



Zentrum für Humangenetik

**VERGLEICHENDE MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN
BENIGNER MESENCHYMALER UND MALIGNER EPITHELIALER TUMOREN
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG DES SCHILDDRÜSENKARZINOMS**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Doctor rerum naturalium)

Vorgelegt dem Promotionsausschuß des Fachbereichs 2,
Biologie / Chemie, der Universität Bremen

von Markus Klemke

Bremen, im November 2013

Referent: Prof. Dr. Jörn Bullerdiek, Universität Bremen

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Dotzauer, Universität Bremen

Datum der Disputation: 28. Januar 2014

“I do not know what I may appear to the world, but to myself I seem to have been only like a boy playing on the seashore, and diverting myself in now and then finding a smoother pebble or a prettier shell than ordinary, whilst the great ocean of truth lay all undiscovered before me.”

Sir Isaac Newton

Zitiert nach: Memoirs of the life, writings, and discoveries of Sir Isaac Newton, Vol. II, Ch. 27.
Sir David Brewster, Edmonston and Douglas, Edinburgh 1860.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Familie der High Mobility Group Proteine	1
1.2	Leiomyome des Uterus	7
1.3	Tumoren der Schilddrüse	9
1.4	Zielsetzungen	13
2	MATERIAL UND METHODEN	15
2.1	Gewebeproben humaner Tumoren	15
2.2	RNA-Isolierungen	15
2.3	cDNA-Synthesen	15
2.4	Quantitative Real-Time RT-PCRs	16
2.5	RT-PCR	16
2.6	Gelelektrophoretische Auftrennung	17
2.7	Stimulation der HMGA2-Expression in adipösen mesenchymalen Stammzellen	17
2.8	Plasmidisolierung aus transformierten <i>E. coli</i> -Zellen	18
2.9	Transfektion eukaryotischer Zellen	18
3	ERGEBNISSE	19
3.1	Chromosomale Aberrationen und deren Auswirkungen auf die <i>HMGA</i> -Gene in Leiomyomen des Uterus	19
3.1.1	Overexpression of <i>HMGA2</i> in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease (Klemke et al., 2009)	20
3.1.2	6p21 rearrangements in uterine leiomyomas targeting <i>HMGA1</i> (Hashemi Nezhad et al., 2010)	31
3.1.3	Loss of let-7 binding sites resulting from truncations of the 3' untranslated region of <i>HMGA2</i> mRNA in uterine leiomyomas (Klemke et al., 2010)	39
3.2	Identifizierung einer intronischen miRNA durch Sequenzvergleiche	47
3.2.1	A microRNA encoded in a highly conserved part of the mammalian <i>HMGA2</i> gene (von Ahsen et al., 2008)	48
3.3	Molekulargenetische Marker zur Abgrenzung von Schilddrüsenkarzinomen follikulären Ursprungs	52
3.3.1	Upregulation of <i>HMGA2</i> in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias (Belge et al., 2008)	54

3.3.2	On the prevalence of the <i>PAX8-PPARG</i> fusion resulting from the chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) in adenomas of the thyroid (Klemke et al., 2011)	64
3.3.3	Detection of <i>PAX8-PPARG</i> fusion transcripts in archival thyroid carcinoma samples by conventional RT-PCR (Klemke et al., 2012)	72
3.4	Vergleichende molekulargenetische Untersuchungen benigner mesenchymaler und maligner epithelialer Tumoren	81
3.4.1	Correlated expression of <i>HMGA2</i> and <i>PLAG1</i> in thyroid tumors, uterine leiomyomas and experimental models (Klemke et al., 2014)	82
4	DISKUSSION	94
4.1	<i>HMGA2</i> als Marker für Malignome der Schilddrüse	94
4.2	Die Rolle der <i>HMGA</i> -Gene in Uterus-Leiomyomen	98
4.3	Die <i>PAX8/PPARG</i> -Genfusion in Schilddrüsentumoren	100
4.4	Identifizierung eines in <i>HMGA2</i> lokalisierten, intronischen miRNA-Gens durch Sequenzvergleiche	104
4.5	Wechselwirkungen zwischen <i>HMGA2</i> und <i>PLAG1</i>	105
4.6	Resümees	108
5	ZUSAMMENFASSUNG	110
6	SUMMARY	112
7	PUBLIKATIONSÜBERSICHT	114
7.1	Begutachtete Artikel	114
7.2	Posterpräsentationen	115
8	LITERATURVERZEICHNIS	116
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	136
10	ERKLÄRUNG	139
11	DANKSAGUNG	140

1 EINLEITUNG

1.1 Die Familie der High Mobility Group-Proteine

Die High Mobility Group-Proteine wurden 1973 im Chromatin aus Kalbsthymus entdeckt und nach ihrer hohen elektrophoretischen Mobilität in Polyacrylamid-Gelen benannt (Goodwin et al., 1973). Es handelt sich um chromatin-assoziierte Nicht-Histon-Proteine geringer Masse mit einem Molekulargewicht von weniger als 30 kDa, die einen hohen Anteil sowohl basischer als auch saurer Aminosäuren enthalten (Goodwin et al., 1973). Zur Gruppe der HMG-Proteine gehören die Familien der HMGA-, HMGB- und HMGN-Proteine, deren strukturelle Gemeinsamkeit ein saurer Karboxyterminus ist (Noro et al., 2003). Die Familie der HMGN-Proteine ist nach ihrer Nukleosomen-Bindedomäne benannt (Crippa et al., 1992), die eine Bindung an Nukleosomenkerne ermöglicht. Die HMGB-Proteine, die die zweite HMG-Familie bilden, zeichnen sich durch zwei basische HMG-Box-Domänen aus, die aus jeweils drei Alpha-Helices bestehen, welche zu einer L-förmigen Struktur gefaltet sind (Weir et al., 1993; Read et al., 1993).

Zur dritten HMG-Familie gehören die HMGA-Proteine, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Sie wurden 1983 in der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa entdeckt (Lund et al., 1983). Namensgebende Eigenschaft dieser Familie ist das Vorhandensein von drei AT-Hooks, mit denen die Proteine in der kleinen Furche an AT-reiche DNA-Abschnitte binden (Solomon et al., 1986; Elton et al., 1987; Reeves et al., 1987; Reeves und Nissen, 1990) und dadurch zu einer Krümmung der DNA führen können (Lehn et al., 1988). Sie werden daher auch als architektonische Transkriptionsfaktoren bezeichnet, die eine wichtige Funktion in der Regulation zahlreicher Gene ausüben (Bustin und Reeves, 1996; Bustin, 1999), obwohl sie keine intrinsische Kapazität zur Transkriptionsaktivierung haben (Wolffe, 1994). Allen HMGA-Proteinen ist außerdem eine Proteinbindedomäne gemeinsam, mit deren Hilfe sie Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eingehen können (Chau et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995; Reeves und Beckerbauer, 2005; Fusco und Fedele, 2007). Zwei Gene, *HMGA1* und *HMGA2*, kodieren für die Proteine der HMGA-Familie.

Das *HMGA1*-Gen ist in der chromosomalen Bande 6p21 lokalisiert (Friedmann et al., 1993). Durch alternatives Spleißen seiner mRNA können drei unterschiedliche Proteine gebildet werden, die man als HMGA1a, HMGA1b und HMGA1c bezeichnet (Johnson et al., 1989; Nagpal et al., 1999). Zwar können sie an die kleine Furche der DNA binden und sie krümmen, sind allein aber nicht in der Lage, die Transkription zu aktivieren (Thanos und Maniatis, 1992; Geierstanger et al., 1994). Durch posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierungen (Elton und Reeves, 1986; Nissen et al., 1991) und Acetylierungen (Munshi et al., 1998) können die HMGA1-Proteine reguliert werden. Ein zellzyklusabhängiger Phosphorylierungsstatus von HMGA1a steuert beispielsweise die Apoptoseinduktion in leukämischen

Zellen (Diana et al., 2001). Auch Methylierungen des HMGA1a-Proteins wurden in diesem Zusammenhang festgestellt (Sgarra et al., 2003a, Sgarra et al., 2003b). Als weitere posttranslationelle Modifikationen wurden Sumoylierungen, d. h. Markierungen durch das SUMO-Protein, von HMGA1 und Ribosylierungen sowohl von HMGA1 als auch von HMGA2 beschrieben (Li et al., 2007a; Giancotti et al., 1996).

In manchen benignen Tumoren mesenchymalen Ursprungs ist *HMGA1* von chromosomalen Aberrationen betroffen. Rearrangierungen der chromosomalen Bande 6p21 in chondroiden Lungenhamartomen (Johansson et al., 1993) führen zu einer Reaktivierung von *HMGA1* (Kazmierczak et al., 1996a; Xiao et al., 1997; Kazmierczak et al., 1999). Gleiches gilt auch für Lipome und Uterus-Leiomyome (Kazmierczak et al., 1998; Tallini et al., 2000; Bartuma et al., 2007). Die chromosomalen Bruchpunkte sind in den meisten Tumoren downstream von *HMGA1* lokalisiert (Kazmierczak et al., 1998), können aber auch upstream oder intragenisch auftreten (Kazmierczak et al., 1996a; Xiao et al., 1997).

Eine Überexpression von *HMGA1* wurde in verschiedenen Malignomen festgestellt, darunter kolorektale Karzinome (Fedele et al., 1996; Abe et al., 1999; Kim et al., 1999; Chiappetta et al., 2001; Balcerczak et al., 2003), Karzinome des Uterus (Bandiera et al., 1998), der Prostata (Tamimi et al., 1993; Tamimi et al., 1996), des Ovars (Masciullo et al., 2003), der Mamma (Flohr et al., 2003; Chiappetta et al., 2004; Peluso und Chiappetta, 2010), des Pankreas (Abe et al., 2000; Abe et al., 2002), der Schilddrüse (Chiappetta et al., 1995; Chiappetta et al., 1998; Kim et al., 2000) sowie Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs (Rho et al., 2007).

Die von HMGA1 ausgeübten Funktionen sind vielfältig. Ein gut untersuchtes Beispiel der Wirkung von HMGA1 ist die Expression des Interferon β -Gens (*IFN- β*) (Yie et al., 1999). Obwohl HMGA1 selbst nicht als Aktivator fungiert, ist es essentiell für die virusinduzierte Bildung des *IFN- β* -Enhancers. Die Bindung des HMGA1-Proteins an regulatorische Elemente im Bereich des *IFN- β* -Promotors bewirkt eine Konformationsänderung der DNA und führt zur Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren, darunter NF- κ B und ATF-2, sowie zur Bildung eines stabilen Nukleoproteinkomplexes, der als Enhanceosom bezeichnet wird (Thanos und Maniatis, 1992; Thanos und Maniatis, 1995). Für die Bindung des NF- κ B-Proteins an die DNA ist nicht nur deren durch HMGA1 verursachte Krümmung sondern auch eine direkte Interaktion zwischen HMGA1 und NF- κ B erforderlich (Du et al., 1993). Eine spezifische Acetylierung von HMGA1 durch das CREB-Bindeprotein (CBP) führt zum Zerfall des Enhanceosoms und zur Abschaltung der *IFN- β* -Expression (Munshi et al., 1998).

HMGA1 interagiert darüber hinaus auch mit dem Tumorsuppressor p53 und inhibiert über verschiedene Mechanismen die p53-abhängige Apoptose. Zum einen ist HMGA1 in der Lage, p53 zu binden und damit einerseits die Transkription von p53-Zielgenen zu beeinflussen, andererseits löst es die Aktivierung des p53-Inhibitors *MDM2* aus (Pierantoni et al.,

2006; Frasca et al., 2006). Des Weiteren übt *HMGA1* eine Funktion im Glukosestoffwechsel aus und wird auch mit Typ-2-Diabetes assoziiert (Brunetti et al., 2001; Foti et al., 2003; Foti et al., 2005; Iritano et al., 2012; Chiefari et al., 2012). Während HMGN-Proteine DNA-Reparaturmechanismen unterstützen, hemmt *HMGA1* außerdem die Nukleotidexzisionsreparatur UV-induzierter DNA-Schäden (Adair et al., 2005; Adair et al., 2007; Maloney et al., 2007).

Das vierte Protein der *HMGA*-Familie wird von einem eigenen Gen kodiert, das in der chromosomalen Region 12q14~15 lokalisiert ist und die Bezeichnung *HMGA2* trägt. Die ersten drei Exons kodieren für je eine AT-Hook-Domäne. Auf das dritte Exon folgt das mit mehr als 100 kb sehr große Intron 3. Das vierte Exon kodiert für eine Spacer-Domäne, die *HMGA2* von den *HMGA1*-Proteinen unterscheidet (Chau et al. 1995). Die saure, karboxyterminale Proteinbindedomäne wird vom fünften Exon kodiert (Chau et al., 1995; Ashar et al., 1996).

Ebenso wie *HMGA1* (Chiappetta et al., 1996) wird auch *HMGA2* in embryonalen Geweben exprimiert, wohingegen in adulten Geweben keine oder nur eine sehr geringe Expression erfolgt (Zhou et al., 1995; Rogalla et al., 1996; Hirning-Folz et al., 1998; Gattas et al., 1999). Besonders stark wird *HMGA2* in embryonalen Stammzellen exprimiert (Li et al., 2006), und mittlerweile ist bekannt, daß das Protein wichtige Funktionen in Stammzellen ausübt. Beispielsweise nimmt man an, daß *HMGA2* in die Differenzierung embryonaler Stammzellen zu Skelettmuskelzellen involviert ist (Caron et al., 2005). Eine Schlüsselrolle bei der Regulierung entwicklungsrelevanter Gene wird *HMGA2* zugeschrieben, da ein siRNA-vermittelter Knockdown die Expression des Pluripotenz-Markers UTF1 signifikant vermindert (Li et al., 2007b). Kontrovers diskutiert wird derzeit die Interaktion zwischen *HMGA2* und den mit zellulärer Seneszenz assoziierten Proteinen p14^{Arf} und p16^{Ink4a}, die durch *CDKN2A* kodiert werden. Versuche an murinen neuralen Stammzellen ergaben, daß *HMGA2* die Expression der Proteine p16^{Ink4a} und p19^{Arf} (homolog zum humanen p14^{Arf}) vermindert, wobei diese Wirkung mutmaßlich über eine Hemmung des Ink4a/Arf-Aktivatoren Jun-B erfolgt. Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde angenommen, daß *HMGA2* zur Aufrechterhaltung des Selbsterneuerungspotentials beiträgt (Nishino et al., 2008). Ähnliche Hinweise lieferten Experimente mit mesenchymalen Stammzellen, in denen gezeigt wurde, daß ein siRNA-vermittelter Knockdown von *HMGA2* zu einer Verminderung des Selbsterneuerungspotentials führt (Kubo et al., 2009). Untersuchungen an humanen Uterus-Leiomyomen zeigten andererseits aber, daß eine verstärkte *HMGA2*-Expression mit einer hohen p14^{Arf}-Expression korreliert (Markowski et al., 2010a). Des Weiteren löste die Stimulation von adipösen mesenchymalen Stammzellen (ADSCs) mit FGF1 eine simultane Steigerung der Expression von *HMGA2* und p14^{Arf} aus (Markowski et al., 2011). Eine Kooperation war zuvor auch für *HMGA2* und p16^{Ink4a} beschrieben worden (Narita et al., 2006). Daraus wurde geschlossen, daß die *HMGA*-Proteine durch die Hemmung proliferationsassoziiierter Gene zur zellulären Seneszenz und damit zu einer Blockade der malignen Transformation beitragen. Den scheinbaren Wider-

spruch zwischen onkogenem Potential einerseits und der Repression proliferationsassoziierter Gene andererseits versuchte man durch eine Abhängigkeit der HMGA-Wirkungen vom zellulären Kontext zu erklären (Narita et al., 2006).

Aufgrund der Möglichkeit, die durch Retroviren verursachte neoplastische Transformation von Schilddrüsenzellen der Ratte durch die Expression einer gegen *HMGA2* gerichteten Antisense-RNA zu inhibieren (Berlingieri et al., 1995), ging man von einer Schlüsselrolle von *HMGA2* bei der malignen Transformation von Thyreozyten aus. Zur gleichen Zeit erkannte man, daß Deletionen innerhalb von *HMGA2*, die in einem inaktiven Protein resultieren, zu einem verminderten Wachstum von Mäusen und zu stark reduziertem Fettgewebsanteil führen (Ashar et al., 1995; Zhou et al., 1995). Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, daß in verschiedenen benignen, soliden Tumoren die Region 12q14~15 (Schoenmakers et al., 1994; Schoenberg Fejzo et al., 1995; Kazmierczak et al., 1995a) bzw. das darin lokalisierte *HMGA2* von chromosomalen Aberrationen betroffen ist. Dazu gehören Lipome, Uterus-Leiomyome, chondroide Lungenhamartome, pleomorphe Speicheldrüsenadenome (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995; Kazmierczak et al., 1996b), Angiomyxome (Kazmierczak et al., 1995b; Nucci et al., 2001; Rabban et al., 2006) sowie Endometriumpolypen (Bol et al., 1996; Hennig et al., 1996a; Dal Cin et al., 1998). In Lipomen und chondroiden Lungenhamartomen wurde eine Fusion mit *LPP* beschrieben (Petit et al., 1996; Rogalla et al., 1998a), in Leiomyomen des Uterus sind beispielsweise *RAD51B* (Schoenmakers et al., 1999) oder *ALDH2* (Kazmierczak et al., 1995c) präferierte Translokationspartner von *HMGA2*, und in pleomorphen Speicheldrüsenadenomen wurden Fusionen mit *FHIT* (Geurts et al., 1997a) und *NFIB* (Geurts et al., 1998) beschrieben.

Eine starke Re-Expression von *HMGA2* kennzeichnet aber auch zahlreiche Malignome epithelialen Ursprungs wie Mammakarzinome (Rogalla et al., 1997), Bronchialkarzinome (Rogalla et al., 1998b; Sarhadi et al., 2006; Meyer et al., 2007), Pankreaskarzinome (Abe et al., 2003), Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle (Miyazawa et al., 2004) und Sarkome (Berner et al., 1997).

Von den vielfältigen, von HMGA2 ausgeübten Funktionen werdem im folgenden ausgewählt, besonders relevante Aspekte dargestellt.

HMGA2 bindet mit derselben Affinität wie HMGA1 an das PRDII-Element des *IFN- β* -Promotors und begünstigt ebenfalls die Bindung von NF- κ B, wodurch eine transkriptionelle Aktivierung eintritt (Mantovani et al., 1998; Noro et al., 2003). Am Beispiel des *IFN- β* -Promotors wurde auch gezeigt, daß durch Phosphorylierungen die DNA-Bindungsaffinität des HMGA2-Proteins beeinflußt werden kann (Schwanbeck et al., 2000). Während in diesem Fall die AT-Hooks von Phosphorylierungen betroffen sind, können auch Phosphorylierungen der sauren, karboxyterminalen Domäne die DNA-Bindungsaffinität vermindern (Sgarra et al.,

2009). Ebenfalls im Zusammenspiel mit NF- κ B reguliert *HMGA2* die Transkription von *IMP2* (Cleynen et al., 2007).

Eine Überexpression von *HMGA2* in Adenomen der Hypophyse geht auf eine Amplifikation zurück (Finelli et al., 2002) und bewirkt eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F1 (Fedele et al., 2006a; Fedele et al., 2006b), der unter der Kontrolle des Zellzyklusregulators pRB steht. Der Eintritt in die S-Phase wird verhindert, wenn E2F1 von pRB in einem Komplex mit der Histondeacetylase HDAC1 gebunden und damit inaktiviert wird (Seville et al., 2005). Die Interaktion zwischen *HMGA2* und pRB bewirkt eine E2F1-Aktivierung, indem HDAC1 aus dem Komplex gelöst wird, was zur Acetylierung von E2F1 durch Histonacetylasen und damit zur Stabilisierung seiner freien und aktiven Form führt, woraufhin *HMGA2* und pRB sich von E2F1 ablösen (Fedele et al., 2006c).

Des Weiteren interagiert *HMGA2* mit dem Repressorprotein p120^{E4F} und bedingt eine Dissoziation desselben vom cAMP-responsiven Element (CRE) des *CCNA2*-Promotors, wodurch die Transkription des Zellzyklusregulators Cyclin A aktiviert wird (Tessari et al., 2003). Auch indirekt wirkt *HMGA2* auf die Cyclin A-Expression, weil E2F1 an dessen Regulation beteiligt ist. Außerdem können *HMGA*-Proteine die Cyclin A-Expression auch durch die Aktivierung des AP1-Komplexes induzieren.

Der AP1-Komplex, zu dem u. a. drei Jun- und vier Fos-Proteine gehören, kann zahlreiche Gene aktivieren, die Funktionen in der Zellproliferation, Tumorigenese und Metastasierung erfüllen (Angel und Karin, 1991; Karin et al., 1997). Zwei seiner Proteine, Jun-B und FRA1, sind essentiell für die neoplastische Transformation von Schilddrüsenzellen der Ratte. Die Transkription beider Gene wird von *HMGA2* aktiviert, so daß sich bei hoher *HMGA2*-Konzentration die Zusammensetzung des AP1-Komplexes verändert und seine transkriptionelle Aktivität gesteigert wird. Somit besteht über die Proteine des AP1-Komplexes eine Verknüpfung zwischen *HMGA2* und der neoplastischen Transformation (Vallone et al., 1997).

Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) kann den Zellen epithelialer Tumoren die Fähigkeit zur Migration und unkontrollierter Proliferation verleihen (Huber et al., 2005). Eine Untersuchung des Transkriptionsprofils der Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 ergab, daß vor allem *HMGA1b* die Expression einiger EMT-Markergene verändert (Reeves et al., 2001). Mittlerweile ist bekannt, daß auch *HMGA2* in die epithelial-mesenchymale Transition involviert ist (Miyazawa et al., 2004). Zunächst wurde eine Aktivierung über den TGF- β /Smad-Signalweg festgestellt (Thuault et al., 2006). Später fand man zudem heraus, daß *HMGA2* den Transkriptionsfaktor Snail reguliert (Thuault et al., 2008), welcher ein E-Cadherin-Repressor und damit an der EMT beteiligt ist (Peinado et al., 2004). Daneben aktiviert *HMGA2* auch den Transkriptionsfaktor Twist (Tan et al., 2012). Eine starke *HMGA2*-Expression wurde insbesondere in der invasiven Front muriner und humaner Tumoren

festgestellt. Dabei aktiviert HMGA2 die Expression des TGF- β Typ 2 Rezeptors (TGF β RII) und somit den TGF- β -Signalweg. Dies spricht nicht nur für eine entscheidende Funktion von HMGA2 in der epithelial-mesenchymalen Transition, sondern man nimmt außerdem an, daß es insbesondere die Infiltration und Metastasierung epithelialer Tumoren begünstigt (Morishita et al., 2013). Übereinstimmende Daten stammen aus Untersuchungen an aus hepatozellulären Karzinomen hervorgegangenen Zelllinien. Es wurde nicht nur von einem Zusammenhang zwischen der Stärke der *HMGA2*-Expression und der Invasivität berichtet, sondern es zeigte sich auch eine Korrelation mit der Expression mehrerer EMT-Marker (Luo et al., 2013). Des Weiteren wird HMGA2 für eine Deregulation von EMT-Genen in Ovarialkarzinomen verantwortlich gemacht (Wu et al., 2011). In Prostatakarzinomen bewirkte eine posttranskriptionelle Hemmung der *HMGA2*-Expression durch miR-154 eine eingeschränkte Migrationsfähigkeit und verminderte Invasivität *in vitro*. Außerdem stieg die Konzentration des epithelialen Markers E-Cadherin an, wohingegen die des mesenchymalen Markers Vimentin abnahm. Dies wurde als Anzeichen für die Fähigkeit der miR-154 angesehen, über eine regulatorische Wirkung auf *HMGA2* der EMT entgegenwirken zu können (Zhu et al., 2013).

Der Promotor des DNA-Reparaturgens *ERCC1* wird sowohl von HMGA1 als auch von HMGA2 negativ reguliert, wobei die Bindung von HMGA2 mit höherer Affinität erfolgt (Borrmann et al., 2003). Somit ist auch HMGA2 an der Regulation von DNA-Reparaturmechanismen beteiligt. Im Gegensatz dazu wird das mit Brustkrebs in Verbindung stehende Tumorsuppressorgen *BRCA1* zwar von HMGA1 negativ reguliert, nicht jedoch von HMGA2 (Baldassarre et al., 2003).

Um den Mechanismus der *HMGA2*-Regulation aufzuklären, versuchte man zunächst, den Promotor als positiv regulatorisches Element zu charakterisieren (Rustighi et al., 1999; Rustighi et al., 2002). Nach Experimenten mit ähnlicher Zielsetzung gelangten belgische Wissenschaftler zu der Annahme, daß *HMGA2* von weiteren, noch unbekanntem Elementen negativ reguliert werden muß (Ayoubi et al., 1999). Es bestand die Vermutung, daß die 3'-UTR regulatorische Elemente enthält, womit auch eine pathologische Relevanz von Transkripten mit Verlusten in der 3'-UTR, wie sie in einem pleomorphen Speicheldrüsenadenom entdeckt worden waren (Geurts et al., 1997b), erklärbar wäre. Außerdem führt im Gegensatz zum Wildtyp-*HMGA2* sowohl ein HMGA2-LPP-Fusionsprotein als auch ein trunkiertes Protein zur malignen Transformation von NIH3T3-Zellen (Fedele et al., 1998). Der experimentelle Nachweis für eine regulatorische Funktion der 3'-UTRs beider *HMGA*-Gene erfolgte wenige Jahre später (Borrmann et al., 2001), wobei der exakte Regulationsmechanismus noch nicht aufgeklärt werden konnte. Dies gelang sechs Jahre später zwei unabhängigen Gruppen, die zeigen konnten, daß MicroRNAs der let-7-Familie in der Lage sind, *HMGA2* posttranskriptionell zu hemmen (Mayr et al., 2007; Lee und Dutta, 2007). Es folgten Berichte

über die supprimierende Wirkung der let-7-Familie auf die *HMGA2*-Expression in Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (Hebert et al., 2007) und in Uterus-Leiomyomen (Wang et al., 2007). Let-7 wird seinerseits durch Lin-28 reguliert, das die Prozessierung der primären let-7-Transkripte posttranskriptionell inhibiert (Viswanathan et al., 2008; Newman et al., 2008; Heo et al., 2008). Interessanterweise gilt Lin-28 als ein Faktor, mit dessen Hilfe somatische Zellen zu pluripotenten Stammzellen reprogrammiert werden können (Yu et al., 2007; Büssing et al., 2008). Vorstellbar ist somit, daß die hohe *HMGA2*-Expression in embryonalen Stammzellen auf eine wegen hoher Lin-28-Expression verminderte Inhibierung durch let-7 zurückzuführen sein kann.

1.2 Leiomyome des Uterus

Eine der in der vorliegenden Arbeit als Modell für die Wirkung der *HMGA*-Gene genutzten Tumorentitäten sind humane Uterus-Leiomyome. Sie sind die am häufigsten auftretenden gynäkologischen Tumoren. Der Verlauf kann symptomlos erfolgen, zu den von ihnen ausgehenden Symptomen können aber unter anderem Abdominalschmerzen, Menorrhagien oder selten sogar Sterilität zählen (Stewart et al., 2001). Es handelt sich um benigne Tumoren mesenchymalen Ursprungs, zu deren Prävalenz unterschiedliche Angaben zu finden sind. Es ist mindestens ein Drittel aller Frauen im Alter von 30 Jahren oder älter betroffen, es wird aber vermutet, daß die Prävalenz sogar 77 % erreichen könnte (Zaloudek und Norris, 1987; Cramer und Patel, 1990; Baird et al., 2003; Heinemann et al., 2003). In bis zu 50 % der Tumoren können klonale chromosomale Veränderungen festgestellt werden (Nilbert und Heim, 1990; Rein et al., 1991). Untersuchungen zur Klonalität ergaben, daß Uterus-Leiomyome monoklonal sind (Wong et al., 1992; Mashal et al., 1994; Hashimoto et al., 1995; Canevari et al., 2005; Zhang et al., 2006). Multiple Myome entwickeln sich jedoch unabhängig voneinander (Linder und Gartler, 1965; Townsend et al., 1970). Anhand rekurrenter Aberrationen lassen sich mehrere zytogenetische Gruppen unterscheiden. Am häufigsten treten Translokationen unter Beteiligung der Region 12q14~15 auf, häufig als $t(12;14)(q14\sim15;q23\sim24)$, und auch interstitielle Deletionen des Chromosoms 7 als $del(7)(q22q32)$ sind nicht selten. In einer weiteren Gruppe ist die chromosomale Bande 6p21 von Aberrationen betroffen. Eine Untersuchung von 115 Leiomyomen ergab, daß Tumoren mit einer 12q14~15-Veränderung überdurchschnittlich groß sind, wohingegen die Größe von Myomen mit einer $del(7)$ unterhalb des Durchschnitts liegt (Rein et al., 1998; Hennig et al., 1999). Außerdem gibt es Hinweise darauf, daß intramural oder subserös lokalisierte Myome häufiger zytogenetische Aberrationen aufweisen als submuköse (Brosens et al., 1998). Die Translokation $t(12;14)(q14\sim q15;q23\sim q24)$ betrifft etwa 20 % aller Myome mit aberrantem Karyotyp (Meloni et al., 1992), aber auch variante Translokationen und andere Aberrationen

wie parazentrische Inversionen können die Region 12q14~15 betreffen (Wanschura et al., 1997).

Aberrationen der Region 12q14~15 (Schoenberg Fejzo et al., 1995) wirken sich auf das in diesem Bereich lokalisierte *HMGA2* aus (Schoenmakers et al., 1995; Hennig et al., 1996a; Schoenberg Fejzo et al., 1996). Mittels Northern Blot und RT-PCR wurde festgestellt, daß Uterus-Leiomyome mit dieser chromosomalen Veränderung verstärkt *HMGA2* exprimieren, während im Myometrium derselben Patientinnen keine *HMGA2*-Expression nachgewiesen werden konnte (Gattas et al., 1999). Auch immunhistochemische Untersuchungen stellten eine erhöhte *HMGA2*-Expression in Uterus-Leiomyomen fest (Klotzbücher et al., 1999). Diese Beobachtungen wurden auch in einer ersten Untersuchung unter Verwendung einer quantitativen Real-Time RT-PCR bestätigt (Gross et al., 2003). Die chromosomalen Bruchpunkte sind häufig upstream von *HMGA2* in Entfernungen von 10 bis 100 kb, seltener auch downstream lokalisiert (Schoenberg Fejzo et al., 1996; Quade et al., 2003). Als Fusionspartner wurden verschiedene Gene identifiziert wie beispielsweise *RAD51B* (Schoenmakers et al., 1999) oder *HEI10* (Mine et al., 2001a). Ebenso wurden aber auch aberrante Spleißvarianten (Kurose et al., 2001) oder trunkierte Proteine nachgewiesen, die zwar alle drei AT-Hooks besaßen, denen jedoch die karboxyterminale Domäne fehlte (Klotzbücher et al., 1999; Mine et al., 2001b; Quade et al., 2003).

Am zweithäufigsten tritt eine interstitielle Deletion del(7)(q22-q32) auf (Sargent et al., 1994; Ishwad et al., 1995), in einigen Untersuchungen war dies auch die häufigste Aberration (Nilbert und Heim, 1990; Ozisik et al., 1993). Sie kann sowohl als einzige chromosomale Aberration als auch in Kombination mit 12q14~q15-Rearrangierungen auftreten (Sait et al., 1989). Wenn die del(7) als solitäre zytogenetische Aberration auftritt, ist einer RT-PCR-basierten Untersuchung zufolge keine erhöhte *HMGA2*-Expression feststellbar. Wird die del(7) jedoch von einer t(12;14) begleitet, dann können *HMGA2*-Transkripte auch mittels RT-PCR nachgewiesen werden (Hennig et al., 1997).

In etwa 5 % der Uterus-Leiomyome mit aberrantem Karyotyp ist die chromosomale Bande 6p21 betroffen. Diese Veränderungen treten zum Beispiel als reziproke Translokation mit den Chromosomen 1, 10 oder 14 als Translokationspartner auf, aber auch Translokationen mit anderen Chromosomen wurden ebenso festgestellt wie Inversionen (Nilbert et al., 1989; Kiechle-Schwarz et al., 1991; Ozisik et al., 1995; Hennig et al., 1996b; Sornberger et al., 1999). Betroffen von Aberrationen der Bande 6p21 ist das darin lokalisierte Gen *HMGA1* (Kazmierczak et al., 1996c; Williams et al., 1997), allerdings wurden in Leiomyomen des Uterus bislang keine intragenischen Rearrangierungen von *HMGA1* nachgewiesen (Kazmierczak et al., 1998). Inzwischen wurde bekannt, daß in einem großen Anteil der Uterus-Leiomyome Mutationen im Gen *MED12* vorhanden sind, das für eine Untereinheit des Mediator-Komplexes kodiert (Mäkinen et al., 2011a; Mäkinen et al., 2011b). Der Mediator-Komplex ist

ein aus insgesamt 26 Untereinheiten bestehender und mit der RNA-Polymerase II interagierender Regulator der Transkription zahlreicher Gene (Taatjes, 2010). Aufgrund der beobachteten Häufigkeit von *MED12*-Mutationen nimmt man an, daß diese Mutationen ursächlich für die Genese von Uterus-Leiomyomen sind, wobei eine Aktivierung des Wnt/-Catenin-Signalweges vermutet wird (Markowski et al., 2012). Mittlerweile wurden mutierte *MED12*-Allele auch in malignen Tumoren des Uterus sowie in extrauterinen Leiomyomen nachgewiesen (Pérot et al., 2012; Ravegnini et al., 2013; Markowski et al., 2013). Interessanterweise wurden *MED12*-Mutationen in Myomen mit normalem Karyotyp als auch in den zytogenetischen Gruppen mit del(7) und 6p21-Aberration gefunden, es ist jedoch kein Fall bekannt, in dem eine *MED12*-Mutation gleichzeitig mit einer 12q14~15-Veränderung auftritt. Daraus leitete sich die Vermutung ab, daß Veränderungen von *MED12* und *HMGA2* alternative Auslöser für die Entstehung von Uterus-Leiomyomen sein könnten (Markowski et al., 2012).

1.3 Tumoren der Schilddrüse

Einen frühen Hinweis auf das onkogene Potential von *HMGA2* in der Schilddrüse lieferten Experimente, die mit Thyreozyten der Ratte durchgeführt worden waren. Eine durch Retroviren ausgelöste neoplastische Transformation ließ sich verhindern, wenn die *HMGA2*-Expression durch eine Antisense-RNA blockiert wurde (Berlingieri et al., 1995). Weitere Untersuchungen zur Rolle der HMGA-Proteine bei der Entstehung von Schilddrüsentumoren konzentrierten sich jedoch vornehmlich auf das verwandte *HMGA1* (Chiappetta et al., 1995; Chiappetta et al., 1998; Kim et al., 2000). Da über den Zusammenhang zwischen der Tumorigenese in der Schilddrüse und *HMGA2* wenig bekannt war, bildet die Untersuchung der *HMGA2*-Expression in Schilddrüsentumoren einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit.

Der häufigste Tumor der Schilddrüse ist das Adenom, bei dem es sich um eine klonale Läsion handelt (Thomas et al., 1989). Im Rahmen von Sektionsstudien wurde dieser benigne Tumor in 1 - 20 % aller untersuchten Schilddrüsen gefunden (Doniach, 1978; Rosai et al., 1992). Dagegen sind Karzinome der Schilddrüse vergleichsweise selten. Bei Frauen macht Schilddrüsenkrebs etwa 1,9 %, bei Männern etwa 0,7 % aller Krebserkrankungen aus. In Deutschland erkrankten im Jahr 2006 1620 Männer und 3660 Frauen daran (Broschüre „Krebs in Deutschland 2005/2006“, RKI, 2010). Weltweit lag die Inzidenz 2002 bei über 140.000 Fällen (37.424 Männer, 103.589 Frauen) (Parkin et al., 2005). Nur etwa 1 - 12 % der Schilddrüsenkarzinome entstehen aus den kalzitininproduzierenden C-Zellen, mit 88 - 99 % entstehen sie mehrheitlich aus den epithelialen Follikelzellen (Schmid et al., 2003; Schmid et al., 2005). Nach der aktuellen Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation werden Schilddrüsenkarzinome in fünf Entitäten unterteilt: papilläre (PTC) und follikuläre Karzinome (FTC),

die auch als gut differenzierte Karzinome zusammengefasst werden, medulläre (MTC), anaplastische (ATC) und seit 2004 auch gering differenzierte Karzinome (PDTC; DeLellis et al., 2004). In Gebieten mit ausreichender Jodversorgung ist das papilläre Karzinom der häufigste maligne Schilddrüsentumor, in Strumaendemiegebieten mit Jodmangel tritt es in etwa ebenso häufig auf wie das follikuläre Karzinom (Schmid et al., 2003).

Als Mikrokarzinome werden papilläre Karzinome bezeichnet, deren Durchmesser einen Zentimeter nicht überschreitet. Ihre klinische Relevanz wird jedoch kontrovers diskutiert (Rosai et al., 2003; Dietlein et al., 2004). Aufgrund der hohen Überlebensrate von mehr als 90 % ist die Prognose des papillären Karzinoms sehr gut (Schmid et al., 2005). Sie hängt offenbar aber auch vom Vorhandensein von Gefäßeinbrüchen ab (Gardner et al., 2000). Das PTC kann bereits frühzeitig metastasieren, wobei diese Metastasierung vorwiegend lymphogen erfolgt (Machens et al., 2005). In etwa der Hälfte der papillären Karzinome kann eine Punktmutation des Gens *BRAF* festgestellt werden, die meisten in Form der Hot-Spot-Mutation V600E (Cohen et al., 2003; Xu et al., 2003). Weitere 10 - 20 % der PTCs weisen *RET/PTC*-Rearrangierungen auf, und in etwa 10 % ist *NTRK1* von Rearrangierungen betroffen (Nikiforova und Nikiforov, 2008; Vriens et al., 2009). *BRAF*-Mutationen und *RET/PTC*-Rearrangierungen treten nicht gemeinsam in PTCs auf sondern schließen sich gegenseitig aus (Soares et al., 2003). Während in klassischen PTCs vor allem *RET/PTC1* vorkommt, weist die follikuläre Variante (FVPTC) häufiger *RET/PTC3* auf (Nikiforov, 2002). FVPTCs weisen zudem häufiger als klassische PTCs *RAS*-Mutationen auf (Zhu et al., 2003). *RET/PTC*-Rearrangierungen treten besonders oft in Karzinomen auf, die durch eine erhöhte Strahlungsexposition induziert wurden. Die Reaktorkatastrophe von Tschernobyl im April 1986 setzte große Mengen des radioaktiven Isotops ^{131}I frei, das wie das natürlich vorkommende, stabile Jodisotop ^{127}I in der Schilddrüse metabolisiert wird, so daß dieses Organ besonders hohen Strahlungsdosen ausgesetzt wird. Infolge der Tschernobyl-Katastrophe stieg insbesondere bei Kindern die Schilddrüsenkrebsrate an, wobei *RET/PTC*-Rearrangierungen gehäuft nachweisbar sind (Nikiforov, 2006; Williams, 2008). Mutationen des *BRAF*-Gens scheinen dagegen nicht gehäuft nach Strahlungsexposition aufzutreten (Lima et al., 2004).

Die Häufigkeit von *BRAF*-Mutationen, die gelegentlich auftretenden *RAS*-Mutationen sowie die *RET/PTC*-Rearrangierungen deuten gemeinsam auf einen maßgeblichen Anteil des *RET/RAS/BRAF/MAPK*-Signalweges bei der Entstehung papillärer Schilddrüsenkarzinome hin (Kimura et al., 2003; Soares et al., 2003; Xing et al., 2007).

Das follikuläre Schilddrüsenkarzinom ist ein maligner Tumor mit Follikelzellendifferenzierung, dessen Kernmorphologie nicht die für PTCs charakteristischen Veränderungen aufweist (DeLellis et al., 2004). Es macht 10 - 30 % aller Schilddrüsenkarzinome aus und ist damit deutlich seltener als das PTC, in Jodmangelgebieten liegt die Inzidenzrate jedoch höher

(Schmid et al., 2010a). Im Gegensatz zur überwiegend lymphogenen Metastasierung der papillären Karzinome zeichnen sich follikuläre Karzinome durch eine vorwiegend hämatogene Metastasierung aus. Fernmetastasen treten im Skelett, in den Lungen oder im Gehirn auf. Neben der TNM-Kategorie hat die Unterscheidung zwischen minimal- und grob-invasiven FTCs große Bedeutung für die Prognose (Schmid et al., 2005). Bei etwa 37 – 50 % aller FTC handelt es sich um minimal-invasive Karzinome, bei denen einzelne Kapseldurchbrüche oder Gefäßeinbrüche nachweisbar sind. Fernmetastasen gehen von etwa 10 % der minimal-invasiven FTCs aus, wohingegen grob-invasive FTCs in etwa 50 % der Fälle Fernmetastasen absiedeln (Schmid et al., 2005). Entsprechend unterscheiden sich auch die Zehnjahresüberlebensraten erheblich. Während sie bei minimal-invasiven FTCs bei 80 - 90 % liegt, erreicht sie bei grob-invasiven FTCs nur etwa 50 % (Schmid et al., 2005). Es wird außerdem vermutet, daß im Falle eines minimal-invasiven FTCs die Unterscheidung zwischen Kapseldurchbruch und Gefäßeinbruch die Prognose entscheidend beeinflusst (Baloch und LiVolsi, 2001). Des weiteren ist die onkozytäre Variante eines FTCs mit einer schlechteren Prognose verbunden als die nicht-onkozytäre Variante, wofür zumindest anteilig die geringere Fähigkeit, radioaktive Jodisotope zu speichern, und das dadurch verminderte Ansprechen auf eine Radiojod-Therapie verantwortlich sein könnte (Schröder, 1988). Lymphknotenmetastasen treten bei follikulären seltener und weniger frühzeitig als bei papillären Karzinomen auf. In der Regel finden sie sich erst bei FTCs, die eine Größe von 2 cm erreichen (Machens et al., 2005). Insbesondere minimal-invasive FTCs stellen eine diagnostische Herausforderung dar, da sie nur durch den Nachweis von Gefäßeinbrüchen oder Kapseldurchbrüchen von Adenomen abgegrenzt werden können (DeLellis et al., 2004). Dafür ist oftmals die Untersuchung zahlreicher Gewebepblöcke erforderlich (Schmid et al., 2003; Schmid und Farid, 2006).

RAS-Mutationen finden sich häufig in follikulären Karzinomen, allerdings treten sie auch in Adenomen auf und sind damit nicht karzinomspezifisch (Namba et al., 1990). Häufig ist *NRAS* und seltener *HRAS* von solchen Mutationen betroffen (Hara et al., 1994; Oyama et al., 1995; Nikiforova et al., 2003b). Von pathogenetischer Relevanz dürfte außerdem der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) / AKT-Kinase-Signalweg sein, da eine Aktivierung der PI3K/AKT-Kaskade beschrieben wurde, die unter anderem durch Mutationen in den Genen *PI3KCA* und *PTEN* ausgelöst wird (Xing, 2008; Vriens et al., 2009). Des weiteren wurde eine Fusion der Gene *PAX8* und *PPARG* in follikulären Karzinomen entdeckt, die auf eine chromosomale Translokation t(2;3)(q13;p25) zurückgeht (Kroll et al., 2000). Später stellte sich allerdings heraus, daß auch diese Aberration ebenfalls in Adenomen nachgewiesen werden kann (Cheung et al., 2003), und gelegentlich findet sie sich auch in FVPTCs (Castro et al., 2005; Castro et al., 2006). Eine *PAX8-PPARG*-Fusion tritt in der Regel nicht kombiniert mit *RAS*-Mutationen auf (Nikiforova et al., 2003b).

Zum Teil kontrovers diskutiert wird die Frage, ob Adenome durch sekundäre genetische Veränderungen die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen und damit zu einem FTC werden, oder ob ein Tumor a priori und damit auch ohne nachweisbare Kriterien des follikulären Karzinoms als maligner Tumor festgelegt ist. Kapseldurchbrüche oder Gefäßeinbrüche treten allerdings erst ab einer Tumorgröße von 1 - 2 cm auf (Machens et al., 2005). Da sie die morphologische Voraussetzung für die Fähigkeit zur Metastasierung darstellen, wird die sogenannte Adenom-Karzinom-Sequenz als wahrscheinlicher angesehen (Schmid et al., 2010a; Schmid et al., 2010b). Dementsprechend wird auch angenommen, daß manche nach histologischen Kriterien als benigne einzustufende Tumoren bereits ein prämalignes Potential besitzen (Arora et al., 2008). Für eine Adenom-Karzinom-Sequenz spricht auch, daß genetische Veränderungen wie *RAS*-Mutationen (Nikiforova et al., 2003a), *PAX8-PPARG*-Fusionen (Cheung et al., 2003) sowie eine Deregulation des Transkriptionsfaktors *FOXO3a* (Karger et al., 2009) sowohl in Adenomen als auch in follikulären Karzinomen nachgewiesen wurden.

Die schlechteste Prognose ist mit dem anaplastischen Karzinom (ATC) verknüpft. Man nimmt an, daß ATCs sowohl aus differenzierten Karzinomen als auch de novo entstehen können. Die meisten Patienten versterben bereits innerhalb eines halben Jahres nach der Diagnosestellung (Schmid et al., 2005).

Medulläre Karzinome (MTC) haben ihren Ursprung in den parafollikulären C-Zellen (DeLellis et al., 2004). Neben den sporadischen MTC sind bis zu 50 % der MTC genetisch determiniert und treten als familiäres MTC oder im Rahmen eines MEN2A- oder MEN2B-Syndroms (Multiple endokrine Neoplasie) auf (Schmid et al., 2005). Von Mutationen in hereditären MTCs ist fast immer das *RET*-Protoonkogen betroffen (van Heyningen, 1994).

Ein wichtiges Werkzeug in der Diagnostik von Schilddrüsentumoren ist die Feinnadel-Aspirationsbiopsie (FNAB). Im Rahmen einer Punktion werden Zellen aus dem Tumor zur zytologischen Begutachtung gewonnen. So lassen sich z. B. papilläre Karzinome anhand ihrer typischen Kernmorphologie bereits präoperativ erkennen. Wegen einer nahezu identischen Zellmorphologie ist dagegen die Abgrenzung follikulärer Karzinome von Adenomen anhand zytologischer Präparate kaum möglich (Greaves et al., 2000; Baloch et al., 2002; Smith et al., 2005; Takano 2011). Zur Abklärung malignitätsverdächtiger Tumoren erfolgt eine Resektion, da zur Beurteilung der Dignität eine histopathologische Begutachtung erforderlich ist, in deren Rahmen die Kapsel genauestens untersucht werden muß. Nur in einem kleinen Teil der aufgrund zytologischer Untersuchungen als malignitätsverdächtig eingestuftten Schilddrüsentumoren wird postoperativ allerdings ein follikuläres Karzinom diagnostiziert (Goellner et al., 1987; Chiappetta et al., 1998; Greaves et al., 2000; Baloch et al., 2002). Auch bei der follikulären Variante des papillären Karzinoms kann eine Differentialdiagnose problematisch sein (Lloyd et al., 2004). In seltenen Fällen kann selbst nach sorgfältiger

histologischer Untersuchung die Dignität eines Schilddrüsentumors nicht eindeutig beurteilt werden (Schmid, 2010b), und es existiert eine Reihe von Sonderfällen, die leicht fehlinterpretiert werden und zu einer falschen Diagnose führen können (Rosai et al, 2006). Es besteht daher weiterhin ein Bedarf an neuen Markern, die insbesondere die Diagnostik der Tumoren zu unterstützen vermögen, deren Klassifizierung mit Hilfe der Zytologie nahezu unmöglich ist oder selbst nach histologischer Aufarbeitung eine Herausforderung darstellt.

1.4 Zielsetzungen

Bisherige Erkenntnisse zur *HMGA2*-Expression in Uterus-Leiomyomen mit chromosomalen Aberrationen der Region 12q14~15 sollten durch die Untersuchung eines umfangreichen Kollektivs verifiziert werden, wobei ergänzend zu vorherigen Ansätzen eine Quantifizierung der Genexpression unter Verwendung der äußerst sensitiven Real-Time RT-PCR erfolgen sollte. Vergleichbare Untersuchungen beschränkten sich bislang auf relativ geringe Probenumfänge. Des Weiteren sollte auch der Expressionsstatus von *HMGA2* in Uterus-Leiomyomen ermittelt werden, die keine zytogenetisch erkennbare Veränderung im Bereich des *HMGA2*-Locus aufweisen. Dieser Ansatz dient der Klärung der Frage, ob das Gen auch in Tumoren mit zytogenetisch normalem Karyotyp eine pathogenetische Rolle spielen kann und somit nicht nur in der 12q14~15-Gruppe ein entscheidender Faktor in der Tumorigenese der Uterus-Leiomyome ist. Außerdem wurde untersucht, wie häufig trunkierte *HMGA2*-Transkripte in Uterus-Leiomyomen mit chromosomalen Bruchpunkten in der Region 12q14~15 vorkommen, da ein Verlust von miRNA-Bindestellen die in dieser zytogenetischen Gruppe besonders stark erhöhte Expression des Gens erklären könnte. Vergleichend wurde ebenfalls mittels Real-Time RT-PCR die *HMGA1*-Expression in Leiomyomen mit Aberrationen der Bande 6p21 quantifiziert, da weitaus weniger Daten zum Zusammenhang zwischen dieser chromosomalen Veränderung und der Auswirkung auf *HMGA1* vorlagen.

Ein weiterer Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit sind genetische Eigenschaften der Schilddrüsenkarzinome mit follikulärem Ursprung. Trotz intensiver Bemühungen konnte bisher kein molekulargenetischer Marker identifiziert werden, der insbesondere die Diagnostik follikulär strukturierter Tumoren mit ausreichend großer Sicherheit unterstützt und für die Beurteilung der Dignität auch grenzwertiger Fälle hinreichend sensitiv und spezifisch ist. Da eine Reaktivierung von *HMGA2* in diversen Malignomen einerseits und eine verstärkte Expression des nahe verwandten *HMGA1* in Schilddrüsenkarzinomen andererseits beschrieben worden war, dennoch aber nur wenige Untersuchungen zur Rolle von *HMGA2* in der Tumorigenese der Schilddrüse erfolgt sind, wurde die Expression sowohl in benignen als auch in malignen Schilddrüsentumoren mittels Real-Time RT-PCR quantifiziert. Ziel dieser Untersuchung war es, Aussagen über die potentielle Eignung von *HMGA2* als Marker für Malignome dieses Organs treffen zu können. Aufgrund der von pleomorphen Adenomen

bekannten Überexpression von *PLAG1*, die einerseits bei chromosomalen Aberrationen der Bande 8q12 auftritt, in der *PLAG1* lokalisiert ist, die andererseits auch ohne diese Veränderung aber bei gleichzeitiger *HMGA2*-Überexpression beobachtet werden kann, wurde außerdem die *PLAG1*-Expression in malignen und benignen Schilddrüsentumoren untersucht. Zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen der Expression beider Gene wurden zusätzlich Uterus-Leiomyome mit Aberrationen der chromosomalen Banden 12q14~15 herangezogen, da in dieser zytogenetischen Gruppe *HMGA2* bekanntermaßen stark aktiviert ist. Ergänzend wurden Zellkulturversuche durchgeführt, um die aufgrund der Ergebnisse der Tumoruntersuchungen aufgestellte Hypothese eines regulatorischen Zusammenhangs zwischen *HMGA2* und *PLAG1* zu verifizieren. Als weitere genetische Eigenschaft und zeitweilig als Malignitätsmarker angesehene Besonderheit wurde die in follikulären Neoplasien der Schilddrüse vorkommende Fusion der Gene *PAX8* und *PPARG* untersucht. Da bisherige Angaben zu ihrer Prävalenz in Adenomen sowie in follikulären Karzinomen zum Teil relativ stark divergieren, wurde zunächst untersucht, wie häufig die der Fusion zugrundeliegende Translokation t(2;3)(q13;p25) in einer umfangreichen Serie von Adenomen auftritt. Obwohl unstrittig sein dürfte, daß die Prävalenz der *PAX8-PPARG*-Fusion in follikulären Karzinomen höher als in Adenomen ist, wurden auch diesbezüglich stark schwankende Angaben veröffentlicht. Als methodisches Problem bestand hierbei der Umstand, daß nahezu sämtliche Arbeiten an frischen oder kryokonservierten Gewebeproben durchgeführt wurden. Das Ziel eines weiteren Ansatzes war es daher, die ungleich leichter verfügbaren, formalinfixierten Gewebe aus pathologischen Archiven für zukünftige Untersuchungen zur Prävalenz der Fusion in FTCs zugänglich zu machen.

2 MATERIAL UND METHODEN

Im folgenden Abschnitt wird eine Übersicht über die Herkunft verwendeter Gewebeproben sowie über die angewandten Methoden gegeben. An dieser Stelle nicht aufgeführt werden die FISH, immunhistochemische Färbungen sowie zytogenetische Methoden. Ausführlichere Schilderungen zur Methodik finden sich in den jeweiligen Publikationen.

2.1 Gewebeproben humaner Tumoren

Bei molekulargenetischen Untersuchungen von Tumoren der Schilddrüse wurden in der Regel formalinfixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben verwendet. Diese stammten aus pathologischen Instituten, überwiegend aus dem Zentrum für Pathologie am Klinikum Bremen-Mitte, und waren histologisch begutachtet worden. In Einzelfällen standen auch Zelllinien bzw. Primärkulturen oder schockgefrorene Gewebeproben zur Verfügung.

Die Probenentnahmen aus Uterus-Leiomyomen nach Myomenukleationen oder Hysterektomien fanden direkt im Operationssaal statt. Dabei wurde jeweils ein Teil der Probe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und ein weiterer Teil in Hanks Salzlösung (HBSS, Hanks' balanced salt solution) mit Penicillin (200 IE/ml) und Streptomycin (200 µg/ml) zur Anlage von Primärkulturen und späteren Karyotypisierung transportiert. Im Falle von Hysterektomien konnte häufig auch eine Probe des tumorfreien Myometriums asserviert werden. Die Probenentnahmen fanden im Krankenhaus St. Joseph-Stift, Bremen, sowie im DIAKO, Evangelisches Diakonie-Krankenhaus, Bremen, statt.

2.2 RNA-Isolierungen

Zur RNA-Isolierung aus FFPE-Geweben wurden zunächst 5 µm dünne Schnitte angefertigt und mit Xylol entparaffiniert. Die RNA-Isolierung erfolgte anschließend mit dem „High Pure RNA Paraffin Kit“ (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim) gemäß der Anweisungen des Herstellers. In späteren Arbeiten wurde stattdessen das „RNeasy FFPE Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden) eingesetzt. Bei RNA-Isolierungen aus kryokonservierten Geweben wurde das „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) gemäß Herstellerangaben eingesetzt. Die RNA-Konzentration wurde im Anschluß an die Isolierung spektrophotometrisch bestimmt. Dazu wurde das „BioPhotometer“ (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet.

2.3 cDNA-Synthesen

Für Real-Time RT-PCRs wurden in der Regel 250 ng Gesamt-RNA in Reaktionsansätzen zu 20 µl nach der von Gerard et al. (1997) beschriebenen Methode revers transkribiert. Als Primer wurden Hexanukleotide (Invitrogen GmbH bzw. Life Technologies GmbH, Darmstadt) verwendet, als Enzym wurde zumeist die Reverse Transkriptase des Moloney-Mäuse-

Leukämievirus (M-MLV RT, Invitrogen bzw. Life Technologies) nach den Vorgaben des Herstellers eingesetzt. Außerdem diente „RNase OUT“ (Invitrogen bzw. Life Technologies) als RNase-Inhibitor. Bei Verwendung von Hexanukleotiden wurden die Reaktionsansätze für 10 min bei 25 °C inkubiert, bevor die Reaktion bei 37 °C für 50 min stattfand und anschließend das Enzym durch Erhitzen auf 70 °C für 15 min inaktiviert wurde.

2.4 Quantitative Real-Time RT-PCRs

Zur genspezifischen Expressionsanalyse kamen entweder kommerzielle TaqMan-Assays (Applied Biosystems Deutschland GmbH bzw. Life Technologies GmbH, Darmstadt) oder separat synthetisierte Primer und TaqMan-Sonden (Heid et al., 1996) zum Einsatz, die in der Regel FAM als 5'-Fluorophore enthielten. Als 3'-Quencher dienten neben TAMRA auch nicht-fluoreszierende Fluorophore, zum Teil auch in Verbindung mit sogenannten „minor groove binders“ (MGB). Des Weiteren wurde der „TaqMan Universal PCR Master Mix“ (Applied Biosystems bzw. Life Technologies) verwendet. Die Reaktionen liefen auf dem „7300 Real-Time PCR System“ (Applied Biosystems) unter folgendem Temperaturprofil ab: 50 °C für 2 min, 95 °C für 10 min und bis zu 50 PCR-Zyklen mit 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Die Auswertung der Experimente erfolgte unter Verwendung der „7300 System Sequence Detection Software“ (Applied Biosystems). Als endogene Kontrolle in relativen Quantifizierungen diente entweder 18S rRNA oder *HPRT1*.

Die relativen Genexpressionen wurden mit Hilfe der komparativen ΔC_T -Methode berechnet (Livak und Schmittgen, 2001; Schmittgen und Livak, 2008). Dabei wird zunächst für jede Probe die Differenz aus den mittleren C_T -Werten des Zielgens und der endogenen Kontrolle (ΔC_T) ermittelt. Eine Probe wird als sogenannter Kalibrator festgelegt, zu dessen Genexpression die Messungen aller anderen Proben in Relation gesetzt werden, in dem die Differenz aus ΔC_T -Wert jeder Einzelprobe und ΔC_T -Wert des Kalibrator berechnet wird ($\Delta\Delta C_T$). Daraus lassen sich mit der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ relative Werte ableiten, wobei der Kalibrator definitionsgemäß den Wert 1 erhält.

2.5 RT-PCR

Für herkömmliche RT-PCRs wurden cDNA-Synthesen wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings wurde bis zu 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Zur Amplifizierung wurden verschiedene Taq-Polymerasen eingesetzt, darunter beispielsweise die „Dream Taq DNA Polymerase“ (Fermentas GmbH, St. Leon Rot) mit einem mitgelieferten Reaktionspuffer. Zum Nachweis der *PAX8-PPARG*-Fusionstranskripte wurden die genspezifischen Primer in einer Konzentration von 0,1 µM verwendet. Die hauptsächlich verwendeten Thermocycler waren der „mastercycler gradient“ (Eppendorf) und der „TGradient“ (Biometra GmbH, Göttingen). Die initiale Denaturierung bei 95 °C wurde üblicherweise für 5 - 10 min durchgeführt. Dann

folgten 40 - 45 PCR-Zyklen, in denen die Denaturierungstemperatur bei 95 °C lag, gefolgt von einer Annealing-Phase bei einer den jeweils verwendeten Primern angepaßten Temperatur (etwa 60 bis 65 °C) sowie einer Elongationsphase bei 72 °C. Die Dauer der einzelnen Phasen variierte, lag in der Regel aber zwischen 30 - 60 sec. Die finale Elongation erfolgte für 5 - 7 min bei 72 °C.

2.6 Gelelektrophoretische Auftrennung

Zur Separation von PCR-Produkten wurden Agarose-Gele unterschiedlicher Konzentrationen hergestellt. Für längere Fragmente wurde „LE Agarose“ (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) in Verbindung mit TAE-Puffer, für sehr kurze PCR-Produkte stattdessen „Sieve 3:1 Agarose“ (Biozym) mit TBE-Puffer verwendet. In Anhängigkeit von der Anwendung wurde auf verschiedene Fragmentlängenmarker zurückgegriffen, am häufigsten kamen jedoch „GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder“ und „Ultra Low Range DNA Ladder“ (Fermentas) zum Einsatz. Die Agarosegele wurden gefärbt mit 10 mg/ml Ethidiumbromid (Invitrogen). Die angelegte Spannung lag bei Gelen mittlerer Größe und Verwendung der LE Agarose meist um 100 V, bei kleinen Gelen und Sieve 3:1 Agarose dagegen stets bei 80 V. Im Anschluß an die Gelelektrophorese wurden die Gele auf einem UV-Transilluminator UST-30M-8E (Biostep GmbH, Jahnsdorf) unter UV-Licht mit einer Wellenlänge von 312 nm betrachtet und ggf. zur Dokumentation fotografiert.

Für Sequenzierungen der PCR-Produkte wurden die entsprechenden Banden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kits“ (Qiagen) aufgereinigt und zum Sequenzieren an einen externen Dienstleister gesendet (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg).

2.7 Stimulation der HMGA2-Expression in adipösen mesenchymalen Stammzellen

Die Gewinnung adipöser mesenchymaler Stammzellen aus adultem Fettgewebe erfolgte wie an anderer Stelle beschrieben (Markowski et al., 2011). In sterilen Petrischalen mit einem Durchmesser von 9,6 cm wurden 300.000 Zellen in Medium TC199 (200 IE/ml Penicillin, 200 µg/ml Streptomycin) mit 20 % FCS ausgesät. Die Serumkonzentration wurde nach 24 h auf 1 % gesenkt. Nach weiteren 24 h wurde das Medium verworfen und ersetzt durch Medium TC199, das FGF1 (Jena Bioscience, Jena) in einer Konzentration von 25 ng/ml enthielt. Parallel wurden Zellen in Medium TC199 mit 1 % FCS ohne FGF1 als Kontrolle kultiviert. Nach Inkubationszeiten von 12, 24 und 72 h wurden die Zellen in Puffer RLT mit β -Mercaptoethanol lysiert. Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers.

2.8 Plasmidisolierung aus transformierten *E. coli*-Zellen

Es lagen kryokonservierte *Escherichia coli*-Zellen vor, die mit den gewünschten Plasmiden transformiert worden waren. Dabei handelte es sich um den eukaryotischen Expressionsvektor pCR3.1 (Invitrogen), der einen CMV-Promotor enthält, ohne Insert einerseits und um denselben Vektor, in den die HMGA2-kodierende Sequenz kloniert worden war. Die transformierten Zellen wurden aufgetaut und zum Animpfen von Vorkulturen verwendet. Dazu wurden 6 ml LB-Medium (1 % NaCl, 1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 100 µg/ml Ampicillin, pH 7,0) angeimpft und bei 37 °C ca. 7 h inkubiert. Als Hauptkultur wurden 300 µl der Vorkulturen in 300 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin gegeben und ebenfalls bei 37 °C über Nacht inkubiert. Die Isolierung der Plasmide erfolgte unter Verwendung des Nucleo Bond Xtra Maxi Plus EF Kits (Macherey-Nagel GmbH, Düren) gemäß Herstellerangaben. Die Konzentrationen der Plasmide wurden spektrophotometrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurde ein Verdau von je 2 µg Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* („Fast Digest“, Fermentas) gemäß Herstellerangaben bei 37 °C für 30 min durchgeführt und anschließend in einem 1,5-prozentigen Agarose-Gel aufgetrennt. Der Vektor besitzt zwei Schnittstellen für dieses Enzym, die das einklonierte Insert flankieren, so daß nach dem Verdau und gelelektrophoretischer Auftrennung die Präsenz eines Inserts festgestellt und dessen Länge abgeschätzt werden kann.

