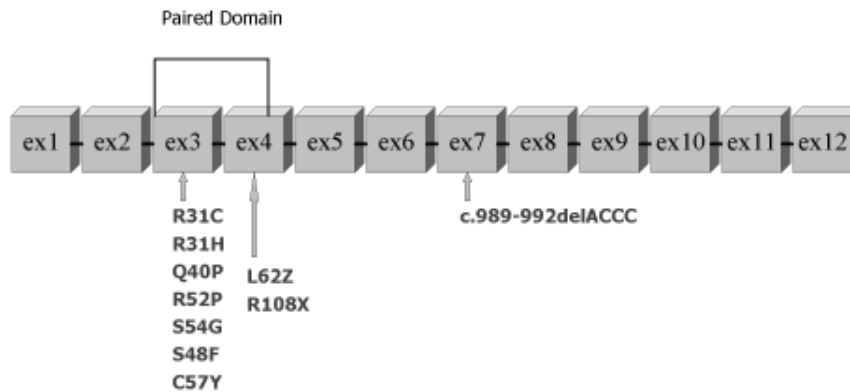


Abbildung 1.4: Schematisch Darstellung der Lokalisation von bisher bekannten PAX8-Mutationen

## 1.4 DNA-Methylierung

Die bisher besprochenen Veränderungen eines Gens betreffen alle die Ebene der Basensequenz der DNA und sind somit der Genetik zuzuordnen. Neben den genetischen Veränderungen können auch Veränderungen auf epigenetischer Ebene die Funktion eines Gens beeinflussen. Epigenetik meint mitotisch und/oder meiotisch vererbte Veränderungen in der Funktion eines Gens, die nicht durch Mutationen in der DNA erklärt werden können (Russo et al., 1996). Ein wichtiges epigenetisches System ist die DNA-Methylierung. Unter Einfluss von Methyltransferasen können an das C-5-Atom der Cytosine, die vor Guanin lokalisiert sind, sogenannte CpGs, Methylgruppen angelagert werden. CpGs sind im Genom der Säuger unterrepräsentiert. Es finden sich jedoch Regionen, in denen CpGs in dichter Folge zu finden sind, den sogenannten CpG-Inseln. Nach der Definition von Gardiner-Garden und Frommer (Gardiner-Garden and Frommer, 1987) handelt es sich bei CpG-Inseln um DNA-Strecken mit einer Länge von etwa 200 Basenpaaren, einem C+G-Gehalt von 50% und einer Ratio der beobachteten zu erwarteten CpG-Inseln von 0,6. Im menschlichen Genom existieren etwa 45000 CpG-Inseln (Antequera and Bird, 1993). Die meisten der CpG-Inseln befinden sich innerhalb oder in der Nähe von Promotorregionen oder des ersten Exons eines Gens und sind in normalen Zellen in der Regel unmethyliert.

### 1.4.1 DNA-Methylierungsmuster und Funktion der DNA-Methylierung

Die Methylierungsmuster des Genoms verändern sich im Verlauf der frühen Embryogenese. Das Methylierungslevel im Mausembryo fällt auf etwa 30% des Levels von

somatischen Mauszellen ab (Kafri et al., 1992, Monk et al., 1987). Zum Zeitpunkt der Implantation kommt es zur De-novo-Methylierung.

Die Funktion der DNA-Methylierung liegt in der differenzierten Regulation der Expression von Genen. Drei verschiedene Mechanismen über die die Transkription durch Methylierung unterdrückt werden könnte, werden derzeit diskutiert: Bestimmte Transkriptionsfaktoren können nicht mehr an die Promotorregion eines Gens binden, wenn diese methyliert ist, so dass die entsprechenden Gene nicht mehr abgelesen werden können. (Hark et al., 2000, Tate and Bird, 1993). Ein zweiter Weg ist die Bindung von transkriptionsunterdrückenden Faktoren, wie z.B. MECP1 (methyl-CpG-binding protein 1) und MECP2 an methylierter DNA (Rountree and Selker, 1997). Der dritte Mechanismus bezieht sich auf die Histonmodifikation durch Methylierung, die dazu führt, dass Chromatin in einer inaktiven Form vorliegt (Kass et al., 1997).

### 1.4.2 DNA-Methylierung und Tumorgenese

Die Rolle der DNA-Methylierung in der Tumorgenese ist schon lange Gegenstand der Forschung. 1983 wiesen Feinberg und Vogelstein erstmalig eine Hypomethylierung von humanen Krebszellen nach (Feinberg and Vogelstein, 1983b). Noch im selben Jahr berichtete Ehrlich et al. von einer globalen Hypomethylierung in Krebsgewebe im Vergleich zu normalem Gewebe (Gama-Sosa et al., 1983). Der Mechanismus der hinter der globalen Hypomethylierung steht, ist bis heute unklar. Nach James et al. 2003 (James et al., 2003) kommt es initial zu einem Verlust der CpG-Methylierung an einem DNA-Strang. Zu einem späteren Zeitpunkt der Präneoplasie sind die meisten CpGs beider DNA-Stränge unmethyliert. Möglicherweise wird die doppelsträngig unmethylierte DNA nicht mehr von der Methyltransferase erkannt. Diese Hypothese würde erklären, weshalb die Hypomethylierung trotz der hohen Methyltransferaseaktivität erhalten bleibt. 1986 konnte eine im Vergleich zu normalen Zellen auffällige Hypermethylierung der 5'-Region des Calcitoninogens in Lungenkrebsgewebe nachgewiesen werden (Baylin et al., 1986), die mit einer Verminderung der Expression von Calcitonin einhergeht. Die epigenetische Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens konnte erstmals drei Jahre später beim Retinoblastom belegt werden (Greger et al., 1994, 1989, Ohtani-Fujita et al., 1993, Sakai et al., 1991). Neben der globalen Hypomethylierung und der Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen spielt außerdem die Hypomethylierung und damit Aktivierung von Onkogenen eine Rolle. Beispiele hierfür sind das Onkogen *RAS* (Feinberg and Vogelstein, 1983a) und das *BCL-2*-Gen (B-cell lymphoma 2 gene) bei chronisch lymphatischer Leukämie (Hanada et al., 1993). Neben einer Hypo- und Hyperme-

thylierung konnte auch eine veränderte DNA-Methyltransferaseaktivität festgestellt werden. So ist die DNA-Methyltransferaseaktivität in neoplastischen Zellen 3000-fach gegenüber normalen Zellen erhöht (Kautiainen and Jones, 1986). Ursache und Auswirkung sind bisher nicht eindeutig geklärt. Inzwischen ist das Methylierungslevel einer Vielzahl von Genen, insbesondere von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen in Tumorgewebe untersucht worden. Für die Tumorsuppressorgene *PTEN* (Alvarez-Nunez et al., 2006), *RASSF1A* (ras association (RalGDS/AF-6) domain family member ) (Schagdarsurengin et al., 2002, Xing et al., 2004), *TIMP3* (tissue inhibitor of metalloproteinase 3), *DAPK* (death-associated protein kinase 1) und *RAR $\beta$ 2* (retinoid-acid-receptor  $\beta$ 2) (Hu et al., 2006, Hoque et al., 2005) konnte gezeigt werden, dass sie in Schilddrüsenkarzinomen hypermethyliert vorliegen. Auch für die schilddrüsenspezifischen Gene *NIS* (Venkataraman et al., 1999, Neumann et al., 2004), *TSHR* (Xing et al., 2003b), *SLC26A4* (solute carrier family 26 member 4)(Xing et al., 2003a) und *SLC5A8* (solute carrier family 5 member 8) (Porra et al., 2005, Hu et al., 2006) konnte eine Hypermethylierung in Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen werden.

## 1.5 Zielsetzung

Bisherige Daten zur Rolle des Transkriptionsfaktors PAX8 in der Entwicklung der Schilddrüse und der Differenzierung der Schilddrüsenzellen sowie die Veränderungen der *PAX8*-Expression in Schilddrüsenkarzinomen legen nahe, dass eine Inaktivierung des *PAX8*-Gens auch unabhängig vom Vorliegen eines *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens tumorprogressiv wirken könnte. Für Tumorsuppressorgene, wie z.B. *P53*, sind tumorprogressive Inaktivierungen durch somatische Mutationen oder Hypermethylierung bereits beschrieben (Kang et al., 2001, Schroeder and Mass, 1997, Pogribny et al., 1997, Lin et al., 2004).

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob in Proben follikulärer Schilddrüsenkarzinome Veränderungen auf genetischer oder epigenetischer Ebene vorliegen, die eine Inaktivierung des *PAX8*-Gens zur Folge haben könnten. Die Entscheidung follikuläre Schilddrüsenkarzinome zu untersuchen begründet sich dadurch, dass mit dem *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen bereits eine wichtige genetische Veränderung unter Einbezug von *PAX8* in FTCs vorliegt.

Auf genetischer Ebene erfolgte ein Screening auf *PAX8*-Mutationen mittels genomischer Sequenzierung. Für den Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens wurde zunächst eine Positivkontrolle aus *PPARG1*-Wildtyp-Sequenz und einem pCS2+*PAX8*-Vektor generiert, anschließend erfolgte die Amplifikation des Fusionsgens aus cDNA und Sequenzierung des PCR-Produktes. Auf epigenetischer Ebene

sollte der Methylierungszustand des *PAX8*-Gens in vier CpG-Inseln untersucht werden, von denen eine im vermuteten Promotorbereich des Gens liegt. Hierfür erfolgte zunächst die Bisulfitbehandlung und anschließend die Amplifikation und Sequenzierung der entsprechenden Fragmente.

# Kapitel 2

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Brutschrank	Brutschrank Heraeus Instruments GmbH, Certomat BS1, B. Braun International, Sartorius Group
Feinwaage	VWR
Gelelektrophorese	Biometra
Heizblock	Techne Dri-Block, DB3, Techne
pH-Meter	WTW
Photometer	Bio-Photometer, Eppendorf, Hamburg
Sequenzier	3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Hitachi
Thermocycler	Mastercycler gradient, Eppendorf, Hamburg, Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems Thermocycler, EquiBio
Thermoschüttler	Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417R/C, Eppendorf, Hamburg
UV-Kamera	GeneFlash Syngene, Bio Imaging, Hamatsu
Vortexer	Bender & Hobein AG, Zürich Schweiz
Waage	Sartorius
Zentrifuge	Centrifuge 5417R, Eppendorf Hamburg

### 2.1.2 Chemikalien

Agar-Agar	Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen
ROTI®GAROSE NEEQ Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	Braun
Betain	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Borat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	Merck
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Amersham Pharmacia, Little Chalfont, England
Diethylpyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA-Größenmarker 1kB DNA-Ladder	Promega, Mannheim
EDTA (Ethylendinitritotetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethanol 96% reinst	Merck, Darmstadt
Ethidumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Heavy Mineral Oil	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hydrochinon (1,4-Benzenediol)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Isopropanol	Merck
Magnesiumchlorid 50mM	Bioline
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumbisulfit/Natriummetabisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Sea Plaques®agerose	Bio Whittaker Molecular Application
SDS (Natriumdodecylsulfonat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Trizol	Invitrogen
Trypton Pepton	Becton Dickinson, Sparks, USA
X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen



### 2.1.3 Enzyme und Enzympuffer

Ampli <i>Taq</i> ®DNA Polymerase	5000 U/ml	Applied Biosystems, Roche
BIO <i>Taq</i>	5000 U/ml	Bioline
BsgI	3000 U/ml	New England Biolabs
ClaI	5000 U/ml	New England Biolabs
<i>Eco</i> RI	20000 U/ml	New England Biolabs
ExoI (ExonucleaseI)	20000 U/ml	New England Biolabs
Hind III	20000 U/m	New England Biolabs
<i>Pfu</i> Turbo(r)-DNA-Polymerase	2500 U/ml	Stratagene, Europe
Proteinase K	20 U/mg	Invitrogen
RNase Out (Ribonuclease Inhibitor)	40000 U/ml	Invitrogen
SAP I (Shrimp Alkaline Phosphatase)	10000 U/ml	New England Biolabs
Stu I	100000 U/ml	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	400000 U/ml	New England Biolabs

#### Enzympuffer

BSA (Bovin Serum Albumin)	New England Biolabs
Ne Buffer 2	New England Biolabs
NH <sub>4</sub> Reaction Buffer	Bioline
PCR Buffer for Ampli <i>Taq</i> ®	Applied Biosystems
<i>Pfu</i> -PCR-Puffer	Stratagene, Europe
Quick Ligation Buffer	New England Biolabs

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Buffer EB (elutions buffer)	Qiagen, Hilden
Buffer N3 (neutralization buffer)	Qiagen, Hilden
Buffer P1 (resuspension buffer)	Qiagen, Hilden
Buffer P2 (lysin buffer)	Qiagen, Hilden
Buffer PE (wash buffer)	Qiagen, Hilden
Buffer PB (binding buffer)	Qiagen, Hilden
Buffer QG (solubilization buffer)	Qiagen, Hilden
Dilutant C Buffer	New England Biolabs
Loading Dye für Agarosegele	Bromphenolblau 0,25% Xylenglycerol 0,25%, Glycerol 25% in $H_2O$
Mouse-Tail-Buffer	0,05M Tris pH8 0,1M EDTA 0,5% SDS
TBE 10X (Tris-Borat-EDTA-Buffer)	0,89M Tris  0,89M Borat 0,02M EDTA
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### 2.1.5 Kulturmedien und Antibiotika

S.O.C. Flüssigmedium	Invitrogen
LB-Flüssigmedium	Trypton 10g/l, Hefeextrakt 5g/l, NaCl 5g/l in $H_2O$ ; pH 7,4
LB-Agarplatten	Agar-Agar 1,5% in LB-Flüssigmedium; pro ml LB-Flüssigmedium 75 $\mu$ g Ampicillin
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

### 2.1.6 Vektoren

pCS2+PAX8	generiert von Natalie Renault im Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie
-----------	---------------------------------------------------------------------------------------------

## 2.1.7 Kits

### 2.1.7.1 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
Oligo-DT-Primer	Invitrogen
RNase out	Invitrogen

### 2.1.7.2 Sequenzierungskit

ABIPrism®Bigdey®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, California, USA
------------------------------------------------------	-------------------------------------

### 2.1.7.3 Gelextraktionskit

QIA quick®Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
------------------------------	----------------

### 2.1.7.4 Klonierungskit

TOPO TA Cloning Kit mit PCR 2.1-TOPO®vector	Invitrogen
---------------------------------------------	------------

## 2.1.8 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Tib Mol-Biol hergestellt.

### 2.1.8.1 Amplifikation von *PAX8* und genomische Sequenzierung

<i>PAX8</i> genom Exon 2 Vorwärts	5' gga tgc agg cat cga atc tca tcg
<i>PAX8</i> genom Exon 2 Rückwärts	5' cga gat cca acc acc cga gcg c3'
<i>PAX8</i> genom Exon 3 Vorwärts	5' cat agc taa tcc cca ccc 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 3 Rückwärts	5' cct gcg gtg aat ttc gtg3'
<i>PAX8</i> genom Exon 4 Vorwärts	5' att ggg taa ttg ttt ggg att c 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 4 Rückwärts	5' cca ggc gtt tct tgt ctc tt 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 5 Vorwärts	5' agg ggt gtg aaa aaa gcg act g 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 5 Rückwärts	5' tgg gta tgc tga agg gga ggt g 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 6 Vorwärts	5' aga gtc acc cag ggc tgt gag 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 6 Rückwärts	5' gcg gag ccc cta caa agt cc 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 7 Vorwärts	5' cct cta ctt tgg cct aga gca 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 7 Rückwärts	5' ctt ctc tgg ccc ttg ccc ac 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 8 Vorwärts	5' gtc tet gtg cgc tga ctt ct 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 8 Rückwärts	5' cac acc ttc cgc ctg ac 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 9 Vorwärts	5' cac ggc ttg gct tgt gcg tg 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 9 Rückwärts	5' tcc cac ccg ccg cca tag 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 10 Vorwärts	5' gcc ccc atg gtc caa ctg ac 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 10 Rückwärts	5' tgc ctc ttg ctc ctt gtg tcc cac 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 11 Vorwärts	5' gat gcc ctt cac ctc aca ggc c 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 11 Rückwärts	5' cca cca ctc cat cca tcc tgc c 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 12 Vorwärts	5' ttt tcc ttt ctg acc aga agt g 3'
<i>PAX8</i> genom Exon 12 Rückwärts	5' att cct ttg tgt gac tct ctg g 3'

### 2.1.8.2 *PAX8* cDNA

<i>PAX8c2-F</i> (Vorwärts)	5' gat gcc tca caa ctc cat cag a 3'
<i>PAX8c6-F</i> (Vorwärts)	5' ctc cac cta ctc cat caa tg 3'
<i>PAX8c6-R</i> (Rückwärts)	5' cat tga tgg agt agg tgg ag 3'
<i>PAX8c12-R</i> (Rückwärts)	5' cta cag atg gtc aaa ggc c 3'

### 2.1.8.3 Positivkontrolle *GAPDH*

<i>GAPDH-F</i> (Vorwärts)	5' cat gtt tgt cat ggg tgt ga 3'
<i>GAPDH-R</i> (Rückwärts)	5' tac cag gaa atg agc ttg ac 3'

**2.1.8.4 PAX8-PPARG1 Fusionsgen**

<i>PAX8ex2-F</i> (Vorwärts)	5' gat gcc tca caa ctc cat cag 3'
<i>PAX8ex5-F</i> (Vorwärts)	5' gcc acc aag tcc ctg agt cc 3'
<i>PAX8ex7-F</i> (Vorwärts)	5' gca ttg act cac aga gca gca 3'
<i>PAX8ex8-F</i> (Vorwärts)	5' gct caa cag cac cct gga 3'
<i>PPARGex1-R1</i> (Rückwärts)	5' caa agg agt ggg agt ggt ct 3'
<i>PPARGex1-R2</i> (Rückwärts)	5' cat tac gga gag atc cac gg 3'
<i>PPARGex4-R</i> (Rückwärts)	5' tct gga ttc agc tgg tgc ata t 3'

**2.1.8.5 Positivkontrolle PAX8-PPARG1 Fusionsgen**

<i>PPARGex4-R</i> (Rückwärts)	5' tct gga ttc agc tgg tgc ata t 3'
<i>PPARGex1-F</i> (Vorwärts)	5' cat ggt tga cac aga gat gc 3'
<i>PPARGStu-R</i> (Rückwärts)	5' agg cct cta gta caa gtc ctt gta gat ctc 3'

**2.1.8.6 Amplifikation der mit Bisulfit behandelten DNA**

<i>hPAX8CpG-1-Fout</i> (Vorwärts)	5' gtg gat gta ttt ttg gga gga aat taa gta t 3'
<i>hPAX8CpG-1-Rout</i> (Rückwärts)	5' ttt act tcc ttt ctc taa act ccc cta ac 3'
<i>hPAX8CpG-1-Fin</i> (Vorwärts)	5' tttagtgagttttttaattttgttta 3'
<i>hPAX8CpG-1-Rin</i> (Rückwärts)	5' tat ttt cct ctc ttt atc tct tc 3'
<i>hPAX8CpG1-1-Fout</i> (Vorwärts)	5' gga ttt aga gaa ttt tat ttt tag g 3'
<i>hPAX8CpG1-1-Rout</i> (Rückwärts)	5' cta aaa aaa ctc caa act cca ac 3'
<i>hPAX8CpG1-1-Fin</i> (Vorwärts)	5' gtt tgt tga gtt agg gtt tag ttg 3'
<i>hPAX8CpG1-1-Rin</i> (Rückwärts)	5' aac tac caa aca tcc taa aac cct 3'
<i>hPAX8CpG1-3-Fout</i> (Vorwärts)	5' gtt ttt ttt agt gat ttt ttt ggt tgg 3'
<i>hPAX8CpG1-3-Rout</i> (Rückwärts)	5' ctc ccc tcc taa tta aac cat aac 3'
<i>hPAX8CpG1-3-Fin</i> (Vorwärts)	5' agt gat ttt ttt ggt tgg att gtg ag 3'
<i>hPAX8CpG1-3-Rin</i> (Rückwärts)	5' aac cat aac cct aaa act aaa aac tac 3'

**2.1.9 Gewebeproben follikulärer Schilddrüsenkarzinome**

In dieser Arbeit wurde DNA und RNA aus Gewebeproben follikulärer Schilddrüsenkarzinome untersucht. Insgesamt lagen 19 verschiedene Proben vor. Die Tumorproben wurden freundlicher Weise von Herrn PD Dr. Cuong Hoang-Vu, Abteilung Endokrinologische und Chirurgische Onkologie, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, bereitgestellt. Die histologische Untersuchung der Tumorproben erfolgte ebenfalls im Universitätsklinikum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Eine Übersicht über die Histologie findet sich im Ergebnisteil.

### 2.1.10 Gewebeprobe von Schilddrüsennormalgewebe

Für die Generierung der Positivkontrolle für den Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens war RNA aus Schilddrüsennormalgewebe erforderlich. Die Gewebeprobe des Schilddrüsennormalgewebes wurde von der Allgemeinchirurgie der Charite Berlin, Campus Virchow-Klinikum, bereit gestellt.

## 2.2 Methoden

In dieser Arbeit wurden 19 Gewebeproben follikulärer Schilddrüsenkarzinome auf genetischer und epigenetischer Ebene untersucht. Die Untersuchungen umfassten den Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens, ein Mutationsscreening des *PAX8*-Gens in Exon 2 bis 12 und die Untersuchung des Methylierungszustandes von *PAX8*. Eine schematische Übersicht über die angewandten Untersuchungsverfahren findet sich in Abbildung 2.3.

### 2.2.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

#### 2.2.1.1 DNA-Extraktion aus Tumorgewebeproben

Die DNA-Extraktion aus den Tumorproben erfolgte nach dem Mouse-Tail-Protokoll. Hierfür wurde ein linsengroßes Stück der Tumorprobe in 300  $\mu\text{l}$  Mouse-Tail-Buffer gegeben. Nach Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  Proteinase K wurde die Probe über Nacht bei 56 °C im Thermoschüttler gelöst. Die Proben wurden mit 1000  $\mu\text{l}$  absolut Ethanol und 150  $\mu\text{l}$  NH<sub>4</sub>Ac 7,5 M gefällt. Die Zentrifugierzeit betrug 30 min bei 14000 Umdrehungen/min. Das Pellet wurde in 200  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O und 200  $\mu\text{l}$  Phenolchloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 1 Minute gevortext und anschließend für 15 Minuten bei 14000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform durch einminütiges Vortexen gründlich gemischt. Die Proben wurden für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abpipettiert. Die Proben wurden mit 1000  $\mu\text{l}$  Ethanol absolut und 150  $\mu\text{l}$  NH<sub>4</sub>Ac gefällt (Zentrifugierzeit 30 min). Anschließend wurde eine weitere Fällung mit 500  $\mu\text{l}$  Ethanol 70% durchgeführt (Zentrifugierzeit 15 min). Nach vollständiger Trocknung des Pellets wurden die Proben in 50  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O angelöst. Die DNA-Konzentration jeder Probe wurde im Photometer gemessen.

#### 2.2.1.2 RNA-Extraktion aus Tumorgewebe und Umschreibung in cDNA

Für die RNA-Extraktion wurde ein etwa linsengroßes Stück der Tumorprobe gründlich zerkleinert, mit 1000  $\mu\text{l}$  Trizol gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur

ruhen gelassen. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  Chloroform hinzugegeben und durch Schütteln gut mit dem Trizol gemischt. Das Gemisch wurde für 3 Minuten ruhen gelassen und anschließend für 15 Minuten bei 12000 Umdrehungen/min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und vorsichtig mit 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol vermengt. Die Proben wurden für 10 Minuten auf Eis gestellt und anschließend für mindestens 8 Stunden bei -80 °C gekühlt. Es wurde eine 1%-DEPC-Lösung in destilliertem Wasser angesetzt und über Nacht autoklaviert. Mit DEPC- $H_2O$  wurde 75%-Ethanol angesetzt. Die Proben wurden für 15 Minuten bei 13000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Anschließend wurden 500  $\mu\text{l}$  des 75%-Ethanol hinzugegeben. Nach 15-minütiger Zentrifugation wurde das Ethanol abpipettiert und das Pellet bei 55 °C für 3 Minuten trocknen gelassen.

