



Analyse genetischer Stabilität in den Nachkommen bestrahlter Zellen mittels
klassischer Chromosomenbänderung und verschiedener
Hochdurchsatz-Techniken

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Julia Flunkert

geboren in

Schwerte

Würzburg, 2018

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Thomas Dandekar

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Eidesstattliche Versicherung

Die vorliegende Arbeit wurde von November 2014 bis September 2018 am Institut für Humangenetik der Universität Würzburg unter Betreuung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Haaf angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „Analyse genetischer Stabilität in den Nachkommen bestrahlter Zellen mittels klassischer Chromosomenbänderung und verschiedener Hochdurchsatz-Techniken“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Am 17.09.2012 wurde mir von der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg der akademische Grad „Bachelor of Science“ und am 23.10.2014 der „Master of Science“ verliehen. Weitere akademische Grade habe ich weder erworben noch zu erwerben versucht.

.....
Ort, Datum

.....
Unterschrift (Julia Flunkert)

Zusammenfassung

Ionisierende Strahlung (IR) ist in der medizinischen Diagnostik und in der Tumorthherapie von zentraler Bedeutung, kann aber Genominstabilität und Krebs auslösen. Strahleninduzierte Genominstabilität (RIGI) ist in den klonalen Nachkommen bestrahlter Zellen zu beobachten, die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch unverstanden. Zur Erforschung von verzögerten Strahleneffekten wurden primäre embryonale Fibroblastenkulturen mit 2 Gray bestrahlt und für 20 Populationsverdopplungen klonal expandiert. Zellen, die keiner Strahlung ausgesetzt waren, dienten als Kontrolle für normale Alterungsprozesse. Die Klone wurden durch klassische Chromosomenbänderungstechniken analysiert und in Abhängigkeit der Stabilität ihres Genoms in Gruppen eingeteilt. Ein Klon wurde als stabil gewertet, wenn die analysierten Metaphasen keinerlei Auffälligkeiten zeigten, während instabile Klone ein Mosaik aus normalen und abnormalen Metaphasen waren. Die Zellen von zwei Spendern wurden untersucht, um interindividuelle Strahleneffekte zu beurteilen. Nach Bestrahlung hatten mehr als die Hälfte der Klone Metaphasen mit strukturellen Aberrationen und wurden dementsprechend als instabil eingestuft. Drei Klone zeigten zudem numerische Aberrationen, die ausschließlich das Y-Chromosom betrafen. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen verifizierten diese Beobachtung in weiteren Klonen und deuteten an, dass der Verlust des Y-Chromosoms mit RIGI assoziiert ist.

Molekulare Karyotypisierungen mit SNP-Arrays ergaben, dass IR in den Klonen Veränderungen der Kopienzahl auslöst. Ein Unterschied zwischen chromosomal stabilen und instabilen Klonen konnte jedoch nicht detektiert werden. Chromosomale Regionen, in denen sich bekanntermaßen fragile Stellen befinden, zeigten eine Anhäufung von CNVs. Ein RIGI-Effekt konnte für die fragile Stelle 3B, in der sich das Gen *FHIT* befindet, identifiziert werden.

Exom-Sequenzierungen von Klonen und der entsprechenden Massenkultur zeigten eine alterungsassoziierte Entstehung von Varianten. Der Effekt wurde durch die Einwirkung von Strahlung erhöht. Auf Ebene von einzelnen Nukleotiden konnten ebenfalls Anhäufungen von Schäden in bestimmten genomischen Bereichen detektiert werden, dieser Effekt ging ohne die typischen RIGI-Endpunkte einher.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass strahlenbedingte Veränderungen auf verschiedenen Ebenen (Chromosomen, Genkopienzahl und einzelnen Nukleotiden) beobachtet werden können, welche, unabhängig von RIGI, die Tumorentstehung begünstigen.

Speziell Veränderungen im FRA3B-Lokus und der Verlust des Y-Chromosoms scheinen jedoch über die Destabilisierung des Genoms zur Krebsentstehung beizutragen.

Summary

Ionizing radiation is important in medical diagnosis and cancer treatment but can lead to genomic instability and secondary malignancies as a late effect. Radiation-induced genomic instability (RIGI) can be observed in the progeny of irradiated cells but the underlying cellular processes remain to be elucidated. To study delayed genetic radiation effects, single cell fibroblast clones from two different male donors were established after a single X-ray dose of 2 Gray. Non-irradiated cells were used as controls to account for aging-related effects. Clones were characterized using chromosome banding analysis. Stable clones were endowed with no karyotype abnormalities in all analysed metaphases after 20 Population doublings, whereas unstable clones showed both normal and abnormal metaphases. Two fibroblast strains were used to detect differences in radiation sensitivity. More than half of the irradiated clones were chromosomally abnormal and thus classified as unstable. Both banding analysis and fluorescence *in situ* hybridization revealed an increased rate of Y chromosome loss in irradiated clones which might be associated with RIGI.

Using SNP-Arrays, an increased rate of *de novo* copy number variations (CNVs) was detected in the progeny of irradiated cells when compared to non-irradiated controls. However, a significant difference between chromosomally stable and unstable clones was not found. CNVs clustered in chromosomal regions that are associated with known fragile sites. The fragile site 3B, which encompasses the gene *FHIT*, was found to be affected by CNVs in unstable clones suggesting a RIGI-related effect.

Exome sequencing of clones and the respective primary cultures revealed an increased rate of variants during *in vitro* aging. This effect was further increased by radiation exposure. Analysis of single nucleotides showed a RIGI-independent accumulation of damage in specific regions.

The results of the present study show that radiation-induced changes can manifest as chromosomal abnormalities, copy number variations and DNA sequence mutations promoting tumorigenesis independent from RIGI. However, changes in FRA3B and loss of Y chromosome might trigger cancer through destabilizing the genome.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Versicherung	III
Zusammenfassung	IV
Summary.....	VI
1. Einleitung	1
1.1. Biologische Wechselwirkung ionisierender Strahlung.....	1
1.2. DNA-Schadensantwort	3
1.2.1. Zellzyklusarrest nach Bestrahlung.....	5
1.2.2. Reparaturmechanismen strahleninduzierter Doppelstrangbrüche.....	8
1.2.3. Zelltod durch Bestrahlung	10
1.3. Folgen von Strahlenschäden	12
1.4. Strahleninduzierte Genominstabilität.....	13
1.5. Strahleninduzierte Krebsentstehung	16
1.6. Genomische Variabilität: Einzelnukleotid-Polymorphismen und Kopienzahlvariationen.....	18
1.7. Fibroblasten als Modellsystem.....	20
1.8. Zielsetzung der Arbeit	21
2. Materialien und Methoden	23
2.1. Materialien	23
2.1.1. Biologisches Material	23
2.1.2. Adaptersequenzen für das Whole Exome Sequencing	23
2.1.3. Kommerzielle Kit-Systeme	24
2.1.4. Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.5. Medien, Puffer und Lösungen.....	25
2.1.6. Geräte.....	26

2.1.7. Programme und Online-Tools	27
2.2. Methoden.....	29
2.2.1. Zellkulturtechniken und klassische zytogenetische Analysen	29
2.2.1.1. Kultivierung der Zellen	29
2.2.1.2. Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....	29
2.2.1.3. Zellzählung	30
2.2.1.4. Bestrahlung	30
2.2.1.5. Herstellung der Zellkulturklone	31
2.2.1.6. Chromosomen-Präparation aus adhärenenten Fibroblastenkulturen.....	32
2.2.1.7. G-Bänderung	33
2.2.1.8. Interphase Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung.....	33
2.2.1.9. Mikroskopische Auswertung und Bildbearbeitung	35
2.2.2. Analyse von Kopienzahlvariationen	36
2.2.2.1. Isolation genomischer DNA aus Zellen und Konzentrationsbestimmung ..	36
2.2.2.2. Illumina Infinium HumanCytoSNP-12 BeadChip Arrays	36
2.2.2.3. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification	40
2.2.3. Whole Exome Sequencing.....	43
2.2.3.1. Tagmentation der genomischen DNA.....	45
2.2.3.2. Erste Amplifikation.....	46
2.2.3.3. Pooling der Proben	47
2.2.3.4. Erste Hybridisierung und Capture.....	47
2.2.3.5. Zweite Hybridisierung und Capture	49
2.2.3.6. Aufreinigung der angereicherten Library	49
2.2.3.7. Zweite Amplifikation	49
2.2.3.8. Herstellung der Sequenzier-Library	50
2.2.3.9. Sequenzierung der Library am NextSeq500	51

2.2.3.10. Detektion von Varianten	53
2.2.4. Statistische Datenauswertung	54
2.2.5. Anreicherungsanalysen	55
3. Ergebnisse	56
3.1. Arbeitsablauf der Studie.....	56
3.2. Herstellung der Zellkulturklone und Analyse der chromosomalen Stabilität.....	57
3.3. Identifizierung von Kopienzahlvariationen	65
3.3.1. Molekulare Karyotypisierung zur Analyse genomweiter Veränderungen der Kopienzahl	65
3.3.2. Detektion von Dosisunterschieden des Gens <i>FHIT</i>	73
3.4. Whole Exome Sequencing.....	76
3.4.1. Untersuchung von genomischen Veränderungen einzelner Nukleotide in bestrahlten und nicht bestrahlten Klonen	76
3.4.2. Untersuchung von genomischen Veränderungen einzelner Nukleotide in Klonen mit veränderter Kopienzahl des Gens <i>FHIT</i>	92
3.5. Verlust des Y-Chromosoms nach Bestrahlung	95
3.5.1. Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	95
3.5.2. Molekulare Analyse der Klone mit Verlust des Y-Chromosoms	98
4. Diskussion	101
4.1. Chromosomale Instabilität in den klonalen Nachkommen bestrahlter Zellen.....	101
4.2. Verlust des Y-Chromosoms als Marker für RIGI und Krebs.....	106
4.3. Strahleninduzierte Kopienzahlvariationen.....	112
4.4. Beteiligung von <i>FHIT</i> an der Destabilisierung des Genoms nach Bestrahlung	118
4.5. Exomweite Analyse von Veränderungen einzelner Nukleotide.....	123
4.6. Interindividuelle Strahlensensitivität	129
4.7. Schlussfolgerung und Ausblick	130

5.	Referenzen	132
5.1.	Literaturverzeichnis.....	132
5.2.	Online Quellen.....	149
6.	Verzeichnisse.....	151
6.1.	Abkürzungsverzeichnis	151
6.2.	Abbildungsverzeichnis.....	155
6.3.	Tabellenverzeichnis	156
7.	Publikationen und Kongressbeiträge	159
7.1.	Publikationen.....	159
7.2.	Kongressbeiträge.....	160
8.	Danksagung.....	161
9.	Anhang.....	162

1. Einleitung

1.1. Biologische Wechselwirkung ionisierender Strahlung

Ionisierende Strahlung (engl. *ionizing radiation*, IR) bezeichnet eine Form der Strahlung, die so energiereich ist, dass sie Elektronen aus der Atomhülle lösen kann [1]. In Folge dessen ist das Atom ionisiert. Haupttypen der IR sind Alpha-, Beta-, Gamma- und Röntgenstrahlung [2]. Alpha- und Betapartikel sind als geladene Teilchen direkt ionisierend, elektromagnetische Strahlung und ungeladene Teilchen hingegen wirken indirekt ionisierend über geladene Teilchen, die bei der Wechselwirkung mit einem Atom entstehen [3, 4]. Die internationale Einheit zur Messung der Energiedosis ist Gray (Gy) und berechnet sich aus dem Quotienten der absorbierten Energie und der Masse der bestrahlten Materie [5]. Der lineare Energietransfer (LET) wird zur Beschreibung der Ionisationsdichte verwendet und gibt die Energiemenge einer definierten Wegstrecke an [3].

Die Lipidschicht der Zellmembran und Proteine können durch IR stark geschädigt werden, dennoch wird der Zellkern als das strahlensensitivste Ziel in der Zelle angesehen [6]. Experimente in den frühen 70er Jahren zeigten unter anderem, dass die zum Zelltod führende nötige Dosis höher war, wenn selektiv das Zytosol als Zielstruktur bestrahlt wurde, im Vergleich zur Dosis, die nötig war, wenn der Zellkern das Ziel war [2, 7]. Auch Zirkle und Bloom berichteten, dass nach fokussierter Bestrahlung einzelner Zellkomponenten der Zelltod abhängig von der Bestrahlung des Zellkerns war, während die Bestrahlung des Zytoplasmas nur zu geringfügigen zytotoxischen Effekten führte [8]. Die Sensitivität des Zellkerns wird hauptsächlich der Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) zugeschrieben, da Schäden der DNA aufgrund ihrer zentralen Rolle besonders schwerwiegend sind [9-11].

Bei der Wechselwirkung von IR mit dem Gewebe unterscheidet man zwischen direkter und indirekter Strahlenwirkung. DNA-Schäden, die unmittelbar durch Ionisation oder Anregung entstehen, werden als direkte Wirkungen bezeichnet [12]. Sie führen zu strukturellen Veränderungen der DNA bis hin zum Zelltod [6, 10, 13, 14]. Die indirekte Strahlenwirkung erfolgt auf dem Umweg über chemische Sekundärprozesse [6, 10, 12, 14]. Die Radiolyse des Wassers führt dabei zur Entstehung von reaktiven oxidativen Spezies (ROS), wie Hydroxylradikalen und ionisiertem Wasser, sowie Hydrogenradikalen und freie Elektronen [2]. Über weitere Prozesse führen diese dann zu Schädigungen von Makromolekülen [2]. Durch

Reaktionen mit Sauerstoff können weiterhin Peroxidradikale entstehen, welche die Moleküle angreifen und verändern [12]. Sauerstoff kann außerdem zur Fixierung der Radikalstelle an der DNA führen und so die chemische Reparatur blockieren [14]. Als Folge der indirekten Strahlenwirkung kommt es zur Beeinträchtigung oder zum Tod der Zelle. Die indirekte Strahlenwirkung dominiert hauptsächlich bei Strahlung mit niedrigem LET, wie Röntgenstrahlung, während die direkte Wirkung bei Strahlungen mit hohem LET, z. B. Neutronen oder alpha-Teilchen, überwiegt [14]. Es konnte gezeigt werden, dass indirekte Strahlenwirkungen die Hauptursache strahleninduzierter Schädigungen sind, da Wasser 70 - 80 % der Zelle ausmacht [9, 10].

Der strahleninduzierte Initialschaden kann nach biochemischer Modifikation auf Ebene der DNA im Rahmen verschiedenster Schadensklassen gemessen werden (Abbildung 1) [15].

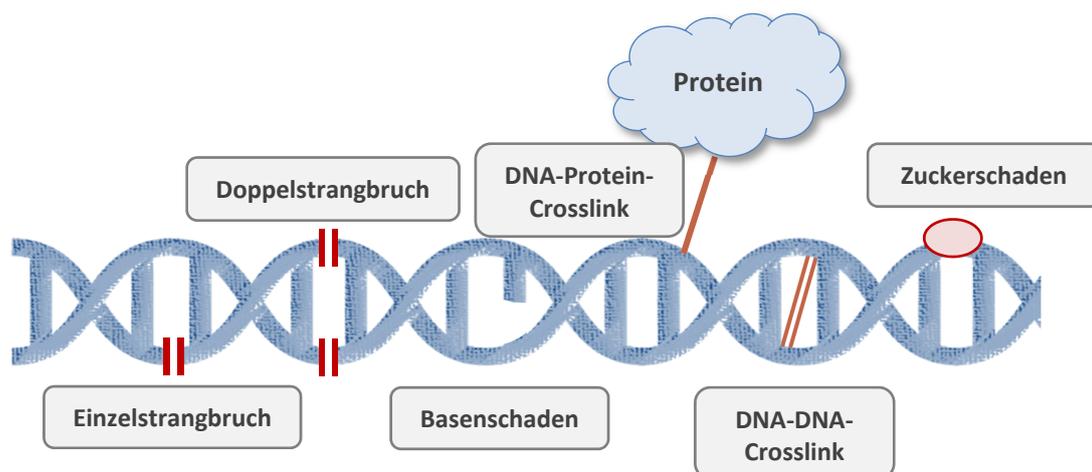


Abbildung 1: Strahleninduzierte DNA-Schäden (Abbildung erstellt nach [6, 16, 17]).

Die am häufigsten auftretenden Schadenstypen sind Veränderungen die DNA-Basen betreffend. Pro Gy werden etwa 1000-2000 dieser Schäden in einer menschlichen Zelle induziert [15]. Weniger häufig sind Einzelstrangbrüche (engl. *single-strand breaks*, SSBs) mit einer Ausbeute von etwa 500-1000, sowie Doppelstrangbrüche (engl. *double-strand breaks*, DSBs), die pro Gy nur etwa 40-mal entstehen [15]. DNA-Protein-Crosslinks entstehen mit 150 Ereignissen pro Gy häufiger als DNA-DNA-Crosslinks (30 pro Gy), beide Vernetzungstypen treten bei hohen Strahlendosen auf [14, 15]. Treten die genannten Schäden kombiniert und

gehäuft in bestimmten DNA-Bereichen auf, spricht man von *locally multiple damaged sites* [15]. Oft sind diese Mehrfachschäden irreparabel und gehen mit der Letalität der Zelle einher [6, 12, 14].

1.2. DNA-Schadensantwort

Von den verschiedenen durch Strahlung induzierten Schadenstypen werden DSBs als eine der gefährlichsten Läsionen für die Zelle angesehen, da sie unrepariert zum permanenten Zellzyklusarrest, zum Zelltod oder zum Verlust genetischen Materials führen können [18]. In eukaryotischen Zellen wird die zelluläre Antwort auf strahleninduzierte DSBs durch die DNA-Schadensantwort (engl. *DNA damage response*, DDR) reguliert und koordiniert [19]. Bei dem zugrundeliegenden Mechanismus handelt es sich um eine Signalkaskade, in die Sensoren, Transduktoren und Effektorproteine involviert sind (Abbildung 2). Diese sind in der Lage den vorliegenden Schaden zu erkennen, die Zellzyklusprogression zu inhibieren, entsprechende DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren, sowie Zellen mit irreparablem Schaden zu eliminieren [2, 19]. Die Aktivierung der DDR erfolgt durch die Wahrnehmung der aberranten DNA-Struktur durch die Sensoren [19]. Zentrale Komplexe dieser Kette bilden dabei ATM (engl. *Ataxia Telangiectasia Mutated*) und ATR (engl. *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein*), die als Transduktoren fungieren [20]. Während ATM vorrangig durch DSBs aktiviert wird, spricht ATR auf ein breites Spektrum von DNA-Schäden an [19]. Dazu gehören in erster Linie Schäden, welche die DNA-Replikation beeinträchtigen, aber auch DSBs aktivieren ATR [21].