2.9 Transfektion eukaryotischer Zellen

In 2 ml Medium mit 10 % DMSO kryokonservierte Zellen der MCF7-Zelllinie wurden bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, in 8 ml Medium TC199 mit 20 % FCS überführt und bei 120 x g für 10 min sedimentiert. Die Zellpellets wurden in Medium resuspendiert, in Zellkulturflaschen mit 5 ml Medium überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgetauscht. Bei konfluentem Wachstum wurden die Zellen trypsiniert (TrypLE Express, Life Technologies) und passagiert. Zur Transfektion wurden pro Well einer 6-Well-Zellkulturplatte (Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden) 150.000 Zellen in 2 ml Medium TC199 ausgesät und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden sie mit Hilfe der Transfektionsreagenz Lipofectamine LTX (Life Technologies) transfiziert. Zur Bildung der Transfektionskomplexe wurde antibiotika- und serumfreies Medium verwendet. Neben dem Leervektor ohne Insert und dem HMGA2-Expressionsvektor wurde je ein Ansatz unbehandelt belassen sowie mit Transfektionsreagenz ohne Plasmid-DNA behandelt. In einem Gesamtvolumen von 500 µl wurden 7 µl Transfektionsreagenz und 2,5 µg Plasmid-DNA für 25 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen in 2 ml Medium getropft. Die transfizierten Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Isolierung der mRNA erfolgte 24 h bzw. 48 h nach der Transfektion unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (Qiagen).

3 ERGEBNISSE

3.1 Chromosomale Aberrationen und deren Auswirkungen auf die *HMGA*-Gene in Leiomyomen des Uterus

Benigne Tumoren mesenchymalen Ursprungs weisen häufig klonale chromosomale Aberrationen auf, anhand derer sie zytogenetischen Gruppen zugeordnet werden können. Dies trifft auf etwa ein Fünftel bis die Hälfte aller Leiomyome des Uterus zu (Nilbert und Heim, 1990; Kiechle-Schwarz et al., 1991; Pandis et al., 1991; Rein et al., 1991; Meloni et al., 1992). Myome mit Veränderungen der Region 12q14~15 bilden eine der beiden größten zytogenetischen Gruppen (Heim et al., 1988; Schoenmakers et al., 1995; Wanschura et al., 1997). Nahezu ebenso häufig ist die chromosomale Bande 7q22 entweder von einer interstitiellen Deletion del(7)(q22q32) oder anderen Rearrangierungen betroffen (Rein et al., 1991; Ozisik et al., 1993; Sargent et al., 1994). Deutlich seltener treten Myome mit Aberrationen der chromosomalen Bande 6p21 auf (Nilbert und Heim, 1990; Kiechle-Schwarz et al., 1991; Ozisik et al., 1995). Wie auch aus Untersuchungen anderer benigner mesenchymaler Tumoren bekannt ist, sind die *HMGA*-Gene häufig von chromosomalen Veränderungen betroffen. Rearrangierungen der Region 12q14~15, in der *HMGA2* lokalisiert ist, treten unter anderem in Lipomen (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995; Sreekantaiah et al., 1991; Nielsen und Mandahl, 2002; Mandahl und Mertens, 2010), in pleomorphen Speicheldrüsenadenomen (Sandros et al., 1990; Bullerdiek et al., 1993; Schoenmakers et al., 1995), in chondroiden Lungenhamartomen (Dal Cin et al., 1993; Fletcher et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995; Rogalla et al., 2000) sowie in Endometriumpolypen (Walter et al., 1989; Vanni et al., 1993) auf. Ebenso ist auch die Bande 6p21, in der das verwandte *HMGA1*-lokalisiert ist, häufig in Lipomen, chondroiden Lungenhamartomen und Endometriumpolypen von chromosomalen Rearrangierungen betroffen (Johansson et al., 1993; Xiao et al., 1997; Kazmierczak et al., 1998; Kazmierczak et al., 1999; Tallini et al., 2000; Bartuma et al., 2007; Medeiros et al., 2012), nicht jedoch in pleomorphen Speicheldrüsenadenomen (Rohen et al., 1999).

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen chromosomaler Aberration und Auswirkung auf die *HMGA*-Gene in Uterus-Leiomyomen unternommen. In den nachfolgend vorgestellten Publikationen wurde untersucht, wie sich Aberrationen der Banden 12q14~15 und 6p21 auf die Expression der *HMGA*-Gene auswirken. Im Fokus einer weiteren Arbeit stand der zugrundeliegende Mechanismus, der bei 12q14~15-Veränderungen die *HMGA2*-Expression beeinflussen kann.

3.1.1 Overexpression of *HMGA2* in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease (Klemke et al., 2009)

Unter den Uterus-Leiomyomen mit klonalen chromosomalen Aberrationen liegen am häufigsten solche Veränderungen vor, die die chromosomale Region 12q14~15 betreffen (Heim et al., 1988). Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß in Tumoren dieser zytogenetischen Gruppe *HMGA2* von den chromosomalen Veränderungen betroffen ist (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995; Schoenberg Fejzo et al., 1995; Hennig et al., 1996a; Wanschura et al., 1997). Im Gegensatz zu Lipomen müssen die Bruchpunkte in Myomen nicht zwangsläufig intragenisch lokalisiert sein, sondern können sowohl upstream als auch downstream von *HMGA2* auftreten. Eine Veränderung der Transkripte bleibt dann zwar aus, es wird aber eine verstärkte Genexpression ausgelöst (Schoenberg Fejzo et al., 1996; Hennig et al., 1999; Tallini et al., 2000; Gross et al., 2003; Quade et al., 2003). Bislang nicht hinreichend untersucht war das Expressionslevel in Myomen, die keine den *HMGA2*-Locus betreffenden chromosomalen Veränderungen aufweisen. Daher wurden insgesamt 180 Uterus-Leiomyome von 100 Patientinnen zunächst karyotypisiert. Zytogenetisch wurde eine Aberration im Bereich 12q14~15 in elf Tumoren nachgewiesen. Zumeist handelte es sich dabei um eine Translokation t(12;14)(q15;q24). In einem weiteren Leiomyom schlug die Karyotypisierung fehl, eine *HMGA2* betreffende Rearrangierung konnte aber mittels FISH nachgewiesen werden. Die übrigen Leiomyome wiesen einen normalen Karyotyp oder andere klonale Aberrationen auf. Darüber hinaus lagen Gewebeproben von 57 Myometriem, die ebenfalls zur Quantifizierung der *HMGA2*-Expression mittels qRT-PCR herangezogen wurden. Von 51 Patientinnen standen zusammengehörige Gewebeproben des Myometriums und mindestens eines Leiomyoms zur Verfügung. Die Quantifizierung ergab, daß die Myome mit 12q14~15-Veränderungen *HMGA2* erwartungsgemäß am stärksten exprimieren. Als unerwartet niedrig stellte sich das Expressionslevel allerdings in einem Myom mit zytogenetisch nachgewiesener t(12;14)(q15;q24) heraus. In diesem Fall wurde eine Interphase-FISH an formalinfixiertem Gewebe des Tumors mit einer den *HMGA2*-Locus überspannenden Sonde durchgeführt. In 98 % der ausgewerteten Zellkerne wurden dabei kolokalisierte Signale der Bruchpunktsonde beobachtet, was auf einen intakten *HMGA2*-Locus hindeutet. Auffällig hoch war dagegen das Expressionslevel in einem Myom mit nach zytogenetischer Untersuchung normalem 46,XX-Karyotyp. Auch dieser Tumor wurde einer FISH unterzogen, wobei eine Rearrangierung in 23 % der Zellen festgestellt wurde, die zytogenetisch nicht in Erscheinung getreten war und die die hohe *HMGA2*-Expression erklären kann. Aufgrund der Ergebnisse der FISH mußte dieses Myom folglich der Gruppe mit 12q14~15-Aberration zugeordnet werden. Nach den kombinierten Ergebnissen der zytogenetischen und molekularzytogenetischen Untersuchungen wiesen zwölf der 180 untersuchten Leiomyome den

HMGA2-Locus betreffende Aberrationen auf. In all diesen Fällen wurde eine sehr starke Expression des Gens festgestellt.

Im Gegensatz zu der gut untersuchten Situation in Myomen mit chromosomaler Veränderung der Region 12q14~15 war nicht bekannt, ob auch Myome mit normalem Karyotyp bzw. mit andersartigen Aberrationen eine veränderte *HMGA2*-Expression aufweisen. Von 51 Hysterektomie-Patientinnen lagen auch Gewebeproben von tumorfreiem Myometrium vor, so daß ein Vergleich der *HMGA2*-Expression von insgesamt 107 Leiomyomen, davon fünf mit aberranter Region 12q14~15, mit dem dazugehörigen Myometrium möglich war. Es wurde festgestellt, daß nicht nur die Gruppe der Myome mit 12q14~15-Veränderungen verstärkt *HMGA2* exprimiert, sondern daß auch Myome ohne diese chromosomale Aberration das Gen mehrheitlich wesentlich stärker exprimieren als die glatte Muskulatur des jeweiligen Uterus. Von 101 Myomen ohne 12q14~15-Veränderung lag das Expressionslevel in nur elf Tumoren unterhalb des im Myometrium der jeweils selben Patientin ermittelten Wertes. Auch zwischen der mittleren relativen *HMGA2*-Expression in tumorfreien Myometrien (1,8) und Myomen ohne 12q14~15-Veränderung (11,4) bestand ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

I.

**Overexpression of *HMGA2* in uterine leiomyomas
points to its general role for the pathogenesis of the disease.**

Klemke M, Meyer A, Hashemi Nezhad M, Bartnitzke S, Drieschner N, Frantzen C, Schmidt EH, Belge G, Bullerdiek J. 2009. *Genes, Chromosomes and Cancer* 48: 171-178.

Eigenanteil:

- Probenentnahme aus Uterus-Leiomyomen und dazugehörigen Myometrien zur Kryokonservierung sowie Karyotypisierung
- Durchführung der RNA-Isolierung sowie der relativen Quantifizierung der *HMGA2*-Expression und deren Auswertung in Zusammenarbeit mit A. Meyer
- Verfassen des Manuskripts in Zusammenarbeit mit N. Drieschner und J. Bullerdiek

Overexpression of *HMGA2* in Uterine Leiomyomas Points to its General Role for the Pathogenesis of the Disease

Markus Klemke,^{1†} Anke Meyer,^{1†} Maliheh Hashemi Nezhad,¹ Sabine Bartnitzke,¹ Norbert Drieschner,¹ Christiane Frantzen,² Ernst Heinrich Schmidt,³ Gazanfer Belge,¹ and Jörn Bullerdiek^{1,4*}

¹Center for Human Genetics, University of Bremen, 28359 Bremen, Germany

²Women's Clinic, St. Joseph-Stift Hospital, 28209 Bremen, Germany

³Department of Obstetrics and Gynecology, DIAKO Evang. Diakonie Hospital, 28239 Bremen, Germany

⁴Clinic for Small Animals and Research Cluster REBIRTH, University of Veterinary Medicine, 30137 Hanover, Germany

An overexpression of *HMGA2* is supposed to be a key event in the genesis of leiomyoma with chromosomal rearrangements affecting the region 12q14-15 targeting the *HMGA2* gene, but gene expression data regarding differences between uterine leiomyomas with and those without 12q14-15 aberrations are insufficient. To address the question whether *HMGA2* is only upregulated in the 12q14-15 subgroup, the expression of *HMGA2* was analyzed in a comprehensive set of leiomyomas ($n = 180$) including tumors with 12q14-15 chromosomal aberrations ($n = 13$) and matching myometrial tissues ($n = 51$) by quantitative RT-PCR. The highest expression levels for *HMGA2* were observed in tumors with rearrangements affecting the region 12q14-15, but although *HMGA2* is expressed at lower levels in leiomyomas without such aberrations, the comparison between the expression in myomas and matching myometrial tissues indicates a general upregulation of *HMGA2* regardless of the presence or absence of such chromosomal abnormalities. The significant ($P < 0.05$) overexpression of *HMGA2* also in the group of fibroids without chromosomal aberrations of the 12q14-15 region suggests a general role of *HMGA2* in the development of the disease. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Uterine leiomyomas (UL, fibroids) are the most frequent gynecological tumors and, despite being benign, constitute an enormous public health burden. Among the symptoms caused by uterine leiomyomas are menorrhagia, abdominal pain, and infertility (Stewart, 2001). Their actual prevalence is still a matter of debate and seems to vary among populations, but at least one third of women aged 30 years or older have one or more UL (Cramer and Patel, 1990; Baird et al., 2003; Heinemann et al., 2003). Their incidence seems to be higher in African American than in European American or European women (Marshall et al., 1998).

Currently, mutations of the two human genes encoding high mobility group proteins of the HMGA type, i.e., *HMGA1* and *HMGA2* have been assumed to be causally linked with the development of subsets of uterine leiomyomas. Both genes encode members of the so-called high mobility group proteins. HMGA proteins are capable of binding to the minor groove of AT-rich DNA with three DNA-binding domains (so-called AT-hooks), thus inducing conformational changes in chromatin structure and enabling the

regulation of the expression of various target genes. In addition, they can interact with other proteins by means of their acidic domain (Fusco and Fedele, 2007). *HMGA1* and *HMGA2* map to chromosomal bands that are targeted by nonrandom structural chromosomal abnormalities found in uterine leiomyomas, i.e., 6p21 for *HMGA1* (Kazmierczak et al., 1996) and 12q14-15 for *HMGA2* (Ashar et al., 1995; Schoenmakers et al., 1995). Usually, these regions are affected by chromosomal translocations but inversions can occur as well with structural chromosomal aberrations affecting 12q14-15 being much more frequent than those affecting 6p21 (Nilbert and Heim, 1990). The molecular alterations resulting from the cytogenetic deviations generally seem to

Supported by: Tönjes-Vagt-Stiftung, Bremen.

[†]Markus Klemke and Anke Meyer contributed equally to this work.

*Correspondence to: Jörn Bullerdiek, Center for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Str. ZHG, 28359 Bremen, Germany. E-mail: bullerd@uni-bremen.de

Received 9 May 2008; Accepted 18 September 2008

DOI 10.1002/gcc.20627

Published online 3 November 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

include an upregulation of the genes (Tallini et al., 2000; Gross et al., 2003). With regard to *HMGA2*, a considerable fraction of the chromosomal breakpoints has been assigned to regions outside the open reading frame of the gene, thus primarily affecting its expression rather than its protein sequence (Quade et al., 2003). Thus, overexpression of *HMGA2* seems to be sufficient to trigger tumorigenesis. It is obvious that an enhanced level of *HMGA2* is pathogenetically relevant in a subset of some 10–20% of uterine leiomyomas (Hennig et al., 1999), but it remains an open question whether or not an increased level of *HMGA2*, compared to normal myometrium, may characterize also leiomyomas that do not have *HMGA2* rearrangements. A recent study by Peng et al., (2008) suggests that upregulation of *HMGA2* may be a more general phenomenon in UL but the analyzed tumors were not genetically classified and no matched samples were analyzed individually by quantitative RT-PCR. Herein, we have quantitated the level of *HMGA2* mRNA in a large series of uterine leiomyomas.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Samples

Samples of uterine leiomyomas and myometrium were snap frozen in liquid nitrogen immediately after surgery and stored at -80°C . In case of UL another part of the tumor was used for cell culturing and karyotyping. Informed consent was obtained from all patients.

For fluorescence in situ hybridization (FISH) analyses HOPE (HEPES-glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect)-fixed, paraffin-embedded tissue sections were used. The tissues were cut into 5 μm sections which were subsequently used for FISH analyses.

RNA Isolation, Reverse Transcription, and Quantitative RT-PCR

RNA was isolated from fresh-frozen tissue samples with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) including DNase treatment according to the manufacturer's instructions and quantitated by spectrophotometry. After reverse transcription of 250 ng of total RNA using M-MLV RT (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and random hexamers, the *HMGA2* mRNA levels were determined by relative quantification referring to the expression of 18S rRNA. Real-time PCR was performed on a 7300 Real-Time PCR System with Assay

No. Hs00171569_m1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) for the detection of *HMGA2* and primers and probe for 18S rRNA as described previously (Belge et al., 2008).

Analysis of Gene Expression

The relative expression was calculated by the ΔC_t method, using 18S rRNA as endogenous control and by choosing the *HMGA2* expression of a myometrial sample as calibrator. The significance of differential *HMGA2* expression between the different groups (myometrium, myoma with and without 12q14-15 aberrations) was determined by Student's *t*-test.

Cell Culture

After surgery, samples of primary tumors were stored in Hank's solution with antibiotics (200 IU/ml penicillin, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin). For cell culture the tumor samples were minced and treated with 0.26% (200U/ml) collagenase (Serva, Heidelberg, Germany) for 5–8 hr. After centrifugation, the pellet was resuspended in culture medium (TC 199 with Earle's salts supplemented with 20% fetal bovine serum, 200 IU/ml penicillin, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin) and incubated at 37°C and 5% CO_2 .

Chromosome Analyses

For chromosome analyses exponentially growing cultures of leiomyoma cells were used. Metaphase chromosome spreads were prepared by using colcemid (0.06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 1 hr) to arrest cultured cells during mitosis. A hypotonic solution (culture medium and aqua bidest in a 1:6 ratio) and the fixative (methanol and acetic acid in a 3:1 ratio) were then applied sequentially. Finally, the chromosome suspension was dropped onto glass slides. The chromosomes were GTG-banded according to routine techniques. Karyotype description followed ISCN (2005).

HMGA2-Specific Break-Apart Probes and FISH

For FISH three BAC clones were used as break-apart probes. RP11-745O10 (AC078927) and RP11-293H23 (AC012264) are located distal (3') to *HMGA2*. RP11-269K4 (AQ478964 and AZ516203) is located proximal (5') to *HMGA2*. Labeling was performed by nick translation (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) either with digoxigenin (RP-269K4) or biotin (RP11-

OVEREXPRESSION OF *HMGA2* IN UTERINE LEIOMYOMAS

173

745O10 and RP11-293H23). For each FISH experiment 2 ng/ μ l of the distally located probes (RP11-745O10 and RP11-293H23) and 3 ng/ μ l of RP11-296K4 were used in 15 μ l hybridization solution containing 50% formamide, 2 \times SSC, 10% dextrane sulfate and 105 ng/ μ l COT human DNA.

FISH analysis on metaphase preparations was performed after GTG banding of the metaphase spreads. Treatment of metaphases and subsequent FISH experiments were performed as described previously (Kievits et al., 1990) with a few modifications. For one slide 25 μ l of hybridization mixture were used. Codenaturation was performed on a Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) for 3 min at 80°C followed by O/N hybridization in a humidified chamber at 37°C. Posthybridization was performed at 61°C for 5 min in 0.1 \times SSC. Subsequent treatment of slides was performed as described previously (Kievits et al., 1990). For detection of the hybridized probes antidigoxigenin fluorescein fab fragments (Roche Diagnostics) and Cy3-conjugated streptavidin (Dianova, Hamburg, Germany) were used. Slides were counterstained with DAPI (0.75 μ g/ml) (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

For FISH, formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue sections were deparaffinized with diethylether. Protease digestion was done with a pepsin ready-to-use solution (DCS, Hamburg, Germany) for 12–17 min. After dehydration in a 70%, 80%, and 95% ethanol series the sections were postfixed with 1% formaldehyde in 1 \times PBS for 15 min. Prior to codenaturation the sections were dehydrated again. Codenaturation was performed on a Mastercycler gradient (Eppendorf) for 5 min at 85°C followed by O/N hybridization in a humidified chamber at 37°C. Posthybridization was performed at 42°C or 61°C for 2 min in 0.4 \times SSC/0.3%NP-40. Subsequent treatment of slides and detection of hybridized probes were performed as described for FISH on metaphase preparations.

Slides were examined in an Axioskop 2 plus fluorescence microscope (Zeiss, Göttingen, Germany). Images were captured with an AxioCam MRm digital camera and were edited with Axio-Vision (Zeiss). For metaphase preparations, 10 metaphases were examined. For analysis of FFPE tissue sections at least 100 nonoverlapping nuclei from different (at least three) areas of the tumors were scored. Nuclei with two colocalized red/green signals (RG) were scored as normal.

Nuclei with one colocalized red/green signal, one single red, and one single green signal (1RG1R1G) were scored as positive for *HMGA2* rearrangement.

RESULTS

For this study 180 uterine leiomyomas from 100 patients have been investigated by qRT-PCR for the expression level of *HMGA2*. A total of 57 myometrium samples from uteri removed because of the occurrence of UL were investigated as well. For 51 of these samples, matching tissue from one or more leiomyomas was available. All UL have been karyotyped successfully based on at least 10 G-banded metaphases showing a resolution of 400 bands per haploid set or higher.

Based on cytogenetics the group of UL was further subdivided into those showing aberrations of chromosomal region 12q14-15 ($n = 13$; Table 1) and those with an apparently normal karyotype or other clonal aberrations ($n = 167$), respectively.

As to these three groups, i.e., myometrium, UL with 12q14-15 changes, and other UL *HMGA2* expression was determined by qRT-PCR using fresh-frozen samples. The average relative *HMGA2* mRNA expression was 1.99 for the myometria and 261.41 for all UL. When distinguishing between both subgroups of UL outlined above average expression levels were 3213.78 for UL with aberrations in the chromosomal region 12q14-15 and 31.59 for those without changes in this region, respectively.

Thus, even within the group of UL without cytogenetically detectable rearrangements of the *HMGA2* locus at 12q14-15 *HMGA2* mRNA was expressed at a higher level than in myometrium (Fig. 1). Differences between all leiomyomas and myometrium as well as between leiomyomas without 12q14-15 aberrations and myometrium were statistically significant ($P < 0.005$ and $P < 0.05$, respectively). Furthermore, an individual analysis of the matched samples (51 myometrial tissues and 107 corresponding UL) was performed. The mean *HMGA2* expression was 11.37 in karyotypically normal UL ($n = 101$) and 1.77 in the corresponding myometrial tissues ($n = 51$).

The results clearly show that in nearly all cases within each of the paired samples the leiomyomas showed higher *HMGA2* expression than the corresponding myometrium (Fig. 2).

One case with a normal karyotype and an unexpectedly high *HMGA2* expression as well as

TABLE 1. Karyotypes of the 13 Leiomyomas with Chromosome 12 Aberrations and Results of Interphase FISH with *HMGA2* Specific Break-Apart Probes

Karyotype	Relative <i>HMGA2</i> expression	FISH results (2RG/IRGIRIG) ^a
46,XX,inv(5)(q15q31~33),t(12;14)(q15;q24)[13]	8.6	98/1
46,XX,t(12;15;14)(q15;q26;q24)[20]/46,XX[1]	302.3	–
46,XX[36]	894.5	72/23
–	993.3	41/51
46,XX,der(1)r(1;2),t(12;14)(q15;q24)[4]/46,XX,t(12;14)(q15;q24)[13]	1047.8	m
46,XX,t(12;14)(q15;q24)[9]/46,XX[3]	1327.3	–
46,XX,r(1),t(1;12;14)(p36.3;q14;q24)[19]	1722.5	–
46,XX,t(2;12)(q33;q13)[17]	2381.6	–
46,XX,der(12),der(14)?ins(14;12)[8]/46,idem,r(1)[4]	3444.3	–
46,XX,t(3;5;12)(q23~25;p13~15;q13~15)[11]/45,XX,idem,-22[10]	4450.7	–
46,XX,t(12;14)(q15;q24)[5]/46,XX[9]	5906.1	–
45,XX,t(12;14)(q15;q24),der(14)t(12;14)(q15;q24),-22[15]	7760.3	–
45,XX,t(12;14)(q15;q24),der(14)t(12;14)(q15;q24),-22[15]	11539.7	–

^aPercentage of nuclei either with two colocalized signals (2RG) or with one colocalized, one single red and one single green signal (IRGIRIG) indicating a *HMGA2* rearrangement.

m, FISH was performed on metaphase preparations (Fig. 4). All 10 metaphases showed a breakpoint upstream of *HMGA2*.

a second myoma with a cytogenetically visible t(12;14) and a rather low *HMGA2* expression were checked by interphase FISH. In the cytogenetically normal myoma, FISH showed *HMGA2* disruption in 23% of the cells (Fig. 3, Table 1). The tumor with visible t(12;14) but low expression of *HMGA2* showed two colocalized signals in 98% of the nuclei, indicating an intact *HMGA2* locus.

Metaphase FISH was also done on one case with a t(12;14)(q15;q24) (Fig. 4). Interestingly, the probe located proximal to *HMGA2* (RP11-269K4) showed three signals: on the normal chromosome 12, the derivative chromosome 12, and the derivative chromosome 14 (Fig. 4C), indicat-

ing a breakpoint located 5' of *HMGA2*. The approximately 16kb distance between the probe RP11-269K4 and the 5' end of *HMGA2* suggests that the breakpoint was located approximately 20kb upstream of *HMGA2*.

DISCUSSION

Despite their high prevalence the etiology and pathogenesis of UL remain poorly understood. Mutations of the gene encoding the high mobility group protein HMGA2 have been suggested to cause a subset of uterine leiomyomas (Schoenmakers et al., 1995; Hennig et al., 1999). As a

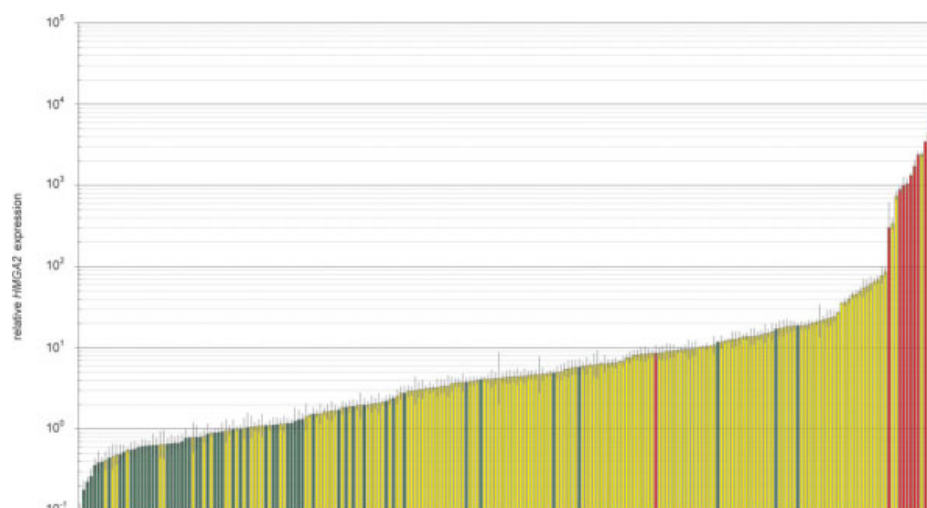


Figure 1. Relative quantification of the *HMGA2* expression in uterine leiomyomas and myometrial tissues. Green bars: Myometrium; yellow bars: UL without cytogenetically detectable aberrations of chromosomal region 12q14-15; red bars: UL with 12q14-15 aberrations.

OVEREXPRESSION OF *HMGA2* IN UTERINE LEIOMYOMAS

175

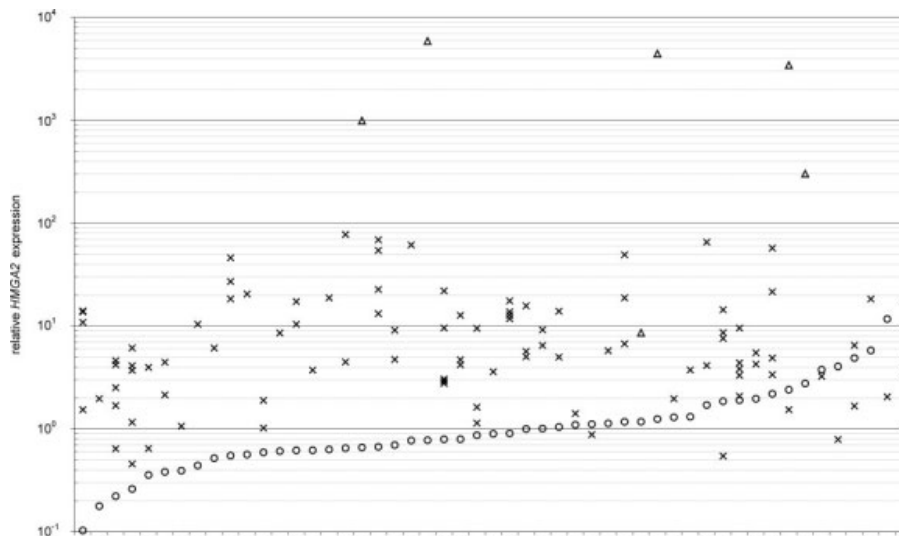


Figure 2. *HMGA2* expression in UL (crosses) and matching myometrial tissues (open circles) in increasing order of expression in myometrial tissues. Triangles indicate UL with 12q14-15 aberrations.

rule, this subset is characterized by cytogenetically visible structural chromosome alterations affecting chromosomal region 12q14-15. *HMGA2* has been identified as the target of these alterations (Schoenmakers et al., 1995) and despite a wide distribution of breakpoints, intragenic as well as extragenic (Kazmierczak et al., 1995; Hennig et al., 1996; Schoenmakers et al., 1999; Kurose et al., 2000; Mine et al., 2001; Takahashi et al., 2001; Quade et al., 2003), the key mechanism by which the chromosomal alterations contribute to tumorigenesis seems to be an upregulation of the *HMGA2* gene leading to overexpression of the full-length transcript or a truncated or chimeric protein. Nevertheless, the majority of UL lack cytogenetically visible chromosome alterations and also by molecular-cytogenetic methods there is no evidence that submicroscopic alterations of the *HMGA2* locus occur in a considerable number of these cases (Weremowicz and Morton, 1999). On the other hand, *HMGA2* overexpression could play a more general role in the development of UL, and not only in the subgroup characterized by 12q14-15 alterations. Roughly 10 years ago the hypothesis was advanced that *HMGA2* overexpression induces an embryonic chromatin configuration in cells, thus re-endowing them with a stem-cell like behavior (Bullerdiek, 1997). This assumption was further supported by recent studies on the *HMGA2* expression in embryonic stem cells (Li et al., 2006, 2007).

Here, we have shown that also UL without cytogenetically detectable 12q14-15 rearrange-

ments overexpress *HMGA2*. This supports the assumption that an elevated level of a stem-cell chromatin associated protein is one of the key events in the genesis of UL. Of particular note, the expression of *HMGA2* in myomas almost always exceeded that of the corresponding myometrium (Fig. 2). Apparently, the basic level of *HMGA2* varies among the samples. Possibly, this could reflect changes throughout the menstrual

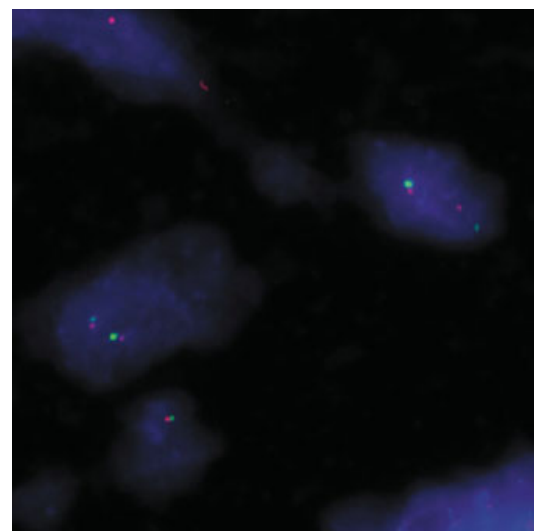


Figure 3. Dual-color FISH performed on interphase nuclei of a leiomyoma with cytogenetically normal karyotype. One nucleus showing two colocalized red/green signals (2RG, left) and a second nucleus with one colocalized red/green and one single red and green signal (IRGIRIG, right), respectively, indicating a rearrangement of *HMGA2*.

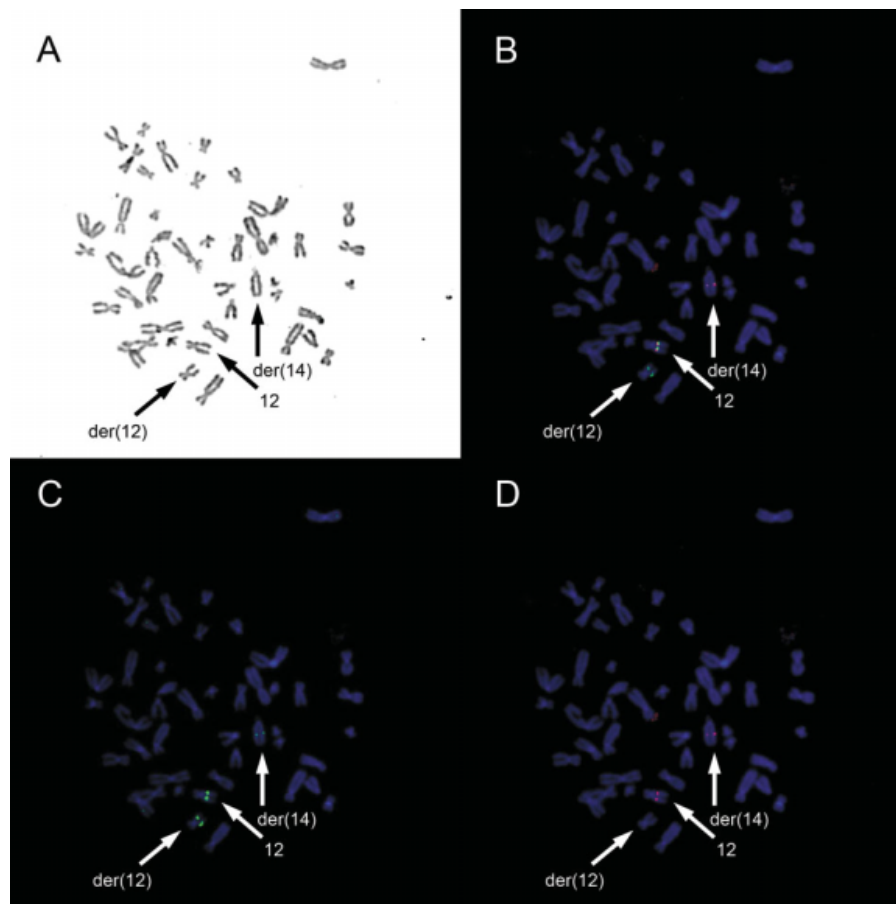


Figure 4. FISH with *HMGA2* break-apart probes in a UL with $t(12;14)(q15;q24)$. A: G-banded metaphase prior to FISH. B: The same metaphase after dual-color FISH indicating a rearrangement of the *HMGA2* locus. C: Corresponding figure only showing the green

fluorescent probe (RP11-269K4) located proximal (5') to *HMGA2*. D: Corresponding figure only showing the red fluorescent probes (RP11-745O10 and RP11-293H23) located distal (3') to *HMGA2*.

cycle. Such alterations in gene expression patterns have been described, e.g., by Kayisli et al. (2007). Herein, the term overexpression refers to an expression exceeding that of the matching myometrium. Despite the monoclonal origin of UL (Townsend et al., 1970; Mashal et al., 1994; Hashimoto et al., 1995; Zhang et al., 2006) overexpression of *HMGA2* must not necessarily be due to mutations affecting the gene itself. It has recently been described that *HMGA2* is regulated by microRNAs of the let-7 family (Lee and Dutta, 2007; Mayr et al., 2007; Park et al., 2007; Shell et al., 2007; Kumar et al., 2008; Motoyama et al., 2008; Peng et al., 2008). Thus, having now identified the overexpression of *HMGA2* also in UL without 12q14-15 alterations being visible at the microscopic level, future studies should also address mutations of let-7 genes and their binding sites within the 3' UTR of *HMGA2*.

To further validate the cytogenetic results in cases with high *HMGA2* expression and no visible translocation or vice versa, FISH was performed with *HMGA2* break-apart probes. In the first case, separate signals from BAC clones located 5' and 3' of *HMGA2* occurred in 23% of the cells, indicating a translocation with a breakpoint within or in close proximity of *HMGA2*. Besides a cryptic *HMGA2* rearrangement undetectable by classical cytogenetics, a selection of cells without translocation during cell culture may explain the observation that the karyotype was apparently normal. However, the fact that chromosome 12 was found to be aberrant in almost one fourth of the cells by FISH is concordant with the high *HMGA2* expression despite an apparently normal karyotype.

In the second case showing a low *HMGA2* expression despite a visible $t(12;14)$ the signals

were colocalized in 98% of the cells suggesting that the breakpoint was localized outside the region covered by the FISH probes. This unusually large distance between the breakpoint and *HMGA2* may explain why the observed *HMGA2* expression was unexpectedly low in one UL with a t(12;14). On the other hand, as indicated by FISH on metaphases of one UL with t(12;14)(q15;q24), an extragenic breakpoint upstream but in closer proximity of *HMGA2* can be sufficient to trigger the observed overexpression. Breakpoints located 5' of *HMGA2* in UL with t(12;14) have also been reported by Quade et al. (2003).

The *HMGA2* expression in uterine leiomyomas has also been quantified in a study by Gross et al. (2003). Eleven karyotypically normal UL plus four matching myometrial samples as well as 10 UL with 12q14-15 rearrangements plus three myometrial tissues were analyzed by qRT-PCR, and a significantly higher *HMGA2* expression in UL with 12q14-15 rearrangements was noted. However, in contrast to the present study, no significant differences between the expression levels in karyotypically normal UL and matching myometrial samples were observed.

In summary, our results confirm the strongly increased *HMGA2* expression in UL with 12q14-15 rearrangements. Moreover, the expression levels detected in 101 UL from 51 patients and 51 matching myometrial samples indicate a general increase of *HMGA2* mRNA also in karyotypically normal tumors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Karmela Sobczyk and Manuela Grund for their valuable technical support.

REFERENCES

- Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K. 1995. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82:57–65.
- Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman JM. 2003. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: Ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol* 188:100–107.
- Belge G, Meyer A, Klemke M, Burchardt K, Stern C, Wosniok W, Loeschke S, Bullerdiek J. 2008. Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: A novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 47:56–63.
- Bullerdiek J. 1997. The molecular target of 12q14-15 aberrations in benign solid tumors. HMGIC rearrangements and beyond. Fourth International workshop on chromosome 12 mapping. Kucherlapati R, Marynen P, Turc-Carel C, editors. Book of abstracts. Nice: Organizing Committee of the Meetings.
- Cramer SF, Patel A. 1990. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 94:435–438.
- Fusco A, Fedele M. 2007. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7:899–910.
- Gross KL, Neskey DM, Manchanda N, Weremowicz S, Kleinman MS, Nowak RA, Ligon AH, Rogalla P, Drechsler K, Bullerdiek J, Morton CC. 2003. HMGA2 expression in uterine leiomyoma and myometrium: Quantitative analysis and tissue culture studies. *Genes Chromosomes Cancer* 38:68–79.
- Hashimoto K, Azuma C, Kamiura S, Kimura T, Nobunaga T, Kanai T, Sawada M, Noguchi S, Saji F. 1995. Clonal determination of uterine leiomyomas by analyzing differential inactivation of the X-chromosome-linked phosphoglycerokinase gene. *Gynecol Obstet Invest* 40:204–208.
- Heinemann K, Thiel C, Möhner S, Lewis MA, Raff T, Kühl-Habich D, Heinemann LA. 2003. Benign gynecological tumors: Estimated incidence. Results of the German Cohort Study on Women's Health. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 107:78–80.
- Hennig Y, Wanschura S, Deichert U, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996. Rearrangements of the high mobility group protein family genes and the molecular genetic origin of uterine leiomyomas and endometrial polyps. *Mol Hum Reprod* 2:277–283.
- Hennig Y, Deichert U, Bonk U, Thode B, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1999. Chromosomal translocations affecting 12q14-15 but not deletions of the long arm of chromosome 7 associated with a growth advantage of uterine smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod* 5:1150–1154.
- ISCN. 2005. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. In: Shaffer LG, Tommerup N, editors. Basel, Switzerland: S. Karger AG.
- Kayisli UA, Berkkanoglu M, Kizilay G, Senturk L, Arici A. 2007. Expression of proliferative and preapoptotic molecules in human myometrium and leiomyoma throughout the menstrual cycle. *Reprod Sci* 14:678–686.
- Kazmierczak B, Bol S, Wanschura S, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996. PAC clone containing the HMGI(Y) gene spans the breakpoint of a 6p21 translocation in a uterine leiomyoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 17:191–193.
- Kazmierczak B, Hennig Y, Wanschura S, Rogalla P, Bartnitzke S, van de Ven W, Bullerdiek J. 1995. Description of a novel fusion transcript between HMGI-C, a gene encoding for a member of the high mobility group proteins, and the mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene. *Cancer Res* 55:6038–6039.
- Kievits T, Dauwerse JG, Wiegant J, Devilee P, Breuning MH, Cornelisse CJ, van Ommen GJ, Pearson PL. 1990. Rapid subchromosomal localization of cosmid by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 53:134–136.
- Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, Jacks T. 2008. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:3903–3908.
- Kurose K, Mine N, Doi D, Ota Y, Yoneyama K, Konishi H, Araki T, Emi M. 2000. Novel gene fusion of COX6C at 8q22-23 to HMGIC at 12q15 in a uterine leiomyoma. *Genes Chromosomes Cancer* 27:303–307.
- Lee YS, Dutta A. 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 21:1025–1030.
- Li O, Li J, Dröge P. 2007. DNA architectural factor and proto-oncogene HMGA2 regulates key developmental genes in pluripotent human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 581:3533–3537.
- Li O, Vasudevan D, Davey CA, Dröge P. 2006. High-level expression of DNA architectural factor HMGA2 and its association with nucleosomes in human embryonic stem cells. *Genesis* 44:523–529.
- Mashal RD, Fejzo ML, Friedman AJ, Mitchner N, Nowak RA, Rein MS, Morton CC, Sklar J. 1994. Analysis of androgen receptor DNA reveals the independent clonal origins of uterine leiomyomata and the secondary nature of cytogenetic aberrations in the development of leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* 11:1–6.
- Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ. 1998. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 90:967–973.
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. 2007. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* 315:1576–1579.
- Mine N, Kurose K, Konishi H, Araki T, Nagai H, Emi M. 2001. Fusion of a sequence from HEI10 (14q11) to the HMGIC gene at 12q15 in a uterine leiomyoma. *Jpn J Cancer Res* 92:135–139.
- Motoyama K, Inoue H, Nakamura Y, Uetake H, Sugihara K, Mori M. 2008. Clinical significance of high mobility group A2 in

- human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. *Clin Cancer Res* 14:2334–2340.
- Nilbert M, Heim S. 1990. Uterine leiomyoma cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 2:3–13.
- Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, Dinulescu DM, Lengyel E, Peter ME. 2007. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle* 6:2585–2590.
- Peng Y, Laser J, Shi G, Mittal K, Melamed J, Lee P, Wei JJ. 2008. Antiproliferative effects by let-7 repression of high-mobility group A2 in uterine leiomyoma. *Mol Cancer Res* 6:663–673.
- Quade BJ, Weremowicz S, Neskey DM, Vanni R, Ladd C, Dal Cin P, Morton CC. 2003. Fusion transcripts involving HMGA2 are not a common molecular mechanism in uterine leiomyomata with rearrangements in 12q15. *Cancer Res* 63:1351–1358.
- Schoenmakers EF, Huysmans C, van de Ven WJ. 1999. Allelic knockout of novel splice variants of human recombination repair gene RAD51B in t(12;14) uterine leiomyomas. *Cancer Res* 59:19–23.
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, van den Berghe H, van de Ven WJ. 1995. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10:436–444.
- Shell S, Park SM, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA, Feig C, Lengyel E, Peter ME. 2007. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11400–11405.
- Stewart EA. 2001. Uterine fibroids. *Lancet* 357:293–298.
- Takahashi T, Nagai N, Oda H, Ohama K, Kamada N, Miyagawa K. 2001. Evidence for RAD51L1/HMGIC fusion in the pathogenesis of uterine leiomyoma. *Genes Chromosomes Cancer* 30:196–201.
- Tallini G, Vanni R, Manfioletti G, Kazmierczak B, Faa G, Pauwels P, Bullerdiek J, Giancotti V, van Den Berghe H, Dal Cin P. 2000. HMGI-C and HMGI(Y) immunoreactivity correlates with cytogenetic abnormalities in lipomas, pulmonary chondroid hamartomas, endometrial polyps, and uterine leiomyomas and is compatible with rearrangement of the HMGI-C and HMGI(Y) genes. *Lab Invest* 80:359–369.
- Townsend DE, Sparkes RS, Baluda MC, McClelland G. 1970. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Obstet Gynecol* 107:1168–1173.
- Weremowicz S, Morton CC. 1999. Is HMGIC rearranged due to cryptic paracentric inversion of 12q in karyotypically normal uterine leiomyomas? *Genes Chromosomes Cancer* 24:172–173.
- Zhang P, Zhang C, Hao J, Sung CJ, Quddus MR, Steinhoff MM, Lawrence WD. 2006. Use of X-chromosome inactivation pattern to determine the clonal origins of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma. *Hum Pathol* 37:1350–1356.

3.1.2 6p21 rearrangements in uterine leiomyomas targeting *HMGA1* (Hashemi Nezhad et al., 2010)

Neben der Gruppe der Uterus-Leiomyome mit Aberrationen der chromosomalen Region 12q14~15 ist in einer kleineren zytogenetischen Gruppe die Bande 6p21 von rekurrenten Chromosomenveränderungen betroffen (Nilbert und Heim, 1990; Kiechle-Schwarz et al., 1991; Ozisik et al., 1995; Hennig et al., 1996b; Sandberg, 2005). Molekulares Target der chromosomalen Bruchpunkte in diesem Bereich ist das in der Bande 6p21 lokalisierte Gen *HMGA1* (Kazmierczak et al., 1996c; Kazmierczak et al., 1998), das für zwei weitere High-Mobility-Group-Proteine kodiert. Ein Zusammenhang zwischen 6p21-Aberrationen und der Expression des *HMGA1*-Gens war in Analogie zur *HMGA2*-Aktivierung bei Veränderungen der chromosomalen Region 12q14~15 anzunehmen, allerdings existierten nur wenige diesbezügliche Untersuchungen mit geringen Fallzahlen. Es gab beispielsweise Studien, in denen eine gesteigerte *HMGA1*-Expression über einen Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) (Williams et al., 1997) oder über einen immunhistochemischen Proteinnachweis in vier Leiomyomen aus der 6p21-Gruppe nachgewiesen worden war (Tallini et al., 2000). Untersuchungen auf mRNA-Ebene waren dagegen kaum vorhanden. Der Zusammenhang zwischen 6p21-Veränderung und *HMGA1*-Expression wurde mittels herkömmlicher RT-PCR an lediglich drei Leiomyomen untersucht (Sornberger et al., 1999).

Mittlerweile stehen weitaus sensitivere Methoden zur Quantifizierung der Genexpression zur Verfügung, von denen in der nachfolgenden Publikation die quantitative Real-Time RT-PCR herangezogen wurde, um die *HMGA1*-Expression in sieben Leiomyomen mit 6p21-Aberration sowie in acht Tumoren ohne zytogenetisch erkennbare chromosomale Veränderung zu messen und zu vergleichen. Dabei stellte sich heraus, daß im Vergleich zu karyotypisch normalen Myomen sechs der sieben Tumoren, welche eine 6p21 betreffende Translokation bzw. in einem Fall eine Monosomie 6 aufwiesen, deutlich stärker *HMGA1* exprimieren. Somit konnte bestätigt werden, daß chromosomale Aberrationen, die die Bande 6p21 betreffen, mit einer verstärkten *HMGA1*-Expression assoziiert sind, ebenso wie Veränderungen von 12q14~15 zu einer Aktivierung von *HMGA2* führen. Außerdem wurde in allen hier eingeschlossenen Myomen die *HMGA2*-Expression untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die Stärke der Expression von *HMGA1* und *HMGA2* nicht miteinander korreliert, obwohl in zwei Myomen mit hoher *HMGA1*-Expression auch *HMGA2* überexprimiert wurde.

II.

6p21 rearrangements in uterine leiomyomas targeting *HMGA1*.

Hashemi Nezhad M, Drieschner N, Helms S, Meyer A, Tadayyon M, Klemke M, Belge G, Bartnitzke S, Burchardt K, Frantzen C, Schmidt EH, Bullerdiek J. 2010. Cancer Genetics and Cytogenetics 203: 247-252.

Eigenanteil:

- Probenentnahme aus Uterus-Leiomyomen und dazugehörigen Myometriem zur Kryokonservierung sowie Karyotypisierung
- Mitwirkung an der relativen Quantifizierung der *HMGA2*-Expression



6p21 rearrangements in uterine leiomyomas targeting *HMGA1*

Maliheh Hashemi Nezhad^a, Norbert Drieschner^a, Sabrina Helms^a, Anke Meyer^a,
Mahboobeh Tadayyon^a, Markus Klemke^a, Gazanfer Belge^a, Sabine Bartnitzke^a,
Käte Burchardt^b, Christiane Frantzen^c, Ernst Heinrich Schmidt^d, Jörn Bullerdiek^{a,e,*}

^aCenter for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Str. ZHG, D-28359 Bremen, Germany

^bDepartment of Pathology, General Hospital Bremen-Mitte, St.-Jürgen-Str. 1, D-28177 Bremen, Germany

^cWomen's Clinic, St. Joseph-Stift Hospital, Schwachhauser Heerstrasse 54, D-28209 Bremen, Germany

^dDepartment of Obstetrics and Gynecology, Evang. Diakonie Hospital, Gröpelinger Heerstrasse 406-408, D-28239 Bremen, Germany

^eClinic for Small Animals, University of Veterinary Medicine, Bischofsholer Damm 15, D-30137 Hanover, Germany

Received 7 January 2010; received in revised form 2 August 2010; accepted 5 August 2010

Abstract

To quantify the expression of *HMGA1* mRNA in uterine leiomyomas, the expression of *HMGA1* was analyzed in a series including tumors with aberrations of chromosome 6 ($n = 7$) and cytogenetically normal tumors ($n = 8$) as a control group by quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction. The average expression level in the 6p21 group was found to be 5.6 times higher than that in the control group, and with one exception, all cases with 6p21 alteration revealed a high expression of *HMGA1* mRNA than cytogenetically normal tumors. Nevertheless, compared to fibroids with a normal karyotype, the upregulation of the *HMGA1* mRNA in these cases was much less strong than that of *HMGA2* mRNA in case of 12q14~15 aberrations identified in previous studies. © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Uterine leiomyomas (ULs) belong to the cytogenetically best investigated human tumors. The cytogenetic analyses have revealed several subtypes, with a frequent group showing rearrangements of chromosomal region 12q14~15, which apparently targets the gene encoding the high-mobility group AT-hook 2 (*HMGA2*) [1,2]. Accordingly, tumors of this type show significantly higher expression of *HMGA2* than fibroids with an apparently normal karyotype [3]. *HMGA2* is a protein abundantly expressed in stem cells and casually linked to their self-renewal ability. A decrease of *HMGA2* has recently been seen linked to the group of hematopoietic as well as neural stem cells [4]. Accordingly, it is tempting to speculate that in terms of pathogenesis, smooth muscle cells continuously expressing *HMGA2* are maintaining a self-renewing program that occasionally also display multilineage potential as witnessed by variants as, for example, lipoleiomyomas or leiomyomas with cartilaginous differentiation [5,6].

Of note, a smaller subgroup of ULs shows rearrangements of 6p21 (i.e., the locus where *HMGA1*, the other gene encoding proteins of the *HMGA* type, has been

mapped), suggesting that *HMGA1* is the relevant target gene in that subgroup of ULs [7]. In small series of ULs, it was shown that this rearrangement leads to an overexpression of *HMGA1* [8,9]. However, to our knowledge, no study quantifying the expression of *HMGA1* mRNA in ULs of this subtype has been performed. Thus, we analyzed the *HMGA1* expression in seven ULs with aberrations of chromosome 6 in comparison to myomas with normal karyotype and to the matching myometrial tissues.

2. Materials and methods

2.1. Tissue samples and chromosome analysis

For RNA isolation, samples of ULs and myometrium were snap frozen in liquid nitrogen immediately after surgery and stored at -80°C . For cell culture, samples of primary tumors were transferred to Hank's solution with antibiotics (200 IU/mL penicillin, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin) after surgery. Cell culture and chromosome analyses were performed as described previously [3].

2.2. RNA isolation, reverse transcription, and quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from tissue samples with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) including

* Corresponding author. Tel.: +49-421-2184239; fax: +49-421-2184239.

E-mail address: bullerd@uni-bremen.de (J. Bullerdiek).

DNase 1 treatment according to the manufacturer's instructions, and quantitated by spectrophotometry. Reverse transcription of 250 ng RNA was carried out with M-MLV reverse transcriptase, RNaseOUT, and random hexamers (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Controls without

reverse transcriptase were included for each sample to ensure the absence of DNA contaminations, which, as a result of the high number of *HMGAI*-related retroseuodgenes, could lead to false-positive results.

Quantitative real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed on a real-time

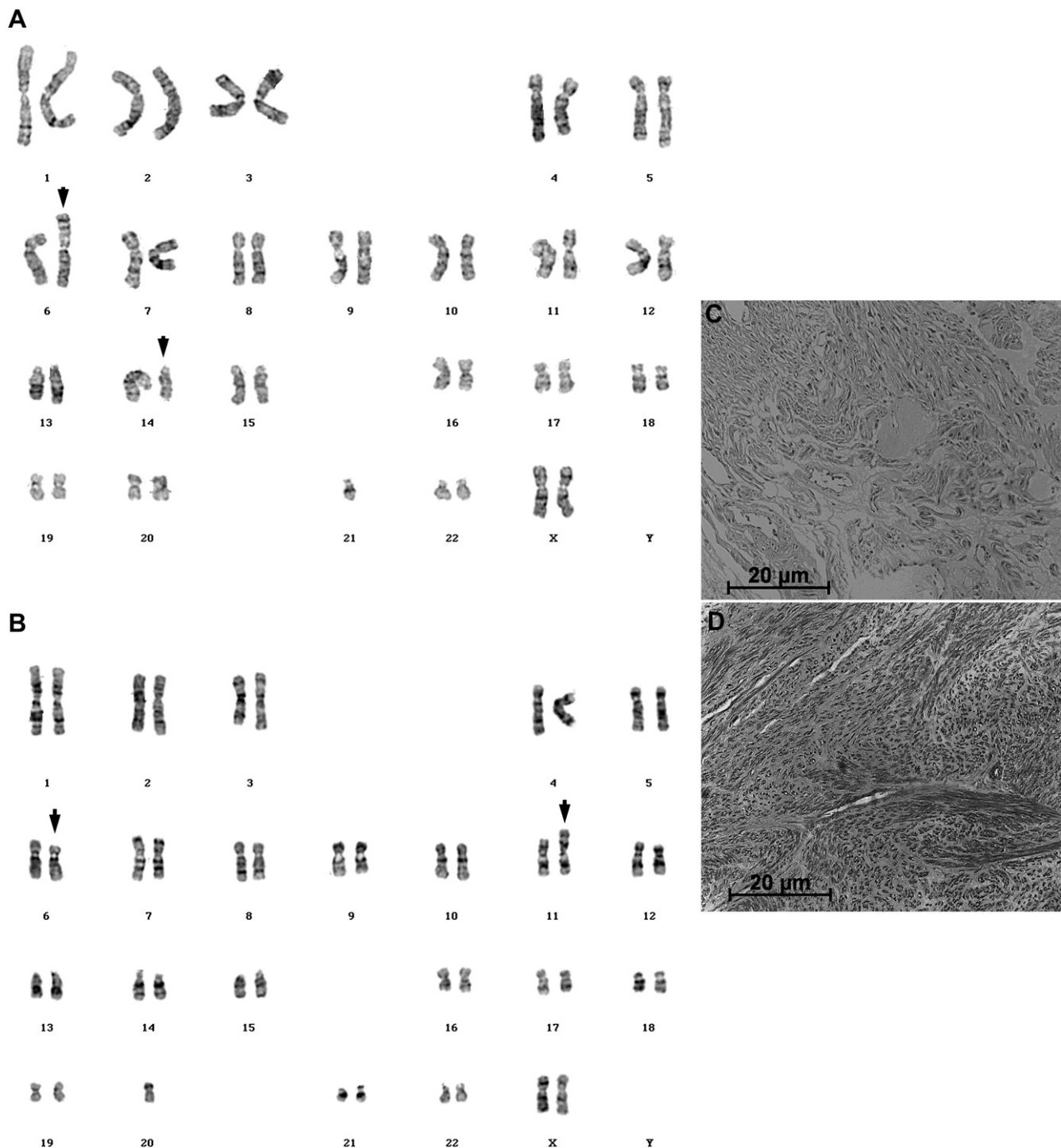


Fig. 1. Karyotypes of two ULs with 6p21 rearrangements with different levels of *HMGAI* expression and the histologic appearance of these ULs. (A) Representative G-banded karyotype of myoma 87: 46,XX,t(6;14)(p23;q24), tas(14;21)(pter;qter). (B) Representative G-banded karyotype of myoma 125A: 46,XX,t(6;11)(p21;p15), chromosomes participating in the 6p21 rearrangements are indicated by arrows. Histologic appearance of myoma 87 (C) and myoma 125A (D).

PCR cycler (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) with TaqMan Universal Mastermix. Of each cDNA, 2 μ L served as template in a final reaction volume of 20 μ L. Reaction condition were as follows: 2 minutes at 50°C, 10 minutes at 95°C, 50 cycles of 15 seconds at 95°C, and 1 minute at 60°C. For transcripts of *HMGA1*, a set of primers and probe was designed (forward primer: 5'-GGA CCA AAG GGA AGC AAA AA-3', reverse primer: 5'-TTC CTG GAG TTG TGG TGG TTT-3', probe: 6-FAM-AAG GGT GCT GCC AAG ACC CGG-MGB). 18S rRNA was chosen as endogenous control and detected with the following primer/probe set: forward primer: 5'-GGA TCC ATT GGA GGG CAA AGT-3', reverse primer: 5'-AAT ATA CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC-3', probe: TGC CAG CAG CCG C [10]. All reactions were run in triplicate.

2.3. Analysis of gene expression

The relative expression was calculated by the ΔC_t method, using 18S rRNA as endogenous control and choosing the *HMGA1* expression of a myometrial sample (of normal group) as calibrator. For statistical analyses, Student's *t*-test was used. *P*-values of ≤ 0.05 were considered to be significant.

2.4. Fluorescence in situ hybridization

For determination of rearrangements involving 6p21 and *HMGA1*, respectively, fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed on metaphase preparations of the cases myoma 36, myoma 110, myoma 121B, myoma 125A, and myoma 166A. For FISH, two overlapping clones CTD-2522J1 (GenBank accession number AQ280064 and AQ280066) and CTD-2510D13 (GenBank accession number AQ264849 and AQ264850), both located distal to *HMGA1* in 6p21, and two overlapping clones CTD-2524P4 (GenBank accession number AQ310763 and AQ277896) and RP11-140K17 (GenBank accession number AQ385566 and AQ385568), both located proximal to *HMGA1*, in 6p21 were used. CTD clones were obtained from Invitrogen (Darmstadt, Germany); RP11-140K17 was obtained from imaGenes (Berlin, Germany). DNA was isolated with the Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

One microgram of isolated plasmid DNA was labeled by nick translation (Abbott Molecular, Wiesbaden, Germany) either with SpectrumOrange-dUTP (CTD-2522J1 and CTD-2510D13) or SpectrumGreen-dUTP (CTD-2524P4 and RP11-140K17) (Abbott Molecular). Treatment of metaphases and subsequent FISH experiments were carried out as described previously [11]. Twenty microliters of the

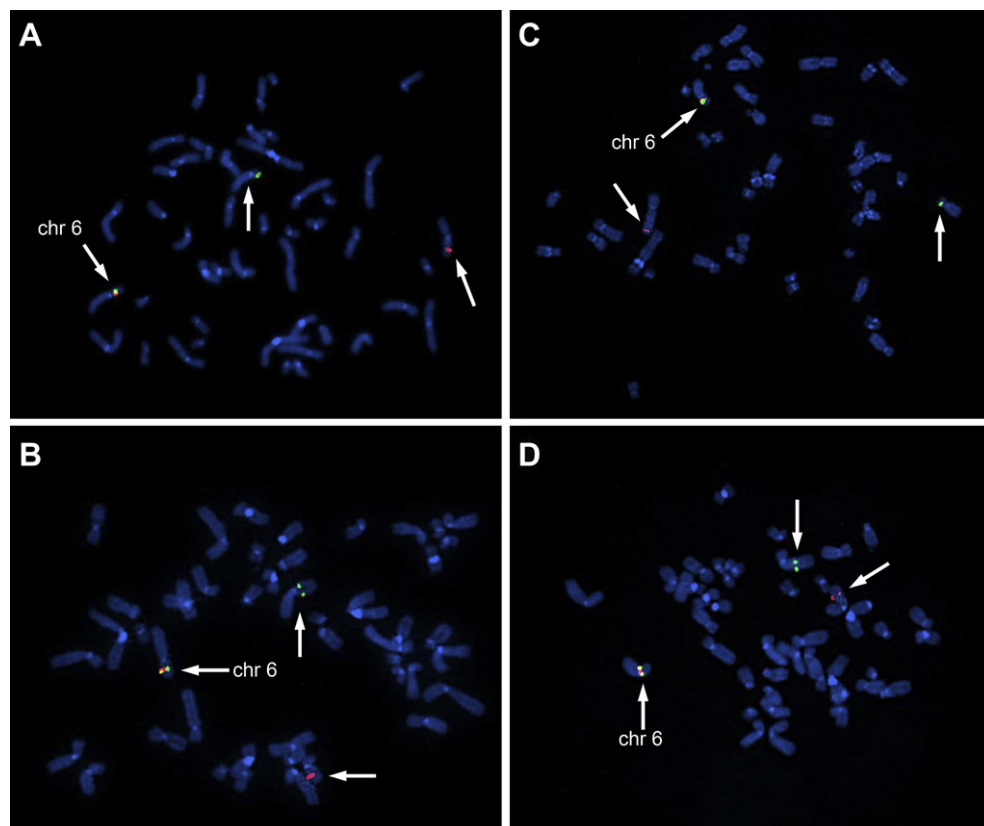


Fig. 2. FISH analysis with *HMGA1* break-apart probes in four UL with 6p21 rearrangement. (A) Myoma 125A, (B) myoma 166A, (C) myoma 121B, (D) myoma 110 (for karyotypes see Table 1). The green fluorescent probes (CTD-2524P4 and RP11-140K17) located proximal to *HMGA1*, the red fluorescent probes (CTD-2522J1 and CTD-2510D13) located distal to *HMGA1*. Arrows point to normal chromosomes 6 and the rearranged chromosomes.

Table 1
Cytogenetic and molecular-cytogenetic data, results of relative *HMGAI* and *HMGGA2* expression, and clinical data of all ULs. All tumors investigated were histologically typical leiomyomas.