Das RNA-Pellet wurde in 20  $\mu\text{l}$  DEPC- $H_2O$  angelöst und für 10 Minuten bei 55 °C inkubiert. In einer Reverse-Transkriptase-PCR (rt-PCR) wurde zur RNA komplementäre cDNA hergestellt. Hierfür wurde ein 20  $\mu\text{l}$ -Ansatz mit 10x Buffer RT, 0,25 mM dNTP-Mix, 10  $\mu\text{M}$  OligoDT-Primer, 1 U RNase out, 1 U Omniscript und 1  $\mu\text{l}$  RNA verwendet. Für die Umschreibung wurde der Ansatz für 60 min bei 37 °C inkubiert. Zum Nachweis einer erfolgreichen RNA-Extraktion und Umschreibung in cDNA, erfolgte zunächst die Amplifikation des Housekeeping-Gens Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) aus der cDNA mit folgendem 25  $\mu\text{l}$ -Mastermix und Temperaturen:

**Mastermix:**

10x	NH4-Reaction Buffer
1,5 mM	MgCl
0,05 mM	dNTPs
0,5 U	<i>Taq</i> Bioline
0,5 $\mu\text{M}$	Vorwärtsprimer
0,5 $\mu\text{M}$	Rückwärtsprimer
2 $\mu\text{l}$	cDNA

**Temperaturen:**

einmalig	5 min	95 °C
40 Zyklen	1 min	95 °C
	1 min	57,8 °C für <i>PAX8</i> und 57,0 °C für <i>GAPDH</i>
	1 min	72 °C
abschließend	7 min	72 °C

## 2.2.2 Generierung der Positivkontrolle zum Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens

Die Positivkontrolle für die Amplifikation des Fusionsgens wurde aus einem PCR-Produkt von *PPARG1* und einem pCS2+*PAX8*-Vektor generiert. Der pCS2-Vektor ist ein von Dave Turner und Ralph Rupp im Hal Weintraub's Labor im Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle generierter Vektor (Turner and Weintraub, 1994, Rupp et al., 1994), der mit zwei Polylinkern ausgestattet ist, die eine Vielzahl von Enzymschnittstellen aufweisen, über die DNA-Fragmente inkloniert werden können (siehe Abbildung 2.1). Der pCS2+*PAX8*-Vektor wurde von Natalie Renault, Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, generiert. Wie im Folgenden genauer erläutert, wurde 5' von *PAX8* über die Enzymschnittstellen *EcoR1* und *Stu1* das *PPARG1*-Fragment inkloniert, so dass anschließend ein *PAX8-PPARG1*-Plasmid vorlag. Eine schematische Abbildung des Verfahrens findet sich in Abbildung 2.4.

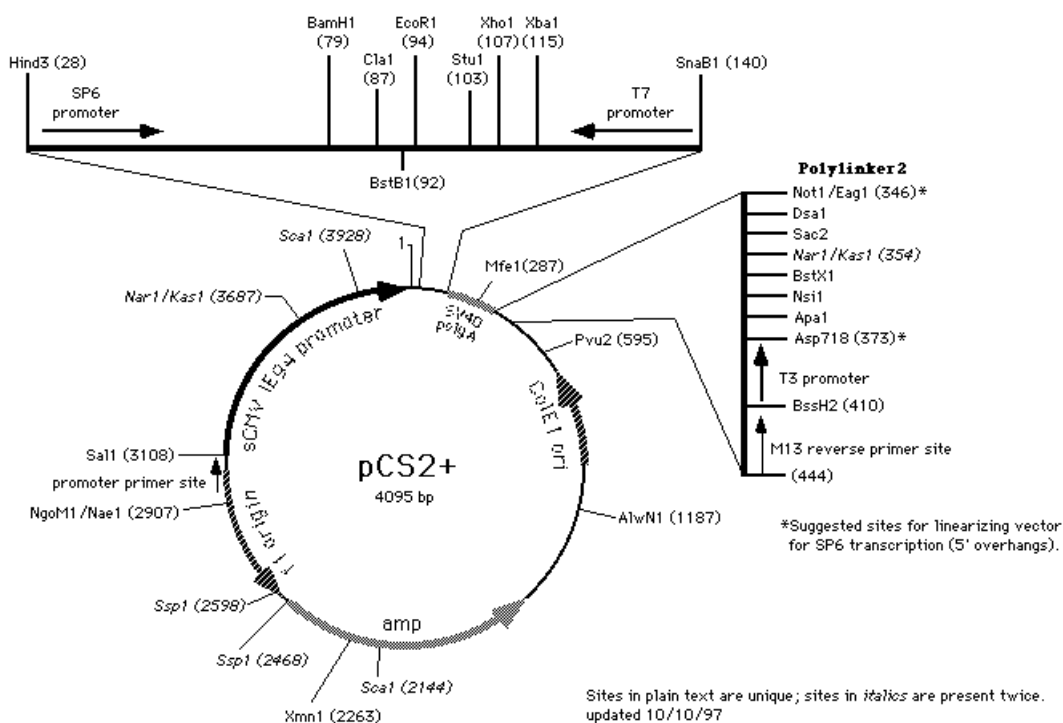


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des pCS2-Vektors, übernommen aus <http://sitemaker.umich.edu/dltturner.vectors/home>, University of Michigan



### 2.2.2.1 PCR-Bedingungen zur Amplifikation des *PPARG1*-Stu-Fragmentes

*PPARG1* wurde von Exon eins bis Mitte des sechsten Exons aus cDNA aus Schilddrüsennormalgewebe amplifiziert. Als Vorwärtsprimer wurde *PPARG*ex1-F, als Rückwärtsprimer *PPARG*-Stu-R eingesetzt. *PPARG*-Stu-R weist zusätzlich die Schnittstelle für das Enzym Stu auf, so dass sich am 3'-Ende des *PPARG1*-Amplifikationsproduktes die Stu-Enzymschnittstelle befindet.

Die PCR erfolgte mit folgendem Mastermix und Temperaturen:

#### Mastermix:

1 M	Betain
10x	NH <sub>4</sub> -Reaction Buffer
1,5 mM	MgCl
0,05 mM	dNTPs
0,5 U	<i>Taq</i> Bioline
0,5 $\mu$ M	Vorwärtsprimer
0,5 $\mu$ M	Rückwärtsprimer

#### Temperaturen:

einmalig	5 min	95 °C
40 Zyklen	1 min	95 °C
	1 min	57,8 °C für <i>PAX8</i> und 57,0 °C für <i>GAPDH</i>
	1 min	72 °C
abschließend	7 min	72 °C

Pro Probe wurden 2  $\mu$ l DNA mit einer DNA-Konzentration von 100 ng eingesetzt. Der Ansatz wurde mit *H*<sub>2</sub>*O* auf 50  $\mu$ l aufgefüllt.

Für die Negativkontrolle wurden 2  $\mu$ l *H*<sub>2</sub>*O* eingesetzt. Die PCR wurde im Eppendorf Gradientencycler durchgeführt.

### 2.2.2.2 Aufreinigung über Säulen mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen

Das *PPARG1*-Stu-PCR-Produkt wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt. Zunächst wurde das PCR-Produkt mit der fünffachen Menge PB binding buffer in eine Spin-Column-Säule von Qiagen pipettiert und eine Minute zentrifugiert. Nach Entleerung des Auffanggefäßes wurden 750  $\mu$ l PE wash buffer in die Säule gegeben und eine Minute zentrifugiert. Der Behälter wurde entleert, anschlie-

ßend wurde erneut für fünf Minuten zentrifugiert. Nach zehnmütiger Trocknung bei Raumtemperatur wurde mit 30  $\mu\text{l}$  50 °C warmen Wasser eluiert.

### 2.2.2.3 TOPO-Klonierung

Das Verfahren der Klonierung ermöglicht eine klonale Vervielfältigung des in einen Plasmidvektor eingebrachten DNA-Fragmentes über die Einschleusung des Vektors in Bakterien mit hoher Teilungsrate. Die derart vervielfältigte Plasmid-DNA lässt sich durch Plasmid-Präparation aus den Zellen isolieren. Plasmidvektoren sind von natürlich vorkommenden Plasmiden ausgehend künstlich hergestellte zirkuläre DNA-Moleküle. Die meisten Plasmidvektoren besitzen ein Resistenzgen, das ihre Selektion ermöglicht, sowie eine künstlich eingefügte Region, die verschiedene Enzymschnittstellen aufweist, der sogenannte Polylinker bzw. die Multiple-cloning-site. Hierüber kann mit Hilfe von Restriktionsenzymen sowie Ligasen eine fremde DNA-Sequenz eingefügt werden.

Der verwendete PCR2.1.Topo-Vektor enthält zum einen ein Ampicillinresistenzgen, wodurch eine Selektion auf Ampicillin möglich wird. Des weiteren weist der Vektor das Gen *lacZ* (Betagalactosidase) auf, das die blau-weiß-Selektion auf X-Gal ermöglicht. Durch die Expression von Betagalactosidase kann X-Gal gespalten werden, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht. Innerhalb des *lacZ*-Gens befindet sich die Schnittstelle, an der während der TOPO-Klonierung das DNA-Fragment eingefügt wird. Jeder Vektor, der ein DNA-Fragment aufgenommen hat, exprimiert keine Betagalactosidase mehr, so dass die entsprechenden Bakterienkolonien nicht angefärbt werden und sich weiß darstellen. Dies ermöglicht die Unterscheidung von Kolonien, die Plasmidvektoren mit dem DNA-Fragment tragen von solchen, die Vektoren ohne DNA-Fragmente beinhalten.

Das aufgereinigte *PPARG1-Stu*-PCR-Produkt wurde zunächst in den PCR2.1.Topo-Vektor inkloniert. Hierfür wurden 2  $\mu\text{l}$  des gereinigten PCR-Produktes zu 2  $\mu\text{l}$   $H_2O$  und 1  $\mu\text{l}$  2.1. TOPO-Vektor pipettiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte die Transformation nach *E. coli* Top10-kompetente Zellen. Anschließend wurde *E. coli* für 45 Minuten auf Eis gestellt, für knapp zwei Minuten auf 42 °C erwärmt und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  S.O.C.-Medium wurden die Bakterien unter Schütteln für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden auf eine mit 40  $\mu\text{l}$  X-Gal behandelte LB-Ampicillin-Agarplatte aufgetragen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch Selektion auf Ampicillin und das durch X-Gal ermöglichte blau-weiß-Screening konnten die Bakterienkolonien, die den Vektor einschließlich des PCR-Produktes beinhalten detektiert werden.

#### 2.2.2.4 Minipräparation

Zur Isolierung des die *PPARG1*-Sequenz enthaltenden Plasmides wurde die Minipräparation durchgeführt. Zunächst wurden weiße *E. coli* Top10-Kolonien von den Agarplatten gepickt und über Nacht in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zunächst 5 Minuten zentrifugiert, so dass sich ein Pellet bildete. Nach Abgießen der Flüssigkeit wurde das Pellet mit 250  $\mu$ l lysin buffer gelöst. Die Lösung wurde mit 250  $\mu$ l P2 Buffer und 500  $\mu$ l neutralization buffer gemischt und 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine Aufreinigungssäule pipettiert, eine Minute zentrifugiert und zweimal mit 750  $\mu$ l PE wash buffer gewaschen. Anschließend wurde mit 50  $\mu$ l  $H_2O$  eluiert. Die derart aufgearbeiteten Plasmide wurden sequenziert, um eindeutig nachzuweisen, dass die *PPARG1-Stu*-Sequenz eingebaut ist.

#### 2.2.2.5 Enzymverdau mit Restriktionsenzymen

Der Enzymverdau mit Restriktionsenzymen dient dazu, sowohl an der im Minipräp isolierten Plasmid-DNA als auch an dem gewünschten Vektor die Schnittstellen für die Ligation zu schaffen. An entsprechenden Schnittstellen schneiden die eingesetzten Enzyme das gewünschte DNA-Fragment aus den Plasmiden heraus. Auch aus dem Plasmidvektor, in den das DNA-Fragment anschließend inkloniert werden soll, wird ein Stück DNA-Sequenz herausgeschnitten, der Vektor somit geöffnet. Der Enzymverdau wurde sowohl für das im Minipräp isolierten *PPARG1*-Plasmids, als auch für den pCS2(plus)-Vektor durchgeführt. Folgender 20  $\mu$ l Ansatz wurde verwendet:

**Mastermix:**

20U	<i>Eco</i> R1
30 U	STU 1
10x	Ne Buffer 2
0,2 $\mu$ g	BSA
8,8 $\mu$ l	pCS2(plus)-Vektor bzw. im Minipräp isolierten <i>PPARG1</i> -Plasmids

Der Ansatz wurde mit  $H_2O$  auf 20  $\mu$ l aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 37 °C. Das Enzym Stu 1 wurde erst nach 30 Minuten hinzugefügt.

In einem 1%-igen Agarosegel erfolgte anschließend die Gelelektrophorese zur Auftrennung der unterschiedlichen DNA-Fragmente. Die Banden der richtigen Länge wurden ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Gelextraktion mit dem QIA quick Gel Extraction Kit.

### 2.2.2.6 Gelextraktion

Die aus dem Gel ausgeschnittenen Banden wurden bei 50 °C im Thermoschüttler in 300  $\mu$ l QG stabilisation buffer gelöst. Anschließend wurden 100  $\mu$ l Isopropanol hinzugegeben und die gesamte Flüssigkeit in eine Spin-Column-Säule von Qiagen umpipettiert und bei 140000 Umdrehungen/min zwei Minuten lang zentrifugiert. Der Behälter unter der Säule wurde ausgeleert. In die Säule wurden 500  $\mu$ l solubilization buffer pipettiert und anschließend erneut für zwei Minuten zentrifugiert. Nach Entleerung des Behälters wurde mit 500  $\mu$ l PE wash buffer und anschließender Zentrifugation zweimal gewaschen. Anschließend wurde mit 20  $\mu$ l 50 °C warmen Eluationsbuffer eluiert.

### 2.2.2.7 Ligation des *PPARG1*-Fragmentes und des pCS2+*PAX8*-Vektors

Die im Enzymverdau mit *EcoR1* und *Stu* aus dem Topovektor herausgeschnittene *PPARG1*-Sequenz wurde in den ebenfalls mit *EcoR1* und *Stu* geschnittenen pCS2+*PAX8*-Vektor über diese beiden Enzymschnittstellen 3' von *PAX8* inkloniert. Hierfür wurde die T4-Ligase eingesetzt, die sowohl glatte als auch überhängende Restriktionsenden miteinander verknüpfen kann. Folgender Ansatz wurde verwendet:

3  $\mu$ l *PPARG1*-Eluat  
1  $\mu$ l pCS2+*PAX8*-Vektor-Eluat  
400 U T4-DNA-Ligase  
2x Quick Ligation Buffer

Der Ansatz wurde mit  $H_2O$  auf 15  $\mu$ l aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Für die Negativkontrolle wurde anstelle der *PPARG1*-Sequenz  $H_2O$  eingesetzt.

### 2.2.2.8 Transformation nach *E. coli*

Zur klonalen Vervielfältigung wurden die mit *PPARG1* infizierten *PAX8*-pCS2(plus)-Vektoren sowie der Ligationsansatz für die Negativkontrolle nach *E. coli* transformiert. Die Ligationsprobe wurde auf 100  $\mu$ l *E. coli* gegeben und 45 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Proben für knapp 2 min auf 42 °C erwärmt und sofort wieder auf Eis gestellt. Es wurden 250  $\mu$ l S.O.C.-Medium hinzugegeben und für 45 min bei 37 °C unter Schütteln im Brutschrank inkubiert. Die Bakterien wurden auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Es wurden Kolonien gepickt und über Nacht in 4 ml LB-Medium mit Ampicillin inkubiert. Anschließend wurde zur Plasmidisolierung die Minipräparation nach dem oben erläuterten Prinzip durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Sequenzierung der Plasmide um nachzuweisen, dass die *PPARG1*-Sequenz am 3´-Ende der *PAX8*-Wildtypsequenz von 5´ nach 3´ eingebaut ist.

### 2.2.3 Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens

Alle Tumorproben, aus denen RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben werden konnten, wurden auf das Vorliegen des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels Amplifikation aus cDNA mit *PAX8*-Vorwärtsprimern und *PPARG1*-Rückwärtsprimern. Zum einen erfolgten einfache PCRs mit folgenden Primerpaaren:

<b>Vorwärtsprimer:</b>	<b>Rückwärtsprimer:</b>
<i>PAX8</i> Exon 2 ( <i>PAX8ex2-F</i> )	und <i>PPARG1</i> Exon 1 ( <i>PPARGex1-R2</i> )
<i>PAX8</i> Exon 5 ( <i>PAX8ex5-F</i> )	und <i>PPARG1</i> Exon 4 ( <i>PPARGex4-R</i> )
<i>PAX8</i> Exon 7 ( <i>PAX8ex7-F</i> )	und <i>PPARG1</i> Exon 1 ( <i>PPARGex1-R2</i> )

Primerpaar 1 und 3 wurden hierbei so gewählt, dass auch Bruchpunkte, die im hinteren Bereich von *PPARG1* (Primerpaar 1) bzw. im vorderen Bereich von *PAX8* (Primerpaar 3) mit abgedeckt werden, auch wenn die bisher beschriebene Bruchpunkte alle im Bereich von Exon 7 bis 10 von *PAX8* und stets am Beginn von Exon 1 von *PPARG1* liegen.

Zusätzlich wurden in Anlehnung an Marques et al. 2002 (Marques et al., 2002) zwei verschiedene Nested-PCRs mit folgenden Primerpaaren durchgeführt:

	<b>Vorwärtsprimer:</b>	<b>Rückwärtsprimer:</b>
Out-PCR:	<i>PAX8</i> Exon 5 ( <i>PAX8ex5-F</i> )	und <i>PPARG1</i> Exon 1 ( <i>PPARGex1-R1</i> )
In-PCR:	<i>PAX8</i> Exon7 ( <i>PAX8ex7-F</i> )	und <i>PPARG1</i> Exon 1 ( <i>PPARGex1-R2</i> )
In-PCR:	<i>PAX8</i> Exon8 ( <i>PAX8ex8-F</i> )	und <i>PPARG1</i> Exon 1 ( <i>PPARGex1-R2</i> )

Die PCR erfolgte mit folgendem Mastermix und Temperaturen:

**Mastermix:**

1 M	Betain
10x	NH <sub>4</sub> -Reaction Buffer
1,5 mM	MgCl
0,05 mM	dNTPs
0,5 U	<i>Taq</i> Bioline
0,5 $\mu$ M	Vorwärtsprimer
0,5 $\mu$ M	Rückwärtsprimer

**Temperaturen:**

einmalig	5 min	95 °C
30 Zyklen	45 s	95 °C
	45 s	Annealingtemperatur je nach Primerpaar
	1 min	72 °C
abschließend	7 min	72 °C

**Annealingtemperaturen:**

PAX8ex2-F,	PPARG-R2: 60,3 °C
PAX8ex5-F,	PPARG-R1: 63,4 °C
PAX8ex5-F,	PPARG-4R: 60,3 °C
PAX8ex7-F,	PPARG-R2: 63,4 °C
PAX8ex8-F,	PPARG-R2: 63,4 °C

Pro Probe wurden 2  $\mu$ l DNA mit einer DNA-Konzentration von 100 ng eingesetzt. Der Ansatz wurde mit  $H_2O$  auf 50  $\mu$ l aufgefüllt.

Als Positivkontrolle wurde das im Rahmen dieser Arbeit generierte Produkt aus PAX8-Wildtyp-DNA und PCR-Produkt von *PPARG1* verwendet. Für die Negativkontrolle wurden 2  $\mu$ l Wasser eingesetzt. Die PCR erfolgte im Gradientencycler von Eppendorf. Die PCR-Produkte wurden auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte nach dem gleichen Verfahren, wie im Punkt 2.2.4. beschrieben, der Exo-Sap-Enzymverdau und anschließend die Sequenzierung.

## 2.2.4 PAX8-Mutationsscreening

### 2.2.4.1 PCR-Bedingungen

Die DNA der Tumorproben wurde auf Mutationen im PAX8-Gen untersucht. Zunächst wurden Exon 2 bis 12 des PAX8-Gens amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Mastermix und Temperaturen:

**Mastermix für Exon 3 bis 8 und 10 bis 12:**

10x	NH <sub>4</sub> -Reaction Buffer
1,5 mM	MgCl
0,05 mM	dNTPs
0,5 U	<i>Taq</i> Bioline
0,5 $\mu$ M	Vorwärtsprimer
0,5 $\mu$ M	Rückwärtsprimer

**Mastermix für Exon 2 und 9:**

1 M	Betain
10x	NH <sub>4</sub> -Reaction Buffer
1,5 mM	MgCl
0,05 mM	dNTPs
0,5 U	<i>Taq</i> Bioline
0,5 $\mu$ M	Vorwärtsprimer
0,5 $\mu$ M	Rückwärtsprimer

**Temperaturen:**

einmalig	5 min	95 °C
30 Zyklen	1 min	95 °C
	1 min	Annealingtemperatur je nach Exon
	1 min	72 °C
abschließend	7 min	72 °C

**Annealingtemperaturen:**

Exon 3 bis 8, 10,12	60,0 °C
Exon 2 und 9	69 °C
Exon 11	63 °C

Pro Probe wurden 2  $\mu$ l DNA mit einer DNA-Konzentration von 100 ng eingesetzt. Der Ansatz wurde mit  $H_2O$  auf 50  $\mu$ l aufgefüllt. Für die Negativkontrolle wurde die DNA durch 1  $\mu$ l Wasser ersetzt. Die PCR wurde im Gradientencycler von Eppendorf durchgeführt. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte durch Gelelektrophorese auf einem 1%-gen Agarosegel.

#### 2.2.4.2 Exo-Sap-Enzymverdau

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte im Exo-Sap-Enzymverdau. Für 8  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt wurden 3,6 U Exo I und 3,2 U SAP I eingesetzt und mit  $H_2O$  zu einem 11  $\mu\text{l}$ -Ansatz aufgefüllt.

Es erfolgte ein Inkubation bei 37 °C für 35 Minuten und eine anschließende Hitzeinaktivierung bei 80 °C für 10 Minuten.

#### 2.2.4.3 Genomische Sequenzierung

Das im Exo-Sap-Enzymverdau aufgereinigte PCR-Produkt wurde sequenziert. Zunächst wurde eine Sequenzier-PCR mit dem ABIPrism®Bigdey®Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit durchgeführt. Die Sequenzier-PCR erfolgte in einem 10  $\mu\text{l}$ -Ansatz mit 1  $\mu\text{l}$  Big dye, 5x Sequencing Buffer, Vorwärtsprimer des entsprechenden Exons mit einer finalen Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  und 2  $\mu\text{l}$  aufgereinigtes PCR-Produkt. Der Ansatz wurde mit  $H_2O$  auf 10  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Die Sequenzier-PCR erfolgte mit folgenden Temperaturen:

**Temperaturen:**

einmalig	1 min	95 °C
30 Zyklen	30 s	95 °C
	30 s	55 °C
	30 s min	60 °C
abschließend	4 min	60 °C

Die Sequenzier-PCR wurde im Eppendorf Gradientencycler durchgeführt.

Anschließend erfolgte die Ethanolfällung. Hierfür wurden zu den Proben 2  $\mu\text{l}$  Natriumacetat 1,5 M und 20  $\mu\text{l}$  96%-iges Ethanol pipettiert und 30 Minuten zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt. Es wurden 200  $\mu\text{l}$  70%-iges Ethanol hinzu pipettiert und für 10 Minuten zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde erneut abgesaugt und die Proben offen bei 95 °C für eine Minute vollständig trocknen gelassen.