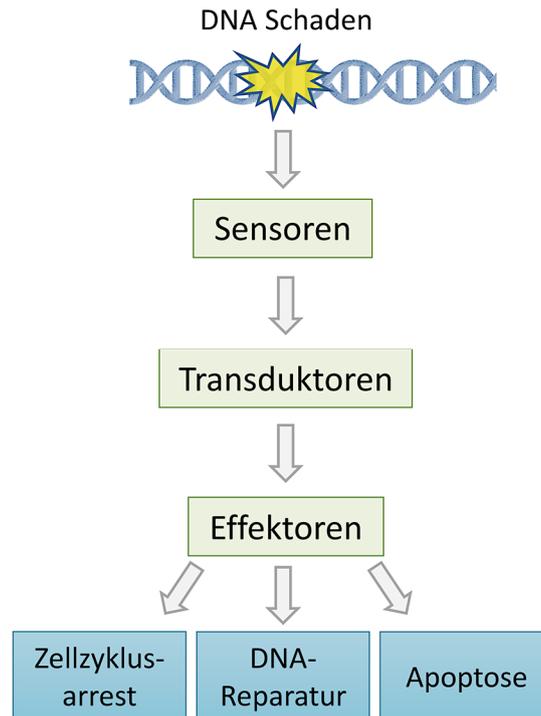


Abbildung 2: Organisation der DNA-Schadensantwort. Der DNA-Schaden wird durch Sensoren wahrgenommen, welche das Signal über Transduktoren zu einer Reihe downstream gelegener Effektoren senden. Die Effektoren sind in zelluläre Prozesse involviert, die wichtig für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität sind (Abbildung erstellt nach [19, 20, 22]).

Der Mre11-Rad50-Nbs1-Komplex fungiert als Sensor für DNA-DSBs und rekrutiert ATM zur Schadensstelle [23]. In nicht bestrahlten Zellen liegt ATM als inaktives Dimer vor, dessen Kinasedomäne blockiert ist [19, 20]. Nach Bestrahlung kommt es zur raschen intermolekularen Autophosphorylierung von ATM und zur Konformationsänderung [23, 24]. Die so aktivierte Serin-/Threonin-Kinase reguliert die Phosphorylierung nachfolgend gelegener Zielstrukturen, wie p53, Mdm2, Checkpointkinase (Chk) 1, Chk2 und Nbs1, die bei der DNA-Reparatur und Zellzyklus-Checkpoints eine Rolle spielen [22]. Ein sehr früher und entscheidender Schritt in der DDR ist zudem die durch ATM vermittelte Phosphorylierung von H2AX zu gamma-H2AX und die damit in Verbindung stehende Rekrutierung von Reparaturproteinen und Chromatinkomplexen zum Schadensbereich [25, 26]. H2AX gehört zur Familie der H2A-Proteine, die eine Komponente des Histon-Oktamers in Nukleosomen bilden [27]. Im Fall eines DSBs bilden sich sogenannte gamma-H2AX-Foci, die durch verschiedenste Techniken visualisiert werden können [27]. Ähnlich wie ATM ist auch ATR in der Lage spezifisch Serin- und Threoninreste zu phosphorylieren [20]. Es konnte gezeigt werden, dass ATR essentiell für das korrekte Fortschreiten des Zellzyklus ist und deletiert in menschlichen Zellen, sowie in

Mäusen, zur Letalität führt [28, 29]. In menschlichen Zellen bildet ATR einen stabilen Komplex mit ATRIP [28]. Die Vermittlung von ATR-ATRIP zur Schadensstelle ist abhängig von der direkten Interaktion zwischen ATRIP und einzelsträngigen DNA-Bereichen (engl. *single stranded DNAs*, ssDNA), die mit dem *replication protein A* (RPA) beladen sind [21]. Hauptroute zur Entstehung dieser ssDNA-Bereiche ist die Entkopplung von Helikase und DNA-Polymerase an der Replikationsgabel in der S-Phase [21]. Es kommt zur Phosphorylierung von Chk1 und dadurch zur Aktivierung weiterer Substrate des Signalwegs, der zentral für die DDR und die DNA-Checkpoints ist [30]. Da die Lokalisierung des ATR-ATRIP-Komplexes abhängig von einzelsträngigen DNA-Bereichen ist, ist deren unmittelbare Nähe auch bei der Aktivierung des ATR-Signalwegs im Fall von DSBs essentiell [19, 31].

1.2.1. Zellzyklusarrest nach Bestrahlung

In Folge eines strahleninduzierten DNA-Schadens kommt es zur Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints, die das Voranschreiten des Zellzyklus verzögern, um der Zelle Zeit zu geben, den Schaden zu reparieren [32]. Der Arrest kann dabei transient oder permanent sein. Erreicht wird dies über Cycline, die während des Zellzyklus exprimiert und degradiert werden, sowie cyclinabhängige Kinasen (engl. *cyclin-dependent kinases*, CDKs) aktivieren [33]. Diese wiederum phosphorylieren eine Vielzahl downstream gelegener Substrate, die den Zellzyklus regulieren [33]. Zellzyklus-Checkpoints befinden sich an der Grenze zwischen G2-Phase (engl. gap, G) und M-Phase (Mitosephase) (Abbildung 3A), sowie zwischen G1- und S-Phase (Synthesephase) (Abbildung 3B).

Der G1/S-Checkpoint verhindert den Eintritt der geschädigten DNA in die S-Phase und somit die Replikation des Fehlers [22]. Der G1-Arrest erfolgt durch die Aktivierung zweier parallellaufender Signalkaskaden, die für den Eintritt in die S-Phase nötige Komplexe inaktivieren [33]. Der erste, langsamer verlaufende Mechanismus ist abhängig von der Phosphorylierung von p53 und MDM2 durch ATM [33, 34]. MDM2 ist ein Negativ-Regulator von p53 und fördert dessen Degradierung [35]. Die Phosphorylierung führt zur Aktivierung und Stabilisierung von p53, wodurch regulatorische Proteine, die in den Zellzyklusarrest eingebunden sind, synthetisiert werden [32]. Eines dieser Proteine ist p21, welches als Cdk-Inhibitor fungiert und so die Phosphorylierung von Retinoblastom-Proteins (pRb) verhindert [36]. Für den Eintritt in die S-Phase liegt pRb normalerweise phosphoryliert vor, wodurch seine Bindungsaffinität für den Transkriptionsfaktor E2F reduziert ist. E2F wird

dadurch freigesetzt und Gene, die für den Eintritt in die S-Phase notwendig sind, werden exprimiert. und der Zellzyklus schreitet voran (Abbildung 3B, blauer Pfeil). Durch die Hochregulierung von CyclinE, welches, als Komplex mit Cdk2, die weitere Freisetzung von E2F stimuliert, kommt es zur Expression von Genen, die für die S-Phase notwendig sind. Nach weiterer Phosphorylierung von pRb wird E2F schließlich vollständig freigesetzt, die Zelle ist nicht mehr in der Lage über den ATM-abhängigen Checkpoint auf DNA-Schäden zu reagieren (Abbildung 3B, roter Pfeil) [37]. Der zweite, schneller verlaufenden Signalweg zur Aktivierung des Zellzyklusarrests führt über die ATM-abhängige Phosphorylierung von Chk2 und damit verbunden zur Inaktivierung von Cdc25, wodurch inhibitorische Phosphate des CyclinE/Cdk2-Komplexes nicht mehr entfernt werden können [33].

Der G2/M-Checkpoint erlaubt die Reparatur defekter DNA, bevor diese in die Mitose eintreten kann und verhindert so die Segregation geschädigter Chromosomen [22, 37]. Der Eintritt in die Mitose wird durch zwei Rückkopplungsmechanismen reguliert. Die Kinasen Myt1 und Wee1 phosphorylieren den zentralen CyclinB/Cdk1-Komplex und inhibieren ihn dadurch, während die Phosphatase Cdc25 die Phosphorylierung des Komplexes beseitigt [38]. Dadurch wird der Komplex aktiviert und kann seinerseits Wee1 inaktivieren und Cdc25 aktivieren, wodurch wiederum weitere CyclinB/Cdk1-Komplexe aktiviert werden und der Eintritt in die Mitose erfolgt [33]. Die Kinase Plk1 ist in beide Rückkopplungsmechanismen involviert und wird durch einen Komplex aus Aurora-A (Aur-A) und Bora aktiviert [33]. Bei einem DNA-Schaden kommt es zur ATM-abhängigen Aktivierung der Checkpoint-Signalwege. ATM phosphoryliert Cdc25, es kommt zur Anhäufung des inaktiven CyclinB/Cdk1-Komplexes und so zum G2-Arrest [33]. Die Inaktivierung des Komplexes wird weiterhin über einen p53-abhängigen Signalweg erreicht, in dem das 14-3-3 σ -Protein eine Rolle spielt [22, 39].

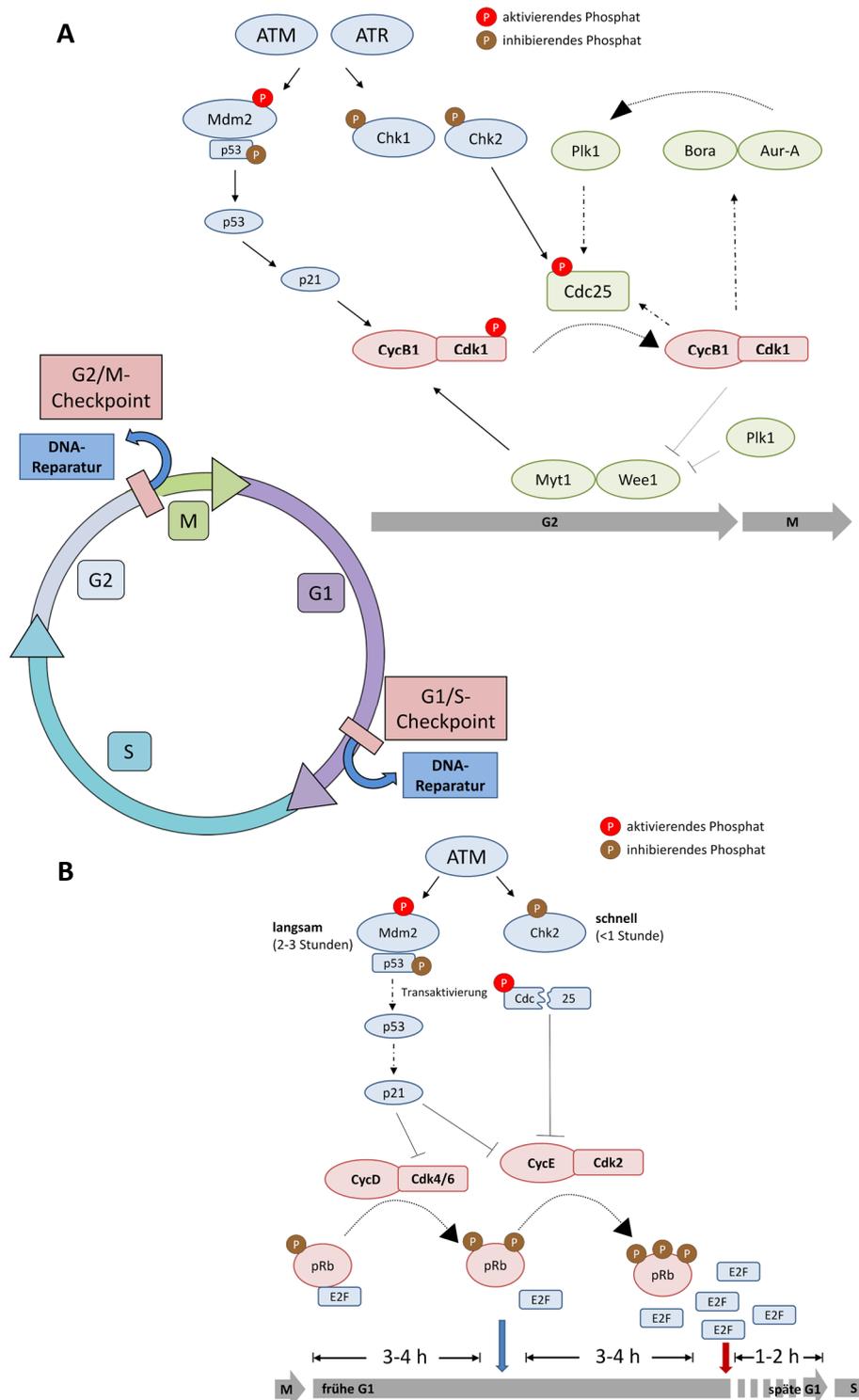


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints. Bestrahlung führt zur Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints zwischen (A) der G2- und M-Phase, sowie zwischen (B) der G1- und S-Phase. Die Zellzyklus-Checkpoints verhindern das Voranschreiten des Zellzyklus, wenn die DNA geschädigt ist und geben der Zelle Zeit, den Schaden zu reparieren. Abkürzungen: Aur-A: Aurora-A; Cdk: engl. *cyclin-dependent kinase*; Cyc: Cyclin; G: engl. *gap*; M-Phase: Mitose-Phase; pRb: Retinoblastom-Protein; S-Phase: Synthese-Phase (Abbildung des Zellzyklus erstellt nach [40], Abbildungen der detaillierten zellulären Abläufe erstellt nach [33]).

1.2.2. Reparaturmechanismen strahleninduzierter Doppelstrangbrüche

DNA-DSBs werden in eukaryotischen Zellen vorrangig durch zwei unterschiedliche Mechanismen, der homologen Rekombination (engl. *homologous recombination*, HR) und der nicht-homologen Endverknüpfung (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ), repariert (Abbildung 4). Während für die HR die Anwesenheit eines sequenzhomologen, intakten Partners Voraussetzung ist, werden beim NHEJ die geschädigten DNA-Enden direkt verknüpft, ein homologes Template wird nicht benötigt [41, 42].

Die HR beginnt mit einer Resektion der Bruchenden in 5'-3'-Richtung [42]. Es entstehen überstehende 3'-Enden, an die das RPA bindet, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern [43]. Im nächsten Schritt wird RPA durch RAD51 ersetzt. Eine zentrale Rolle bei diesem Prozess spielt der BRCA2/PALB2-Komplex [42]. RAD51 formt Filamente entlang der entwundenen DNA und erleichtert so die Stranginvasion des 3'-Endes in die homologe DNA-Duplex, wodurch der intakte Strang verdrängt wird [6, 22]. Die so entstandene Struktur wird als D-Loop (engl. *displacement loop*) bezeichnet [42]. Der eingedrungene Strang wird am 3'-Ende durch die DNA-Polymerase verlängert, wobei der intakte Strang als Template genutzt wird [6, 10]. Es kommt zur Verschiebung des Überkreuzungspunkt und dadurch zur Vergrößerung des D-Loops [44]. Es bilden sich Überkreuzungen aus, die als Holliday-Struktur (engl. *holliday junctions*) bezeichnet werden [43]. Die Auflösung dieser Überkreuzungen kann in zwei verschiedene Richtungen erfolgen, das Resultat ist entweder eine Genkonversion mit Crossing-over oder eine Genkonversion ohne Crossing-over [6, 42].

Da für die HR die räumliche Nähe der Schwesterchromatiden zur Reparatur des DSBs nötig ist, ist seine Aktivität auf die S-Phase und frühe G2-Phase des Zellzyklus beschränkt [45]. Für das NHEJ hingegen wird kein homologes Template benötigt, sodass dieser Mechanismus in allen Zellzyklusphasen greifen kann. Die Verwendung des sequenzähnlichen Template bei der HR führt zudem zu einer geringeren Fehleranfälligkeit im Vergleich zum NHEJ, bei dem es häufig zur Einführung von Veränderungen, wie kleinen Deletionen oder Insertionen, kommt [22].

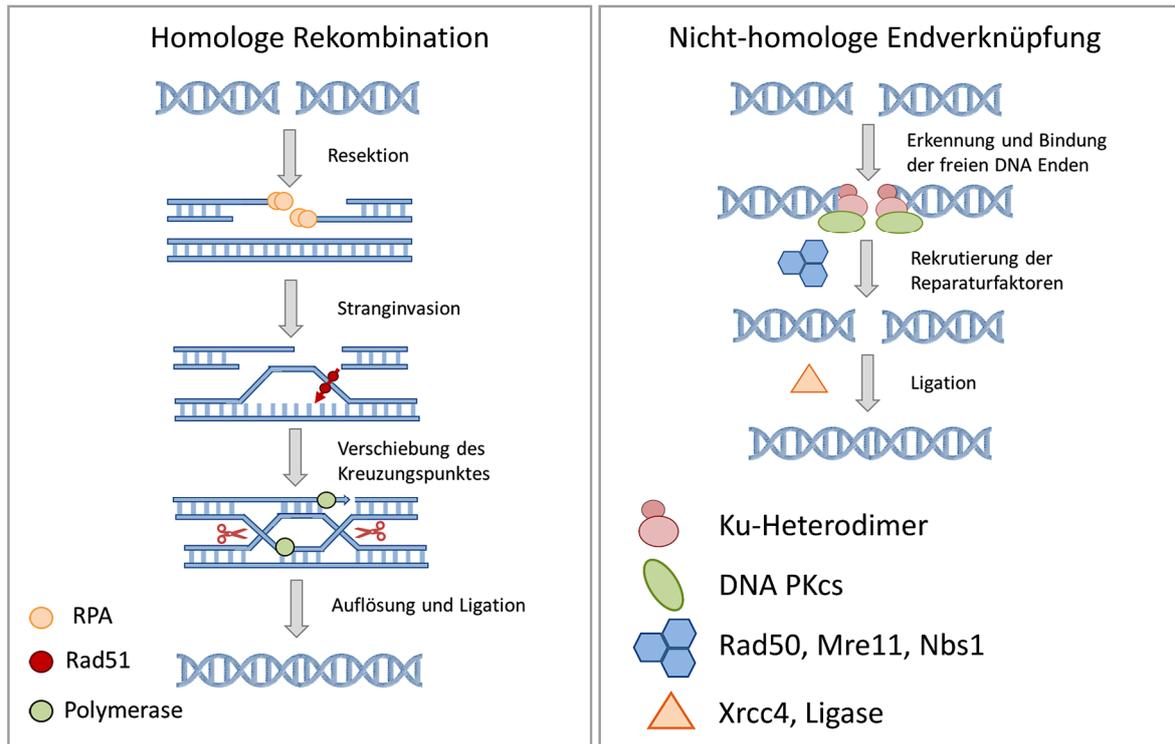


Abbildung 4: Reparaturmechanismen für DNA-Doppelstrangbrüche Strahleninduzierte DSBs werden über homologe Rekombination (HR) oder über Nicht-homologe Endverknüpfung (NHEJ) repariert. Bei der HR wird ein sequenzhomologer Partner als Template für die Reparatur des Schadens genutzt, während beim NHEJ die geschädigten DNA-Enden direkt miteinander verknüpft werden (Abbildung erstellt nach [6, 22, 46, 47]).

Der erste Schritt des NHEJ ist die Erkennung und Bindung des Ku-Heterodimers, bestehend aus den Untereinheiten Ku70 und Ku80, an die Enden des DSBs [43]. Das DNA-gebundene Ku-Heterodimer rekrutiert schließlich verschiedene Reparatur-Faktoren zur Schadensstelle [41]. Eine Schlüsselkomponente dabei bildet die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase, (engl. *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*, DNA-PKcs), die zur Familie der *phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase-like kinases* gehört, zu der auch ATM und ATR gezählt werden [22]. Die Rekrutierung von Artemis zur Schadensstelle führt, wenn nötig, zur Prozessierung der DNA-Enden, um diese kompatibel für die enzymatische Ligation zu machen [42]. Durch die Rekrutierung von DNA-PKcs durch Ku70/80 entsteht der DNA-PK-Komplex [43]. Es kommt zur Aktivierung der Kinaseaktivität und zur Rekrutierung eines Ligations-Komplexes, bestehend aus XRCC4, DNA-Ligase IV und XLF, der die finale Ligation vollzieht [42, 43].