Case no.	Karyotype	<i>HMGAI</i>				Patient age (y)	Tumor size (cm)	<i>HMGAI</i> expression matching myometrium	Single or multiple	FISH analysis for <i>HMGAI</i> rearrangements
		Relative <i>HMGAI</i> expression	Relative <i>HMGGA2</i> expression	expression	1.7					
87	46,XX,t(6;14)(p23;q24)[6]/46,XX,t(6;14)(p23;q24),tas(14;21)(p13;q22)[11]/46,XX[2]/47,XX,+12[1]	0.5	0.6	0.6	63	—	1.7	Multiple	ND	
125A	46,XX,t(6;11)(p21;p15)[7]/46,XX[14]	32.0	2.7	2.3	42	2.5	2.3	Multiple	Split signals	
110	44,XX,der(1)t(1;?)der(3),der(5)t(5;?)-6,der(11)t(11;15)(q25;q22),del(15)(q22),der(15)t(15;?)-19[25]	33.2	1.6	NA	44	4	NA	Single	Split signals	
113C	46,XX,t(6;10)(p23;q23)[5]/46,XX[7]	34.0	11.4	NA	53	3.5	NA	Multiple	ND	
117D	46,XX,t(6;11)(p23;q21)[4]/46,XX[12]	41.2	26.0	NA	39	4.5	NA	Multiple	ND	
121B	42-46,X,-X[6],-1[19],t(1;8)(p22;q24)[11],der(1)[6],del(3)[3],add(6)[19],-8[6],der(8)[4],-10[6],-11[6],-13[6],-14[19],-22[15],+mar[118],+mar2[18],+mar3[6],+mar[6][cp19]/46,XX[1]	63.3	0.8	NA	38	3	NA	Multiple	Split signals	
166A	46,XX,t(6;10)(p21;q22)[13]/46,XX[8]	110.4	1.29	NA	—	3	NA	Multiple	Split signals	
14B	46,XX[10]	2.8	3.8	8.5	46	—	8.5	Multiple	ND	
12B	46,XX[10]	3.1	2.4	1.0	41	—	1.0	Multiple	ND	
24	46,XX[20]	3.9	0.5	7.6	44	1	7.6	Multiple	ND	
27A	46,XX[10]	4.8	2.8	NA	40	5	NA	Multiple	ND	
20	46,XX[15]	5.1	0.6	1.2	36	—	1.2	Multiple	ND	
37D	46,XX[15]	10.0	12.9	15.4	43	2	15.4	Multiple	ND	
29	46,XX[21]	12.6	1.1	8.5	48	3.5	8.5	Multiple	ND	
36	46,XX[14]	23.2	10.7	6.9	39	6	6.9	Single	No split signals	

Abbreviations: —, unknown; ND, not done; NA, not available.

break-apart probe was used per slide. Co-denaturation was performed on a ThermoBrite (Abbott Molecular) for 7 minutes at 77°C, followed by overnight hybridization in a humidified chamber at 37°C. Posthybridization was performed at 70°C for 2 minutes in 0.4× standard saline citrate/0.3% NP-40. Metaphases were counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; 0.75 µg/mL). Slides were examined with an Axioskop 2 Plus fluorescence microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Images were captured with a high-performance CCD camera (Visitron Systems, Puchheim, Germany) and were edited with FISH View (Applied Spectral Imaging, Migdal Ha'Emek, Israel). Chromosomes were identified by inverted DAPI staining. For each case, if possible, at least 10 metaphases were analyzed, and 100 interphase nuclei were scored. Co-localized signals (green/red) indicate a nonrearranged breakpoint region, whereas separated green and orange signals indicate a rearrangement of the chromosomal region 6p21 and *HMGA1*, respectively.

3. Results

In this study, seven ULs with chromosomal rearrangements of 6p21 and eight karyotypically normal ULs as detected by chromosome analysis of GTG-banded metaphases and FISH analysis were subjected to real-time RT-PCR analysis. According to the histological examination, no sign of leiomyosarcoma or atypical leiomyoma was detected in any of the cases (Fig. 1).

For identification of 6p21 rearrangements involving *HMGA1* FISH on metaphase preparations and interphase nuclei of five myomas (four cases with 6p rearrangement or loss of one normal chromosome 6, respectively, and one with apparently normal karyotype) was performed with a *HMGA1*-specific break-apart probe. The results revealed a signal pattern corresponding to a 6p21

rearrangement involving *HMGA1* in all cases except for that with a normal karyotype (numbers 110, 121B, 125A, and 166A; Fig. 2A–D).

The expression of *HMGA1* mRNA in seven ULs with 6p21 rearrangement was compared to that in eight samples of UL with an apparently normal karyotype, which served as controls (Table 1). For nine of these samples, matching myometrium was available. Two myometrial samples belonged to fibroids of the 6p group, and the remaining tissues belonged to fibroids of the normal group. The average relative expression level in the 6p group was 45-fold compared to its expression in a myometrium sample of normal group as calibrator and differed significantly from that in the control group (8.2-fold increase). As to the expression in the individual tumors, *HMGA1* expression, with one exception, clearly distinguishes between both karyotypic groups (Fig. 3). In the exception, case 87, no unusually high percentage of metaphases with normal karyotype could be detected, which may explain the low expression of *HMGA1* observed. Regarding the expression of *HMGA1* in UL and matching myometrium, there were no significant differences in the normal group.

Next, we analyzed whether the expression of *HMGA1* correlates with the expression of *HMGA2*. No evidence for such a correlation was obtained (Fig. 3).

4. Discussion

ULs are by far the most common gynecological tumors, occurring in at least 70–80% of all women in their reproductive years [12–14]. Cytogenetic subtypes have been identified that may correlate with a different molecular pathogenesis of the disease. So far, the best-investigated group is characterized by 12q14~15 changes associated with a strong overexpression of *HMGA2* [3,15]. The

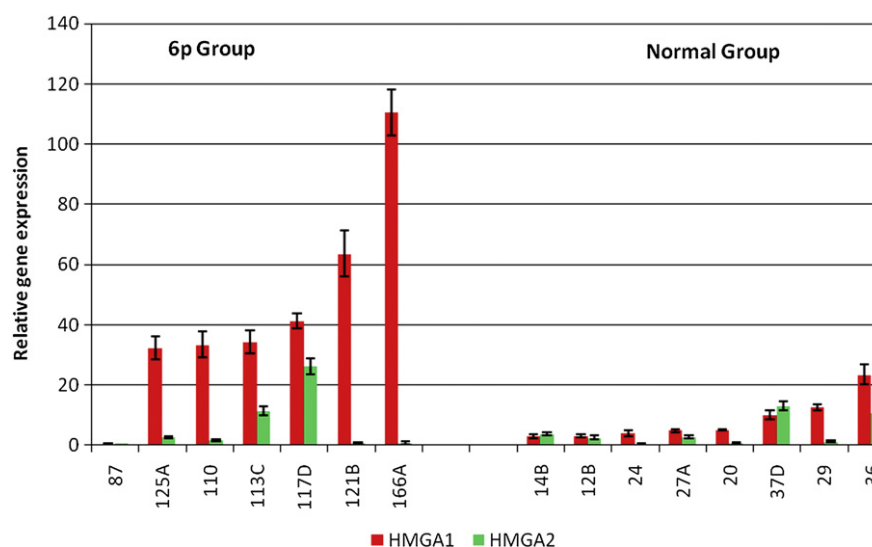


Fig. 3. Relative quantification of the *HMGA1* and *HMGA2* expression in normal and aberrant uterine leiomyomas (ULs).

overexpression of the stem-cell chromatin-associated protein HMGA2 fits well with important characteristics of UL growth. A much smaller subset of UL is characterized by 6p21 rearrangements leading to the upregulation of a closely related protein of the HMGA family (i.e., *HMGA1*). Likely activation of either of both genes and the abundance of their proteins, respectively, leads to an almost identical histopathologic phenotype of the tumors commonly referred as leiomyomas.

However, what distinguishes tumors of both types is the level of overexpression of *HMGA* genes compared to myometrium. Whereas the average upregulation of *HMGA2* in case of 12q14~15 aberrations is in range of 3,000-fold [3], even when omitting the outlier represented by case 87, upregulation of *HMGA1* due to 6p21 rearrangements is on average 45-fold and raise up to a maximum of only 52.4-fold.

We had recently been able to show that most cytogenetically normal leiomyomas show subtle changes of the *HMGA2* level compared to the matching myometrium as well [3]. Some recent studies have correlated *HMGA2* with stemness of mesenchymal cells and stem cell self-renewal [4,16]. Although similar studies are lacking for *HMGA1*, it is tempting to assume that the translocation products of both genes can shift mesenchymal stem cells or progenitors of smooth muscle cells and other mesenchyme-derived cells back to a higher self-renewing potential. Nevertheless, we were recently able to show that there is no correlation between the expression of *Ki-67* and *HMGA2* [17]. Thus, the exact mechanism by which increased levels of *HMGA* proteins contribute to benign tumorigenesis still remains to be elucidated. However, *HMGA1* can be assumed to have the ability to replace, at least in part, the function of *HMGA2* and vice versa. The proteins of both genes are highly charged DNA-binding proteins that show abundant expression in embryonic cells but greatly decreased expression in most adult cells. They share a high homology in their DNA-interacting domains; despite their apparent differences in interaction partners [18], this may explain why knockout for neither gene alone is lethal.

Acknowledgments

This study was supported by grant from the Tönjes-Vagt-Foundation, Bremen. We acknowledge the valuable technical support of Tanja Schwarz and Lisa Imbiel.

References

- [1] Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, et al. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995;82:57–65.
- [2] Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 1995;10:436–44.
- [3] Klemke M, Meyer A, Hashemi Nezhad M, Bartnitzke S, Drieschner N, Frantzen C, et al. Overexpression of HMGA2 in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48:171–8.
- [4] Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young, but not old, mice by reducing p16Ink4a and p19Arf expression. *Cell* 2008;135:227–39.
- [5] Willén R, Gad A, Willén H. Lipomatous lesions of the uterus. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1978;377:351–61.
- [6] Yamadori I, Kobayashi S, Ogino T, Ohmori M, Tanaka H, Jimbo T. Uterine leiomyoma with a focus of fatty and cartilaginous differentiation. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1993;72:307–9.
- [7] Kazmierczak B, Bol S, Wanschura S, Bartnitzke S, Bullerdiek J. PAC clone containing the HMGI(Y) gene spans the breakpoint of a 6p21 translocation in a uterine leiomyoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;17:191–3.
- [8] Sornberger KS, Weremowicz S, Williams AJ, Quade BJ, Ligon AH, Pedutour F, et al. Expression of HMGIY in three uterine leiomyomata with complex rearrangements of chromosome 6. *Cancer Genet Cytogenet* 1999;114:9–16.
- [9] Tallini G, Vanni R, Manfioletti G, Kazmierczak B, Faa G, Pauwels P, et al. HMGI-C and HMGI(Y) immunoreactivity correlates with cytogenetic abnormalities in lipomas, pulmonary chondroid hamartomas, endometrial polyps, and uterine leiomyomas and is compatible with rearrangement of the HMGI-C and HMGI(Y) genes. *Lab Invest* 2000;80:359–69.
- [10] Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirota M, Fleischmann A, et al. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest* 2005;85:1040–50.
- [11] Kievits T, Devilee P, Wiegant J, Wapenaar MC, Cornelisse CJ, van Ommen GJ, et al. Direct nonradioactive in situ hybridization of somatic cell hybrid DNA to human lymphocyte chromosomes. *Cytometry* 1990;11:105–9.
- [12] Cramer SF, Patel A. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 1990;94:435–8.
- [13] Day Baird D, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman JM. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:100–7.
- [14] Heinemann K, Thiel C, Möhner S, Lewis MA, Raff T, Kühl-Habich D, et al. Benign gynecological tumors: estimated incidence. Results of the German Cohort Study on Women's Health. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003;107:78–80.
- [15] Gross KL, Neskey DM, Manchanda N, Weremowicz S, Kleinman MS, Nowak RA, et al. HMGA2 expression in uterine leiomyomata and myometrium: quantitative analysis and tissue culture studies. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:68–79.
- [16] Li O, Li J, Dröge P. DNA architectural factor and proto-oncogene HMGA2 regulates key developmental genes in pluripotent human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 2007;581:3533–7.
- [17] Markowski DN, von Ahsen I, Nezhad MH, Wosniok W, Helmke BM, Bullerdiek J. HMGA2 and the p19Arf-TP53-CDKN1A axis: a delicate balance in the growth of uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:661–8.
- [18] Arlotta P, Rustighi A, Mantovani F, Manfioletti G, Giancotti V, Tell G, et al. High mobility group I proteins interfere with the homeodomains binding to DNA. *J Biol Chem* 1997;272:29904–10.

3.1.3 Loss of let-7 binding sites resulting from truncations of the 3' untranslated region of *HMGA2* mRNA in uterine leiomyomas (Klemke et al., 2010)

In Uterus-Leiomyomen tritt beim Vorliegen einer chromosomalen Aberration der Region 12q14~15 auch dann eine erhöhte *HMGA2*-Expression auf, wenn der Bruchpunkt außerhalb des Gens liegt (Tallini et al., 2000; Gross et al., 2003; Quade et al., 2003). Durch welche Faktoren diese Überexpression ausgelöst wird, ist nicht im Detail bekannt. Ein gut untersuchter Mechanismus der *HMGA2*-Regulation ist aber die posttranskriptionelle Hemmung durch miRNAs aus der let-7-Familie (Mayr et al., 2007; Lee und Dutta, 2007, Park et al., 2007; Shell et al., 2007). Die 3'-UTR der *HMGA2*-mRNA weist acht let-7-Bindestellen auf (Lee und Dutta, 2007), durch die die Translation bei Bindung eines mit spezifischen miRNAs beladenen RISC (RNA-induced silencing complex) inhibiert oder eine Degradation der mRNA herbeigeführt werden kann (Rana, 2007; Bushati und Cohen, 2007). Bei Transkripten mit trunkierter 3'-UTR können diese let-7-Bindestellen fehlen, womit ein Verlust dieses Regulationsmechanismus einhergeht. Eine Funktion bei der Hemmung der *HMGA2*-Expression wurde den miRNAs der let-7-Familie auch in Uterus-Leiomyomen zugeschrieben (Peng et al., 2008).

Es war nicht bekannt, ob die *HMGA2*-Überexpression in Uterus-Leiomyomen mit Aberrationen der chromosomalen Region 12q14~15 in erster Linie durch eine transkriptionelle Aktivierung oder auch durch einen Ausfall posttranskriptioneller Regulationsmechanismen ausgelöst werden kann. Käme es durch eine Trunkierung der Transkripte zum Verlust von Teilen oder der gesamten 3'-UTR, würden die Transkripte damit auch ihre let-7-Bindestellen verlieren. Somit würde die posttranskriptionelle Regulation durch die miRNAs der let-7-Familie aufgrund nicht vorhandener Targetsequenzen fehlschlagen und zu einer Überexpression führen. Um diese Frage zu beantworten, wurde eine quantitative Real-Time RT-PCR entwickelt, mit deren Hilfe trunkierte und vollständige *HMGA2*-Transkripte diskriminiert werden können. Da intragenische Bruchpunkte häufig im dritten Intron lokalisiert sind (Schoenmakers et al., 1995; Kazmierczak et al., 1995c; Petit et al., 1996; Lemke et al., 2001), wurde zur Detektion aller Transkriptvarianten ein kommerzieller TaqMan-Assay verwendet, dessen Primer komplementär zum Übergang der Exons 1 und 2 sind. Auf diese Weise können sowohl vollständige als auch trunkierte mRNAs detektiert werden. Zusätzlich wurde eine Kombination aus Primern und einer TaqMan-Sonde verwendet, die einen Abschnitt am distalen Ende der 3'-UTR detektiert, der nur bei vollständigen Transkripten mit allen acht let-7-Bindestellen vorhanden ist. Getestet wurde dieses Verfahren zunächst an einer auf ein Lipom zurückgehenden Zelllinie, die bekanntermaßen eine Translokation t(3;12)(q27~28;q14~15) aufweist und in der Fusionstranskripte bestehend aus den Exons 1 bis 3 von *HMGA2* und den Exons 9 bis 11 von *LPP*, nicht jedoch die vollständige *HMGA2*-

mRNA nachgewiesen wurde (Lemke et al., 2001). Der in den Exons 1 und 2 lokalisierte Assay ergab einen ΔC_T -Wert von -0,581, wohingegen er unter Verwendung des am distalen Ende der 3'-UTR gelegenen Assays bei +11,552 lag. Dieser gravierende Unterschied ist ein deutliches Anzeichen für die differentielle Expression vollständiger und trunkierter Transkripte und zugleich der erfolgreiche Nachweis für die Eignung der gewählten Assays zur Detektion der unterschiedlichen mRNAs.

Daher wurde dieser Ansatz sowohl an zwei Zelllinien angewendet, die aus Uterus-Leiomyomen mit bekannten Translokationen unter Beteiligung der Region 12q14~15 hervorgegangen sind, als auch an 13 schockgefrorenen Gewebeproben von Leiomyomen, die ebenfalls bekannte Aberrationen des *HMGA2*-Locus aufwiesen (Klemke et al., 2009).

Als Schwellwert für eine differentielle Expression wurde in Anlehnung an Bartuma et al. (2009) ein zehnfacher Unterschied in der relativen Expression zwischen beiden Assays gewählt. Bei der relativen Quantifizierung der Expression in beiden Myom-Zelllinien mit 12q14~15-Veränderung wurde dieser Wert deutlich überschritten, was als weiterer Beleg für die Anwendbarkeit des Tests anzusehen ist. Unter Verwendung der 13 Gewebeproben der Tumoren wurde wie bereits zuvor beschrieben (Klemke et al., 2009) mit dem in den Exons 1 und 2 lokalisierten Assay eine starke *HMGA2*-Expression ermittelt. Ein ähnliches Ergebnis wurde in acht Myomen unter Verwendung des am distalen Ende der 3'-UTR lokalisierten Assays erzielt, woraus geschlossen werden kann, daß keine Trunkierung der *HMGA2*-mRNA vorliegt. In fünf der untersuchten Myome wurde der festgelegte Grenzwert eines zehnfachen Expressionsunterschiedes überschritten. Da in drei dieser fünf Myome mit differentieller Expression zwar ein großer Anteil der Transkripte trunkiert zu sein scheint, aber auch vollständige Transkripte in nicht unerheblichem Maße vorhanden sein müssen, liegt der chromosomale Bruchpunkt vermutlich außerhalb von *HMGA2*. In den anderen beiden Myomen wurden deutlichere Unterschiede festgestellt. Trotz einer hohen Konzentration der mRNA, die die ersten *HMGA2*-Exons enthält, wurden mit dem 3'-UTR-Assay Werte ermittelt, die mit dem Resultat der Lipom-Zelllinie vergleichbar sind. Diese Beobachtung legt nahe, daß in diesen beiden Myomen vornehmlich trunkierte Transkripte vorliegen, die nicht die vollständige 3'-UTR enthalten. Somit ist die Wahrscheinlichkeit hoch, daß die Bruchpunkte der Translokationen in diesen Tumoren innerhalb von *HMGA2* liegen und so eine Trunkierung der mRNA verursachen, die deshalb nicht mehr der posttranskriptionellen Regulation durch miRNAs der *let-7*-Familie unterliegt. Da von einem Verlust der Regulation durch *let-7* aufgrund trunkierter *HMGA2*-Transkripte nur ein kleiner Anteil der Myome mit Aberrationen der Region 12q14~15 betroffen ist, muß im Regelfall ein anderer Mechanismus der Dysregulation vorliegen, der die starke *HMGA2*-Expression in der gesamten 12q14~15-Gruppe verursacht.

III.

Loss of let-7 binding sites resulting from truncations of the 3' untranslated region of *HMGA2* mRNA in uterine leiomyomas.

Klemke M, Meyer A, Hashemi Nezhad M, Belge G, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 2010. Cancer Genetics and Cytogenetics 196: 119-123.

Eigenanteil:

- Probenentnahme aus Uterus-Leiomyomen zur Kryokonservierung sowie Karyotypisierung
- Planung der qRT-PCR zur Erfassung differentieller Expression
- Durchführung der RNA-Isolierung sowie der relativen Quantifizierung vollständiger und trunkierter *HMGA2*-Transkripte und deren Auswertung
- Verfassen des Manuskripts in Zusammenarbeit mit J. Bullerdiek



Loss of *let-7* binding sites resulting from truncations of the 3' untranslated region of *HMGA2* mRNA in uterine leiomyomas

Markus Klemke^a, Anke Meyer^a, Maliheh Hashemi Nezhad^a, Gazanfer Belge^a,
Sabine Bartnitzke^a, Jörn Bullerdiek^{a,b,*}

^aCenter for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Strasse ZHG, 28359 Bremen, Germany

^bClinic for Small Animals and Research Cluster REBIRTH, University of Veterinary Medicine, Bischofsholer Damm 15, 30137 Hannover, Germany

Received 28 May 2009; received in revised form 11 September 2009; accepted 27 September 2009

Abstract

A subset of uterine leiomyomas (UL) shows chromosomal rearrangements of the region 12q14~q15, leading to an overexpression of the high-mobility group protein A2 gene (*HMGA2*). Recent studies identified microRNAs of the *let-7* family as post-transcriptional regulators of *HMGA2*. Intragenic chromosomal breakpoints might cause truncated *HMGA2* transcripts lacking part of the 3' UTR. The corresponding loss of *let-7* complementary sites (LCS) located in the 3' UTR would therefore stabilize *HMGA2* mRNA. The aim of this study was to check UL with rearrangements of the chromosomal region 12q14~15 for truncated *HMGA2* transcripts by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. In 8/13 leiomyomas with aberrations of chromosomal region 12q15, the results showed the presence of the complete 3' UTR with all LCS. A differential expression with highly reduced 3' untranslated region levels was found in 5/13 myomas. In two of these, full-length transcripts were almost undetectable. Truncated transcripts were apparently predominant in roughly one-third of UL with chromosomal rearrangements affecting the *HMGA2* locus, where they lead to a higher stability of its transcripts and subsequently contribute to the overexpression of the protein. The assay used is also generally suited to detect submicroscopic alterations leading to truncated transcripts of *HMGA2*. © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

A subgroup of uterine leiomyomas (UL) is characterized by rearrangements of chromosomal segment 12q14~q15. Roughly 15 years ago, a causal link among these aberrations, the deregulation of the gene encoding the high-mobility group AT-hook 2 (*HMGA2*), and the pathogenesis of UL has been shown [1–3]. *HMGA2* was found to be targeted by breakpoints that are located either intragenically or extragenically 3' or 5' of the gene. This type of abnormality is shared by a variety of other mainly benign tumors of mesenchymal origin (e.g., lipomas or pulmonary chondroid hamartomas) [1,2,4,5]. Initially, the transcriptional deregulation of *HMGA2* by the rearrangements of controlling elements and/or fusion genes was thought to be the relevant molecular alteration resulting from the chromosomal rearrangements. Because *HMGA2* is abundantly

expressed during prenatal development and because its rearrangements often leave the open reading frame (ORF) intact, it is tempting to assume that the increased protein level alone is sufficient to cause or contribute to UL development [6]. Accordingly, the 12q14~q15 rearrangements are always associated with a drastically increased level of *HMGA2* mRNA [7–9]. However, there have been recent descriptions of another mechanism by which the chromosomal deviations can lead to a higher stability of the *HMGA2* transcript and, subsequently, a higher protein level as well. The 3' untranslated region (UTR) of *HMGA2* was shown to harbor multiple binding sites for microRNAs of the *let-7* family [10–14]. Truncations of the *HMGA2* transcript resulting from intragenic breakpoints can thus reduce the sensitivity of the transcript against microRNAs of the *let-7* family, finally leading to a higher protein level in the corresponding cells. This also explains an earlier observation that constructs containing a truncated *HMGA2* 3' UTR are more stable than those with a wild-type UTR [15]. While this mechanism is experimentally well documented, it is unclear to which extent truncation of *HMGA2*

* Corresponding author. Tel.: +49-421-2184239; fax: +49-421-2184239.

E-mail address: bullerd@uni-bremen.de (J. Bullerdiek).

mRNA coincides with the chromosomal rearrangements of the gene locus and could amplify the effect of simple transcriptional up-regulation. To address this question, we have quantified and compared the level of wild-type and truncated *HMGA2* mRNA from 13 primary UL and 2 cell lines derived from UL with 12q14~q15 rearrangements by real-time reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

2. Materials and methods

2.1. Tumor samples and cell culture

Tissue samples of uterine leiomyomas were collected immediately after surgery, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C for RNA isolation. Samples used for cell culturing were treated as described previously [9].

Immortalized cells from a lipoma with a t(3;12)(q27~q28;q14~q15) accompanied by a partial genomic deletion of the *HMGA2* locus were used as a control because the presence of fusion transcripts consisting of exons 1–3 of *HMGA2* and exons 9–11 of *LPP* was shown for this case [16]. Cells were cultured in medium 199 with Earle's salts containing 1% fetal calf serum (FCS) for 24 hours and in FCS-free medium for an additional 24 hours to avoid the stimulating effects of FCS on the expression of *HMGA2* from the nonrearranged allele. Before the isolation of total RNA, cells were lysed directly in the cell culture flask.

2.2. Methods

Total RNA was isolated from tissue samples and cell cultures using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). In addition to the on-column DNase I digestion, a second digestion was performed in solution before reverse transcription, since the PCR reaction with the primer set binding in the 3' UTR of *HMGA2* is highly sensitive to contaminations with genomic DNA.

Reverse transcription of 250 ng RNA was carried out with Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reverse transcriptase and random hexamers (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) according to the manufacturer's recommendations. Controls without enzyme (NoRT) were included for each sample to ensure the absence of DNA contaminations, which would introduce a bias to the results of the 3' UTR-specific primer set.

Quantitative real-time RT-PCR was performed on a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) with TaqMan Universal PCR Mastermix. Of each cDNA, 2 μL served as template in a final reaction volume of 20 μL . Reaction conditions were as follows: 2 minutes at 50°C , 10 minutes at 95°C , and 50 cycles of 15 seconds at 95°C and 1 minute at 60°C . A commercial *HMGA2*-specific assay (assay ID Hs00171569_m1; Applied Biosystems) with primers binding in exons 1 and 2 was used to detect transcripts irrespectively of a possible downstream truncation.

In addition, for full-length transcripts with an intact 3' UTR, a set of primers and probe complementary to the distal 3' end of the mRNA downstream of all *let-7* complementary sites (Fig. 1) was designed (forward primer: 5'-TGTATTATCACTGTCTGTTCTGCACAA-3', reverse primer: 5'-TGGAACTGTAACAAAGAGCAGGAA-3', probe: 6FAM-CAGCCTCTGTGATCCCCATGTGTTTTG-TAMRA). A differential expression of full-length and truncated *HMGA2* transcripts has been reported recently for lipomas with t(3;12) [17]. Herein, for evaluating the 3' UTR-specific primer/probe set and graphic display of the results, the same method with slight modifications has been used. To evaluate the primer and probe set designed for the distal 3' UTR of *HMGA2*, a cell line of a lipoma with t(3;12) was tested for differential expression. In a previous study [16], we had reported the presence of *HMGA2-LPP* fusion transcripts consisting of exons 1–3 of *HMGA2* and exons 9–11 of *LPP* in this cell line.

HPRT1 was chosen as an endogenous control and was detected with the following primer/probe set: forward primer: 5'-GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA-3', reverse primer: 5'-GTCTGGCTTATATCCAACACTTCGT-3', probe: 6FAM-CAAGCTTGCTGGTGAAAAGGACCCC-TAMRA. All reactions were run in triplicate. Due to the low *HMGA2* expression in normal tissues, the Ct values of the 3' UTR-specific PCR were much higher in myometrial tissues than in myomas with aberrations affecting the chromosomal region 12q15, making the use of normal tissue as a calibrator unsuitable. Therefore, the myoma with the smallest difference in dCt values between both PCRs (case 4) was chosen as a calibrator. Although the chromosomal region 12q13~q15 is rearranged in this case, the closely related dCt values indicate the predominance of full-length transcripts. Thus, an overestimation of the relative 3' UTR expression resulting from the alternative use of myometrial tissues was avoided. The \log_{10} of the relative expression was used for graphic display (Fig. 2).

3. Results

In a total of 234 uterine leiomyomas from 124 patients, chromosome analysis of GTG-banded metaphases revealed rearrangements of the chromosomal region 12q14~15 in 12 cases (Table 1), which were subjected to real-time RT-PCR analysis. One additional myoma (case 13) had an apparently normal karyotype, but fluorescence *in situ*



Fig. 1. Schematic representation of the full-length *HMGA2* transcript with the ORF consisting of five exons (gray boxes) and *let-7* complementary sites (LCS) in the 3' UTR (black lines) according to TargetScan [20], PicTar [21], and miRanda [22,23]. For a detailed list of the LCS, see ref. 11, Table S2. The black bars below the transcript indicate the positions of the regions amplified with two different primer sets.

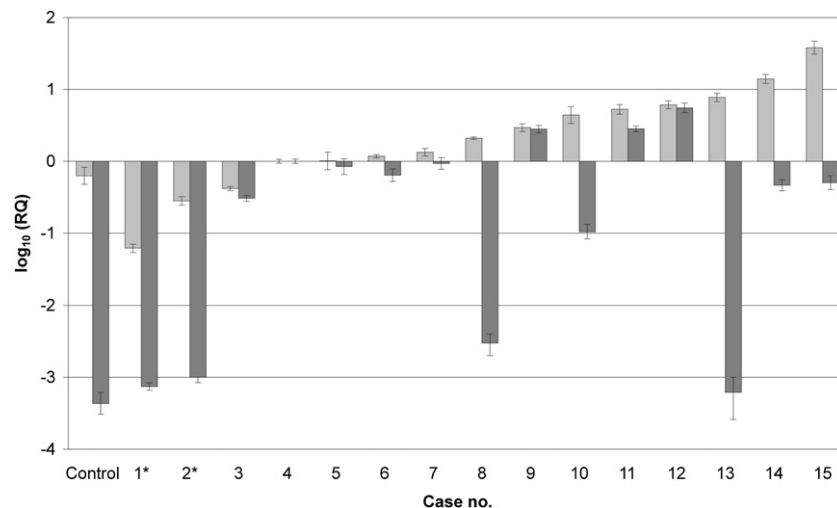


Fig. 2. Relative expression of *HMGA2* in uterine leiomyomas with chromosomal aberrations affecting region 12q14–15 and a lipoma cell line with known absence of full-length transcripts as a control. The \log_{10} of the relative expression levels is shown (RQ: relative quantification). qRT-PCR was performed with primers located in exons 1 and 2 of *HMGA2* (light gray bars) and an additional set of primers located in the distal 3' UTR of the gene (dark gray bars). Case 4 was used as calibrator. Asterisks indicate cell lines of myomas with t(12;14).

hybridization (FISH) revealed split signals for *HMGA2*, indicating a hidden rearrangement of the gene locus.

With the criteria defined by Bartuma et al. [17] (i.e., an expression level that is 10 times higher for exons 1 and 2 than for the distal 3' UTR), a differential expression was observed in two myoma cell lines (cases 1 and 2), as well as in 5/13 myomas (cases 8, 10, 13, 14, and 15; Fig. 2). In contrast, no differential expression was detected in the remaining eight myomas.

In the lipoma cell line, which was used as control, the relative expression of *HMGA2* exons 1–2 was only slightly lower than in the myoma used as the calibrator, but the expression of the distal 3' UTR is clearly reduced ($\log_{10} = -3,36$), thus indicating the usefulness of the test procedure used.

4. Discussion

We recently reported an overexpression of *HMGA2* in uterine leiomyomas with a normal 46,XX karyotype in comparison to matching myometrial tissues [9]. Moreover, our results confirmed the previous finding, that *HMGA2* is strongly overexpressed in leiomyomas with chromosomal aberrations, affecting the locus of the gene [7–9]. However, the molecular mechanisms causing an overexpression, especially in those cases with cytogenetically detectable translocations with breakpoints in or close to chromosomal region 12q14–15, remain to be identified. Several studies [10–13] have reported the post-transcriptional regulation of *HMGA2* expression by miRNAs of the *let-7* family. Reduced expression of *let-7* family members in uterine

Table 1

Karyotypes of 13 leiomyomas and two cell lines (nos. 1 and 2) originating from myomas with chromosomal translocations affecting region 12q13–q15

Case no.	Karyotype	Age (yr)	Tumor diameter (cm)
1	46,XX,del(7)(q22q32),t(12;14)(q15;q24)[29]	—	—
2	46,X,t(X;12)(q22;q15)[8]	—	—
3	46,XX,t(12;15;14)(q15;q26;q24)[20]/46,XX[1]	49	1.5
4	46,XX,t(3;5;12)(q23~25;p13~15;q13~15)[11]/45,XX,idem,-22[10]	42	5.0
5	46,XX,der(7)del(7)(p)del(7)(q),add(8)(q2?),add(10)(q2?),t(12;14)(q15;q24)[15]	40	8.0
6	46,XX,t(12;14)(q15;q24)[9]/46,XX[3]	47	5.0
7	46,XX,r(1),t(1;12;14)(p36.3;q14;q24)[7]	40	6.0
8	46,XX,t(2;12)(q33;q13)[17]	49	10.0
9 ^a	n. a.	46	3.0
10	46,XX,t(12;14)(q15;q24)[12]/ 45,XX,der(1),?t(1;2),-2,add(7)(?q36),t(12;14)(q15;q24)[2]/ 46,XX,del(4)(q31~q32),der(10),?t(10,14)(q24;q32),t(12;14)(q15;q24)[9]	47	4.0
11	46,XX,t(12;14)(q15;q24)[5]/46,XX[9]	37	7.0
12	45,XX,t(12;14)(q15;q24),der(14)t(12;14)(q15;q24),-22[8]	32	10.0
13 ^a	46,XX	48	1.5
14	46,XX,t(12;14)(q15;q24)[13]/46,XX,der(1)r(1;2),t(12;14)(q15;q24)[4]	44	6.0
15	46,XX,ins(14;12)[8]/46,idem,r(1)[4]	73	2.5

Abbreviation: n.a., not available

^a Case in which FISH revealed split signals for the *HMGA2* locus, indicating a rearrangement of the gene.

leiomyomas has been reported as well [14]. In addition to a downregulation of miRNAs responsible for the repression of *HMGA2* expression, losses of the *let-7* complementary sites (LCS) within the 3' UTR of *HMGA2* may also lead to a deficiency in *let-7*-mediated regulation [10]. Herein, we have investigated 13 leiomyomas as well as two cell lines of myomas with chromosomal aberrations affecting the *HMGA2* locus using a real-time RT-PCR approach to detect the truncation of *HMGA2* transcripts.

In 8/13 myomas, no differential expression between *HMGA2* exons 1 and 2 and the 3' UTR was observed (Fig. 2). This is in good agreement with previous studies reporting breakpoints upstream of the *HMGA2* gene in leiomyomas with rearrangements of chromosomal region 12q14–15 [18].

A lipoma with a t(3;12)(q27~q28;q14~q15) and a known disruption of the *HMGA2* gene was used as a control. The observed expression of the 3' UTR is extremely low in this sample, indicating the near absence of full-length transcripts. A complete absence should lead to negative PCR results, however, the negligible expression level is likely to be caused by a minor transcription of the unaltered allele.

Both cell lines as well as 5/13 myomas revealed a differential expression of exons 1–2 and the 3' UTR. In three of these tumors (cases 10, 14, and 15), however, a noteworthy amount of transcripts is truncated, but since full-length transcripts do not seem to be absent, the chromosomal breakpoint is unlikely to be located within the gene.

Two myomas (nos. 8 and 13) revealed expression levels of the 3' UTR, which are comparably low as the 3' UTR expression in the control, indicating the almost complete absence of full-length transcripts. Of note, the karyotype of one of these cases (no. 13) is apparently normal, but FISH performed on interphase nuclei indicated a rearrangement of *HMGA2* [9].

Overall, the test seems to be well suited to detect truncated *HMGA2* transcripts caused by cytogenetically visible genomic rearrangements as well as by those undetectable by conventional cytogenetics.

In conclusion, we were able to identify five leiomyomas with a strongly reduced expression of the full-length mRNA, which is the prevailing transcript in the remaining eight leiomyomas, also showing chromosomal rearrangements affecting 12q14–q15. Thus, a loss of *let-7* complementary sites does not account for the overexpression of *HMGA2* in the majority of UL, but seems to amplify the effects of a transcriptional de-regulation of *HMGA2* in a rather small subset of these tumors. Of note, phenotypic effects of a truncation of the *HMGA2* 3' UTR have also been described in a boy with a pericentric inversion of chromosome 12 that truncated *HMGA2* [19].

Acknowledgments

This study was supported by a grant from the Tönjes-Vagt-Foundation.

References

- [1] Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995;82:57–65.
- [2] Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 1995;10:436–44.
- [3] Hennig Y, Wanschura S, Deichert U, Bartnitzke S, Bullerdiek J. Rearrangements of the high mobility group protein family genes and the molecular genetic origin of uterine leiomyomas and endometrial polyps. *Mol Hum Reprod* 1996;2:277–83.
- [4] Kazmierczak B, Rosigkeit J, Wanschura S, Meyer-Bolte K, Van de Ven WJ, Kayser K, Kriehoff B, Kastendiek H, Bartnitzke S, Bullerdiek J. HMGI-C rearrangements as the molecular basis for the majority of pulmonary chondroid hamartomas: a survey of 30 tumors. *Oncogene* 1996;12:515–21.
- [5] Wanschura S, Kazmierczak B, Pohnke Y, Meyer-Bolte K, Bartnitzke S, Van de Ven WJ, Bullerdiek J. Transcriptional activation of HMGI-C in three pulmonary hamartomas each with a der(14)t(12;14) as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Lett* 1996;102:17–21.
- [6] Klotzbücher M, Wasserfall A, Fuhrmann U. Misexpression of wild-type and truncated isoforms of the high-mobility group I proteins HMGI-C and HMGI(Y) in uterine leiomyomas. *Am J Pathol* 1999;155:1535–42.
- [7] Hennig Y, Rogalla P, Wanschura S, Frey G, Deichert U, Bartnitzke S, Bullerdiek J. HMGIC expressed in a uterine leiomyoma with a deletion of the long arm of chromosome 7 along with a 12q14–15 rearrangement but not in tumors showing del(7) as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 1997;96:129–33.
- [8] Gross KL, Neskey DM, Manchanda N, Weremowicz S, Kleinman MS, Nowak RA, Ligon AH, Rogalla P, Drechsler K, Bullerdiek J, Morton CC. HMGA2 expression in uterine leiomyomata and myometrium: quantitative analysis and tissue culture studies. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38:68–79.
- [9] Klemke M, Meyer A, Hashemi Nezhad M, Bartnitzke S, Drieschner N, Frantzen C, Schmidt EH, Belge G, Bullerdiek J. Overexpression of HMGA2 in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes Chromosomes Cancer* 2009;48:171–8.
- [10] Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. Disrupting the pairing between *let-7* and *Hmga2* enhances oncogenic transformation. *Science* 2007;315:1576–9.
- [11] Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA *let-7* represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 2007;21:1025–30.
- [12] Shell S, Park SM, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA, Feig C, Lengyel E, Peter ME. *Let-7* expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:11400–5.
- [13] Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, Dinulescu DM, Lengyel E, Peter ME. *Let-7* prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle* 2007;6:2585–90.
- [14] Peng Y, Laser J, Shi G, Mittal K, Melamed J, Lee P, Wei JJ. Antiproliferative effects by *let-7* repression of high-mobility group A2 in uterine leiomyoma. *Mol Cancer Res* 2008;6:663–73.
- [15] Borrmann L, Wilkening S, Bullerdiek J. The expression of HMGA genes is regulated by their 3' UTR. *Oncogene* 2001;20:4537–41.
- [16] Lemke I, Rogalla P, Bullerdiek J. Large deletion of part of the HMGIC locus accompanying a t(3;12)(q27~q28;q14~q15) in a lipoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;129:161–4.
- [17] Bartuma H, Panagopoulos I, Collin A, Trombetta D, Domanski HA, Mandahl N, Mertens F. Expression levels of HMGA2 in adipocytic tumors correlate with morphologic and cytogenetic subgroups. *Mol Cancer* 2009;8:36.

- [18] Quade BJ, Weremowicz S, Neskey DM, Vanni R, Ladd C, Dal Cin P, Morton CC. Fusion transcripts involving HMGA2 are not a common molecular mechanism in uterine leiomyomata with rearrangements in 12q15. *Cancer Res* 2003;63:1351–8.
- [19] Ligon AH, Moore SD, Parisi MA, Mealiffe ME, Harris DJ, Ferguson HL, Quade BJ, Morton CC. Constitutional rearrangement of the architectural factor HMGA2: a novel human phenotype including overgrowth and lipomas. *Am J Hum Genet* 2005;76:340–8.
- [20] Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003;115:787–98.
- [21] Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005;37:495–500.
- [22] John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol* 2004;2:e363.
- [23] Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 2008;36:D149–53.

3.2 Identifizierung einer intronischen miRNA durch Sequenzvergleiche

MicroRNAs (abgekürzt: miRNA oder miR) sind einzelsträngige Ribonukleinsäuren mit einer Länge von 20 - 22 Nukleotiden. Zuerst entdeckt wurde die zu *lin-14* komplementäre miRNA *lin-4* im Nematoden *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Die miR-kodierenden Gene können sowohl in intergenischen Bereichen als auch intragenisch lokalisiert sein (Lin et al., 2006), in der Klasse der Mammalia werden die meisten miRNAs jedoch intronisch kodiert (Kim und Kim, 2007). Sie werden mit Ausnahme von in repetitiven Elementen wie Alu-Repeats lokalisierten miRNA-Genen (Borchert et al., 2006) von der RNA-Polymerase II transkribiert (Bracht et al., 2004; Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Die primären Transkripte, die als Pri-miRNA bezeichnet werden, besitzen daher eine 5'-Cap und sind polyadenyliert (Cai et al., 2004). Sie bilden eine charakteristische Struktur in Form einer einzelsträngigen Schleife („loop“) und eines doppelsträngigen Bereichs („stem“) aus. Im Zellkern schneidet ein Enzymkomplex, zu dem die Typ III-RNase Drosha sowie das doppelsträngige RNA bindende Enzym DGCR8/Pasha gehören, die Pri-miRNA an zwei Stellen, so daß eine Haarnadelstruktur, die sogenannte Prä- oder Präkursor-miRNA, entsteht. Sie ist etwa 70 Nukleotide lang und wird mit Hilfe von Exportin-5 aus dem Nukleus in das Zytoplasma transportiert. Dort wird die Prä-miRNA von Dicer, einer weiteren RNase III, unter Beteiligung des RNA-Bindeproteins TRBP/Loquacious erneut gespalten, so daß ein zunächst noch doppelsträngiges RNA-Molekül mit einer Länge von 20 bis 22 Basenpaaren (miRNA:miRNA*-Duplex) entsteht. Nach Rekrutierung des Argonaut-2 Proteins (Ago2) bildet sich ein als RISC (RNA-induced silencing complex) bezeichneter Ribonukleoproteinkomplex aus. Aus dem miRNA:miRNA*-Duplex bildet vornehmlich das Molekül mit der weniger stabilen Basenpaarung an seinem 5'-Ende die reife miRNA. Der als miRNA* bezeichnete Gegenstrang wird in der Regel degradiert (Schwarz et al., 2003; Du und Zamore, 2005). Mit Hilfe der im RISC gebundenen miRNA kann eine spezifische Bindung an die Ziel-mRNA erfolgen, woraufhin diese entweder degradiert oder ihre Translation inhibiert wird (Rana, 2007; Bushati und Cohen, 2007).

3.2.1 A microRNA encoded in a highly conserved part of the mammalian *HMGA2* gene (von Ahsen et al., 2008)

Die typische Sekundärstruktur der primären miRNA-Transkripte erlaubt die Vorhersage potentieller miRNA-Gene auf der Grundlage von Sequenzinformationen. Experimente mit murinen miRNAs wiesen eine als mmu-miR-763 bezeichnete MicroRNA nach, die durch ein Gen im dritten Intron des murinen *Hmga2* kodiert wird (Berezikov et al., 2006). In der folgenden Veröffentlichung (von Ahsen et al., 2008) wurde ein 1,2 kb langer Abschnitt aus dem dritten humanen *HMGA2*-Intron mit der entsprechenden Sequenz acht anderer Mammalia verglichen. Dieser Sequenzvergleich ergab, daß der darin enthaltene, die murine miR-763 kodierende Abschnitt in den herangezogenen Sequenzen hochkonserviert ist, wohingegen andere intronische Bereiche variabel sind. In den dem murinen Gen homologen Sequenzen wurden Sequenzidentitäten zwischen 92 und 100 % festgestellt. Aufgrund der geringen Sequenzunterschiede in diesem 120 bp langen Bereich könnten seine Transkripte in allen untersuchten Spezies die für primäre miRNAs typische Stem-Loop-Struktur ausbilden. Zwischen der humanen und der murinen Sequenz liegt die Homologie bei 95 %, und die Sequenz der reifen, murinen miR unterscheidet sich in nur einer von 22 Positionen von der humanen Sequenz.

Da die murine miR-763 experimentell nachgewiesen wurde und die Sequenz des murinen miRNA-Gens zu 95 % (114 von 120 Basenpaaren) mit der humanen Sequenz übereinstimmt, wäre eine Prozessierung des entsprechenden Bereichs des dritten *HMGA2*-Introns zu einer reifen miRNA auch beim Menschen denkbar. Die humane miR-763 könnte vor allem in solchen Geweben entstehen, die eine starke Expression des *HMGA2*-Gens aufweisen, da Vorläuferstrukturen in Form von Präkursor-mRNAs (Prä-mRNA) vorhanden sind, die wie intergenische miRNAs von der RNA-Polymerase II transkribiert wurden. Aus ihnen werden die Introns und damit auch der die Stem-Loop-Sequenz enthaltende Abschnitt herausgespleißt. Bislang existieren jedoch keine über die Sequenzhomologie hinausgehenden Hinweise auf eine humane miR-763, da im Gegensatz zur murinen miR-763 kein experimenteller Nachweis vorliegt. Daher muß die humane miR-763 derzeit noch als hypothetisch angesehen werden.

IV.

A microRNA encoded in a highly conserved part of the mammalian *HMGA2* gene.

Von Ahsen I, Nimzyk R, Klemke M, Bullerdiek J. 2008. Cancer Genetics and Cytogenetics 187: 43-44.

Eigenanteil:

- Diskussion des Manuskripts mit I. von Ahsen und R. Nimzyk
- Versuche zum experimentellen Nachweis der miRNA mittels RT-PCR



Short communication

A microRNA encoded in a highly conserved part of the mammalian *HMGA2* gene

Inga von Ahsen^{a,b}, Rolf Nimzyk^b, Markus Klemke^b, Jörn Bullerdiek^{a,b,*}

^a*Small Animal Clinic, University of Veterinary Medicine and Research Cluster of Excellence "REBIRTH," Bischofsholer Damm 15, D-30173 Hannover, Germany*

^b*Center of Human Genetics, University of Bremen, Leobener Strasse ZHG, D-28359 Bremen, Germany*

Received 14 July 2008; accepted 16 July 2008

Abstract

The high mobility group protein HMGA2 plays an important role as a chromatin component of stem cells and as a protein causally related to the development of a variety of benign tumors (e.g., uterine leiomyomas, lipomas, and pleomorphic adenomas of the salivary glands). Herein, the existence of a highly conserved region within intron 3 of *HMGA2* encoding a microRNA is described. The co-expression with *HMGA2* suggests that as an intronic microRNA, this microRNA may cooperate with HMGA2 in its physiological and/or aberrant functions. © 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

The high mobility group A2 (HMGA2) protein is an architectural transcription factor that can bind to DNA by any of the three separate DNA-binding domains called AT hooks, thus regulating a huge number of target genes [1].

HMGA2 is abundantly expressed during embryonic development and in embryonic stem cells [2–5]. Also, its aberrant expression has been linked causally to the growth and development of a variety of benign tumors (e.g., lipomas, leiomyomas, pleomorphic adenomas of the salivary glands, and pulmonary chondroid hamartomas [6–8], whereas its overexpression in malignant tumors has been correlated with a worse prognosis and may be associated with cancer cells showing a stem cell-like behavior [9]. From the growth patterns of some of the entities of benign tumors displaying a marked intratumoral histologic heterogeneity (e.g., cartilage, smooth muscle, and adipose tissue), despite their monoclonal origin, we have concluded that this protein allows the cells to regain stem cell properties [10], thus mediating their ability to follow various routes of mesenchymal differentiation and even stimulate the outgrowth of epithelial components not derived from the tumor cell population itself [11,12]. Comparative genome analysis by sequence alignment shows that the *HMGA2* open reading frame is highly conserved among

mammals, and even a comparison to other vertebrates (e.g., chicken) reveals a high degree of homology [13]. With regard to its noncoding regions (i.e., untranslated regions and intronic sequences), the homology is much lower. Despite this generally lower homology, intron 3 of *HMGA2* harbors a short sequence that turns out to be considerably conserved. Intron 3 of *HMGA2* has a size of roughly 112 kilobases [14] and represents one of the most frequent targets of structural chromosomal abnormalities in human tumors [7]. A short sequence within that intron shows a high homology to an intronic sequence of the murine *HMGA2* (i.e., a locus encoding microRNA mmu-miR-763 (http://www.microna.sanger.ac.uk/cgi-bin/sequences/mirna_entry.pl?acc=MI0004516)). Moreover, clearly related conserved sequences can be found as *HMGA2* intronic microRNA in the genome of other mammalian species [e.g., cow, dog, rabbit, elephant, and rhesus macaque (Fig. 1)]. As a rule, intronic microRNA are transcribed by polymerase II being part of a transcription unit with their host genes [15]. Accordingly, the primary transcript of *HMGA2* not only gives rise to an mRNA encoding a protein highly relevant in embryonic and tumor development, but in addition, a microRNA seems to be processed from it. However, the high evolutionary conservation of a small part of intron 3 of *HMGA2* for a long period of at least 85–100 million years of mammalian development supports an important role for this microRNA and the significance of its coregulation with *HMGA2* itself.

* Corresponding author. Tel.: +49-421-218-4239; fax: +49-421-218-4239.

E-mail address: bullerdiek@uni-bremen.de (J. Bullerdiek).

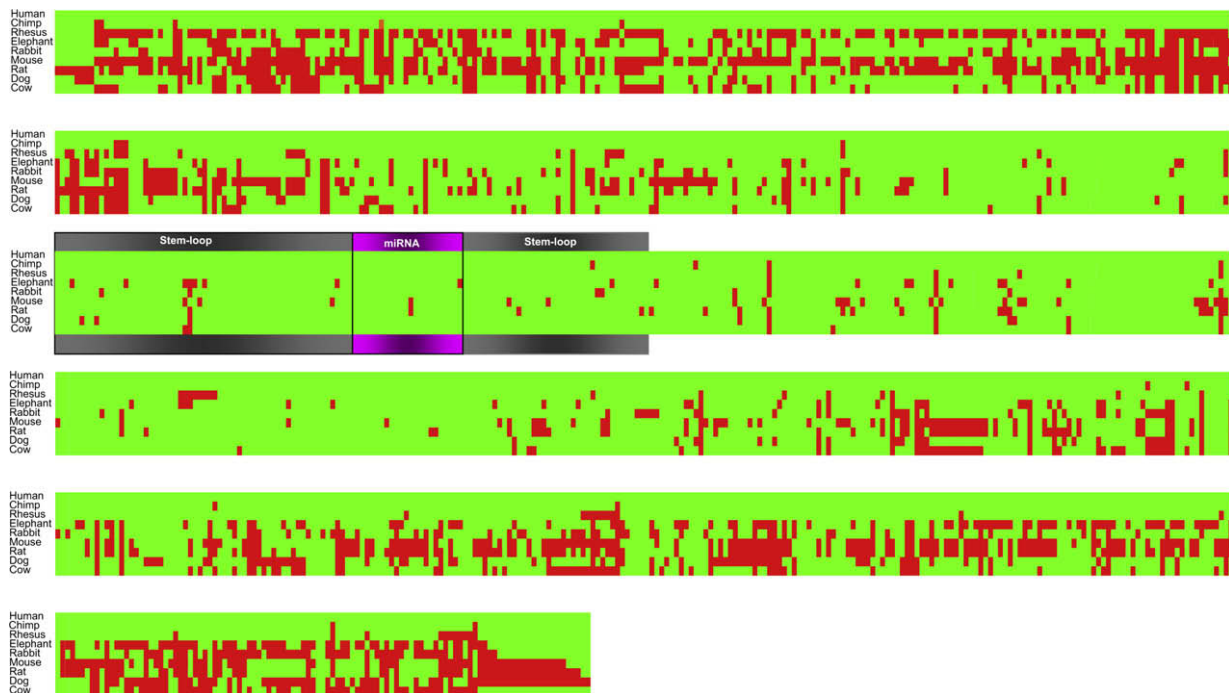


Figure 1. Comparative genome analysis of 1200 base pairs (bp) of intron3 of *HMGA2* by sequence alignment (matches in green, mismatches in red) between human (*Homo sapiens*; 100%) used as template, chimpanzee (*Pan troglodytes*; 99%), rhesus macaque (*Macaca mulatta*; 100%), elephant (*Elephas maximus*; 92%), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*; 96%), mouse (*Mus musculus*; 95%), rat (*Rattus norvegicus*; 96%), dog (*Canis familiaris*; 97%), and cow (*Bos Taurus*; 98%). This part of the intron encodes microRNA mmu-miR-763 (gray- and violet-colored); the homology of sequences (120 bp) is indicated in parentheses.

References

- [1] Bustin M, Reeves R. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Proc Nucleic Acid Res Mol Biol* 1996;54:35–100.
- [2] Chiappetta G, Avantiato V, Visconti R, Fedele M, Battista S, Trapasso F, Merciai BM, Fidanza V, Giacotti V. High level expression of the *HMGI (Y)* gene during embryonic development. *Oncogene* 1996;13:2439–46.
- [3] Rogalla P, Drechsler K, Frey G, Hennig Y, Helmke B, Bonk U, Bullerdiek J. HMGIC expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol* 1996;149:775–9.
- [4] Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Bullerdiek J, Hameister H. The expression pattern of the *Hmgic* gene during development. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;23:350–7.
- [5] Li O, Li J, Droge P. DNA architectural factor and proto-oncogene *HMGA2* regulates key developmental genes in pluripotent human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 2007;581:3533–7.
- [6] Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K. Disruption of the architectural factor *HMGI-C*: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 1995;82: 57–64.
- [7] Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, van den Berghe H, van de Ven WJ. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, *HMGI-C*, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 1995;10:436–44.
- [8] Rogalla P, Lemke I, Kazmierczak B, Bullerdiek J. An identical *HMGIC-LPP* fusion transcript is consistently expressed in pulmonary chondroid hamartomas with t(3;12)(q27-28;q14-15). *Genes Chromosomes Cancer* 2000;29:363–6.
- [9] Fusco A, Fedele M. Roles of *HMGA* proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:899–910.
- [10] Bullerdiek J. The molecular target of 12q14-15 aberrations in benign solid tumors. *HMGIC* rearrangements and beyond. In: Fourth International Chromosome 12 Workshop 1997, Nice; Kucherlapati R, Marynen P, Turc-Carel C, editors.
- [11] Kazmierczak B, Rosigkeit J, Wanschura S, Meyer-Bolte K, Van de Ven WJ, Kayser K, Krieghoff B, Kastendiek H, Bartnitzke S, Bullerdiek J. *HMGIC-C* rearrangements as the molecular basis for the majority of pulmonary chondroid hamartomas: a survey of 30 tumors. *Oncogene* 1996;12:515–21.
- [12] Lemke I, Rogalla P, Grundmann F, Kunze WR, Haupt R, Bullerdiek J. Expression of the *HMGA2-LPP* fusion transcript in only one of 61 karyotypically normal pulmonary chondroid hamartomas suggests the primary nature of chromosomal aberrations in those tumors with chromosomal rearrangements. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;138:160–4.
- [13] von Ahsen I, Rogalla P, Bullerdiek J. Germ line mutations of the *HMGA2* gene are rare among the general population. *Anticancer Res* 2006;26:3289–92.
- [14] Hauke S, Flohr A, Rogalla P, Bullerdiek J. Sequencing of intron 3 of *HMGA2* uncovers the existence of a novel intron. *Genes Chromosomes Cancer* 2002;34:17–23.
- [15] Lin S-L, Miller JD, Ying S-Y. Intronic Micro RNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol* 2006;2006:1–13.

3.3 Molekulargenetische Marker zur Abgrenzung von Schilddrüsenkarzinomen folliculären Ursprungs

Tumoren der Schilddrüse können insbesondere dann eine diagnostische Herausforderung darstellen, wenn es sich um folliculäre Neoplasien handelt, da hier histologisch als einzige Unterscheidungskriterien zwischen Adenomen und folliculären Karzinomen Kapseldurchbrüche oder Gefäßeinbrüche herangezogen werden können (Schmid et al., 2003; Sheu et al., 2003; DeLellis et al., 2004). Zytologische Präparate aus präoperativen Feinnadelpunktionen ermöglichen diese Abgrenzung nicht, da die Zellmorphologie folliculärer Adenome und Karzinome in der Regel identisch ist (Greaves et al., 2000; Baloch et al., 2002; Smith et al., 2005; Takano, 2011). Somit kann eine gesicherte Diagnosestellung in der Regel erst postoperativ nach histologischer Aufarbeitung des Tumors erfolgen. Nur in einem geringen Prozentsatz der präoperativ als malignitätsverdächtig eingestuft Tumoren bestätigt sich dabei allerdings der Verdacht auf ein Karzinom (Goellner et al., 1987; Chiappetta et al., 1998; Greaves et al., 2000; Baloch et al., 2002). Aus diesen Gründen besteht ein hoher Bedarf an einem molekularen Marker, der die Beurteilung der Dignität unterstützen kann (Schmid und Farid, 2006).

Zwar existierten bereits Studien zur Expression der *HMG*-Gene in Schilddrüsentumoren, diese konzentrierten sich jedoch auf *HMGA1* (Chiappetta et al., 1995; Chiappetta et al., 1998), dessen Expression als Voraussetzung für die maligne Transformation von Thyreozyten angesehen wurde (Berlingieri et al., 1995). Später wurde *HMGA1* sogar als spezifischer Marker für folliculäre Karzinome vorgeschlagen (Czyz et al., 2004). Obwohl es andererseits Hinweise auf eine wichtige Funktion von *HMGA2* bei der malignen Transformation von Thyreozyten gab (Berlingieri et al., 1995; Vallone et al., 1995), wurde es im Zusammenhang mit Karzinomen der Schilddrüse vernachlässigt. Ein Grund dafür kann darin gesehen werden, daß man aufgrund der an Zelllinien gemachten Beobachtungen bereits früh zu dem Schluß gekommen war, *HMGA2* werde nicht ausnahmslos in Schilddrüsenkarzinomen exprimiert (Chiappetta et al., 1995). Sieben Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien waren mittels Northern und Western Blot untersucht worden. Während in allen Zelllinien eine Expression von *HMGA1* festgestellt wurde, waren zwei Zelllinien negativ im Hinblick auf die *HMGA2*-Expression, darunter auch die einzige aus einem folliculären Karzinom hervorgegangene Zelllinie WRO (Chiappetta et al., 1995). Insbesondere die Feststellung, daß diese Zelllinie *HMGA2* nicht exprimiert, erscheint zweifelhaft und kann dem Umstand geschuldet sein, daß die Sensitivität der zum Nachweis der Expression durchgeführten Northern und Western Blots verhältnismäßig gering war.

Im nachfolgend beschriebenen Abschnitt wurde deshalb die *HMGA2*-Expression in einer umfangreichen Serie von Gewebeproben aus benignen und malignen Schilddrüsentumoren

mit Hilfe einer Real-Time RT-PCR untersucht, die sich durch eine hohe Sensitivität auszeichnet. Darüber hinaus wurden ausgewählte Fälle auch immunhistochemisch mit einem gegen das HMGA2-Protein gerichteten Antikörper gefärbt. In zwei weiteren Veröffentlichungen werden Ergebnisse aus Untersuchungen zur Fusion der Gene *PAX8* und *PPARG* dargestellt, die ebenfalls als ein für follikuläre Karzinome spezifischer Marker vorgeschlagen wurde, dessen Sensitivität inzwischen aber ebenso fraglich ist wie seine Spezifität.

3.3.1 Upregulation of *HMGA2* in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias (Belge et al., 2008)

Die *HMGA2*-Expression von insgesamt 61 formalinfixierten Gewebeproben aus Schilddrüsentumoren wurde mit einer qRT-PCR quantifiziert und mit der in Normalgeweben festgestellten Expression verglichen. In 19 Fällen handelte es sich um Tumoren, die histologisch als Adenom klassifiziert worden waren. Als weitere nicht-maligne Läsion wurden zwei Fälle von Thyroiditis untersucht. Aus der Gruppe der malignen Tumoren wurden Gewebeproben aus 28 papillären, neun follikulären und drei anaplastischen Karzinomen in die Untersuchung einbezogen. Ausgewählte Fälle wurden zusätzlich immunhistochemisch mit einem gegen das *HMGA2*-Protein gerichteten Antikörper gefärbt.

Wie die Quantifizierung der *HMGA2*-Expression ergab, war in benignen Läsionen, d. h. in Adenomen und beiden Fällen von Thyroiditis, keine oder eine im Vergleich zu tumorfreiem Schilddrüsengewebe nur moderat erhöhte Expression feststellbar. Nur fünf der 21 benignen Läsionen wiesen leicht erhöhte Werte auf, die nur von einigen wenigen Karzinomen unterschritten wurden.

In der Mehrheit der Karzinome wurden Werte gemessen, die die Expression der nicht-malignen Läsionen überstieg. Keine gesteigerte *HMGA2*-Expression wurde in nur je einem papillären und follikulären Karzinom festgestellt. Abgesehen von diesen Ausnahmen wurde in den untersuchten Karzinomen mehrheitlich eine verglichen mit tumorfreiem Schilddrüsengewebe mindestens zehnfach, zum Teil auch mehr als einhundertfach höhere Expression ermittelt. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß *HMGA2* einen wichtigen Hinweis auf die Dignität von Schilddrüsentumoren geben kann. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbung bestätigten die mittels quantitativer Real-Time RT-PCR gewonnenen Erkenntnisse. Sowohl in tumorfreiem Schilddrüsengewebe als auch in einem follikulären Adenom wurde keine positive Reaktion mit dem *HMGA2*-spezifischen Antikörper beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den untersuchten Karzinomen eine starke nukleäre Anfärbung. Besonders eindrucksvoll gelang dies in einem insulär differenzierten Bereich eines follikulären Karzinoms. Während die Zellkerne von transformierten Thyreozyten sehr stark angefärbt wurden, zeigten die Kerne in dazwischengelagertem Bindegewebe eine negative Färbereaktion. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, daß Karzinome im Gegensatz zu Adenomen verstärkt *HMGA2* exprimieren und daß die Quantifizierung der *HMGA2*-Expression somit ein hilfreiches Werkzeug für die Dignitätsbewertung insbesondere follikulärer Neoplasien der Schilddrüse darstellen könnte.

V.

Upregulation of *HMGA2* in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias.

Belge G, Meyer A, Klemke M, Burchardt K, Stern C, Wosniok W, Loeschke S, Bullerdiek J.
2008. *Genes, Chromosomes and Cancer* 47: 56-63.

Eigenanteil:

- Durchführung der RNA-Isolierungen aus FFPE-Gewebeproben
- Durchführung und Auswertung der quantitativen Real-Time RT-PCR gemeinsam mit A. Meyer
- Verfassen des Manuskripts in Zusammenarbeit mit A. Meyer und J. Bullerdiek

Anmerkung: In diese Publikation flossen zum Teil Ergebnisse ein, die bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit erlangt wurden („Quantitative Expressionsanalyse des *HMGA2*-Gens in malignen Tumoren mittels Real-Time PCR“, Universität Bremen, 2006).