Die Proben wurden mit je 30  $\mu\text{l}$   $H_2O$  angelöst und anschließend im Hitachi Sequenzer sequenziert.



## 2.2.5 Untersuchung des Methylierungszustandes des *PAX8*-Gens

### 2.2.5.1 Bisulfitbehandlung

**Prinzip:** Mit Hilfe der Bisulfitbehandlung (bisulfite genomic sequencing) kann der Methylierungszustand der DNA aufgezeigt werden. Die Methode (Frommer et al., 1992) basiert auf der kompletten Deamination von Cytosin zu Uracil in einzelsträngiger DNA durch Behandlung mit Bisulfit.

Wie in Abbildung 2.2 dargestellt, kommt durch Anlagerung von Bisulfit an die 5-6-Doppelbindung von Cytosin die Konversion von Cytosin zu Uracil zustande. Bei niedrigem pH ( $< 7$ ) entsteht durch Sulfonierung Cytosinsulfonat, das in Anwesenheit von Bisulfit hydrolytisch deaminiert wird, so dass Uracilsulfonat vorliegt. Durch anschließende alkalische Desulphonation entsteht schließlich Uracil (Shapiro et al., 1974).

Methyliertes Cytosin (5-Methylcytosin) reagiert nicht mit Bisulfit, so dass es weiterhin als Cytosin vorliegt. In der anschließenden PCR wird das durch die Bisulfitbehandlung in Uracil umgewandelte Cytosin als Thymin gelesen, das methylierte Cytosin hingegen liegt weiter als Cytosin vor, so dass nach Sequenzierung der Amplifikationsprodukte eindeutig zwischen methyliertem und nicht methyliertem Cytosin unterschieden werden kann.

Da nur eine begrenzte Menge Tumorgewebe vorlag und dementsprechend auch nur eine begrenzte Menge DNA gewonnen werden konnte, wurde das Verfahren nach Olek et al. 1996 gewählt, bei dem die DNA in Agarose-Beads gebettet wird. Hierdurch wird die erforderliche DNA-Menge minimiert, da durch die Einbettung der DNA in Agarose die DNA bei den Waschvorgängen, die nach der Bisulfitbehandlung erforderlich sind, nicht verloren geht. Weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist die Optimierung der Reaktivität der verwendeten Chemikalien, sowie die Verhinderung der Renaturierung der DNA.

Die aus dem Tumorgewebe extrahierte DNA wurde zunächst mit *Eco* R1 verdaut. Eingesetzt wurden DNA-Konzentrationen von 350 bis 400 ng.

20 U *Eco* R1 und 10x Ne Buffer 2 wurden mit der entsprechenden Menge von DNA gemischt und mit Wasser zu einem 21  $\mu$ l-Ansatz aufgefüllt. Es erfolgte eine zwei-stündige Inkubation bei 37 °C. Da es für eine erfolgreiche Konversion von Cytosin zu Uracil durch Behandlung mit Bisulfit von großer Bedeutung ist, dass die DNA einzelsträngig vorliegt (Feil et al., 1994), wurde sowohl thermisch durch Erhitzung auf 95 °C und anschließenden Kälteschock, als auch alkalisch durch fünfzehnminütige Inkubation bei 50 °C mit 4  $\mu$ l 2M NaOH denaturiert. Für die Bisulfitbehandlung wurde eine 2,5 molare Bisulfitlösung hergestellt. Hierzu wurden 2,5 ml  $H_2O$  mit 750  $\mu$ l 2M

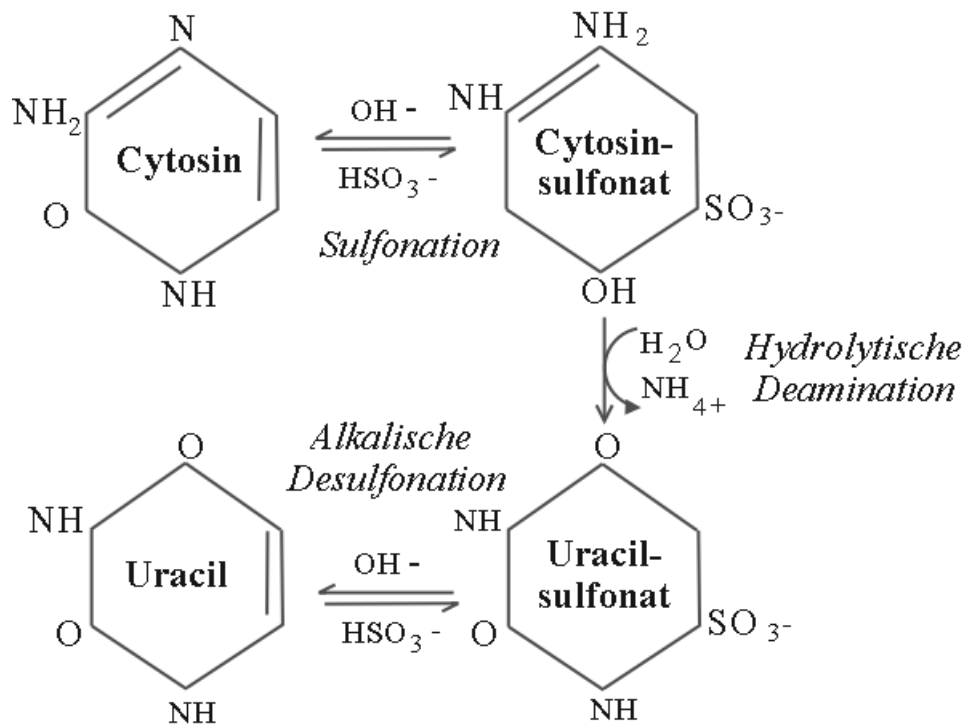


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Konversion von Cytosin zu Uracil durch Bisulfit

NaOH-Lösung gemischt. Anschließend wurden 1,9 g Natriumbisulfit hinzugegeben. 55 mg Hydrochinon wurden in 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  bei 50 °C im Thermoschüttler gelöst. Die Hydrochinonlösung wurde mit der Bisulfitlösung gemischt. Je 1 ml der Lösung wurde in ein Eppendorfggefäß pipettiert, mit 750  $\mu\text{l}$  schwerem Mineralöl beschichtet und für 3 bis 4 Stunden in Eis gestellt.

Zur Herstellung der Beads wurden 0,02 g Sea Plaques Agarose mit 1000  $\mu\text{l}$  Wasser gemischt, gründlich gevortext und sofort bei 80 °C schmelzen gelassen. 50  $\mu\text{l}$  der warmen Agarose wurden mit der durch Enzymverdau aufgereinigten DNA gemischt. Bis zu 7 10  $\mu\text{l}$  Aliquots des DNA-Agarosegemisches wurden in das eisgekühlte Mineralöl pipettiert. Sobald die Beads in die wässrige Phase eingetreten waren, wurde die Probe zurück auf Eis gestellt und für 30 Minuten gekühlt. Anschließend wurden die Proben bei 50 °C für 3,5 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads zunächst 3 mal für je 10 min mit 1 ml 1X TE Buffer, dann 2 mal für je 15 Minuten mit 500  $\mu\text{l}$  0,2 M NaOH-Lösung gewaschen. Anschließend erfolgten drei weitere Waschvorgänge mit 1 ml 1X TE Buffer für je 10 min. Vor der Amplifikation wurden die Beads zwei mal für 15 Minuten mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen.

### 2.2.5.2 PCR-Bedingungen

Die mit Bisulfit behandelte DNA wurde in einer Nested-PCR mit je 40 Zyklen amplifiziert. In der Out-PCR wurde pro Probe je ein Bead, in der In-PCR pro Probe 2  $\mu\text{l}$  PCR-Produkt der Out-PCR eingesetzt. Die Amplifikationen erfolgten mit folgenden Ansätzen und Temperaturen:

#### Mastermix für die Region -1:

1 M	Betain
10x	<i>Pfu</i> -Puffer
10x	NH <sub>4</sub> -Reaction Buffer
1,5 mM	MgCl
0,1 mM	dNTPs
4,25 U	<i>Taq</i> Bioline
0,375 U	<i>Pfu</i> Turbo-Dna-Polymerase
0,5 $\mu\text{M}$	Vorwärtsprimer
0,5 $\mu\text{M}$	Rückwärtsprimer

#### Mastermix für die Fragmente 1-1 und 1-3:

1 M	Betain
10x	Buffer for <i>AmpliTaq</i>
0,1 mM	dNTPs
2,5 U	<i>AmpliTaq</i>
0,5 $\mu\text{M}$	Vorwärtsprimer
0,5 $\mu\text{M}$	Rückwärtsprimer

Die Ansätze wurden mit  $H_2O$  jeweils auf 50  $\mu\text{l}$  aufgefüllt.

#### Temperaturen:

einmalig	5 min	95 °C
40 Zyklen	1 min	95 °C
	1 min	Annealingtemperatur je nach Primerpaar
	1 min	72 °C
abschließend	7 min	72 °C

Im Folgenden findet sich eine Übersicht über die verwendeten Primerpaare und den entsprechenden Annealingtemperaturen.

Fragment	PCR	Primer	Annealingtemperatur
Region -1	Out-PCR	<i>hPAX8CpG-1Fout</i> (vorwärts)	60,6 °C
		<i>hPAX8CpG-1Rout</i> (rückwärts)	
	In-PCR	<i>hPAX8Cp-1GFin</i>	
		<i>hPAX8Cp-1GRin</i>	
Fragment 1-1	Out-PCR	<i>hPAX8CpG1-1Fout</i>	62,6 °C
		<i>hPAX8CpG1-1Rout</i>	
	In-PCR	<i>hPAX8Cp1-1GFin</i>	
		<i>hPAX8Cp1-1GRin</i>	
Fragment 1-3	Out-PCR	<i>hPAX8CpG1-3Fout</i>	60,3 °C
		<i>hPAX8CpG1-3Rout</i>	
	In-PCR	<i>hPAX8Cp1-3GFin</i>	
		<i>hPAX8Cp1-3GRin</i>	

Als Negativkontrolle wurde statt DNA 2  $\mu\text{l}$   $H_2O$  eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte im Gradientencycler von Eppendorf. Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese auf einem 1%-igen Agarosegel. Die Amplifikationsprodukte wurden im Exo-Sap-Enzymverdau aufgereinigt (Verfahren siehe Punkt 2.2.4.2). Anschließend wurden die PCR-Produkte der Fragmente direkt sequenziert.

### 2.2.5.3 Direktsequenzierung

Die Direktsequenzierung der Amplifikationsprodukte der mit Bisulfit behandelten DNA entspricht vom Vorgehen her dem Verfahren, wie es im Punkt 2.2.4.3. erläutert wurde. In der Sequenzier-PCR wurden pro Probe jedoch 3  $\mu\text{l}$  des ABIP Bigdey eingesetzt.

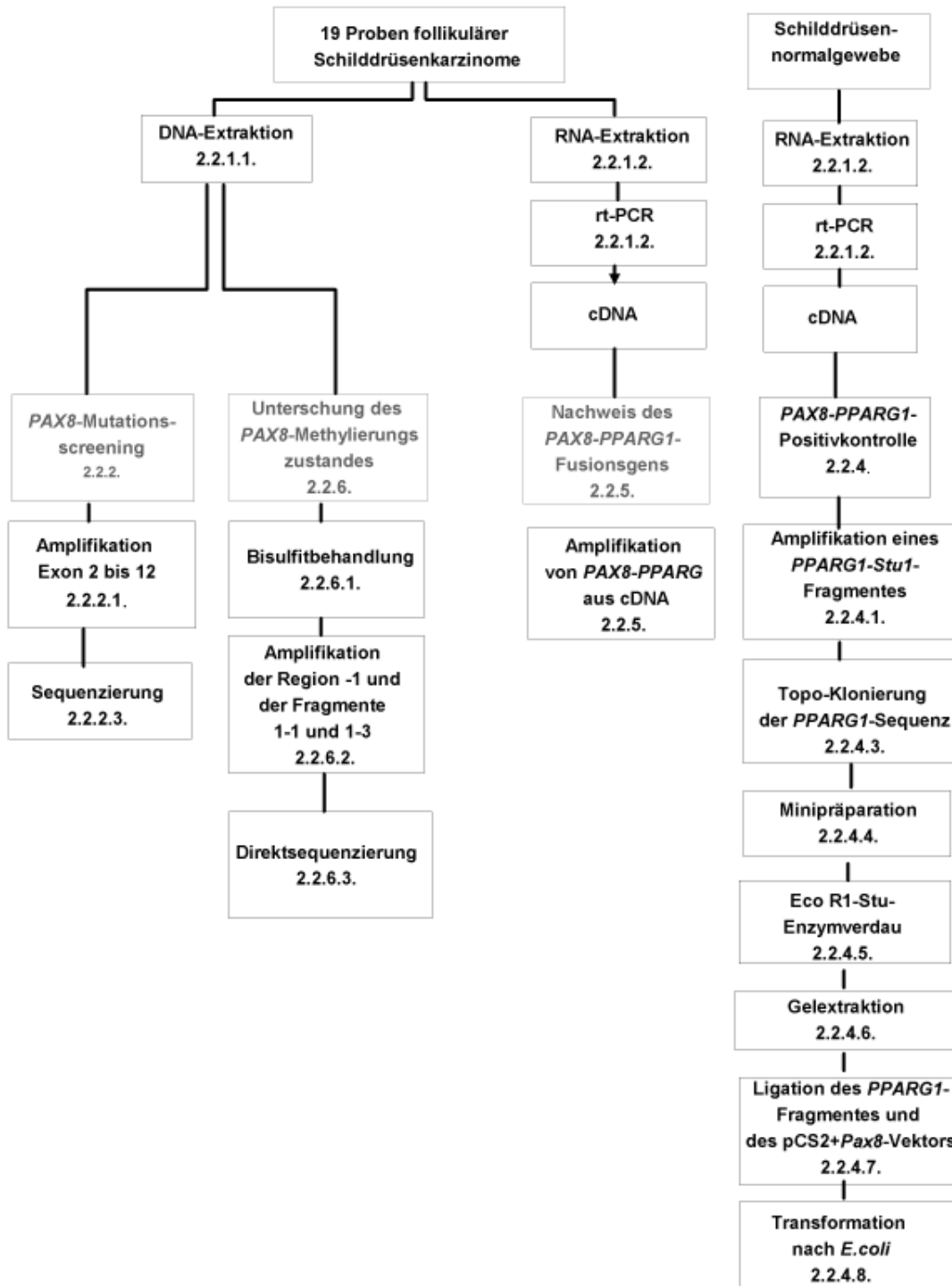
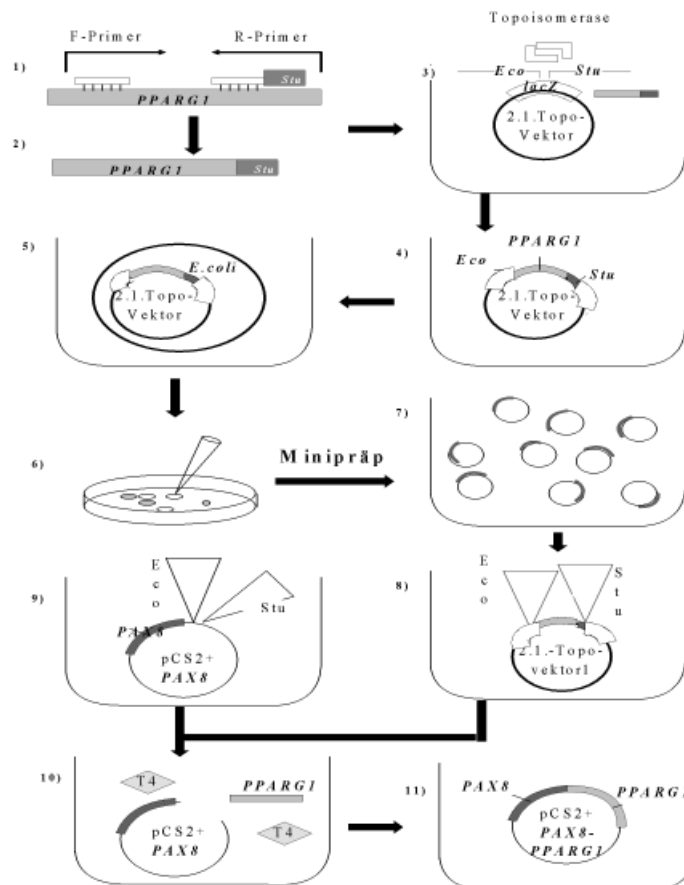


Abbildung 2.3: Darstellung der verwendeten Methoden



- 1) und 2) Amplifikation von *PPARG1* aus cDNA. Der Rückwärtsprimer enthält zusätzlich die Sequenz für die *Stu*-Schnittstelle.  
 3) und 4) Das Amplifikationsprodukt wird in den 2.1. Topovektor einkloniert und in *E. coli* transfiziert (5).  
 6) Nach Inkubation über Nacht werden weiße Kolonien gepickt.  
 7) Im Minipräp erfolgt die Plasmidisolation.  
 8) Enzymverdau mit *Eco*R1 und *Stu*I: Die *PPARG1*-Sequenz wird aus dem Topo-Vektor herausgeschnitten.  
 9) Im *pCS2+PAX8*-Vektor werden im Enzymverdau die Schnittstellen für die Ligation geschaffen.  
 10) Mit Hilfe der T4-Ligase erfolgt die Ligation der *PPARG1*-Sequenz mit dem *pCS2+PAX8*-Vektor.

Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Generierung der *PAX8-PPARG1*-Positivkontrolle

# Kapitel 3

## Ergebnisse

Die bisherige Datenlage zur Rolle von PAX8 in der Entwicklung der Schilddrüse und Differenzierung der Schilddrüsenzellen sowie die Veränderungen des *PAX8*-Gens in Schilddrüsenkarzinomen lassen die Überlegung zu, dass eine Inaktivierung des *PAX8*-Gens, z.B. durch somatische Mutationen oder Fehlmethylierung von *PAX8*, zu einer Tumorprogression führen könnte. Da mit dem *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen bereits eine wichtige genetische Veränderung unter Einbezug von *PAX8* in follikulären Schilddrüsenkarzinomen beschrieben ist, wurden in dieser Arbeit ausschließlich FTCs untersucht. Auf genetischer Ebene erfolgte der Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens einschließlich der Generierung einer Positivkontrolle zur Etablierung der PCR sowie das Screening auf Punktmutationen im *PAX8*-Gen. Auf epigenetischer Ebene erfolgte die Untersuchung des Methylierungszustandes von *PAX8*.

### 3.1 Untersuchung der Tumorproben follikulärer Schilddrüsenkarzinome

Insgesamt standen 19 Gewebeproben follikulärer Schilddrüsenkarzinome jeweils unterschiedlicher Patienten zur Verfügung. 10 der Tumorproben sind Primärtumoren. Bei 8 der Proben handelt es sich um Rezidive follikulärer Schilddrüsenkarzinome. Eine der Proben ist eine Metastase eines FTCs. Eine Übersicht über Histologie, Tumorstadium und Grading findet sich in Tabelle 3.4. Übersichten zu Verwendung der Tumorproben in den einzelnen Untersuchungsverfahren einschließlich der Ergebnisse finden sich in der Abbildung 3.10.

### 3.1.1 Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens

Zur Etablierung der PCR zum Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens wurde zunächst eine Positivkontrolle aus *PPARG1*-PCR-Produkt und pCS2+*PAX8*-Wildtyp-Vektor generiert. Hierfür wurde *PPARG1* von Exon 1 bis Exon 6 aus cDNA aus Schilddrüsennormalgewebe amplifiziert. Der Rückwärtsprimer im Exon 6 wies zusätzlich eine Schnittstelle des Enzyms Stu auf, so dass mit der Amplifikation passende Schnittstellen für die Ligation geschaffen wurde. Nach Topoklonierung des *PPARG1*-Stu-Amplifikationsproduktes und Plasmidisolierung über den Minipräp erfolgte nach Enzymverdau mit Restriktionsenzymen die Ligation von *PPARG1* mit einem *PAX8*-Wildtyp-cDNA enthaltenden pCS2(plus)-Vektor. Mit Hilfe dieser Positivkontrolle wurden die PCRs zum Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens etabliert. Alle Tumorproben, aus denen eine RNA-Extraktion und dementsprechend eine Gewinnung von cDNA möglich war, wurden auf das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen hin untersucht. Der Nachweis einer erfolgreichen RNA-Extraktion mit anschließender Umschreibung in cDNA erfolgte mittels Amplifikation des Housekeeping-Gens *GAPDH* aus der cDNA. Die RNA-Extraktion und Umschreibung in cDNA gelang in 6 Proben nicht (Probe 2, 4, 8, 9, 10, 19). Da im *PAX8*-Gen unterschiedliche Bruchpunkte beschrieben sind, wurde die Amplifikation mit verschiedenen Primerpaaren durchgeführt, die in Tabelle 3.1 mit den entsprechenden Ergebnissen zusammengestellt sind.

Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	positiv in Probe
<i>PAX8ex5-F</i>	<i>PPARG-R1</i>	Probe 13
<i>PAX8ex7-F</i>	<i>PPARG-R1</i>	Probe 13
<i>PAX8ex2-F</i>	<i>PPARG-R1</i>	Probe 13
<i>PAX8ex5-F</i>	<i>PPARG-R4</i>	Probe 13

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Amplifikationen zum Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens mit den verschiedenen Primerpaaren

Vorwärts Out	Rückwärts Out	Vorwärts in	Rückwärts in	positiv in Probe
<i>PAX8ex5-F</i>	<i>PPARG-R1</i>	<i>PAX8ex7-F</i>	<i>PPARG-R2</i>	Probe 13
<i>PAX8ex5-F</i>	<i>PPARG-R1</i>	<i>PAX8ex8-F</i>	<i>PPARG-R2</i>	Probe 13

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Nested-PCRs zum Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens mit den verschiedenen Primerpaaren

Zwei Primerpaare (*PAX8ex5-F/PPARG-R1* und *PAX8ex7-F/PPARG-R1*) wurden so gewählt, dass die bisher beschriebenen Bruchpunkte des Fusionsgens optimal abgedeckt sind. Die bisher beschriebenen Bruchpunkte für *PAX8* liegen alle im Exon 7 bis 10. Für *PPARG1* ist bisher nur ein einziger Bruchpunkt genau am Beginn des



Exon 1 bekannt (Cheung et al., 2003, Dwight et al., 2003, Kroll et al., 2000, Lacroix et al., 2004, Marques et al., 2002, Nikiforova et al., 2002, 2003b). Trotzdem wurde in einem Primerpaar der Vorwärtsprimer in Exon 2 von *PAX8*, in einem anderen Primerpaar der Rückwärtsprimer in Exon 4 von *PPARG1* gelegt, um mögliche andere Bruchvarianten nicht zu übersehen. Da Marques et al. 2002 (Marques et al., 2002) beschreibt, einige Tumorproben erst in der Nested-PCR detektiert zu haben, wurden in Anlehnung an Marques 2002 zusätzlich zwei Nested-PCR mit einem Out-PCR-Primerpaar und zwei In-PCR-Primerpaaren durchgeführt (siehe Tabelle 3.2). Trotz der unterschiedlichen Primervarianten sowie der beiden Nested-PCRs konnte nur in Tumorprobe 13 das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.1). Der Bruchpunkt des Fusionsgens in Probe 13 liegt im Falle des *PAX8*-Gens genau am Ende des Exons 8. Der Beginn des Exon 1 von *PPARG1* schließt an, wobei der Leserahmen erhalten bleibt. Die Fusion ist dementsprechend im Leserahmen. Der Bruchpunkt ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

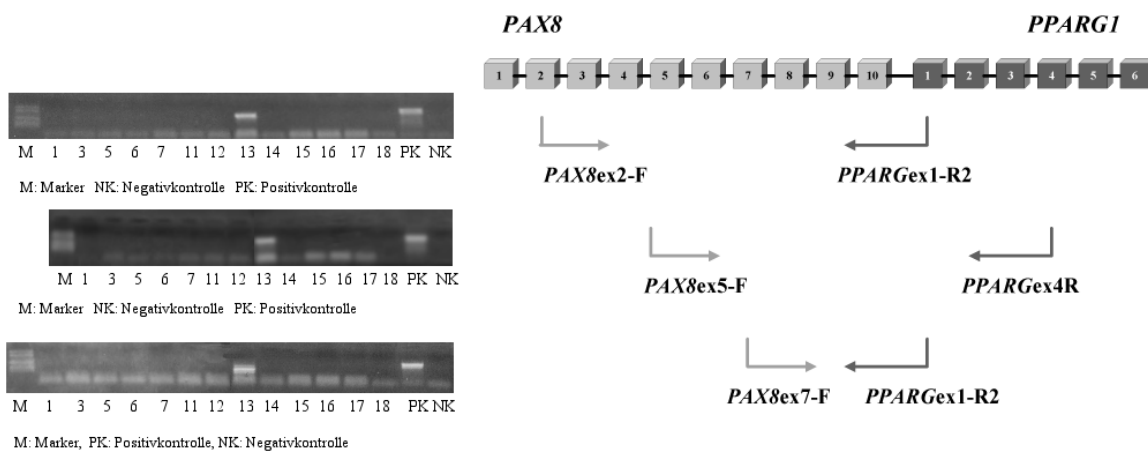
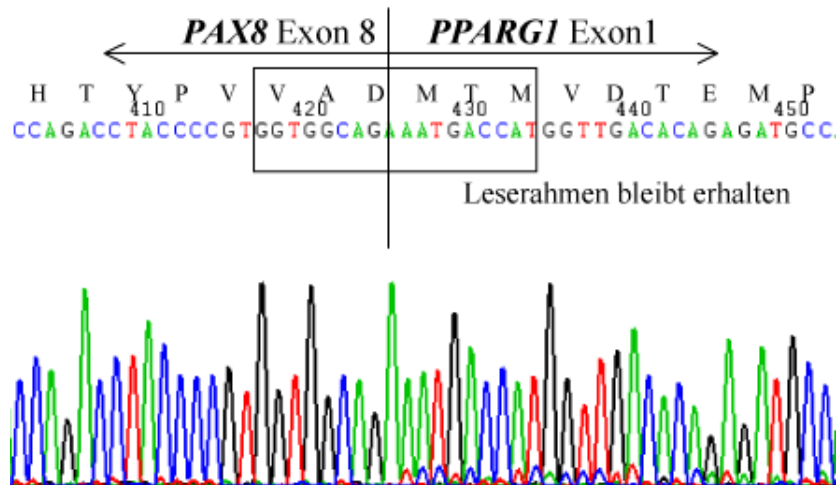


Abbildung 3.1: Ergebnisse der Amplifikation des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens mit verschiedenen Primerpaaren

### 3.1.2 Untersuchung auf Punktmutationen im *PAX8*-Gen in follikulären Schilddrüsenkarzinome

Alle Tumorproben wurden auf Punktmutationen des *PAX8*-Gens hin untersucht. Hierfür erfolgte zunächst die Amplifikation jedes einzelnen Exons von *PAX8* (Exon 2 bis 12) und die anschließende Sequenzierung. In keiner Tumorprobe konnte eine Punktmutation im *PAX8*-Gen nachgewiesen werden.

Abbildung 3.2: Sequenz des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens

### 3.1.3 Methylierung des *PAX8*-Gens

Im *PAX8*-Gen liegen nach der Definition von Gardiner und Frommer (Gardiner-Garden and Frommer, 1987) zwei CpG-Inseln vor, CpG-Insel 1 und 2. Zusätzlich befindet sich am Beginn des *PAX8*-Gens eine Region, in der die CpGs in dichter Folge vorliegen, jedoch von der Anzahl her nicht der Definition von Gardiner und Frommer genügen, die im Folgenden als Region -1 bezeichnet wird. Die Methylierung beider CpG-Inseln des *PAX8*-Gens, sowie die Region -1 wurden erstmals am Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie (IEPE) (Dissertation N. Haufs, IEPE) beschrieben. CpG-Insel 1 liegt im Bereich von Exon 1 und 2 des *PAX8*-Gens, CpG-Insel 2 im Bereich von Exon 8 und 9. In dieser Arbeit wurde der Methylierungszustand der Region -1 sowie der vordere und der hintere Abschnitt der CpG-Insel 1 untersucht, die im Folgenden als Fragment 1-1 bzw. 1-3 bezeichnet werden. Fragment 1-1 liegt hierbei in dem Bereich, wo der Transkriptionsstart in Analogie zum murinen *PAX8*-Gen zu vermuten ist (Okladnova et al., 1997). Eine schematische Darstellung findet sich in der Abbildung 3.3.

Die Untersuchung des Methylierungsmusters erfolgte mit Hilfe der Bisulfitbehandlung nach dem Protokoll von Frommer et al. 1992 (Frommer et al., 1992) mit anschließender Amplifikation und Sequenzierung der entsprechenden Genabschnitte. Die Sequenzierung kann entweder direkt aus dem Amplifikationsprodukt erfolgen oder nach Topoklonierung des Amplifikationsproduktes sowie Kolonie-PCR durchgeführt werden. Die Direktsequenzierung bietet den Vorteil, dass das gesamte Amplifikationsprodukt wiederspiegelt wird. Homozygot methylierte, nicht methylierte oder heterozygote Sequenzen können eindeutig voneinander unterschieden werden. Demgegenüber müssen bei der Topoklonierung relativ viele Klone sequenziert werden,

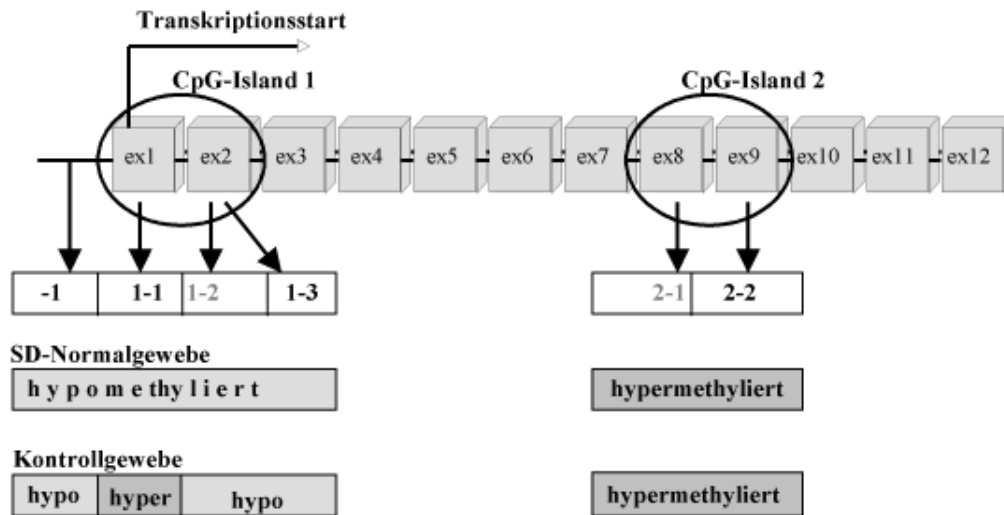


Abbildung 3.3: Lokalisation und Methylierungszustand der CpG-Inseln im *PAX8*-Gen in Schilddrüsennormalgewebe und Kontrollgewebe

um ein repräsentatives Bild über den Methylierungszustand eines DNA-Abschnittes zu erhalten. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit das Verfahren der Direktsequenzierung gewählt.

Die Untersuchung des Methylierungszustandes von *PAX8* in Schilddrüsennormalgewebe, Lymphozyten und Wangenschleimhaut ergab eine Hypomethylierung der Region -1 und der CpG-Insel 1 und eine Hypermethylierung der CpG-Insel 2. In den beiden Kontrollgeweben (Lymphozyten und Wangenschleimhaut) findet sich das gleiche Methylierungsmuster, mit einer einzigen Ausnahme: Im Bereich des Transkriptionsstartes, Fragment 1-1, liegt hier eine Hypermethylierung vor (N. Haufs, IEPE) (siehe Abbildung 3.3).

### 3.1.3.1 Methylierungszustand der Region -1

In der Region -1 zeigten alle untersuchten Tumorgeweben eine deutliche Hypomethylierung. Lediglich in Probe 6 und 17 zeigten sich ein bzw. zwei methylierte CpGs. Der Methylierungszustand entspricht in dieser Region also dem von Schilddrüsennormalgewebe. Eine Beispielsequenz der Region -1 in Tumorgewebe findet sich in der Abbildung 3.7.

In Probe 4, 8, 10 und 16 konnte die Region -1 aus nicht bekannten Gründen nicht amplifiziert werden, so dass dementsprechend für diese Proben keine Ergebnisse zum Methylierungszustand der Region -1 vorliegen. Eine schematische Übersicht zum Methylierungszustand der Tumorgeweben in der Region -1 findet sich in Abbildung 3.4.

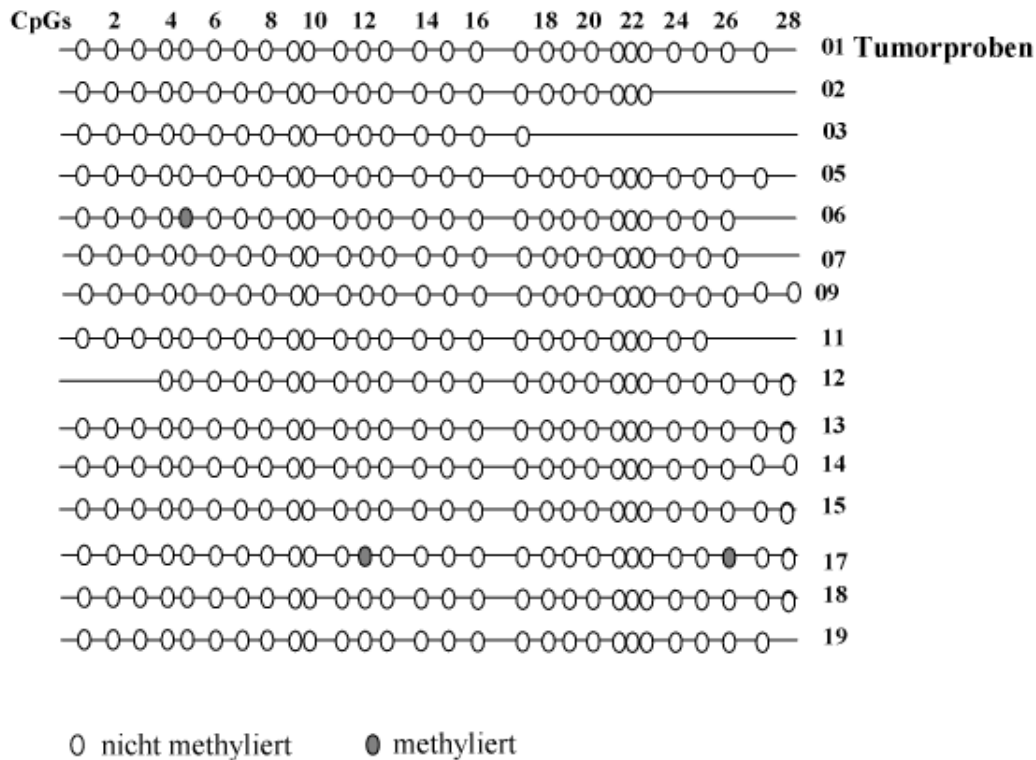


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Methylierungsmusters der Region -1 in Direktsequenzen der Tumorproben

### 3.1.3.2 Methylierungszustand des Fragments 1-1

Von besonderem Interesse war das Fragment 1-1, da sich in diesem Bereich der Transkriptionsstart des *PAX8*-Gens befindet und eine Fehlmethylierung somit die größten Auswirkungen auf die Expression von *PAX8* hätte. Wie in der Übersicht zum Methylierungszustand der einzelnen Fragmente in den Kontrollgeweben (Abbildung 3.3) dargestellt, ist Fragment 1-1 in normalem Schilddrüsengewebe hypomethyliert. In Kontrollgeweben (Lymphozyten und Wangenschleimhaut), in denen *PAX8* nicht exprimiert wird, findet sich eine komplette Methylierung des Fragmentes 1-1 (N. Haufs, IEPE). Beispielsequenzen finden sich in Abbildung 3.8.

Bei 16 der 19 Tumorproben gelang die Untersuchung des Fragments 1-1.

Bei 8 der 16 Tumorproben fand sich eine Hypermethylierung im Bereich des Transkriptionsstartes (siehe Abbildung 3.5). Das Methylierungsmuster in diesen Proben ähnelt somit dem Methylierungsmuster von Geweben, in denen *PAX8* nicht exprimiert wird.

Zwei der acht hypermethylierten Tumorproben zeigten eine homozygote Hypermethylierung (Probe 9 und 19). Probe 8 zeigte sowohl homozygot hypermethylierte

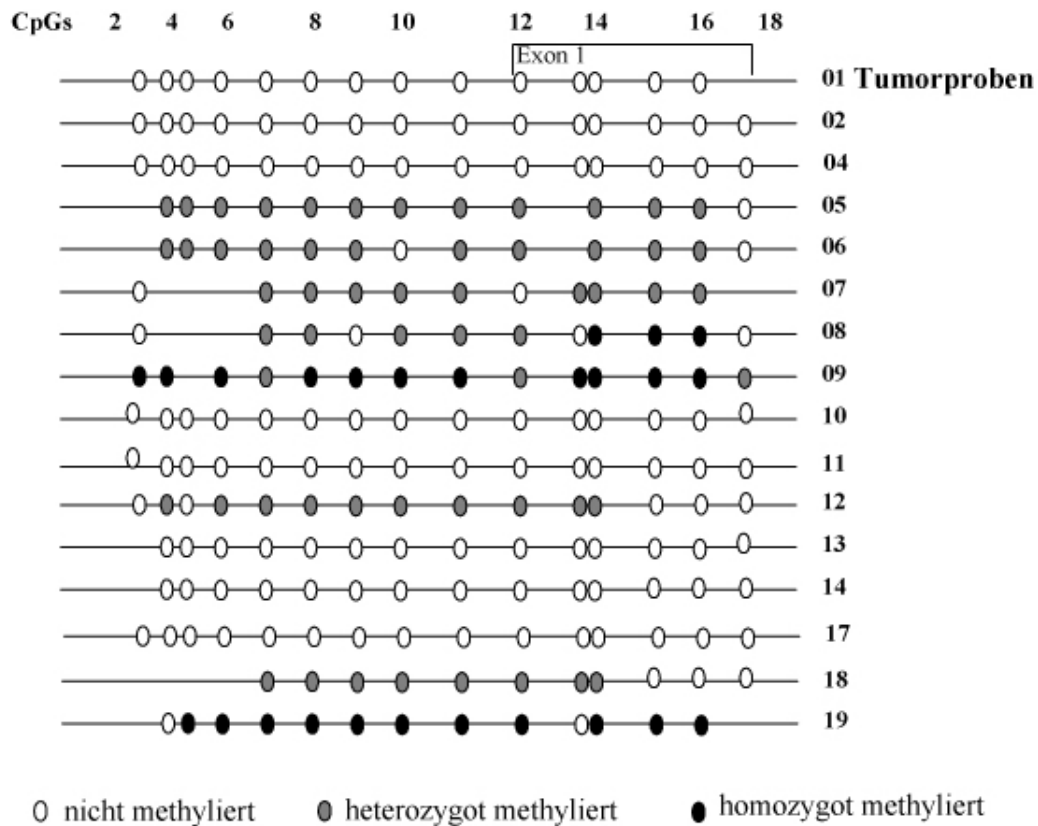


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Methylierungsmusters des Fragments 1-1 in Direktsequenzen der Tumorproben

CpGs als auch heterozygot hypermethylierte CpGs. Die restlichen fünf hypermethylierten Tumorproben sind heterozygot methyliert. Beispielsequenzen finden sich in Abbildung 3.9. Sowohl in den homozygot als auch in den heterozygot hypermethylierten Tumorproben fanden sich vereinzelt nicht methylierte CpGs. Vereinzelt unmethylierte CpGs fanden sich, wie in der schematischen Übersicht dargestellt, bei 7 der 8 hypermethylierten Tumorproben. Ein bestimmtes Muster der nicht methylierten CpGs ließ sich hier jedoch nicht erkennen. Probe 9 wies eine Methylierung aller in der Sequenzierung verwertbarer CpGs auf.

Probe 13, in der das *PAX8-PPARG1*-Fusions gefunden werden konnte, war im Fragment 1-1 komplett unmethyliert.

### 3.1.3.3 Methylierungszustand des Fragments 1-3

In der Region 1-3 fand sich ebenfalls eine deutliche Hypomethylierung aller untersuchten Tumorproben und somit ein Methylierungsmuster, das dem Muster von Schilddrüsennormalgewebe entspricht. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen, fanden sich lediglich in Tumorprobe 3, 12 und 18 vereinzelte methylierte CpGs. Für 17 der ins-

gesamt 19 untersuchten Tumorproben gelang die Amplifikation des Fragmentes 1-3. Kein Ergebnis konnte in den Proben 13 und 17 erzielt werden. Eine Beispielsequenz für das Fragment 1-3 in den Tumorproben findet sich in Abbildung 3.7.

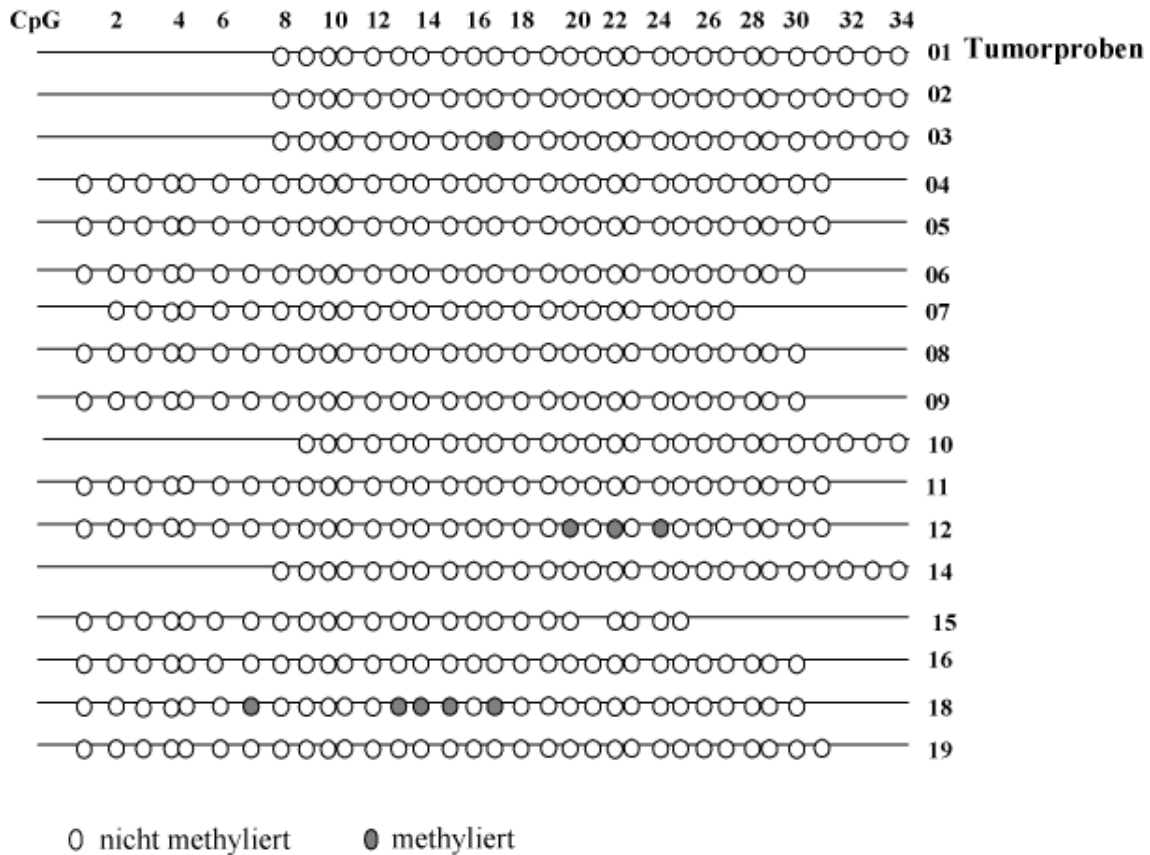
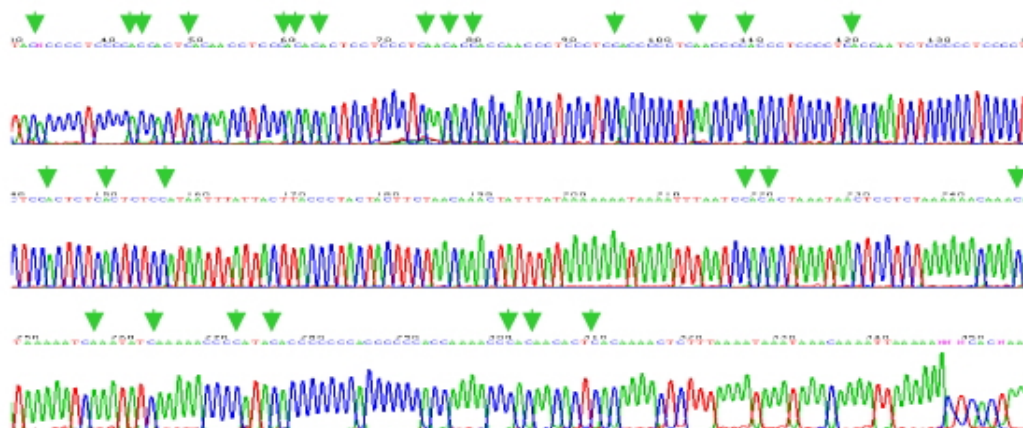
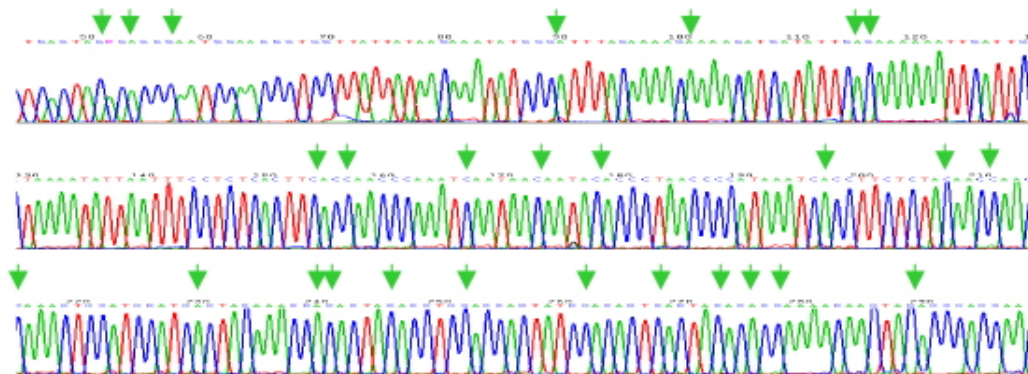


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Methylierungsmusters des Fragments 1-3 in Direktsequenzen der Tumorproben