Ist die Zelle in der Lage den strahleninduzierten DNA-Schaden erfolgreich zu reparieren, kann diese wieder in den Zellzyklus eintreten. Ist der Schaden jedoch irreparabel kommt es zum Tod der Zelle.

1.2.3. Zelltod durch Bestrahlung

Der Zelltod spielt eine zentrale Rolle als zelluläre Antwort auf einen Strahlenschaden und sorgt für die Aufrechterhaltung der Homöostase von Geweben durch die Eliminierung geschädigter Zellen [48]. Apoptose und mitotische Katastrophe werden als Hauptformen des Zelltods in Folge von IR genannt [49].

Unter Apoptose versteht man den programmierten Zelltod. Morphologisch charakterisiert sich die Apoptose durch das Schrumpfen der Zelle, die Bläschenbildungen der Membran, die Verdichtung des Chromatins, sowie die Degradierung der DNA [50]. Während dieses Prozesses werden zelluläre Komponenten in membranumschlossene apoptotische Körperchen fragmentiert und schließlich phagozytiert [51]. Die strahleninduzierte Apoptose findet vorrangig in hämatopoetischen Zellen, in Zellen der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes oder in Tumorzellen mit wildtypischem p53 statt [52]. Man unterscheidet zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Apoptoseweg. Die Vermittlung beider Mechanismen erfolgt über Caspasen, die anfänglich in inaktiver Form exprimiert und durch Inhibitoren kontrolliert werden [51, 52]. Durch die Aktivierung der Caspasen wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die schließlich zur Ausführung des Zelltods führt [48]. Beim intrinsischen Signalweg spielen proapoptotische Proteine, welche die Membranpermeabilität von Mitochondrien überwachen, sowie die Bildung des Apoptosoms, eine zentrale Rolle, während der extrinsische Weg über die Aktivierung von Todesrezeptoren eingeleitet wird [52].

Alternativ zur Apoptose kann die Aktivierung von p53 durch IR und die daraus resultierende Expression von p21 einen permanenten G1-Arrest auslösen, der zur vorzeitigen Seneszenz führt [52]. Besonders häufig wird dies nach Bestrahlung diploider Fibroblasten beobachtet, in denen die strahleninduzierte Apoptose eine eher untergeordnete Rolle spielt [51]. Die stressinduzierte, vorzeitige Seneszenz ist von der replikativen Seneszenz zu unterscheiden, die mit dem natürlichen Alterungsprozess einhergeht und mit der schrittweisen Verkürzung der Telomere an den Chromosomenenden korreliert [51]. In beiden Fällen beschreibt Seneszenz den Verlust der Fähigkeit zur Zellteilung. Senescente Zellen sind zwar permanent im Zellzyklus arretiert, bleiben aber lebensfähig und metabolisch aktiv [52]. Im Vergleich zu normalen Zellen

haben seneszente Zellen eine Vielzahl aberranter Charakteristiken [53]. Dazu gehören unter anderem morphologische und biochemische Anomalien, veränderte Zell-Zell-Kontakte, sowie Veränderungen in der Chromatinstruktur und in der Genexpression [54]. Neben dem p53/p21-Signalweg, der den Zellzyklusarrest in der G1-Phase auslöst, spielt der CDK-Inhibitor p16 eine Rolle bei der Induktion der Seneszenz [51]. p16 wirkt dabei auf CDK4/6, wodurch die Phosphorylierung von Rb1 verhindert wird [52]. Das Protein bleibt an den Transkriptionsfaktor E2F gebunden, sodass die Expression der Gene, die den Übertritt der G1-Phase in die S-Phase ermöglichen, unterdrückt wird [52]. Es konnte zudem gezeigt werden, dass strahleninduzierte Seneszenz abhängig von der Aktivierung des *Insulin-like growth factor 1 receptors* ist (IGF-1R). Zellen, die mit einem IGF-1R-Inhibitor behandelt wurden, zeigten in Folge einer Bestrahlung mit Röntgenstrahlen keine phänotypischen Merkmale vorzeitiger Seneszenz [55].

Die mitotische Katastrophe beschreibt den vorzeitigen Eintritt in die Mitose, bevor die S- und G2-Phase abgeschlossen sind [56]. Durch den vorzeitigen Eintritt in die Mitose bleiben DNA-Schäden fehlerhaft repariert oder komplett unrepariert [51]. Morphologisch charakterisieren sich Zellen mit aberranter Mitose durch die Anhäufung von multinukleären Riesenzellen, in denen das Chromatin ungleichmäßig kondensiert ist und durch das Auftreten von Chromosomenaberrationen und Mikronuklei [51]. Es existieren verschiedene Kontrollpunkte in der G2-Phase und in der M-Phase, um zu verhindern, dass die mitotische Katastrophe eintritt. Kontrollpunkte in der M-Phase überwachen die ordnungsgemäße Assemblierung des Spindelapparates, sowie die Bindung mit den Chromatiden. Der Mitose-Checkpoint-Komplex bestehend aus BubR1, Bub3, Mad2 und Cdc20 wird durch unbesetzte Kinetochore gebildet [57]. Sobald die Bindung mit den Chromosomen erfolgt ist, kommt es zur Aktivierung der Ubiquitin-Ligase APC/C und dadurch zur Degradierung von CyclinB1 und Securin [58]. Dadurch wird die Separase frei und kann die Kleisin-Untereinheit Scc1 vom Cohesin-Ring abspalten [59]. In Folge dessen öffnet sich der Ring und die Schwesterchromatiden trennen sich. Zusätzlich führt die Degradierung von CyclinB1 zur Inaktivierung von Cdk1, sodass der Mitoseaustritt gewährleistet ist [59]. Die mitotische Katastrophe kann einerseits im mitotischen Tod resultieren, andererseits aber auch andere Zelltod-Signalwege, wie die Apoptose, auslösen [51].

Die DDR agiert als Wächter für die genomische Stabilität und verhindert die Tumorentstehung [60]. Eine geschädigte DDR, die sich durch Veränderungen in den beteiligten Genen,

Strukturen und Netzwerken äußert, fördert die Krebsentstehung und führt oftmals zur Akkumulation von Mutationen, die einen Wachstumsvorteil liefern [61].

1.3. Folgen von Strahlenschäden

Strahlenschäden können deterministisch oder stochastisch sein. Als deterministisch werden Effekte beschrieben, die erst nach Überschreiten eines bestimmten Grenzwertes auftreten. Bis zum Erreichen des Grenzwertes ist die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Schäden zwar gering, ist dieser Schwellenwert jedoch überschritten, steigt die Wirkung in ihrem Schweregrad sowie in der Eintrittshäufigkeit in Abhängigkeit von der Dosis [62]. Zu beobachten ist dies unter anderem bei Organschäden, wie einem Erythem oder einer Strahlenfibrose [63, 64]. Stochastische Effekte hingegen sind zufällig. Die Wahrscheinlichkeit des Eintretens ist dosisabhängig, es gibt jedoch keinen Schwellenwert und auch der Schweregrad ist nicht mit der Dosis verbunden [63, 64]. Strahleninduzierte Tumore sind Beispiele für stochastische Schäden [64].

Entstehen können Strahlenschäden einerseits durch die Bestrahlung selbst, andererseits durch eine fehlerhafte Reparatur oder Replikationsfehler [12]. Das auftretende Mutationsspektrum ist vielfältig und unterscheidet sich von dem der spontan entstehenden Mutationen [65]. Veränderungen können einzelne, bzw. wenige Nukleotide (Genmutationen) oder ganze Chromosomen betreffen [12]. Zu den Genmutationen werden Substitutionen, Insertionen und Deletionen gezählt [12]. Chromosomenaberrationen entstehen in Folge von fehlerhaft oder nicht reparierten DSBs [66]. Nach Bestrahlung können eine Vielzahl verschiedener Aberrationstypen entstehen, die durch Färbetechniken bereits in der ersten Metaphase nach Bestrahlung sichtbar gemacht werden können [6]. Chromosomenveränderungen werden daher als Biomarker für die Dosimetrie angesehen. Lymphozyten werden im Zuge dessen häufig auf das Vorhandensein verschiedenster Aberrationstypen analysiert, um die Auswirkung der Strahlendosis auf die Gesundheit zu beurteilen [67]. Besonders als instabil geltende Aberrationstypen werden dabei oftmals analysiert, da sie zuverlässig mittels Giemsa detektierbar sind [67]. Instabile Veränderungen, wie dizentrische Chromosomen, können in der Regel keine weiteren Zellteilungen durchlaufen. Dizentrische Chromosomen entstehen, wenn sich zwei gebrochene Chromosomen fehlerhaft zusammenschließen. Das Resultat ist eine Struktur mit zwei Zentromeren. Bei dieser Struktur kann es in der Anaphase zur Bildung einer Brücke kommen,

wenn die beiden Zentromere zu den jeweils gegenüberliegenden Polen gezogen werden [68]. Neben dieser Struktur bilden sich zwei azentrische Fragmente aus, die in der nächsten Mitose aufgrund des nicht vorhandenen Zentromers verloren gehen [62].

Zu den stabilen Aberrationen zählen unter anderem perizentrische Inversionen und Translokationen, die den Zellzyklus in der Regel ohne Probleme durchlaufen [68]. Besonders Translokationen sind jedoch mit verschiedensten Tumorarten assoziiert, in denen sie, nicht zuletzt durch Aktivierung von Onkogenen (OGs), zur Entartung der Zelle beitragen [62]. Strahleninduzierte DSBs in sich teilenden Zellen können so über die Entstehung chromosomaler Aberrationen zur genomischen Instabilität (GI) beitragen.

Eine weitere Form von GI bilden numerische Chromosomenaberrationen, auch bekannt als Aneuploidien [69]. Ursache für Aneuploidien sind Störungen an Strukturen, die normalerweise die ordnungsgemäße Segregation der Chromosomen erlauben [70]. Der *spindle assembly checkpoint* (SAC) ist einer dieser Komponenten. Ein geschwächter SAC führt zur vorzeitigen Trennung der Schwesterchromatiden, während ein überaktivierter SAC dazu führt, dass Chromosomen nach dem Einsetzen der Anaphase in der Äquatorialebene zurückbleiben [70-73]. Beide Ereignisse lösen Fehlsegregationen und Aneuploidien aus.

1.4. Strahleninduzierte Genominstabilität

Für viele Jahre galt in der Strahlenbiologie der Grundsatz, dass strahleninduzierte biologische Effekte nur in der direkt bestrahlten Zelle selbst entstehen. Sie werden dem initialen DNA-Schaden zugesprochen, der durch die DNA-Replikation oder durch eine fehlerhafte Reparatur in einer Mutation oder chromosomalen Aberration resultiert [74]. Da diese Veränderungen unmittelbar nach Bestrahlung entstehen, wird erwartet, dass die Nachkommen der bestrahlten Zelle den gleichen Schaden zeigen (Abbildung 5A) [75]. Wird der Schaden repariert, so ist die direkt bestrahlte Zelle, sowie deren Nachkommen, normal (Abbildung 5B) [75].

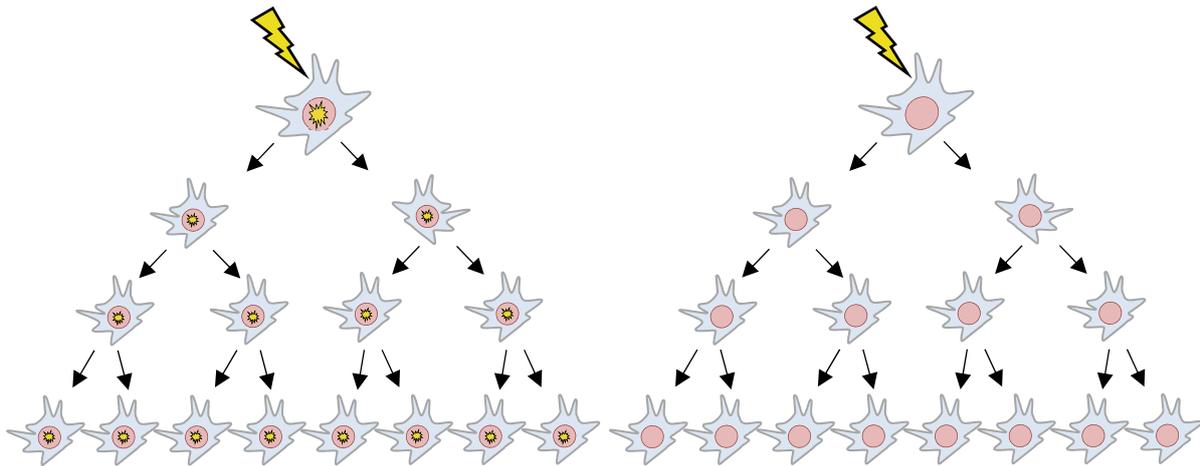


Abbildung 5: Modelle zellulärer Antworten auf ionisierende Strahlung. (A) die direkt bestrahlte Zelle ist mutiert und gibt die Veränderungen an alle Nachkommen weiter. (B) die direkt bestrahlte Zelle repariert den Schaden, sodass alle Nachkommen normal sind (Abbildung erstellt nach [75]).

Daten aus Studien der letzten 30 Jahre zeigten jedoch, dass chromosomale Aberrationen und Mutationen auch verzögert in nicht bestrahlten Nachkommen von Zellen auftreten können, die mehrere Zellzyklen vorher Strahlung ausgesetzt waren [76-81]. Den ersten Hinweis dazu lieferten Weissenborn und Streffer 1988 [82]. Nach Bestrahlung von murinen Embryonen im Einzelzell-Stadium mit Röntgenstrahlung und Neutronen beobachteten sie das Auftreten von *de novo* Chromosomenaberrationen in der ersten, zweiten und dritten Mitose nach Bestrahlung. Insgesamt werden alle Beobachtungen zum Auftreten von nicht klonalen genomischen Schäden unter dem Begriff der strahleninduzierten Genominstabilität (engl. *radiation-induced genomic instability*, RIGI) zusammengefasst. Verschiedenste Endpunkte werden verwendet um RIGI zu charakterisieren, dazu gehören Veränderungen die Chromosomen betreffend, Genmutationen und -Amplifikationen, Mikrosatelliteninstabilität, eine reduzierte Plattierungseffizienz, der verzögerte Zelltod, sowie die Bildung von Mikronuklei (Abbildung 6) [76, 83-89].

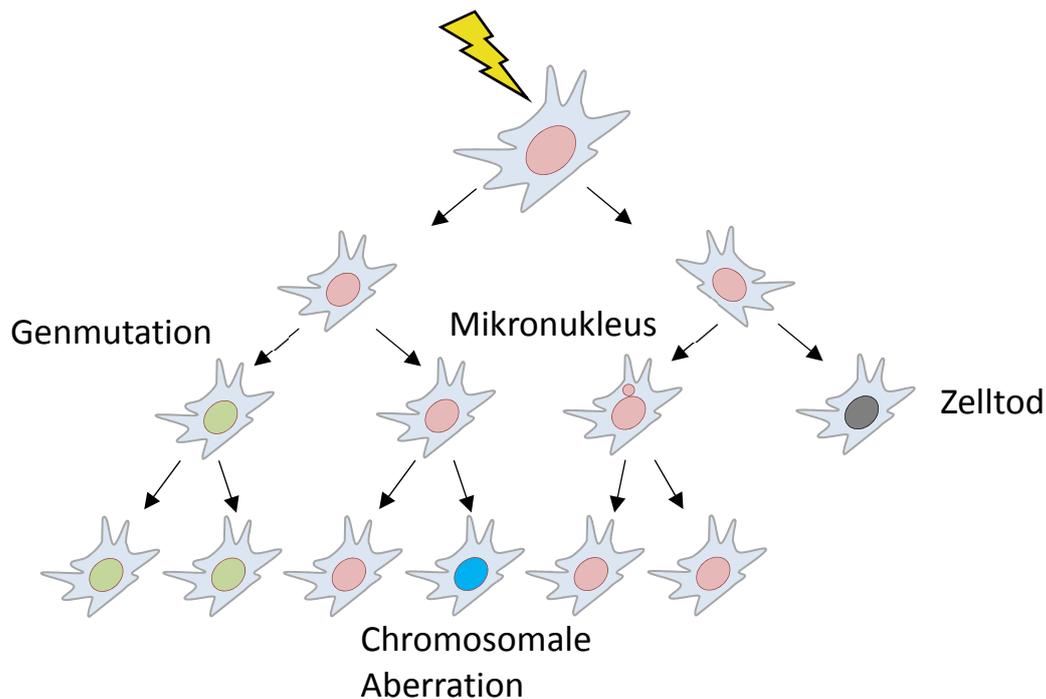


Abbildung 6: Schematisches Modell für strahleninduzierte Genominstabilität. Strahleninduzierte Genominstabilität manifestiert sich in den Nachkommen bestrahlter Zellen und ist durch verschiedene Endpunkte charakterisiert (Abbildung erstellt nach [75]).

RIGI wurde seit der Entdeckung in einer Vielzahl von Säugersystemen *in vivo* und *in vitro* beobachtet, sowie nach Bestrahlung mit niedrigem und hohem LET [77, 84, 90-98]. Anhand verschiedener Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass RIGI ein häufig auftretendes Ereignis ist und mit einer hohen Frequenz auftritt [77, 91, 99-101]. Die Mechanismen, welche zur verzögerten GI über mehrere Generationen hinweg führen, sind bisher noch nicht vollständig verstanden. Besonders zwei mögliche Entstehungsmechanismen für RIGI sind in den letzten Jahren in den Vordergrund der Diskussion gerückt. Epigenetik beschreibt Mechanismen, die die Genaktivität beeinflussen ohne die DNA-Sequenz an sich zu ändern [102]. Zu den epigenetischen Prozessen zählen die DNA-Methylierung, Histonmodifikationen, sowie die microRNA regulierte Genexpression [102]. Vor allem Veränderungen im DNA-Methylierungsmuster konnten nach Bestrahlung beobachtet werden, was zur Vermutung führte, dass diese Mechanismen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von RIGI eine Rolle spielen [103-106]. Der zweite potentielle Entstehungsmechanismus beinhaltet, dass der instabile Phänotyp auf zelluläre entzündungsähnliche Reaktionen zurück zu führen ist [107-109]. Eine zentrale Rolle spielen dabei ein erhöhtes intrazelluläres ROS-Level, die

Dysfunktion von Mitochondrien, sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine [107, 110-113].

Neben RIGI ist der Bystander-Effekt ein weiteres Phänomen, bei dem biologische Effekte von IR in Zellen auftreten, die selbst nicht im Strahlengang lagen. Nötig dafür ist die Zell-Zell-Kommunikation zu den Zellen, die der Strahlung direkt ausgesetzt waren. Schadenssignale werden dabei entweder direkt über Gap Junctions übertragen oder in das umliegende Medium sekretiert und gelangen so zu den nicht bestrahlten Zellen [114, 115]. Beobachtet wurde der Bystander-Effekt erstmals 1992 von Nagasawa und Little. Obwohl nur etwa 1 % der Zellen einer Kultur mit alpha-Teilchen bestrahlt wurden, zeigten sich Schwesterchromatid-Austausche in 20–40 % der Zellen [116]. Die Endpunkte des Bystander-Effekts sind vielfältig und überlappen teilweise mit den Endpunkten, die für RIGI charakteristisch sind. Zu den beobachteten Effekten zählen unter anderem: chromosomale Aberrationen, die Bildung von Mikronuklei, Veränderungen in der Genexpression, der Zellproliferation und dem Zelltod [117-123].