Upregulation of *HMGA2* in Thyroid Carcinomas: A Novel Molecular Marker to Distinguish Between Benign and Malignant Follicular Neoplasias

Gazanfer Belge,^{1*} Anke Meyer,^{1*} Markus Klemke,^{1*} Käte Burchardt,² Corinna Stern,³ Werner Wosniok,⁴ Siegfried Loeschke,¹ and Jörn Bullerdiek^{1†}

¹Center for Human Genetics, University of Bremen, Bremen, Germany

²Department of Pathology, General Hospital Bremen-Mitte, Bremen, Germany

³Department of Pathology, General Hospital Altona, Hamburg, Germany

⁴Institute of Statistics, University of Bremen, Bremen, Germany

The identification of molecular markers allowing to differentiate between benign and malignant thyroid tumors remains a diagnostic challenge. Herein, we have used the expression of the high mobility group protein gene *HMGA2* and its protein, respectively, as a possible marker detecting malignant growth of thyroid tumors. *HMGA2* belongs to the high mobility group proteins, i.e. small, highly charged DNA-binding proteins. While *HMGA2* is highly expressed in most embryonic tissues, its expression in adult tissues is very low. However, a reactivation of *HMGA2* expression has been described for various malignant tumors and often correlates with the aggressiveness of the tumors. The aim of this study was to investigate whether the *HMGA2* expression can be used to detect malignant thyroid tumors. RNA from 64 formalin-fixed paraffin-embedded thyroid tissues including normal tissue ($n = 3$), thyroiditis ($n = 2$), and follicular adenomas ($n = 19$) as well as follicular ($n = 9$), papillary ($n = 28$), and anaplastic ($n = 3$) carcinomas was reverse transcribed. Finally, real-time quantitative RT-PCR was performed. Expression differences of up to 400-fold were detected between benign and malignant thyroid tumors. Based on *HMGA2* expression alone, it was possible to distinguish between benign and malignant thyroid tissues with a sensitivity of 95.9% and a specificity of 93.9%. There was a highly significant ($P < 0.001$) difference with histology of the tumors being the gold standard between the benign lesions and malignant tumors. Our results show that even as a stand-alone marker *HMGA2* expression has a high potential to improve diagnoses of follicular neoplasms of the thyroid. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Thyroid nodules are frequently found in both sexes. While by palpation it is detected in 4–8% of adults, ultrasound examination reveals a much higher frequency of about 40% corresponding to roughly 50% of thyroid nodules found at autopsy. As to those nodules selected for fine needle aspiration (FNA), the average cancer rate is ~10–13% and does not increase with the number of nodules per patient (Frates et al., 2005). In patients with multiple nodules the cancer is located in the dominant or larger nodule in only two thirds of the cases (Frates et al., 2005). FNA is now the widely accepted method for screening of suspect lesions for cancer. However, the histological diagnosis of follicular-patterned thyroid lesions is often difficult and cytological samples obtained by FNA are even more difficult to diagnose (Greaves et al., 2000; Baloch et al., 2002; Smith et al., 2005). These difficulties are reflected by papers entitled “The demise of follicular carcinoma of the thyroid (LiVolsi and Asa, 1994)”, “Can we agree to disagree”

(LiVolsi, 2003), or “Follicular-patterned lesions of the thyroid: the bane of the pathologist” (Baloch and LiVolsi, 2002). A particular problem in clinical practice is the cytological differentiation between follicular thyroid carcinoma (FTC) and benign follicular thyroid adenoma (FTA), since the cell morphology is often nearly identical. Thus, FNA followed by cytological examination often will not lead to a precise diagnosis of these lesions. To find diagnostic markers that would enable a better classification of thyroid tumors, we quantified *HMGA2* gene expression in benign as well as malignant thyroid lesions and normal thyroid tissue samples by quantitative real-time reverse-transcription-PCR (qRT-PCR). The high mobility group A (HMGA)

*These authors contributed equally to this paper.

†Correspondence to: J. Bullerdiek, Center for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Str. ZHG, D-28359 Bremen, Germany. E-mail: bullerd@uni-bremen.de

Received 3 May 2007; Accepted 19 September 2007

DOI 10.1002/gcc.20505

Published online 17 October 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

proteins are small chromatin associated nonhistone proteins that act as architectural transcription factors (Wolffe, 1994; Bustin and Reeves, 1996). HMGA proteins have three DNA-binding domains designated as AT-hooks, enabling their binding to the minor groove of AT-rich DNA, and an acidic C-tail responsible for protein–protein interactions (Reeves and Nissen, 1990; Chau et al., 1995; Harter et al., 2004; Reeves and Beckerbauer, 2005). The interaction of HMGA with DNA leads to changes in chromatin structure involving HMGA proteins in the regulation of the expression of a high number of target genes. The oncogenic potential of *HMGA2* was first described by Ashar et al. (1995) and Schoenmakers et al. (1995). The *HMGA2* expression level is very high during embryonic development whereas it is almost undetectable in differentiated cells and tissues (Chiappetta et al., 1996; Rogalla et al., 1996; Hirning-Folz et al., 1998). A strong association between the over-expression of *HMGA2* and an adverse prognosis has been demonstrated for carcinomas of the breast (Rogalla et al., 1997), lung (Sarhadi et al., 2006), and squamous cell carcinoma of the oral cavity (Miyazawa et al., 2004).

Nevertheless, so far only few of these studies have used qRT-PCR to quantify *HMGA2* expression in human neoplasias. In the present study, we analyzed the expression level of *HMGA2* in paraffin-embedded thyroid tissues, using real-time quantitative RT-PCR. The *HMGA2* gene expression of 9 FTCs, 28 PTCs, 3 ATCs, 19 adenomas, and 3 normal thyroid tissue samples was tested by quantitative real-time RT-PCR. To confirm the qRT-PCR results on the protein level, immunohistochemistry was performed on two samples from apparently normal thyroid tissue, five adenomas, seven FTCs, and five PTCs with an antibody raised against HMGA2.

MATERIALS AND METHODS

Patients

All patients underwent surgery between 1995 and 2005 in the general hospitals Bremen-Mitte or Hamburg Altona. In this study 64 thyroid samples from 44 female and 17 male patients were analyzed: 19 were adenomas, 28 papillary thyroid carcinomas (PTC), 9 follicular carcinomas (FTC), and 3 anaplastic carcinomas (ATC) (Table 1). In addition, two samples from patients with lymphofollicular thyroiditis were included. The control group consisted of three nonmalignant surrounding tissues. The age of patients ranged from 21 to 85

years. The average thyroid nodule size was 3.1 cm (range 0.3–14.0 cm).

Sample Preparation

Six 5- μ m sections of each FFPE tissue were deparaffinized in xylene prior to RNA isolation. Haematoxylin–eosin stains were prepared from consecutive sections following those used for RNA isolation. To validate the constant expression level of the endogenous control, RNA was isolated from a primary cell culture derived from apparently normal thyroid tissue, cell cultures of six adenomas (S325, S40.2, S211, S121, S731, and S734.1), and two carcinomas (ARO and WRO) with the RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

RNA-Isolation

Total RNA was extracted using the high pure RNA paraffin kit for isolation of total RNA from FFPE tissues (Roche, Penzberg, Germany) including a Proteinase K and DNase I digestion according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration and the ratio of absorbance at 260–280 nm was quantitated by spectrophotometry.

Reverse Transcription

About 250 ng of total RNA was reverse transcribed with 200 U of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) and 150 ng random hexamers according to the manufacturer's instructions. RNA was denatured before transcription at 65°C for 10 min and subsequent cooling on ice for 1 min. After adding the enzyme to the RNA primer mixes, samples were incubated for 10 min at 25°C to allow annealing of the random hexamers. Reverse transcription was performed at 37°C for 50 min followed by inactivation of the reverse transcriptase at 70°C for 10 min.

Real-Time Quantitative RT-PCR

RT-PCR amplification was performed using the ABI Prism 7300 sequence detection system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). Because of different degradation of RNA isolated from formalin-fixed samples, a relative quantification method with 18S rRNA as endogenous control was used.

HMGA2 and 18S rRNA expression analyses were performed in triplicate in a total volume of 20 μ l using 2 μ l of each cDNA corresponding to 25 ng of total RNA. TaqMan primers and probe for *HMGA2* were ordered as assay on demand (No. Hs00171569_m1; Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). The

TABLE I. Histology of Thyroid Lesions Used for *HMGA2* Expression Analyses

Case no.	Age (years)	Sex	Histology	Tumor diameter (cm)	TNM classification and/or grading
1	58	f	Thyroiditis	–	–
2	40	m	Adenoma	7.5	–
3	47	m	Adenoma	6.8	–
4	25	f	Adenoma	2.5	–
5	85	m	PTC	4.0	pT3a
6	53	f	Adenoma	6.5	–
7	44	m	Adenoma	4.0	–
8	48	f	Adenoma	5.0	–
ST			Normal thyroid tissue	–	–
9	63	f	Thyroiditis		–
10	29	f	Adenoma	7.0	–
11	54	f	Adenoma	1.0	–
12	71	f	Adenoma	1.7	–
13	35	m	Adenoma	6.5	–
14	51	f	Adenoma	6.0	–
15	42	m	Adenoma	3.5	–
16	42	f	Adenoma	1.0	–
17	34	f	FTC	2.2	G1
18	61	f	Adenoma	4.0	–
19	44	m	Adenoma	1.0	–
20	39	f	Adenoma	1.5	–
21	30	f	Adenoma	0.3	–
22	40	f	Adenoma	3.8	–
23	42	f	Adenoma	4.0	–
24	35	f	MI-FTC (t)	2.1	pT2 N0 MX
25	61	m	FTC (o)	8.0	pT4
26	72	f	FV-PTC	1.0	pT1
27	84	f	FV-PTC	6.0	pT3 pNX
28	38	f	PTC	0.6	pT1
29	50	f	PTC	2.2	pT2
30	21	f	FV-PTC	1.0	pT1 pNX pMX
31	31	m	PTC	2.5	pT2 pN0
32	46	f	PTC	1.5	pT1; G2
33	65	f	ATC	2.0	pT4 N0; G1V
34	54	f	PTC	0.6	pT1 pNX pMX
35	85	f	PTC	1.5	G2
36	85	f	PTC	14.0	pT3; G3
37	42	m	FV-PTC	0.7	pT1 N0 MX
38	66	f	MI-FTC	2.0	pT1
39	72	f	FV-PTC	1.0	pT3
40	38	m	PTC	0.8	pT1; G1
41	76	f	ATC	3.8	pT4b
42	33	f	PTC	2.5	pT2; G2
43	69	m	FV-PTC	0.5	pT1 NX MX
44	42	f	FV-PTC	1.4	pT2a; G2
45	30	f	PTC	2.5	pT2 NX
46	49	f	PTC	1.2	pT2
47	25	f	FV-PTC	2.3	pT2 pN0
48	48	f	PTC	0.8	pT1; G1-2
49	76	f	ATC	1.7	pT4b
50	67	m	FTC (t)	5.5	pT3 pNX pM1
51	59	f	FTC	1.2	pT1; G2
52	34	f	PTC	2.3	pT2 pNI pMX
53	57	f	PTC	0.9	pT1
54	31	m	PTC	2.0	pT3 pNI
55	27	m	FV-PTC	2.5	pT2

TABLE I. Histology of Thyroid Lesions Used for *HMGA2* Expression Analyses (Continued)

Case no.	Age (years)	Sex	Histology	Tumor diameter (cm)	TNM classification and/or grading
56	66	f	PTC	2.0	pT3; G2
57	41	m	PTC	2.0	pT1; G2
58	37	f	FTC	2.8	pT2 N0
59	69	m	FTC	3.0	pT4
60	79	f	PTC	2.0	pT3 pNX; G1
61	71	f	FTC (o), with partially insular pattern	9.0	pT4 NX MX

ST, surrounding tissues; PTC, papillary thyroid carcinoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; MI-FTC, minimally invasive FTC; ATC, anaplastic thyroid carcinoma; FV-PTC, follicular variant PTC; (o), oncocytic; (t), trabecular.

HMGA2-specific primers in this assay are spanning the boundary between Exons 1 and 2. Primers and probe for 18S rRNA were 5'-GGATCCATTTGGA GGGCAAGT-3' (forward), 5'-AATATACGCTATTG GAGCTGGAATTAC-3' (reverse), and FAM-TGC CAGCAGCCGC-MGB TAMRA (probe) (Antonov et al., 2005). For each run nontemplate controls (-RT) and reactions without reverse transcriptase (-RT) were included. PCR conditions were as follows: 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, followed by 50 cycles with 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C.

Analysis of Gene Expression

The relative expression was calculated by the ΔC_t method. The results were compared with those obtained by conventional histology, which is the current "gold standard" in diagnosis of thyroid lesions. In addition, correlation analyses as well as normal distribution parameter estimations were performed to determine the optimal decision limit to distinguish benign from malignant tumors. Sensitivity and specificity calculations were done on logarithms of expression to obtain normally distributed values. Moreover, Student's *t* test was performed to determine the significance of observed differences in *HMGA2* expression in benign and malignant tissues.

Immunohistochemical Analysis of *HMGA2* Expression

For the immunohistochemical analysis of *HMGA2* expression, formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections (6 μ m) were deparaffinized, rehydrated, and washed with PBS before immunoperoxidase staining. Slides were incubated

UPREGULATION OF *HMGA2* IN THYROID CARCINOMAS

59

overnight at 4°C in a humidified chamber with goat anti-*HMGA2* (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA). Biotinylated anti-goat link was used as secondary antibody (30 min). Slides were then incubated with avidin biotin enzyme label (Vector Laboratories, California, USA) for 30 min and developed with AEC peroxidase substrate (Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden, Germany) for 10 min. Finally, slides were counter-stained with haematoxylin.

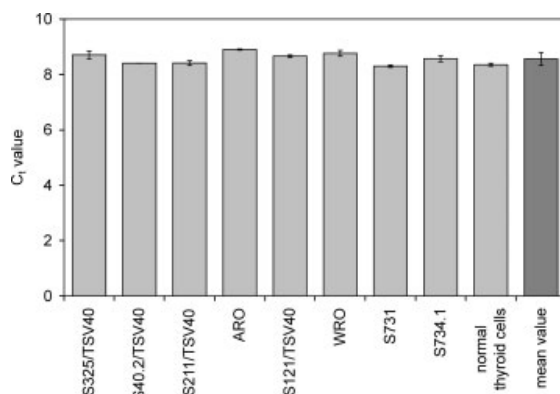


Figure 1. C_t values of 18S rRNA in different types of thyroid cell lines. Adenoma-derived cell lines: S325/TSV40, S40.2/TSV40, S211/TSV40, S121/TSV40, S731, S734.1; ARO: cell line of an anaplastic carcinoma; WRO: cell line of a follicular carcinoma. Dark gray bar: mean value.

RESULTS

The expression of 18S rRNA in thyroid cell cultures (one normal thyroid, six adenomas and two carcinomas) showed only a low variation, the mean C_t value was 8.56 ± 0.21 (Fig. 1). Therefore, 18S rRNA was chosen as endogenous control for relative quantification.

In all samples an expression of *HMGA2* was detected (Fig. 2). The highest expression was found in a FTC with partially insular pattern with a 432-fold *HMGA2* expression in relation to normal tissue. In contrast, inflammatory diseases or adenomas showed a significantly lower level of *HMGA2* expression. One FTC was gross dissected to quantify the *HMGA2* expression in the tumor and the surrounding tissue separately. The *HMGA2* expression in the surrounding tissue was not higher than in normal thyroid tissues, whereas *HMGA2* was overexpressed 47.2-fold in the tumor.

The possible correlation between the expression of *HMGA2* mRNA and the malignant transformation of the follicular epithelium is illustrated in Figure 2 showing all cases analyzed in increasing order of *HMGA2* expression.

A normal distribution was fitted to the expression data to estimate the decision limit, sensitivity, and specificity. The decision limit for the discrimination of benign and malignant tissues is 3.99 with a sensitivity of 95.9% and a specificity of 93.9%.

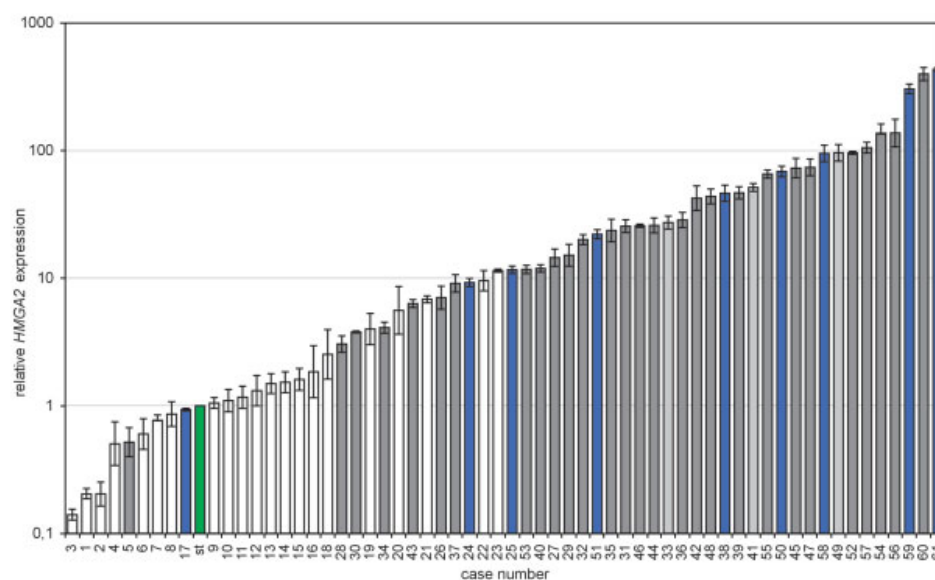


Figure 2. *HMGA2* expression in thyroid lesions. Results of the relative *HMGA2* quantification. The mean value of three surrounding thyroid tissues (ST, green bar) serves as calibrator. Different thyroid lesions are represented by bar colors: blue: FTC, dark gray: PTC, light gray: ATC, white: follicular adenoma or thyroiditis.

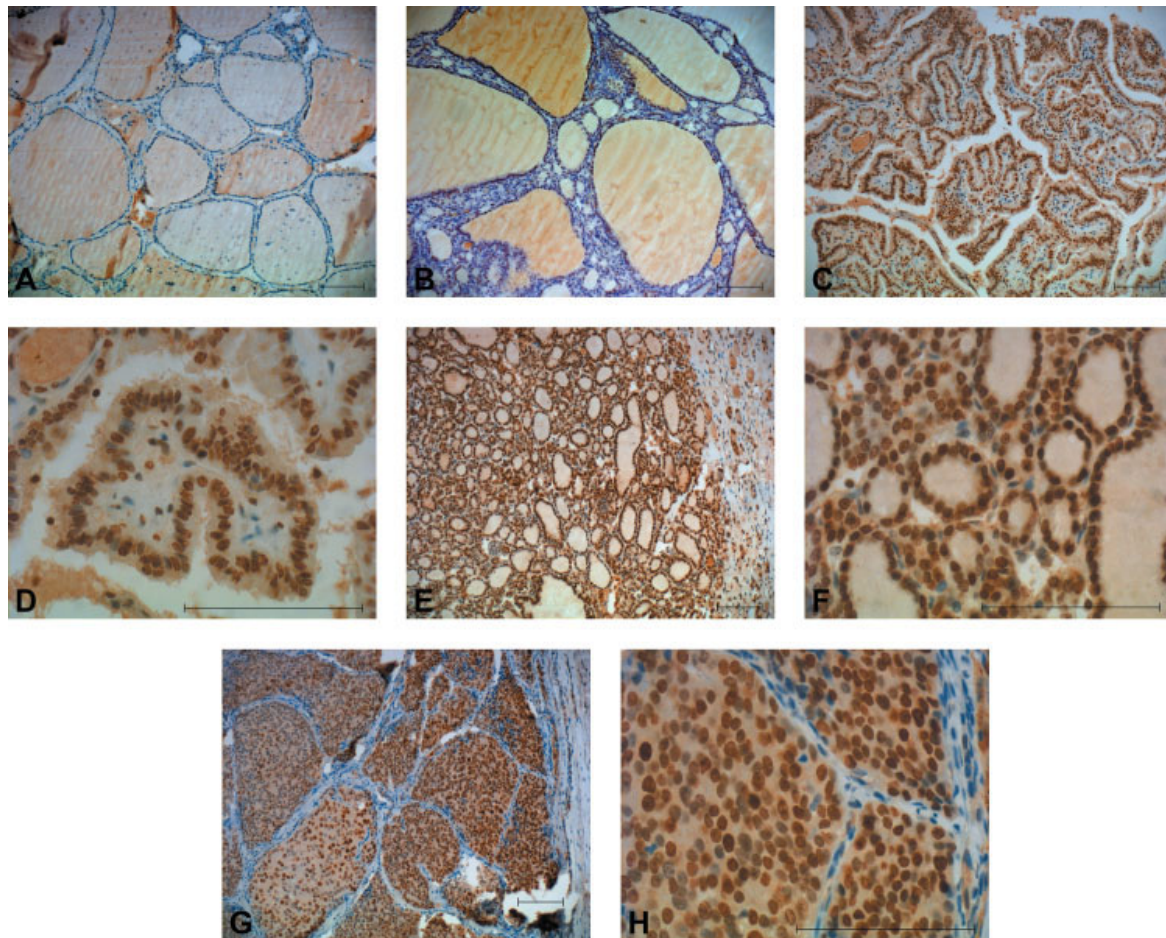


Figure 3. Immunostaining of thyroid tissues with an antibody raised against the HMGA2 protein. (A) Normal thyroid tissue, $\times 100$; (B) Follicular adenoma (Case no. 2), $\times 100$; (C) and (D) Papillary thyroid carcinoma (Case no. 54), $\times 100$ and $\times 400$, respectively; (E) and (F) Follicular thyroid carcinoma (Case no. 38), $\times 100$ and $\times 400$, respectively; (G) and

(H) Follicular thyroid carcinoma with partially insular pattern (Case no. 61), $\times 100$ and $\times 400$, respectively. Bars indicate 100 μm . Brown staining of nuclei was noted in cases revealing high HMGA2 expression by real-time PCR.

As to the adenomas, the *HMGA2* expression level of benign tumors was not significantly elevated as ascertained by Student's *t* test ($P = 0.42$). A maximum value of 11-fold overexpression was found in an atypical adenoma. The majority of the malignant samples had expression levels of more than the 20-fold of normal tissue values. Values up to a 400-fold overexpression were detected. Finally, mean values in the groups (normal, benign, and malignant tissues) were compared by *t* tests. There was no significant difference between the normal and benign tissue groups ($P = 0.42$), while the differences between the normal and malignant tissue group as well as between the benign and malignant tissue group were highly significant ($P < 0.001$).

In the next step, the group of follicular carcinomas and follicular variants of papillary carcinomas was compared with follicular adenomas. The decision

limit to separate these two groups is 6.3 with a sensitivity of 81.2% and a specificity of 88.3%. A significant, but weak correlation between patients' age and relative *HMGA2* expression (Pearson correlation coefficient = 0.25340, $P = 0.048$) was observed, whereas no significant correlations were found between the tumor size or patients' age and the expression level.

It should be noted that the qRT-PCR results are based on whole sections. Thus, the area covered by the tumor itself is different among the cases. To check if the results even can be expected to improve when detecting HMGA2 expression only in the tumor cells, IHC has been performed in a number of cases.

A strong nuclear positivity was observed in all carcinomas, whereas no immunoreactivity was observed in normal thyrocytes, tumor cells of adenomas, cells of the stromal component of carcinomas, and lymphocytes, respectively (Fig. 3).

DISCUSSION

Currently, FNA biopsy with subsequent cytologic diagnosis is the most important procedure in preoperative thyroid tumor diagnosis besides scintigraphy. However, it is virtually impossible to differentiate between follicular carcinomas and adenomas based on samples obtained by FNA alone. Only in 20–30% of the cases of surgically removed thyroid glands due to suspicious cytological results is a follicular malignancy diagnosed at postoperative histology (Goellner et al., 1987; Chiappetta et al., 1998; Greaves et al., 2000; Baloch et al., 2002). With regard to the limitations of FNA cytology, reliable markers that allow to differentiate between different thyroid nodules are still an unmet challenge especially for follicular thyroid neoplasias. Also, there is a high demand to stratify the group of papillary cancers with an adverse prognosis. Herein, we have described our results obtained with the expression of *HMGA2* as a stand-alone molecular marker.

The aim of this study was to evaluate the potential of *HMGA2* expression for the diagnosis of thyroid tumors. As a rule, the expression level of benign tumors was comparable with those of normal tissues. In contrast, we were able to demonstrate that *HMGA2* is significantly overexpressed in most thyroid carcinomas as compared with benign tumors. Values up to 400-fold overexpression were detected.

Even with archival material it was possible to identify malignancies with a sensitivity of 95.9% based on *HMGA2* expression alone taking histology as the gold standard. Furthermore, it should be noted that the quantitative real-time PCR results are based on whole sections. Thus, as shown by the IHC data, if only the area covered by the tumor is studied, even greater differences between benign and malignant samples should be seen.

Generally, *HMGA2* expression either as a stand-alone parameter or combined with others is a promising marker with the potential to improve preoperative diagnoses and treatment of thyroid nodules. Besides its utility for clinical diagnostics of follicular thyroid tumors, the increased expression of *HMGA2* may also improve the understanding of the molecular mechanisms involved in the genesis of thyroid malignancies.

As an alternative to quantitative real-time PCR, immunohistochemistry is a suitable method to detect the *HMGA2* protein in nuclei of malignant thyroid tumors. As shown by immunostaining with an *HMGA2*-specific antibody (Fig. 3), malignant epithelial tumor cells exhibit a strong nuclear reac-

tion, whereas normal thyrocytes and adenomas as well as stromal components of carcinomas do not show immunoreactivity, thus confirming the results obtained by quantitative real-time PCR. Therefore, *HMGA2*-specific immunohistochemistry can improve the diagnosis of thyroid tumors.

Furthermore, in papillary thyroid carcinomas (PTCs), the *HMGA2* overexpression varied over a broad range. Although PTCs have a favorable prognosis in general, there are subgroups in which the prognosis is worse. Current methods fail to identify these subgroups prior to surgical removal. Because *HMGA2* expression seems to be a more general marker of increased malignancy in a variety of malignant neoplasms (e.g. lung cancer (Sarhadi et al., 2006) and squamous cell carcinomas of the oral cavity (Miyazawa et al., 2004)), it is tempting to speculate that the range of *HMGA2* overexpression in PTCs reliably identifies the subgroup of PTCs with a poor prognosis. Interestingly, in a recent study by Rodrigues et al. (2007) *HMGA2* was found to be one of the most overexpressed genes in a group of aneuploid papillary thyroid cancers.

Previous studies have identified a variety of genes as potential markers of malignant thyroid neoplasms and in the most recent studies often a combination of several genes is recommended. Kebebew et al. (2006) investigated 19 cases each of hyperplastic nodules, follicular adenomas, follicular thyroid cancers, follicular variants of papillary cancers, and papillary thyroid cancers. Their study is based on the expression of three cell-cycle regulatory genes, *MCM5*, *MCM7*, and *RAD9*, as molecular markers of malignancy. While the combined use of these genes provided a sensitivity of 98.2%, the specificity did not exceed 65.7%. As to single genes, overlaps in expression levels in benign and malignant tumors ranged between 27.3 and 38.9% (Kebebew et al., 2006).

Another multi-gene assay focussing on follicular neoplasias has been suggested by Weber et al. (2005). In this study, both immunostaining and quantitative RT-PCR for three genes were performed. However, minimally invasive FTCs representing the most important diagnostic challenge were excluded from this study. In contrast, this subtype as well as atypical adenomas were included in a study by Fryknäs et al. (2006). Several genes were identified, which are differentially expressed in adenomas and FTCs. Interestingly, *HMGA2* was included in the cDNA microarray, but not included in the panel of finally selected genes. The *FHL1* expression, which is described more in detail, was significantly lower in (minimally inva-

sive) FTCs than in (atypical) adenomas. However, *FHL1* expression levels of benign and malignant follicular neoplasias overlap to a great extent, so that the *FHL1* expression alone does not seem to allow a sufficient differentiation between these groups (Fryknäs et al., 2006).

Moreover, several proteins have been suggested as targets for immunostaining, e.g. galectin-3 (*GAL3*) and human bone marrow endothelial cell (HBME)-1. Although immunohistochemistry can be an adjunct in the diagnostic process, the staining pattern can vary in subvariants of differentiated thyroid carcinomas representing a particular problem in borderline tumors where a reliable marker is highly needed (Castro and Gharib, 2005; Sheils, 2005). It has been reported, that under certain circumstances, e.g. Hashimoto thyroiditis with coexistent solitary or multiple nodules, the usefulness of *GAL3* expression analysis is limited (Niedziela et al., 2002). While the *GAL3* mRNA and protein level is increased in the majority of PTCs, follicular thyroid tumors were negative with regard to *GAL3* mRNA. This observation raises doubts on the usefulness of this marker, since it seems to be impossible to distinguish adenomas from follicular cancers (Feilchenfeldt et al., 2003).

Other studies suggested the expression of *HMGA1* as a suitable genetic marker to distinguish benign from malignant thyroid tumors (Chiappetta et al., 1995, 1998; Berlingieri et al., 2002; Czyz et al., 2004). As for the RT-PCR analyses, one main disadvantage of *HMGA1* is the existence of several retropseudogenes, which can lead to false-positive results in quantification experiments when RNA extractions are contaminated with genomic DNA. In contrast to *HMGA1*, no retropseudogenes of *HMGA2* are known (Blank et al., 2000; Rogalla et al., 2001; Strichman-Almashanu et al., 2003).

Thus, to the best of our knowledge, *HMGA2* expression is currently the best known single molecular marker to distinguish between benign and malignant thyroid neoplasms.

An additional point of interest are papillary thyroid microcarcinomas (PTMC), defined as being less than or equal to 1.0 cm in diameter. However, the clinical relevance of these tumors still remains a matter of debate and markers to judge the aggressiveness are missing (Frates et al., 2005; Burman, 2006; Roti et al., 2006). Herein, we quantified the expression of *HMGA2* in 10 cases of papillary thyroid microcarcinoma (Case nos. 26, 28, 30, 34, 37, 39, 40, 43, 48, and 53), and found an overexpression in comparison with normal thyroid tissue. Nevertheless, the expression levels found in the

individual PTMCs varied over a broad range. Thus, we assume that *HMGA2* expression might be a potent genetic marker to discriminate PTMCs displaying aggressive behavior from those with an indolent clinical course, but clinical trials are necessary to verify the utility of *HMGA2* expression analysis in the diagnosis of PTMC. Further analyses on fresh frozen tissues or FNA biopsies are necessary to elucidate if the accuracy of this new marker is sufficient even to identify the challenging minimally invasive subtype of FTCs.

In summary, *HMGA2* expression is a molecular marker that does not only distinguish between benign and malignant growth but also reflects the continuous process underlying the malignant transformation of thyroid nodules. Besides real-time quantitative PCR, immunohistochemistry is an adequate method to investigate the *HMGA2* status of thyroid tissue samples.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Annette Rudolph, Prof. Dr. Ulrich Bonk, and Prof. Dr. Jörg Caselitz, who generously agreed to provide us with biological specimens, and Cornelia Ebisch for excellent technical assistance. We thank Prof. Dr. Thomas Löning and his staff for the immunostainings.

REFERENCES

- Antonov J, Goldstein DR, Oberli A, Baltzer A, Pirotta M, Fleischmann A, Altermatt HJ, Jaggi R. 2005. Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization. *Lab Invest* 85:1040–1050.
- Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K. 1995. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82:57–65.
- Baloch ZW, LiVolsi VA. 2002. Follicular-patterned lesions of the thyroid: The bane of the pathologist. *Am J Clin Pathol* 117:143–150.
- Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. 2002. Diagnosis of "follicular neoplasm": A gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 26:41–44.
- Berlingieri MT, Pierantoni GM, Giancotti V, Santoro M, Fusco A. 2002. Thyroid cell transformation requires the expression of the *HMGA1* proteins. *Oncogene* 21:2971–2980.
- Blank C, Rogalla P, Tran KH, Bullerdiek J. 2000. A novel high mobility group protein gene is a candidate for Xp22 abnormalities in uterine leiomyomas and other benign tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 121:172–180.
- Burman KD. 2006. Micropapillary thyroid cancer: Should we aspirate all nodules regardless of size? *J Clin Endocrinol Metab* 91:2043–2046.
- Bustin M, Reeves R. 1996. High-mobility-group chromosomal proteins: Architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54:35–100.
- Castro MR, Gharib H. 2005. Continuing controversies in the management of thyroid nodules. *Ann Intern Med* 142:926–931.
- Chau KY, Patel UA, Lee KL, Lam HY, Crane-Robinson C. 1995. The gene for the human architectural transcription factor HMGI-C consists of five exons each coding for a distinct functional element. *Nucleic Acid Res* 23:4262–4266.
- Chiappetta G, Bandiera A, Berlingieri MT, Visconti R, Manfioletti G, Battista S, Martinez-Tello FJ, Santoro M, Giancotti V, Fusco

UPREGULATION OF HMGA2 IN THYROID CARCINOMAS

63

- A. 1995. The expression of the high mobility group HMGI (Y) proteins correlates with the malignant phenotype of human thyroid neoplasias. *Oncogene* 10:1307–1314.
- Chiappetta G, Avantiato V, Visconti R, Fedele M, Battista S, Trappasso F, Merciai BM, Fidanza V, Giancotti V, Santoro M, Simeone A, Fusco A. 1996. High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. *Oncogene* 13:2439–2446.
- Chiappetta G, Tallini G, De Biasio MC, Manfioletti G, Martinez-Tello FJ, Pentimalli F, de Nigris F, Mastro A, Botti G, Fedele M, Berger N, Santoro M, Giancotti V, Fusco A. 1998. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 58:4193–4198.
- Czyz W, Balcerzak E, Jakubiak M, Pasieka Z, Kuzdak K, Mirowski M. 2004. HMGI(Y) gene expression as a potential marker of thyroid follicular carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 389:193–197.
- Feilchenfeldt J, Totsch M, Sheu SY, Robert J, Spiliopoulos A, Frilling A, Schmid KW, Meier CA. 2003. Expression of galectin-3 in normal and malignant thyroid tissue by quantitative PCR and immunohistochemistry. *Mod Pathol* 16:1117–1123.
- Frates MC, Benson CB, Charboneau JW, Cibas ES, Clark OH, Coleman BG, Cronan JJ, Doubilet PM, Evans DB, Goellner JR, Hay ID, Hertzberg BS, Intenzo CM, Jeffrey RB, Langer JE, Larsen PR, Mandel SJ, Middleton WD, Reading CC, Sherman SI, Tessler FN. 2005. Management of thyroid nodules detected at US: Society of radiologists in ultrasound consensus conference statement. *Radiology* 237:794–800.
- Fryknäs M, Wickenberg-Bolin U, Goransson H, Gustafsson MG, Foukakis T, Lee JJ, Landegren U, Hoog A, Larsson C, Grimelius L, Wallin G, Pettersson U, Isaksson A. 2006. Molecular markers for discrimination of benign and malignant follicular thyroid tumors. *Tumor Biol* 27:211–220.
- Goellner JR, Gharib H, Grant CS, Johnson DA. 1987. Fine needle aspiration cytology of the thyroid, 1980 to 1986. *Acta Cytol* 31:587–590.
- Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS, Cobb CJ, Tsao-Wei DD, Groshen S, Singer P, Lopresti J, Martin SE. 2000. Follicular lesions of thyroid: A 5-year fine-needle aspiration experience. *Cancer* 90:335–341.
- Harrer M, Luhrs H, Bustin M, Scheer U, Hock R. 2004. Dynamic interaction of HMGA1a proteins with chromatin. *J Cell Sci* 117:3459–3471.
- Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Bullerdiek J, Hameister H. 1998. The expression pattern of the Hmgic gene during development. *Genes Chromosomes Cancer* 23:350–357.
- Kebebew E, Peng M, Reiff E, Duh QY, Clark OH, McMillan A. 2006. Diagnostic and prognostic value of cell-cycle regulatory genes in malignant thyroid neoplasms. *World J Surg* 30:767–774.
- LiVolsi VA. 2003. Can we agree to disagree? *Hum Pathol* 34:1081–1082.
- LiVolsi VA, Asa SL. 1994. The demise of follicular carcinoma of the thyroid gland. *Thyroid* 4:233–236.
- Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, Chada KK, Imai K. 2004. Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer Res* 64:2024–2029.
- Niedziela M, Maceluch J, Korman E. 2002. Galectin-3 is not an universal marker of malignancy in thyroid nodular disease in children and adolescents. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4411–4415.
- Reeves R, Nissen MS. 1990. The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265:8573–8582.
- Reeves R, Beckerbauer L. 2005. HMGI/Y proteins: Flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta* 1519:13–29.
- Rodrigues R, Roque L, Espadinha C, Pinto A, Domingues R, Dinis J, Catarino A, Pereira T, Leite V. 2007. Comparative genomic hybridization, BRAF, RAS, RET, and oligo-array analysis in aneuploid papillary thyroid carcinomas. *Oncol Rep* 18:917–926.
- Rogalla P, Drechsler K, Frey G, Hennig Y, Helmke B, Bonk U, Bullerdiek J. 1996. HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol* 149:775–779.
- Rogalla P, Drechsler K, Kazmierczak B, Rippe V, Bonk U, Bullerdiek J. 1997. Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: Relationship to histologic grade. *Mol Carcinog* 19:153–156.
- Rogalla P, Blank C, Helbig R, Wosniok W, Bullerdiek J. 2001. Significant correlation between the breakpoint of rare clonal aberrations in benign solid tumors and the assignment of HMGIY retrosequences. *Cancer Genet Cytogenet* 130:51–56.
- Roti E, Rossi R, Trasforini G, Bertelli F, Ambrosio MR, Busutti L, Pearce EN, Braverman LE, Degli Uberti EC. 2006. Clinical and histological characteristics of papillary thyroid microcarcinoma: Results of a retrospective study in 243 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 91:2171–2178.
- Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, Kuosma E, Sioris T, Salo J, Karjalainen A, Knuutila S, Anttila S. 2006. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol* 209:206–212.
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. 1995. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, HMGI-C, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10:436–444.
- Sheils O. 2005. Molecular classification and biomarker discovery in papillary thyroid carcinoma. *Expert Rev Mol Diagn* 5:927–946.
- Smith J, Cheifetz RE, Schneider N, Berean K, Thomson T. 2005. Can cytology accurately predict benign follicular nodules? *Am J Surg* 189:592–595.
- Strichman-Almashanu LZ, Bustin M, Landsman D. 2003. Retroposed Copies of the HMG Genes: A window to genome dynamics. *Genome Res* 13:800–812.
- Weber F, Shen L, Aldred MA, Morrison CD, Frilling A, Saji M, Schuppert F, Broelsch CE, Ringel MD, Eng C. 2005. Genetic classification of benign and malignant thyroid follicular neoplasia based on a three-gene combination. *J Clin Endocrinol Metab* 90:2512–2521.
- Wolffe AP. 1994. Architectural transcription factors. *Science* 264:1100–1101.

3.3.2 On the prevalence of the *PAX8-PPARG* fusion resulting from the chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) in adenomas of the thyroid (Klemke et al., 2011)

Die Suche nach molekularen Markern zur Unterstützung der Dignitätsbewertung follikulärer Neoplasien führte im Jahr 2000 zur Entdeckung von Fusionstranskripten der Gene *PAX8* und *PPARG* (Kroll et al., 2000). Bei *PAX8* handelt es sich um einen schilddrüsenspezifischen und für die Entwicklung der Follikelzellen essentiellen Transkriptionsfaktor (Mansouri et al., 1998; Antonica et al., 2012), wohingegen *PPARG* für einen ubiquitär exprimierten nukleären Rezeptor kodiert (Fajas et al., 1997). Auf chromosomaler Ebene liegt dieser Genfusion eine Translokation t(2;3)(q13;p25) zugrunde, die zuvor bereits bei follikulären Adenomen beschrieben worden war (Teyssier et al., 1990; Sozzi et al., 1992; Roque et al., 1993). In der Erstbeschreibung der Folgen dieser Translokation auf molekularer Ebene konnten *PAX8-PPARG*-Fusionstranskripte und auch die daraus resultierenden Fusionsproteine häufig in follikulären Karzinomen, nicht jedoch in follikulären Adenomen nachgewiesen werden (Kroll et al., 2000). Mit der Annahme, daß die entdeckten Fusionsproteine bzw. -transkripte einen entscheidenden Beitrag zur Entstehung follikulärer Karzinome leisten könnten, verband sich auch die Hoffnung, die beobachtete Genfusion könne sich als Marker für follikuläre Karzinome eignen und die Abgrenzung derselben von Adenomen unterstützen. Nachfolgende Untersuchungen zahlreicher Arbeitsgruppen zur Prävalenz der *PAX8-PPARG*-Fusion ergaben jedoch, daß die Fusion erstens nicht so häufig wie ursprünglich vermutet in follikulären Karzinomen auftritt (Martelli et al., 2002; Aldred et al., 2003; Dwight et al., 2003), was eine geringere Sensitivität bedeutet, und daß sie zweitens auch in Adenomen nachgewiesen werden kann, wodurch zusätzlich die Spezifität vermindert ist (Marques et al., 2002; Banito et al., 2007; vgl. Tabelle 1 aus Klemke et al., 2011).

Trotz zahlreicher Untersuchungen blieb die Frequenz der *PAX8-PPARG*-Fusion in beiden Tumorentitäten unklar, da die von unterschiedlichen Gruppen erzielten Ergebnisse zum Teil stark divergierten. Um die Frage zu klären, wie häufig sie tatsächlich in Adenomen auftritt und wie stark die Spezifität dadurch vermindert ist, wurden 192 follikuläre Adenome zytogenetisch untersucht, wobei die t(2;3)(q13;p25) in nur zwei Fällen nachgewiesen werden konnte. Eine erneute histologische Begutachtung beider Tumoren ergab keine Hinweise auf Malignität, so daß Zweifel an ihrer Dignität ausgeschlossen werden konnten. Die *PPARG*-Rearrangierung wurde in einem Tumor auch durch eine FISH bestätigt. Des Weiteren wurden in beiden Adenomen Fusionstranskripte der Gene *PAX8* und *PPARG* durch RT-PCRs mit anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte nachgewiesen. Die in dieser Serie aus 192 Adenomen festgestellte Frequenz der Genfusion liegt damit bei etwa einem Prozent und damit deutlich unter den in einigen anderen Studien ermittelten Häufigkeiten (Cheung et al., 2003; Nakabashi et al., 2004; vgl. Tabelle 1 aus Klemke et al., 2011).

VI.

On the prevalence of the *PAX8-PPARG* fusion resulting from the chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) in adenomas of the thyroid.

Klemke M, Drieschner N, Laabs A, Rippe V, Belge G, Bullerdiek J, Sendt W. 2011. *Cancer Genetics* 204: 334-339.

Eigenanteil:

- Durchführung der RT-PCRs und der gelelektrophoretischen Auftrennungen
- Aufreinigung der PCR-Produkte zur Vorbereitung der Sequenzierung
- Auswertung der Sequenzierungsergebnisse
- Verfassen des Manuskripts in Zusammenarbeit mit N. Drieschner und J. Bullerdiek



ELSEVIER

Cancer Genetics 204 (2011) 334–339

**Cancer
Genetics**

BRIEF COMMUNICATION

On the prevalence of the *PAX8-PPARG* fusion resulting from the chromosomal translocation *t(2;3)(q13;p25)* in adenomas of the thyroid

Markus Klemke^a, Norbert Drieschner^a, Anne Laabs^a, Volkhard Rippe^a,
Gazanfer Belge^a, Jörn Bullerdiek^{a,b,*}, Wolfgang Sendt^c

^a Center for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Strasse ZHG, Bremen, Germany; ^b Clinic for Small Animals and Research Cluster REBIRTH, University of Veterinary Medicine, Hannover, Germany; ^c Department of General and Visceral Surgery, St. Joseph-Stift Hospital Bremen, Bremen, Germany

The chromosomal translocation *t(2;3)(q13;p25)* characterizes a subgroup of tumors originating from the thyroid follicular epithelium and was initially discovered in a few cases of adenomas. Later, a fusion of the genes *PAX8* and *PPARG* resulting from this translocation was frequently observed in follicular carcinomas and considered as a marker of follicular thyroid cancer. According to subsequent studies, however, this rearrangement is not confined to carcinomas but also occurs in adenomas, with considerably varying frequencies. Only five cases of thyroid adenomas with this translocation detected by conventional cytogenetics have been documented. In contrast, studies using reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) detected fusion transcripts resulting from that translocation in an average of 8.2% of adenomas. The aim of this study was to determine the frequency of the *PAX8-PPARG* fusion in follicular adenomas and to use the *HMGA2* mRNA level of such tumors as an indicator of malignancy. In cytogenetic studies of 192 follicular adenomas, the *t(2;3)(q13;p25)* has been identified in only two cases described herein. Histopathology revealed no evidence of malignancy in either case, and, concordantly, *HMGA2* mRNA levels were not elevated. In summary, the fusion is a rare event in follicular adenomas and its prevalence may be overestimated in many RT-PCR-based studies.

Keywords Follicular thyroid neoplasia, *t(2;3)(q13;p25)*, *PAX8-PPARG* fusion, *HMGA2*

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Distinguishing follicular thyroid carcinomas (FTC) from adenomas cytologically represents a major diagnostic challenge because of their similar appearance, so there is a need for specific markers (1). The chromosomal *t(2;3)(q13;p25)* is a recurrent cytogenetic aberration in follicular neoplasias of the thyroid leading to a fusion of the genes encoding the thyroid-specific transcription factor *PAX8* and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR γ*). Although the translocation had been reported before in adenomas as well (2–4), the *PAX8-PPARG* rearrangement was considered a marker of FTC in a study by Kroll et al., who detected *PAX8-PPARG* fusion transcripts in 5/8 FTCs but in none of 20 follicular adenomas (FA), 10 papillary carcinomas, and 10 multinodular hyperplasias (5). Accordingly, it was proposed

that the *PAX8-PPARG* fusion may aid the differential diagnosis of follicular neoplasias. The presence of the fusion gene in follicular thyroid carcinomas has been confirmed by several studies, even though its prevalence seems to be lower than initially reported (Table 1A). It occurs in FA, however, with a prevalence reported to range between 0.0 and 54.5% (for references, see Table 1A). Herein, we present two novel cases of thyroid adenomas that harbor the *t(2;3)(q13;p25)* and express low levels of *HMGA2*, a molecular marker to distinguish between benign and malignant thyroid tumors (6–9).

Materials and methods

Tissue samples

Tumor samples were snap-frozen in liquid nitrogen immediately after surgery and stored at -80°C for RNA isolation.

Received October 18, 2010; received in revised form April 28, 2011; accepted May 3, 2011.

* Corresponding author.

E-mail address: bullerd@uni-bremen.de

2210-7762/\$ - see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cancergen.2011.05.001

Table 1 Prevalence of PAX8-PPARG rearrangements in follicular neoplasias of the thyroid

A. Prevalence of PAX8-PPARG fusion transcripts according to RT-PCR-based studies							
Reference	FA with fusion of PAX8-PPARG	Total number of FA	Frequency (%)	FTC with fusion of PAX8-PPARG	Total number of FTC	Frequency (%)	FISH performed in addition to PCR
Kroll et al. (5)	0	20	0.0	5	8	62.5	Yes
Marques et al. (22) ^a	2	16	12.5	5	9	55.6	No
Nikiforova et al. (21)	2	25	8.0	8	15	53.3	No
Martelli et al. (23)	—	—	—	0	5	0.0	No
Cheung et al. (19)	6	11	54.5	6	17	35.3	No
Aldred et al. (24)	—	—	—	2	19	10.5	No
Nikiforova et al. (25)	1	23	4.3	5	17	29.4	No ^b
Dwight et al. (26)	1	40	2.5	4 ^c	34	11.8	Yes
Hibi et al. (27)	0	12	0.0	0	6	0.0	Yes
Lacroix et al. (28)	1	26	3.8	4	21	19.0	No
Nakabashi et al. (29)	3	10	30.0	4	12	33.3	No
Sahin et al. (30) ^a	—	—	—	8	10	57.4	No
Giordano et al. (31)	0	10	—	8	13	61.5	No
Di Cristofaro et al. (32)	0	9	0.0	9	21	42.9	No
Banito et al. (33) ^d	5	40	12.5	7	17	41.2	Yes
Algeciras-Schimmich et al. (20)	2	39	5.1	13	21	61.9	Yes
Overall prevalence	23	281	8.2	88	245	35.9	

B. Prevalence of the chromosomal t(2;3)(q13;p25) according to cytogenetic studies					
Reference	FA with t(2;3)	Total number of FA	Frequency of translocation (%)	Translocation	Case no.
Teyssier et al. (2)	1	42	2.4	t(2;3)(q12;p24)	43
Antonini et al. (13)	0	6	0.0	—	—
Sozzi et al. (3)	2	5	40.0	t(2;3)(q12-13;p24-25)	1 and 2
Roque et al. (4)	1	18	5.6	t(2;3)(q13;p25)	6
Belge et al. (14)	0	69	0.0	—	—
Roque et al. (15)	1	6	16.7	t(2;3)(q13;p25)	10
Overall prevalence	5	146	3.4		

C. Prevalence of the PAX8-PPARG rearrangement according to FISH-based studies			
Reference	FA with PAX8-PPARG rearrangement	Total number of FA	Frequency of rearrangement (%)
French et al. (16)	0	40	0.0
Castro et al. (17)	3	9	33.3
Chia et al. (18)	0	24	0.0
Overall prevalence	3	73	4.1

(A) Summary of 16 RT-PCR-based studies on follicular adenomas as well as carcinomas. Some studies additionally performed FISH experiments, as indicated in the last column. ^aImmunohistochemical results excluded. ^bFISH was performed on 16 additional carcinomas, but not on the 40 cases listed here. ^cSix FTCs were positive for rearrangement in FISH analysis. ^dAuthors do not state the results of FISH and RT-PCR separately. (B) Cytogenetic studies on the chromosomal t(2;3)(q13;p25) in follicular thyroid adenomas. (C) Summary of studies in which the PAX8-PPARG rearrangement was detected by FISH.

For cell cultures, tissues were kept in Hank's solution with 200 IU/mL penicillin and 200 µg/mL streptomycin.

Cell culture and chromosome analyses

Tissue samples of surgically removed thyroid tumors were minced and treated with 0.26% (200 U/mL) collagenase (Serva, Heidelberg, Germany) for 3–5 hours. After centrifugation, the pellet was re-suspended in culture medium (TC 199 with Earle's salts supplemented with 20% fetal bovine serum, 200 IU/mL penicillin, 200 µg/ml streptomycin) and incubated at 37°C and 5% CO₂. Exponentially growing

cultures of thyroid cells were used for GTG banding and chromosome analyses according to routine methods. Karyotype description followed ISCN 2009 (10). A total of 192 tumor samples were karyotyped successfully.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

For the detection of rearrangements of the PPARG gene, interphase FISH (I-FISH) with a PPARG break-apart probe (PanPath, Budel, The Netherlands) was performed on touch preparations. For one slide, 10 µL of the PPARG break-apart probe was used. Co-denaturation was performed on

a Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany) for 3 minutes at 80°C followed by overnight hybridization in a humidified chamber at 37°C. Post-hybridization was performed at 61°C for 5 minutes in 0.1 × standard saline citrate (SSC). Interphase nuclei were finally counterstained with DAPI (0.75 µg/mL; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Slides were examined with an Axioskop 2 plus fluorescence microscope (Zeiss, Göttingen, Germany). Images were captured with an AxioCam MRm digital camera and edited with AxioVision (Zeiss, Göttingen, Germany). At least 200 non-overlapping nuclei were scored. For determination of cut-off values, signal patterns of 200 non-overlapping nuclei of control specimens (i.e., touch preparations of four previously frozen normal thyroid tissue samples) were determined. Cut-off values were defined as the mean plus three standard deviations ($M + 3SD$) of the number of nuclei with abnormal signal patterns in control specimens (11). Nuclei with two co-localized red/green signals (RG) were scored as normal. Nuclei with one co-localized red/green signal, one single red, and one single green signal (1RG1R1G) were scored as positive for a *PPARG* rearrangement.

RNA isolation and reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA was isolated from frozen tissue samples with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription was performed using M-MLV RT (Invitrogen, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions. For the detection of fusion transcripts, three different primers specific for *PAX8* (5'-GCC ACC AAG TCC CTG AGT CC-3', exon 5; 5'-GCA TTG ACT CAC AGA GCA GCA-3', exon 7; 5'-GCT CAA CAG CAC CCT GGA-3', exon 8) were used in combination with a *PPARG*-specific reverse primer (5'-CAT TAC GGA GAG ATC CAC GG-3'). PCR was performed with DreamTaq DNA polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). Reaction conditions were as follows: 5 minutes at 95°C followed by 41 cycles of 30 seconds at 95°C, 30 seconds at 60°C, and 1 minute at 72°C, and a final elongation at 72°C for 5 minutes. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis, distinct bands were excised from the gel, and the DNA was extracted with the Gel Extraction Kit (Qiagen). The purified PCR products were sequenced directly (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany). Two tumors with a known chromosomal t(2;3)(q13;p25) and 19 karyotypically normal tumors were used for RT-PCR.

Quantitative real-time PCR

The relative quantification of *HMG2* expression was performed with the *HMG2*-specific TaqMan assay Hs00171569_m1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany), as described elsewhere (6), on a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). For the detection of the endogenous control *HPRT1*, primers 5'-GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG TCA A-3' and 5'-GTC TGG CTT ATA TCC AAC ACT TCG T-3' were used in combination with the *HPRT1*-specific hydrolysis probe 6FAM-CAA GCT TGC TGG TGA AAA GGA CCC C-TAMRA.

Results

Cytogenetic analyses identified a chromosomal t(2;3)(q13;p25) as the sole clonal aberration in two thyroid tumors classified as follicular adenomas by routine histological examinations (Figure 1A): The first tumor (case 1) was 2.5 cm in diameter and was removed from the right thyroid lobe of a 25-year-old female patient. The second tumor harboring the translocation (case 2) measured 3.7 cm in diameter and was found during pathologic examination of a nodular goiter of a 36-year-old female patient. In addition to hematoxylin and eosin staining, sections were also Elastica van Gieson (EvG)-stained. A microfollicular growth pattern but no invasive growth of the tumor was noted, which was accordingly classified as microfollicular adenoma. The t(2;3)(q13;p25) was also confirmed by FISH on interphase nuclei (Figure 1B).

RT-PCR was performed on both tumors with the chromosomal translocation, as well as on 19 adenomas with an apparently normal karyotype, to detect *PAX8-PPARG* fusion transcripts. It was positive in both cases with the translocation, but in none of the cases with an apparently normal karyotype. The PCR products of the two positive cases were sequenced directly to confirm their identity. In case 1, two different fusion transcripts consisting of exons 1–7 and 1–10, respectively, of *PAX8* fused to *PPARG* were found. Three different fusion transcripts consisting of *PAX8* exons 1–7, 1–8, and 1–9, respectively, fused to *PPARG* were identified in case 2 (Figure 1C).

Finally, we have quantified the *HMG2* mRNA level, which was not elevated in the two adenomas with the *PAX8-PPARG* fusion, compared to histologically normal thyroid tissue (data not shown).

Discussion

When *PAX8-PPARG* fusion transcripts were discovered in follicular thyroid carcinomas with a t(2;3), it was suggested that this gene fusion was a useful marker for the diagnosis of follicular neoplasias of the thyroid (5). Subsequent studies, however, reported lower occurrence rates of the fusion transcripts in follicular carcinomas than initially reported. While this gene fusion seems to characterize a distinct subgroup of follicular thyroid tumors, it is not specific for malignant tumors, because it has also been detected in follicular adenomas (Table 1A).

In our series of 192 follicular adenomas, the t(2;3)(q13;p25) was detected in only two tumors by conventional cytogenetics. Histologic examination revealed no evidence for malignancy in either case. In addition, *HMG2* mRNA levels (6–9) were not elevated in the two tumors with the translocation, compared to histologically normal thyroid tissue. By RT-PCR and sequencing of PCR products, fusion transcripts of *PAX8* and *PPARG* were detected in both cases. Hence, it was shown that the chromosomal translocation led to the same gene fusion that was initially described for FTC.

Based on cytogenetic analyses, the translocation leading to the *PAX8-PPARG* fusion is a rare finding in thyroid adenomas. The Mitelman Database (12) was searched for cases of FA harboring a t(2;3)(q12–13;p24–25) chromosomal translocation (last checked on February 25, 2011). Previous

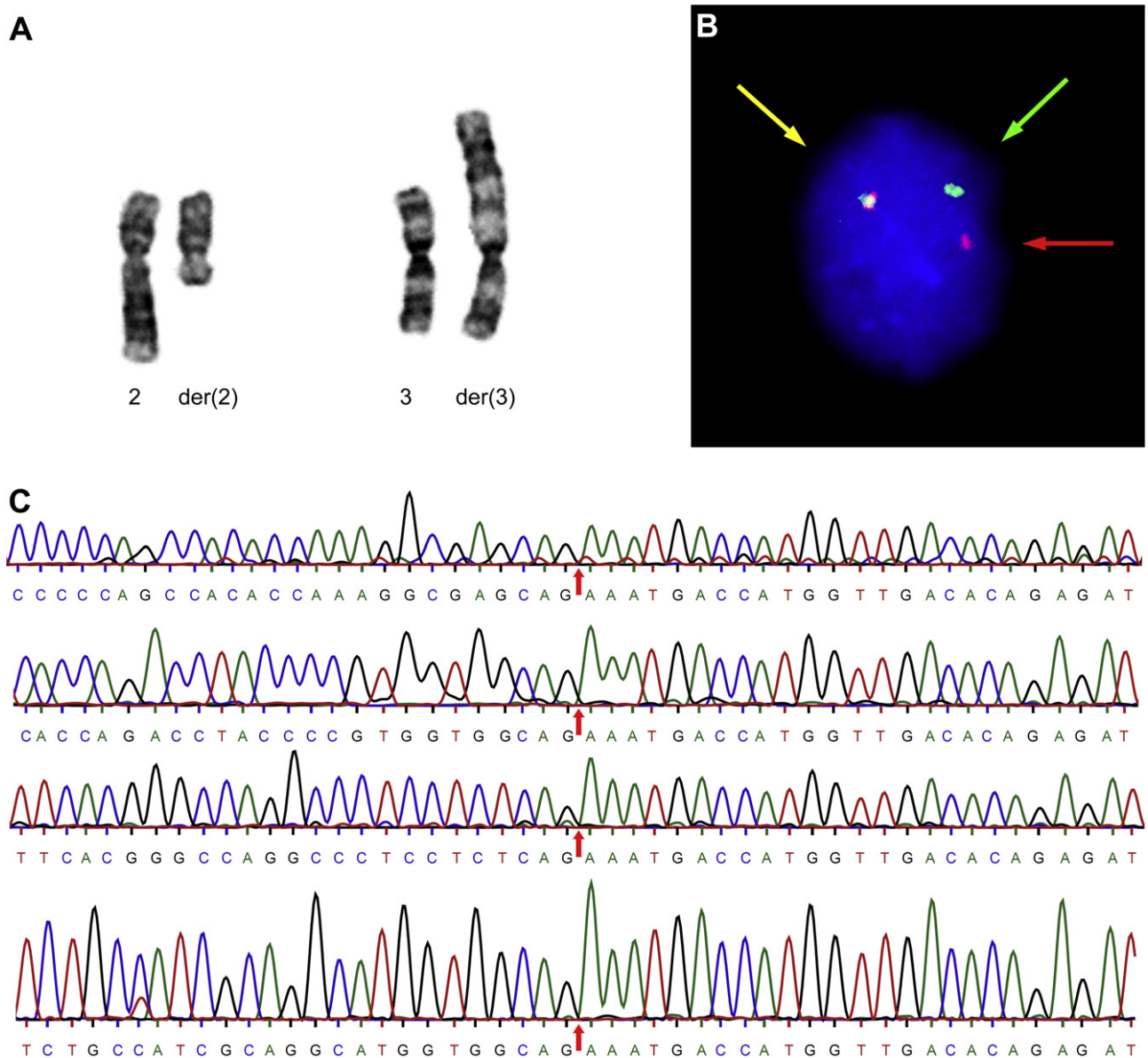


Figure 1 (A) Partial G-banded karyotype of case 1 with a $t(2;3)(q13;q15)$ as the sole chromosomal aberration. (B) Interphase-FISH with a *PPARG* break-apart probe (PanPath, Budel, Netherlands) on a touch preparation of case 2 showing a rearrangement of *PPARG* as indicated by a split of the *PPARG* surrounding probes (signals marked by green and red arrow). The non-rearranged region appears as a red/green fusion signal (yellow arrow). (C) Sequences of four different *PAX8-PPARG* fusion transcripts. The fusion sites are indicated by arrows. From top to bottom: exons 1–7, 1–8, 1–9a, and 1–10 of *PAX8* are fused to *PPARG*. The first three fusion transcripts are from case 2, the fusion of *PAX8* exon 10 (in addition to exon 7) to *PPARG* was found in case 1. *PAX8* exon numbering is based on GenBank accession number NM_003466.

studies based on cytogenetic analysis (2–4,13–15) reported the $t(2;3)(q13;p25)$ leading to a fusion of *PAX8* and *PPARG* in only 5/146 cases (Table 1B), corresponding to a prevalence of 3.4%. In three more recent studies, FISH was used to detect the rearrangement in 73 follicular adenomas (16–18; Table 1C), but only three cases were positive (4.1%). These data indicate that the prevalence of the chromosomal aberration in adenomas is low and does not coincide with the more frequently reported occurrence of *PAX8-PPARG* fusion transcripts. In contrast to the relatively low prevalence observed in the present series, several other studies, though usually based on smaller series, have

identified this aberration by RT-PCR at a much higher frequency (Table 1A). The highest frequency of this gene fusion reported in follicular adenomas was 54.5% (19). Summing up the results of several studies, *PAX8-PPARG* fusion transcripts were detected by RT-PCR in 23/281 adenomas (8.2%; for references, see Table 1A). As a possible explanation for the clear discrepancy in the prevalence of the gene fusion in adenomas, we considered the use of different methods for its detection. Mosaicism of aberrant and cytogenetically normal cells in thyroid adenomas might cause discrepant results between cytogenetic analyses and RT-PCR-based studies. Interphase

FISH analyses of tumors harboring the rearrangement revealed that the proportion of fusion-positive tumor cells varied between 16 and 93% (20). If only a small fraction of cells in a tumor is aberrant, they might escape detection by chromosome analysis. The fusion transcripts, however, would still be detectable by RT-PCR on native tissue samples. As another explanation, the rearrangement may not always be detectable at the cytogenetic level, as reported for many other chromosomal translocations in tumors. In the present study, however, *PAX8-PPARG* fusion transcripts were not detected in any of the 19 adenomas with an apparently normal karyotype that were subjected to RT-PCR.

Another conceivable reason for the relatively high prevalence of the gene fusion in adenomas in some studies may be the possible mis-identification of follicular thyroid carcinomas, in which the rearrangement is known to be more common than in follicular adenomas. As discussed by Nikiforova et al. (21), tumors classified as adenomas and harboring the *PAX8-PPARG* fusion may in fact be follicular carcinomas that were removed at a preinvasive stage.