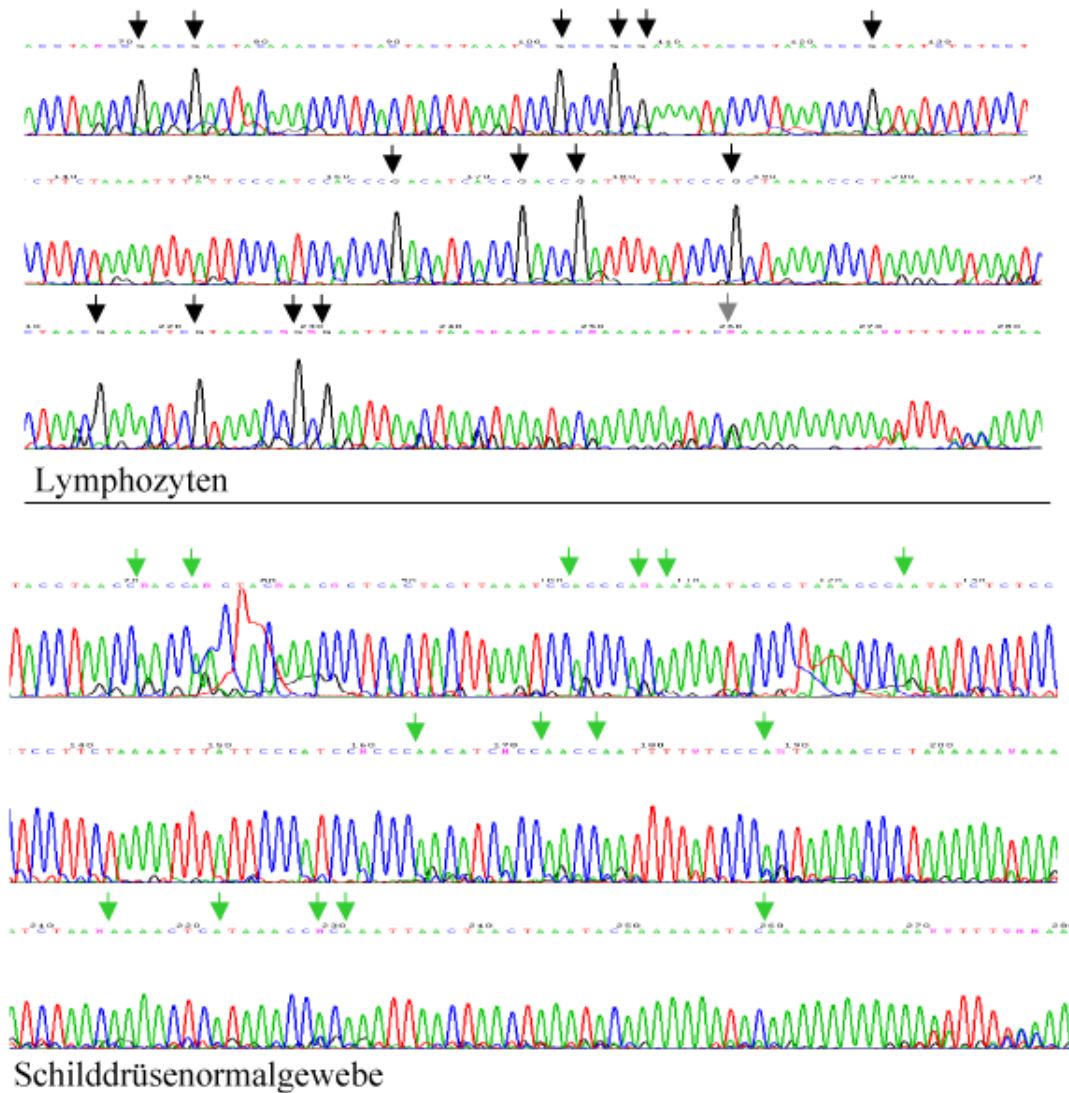
Region -1, Tumorgewebe Probe 1, homozygot hypomethyliert



Fragment 1-3, Tumorgewebe Probe 12, homozygot hypomethyliert

Die Pfeile markieren die CpGs; grün = homozygot hypomethyliert.

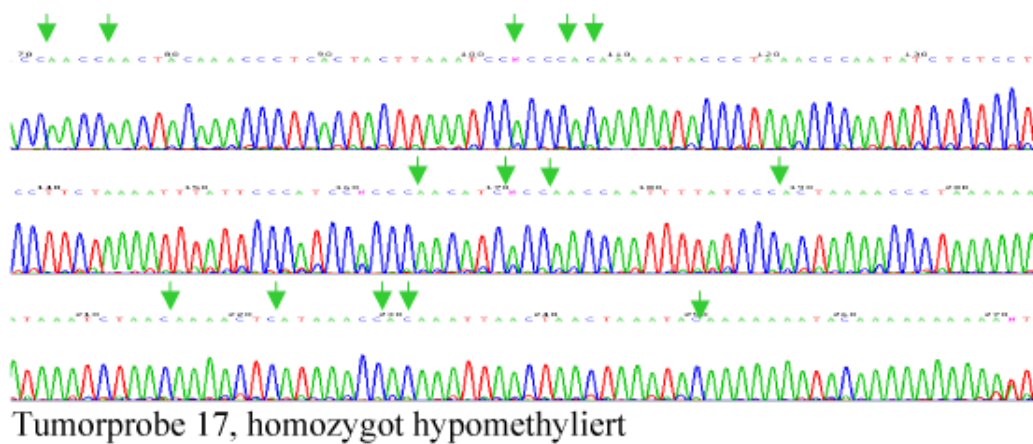
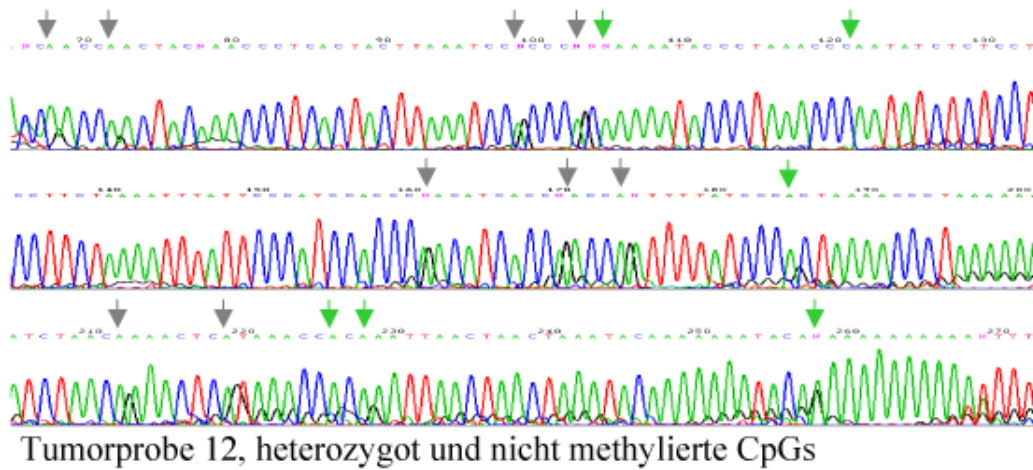
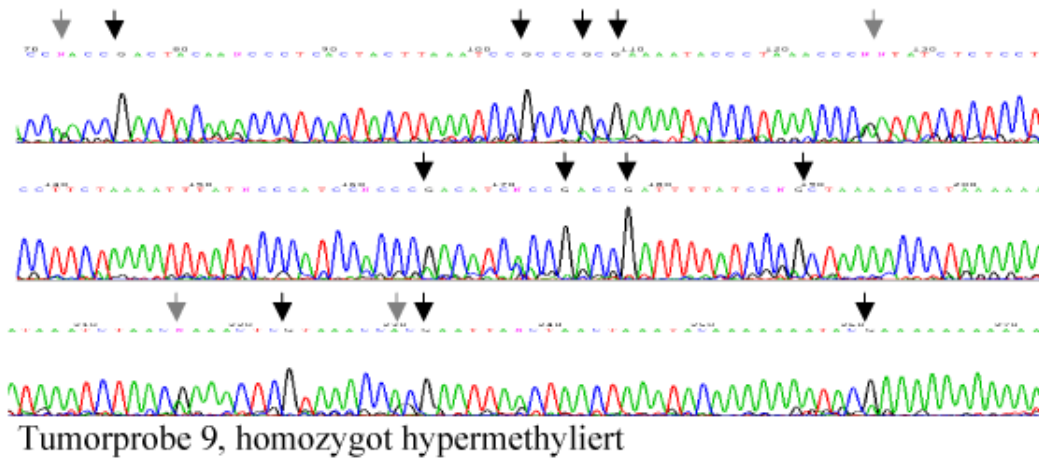
Abbildung 3.7: Direktsequenzen der Region -1 sowie des Fragments 1-3 in den Tumormproben



Die Pfeile markieren die CpGs; schwarz = homozygot methyliert,  
 grau= heterozygot methyliert, grün = homozygot hypomethyliert.

Abbildung 3.8: Direktsequenzen des Fragments 1-1 in Lymphozyten und Schilddrüsennormalgewebe





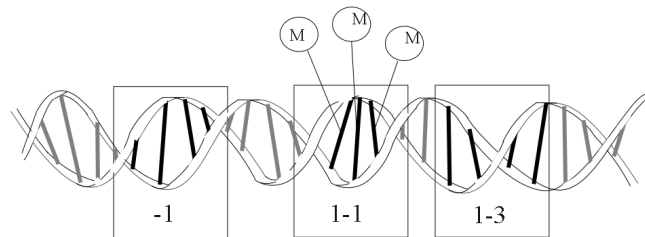
Die Pfeile markieren die CpGs; schwarz = homozygot methyliert, grau = heterozygot methyliert, grün = homozygot unmethyliert

Abbildung 3.9: Direktsequenzen des Fragments 1-1 verschiedener Proben folliculärer Schilddrüsenkarzinome

Probe	Histologie	Grading	Tumorstadium
1	Rezidiv, gering bis mäßig differenziertes FTC mit Gefäßeinbruch	3	pT3pN1bcM0
2	Primärtumor, grob-invasives, gut differenziertes FTC	1	pT4NxM1
3	Primärtumor, FTC mit Kapselinvasion, Neigung zur Anaplasie herdförmige, fokale onkozytäre Areale, oxiphil	3	T3NxM1
4	Primärtumor, minimal invasives FTC	2	pT3NxMx
5	Rezidiv, Infiltrate eines FTCs vom oxyphilen Typ	fehlt	pT3NxMx
6	Primärtumor, Infiltrationen eines FTC	3	pT4pNoMx
7	grob invasives FTC	fehlt	pT4pN0pMx
8	Primärtumor, lymphonodal metastasierendes FTC, kapselüberschreitende Infiltrate eines mäßig differenzierten FTCs	2	pT4pN1M0
9	Metastase eines gut differenzierten follikulären SD Karzinoms im kleinen Becken	2	pT3apN0pM1
10	Weichgewebsinfiltrate eines soliden, mäßig differenzierten Karzinoms; Vereinbar mit FTC-Rezidiv	fehlt	pT2No
11	Rezidiv eines FTC	fehlt	pT4N1bMo
12	Tumordinfiltrate eines onkozytären Karzinoms, vereinbar mit Rezidiv des bekannten oxyphilen follikulären SD-Karzinoms)	fehlt	pT2N1Mx
13	Primärtumor, schlecht differenzierten Schilddrüsenkarzinoms mit teils follikulären, teils insulären Baumuster	fehlt	pT4NxMx
14	Rezidiv, Infiltration eines FTCs mit Übergang in ein insuläres Karzinom	3	TxN1M1
15	Primärtumor, partiell gekapseltes, überwiegend diffus infiltrierendes, kleinherdiges, überwiegend schlecht differenziertes FTC (insulärer Typ)	3	pT4pN1Mx
16	Rezidiv, Infiltration eines mäßig bis schlecht differenzierten FTCs	fehlt	pT3
17	Primärtumor, FTC, grob-invasives, überwiegend follikulär strukturiertes, teilweise insuläres, insgesamt schlecht differenziertes Schilddrüsenkarzinom	3	pT3pN1
18	Primärtumor FTC	fehlt	pT4N0pM1
19	Rezidiv, Weichgewebsinfiltrate eines FTCs	fehlt	pT2N1M1

Tabelle 3.4: Histologie, Tumorstadium und Grading der Tumorproben

Tumorproben	genomische Sequenzierung erfolgt	RNA-Extraktion erfolgreich	Amplifikation von GAPDH aus cDNA	PAX8-PPARG1	
				Nachweis des Fusionsgens	
01	ja	ja	ja	negativ	
02	ja	nein			
03	ja	ja	ja	negativ	
04	ja	nein			
05	ja	ja	ja	negativ	
06	ja	ja	ja	negativ	
07	ja	ja	ja	negativ	
08	ja	nein			
09	ja	nein			
10	ja	nein			
11	ja	ja	ja	negativ	
12	ja	ja	ja	negativ	
13	ja	ja	ja	positiv	
14	ja	ja	ja	negativ	
15	ja	ja	ja	negativ	
16	ja	ja	ja	negativ	
17	ja	ja	ja	negativ	
18	ja	ja	ja	negativ	
19	ja	nein			



Tumorproben	Region -1	Fragment 1-1	Fragment 1-3
01	hypo	hypo	hypo
02	hypo	hypo	hypo
03	hypo	kein Erg	hypo
04	kein Erg	hypo	hypo
05	hypo	hetero hyper	hypo
06	hypo	hetero hyper	hypo
07	hypo	hetero hyper	hypo
08	kein Erg	hetero und homo hyper	hypo
09	hypo	homo hyper	hypo
10	kein Erg	hypo	hypo
11	hypo	hypo	hypo
12	hypo	hetero hyper	hypo
13	hypo	hypo	kein Erg
14	hypo	hypo	hypo
15	hypo	kein Erg	hypo
16	kein Erg	kein Erg	hypo
17	hypo	hypo	kein Erg
18	hypo	hetero hyper	hypo
19	hypo	homo hyper	hypo

hypo = hypomethyliert  
hetero hyper = heterozygot hypermethyliert  
homo hyper = homozygot hypermethyliert  
kein Erg = kein Ergebnis

Abbildung 3.10: Schematische Darstellung aller Untersuchungsergebnisse

# Kapitel 4

## Diskussion

*PAX8* spielt in der Entwicklung und Differenzierung der Schilddrüse eine bedeutende Rolle. In Schilddrüsenkarzinomen konnte eine verminderte *PAX8*-Expression beobachtet werden, die im Zusammenhang mit dem Entdifferenzierungsgrad der Schilddrüsenkarzinome zu stehen scheint. Möglicherweise könnte eine Inaktivierung von *PAX8* z.B. durch somatische Mutationen oder durch Hypermethylierung tumorprogressiv wirken. Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob in Proben follikulärer Schilddrüsenkarzinome Veränderungen auf genetischer oder epigenetischer Ebene vorliegen, die eine Inaktivierung des *PAX8*-Gens zur Folge haben könnten. Die Entscheidung follikuläre Schilddrüsenkarzinome zu untersuchen, begründete sich auf der Tatsache, dass mit dem *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen bereits eine wichtige genetische Veränderung unter Einschluss von *PAX8* in FTCs beschrieben ist.

### 4.1 Das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen

Eine Veränderung des *PAX8*-Gens auf chromosomaler Ebene wurde von Kroll et al. 2000 durch die Identifizierung des aus der Translokation  $t(2;3)(q13;p25)$  resultierenden *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens erstmalig beschrieben. Chromosomale Aberrationen und Translokationen in Gewebe von Schilddrüsenneoplasien einschließlich der Translokation  $t(2;3)(q13;p25)$  sind schon Jahre vor der Identifikation eines entsprechenden Fusionsgens publiziert worden (Bondeson et al., 1989, Jenkins et al., 1990, Roque et al., 1993, Sozzi et al., 1992, Teyssier et al., 1990). Kroll et al. 2000 konnte das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen ausschließlich in follikulären Schilddrüsenkarzinomen (5 von 8) nachweisen. Nachfolgende Arbeiten bestätigten diese Ergebnisse (Cheung et al., 2003, Dwight et al., 2003, Kroll et al., 2000, Lacroix et al., 2004, 2005, Marques et al., 2002, Nikiforova et al., 2002, 2003b), wobei einige Autoren auch in follikulären Adenomen die Fusion von *PAX8* mit *PPARG1* detektieren konnten

(Cheung et al., 2003, Marques et al., 2004). In papillären oder anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen konnte das Fusionsgen hingegen in keiner Arbeit nachgewiesen werden.

Der Nachweis des Fusionsgens erfolgte in der vorliegenden Arbeit durch Amplifikation mit verschiedenen fusionsgenspezifischen Primern aus cDNA. Alle Tumorproben, aus denen die RNA-Extraktion einschließlich der Umschreibung in cDNA gelang, wurden auf das Vorliegen eines *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens untersucht.

Die Extraktion von RNA und Umschreibung in cDNA gelang in nur 13 von 19 Tumorproben. Möglicherweise erklärt sich dies durch die Empfindlichkeit von RNA. Vor der Entnahme des Gewebestücks zur RNA-Extraktion waren die Tumorproben Temperaturschwankungen ausgesetzt, was möglicherweise Ursache für einen Verlust der RNA gewesen sein könnte.

Das Fusionsgen konnte mit sämtlichen PCRs nur in Tumorprobe 13 nachgewiesen werden. Es zeigt einen bereits bekannten Bruchpunkt am Ende des Exons 8 des *PAX8* Gens (Kroll et al., 2000, Marques et al., 2002). Wie alle bisher beschriebenen *PAX8-PPARG1*-Fusionsgene schließt daran das Exon 1 von *PPARG1* an. Der Leserahmen bleibt, wie in allen bisherigen Veröffentlichungen auch, erhalten.

Drei der für den Nachweis des Fusionsgens verwendeten Primerpaare wurden in Anlehnung an Marques et al. 2002 gewählt, zusätzlich wurden Amplifikationen mit Primern durchgeführt, die im Exon 2 von *PAX8* bzw. im Exon 4 von *PPARG1* binden, um mögliche andere Bruchvarianten des Fusionsgens nicht zu übersehen. Desweiteren wurden zwei verschiedene Nested-PCRs durchgeführt. Alle PCR-Bedingungen wurden mit Hilfe einer eigens generierten *PAX8-PPARG1*-Positivkontrolle etabliert. Die Funktionstüchtigkeit der cDNA wurde mittels Amplifikation des Housekeeping-Gens *GAPDH* überprüft. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Methode zum Nachweis des Fusionsgens ausreichend valide gewesen ist. Zum Teil wurden in den bereits genannten Arbeiten neben der PCR, die auch in dieser Arbeit zum Nachweis des Fusionsgens verwendet wurde, noch weitere Methoden zum Nachweis des Fusionsgens genutzt, wie FISH oder Western Blot. Der Großteil der Fusionsgene wurde jedoch in allen Arbeiten mit der PCR nachgewiesen.

Die Angaben zur Häufigkeit des Fusionsgens in den bereits zitierten Arbeiten unterliegen einer großen Spannweite. Kroll et al. 2000 konnte in 5 von 8 (63%) FTCs das Fusionsgen nachweisen, Lacroix et al. 2004 hingegen fand das Fusionsgen nur in 4 von 21 (19%) FTCs. Hibi et al. 2004 wiederum konnte in 6 FTCs einer japanischen Population gar kein *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen nachweisen. Addiert man sämtliche Proben follikulärer Schilddrüsenkarzinome, die in den zitierten Arbeiten untersucht wurden, und alle *PAX8-PPARG1*-Fusionsgene, die gefunden wurden, so finden sich 35 Fusionsgene auf eine Anzahl von 119 Proben follikulärer Schilddrüsenkarzino-

me (ca. 30%). In den bisherigen Publikationen wurden, wie in dieser Arbeit auch, stets relativ geringe Anzahlen von Tumorproben untersucht. Möglicherweise erklären sich hierdurch die unterschiedlichen Ergebnisse zur Häufigkeit des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens in FTCs.

Die Auswirkung des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens ist in ihrer Gesamtheit bisher nicht geklärt. Es liegen jedoch sowohl Daten zu der Wirkung des Fusionsgens auf Schilddrüsenzellen, als auch zu der Auswirkung der Fusion auf die Wildtypaktivität der beiden an dem Fusionsgen beteiligten Gene vor. Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass die Fusion "inframe" ist, der Leserahmen also auch für das mit *PAX8* fusionierte *PPARG1* erhalten bleibt (Kroll et al., 2000). Powell et al. 2004 konnte den wachstumsfördernden Einfluss des Fusionsgens auf immortalisierte Schilddrüsenzellen nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass das Fusionsgen sowohl einen Einfluss auf den Zellzyklus nimmt, als auch die Apoptoserate transfizierter Zellen stark vermindert. Des weiteren kommt es durch das Fusionsgen zu einem Verlust der Kontakthemmung durch benachbarte Zellen. Diese Mechanismen können alle der malignen Transformation zugeordnet werden (Hanahan and Weinberg, 2000, Knudson, 2001). Zusätzlich konnte Powell et al. 2004 zeigen, dass *PAX8-PPARG1*-positive Tumoren eine stark reduzierte Expression eines Tumorsuppressorgens, dem *NORE1A*, aufweisen. Das Fusionsgen hat somit Eigenschaften eines Onkogens.

Des weiteren liegen Erkenntnisse zu der Auswirkung des Fusionsgens auf die Aktivität der Wildtypen der beiden beteiligten Gene vor. Die Ergebnisse der Auswirkung des Fusionsgens auf die Wildtypaktivität des *PPARG1* sind widersprüchlich. In Abhängigkeit von dem mit *PAX8-PPARG1* transfizierten Zelltyp wirkt sich das Fusionsgen supprimierend oder stimulierend auf die Wildtyp-*PPARG1*-Aktivität aus (Au et al., 2005, Kroll et al., 2000). In seiner Wildtypfunktion reduziert *PPARG1* die Wachstumsrate verschiedener maligner Zelllinien und induziert in einigen Fällen sogar eine erneute Differenzierung oder die Apoptose entarteter Zellen (Brockman et al., 1998, Elstner et al., 1998, Kubota et al., 1998, Mueller et al., 1998, Sarraf et al., 1998, Tontonoz et al., 1997).

Eine interessante Frage ist nun, inwieweit die Beteiligung von *PAX8* am Fusionsgen ausschlaggebend für die Entwicklung von follikulären Schilddrüsenadenomen und -karzinomen ist. Au et al. 2005 untersuchte mit Hilfe von Reportergenkonstrukten, die jeweils für die Gene *TPO*, *NIS* und *TG* die Bindungsstellen für *PAX8* aufwiesen, die Auswirkung des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens auf die Expression der von *PAX8* abhängigen Gene *TPO*, *NIS* und *TG*. Hierbei konnte gezeigt werden, dass das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen die Expression von *NIS* und *TPO* stimuliert. Die Expression von *TG* wird jedoch unter Anwesenheit des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens unterdrückt und auch bei Anwesenheit von sowohl *TITF1*, das ebenfalls Transkrip-

tionsfaktor für *TG* ist, als auch Wildtyp-*PAX8* konnte keine Expression von *TG* erzielt werden (Au et al., 2005). Unklar ist bisher, welche Auswirkung der Expressionsverlust des Thyreoglobulins in *PAX8-PPARG1*-positiven Tumoren hat.

## 4.2 Suche nach somatischen *PAX8*-Mutationen in follikulären Schilddrüsenkarzinomen

Inaktivierungen eines Gens mit der Folge der Tumorprogression können auf genetischer Ebene z.B. durch somatische Mutationen ausgelöst werden. Insbesondere für Tumorsuppressorgene ist dies ein häufig beschriebener Mechanismus (Lin et al., 2004, Halachmi et al., 1998, Dahia et al., 1997). In den 19 untersuchten Gewebeproben der follikulären Schilddrüsenkarzinome konnte jedoch im Bereich von Exon 2 bis 12 des *PAX8*-Gens keine *PAX8*-Mutation gefunden werden. Somatische Mutationen als häufige Ursache einer Tumorprogression sind somit unwahrscheinlich.