1.5. Strahleninduzierte Krebsentstehung

Kurz nach Entdeckung der Röntgenstrahlung im Jahr 1895 wurde auch das karzinogene Potential von IR nachgewiesen [124]. Eines der bekanntesten Beispiele dafür bilden Marie Curie und ihre Tochter Irene. Es wird vermutet, dass beide an Leukämie gestorben sind, welche sich als Folge von Strahlenexpositionen während ihrer Experimente mit Radioaktivität entwickelt hat [63]. Viele Daten zur Induktion von Krebs durch Strahlung kommen von Populationsgruppen, die im Zuge diagnostischer oder therapeutischer Verfahren Strahlung ausgesetzt waren. Besonders Studien an Überlebenden von Atomkatastrophen liefern ein umfangreiches Wissen zur Risikoabschätzung von IR [125]. Anhand dieser Daten konnte unter anderem gezeigt werden, dass strahleninduzierter Krebs in fast allen Organen auftreten kann und verschiedenste Altersgruppen betrifft [124]. Das Zeitintervall zwischen der Strahlenexposition und der Tumorentstehung wird als Latenzzeit bezeichnet [63, 64]. Die Latenzzeit variiert zwischen den verschiedenen Tumorarten. Für die meisten Krebsarten werden Latenzzeiten von über 10 Jahren angegeben, Leukämien hingegen haben eine vergleichsweise kurze Latenzzeit, die im Mittel bei acht Jahren liegt [Internetquelle 1].

Der zugrundeliegende Mechanismus der strahleninduzierten Karzinogenese ist immer noch unzureichend verstanden. Der Verlust der Stabilität des Genoms ist heutzutage als eines der

wichtigsten Charakteristiken von Krebs akzeptiert und daher vermutlich maßgeblich an der Krebsentstehung beteiligt [74, 126]. Viele Tumore zeigen dabei die gleichen genomischen Veränderungen, die auch bei RIGI beobachtet werden können [125]. Genetische Erkrankungen, die mit erhöhter GI, Radiosensitivität, sowie einem erhöhten Krebsrisiko einhergehen, geben Einblicke in die möglichen Mechanismen der Krebsentstehung sowie die Rolle der GI dabei [126]. Für viele dieser Syndrome konnte das krankheitsverursachende Gen identifiziert werden [127]. Die entsprechenden Genprodukte sind primär in der DNA-Replikation, der DNA-Reparatur oder bei der Zellzykluskontrolle beteiligt [126]. Eines der bekanntesten Beispiele ist das Louis-Bar-Syndrom (engl. *Ataxia telangiectasia*), eine seltene, autosomal rezessive Erkrankung, bei der Betroffene an zerebellärer Degeneration, Immundefizienz, GI, Strahlensensitivität und einem erhöhten Krebsrisiko leiden [128]. Die genetische Ursache hierfür sind Mutationen im *ATM*-Gen, welches ein wichtiger Sensor für DNA-Schäden ist (siehe Kapitel 1.2 DNA-Schadensantwort, S. 3).

Viele Theorien zur Krebsentstehung fokussieren sich daher hauptsächlich auf Protoonkogene und Tumorsuppressorgene (TSGs). Protoonkogene sind Positiv-Regulatoren des Zellwachstums. Eine Mutation mit Funktionsgewinn (engl. *gain-of-function mutation*) in nur einer Kopie eines Protoonkogens führt zur Aktivierung des OGs und damit verbunden zur abnormalen Zellproliferation [129, 130]. TSGs hingegen repräsentieren die entgegengesetzte Seite des Zellwachstums, sie sind Negativ-Regulatoren [129]. Auf zellulärer Ebene sind TSGs rezessiv, sodass die Inaktivierung beider Allele nötig ist [131]. Mutationen in TSGs und OGs stören die Gewebemöostase, durch die eine kontrollierte Zellproliferation und das Überleben einer Zelle reguliert wird [132]. Sind die Mechanismen der kontrollierten Zellteilung und Selbsteliminierung nicht mehr gewährleistet, kann es zur Entartung der Zelle kommen [63]. Es ist unumstritten, dass eine einzelne genetische Veränderung in Zellen nicht zur Krebsentstehung führt. Vielmehr ist die Tumorgenese ein mehrstufiger Prozess mit vielen genetischen Veränderungen, deren Akkumulation schrittweise zur Entartung der Zelle führen [130]. Ein allgemeines Modell dazu umfasst zunächst die Entstehung einer Mutation in einem Gen, welches für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität zuständig ist (Abbildung 7) [133]. Diese Mutation kann durch Strahlung ausgelöst werden. Als Folge entsteht ein „Mutator“-Phänotyp, mit multiplen Mutationen, die auch OGs und TSGs betreffen, wodurch schließlich schrittweise Krebs entsteht [63].

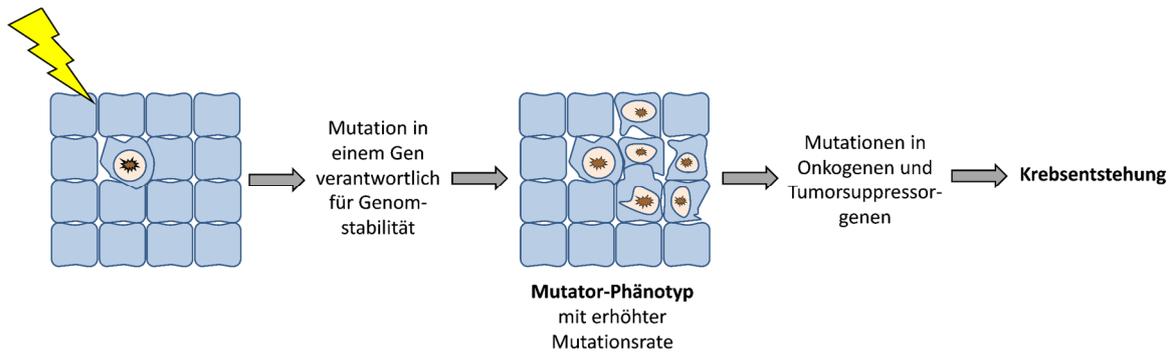


Abbildung 7: Schematische Darstellung des mehrstufigen Mechanismus der Krebsentstehung über den Mutator-Phänotyp. Strahlung induziert eine Mutation in einem Gen, welches für die Aufrechterhaltung der Genomstabilität verantwortlich ist. Dies führt zur Entstehung eines „Mutator“-Phänotyps, in dem multiple Mutationen akkumulieren. Einige dieser Mutationen betreffen Tumorsuppressoren und Onkogene, wodurch Krebs entsteht (Abbildung erstellt nach [63]).

1.6. Genomische Variabilität: Einzelnukleotid-Polymorphismen und Kopienzahlvariationen

Die genetische Variation beschreibt die Unterschiede in kodierenden und nicht kodierenden Bereichen der DNA, auf denen die Einzigartigkeit der Individuen beruht [134]. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms im Rahmen des Humangenomprojekts führte unter anderem zur Identifizierung von Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphisms*, SNPs), die eine wichtige Quelle der genetischen Variation darstellen [135]. Es handelt sich um Veränderungen einzelner Basen in der DNA-Sequenz, die im Durchschnitt alle mehrere hundert Nukleotide auftreten [136]. Es wird angenommen, dass SNPs für etwa 90 % der genetischen Variationen im menschlichen Genom verantwortlich sind [137]. Abhängig von der Lokalisation des SNPs sind die Konsequenzen der Veränderungen unterschiedlich [138]. Die meisten SNPs (90 %) beeinflussen die Genfunktion wahrscheinlich nicht, da sie sich in nicht kodierenden Bereichen des Genoms befinden [139]. Die Rolle dieser SNPs ist jedoch noch nicht abschließend geklärt [139]. SNPs in kodierenden Bereichen (engl. *coding single nucleotide polymorphism*, cSNP) oder regulatorischen Regionen des Genoms hingegen führen zu funktionellen Unterschieden und können das Risiko für bestimmte Krankheiten beeinflussen [137]. Pro Gen treten im Durchschnitt schätzungsweise 6 cSNPs auf [137]. Das enorme Interesse an SNPs beruht auf der Hoffnung diese als Marker zu verwenden, um so Gene zu identifizieren, die Individuen für bestimmte Krankheiten prädisponieren [138]. Eine Reihe von SNP-basierten Varianten konnten bereits mit einer erhöhten Anfälligkeit für

bestimmte Krankheiten assoziiert werden [135]. Zu diesen Krankheiten zählen unter anderem Diabetes, Asthma, Morbus Crohn und allen voran Krebs [140-143]. Der Fortschritt auf dem Gebiet der Hochdurchsatz-Sequenzierung in den letzten Jahren erlaubt mittlerweile die zeitgleiche Sequenzierung von vielen Millionen DNA-Fragmenten. Verschiedenste Plattformen für das Next Generation Sequencing (NGS) werden dabei genutzt, um neue und vor allem krankheitsrelevante SNPs zu identifizieren.

Studien der letzten Jahre haben sich neben SNPs auf eine weitere Klasse von Variationen und deren Auswirkungen auf das Genom fokussiert, den Kopienzahlvariationen (engl. *copy number variations*, CNVs). CNVs sind definiert als mikroskopische und submikroskopische Duplikationen und Deletionen (>1 kb), die in der allgemeinen Bevölkerung vorkommen und dort zur interindividuellen genetischen Variabilität beitragen [144]. CNVs sind über das gesamte menschliche Genom verteilt, in dem sie etwa 12 % ausmachen [145-147]. Man unterscheidet zwischen häufig auftretenden CNVs (>1 % Populationsfrequenz) und selten auftretenden CNVs (<1 % Populationsfrequenz). Veränderungen in der Kopienzahl (engl. *copy number*, CN) können sowohl in somatischen Zellen als auch in Zellen der Keimbahn vorkommen. Auf molekularer Ebene gehen CNVs häufig mit komplexen strukturellen Veränderungen, wie Insertionen und Inversionen, einher [148]. Im Allgemeinen erfolgt die Bildung von CNVs über zwei mögliche Mechanismen, der nicht-allelischen homologen Rekombination (engl. *non-allelic homologous recombination*, NAHR) oder über Ereignisse, die nicht homologieabhängig sind, wie das NHEJ und das Mikrohomologie vermittelte End-joining [148, 149]. Zur Strukturänderung während der HR kann es kommen, wenn homologe Sequenzen inkorrekt chromosomaler Loci als Template für die Reparatur geschädigter Sequenzen genutzt werden. Zwar sind besonders DNA-Abschnitte mit hoher Sequenzhomologie, wie segmentale Duplikationen, ALU- und LINE-Elemente, anfällig für CNVs durch NAHR, die meisten CNVs entstehen jedoch über Mechanismen, die keine oder nur geringe Homologien voraussetzen [148, 149]. CNVs spielen auch bei der Anpassungsfähigkeit von Individuen auf Umweltfaktoren eine Rolle und können dabei die Fitness des Individuums positiv beeinflussen, wie im Fall des Gens *AMY1*, welches für die im Speichel vorkommende Amylase kodiert [150]. Die Amylase-Konzentration im Speichel ist direkt proportional zur CN von *AMY1*. Diese ist in Bevölkerungsgruppen, die Nahrung mit erhöhtem Stärkeanteil konsumieren, höher als in Bevölkerungsgruppen, deren Nahrung eher stärkearm ist. Die erhöhte *AMY1*-Dosis ist für die Menschen der stärkeverzehrenden Bevölkerungsgruppe somit

von Vorteil [151]. Besonders in dosissensitiven Bereichen des Genoms können CNVs jedoch zur Entstehung verschiedenster Krankheiten führen. Die Vielzahl klinischer Phänotypen, die durch Veränderungen der CN bestimmter Gene entstehen können, lässt sich mit Hilfe der Gendosis-Hypothese erklären. Dabei können Abweichungen in der CN zur Veränderung der Expression des betroffenen Gens und damit verbunden zur Veränderung des Proteinlevels führen [152]. Die veränderte Gendosis kann somit den Organismus beeinträchtigen [153]. Diese Hypothese wird unterstützt durch die Tatsache, dass CNVs von Geschlechtschromosomen, für die eine Dosiskompensation existiert, weniger schwerwiegende Konsequenzen haben als Duplikationen oder Deletionen von Autosomen, für die keine Dosiskompensation stattfindet [153]. Das Spektrum der mit CNVs assoziierten Krankheiten ist vielfältig und beinhaltet unter anderem komplexe neurologische Erkrankungen, kardiovaskuläre Erkrankungen, Infektionen und Autoimmunerkrankungen [154]. CNVs spielen zudem eine zentrale Rolle in der Krebsentstehung, da die Aktivierung von OGs und die Inaktivierung von TSGs oft auf Veränderungen in der chromosomalen CN zurückgehen [155]. Da NGS-Verfahren zur Detektion von CNVs als nicht zuverlässig gelten und mit einer sehr komplexen bioinformatischen Auswertung verbunden sind, bleiben Mikroarrays bis heute noch die Technik der Wahl um zuverlässig strukturelle Variationen im Genom zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund SNP-Arrays zur CNV Detektion herangezogen.

1.7. Fibroblasten als Modellsystem

Fibroblasten kommen als Zellen des Bindegewebes in vielen Organen und Geweben des Körpers vor [156]. Sie sind mesenchymalen Ursprungs und ihre Erscheinung variiert je nach Gewebetyp [157]. Fibroblasten sind metabolisch aktiv, ihre Hauptaufgabe ist die Produktion und Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix (engl. *extracellular matrix*, ECM) durch Sekretion von Matrixkomponenten wie Kollagenen, Proteoglykanen, Fibronectin, Tenascin und Laminin [157]. Fibroblasten spielen außerdem eine zentrale Rolle bei der Wundheilung. Kommt es zur Verletzung des Gewebes werden Fibroblasten aktiviert und differenzieren zu Myofibroblasten [158]. Die Kontraktion der Myofibroblasten und die Sekretion von ECM-Proteinen führt zum Verschluss der Wunde [158]. Da Fibroblasten im Körper von zentraler Bedeutung sind, eignen sie sich besonders gut als Modell für verschiedene biologische Fragestellungen. *In vitro* heften sich Fibroblasten an die Unterlage an und wachsen

dort als einlagige, zweidimensionale Schicht [159]. Die Teilung der Zellen wird eingestellt, sobald eine hohe Zelldichte erreicht ist und jede Zelle in direktem Kontakt mit den benachbarten Zellen steht, man spricht von Kontakthemmung [159, 160]. Sobald der Zellkontakt durch Subkultivierung aufgelöst wird, setzt die Teilungsfähigkeit wieder ein. Hayflick und Moorhead zeigten 1961, dass diese Teilungsfähigkeit begrenzt ist [161]. Die Kultivierung fetaler Fibroblasten aus verschiedenen Geweben zeigte, dass die Zellen 50 ± 10 Subkultivierungen (mit einem Subkultivierungsverhältnis von 1:2) durchliefen, bevor ihr Teilungspotential erschöpft war [161]. Dieser Zustand entspricht der replikativen oder zellulären Seneszenz und ist irreversibel. Die replikative Lebensspanne korreliert invers mit dem Alter der Zellen des Spenders [162-164]. Aufgrund dieser begrenzten Teilungsfähigkeit werden Fibroblasten häufig als Modell für Studien zur menschlichen Alterung genutzt. Nach Einwirkung von IR im Rahmen der Strahlentherapie oder bei Strahlenunfällen sind Fibroblasten als Teil der Haut stets mitbetroffen [165]. IR kann die Funktion der Haut als biologische Barriere beeinträchtigen und Entzündungsreaktionen hervorrufen [165]. Fibroblasten werden daher häufig als Modell für Strahlenexperimente verwendet.

1.8. Zielsetzung der Arbeit

RIGI manifestiert sich verzögert in den Nachkommen bestrahlter Zellen und kann dort zur Krebsentstehung beitragen [74]. Obwohl die vielen Endpunkt von RIGI gut charakterisiert sind, herrscht über die zugrundeliegenden Mechanismen noch Unklarheit. Erhöhter oxidativer Stress, die Sekretion von Zytokinen, entzündungsähnliche Reaktionen und epigenetische Veränderungen wurden in den letzten Jahren als potentielle Ursache von RIGI vorgeschlagen [105, 107, 166, 167]. Keiner dieser Mechanismen scheint jedoch alleinig für die Entstehung und Aufrechterhaltung von GI verantwortlich zu sein. Es handelt sich vielmehr um einen multifaktoriellen Prozess, an dem verschiedene komplexe Komponenten beteiligt sind. Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, die verzögerten Effekte von IR in den klonalen Nachkommen bestrahlter Zellen zu untersuchen, um bislang unbekannte genetische Aspekte, die über die Destabilisierung des Genoms zur Tumorentstehung beitragen, aufzudecken. Um dies zu erreichen, sollen zunächst durch klassische zytogenetische Analysen genetisch identische chromosomal stabile und chromosomal instabile Nachkommen bestrahlter Zellen charakterisiert werden. Mittels DNA-Mikroarrays und Whole Exome Sequencing (WES) sollen Gene und Netzwerke identifiziert werden, die allgemein strahlenbedingte Veränderungen

zeigen oder mit RIGI assoziiert sind. Von zentralem Interesse sind Gene und Signalwege, die an der DDR beteiligt sind, da diese die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität sichern. Es sollen Zellen von zwei unabhängigen Spendern untersucht werden, um potentielle interindividuelle Effekte zu beurteilen. Darüber hinaus sollen Nachkommen von Zellen, die keiner Strahlung ausgesetzt waren, als Kontrollen für normale Alterungsprozesse dienen. Die Studie kann potentielle Marker identifizieren, die bei der Beurteilung indirekter Strahlenschäden relevant sein könnten.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Biologisches Material

Die Experimente in der vorliegenden Arbeit wurden an Fibroblasten von sieben verschiedenen männlichen Feten durchgeführt. Die Zellen stammten aus der Abteilung zytogenetische Diagnostik des Instituts für Humangenetik der Universität Würzburg. Es handelte sich um überschüssiges, durch eine Fruchtwasserpunktion gewonnenes Material, welches nach Ausschluss eines pathologischen Befundes durch die Routinediagnostik anonymisiert für die Forschung freigegeben wurde.

In den nachfolgenden Tabellen sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Adaptersequenzen, kommerziellen Kits, Chemikalien und Reagenzien, sowie die Geräte alphabetisch mit Herstellerangaben aufgeführt. Darüber hinaus sind alle für diese Arbeit hergestellten Medien, Puffer und Lösungen mit Hinweisen zu deren Zusammensetzung nach Verwendungszweck aufgelistet. Materialien, die zur allgemeinen Laborausstattung gehören, stammen von verschiedenen Herstellern und sind nicht explizit erwähnt.

2.1.2. Adaptersequenzen für das Whole Exome Sequencing

Tabelle 1: Index Adaptersequenzen für das WES.