Nevertheless, in follicular carcinomas as well, the frequency of the fusion gene varies over a broad range among different studies. In a recent study based on FISH (18), the authors discuss the role of the patients' ethnic background and geographic location as possible explanations for the relatively low frequency they observed in follicular thyroid carcinomas. Future studies should address the question of whether these factors also may cause diverging frequencies of the gene fusion in adenomas.

In summary, our results indicate that the chromosomal t(2;3)(q13;p25) and the resulting fusion of *PAX8* and *PPARG* is rare in follicular adenomas. The diverging rates of occurrence in adenomas between different studies could be explained by a high rate of hidden translocations, a minority of positive cells in the samples, or by the use of different methodologies. In addition, the influence by other factors such as ethnic background or geographic location still remains to be elucidated.

Acknowledgments

We thank Dr. Birgit Rommel for critically reading the manuscript.

References

- Schmid KW, Farid NR. How to define follicular thyroid carcinoma? *Virchows Arch* 2006;448:385–393.
- Teyssier JR, Liautaud-Roger F, Ferre D, et al. Chromosomal changes in thyroid tumors. Relation with DNA content, karyotypic features, and clinical data. *Cancer Genet Cytogenet* 1990;50:249–263.
- Sozzi G, Miozzo M, Cariani TC, et al. A t(2;3)(q12-13;p24-25) in follicular thyroid adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;64:38–41.
- Roque L, Castedo S, Gomes P, et al. Cytogenetic findings in 18 follicular thyroid adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1993;67:1–6.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, et al. *PAX8-PPAR γ 1* fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 2000;289:1357–1360.
- Belge G, Meyer A, Klemke M, et al. Upregulation of *HMG2* in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 2008;47:56–63.
- Chiappetta G, Ferraro A, Vuttariello E, et al. *HMG2* mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. *Eur J Cancer* 2008;44:1015–1021.
- Prasad NB, Somervell H, Tufano RP, et al. Identification of genes differentially expressed in benign versus malignant thyroid tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14:3327–3337.
- Lappinga PJ, Kip NS, Jin L, et al. *HMG2* gene expression analysis performed on cytologic smears to distinguish benign from malignant thyroid nodules. *Cancer Cytopathol* 2010;118:287–297.
- Schaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ, editors. *ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Basel: Karger; 2009.
- Castagné C, Muhlematter D, Beyer V, et al. Determination of cutoff values to detect small aneuploid clones by interphase fluorescence in situ hybridization: the Poisson model is a more appropriate approach. Should single-cell trisomy 8 be considered a clonal defect? *Cancer Genet Cytogenet* 2003;147:99–109.
- Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2011). Mitelman F, Johansson B, Mertens F, editors. Available at: <http://www.cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. Accessed on February 25, 2011.
- Antonini P, Vénuat AM, Linares G, et al. Cytogenetic abnormalities in thyroid adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;52:157–164.
- Belge G, Roque L, Soares J, et al. Cytogenetic investigations of 340 thyroid hyperplasias and adenomas revealing correlations between cytogenetic findings and histology. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;101:42–48.
- Roque L, Rodrigues R, Pinto A, et al. Chromosome imbalances in thyroid follicular neoplasms: a comparison between follicular adenomas and carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:292–302.
- French CA, Alexander EK, Cibas ES, et al. Genetic and biological subgroups of low-stage follicular thyroid cancer. *Am J Pathol* 2003;162:1053–1060.
- Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, et al. *PAX8-PPAR γ* rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:213–220.
- Chia WK, Sharifah NA, Reena RM, et al. Fluorescence in situ hybridization analysis using *PAX8*- and *PPARG*-specific probes reveals the presence of *PAX8-PPARG* translocation and 3p25 aneusomy in follicular thyroid neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;196:7–13.
- Cheung L, Messina M, Gill A, et al. Detection of the *PAX8-PPAR γ* fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:354–357.
- Algeciras-Schimmich A, Milosevic D, Mclver B, et al. Evaluation of the *PAX8/PPARG* translocation in follicular thyroid cancer with a 4-color reverse-transcription PCR assay and automated high-resolution fragment analysis. *Clin Chem* 2010;56:391–398.
- Nikiforova MN, Biddinger PW, Caudill CM, et al. *PAX8-PPAR γ* rearrangement in thyroid tumors: RT-PCR and immunohistochemical analyses. *Am J Surg Pathol* 2002;26:1016–1023.
- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, et al. Expression of *PAX8-PPAR γ 1* rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3947–3952.
- Martelli ML, Iuliano R, Le Pera I, et al. Inhibitory effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ on thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4728–4735.

24. Aldred MA, Morrison C, Gimm O, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is frequently downregulated in a diversity of sporadic nonmedullary thyroid carcinomas. *Oncogene* 2003;22:3412–3416.
25. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, et al. RAS point mutations and PAX8-PPAR γ rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:2318–2326.
26. Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, et al. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor γ rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:4440–4445.
27. Hibi Y, Nagaya T, Kambe F, et al. Is thyroid follicular cancer in Japanese caused by a specific t(2;3)(q13;p25) translocation generating Pax8-PPAR γ fusion mRNA? *Endocr J* 2004;51:361–366.
28. Lacroix L, Mian C, Barrier T, et al. PAX8 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 gene expression status in benign and malignant thyroid tissues. *Eur J Endocrinol* 2004;151:367–374.
29. Nakabashi CC, Guimarães GS, Michaluart P Jr, et al. The expression of PAX8-PPAR γ rearrangements is not specific to follicular thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004;61:280–282.
30. Sahin M, Allard BL, Yates M, et al. PPAR γ staining as a surrogate for PAX8/PPAR γ fusion oncogene expression in follicular neoplasms: clinicopathological correlation and histopathological diagnostic value. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:463–468.
31. Giordano TJ, Au AY, Kuick R, et al. Delineation, functional validation, and bioinformatic evaluation of gene expression in thyroid follicular carcinomas with the PAX8-PPARG translocation. *Clin Cancer Res* 2006;12:1983–1993.
32. Di Cristofaro J, Silvy M, Lanteaume A, et al. Expression of tpo mRNA in thyroid tumors: quantitative PCR analysis and correlation with alterations of ret, Braf, ras and pax8 genes. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:485–495.
33. Banito A, Pinto AE, Espadinha C, et al. Aneuploidy and RAS mutations are mutually exclusive events in the development of well-differentiated thyroid follicular tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2007;67:706–711.

3.3.3 Detection of *PAX8-PPARG* fusion transcripts in archival thyroid carcinoma samples by conventional RT-PCR (Klemke et al., 2012)

Der Nachweis von *PAX8-PPARG*-Fusionstranskripten durch RT-PCRs erfolgte in allen bisherigen Publikationen ausschließlich an frischen oder kryokonservierten Geweben. Bei Verwendung von Primern, die mehrere hundert Basenpaare lange PCR-Produkte generieren, ist diese Methode nicht auf formalinfixierte Gewebe übertragbar. Die RNA solcher Gewebe ist fixierungsbedingt degradiert, so daß nur kurze Abschnitte amplifiziert werden können. Erstmals beschrieben wurde der RT-PCR-basierte Nachweis der Fusionstranskripte in formalinfixierten Geweben in einer Arbeit von Algeciras-Schimmich et al. (2010). Es wurden vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Primer sowie eine hochauflösende Kapillarelektrophorese der Produkte mit gleichzeitiger Messung der Fluoreszenz verwendet. Da dieses Verfahren relativ aufwendig ist, wurde ein Nachweis der Fusionstranskripte im Rahmen einer herkömmlichen RT-PCR in Kombination mit einer gelelektrophoretischen Auftrennung angestrebt. Zunächst wurde die RT-PCR an zwei Adenomen mit bekannter t(2;3)(q13;p25) und bereits erfolgtem Nachweis von *PAX8-PPARG*-Fusionstranskripten getestet. Im Unterschied zu der in einer vorherigen Studie durchgeführten PCR an frischen bzw. kryokonservierten Geweben (Klemke et al., 2011) wurde die RT-PCR nun jedoch an aus FFPE-Geweben isolierter RNA durchgeführt. Alle bekannten Fusionstranskripte konnten auch unter Verwendung von degradiertem RNA amplifiziert und im Agarose-Gel visualisiert werden. Daraufhin wurden FFPE-Gewebe von insgesamt 21 follikulären Karzinomen und sieben follikulären Varianten von papillären Karzinomen, die nicht karyotypisiert oder mit Hilfe der FISH auf eine Translokation untersucht worden waren, dieser RT-PCR unterzogen. In keinem der sieben FVPTCs wurde ein positives Ergebnis erzielt. Zwei der follikulären Karzinome wurden jedoch positiv auf *PAX8-PPARG*-Fusionstranskripte getestet. Da eine übereinstimmende Länge der mittels Gelelektrophorese erzeugten Banden nicht ausreicht, um die entsprechenden PCR-Produkte zu identifizieren, wurden diese zusätzlich sequenziert. Ein follikuläres Karzinom exprimiert insgesamt fünf verschiedene Transkripte, in denen jeweils die Exons 7, 8, 9 oder 10 von *PAX8* mit *PPARG* fusioniert waren. Zusätzlich trat die Fusion von Exon 10 sowohl mit einer kompletten Deletion des Exons 9 als auch ohne diese auf. In Übereinstimmung mit dem Resultat der RT-PCR zeigte die anschließend durchgeführte FISH in diesem Tumor einen mit 79 % hohen Anteil der Nuklei mit einer Rearrangierung der Bande 3p25 an. In dem zweiten FTC konnte nur ein Transkript mit einer Fusion des Exons 10 (ohne Deletion von Exon 9) mit *PPARG* gefunden werden. Zwar wurden auch in diesem Fall Nuklei mit rearrangierter Bande 3p25 mittels FISH nachgewiesen, ihr Anteil lag mit nur einem Prozent jedoch unterhalb der Detektionsgrenze. Zusätzlich wurde ein *PAX8-PPARG*-Fusionstranskript in einer Knochenmarksmetastase eines follikulären Karzinoms gefunden.

VII.

Detection of *PAX8-PPARG* fusion transcripts in archival thyroid carcinoma samples by conventional RT-PCR.

Klemke M, Drieschner N, Belge G, Burchardt K, Junker K, Bullerdiek J. 2012. *Genes, Chromosomes and Cancer* 51: 402-408.

Eigenanteil:

- Konzeption des Vorhabens und Planung der RT-PCRs
- Durchführung der RT-PCRs und der gelelektrophoretischen Auftrennungen
- Aufreinigung der PCR-Produkte zur Vorbereitung der Sequenzierung
- Auswertung der Sequenzierungsergebnisse
- Verfassen des Manuskripts in Zusammenarbeit mit N. Drieschner und J. Bullerdiek

Detection of *PAX8–PPARG* Fusion Transcripts in Archival Thyroid Carcinoma Samples by Conventional RT-PCR

Markus Klemke,¹ Norbert Drieschner,¹ Gazanfer Belge,¹ Käte Burchardt,² Klaus Junker,² and Jörn Bullerdiek^{1*}

¹Center for Human Genetics, University of Bremen, Bremen, Germany

²Institute of Pathology, Clinical Center Bremen-Mitte, Bremen, Germany

The t(2;3)(q13;p25) occurs in a subgroup of follicular-patterned thyroid tumors and leads to a fusion of the genes encoding for the thyroid-specific transcription factor paired box 8 (*PAX8*) and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR* γ). Although initially discovered in follicular carcinomas (FTC), the fusion transcripts were also detected in a small fraction of follicular adenomas and rarely in follicular variants of papillary carcinomas (FV-PTC). In most RT-PCR based studies, fresh or snap-frozen tissue samples were used. The aim of the present study was to develop a method for the detection of chimeric *PAX8–PPARG* transcripts in formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) thyroid tumor samples by conventional RT-PCR. For this purpose, RNA from FFPE samples of 21 FTC, seven FV-PTC, and one bone metastasis derived from an FTC was subjected to RT-PCR with subsequent gel electrophoretic separation of the products. Fusion transcripts were detected in 2/21 primary FTC (9.5%) and in the bone metastasis, but they were undetectable in all seven FV-PTC under investigation. The RT-PCR approach described herein allows to detect all known variants of *PAX8–PPARG* fusion transcripts and is applicable to FFPE tissues. Thus, it can be used to screen archival thyroid tumor samples for the gene fusion. © 2011 Wiley Periodicals, Inc.

INTRODUCTION

Eleven years ago, a fusion of the genes *PAX8* and *PPARG* resulting from the t(2;3)(q13;p25) was described in follicular thyroid carcinomas (FTC) (Kroll et al., 2000), and it was assumed that it might be specific for FTC. However, in later studies, the presence of *PAX8–PPARG* fusion transcripts was reported in follicular adenomas (FA) as well. Besides conventional cytogenetic analysis and fluorescence in situ hybridization (FISH) to detect the translocation, RT-PCR is a commonly used method for the detection of the fusion transcripts. However, for most RT-PCR approaches published so far intact RNA from fresh or snap-frozen tissues is required and they cannot be performed on degraded RNA isolated from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples. In a recently published approach, fluorescently labeled primers were used in combination with high-resolution fragment analysis (Algeciras-Schimnich et al., 2010). Herein, we describe a method to detect chimeric *PAX8–PPARG* transcripts in RNA from FFPE samples using a conventional RT-PCR with gel electrophoretic separation of PCR products. Of note, an additional sense primer for the detection of a fusion transcript, which is not included in the recently published RT-PCR based analysis of *PAX8–PPARG* fusions in FFPE samples (Algeciras-

Schimnich et al., 2010) was used. Since there have been reports on tumors harboring the *PAX8–PPARG* rearrangement, which express this additional variant as the sole fusion transcript (Cheung et al., 2003), it is important to include specific primers for this variant. Otherwise such tumors would escape the RT-PCR based detection of the fusion. The RT-PCR described in the present study offers a reliable tool to screen archives of FFPE thyroid tumors for the presence of *PAX8–PPARG* fusion transcripts.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Samples

FFPE tissue samples of two FA of the thyroid that were recently described in detail (Klemke et al., 2011) were used to ascertain the feasibility of the RT-PCR approach for the detection of *PAX8–PPARG* fusion transcripts. One tumor (Case 1) is known to express three different chimeric

*Correspondence to: Jörn Bullerdiek, Center for Human Genetics, University of Bremen, Leobener Strasse ZHG, 28359 Bremen, Germany. E-mail: bullerd@uni-bremen.de

Received 21 April 2011; Accepted 20 November 2011

DOI 10.1002/gcc.21925

Published online 16 December 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

CHIMERIC PAX8-PPARG TRANSCRIPTS IN FFPE TISSUES

403

TABLE I. Clinicopathological Parameters of all Thyroid Tumors Included in the Present Study

Case No.	Type of tumor	Tumor size (cm)	Patient's age	Sex	pTNM classification	PAX8 exons juxtaposed to PPARG	Remarks/clinical outcome
1	FA	3.7	36	F		7, 8, 9	
2	FA	2.5	25	F		7, 10	
3	FTC	3.0	69	M	pT4	Negative	Bone metastases (3.7 and 5.6 years)
4	FTC	2.8	37	F	pT2 pN0	Negative	
5	FTC (m. i.)	2.0	66	F	pT1	Negative	Regional lymph node metastasis, bone metastasis at the time of surgery
6	FTC (w. i.)	5.5	67	M	pT3 pN1 (1/8) pM1	Negative	
7	FTC (w. i.)	1.0	68	M	pT3 pN0 (0/17) pMX R1	Negative	Liver metastasis (1.5 years)
8	FTC (m. i.)	3.3	62	F	pT2 pN0 (0/31) R0	Negative	
9	FTC (w. i.)	extensive growth	81	F	pT4a pN1a (1/2) (pN1b) M1 (PUL) R1	Negative	Multiple lung metastases and mediastinal lymphomas (at the time of surgery) Vascular invasion
10	FTC (w. i.)	6.0	53	M	pT3 pNX pMX V1 R0	7, 8, 9, 9 + 10, 8 + 10	
11	FTC (w.i.)	2.5	24	F	pT2 N0 (0/44) pN0 pMX V1 RX	Negative	Vascular invasion
12	FTC (m.i.)	1.5	39	M	pT1 pN0 (0/3) pMX R0	Negative	
13	FTC (w.i.)	1.8	41	F	pT1 pN0 (0/8) R0	Negative	
14	FTC (w. i.)	8.0	61	M	pT4	Negative	
15	FTC	1.2	53	F	pT1 (M)	8 (Detected in a bone metastasis but not in the primary tumor)	Bone metastasis at the time of surgery, additional bone metastases after 2.0 and 2.4 years
16	FTC (m.i.)	1.5	48	F	pT1 pN0 (0/12) pMX R0	10	
17	FTC (m.i.)	4.5	63	M	pT3 pN0 (0/2)	Negative	
18	FTC (m.i.)	3.6	46	M	pT2 pN0 (0/15) R0	Negative	
19	FTC (m.i.)	1.3	65	F	pT1 pN0 (0/14) pMX R0	Negative	
20	FTC (m.i.)	6.0	72	F	pT3 pN0 (0/50)	Negative	
21	FTC (m.i.)	1.0	58	M	pT1 pN0 (0/24) L0 V0 R0	Negative	
22	FTC (m.i.)	3.6	41	M	pT2 pN0 (0/13) R0	Negative	
23	FTC (m.i.)	2.2	35	F	pT2 pN0 (0/14) pMX R0	Negative	
24	FV-PTC	3.3	74	F	pT3	Negative	
25	FV-PTC	1.2	47	M	pT1 R0	Negative	
26	FV-PTC	0.7	38	F	pT1 pN1a (1/20) R0	Negative	Regional lymph node metastasis
27	FV-PTC	1.5	50	M	pT1 pN0 (0/30) R0	Negative	
28	FV-PTC	1.8	33	F	pT1 pN1a (3/26) pMX R0	Negative	Regional lymph node micrometastases
29	FV-PTC	1.6	66	M	pT1 pN1 (4/11) R0	Negative	Regional lymph node metastases
30	FV-PTC	3.5	23	F	pT3 pN1 (3/25) L1 V1 pMX R0	Negative	Regional lymph node metastases, vascular invasion

FA, follicular adenoma; FTC, follicular thyroid carcinoma; m.i., minimally invasive; w.i., widely invasive; FV-PTC, follicular variant of a papillary thyroid carcinoma.

TABLE 2. Sequences and Locations of the Primers Used for the Detection of the Positive Control (*PAX8* exons 5 and 6) and the *PAX8-PPARG* Fusion Transcripts

Primer	Sequence (5'-3')	Location	Product length (bp)
E5	TCA ACC TCC CTA TGG ACA GC	<i>PAX8</i> , exon 5	125
E6-as	GGA GTA GGT GGA GCC CAG G	<i>PAX8</i> , exon 6	
E7	CCG CTC GAG TGC CCA TTT GA	<i>PAX8</i> , exon 7	124
E8	CCT CTC GAC TCA CCA GAC CT	<i>PAX8</i> , exon 8	84
E9	GCC CTT CAA TGC CTT TCC CCA TG	<i>PAX8</i> , exon 9	117
E10	AGC GGA CAG GGC AGC TAT GC	<i>PAX8</i> , exon 10	98
PPARG-as	CCA AAG TTG GTG GGC CAG AAT	PPARG, exon 5	

For the primers E7–E9 in combination with the *PPARG* specific antisense primer, the length of the shortest amplicon is indicated. All primer sequences except primer E7 located in exon 7 of *PAX8* were reported previously (Algeciras-Schimmich et al., 2010). as: antisense.

PAX8-PPARG transcripts consisting of exons 1–7, 1–8, and 1–9 of *PAX8* juxtaposed to exon 5 (the first coding exon) of *PPARG*. In the second tumor (Case 2) two fusion transcripts consisting of exons 1–7 and 1–10 fused to *PPARG* were detected earlier. After the RT-PCR was established using the FA samples, it was performed on 21 FTC as well as on seven FV-PTC, which have not been karyotyped or analyzed by FISH previously. All carcinomas were diagnosed by routine histological classification of hematoxylin and eosin stained tissue sections. In addition, a bone metastasis that had developed in one FTC patient (Case 15) was also included in the study. Clinicopathological parameters of the tumors included in the study are given in Table 1.

RT-PCR

Six 5 µm sections of each tumor were deparaffinized with xylene and rehydrated with ethanol. RNA was isolated with the RNeasy FFPE kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. In a total reaction volume of 20 µl, 1 µg RNA was reverse transcribed with M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Darmstadt, Germany). The final concentrations of the reaction components were as follows: 1× first strand buffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 0.5 mM dNTPs (each) 2 U/µl RNaseOUT recombinant ribonuclease inhibitor, 10 U/µl M-MLV reverse transcriptase, 10 mM dithiothreitol, and 7.5 ng/µl random hexamers. The reaction tubes were incubated at 25°C for 10 min, at 37°C for 50 min, and finally at 70°C for 15 min.

In each PCR reaction, 4 µl of cDNA was used as template. PCR was performed with 2.5 U DreamTaq DNA polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) per reaction in a total reaction volume of 25 µl with the following final con-

centrations: 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (each), and 0.1 µM sense as well as antisense primer. The initial denaturation was performed at 95°C for 10 min followed by 41–43 cycles of 95°C for 30 sec, 65°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec. The final extension was performed at 72°C for 7 min.

The sequences of the primers used for the detection of the positive control (exons 5–6 of *PAX8*) and the different *PAX8-PPARG* transcripts are given in Table 2. All primer sequences except the sense primer in exon 7 of *PAX8* were published recently (Algeciras-Schimmich et al., 2010). In contrast to the method described by Algeciras-Schimmich et al. (2010), unmodified oligonucleotides were used in the present study. PCR products were separated on 4% agarose gels with 0.5× TBE buffer and stained with ethidium bromide.

FISH

For the detection of rearrangements of the *PPARG* gene, interphase-FISH (I-FISH) with a *PPARG* break-apart probe (PanPath, Budel, Netherlands) was performed on FFPE tissue sections. Pretreatment of 4 µm tissue sections was performed as described previously for FFPE tissue sections (Hopman and Ramaekers, 2001) with a few modifications. Digestion with a pepsin ready-to-use solution (DCS, Hamburg, Germany) was performed at 37°C for 2 × 30 min. Fifteen microliters of the *PPARG* break-apart probe was used per slide. Co-denaturation was performed on a ThermoBrite (Abbott Molecular, Wiesbaden, Germany) for 5 min at 85°C followed by overnight hybridization in a humidified chamber at 37°C. Posthybridization was performed at 42°C for 2 min in 0.4× SSC/0.3% NP-40. Interphase nuclei were counterstained with DAPI (0.75 µg/ml) and slides were examined with an Axioskop 2

CHIMERIC PAX8-PPARG TRANSCRIPTS IN FFPE TISSUES

405

plus fluorescence microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany). Images were captured with a high performance CCD-camera (Visitron Systems, Puchheim, Germany) and were edited with FISH View (Applied Spectral Imaging, Migdal HaEmek, Israel). 100 nonoverlapping nuclei from different (at least four) areas of the tumor were scored.

RESULTS

Samples of two well characterized FA with t(2;3)(q13;p25) were used to check the performance of the RT-PCR. *PAX8-PPARG* fusion transcripts were detected in both cases as reported previously (Klemke et al., 2011). The gel electrophoretic separation of the PCR products (Fig. 1, left) resulted in distinct bands for the positive control as well as for fusions of exons 7, 8, 9, and 10 of *PAX8* to *PPARG*. The identity of the PCR products was confirmed by direct sequencing. In the PCR with the forward primer located in *PAX8* exon 7 an additional longer band was visible. By sequencing of this PCR product, its origin from the fusion of *PAX8* exon 8 to *PPARG* was shown.

The positive controls with primers located in *PAX8* exons 5 and 6 resulted in distinct bands with an expected length of 125 bp in all 21 FTC and 7 FV-PTC under investigation.

Of the 21 primary FTC screened for fusion transcripts, two cases were positive (9.5%). The first of them (No. 16) expressed only one type of chimeric transcript in which exon 10 of *PAX8* was fused to *PPARG*. Several PCR products were visible in the second case (No. 10, Fig. 1, right). Strong bands resulted from the PCRs with forward primers located in *PAX8* exon 7 and 10, respectively. Interestingly, the PCRs with forward primers located in exons 8 and 9 resulted in weak bands with the expected length of 84 and 117 bp, but strong bands of a higher molecular weight appeared in both cases. These PCR products were sequenced directly, and the product generated with the forward primer in exon 9 also contained exon 10 of *PPARG*, the same variant that was also detected with the forward primer in exon 10. The longer product of the PCR with the forward primer located in exon 8, however, indicated the presence of an additional transcript variant. Sequencing revealed a fusion of exon 10 to *PPARG* as well, while exon 9 was completely deleted in this case.

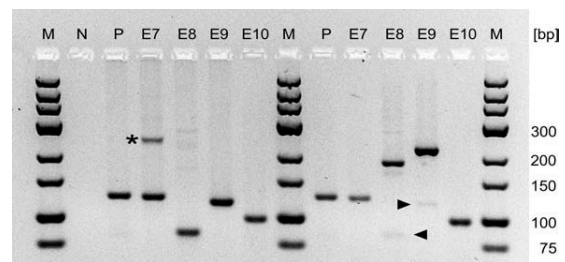


Figure 1. Gel electrophoretic separation of RT-PCR products using RNA templates extracted from FFPE samples of two adenomas (left, E7–E9 from Case 1, E10 from Case 2) and one follicular carcinoma (right, Case 10). M: Fragment length marker (GeneRuler Low Range DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), N: no template control, P: positive control (*PAX8* exons 5 and 6). Lanes E7–E10: PCR with primers specific for *PAX8-PPARG* fusion transcripts. The names of the forward primers used in combination with the reverse primer (*PPARG*-as) are indicated above the lanes (see also Table 2). Asterisk: the fusion transcript in which *PAX8* exon 8 is juxtaposed to *PPARG* is also detected with a primer located in exon 7 (product length: 245 bp). Triangles: weak bands in the RT-PCR with RNA from a follicular carcinoma corresponding to *PAX8* exon 8 and 9 joined to *PPARG*. The longer PCR products in this case correspond to *PAX8* exons 8 + 10 (E8, 186 bp) and 9 + 10 (E9, 219 bp) juxtaposed to *PPARG*.

A bone metastasis derived from a follicular carcinoma (Case 15) was also analyzed, and a chimeric transcript consisting of *PAX8* exon 8 juxtaposed to *PPARG* was detected. Two samples of the primary tumor, which was multifocal, were available for RT-PCR, but chimeric transcripts were detected in neither of them. Therefore, this case was regarded as negative when calculating the frequency of the rearrangement.

To verify the results obtained by RT-PCR, I-FISH with a *PPARG* break-apart probe was performed on FFPE sections. In Case no. 10, 79/100 nuclei showed one co-localized signal corresponding to the unaffected chromosome 3 and split red and green signals, indicating a translocation targeting *PPARG* (Fig. 2) in accordance with the positive PCR result. In a second follicular carcinoma with positive PCR result (No. 16), FISH revealed a break affecting the *PPARG* locus in only 1/100 nuclei. In case of the bone marrow metastasis (Case No. 15), FISH did not result in appropriate signals.

DISCUSSION

In all 28 FFPE samples under investigation, the positive control was successfully amplified indicating a sufficient quality of all RNA samples for RT-PCR analysis. Using FFPE tissue samples of two FA for which the presence of *PAX8-PPARG* fusion transcripts was shown previously, it was possible to detect the transcripts by

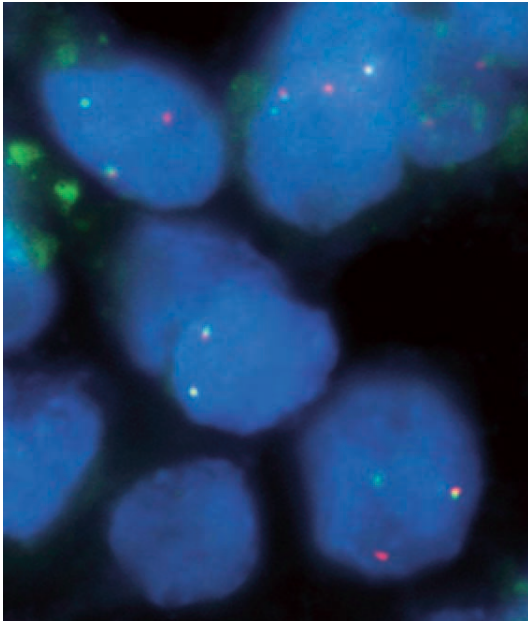


Figure 2. I-FISH with a *PPARG* break-apart probe on an FFPE section of Case 10. A rearrangement of *PPARG* is indicated by a split of the *PPARG* break-apart probes. The nonrearranged region appears as a red/green fusion signal. Two nuclei with aberrations affecting *PPARG* are visible (upper left and lower right corner).

RT-PCR. Thus, it was demonstrated that conventional RT-PCR is suitable for the detection of chimeric *PAX8-PPARG* transcripts in FFPE tissue samples.

Of the 21 FFPE tissue samples from FTC, fusion transcripts were found in two cases. One of them (Case 16) expressed only one transcript variant, but in the second case (No. 10) five different variants were detected. Exons 7, 8, 9, and 10 of *PAX8* were juxtaposed to *PPARG* in this case, and the fusion of exon 10 occurred with as well as without a complete deletion of exon 9. Partial deletions of exon 9 that have been reported in previous studies (Marques et al., 2002) were not found. Of note, this second case of FTC was a rather large tumor with a diameter of 6.0 cm and did not only show capsular invasion but was angioinvasive as well. It is tempting to speculate that the transcript with exon 10 of *PAX8* juxtaposed to *PPARG* accompanied by a deletion of exon 9, which was not observed in any other of the cases, contributes to aggressiveness of thyroid tumors. While exons 10 and 11 of *PAX8* encode an activating domain of the protein, an inhibitory domain is encoded by exon 9, which is rich in proline, serine, and threonine residues (PST domain). It has been demonstrated that removal of this domain results in a strong increase

in the transactivating potential of the corresponding protein (Poleev et al., 1995, 1997). Likewise, a *PAX8-PPAR γ* fusion protein lacking the region encoded by *PAX8* exon 9 but containing the transactivating domain encoded by exon 10 may as well exhibit a strong transactivating potential due to the lost repression of function of the activating domain. Further studies are required to elucidate whether tumors expressing fusion transcripts with partial or complete deletions of exon 9 exhibit a more aggressive behavior in general. Regardless of whether fusion proteins lacking the domain encoded by exon 9 of *PAX8* display a significant but as yet unknown effect, this second case is an unusual tumor, because the presence of five different fusion transcripts in a single carcinoma is a rare finding and may account for the aggressiveness of the tumor.

The incidence of the rearrangement observed in our series of FTC (9.5%) is relatively low when compared with the average rates observed by other investigators. However, similarly low rates were also reported in some studies. In a study by Aldred et al. (2003), the fusion transcripts were detected by RT-PCR in 2/19 cases of FTC (10.5%). The authors discussed the possibility of a geographical variation in the incidence of the translocation among FTC but could not confirm this hypothesis. Instead, they speculated that the frequency of the translocation may be generally lower than reported in earlier studies. As in the present study, their FTC samples were collected in a German Hospital. Considered together, these results indicate that at least in Germany, the gene fusion is less common in FTC.

Interestingly, a chimeric *PAX8-PPARG* transcript was detected in a bone metastasis originating from an FTC (Case 15) located in the lower jaw of the patient. In this case, *PAX8* exon 8 is juxtaposed to *PPARG*. Samples of the primary tumor located in the thyroid were also analyzed by RT-PCR, but no chimeric transcript was found. The tumor was multifocal, and unfortunately the available FFPE samples did not cover all foci. Thus, the bone metastasis is likely to originate from one of the nodules unavailable for RT-PCR analysis.

All seven FFPE tissue samples from FV-PTC under investigation were negative with respect to chimeric *PAX8-PPARG* transcripts. This observation is in good agreement with previous work because fusion transcripts have been detected by RT-PCR in only two FV-PTC cases so far (Castro et al., 2006).

CHIMERIC PAX8-PPARG TRANSCRIPTS IN FFPE TISSUES

407



Figure 3. Four variants of *PAX8-PPARG* fusion transcripts. Exons 8 (B), 9 (C), and 10 (D) are fused in-frame to *PPARG* (Kroll et al., 2000). A fourth transcript variant with exon 7 juxtaposed to *PPARG* described later (Marques et al., 2002; Cheung et al., 2003) is not

translated into a fusion protein (A). Due to a premature stop codon, it is translated into a truncated *PAX8* protein. The start codon of *PPARG* is underlined and the fusion junctions are indicated by vertical lines.

The rearrangement affecting chromosome band 3p25 was also detected by I-FISH in the tumor in which multiple fusion transcripts were detected (No. 10). In this case, the rate of translocation-positive nuclei was high (79%). In a tumor expressing a single fusion transcript variant (No. 16), the chromosomal translocation was detected in only 1/100 nuclei by FISH. By FISH alone this case would be scored as negative for a *PPARG* rearrangement because the fraction of positive nuclei is below the detection limit. However, a small fraction of cells harboring the translocation and expressing *PAX8-PPARG* fusion transcripts seems to be sufficient to induce positive RT-PCR signals and could thus lead to discrepant results between both methods. Moreover, the paucity of positive cells may indicate that in this case the rearrangement had occurred as a secondary event.

Recently, the detection of *PAX8-PPARG* transcripts by a four-color RT-PCR assay and automated high-resolution fragment analysis was reported (Algeciras-Schimmich et al., 2010). We were able to demonstrate that fusion transcripts in RNA from FFPE samples can also be successfully amplified by conventional RT-PCR and visualized by standard gel electrophoresis with ethidium bromide staining without the use of fluorescently labeled primers and capillary electrophoresis. We identified one FTC expressing five variants, but often only a single transcript variant can be detected. In the study by Algeciras-Schimmich et al. (2010), no primer located in exon 7 of *PAX8* was used, although fusion transcripts consisting of exons 1–7 joined to *PPARG* were described earlier (Marques et al., 2002; Cheung et al., 2003). Thus, translocation-positive tumors would escape detection by the RT-PCR assay if they would express a transcript consisting

of *PAX8* exons 1–7 fused to *PPARG* exclusively. Therefore, we have designed an additional primer with a binding site in exon 7 and were able to detect the transcript with exon 7 of *PAX8* as the fusion partner in adenomas as well as in one follicular carcinoma. The use of primers specific for all known chimeric *PAX8-PPARG* transcripts is recommended, because a given tumor may express any one of them as the sole fusion transcript. Unlike the three transcripts described by Kroll et al. (2000), no fusion protein is encoded by the transcript in which exon 7 is joined to *PPARG*. While exons 8, 9, and 10 are fused in-frame to their partner, the fusion of exon 7 induces an early stop codon directly after the junction and results in a truncated *PAX8* protein (Fig. 3).

In summary, it was demonstrated that conventional RT-PCR is feasible and well-suited for the detection of chimeric *PAX8-PPARG* transcripts in FFPE samples as well. The RT-PCR was performed on FFPE samples of 28 follicular-patterned thyroid tumors. Whereas no fusion was detectable in seven cases of FV-PTC, fusion transcripts were detected in 9.5% of FTC. To detect all known variants of fusion transcripts, the RT-PCR described in the present study uses an additional forward primer located in exon 7 of *PAX8*. Since it is applicable to partially degraded RNA from FFPE tissues, our approach enables the RT-PCR based detection of *PAX8-PPARG* fusion transcripts in archival thyroid tumor samples, which are more easily available than fresh or cryopreserved tissues.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Caroline Zeiser for excellent technical assistance.

REFERENCES

- Aldred MA, Morrison C, Gimm O, Hoang-Vu C, Krause U, Dralle H, Jhiang S, Eng C. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is frequently downregulated in a diversity of sporadic nonmedullary thyroid carcinomas. *Oncogene* 22:3412–3416.
- Algeciras-Schimmich A, Milosevic D, McIver B, Flynn H, Reddi HV, Eberhardt NL, Grebe SK. 2010. Evaluation of the PAX8/PPARG translocation in follicular thyroid cancer with a 4-color reverse-transcription PCR assay and automated high-resolution fragment analysis. *Clin Chem* 56:391–398.
- Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simões M. 2006. PAX8-PPAR γ rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91:213–220.
- Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wentworth J, Philips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG. 2003. Detection of the PAX8-PPAR γ fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88:354–357.
- Hopman AH, Ramaekers FC. 2001. Processing and staining of cell and tissue material for interphase cytogenetics. *Curr Protoc Cytom* 8.5.1–8.5.22. DOI: 10.1002/0471142956.cy0805s05.
- Klemke M, Drieschner N, Laabs A, Rippe V, Belge G, Bullerdiek J, Sendt W. 2011. On the prevalence of the PAX8-PPARG fusion resulting from the chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) in adenomas of the thyroid. *Cancer Genet* 204:334–339.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. 2000. PAX8-PPAR γ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 289:1357–1360.
- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V. 2002. Expression of PAX8-PPAR γ 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 87:3947–3952.
- Poleev A, Wendler F, Fickenscher H, Zannini MS, Yaginuma K, Abbott C, Plachov D. 1995. Distinct functional properties of three human paired-box-protein, PAX8, isoforms generated by alternative splicing in thyroid, kidney and Wilms' tumors. *Eur J Biochem* 228:899–911.
- Poleev A, Okladnova O, Musti AM, Schneider S, Royer-Pokora B, Plachov D. 1997. Determination of functional domains of the human transcription factor PAX8 responsible for its nuclear localization and transactivating potential. *Eur J Biochem* 247:860–869.

3.4 Vergleichende molekulargenetische Untersuchungen benigner mesenchymaler und maligner epithelialer Tumoren

Eine auf Microarrays basierende Untersuchung von Schilddrüsentumoren bestätigte, daß *HMGA2* zwischen Adenomen und Karzinomen differentiell exprimiert wird (Prasad et al., 2008). Von allen darin erfaßten Genen wird *HMGA2* am stärksten in malignen Schilddrüsentumoren überexprimiert. An fünfter Position in der Liste der überexprimierten Gene folgt das „pleomorphic adenoma gene 1“ (*PLAG1*), das für einen sieben Zink-Finger-Domänen beinhaltenden Transkriptionsfaktor mit karboxyterminaler Transaktivierungsdomäne kodiert. Es wird vornehmlich in fötalen Geweben exprimiert (Kas et al., 1997; Kas et al., 1998) und ist in die Entwicklung von pleomorphen Speicheldrüsenadenomen (Kas et al., 1997), Lipoblastomen (Hibbard et al., 2000), Hepatoblastomen (Zatkova et al., 2004), pädiatrischen, gastrointestinalen Stromatumoren (GIST, Agaram et al., 2000) und seltenen Fällen von chronischer lymphatischer Leukämie involviert (CLL, Pallasch et al., 2009). Pleomorphe Speicheldrüsenadenome lassen sich zytogenetischen Gruppen zuordnen, wobei am häufigsten chromosomale Aberrationen der Bande 8q12 und der Region 12q14~15 vorkommen (Sandros et al., 1990; Bullerdiek et al., 1987; Bullerdiek et al., 1988; Bullerdiek et al., 1989). *PLAG1* ist in der chromosomalen Bande 8q12 lokalisiert (Kas et al., 1997; Kas et al., 1998), die in pleomorphen Speicheldrüsenadenomen von rekurrenten Rearrangierungen betroffen ist (Steman et al., 1984; Sandros et al., 1990; Bullerdiek et al., 1993). In der Regel tritt in pleomorphen Adenomen der Speicheldrüse mit dieser chromosomalen Aberration eine *PLAG1*-Aktivierung auf, zu der es allerdings auch ohne 8q12-Veränderung kommen kann (Åström et al., 1999). Obwohl 8q12- und 12q14~15-Veränderungen nicht gemeinsam in Speicheldrüsenadenomen auftreten (Sandros et al., 1990; Bullerdiek et al., 1987; Bullerdiek et al., 1988; Bullerdiek et al., 1989), kann in ca. 40 % (2/5) der Tumoren eine simultane Aktivierung von *PLAG1* und *HMGA2* festgestellt werden (Åström et al., 1999). Die Erkenntnisse aus Untersuchungen von pleomorphen Speicheldrüsenadenomen in Verbindung mit der von Prasad et al. (2008) berichteten Überexpression beider Gene in Schilddrüsenkarzinomen warfen die Frage auf, ob beide Gene Teil eines gemeinsamen Signaltransduktionsweges sein könnten. Daher wurde zunächst die Expression beider Gene in Schilddrüsentumoren eingehender untersucht. Da es außerdem Hinweise auf eine verstärkte *PLAG1*-Expression in Uterus-Leiomyomen gab (Åström et al., 1999), wurde eine Quantifizierung der Expression beider Gene auch in Myomgeweben durchgeführt, wobei sowohl Myome mit normalem Karyotyp als auch Tumoren mit chromosomalen Veränderungen der Region 12q14~15 eingeschlossen wurden. Letztere zeichnen sich durch eine starke *HMGA2*-Aktivierung aus, so daß auch eine erhöhte *PLAG1*-Expression zu erwarten wäre, wenn *PLAG1* in einer Signalkaskade *HMGA2* nachgeschaltet und somit ein (direktes oder indirektes) Zielgen von *HMGA2* ist.

3.4.1 Correlated expression of *HMGA2* and *PLAG1* in thyroid tumors, uterine leiomyomas and experimental models (Klemke et al., 2014)

Die Expression der Gene *HMGA2* und *PLAG1* wurde in 37 Schilddrüsentumoren quantifiziert, wobei es sich in 14 Fällen um Adenome und in den übrigen 23 Fällen um Karzinome handelte. Wie bereits zuvor gezeigt, konnte in der Regel eine starke *HMGA2*-Expression in Karzinomen festgestellt werden, wohingegen das Expressionslevel in Adenomen geringer war. In allen sieben untersuchten klassischen papillären Karzinomen wurde eine im Vergleich zu den Adenomen deutlich erhöhte *HMGA2*-Expression festgestellt. Allerdings wurde *HMGA2* nur in sieben von 13 untersuchten follikulären Karzinomen überexprimiert.

Die erhöhte *HMGA2*-Expression in den klassischen papillären Karzinomen wurde in allen sieben Fällen von einer hohen *PLAG1*-Expression begleitet. In der Gruppe der follikulären Karzinome korrelierten die *HMGA2*- und *PLAG1*-Expressionen ebenfalls stark. Nur in einem der fünf FTCs ohne *HMGA2*-Aktivierung war eine leicht verstärkte *PLAG1*-Expression erkennbar, und in sechs von sieben follikulären Karzinomen mit hoher *HMGA2*-Expression wurde auch *PLAG1* stark exprimiert. Die Ergebnisse der relativen Quantifizierung aller 37 untersuchten Schilddrüsentumoren wurden herangezogen, um Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten als Maß der Korrelation zwischen der *HMGA2*- und *PLAG1*-Expression zu ermitteln. Da dieser Wert mit $\rho = 0,82$ ($p < 0,0001$) sehr hoch war, deuten die Ergebnisse auf eine starke Abhängigkeit beider Meßgrößen voneinander hin.

Um den möglichen Zusammenhang zwischen beiden Genen weiter zu untersuchen, wurde ihre Expression anschließend in 32 Uterus-Leiomyomen quantifiziert. Zytogenetischen Untersuchungen zufolge trugen 16 dieser Tumoren eine Rearrangierung des *HMGA2*-Locus 12q14~15. Fünfzehn dieser Fälle wiesen dementsprechend auch eine erhöhte *HMGA2*-Expression auf. Ein Myom, auf das diese Beobachtung nicht zutraf, obwohl zytogenetisch eine $t(12;14)(q15;q24)$ erkennbar war, wurde einer FISH unterzogen, derzufolge der chromosomale Bruchpunkt nicht durch die Sonden flankiert wurde (Klemke et al., 2009). Von den 16 Uterus-Leiomyomen mit zytogenetisch normalem Karyotyp wiesen zwei Tumoren eine *HMGA2*-Überexpression auf. Auch sie wurden deshalb mittels FISH untersucht, die in einem Myom eine zytogenetisch nicht sichtbare Rearrangierung des *HMGA2*-Locus nachweisen konnte (Markowski et al., 2010b). Durch die Kombination aus konventioneller Zytogenetik und FISH mußte die Einordnung jeweils eines Tumors korrigiert werden. In allen 16 Leiomyomen mit einer Rearrangierung unter Beteiligung der Region 12q14~15 wurde eine stark erhöhte *HMGA2*-Expression ermittelt, wohingegen in nur einem von 16 Myomen mit intaktem *HMGA2*-Locus eine solche Überexpression festgestellt wurde, deren Ursache bislang nicht aufgeklärt werden konnte.

Bei der Messung der *PLAG1*-Expression fiel auf, daß eine erhöhte *HMGA2*-Expression, die in 17 Leiomyomen – eines davon ohne nachweisbare chromosomale Aberration der Region 12q14~15 – festgestellt worden war, stets auch mit einer erhöhten *PLAG1*-Expression einhergeht. Demgegenüber war in nur zwei von 15 Fällen ohne *HMGA2*-Rearrangierung und -Überexpression eine Erhöhung der *PLAG1*-Aktivität festzustellen. In diesen beiden Fällen wurden submikroskopische Rearrangierungen des *PLAG1*-Locus vermutet. Eines dieser Myome wurde daher zusätzlich mit einer FISH unter Verwendung einer den *PLAG1*-Locus überspannenden Bruchpunktsonde untersucht, jedoch lieferte auch die FISH keinen Hinweis auf eine Rearrangierung im Bereich 8q12. Statistische Berechnungen bestätigten, daß die Expressionslevel beider Gene auch in Uterus-Leiomyomen stark miteinander korrelieren.

Zur weiteren Aufklärung des Zusammenhangs von *HMGA2*- und *PLAG1*-Expression wurden darüber hinaus zwei experimentelle Ansätze verfolgt. Adipöse mesenchymale Stammzellen (ADSCs) wurden verwendet, um die *HMGA2*-Expression mit Hilfe des Proteins FGF1 zu stimulieren (Ayoubi et al., 1999). Zur Kontrolle wurde die *HMGA2*-Expression quantifiziert, und erwartungsgemäß wurden nach 24, 48 und 72 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöhte Werte festgestellt. Auch die *PLAG1*-Expression war in mit FGF1 stimulierten Zellen gegenüber nicht stimulierten ADSCs um das Zwei- bis Dreifache erhöht.

Im zweiten Experiment wurde die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7, die auch in anderen Untersuchungen als Modell für Wirkungen von HMG-Proteinen diente (Baldassarre et al., 2003; Mussnich et al., 2013), transient transfiziert. Dazu wurde ein eukaryotischer Expressionsvektor verwendet, in den die für *HMGA2* kodierende Sequenz kloniert worden war. Die Regulation durch einen Promotor des Zytomegalie-Virus (CMV) gewährleistet eine starke konstitutive *HMGA2*-Expression. Um den Erfolg der Transfektion zu überprüfen, wurde die *IGF2BP2*-Expression quantifiziert, da *IGF2BP2* (synonym: *IMP2*) bekanntermaßen von *HMGA2* reguliert wird (Brants et al., 2004; Cleynen et al., 2007). Die 24 bzw. 48 Stunden nach der Transfektion ermittelte *IMP2*-Expression war sowohl gegenüber unbehandelten Zellen als auch im Vergleich zu mit einem leeren Vektor ohne *HMGA2*-Insert transfizierten Zellen deutlich erhöht. Ebenso konnte zu beiden Meßzeitpunkten ein Anstieg der *PLAG1*-Expression konstatiert werden.

Schließlich wurde aus einer SELEX-Studie (Cui und Leng, 2007) die Nukleotidfolge 5' - AWAWTSSSSNWWWWT - 3' als Konsensussequenz potentieller *HMGA2*-Bindestellen abgeleitet. Damit wurde im fünften Exon des *PLAG1*-Gens die Sequenz 5' - ATATTGGCCT ATAAT - 3' (Accession No. NG_023310.1, Nukleotide 53615 - 53629) identifiziert, an die eine Bindung von *HMGA2* vorstellbar ist.

VIII.

Correlated expression of *HMGA2* and *PLAG1* in thyroid tumors, uterine leiomyomas and experimental models.

Klemke M, Müller MH, Wosniok W, Markowski DN, Nimzyk R, Helmke BM, Bullerdiek J. 2014. PLoS ONE 9: e88126.

Eigenanteil:

- Durchführung der RNA-Isolierung sowie der relativen Quantifizierung der *HMGA2*- und *PLAG1*-Expression und deren Auswertung
- Stimulation von ADSCs mit FGF1 mit D. Markowski, anschließend Quantifizierung der *HMGA2*- und *PLAG1*-Expression
- Plasmidisolierung aus transformierten *E. coli*-Zellen mit M. Müller
- Transfektion der MCF7-Zelllinie mit einem *HMGA2*-Expressionsvektor mit anschließender Quantifizierung der *IMP2*- und *PLAG1*-Expression gemeinsam mit M. Müller
- Verfassen des Manuskripts in Zusammenarbeit mit J. Bullerdiek

Correlated Expression of *HMGA2* and *PLAG1* in Thyroid Tumors, Uterine Leiomyomas and Experimental Models

Markus Klemke¹, Marietta Henrike Müller¹, Werner Wosniok², Dominique Nadine Markowski¹, Rolf Nimzyk¹, Burkhard Maria Helmke^{3,4}, Jörn Bullerdiek^{1,4*}

1 Center for Human Genetics, University of Bremen, Bremen, Germany, **2** Institute of Statistics, University of Bremen, Bremen, Germany, **3** Institute of Pathology, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany, **4** Institute for Medical Genetics, University of Rostock, University Medicine, Rostock, Germany

Abstract

In pleomorphic adenomas of the salivary glands (PASG) recurrent chromosomal rearrangements affecting either 8q12 or 12q14~15 lead to an overexpression of the genes of the genuine transcription factor *PLAG1* or the architectural transcription factor *HMGA2*, respectively. Both genes are also affected by recurrent chromosomal rearrangements in benign adipocytic tumors as e. g. lipomas and lipoblastomas. Herein, we observed a strong correlation between the expression of *HMGA2* and *PLAG1* in 14 benign and 23 malignant thyroid tumors. To address the question if *PLAG1* can be activated by *HMGA2*, the expression of both genes was quantified in 32 uterine leiomyomas 17 of which exhibited an overexpression of *HMGA2*. All leiomyomas with *HMGA2* overexpression also revealed an activation of *PLAG1* in the absence of detectable chromosome 8 abnormalities affecting the *PLAG1* locus. To further investigate if the overexpression of *PLAG1* is inducible by *HMGA2* alone, *HMGA2* was transiently overexpressed in MCF-7 cells. An increased *PLAG1* expression was observed 24 and 48 h after transfection. Likewise, stimulation of *HMGA2* by FGF1 in adipose tissue-derived stem cells led to a simultaneous increase of *PLAG1* mRNA. Altogether, these data suggest that *HMGA2* is an upstream activator of *PLAG1*. Accordingly, this may explain the formation of tumors as similar as lipomas and lipoblastomas resulting from an activation of either of both genes by chromosomal rearrangements.

Citation: Klemke M, Müller MH, Wosniok W, Markowski DN, Nimzyk R, et al. (2014) Correlated Expression of *HMGA2* and *PLAG1* in Thyroid Tumors, Uterine Leiomyomas and Experimental Models. PLoS ONE 9(2): e88126. doi:10.1371/journal.pone.0088126

Editor: Jacques Emile Dumont, Université Libre de Bruxelles (ULB), Belgium

Received: August 23, 2013; **Accepted:** January 6, 2014; **Published:** February 7, 2014

Copyright: © 2014 Klemke et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). No additional external funding was received for this study. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bullerd@uni-bremen.de

‡ Current address: Institute of Pathology, Elbe Klinikum Stade, Stade, Germany

Introduction

The DNA-binding protein high mobility group AT-hook 2 (*HMGA2*) and the zinc finger protein *PLAG1* share a common role in the molecular pathogenesis of certain benign tumors, e. g. of the salivary glands and of adipose tissue. Pleomorphic adenomas are benign tumors of myoepithelial origin most often located in the parotid glands. Based on the existence of clonal chromosomal aberrations cytogenetic subtypes of pleomorphic adenomas can be distinguished [1–3]. Of these, structural rearrangements involving chromosomal regions 8q12 and 12q14~15 are most frequently observed. Both types of aberrations seem to occur mutually exclusive [2,4–6] and appear to be causally linked to the development of the disease. Though independently related to the same histologic tumor entity, the target genes rearranged by these aberrations encode proteins with different functions. *HMGA2* is located within the region 12q14~15 which is frequently affected by chromosomal alterations [7–9] and encodes a DNA-binding non-histone protein mainly expressed during embryogenesis and in embryonic as well as in adult stem cells [10–16]. *PLAG1* (Pleomorphic adenoma gene 1) mapping to 8q12 encodes a genuine transcription factor encompassing seven zinc finger domains and a carboxyterminal transactivation domain. *PLAG1* is developmentally regulated and highly expressed in

certain fetal tissues [17,18]. Oncogenic activation of *PLAG1* plays a key role in the development of lipoblastomas [19], hepatoblastomas [20], chronic lymphocytic leukemia [21] as well as in pediatric gastro-intestinal stromal tumors [22]. *PLAG1* has been found to bind the insulin-like growth factor gene (*IGF-II*) promoter and to stimulate its activity [23–25].

Similar but not identical to what is seen in pleomorphic adenomas both genes participate in the genesis of benign adipose tissue tumors. Chromosomal translocations affecting 12q14~15 and targeting *HMGA2* are a common finding in lipomas often as a t(3;12)(q27;q14~15) [26,27]. In contrast, translocations of 8q12 are a recurrent cytogenetic deviation in lipoblastomas, i. e. rare benign adipose tissue tumors of early childhood [19,28–30]. Interestingly, pleomorphic adenomas and lipoblastomas share the most frequent type of this rearrangement, i. e. a simple reciprocal translocation t(3;8)(p21;q12). Recently, an infantile lipoblastoma with rearrangements of the *HMGA2* locus has been described as well [31]. These findings raise the question why transcriptional activation of either of these two genes leads to the formation of tumors as similar as lipomas and lipoblastomas. One likely explanation is that they both act as part of a common pathway. Besides pleomorphic adenomas and adipose tissue tumors, another link between these two genes has recently emerged: in thyroid tumors, the expression level of *HMGA2* has been found to allow a

good discrimination between benign and malignant thyroid lesions [32–35]. Likewise, Prasad et al. have recently studied the genome-wide mRNA expression patterns of benign and malignant thyroid tumors in a systematic approach aimed at the identification of those genes best suited to distinguish between both types of thyroid lesions. The expression of *HMG2* ranked at the first position followed by *Kallikrein 7 (KLK7)*, *Mannose receptor, C type 2 (MRC2)*, *Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2)*, and *PLAG1* [36].

Because of the apparent relationship of *HMG2* and *PLAG1* in the molecular pathogenesis of salivary gland adenomas and adipose tissue tumors, we also quantified and compared the expression of *HMG2* and *PLAG1* mRNA in thyroid adenomas as well as in papillary and follicular thyroid carcinomas. To further analyze the relationship between these two genes, we also quantified the *PLAG1* expression in 32 uterine leiomyomas (UL) with as well as without 12q14 rearrangements. In addition, the *PLAG1* expression was quantified in adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) upon a stimulation of *HMG2* by FGF1. Furthermore, the MCF-7 breast cancer cell line, which has previously been used as a model in transfection experiments aiming at the functions of HMG proteins [37,38], was transiently transfected with a eukaryotic expression vector encoding for wild-type *HMG2* to evaluate whether *PLAG1* can be transcriptionally activated by *HMG2*.

Methods

Tissue Samples

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples of 37 thyroid tumors were classified histologically. Fourteen cases were classified as follicular adenomas (FA), eleven tumors were diagnosed as papillary carcinomas (PTC), and four of them were follicular variants (FV PTC). The remaining twelve tumors were follicular thyroid carcinomas (FTC). Cryopreserved tissue samples of 32 uterine leiomyomas that have been analyzed cytogenetically [16,39–41], were also used for quantification of gene expression. The karyotypes of the leiomyomas are given in supplementary Table S1. Karyotype description followed ISCN 2009 [42].

RNA Isolation and Reverse Transcription

In case of thyroid tumors, RNA was isolated from six 5 µm sections of FFPE tissues with the RNeasy FFPE kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA from cryopreserved leiomyoma tissues as well as from cultivated cells (ADSCs and MCF-7 cell line) was isolated with the RNeasy Mini kit (Qiagen). Of each sample, 250 ng RNA was used for reverse transcription with M-MLV reverse transcriptase and random hexamers (Invitrogen, Darmstadt, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Quantitative Real-time RT-PCR (qRT-PCR)

Quantitative real-time RT-PCR was performed with the TaqMan Universal PCR Master Mix on a 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) as described elsewhere [32].

The relative quantification of the *HMG2* expression was performed with the *HMG2*-specific TaqMan assay Hs00171569_m1 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany). For the detection of the endogenous control *HPRT1*, primers 5'-GGC AGT ATA ATC CAA AGA TGG TCA A-3' and 5'-GTC TGG CTT ATA TCC AAC ACT TCG T-3' were used in combination with the *HPRT1*-specific hydrolysis probe 6FAM-CAA GCT TGC TGG TGA AAA GGA CCC C-TAMRA. The *PLAG1* expression was quantified with the TaqMan assay Hs00231236_m1 (Applied Biosystems). Reaction conditions were

as follows: 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 50 cycles of 15 sec at 95°C and 1 min at 60°C.

Stimulation of *HMG2* Expression

Human adipose tissue-derived stem cells were obtained and treated as described previously [16]. For stimulation with fibroblast growth factor 1 (FGF1), cells were plated at a density of 3×10^5 cells/9.6-cm dish. After 24 hours the serum concentration was reduced to 1%. Another 24 hours later the medium was replaced by serum-free medium supplemented with 25 ng/ml of human recombinant FGF1 (Jena Bioscience, Jena, Germany). Twelve, 24, and 72 hours after growth factor addition, cells were harvested and total RNA was extracted. As controls cells were cultured in medium 199 supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS) without FGF1.

Plasmid DNA Purification

Plasmid pCR3.1 containing the sequence coding for human wild type *HMG2* as well as the empty vector serving as a control (for generation of the vectors see [43]) were purified using the NucleoBond Maxi Plus EF Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Cell Culture and Transfection of MCF-7 Cells

The cell line MCF-7 (breast cancer) was maintained in medium 199 (Life Technologies) supplemented with 20% FBS in an incubator at 37°C and 5% CO₂. When grown till confluence, cells were passaged using TrypLE Express (Life Technologies). The day before transfection, 150,000 cells were seeded in 6-well plates (Nunc, Wiesbaden, Germany) in 2 ml medium 199 supplemented with 20% FBS and allowed to attach for 24 h. Transfection complexes were prepared in a total volume of 500 µl in serum free medium 199 without antibiotics, 2.5 µg of the respective plasmid DNA and 7 µl Lipofectamine LTX transfection reagent (Life Technologies). A mock control treated with transfection reagent only as well as a non-treated control were included for each incubation period. During the formation of transfection complexes (25 min at room temperature), old growth medium was replaced by 2 ml fresh medium. Transfection complexes were then pipetted drop-wise to the cells. After incubation for 24 h or 48 h, cells were harvested in 350 µl RLT buffer (Qiagen) containing β-mercaptoethanol for RNA isolation using the RNeasy Mini Kit and Qiacube (Qiagen). As a positive control, the expression of *IGF2BP2* (synonym: *IMP2*), which is known to be regulated by *HMG2* [44,45], was quantified by qRT-PCR as described above using the TaqMan Assay Hs00538956_m1 (Applied Biosystems).

Statistical Analysis

As a measure of association between the relative *HMG2* and *PLAG1* expression levels, Spearman's rank correlation coefficient was calculated using the data of all 37 thyroid tumor samples analyzed. In addition, Pearson's correlation coefficient was calculated using the relative expression values as well as the ΔC_T values. In case of uterine leiomyomas, the expression levels of both *HMG2* and *PLAG1* were classified as high or low based on the ΔC_T values (*HMG2*: <0/≥0, *PLAG1*: <3/≥3). The agreement between the *HMG2* and the *PLAG1* classes was then quantified and tested by the kappa coefficient of agreement.

Ethics Statement

This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki [46] and the guidelines of the German National Ethics Council [47]. In case of uterine leiomyomas, the use of tissue

samples taken from surgically removed tumors was approved by the Ethics Committee of the Ärztekammer Bremen. Written informed consent was obtained from all patients. For the investigations on thyroid tumors, archival samples originally taken for diagnostic purposes were used. All thyroid tumor samples were used in previous studies [32,48].

Results

Expression of *HMGA2* and *PLAG1* in Adenomas and Carcinomas of the Thyroid

The expression of *HMGA2* and *PLAG1* was quantified in 37 thyroid tumors. An adenoma with low expression of both genes was chosen as calibrator for the relative quantification. The highest relative *HMGA2* expression observed in 14 follicular adenomas was 17.4, whereas the expression levels in four FV PTC ranged between 23.9 and 156.9. Even higher expression levels ranging between 128.2 and 1207.5 were observed in seven PTC (Fig. 1).

Based on their *HMGA2* expression, two groups of follicular thyroid carcinomas can be distinguished. Seven cases clearly overexpressed *HMGA2* with expression levels ranging between 33.3 and 478.3, whereas in five FTCs the *HMGA2* expression was within the range of adenomas (0.4 up to 5.73, Fig. 2).

The relative expression of *PLAG1* ranged between 0.2 and 19.8 in follicular adenomas and was below ten in twelve of 14 cases (Figs. 1 and 2). In the follicular variants of papillary carcinomas, it ranged between 10.9 and 27.2, and in the classic variants of papillary carcinomas, the *PLAG1* expression ranged between 21.3 and 72.2. Akin to *HMGA2*, *PLAG1* is also expressed at higher levels in papillary carcinomas. In the subgroup of follicular carcinomas without or with only slight *HMGA2* overexpression, the *PLAG1*

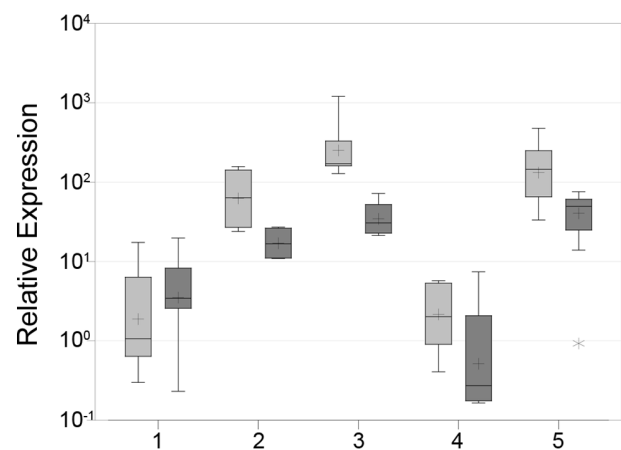


Figure 2. *HMGA2* expression in thyroid tumors. Box-whisker-plot indicating the relative expression of *HMGA2* (light gray) and *PLAG1* (dark gray) in five groups of thyroid tumors. Group 1: follicular adenomas (n = 14), group 2: follicular variants of papillary carcinomas (n = 4), group 3: papillary carcinomas (n = 7), group 4: follicular thyroid carcinomas without *HMGA2* over-expression (n = 5), group 5: follicular thyroid carcinomas with *HMGA2* overexpression (n = 7). The asterisk marks an outlier.

doi:10.1371/journal.pone.0088126.g002

expression levels ranged between 0.3 and 0.6 in four cases while one case showed a slight overexpression (7.4). In contrast, *PLAG1* was expressed at levels between 13.9 and 55.9 in six follicular carcinomas overexpressing *HMGA2*. No overexpression of *PLAG1* (0.9) was detected in only one FTC with high *HMGA2* expression.