Bei zwei verschiedenen Keimbahnmutationen des *PAX8*-Gens, die im Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Charité Berlin (IEPE) gefunden wurden, konnte jedoch neben der congenitalen Hypothyreose zusätzlich die Entwicklung einer Schilddrüsenneoplasie beobachtet werden. Die Mutation R108Stop im Exon 4 von *PAX8* trat in einer Familie beim Vater und bei seinem Sohn auf. Die Schilddrüse des Sohnes ist hypoplastisch, beim Vater ist nur ein Schilddrüsenlappen angelegt, in dem ein Knoten entdeckt wurde. Eine Histologie hierzu liegt nicht vor (noch unveröffentlichte Daten). Bei einer weiteren *PAX8*-Mutation, die Mutation L224F im Exon 7 von *PAX8*, entwickelte einer der Mutationsträger ein follikuläres Schilddrüsenadenom. Seine beiden Töchter sind ebenfalls von der Mutation betroffen. Die Schilddrüsen der beiden Mädchen sind hypoplastisch (noch unveröffentlichte Daten). Die Schilddrüsenneoplasie wurde bei beiden Mutationsträgern erst im Erwachsenenalter festgestellt. Die Kinder beider Familien zeigten keine Schilddrüsenneoplasien. Es wäre möglich, dass aufgrund eines *PAX8*-Funktionsverlustes sich erst im Laufe der Jahre eine Schilddrüsenneoplasie, insbesondere ein Schilddrüsenadenom, entwickelt, so dass es sinnvoll erscheint, die Schilddrüse aller *PAX8*-Mutationsträger in regelmäßigen Abständen sonographisch zu untersuchen.

### 4.3 Methylierungsmuster des *PAX8*-Gens in Proben follikulärer Schilddrüsenkarzinome

Neben genetischen Veränderungen spielen epigenetische Veränderungen wie z.B. die DNA-Methylierung eine wichtige Rolle bezüglich der Funktion eines Gens. Die DNA-Methylierung ist ein System, über das die Genexpression sehr fein reguliert werden kann. Wie bereits in der Einleitung erläutert, interessieren in Bezug auf den Methylierungszustand eines Gens insbesondere die CpG-Inseln, also die Genabschnitte, wo CpGs in dichter Folge zu finden sind. Das *PAX8*-Gen weist zwei CpG-Inseln auf. Zusätzlich findet sich eine weitere Region, in der CpGs in dichter Folge zu finden sind, Region -1, die jedoch bezüglich Anzahl und Dichte der CpGs nicht die Definition von Gardiner-Garden und Frommer (Gardiner-Garden and Frommer, 1987) erfüllt. Region -1 befindet sich vor Exon 1. Die Untersuchung des Methylierungszustandes dieser drei Regionen in Schilddrüsennormalgewebe und zwei Kontrollgeweben (Lymphozyten und Wangenschleimhaut) wurde von N. Haufs (IEPE) durchgeführt. Fragment 1-1 weist im Vergleich zu allen anderen Fragmenten der CpG-Inseln des *PAX8*-Gens eine Besonderheit auf. Ausschließlich hier findet sich in Schilddrüsennormalgewebe ein anderes Methylierungsmuster als in den Kontrollgeweben Lymphozyten und Wangenschleimhaut. So ist Fragment 1-1 in normalem Schilddrüsenengewebe hypomethyliert, während die Kontrollgewebe hypermethyliert sind. Alle anderen Fragmente beider CpG-Inseln, sowie die Region -1 zeigen in normalen Schilddrüsenengewebe, Lymphozyten und Wangenschleimhaut das gleiche Methylierungsmuster (Dissertation N. Haufs, IEPE).

In Bezug auf den Methylierungszustand eines Gens ist die CpG-Insel, die in der Nähe des Promotors liegt von besonderem Interesse. Die Charakterisierung des Promotorbereichs des *PAX8*-Gens erfolgte bisher nur für das murine *PAX8*-Gen (Okladnova et al., 1997). Das *PAX8*-Gen ist jedoch hoch konserviert und es finden sich viele Homologien zwischen dem murinen und dem humanen *PAX8*-Gen (Kozmik et al., 1993). Bei der Maus befindet sich der Transkriptionsstart 488 Nukleotide vor dem Start-ATG (Okladnova et al., 1997). Analog dazu würde sich der Promotorbereich beim humanen *PAX8*-Gen im Bereich des ersten Exons befinden.

In dieser Arbeit wurde die Region -1 sowie Fragment 1-1 und 1-3 der CpG-Insel 1 untersucht. Fragment 1-1 liegt im Bereich des vermuteten Promotors von *PAX8*. Region -1 ist weiter 5' lokalisiert und könnte unter Umständen im Sinne eines Enhancers einen Einfluss auf die *PAX8*-Expression nehmen.

Region -1 und Fragment 1-3 zeigten keine Auffälligkeiten in der Methylierung. Im Fragment 1-1, das im Bereich des vermuteten Promotors von *PAX8* liegt, fand sich jedoch bei 8 von 16 untersuchten Tumorproben eine Hypermethylierung und somit



ein Verlust der schilddrüsenspezifischen Hypomethylierung. Die entsprechenden Tumorproben zeigen somit ein Methylierungsmuster, das dem von Geweben entspricht, die kein *PAX8* exprimieren. Bei 4 der 8 hypermethylierten Tumorproben zeigte sich in den Direktsequenzen eine homozygote Hypermethylierung, bei den übrigen 4 Tumorproben eine heterozygote Hypermethylierung.

Es konnte mehrfach gezeigt werden, dass eine Methylierung im Promotorbereich zur Inaktivierung des entsprechenden Gens führt (Rose et al., 2000, Wang et al., 2003, Xing et al., 2003b). Eine komplette Inaktivierung von *PAX8* ist in FTCs jedoch nicht anzunehmen, da für FTCs lediglich eine herabregulierte *PAX8*-Expression beschrieben ist. Ein vollständiger Expressionsverlust von *PAX8* hingegen findet sich in anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen (Fabbro et al., 1994, Ros et al., 1999, Lacroix et al., 2004). In den Gewebeproben der FTCs, die in den Direktsequenzen homozygot methyliert erscheinen, liegt unter Umständen auf Zellebene ein gewisser Anteil von nichtmethyliertem *PAX8* vor, so dass eine Restexpression von *PAX8* erhalten bleiben könnte. Für ein solches Mosaik auf Zellebene würde ebenfalls sprechen, dass in den bisherigen Untersuchungen zur *PAX8*-Expression in Schilddrüsenkarzinomen eine sehr unterschiedlich stark ausgeprägte Verminderung der *PAX8*-Expression in der Gruppe der untersuchten FTCs und PTCs beschrieben wird (Fabbro et al., 1994, Lacroix et al., 2004).

Es ist vorstellbar, dass nicht nur ein kompletter *PAX8*-Expressionsverlust, sondern auch eine eingeschränkte *PAX8*-Expression in der Schilddrüse weitreichende Folgen haben könnte, da dies möglicherweise eine veränderte Expression der von *PAX8* abhängigen Gene nach sich ziehen könnte. Der oben beschriebene Patient mit der *PAX8*-Mutation und dem Schilddrüsenadenom ist heterozygot für die Mutation. Ebenfalls betrifft die Fusion von *PAX8* mit *PPARG1* jeweils nur ein Allel von *PAX8*, wobei in diesem Falle zumindest für die Expression des von *PAX8* abhängigen Thyreoglobulins ein dominant negativer Effekt des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens gezeigt werden konnte (Au et al., 2005).

Weitere Arbeiten müssen nun zeigen, ob die Hypermethylierung des Promotorbereichs des *PAX8*-Gens zu einer quantitativen Veränderung der *PAX8*-Expression führt und inwiefern sich ein Unterschied bezüglich der *PAX8*-Expression in Tumorproben, die sich in den Direktsequenzen homozygot bzw. heterozygot hypermethyliert darstellen, finden lässt. Dies ließe sich z.B. mittels einer quantitativen Realtime-PCR untersuchen, was in dieser Arbeit aufgrund des eingeschränkten Tumorprobenmaterials nicht möglich war. Ebenso muss in weiteren Arbeiten die *PAX8*-Methylierung in follikulären Adenomen, PTCs und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen untersucht werden.

Es lässt sich zusammenfassen, dass mit der Fehlmethylierung des Promotorbereichs

von *PAX8* in den Gewebeproben der FTCs eine mögliche Ursache für die in der Literatur beschriebene Verminderung der *PAX8*-Expression gefunden werden konnte. Neben der herabgesetzten *PAX8*-Expression in Schilddrüsentumoren ist eine Veränderung der *PAX8*-Funktion auch im Zusammenhang mit dem *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen in follikulären Schilddrüsenadenomen und -karzinomen beschrieben. In Bezug auf *TG*, dessen Expression unter Einfluss von *PAX8* steht, führt das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen zu ähnlichen Veränderungen, wie sie in FTCs unabhängig vom Vorliegen eines *PAX-PPARG1*-Fusionsgens gefunden werden. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass unabhängig von der Ursache eine Veränderung der Aktivität von *PAX8* kanzerogen wirkt. *PAX8* übernimmt eine wichtige Funktion in der Differenzierung der Schilddrüsenzellen und reguliert als Transkriptionsfaktor Gene, die Bedeutung für die Entwicklung und die Funktion der Schilddrüse haben. Möglicherweise führt ein Funktionsverlust von *PAX8* zu einem Missverhältnis in der Regulation weiterer Gene, was wiederum eine veränderte Signaltransduktion und ein verändertes Wachstumsverhalten von Zellen nach sich ziehen könnte.

## 4.4 Ausblick

Für die Zukunft interessant wäre die Untersuchung des Methylierungsmusters von *PAX8* in follikulären Schilddrüsenadenomen, papillären Schilddrüsenkarzinomen und in undifferenzierten anaplastischen Karzinomen. Möglicherweise ist insbesondere der Vergleich zwischen den anaplastischen und den differenzierten follikulären und papillären Schilddrüsenkarzinomen aufschlussreich, da nach den Daten von Ros et al. 1999 und Fabbro et al. 1994 die *PAX8*-Expression in anaplastischen Karzinomen nicht nur vermindert sondern vollkommen aufgehoben ist. Da die bisher gefundenen genetischen und epigenetischen Veränderungen sich in FTCs und PTCs häufig stark unterscheiden, wäre es jedoch ebenfalls sinnvoll, das *PAX8*-Methylierungsmuster in papillären Schilddrüsenkarzinomen zu untersuchen. Vor allen Dingen wäre interessant, inwiefern sich das *PAX8*-Expressionslevel in den Proben, die sich in den Direktsequenzen als homozygot methyliert darstellen von den heterozygot methylierten Tumorproben unterscheidet. Hierfür müsste eine quantitative Realtime-PCR durchgeführt und eine anschließende Gegenüberstellung des *PAX8*-Expressionsverlustes mit dem Methylierungsgrad des Fragments 1-1 erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit war dies aufgrund des eingeschränkten Tumorprobenmaterials nicht möglich.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Schilddrüsenkarzinome sind seltene Tumoren, die etwa 1% aller Malignome ausmachen (Gimm, 2001). Follikuläre Schilddrüsenkarzinome (FTC) gehören wie die papillären Schilddrüsenkarzinome (PTC) zu den differenzierten epithelialen Schilddrüsenkarzinomen. Für FTCs spielt das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen, das von Kroll et al. 2000 erstmalig beschrieben wurde, eine wichtige Rolle. Sowohl die Wildtypfunktion von *PPARG1* als auch die Wildtypfunktion von *PAX8* wird durch das Fusionsgen beeinträchtigt (Kroll et al., 2000, Au et al., 2005). Ein Verlust der *PAX8*-Expression wiederum scheint bedeutungsvoll für die Entwicklung von Schilddrüsenkarzinomen zu sein. In verschiedenen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass die Expression von *PAX8* in FTCs und PTCs herabreguliert ist und in den undifferenzierten anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen sogar ganz verloren geht (Fabbro et al., 1994, Lacroix et al., 2004, Ros et al., 1999).

Die Entwicklung der Schilddrüse beginnt beim Menschen in der dritten Gestationswoche (Fisher and Polk, 1989). Für die Differenzierung der Schilddrüsenzellen ist die für die Schilddrüse spezifische Kombination der Transkriptionsfaktoren *PAX8* (Plachov et al., 1990), *TITF1* (*NKX2.1*) (Lazzaro et al., 1991), *FOXE1* (*TTF2*) (Zannini et al., 1997) und *HHEX* (Thomas et al., 1998) ausschlaggebend (Damante et al., 2001). Ein Knockout von *PAX8*, *TITF-1* oder *FOXE1* bei Mäusen führt zu einer gestörten Schilddrüsenentwicklung (Mansouri et al., 1998, Kimura et al., 1999, De Felice et al., 1998).

Die Familie der *PAX*-Gene umfasst neun verschiedene Gene, die alle durch die Paired-Domäne, eine hoch konservierte DNA-bindende Region, charakterisiert sind und für Transkriptionsfaktoren codieren. Beim Menschen sind bisher insgesamt zehn Keimbahnmutationen des *PAX8*-Gens beschrieben (Congdon et al., 2001, de Sanctis et al., 2004, Grasberger et al., 2005, Komatsu et al., 2001, Macchia, 2000, Macchia et al., 1998, Meeus et al., 2004, Vilain et al., 2001, Al Taji et al., 2007). Die Mutationsträger leiden an einer congenitalen Hypothyreose, bzw. im Falle der Mutation

R52P an einer early-onset-Hypothyreose (Al Taji et al., 2007).

Neben genetischen Veränderungen können auch epigenetische Veränderungen, wie z.B. die DNA-Methylierung, Einfluss auf die Funktion von Genen nehmen. Die Funktion der DNA-Methylierung liegt in der differenzierten Regulation der Expression von Genen. Nach der gängigen Theorie führt eine Hypermethylierung einer Promotorregion zum Expressionsverlust des entsprechenden Gens. In Schilddrüsenkarzinomen konnte sowohl für verschiedene Tumorsuppressorgene (Alvarez-Nunez et al., 2006, Schagdarsurengin et al., 2002, Xing et al., 2004, Hu et al., 2006, Hoque et al., 2005), als auch für die schilddrüsenspezifischen Gene *NIS* (Venkataraman et al., 1999, Neumann et al., 2004), *TSHR* (Xing et al., 2003b), *SLC26A4* (Xing et al., 2003a) und *SLC5A8* (Porra et al., 2005, Hu et al., 2006) eine pathologische Hypermethylierung nachgewiesen werden.

Bisherige Daten zur Rolle von *PAX8* in der Schilddrüsenentwicklung sowie die Veränderungen der *PAX8*-Expression in Schilddrüsenkarzinomen legen nahe, dass eine Inaktivierung des *PAX8*-Gens auch unabhängig vom Vorliegen eines *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens tumorprogressiv wirken kann. Eine solche Inaktivierung könnte zum einen durch somatische *PAX8*-Mutationen oder aber durch epigenetische Veränderungen im Sinne einer Hypermethylierung von *PAX8* hervorgerufen werden. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob in Proben follikulärer Schilddrüsenkarzinome Veränderungen auf genetischer oder epigenetischer Ebene vorliegen, die eine Inaktivierung des *PAX8*-Gens zur Folge haben könnten. Die Entscheidung FTCs zu untersuchen begründet sich dadurch, dass mit dem *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen bereits eine wichtige genetische Veränderung unter Einbezug von *PAX8* in FTCs vorliegt.

Insgesamt wurden 19 Gewebeproben follikulärer Schilddrüsenkarzinome untersucht. Die Untersuchung auf Vorliegen des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens erfolgte in allen Proben, aus denen RNA extrahiert und zu cDNA umgeschrieben werden konnte. Der Nachweis des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens erfolgte mittels Amplifikation mit vier verschiedenen Primerpaaren für eine Standard-PCR sowie zwei verschiedenen Primerpaaren für eine Nested-PCR. Zur Etablierung der PCRs wurde eine Positivkontrolle aus *PPARG1*-Amplifikationsprodukt und *PAX8*-Wildtyp-DNA enthaltenden pCS(plus)-Vektor generiert. Hierfür wurde ein *PPARG1*-Wildtyp-Amplifikationsprodukt nach *E. coli* transfiziert und nach Plasmidisolierung in den pCS2+*PAX8*-Vektor inkloniert.

Alle Tumorproben wurden auf das Vorliegen von *PAX8*-Punktmutationen untersucht. Hierfür wurden die Exone 2 bis 12 des *PAX8*-Gens amplifiziert und sequenziert.

Die Untersuchung des Methylierungszustandes des *PAX8*-Gens erfolgte mit Hilfe

der Bisulfitbehandlung nach dem Protokoll von Frommer et al. 1992. Durch die Behandlung von einzelsträngiger DNA mit Bisulfit kommt es zur kompletten Deamination von Cytosin zu Uracil. Methyliertes Cytosin reagiert nicht mit Bisulfit, so dass es weiter als Cytosin vorliegt. In der anschließenden PCR wird dementsprechend methyliertes Cytosin als Cytosin, unmethyliertes Cytosin als Thymin gelesen, so dass der Methylierungszustand des entsprechenden Genabschnittes indirekt dargestellt wird. Da nur eine begrenzte Menge von DNA zur Verfügung stand, wurde das Verfahren nach Olek et al. 1996 verwendet, bei dem die DNA in Agarosekügelchen eingebettet der Bisulfitbehandlung unterzogen wird. Im Anschluss an die Bisulfitbehandlung erfolgte die Amplifikation des entsprechenden Genabschnittes. Die Amplifikationsprodukte wurden direkt sequenziert.

Der Untersuchung auf Vorliegen des *PAX8-PPARG1*-Fusionens konnte in 13 von 19 Tumorproben erfolgen. Das *PAX8-PPARG1*-Fusionensgen konnte nach erfolgreicher Generierung der Positivkontrolle in einer Tumorproben detektiert werden. Der Bruchpunkt liegt am Ende des Exons 8 von *PAX8*. Die Fusion ist inframe, der Leserahmen der Aminosäurefolge bleibt also erhalten. Für alle Tumorproben erfolgte eine genomische Sequenzierung. In keiner der Tumorproben konnte eine Mutation des *PAX8*-Gens gefunden werden.

Die Untersuchung des Methylierungszustandes von *PAX8* in den Tumorproben erfolgte in der Region -1 sowie den Fragmenten 1-1 und 1-3 der CpG-Inseln 1. Die Region -1 liegt vor dem ersten Exon von *PAX8* und könnte möglicherweise die Funktion eines Enhancers übernehmen. CpG-Insel 1 liegt im Bereich des ersten und zweiten Exons. Das Fragment 1-1 findet sich im Bereich des Transkriptionsstartes von *PAX8*. (N. Haufs, IEPE, noch unveröffentlichte Daten). In Schilddrüsennormalgewebe liegt die Region -1 und die CpG-Insel 1 unmethyliert vor. In Lymphozyten und Wangenschleimhaut ist das Fragment im Bereich des Transkriptionsstartes, Fragment 1-1, hingegen hypermethyliert, Region -1 und 1-3 sind ebenfalls hypomethyliert.

In den Proben der follikulären Schilddrüsenkarzinome zeigte sich in der Region -1 eine eindeutige Hypomethylierung und damit ein Methylierungsmuster, das dem des Schilddrüsennormalgewebes entspricht. Bei fünf der 21 Tumorproben konnte die Region -1 nicht amplifiziert werden, so dass für diese Proben keine Aussage zum Methylierungszustand getroffen werden konnte.

Die Amplifikation von Fragment 1-1 gelang in 16 der Tumorproben. Bei genau der Hälfte der Proben zeigte sich eine Hypermethylierung des Fragmentes 1-1 und somit ein Verlust des schilddrüsenpezifischen Methylierungsmusters. Den Direktsequenzen nach zu urteilen zeigten zwei der acht hypermethylierten Tumorproben eine homozygote Hypermethylierung, eine Tumorprobe zeigt sowohl homozygot als auch heterozygot hypermethylierte CpGs. Die anderen fünf Tumorproben scheinen he-

terozygot hypermethyliert zu sein.

Im Fragment 1-3 waren alle untersuchten Tumorproben hypomethyliert und weisen somit ein Methylierungsmuster auf, das dem Methylierungsmuster von Schilddrüsennormalgewebe entspricht. Bei vier Proben gelang die Amplifikation des Fragmentes nicht.

PAX8 spielt in der Entwicklung und Differenzierung der Schilddrüse eine wichtige Rolle. Neben einer veränderten *PAX8*-Expression in follikulären Schilddrüsenkarzinomen ist mit dem *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen bereits eine Veränderung auf genetischer Ebene unter Einbezug von *PAX8* in FTCs beschrieben. In dieser Arbeit konnte lediglich in einer von 13 untersuchten Tumorproben das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen nachgewiesen werden. Bei Verwendung einer eigens generierten *PAX8-PPARG1*-Positivkontrolle zur Etablierung der PCR-Bedingungen sowie Verwendung bereits beschriebener Primerpaare scheint die Methode ausreichend valide. Die Angaben zur Häufigkeit des Fusionsgens in der Literatur schwanken stark, was möglicherweise durch eine jeweils geringe Anzahl untersuchter Tumorproben bedingt sein könnte. Die Auswirkung des *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens ist in ihrer Gesamtheit noch nicht geklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Expression von *TG*, die normalerweise von *PAX8* und *TITF1* stimuliert wird, durch die Anwesenheit eines *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens unterdrückt wird (Au et al., 2005). Folglich geht bei Vorliegen eines *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens zumindest ein Teil der *PAX8*-Funktion verloren.

Eine Inaktivierung des *PAX8*-Gens durch somatische Mutationen konnte bei allen 19 Tumorproben ausgeschlossen werden. Somit scheinen somatische Mutationen nicht der überwiegende Auslöser einer Inaktivierung von *PAX8* in Tumorgewebe zu sein. Trotzdem muss in Betracht gezogen werden, dass eine Inaktivierung von *PAX8* durch eine Keimbahnmutation für die Entwicklung einer Schilddrüsenneoplasie, insbesondere eines Schilddrüsenadenoms, prädisponieren kann. So wurde bei zwei Trägern einer *PAX8*-Keimbahnmutation, die im Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie, Charité Berlin (IEPE) diagnostiziert wurden, im Erwachsenenalter die Entwicklung einer Schilddrüsenneoplasie beobachtet (noch unveröffentlichte Daten). Neben genetischen Veränderungen können Veränderungen auf epigenetischer Ebene Einfluss auf die Funktion eines Gens nehmen. In der Region -1 und dem Fragment 1-3 fanden sich keine Auffälligkeiten im Vergleich zum Methylierungsmuster in Schilddrüsennormalgewebe. Im Fragment 1-1, das im Bereich des vermuteten Promotors von *PAX8* liegt, fand sich jedoch bei der Hälfte der untersuchten Tumorproben eine Hypermethylierung und somit ein Methylierungsmuster das dem von Geweben, die kein *PAX8* exprimieren, entspricht. Zwei der hypermethylierten Tumorproben zeigten in den Direktsequenzen eine heterozygote Hypermethylierung, von der jedoch

nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, dass es sich hierbei um eine allelspezifische Methylierung handelt, da sich im Fragment 1-1 kein SNP befindet. Es wäre ebenfalls möglich, dass sich auf Zellebene ein Mosaik mit methyliertem und nicht methyliertem *PAX8* findet.

Wie mehrfach gezeigt werden konnte, führt eine Methylierung im Promotorbereich zur Inaktivierung des entsprechenden Gens (Rose et al., 2000, Wang et al., 2003, Xing et al., 2003b). Für FTCs ist jedoch kein vollständiger Expressionsverlust von *PAX8* beschrieben, sondern lediglich eine verminderte Expression (Fabbro et al., 1994, Ros et al., 1999, Lacroix et al., 2004). Die Ausprägung der Expressionseinschränkung ist jedoch innerhalb der Gruppe der FTCs sehr unterschiedlich stark ausgeprägt (Fabbro et al., 1994, Lacroix et al., 2004). Dies könnte sich möglicherweise darauf begründen, dass die Hypermethylierung von *PAX8* auf Zelleben in Mosaikform vorliegt.