Index 1 (i7)	Sequenz	Index 2 (i5)	Sequenz
N701	5'-TAAGGCGA-3'	E505	5'-CTCCTTAC-3'
N702	5'-CGTACTAG-3'	E506	5'-TATGCAGT-3'
N703	5'-AGGCAGAA-3'		
N704	5'-TCCTGAGC-3'		
N705	5'-GGACTCCT-3'		
N706	5'-TAGGCATG-3'		
N707	5'-CTCTCTAC-3'		
N708	5'-CAGAGAGG-3'		
N709	5'-GCTACGCT-3'		

2.1.3. Kommerzielle Kit-Systeme

Tabelle 2: Kommerzielle Kit-Systeme mit Herstellerangaben.

Kit-System	Hersteller
Agilent High Sensitivity DNA Kit	Agilent Technologies, Waldbronn (GER)
HumanCytoSNP-12 v2.1 BeadChip	Illumina, San Diego (USA)
NextSeq High Output v2 kit (150 cycles)	Illumina, San Diego (USA)
Qubit dsDNA BR Assay Kit	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Quick-gDNA MiniPrep Kit	Zymo Research, Californien (USA)
SALSA MLPA probemix P063-B1 FHIT-WWOX Kit	MRC-Holland, Amsterdam (NLD)
TruSeq Rapid Exome Library Prep Kit	Illumina, San Diego (USA)
Vysis CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen	Abbott Laboratories, Illinois (USA)
Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit	

2.1.4. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben.

Bezeichnung	Hersteller und Firmensitz
Alconox Detergent	Sigma-Aldrich, München (GER)
Chang-Medium mit L-Glutamin	Irvine Scientific, Kalifornien (USA)
Colcemid (10 µg/ml)	Life Technologies, Warrington (UK)
ddH ₂ O Ampuwa®	Fresenius, Homburg (GER)
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄ , M = 228,28 g/mol)	Merck, Darmstadt (GER)
Dimethylsulfoxid (DMSO, ≥ 99.5%)	Roth, Karlsruhe (GER)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ , 177,99 g/mol)	Applichem, Darmstadt (GER)
Dulbeco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX + 4.5 g/l D-Glucose + Pyruvate (DMEM)	Life Technologies, Warrington (UK)
Dulbeco's phosphate buffered saline (DPBS 1x)	Anprotec, Bruckberg (GER)
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA, 0,5 M)	Promega, Madison (USA)
Essigsäure (CH ₃ COOH, 100 %)	Roth, Karlsruhe (GER)
Ethanol absolut (C ₂ H ₆ O)	Scheller, Euerbach, (GER)
Fetal Bovine Serum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach (GER)
Fixogum	Marabu, Tamm (GER)
Formaldehyd (CH ₂ O, 37%)	Applichem, Darmstadt (GER)
Formamid (CH ₂ O, >99.5%)	Sigma-Aldrich, München (GER)
Formamid (deionized)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Gene Scan 500 Rox Size Standard	Life Technologies, Warrington (UK)
Giemsa-Stammlösung	Applichem, Darmstadt (GER)
Hank's Balanced Salt Solution (1 x)	PAA, Cölbe, (GER)
Hi-Di Formamid	Life Technologies, Warrington (UK)
Immersionsöl	Zeiss, Oberkochen (GER)
Injektionsflasche Ampuwa® 50 ml	Fresenius, Homburg (GER)
Kaliumchlorid (KCl, 74, 56 g/mol)	Applichem, Darmstadt (GER)
KORASILON-Paste	Bayer, Leverkusen (GER)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ , M = 203,39 g/mol)	Applichem, Darmstadt (GER)

Methanol (CH ₃ OH ≥99,9 %)	Roth, Karlsruhe (GER)
Natriumchlorid (NaCl, M = 58,44 g/mol)	Applichem, Darmstadt (GER)
Natriumhydroxidlösung (NaOH, 1 M)	Applichem, Darmstadt (GER)
Pencillin/Streptomycin (10.000 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml)	PAN Biotech, Aidenbach (GER)
Pepsin, 10% Stocklösung	Sigma-Aldrich, München (GER)
PhiX Control v3	Illumina, San Diego (USA)
Salzsäure (HCl, 1M)	Roth, Karlsruhe (GER)
β-Mercaptoethanol	Applichem, Darmstadt (GER)
Trypsin (1:250)	Sigma-Aldrich, München (GER)
Trypsin-EDTA (10 x)	Life Technologies, Warrington (UK)
Vectashield Mounting Medium mit DAPI (1,5 µg/ml)	Vector Laboratories, Burlingame (USA)

2.1.5. Medien, Puffer und Lösungen

Tabelle 4: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen mit Angaben zur Zusammensetzung.

Medium/Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Zellkultur	
Trypsinlösung	10 ml 0,5 % Trypsin-EDTA (10 x) 90 ml 1 × PBS
Abstopp-Medium (200 ml)	30 ml FKS 1 ml Penicillin/Streptomycin ad. 200 ml DMEM
Einfriermedium	30 ml DMEM 7,5 ml FKS 5 ml DMSO
Chromosomenaufarbeitung und -Bänderung	
Kaliumchloridlösung	5,592 g KCl ad. 1 L Ampuwa
Fixativ	10 ml Essigsäure 30 ml Methanol
Phosphatpuffer für Giemsalösung (pH 6,88)	0,025 M K ₂ PO ₄ ad. 1 L Ampuwa 0,25 M Na ₂ HPO ₄ × H ₂ O ad. 1 L Ampuwa Mischung der beiden Lösungen im Verhältnis 1:0,87
Trypsinlösung	0,5 g Trypsin (1:250) 100 ml Hank's Balanced Salt Solution (1 x)
5 % Giemsa färbelösung	5 ml Giemsa-Stammlösung 10 ml Giemsa-Puffer 85 ml Ampuwa
Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	
0,01 N HCl-Lösung (1L)	10 ml HCl 990 ml Ampuwa

Pepsinlösung	40 ml 0,01 N HCl 40 µl Pepsin (10 % Stammlösung)
4 % Formaldehydlösung	4,32 ml Formaldehyd (37 %) 0,1904 g MgCl ₂ ad. 40 ml 1 × PBS
20 × SSC	NaCl (3 M) 300 mM Trinatriumcitrat × 2 H ₂ O ad. 1 L Aqua bidest.
Denaturierungslösung	10 ml 20 × SSC 20 ml Ampuwa 70 ml Formamid
70 % Ethanol	70 ml Ethanol (100 %) ad. 100 ml Ampuwa entsprechend 80 % und 90 %
0,4 × SSC	2 ml 20 × SSC ad. 100 ml Ampuwa
Waschlösung	1 ml NP40 100 ml 20 × SSC 900 ml Ampuwa
CytoSNP-12	
95 % Formamidlösung	9,5 ml Formamid 20 µl EDTA 480 µl Ampuwa
MLPA	
Formamidlösung	20 µl Hi-Di Formamid 0,5 µl Rox dye

2.1.6. Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben.

Gerätebezeichnung	Hersteller mit Firmensitz
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn (GER)
AirClean 600 PCR Workstation UV-Bench	AirClean Systems, Raleigh (USA)
ALPS 25 Manual Heat Sealer	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Bioanalyzer Chip Priming-Station	Agilent Technologies, Waldbronn (GER)
Brutschrank/Inkubator B5042E	Heraeus, Hanau (GER)
Brutschrank/Inkubator BM 500	Memmert, Schwabach (GER)
CCD-Kamera	Applied Spectral Imaging, Carlsbad (USA)
Corning® Zellkulturflasche (25 cm ² , 75 cm ²)	Life Sciences, Carlsbad (USA)
Cryotubes	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Deckgläser (18 × 18 mm)	Roth, Karlsruhe (GER)
Deckgläser (24 × 60 mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen (GER)
Delta Range PM 460	Mettler Toledo, Giessen (GER)
Exsikkator	Roth, Karlsruhe (GER)

Flüssigstickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim, Bad Soden am Taunus (GER)
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	W. Schreck, Hofheim (GER)
Gefrierbehälter CoolCell	Biocision, Mill Valley (USA)
Genetic Analyzer 3130xl	Applied Biosystems, Foster City (USA)
Gewebekulturplatte (6-Well, 12-Well, 24-Well, 48-Well)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AUT)
Gewebekulturschale (100 × 20 mm)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AUT)
HeraCell 240	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
High-Speed Microplate Shaker	Illumina, San Diego (USA)
Hybex Microsample Incubator	SciGene, Sunnyvale (USA)
Hybridization Oven	Illumina, San Diego (USA)
Inkubations- / Inaktivierungsbad	GFL, Burgwedel (GER)
iScan System	Illumina, San Diego (USA)
Klonierungsring (10 mm × 9 mm)	Werkstatt Biozentrum, Würzburg (GER)
LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau (GER)
Magnetständer DynaMag-2	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Mastercycler nexus	Eppendorf, Hamburg (GER)
Mikroliter-Pipetten	Brand, Wertheim (GER)
NextSeq 500	Illumina, San Diego (USA)
Objektträger Superfrost	Menzel-Gläser, Braunschweig (GER)
Optische Filter	AHF Analysentechnik, Tübingen (GER)
Pipetten Eppendorf Multichannel Plus	Eppendorf, Hamburg (GER)
Pipetten Eppendorf Research Plus (0,1 µl-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg (GER)
Primus L	Siemens, München (GER)
Qubit Fluorometer	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Rack Chamber 48 Pos. Te-Flow with consumables	Tecan Group Ltd., Männedorf (CHE)
Tischkonzentrator, Concentrator Plus	Eppendorf, Hamburg (GER)
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Mikroskope	
Axioimager A1 mit Objektiven	Zeiss, Jena (GER)
Axioskop 40 und MC100 mit Objektiven	Zeiss, Jena (GER)
CK2 Mikroskop	Olympus, Hamburg (GER)
Metall-Halid Lampe (HXP120)	Zeiss, Jena (GER)
Zentrifugen	
Megafuge 1.0 und 11	Heraeus, Hanau (GER)
Multifuge 3SR+/ X1R/ X3	Heraeus, Hanau (GER)
Pico 17 Mikrozentrifuge	Heraeus, Hanau (GER)

2.1.7. Programme und Online-Tools

Die nachfolgende Tabelle listet alle verwendeten Programme und Online-Tools mit Anwendungsbereich und Firmensitz oder Link auf. Informationen zu der Funktion von Genen und Proteinen sind, soweit nicht explizit auf eine andere Referenz hingewiesen ist, aus den Datenbanken GeneCards, bzw. UniProtKB entnommen.

Tabelle 6: Verwendete Programme und Online-Tools.

Software/Online Tool	Anwendungsbereich	Hersteller mit Firmensitz/Link
Bedtools	Berechnung der Abdeckungstiefe	https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/
Beeline Software	Reduzierung des Datenvolumens des Array-Datensets	Illumina, San Diego (USA)
BlueFuse Multi Software	Visualisierung und Analyse der Array Daten	Illumina, San Diego (USA)
BlueGnome	Annotations-Datenbank	www.cambridgebluegnome.com
Burrows-Wheeler Aligner 0.7.12-r1039	Demultiplexen und Mappen der Reads	https://sourceforge.net/projects/bio-bwa/files/
Case Data Manager 6.0	Datenbank der GenASIs Pakete	Applied Spectral Imaging, Carlsbad (USA)
Coffalyser.net Software	Visualisierung und Analyse der MLPA Daten	MRC-Holland, Amsterdam (NLD)
COSMIC	Liste somatischer Mutationen in verschiedenen Krebsarten	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic
Enrichr	Anreicherungsanalyse von Signalwegen und GO-Terms	http://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/
Ensembl variant effect predictor	Vorhersage von funktionellen Konsequenzen von Varianten	https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html
FISHView 2.0	Analyse der FISH Daten	Applied Spectral Imaging, Carlsbad (USA)
GenASIs BandView	Chromosomenanalyse und Erstellung von Karyogrammen	Applied Spectral Imaging, Carlsbad (USA)
GeneCards	Datenbank humaner Gene	https://www.genecards.org/
GenomeStudio Software	Visualisierung und Analyse der Array Daten	Illumina, San Diego (USA)
GenSearchNGS	Visualisierung und Analyse der NGS-Datensätze	Phenosystems, Braine le Chateau (BEL)
Microsoft Office 2016	Datenauswertung, Textverarbeitung und Erstellen von Abbildungen	Microsoft Corporation, Redmond (USA)
MuSiCa	Tool zur Analyse von Mutationssignaturen	http://bioinfo.ciberehd.org:3838/MuSiCa/
PhenoGram Vizualization tool	Erstellung von Phenogrammen	http://visualization.ritchielab.org/phenograms/plot
R	Statistische Auswertung und Erstellung von Grafiken	https://www.r-project.org/
SPSS Statistics 25	Statistische Auswertung von allen Daten	IBM (New York, USA)
TSGene	Tumorsuppressorgen-Datenbank	https://bioinfo.uth.edu/TSGene/

UCSC cytoBand	Positionen der zytogenetischen Banden	http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/hg18/database/cytoBand.txt.gz
UniProtKB	Datenbank für Proteinsequenzen	https://www.uniprot.org/uniprot/

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkulturtechniken und klassische zytogenetische Analysen

2.2.1.1. Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden unter Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO₂-Gehalt) in T25- oder T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Zellen erhielten Chang-Medium mit L-Glutamin, welches alle zwei Tage ausgewechselt wurde. Mögliche Kontaminationen wurden durch optische Kontrolle der ausgesäten Zellen täglich ausgeschlossen. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90 % erreichten, wurden sie subkultiviert. Dies ist nötig, da es bei steigender Zellzahl durch die Kontaktinhibition zum Stoppen des Wachstums der Zellen kommen kann. Für die Subkultivierung wurde das Medium abgenommen und der Monolayer mit 1 × Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl. phosphate buffered saline, PBS) gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsinlösung (Tabelle 4) und etwa fünfminütiger Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen vom Flaschenboden gelöst. Zur Inaktivierung der Enzymreaktion wurden 5 ml Abstopp-Medium (Tabelle 4) zugegeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden Zellklumpen voneinander gelöst. Die Suspension wurde dann in einem 15 ml Röhrchen 8 Minuten (min) bei 1100 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml Chang-Medium gelöst und in neue Zellkulturflaschen, in denen das entsprechende Medium vorgelegt wurde, transferiert. Einen Tag nach der Subkultivierung wurde das Medium gewechselt, um nicht angeheftete Zellen aus der Kultur zu entfernen.

2.2.1.2. Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C in speziell dafür vorgesehenen Tanks (Tabelle 5). Die adhärennten Zellen wurden bei einer Konfluenz von 90 % wie beschrieben (siehe Kapitel 2.2.1.1 Kultivierung der Zellen, S.29) vom

Zellkulturflaschenboden gelöst und pelletiert. Das entstandene Pellet wurde in dem entsprechenden Volumen Einfriermedium (Tabelle 4) resuspendiert und in sterile Kryoröhrchen pipettiert. Bei DMSO handelt es sich um ein Lösungsmittel, welches die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren von Zellen verhindert. Die Röhrchen wurden über Nacht in einer speziellen Einfrierbox (Tabelle 5) mit Isopropanol zur Temperatursenkung bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden diese direkt nach Entnahme aus dem Stickstofftank für 5 min bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in eine Zellkulturflasche mit vorgewärmtem Chang-Medium transferiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt, um das vorhandene DMSO und nicht angeheftete Zellen zu entfernen.

2.2.1.3. Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension unter das Hämocytometer-Deckglas in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer pipettiert. Die Zählkammer besteht aus 16 Großquadraten mit einer Größe von 1 mm pro Quadrat. Jedes Großquadrat besteht seinerseits aus 4 × 4 Kleinquadraten mit je einer Fläche von 0,0625 mm². Es ergibt sich ein Rauminhalt von 3,2 µl.

Unter einem invertierten Phasenkontrastmikroskop wurden die Zellen der gesamten Großquadrat-Fläche ausgezählt und mit folgender Formel die Zellzahl pro ml Zellsuspension bestimmt:

$$\text{Zellzahl pro ml Suspension} = \frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen pro Großquadrat} \times 1000}{\text{Kammerfaktor } 3,2}$$

Der Kammerfaktor ergibt sich aus dem Produkt der ausgezählten Fläche (16 × 1 mm²) und der Kammertiefe (0,2 mm).

2.2.1.4. Bestrahlung

Für die Bestrahlungsexperimente wurden Zellen so ausgesät, dass sie am Tag des Experiments eine subkonfluente Dichte hatten. Einen Tag vor der Bestrahlung wurde das Medium gewechselt. Für den Transport der Zellen wurden die Zellkulturflaschen in Styroporboxen auf 37 °C vorgewärmte Wärmepads gelegt und möglichst nicht bewegt. Die Bestrahlung erfolgte mit einem Siemens Primus L Linearbeschleuniger (sechs Megavolt) in der Klinik und Poliklinik

für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Würzburg. Die Kulturen erhielten bei RT eine Einzeldosis von 2 Gy (8 Gy/min).

2.2.1.5. Herstellung der Zellkulturklone

Nach Bestrahlung wurden die Zellen für 24 Stunden weiter kultiviert, um eine Reparatur des durch Bestrahlung induzierten Schadens zu ermöglichen. Die Zellen wurden geerntet und die Zellzahl bestimmt. Dreihundert überlebende Zellen wurden jeweils in 100 mm Petrischalen ausgesät und weiter kultiviert, bis einzelne Kolonien sichtbar waren (Abbildung 8). Mit Hilfe eines Klonierungsringes wurden die Kolonien isoliert. Dazu wurde eine Öffnung des Ringes mit den Maßen 10 mm × 9 mm in autoklavierte Silikonpaste getaucht und über die Kolonie gestülpt, um diese von den anderen Zellen zu trennen. Durch Zugabe von 10 µl Trypsinlösung in den Klonierungsring wurde die Kolonie vom Boden der Petrischale gelöst. Nach Inaktivierung der Enzymaktivität wurden möglichst alle Zellen einer Kolonie vorsichtig mit einer Pipette in eine 48-Multiwell-Zellkulturplatte überführt, in die pro Well 200 µl Medium vorgelegt wurden. Sobald die Kolonie eine Konfluenz von 90 % erreichte, wurde sie in eine Platte mit 12-Well, dann in eine Platte mit 6-Well und schließlich in T25-Zellkulturflaschen überführt, bis die Kolonie aus etwa 1.000.000 Zellen bestand. Die Zellen befanden sich dann in der 20. Populationsverdopplung (engl. *population doubling*, PD). Zu diesem Zeitpunkt wurde ein Teil der Zellen für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren und der Rest für die Chromosomenpräparation und DNA-Isolation verwendet. Nicht bestrahlte Zellen wurden als Kontrolle parallel kloniert.

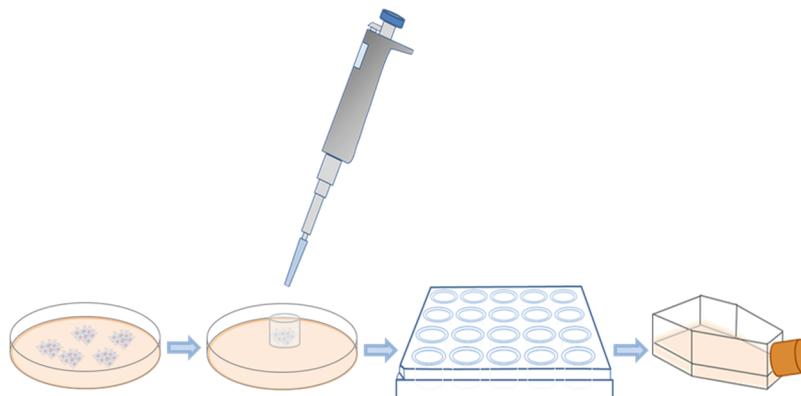


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Herstellung von Zellkulturklonen. Zellkulturklone wurden mit Hilfe von Klonierungsringen isoliert und in Multiwell-Zellkulturplatten und Zellkulturflaschen expandiert.