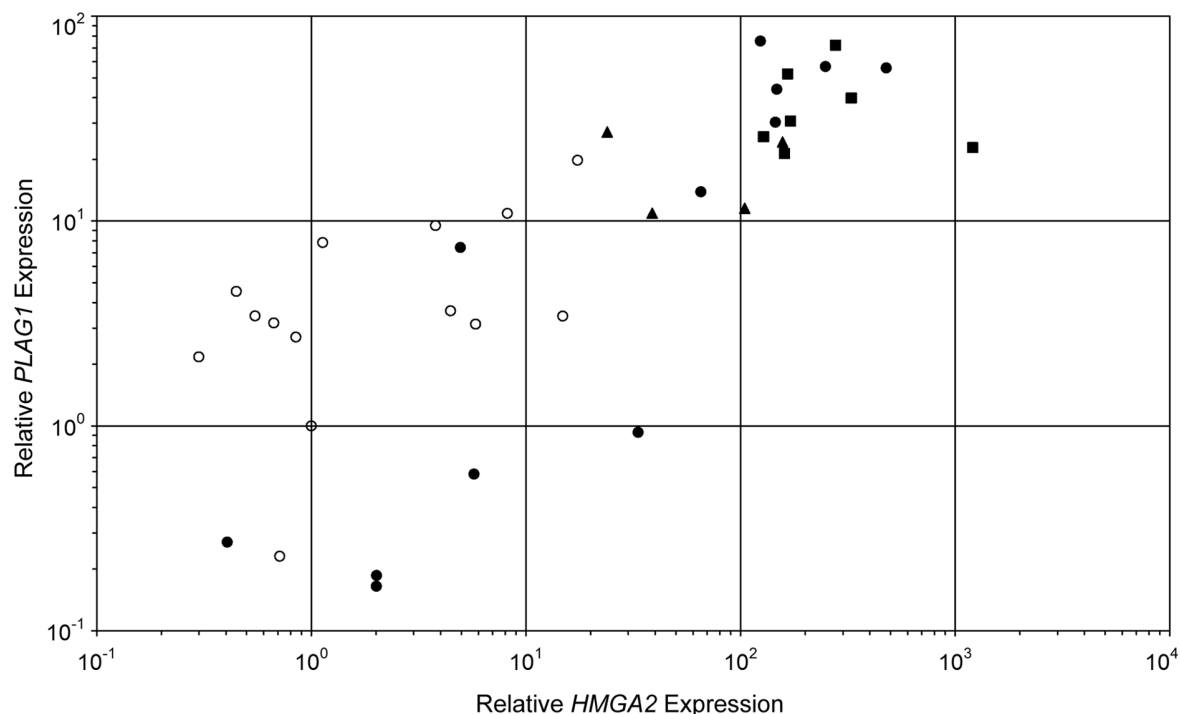


Figure 1. Relative expression of *PLAG1* versus *HMGA2* in 37 thyroid tumors. The calibrator sample for the quantification of both genes' expression is a follicular adenoma. Open circle: follicular adenoma; full circle: follicular carcinoma; square: papillary carcinoma; triangle: follicular variant of papillary carcinoma.

doi:10.1371/journal.pone.0088126.g001

Thus, as to the expression level of both genes a strong variation was noted even within the group of malignant tumors. If an alternative overexpression of either gene represents different pathways of tumorigenesis one would expect no or even an inverse correlation. On the other hand a correlation would indicate their involvement in just one pathway. Spearman's correlation coefficient thus was calculated as a measure of association between the *HMGA2* and *PLAG1* expression for all 37 tumor samples and resulted in a high value ($\rho = 0.82$, $p < 0.0001$) indicating that the expression of both genes is strongly correlated in thyroid tumors. For reasons of comparison, Pearson's correlation coefficient was calculated and also indicates a strong correlation when using the ΔC_T values ($r = 0.77$, $p < 0.0001$). Due to the exponential transformation, the linear relationship is less pronounced on the basis of relative gene expression values ($r = 0.44$, $p < 0.001$).

Expression of *HMGA2* and *PLAG1* in Uterine Leiomyomas

Recurrent rearrangements affecting the chromosomal band 12q14 are known to cause an overexpression of *HMGA2* in uterine leiomyomas. Therefore, UL ($n = 32$) were chosen to study a presumable effect of *HMGA2* on the *PLAG1* expression. One myoma with a normal 46,XX karyotype was chosen as calibrator for the qRT-PCR data obtained for both genes.

Of 17 UL with known 12q14 rearrangement including case 646 without cytogenetically visible breakpoint but rearranged *HMGA2* locus according to FISH [40], an overexpression of *HMGA2* was detected in 16 cases. In the remaining case without elevated *HMGA2* expression despite a cytogenetically visible $t(12;14)(q15;q24)$ (no. 503) FISH revealed no rearrangement of the *HMGA2* locus [39].

Only 1/15 UL without cytogenetically detectable 12q14 aberration also showed an elevated *HMGA2* expression. A hidden rearrangement of *HMGA2* was suspected but no evidence for such a rearrangement was obtained by FISH (case 520).

The expression of *PLAG1* was clearly elevated in all 17 UL which overexpress *HMGA2*. In 15 UL with low *HMGA2* expression, elevated levels of *PLAG1* were detected in only two cases (509 and 617, Fig. 3). Spearman's rank correlation coefficient was calculated for the expression of both genes and resulted in a high value ($\rho = 0.75$, $p < 0.0001$). Pearson's correlation coefficient also indicated a significant correlation when it was calculated based on the ΔC_T values ($r = 0.85$, $p < 0.0001$). Similarly a high and significant degree of agreement was found between the low/high expression classification of samples obtained by both parameters ($\kappa = 0.8735$, 95% CI = (0.752, 1.000), see also Table 1).

Stimulation of *HMGA2* Expression in ADSCs

To stimulate the expression of *HMGA2* in ADSCs, FGF1 was chosen because it is a known inducer of *HMGA2* [49]. The relative quantification revealed a 3.9-fold increase of the *HMGA2* mRNA level 24 h after the addition of FGF1. Simultaneously, the *PLAG1* expression increased by 2-fold (Fig. 4). After 48 h, the *HMGA2* level decreased only slightly, but a clear peak could not be identified, because the highest level was observed after 72 h with a 4.2-fold increase. The expression of *PLAG1* increased continuously to a 2.9-fold expression 72 h after the addition of FGF1.

Transient Transfection of the MCF-7 Breast Cancer Cell Line

The expression of *HMGA2* in MCF-7 cells was quantified 24 and 48 h after transfection in mock transfected cells and in cells

transfected either with the empty vector or with the vector containing an insert encoding for wild-type *HMGA2*. qRT-PCR revealed a strongly increased *HMGA2* expression in the latter (Fig. 5) indicating successful transfection. In addition, the expression of *IMP2* encoding for the insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2 was quantified, because it is a known target of *HMGA2* [44,45]. Whereas no effect was apparent upon transfection with the empty vector, *IMP2* was clearly upregulated upon transfection with the vector encoding for *HMGA2*. Quantifications at both 24 and 48 h after transfection resulted in a similar value of at least 4-fold *IMP2* overexpression (Fig. 6). Similar results were obtained for *PLAG1*, the expression of which remained unaltered by the addition of transfection reagent alone ("mock") as well as after transfection with the empty vector. Cells transfected with the vector containing the *HMGA2* insert, however, showed an approximately 2.8-fold increase in *PLAG1* expression as compared to mock transfected cells 24 h as well as 48 h after transfection (Fig. 6).

Discussion

Previous studies on pleomorphic adenomas of the salivary glands have shown that *PLAG1* is frequently overexpressed in PASG with normal karyotype as well as with 12q14~15 abnormalities [50,51].

Akin to what has been described for PASG, the results of the present study indicate that both genes are co-expressed in thyroid tumors as well as in leiomyomas. In papillary carcinomas (including follicular variants), both genes are expressed at higher levels than in follicular adenomas. Follicular carcinomas with high *HMGA2* expression levels also express *PLAG1* at elevated levels.

A correlation between chromosomal rearrangements affecting the *HMGA2* locus and the *HMGA2* protein expression has been shown in uterine leiomyomas [52]. Moreover, it has been shown that in thyroid carcinomas the increased expression of *HMGA2* and *PLAG1* is detectable on the mRNA as well as on the protein level [53]. Therefore, the correlation of *HMGA2* and *PLAG1* mRNA expression described herein is expected to reflect a correlation at the protein level as well.

Besides the typical rearrangements involving chromosomal band 8q12 including the most frequent $t(3;8)(p21;q12)$, an activation of *PLAG1* in pleomorphic adenomas of the salivary glands occurs also in tumors with 12q14~15 abnormalities lacking 8q12 aberrations [50]. Besides 13/17 tumors with an apparently normal karyotype, 5/10 pleomorphic adenomas with 12q13~15 abnormalities were found to overexpress *PLAG1*. In the same study, the *PLAG1* expression was investigated in three UL, and two cases were also found to overexpress *PLAG1*, but no cytogenetic data were available for these three tumors.

These findings suggest alternative mechanisms of *PLAG1* activation in tumorigenesis other than gene rearrangements. The results presented herein point to *HMGA2* as an upstream regulator of *PLAG1* and are additionally confirmed by the correlation between the expressions of both genes in uterine leiomyomas. An activation of *HMGA2* in UL by 12q14 aberrations is well known [7,39,54–56]. Therefore, we chose 15 UL with an apparently normal karyotype or with chromosomal aberrations affecting regions other than 12q14 and 17 cases with 12q14 aberrations to quantify the expression of *PLAG1* and *HMGA2* simultaneously. Of the 15 UL showing low *HMGA2* levels, 13 also showed low levels of *PLAG1*. The two remaining cases showed an elevated *PLAG1* expression despite a low *HMGA2* mRNA expression, thus pointing to mechanisms other than *HMGA2* upregulation being responsible for *PLAG1* activation. In pleomor-

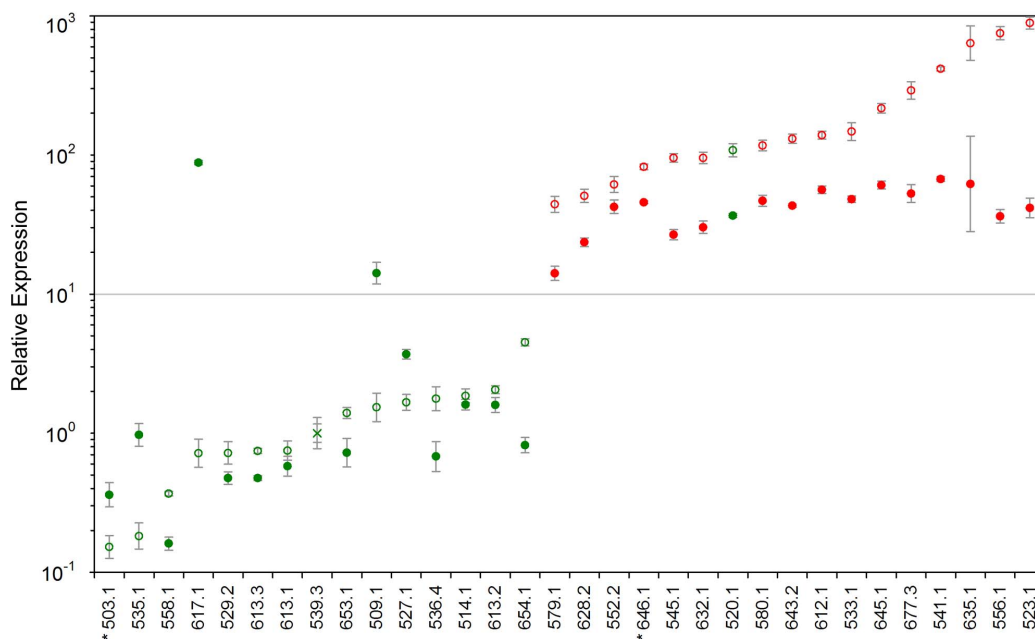


Figure 3. Relative expression of *HMGA2* and *PLAG1* in uterine leiomyomas. Open circle: *HMGA2*, full circle: *PLAG1*, cross: calibrator sample. Green: the *HMGA2* locus is not affected by rearrangement ($n = 16$), red: the *HMGA2* locus is affected by rearrangement ($n = 16$). In two cases marked with an asterisk, cytogenetic and FISH results differ. A $t(12;14)(q15;q24)$ was visible in case 503, but FISH excluded a rearrangement of *HMGA2*. In case 646 FISH revealed a hidden rearrangement of *HMGA2* [40].
doi:10.1371/journal.pone.0088126.g003

phic adenomas of the salivary gland cryptic, intrachromosomal 8q rearrangements have been observed leading to a fusion of *PLAG1* with *CHCHD7* or *TCEA1* [57]. Because the breakpoints are located in the 5'-noncoding regions of both fusion partners, these fusions lead to an activation of *PLAG1* by promoter swapping. Similar events that escape detection by conventional cytogenetics may have caused the upregulation of *PLAG1* observed in two UL without visible rearrangements affecting 8q12. In all 17 UL with elevated *HMGA2* levels a concomitant overexpression of *PLAG1* was noted. The fact that increased *HMGA2* levels were always linked to elevated *PLAG1* levels suggests *HMGA2* as an activator of *PLAG1*. Because no chromosomal rearrangements affecting 8q12 were present in these 17 UL, we assumed that elevated *HMGA2* levels caused by 12q14 abnormalities trigger the activation of *PLAG1*. In turn, *HMGA2* may exert its stimulating effect on the growth of UL with 12q14 aberrations [54] at least in part by activating *PLAG1*, which was shown to possess transactivating capacity [18] and is able to activate downstream target genes like *IGF-II*.

The observation that FGF1-stimulated expression of *HMGA2* is accompanied by increased *PLAG1* expression levels (Fig. 4), further supports the hypothesis that *HMGA2* exerts a *PLAG1*-activating

function. Likewise, transient overexpression of *HMGA2* using an appropriate vector is sufficient to trigger an upregulation of *PLAG1*. Although factors beside *HMGA2* may be involved in the upregulation of *PLAG1*, comparable to the cooperation between *HMGA2* and NF- κ B in the transcriptional activation of the IFN- β gene *IFNBI* [58,59] or *IMP2* [44,45], the *HMGA2* expression vector alone was sufficient to exert an activating effect not only on the known *HMGA2* target *IMP2* but also on *PLAG1*.

In conclusion, it has been shown that *PLAG1* overexpression in thyroid carcinomas as well as in uterine leiomyomas with aberrations affecting the chromosomal region 12q14~15 strongly correlates with the overexpression of *HMGA2*. The increased expression levels of both genes upon stimulation of ADSCs with FGF1 and particularly the upregulation of *PLAG1* upon introduction of an *HMGA2* expression vector into the MCF-7 cell line strongly suggest that *PLAG1* is regulated by *HMGA2* and that histologic similarities observed between benign tumors with either

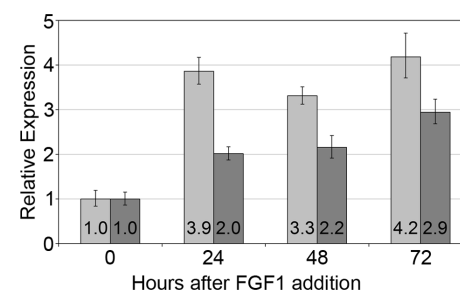


Figure 4. Relative expression of *HMGA2* and *PLAG1* in ADSCs after stimulation with FGF1. Light gray: *HMGA2*, dark grey: *PLAG1*. Expression levels were measured before and 24, 48 and 72 h after stimulation with the FGF1 protein.
doi:10.1371/journal.pone.0088126.g004

Table 1. Case numbers of uterine leiomyomas assigned to high vs. low gene expression classes according to ΔC_T values.

<i>HMGA2</i> expression	<i>PLAG1</i> expression	
	Low ($\Delta C_T \geq 3$)	High ($\Delta C_T < 3$)
Low ($\Delta C_T \geq 0$)	n = 13	n = 2
High ($\Delta C_T < 0$)	n = 0	n = 17

doi:10.1371/journal.pone.0088126.t001

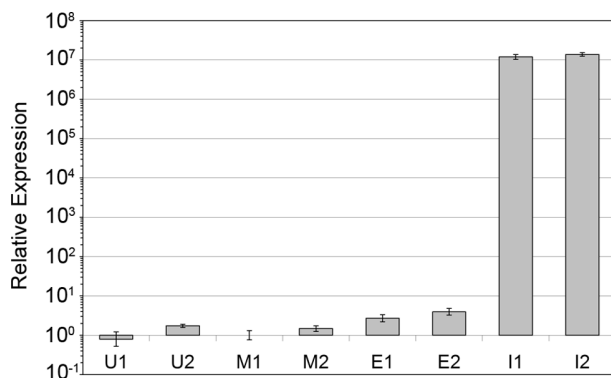


Figure 5. Relative expression of *HMGA2* in transiently transfected MCF-7 cells. The gene expression was measured 24 h (1) and 48 h (2) after transfection. U: untreated cells, M: mock-transfected cells (transfection reagent only), E: cells transfected with the empty expression vector, I: cells transfected with the *HMGA2* expression vector. doi:10.1371/journal.pone.0088126.g005

rearrangements of the *HMGA2* or the *PLAG1* locus result from activation within the same pathway.

Supporting Information

Table S1 Karyotypes of all 32 uterine leiomyomas. (DOC)

References

- Stenman G, Mark J, Ekedhal C (1984) Relationships between chromosomal patterns and protooncogenes in human benign salivary gland tumors. *Tumour Biol* 5: 103–117.
- Sandros J, Stenman G, Mark J (1990) Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 44: 153–167.
- Bullerdiek J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R, Haubrich J, et al. (1993) Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet Cytogenet* 65: 27–31.
- Bullerdiek J, Bartnitzke S, Weinberg M, Chilla R, Haubrich J, et al. (1987) Rearrangements of chromosome region 12q13→q15 in pleomorphic adenomas of the human salivary gland (PSA). *Cytogenet Cell Genet* 45: 187–190.
- Bullerdiek J, Chilla R, Haubrich J, Meyer K, Bartnitzke S (1989) A causal relationship between chromosomal rearrangements and the genesis of salivary gland pleomorphic adenomas. *Arch Otorhinolaryngol* 245: 244–249.
- Bullerdiek J, Takla G, Bartnitzke S, Brandt G, Chilla R, et al. (1989) Relationship of cytogenetic subtypes of salivary gland pleomorphic adenomas with patient age and histologic type. *Cancer* 64: 876–880.
- Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Bergh H, et al. (1995) Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, *HMGI-C*, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10: 436–444.
- Van de Ven WJ, Schoenmakers EF, Wanschura S, Kazmierczak B, Kools PF, et al. (1995) Molecular characterization of MAR, a multiple aberration region on human chromosome segment 12q13–q15 implicated in various solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 296–303.
- Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, et al. (1995) Disruption of the architectural factor *HMGI-C*: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82: 57–65.
- Bustin M, Reeves R (1996) High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54: 35–100.
- Chiappetta G, Avantaggiato V, Visconti R, Fedele M, Battista S, et al. (1996) High level expression of the *HMGI (Y)* gene during embryonic development. *Oncogene* 13: 2439–2446.
- Rogalla P, Drechsler K, Frey G, Hennig Y, Helmke B, et al. (1996) *HMGI-C* expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol* 149: 775–779.
- Rommel B, Rogalla P, Jox A, Kalle CV, Kazmierczak B, et al. (1997) *HMGI-C*, a member of the high mobility group family of proteins, is expressed in hematopoietic stem cells and in leukemic cells. *Leuk Lymphoma* 26: 603–607.
- Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Bullerdiek J, Hameister H (1998) The expression pattern of the *Hmgic* gene during development. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 350–357.

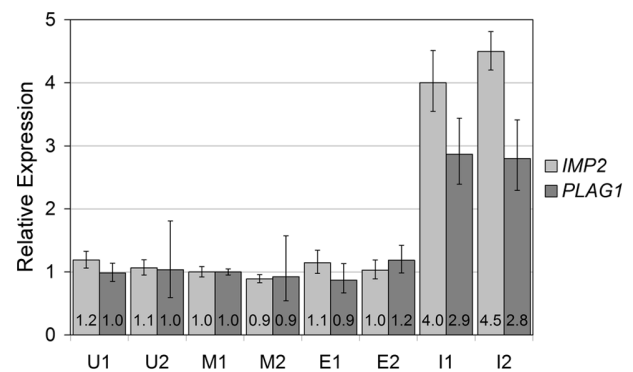


Figure 6. Relative expression of *IMP2* and *PLAG1* in MCF-7 cells transfected with an *HMGA2* expression vector. Light gray: *IMP2*, dark grey: *PLAG1*. The gene expression was measured 24 h (1) and 48 h (2) after transfection. The expression level of mock-transfected cells 24 h after transfection was used as calibrator. U: untreated cells, M: mock-transfected cells (transfection reagent only), E: cells transfected with the empty expression vector, I: cells transfected with the expression vector containing the insert encoding for *HMGA2*. doi:10.1371/journal.pone.0088126.g006

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MK JB. Performed the experiments: MK MHM DN. Analyzed the data: MK WW RN BMH. Contributed reagents/materials/analysis tools: BMH. Wrote the paper: MK JB.

- derivative chromosome 8 with a deletion del(8)(q13q21.2). *Cytogenet Genome Res* 119: 33–38.
30. Bartuma H, Domanski HA, Von Steyern FV, Kullendorff CM, Mandahl N, et al. (2008) Cytogenetic and molecular cytogenetic findings in lipoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 183: 60–63.
 31. Pedeutour F, Deville A, Steyaert H, Ranchere-Vince D, Ambrosetti D, et al. (2012) Rearrangement of HMGA2 in a case of infantile lipoblastoma without *Plag1* alteration. *Pediatr Blood Cancer* 58: 798–800.
 32. Belge G, Meyer A, Klemke M, Burchardt K, Stern C, et al. (2008) Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 56–63.
 33. Chiappetta G, Ferraro A, Vuttariello E, Monaco M, Galdiero F, et al. (2008) HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. *Eur J Cancer* 44: 1015–1021.
 34. Lappinga PJ, Kip NS, Jin L, Lloyd RV, Henry MR, et al. (2010) HMGA2 gene expression analysis performed on cytologic smears to distinguish benign from malignant thyroid nodules. *Cancer Cytopathol* 118: 287–297.
 35. Jin L, Lloyd RV, Nassar A, Lappinga PJ, Sebo TJ, et al. (2011) HMGA2 expression analysis in cytological and paraffin-embedded tissue specimens of thyroid tumors by relative quantitative RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 20: 71–80.
 36. Prasad NB, Somervell H, Tufano RP, Dackiw AP, Marohn MR, et al. (2008) Identification of genes differentially expressed in benign versus malignant thyroid tumors. *Clin Cancer Res* 14: 3327–3337.
 37. Baldassarre G, Battista S, Belletti B, Thakur S, Pentimalli F, et al. (2003) Negative regulation of *BRC1* gene expression by HMGA1 proteins accounts for the reduced *BRC1* protein levels in sporadic breast carcinoma. *Mol Cell Biol* 23: 2225–2238.
 38. Mussnich P, D'Angelo D, Leone V, Croce CM, Fusco A (2013) The High Mobility Group A proteins contribute to thyroid cell transformation by regulating miR-603 and miR-10b expression. *Mol Oncol* 7: 531–542.
 39. Klemke M, Meyer A, Nezhad MH, Bartnitzke S, Drieschner N, et al. (2009) Overexpression of HMGA2 in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 171–178.
 40. Markowski DN, Bartnitzke S, Belge G, Drieschner N, Helmke BM, et al. (2010) Cell culture and senescence in uterine fibroids. *Cancer Genet Cytogenet* 202: 53–57.
 41. Markowski DN, Helmke BM, Radtke A, Froeb J, Belge G, et al. (2012) Fibroid explants reveal a higher sensitivity against MDM2-inhibitor nutlin-3 than matching myometrium. *BMC Womens Health* 12: 2.
 42. Schaffer LG, Slovak ML, Campbell IJ, editors (2009) *ISCN 2009: an international system for human cytogenetic nomenclature*. Basel, S. Karger.
 43. Fedele M, Berlingieri MT, Scala S, Chiariotti L, Viglietto G, et al. (1998) Truncated and chimeric HMGI-C genes induce neoplastic transformation of NIH3T3 murine fibroblasts. *Oncogene* 17: 413–418.
 44. Brants JR, Ayoubi TA, Chada K, Marchal K, Van de Ven WJ, et al. (2004) Differential regulation of the insulin-like growth factor II mRNA-binding protein genes by architectural transcription factor HMGA2. *FEBS Lett* 569: 277–283.
 45. Cleynen I, Brants JR, Peeters K, Deckers R, Debicq-Rychter M, et al. (2007) HMGA2 regulates transcription of the *Imp2* gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor- κ B. *Mol Cancer Res* 5: 363–372.
 46. Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. World Medical Association. Available from: <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/> (accessed on June 22, 2012).
 47. German National Ethics Council. 2004. Opinion: Biobanks for research. Available from http://www.ethikrat.org/_english/publications/Opinion_Biobanks-for-research.pdf (accessed on June 22, 2012).
 48. Klemke M, Drieschner N, Belge G, Burchardt K, Junker K, et al. (2012) Detection of PAX8-PPARG fusion transcripts in archival thyroid carcinoma samples by conventional RT-PCR. *Genes Chromosomes Cancer* 51: 402–408.
 49. Ayoubi TA, Jansen E, Meulemans SM, Van de Ven WJ (1999) Regulation of HMGI-C expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development. *Oncogene* 18: 5076–5087.
 50. Åström AK, Voz ML, Kas K, Röjger E, Wedell B, et al. (1999) Conserved mechanism of *PLAG1* activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of *SII* as a new fusion partner gene. *Cancer Res* 59: 918–923.
 51. Enlund F, Nordkvist A, Sahlén P, Mark J, Stenman G (2002) Expression of *PLAG1* and HMGI-C proteins and fusion transcripts in radiation-associated pleomorphic adenomas. *Int J Oncol* 20: 713–716.
 52. Tallini G, Vanni R, Manfioletti G, Kazmierczak B, Faa G, et al. (2000) HMGI-C and HMGI(Y) immunoreactivity correlates with cytogenetic abnormalities in lipomas, pulmonary chondroid hamartomas, endometrial polyps, and uterine leiomyomas and is compatible with rearrangement of the HMGI-C and HMGI(Y) genes. *Lab Invest* 80: 359–369.
 53. Prasad NB, Kowalski J, Tsai HL, Talbot K, Somervell H, et al. (2012) Three-gene molecular diagnostic model for thyroid cancer. *Thyroid* 22: 275–284.
 54. Hennig Y, Wanschura S, Deichert U, Bartnitzke S, Bullerdick J (1996) Rearrangements of the high mobility group protein family genes and the molecular genetic origin of uterine leiomyomas and endometrial polyps. *Mol Hum Reprod* 2: 277–283.
 55. Hennig Y, Deichert U, Bonk U, Thode B, Bartnitzke S, et al. (1999) Chromosomal translocations affecting 12q14–15 but not deletions of the long arm of chromosome 7 associated with a growth advantage of uterine smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod* 5: 1150–1154.
 56. Gross KL, Neskey DM, Manchanda N, Weremowicz S, Kleinman MS, et al. (2003) HMGA2 expression in uterine leiomyomata and myometrium: quantitative analysis and tissue culture studies. *Genes Chromosomes Cancer* 38: 68–79.
 57. Asp J, Persson F, Kost-Alimova M, Stenman G (2006) CHCHD7-*PLAG1* and TCEA1-*PLAG1* gene fusions resulting from cryptic, intrachromosomal 8q rearrangements in pleomorphic salivary gland adenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 820–828.
 58. Mantovani F, Covacevzsch S, Rustighi A, Sgarra R, Heath C, et al. (1998) NF- κ B mediated transcriptional activation is enhanced by the architectural factor HMGI-C. *Nucleic Acids Res* 26: 1433–1439.
 59. Noro B, Licheri B, Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, et al. (2003) Molecular dissection of the architectural transcription factor HMGA2. *Biochemistry* 42: 4569–4577.

Supplementary Table S1: Karyotypes of all 32 uterine leiomyomas. ¹⁾ *HMGA2* is unaffected by the rearrangement according to FISH ^[39]. ²⁾ FISH revealed a hidden rearrangement of *HMGA2* ^[40].

Case	Karyotype
503.1 ¹⁾	46,XX,inv(5)(q15q31~33),t(12;14)(q15;q24)[13]
509.1	46,XX[14]
514.1	46,XX[17]
520.1	46,XX[7]
523.1	45,XX,t(12;14)(q15;q24),der(14)t(12;14)(q15;q24),-22[8]
527.1	46,XX[10]
529.2	46,XX[14]
533.1	46,XX,r(1),t(1;12;14)(p36.3;q14;q24)[19]
535.1	47,XX,+10[2]/46,XX[10]
536.4	46,XX[11]
539.3	46,XX[9]
541.1	46,XX,t(12;14)(q15;q24)[5]/46,XX[9]
545.1	46,XX,t(12;14)(q15;q24)[9]/46,XX[3]
552.2	46,XX,t(2;12)(q33;q13)[17]
556.1	46,XX,t(3;5;12)(q23~25;p13~15;q13~15)[11]/45,XX,idem,-22[10]
558.1	46,XX[13]
579.1	46,XX,t(12;15;14)(q15;q26;q24)[20]

Supplementary Table S1 (continued).

Case	Karyotype
580.1	46,XX,der(7)del(7)(p)del(7)(q),add(8)(q),add(10)(q),t(12;14)(q15;q24)[19]
612.1	46,XX,t(12;14)(q15;q24)[13]/46,XX,der(1)r(1;2),t(12;14)(q15;q24)[4]
613.1	46,XX[15]
613.2	46,XX[15]
613.3	46,XX[16]
617.1	46,XX,der(1)del(1)(p22),der(3)?t(1;3)(p22;q?),der(5)del(5),der(12)t(12;?) (q24.3;?)-14,-20,+mar1,+mar2[6]
628.2	46,XX,?ins(12;14)(q15;q31q24)[5]/46,XX[14]
632.1	46,XX,t(12;14)(q15;q24)[12]/46,XX,del(4)(q31~q32),der(10),?t(10,14) (q24;q32),t(12;14)(q15;q24)[9]
635.1	46,XX,der(10),del(12)(q13~q14)[18]
643.2	46,XX,t(12;14)(q15;q24)[14]
645.1	45,XX,r(1),der(13;14)(q10;q10)t(12;14)(q15;q24)[20]/44,XX,-1,der(13;14) (q10;q10)t(12;14)(q15;q24)[6]
646.1 ²⁾	46,XX,t(2;12)(p21;p13)[11]
653.1	46,XX[14]
654.1	46,XX[8]
677.3	46,XX,add(1)(p13),r(1)(?p36.3q25),add(7)(q22),der(10)t(1;10)(q25;q22), der(12)add(12)(p11.2)add(q12),add(13)(q12)[20]/46,XX[3]

4 DISKUSSION

Eine Reaktivierung des *HMGA2*-Gens, die in vielen malignen Tumoren auftritt, trägt entscheidend zur Zelltransformation bei. Einige Mechanismen, über die *HMGA2* sein onkogenes Potential entfalten kann, wurden mittlerweile aufgeklärt. Es steigert die Aktivität von E2F1 und AP-1 und induziert die Cyclin-A-Expression (Fedele et al., 2006b; Fedele et al., 2006c; Vallone et al., 1997; Tessari et al., 2003). Des Weiteren reguliert *HMGA2* außerdem Gene, die an der epithelial-mesenchymalen Transition mitwirken (Tan et al., 2012; Wu et al., 2011). Bisherige Untersuchungen zur *HMGA2*-Reaktivierung in malignen epithelialen Tumoren hatten Tumorentitäten wie beispielsweise Mammakarzinome (Rogalla et al., 1997) oder Bronchialkarzinome (Rogalla et al., 1998b; Sarhadi et al., 2006; Meyer et al., 2007) zum Gegenstand. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war es daher, die Rolle von *HMGA2* in epithelialen Tumoren der Schilddrüse zu beleuchten (Belge et al., 2008). Daneben wurde auch die Fusion der Gene *PAX8* und *PPARG*, die als Marker für follikuläre Karzinome diskutiert wurde, behandelt (Klemke et al., 2011; Klemke et al., 2012). *HMGA2* ist aber nicht nur in epithelialen Malignomen von Interesse, denn auch in benignen Tumoren mesenchymalen Ursprungs kann vor allem durch chromosomale Aberrationen eine Reaktivierung auftreten, was in der vorliegenden Arbeit am Beispiel von Uterus-Leiomyomen berücksichtigt wurde (Klemke et al., 2009; Klemke et al., 2010; Hashemi Nezhad et al., 2010). Schließlich führte die Kombination aus Untersuchungen an Schilddrüsentumoren und Leiomyomen des Uterus dazu, daß *PLAG1* als ein potentielles, weiteres Zielgen von *HMGA2* identifiziert werden konnte (Klemke et al., 2014).

4.1 *HMGA2* als Marker für Malignome der Schilddrüse

Es besteht ein großer Bedarf an molekularen Markern, die die Diagnostik von Neoplasien der Schilddrüse bereits präoperativ unterstützen können. Zwar existieren molekulargenetische oder immunhistochemische Marker für Tumorentitäten wie beispielsweise papilläre Karzinome, zur sicheren Identifizierung follikulärer Karzinome steht gegenwärtig jedoch kein Marker zur Verfügung. Obwohl entsprechend zahlreiche Forschungsarbeiten durchgeführt wurden, die die Identifizierung solcher Marker zum Ziel hatten, konnte bislang keiner der darin vorgeschlagenen Kandidaten in der klinischen Praxis etabliert werden.

Eine verstärkte Expression des ansonsten überwiegend in der Embryonalentwicklung aktiven Gens *HMGA2* war bereits an verschiedenen malignen Tumoren epithelialen Ursprungs beschrieben worden. Hierzu zählen unter anderem Sarkome (Berner et al., 1997), Mammakarzinome (Rogalla et al., 1997), Bronchialkarzinome (Rogalla et al., 1998b; Sarhadi et al., 2006; Meyer et al., 2007), Pankreaskarzinome (Abe et al., 2003) sowie Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle (Miyazawa et al., 2004). Hinweise auf eine Rolle von *HMGA2* auch bei

der Pathogenese von Karzinomen der Schilddrüse ergaben sich aus der Beobachtung, daß die Inhibition der *HMGA2*-Expression die retroviral vermittelte, neoplastische Transformation von Schilddrüsenzellen der Ratte supprimiert (Berlingieri et al., 1995). Allerdings inhibierte die gegen *HMGA2* gerichtete Antisense-cDNA auch die *HMGA1*-Expression, so daß nicht ausgeschlossen werden konnte, daß die beobachtete Suppression der neoplastischen Transformation auf das verwandte *HMGA1* zurückging. Später zeigte sich, daß eine *HMGA2*-abhängige transkriptionelle Aktivierung der Gene *JUNB* und *FOSL1*, deren Produkte jun-B und FRA1 Bestandteil des AP1-Komplexes sind, Voraussetzung für die neoplastische Transformation von Thyreozyten ist (Vallone et al., 1997; Battista et al., 1998). Nachdem festgestellt worden war, daß *HMGA2* für die Transformation *in vivo* nicht erforderlich ist (Scala et al., 2001), dürfte das Interesse an *HMGA2* im Zusammenhang mit Malignomen der Schilddrüse jedoch gesunken sein. Stattdessen konzentrierte man sich auf *HMGA1*, dem zuvor ebenfalls eine Rolle in der Tumorigenese der Schilddrüse zugeschrieben worden war (Chiappetta et al., 1995; Chiappetta et al., 1998). In einer späteren Publikation wurde die Bedeutung von *HMGA1* auch im Zusammenhang mit der AP1-Aktivierung betont (Berlingieri et al., 2002). Schließlich postulierte man *HMGA1* sogar als einen für follikuläre Karzinome spezifischen Marker (Czyz et al., 2004). In nicht unerheblichem Maße dürfte eine an sieben aus Schilddrüsenkarzinomen hervorgegangenen Zelllinien durchgeführte Studie (Chiappetta et al., 1995) dazu beigetragen haben, daß die *HMGA2*-Expression in Tumoren der Schilddrüse nicht vertieft untersucht wurde. In nur fünf dieser sieben Zelllinien konnte eine *HMGA2*-Expression mittels Northern und Western Blot nachgewiesen werden, weshalb man von einer zu geringen Sensitivität von *HMGA2* als Marker ausging. Es wäre jedoch vorstellbar, daß eine *HMGA2*-Expression aufgrund einer zu geringen Sensitivität der durchgeführten Blots in zwei Zelllinien nicht detektiert werden konnte. Die weitaus sensitivere, quantitative Real-Time RT-PCR war 1995 noch nicht verbreitet, und umfangreiche *HMGA2*-Expressionsanalysen mittels qRT-PCR an Schilddrüsentumoren waren noch nicht durchgeführt worden. Laut Chiappetta et al. (1995) konnte in der Zelllinie WRO das *HMGA2*-Protein nicht nachgewiesen werden, und im Northern Blot waren *HMGA2*-Transkripte „nahezu nicht detektierbar“. Spätere Quantifizierungen mittels Real-Time RT-PCR ergaben dagegen, daß die WRO-Zelllinie eine relativ starke *HMGA2*-Expression aufweist (unveröffentlichte Ergebnisse). Zu berücksichtigen ist außerdem eine potentielle Fehlidentifizierung von Zelllinien. In der Zelllinie NPA, die aus einem papillären Schilddrüsenkarzinom hervorgegangen sein soll, konnte weder mittels Northern noch mittels Western Blot eine *HMGA2*-Expression festgestellt werden. In der Zelllinie ARO, deren Ursprung in einem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom angenommen wurde, konnte zwar die mRNA nachgewiesen werden, dem Western Blot zufolge ist allerdings nur eine sehr geringe Menge des *HMGA2*-Proteins vorhanden (Chiappetta et al., 1995). Inzwischen ist bekannt geworden, daß diese Zelllinien nicht wie

zuvor angenommen Schilddrüsengewebe entstammen. ARO ist demnach identisch mit der Zelllinie HT-29, bei der es sich um Zellen eines Kolonkarzinoms handelt. Ein ähnliches Problem besteht mit der Zelllinie NPA, in der keine *HMGA2*-Expression nachweisbar war. Sie soll identisch sein mit einer Zelllinie, die als MDA-MB-435S/M14 bezeichnet wird (Schweppe et al., 2009). Auch diese Zelllinie geht nicht auf ein Karzinom der Schilddrüse sondern auf ein Melanom zurück, was das negative Resultat von Chiappetta et al. (1995) erklären kann. Außerdem muß hinterfragt werden, inwieweit die aus Untersuchungen an Zellkulturen stammenden Ergebnisse auf Tumoren *in vivo* übertragbar sind. Mehrere Untersuchungen an Uterus-Leiomyomen haben gezeigt, daß Rearrangierungen der chromosomalen Region 12q14~15 mit einer Überexpression von *HMGA2* korrelieren. Daher überraschten Genexpressionsanalysen, die nach Kultivierung der aus solchen Myomen stammenden Zellen durchgeführt worden waren. Es war ein zum Teil drastischer Rückgang der *HMGA2*-Expression *in vitro* zu verzeichnen, so daß sich die Expressionslevel von Zellen mit rearrangiertem und unverändertem *HMGA2*-Locus einander annäherten (Markowski et al., 2010b). Daher stellt sich auch für die Tumoren der Schilddrüse die Frage, ob die in einem *in vitro*-System erhaltenen Ergebnisse auch für Tumoren *in vivo* repräsentativ sein können. Die deutliche Abnahme der *HMGA2*-Expression bei Kultivierung von Myomen mit Aberration der chromosomalen Region 12q14~15 spricht eher für eine begrenzte Aussagekraft der an Zellkulturen durchgeführten Messungen, zumal auch bei Kultivierung von Thyreozyten mit Veränderungen zu rechnen ist. Manche Schilddrüsen-Zelllinien scheinen unabhängig von ihrem Ursprung den undifferenzierten Tumoren genetisch ähnlicher zu sein. Zudem haben viele Zelllinien die Fähigkeit zur Expression schilddrüsenpezifischer Gene verloren (Pilli et al., 2009). Was immunhistochemische Untersuchungen betrifft, so ist aus der Familie der HMGA-Proteine vornehmlich HMGA1 untersucht worden. In älteren Veröffentlichungen spielt dabei sicherlich auch eine Rolle, daß gegen HMGA1 gerichtete Antikörper früher verfügbar waren als HMGA2-spezifische (Fusco und Fedele, 2007).

Aus mehreren Gründen erschien folglich eine umfangreichere Quantifizierung der *HMGA2*-Expression in humanen Schilddrüsentumoren als sinnvoll. Hierzu wurden formalinfixierte Gewebeproben von nicht-malignen Läsionen der Schilddrüse ebenso verwendet wie von 40 Karzinomen, darunter neun follikuläre Karzinome. Während in benignen Läsionen in der Regel keine oder allenfalls eine leichte Erhöhung der *HMGA2*-Expression zu beobachten war, exprimierten nahezu alle Karzinome *HMGA2* stark (Belge et al., 2008). Lediglich für je ein follikuläres und ein papilläres Karzinom galt dies nicht, so daß eine Sensitivität von über 96 % erreicht wurde. Zu bedenken ist außerdem, daß die zur Quantifizierung herangezogene RNA aus kompletten Gewebeschnitten erfolgte, die neben Karzinomanteilen auch Schilddrüsenparenchym enthielten, so daß die Eindeutigkeit der Resultate nach Durchführung einer Mikrodissektion gesteigert werden könnte. Darauf wurde zugunsten eines immunhistochemi-

schen Nachweises des *HMGA2*-Proteins in ausgewählten Fällen verzichtet. Die Überexpression in den Karzinomen konnte auch auf Proteinebene bestätigt werden (Belge et al., 2008). Nach Veröffentlichung dieser Ergebnisse wurden weitere Studien zur *HMGA2*-Expression in Tumoren der Schilddrüse publiziert. Der Vergleich zwischen quantitativer Real-Time RT-PCR und immunhistochemischem *HMGA2*-Nachweis bestätigte zwar die Beobachtung, daß Karzinome generell eine erhöhte *HMGA2*-Expression aufweisen, führte aber auch zu dem Schluß, daß die qRT-PCR zur Abgrenzung maligner und benigner Tumoren besser geeignet ist als die immunhistochemische Färbung (Chiappetta et al., 2008). In einer weiteren Veröffentlichung wurde die bereits beschriebene Überexpression neben qRT-PCR und Immunhistochemie auch mittels Western Blot bestätigt (Prasad et al., 2008). In zwei weiteren Arbeiten, in denen nicht nur formalinfixierte Gewebe, sondern auch zytologische Präparate verwendet wurden, konnte gezeigt werden, daß diese Erkenntnisse auch auf Präparate übertragbar sind, die durch Feinnadelpunktionen von Schilddrüsentumoren gewonnen wurden (Lappinga et al., 2010; Jin et al., 2011).

Intensive Bemühungen anderer Arbeitsgruppen führten dazu, daß zahlreiche potentielle Marker vorgeschlagen wurden. Ein Beispiel hierfür ist *FHL1*, das in follikulären Karzinomen weniger stark als in Adenomen exprimiert wird, wobei dieser Unterschied statistisch signifikant ist (Fryknäs et al., 2006). Dennoch ist der Umstand problematisch, daß in den Expressionsstärken zwischen beiden Tumorentitäten ein großer Überlappungsbereich existiert, so daß eine Dignitätsbewertung einzelner Tumoren trotz statistisch signifikanter Unterschiede ausschließlich mit Hilfe der *FHL1*-Expression in den meisten Fällen nicht möglich sein dürfte. Im Unterschied dazu wird *HMGA2* in Adenomen und follikulären Karzinomen nicht nur signifikant unterschiedlich exprimiert, sondern es kommt in diesen Tumoren auch kaum zu Überschneidungen der Expressionsstärke. Daher läßt sich nach Untersuchung einer ausreichend großen Fallzahl höchstwahrscheinlich ein Schwellwert festlegen, der die Zuordnung zu einer der beiden Gruppen mit großer Sicherheit erlaubt. Besonderes Augenmerk muß dabei auf follikuläre Karzinome gerichtet werden, die keine erhöhte *HMGA2*-Expression aufweisen. Diese Fälle dürften zwar eine Minderheit darstellen, ihre Existenz ist aber weitgehend gesichert. Da in der klinischen Praxis falsch-negative Bewertungen follikulärer Neoplasien weitestgehend minimiert werden müssen, kann eine Ergänzung in Form eines oder mehrerer zusätzlicher Marker erforderlich werden. Von diesen wenigen Ausnahmefällen abgesehen bietet *HMGA2* gegenüber *FHL1* aber den Vorteil, daß auch eine Einzelmessung zur Dignitätsbewertung herangezogen kann, da dieses Gen auch als alleiniger Marker für eine Diskriminierung der diagnostisch problematischen follikulären Neoplasien vielversprechend erscheint. Im Zusammenhang mit Ovarialkarzinomen wurde *HMGA2* auch als therapeutischer Ansatzpunkt diskutiert (Malek et al., 2008). Ob *HMGA2* auch in Schilddrüsenkarzinomen nicht nur für diagnostische sondern auch für therapeutische Zwecke in Betracht

gezogen werden kann, ist fraglich, da bei Schilddrüsenkrebs eine Thyreoidektomie indiziert ist und außerdem eine Radiojodtherapie durchgeführt werden kann. Zur Vermeidung von Rezidiven könnte *HMGA2* dennoch ein interessanter Ansatzpunkt werden, was nach dem derzeitigen Kenntnisstand aber spekulativ ist.

4.2 Die Rolle der *HMGA*-Gene in Uterus-Leiomyomen

Die am häufigsten in Uterus-Leiomyomen vorkommende rekurrente chromosomale Aberration betrifft die Region 12q14~15, meist als $t(12;14)(q14\sim q15;q23\sim q24)$ (Meloni et al., 1992), aber auch in Form anderer Aberrationen (Wanschura et al., 1997). Betroffen von Veränderungen dieser Region ist *HMGA2* (Schoenmakers et al., 1995; Hennig et al., 1996a; Schoenberg Fejzo et al., 1996), das infolge der strukturellen Veränderung verstärkt exprimiert wird (Gattas et al., 1999; Hennig et al., 1999; Tallini et al., 2000; Gross et al., 2003; Quade et al., 2003). Diese früheren Erkenntnisse konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da in insgesamt zwölf Leiomyomen mit Aberrationen der Region 12q14~15 eine stark erhöhte *HMGA2*-Expression festgestellt wurde (Klemke et al., 2009). Die Untersuchung der *HMGA2*-Expression in Myomen ohne chromosomale Aberration der Region 12q14~15 wurde in bisherigen Studien dagegen vernachlässigt. Die Quantifizierung in einer vergleichsweise großen Anzahl von Myomen ohne zytogenetisch erkennbare chromosomale Veränderungen sowie den dazugehörigen Myometrien ergab, daß *HMGA2* in etwa 90 % der Myome ohne zytogenetisch erkennbare Anomalie stärker als im Myometrium exprimiert wird (Klemke et al., 2009). Obwohl Myome mit normalem Karyotyp *HMGA2* nicht so stark exprimierten wie Myome der 12q14~15-Gruppe, ist dieser Befund dennoch bemerkenswert, da er impliziert, daß *HMGA2* auch ohne eine den Genlocus betreffende, chromosomale Veränderung zur Tumorentstehung beitragen könnte. Da die Mehrheit der Uterus-Leiomyome keine chromosomalen Aberrationen aufweist, bedeutet dieses Resultat, daß *HMGA2* möglicherweise nicht nur in einer zytogenetischen Gruppe besonders relevant ist, sondern daß seine Dysregulation in einem sehr viel größeren Anteil eine entscheidende Funktion erfüllen könnte. Die Mechanismen, die zu einer Steigerung der *HMGA2*-Expression in karyotypisch normalen Myomen führen, sind nicht bekannt. Vorstellbar wäre beispielsweise ein Ausfall der posttranskriptionellen Regulation durch miRNAs der let-7-Familie (Mayr et al., 2007; Lee und Dutta, 2007; Shell et al., 2007; Park et al., 2007).

Neben Uterus-Leiomyomen mit Aberrationen der Region 12q14~15 existiert eine kleinere zytogenetische Gruppe, in der Rearrangierungen der chromosomale Bande 6p21 vorliegen (Nilbert und Heim, 1990; Kiechle-Schwarz et al., 1991; Ozisik et al., 1995; Hennig et al., 1996b). Betroffen ist in diesen Fällen das eng mit *HMGA2* verwandte Gen *HMGA1* (Kazmierczak et al., 1996c; Kazmierczak et al., 1998). Zwar gab es Hinweise auf eine *HMGA1*-Überexpression infolge der Aberration der Bande 6p21 (Sornberger et al., 1999; Tallini et al.,

2000), diese Untersuchungen beschränkten sich allerdings auf die Proteinebene bzw. auf einen qualitativen mRNA-Nachweis mit einer herkömmlichen RT-PCR. Da auf quantitativen Methoden beruhende Studien zur *HMGA1*-Expression in Uterus-Leiomyomen fehlten, wurde sie im Rahmen einer qRT-PCR in Myomen mit veränderter Bande 6p21 quantifiziert und mit Myomen ohne zytogenetisch sichtbare Chromosomenanomalien verglichen. Dabei stellte sich heraus, daß *HMGA1* in Myomen mit Rearrangierungen unter Beteiligung der Bande 6p21 in der Regel deutlich stärker exprimiert wird als in karyotypisch normalen Myomen (Hashemi Nezhad et al., 2010). In Analogie zur *HMGA2*-Expression bei Aberrationen der Region 12q14~15 kann als Ursache dieser erhöhten Expression ein Ausfall negativer Regulationsmechanismen ebenso in Betracht gezogen werden wie der Austausch von Promotoren, so daß *HMGA1* unter die Kontrolle eines Promotors gelangen könnte, der für eine konstitutive Genexpression verantwortlich ist. Noch ist unbekannt, welche Rolle *HMGA1* bei der Entstehung von Uterus-Leiomyomen spielt. Das sehr ähnliche *HMGA2* wurde mit dem Stammzellcharakter und dem Selbsterneuerungspotential mesenchymaler Zellen in Verbindung gebracht (Li et al., 2007b; Nishino et al., 2008). Aufgrund der strukturellen Gemeinsamkeiten von *HMGA1* und *HMGA2* sind vergleichbare Funktionen von *HMGA1* denkbar, die Folgen einer verstärkten *HMGA1*-Expression auf molekularer Ebene und die Bedeutung für die Tumorigenese von Uterus-Leiomyomen sind jedoch unbekannt. Ähnlichkeiten wie die hohe Homologie der DNA-Bindedomänen lassen vermuten, daß die starke *HMGA1*-Expression in Leiomyomen mit 6p21-Veränderung einen sehr ähnlichen Effekt wie die *HMGA2*-Expression bei 12q14~15-Veränderung haben könnte. Gestützt wird diese Annahme durch erst kürzlich veröffentlichte Forschungsergebnisse, denen zufolge *HMGA1* in der Lage ist, somatische Zellen zu pluripotenten Stammzellen zu reprogrammieren (Shah et al., 2012). Unter anderem wurde nachgewiesen, daß *HMGA1* die Pluripotenz-Gene *SOX2*, *LIN28* und *cMYC* stimuliert, und auch seine Bindung an die Promotoren dieser Gene konnte festgestellt werden (Shah et al., 2012). Im Hinblick auf eine mögliche Rolle bei der Pathogenese von Myomen wäre vorstellbar, daß *HMGA1* in ähnlicher Weise auf mesenchymale Stammzellen wirkt und einen proliferationssteigernden Effekt ausübt.

Obwohl bekannt war, daß Uterus-Leiomyome mit chromosomaler Aberration der Region 12q14~15 eine besonders starke *HMGA2*-Expression aufweisen (Gattas et al., 1999; Hennig et al., 1999; Tallini et al., 2000; Gross et al., 2003; Quade et al., 2003; Klemke et al., 2009), herrschte Unklarheit über die zugrundeliegenden Mechanismen. Neben einem Promortausch konnte auch der Verlust regulatorischer Elemente in Erwägung gezogen werden (Quade et al., 2003). Nachdem bekannt geworden war, daß in der 3'-UTR Bindestellen für miRNAs der let-7-Familie vorhanden sind, die eine posttranskriptionelle Regulation ermöglichen (Mayr et al., 2007; Lee und Dutta, 2007; Shell et al., 2007; Park et al., 2007), stellte sich die Frage, ob der Verlust der let-7-Bindestellen auch in Uterus-Leiomyomen für eine

erhöhte *HMGA2*-Expression verantwortlich sein könnte. Daher wurde eine qRT-PCR so angelegt, daß mit zwei unterschiedlichen Primerkombinationen alle *HMGA2*-Transkripte einerseits und nur vollständige Transkripte andererseits erfaßt werden (Klemke et al., 2010). Ergeben sich deutliche Diskrepanzen zwischen beiden PCRs, kann davon ausgegangen werden, daß zumindest anteilig trunkierte *HMGA2*-Transkripte vorhanden sind, die aufgrund fehlender Bindestellen nicht unter der Kontrolle der *let-7*-miRNAs stehen. Auf diese Weise wurden dreizehn Uterus-Leiomyome mit einem von Aberrationen betroffenen *HMGA2*-Locus untersucht. Sehr deutliche Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen beider PCRs ergaben sich allerdings in nur zwei Fällen. Daraus ist zu schließen, daß chromosomale Bruchpunkte zwar intragenisch auftreten und zu trunkierten *HMGA2*-Transkripten führen können, die keine *let-7*-Bindestellen aufweisen und sich daher einer posttranskriptionellen Kontrolle entziehen, allerdings scheint dies nur auf eine Minderheit der Tumoren zuzutreffen. In den meisten Fällen wurden auch vollständige Transkripte detektiert, so daß ein intragenischer Bruchpunkt als Ursache für die Steigerung der *HMGA2*-Expression ausgeschlossen werden kann. Dieses Resultat stimmt mit anderen Untersuchungen überein, denen zufolge die chromosomalen Bruchpunkte häufig außerhalb des Gens lokalisiert sind (Quade et al., 2003). Als grundlegender, zur Überexpression führender Mechanismus kommt die Trunkierung der Transkripte daher nicht in Frage. Der Verlust posttranskriptioneller Regulationsmechanismen ist dadurch zwar nicht auszuschließen, denn neben einer Trunkierung der mRNA könnten Punktmutationen der *let-7*-Bindestellen ebenso dazu führen, daß die miRNAs nicht an die mRNA binden können. Außerdem könnte auch eine verminderte Expression der miRNAs selbst zu einem ähnlichen Effekt führen. Hinweise auf eine verminderte *let-7*-Expression in Uterus-Leiomyomen existieren bereits (Peng et al., 2008). Neben einer posttranskriptionellen Regulation kann aber auch eine transkriptionelle Aktivierung, deren Ursachen noch aufzuklären sind, hauptsächlich für die starke *HMGA2*-Expression verantwortlich sein.

4.3 Die *PAX8/PPARG*-Genfusion in Schilddrüsentumoren

Zum Zeitpunkt ihrer Erstbeschreibung wurde die Fusion der Gene *PAX8* und *PPARG* in Schilddrüsenkarzinomen für einen vielversprechenden, karzinomspezifischen Marker gehalten (Kroll et al., 2000). Folglich stellten zahlreiche Arbeitsgruppen eigene Untersuchungen zum Auftreten dieser Genfusion in Karzinomen der Schilddrüse an, deren Ergebnisse die Eignung der *PAX8-PPARG*-Fusion als Marker für follikuläre Karzinome jedoch in Frage stellten. Einerseits zeichnete sich eine zu geringe Sensitivität ab, weil der Anteil der fusionspositiven FTCs geringer als ursprünglich angenommen war, andererseits schien auch die Spezifität vermindert zu sein, da zum Teil auch Adenome die Genfusion aufwiesen. Auffällig ist zudem, daß die in unterschiedlichen Studien angegebenen Häufigkeiten des Auftretens der Fusion sowohl in follikulären Karzinomen als auch in Adenomen stark divergieren. In der

ersten der beiden diesbezüglichen Publikationen der vorliegenden Arbeit wurde die Häufigkeit der der Genfusion zugrundeliegenden chromosomalen Translokation in einem umfangreichen Kollektiv aus 192 Adenomen untersucht (Klemke et al., 2011). Es zeigte sich, daß die $t(2;3)(q13;p25)$ in nur zwei Fällen zytogenetisch detektiert werden konnte, was einem prozentualen Anteil von einem Prozent entspricht. Diese Beobachtung ist im Einklang mit anderen zytogenetischen Untersuchungen, in denen fünf von 146 Adenomen diese Translokation aufwiesen (Tabelle 1 aus Klemke et al., 2011). Im Gegensatz dazu ist der prozentuale Anteil der *PAX8-PPARG*-Fusion in einigen molekulargenetischen Studien, die auf einem Nachweis der Transkripte durch eine RT-PCR basieren, deutlich höher und erreicht im Mittel 8,2 % (23 von 281 Adenomen). Für diese Diskrepanz kommen mehrere Erklärungen in Frage. Erstens kann die Anwendung unterschiedlicher Nachweismethoden zu diskrepanten Ergebnissen führen. Aus FISH-Untersuchungen an follikulären Karzinomen weiß man, daß der Anteil fusionspositiver Zellen stark schwanken kann (Algeciras-Schimmich et al., 2010). In einer nicht-quantitativen RT-PCR wäre unabhängig vom Anteil positiver Zellen ein positives Resultat zu erwarten. Bei einer der Karyotypisierung vorausgehenden Kultivierung könnten Zellen, die die Translokation tragen, von Zellen ohne die $t(2;3)(q13;p25)$ verdrängt werden und verlorengehen, so daß sie zytogenetisch nicht in Erscheinung treten. Alternativ könnten auch submikroskopische Rearrangierungen vorliegen, die nur molekulargenetisch erfaßt werden können. Für diese Möglichkeit konnten bisher allerdings keine Hinweise gefunden werden, da in insgesamt 19 zytogenetisch unauffälligen Adenomen auch mittels RT-PCR keine *PAX8-PPARG*-Fusionstranskripte nachgewiesen werden konnten (Klemke et al., 2011). Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, daß die Genfusion mit unterschiedlicher Häufigkeit in verschiedenen Ethnien oder geographischen Regionen auftritt. Diese Möglichkeit wurde von einer Arbeitsgruppe diskutiert, die Schilddrüsentumoren mittels FISH auf die Rearrangierung untersucht hat (Chia et al., 2010). Die derzeitige Datenlage läßt es jedoch nicht zu, diese Hypothese zu verifizieren. Ein interessanter Aspekt ist außerdem die korrekte Klassifizierung follikulärer Neoplasien. Wie beschrieben kann die Abgrenzung follikulärer Karzinome und Adenome problematisch sein, da gemäß Definition der WHO als histologische Unterscheidungskriterien nur Kapseldurchbrüche und Gefäßeinbrüche gelten. Geht man von einer Adenom-Karzinom-Sequenz aus – für die mehrere Anhaltspunkte sprechen – dann müßten Tumoren existieren, in denen das die maligne Transformation auslösende Ereignis bereits eingetreten ist, die aber noch nicht die histologischen Kriterien eines Karzinoms erfüllen, weil weder Kapseldurchbruch noch Gefäßeinbruch erfolgt sind. Somit könnte die *PAX8-PPARG*-Fusion in einem Tumor auftreten, der zwar histologisch als Adenom klassifiziert werden muß, der sich auf molekularer Ebene aber bereits zu einem Karzinom entwickelt hat („präkanzeröse“ oder „prä maligne“ Läsion). Unabhängig von den Ursachen, die zu divergierenden Häufigkeiten der Fusion in Adenomen führen, bleibt festzuhal-

ten, daß die an einer vergleichsweise großen Serie durchgeführten Untersuchungen darauf hindeuten, daß die *PAX8-PPARG*-Fusion nur sehr selten in Adenomen der Schilddrüse anzutreffen ist.