Mit der Fehlmethylierung des Promotorbereichs von *PAX8* in den Gewebeproben der FTCs konnte also eine mögliche Ursache für die mehrfach beschriebene Verminderung der *PAX8*-Expression in FTCs gefunden werden. In Bezug auf *TG*, dessen Expression unter Einfluss von *PAX8* steht, führt das *PAX8-PPARG1*-Fusionsgen zu ähnlichen Veränderungen, wie sie in FTCs unabhängig vom Vorliegen eines *PAX8-PPARG1*-Fusionsgens gefunden werden. Dies kann ein Hinweis dafür sein, dass unabhängig von der Ursache, eine Veränderung der Aktivität von *PAX8* zu einer Entdifferenzierung der Schilddrüsenzellen führt. *PAX8* übernimmt eine wichtige Funktion in der Differenzierung der Schilddrüsenzellen und reguliert als Transkriptionsfaktor Gene, die wichtig für die Entwicklung und Funktion der Schilddrüsen sind. Möglicherweise führt ein Funktionsverlust von *PAX8* zu einem Missverhältnis in der Regulation weiterer Gene, was wiederum eine veränderte Signaltransduktion und ein verändertes Wachstumsverhalten von Zellen nach sich ziehen könnte.

Weitere Arbeiten müssen nun zeigen, inwiefern die Hypermethylierung des Promotorbereichs des *PAX8*-Gens zu einer quantitativen Veränderung der *PAX8*-Expression führt und wie sich die *PAX8*-Expression bei den Tumorproben, die in den Direktsequenzen homozygot bzw. heterozygot hypermethyliert erscheinen, voneinander unterscheidet. Desweiteren wäre die Untersuchung des Methylierungsmusters von *PAX8* in follikulären Schilddrüsenadenomen, papillären Schilddrüsenkarzinomen und in undifferenzierten anaplastischen Karzinomen interessant. Möglicherweise ist insbesondere der Vergleich zwischen den anaplastischen und den differenzierten follikulären und papillären Schilddrüsenkarzinomen aufschlussreich, da nach den Daten von Ros et al. 1999 die *PAX8*-Expression in anaplastischen Karzinomen nicht nur vermindert sondern vollkommen aufgehoben ist.

---

---

## Literaturverzeichnis

- M. J. Abramowicz, L. Duprez, J. Parma, G. Vassart, and C. Heinrichs. Familial congenital hypothyroidism due to inactivating mutation of the thyrotropin receptor causing profound hypoplasia of the thyroid gland. *J Clin Invest*, 99(12):3018–24, 1997. 0021-9738 Case Reports Journal Article.
- E. Al Taji, H. Biebermann, Z. Limanova, O. Hnikova, J. Zikmund, C. Dame, A. Gruters, J. Lebl, and H. Krude. Screening for mutations in transcription factors in a czech cohort of 170 patients with congenital and early-onset hypothyroidism: identification of a novel pax8 mutation in dominantly inherited early-onset non-autoimmune hypothyroidism. *Eur J Endocrinol*, 156(5):521–9, 2007. 0804-4643 (Print) Journal Article.
- F. Alvarez-Nunez, E. Bussaglia, D. Mauricio, J. Ybarra, M. Vilar, E. Lerma, A. Leiva, and X. Matias-Guiu. Pten promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid*, 16(1):17–23, 2006. 1050-7256 (Print) Journal Article.
- F. Antequera and A. Bird. Number of cpg islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24):11995–9, 1993. 0027-8424 Journal Article.
- A. Y. Au, C. McBride, Jr. Wilhelm, K. G., R. J. Koenig, B. Speller, L. Cheung, M. Messina, J. Wentworth, V. Tasevski, D. Learoyd, B. G. Robinson, and R. J. Clifton-Bligh. Pax8-ppar disrupts normal pax8 or ppar transcriptional function and stimulates follicular thyroid cell growth, 2005.
- J. Auwerx. Ppargamma, the ultimate thrifty gene. *Diabetologia*, 42(9):1033–49, 1999. 0012-186x Journal Article Review.
- B. Bakker, H. Bikker, T. Vulsmä, J. S. de Randamie, B. M. Wiedijk, and J. J. De Vijlder. Two decades of screening for congenital hypothyroidism in the netherlands: Tpo gene mutations in total iodide organification defects (an update). *J Clin Endocrinol Metab*, 85(10):3708–12, 2000. 0021-972X (Print) Journal Article.



- Z. W. Baloch, S. Mandel, and V. A. LiVolsi. Combined tall cell carcinoma and hurthle cell carcinoma (collision tumor) of the thyroid. *Arch Pathol Lab Med*, 125(4):541–3, 2001. 0003-9985 (Print) Case Reports Journal Article.
- S. B. Baylin, J. W. Hoppener, A. de Bustros, P. H. Steenbergh, C. J. Lips, and B. D. Nelkin. Dna methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Res*, 46(6):2917–22, 1986. 0008-5472 Journal Article.
- M. Bernasconi, A. Remppis, W. J. Fredericks, 3rd Rauscher, F. J., and B. W. Schafer. Induction of apoptosis in rhabdomyosarcoma cells through down-regulation of pax proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23):13164–9, 1996. 0027-8424 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- H. Biebermann, T. Schoneberg, H. Krude, G. Schultz, T. Gudermann, and A. Gruters. Mutations of the human thyrotropin receptor gene causing thyroid hypoplasia and persistent congenital hypothyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(10):3471–80, 1997. 0021-972x Case Reports Journal Article.
- L. Bondeson, A. Bengtsson, A. G. Bondeson, R. Dahlenfors, L. Grimelius, B. Wedell, and J. Mark. Chromosome studies in thyroid neoplasia. *Cancer*, 64(3):680–5, 1989. 0008-543x Journal Article.
- M. Bouchard, A. Souabni, M. Mandler, A. Neubuser, and M. Busslinger. Nephric lineage specification by pax2 and pax8. *Genes Dev*, 16(22):2958–70, 2002. 0890-9369 Journal Article.
- J. A. Brockman, R. A. Gupta, and R. N. Dubois. Activation of ppargamma leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology*, 115(5):1049–55, 1998. 0016-5085 Journal Article.
- C. Ceccarelli, F. Pacini, F. Lippi, R. Elisei, M. Arganini, P. Miccoli, and A. Pinchera. Thyroid cancer in children and adolescents. *Surgery*, 104(6):1143–8, 1988. 0039-6060 Journal Article.
- L. Cheung, M. Messina, A. Gill, A. Clarkson, D. Learoyd, L. Delbridge, J. Wentworth, J. Philips, R. Clifton-Bligh, and B. G. Robinson. Detection of the pax8-ppar gamma fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(1):354–7, 2003. 0021-972x Journal Article.
- N. Chi and J. A. Epstein. Getting your pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet*, 18(1):41–7, 2002. 0168-9525 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.

- R. J. Clifton-Bligh, J. M. Wentworth, P. Heinz, M. S. Crisp, R. John, J. H. Lazarus, M. Ludgate, and V. K. Chatterjee. Mutation of the gene encoding human ttf-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet*, 19(4):399–401, 1998. 1061-4036 Journal Article.
- T. Congdon, L. Q. Nguyen, C. R. Nogueira, R. L. Habiby, G. Medeiros-Neto, and P. Kopp. A novel mutation (q40p) in pax8 associated with congenital hypothyroidism and thyroid hypoplasia: evidence for phenotypic variability in mother and child. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(8):3962–7, 2001. 0021-972x Case Reports Journal Article.
- D. S. Cooper, L. Axelrod, L. J. DeGroot, Jr. Vickery, A. L., and F. Maloof. Congenital goiter and the development of metastatic follicular carcinoma with evidence for a leak of nonhormonal iodide: clinical, pathological, kinetic, and biochemical studies and a review of the literature. *J Clin Endocrinol Metab*, 52(2):294–306, 1981. 0021-972X (Print) Case Reports Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- P. L. Dahia, D. J. Marsh, Z. Zheng, J. Zedenius, P. Komminoth, T. Frisk, G. Wallin, R. Parsons, M. Longy, C. Larsson, and C. Eng. Somatic deletions and mutations in the cowden disease gene, pten, in sporadic thyroid tumors. *Cancer Res*, 57(21):4710–3, 1997. 0008-5472 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- E. Dahl, H. Koseki, and R. Balling. Pax genes and organogenesis. *Bioessays*, 19(9):755–65, 1997. 0265-9247 Journal Article Review Review, Tutorial.
- G. Damante, G. Tell, and R. Di Lauro. A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 66:307–56, 2001. 0079-6603 Journal Article Review.
- M. De Felice, C. Ovitt, E. Biffali, A. Rodriguez-Mallon, C. Arra, K. Anastassiadis, P. E. Macchia, M. G. Mattei, A. Mariano, H. Scholer, V. Macchia, and R. Di Lauro. A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate. *Nat Genet*, 19(4):395–8, 1998. 1061-4036 Journal Article.
- L. de Sanctis, A. Corrias, D. Romagnolo, T. Di Palma, A. Biava, G. Borgarello, P. Gianino, L. Silvestro, M. Zannini, and I. Dianzani. Familial pax8 small deletion (c.989\_992delacc) associated with extreme phenotype variability. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(11):5669–74, 2004. 0021-972x Journal Article.

- G. D. Demetri, C. D. Fletcher, E. Mueller, P. Sarraf, R. Naujoks, N. Campbell, B. M. Spiegelman, and S. Singer. Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):3951–6, 1999. 0027-8424 Case Reports Clinical Trial Clinical Trial, Phase II Journal Article Multicenter Study.
- R. DiLauro and M. DeFelice. *Endocrinology*, volume 2. DeGroot, L. J. Jameson, J. L., Saunders, Philadelphia, 2001.
- G. R. Dressler, J. E. Wilkinson, U. W. Rothenpieler, L. T. Patterson, L. Williams-Simons, and H. Westphal. Deregulation of pax-2 expression in transgenic mice generates severe kidney abnormalities. *Nature*, 362(6415):65–7, 1993. 0028-0836 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- T. Dwight, S. R. Thoppe, T. Foukakis, W. O. Lui, G. Wallin, A. Hoog, T. Frisk, C. Larsson, and J. Zedenius. Involvement of the pax8/peroxisome proliferator-activated receptor gamma rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(9):4440–5, 2003. 0021-972x Journal Article.
- E. Elstner, C. Muller, K. Koshizuka, E. A. Williamson, D. Park, H. Asou, P. Shintaku, J. W. Said, D. Heber, and H. P. Koeffler. Ligands for peroxisome proliferator-activated receptorgamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in bnx mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(15):8806–11, 1998. 0027-8424 Journal Article.
- J. A. Epstein, T. Glaser, J. Cai, L. Jepeal, D. S. Walton, and R. L. Maas. Two independent and interactive dna-binding subdomains of the pax6 paired domain are regulated by alternative splicing. *Genes Dev*, 8(17):2022–34, 1994. 0890-9369 (Print) Case Reports Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- C. T. Esapa, S. J. Johnson, P. Kendall-Taylor, T. W. Lennard, and P. E. Harris. Prevalence of ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 50(4): 529–35, 1999. 0300-0664 Journal Article.
- D. Fabbro, C. Di Loreto, C. A. Beltrami, A. Belfiore, R. Di Lauro, and G. Daman-  
te. Expression of thyroid-specific transcription factors ttf-1 and pax-8 in human thyroid neoplasms. *Cancer Res*, 54(17):4744–9, 1994. 0008-5472 (Print) Journal Article.

- J. A. Fagin. Perspective: lessons learned from molecular genetic studies of thyroid cancer—insights into pathogenesis and tumor-specific therapeutic targets. *Endocrinology*, 143(6):2025–8, 2002. 0013-7227 Journal Article.
- A. S. Fassina, M. Rupolo, M. R. Pelizzo, and D. Casara. Thyroid cancer in children and adolescents. *Tumori*, 80(4):257–62, 1994. 0300-8916 Clinical Trial Journal Article.
- R. Feil, J. Charlton, A. P. Bird, J. Walter, and W. Reik. Methylation analysis on individual chromosomes: improved protocol for bisulphite genomic sequencing. *Nucleic Acids Res*, 22(4):695–6, 1994. 0305-1048 Journal Article.
- A. P. Feinberg and B. Vogelstein. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. *Biochem Biophys Res Commun*, 111(1):47–54, 1983a. 0006-291x Journal Article.
- A. P. Feinberg and B. Vogelstein. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301(5895):89–92, 1983b. 0028-0836 Journal Article.
- D. A. Fisher and D. H. Polk. Development of the thyroid. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 3(3):627–57, 1989. 0950-351x Journal Article Review Review, Tutorial.
- B. M. Forman, P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman, and R. M. Evans. 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin j2 is a ligand for the adipocyte determination factor ppar gamma. *Cell*, 83(5):803–12, 1995. 0092-8674 Journal Article.
- M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy, and C. L. Paul. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual dna strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(5):1827–31, 1992. 0027-8424 Journal Article.
- H. Fujiwara, K. Tatsumi, K. Miki, T. Harada, K. Miyai, S. Takai, and N. Amino. Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the na<sup>+</sup>/i<sup>-</sup> symporter. *Nat Genet*, 16(2):124–5, 1997. 1061-4036 (Print) Case Reports Letter Research Support, Non-U.S. Gov't.
- M. A. Gama-Sosa, V. A. Slagel, R. W. Trewyn, R. Oxenhandler, K. C. Kuo, C. W. Gehrke, and M. Ehrlich. The 5-methylcytosine content of dna from human tumors. *Nucleic Acids Res*, 11(19):6883–94, 1983. 0305-1048 Journal Article.

- M. Gardiner-Garden and M. Frommer. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*, 196(2):261–82, 1987. 0022-2836 Journal Article.
- O. Gimm. Thyroid cancer. *Cancer Lett*, 163(2):143–56, 2001. 0304-3835 (Print) Journal Article Review.
- D. Gorson. Familial papillary carcinoma of the thyroid. *Thyroid*, 2(2):131–2, 1992. 1050-7256 (Print) Case Reports Journal Article.
- H. Grasberger, U. Ringkanaanont, P. Lefrancois, M. Abramowicz, G. Vassart, and S. Refetoff. Thyroid transcription factor 1 rescues pax8/p300 synergism impaired by a natural pax8 paired domain mutation with dominant negative activity. *Mol Endocrinol*, 19(7):1779–91, 2005. 0888-8809 Journal Article.
- V. Greger, E. Passarge, W. Hopping, E. Messmer, and B. Horsthemke. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet*, 83(2):155–8, 1989. 0340-6717 Journal Article.
- V. Greger, N. Debus, D. Lohmann, W. Hopping, E. Passarge, and B. Horsthemke. Frequency and parental origin of hypermethylated rb1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet*, 94(5):491–6, 1994. 0340-6717 Journal Article.
- N. Halachmi, S. Halachmi, E. Evron, P. Cairns, K. Okami, M. Saji, W. H. Westra, M. A. Zeiger, J. Jen, and D. Sidransky. Somatic mutations of the pten tumor suppressor gene in sporadic follicular thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer*, 23(3):239–43, 1998. 1045-2257 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- M. Hanada, D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer, and J. C. Reed. bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in b-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 82(6):1820–8, 1993. 0006-4971 Journal Article.
- D. Hanahan and R. A. Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70, 2000. 0092-8674 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.
- H. R. Harach, G. T. Williams, and E. D. Williams. Familial adenomatous polyposis associated thyroid carcinoma: a distinct type of follicular cell neoplasm. *Histopathology*, 25(6):549–61, 1994. 0309-0167 (Print) Case Reports Journal Article Review.

- A. T. Hark, C. J. Schoenherr, D. J. Katz, R. S. Ingram, J. M. LeVorse, and S. M. Tilghman. Ctfc mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the h19/igf2 locus. *Nature*, 405(6785):486–9, 2000. 0028-0836 Journal Article.
- M. O. Hoque, E. Rosenbaum, W. H. Westra, M. Xing, P. Ladenson, M. A. Zeiger, D. Sidransky, and C. B. Umbricht. Quantitative assessment of promoter methylation profiles in thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(7):4011–8, 2005. 0021-972X (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- S. Hu, D. Liu, R. P. Tufano, K. A. Carson, E. Rosenbaum, Y. Cohen, E. H. Holt, K. Kiseljak-Vassiliades, K. J. Rhoden, S. Tolaney, S. Condouris, G. Tallini, W. H. Westra, C. B. Umbricht, M. A. Zeiger, J. A. Califano, V. Vasko, and M. Xing. Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and braf mutation in papillary thyroid cancer. *Int J Cancer*, 119(10):2322–9, 2006. 0020-7136 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- S. J. James, I. P. Pogribny, M. Pogribna, B. J. Miller, S. Jernigan, and S. Melnyk. Mechanisms of dna damage, dna hypomethylation, and tumor progression in the folate/methyl-deficient rat model of hepatocarcinogenesis. *J Nutr*, 133(11 Suppl 1):3740S–3747S, 2003. 0022-3166 Journal Article Review Review, Tutorial.
- R. B. Jenkins, I. D. Hay, J. F. Herath, C. G. Schultz, J. L. Spurbeck, C. S. Grant, J. R. Goellner, and G. W. Dewald. Frequent occurrence of cytogenetic abnormalities in sporadic nonmedullary thyroid carcinoma. *Cancer*, 66(6):1213–20, 1990. 0008-543x Journal Article.
- S. M. Jhiang, J. E. Sagartz, Q. Tong, J. Parker-Thornburg, C. C. Capen, J. Y. Cho, S. Xing, and C. Ledent. Targeted expression of the ret/ptc1 oncogene induces papillary thyroid carcinomas. *Endocrinology*, 137(1):375–8, 1996. 0013-7227 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- S. Jun and C. Desplan. Cooperative interactions between paired domain and homeodomain. *Development*, 122(9):2639–50, 1996. 0950-1991 (Print) Journal Article.
- T. Kafri, M. Ariel, M. Brandeis, R. Shemer, L. Urven, J. McCarrey, H. Cedar, and A. Razin. Developmental pattern of gene-specific dna methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*, 6(5):705–14, 1992. 0890-9369 Journal Article.

- J. H. Kang, S. J. Kim, D. Y. Noh, I. A. Park, K. J. Choe, O. J. Yoo, and H. S. Kang. Methylation in the p53 promoter is a supplementary route to breast carcinogenesis: correlation between cpg methylation in the p53 promoter and the mutation of the p53 gene in the progression from ductal carcinoma in situ to invasive ductal carcinoma. *Lab Invest*, 81(4):573–9, 2001. 0023-6837 (Print) Journal Article.
- H. Karga, J. K. Lee, Jr. Vickery, A. L., A. Thor, R. D. Gaz, and J. L. Jameson. Ras oncogene mutations in benign and malignant thyroid neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*, 73(4):832–6, 1991. 0021-972x Journal Article.
- S. U. Kass, N. Landsberger, and A. P. Wolffe. Dna methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. *Curr Biol*, 7(3):157–65, 1997. 0960-9822 Journal Article.
- T. L. Kautiainen and P. A. Jones. Dna methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem*, 261(4):1594–8, 1986. 0021-9258 Journal Article.
- J. Kim, A. E. Giuliano, R. R. Turner, R. E. Gaffney, N. Umetani, M. Kitago, D. Elashoff, and D. S. Hoon. Lymphatic mapping establishes the role of braf gene mutation in papillary thyroid carcinoma. *Ann Surg*, 244(5):799–804, 2006. 0003-4932 (Print) Journal Article Research Support, N.I.H., Extramural Research Support, Non-U.S. Gov't.
- S. Kimura, J. M. Ward, and P. Minoo. Thyroid-specific enhancer-binding protein/thyroid transcription factor 1 is not required for the initial specification of the thyroid and lung primordia. *Biochimie*, 81(4):321–7, 1999. 0300-9084 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- S. A. Kliewer, S. S. Sundseth, S. A. Jones, P. J. Brown, G. B. Wisely, C. S. Koble, P. Devchand, W. Wahli, T. M. Willson, J. M. Lenhard, and J. M. Lehmann. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9):4318–23, 1997. 0027-8424 Journal Article.
- A. G. Knudson. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, 1(2):157–62, 2001. 1474-175X (Print) Journal Article Review.
- A. J. Koleske and R. A. Young. An rna polymerase ii holoenzyme responsive to activators. *Nature*, 368(6470):466–9, 1994. 0028-0836 (Print) Journal Article.

- M. Komatsu, T. Takahashi, I. Takahashi, M. Nakamura, and G. Takada. Thyroid dysgenesis caused by pax8 mutation: the hypermutability with cpg dinucleotides at codon 31. *J Pediatr*, 139(4):597–9, 2001. 0022-3476 Case Reports Journal Article.
- Z. Kozmik, R. Kurzbauer, P. Dorfler, and M. Busslinger. Alternative splicing of pax-8 gene transcripts is developmentally regulated and generates isoforms with different transactivation properties. *Mol Cell Biol*, 13(10):6024–35, 1993. 0270-7306 (Print) Journal Article.
- Z. Kozmik, T. Czerny, and M. Busslinger. Alternatively spliced insertions in the paired domain restrict the dna sequence specificity of pax6 and pax8. *Embo J*, 16(22):6793–803, 1997. 0261-4189 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- G. Krey, O. Braissant, F. L'Horset, E. Kalkhoven, M. Perroud, M. G. Parker, and W. Wahli. Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol*, 11(6):779–91, 1997. 0888-8809 Journal Article.
- T. G. Kroll, P. Sarraf, L. Pecciarini, C. J. Chen, E. Mueller, B. M. Spiegelman, and J. A. Fletcher. Pax8-ppargamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma [corrected]. *Science*, 289(5483):1357–60, 2000. 0036-8075 Journal Article.
- H. Krude, B. Schutz, H. Biebermann, A. von Moers, D. Schnabel, H. Neitzel, H. Tonnies, D. Weise, A. Lafferty, S. Schwarz, M. DeFelice, A. von Deimling, F. van Landeghem, R. DiLauro, and A. Gruters. Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human nkx2-1 haploinsufficiency. *J Clin Invest*, 109(4):475–80, 2002. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- T. Kubota, K. Koshizuka, E. A. Williamson, H. Asou, J. W. Said, S. Holden, I. Miyoshi, and H. P. Koeffler. Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 58(15):3344–52, 1998. 0008-5472 Journal Article.
- L. Lacroix, C. Mian, T. Barrier, M. Talbot, B. Caillou, M. Schlumberger, and J. M. Bidart. Pax8 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 gene expression status in benign and malignant thyroid tissues. *Eur J Endocrinol*, 151(3):367–74, 2004. 0804-4643 Journal Article.



- L. Lacroix, V. Lazar, S. Michiels, H. Ripoche, P. Dessen, M. Talbot, B. Caillou, J. P. Levillain, M. Schlumberger, and J. M. Bidart. Follicular thyroid tumors with the pax8-ppargamma1 rearrangement display characteristic genetic alterations. *Am J Pathol*, 167(1):223–31, 2005. 0002-9440 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- D. Lazzaro, M. Price, M. de Felice, and R. Di Lauro. The transcription factor ttf-1 is expressed at the onset of thyroid and lung morphogenesis and in restricted regions of the foetal brain. *Development*, 113(4):1093–104, 1991. 0950-1991 (Print) Journal Article.
- J. M. Lehmann, L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, W. O. Wilkison, T. M. Willson, and S. A. Kliewer. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppar gamma). *J Biol Chem*, 270(22):12953–6, 1995. 0021-9258 Journal Article.
- N. R. Lemoine, E. S. Mayall, F. S. Wyllie, E. D. Williams, M. Goyns, B. Stringer, and D. Wynford-Thomas. High frequency of ras oncogene activation in all stages of human thyroid tumorigenesis. *Oncogene*, 4(2):159–64, 1989. 0950-9232 Journal Article.
- S. C. Lin, K. F. Lee, A. Y. Nikitin, S. G. Hilsenbeck, R. D. Cardiff, A. Li, K. W. Kang, S. A. Frank, W. H. Lee, and E. Y. Lee. Somatic mutation of p53 leads to estrogen receptor alpha-positive and -negative mouse mammary tumors with high frequency of metastasis. *Cancer Res*, 64(10):3525–32, 2004. 0008-5472 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- K. Lote, K. Andersen, E. Nordal, and I. O. Brennhovd. Familial occurrence of papillary thyroid carcinoma. *Cancer*, 46(5):1291–7, 1980. 0008-543X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- P. E. Macchia. Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism. *Mol Med Today*, 6(1):36–42, 2000. 1357-4310 (Print) Journal Article Review.
- P. E. Macchia, P. Lapi, H. Krude, M. T. Pirro, C. Missero, L. Chiovato, A. Souabni, M. Baserga, V. Tassi, A. Pinchera, G. Fenzi, A. Gruters, M. Busslinger, and R. Di Lauro. Pax8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis. *Nat Genet*, 19(1):83–6, 1998. 1061-4036 Journal Article.