2.2.1.6. Chromosomen-Präparation aus adhärennten Fibroblastenkulturen

Die Analyse von Chromosomen erfolgt im Metaphasestadium, wenn sie den höchsten Kondensationsgrad haben und lichtmikroskopisch gut sichtbar sind. Für die Präparation der Chromosomen aus Fibroblastenkulturen sollten sich daher möglichst viele Zellen in der Mitose befinden. Unter dem Mikroskop haben diese Zellen eine runde Form. Der erste Schritt der Präparation beinhaltet die Zugabe von 70 µl Colcemid (10 µg/ml) pro T25-Zellkulturflasche in das Medium der Zellen. Colcemid ist ein weniger toxisches Derivat von Colchizin. Beide Spindelgifte verhindern die Ausbildung der Spindelfasern, wodurch die Zellen in der Mitose arretiert werden [168]. Um viele Zellen in der Metaphase anzureichern erfolgte eine Inkubation für drei Stunden. Nach der Colcemid-Behandlung wurden die Zellen geerntet und mit dem Medium bei 1400 rpm für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 0,075 M Kaliumchloridlösung für 16 min bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt dient zur hypotonen Behandlung der Zellen. Durch den osmotischen Druck diffundiert Wasser in die Zellen, diese schwellen an, sodass die Chromosomen auseinanderweichen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in eiskaltem Fixativ, bestehend aus einem Methanol-Eisessig-Gemisch im Verhältnis 3:1, gelöst. Zur Konservierung wurde die Suspension über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml frischem Fixativ resuspendiert. In diesem Zustand können die Zellen über längere Zeit bei 4 °C gelagert werden.

Vor dem Auftropfen der Zellen auf die Objektträger wurden diese zunächst für 3 min in fließendem heißem Wasser und für weitere 3 min in fließendem destilliertem Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden mit einem fusselfreien Tuch getrocknet und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert. Mit einer Pasteurpipette wurden wenige Tropfen der Zellsuspension auf die Objektträger aufgetropft, wodurch die Zellen aufplatzen und sich die Chromosomen auf dem Objektträger ausbreiten. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und anschließend die Qualität der Chromosomen, sowie deren Spreitung mikroskopisch kontrolliert. Zur Optimierung der Spreitung wurden die Objektträger gegebenenfalls kurz durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen. Die Analyse mittels G-Bänderung (engl. *G-bands by Trypsing using Giemsa*) oder Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) erfolgte direkt im Anschluss oder am nächsten Tag.

2.2.1.7. G-Bänderung

Bei der G-Bänderung handelt es sich um eine zytogenetische Methode, bei der Chromosomen zunächst mit Trypsin verdaut und anschließend mit Giemsa gefärbt werden. Jedes Chromosom erhält so ein individuelles Muster aus hellen und dunklen Banden. Die Regionen der dunklen Banden sind bekanntermaßen spät replizierend und enthalten stark kondensiertes Chromatin, während die hellen Banden genreich und früh replizierend sind [169]. Lange Zeit wurde angenommen, dass dunkle Banden AT-reich und helle Banden GC-reich sind [170]. Mittlerweile ist aber bekannt, dass sich der Unterschied im AT-Gehalt der Banden nur um wenige Prozentpunkte unterscheidet [171]. Neue Färbetechniken deckten auf, dass das Bandenmuster auf die unterschiedliche Faltung der AT-reichen *scaffold attached regions* entlang der längslaufenden Chromatiden zurückzuführen ist [170, 171].

Für die Bänderung wurden die fixierten Zellen wie beschrieben auf die Objektträger ausgetropft und für 90 min bei 90 °C gealtert. Nach dem Abkühlen der Objektträger wurden die Präparate für 60–120 Sekunden (s) in Trypsin/PBS-Lösung (Tabelle 4) behandelt und kurz in 1 × PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Präparate 4 min in Giemsalösung, bestehend aus 5 ml gefilterter Giemsa-Stammlösung, 85 ml destilliertem Wasser und 5 ml Sörensen-Puffer, gefärbt. Die Objektträger wurden nach der Inkubationszeit kurz in destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet.

2.2.1.8. Interphase Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die FISH beruht auf der Bindung markierter, einzelsträngiger Sonden an komplementäre DNA Bereiche [169]. Die Sonden sind fluoreszenzmarkiert, sodass selektiv zu analysierende Bereiche sichtbar gemacht werden können. Die Hybridisierung zwischen DNA und Sonde erfolgt direkt auf dem Objektträger. Die Interphase FISH wurde unter Verwendung des Vysis CEP X SpectrumOrange/Y SpectrumGreen Direct Labeled Fluorescent DNA Probe Kit (Abbott Laboratories, Illinois, USA) durchgeführt. Die Sonden binden an spezifische Bereiche der Chromosomen, sodass deren genaue Anzahl im Interphasekern bestimmt werden kann (Abbildung 9).

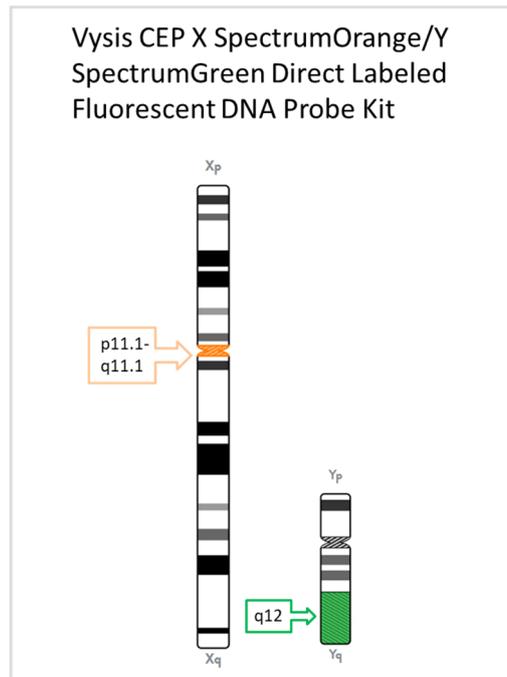


Abbildung 9: Chromosomenideogramme für die Sonden des verwendeten FISH-Kits. Abkürzungen: p: kurzer Chromosomenarm, q: langer Chromosomenarm (Abbildung entnommen aus [Internetquelle 2] und modifiziert).

Für die Vorbehandlung der Objektträger wurden einige Tropfen der zu analysierenden Zellsuspension auf einen gereinigten OT getropft und bei RT getrocknet. Unter dem Phasenkontrastmikroskop wurde ein Bereich mit vielen Zellkernen markiert. Die Objektträger wurden für 20 min in frisch angesetzter Pepsinlösung (0,01 %) bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Durch den Pepsin-Verdau wird Zytoplasma entfernt, welches später das Hybridisierungssignal stören könnte. Im Anschluss wurden die Objektträger für 5 min bei RT in PBS gewaschen und für weitere 5 min bei RT in 4 % Paraformaldehydlösung (in 50 mM MgCl₂/PBS) inkubiert, um die Präparate nachzufixieren. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Objektträger zum Trocknen aufgestellt. Zur Entwässerung wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe bestehend aus eiskaltem 70 %, 85 % und 100 % Ethanol (EtOH) für jeweils 2 min inkubiert und wieder luftgetrocknet. Für die Denaturierung der DNA wurden die Objektträger in eine 70 % Formamid/SSC-Lösung transferiert und für 2 min im Wasserbad bei 72 °C inkubiert. Die Objektträger wurden im Anschluss erneut in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und bei RT getrocknet. Fünf Mikroliter der DNA-Sonde wurden für 5 min bei 72 °C im Wasserbad inkubiert und auf die markierte Stelle des Objektträgers pipettiert. Der Bereich wurde mit einem 18 × 18 mm großen Deckglas luftblasenfrei eingedeckt und das Deckglas mit Kleber umrandet. Um die fluoreszenzmarkierte

Sonde an die zu analysierenden Chromosomenabschnitte zu hybridisieren wurde der OT über Nacht bei 37 °C in einer mit angefeuchtetem Whatman-Papier ausgelegten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden das Deckglas und der Kleber entfernt und die Objektträger in eine Waschlösung bestehend aus 0,4 × SSC gestellt und bei 72 °C für 2 min inkubiert. Es folgten ein weiterer Waschschrift in NP-40 bei RT und schließlich ein kurzer Spülschritt in destilliertem Wasser. Die Waschschriffe werden durchgeführt um nicht hybridisierte Überschüsse der Sonde zu entfernen und um so das Hintergrundsignal zu reduzieren. Die Objektträger wurden mit einigen Tropfen Vectashield Mounting Medium mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (engl. *4',6-diamidino-2-phenylindole*, DAPI) versehen und mit einem 24 × 50 mm Deckglas eingedeckt. Bei DAPI handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff der vorzugsweise in AT-reichen Regionen der DNA bindet, sodass auch der nicht spezifische Hintergrund (der gesamte Zellkern) dargestellt werden kann. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Präparate bei 4 °C gelagert.

2.2.1.9. Mikroskopische Auswertung und Bildbearbeitung

Die Auswertung der Chromosomenbänderungen erfolgte an einem Mikroskop des Typs Axioskop. Der zu analysierende Objektträger wurde zunächst mit einem 10 × Objektiv nach geeigneten Metaphasen gescreent. Zur feinstrukturellen Analyse und zur Aufnahme der Metaphase wurde zu einem 100 × Ölimmersionsobjektiv gewechselt. Mit einer Charge Coupled Device (CCD)-Kamera wurden die entsprechenden Metaphasen über die Software GenASIs BandView aufgenommen. Zur Erstellung der Karyogramme wurden die Bilder der Metaphasen zunächst in ihrer Helligkeit und im Kontrast optimiert. Anhand ihres individuellen Bandenmusters wurden die Chromosomen an die jeweiligen Positionen im Karyogramm der Software sortiert. Die Aberrationen wurden nach dem internationalen Standard (ISCN 2016) klassifiziert [172].

Zur Analyse der FISH-Präparate wurde ein Epifluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss verwendet. Die Anregung der Fluorochrome erfolgte mit einer Metall-Halid Lampe (HXP120). Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht in erster Linie darauf, dass durch Verwendung geeigneter Filter das Anregungslicht und das vom Farbstoff emittierte Licht voneinander getrennt werden [Internetquelle 3]. Dabei trifft das Licht der Lampe zunächst auf einen Anregungsfilter, welcher die notwendige Wellenlänge isoliert [Internetquelle 3]. Ein dichroitischer Spiegel reflektiert das Licht, welches dann durch das Objektiv auf die Probe trifft

[Internetquelle 3]. Das vom Fluorochrom emittierte Licht wird im Objektiv gesammelt und zurück zum dichroitischen Spiegel gelenkt. Vom Spiegel wird das Anregungslicht zurück in die Lichtquelle reflektiert, während das längerwellige Emissionslicht den Spiegel passiert und auf den Emissionsfilter trifft, bevor es in das Okular des Mikroskops oder in die Kamera geleitet wird [Internetquelle 3]. Die Zellkerne wurden durch ein 100 × Ölimmersionsobjektiv mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Für die individuelle Darstellung der Fluorochrome (DAPI, FITC, Cy3) wurden drei Bandpassfilter verwendet und entsprechend für jeden Zellkern mehrere Aufnahmen gemacht.

Mit Hilfe der Software Case Data Manager 6.0 und FISHView 2.0 wurden die Signale der Sonden, sowie die DAPI-Färbung des Zellkerns visualisiert und farblich optimiert. Die zur Analyse beider Techniken verwendete mikroskopische Ausstattung stammte von der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland). Die verwendete Software, sowie die CCD-Kameras stammten von der Firma Applied Spectral Imaging (Carlsbad, USA).

2.2.2. Analyse von Kopienzahlvariationen

2.2.2.1. Isolation genomischer DNA aus Zellen und Konzentrationsbestimmung

Die Isolation genomischer DNA (gDNA) aus Zellen erfolgte mit Hilfe des Quick-gDNA MiniPrep Kits nach Angaben des beigelegten Handbuchs (Abschnitt adhärenzte Zellkulturen) (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Die DNA wurde in 60 µl Puffer eluiert.

Die Konzentration der DNA wurde unter Verwendung des Qubit dsDNA BR Assay Kits (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) am Qubit Fluorometer (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Es handelt sich dabei um eine fluoreszenzbasierte Quantifizierungsmethode, bei der spezifisch doppelsträngige DNA detektiert wird. Durchgeführt wurde die Messung entsprechend der Anleitung im „User Guide: Qubit dsDNA BR Assay Kits“ (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/Qubit_dsDNA_BR_Assay_UG.pdf). Die isolierte DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei –20 °C gelagert.

2.2.2.2. Illumina Infinium HumanCytoSNP-12 BeadChip Arrays

Für die genomweite Analyse von strukturellen Variationen wurde das HumanCytoSNP-12 v2.1 BeadChip Kit (Illumina, San Diego, USA) verwendet.

Mit Hilfe der BeadChips können Mikroduplikationen, Mikrodeletionen, Regionen mit Verlust der Heterozygotie ohne Veränderung der CN (engl. *copy neutral loss of heterozygosity*, CN-LOH) und Mosaik detektiert werden, die unterhalb der Auflösungsgrenze der G-Bänderung und der FISH liegen. Die Bead-Array-Technologie beruht dabei auf der Fähigkeit der Selbstassemblierung kleiner Beads in Mikrowells des Chips [Internetquelle 4]. Jeder Bead ist mit einer Vielzahl von spezifischen Oligonukleotiden bedeckt [Internetquelle 4]. Nach der Selbstassemblierung erfolgt die Dekodierung, bei der die Lage eines jeden Beads erfasst wird [Internetquelle 4]. Die Lage der Beads ist zufällig, die Dekodierung erfolgt durch die Firma [Internetquelle 4].

Die Infinium Technologie erlaubt die effiziente Genotypisierung von 300.000 Markern in 250 krankheitsrelevanten Regionen, dazu gehören subtelomerische und perizentromerische Regionen, sowie die Geschlechtschromosomen [Internetquelle 5]. Die eingesetzte DNA-Menge betrug 200 ng. Die Durchführung des Protokolls erfolgte entsprechend der Angaben im „Infinium HD Assay Ultra Manual, Experienced User Card“ (https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/infinium_assays/infinium-hd-ultra/11328095_RevB_Infinium_HD_Ultra_Manual_EUC_11328095_press.pdf). Der Infinium HD-Arbeitsablauf ist in Abbildung 10 dargestellt und beläuft sich auf drei Tage. Während der ersten beiden Schritte wird die gDNA amplifiziert und über Nacht inkubiert (Abbildung 10A und B). Am nächsten Tag wird die amplifizierte DNA enzymatisch fragmentiert (Abbildung 10C). Nach der Präzipitation mit Isopropanol und der anschließenden Resuspension wird der BeadChip für die Hybridisierung vorbereitet (Abbildung 10D). Die Proben werden auf den BeadChip geladen, die Hybridisierung erfolgt über Nacht (Abbildung 10E). Während der Hybridisierung bindet die DNA an die 50 Basenpaar (bp) langen Oligonukleotidsonden. Diese sind komplementär zur DNA-Sequenz, die sich neben dem zu analysierenden SNP befindet [173]. Der nachfolgende Prozess der enzymatischen Einzelbasenverlängerung (engl. *single base extension*) sichert die Allelspezifität. Hierbei werden fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate eingebaut, die komplementär zum Allel der Proben-DNA sind (Abbildung 10F) [173]. Bei der Bildgebung wird die Fluoreszenz über einen Laser angeregt, das vom Nukleotid emittierte Signal wird durch den iScan (Illumina, San Diego, USA) detektiert (Abbildung 10G) [174]. Über zwei Farbkanäle wird eine Messung für das A-Allel und für das B-Allel durchgeführt, sodass eine Auskunft über das vorhandene Allel in der Zielsequenz gegeben werden kann [175]. Die

Signalintensität ist dabei abhängig von der DNA-Menge, sowie von der Affinität zwischen Probe und Sonde [173]. Für jeden SNP-Lokus werden zwei Datentypen generiert, der Genotyp, sowie die Intensität (Abbildung 10H) [173].

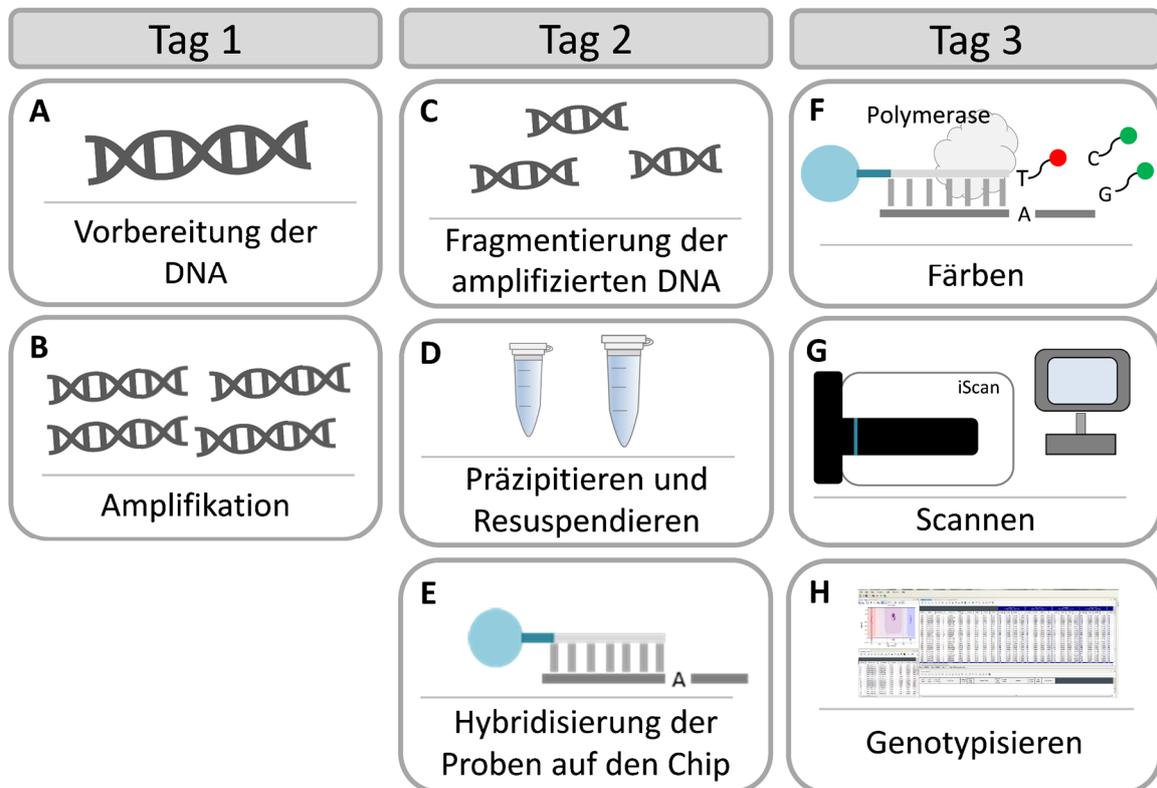


Abbildung 10: Infinium Assay Arbeitsablauf Der Arbeitsablauf beläuft sich auf drei Tage und umfasst die Amplifikation und Fragmentierung der DNA, sowie die Hybridisierung zwischen DNA und Oligonucleotidsonden, die sich auf dem BeadChip befinden. Die Bildgebung erfolgt mit dem iScan (Abbildung erstellt nach [173] und [Internetquelle 4, Internetquelle 6]).