Ziel der nächsten Publikation zum Thema *PAX8-PPARG*-Fusion war die Ermittlung der Häufigkeit in Schilddrüsenkarzinomen. In nahezu allen zuvor veröffentlichten, RT-PCR-basierten Studien wurden frische oder kryokonservierte Gewebeproben von Tumoren verwendet, was wegen der Seltenheit insbesondere follikulärer Karzinome hier nicht in Frage kam. Das Bremer Krebsregister (abrufbar unter www.krebsregister.bremen.de) gibt für die Jahre 2000 bis 2009 insgesamt 51.130 bösartige Neuerkrankungen im Land Bremen an, davon handelt es sich aber in nur 302 Fällen um Karzinome der Schilddrüse, was einem prozentualen Anteil von 0,6 % entspricht. Berücksichtigt man außerdem, daß es sich in den meisten Fällen um papilläre Karzinome handelt und zudem die Diagnose eines follikulären Karzinoms in der Regel erst postoperativ als gesichert gelten kann, dann wird deutlich, daß aussagekräftige Fallzahlen kaum erreicht werden können, wenn man sich darauf beschränkt, frische oder kryokonservierte Gewebeproben zu verwenden. Im Jahr 2010 wurde eine RT-PCR vorgestellt, die auch an formalinfixierten Geweben durchgeführt werden kann. Die Primer waren so gewählt worden, daß sie Amplikons geringer Länge erzeugen, so daß auch die degradierte RNA formalinfixierter Gewebe verwendet werden kann. Allerdings wurden fluoreszenzmarkierte Primer verwendet, die in der sich an die PCR anschließenden Kapillarelektrophorese detektiert wurden (Algeciras-Schimmich et al., 2010). Es stellte sich daraufhin die Frage, ob vergleichbare Ergebnisse auch ohne diese Technik erzielt werden können. Daher wurden die Sequenzen der Primer übernommen, auf eine Fluoreszenzmarkierung wurde aber verzichtet, da die PCR-Produkte in einem herkömmlichen Agarosegel aufgetrennt und anschließend sequenziert werden sollten. Außerdem wurde ein Primer ergänzt, da mit den beschriebenen Primern nicht alle bekannten Fusionstranskripte detektiert werden können. Das zusätzliche Transkript beinhaltet allerdings ein vorzeitiges Stopkodon, so daß statt eines Fusionsproteins ein trunkiertes PAX8-Protein daraus resultiert. Die prinzipielle Eignung der herkömmlichen RT-PCR zum Nachweis der Fusionstranskripte wurde durch die Verwendung von RNA aus zwei Adenomen mit bereits in der vorherigen Arbeit nachgewiesenen Genfusion (Klemke et al., 2011) bestätigt. Im Anschluß wurde die RT-PCR an formalinfixierten Gewebeproben von 21 follikulären Karzinomen und sieben follikulären Varianten papillärer Karzinome durchgeführt. In letzteren konnten keine Fusionstranskripte nachgewiesen werden, was gut mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt, da nur äußerst selten von der *PAX8-PPARG*-Fusion in FVPTCs berichtet wurde. In zwei der 21 FTCs lieferte die PCR ein positives Resultat, was einem prozentualen Anteil von 9,5 % entspricht (Klemke et al., 2012), der damit deutlich von dem mit 62,5 % relativ hohen Anteil der Erstbeschreibung abweicht. Als Marker für follikuläre Karzinome scheint diese Genfusion daher

kaum geeignet zu sein, denn obwohl die Spezifität wie in der Untersuchung der 192 Adenome gezeigt wurde relativ hoch sein dürfte, ist die Sensitivität mit nur knapp 10 % zu gering, als daß von einem hilfreichen Marker die Rede sein könnte. Die nach Entdeckung der Fusionstranskripte gehegte Hoffnung auf einen molekularen Marker, der die Diagnose insbesondere follikulärer Neoplasien unterstützen kann, erfüllt die Genfusion somit nicht. Eine andere Bewertung könnte sich allenfalls ergeben, wenn sich zeigen ließe, daß die *PAX8-PPARG*-Fusion in einer Untergruppe follikulärer Karzinome das die maligne Transformation auslösende Ereignis oder zumindest eine charakteristische Eigenschaft ist. Eine Kombination mit Markern, die spezifisch die Gruppe der FTCs ohne diese Genfusion kennzeichnen, könnte dann das diagnostische Interesse an der *PAX8-PPARG*-Fusion gegebenenfalls wieder steigern. In der Untersuchung der 21 FTCs fiel außerdem auf, daß ein der RT-PCR zufolge fusionspositiver Tumor nach dem Ergebnis der FISH als negativ klassifiziert worden wäre, da der Anteil der Nuklei mit *PPARG*-Rearrangierung mit nur einem Prozent unterhalb der Detektionsgrenze lag. Diese Feststellung stützt die bereits nach der Untersuchung der Adenome aufgestellte Hypothese, daß unterschiedliche Untersuchungsmethoden diskrepante Ergebnisse generieren. Insgesamt fällt jedoch auf, daß die Häufigkeit der Genfusion auch in den follikulären Karzinomen mit 9,5 % im Vergleich zu den in anderen Publikationen dargestellten Ergebnissen verhältnismäßig gering ist. Faßt man 16 Veröffentlichungen zusammen, in denen die Fusionstranskripte mittels RT-PCR nachgewiesen wurden, liegt die Häufigkeit positiver FTCs bei rund 36 % (88 von 245 FTCs; Tabelle 1 aus Klemke et al., 2011). Die Gründe für den niedrigen Anteil fusionspositiver Karzinome in der eigenen Untersuchung bleiben unklar. In Anbetracht des mit 21 Fällen relativ geringen Probenumfangs können statistische Ursachen nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise existieren aber auch Unterschiede in der geographischen Verteilung, wie bereits von Chia et al. (2010) diskutiert. In einer Arbeit, in der die mittels RT-PCR ermittelte Häufigkeit der Fusion in follikulären Karzinomen bei nur 10,5 % (2/19 FTCs) lag (Aldred et al., 2003), wurden ausschließlich aus einem deutschen Krankenhaus stammende Gewebeproben verwendet. Zusammen mit der vorliegenden Untersuchung, in der ebenfalls alle verwendeten Tumoren von Patienten aus Deutschland stammten, könnte dies darauf hindeuten, daß die Genfusion zumindest in Deutschland seltener in follikulären Karzinomen auftritt als in anderen Regionen. Zur Verifizierung dieser Vermutung wären allerdings umfangreichere Untersuchungen erforderlich. Auch im Rahmen einer FISH-basierten Arbeit wurde die Rearrangierung ebenfalls in einer vergleichsweise geringen Häufigkeit von 12 % in FTCs nachgewiesen (Boos et al., 2013). Leider wird darin aber nicht angegeben, aus welcher Region die verwendeten Proben stammen. Die Zugehörigkeit der Autoren kann lediglich nahelegen, daß es sich um Gewebeproben aus der Schweiz handelt, womit ein weiterer Hinweis auf eine in dieser Region generell geringere Häufigkeit der Genfusion in FTCs gegeben wäre. Obwohl die

Ursachen für stark unterschiedliche Häufigkeiten der *PAX8-PPARG*-Fusion nicht abschließend aufgeklärt werden konnten, vereinfacht die hier etablierte RT-PCR zukünftige diesbezügliche Untersuchungen, da durch sie auch fixierte und archivierte Gewebeproben follikulärer Karzinome als mögliches Untersuchungsobjekt erschlossen wurden, was wegen der im Vergleich zu Frischgewebe deutlich besseren Verfügbarkeit selbst seltener Tumorentitäten besonders attraktiv ist.

4.4 Identifizierung eines in *HMGA2* lokalisierten, intronischen miRNA-Gens durch Sequenzvergleiche

Die ursprüngliche Annahme, miRNA-kodierende Gene seien überwiegend in nicht-kodierenden Transkriptionseinheiten lokalisiert, mußte revidiert werden, nachdem immer mehr miRNA-Gene in den Introns proteinkodierender Gene lokalisiert wurden (Kim und Kim, 2007). Ein solches intronisches miRNA-Gen wurde auch im dritten Intron des murinen *Hmga2*-Gens identifiziert und die daraus hervorgehende reife miRNA konnte experimentell nachgewiesen werden (Berezikov et al., 2006). Vergleicht man die Sequenzen dieses *HMGA2*-Introns verschiedener Mammalia miteinander, fällt auf, daß der dem murinen miR-763-Gen homologe Bereich vieler Säuger hochkonserviert ist, wohingegen die Sequenz nicht-kodierender Abschnitte des Introns erwartungsgemäß variabel ist. Die humane Sequenz könnte ebenso wie bei der Maus die für primäre miRNA-Transkripte typische Haarnadelstruktur ausbilden. Diese Ähnlichkeiten legten die Vermutung nahe, daß im humanen *HMGA2* ein intronisches Gen lokalisiert sein könnte, das für eine homologe miRNA kodiert (von Ahnen et al., 2008). Eine andere Arbeitsgruppe identifizierte ebenfalls die potentielle miRNA im humanen *HMGA2* aufgrund ihrer *in silico*-Analysen, und fand darüber hinaus eine potentielle Bindestelle in der *HMGA2* 3'-UTR. Daraufhin wurde spekuliert, daß zwischen der miRNA und ihrem Wirtsgen *HMGA2* eine negative Rückkoppelung bestehen könnte (Artzi et al., 2008). Aufgrund dieser Vermutungen wurden im Rahmen dieser Arbeit Versuche unternommen, die reife, humane miRNA mittels einer RT-PCR nachzuweisen. Dazu wurden vor allem Gewebeproben verwendet, die bekanntermaßen eine starke *HMGA2*-Expression aufweisen, da angenommen wurde, daß sowohl die *HMGA2*-kodierende mRNA als auch die Vorläufer-miRNA aus einem gemeinsamen Transkript entstehen könnten. Die Regulation der potentiellen Zielgene der miRNA könnte somit mit einer starken *HMGA2*-Expression korrelieren, obwohl *HMGA2* nicht direkt involviert ist. Ein experimenteller Nachweis der Existenz einer homologen humanen miR-763 gelang trotz dieser Bemühungen bislang jedoch nicht, wofür verschiedene Ursachen in Frage kommen. Zum einen ist vorstellbar, daß die miRNA unabhängig von ihrem Wirtsgen exprimiert wird und sie deshalb in Zellen zu finden wäre, die *HMGA2* nicht oder kaum exprimieren. Zum anderen liegen keine Hinweise auf bestimmte Gewebe- oder Zelltypen vor, in denen die Existenz der reifen miRNA besonders wahrschein-

lich ist. Deshalb wäre es möglich, daß die humane miR-763 nur in speziellen, bisher nicht untersuchten Zelltypen vorkommt und zudem auf bestimmte Entwicklungsstadien beschränkt ist. Daneben spielen aber auch methodische Aspekte eine Rolle. Für die miRNA-spezifische cDNA-Synthese wurde ein Stem-Loop-Primer verwendet, dessen 3'-Überhang ausgehend von der reifen, murinen miRNA erstellt wurde. Eine erfolgreiche cDNA-Synthese erfordert, daß das 3'-Ende der reifen miRNA lückenlos an diesen Überhang binden kann. Voraussetzung dafür ist aber, daß sich die 3'-Enden der murinen und humanen miRNA nicht unterscheiden. Unklar ist jedoch, ob die Schnittstellen in den miRNA-Vorläufern exakt übereinstimmen. Schon eine Verschiebung um ein Nukleotid kann dazu führen, daß die reife miRNA mit dem gewählten Primer nicht mehr revers transkribiert werden kann. Es bleibt festzuhalten, daß die Existenz eines miRNA-kodierenden Gens im dritten Intron des *HMGA2*-Gens aufgrund der Ähnlichkeit zwischen muriner und humaner Sequenz zwar angenommen werden kann, aufgrund eines bislang fehlenden experimentellen Nachweises aber nicht gesichert und daher weiterhin als hypothetisch anzusehen ist.

4.5 Wechselwirkungen zwischen *HMGA2* und *PLAG1*

Nach Erscheinen der Publikation zur Überexpression von *HMGA2* in Malignomen der Schilddrüse (Belge et al., 2008) nahmen sich einige andere Arbeitsgruppen dieser Thematik an. Kurze Zeit später wurde eine Untersuchung unter Anwendung von Microarrays veröffentlicht, nach deren Ergebnissen *HMGA2* das in malignen Schilddrüsentumoren am stärksten überexprimierte Gen war (Prasad et al., 2008). Zu weiteren stark überexprimierten Genen gehörte *PLAG1*, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert, dessen Locus in pleomorphen Speicheldrüsenadenomen häufig von chromosomalen Rearrangierungen betroffen ist (Sandros et al., 1990; Bullerdiek et al., 1989; Bullerdiek et al., 1993). Eine chromosomale Translokation t(3;8)(p21;q12) führt zu einem Austausch der Promotoren zwischen *PLAG1* und *CTNNB1*, was in einer konstitutiven *PLAG1*-Expression resultiert (Kas et al., 1997). Auch intrachromosomale Rearrangierungen können zu einem Promotoraustausch führen (Asp et al., 2006), und selbst ohne eine Veränderung der Bande 8q12 kann *PLAG1* in pleomorphen Speicheldrüsenadenomen verstärkt exprimiert werden, wenn stattdessen ein rearrangierter *HMGA2*-Locus vorliegt (Åström et al., 1999). Dementsprechend wurde auch eine simultane Expression beider Gene festgestellt (Enlund et al., 2002). Eine Gruppe myoepithelialer Tumoren, die pleomorphen Adenomen sehr ähnlich sind, wurde kürzlich daraufhin untersucht, ob in ihnen ebenfalls die *HMGA2*- und *PLAG1*-Loci von rekurrenten chromosomalen Aberrationen betroffen sind. Die Untersuchung ergab, daß eine genetische Verbindung zu pleomorphen Adenomen zwar in Form *PLAG1* betreffender Rearrangierungen vorhanden ist, Veränderungen des *HMGA2*-Locus wurden dagegen nicht identifiziert (Antonescu et al., 2013). Interessanterweise sind beide Gene aber in die Genese von lipomatösen Tumoren involviert. Trans-

lokationen unter Beteiligung der chromosomalen Bande 8q12 treten als rekurrente Aberration in Lipoblastomen auf, an deren Entstehung eine *PLAG1*-Aktivierung maßgeblich beteiligt ist (Hibbard et al., 2000; Gisselsson et al., 2001; Röpke et al., 2007; Bartuma et al., 2008). Dagegen ist *HMGA2* häufig von chromosomalen Aberrationen in Lipomen betroffen (Nielsen und Mandahl, 2002; Mandahl und Mertens, 2010). Es stellte sich daher die Frage, ob Störungen in Form transkriptioneller Aktivierung eines der beiden Gene zu ähnlichen Tumoren führen und *HMGA2* und *PLAG1* als alternative Auslöser der Tumorentstehung angesehen werden können. Dies könnte vor allem dann zutreffen, falls beide Gene Teil einer gemeinsamen Signalkaskade wären. Die starke Überexpression von *HMGA2* und *PLAG1* in Karzinomen der Schilddrüse (Prasad et al., 2008), für die weder 8q12 noch 12q14~15 betreffende Aberrationen beschrieben sind, lieferte einen zusätzlichen Hinweis auf ein mögliches Zusammenwirken. Zur Klärung der Frage, ob ein der Situation in pleomorphen Speicheldrüsenadenomen und in Lipomen bzw. Lipoblastomen vergleichbarer Zusammenhang auch in der Schilddrüse besteht, wurden die *HMGA2*- und *PLAG1*-Expressionen in Schilddrüsentumoren gleichzeitig quantifiziert. Aus diesen Messungen ergab sich eine deutliche Korrelation, da eine verstärkte *HMGA2*-Expression in Karzinomen der Schilddrüse mit einer *PLAG1*-Aktivierung einherging. Dagegen wurde bei niedriger *HMGA2*-Expression in keinem Fall eine verstärkte *PLAG1*-Expression festgestellt (Klemke et al., 2014). Somit ergab sich ein weiterer Anhaltspunkt für einen regulatorischen Zusammenhang zwischen *HMGA2* und *PLAG1*. Gestützt wurde diese Annahme des weiteren durch die Feststellung, daß auch Uterus-Leiomyome mit starker *HMGA2*-Expression, bedingt durch chromosomale Aberrationen der Region 12q14~15, eine sehr starke *PLAG1*-Expression aufweisen. Zwar trat eine erhöhte *PLAG1*-Expression in seltenen Fällen auch bei geringer *HMGA2*-Expression auf, was auf *HMGA2*-unabhängige Mechanismen der *PLAG1*-Aktivierung wie beispielsweise intrachromosomale Rearrangierungen hindeutet. Der umgekehrte Fall wurde jedoch nicht beobachtet: alle Myome mit hoher *HMGA2*-Expression wiesen auch eine *PLAG1*-Überexpression auf, so daß diese Resultate mit einer *HMGA2* nachgeschalteten Position von *PLAG1* im selben Signaltransduktionsweg vereinbar sind (Klemke et al., 2014). Daraufhin wurde die *HMGA2*-Expression in adipösen mesenchymalen Stammzellen durch Zugabe des Proteins FGF1 stimuliert, woraufhin eine simultane Steigerung der *PLAG1*-Expression beobachtet werden konnte. Auch dieses Ergebnis stützt die Vermutung einer *PLAG1*-aktivierenden Wirkung von *HMGA2*. Um einen *HMGA2*-unabhängigen Effekt des FGF1-Proteins auszuschließen, wurden zusätzlich Zellen der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 transient mit einem *HMGA2*-kodierenden Vektor transfiziert. Die relative Quantifizierung ergab, daß die auf diese Weise herbeigeführte *HMGA2*-Expression ausreicht, um auch die *PLAG1*-Expression zu verstärken. Ebenso wie das bekanntermaßen von *HMGA2* regulierte, als Positivkontrolle dienende *IGF2BP2*, exprimierten die mit dem *HMGA2*-kodierenden Vektor transfizierten Zellen auch

vermehrt *PLAG1* (Klemke et al., 2014). Ob die *PLAG1*-aktivierende Wirkung von HMGA2 auf einer direkten Interaktion beruht, ist derzeit nicht zweifelsfrei geklärt. Sequenzanalysen ergaben, daß *PLAG1* nach den Kriterien von Cui und Leng (2007) eine potentielle Bindestelle für HMGA2 beinhaltet, ein experimenteller Nachweis für diese Bindung existiert jedoch noch nicht. Mit Hilfe der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) könnte aufgeklärt werden, ob HMGA2 in diesem Bereich oder in der Promotorregion von *PLAG1* bindet. Derzeit ist auch vorstellbar, daß die *PLAG1*-Aktivierung nicht direkt sondern über Zwischenstufen erfolgt. Ungeachtet dessen ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse anzunehmen, daß *HMGA2* und *PLAG1* mit hoher Wahrscheinlichkeit Teile einer gemeinsamen Signalkaskade sind, in der sich *PLAG1* an einer *HMGA2* nachgeschalteten Position befindet. Hierfür sprechen nicht nur die Beobachtungen, daß in Schilddrüsenkarzinomen einerseits und in Uterus-Leiomyomen andererseits eine *HMGA2*-Überexpression in aller Regel von einer starken *PLAG1*-Aktivität begleitet wird, sondern auch die gesteigerte *PLAG1*-Expression in adipösen mesenchymalen Stammzellen nach Stimulation von *HMGA2* durch FGF1. Insbesondere die Erkenntnis, daß allein die ektopische Expression von *HMGA2* ausreicht, um *PLAG1* zu stimulieren, bekräftigt diese Hypothese. HMGA2 entfaltet seine genregulatorische Wirkung oft im Zusammenspiel mit anderen Proteinen. So kooperiert es beispielsweise bei der transkriptionellen Aktivierung von *IFNB1* (Mantovani et al., 1998; Noro et al., 2003) und *IGF2BP2* mit NF- κ B (Brants et al., 2004; Cleynen et al., 2007). Daher wäre es denkbar, daß eine Verstärkung der *PLAG1*-aktivierenden Wirkung erzielt werden könnte, wenn gleichzeitig Kofaktoren stimuliert werden. Dies wäre aber keine essentielle sondern eine optionale Vorgehensweise, da am Beispiel der Positivkontrolle *IGF2BP2* gezeigt werden konnte, daß eine simultane Einflußnahme auf den Kofaktor NF- κ B keine Voraussetzung für die Wirksamkeit von HMGA2 ist. Insgesamt deuten die Ergebnisse aller Untersuchungen sehr deutlich darauf hin, daß *PLAG1* von HMGA2 reguliert wird. Die Aktivierung desselben Signaltransduktionsweges könnte erklären, warum chromosomale Rearrangierungen einer der beiden Loci zu morphologisch so ähnlichen Tumoren wie Lipoblastomen und Lipomen führen können.

4.6 Resümee

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führten zu neuen Erkenntnissen über den Zusammenhang zwischen *HMGA*-Genen und Uterus-Leiomyomen. Zum einen konnte gezeigt werden, daß chromosomale Aberrationen der Bande 6p21 einen Einfluß auf die Expression von *HMGA1* ausüben. Zum anderen wurde festgestellt, daß *HMGA2* nicht nur in Leiomyomen mit Rearrangierungen der chromosomalen Region 12q14~15 überexprimiert wird. Da es auch in Tumoren mit zytogenetisch normalem Karyotyp stärker als in tumorfreiem Myometrium exprimiert wird, besteht die Möglichkeit, daß *HMGA2* nicht nur in einer zytogenetischen Gruppe sondern in der Mehrheit aller Uterus-Leiomyome einen Faktor darstellt, der maßgeblich an ihrer Entstehung beteiligt ist. In zukünftigen Untersuchungen wäre gegebenenfalls auch zu überprüfen, ob *HMGA2* sogar für therapeutische Zwecke nutzbar sein könnte. Von besonderem Interesse ist die Frage, ob das Wachstum oder sogar die Bildung von Uterus-Leiomyomen durch expressionsinhibierende Maßnahmen wie beispielsweise siRNAs oder unter Anwendung von gegen *HMGA2* gerichteten Antikörpern unterbunden werden kann. Zur weiteren Aufklärung der genetischen Ursachen dieser benignen mesenchymalen Tumoren und der Rolle der *HMGA*-Gene sollten zukünftige Untersuchungen sich nicht nur auf Tumoren beschränken, in denen die Loci von *HMGA1* oder *HMGA2* von strukturellen Veränderungen betroffen sind.

Im Hinblick auf Tumoren der Schilddrüse stehen weniger therapeutische, sondern vielmehr diagnostische und prognostische Aspekte im Vordergrund. Die hier vorgestellten Ergebnisse machen *HMGA2* auch in Verbindung mit nachfolgenden Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen zu einem vielversprechenden, potentiellen Marker für Schilddrüsenkarzinome. Insbesondere follikuläre Schilddrüsenkarzinome müssen vertieft untersucht werden. Dabei sind zytologische Präparate aus Feinnadelbiopsien vorzuziehen, da sich eine Quantifizierung der Genexpression an diesen Präparaten leichter in klinische Abläufe integrieren ließe.

Der diagnostische Nutzen der *PAX8-PPARG*-Genfusion dürfte dagegen vergleichsweise gering sein, da sie in einem Großteil der follikulären Karzinome nicht nachweisbar ist. Dessen ungeachtet bietet die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte RT-PCR die Möglichkeit, auch archivierte Gewebeproben in retrospektiven Studien diesbezüglich zu screenen. Damit kann die Anzahl untersuchter Gewebeproben aller relevanten Tumoren gesteigert werden, womit aufgeklärt werden könnte, warum bislang zum Teil stark divergierende Frequenzen der Genfusion ermittelt wurden. Dies gilt nicht nur für follikuläre Karzinome, sondern insbesondere auch für Adenome der Schilddrüse. Daraus könnte sich schließlich die Möglichkeit eröffnen, die für unterschiedliche Häufigkeiten verantwortlichen Faktoren wie beispielsweise geographische Gegebenheiten oder die ethnische Herkunft aufzuklären und somit das Verständnis der Zusammenhänge zwischen der *PAX8-PPARG*-Fusion und Tumoren der Schilddrüse zu erweitern.

Die hier präsentierten Analysen hinsichtlich der Expression von *HMGA2* und *PLAG1* sowohl in Schilddrüsentumoren als auch in Uterus-Leiomyomen zeigen eine deutliche Korrelation an. Gestützt durch die an Zellkulturen durchgeführten Experimente deuten diese Resultate darauf hin, daß auch *PLAG1* zu den Zielgenen von *HMGA2* gerechnet werden muß. Es bleibt abzuklären, über welchen Mechanismus *HMGA2* einen Einfluß auf *PLAG1* ausübt und ob eine Bindung des *HMGA2*-Proteins an regulatorische Elemente des *PLAG1*-Gens stattfindet. Im Rahmen von *in silico*-Analysen konnte eine potentielle *HMGA2*-Bindestelle in einem *PLAG1*-Exon identifiziert werden. Da ein Nachweis für eine direkte Wechselwirkung bislang nicht erbracht wurde, ist auch eine indirekte Einflußnahme unter Beteiligung weiterer Faktoren vorstellbar. Die Kenntnis der molekularen Interaktion zwischen *HMGA2* und *PLAG1* kann von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Tumorentstehung sein, die sich nicht nur auf die in dieser Arbeit untersuchten Tumorentitäten beschränken muß. Möglicherweise wäre sie auf ein breites Spektrum verschiedener Arten von Tumoren übertragbar.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl Leiomyome des Uterus die häufigsten gynäkologischen Tumoren darstellen, sind die für ihre Entstehung verantwortlichen Auslöser weitgehend unbekannt. Die chromosomale Region 12q14~15 ist in Myomen am häufigsten von rekurrenten Aberrationen betroffen. In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, daß diese zytogenetische Gruppe eine besonders starke Expression des *HMGA2*-Gens aufweist. Mit einer qRT-PCR, die zwischen trunkierten und vollständigen Transkripten diskriminieren kann, konnte gezeigt werden, daß in der Mehrheit der untersuchten Myome trotz einer 12q14~15-Rearrangierung vollständige Transkripte detektierbar sind. Folglich kann ein Verlust von Bindestellen für miRNAs der let-7-Familie in der 3'-UTR als generelle Ursache der *HMGA2*-Reaktivierung in dieser zytogenetischen Gruppe ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, daß Leiomyome ohne zytogenetisch erkennbare Aberration im Bereich 12q14~15 eine höhere *HMGA2*-Expression aufweisen als Myometrium derselben Patientinnen, so daß eine pathogenetische Relevanz von *HMGA2* auch in Myomen mit unverändertem Karyotyp denkbar geworden ist. Weitaus seltener ist die chromosomale Bande 6p21 von chromosomalen Rearrangierungen betroffen. Zu Auswirkungen auf das in dieser Bande lokalisierte, eng mit *HMGA2* verwandte *HMGA1* lagen kaum Daten vor. Daher wurde seine Expression unter Verwendung einer qRT-PCR quantifiziert und festgestellt, daß Myome mit Aberrationen der Bande 6p21 verstärkt *HMGA1* exprimieren. In Anbetracht der Ähnlichkeit der HMGA-Proteine ist es vorstellbar, daß chromosomale Aberrationen ihrer Loci alternative Auslöser der Myombildung darstellen.

In vielen malignen Tumoren epithelialen Ursprungs findet ebenfalls eine Reaktivierung des *HMGA2*-Gens statt. Ein zweiter Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt deshalb auf Tumoren der Schilddrüse, bei denen ein großer Bedarf an molekularen Markern zur Unterstützung der bisher verfügbaren diagnostischen Verfahren besteht. Während viele Tumorentitäten bereits präoperativ nach Feinnadelpunktionen mit großer Sicherheit erkannt werden können, stellen insbesondere follikuläre Neoplasien eine diagnostische Herausforderung dar, da follikuläre Karzinome aufgrund identischer Zellmorphologie anhand zytologischer Präparate nicht von Adenomen abgegrenzt werden können. Bereits die im Rahmen einer Diplomarbeit erlangten Ergebnisse deuteten darauf hin, daß sich auch Karzinome der Schilddrüse durch eine sehr starke *HMGA2*-Expression auszeichnen. In Fortführung dieser ersten Untersuchung wurde das *HMGA2*-Protein immunhistochemisch in Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen. Außerdem wurden weitere follikuläre Karzinome untersucht. Dabei zeigte sich, daß diese diagnostisch besonders problematische Tumorentität zwar häufig aber nicht ausnahmslos eine erhöhte *HMGA2*-Expression aufweist. Somit wäre die Erfassung ergänzender Charakteristika hilfreich, um follikuläre Neoplasien sicher zu klassifizieren und follikuläre Karzinome mit höherer Sensitivität zu detektieren.

Obwohl die Translokation t(2;3)(q13;p25) zuerst in Adenomen der Schilddrüse beschrieben wurde, entdeckte man die resultierende Fusion der Gene *PAX8* und *PPARG* in follikulären Karzinomen. Zunächst wurde sie als potentieller Marker für follikuläre Karzinome diskutiert. Nachfolgende Untersuchungen ergaben jedoch, daß diese Genfusion auch in Adenomen auftritt, allerdings divergieren die angegebenen Häufigkeiten stark. Die Untersuchung einer umfangreichen Serie von Adenomen mittels konventioneller Zytogenetik sowie einer RT-PCR ergab, daß die Translokation bzw. Genfusion zwar nur selten in Adenomen auftritt, bestätigte aber gleichzeitig, daß es sich nicht um karzinomspezifische Ereignisse handelt. Untersuchungen zur Häufigkeit der Genfusion in follikulären Karzinomen werden durch die geringe Inzidenz dieser Tumorentität erschwert. Daher wurde eine RT-PCR etabliert, die alle bekannten *PAX8-PPARG*-Fusionstranskripte erfaßt und die außerdem auf archivierte, formalinfixierte Gewebeproben anwendbar ist. Somit werden umfangreiche Untersuchungen auch seltener Tumorentitäten ermöglicht. Mit dieser PCR konnte die Genfusion in 9,5 % aller untersuchten follikulären Karzinome nachgewiesen werden. Dieser Anteil ist verglichen mit vielen zuvor publizierten Daten deutlich geringer.

Ein neben *HMGA2* in Schilddrüsenkarzinomen stark exprimiertes Gen ist einer Microarray-basierten Studie zufolge *PLAG1*. Dieses Gen wird in pleomorphen Speicheldrüsenadenomen mit chromosomalen Aberrationen, die entweder seinen eigenen Locus 8q12 oder den *HMGA2*-Locus betreffen, überexprimiert. In Verbindung mit Microarray-Daten von Schilddrüsentumoren ergab sich die Frage, ob ein tumorunabhängiger Zusammenhang zwischen beiden Genen besteht. Eine parallele, relative Quantifizierung der *HMGA2*- und *PLAG1*-Expression ergab, daß die Expression beider Gene in Schilddrüsenkarzinomen eng miteinander korreliert. Auch in Uterus-Leiomyomen, die in Abhängigkeit von der Präsenz einer 12q14~15-Aberration große Unterschiede in der Stärke der *HMGA2*-Expression aufweisen, ging eine Reaktivierung von *HMGA2* stets mit einer erhöhten *PLAG1*-Expression einher. In Zellkulturversuchen konnte zudem gezeigt werden, daß eine Steigerung der *HMGA2*-Expression sowohl durch Stimulation mit einem Wachstumsfaktor als auch durch transiente Transfektion mit einem *HMGA2*-Expressionsvektor zu einer Erhöhung der *PLAG1*-Expression führt, was als Indiz dafür gedeutet wird, daß *PLAG1* sich in einer gemeinsamen Signalkaskade mit *HMGA2* befindet und daß zudem *HMGA2* einen positiv regulatorischen Effekt auf *PLAG1* ausübt.

Insgesamt konnte aufgezeigt werden, daß das *HMGA2*-Gen nicht nur in einer zytogenetischen Gruppe der Uterus-Leiomyome von pathogenetischer Relevanz ist, sondern generell an der Entstehung dieser benignen, mesenchymalen Tumoren beteiligt sein kann. Darüber hinaus müssen nun auch Karzinome der Schilddrüse zu denjenigen malignen, epithelialen Tumoren gezählt werden, in denen häufig eine Reaktivierung von *HMGA2* stattfindet, woraus sich eine mögliche Nutzung seiner Expression für diagnostische Zwecke ableitet.

6 SUMMARY

Leiomyomas of the uterus are the most frequent gynecological tumours. Nevertheless, their pathogenesis remains largely unknown. Chromosomal rearrangements affecting the region 12q14~15 belong to the most frequent recurrent chromosomal aberrations. A strong overexpression of *HMGA2* in this group was confirmed in the present thesis. To evaluate whether or not the loss of miRNA binding sites in the mRNA accounts for this observation, a qRT-PCR was established, which discriminates between truncated and full-length transcripts. Despite a rearranged *HMGA2* locus, full-length mRNAs were detectable in most leiomyomas. Thus, truncated transcripts due to intragenic breakpoints cannot account for the reactivation of *HMGA2* in leiomyomas of the 12q14~15 group in general. Moreover, fibroids without cytogenetically detectable 12q14~15 aberration were found to express *HMGA2* at higher rates than the corresponding myometrium. Therefore, *HMGA2* may also be of pathogenetic relevance in fibroids without chromosomal abnormalities affecting 12q14~15 and could possibly play a crucial role in a much larger fraction of uterine leiomyomas than previously assumed. A smaller cytogenetic subgroup harbours aberrations of the chromosomal band 6p21, in which *HMGA1* is located. Despite the similarity between *HMGA2* and *HMGA1* the effect of 6p21 aberrations upon the expression of *HMGA1* in leiomyomas has not been investigated previously. In a series of leiomyomas harbouring chromosome 6 abnormalities, qRT-PCR revealed a significantly increased *HMGA1* expression. Because the proteins encoded by both *HMGA* genes are very similar, overexpression of either *HMGA1* or *HMGA2* may have similar effects. Chromosomal translocations affecting the loci of either gene may thus be alternative events in the tumourigenesis of leiomyomas that lead to an identical outcome.

Besides benign mesenchymal tumours, several malignant tumours of epithelial origin also exhibit a reactivation of *HMGA2*. Herein, a second main focus was laid on tumours of the thyroid gland, since they have not been investigated extensively with respect to *HMGA2*. Although many of them can accurately be classified presurgically by fine-needle aspiration biopsies, some entities represent a diagnostic challenge. Because the cell morphology of adenomas and follicular carcinomas is identical, it is virtually impossible to discriminate follicular neoplasias by cytology alone. Based on preliminary results presented in a diploma thesis, the *HMGA2* expression of thyroid tumours was further investigated. It was shown that *HMGA2* is strongly expressed in thyroid carcinomas of follicular origin by qRT-PCR as well as by immunohistochemistry. The analysis of additional cases revealed that although a reactivation of the gene occurs frequently, a fraction of FTCs cannot be detected by means of *HMGA2* expression. Nevertheless, the current results suggest that *HMGA2* has the potential to serve as a marker in the diagnosis of thyroid tumours. To increase the sensitivity of a test for malignancy, the incorporation of additional tumour characteristics will be beneficial.

The chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) was initially discovered in thyroid adenomas. When the resulting fusion of the genes *PAX8* and *PPARG* fusion was discovered in follicular thyroid carcinomas, it was regarded as an event that is specific for this entity. However, it has been detected in adenomas as well. Due to diverging frequencies in different reports, a comprehensive cohort of adenomas was analysed by conventional cytogenetics. The presence of *PAX8-PPARG* fusion transcripts was confirmed in translocation-positive cases using an RT-PCR. Although the occurrence of the gene fusion in adenomas was confirmed, it seems to be a rare event. Because the incidence of follicular carcinomas is low, a conventional RT-PCR capable of detecting all known variants of fusion transcripts also in formalin-fixed tissues was established. It revealed that only 9.5 % of all tested FTCs harbour the *PAX8-PPARG* fusion. A major advantage of this approach is that archived tumour material can be screened. Thus, even rare tumour entities such as follicular thyroid carcinomas can be analysed in larger quantities as an important prerequisite for a more precise determination of the frequency of the gene fusion.

According to a microarray-based approach, *PLAG1* is among the most upregulated genes in thyroid carcinomas besides *HMGA2*. This gene is activated in pleomorphic adenomas of the salivary glands harbouring rearrangements of the chromosomal band 8q12. Moreover, rearrangements affecting the *HMGA2* locus can also lead to an upregulation of *PLAG1* even in the absence of a rearranged *PLAG1* locus. Thus, the question arose if a general connection exists between both genes that is independent of the type of tumour. Therefore, the expression of both *HMGA2* and *PLAG1* was quantified in a series of thyroid tumours and found to be closely correlated. Subsequently, the investigation was extended to uterine leiomyomas revealing that a high *HMGA2* expression due to 12q14~15 rearrangements coincides with a strongly increased expression of *PLAG1*. An increased overexpression of *PLAG1* in leiomyomas was previously unknown. In cell culture experiments, the stimulation of *HMGA2* with a growth factor as well as the transient transfection with an *HMGA2* expression vector resulted in an increased *PLAG1* expression. Although the mechanism of interaction remains to be resolved, these findings strongly indicate that *HMGA2* and *PLAG1* act in the same signal transduction pathway and that *HMGA2* exerts an activating effect upon *PLAG1*.

In conclusion, it has been revealed that *HMGA2* is not only of pathogenetic relevance in uterine leiomyomas with chromosomal rearrangements affecting the region 12q14~15, but that it rather may play a crucial role in the tumourigenesis of these benign tumours in general. Furthermore, a reactivation of *HMGA2* has been confirmed in thyroid carcinomas of the follicular epithelium, which implies that the gene represents a promising molecular marker for diagnostic purposes in thyroid tumours.

7 PUBLIKATIONSÜBERSICHT

7.1 Begutachtete Artikel

Belge G, Meyer A, Klemke M, Burchardt K, Stern C, Wosniok W, Loeschke S, Bullerdiek J. 2008. Upregulation of *HMGA2* in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 56-63.

Klemke M, Meyer A, Nezhad MH, Bartnitzke S, Drieschner N, Frantzen C, Schmidt EH, Belge G, Bullerdiek J. 2009. Overexpression of *HMGA2* in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 171-178.

Von Ahsen I, Nimzyk R, Klemke M, Bullerdiek J. 2008. A microRNA encoded in a highly conserved part of the mammalian *HMGA2* gene. *Cancer Genet Cytogenet* 187: 43-44.

Sterenczak KA, Willenbrock S, Barann M, Klemke M, Soller JT, Eberle N, Nolte I, Bullerdiek J, Murua Escobar H. 2009. Cloning, characterisation, and comparative quantitative expression analyses of receptor for advanced glycation end products (*RAGE*) transcript forms. *Gene* 434: 35-42.

Klemke M, Meyer A, Hashemi Nezhad M, Belge G, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 2010. Loss of let-7 binding sites resulting from truncations of the 3' untranslated region of *HMGA2* mRNA in uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet* 196: 119-123.

Nezhad MH, Drieschner N, Helms S, Meyer A, Tadayyon M, Klemke M, Belge G, Bartnitzke S, Burchardt K, Frantzen C, Schmidt EH, Bullerdiek J. 2010. 6p21 rearrangements in uterine leiomyomas targeting *HMGA1*. *Cancer Genet Cytogenet* 203: 247-252.

Klemke M, Drieschner N, Laabs A, Rippe V, Belge G, Bullerdiek J, Sendt W. 2011. On the prevalence of the *PAX8-PPARG* fusion resulting from the chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) in adenomas of the thyroid. *Cancer Genet* 204: 334-339.

Klemke M, Drieschner N, Belge G, Burchardt K, Junker K, Bullerdiek J. 2012. Detection of *PAX8-PPARG* fusion transcripts in archival thyroid carcinoma samples by conventional RT-PCR. *Genes Chromosomes Cancer* 51: 402-408.

Müller MH, Drieschner N, Focken T, Bartnitzke S, Winter N, Klemke M, Bullerdiek J. 2013. *HMGA2* expression in the PC-3 prostate cancer cell line is autonomous of growth factor stimulation. *Anticancer Res* 33: 3069-3078.

Klemke M, Müller MH, Wosniok W, Markowski DN, Nimzyk R, Helmke BM, Bullerdiek J. 2014. Correlated expression of *HMGA2* and *PLAG1* in thyroid tumors, uterine leiomyomas and experimental models. *PLoS ONE* 9: e88126.

7.2 Posterpräsentationen

Belge G, Meyer A, Klemke M, Burchardt K, Stern C, Wosniok W, Loeschke S, Bullerdiek J. *HMGA2* as single marker for thyroid carcinomas (P3-9). DSPAC 's annual meeting 2008: Targeted cancer therapy - new possibilities and demands on pathology. Jahrestreffen der DSPAC, Danish Society of Pathological Anatomy and Clinical Cytology, 27. - 29. März 2008, Vejle, DK. Abstract: *APMIS (Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica)* 116: 245. (Präsentierender Autor: Dr. S. Loeschke.)

Klemke M, Belge G, Meyer A, Burchardt K, Stern C, Wosniok W, Loeschke S, Bullerdiek J. Overexpression of *HMGA2* in thyroid carcinomas as a novel molecular marker for preoperative discrimination of follicular neoplasias. 19. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 8. - 10. April 2008, Hannover Congress Centrum. Abstract: *Medizinische Genetik* 1/2008, P130.

Belge G, Meyer A, Klemke M, Burchardt K, Stern C, Wosniok W, Loeschke S, Bullerdiek J. *HMGA2* as single marker for thyroid carcinomas (P-64). Looking Towards the Future : 3rd Intercontinental Congress of Pathology, 18. - 22. Mai 2008, Barcelona, E. Abstract: *Virchows Arch* 452 (Suppl. 1): S73-S74. (Präsentierender Autor: Dr. S. Loeschke.)

Klemke M, Drieschner N, Laabs A, Sendt W, Rippe V, Bullerdiek J, Belge G. Chromosomale Translokationen t(2;3)(q13;p25) in follikulären Schilddrüsentumoren - eine Seltenheit in Adenomen? 11. Bremer Krebskongreß (Bremer Krebsgesellschaft e. V.), 18. - 19. November 2009, Congress Centrum Bremen.

Klemke M, Drieschner N, Laabs A, Rippe V, Belge G, Sendt W, Bullerdiek J. The detection of *PAX8/PPAR γ* fusion transcripts in follicular-patterned thyroid tumours. 22. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 16. - 18. März 2011, Universität Regensburg. Abstract: *Medizinische Genetik* 1/2011, P-CytoG-184.

Klemke M, Belge G, Sendt W, Bullerdiek J. The detection of *PAX8/PPAR γ* fusion transcripts in archival thyroid tumour samples by conventional RT-PCR. 54. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, 30. März - 2. April 2011, Congress Center Hamburg, Abstract PS1-08-6.

Klemke M, Drieschner N, Belge G, Burchardt K, Junker K, Bullerdiek J. Nachweis von *PAX8-PPARG*-Fusionstranskripten in FFPE-Gewebeproben von Schilddrüsentumoren. 12. Bremer Krebskongreß (Bremer Krebsgesellschaft e. V.), 8. - 9. November 2011, Swissôtel Bremen.

8 LITERATURVERZEICHNIS**A**

- Abe N, Watanabe T, Izumisato Y, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Chiappetta G, Fusco A, Fujioka Y, Atomi Y. 2002. Diagnostic significance of high mobility group I(Y) protein expression in intraductal papillary mucinous tumors of the pancreas. *Pancreas* 25: 198-204.
- Abe N, Watanabe T, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Uchimura H, Fujioka Y, Chiappetta G, Fusco A, Atomi Y. 2000. Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I(Y) proteins. *Cancer Res* 60: 3117-3122.
- Abe N, Watanabe T, Sugiyama M, Uchimura H, Chiappetta G, Fusco A, Atomi Y. 1999. Determination of high mobility group I(Y) expression level in colorectal neoplasias: a potential diagnostic marker. *Cancer Res* 59: 1169-1174.
- Adair JE, Kwon Y, Dement GA, Smerdon MJ, Reeves R. 2005. Inhibition of nucleotide excision repair by high mobility group protein HMGA1. *J Biol Chem* 280: 32184-32192.
- Adair JE, Maloney SC, Dement GA, Wertzler KJ, Smerdon MJ, Reeves R. 2007. High-mobility group A1 proteins inhibit expression of nucleotide excision repair factor xeroderma pigmentosum group A. *Cancer Res* 67: 6044-6052.
- Agaram NP, Laquaglia MP, Ustun B, Guo T, Wong GC, Socci ND, Maki RG, DeMatteo RP, Besmer P, Antonescu CR. 2008. Molecular characterization of pediatric gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* 14: 3204-3215.
- Aldred MA, Morrison C, Gimm O, Hoang-Vu C, Krause U, Dralle H, Jhiang S, Eng C. 2003. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is frequently downregulated in a diversity of sporadic nonmedullary thyroid carcinomas. *Oncogene* 22: 3412-3416.
- Algeciras-Schimmich A, Milosevic D, McIver B, Flynn H, Reddi HV, Eberhardt NL, Grebe SK. 2010. Evaluation of the PAX8/PPARG translocation in follicular thyroid cancer with a 4-color reverse-transcription PCR assay and automated high-resolution fragment analysis. *Clin Chem* 56: 391-398.
- Angel P, Karin M. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072: 129-157.
- Antonescu CR, Zhang L, Shao SY, Mosquera JM, Weinreb I, Katabi N, Fletcher CD. 2013. Frequent PLAG1 gene rearrangements in skin and soft tissue myoepithelioma with ductal differentiation. *Genes Chromosomes Cancer* 52: 675-682.
- Antonica F, Kasprzyk DF, Opitz R, Iacovino M, Liao XH, Dumitrescu AM, Refetoff S, Peremans K, Manto M, Kyba M, Costagliola S. 2012. Generation of functional thyroid from embryonic stem cells. *Nature* 491: 66-71.
- Arora N, Scognamiglio T, Zhu B, Fahey TJ 3rd. 2008. Do benign thyroid nodules have malignant potential? An evidence-based review. *World J Surg* 32: 1237-1246.
- Ashar HR, Cherath L, Przybysz KM, Chada K. 1996. Genomic characterization of human HMGIC, a member of the accessory transcription factor family found at translocation breakpoints in lipomas. *Genomics* 31: 207-214.
- Ashar HR, Fejzo MS, Tkachenko A, Zhou X, Fletcher JA, Weremowicz S, Morton CC, Chada K. 1995. Disruption of the architectural factor HMGI-C: DNA-binding AT hook motifs fused in lipomas to distinct transcriptional regulatory domains. *Cell* 82: 57-65.
- Asp J, Persson F, Kost-Alimova M, Stenman G. 2006. CHCHD7-PLAG1 and TCEA1-PLAG1 gene fusions resulting from cryptic, intrachromosomal 8q rearrangements in pleomorphic salivary gland adenomas. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 820-828.
- Åström AK, Voz ML, Kas K, Röijer E, Wedell B, Mandahl N, Van de Ven W, Mark J, Stenman G. 1999. Conserved mechanism of PLAG1 activation in salivary gland tumors with and without chromosome 8q12 abnormalities: identification of SII as a new fusion partner gene. *Cancer Res* 59: 918-923.
- Ayoubi TA, Jansen E, Meulemans SM, Van de Ven WJ. 1999. Regulation of HMGIC expression: an architectural transcription factor involved in growth control and development. *Oncogene* 18: 5076-5087.

B

- Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman JM. 2003. High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: Ultrasound evidence. *Am J Obstet Gynecol* 188: 100–107.
- Balcerczak M, Pasz-Walczak G, Balcerczak E, Wojtylak M, Kordek R, Mirowski M. 2003. HMGI(Y) gene expression in colorectal cancer: comparison with some histological typing, grading, and clinical staging. *Pathol Res Pract* 199: 641-646.
- Baldassarre G, Battista S, Belletti B, Thakur S, Pentimalli F, Trapasso F, Fedele M, Pierantoni G, Croce CM, Fusco A. 2003. Negative regulation of BRCA1 gene expression by HMGA1 proteins accounts for the reduced BRCA1 protein levels in sporadic breast carcinoma. *Mol Cell Biol* 23: 2225-2238.
- Baloch ZW, Fleisher S, LiVolsi VA, Gupta PK. 2002. Diagnosis of "follicular neoplasm": a gray zone in thyroid fine-needle aspiration cytology. *Diagn Cytopathol* 26: 41-44.
- Baloch ZW, LiVolsi VA. 2001. Prognostic factors in well-differentiated follicular-derived carcinoma and medullary thyroid carcinoma. *Thyroid* 11: 637-645.
- Bandiera A, Bonifacio D, Manfioletti G, Mantovani F, Rustighi A, Zanconati F, Fusco A, Di Bonito L, Giacotti V. 1998. Expression of HMGI(Y) proteins in squamous intraepithelial and invasive lesions of the uterine cervix. *Cancer Res* 58: 426-431.
- Banerjee S, Kundu TK. 2003. The acidic C-terminal domain and A-box of HMGB-1 regulates p53-mediated transcription. *Nucleic Acids Res* 31: 3236-3247.
- Banito A, Pinto AE, Espadinha C, Marques AR, Leite V. 2007. Aneuploidy and RAS mutations are mutually exclusive events in the development of well-differentiated thyroid follicular tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67: 706-711.
- Bartuma H, Domanski HA, Von Steyern FV, Kullendorff CM, Mandahl N, Mertens F. 2008. Cytogenetic and molecular cytogenetic findings in lipoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 183: 60-63.
- Bartuma H, Hallor KH, Panagopoulos I, Collin A, Rydholm A, Gustafson P, Bauer HC, Brosjö O, Domanski HA, Mandahl N, Mertens F. 2007. Assessment of the clinical and molecular impact of different cytogenetic subgroups in a series of 272 lipomas with abnormal karyotype. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 594-606.
- Bartuma H, Panagopoulos I, Collin A, Trombetta D, Domanski HA, Mandahl N, Mertens F. 2009. Expression levels of *HMGA2* in adipocytic tumors correlate with morphologic and cytogenetic subgroups. *Mol Cancer* 8: 36.
- Battista S, de Nigris F, Fedele M, Chiappetta G, Scala S, Vallone D, Pierantoni GM, Mega T, Santoro M, Viglietto G, Verde P, Fusco A. 1998. Increase in AP-1 activity is a general event in thyroid cell transformation in vitro and in vivo. *Oncogene* 17: 377-385.
- Belge G, Meyer A, Klemke M, Burchardt K, Stern C, Wosniok W, Loeschke S, Bullerdiek J. 2008. Upregulation of *HMGA2* in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer* 47: 56-63.
- Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, Verloop R, van de Wetering M, Guryev V, Takada S, van Zonneveld AJ, Mano H, Plasterk R, Cuppen E. 2006. Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res* 16: 1289-1298.
- Bergeron S, Madathiparambil T, Swanson PC. 2005. Both high mobility group (HMG)-boxes and the acidic tail of HMGB1 regulate recombination-activating gene (RAG)-mediated recombination signal synapsis and cleavage in vitro. *J Biol Chem* 280: 31314-31324.
- Berlingieri MT, Manfioletti G, Santoro M, Bandiera A, Visconti R, Giacotti V, Fusco A. 1995. Inhibition of HMGI-C protein synthesis suppresses retrovirally induced neoplastic transformation of rat thyroid cells. *Mol Cell Biol* 15: 1545-1553.
- Berlingieri MT, Pierantoni GM, Giacotti V, Santoro M, Fusco A. 2002. Thyroid cell transformation requires the expression of the HMGA1 proteins. *Oncogene* 21: 2971-2980.
- Berner JM, Meza-Zepeda LA, Kools PF, Forus A, Schoenmakers EF, Van de Ven WJ, Fodstad O, Myklebost O. 1997. HMGIC, the gene for an architectural transcription factor, is amplified and rearranged in a subset of human sarcomas. *Oncogene* 14: 2935-2941.

- Bernués J, Espel E, Querol E. 1986. Identification of the core-histone-binding domains of HMG1 and HMG2. *Biochim Biophys Acta* 866: 242-251.
- Bianchi ME, Beltrame M, Paonessa G. 1989. Specific recognition of cruciform DNA by nuclear protein HMG1. *Science* 243: 1056-1059.
- Bol S, Wanschura S, Thode B, Deichert U, Van de Ven WJ, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996. An endometrial polyp with a rearrangement of HMGI-C underlying a complex cytogenetic rearrangement involving chromosomes 2 and 12. *Cancer Genet Cytogenet* 90: 88-90.
- Boonyaratanakornkit V, Melvin V, Prendergast P, Altmann M, Ronfani L, Bianchi ME, Taraseviciene L, Nordeen SK, Allegretto EA, Edwards DP. 1998. High-mobility group chromatin proteins 1 and 2 functionally interact with steroid hormone receptors to enhance their DNA binding in vitro and transcriptional activity in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 18: 4471-4487.
- Boos LA, Dettmer M, Schmitt A, Rudolph T, Steinert H, Moch H, Sobrinho-Simões M, Komminoth P, Perren A. 2013. Diagnostic and prognostic implications of the PAX8-PPAR γ translocation in thyroid carcinomas—a TMA-based study of 226 cases. *Histopathology* 63: 234-241.
- Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. 2006. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 13: 1097-1101.
- Borrmann L, Schwanbeck R, Heyduk T, Seebeck B, Rogalla P, Bullerdiek J, Wisniewski JR. 2003. High mobility group A2 protein and its derivatives bind a specific region of the promoter of DNA repair gene ERCC1 and modulate its activity. *Nucleic Acids Res* 31: 6841-6851.
- Borrmann L, Wilkening S, Bullerdiek J. 2001. The expression of HMGA genes is regulated by their 3'UTR. *Oncogene* 20: 4537-4541.
- Bracht J, Hunter S, Eachus R, Weeks P, Pasquinelli AE. 2004. *Trans*-splicing and polyadenylation of *let-7* microRNA primary transcripts. *RNA* 10: 1586-1594.
- Brants JR, Ayoubi TA, Chada K, Marchal K, Van de Ven WJ, Petit MM. 2004. Differential regulation of the insulin-like growth factor II mRNA-binding protein genes by architectural transcription factor HMGA2. *FEBS Lett* 569: 277-283.
- Brosens I, Deprest J, Dal Cin P, Van den Berghe H. 1998. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in uterine myomas. *Fertil Steril* 69: 232-235.
- Brunetti A, Manfioletti G, Chieffari E, Goldfine ID, Foti D. 2001. Transcriptional regulation of human insulin receptor gene by the high-mobility group protein HMGI(Y). *FASEB J* 15: 492-500.
- Bullerdiek J, Bartnitzke S, Weinberg M, Chilla R, Haubrich J, Schloot W. 1987. Rearrangements of chromosome region 12q13→q15 in pleomorphic adenomas of the human salivary gland (PSA). *Cytogenet Cell Genet* 45: 187-190.
- Bullerdiek J, Chilla R, Haubrich J, Meyer K, Bartnitzke S. 1988. A causal relationship between chromosomal rearrangements and the genesis of salivary gland pleomorphic adenomas. *Arch Otorhinolaryngol* 245: 244-249.
- Bullerdiek J, Takla G, Bartnitzke S, Brandt G, Chilla R, Haubrich J. 1989. Relationship of cytogenetic subtypes of salivary gland pleomorphic adenomas with patient age and histologic type. *Cancer* 64: 876-880.
- Bullerdiek J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R, Haubrich J, Thode B, Bartnitzke S. 1993. Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet Cytogenet* 65: 27-31.
- Büssing I, Slack FJ, Grosshans H. 2008. *let-7* microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med* 14: 400-409.
- Bushati N, Cohen SM. 2007. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 175-205.
- Bustin M. 1999. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 19: 5237-5246.
- Bustin M, Reeves R. 1996. High-mobility-group chromosomal proteins: architectural components that facilitate chromatin function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 54: 35-100.

C

- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10: 1957-66.
- Canevari RA, Pontes A, Rosa FE, Rainho CA, Rogatto SR. 2005. Independent clonal origin of multiple uterine leiomyomas that was determined by X chromosome inactivation and microsatellite analysis. *Am J Obstet Gynecol* 193: 1395-1403.
- Caron L, Bost F, Prot M, Hofman P, Binétry B. 2005. A new role for the oncogenic high-mobility group A2 transcription factor in myogenesis of embryonic stem cells. *Oncogene* 24: 6281-6291.
- Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simões M. 2006. PAX8-PPAR γ rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 213-220.
- Castro P, Roque L, Magalhães J, Sobrinho-Simões M. 2005. A subset of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma harbors the PAX8-PPAR γ translocation. *Int J Surg Pathol* 13: 235-238.
- Chau KY, Patel UA, Lee KL, Lam HY, Crane-Robinson C. 1995. The gene for the human architectural transcription factor HMGI-C consists of five exons each coding for a distinct functional element. *Nucleic Acids Res* 23: 4262-4266.
- Cheung L, Messina M, Gill A, Clarkson A, Learoyd D, Delbridge L, Wentworth J, Philips J, Clifton-Bligh R, Robinson BG. 2003. Detection of the PAX8-PPAR γ fusion oncogene in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 354-357.
- Chia WK, Sharifah NA, Reena RM, Zubaidah Z, Clarence-Ko CH, Rohaizak M, Naqiyah I, Srijit D, Hisham AN, Asmiati A, Rafie MK. 2010. Fluorescence in situ hybridization analysis using PAX8- and PPARG-specific probes reveals the presence of PAX8-PPARG translocation and 3p25 aneusomy in follicular thyroid neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet* 196: 7-13.
- Chiappetta G, Avantaggiato V, Visconti R, Fedele M, Battista S, Trapasso F, Merciai BM, Fidanza V, Giancotti V, Santoro M, Simeone A, Fusco A. 1996. High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. *Oncogene* 13: 2439-2446.
- Chiappetta G, Bandiera A, Berlingieri MT, Visconti R, Manfioletti G, Battista S, Martinez-Tello FJ, Santoro M, Giancotti V, Fusco A. 1995. The expression of the high mobility group HMGI (Y) proteins correlates with the malignant phenotype of human thyroid neoplasias. *Oncogene* 10: 1307-1314.
- Chiappetta G, Botti G, Monaco M, Pasquinelli R, Pentimalli F, Di Bonito M, D'Aiuto G, Fedele M, Iuliano R, Palmieri EA, Pierantoni GM, Giancotti V, Fusco A. 2004. HMGA1 protein overexpression in human breast carcinomas: correlation with ErbB2 expression. *Clin Cancer Res* 10: 7637-7644.
- Chiappetta G, Ferraro A, Vuttariello E, Monaco M, Galdiero F, De Simone V, Califano D, Pallante P, Botti G, Pezzullo L, Pierantoni GM, Santoro M, Fusco A. 2008. HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. *Eur J Cancer* 44: 1015-1021.
- Chiappetta G, Manfioletti G, Pentimalli F, Abe N, Di Bonito M, Vento MT, Giuliano A, Fedele M, Viglietto G, Santoro M, Watanabe T, Giancotti V, Fusco A. 2001. High mobility group HMGI(Y) protein expression in human colorectal hyperplastic and neoplastic diseases. *Int J Cancer* 91: 147-151.
- Chiappetta G, Tallini G, De Biasio MC, Manfioletti G, Martinez-Tello FJ, Pentimalli F, de Nigris F, Mastro A, Botti G, Fedele M, Berger N, Santoro M, Giancotti V, Fusco A. 1998. Detection of high mobility group I HMGI(Y) protein in the diagnosis of thyroid tumors: HMGI(Y) expression represents a potential diagnostic indicator of carcinoma. *Cancer Res* 58: 4193-4198.
- Chiefari E, Nevolo MT, Arcidiacono B, Maurizio E, Nocera A, Iiritano S, Sgarra R, Possidente K, Palmieri C, Paonessa F, Brunetti G, Manfioletti G, Foti D, Brunetti A. 2012. HMGA1 is a novel downstream nuclear target of the insulin receptor signaling pathway. *Sci Rep* 2: 251.
- Cleynen I, Brants JR, Peeters K, Deckers R, Debiec-Rychter M, Sciôt R, Van de Ven WJ, Petit MM. 2007. HMGA2 regulates transcription of the *Imp2* gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor-kappaB. *Mol Cancer Res* 5: 363-372.
- Cohen Y, Xing M, Mambo E, Guo Z, Wu G, Trink B, Beller U, Westra WH, Ladenson PW, Sidransky D. 2003. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 95: 625-627.
- Cramer SF, Patel A. 1990. The frequency of uterine leiomyomas. *Am J Clin Pathol* 94:435-438.

Crippa MP, Alfonso PJ, Bustin M. 1992. Nucleosome core binding region of chromosomal protein HMG-17 acts as an independent functional domain. *J Mol Biol* 228: 442-449.

Czyz W, Balcerczak E, Jakubiak M, Pasięka Z, Kuzdak K, Mirowski M. 2004. HMG(Y) gene expression as a potential marker of thyroid follicular carcinoma. *Langenbecks Arch Surg* 389: 193-197.

D

Dal Cin P, Kools P, De Jonge I, Moerman P, Van de Ven W, Van den Berghe H. 1993. Rearrangement of 12q14-15 in pulmonary chondroid hamartoma. *Genes Chromosomes Cancer* 8: 131-133.

Dal Cin P, Wanschura S, Kazmierczak B, Tallini G, Dei Tos A, Bullerdiek J, Van den Berghe I, Moerman P, Van den Berghe H. 1998. Amplification and expression of the HMGIC gene in a benign endometrial polyp. *Genes Chromosomes Cancer* 22: 95-99.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-954.

DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (Hrsg.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs*. IARC Press, Lyon 2004.

Diana F, Sgarra R, Manfioletti G, Rustighi A, Poletto D, Sciortino MT, Mastino A, Giancotti V. 2001. A link between apoptosis and degree of phosphorylation of high mobility group A1a protein in leukemic cells. *J Biol Chem* 276: 11354-11361.

Dietlein M, Schober O, Schicha H. 2004. Über- oder Untertherapie des papillären Mikrokarzinoms der Schilddrüse? Überlegungen zur ablativen Radioiodtherapie. *Nuklearmedizin* 43: 107-114.

Ding HF, Bustin M, Hansen U. 1997. Alleviation of histone H1-mediated transcriptional repression and chromatin compaction by the acidic activation region in chromosomal protein HMG-14. *Mol Cell Biol* 17: 5843-5855.

Doniach I. 1978. *The thyroid gland*. Symmers WStC. *Systemic Pathology*. Churchill Livingstone, Edinburgh, Seiten 1976-2037.

Du W, Thanos D, Maniatis T. 1993. Mechanisms of transcriptional synergism between distinct virus-inducible enhancer elements. *Cell* 74: 887-898.

Du T, Zamore PD. 2005. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132: 4645-4652.

Dwight T, Thoppe SR, Foukakis T, Lui WO, Wallin G, Höög A, Frisk T, Larsson C, Zedenius J. 2003. Involvement of the PAX8/peroxisome proliferator-activated receptor γ rearrangement in follicular thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4440-4445.

E

Elton TS, Nissen MS, Reeves R. 1987. Specific A . T DNA sequence binding of RP-HPLC purified HMG-I. *Biochem Biophys Res Commun* 143: 260-265.

Elton TS, Reeves R. 1986. Purification and postsynthetic modifications of Friend erythroleukemic cell high mobility group protein HMG-I. *Anal Biochem* 157: 53-62.

Enlund F, Nordkvist A, Sahlin P, Mark J, Stenman G. 2002. Expression of PLAG1 and HMGIC proteins and fusion transcripts in radiation-associated pleomorphic adenomas. *Int J Oncol* 20: 713-716.

F

- Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. 1997. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 272: 18779-18789.
- Fedele M, Bandiera A, Chiappetta G, Battista S, Viglietto G, Manfioletti G, Casamassimi A, Santoro M, Giancotti V, Fusco A. 1996. Human colorectal carcinomas express high levels of high mobility group HMGI(Y) proteins. *Cancer Res* 56: 1896-1901.
- Fedele M, Berlingieri MT, Scala S, Chiariotti L, Viglietto G, Rippe V, Bullerdiek J, Santoro M, Fusco A. 1998. Truncated and chimeric HMGI-C genes induce neoplastic transformation of NIH3T3 murine fibroblasts. *Oncogene* 17: 413-418.
- Fedele M, Pierantoni GM, Visone R, Fusco A. 2006a. Critical role of the HMGA2 gene in pituitary adenomas. *Cell Cycle* 5: 2045-2048.
- Fedele M, Pierantoni GM, Visone R, Fusco A. 2006b. E2F1 activation is responsible for pituitary adenomas induced by HMGA2 gene overexpression. *Cell Div* 1: 17.
- Fedele M, Visone R, De Martino I, Troncone G, Palmieri D, Battista S, Ciarmiello A, Pallante P, Arra C, Melillo RM, Helin K, Croce CM, Fusco A. 2006c. HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity. *Cancer Cell* 9: 459-471.
- Finelli P, Pierantoni GM, Giardino D, Losa M, Rodeschini O, Fedele M, Valtorta E, Mortini P, Croce CM, Larizza L, Fusco A. 2002. The High Mobility Group A2 gene is amplified and overexpressed in human prolactinomas. *Cancer Res* 62: 2398-2405.
- Fletcher JA, Longtine J, Wallace K, Mentzer SJ, Sugarbaker DJ. 1995. Cytogenetic and histologic findings in 17 pulmonary chondroid hamartomas: evidence for a pathogenetic relationship with lipomas and leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 220-223.
- Flohr AM, Rogalla P, Bonk U, Puettmann B, Buerger H, Gohla G, Packeisen J, Wosniok W, Loeschke S, Bullerdiek J. 2003. High mobility group protein HMGA1 expression in breast cancer reveals a positive correlation with tumour grade. *Histol Histopathol* 18: 999-1004.
- Foti D, Chiefari E, Fedele M, Iuliano R, Brunetti L, Paonessa F, Manfioletti G, Barbetti F, Brunetti A, Croce CM, Fusco A, Brunetti A. 2005. Lack of the architectural factor HMGA1 causes insulin resistance and diabetes in humans and mice. *Nat Med* 11: 765-773.
- Foti D, Iuliano R, Chiefari E, Brunetti A. 2003. A nucleoprotein complex containing Sp1, C/EBP beta, and HMGI-Y controls human insulin receptor gene transcription. *Mol Cell Biol* 23: 2720-2732.
- Frasca F, Rustighi A, Malaguarnera R, Altamura S, Vigneri P, Del Sal G, Giancotti V, Pezzino V, Vigneri R, Manfioletti G. 2006. HMGA1 inhibits the function of p53 family members in thyroid cancer cells. *Cancer Res* 66: 2980-2989.
- Friedmann M, Holth LT, Zoghbi HY, Reeves R. 1993. Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res* 21: 4259-4267.
- Fryknäs M, Wickenberg-Bolin U, Göransson H, Gustafsson MG, Foukakis T, Lee JJ, Landegren U, Höög A, Larsson C, Grimelius L, Wallin G, Pettersson U, Isaksson A. 2006. Molecular markers for discrimination of benign and malignant follicular thyroid tumors. *Tumour Biol* 27: 211-220.
- Fusco A, Fedele M. 2007. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 7: 899-910.