- A. Mansouri, M. Hallonet, and P. Gruss. Pax genes and their roles in cell differentiation and development. *Curr Opin Cell Biol*, 8(6):851–7, 1996. 0955-0674 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- A. Mansouri, K. Chowdhury, and P. Gruss. Follicular cells of the thyroid gland require pax8 gene function. *Nat Genet*, 19(1):87–90, 1998. 1061-4036 Journal Article.
- A. R. Marques, C. Espadinha, A. L. Catarino, S. Moniz, T. Pereira, L. G. Sobrinho, and V. Leite. Expression of pax8-ppar gamma 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(8):3947–52, 2002. 0021-972x Journal Article.
- A. R. Marques, C. Espadinha, M. J. Frias, L. Roque, A. L. Catarino, L. G. Sobrinho, and V. Leite. Underexpression of peroxisome proliferator-activated receptor (ppar)gamma in pax8/ppargamma-negative thyroid tumours. *Br J Cancer*, 91(4):732–8, 2004. 0007-0920 Journal Article.
- D. J. Marsh, V. Coulon, K. L. Lunetta, P. Rocca-Serra, P. L. Dahia, Z. Zheng, D. Liaw, S. Caron, B. Duboue, A. Y. Lin, A. L. Richardson, J. M. Bonnetblanc, J. M. Bressieux, A. Cabarrot-Moreau, A. Chompret, L. Demange, R. A. Eeles, A. M. Yahanda, E. R. Fearon, J. P. Fricker, R. J. Gorlin, S. V. Hodgson, S. Huson, D. Lacombe, C. Eng, and et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in cowden disease and bannayan-zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline pten mutation. *Hum Mol Genet*, 7(3):507–15, 1998. 0964-6906 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- L. Meeus, B. Gilbert, C. Rydlewski, J. Parma, A. L. Roussie, M. Abramowicz, C. Vilain, D. Christophe, S. Costagliola, and G. Vassart. Characterization of a novel loss of function mutation of pax8 in a familial case of congenital hypothyroidism with in-place, normal-sized thyroid. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(9):4285–91, 2004. 0021-972x Journal Article.
- Y. Merrick and H. S. Hansen. Thyroid cancer in children and adolescents in denmark. *Eur J Surg Oncol*, 15(1):49–53, 1989. 0748-7983 Journal Article.
- M. Monk, M. Boubelik, and S. Lehnert. Temporal and regional changes in dna methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*, 99(3):371–82, 1987. 0950-1991 Journal Article.

- A. M. Morrison, S. L. Nutt, C. Thevenin, A. Rolink, and M. Busslinger. Loss- and gain-of-function mutations reveal an important role of bsap (pax-5) at the start and end of b cell differentiation. *Semin Immunol*, 10(2):133–42, 1998. 1044-5323 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- N. Motoi, A. Sakamoto, T. Yamochi, H. Horiuchi, T. Motoi, and R. Machinami. Role of ras mutation in the progression of thyroid carcinoma of follicular epithelial origin. *Pathol Res Pract*, 196(1):1–7, 2000. 0344-0338 Journal Article.
- E. Mueller, P. Sarraf, P. Tontonoz, R. M. Evans, K. J. Martin, M. Zhang, C. Fletcher, S. Singer, and B. M. Spiegelman. Terminal differentiation of human breast cancer through ppar gamma. *Mol Cell*, 1(3):465–70, 1998. 1097-2765 Journal Article.
- L. Murer, G. Caridi, M. Della Vella, G. Montini, C. Carasi, G. Ghiggeri, and G. Zaccchello. Expression of nuclear transcription factor pax2 in renal biopsies of juvenile nephronophthisis. *Nephron*, 91(4):588–93, 2002. 0028-2766 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- H. Namba, S. A. Rubin, and J. A. Fagin. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol*, 4(10):1474–9, 1990. 0888-8809 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- S. Neumann, K. Schuchardt, A. Reske, P. Emmrich, and R. Paschke. Lack of correlation for sodium iodide symporter mrna and protein expression and analysis of sodium iodide symporter promoter methylation in benign cold thyroid nodules. *Thyroid*, 14(2):99–111, 2004. 1050-7256 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- M. N. Nikiforova, P. W. Biddinger, C. M. Caudill, T. G. Kroll, and Y. E. Nikiforov. Pax8-ppargamma rearrangement in thyroid tumors: Rt-pcr and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol*, 26(8):1016–23, 2002. 0147-5185 Journal Article.
- M. N. Nikiforova, E. T. Kimura, M. Gandhi, P. W. Biddinger, J. A. Knauf, F. Basolo, Z. Zhu, R. Giannini, G. Salvatore, A. Fusco, M. Santoro, J. A. Fagin, and Y. E. Nikiforov. Braf mutations in thyroid tumors are restricted to papillary carcinomas and anaplastic or poorly differentiated carcinomas arising from papillary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(11):5399–404, 2003a. 0021-972X (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- M. N. Nikiforova, R. A. Lynch, P. W. Biddinger, E. K. Alexander, 2nd Dorn, G. W., G. Tallini, T. G. Kroll, and Y. E. Nikiforov. Ras point mutations and pax8-ppar gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways

- in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(5):2318–26, 2003b. 0021-972x Journal Article.
- M. Ohno, M. Zannini, O. Levy, N. Carrasco, and R. di Lauro. The paired-domain transcription factor pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-amp-dependent transcription. *Mol Cell Biol*, 19(3):2051–60, 1999. 0270-7306 Journal Article.
- N. Ohtani-Fujita, T. Fujita, A. Aoike, N. E. Osifchin, P. D. Robbins, and T. Sakai. CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Oncogene*, 8(4):1063–7, 1993. 0950-9232 Journal Article.
- O. Okladnova, A. Poleev, J. Fantes, M. Lee, D. Plachov, and J. Horst. The genomic organization of the murine pax 8 gene and characterization of its basal promoter. *Genomics*, 42(3):452–61, 1997. 0888-7543 (Print) Journal Article.
- T. Oyama, Jr. Vickery, A. L., F. I. Preffer, and R. B. Colvin. A comparative study of flow cytometry and histopathologic findings in thyroid follicular carcinomas and adenomas. *Hum Pathol*, 25(3):271–5, 1994. 0046-8177 (Print) Journal Article.
- F. Pacini, M. Fontanelli, L. Fugazzola, R. Elisei, C. Romei, G. Di Coscio, P. Miccoli, and A. Pinchera. Routine measurement of serum calcitonin in nodular thyroid diseases allows the preoperative diagnosis of unsuspected sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 78(4):826–9, 1994. 0021-972x Journal Article.
- M. Pasca di Magliano, R. Di Lauro, and M. Zannini. Pax8 has a key role in thyroid cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(24):13144–9, 2000. 0027-8424 Journal Article.
- S. Pilotti, P. Collini, L. Mariani, M. Placucci, I. Bongarzone, P. Vigneri, S. Cipriani, F. Falcetta, R. Miceli, M. A. Pierotti, and F. Rilke. Insular carcinoma: a distinct de novo entity among follicular carcinomas of the thyroid gland. *Am J Surg Pathol*, 21(12):1466–73, 1997. 0147-5185 Journal Article.
- D. Plachov, K. Chowdhury, C. Walther, D. Simon, J. L. Guenet, and P. Gruss. Pax8, a murine paired box gene expressed in the developing excretory system and thyroid gland. *Development*, 110(2):643–51, 1990. 0950-1991 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

- I. P. Pogribny, B. J. Miller, and S. J. James. Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/methyl deficiency in the rat. *Cancer Lett*, 115(1):31–8, 1997. 0304-3835 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- J. Pohlenz, I. M. Rosenthal, R. E. Weiss, S. M. Jhiang, C. Burant, and S. Refetoff. Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest*, 101(5):1028–35, 1998. 0021-9738 Case Reports Journal Article.
- V. Porra, C. Ferraro-Peyret, C. Durand, S. Selmi-Ruby, H. Giroud, N. Berger-Dutrieux, M. Decaussin, J. L. Peix, C. Bournaud, J. Orgiazzi, F. Borson-Chazot, R. Dante, and B. Rousset. Silencing of the tumor suppressor gene *slc5a8* is associated with *braf* mutations in classical papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(5):3028–35, 2005. 0021-972X (Print) Journal Article.
- M. Rieu, M. C. Lame, A. Richard, B. Lissak, B. Sambort, P. Vuong-Ngoc, J. L. Berrod, and J. P. Fombeur. Prevalence of sporadic medullary thyroid carcinoma: the importance of routine measurement of serum calcitonin in the diagnostic evaluation of thyroid nodules. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 42(5):453–60, 1995. 0300-0664 Journal Article.
- L. Roque, S. Castedo, A. Clode, and J. Soares. Deletion of 3p25->pter in a primary follicular thyroid carcinoma and its metastasis. *Genes Chromosomes Cancer*, 8(3):199–203, 1993. 1045-2257 Journal Article.
- P. Ros, D. L. Rossi, A. Acebron, and P. Santisteban. Thyroid-specific gene expression in the multi-step process of thyroid carcinogenesis. *Biochimie*, 81(4):389–96, 1999. 0300-9084 Journal Article.
- J. A. Rose, P. A. Yates, J. Simpson, J. A. Tischfield, P. J. Stambrook, and M. S. Turker. Biallelic methylation and silencing of mouse *aprt* in normal kidney cells. *Cancer Res*, 60(13):3404–8, 2000. 0008-5472 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- M. R. Rountree and E. U. Selker. Dna methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *neurospora crassa*. *Genes Dev*, 11(18):2383–95, 1997. 0890-9369 Journal Article.
- R. A. Rupp, L. Snider, and H. Weintraub. *Xenopus* embryos regulate the nuclear localization of *xmyod*. *Genes Dev*, 8(11):1311–23, 1994. 0890-9369 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

- VEA Russo, RA Martienssen, and AD Riggs. Epigenetic mechanisms of gene regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, 1996.
- T. Sakai, J. Toguchida, N. Ohtani, D. W. Yandell, J. M. Rapaport, and T. P. Dryja. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet*, 48(5):880–8, 1991. 0002-9297 Journal Article.
- M. Santoro, G. Chiappetta, A. Cerrato, D. Salvatore, L. Zhang, G. Manzo, A. Piccone, G. Portella, G. Santelli, G. Vecchio, and A. Fusco. Development of thyroid papillary carcinomas secondary to tissue-specific expression of the ret/ptc1 oncogene in transgenic mice. *Oncogene*, 12(8):1821–6, 1996. 0950-9232 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- P. Sarraf, E. Mueller, D. Jones, F. J. King, D. J. DeAngelo, J. B. Partridge, S. A. Holden, L. B. Chen, S. Singer, C. Fletcher, and B. M. Spiegelman. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through ppargamma. *Nat Med*, 4(9):1046–52, 1998. 1078-8956 Journal Article.
- U. Schagdarsurengin, O. Gimm, C. Hoang-Vu, H. Dralle, G. P. Pfeifer, and R. Dammann. Frequent epigenetic silencing of the cpG island promoter of rassfla in thyroid carcinoma. *Cancer Res*, 62(13):3698–701, 2002. 0008-5472 Journal Article.
- L. J. Schelfhout, C. J. Cornelisse, B. M. Goslings, J. F. Hamming, N. J. Kuipers-Dijkshoorn, C. J. van de Velde, and G. J. Fleuren. Frequency and degree of aneuploidy in benign and malignant thyroid neoplasms. *Int J Cancer*, 45(1):16–20, 1990. 0020-7136 (Print) Comparative Study Journal Article.
- M. Schroeder and M. J. Mass. CpG methylation inactivates the transcriptional activity of the promoter of the human p53 tumor suppressor gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 235(2):403–6, 1997. 0006-291X (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S.
- R. Shapiro, V. DiFate, and M. Welcher. Deamination of cytosine derivatives by bisulfite. mechanism of the reaction. *J Am Chem Soc*, 96(3):906–12, 1974. 0002-7863 (Print) Journal Article.
- S. Singh, C. M. Stellrecht, H. K. Tang, and G. F. Saunders. Modulation of pax6 homeodomain function by the paired domain. *J Biol Chem*, 275(23):17306–13, 2000. 0021-9258 (Print) Journal Article.

- P. A. Smanik, T. L. Furminger, E. L. Mazzaferri, and S. M. Jhiang. Breakpoint characterization of the *ret/ptc* oncogene in human papillary thyroid carcinoma. *Hum Mol Genet*, 4(12):2313–8, 1995. 0964-6906 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- G. Sozzi, M. Miozzo, T. C. Cariani, I. Bongarzone, S. Pilotti, M. A. Pierotti, and G. Della Porta. A  $t(2;3)(q12-13;p24-25)$  in follicular thyroid adenomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 64(1):38–41, 1992. 0165-4608 Journal Article.
- M. Takahashi, J. Ritz, and G. M. Cooper. Activation of a novel human transforming gene, *ret*, by dna rearrangement. *Cell*, 42(2):581–8, 1985. 0092-8674 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- H. E. Tamez-Perez, E. Saavedra-Castillo, A. Oliveros-Rodriguez, M. D. Gomez-de Ossio, M. I. Hernandez-Coria, A. L. Tamez-Pena, G. Forsbach-Sanchez, A. K. Pina-Osuna, and A. Zavala-Pompa. [thyroid cancer in children and adolescents]. *Rev Invest Clin*, 56(4):449–53, 2004. 0034-8376 Journal Article.
- P. H. Tate and A. P. Bird. Effects of dna methylation on dna-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, 3(2):226–31, 1993. 0959-437x Journal Article Review Review, Tutorial.
- J. R. Teyssier, F. Liautaud-Roger, D. Ferre, M. Patey, and J. Dufer. Chromosomal changes in thyroid tumors. relation with dna content, karyotypic features, and clinical data. *Cancer Genet Cytogenet*, 50(2):249–63, 1990. 0165-4608 Journal Article.
- P. Q. Thomas, A. Brown, and R. S. Beddington. Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development*, 125(1):85–94, 1998. 0950-1991 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- P. Tontonoz, S. Singer, B. M. Forman, P. Sarraf, J. A. Fletcher, C. D. Fletcher, R. P. Brun, E. Mueller, S. Altiook, H. Oppenheim, R. M. Evans, and B. M. Spiegelman. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid x receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(1):237–41, 1997. 0027-8424 Journal Article.
- J. Treisman, E. Harris, and C. Desplan. The paired box encodes a second dna-binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev*, 5(4):594–604, 1991. 0890-9369 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.

- S. S. Trueba, J. Auge, G. Mattei, H. Etchevers, J. Martinovic, P. Czernichow, M. Verkemans, M. Polak, and T. Attie-Bitach. Pax8, titf1, and foxe1 gene expression patterns during human development: new insights into human thyroid development and thyroid dysgenesis-associated malformations. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(1):455–62, 2005. 0021-972x Journal Article.
- W. S. Tung, D. W. Shevlin, Z. Kaleem, D. J. Tribune, Jr. Wells, S. A., and P. J. Goodfellow. Allelotype of follicular thyroid carcinomas reveals genetic instability consistent with frequent nondisjunctional chromosomal loss. *Genes Chromosomes Cancer*, 19(1):43–51, 1997. 1045-2257 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- D. L. Turner and H. Weintraub. Expression of achaete-scute homolog 3 in xenopus embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev*, 8(12):1434–47, 1994. 0890-9369 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- K. Unger, H. Zitzelsberger, G. Salvatore, M. Santoro, T. Bogdanova, H. Braselmann, P. Kastner, L. Zurnadzhy, N. Tronko, P. Hutzler, and G. Thomas. Heterogeneity in the distribution of ret/ptc rearrangements within individual post-chernobyl papillary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 89(9):4272–9, 2004. 0021-972X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- G. M. Venkataraman, M. Yatin, R. Marcinek, and K. B. Ain. Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human na<sup>+</sup>/i<sup>-</sup>symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab*, 84(7):2449–57, 1999. 0021-972X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- H. Vierhapper, W. Raber, C. Bieglmayer, K. Kaserer, A. Weinhausl, and B. Niederle. Routine measurement of plasma calcitonin in nodular thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab*, 82(5):1589–93, 1997. 0021-972x Journal Article.
- C. Vilain, C. Rydlewski, L. Duprez, C. Heinrichs, M. Abramowicz, P. Malvaux, B. Renneboog, J. Parma, S. Costagliola, and G. Vassart. Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of pax8. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(1):234–8, 2001. 0021-972x Case Reports Journal Article.
- J. Villard. Transcription regulation and human diseases. *Swiss Med Wkly*, 134(39-40):571–9, 2004. 1424-7860 (Print) Journal Article Review.



- C. Walther, J. L. Guenet, D. Simon, U. Deutsch, B. Jostes, M. D. Goulding, D. Plachov, R. Balling, and P. Gruss. Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics*, 11(2):424–34, 1991. 0888-7543 (Print) Journal Article.
- Y. C. Wang, Y. P. Lu, R. C. Tseng, R. K. Lin, J. W. Chang, J. T. Chen, C. M. Shih, and C. Y. Chen. Inactivation of hmlh1 and hmsh2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched sputum samples. *J Clin Invest*, 111(6):887–95, 2003. 0021-9738 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- L. S. Ward, G. Brenta, M. Medvedovic, and J. A. Fagin. Studies of allelic loss in thyroid tumors reveal major differences in chromosomal instability between papillary and follicular carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 83(2):525–30, 1998. 0021-972X (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- P. J. Winyard, R. A. Risdon, V. R. Sams, G. R. Dressler, and A. S. Woolf. The pax2 transcription factor is expressed in cystic and hyperproliferative dysplastic epithelia in human kidney malformations. *J Clin Invest*, 98(2):451–9, 1996. 0021-9738 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- M. Xing, Y. Tokumaru, G. Wu, W. B. Westra, P. W. Ladenson, and D. Sidransky. Hypermethylation of the pendred syndrome gene slc26a4 is an early event in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res*, 63(9):2312–5, 2003a. 0008-5472 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- M. Xing, H. Usadel, Y. Cohen, Y. Tokumaru, Z. Guo, W. B. Westra, B. C. Tong, G. Tallini, R. Udelsman, J. A. Califano, P. W. Ladenson, and D. Sidransky. Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. *Cancer Res*, 63(9):2316–21, 2003b. 0008-5472 (Print) Journal Article.
- M. Xing, Y. Cohen, E. Mambo, G. Tallini, R. Udelsman, P. W. Ladenson, and D. Sidransky. Early occurrence of rassf1a hypermethylation and its mutual exclusion with braf mutation in thyroid tumorigenesis. *Cancer Res*, 64(5):1664–8, 2004. 0008-5472 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- W. Xu, M. A. Rould, S. Jun, C. Desplan, and C. O. Pabo. Crystal structure of a paired domain-dna complex at 2.5 a resolution reveals structural basis for pax developmental mutations. *Cell*, 80(4):639–50, 1995. 0092-8674 (Print) Comparative

---

Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

R. A. Young. Rna polymerase ii. *Annu Rev Biochem*, 60:689–715, 1991. 0066-4154 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.

M. Zannini, H. Francis-Lang, D. Plachov, and R. Di Lauro. Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol*, 12(9):4230–41, 1992. 0270-7306 Journal Article.

M. Zannini, V. Avantaggiato, E. Biffali, M. I. Arnone, K. Sato, M. Pischetola, B. A. Taylor, S. J. Phillips, A. Simeone, and R. Di Lauro. Ttf-2, a new forkhead protein, shows a temporal expression in the developing thyroid which is consistent with a role in controlling the onset of differentiation. *Embo J*, 16(11):3185–97, 1997. 0261-4189 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

---

---

# Abkürzungen

ATC	anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
cDNA	copy-DNA
CH	congenitale Hypothyreose
C-Zellen	Calcitonin sezernierenden Zellen
BSA	Bovin Serum Albumin
DAPK	death-associated-protein-kinase
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EXOExoI	Exonuclease
FTC	follikuläres Schilddrüsenkarzinom
HCC	Hürthle-Zell-Karzinome
HTH-Untereinheit	Helix-Turn-Helix-Untereinheit
ITC	insuläres Schilddrüsenkarzinom
LB-Medium	lysogeny-broth-Medium
LOH	loss of heterozygoty
MeCP	Methyl-CpG-bindendes-Protein
MTC	medulläres Schilddrüsenkarzinom
NIS	Natrium-Jod-Transporter
PAI-SD	PAI-Subdomäne
PAX-Gen	paired-box-Gen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPARG 1	Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor-Gamma 1
PTC	papilläres Schilddrüsenkarzinom
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RAR	retinoid acid receptor
rt-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR

---

---

RED-SD	RED-Subdomäne
RNA	Ribonukleinsäure
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfonat
T3	Trijodthyronin
T4	Tetraiodthyronin/ Thyroxin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Buffer
TIMP	Tissue-inhibitor-of-metalloproteinase
TITF	Thyroid transcription factor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
SAP	shrimp alkine phosphatase
Tg	Thyreoglobulin
TPO	thyroid peroxidase
TSH	thyroid stimulating hormone
TSHR	thyroid stimzulin hormone receptor
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie des Otto-Heubner-Centrums der Universitätsmedizin Charité, Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich unter Anleitung von PD Dr. Heiko Krude und PD Dr. Heike Biebermann durchgeführt.

Frau Prof. Dr. Grüters-Kieslich danke ich herzlich, dass ich es mir ermöglicht wurde, die Arbeit am Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Krude, für die Bereitstellung des Themas sowie die Betreuung und Korrektur dieser Arbeit, vor allen Dingen aber für sein Talent für ein Thema zu begeistern.

Bei Frau PD Dr. Biebermann möchte ich mich ganz herzlich für ihre unermüdliche Unterstützung, die hervorragende fachliche Anleitung sowie ihre aufmunternden Worte bei allen Schwierigkeiten des experimentellen Teils dieser Arbeit bedanken.

Sehr herzlich danke ich Dr. Cuong Hoang-Vu, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, für die schnelle und unkomplizierte Bereitstellung der Tumorproben.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei allen Labor-Mitarbeitern des Institut für Experimentelle Pädiatrische Endokrinologie für die ausgesprochen nette Zusammenarbeit bedanken. Mein ganz besonderer Dank gilt Rita Oeltjen und Nele Haufs, die mich beide in die Laborarbeit einführten und mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Matthias Sefrin danke ich sehr für die viele Zeit, die er opferte, um sich aller Computerprobleme anzunehmen.

Größter Dank gilt Ruth und Bruno Sefrin, die viele Stunden lang liebevoll meine beiden Töchter betreuten und ohne die diese Arbeit zu dem jetzigen Zeitpunkt noch nicht vollendet wäre.

Meinen Eltern, Geschwistern und Freunden danke ich für ihr Mitfühlen und ihren Zuspruch.

# Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.

## Selbständigkeitserklärung

Ich, Carmen-Andrea Holz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema "Genetische und epigenetische Veränderungen des *PAX8*-Gens in follikulären Schilddrüsenkarzinomen" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.