Die Analyse und Interpretation der Daten erfolgte mit dem für die GenomeStudio Software entwickelten Zusatzmodul cnvpartition, sowie mit der BlueFuse Multi Software. Beide Software-Pakete stammen von der Firma Illumina (San Diego, USA). Die vom Scanner erstellten idat-Files wurden zusammen mit einem array-spezifischen Manifest, einem Cluster-File, sowie dem Sample Sheet in die GenomeStudio Software importiert. Das Sample Sheet enthält Informationen zu den einzelnen Proben, sowie zu deren jeweiliger Position auf dem Chip. Für den Datenimport in die BlueFuse Multi Software wurden die idat-Files zunächst mit Hilfe der Beeline Software in GTC-Files konvertiert bzw. das Datenvolumen dadurch reduziert. Für die zuverlässige Einordnung der Ergebnisse wird eine aktuelle Annotations-Datenbank benötigt, die über die „BlueGnome“-Website der Firma Illumina

(Tabelle 6) zugänglich ist. Die Detektion der CNVs erfolgt automatisch mit Hilfe von validierten Algorithmen. Über die beiden Parameter *normalized intensity values* und *allelic intensity ratio* werden die B-Allelfrequenz (BAF) und die LogR-Ratio (LRR) berechnet, die Auskunft über den Genotyp und den CN-Status geben [Internetquelle 7]. Die BAF wird aus dem Verhältnis der Intensitäten der beiden Allele zueinander bestimmt [175]. In einem normalen diploiden Genom sind drei Werte für die BAF möglich: 0,0 (AA), 0,5 (AB) und 1,0 (BB) (Abbildung 11A oben). Kommt es jedoch zum allelischen Ungleichgewicht, sind die Werte der BAF verändert (Abbildung 11B und C oben) [175]. Die gemessene Intensität im Verhältnis zur erwarteten Intensität wird genutzt um die LRR zu berechnen. Jegliche Abweichung von 0 spricht dabei für eine Veränderung der CN (Abbildung 11B und C unten).

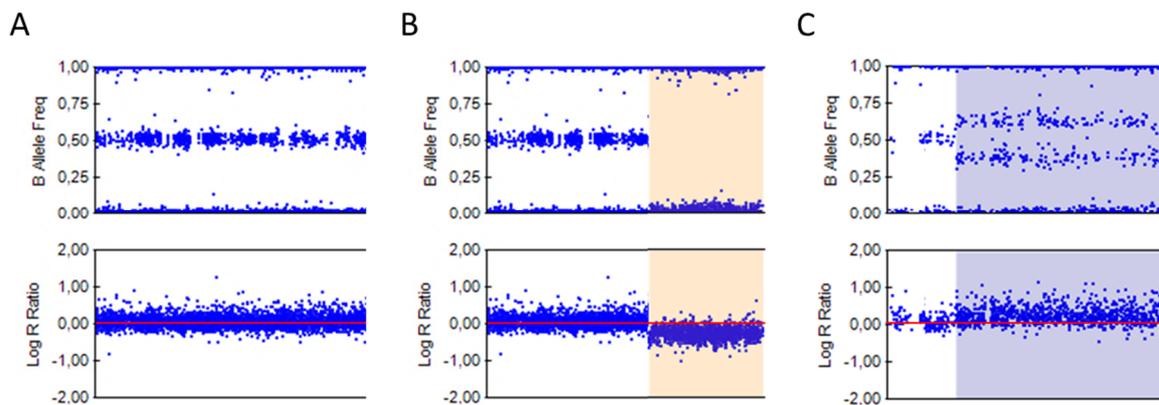


Abbildung 11: Repräsentative Plots der B-Allelfrequenz (BAF) und der LogR-Ratio (LRR) erstellt mit GenomeStudio.(A) ein normales diploides Genom. Für die BAF sind drei Werte möglich: 0, 0,5 und 1. Die LRR zeigt bei 0 eine Kopienzahl von zwei, welches dem Normalzustand entspricht. (B) eine hemizygoten Deletion (Kopienzahl = 1, dunkelorange eingefärbter Bereich) wird dargestellt durch den Verlust der mittleren (heterozygoten) Linie im Plot der BAF und einem Verlust in der Signalintensität im Plot der LRR. (C) hemizygot duplizierte Regionen (Kopienzahl = 3, blauviolett eingefärbter Bereich) zeigen in der BAF zwei neue Subpopulationen, dargestellt durch eine aufgesplittete Linie, während im Plot der LRR eine erhöhte Signalintensität zu sehen ist.

Mit Hilfe des CytoSNP-12 BeadChips können neben dem Zugewinn und dem Verlust von genetischem Material auch CN-LOH-Regionen detektiert werden. Diese Bereiche kennzeichnen sich durch einen Verlust der mittleren Linie im Plot der BAF, während es bei der Signalintensität im Plot der LRR zu keiner Änderung kommt (Abbildung 12).

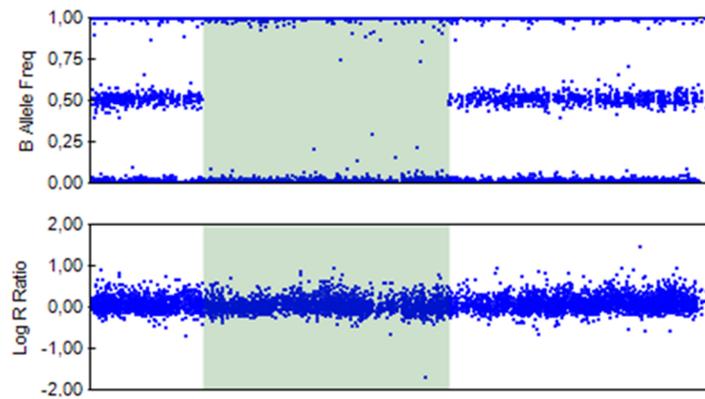


Abbildung 12: Darstellung einer Region mit Verlust der Heterozygotie ohne Veränderung der Kopienzahl erstellt mit GenomeStudio (grün). Plot für die B-Allelfrequenz (oben) zeigt einen Verlust der Datenpunkte bei 50 %, während im Plot der LogR-Ratio (unten) keine Veränderung zu sehen ist.

2.2.2.3. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

Die Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) erlaubt die Detektion von Deletionen und Duplikationen einzelner Exons in einer einzelnen Polymerasekettenreaktion (PCR)-basierten Reaktion. Die Methode wurde erstmals von Schouten und seinen Kollegen beschrieben [176]. Das Protokoll der MLPA umfasst vier Schritte (Abbildung 13A). Zunächst wird die DNA der Proben denaturiert. Für die Hybridisierung wird ein Mix aus sequenzspezifischen Sonden zugegeben [Internetquelle 8]. Jede Sonde besteht aus zwei Oligonukleotiden, die an benachbarte Bereiche der Zielsequenz binden [Internetquelle 8]. Die Oligonukleotide enthalten jeweils eine Primersequenz. Erst nach der Ligation der Oligonukleotide erfolgt die Amplifikation der Sonden [Internetquelle 8]. Im Anschluss werden die Produkte über Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, wobei der Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Primers zur Visualisierung der Produkte dient [Internetquelle 8]. Die Fragmentlänge kann zwischen 150 bp und 500 bp variieren. Für jede Test-Probe, sowie für die Referenz, wird ein individuelles Peakmuster in einem Elektropherogramm erstellt (Abbildung 13B). Durch Vergleich der relativen Peakhöhen sind Veränderungen der Gendosis detektierbar. Da nur ligierte Oligonukleotide amplifiziert werden, entspricht die Menge des entstandenen Produkts der Gendosis der Zielsequenz in der Probe. Nicht ligierte Oligonukleotide besitzen nur eine Primersequenz, die Amplifikation kann nicht erfolgen und es wird kein Signal generiert.

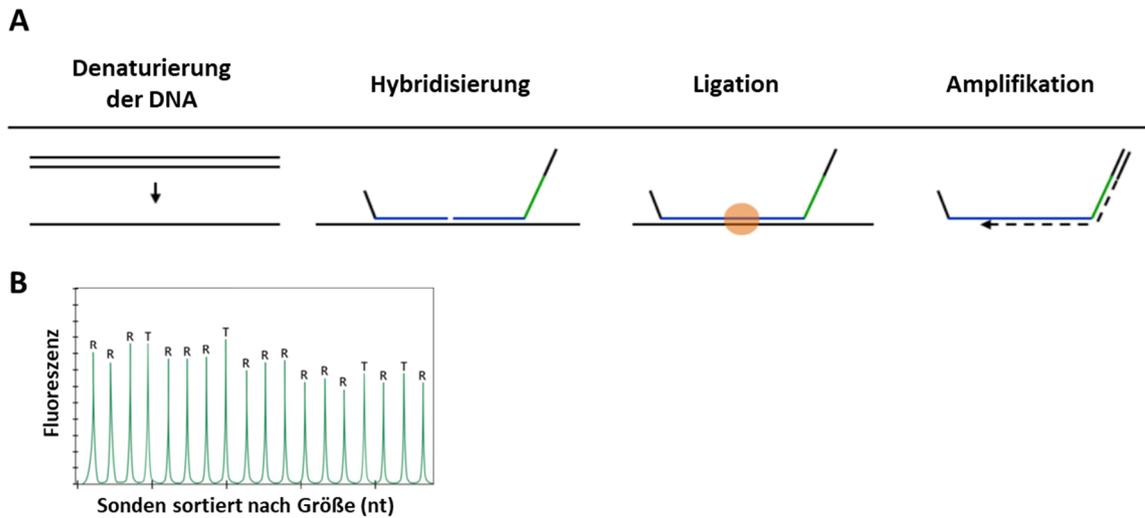


Abbildung 13: Prinzip der MLPA. (A) Die vier Schritte des MLPA Protokolls. (B) Repräsentative Darstellung eines Elektropherogramms. Abkürzungen: nt: Nukleotide (Abbildung übernommen aus dem „MLPA General Protocol“ und modifiziert [Internetquelle 8]).

Für die Bestimmung der *FHIT*-Gendosis wurde das SALSA MLPA probemix P063-B1 FHIT-WWOX Kit verwendet (MRC-Holland, Amsterdam, NLD). Die Durchführung der MLPA erfolgte nach Angaben des beiliegenden Handbuchs „MLPA General Protocol“ (https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_g2hKwvshD9I.) mit leichten Modifikationen des Thermocyclerprogramms (Tabelle 7).

Tabelle 7: Thermocyclerprogramm der MLPA Reaktion.

Thermocycler-Schritt		Temperatur	Dauer
DNA-Denaturierung	1.	98 °C	7 min
	2.	25 °C	∞
Hybridisierung	3.	95 °C	2 min
	4.	60 °C	∞
Ligation	5.	54 °C	∞
	6.	54 °C	20 min
	7.	98 °C	5 min
	8.	20 °C	∞
PCR-Reaktion		95 °C	30 s
	9.*	60 °C	30 s
		72 °C	60 s
	10.	72 °C	20 min
	11.	15 °C	∞

*die Zyklen unter diesem Schritt wurden 34 × wiederholt. Abkürzungen: ∞: Unendlichzeichen.

Die eingesetzte DNA-Menge betrug 60 ng. Die PCR-Produkte wurden durch Kapillargelelektrophorese am ABI3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City USA) aufgetrennt. Die relative Quantifizierung der Amplifikationsprodukte erfolgte mit der Coffalyser.net Software (MRC-Holland, Amsterdam, NLD). Die generierten Daten werden von der Software in einem Säulendiagramm dargestellt (Abbildung 14), aus dem Dosisquotient kann die Gendosis abgelesen werden (Tabelle 8).

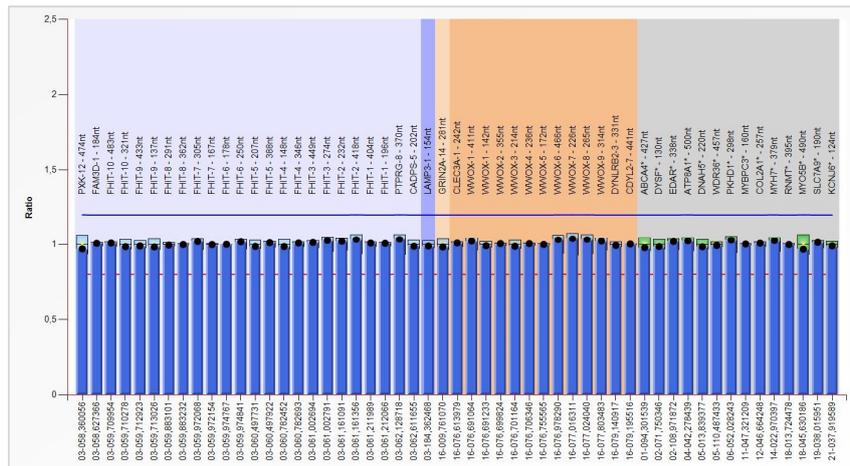


Abbildung 14: Ausschnitt einer Analyse der Genkopienzahl mit Coffalyser.Net. Dargestellt ist das Ergebnis einer MLPA-Analyse in Form eines Säulendiagramms exemplarisch für eine Probe mit normaler Kopienzahl für die Gene *FHIT* und *WWOX*. Abkürzungen: *FHIT*: engl. *fragile histidine triad*; *WWOX*: engl. *ww domain containing oxireductase*.

Tabelle 8: Relative Dosisquotienten und Kopienzahl. (Tabelle entnommen aus dem „MLPA General Protocol“ und modifiziert [Internetquelle 8])

Dosisquotient	Status der Kopienzahl
DQ = 0	homozygote Deletion
0,4 < DQ < 0,65	heterozygote Deletion
0,8 < DQ < 1,20	normal
1,3 < DQ < 1,65	Heterozygote Duplikation
1,75 < DQ < 2,15	Homozygote Duplikation
andere Werte	uneindeutiges Ergebnis

Abkürzungen: DQ: Dosisquotient

2.2.3. Whole Exome Sequencing

Für das WES wurde das TruSeq Rapid Exome Library Prep Kit (Illumina, San Diego, USA) verwendet. Das Kit ermöglicht die Detektion von codierenden Varianten in über 214.000 Exons [Internetquelle 9]. Es können zwölf Proben in einem Pool zusammengefasst werden, wobei eine einheitliche Abdeckung der Zielregion ermöglicht wird (85 % Reads bei 20-facher Tiefe) [Internetquelle 9]. Zur Erhöhung der Abdeckung wurden pro Durchgang neun Proben sequenziert. Das Protokoll besteht aus zwei Teilbereichen, der Library-Herstellung und der Anreicherung, die jeweils in mehrere Arbeitsschritte unterteilt sind (Abbildung 15). Die eingesetzte DNA-Menge betrug 50 ng.

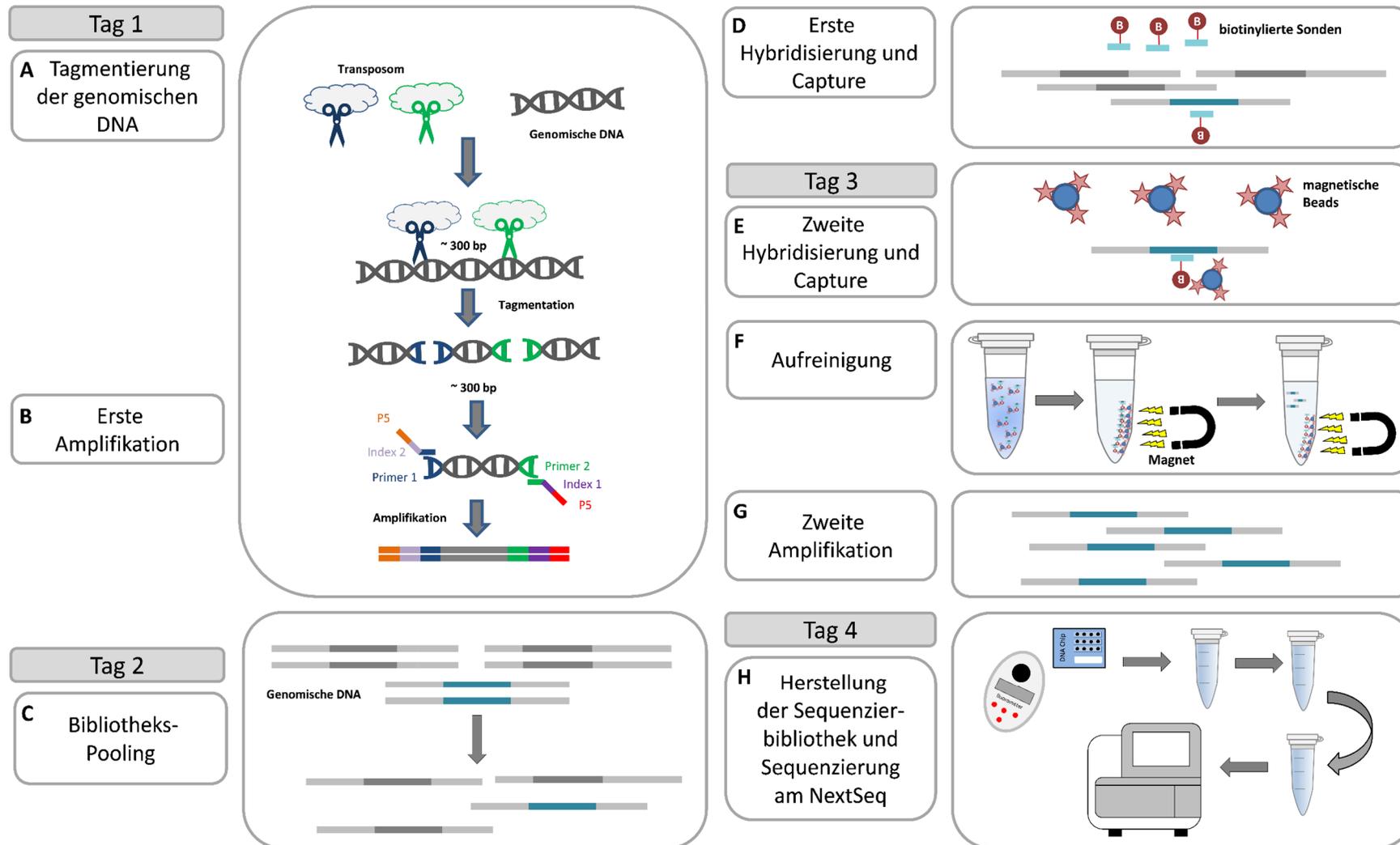


Abbildung 15: Arbeitsschritte des Truseq Rapid Exome Library Kits. Der Arbeitsablauf beläuft sich auf vier Tage und beinhaltet die Herstellung der Library, die spezifische Anreicherung des gesamten Exoms, sowie die Sequenzierung am NextSeq. Abkürzungen: bp: Basenpaar(e) (Abbildung erstellt nach [Internetquelle 10]).