G

- Gardner RE, Tuttle RM, Burman KD, Haddady S, Truman C, Sparling YH, Wartofsky L, Sessions RB, Ringel MD. 2000. Prognostic importance of vascular invasion in papillary thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126: 309-312.
- Gattas GJ, Quade BJ, Nowak RA, Morton CC. 1999. *HMGIC* expression in human adult and fetal tissues and in uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* 25: 316-322.
- Geierstanger BH, Volkman BF, Kremer W, Wemmer DE. 1994. Short peptide fragments derived from HMG-I/Y proteins bind specifically to the minor groove of DNA. *Biochemistry* 33: 5347-5355.

- Gerard GF, Fox DK, Nathan M, D'Alessio JM. 1997. Reverse transcriptase. The use of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase to synthesize DNA from RNA. *Mol Biotechnol* 8: 61-77.
- Geurts JM, Schoenmakers EF, Röijer E, Aström AK, Stenman G, van de Ven WJ. 1998. Identification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGIC in pleomorphic adenomas. *Oncogene* 16: 865-872.
- Geurts JM, Schoenmakers EF, Röijer E, Stenman G, Van de Ven WJ. 1997a. Expression of reciprocal hybrid transcripts of HMGIC and FHIT in a pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer Res* 57: 13-17.
- Geurts JM, Schoenmakers EF, Van de Ven WJ. 1997b. Molecular characterization of a complex chromosomal rearrangement in a pleomorphic salivary gland adenoma involving the 3'-UTR of HMGIC. *Cancer Genet Cytogenet* 95: 198-205.
- Giancotti V, Bandiera A, Sindici C, Perissin L, Crane-Robinson C. 1996. Calcium-dependent ADP-ribosylation of high-mobility-group I (HMGI) proteins. *Biochem J* 317: 865-870.
- Gisselsson D, Hibbard MK, Dal Cin P, Sciot R, Hsi BL, Kozakewich HP, Fletcher JA. 2001. PLAG1 alterations in lipoblastoma: involvement in varied mesenchymal cell types and evidence for alternative oncogenic mechanisms. *Am J Pathol* 159: 955-962.
- Goellner JR, Gharib H, Grant CS, Johnson DA. 1987. Fine needle aspiration cytology of the thyroid, 1980 to 1986. *Acta Cytol* 31: 587-590.
- Goodwin G. 1998. The high mobility group protein, HMGI-C. *Int J Biochem Cell Biol* 30: 761-766.
- Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. 1973. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem* 38: 14-19.
- Greaves TS, Olvera M, Florentine BD, Raza AS, Cobb CJ, Tsao-Wei DD, Groshen S, Singer P, Lopresti J, Martin SE. 2000. Follicular lesions of thyroid: a 5-year fine-needle aspiration experience. *Cancer* 90: 335-341.
- Gross KL, Neskey DM, Manchanda N, Weremowicz S, Kleinman MS, Nowak RA, Ligon AH, Rogalla P, Drechsler K, Bullerdiel J, Morton CC. 2003. *HMGA2* expression in uterine leiomyomata and myometrium: quantitative analysis and tissue culture studies. *Genes Chromosomes Cancer* 38: 68-79.
- Grosschedl R, Giese K, Pagel J. 1994. HMG domain proteins: architectural elements in the assembly of nucleoprotein structures. *Trends Genet* 10: 94-100.

H

- Hara H, Fulton N, Yashiro T, Ito K, DeGroot LJ, Kaplan EL. 1994. N-ras mutation: an independent prognostic factor for aggressiveness of papillary thyroid carcinoma. *Surgery* 116: 1010-1016.
- Hashemi Nezhad M, Drieschner N, Helms S, Meyer A, Tadayyon M, Klemke M, Belge G, Bartnitzke S, Burchardt K, Frantzen C, Schmidt EH, Bullerdiel J. 2010. 6p21 rearrangements in uterine leiomyomas targeting *HMGA1*. *Cancer Genet Cytogenet* 203: 247-252.
- Hashimoto K, Azuma C, Kamiura S, Kimura T, Nobunaga T, Kanai T, Sawada M, Noguchi S, Saji F. 1995. Clonal determination of uterine leiomyomas by analyzing differential inactivation of the X-chromosome-linked phosphoglycerokinase gene. *Gynecol Obstet Invest* 40: 204-208.
- Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ. 2007. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 6: 5.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6: 986-994.
- Heim S, Nilbert M, Vanni R, Floderus UM, Mandahl N, Liedgren S, Lecca U, Mitelman F. 1988. A specific translocation, t(12;14)(q14-15;q23-24), characterizes a subgroup of uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet* 32: 13-17.
- Heinemann K, Thiel C, Möhner S, Lewis MA, Raff T, Kühl-Habich D, Heinemann LA. 2003. Benign gynecological tumors: estimated incidence. Results of the German Cohort Study on Women's Health. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 107: 78-80.

- Hennig Y, Deichert U, Bonk U, Thode B, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1999. Chromosomal translocations affecting 12q14-15 but not deletions of the long arm of chromosome 7 associated with a growth advantage of uterine smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod* 5: 1150-1154.
- Hennig Y, Deichert U, Stern C, Ghassemi A, Thode B, Bonk U, Meister P, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996b. Structural aberrations of chromosome 6 in three uterine smooth muscle tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 87: 148-151.
- Hennig Y, Rogalla P, Wanschura S, Frey G, Deichert U, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1997. HMGIC expressed in a uterine leiomyoma with a deletion of the long arm of chromosome 7 along with a 12q14-15 rearrangement but not in tumors showing del(7) as the sole cytogenetic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 96: 129-133.
- Hennig Y, Wanschura S, Deichert U, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996a. Rearrangements of the high mobility group protein family genes and the molecular genetic origin of uterine leiomyomas and endometrial polyps. *Mol Hum Reprod* 2: 277-283.
- Heo I, Joo C, Cho J, Ha M, Han J, Kim VN. 2008. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell* 32: 276-284.
- Hibbard MK, Kozakewich HP, Dal Cin P, Sciot R, Tan X, Xiao S, Fletcher JA. 2000. PLAG1 fusion oncogenes in lipoblastoma. *Cancer Res* 60: 4869-4872.
- Hirning-Folz U, Wilda M, Rippe V, Bullerdiek J, Hameister H. 1998. The expression pattern of the Hmgic gene during development. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 350-357.
- Huber MA, Kraut N, Beug H. 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol* 17: 548-558.
- Hughes EN, Engelsberg BN, Billings PC. 1992. Purification of nuclear proteins that bind to cisplatin-damaged DNA. Identity with high mobility group proteins 1 and 2. *J Biol Chem* 267: 13520-13527.

I

- Iiritano S, Chiefari E, Ventura V, Arcidiacono B, Possidente K, Nocera A, Nevolo MT, Fedele M, Greco A, Greco M, Brunetti G, Fusco A, Foti D, Brunetti A. 2012. The HMGA1-IGF-I/IGFBP system: a novel pathway for modulating glucose uptake. *Mol Endocrinol* 26: 1578-1589.
- Imamura T, Izumi H, Nagatani G, Ise T, Nomoto M, Iwamoto Y, Kohno K. 2001. Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. *J Biol Chem* 276: 7534-7540.
- Ishwad CS, Ferrell RE, Davare J, Meloni AM, Sandberg AA, Surti U. 1995. Molecular and cytogenetic analysis of chromosome 7 in uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 14: 51-55.

J

- Jayaraman L, Moorthy NC, Murthy KG, Manley JL, Bustin M, Prives C. 1998. High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev* 12: 462-472.
- Jin L, Lloyd RV, Nassar A, Lappinga PJ, Sebo TJ, Swartz K, Seys AR, Erickson-Johnson MR, Roth CW, Evers BR, Oliveira AM, Zhang J. 2011. HMGA2 Expression Analysis in Cytological and Paraffin-embedded Tissue Specimens of Thyroid Tumors by Relative Quantitative RT-PCR. *Diagn Mol Pathol* 20: 71-80.
- Johansson M, Dietrich C, Mandahl N, Hambræus G, Johansson L, Clausen PP, Mitelman F, Heim S. 1993. Recombinations of chromosomal bands 6p21 and 14q24 characterise pulmonary hamartomas. *Br J Cancer* 67: 1236-1241.
- Johnson KR, Lehn DA, Reeves R. 1989. Alternative processing of mRNAs encoding mammalian chromosomal high-mobility-group proteins HMG-I and HMG-Y. *Mol Cell Biol* 9: 2114-2123.

K

- Karger S, Weidinger C, Krause K, Sheu SY, Aigner T, Gimm O, Schmid KW, Dralle H, Fuhrer D. 2009. FOXO3a: a novel player in thyroid carcinogenesis? *Endocr Relat Cancer* 16: 189-199.

- Karin M, Liu Z, Zandi E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 240-246.
- Kas K, Voz ML, Hensen K, Meyen E, Van de Ven WJ. 1998. Transcriptional activation capacity of the novel PLAG family of zinc finger proteins. *J Biol Chem* 273: 23026-23032.
- Kas K, Voz ML, Röijer E, Åström AK, Meyen E, Stenman G, Van de Ven WJ. 1997. Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. *Nat Genet* 15: 170-174.
- Kazmierczak B, Bol S, Wanschura S, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996c. PAC clone containing the HMGI(Y) gene spans the breakpoint of a 6p21 translocation in a uterine leiomyoma cell line. *Genes Chromosomes Cancer* 17: 191-193.
- Kazmierczak B, Dal Cin P, Wanschura S, Borrmann L, Fusco A, Van den Berghe H, Bullerdiek J. 1998. HMGI(Y) is the target of 6p21.3 rearrangements in various benign mesenchymal tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 279-285.
- Kazmierczak B, Hennig Y, Wanschura S, Rogalla P, Bartnitzke S, Van de Ven W, Bullerdiek J. 1995c. Description of a novel fusion transcript between *HMGI-C*, a gene encoding for a member of the high mobility group proteins, and the mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene. *Cancer Res* 55: 6038-6039.
- Kazmierczak B, Meyer-Bolte K, Tran KH, Wöckel W, Brightman I, Rosigkeit J, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1999. A high frequency of tumors with rearrangements of genes of the HMGI(Y) family in a series of 191 pulmonary chondroid hamartomas. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 125-133.
- Kazmierczak B, Rosigkeit J, Wanschura S, Meyer-Bolte K, Van de Ven WJ, Kayser K, Kriehoff B, Kastendiek H, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996b. HMGI-C rearrangements as the molecular basis for the majority of pulmonary chondroid hamartomas: a survey of 30 tumors. *Oncogene* 12: 515-521.
- Kazmierczak B, Wanschura S, Meyer-Bolte K, Caselitz J, Meister P, Bartnitzke S, Van de Ven W, Bullerdiek J. 1995b. Cytogenic and molecular analysis of an aggressive angiomyxoma. *Am J Pathol* 147: 580-585.
- Kazmierczak B, Wanschura S, Rommel B, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 1996a. Ten pulmonary chondroid hamartomas with chromosome 6p21 breakpoints within the HMG-I(Y) gene or its immediate surroundings. *J Natl Cancer Inst* 88: 1234-1236.
- Kazmierczak B, Wanschura S, Rosigkeit J, Meyer-Bolte K, Uschinsky K, Haupt R, Schoenmakers EF, Bartnitzke S, Van de Ven WJ, Bullerdiek J. 1995a. Molecular characterization of 12q14-15 rearrangements in three pulmonary chondroid hamartomas. *Cancer Res* 55: 2497-2499.
- Kiechle-Schwarz M, Sreekantaiah C, Berger CS, Pedron S, Medchill MT, Surti U, Sandberg AA. 1991. Nonrandom cytogenetic changes in leiomyomas of the female genitourinary tract. A report of 35 cases. *Cancer Genet Cytogenet* 53: 125-136.
- Kim YK, Kim VN. 2007. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 26: 775-783.
- Kim DH, Park YS, Park CJ, Son KC, Nam ES, Shin HS, Ryu JW, Kim DS, Park CK, Park YE. 1999. Expression of the HMGI(Y) gene in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 84: 376-380.
- Kim SJ, Ryu JW, Choi DS. 2000. The expression of the high mobility group I(Y) mRNA in thyroid cancers: useful tool of differential diagnosis of thyroid nodules. *Korean J Intern Med* 15: 71-75.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. 2003. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* 63: 1454-1457.
- Klemke M, Drieschner N, Belge G, Burchardt K, Junker K, Bullerdiek J. 2012. Detection of *PAX8-PPARG* fusion transcripts in archival thyroid carcinoma samples by conventional RT-PCR. *Genes Chromosomes Cancer* 51: 402-408.
- Klemke M, Drieschner N, Laabs A, Rippe V, Belge G, Bullerdiek J, Sendt W. 2011. On the prevalence of the *PAX8-PPARG* fusion resulting from the chromosomal translocation t(2;3)(q13;p25) in adenomas of the thyroid. *Cancer Genet* 204: 334-339.
- Klemke M, Meyer A, Hashemi Nezhad M, Bartnitzke S, Drieschner N, Frantzen C, Schmidt EH, Belge G, Bullerdiek J. 2009. Overexpression of *HMGA2* in uterine leiomyomas points to its general role for the pathogenesis of the disease. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 171-178.

- Klemke M, Meyer A, Hashemi Nezhad M, Belge G, Bartnitzke S, Bullerdiek J. 2010. Loss of let-7 binding sites resulting from truncations of the 3' untranslated region of *HMGA2* mRNA in uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet* 196: 119-123.
- Klemke M, Müller MH, Wosniok W, Markowski DN, Nimzyk R, Helmke BM, Bullerdiek J. 2014. Correlated expression of *HMGA2* and *PLAG1* in thyroid tumors, uterine leiomyomas and experimental models. *PLoS ONE* 9: e88126.
- Klotzbücher M, Wasserfall A, Fuhrmann U. 1999. Misexpression of wild-type and truncated isoforms of the high-mobility group I proteins HMGI-C and HMGI(Y) in uterine leiomyomas. *Am J Pathol* 155: 1535-1542.
- Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2010.
- Kriatchko AN, Bergeron S, Swanson PC. 2008. HMG-box domain stimulation of RAG1/2 cleavage activity is metal ion dependent. *BMC Mol Biol* 9: 32.
- Kroll TG, Sarraf P, Pecciarini L, Chen CJ, Mueller E, Spiegelman BM, Fletcher JA. 2000. PAX8-PPAR γ 1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma. *Science* 289: 1357-1560.
- Kubo H, Shimizu M, Taya Y, Kawamoto T, Michida M, Kaneko E, Igarashi A, Nishimura M, Segoshi K, Shimazu Y, Tsuji K, Aoba T, Kato Y. 2009. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells* 14: 407-424.
- Kurose K, Mine N, Iida A, Nagai H, Harada H, Araki T, Emi M. 2001. Three aberrant splicing variants of the HMGIC gene transcribed in uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 30: 212-217.

L

- Landsman D, Bustin M. 1991. Assessment of the transcriptional activation potential of the HMG chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 11: 4483-4489.
- Lappinga PJ, Kip NS, Jin L, Lloyd RV, Henry MR, Zhang J, Nassar A. 2010. *HMGA2* gene expression analysis performed on cytologic smears to distinguish benign from malignant thyroid nodules. *Cancer Cytopathol* 118: 287-297.
- Lee KB, Thomas JO. 2000. The effect of the acidic tail on the DNA-binding properties of the HMG1,2 class of proteins: insights from tail switching and tail removal. *J Mol Biol* 304: 135-149.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854.
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23: 4051-4060.
- Lee YS, Dutta A. 2007. The tumor suppressor microRNA *let-7* represses the *HMGA2* oncogene. *Genes Dev* 21: 1025-1030.
- Lehn DA, Elton TS, Johnson KR, Reeves R. 1988. A conformational study of the sequence specific binding of HMG-I (Y) with the bovine interleukin-2 cDNA. *Biochem Int* 16: 963-971.
- Lemke I, Rogalla P, Bullerdiek J. 2001. Large deletion of part of the *HMGIC* locus accompanying a t(3;12)(q27~28;q14~q15) in a lipoma. *Cancer Genet Cytogenet* 129: 161-164.
- Li O, Li J, Dröge P. 2007b. DNA architectural factor and proto-oncogene *HMGA2* regulates key developmental genes in pluripotent human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 581: 3533-3537.
- Li Y, Lu J, Prochownik EV. 2007a. Dual role for SUMO E2 conjugase Ubc9 in modulating the transforming and growth-promoting properties of the *HMGA1b* architectural transcription factor. *J Biol Chem* 282: 13363-13371.
- Li O, Vasudevan D, Davey CA, Dröge P. 2006. High-level expression of DNA architectural factor *HMGA2* and its association with nucleosomes in human embryonic stem cells. *Genesis* 44: 523-529.
- Ligon AH, Morton CC. 2000. Genetics of uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* 28:235-245.

- Lima J, Trovisco V, Soares P, Máximo V, Magalhães J, Salvatore G, Santoro M, Bogdanova T, Tronko M, Abrosimov A, Jeremiah S, Thomas G, Williams D, Sobrinho-Simões M. 2004. BRAF mutations are not a major event in post-Chernobyl childhood thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 4267-4271.
- Lin SL, Miller JD, Ying SY. 2006. Intronic microRNA (miRNA). *J Biomed Biotechnol* 2006: 26818.
- Linder D, Gartler SM. 1965. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mosaicism: utilization as a cell marker in the study of leiomyomas. *Science* 150: 67-69.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods* 25: 402-408.
- Lloyd RV, Erickson LA, Casey MB, Lam KY, Lohse CM, Asa SL, Chan JK, DeLellis RA, Harach HR, Kakudo K, LiVolsi VA, Rosai J, Sebo TJ, Sobrinho-Simoes M, Wenig BM, Lae ME. 2004. Observer variation in the diagnosis of follicular variant of papillary thyroid carcinoma. *Am J Surg Pathol* 28: 1336-1340.
- Lund T, Holtlund J, Fredriksen M, Laland SG. 1983. On the presence of two new high mobility group-like proteins in HeLa S3 cells. *FEBS Lett* 152: 163-167.
- Luo Y, Li W, Liao H. 2013. HMGA2 induces epithelial-to-mesenchymal transition in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Lett* 5: 1353-1356.

M

- Machens A, Holzhausen HJ, Dralle H. 2005. The prognostic value of primary tumor size in papillary and follicular thyroid carcinoma. *Cancer* 103: 2269-2273.
- Mäkinen N, Heinonen HR, Moore S, Tomlinson IP, van der Spuy ZM, Aaltonen LA. 2011. MED12 exon 2 mutations are common in uterine leiomyomas from South African patients. *Oncotarget* 2: 966-969.
- Mäkinen N, Mehine M, Tolvanen J, Kaasinen E, Li Y, Lehtonen HJ, Gentile M, Yan J, Enge M, Taipale M, Aavikko M, Katainen R, Virolainen E, Böhling T, Koski TA, Launonen V, Sjöberg J, Taipale J, Vahteristo P, Aaltonen LA. 2011. MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Science* 334: 252-255.
- Maloney SC, Adair JE, Smerdon MJ, Reeves R. 2007. Gene-specific nucleotide excision repair is impaired in human cells expressing elevated levels of high mobility group A1 nonhistone proteins. *DNA Repair (Amst)* 6: 1371-1379.
- Mandahl N, Mertens F. 2010. Soft Tissue Tumors. In: *Cancer Cytogenetics*, 3. Auflage (Hrsg.: S. Heim und F. Mitelman), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9781118010136.ch23
- Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P. 1998. Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 19: 87-90.
- Mantovani F, Covaceuszach S, Rustighi A, Sgarra R, Heath C, Goodwin GH, Manfioletti G. 1998. NF-kappaB mediated transcriptional activation is enhanced by the architectural factor HMGI-C. *Nucleic Acids Res* 26: 1433-1439.
- Markowski DN, Bartnitzke S, Belge G, Drieschner N, Helmke BM, Bullerdiek J. 2010b. Cell culture and senescence in uterine fibroids. *Cancer Genet Cytogenet* 202: 53-57.
- Markowski DN, Bartnitzke S, Löning T, Drieschner N, Helmke BM, Bullerdiek J. 2012. MED12 mutations in uterine fibroids - their relationship to cytogenetic subgroups. *Int J Cancer* 131: 1528-1536.
- Markowski DN, Huhle S, Nimzyk R, Stenman G, Löning T, Bullerdiek J. 2013. MED12 mutations occurring in benign and malignant mammalian smooth muscle tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 52: 297-304.
- Markowski DN, von Ahsen I, Nezhad MH, Wosniok W, Helmke BM, Bullerdiek J. 2010a. HMGA2 and the p19Arf-TP53-CDKN1A axis: a delicate balance in the growth of uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 49: 661-668.
- Markowski DN, Winter N, Meyer F, von Ahsen I, Wenk H, Nolte I, Bullerdiek J. 2011. p14Arf acts as an antagonist of HMGA2 in senescence of mesenchymal stem cells-implications for benign tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 50: 489-498.

- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V. 2002. Expression of PAX8-PPAR γ 1 rearrangements in both follicular thyroid carcinomas and adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 3947-3952.
- Marshall LM, Spiegelman D, Barbieri RL, Goldman MB, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Hunter DJ. 1997. Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race. *Obstet Gynecol* 90: 967-973.
- Martelli ML, Iuliano R, Le Pera I, Sama' I, Monaco C, Cammarota S, Kroll T, Chiariotti L, Santoro M, Fusco A. 2002. Inhibitory effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ on thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4728-4735.
- Masciullo V, Baldassarre G, Pentimalli F, Berlingieri MT, Boccia A, Chiappetta G, Palazzo J, Manfioletti G, Giancotti V, Viglietto G, Scambia G, Fusco A. 2003. HMGA1 protein over-expression is a frequent feature of epithelial ovarian carcinomas. *Carcinogenesis* 24: 1191-1198.
- Mashal RD, Fejzo ML, Friedman AJ, Mitchner N, Nowak RA, Rein MS, Morton CC, Sklar J. 1994. Analysis of androgen receptor DNA reveals the independent clonal origins of uterine leiomyomata and the secondary nature of cytogenetic aberrations in the development of leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* 11: 1-6.
- Mayr C, Hemann MT, Bartel DP. 2007. Disrupting the pairing between *let-7* and *Hmga2* enhances oncogenic transformation. *Science* 315: 1576-1579.
- Medeiros F, Wang X, Araujo AR, Erickson-Johnson MR, Lima JF, Meuter A, Winterhoff B, Oliveira AM. 2012. HMGA gene rearrangement is a recurrent somatic alteration in polypoid endometriosis. *Hum Pathol* 43: 1243-1248.
- Meloni AM, Surti U, Contento AM, Davare J, Sandberg AA. 1992. Uterine leiomyomas: cytogenetic and histologic profile. *Obstet Gynecol* 80: 209-217.
- Mine N, Kurose K, Konishi H, Araki T, Nagai H, Emi M. 2001a. Fusion of a sequence from HEI10 (14q11) to the HMGIC gene at 12q15 in a uterine leiomyoma. *Jpn J Cancer Res* 92: 135-139.
- Mine N, Kurose K, Nagai H, Doi D, Ota Y, Yoneyama K, Konishi H, Araki T, Emi M. 2001b. Gene fusion involving HMGIC is a frequent aberration in uterine leiomyomas. *J Hum Genet* 46: 408-412.
- Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, Chada KK, Imai K. 2004. Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer Res* 64: 2024-2029.
- Morishita A, Zaidi MR, Mitoro A, Sankarasharma D, Szabolcs M, Okada Y, D'Armiento J, Chada K. 2013. HMGA2 is a Driver of Tumor Metastasis. *Cancer Res* 73: 4289-4299.
- Munshi N, Merika M, Yie J, Senger K, Chen G, Thanos D. 1998. Acetylation of HMG I(Y) by CBP turns off IFN beta expression by disrupting the enhanceosome. *Mol Cell* 2: 457-467.
- Musholt PB, Musholt TJ, Morgenstern SC, Worm K, Sheu SY, Schmid KW. 2008. Follicular histotypes of oncocytic thyroid carcinomas do not carry mutations of the BRAF hot-spot. *World J Surg* 32: 722-728.
- Mussnich P, D'Angelo D, Leone V, Croce CM, Fusco A. 2013. The High Mobility Group A proteins contribute to thyroid cell transformation by regulating miR-603 and miR-10b expression. *Mol Oncol* 7: 531-542.

N

- Nagpal S, Ghosn C, DiSepio D, Molina Y, Sutter M, Klein ES, Chandraratna RA. 1999. Retinoid-dependent recruitment of a histone H1 displacement activity by retinoic acid receptor. *J Biol Chem* 274: 22563-22568.
- Nakabashi CC, Guimarães GS, Michaluart P Jr, Ward LS, Cerutti JM, Maciel RM. 2004. The expression of PAX8-PPAR γ rearrangements is not specific to follicular thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 61: 280-282.
- Namba H, Rubin SA, Fagin JA. 1990. Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol* 4: 1474-1479.

- Narita M, Narita M, Krizhanovsky V, Nuñez S, Chicas A, Hearn SA, Myers MP, Lowe SW. 2006. A novel role for high-mobility group a proteins in cellular senescence and heterochromatin formation. *Cell* 126: 503-514.
- Newman MA, Thomson JM, Hammond SM. 2008. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* 14: 1539-1549.
- Nielsen GP, Mandahl N. 2002. Lipoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F (Hrsg.) World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone. IARC Press, Lyon, Seiten 20-22.
- Nikiforov YE. 2002. RET/PTC rearrangement in thyroid tumors. *Endocr Pathol* 13: 3-16.
- Nikiforov YE. 2006. Radiation-induced thyroid cancer: what we have learned from chernobyl. *Endocr Pathol* 17: 307-317.
- Nikiforova MN, Kimura ET, Gandhi M, Biddinger PW, Knauf JA, Basolo F, Zhu Z, Giannini R, Salvatore G, Fusco A, Santoro M, Fagin JA, Nikiforov YE. 2003a. 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: 5399-5404.
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE. 2003b. 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: 2318-2326.
- Nikiforova MN, Nikiforov YE. 2008. Molecular genetics of thyroid cancer: implications for diagnosis, treatment and prognosis. *Expert Rev Mol Diagn* 8: 83-95.
- Nilbert M, Heim S. 1990. Uterine leiomyoma cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer* 2: 3-13.
- Nilbert M, Heim S, Mandahl N, Flodérus UM, Willén H, Mitelman F. 1989. Different karyotypic abnormalities, t(1;6) and del(7), in two uterine leiomyomas from the same patient. *Cancer Genet Cytogenet* 42: 51-53.
- Nilbert M, Heim S, Mandahl N, Flodérus UM, Willén H, Mitelman F. 1990a. Characteristic chromosome abnormalities, including rearrangements of 6p, del(7q), +12, and t(12;14), in 44 uterine leiomyomas. *Hum Genet* 85: 605-611.
- Nilbert M, Heim S, Mandahl N, Flodérus UM, Willén H, Mitelman F. 1990b. Trisomy 12 in uterine leiomyomas. A new cytogenetic subgroup. *Cancer Genet Cytogenet* 45: 63-66.
- Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ. 2008. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135: 227-239.
- Nissen MS, Langan TA, Reeves R. 1991. Phosphorylation by cdc2 kinase modulates DNA binding activity of high mobility group I nonhistone chromatin protein. *J Biol Chem* 266: 19945-19952.
- Noro B, Licheri B, Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, Chau KY, Ono SJ, Giancotti V, Manfioletti G. 2003. Molecular dissection of the architectural transcription factor HMGA2. *Biochemistry* 42: 4569-4577.
- Nucci MR, Weremowicz S, Neskey DM, Sornberger K, Tallini G, Morton CC, Quade BJ. 2001. Chromosomal translocation t(8;12) induces aberrant HMGIC expression in aggressive angiomyxoma of the vulva. *Genes Chromosomes Cancer* 32: 172-176.

O

- Oñate SA, Prendergast P, Wagner JP, Nissen M, Reeves R, Pettijohn DE, Edwards DP. 1994. The DNA-bending protein HMG-1 enhances progesterone receptor binding to its target DNA sequences. *Mol Cell Biol* 14: 3376-3391.
- Oyama T, Suzuki T, Hara F, Iino Y, Ishida T, Sakamoto A, Nakajima T. 1995. N-ras mutation of thyroid tumor with special reference to the follicular type. *Pathol Int* 45: 45-50.
- Ozisik YY, Meloni AM, Altungoz O, Surti U, Sandberg AA. 1995. Translocation (6;10)(p21;q22) in uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet* 79: 136-138.
- Ozisik YY, Meloni AM, Surti U, Sandberg AA. 1993. Deletion 7q22 in uterine leiomyoma. A cytogenetic review. *Cancer Genet Cytogenet* 71: 1-6.

P

- Pallasch CP, Patz M, Park YJ, Hagist S, Eggle D, Claus R, Debey-Pascher S, Schulz A, Frenzel LP, Claasen J, Kutsch N, Krause G, Mayr C, Rosenwald A, Plass C, Schultze JL, Hallek M, Wendtner CM. 2009. miRNA deregulation by epigenetic silencing disrupts suppression of the oncogene PLAG1 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 114: 3255-3264.
- Pandis N, Heim S, Bardi G, Flodérus UM, Willén H, Mandahl N, Mitelman F. 1991. Chromosome analysis of 96 uterine leiomyomas. *Cancer Genet Cytogenet* 55: 11-18.
- Park SM, Shell S, Radjabi AR, Schickel R, Feig C, Boyerinas B, Dinulescu DM, Lengyel E, Peter ME. 2007. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. *Cell Cycle* 6: 2585-2590.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108.
- Paull TT, Haykinson MJ, Johnson RC. 1993. The nonspecific DNA-binding and -bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures. *Genes Dev* 7: 1521-1534.
- Peinado H, Ballestar E, Esteller M, Cano A. 2004. Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex. *Mol Cell Biol* 24: 306-319.
- Peluso S, Chiappetta G. 2010. High-Mobility Group A (HMGA) Proteins and Breast Cancer. *Breast Care (Basel)* 5: 81-85.
- Peng Y, Laser J, Shi G, Mittal K, Melamed J, Lee P, Wei JJ. 2008. Antiproliferative effects by *Let-7* repression of high-mobility group A2 in uterine leiomyoma. *Mol Cancer Res* 6: 663-673.
- Pérot G, Croce S, Ribeiro A, Lagarde P, Velasco V, Neuville A, Coindre JM, Stoeckle E, Floquet A, MacGrogan G, Chibon F. 2012. MED12 alterations in both human benign and malignant uterine soft tissue tumors. *PLoS One* 7: e40015.
- Petit MM, Mols R, Schoenmakers EF, Mandahl N, Van de Ven WJ. 1996. *LPP*, the preferred fusion partner gene of *HMGIC* in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics* 36: 118-129.
- Pierantoni GM, Rinaldo C, Esposito F, Mottolese M, Soddu S, Fusco A. 2006. High Mobility Group A1 (HMGA1) proteins interact with p53 and inhibit its apoptotic activity. *Cell Death Differ* 13: 1554-1563.
- Pil PM, Chow CS, Lippard SJ. 1993. High-mobility-group 1 protein mediates DNA bending as determined by ring closures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9465-9469.
- Pil PM, Lippard SJ. 1992. Specific binding of chromosomal protein HMG1 to DNA damaged by the anticancer drug cisplatin. *Science* 256: 234-237.
- Pilli T, Prasad KV, Jayarama S, Pacini F, Prabhakar BS. 2009. Potential utility and limitations of thyroid cancer cell lines as models for studying thyroid cancer. *Thyroid* 19: 1333-1342.
- Prasad NB, Somervell H, Tufano RP, Dackiw AP, Marohn MR, Califano JA, Wang Y, Westra WH, Clark DP, Umbricht CB, Libutti SK, Zeiger MA. 2008. Identification of genes differentially expressed in benign versus malignant thyroid tumors. *Clin Cancer Res* 14: 3327-3337.

Q

- Quade BJ, Weremowicz S, Neskey DM, Vanni R, Ladd C, Dal Cin P, Morton CC. 2003. Fusion transcripts involving *HMGA2* are not a common molecular mechanism in uterine leiomyomata with rearrangements in 12q15. *Cancer Res* 63: 1351-1358.

R

- Rabban JT, Dal Cin P, Oliva E. 2006. HMGA2 rearrangement in a case of vulvar aggressive angiomyxoma. *Int J Gynecol Pathol* 25: 403-407.
- Rana TM. 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 23-36.

- Ravegnini G, Mariño-Enriquez A, Slater J, Eilers G, Wang Y, Zhu M, Nucci MR, George S, Angelini S, Raut CP, Fletcher JA. 2013. MED12 mutations in leiomyosarcoma and extrauterine leiomyoma. *Mod Pathol* 26: 739-749.
- Read CM, Cary PD, Crane-Robinson C, Driscoll PC, Norman DG. 1993. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res* 21: 3427-3436.
- Reeves R, Adair JE. 2005. Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 4: 926-938.
- Reeves R, Edberg DD, Li Y. 2001. Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Mol Cell Biol* 21: 575-594.
- Reeves R, Elton TS, Nissen MS, Lehn D, Johnson KR. 1987. Posttranscriptional gene regulation and specific binding of the nonhistone protein HMG-I by the 3' untranslated region of bovine interleukin 2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6531-6535.
- Reeves R, Nissen MS. 1990. The A.T-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 265: 8573-8582.
- Rein MS, Friedman AJ, Barbieri RL, Pavelka K, Fletcher JA, Morton CC. 1991. Cytogenetic abnormalities in uterine leiomyomata. *Obstet Gynecol* 77: 923-926.
- Rho YS, Lim YC, Park IS, Kim JH, Ahn HY, Cho SJ, Shin HS. 2007. High mobility group HMGI(Y) protein expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 127: 76-81.
- Röpke A, Kalinski T, Kluba U, von Falkenhausen U, Wieacker PF, Röpke M. 2007. PLAG1 activation in lipoblastoma coinciding with low-level amplification of a derivative chromosome 8 with a deletion del(8)(q13q21.2). *Cytogenet Genome Res* 119: 33-38.
- Rogalla P, Drechsler K, Frey G, Hennig Y, Helmke B, Bonk U, Bullerdiek J. 1996. HMGI-C expression patterns in human tissues. Implications for the genesis of frequent mesenchymal tumors. *Am J Pathol* 149: 775-779.
- Rogalla P, Drechsler K, Kazmierczak B, Rippe V, Bonk U, Bullerdiek J. 1997. Expression of HMGI-C, a member of the high mobility group protein family, in a subset of breast cancers: relationship to histologic grade. *Mol Carcinog* 19: 153-156.
- Rogalla P, Drechsler K, Schröder-Babo W, Eberhardt K, Bullerdiek J. 1998b. HMGIC expression patterns in non-small lung cancer and surrounding tissue. *Anticancer Res* 18: 3327-3330.
- Rogalla P, Kazmierczak B, Meyer-Bolte K, Tran KH, Bullerdiek J. 1998a. The t(3;12)(q27;q14-q15) with underlying HMGIC-LPP fusion is not determining an adipocytic phenotype. *Genes Chromosomes Cancer* 22: 100-104.
- Rogalla P, Lemke I, Kazmierczak B, Bullerdiek J. 2000. An identical HMGIC-LPP fusion transcript is consistently expressed in pulmonary chondroid hamartomas with t(3;12)(q27-28;q14-15). *Genes Chromosomes Cancer* 29: 363-366.
- Rohen C, Rogalla P, Meyer-Bolte K, Bartnitzke S, Chilla R, Bullerdiek J. 1999. Pleomorphic adenomas of the salivary glands: absence of HMGIY rearrangements. *Cancer Genet Cytogenet* 111: 178-181.
- Roque L, Castedo S, Gomes P, Soares P, Clode A, Soares J. 1993. Cytogenetic findings in 18 follicular thyroid adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 67: 1-6.
- Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA. 1992. Tumors of the thyroid gland. *Atlas of tumor pathology*. Washington, D. C.
- Rosai J, Kuhn E, Carcangiu ML. 2006. Pitfalls in thyroid tumour pathology. *Histopathology* 49: 107-120.
- Rosai J, LiVolsi VA, Sobrinho-Simoes M, Williams ED. 2003. Renaming papillary microcarcinoma of the thyroid gland: the Porto proposal. *Int J Surg Pathol* 11: 249-251.
- Rustighi A, Mantovani F, Fusco A, Giancotti V, Manfioletti G. 1999. Sp1 and CTF/NF-1 transcription factors are involved in the basal expression of the Hmgi-c proximal promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 439-447.

Rustighi A, Tessari MA, Vascotto F, Sgarra R, Giancotti V, Manfioletti G. 2002. A polypyrimidine/polypurine tract within the Hmga2 minimal promoter: a common feature of many growth-related genes. *Biochemistry* 41: 1229-1240.

S

Sait SN, Dal Cin P, Ovanessoff S, Sandberg AA. 1989. A uterine leiomyoma showing both t(12;14) and del(7) abnormalities. *Cancer Genet Cytogenet* 37: 157-161.

Sandberg AA. 2005. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: leiomyoma. *Cancer Genet Cytogenet* 158: 1-26.

Sandros J, Stenman G, Mark J. 1990. Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 44: 153-167.

Sargent MS, Weremowicz S, Rein MS, Morton CC. 1994. Translocations in 7q22 define a critical region in uterine leiomyomata. *Cancer Genet Cytogenet* 77: 65-68.

Scala S, Portella G, Vitagliano D, Ledent C, Chiappetta G, Giancotti V, Dumont J, Fusco A. 2001. HMGI-C gene expression is not required for in vivo thyroid cell transformation. *Carcinogenesis* 22: 251-256.

Schmid KW. 2010a. Pathogenese, Klassifikation und Histologie von Schilddrüsenkarzinomen. *Onkologie* 16: 644-656.

Schmid KW. 2010b. Molekularpathologie von Schilddrüsentumoren. *Pathologie* 31 (Supplement 2): 229-233.

Schmid KW, Farid NR. 2006. How to define follicular thyroid carcinoma? *Virchows Arch* 448: 385-393.

Schmid KW, Sheu SY, Görges R, Ensinger C, Tötsch M. 2003. Tumoren der Schilddrüse. *Pathologie* 24: 357-372.

Schmid KW, Sheu SY, Tötsch M, Görges R, Bockisch A, Mann K. 2005. Pathologie des Schilddrüsenkarzinoms. *Onkologie* 11: 29-39.

Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nat Protoc* 3: 1101-1108.

Schoenberg Fejzo M, Ashar HR, Krauter KS, Powell WL, Rein MS, Weremowicz S, Yoon SJ, Kucherlapati RS, Chada K, Morton CC. 1996. Translocation breakpoints upstream of the *HMGIC* gene in uterine leiomyomata suggest dysregulation of this gene by a mechanism different from that in lipomas. *Genes Chromosomes Cancer* 17: 1-6.

Schoenberg Fejzo M, Yoon SJ, Montgomery KT, Rein MS, Weremowicz S, Krauter KS, Dorman TE, Fletcher JA, Mao JI, Moir DT, Kucherlapati RS, Morton CC. 1995. Identification of a YAC spanning the translocation breakpoints in uterine leiomyomata, pulmonary chondroid hamartoma, and lipoma: physical mapping of the 12q14-q15 breakpoint region in uterine leiomyomata. *Genomics* 26: 265-271.

Schoenmakers EF, Huysmans C, Van de Ven WJ. 1999. Allelic knockout of novel splice variants of human recombination repair gene *RAD51B* in t(12;14) uterine leiomyomas. *Cancer Res* 59: 19-23.

Schoenmakers EF, Kools PF, Mols R, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Bullerdiek J, Dal Cin P, De Jong PJ, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. 1994. Physical mapping of chromosome 12q breakpoints in lipoma, pleomorphic salivary gland adenoma, uterine leiomyoma, and myxoid liposarcoma. *Genomics* 20: 210-222.

Schoenmakers EF, Wanschura S, Mols R, Bullerdiek J, Van den Berghe H, Van de Ven WJ. 1995. Recurrent rearrangements in the high mobility group protein gene, *HMGIC*, in benign mesenchymal tumours. *Nat Genet* 10: 436-444.

Schröder S. 1988. Pathologie und Klinik maligner Schilddrüsentumoren. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Schwanbeck R, Manfioletti G, Wiśniewski JR. 2000. Architecture of high mobility group protein I-C.DNA complex and its perturbation upon phosphorylation by Cdc2 kinase. *J Biol Chem* 275: 1793-1801.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 199-208.

- Schweppe RE, Klopper JP, Korch C, Pugazhenth U, Benezra M, Knauf JA, Fagin JA, Marlow LA, Copland JA, Smallridge RC, Haugen BR. 2008. Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4331-4341.
- Seville LL, Shah N, Westwell AD, Chan WC. 2005. Modulation of pRB/E2F functions in the regulation of cell cycle and in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 5: 159-170.
- Sgarra R, Diana F, Bellarosa C, Dekleva V, Rustighi A, Toller M, Manfioletti G, Giacotti V. 2003a. During apoptosis of tumor cells HMGA1a protein undergoes methylation: identification of the modification site by mass spectrometry. *Biochemistry* 42: 3575-3585.
- Sgarra R, Diana F, Rustighi A, Manfioletti G, Giacotti V. 2003b. Increase of HMGA1a protein methylation is a distinctive characteristic of leukaemic cells induced to undergo apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 386-389.
- Sgarra R, Maurizio E, Zammiti S, Lo Sardo A, Giacotti V, Manfioletti G. 2009. Macroscopic differences in HMGA oncoproteins post-translational modifications: C-terminal phosphorylation of HMGA2 affects its DNA binding properties. *J Proteome Res* 8: 2978-2989.
- Shah SN, Kerr C, Cope L, Zambidis E, Liu C, Hillion J, Belton A, Huso DL, Resar LM. 2012. HMGA1 reprograms somatic cells into pluripotent stem cells by inducing stem cell transcriptional networks. *PLoS One* 7: e48533.
- Sheflin LG, Fucile NW, Spaulding SW. 1993. The specific interactions of HMG 1 and 2 with negatively supercoiled DNA are modulated by their acidic C-terminal domains and involve cysteine residues in their HMG 1/2 boxes. *Biochemistry* 32: 3238-3248.
- Shell S, Park SM, Radjabi AR, Schickel R, Kistner EO, Jewell DA, Feig C, Lengyel E, Peter ME. 2007. Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11400-11405.
- Sheu SY, Görges R, Schmid KW. 2003. Hyperplasien der Schilddrüse. *Pathologe* 24: 348-356.
- Smith J, Cheifetz RE, Schneiderei N, Berean K, Thomson T. 2005. Can cytology accurately predict benign follicular nodules? *Am J Surg* 189: 592-595.
- Soares P, Trovisco V, Rocha AS, Lima J, Castro P, Preto A, Máximo V, Botelho T, Seruca R, Sobrinho-Simões M. 2003. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. *Oncogene* 22: 4578-4580.
- Solomon MJ, Strauss F, Varshavsky A. 1986. A mammalian high mobility group protein recognizes any stretch of six A.T base pairs in duplex DNA. *Proc Natl Sci U S A* 83: 1276-1280.
- Sornberger KS, Weremowicz S, Williams AJ, Quade BJ, Ligon AH, Pedoutour F, Vanni R, Morton CC. 1999. Expression of HMG1Y in three uterine leiomyomata with complex rearrangements of chromosome 6. *Cancer Genet Cytogenet* 114: 9-16.
- Sozzi G, Miozzo M, Cariani TC, Bongarzone I, Pilotti S, Pierotti MA, Della Porta G. 1992. A t(2;3)(q12-13;p24-25) in follicular thyroid adenomas. *Cancer Genet Cytogenet* 64: 38-41.
- Sreekantaiah C, Leong SPL, Karakousis CP, McGee DL, Rappaport WD, Villar HV, Neal D, Fleming S, Wankel A, Herrington PN, Carmona R, Sandberg AA. 1991. Cytogenetic profile of 109 lipomas. *Cancer Res* 51: 422-433.
- Stenman G, Mark J, Ekedhal C. 1984. Relationships between chromosomal patterns and protooncogenes in human benign salivary gland tumors. *Tumour Biol* 5: 103-117.
- Stewart EA. 2001. Uterine fibroids. *Lancet* 357: 293-298.
- Stros M, Kolíbalová A. 1987. Interaction of non-histone proteins HMG1 and HMG2 with core histones in nucleosomes and core particles revealed by chemical cross-linking. *Eur J Biochem* 162: 111-118.

T

- Taatjes DJ. 2010. The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem Sci* 35: 315-322.
- Takano T. 2011. The fifteen percent issue in molecular-based diagnosis of follicular thyroid carcinoma. *Pathol Int* 61: 165-166.

- Tallini G, Vanni R, Manfioletti G, Kazmierczak B, Faa G, Pauwels P, Bullerdiel J, Giancotti V, Van Den Berghe H, Dal Cin P. 2000. HMGI-C and HMGI(Y) immunoreactivity correlates with cytogenetic abnormalities in lipomas, pulmonary chondroid hamartomas, endometrial polyps, and uterine leiomyomas and is compatible with rearrangement of the HMGI-C and HMGI(Y) genes. *Lab Invest* 80: 359-369.
- Tamimi Y, van der Poel HG, Denyn MM, Umbas R, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA. 1993. Increased expression of high mobility group protein I(Y) in high grade prostatic cancer determined by in situ hybridization. *Cancer Res* 53: 5512-5516.
- Tamimi Y, van der Poel HG, Karthaus HF, Debruyne FM, Schalken JA. 1996. A retrospective study of high mobility group protein I(Y) as progression marker for prostate cancer determined by in situ hybridization. *Br J Cancer* 74: 573-578.
- Tan EJ, Thuault S, Caja L, Carletti T, Heldin CH, Moustakas A. 2012. Regulation of transcription factor Twist expression by the DNA architectural protein high mobility group A2 during epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 287: 7134-7145.
- Tessari MA, Gostissa M, Altamura S, Sgarra R, Rustighi A, Salvagno C, Caretti G, Imbriano C, Mantovani R, Del Sal G, Giancotti V, Manfioletti G. 2003. Transcriptional activation of the cyclin A gene by the architectural transcription factor HMGA2. *Mol Cell Biol* 23: 9104-9116.
- Teyssier JR, Liautaud-Roger F, Ferre D, Patey M, Dufer J. 1990. Chromosomal changes in thyroid tumors. Relation with DNA content, karyotypic features, and clinical data. *Cancer Genet Cytogenet* 50: 249-263.
- Thanos D, Maniatis T. 1992. The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-kappa B-dependent virus induction of the human IFN-beta gene. *Cell* 71: 777-789.
- Thanos D, Maniatis T. 1995. Virus induction of human IFN beta gene expression requires the assembly of an enhanceosome. *Cell* 83: 1091-1100.
- Thomas GA, Williams D, Williams ED. 1989. The clonal origin of thyroid nodules and adenomas. *Am J Pathol* 134: 141-147.
- Thuault S, Tan EJ, Peinado H, Cano A, Heldin CH, Moustakas A. 2008. HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Biol Chem* 283: 33437-33446.
- Thuault S, Valcourt U, Petersen M, Manfioletti G, Heldin CH, Moustakas A. 2006. Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 174: 175-183.
- Townsend DE, Sparkes RS, Baluda MC, McClelland G. 1970. Unicellular histogenesis of uterine leiomyomas as determined by electrophoresis by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Am J Obstet Gynecol* 107: 1168-1173.
- Trieschmann L, Postnikov YV, Rickers A, Bustin M. 1995. Modular structure of chromosomal proteins HMG-14 and HMG-17: definition of a transcriptional enhancement domain distinct from the nucleosomal binding domain. *Mol Cell Biol* 15: 6663-6669.
- Trovisco V, Soares P, Preto A, de Castro IV, Lima J, Castro P, Máximo V, Botelho T, Moreira S, Meireles AM, Magalhães J, Abrosimov A, Cameselle-Teijeiro J, Sobrinho-Simões M. 2005. Type and prevalence of BRAF mutations are closely associated with papillary thyroid carcinoma histotype and patients' age but not with tumour aggressiveness. *Virchows Arch* 446: 589-595.
- Trovisco V, Vieira de Castro I, Soares P, Máximo V, Silva P, Magalhães J, Abrosimov A, Guiu XM, Sobrinho-Simões M. 2004. BRAF mutations are associated with some histological types of papillary thyroid carcinoma. *J Pathol* 202: 247-251.

V

- Vallone D, Battista S, Pierantoni GM, Fedele M, Casalino L, Santoro M, Viglietto G, Fusco A, Verde P. 1997. Neoplastic transformation of rat thyroid cells requires the *junB* and *fra-1* gene induction which is dependent on the HMGI-C gene product. *EMBO J* 16: 5310-5321.
- van Gent DC, Hiom K, Paull TT, Gellert M. 1997. Stimulation of V(D)J cleavage by high mobility group proteins. *EMBO J* 16: 2665-2670.
- van Heyningen V. 1994. One gene - four syndromes. *Nature* 367: 319-320.

Vanni R, Dal Cin P, Marras S, Moerman P, Andria M, Valdes E, Deprest J, Van den Berghe H. 1993. Endometrial polyp: another benign tumor characterized by 12q13-q15 changes. *Cancer Genet Cytogenet* 68: 32-33.

Vanni R, Van Roy N, Lecca U, Speleman F. 1992. Uterine leiomyoma cytogenetics. III. Interphase cytogenetic analysis of karyotypically normal uterine leiomyoma excludes possibility of undetected trisomy 12. *Cancer Genet Cytogenet.* 62: 40-42.

Verrier CS, Roodi N, Yee CJ, Bailey LR, Jensen RA, Bustin M, Parl FF. 1997. High-mobility group (HMG) protein HMG-1 and TATA-binding protein-associated factor TAF(II)30 affect estrogen receptor-mediated transcriptional activation. *Mol Endocrinol* 11: 1009-1019.

Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI. 2008. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320: 97-100.

von Ahsen I, Nimzyk R, Klemke M, Bullerdiek J. 2008. A microRNA encoded in a highly conserved part of the mammalian *HMGA2* gene. *Cancer Genet Cytogenet* 187: 43-44.

Vriens MR, Schreinemakers JM, Suh I, Guerrero MA, Clark OH. 2009. Diagnostic markers and prognostic factors in thyroid cancer. *Future Oncol* 5: 1283-1293.

W

Walter TA, Fan SX, Medchill MT, Berger CS, Decker HJ, Sandberg AA. 1989. *inv(12)(p11.2q13)* in an endometrial polyp. *Cancer Genet Cytogenet* 41: 99-103.

Wan PT, Garnett MJ, Roe SM, Lee S, Niculescu-Duvaz D, Good VM, Jones CM, Marshall CJ, Springer CJ, Barford D, Marais R; Cancer Genome Project. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855-867.

Wang T, Zhang X, Obijuru L, Laser J, Aris V, Lee P, Mittal K, Soteropoulos P, Wei JJ. 2007. A microRNA signature associated with race, tumor size, and target gene activity in human uterine leiomyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 46: 336-347.

Wanschura S, Dal Cin P, Kazmierczak B, Bartnitzke S, Van den Berghe H, Bullerdiek J. 1997. Hidden paracentric inversions of chromosome arm 12q affecting the *HMGIC* gene. *Genes Chromosomes Cancer* 18: 322-323.

Weir HM, Kraulis PJ, Hill CS, Raine AR, Laue ED, Thomas JO. 1993. Structure of the HMG box motif in the B-domain of HMG1. *EMBO J* 12: 1311-1319.

WHO histological classification of thyroid and parathyroid tumours. 2004. In: DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (Hrsg.). *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Endocrine Organs.* IARC Press, Lyon, 49-123.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75: 855-862.

Williams AJ, Powell WL, Collins T, Morton CC. 1997. HMGI(Y) expression in human uterine leiomyomata. Involvement of another high-mobility group architectural factor in a benign neoplasm. *Am J Pathol* 150: 911-918.

Williams D. 2008. Radiation carcinogenesis: lessons from Chernobyl. *Oncogene* 27 Suppl 2: S9-18.

Wolffe AP. 1994. Architectural transcription factors. *Science* 264: 1100-1101.

Wong IL, Nelson LM, Ward K. 1992. Uterine leiomyomata are clonal tumors as determined by an X chromosome methylation sensitive DNA polymorphism. 39th Annual Meeting of the Society for Gynecologic Investigation, San Antonio, Texas.

Wu J, Liu Z, Shao C, Gong Y, Hernando E, Lee P, Narita M, Muller W, Liu J, Wei JJ. 2011. HMGA2 overexpression-induced ovarian surface epithelial transformation is mediated through regulation of EMT genes. *Cancer Res* 71: 349-359.

X

Xiao S, Lux ML, Reeves R, Hudson TJ, Fletcher JA. 1997. HMGI(Y) activation by chromosome 6p21 rearrangements in multilineage mesenchymal cells from pulmonary hamartoma. *Am J Pathol* 150: 901-910.

Xing M. 2007. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr Rev* 28: 742-762.

Xing M. 2008. Recent advances in molecular biology of thyroid cancer and their clinical implications. *Otolaryngol Clin North Am* 41: 1135-1146.

Xu X, Quiros RM, Gattuso P, Ain KB, Prinz RA. 2003. High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 63: 4561-4567.

Y

Yie J, Merika M, Munshi N, Chen G, Thanos D. 1999. The role of HMG I(Y) in the assembly and function of the IFN-beta enhanceosome. *EMBO J* 18: 3074-3089.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.

Z

Zaloudek C, Norris HJ. Mesenchymal tumors of the uterus. In: Kurman RJ (Hrsg.), *Blaustein's pathology of the female genital tract*, New York: Springer-Verlag, 3rd ed., 1987: 373-408.

Zappavigna V, Falciola L, Helmer-Citterich M, Mavilio F, Bianchi ME. 1996. HMG1 interacts with HOX proteins and enhances their DNA binding and transcriptional activation. *EMBO J* 15: 4981-4991.

Zatkova A, Rouillard JM, Hartmann W, Lamb BJ, Kuick R, Eckart M, von Schweinitz D, Koch A, Fonatsch C, Pietsch T, Hanash SM, Wimmer K. 2004. Amplification and overexpression of the IGF2 regulator PLAG1 in hepatoblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 39:126-137.

Zhang P, Zhang C, Hao J, Sung CJ, Quddus MR, Steinhoff MM, Lawrence WD. 2006. Use of X-chromosome inactivation pattern to determine the clonal origins of uterine leiomyoma and leiomyosarcoma. *Hum Pathol* 37: 1350-1356.

Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K. 1995. Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 376: 771-774.

Zhu C, Li J, Cheng G, Zhou H, Tao L, Cai H, Li P, Cao Q, Ju X, Meng X, Wang M, Zhang Z, Qin C, Hua L, Yin C, Shao P. 2013. miR-154 inhibits EMT by targeting HMGA2 in prostate cancer cells. *Mol Cell Biochem* 379: 69-75.

Zhu Z, Gandhi M, Nikiforova MN, Fischer AH, Nikiforov YE. 2003. Molecular profile and clinical-pathologic features of the follicular variant of papillary thyroid carcinoma. An unusually high prevalence of ras mutations. *Am J Clin Pathol* 120: 71-77.

9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADSC	Adipöse, mesenchymale Stammzellen
AKT	Proteinkinase B
ALDH2	Aldehyd-Dehydrogenase 2
AP1	Aktivatorprotein 1 (Transkriptionsfaktor)
ATC	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
ATF-2	Aktivierender Transkriptionsfaktor 2
Bcl-2	Mitochondriales Membranprotein B-cell CLL/lymphoma 2
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, Serin-Threonin-spezifische Proteinkinase
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CBP	CREB-Bindeprotein (CREBBP)
CCNA2	Cyclin A2
CDKN2A	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor 2A
cDNA	copy DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
cMYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian), nukleäres Phosphoprotein
CRE	cAMP-responsives Element
CREB	cAMP-responsives Element Bindeprotein
CTNNB1	Catenin (Cadherin-assoziiertes Protein), beta 1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2F1	E2F Transkriptionsfaktor 1
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ERCC1	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1
FAM	6-Carboxyfluorescein
FGF1	Fibroblast growth factor 1
FHIT	Fragile Histidine Triad
FHL1	Four and a half LIM domains 1
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FNAB	Feinnadel-Aspirationsbiopsie
FOSL1	FOS-like antigen 1 (FRA1)

FOXO3a	Forkhead box O3a
FTC	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
FVPTC	Follikuläre Variante eines papillären Schilddrüsenkarzinoms
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HDAC1	Histon-Deacetylase 1
HEI10	CCNB1IP1, Cyclin B1 interacting protein 1, E3 ubiquitin protein ligase
HMG	High mobility group
HMGA1	High mobility group protein AT-Hook 1
HMGA2	High mobility group protein AT-Hook 1
HMGB1/2	High mobility group protein box 1/2
HMGN	High mobility group nucleosomal binding domain
HPRT1	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1
HRAS	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IE	Internationale Einheit
I-FISH	Interphase-FISH
IFNB1	Interferon, beta 1, fibroblast
IFN- β	Interferon- β
IGF2BP2	Insulin-like growth factor II mRNA binding protein 2 (IMP2)
IHC	Immunhistochemie
let-7	MicroRNA let-7 (lethal-7)
Lin-28	lin-28 homolog A (C. elegans) (LIN28)
LPP	LIM domain containing preferred translocation partner in lipoma
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDM2	MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase
MED12	Mediator complex subunit 12
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
MGB	minor groove binder
miRNA, miR	MicroRNA
M-MLV	Moloney Murines Leukämievirus
mRNA	messenger-RNA
MTC	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
NFIB	Nukleärer Faktor I/B
NF- κ B	Nukleärer Faktor Kappa B
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NTRK1	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
p53	Tumorprotein p53 (TP53)

PASG	Pleomorphes Speicheldrüsenadenom
PAX8	Paired box 8
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PLAG1	Pleiomorphic adenoma gene 1
PPARG	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
pRB	Retinoblastoma 1 (RB1)
PRDII	Positive regulatory domain II (IFN- β -Promotor)
PTC	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR	Quantitative Real-Time RT-PCR
RAD51B	RAD51 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)
RET/PTC	ret proto-oncogene („rearranged during transfection“), Rezeptor-Tyrosinkinase
RISC	RNA-induced silencing complex
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SELE	Selectin E
siRNA	small interfering RNA
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2 (Transkriptionsfaktor)
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNM	Klassifikation zur Stadieneinteilung maligner Tumoren (Tumor, Lymphknoten, Metastasen)
UTF1	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1
UTR	Nichttranslatierte Region
WHO	Weltgesundheitsorganisation
FFPE	formalin fixed, paraffin embedded
C _T	Cycle threshold
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
LB	Lysogeny Broth Nährmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid

10 ERKLÄRUNG

Erklärung gemäß §6 (5) der Promotionsordnung der Universität Bremen für die mathematischen, natur- und ingenieurwissenschaftlichen Fachbereiche vom 14. März 2007

Hiermit erkläre ich, Markus Klemke, geboren am 11. Juni 1979 in Bremen, daß ich die vorliegende Dissertationsschrift mit dem Titel „Vergleichende molekulargenetische Untersuchungen benigner mesenchymaler und maligner epithelialer Tumoren unter besonderer Berücksichtigung des Schilddrüsenkarzinoms“ selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Bremen, den 25. November 2013

Markus Klemke

11 DANKSAGUNG

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Jörn Bullerdiek dafür, daß er mir die Umsetzung meines Promotionsvorhabens im Zentrum für Humangenetik ermöglicht und dasselbe betreut hat, für zahlreiche Anregungen und Diskussionen sowie für die Übernahme des Referats.

Herrn Prof. Dr. Andreas Dotzauer danke ich für die Übernahme des Korreferats. Außerdem danke ich Frau Prof. Dr. Ursula Dicke, Herrn PD Dr. Gazanfer Belge, Frau Marietta Müller und Frau Claudia Krupinski für ihre Teilnahme am Prüfungsausschuß.

Des weiteren danke ich PD Dr. Burkhard M. Helmke, Käte Burchardt, Prof. Dr. Klaus Junker, PD Dr. Wolfgang Sendt, Dr. Heiko Dirks, Prof. Dr. Ernst Heinrich Schmidt, Prof. Dr. Christiane Frantzen und Dr. Gudrun Michael, ohne deren Kooperationsbereitschaft diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Überaus dankbar bin ich außerdem Dr. Nina Winter und Dr. Norbert Drieschner, die wertvolle Anmerkungen und Hinweise zu dieser Arbeit geliefert haben.

Vielen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen möchte ich einerseits für fachliche Diskussionen, Hilfestellungen und Ratschläge, andererseits aber auch für fachfremde Unterhaltungen, für das gesellige Konsumieren zweier Alkaloide, sowie für all die heiteren Momente im ZHG danken, für die sie gesorgt haben: Dr. Nina Winter (wir sehen uns hoffentlich nicht erst in Freißenbüttel \m/), Marietta Müller (bis zum Juni muß der Käfer fertig sein!), Dr. Andreas Richter, Lars Kloth, Dr. Norbert Drieschner, PD Dr. Gazanfer Belge, Arlo Radtke, Dr. Yvonne Kiefer, Martina Lübbling, Henrieke Förster, Meike Spiekermann, Bianca Burchardt, Svenja Kerschling, Rebecca Schröder, Laura Rogge, Dr. Nicola Reimann-Berg, Dr. Inga von Ahsen, Dr. Dominique Markowski (wenn's mal wieder „Ernst“ wurde), Helge Thies, Inga Flor, Dr. Rolf Nimzyk, Dr. André Fehr, Dr. Anke Meyer, Dr. Birgit Rommel, Dr. Sabine Bartnitzke, Dr. Siegfried Loeschke, Daniela Begandt, Anne Laabs und Angelika Schneider-Uhlhorn.

Won't forget these days!

Ebenso möchte ich folgenden Personen für langjährige Freundschaften danken, deren Bedeutung auch ohne weitere Ausführungen hoffentlich allen bewußt ist: Nadine Rogge, Michael Jöckel, Dörte Kaufhold, Henning Söder, Meike und Marco Ehrich, Katrin Wendhut,

Verena Hell, Susanne Mahnkopf, Corinna Colell und Ingo Oehlkers, Sarah und Jan Hochlenert, Fabian Arndt und Michael Bohlmann.

Noch nicht ganz so langjährig aber deswegen nicht minder geschätzt ist die Freundschaft mit Nadine Müller, der ich für interessante Gespräche ebenso wie für die Begleitung zu In Extremo-Konzerten mit einem Zitat danken möchte, das zwar nicht von InEx, aber aus Omnia Sol Temperat stammt: Sum presentialiter absens in remota.

Meinen Eltern Gisela und Günter Klemke bin ich für ihre ausdauernde Unterstützung zu besonderem Dank verpflichtet. Meiner Schwester Christina Klemke danke ich darüber hinaus für ihre Hilfe bei syntaktischen Problemen, die während des Verfassens dieser Dissertation auftraten. Großer Dank gebührt auch meinen Großeltern Marianne und Karl Wenzel, auf deren Unterstützung ich ebenfalls immer zählen konnte.

Ganz besonders danke ich Nicole Kroog für die aufgebrachte Geduld, ihr Verständnis und vor allem für die Kraft, die sie mir in den vergangenen Jahren gegeben hat.