2.2.3.1. Tagmentation der genomischen DNA

Im ersten Schritt wurde die DNA-Konzentration der Proben am Qubit Fluorometer quantifiziert und auf eine Konzentration von 5 ng/μl eingestellt. Im Anschluss folgte die Tagmentation, bei der die gDNA zeitgleich enzymatisch fragmentiert und mit Adaptersequenzen markiert wird (Abbildung 15A). Der für die Tagmentation verwendete Reaktionsansatz sowie die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Tagmentation: Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen.

Reagenz	Volumen für einen Ansatz (μl)
DNA (ng/μl)	10
Tagment DNA Buffer	25
Tagment DNA Enzyme	15
Inkubation 58 °C für 10 min	
Stop Tagment Buffer 2	15
Inkubation 60 °C für 5 min	

Da das für die Tagmentation eingesetzte Transposonenzym an die DNA binden und nachfolgende Prozesse stören könnte, wurde es in einem Aufreinigungsschritt entfernt. Hierzu wurden 52 μl Sample Purification Beads (SPBs) zur Probe pipettiert, gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Zum Pelletieren der Beads wurden die Proben für 2 min auf einen Magnetständer gestellt. Der klare Überstand wurde abgenommen, mit 137 μl SPBs gemischt und für 8 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden erneut 2 min auf dem Magnetständer inkubiert, bis eine klare Lösung sichtbar war. Es folgten zwei Waschschriffe, bei denen jeweils 200 μl EtOH (80 %) auf die Beads pipettiert wurde. Nach 30 s wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Proben wurden auf dem Magnetständer bei RT für etwa 2 min getrocknet, bis sich leichte Risse in den Beads zeigten. Nach diesem Schritt wurden die Beads mit 22,5 μl Resuspensionspuffer in Lösung gebracht und für 2 min bei RT inkubiert. Das Gemisch wurde erneut auf den Magnetständer gestellt, bis sich eine klare Lösung absetzte, von der 21 μl für die nächsten Schritte verwendet wurde.

Um zu prüfen, ob die Tagmentation erfolgreich war, wurde die tagmentierte DNA am Bioanalyzer 2100 analysiert. Bei der Messung werden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Einlagerung von Fluoreszenzfarbstoffen werden die DNA-Fragmente

detektiert, sodass Größe und Konzentration der Fragmente bestimmt werden können. Die Messung wurde entsprechend des „Agilent High Sensitivity DNA Kit Guides“ (https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G2938-90321_SensitivityDNA_KG_EN.pdf) mit 1 µl DNA durchgeführt. Der Bioanalytiker, der DNA-Chip sowie das Protokoll stammten von der Firma Agilent (Waldbronn, Deutschland).

2.2.3.2. Erste Amplifikation

Bei der ersten Amplifikation werden die aufgereinigten tagmentierten DNA-Fragmente amplifiziert. Über eine PCR werden individuelle Sequenzierungsindizes und Primer hinzugefügt (Abbildung 15B). Pro Probe wurden jeweils zwei Index Adapter zugegeben. Für jede Probe wurde ein individueller Index Adapter 1 gewählt (N701-N709), während für die Index Adapter 2 je nach Sequenzierlauf zwischen E505 und E506 gewählt wurde (Tabelle 1). Über die Indizes ist nach dem Pooling eine präzise Zuordnung der Sequenzen möglich. Pro Probe wurden 5 µl DNA mit jeweils 5 µl des individuellen Index Adapter 1 und mit 5 µl Index Adapter 2 vermischt. Nach Zugabe von 20 µl Library Amplification Mix wurden die DNA-Libraries im Thermocycler unter Verwendung des in Tabelle 10 aufgeführten Programms amplifiziert.

Tabelle 10: Erste Amplifikation: Reaktionsbedingungen.

Thermocycler-Schritt	Temperatur	Dauer
Deckeltemperatur 100 °C		
1.	72 °C	3 min
2.	98 °C	30 s
	98 °C	10 s
3.*	60 °C	30 s
	72 °C	30 s
4.	72 °C	5 min
5.	10 °C	∞

* Die Zyklen in diesem Schritt wurden 9 × wiederholt. Abkürzungen: ∞: Unendlichzeichen

Nach der ersten Amplifikation erfolgte die PCR-Aufreinigung. SPBs werden hierbei genutzt, um die DNA-Library aufzureinigen und nicht amplifizierte Nebenprodukte zu entfernen. Die SPBs wurden gevortext und zu 50 µl des PCR-Produkts jeder Probe zugegeben. Nach einer

Inkubationszeit von 10 min bei RT wurden die Proben für 2 min auf dem Magnetständer inkubiert. Die so entstandene klare Lösung wurde abgenommen und verworfen. Die Beads wurden im Anschluss zweimal für jeweils 30 s mit 200 μ l EtOH (80 %) gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Proben für 5 min bei RT getrocknet, bis das EtOH vollständig verdampft war und Risse in den Beads zu sehen waren. Die Beads wurden dann mit 27,5 μ l Resuspensionspuffer in Lösung gebracht und erneut zunächst für 2 min bei RT und schließlich für weitere 2 min auf dem Magnetständer inkubiert. Nachdem sich die Beads abgesetzt hatten, wurden 25 μ l der klaren Lösung abgenommen und über Nacht bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.3. Pooling der Proben

Am nächsten Tag wurde die Konzentration der Libraries mittels des Qubit dsDNA BR Assay Kits am Qubit Fluorometer quantifiziert (siehe Kapitel 2.2.2.1 Isolation genomischer DNA aus Zellen und Konzentrationsbestimmung, S. 36). Zum Erstellen des Pools wurden 500 ng jeder Library in einem Reaktionsgefäß vereint (Abbildung 15C). Dazu wurde das jeweils einzusetzende Volumen der einzelnen DNA-Libraries über die gemessenen DNA-Konzentrationen bestimmt. Mit einer Vakuumzentrifuge wurde das Volumen des Pools auf 30 μ l eingedampft.

2.2.3.4. Erste Hybridisierung und Capture

Um die DNA zu denaturieren (Abbildung 15C) wurde zunächst die in Tabelle 11 dargestellte Reaktion angesetzt.

Tabelle 11: Erste Hybridisierung: Reaktionsansatz.

Reagenz	Volumen für einen Pool (μ l)
gepoolte Library	30
Blocker	10
Coding Exome Oligos	10
SPBs	125

Abkürzungen: SPBs: Sample Purification Beads.

Der Reaktionsansatz wurde für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 2 min auf dem Magnetständer inkubiert. Die klare Lösung wurde abgenommen und verworfen. Die Beads wurden zwei Mal für je 30 s mit 200 µl EtOH (80 %) gewaschen und dann für etwa 10 min bei RT getrocknet, bis das EtOH vollständig verdampft war. Die Beads wurden mit 8,5 µl Enrichment Hybridization Buffer in Lösung gebracht, 2 min bei RT inkubiert und schließlich für weitere 2 min auf den Magnetständer gestellt. Von jedem Pool wurden 7,5 µl mit 2,5 µl Enrichment Hybridization Buffer vermischt. Im Thermocycler erfolgte die Reaktion unter den aus Tabelle 12 zu entnehmenden Bedingungen.

Tabelle 12: Erste Hybridisierung: Reaktionsbedingungen.

Thermocycler-Schritt	Temperatur	Dauer
Deckeltemperatur 100 °C		
1.	95 °C	10 min
2.	58 °C	30 min
3.	58 °C	∞

Abkürzungen: ∞ Unendlichzeichen.

Während der Hybridisierung werden mit Biotin markierte Sonden eingesetzt um an spezifische Zielregionen zu binden (Abbildung 15D). Für die Anreicherung des Pools wurden 250 µl Streptavidin Magnetic Beads hinzugegeben und für 25 min bei RT inkubiert. Die magnetischen Beads binden dabei an die biotinylierten Sonden. Im Anschluss wurde die Probe für 2 min auf dem Magnetständer inkubiert. Über die Beads werden die gewünschten DNA-Fragmente magnetisch aus der Lösung gezogen, unspezifisch gebundene DNA wird entfernt. Der Überstand wurde verworfen, die Beads in 200 µl Waschlösung gelöst und die Probe für 30 min bei 50 °C gewaschen. Zum Pelletieren der Beads wurde die Probe für 2 min auf dem Magnetständer inkubiert, der Überstand abgenommen und die Waschung wiederholt. Die unter Hitzeeinwirkung durchgeführten Waschschriffe dienen dabei zur Entfernung unspezifischer Bindungen mit den Beads.

Um die angereicherten DNA-Fragmente von den Beads zu lösen wurden die Beads zunächst mit 23,5 µl Elution Premix (EP), bestehend aus 28,5 µl Enrichment Elution Buffer 1 und 1,5 µl HP3 (2 N NaOH), in Lösung gebracht. Die Proben wurden für 2 min bei RT inkubiert und schließlich weitere 2 min auf den Magnetständer gestellt. Von dem klaren Überstand wurden

21 µl mit 4 µl Elute Target Buffer 2 und mit 5 µl Resuspensionspuffer vermischt und über Nacht bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.5. Zweite Hybridisierung und Capture

Um die Zielregionen weiter anzureichern wurde am nächsten Tag eine zweite Hybridisierung mit anschließendem zweiten Capture durchgeführt (Abbildung 15E). Der Ablauf erfolgte entsprechend der ersten Hybridisierung (siehe Kapitel 2.2.3.4 Erste Hybridisierung und Capture, S. 47).

2.2.3.6. Aufreinigung der angereicherten Library

Um die Library vor der Amplifikation aufzureinigen (Abbildung 15F) wurden 45 µl SPBs mit der Probe vermischt und für 8 min bei RT inkubiert. Die Proben wurden für 2 min auf den Magnetständer gestellt. Der klare Überstand wurde abgenommen und verworfen. Es folgten zwei Waschstritte mit jeweils 200 µl EtOH (80 %) für je 30 s. Zum Trocknen der Beads wurden diese 8 min bei RT inkubiert. Nachdem Risse zu erkennen waren, wurden die Beads mit 27,5 µl Resuspensionspuffer in Lösung gebracht. Die Proben wurden für 2 min bei RT inkubiert und schließlich für weitere 2 min auf den Magnetständer gestellt. Vom klaren Überstand wurden 25 µl in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3.7. Zweite Amplifikation

Die angereicherten DNA-Fragmente wurden in einer weiteren PCR amplifiziert (Abbildung 15G). Hierzu wurden 5 µl Primercocktail und 20 µl Enrichment Amplification Mix zur Probe gegeben und vermischt. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler unter den in Tabelle 13 dargestellten Bedingungen.

Tabelle 13: Zweite PCR: Reaktionsbedingungen.

Thermocycler-Schritt	Temperatur	Dauer
1.	98 °C	30 s
	98 °C	10 s
2.*	60 °C	30 s
	72 °C	30 s
3.	72 °C	5 min
4.	10 °C	∞

* Die Zyklen in diesem Schritt wurden 9 × wiederholt, Abkürzungen: ∞: Unendlichzeichen, PCR: Polymerasekettenreaktion

Nach diesem Schritt wurde die amplifizierte Library aufgereinigt. Fünfzig Mikroliter SPBs wurden zum PCR-Produkt gegeben, vermischt und für 10 min bei RT inkubiert. Um die Beads zu pelletieren wurde die Probe 2 min auf dem Magnetständer inkubiert und im Anschluss zweimal mit EtOH gewaschen. Die Proben wurden für 10 min bei RT getrocknet, bis Risse in den Beads zu sehen waren. Durch Zugabe von 32,5 µl Resuspensionspuffer wurden die Beads gelöst, 2 min bei RT inkubiert und weitere 2 min auf den Magnetständer gestellt, bis eine klare Lösung zu sehen war. Von jeder Library wurde ein Volumen von 30 µl in ein neues Gefäß überführt.

2.2.3.8. Herstellung der Sequenzier-Library

Die Herstellung der Sequenzier-Library umfasste die Einstellung der Konzentration auf 1,3 pM über mehrere Schritte (Abbildung 15H). Zunächst wurde dazu die Konzentration der Library in doppeltem Ansatz unter Verwendung des Qubit Fluorometer (siehe Kapitel 2.2.2.1, Isolation genomischer DNA aus Zellen und Konzentrationsbestimmung, S.36) bestimmt. Zur Messung der durchschnittlichen Fragmentlänge wurde zusätzlich eine Messung am Bioanalyzer durchgeführt. Neben der unverdünnten Library wurde die Fragmentlänge einer im Verhältnis von 1:10 verdünnten Library gemessen.

Zur Erstellung der 4 nM-konzentrierten Library wurden die gemessenen Werte in die folgende Formel eingefügt:

$$\text{Konzentration (nM)} = \frac{\text{Konzentration (ng/ } \mu\text{l)}}{(660 \text{ g/mol}) * \text{durchschnittliche Fragmentlänge(bp)}} \times 10^6$$

Über die errechnete Konzentration wurde das Volumen des einzusetzenden EPs berechnet. Von der Library wurden 5 µl eingesetzt.

Zur Erstellung der 20 pM Library wurden 5 µl des 4 nM Ansatzes mit 5 µl 0,2 M NaOH verdünnt und für 5 min bei RT inkubiert. Die Probe wurde dann mit 5 µl EP und 985 µl HT1-Puffer vermischt. Von diesem Ansatz wurden 10 µl entnommen und verworfen. Die Verdünnung wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Im nächsten Schritt wurde eine PhiX-Kontrolle (PhiX control v3, Illumina, San Diego, USA) zum Library pool hinzugefügt. Das Einfügen dieser vorgefertigten Library dient unter anderem zur Qualitätskontrolle für die Clustergenerierung, die Sequenzierung und das Alignment. Aus einer 20 pM PhiX-Library wurden dazu 12,5 µl entnommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Von der denaturierten PhiX-Library wurden dann 10 µl mit 990 µl der 20 pM Library vermischt. Zur Herstellung der finalen 1,3 pM konzentrierten Library wurden schließlich 85 µl der 20 pM konzentrierten Library mit 1 % PhiX mit 1215 µl HT1-Puffer vereint.

2.2.3.9. Sequenzierung der Library am NextSeq500

Die Library wurde am Nextseq500 unter Verwendung eines NextSeq High Output Kits sequenziert (Abbildung 15H). Der Sequenzierer, sowie das Kit stammten von der Firma Illumina (San Diego, USA). Zur Vorbereitung der Sequenzierung wurde die Reagenzienkartusche zunächst etwa eine Stunde in raumtemperiertes Wasser gelegt, bis alle Reagenzien aufgetaut waren [Internetquelle 11]. Zeitgleich wurde die Flow Cell auf RT gebracht. Nach etwa 30 min wurde die Flow Cell aus der Verpackung entnommen, auf Kratzer inspiziert und gereinigt [Internetquelle 11]. Nach dem Auftauen der Reagenzienkartusche wurde diese mehrmals invertiert. Mit einer 1-ml-Pipettenspitze wurde die Verschlussfolie von Behälter Nr. 10 durchgestochen und die 1,3 pM Library mit 1 % PhiX in die Öffnung pipettiert [Internetquelle 11]. Die Flow Cell und die Pufferkartusche wurden in die dafür vorgesehenen Fächer im NextSeq500 geladen. Das Fach mit den verbrauchten Reagenzien wurde geleert und für den anstehenden Lauf wiedereingesetzt [Internetquelle 11]. Als Letztes wurde die Reagenzienkartusche geladen und der Sequenzierlauf (75 Zyklen, paired-end) über die NextSeq500 Benutzeroberfläche gestartet [Internetquelle 11].

Bei der Sequenzierung werden die Libraries aus der Reagenzienkartusche auf die Flow Cell übertragen. Bei der Flow Cell handelt es sich um einen Glasobjektträger, auf dem die Clustergenerierung und die eigentliche Sequenzierreaktion stattfinden [Internetquelle 12].

Die Flow Cell enthält sogenannte Lanes, wobei jede Lane mit einer Vielzahl von zwei Oligotypen bedeckt ist, die komplementär zur Adaptersequenzen der Library sind (Abbildung 16A). Die Hybridisierung der DNA-Fragmente erfolgt über den ersten Oligotyp, der mit der Oberfläche verankert ist (Abbildung 16B). Eine Polymerase ergänzt den Strang des hybridisierten Fragments. Das so entstandene doppelsträngige Molekül wird denaturiert, das Template wird gewaschen. Über die „Bridge Amplification“ werden die Stränge klonal amplifiziert. Hierbei kippt der Strang zunächst um (Abbildung 16C). Es folgt die Hybridisierung der Adaptersequenz mit dem zweiten Oligotyp auf der Flow cell. Polymerasen verlängern den komplementären Strang, es entsteht eine doppelsträngige Brücke (Abbildung 16D). Die Brücke wird im nächsten Schritt denaturiert, sodass zwei einzelsträngige Kopien der Moleküle entstehen, die auf der Flow Cell gebunden sind (Abbildung 16E) [Internetquelle 13]. Dieser Prozess wird kontinuierlich wiederholt und erfolgt zeitgleich für Millionen von Cluster (Abbildung 16F) [Internetquelle 14]. Nach der Amplifikation werden die reversen Stränge abgespalten und gewaschen, sodass nur die forward-Stränge bleiben. Die freien 3'-Enden werden blockiert [Internetquelle 13]. Die Sequenzierung beginnt durch Bindung der Sequenzierprimer [Internetquelle 14]. Das „Sequencing by Synthesis“ (SBS)-Prinzip benutzt vier Nukleotide, um Millionen Cluster parallel zu sequenzieren (Abbildung 16G) [Internetquelle 15]. Mit jedem Zyklus wird der Strang durch den Einbau der zur Sequenz des Templates komplementären Base verlängert [Internetquelle 14]. Durch den Einsatz von Terminatoren erfolgt die Identifikation der eingebauten Base nach jedem Nukleotid-Einbau [Internetquelle 14]. Die Cluster werden über die Zwei-Kanal SBS Technologie aufgenommen [Internetquelle 16]. Durch Verwendung eines Lasers emittieren die an Thymin (grün) und Cytosin (rot) gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe charakteristische Wellenlängen. Cluster in roten und grünen Bildern werden entsprechend als Cytosin und Thymin identifiziert. Die Überlagerung von roten und grünen Bildern entstehen gelbe Cluster, die Adenin-Basen zugesprochen werden, während nicht markierte Cluster als Guanin-Basen identifiziert werden (Abbildung 16H) [Internetquelle 16]. Für jedes Cluster werden die identischen Stränge zeitgleich gelesen. Im Anschluss wird der sequenzierte Strang entfernt und gewaschen [Internetquelle 13]. Die 3'-Enden werden entblockt, der Template-Strang kippt um und bindet an den zweiten Oligo auf der Flow Cell [Internetquelle 13]. Polymerasen verlängern den zweiten Oligo, sodass wieder eine doppelsträngige Brücke entsteht. Die doppelsträngige DNA wird linearisiert, die 3'-Enden werden blockiert und der Forward-Strang wird abgespalten und

weggewaschen, sodass nur der Reverse-Strang bleibt [Internetquelle 13]. Analog zur ersten Runde wird die Sequenzierung wiederholt, bis die gewünschte Readlänge erreicht ist. Es entstehen Millionen Reads, die alle bestimmte Fragmente repräsentieren. Anhand der Indizes können die Sequenzen der Patienten getrennt werden. Forward- und Reverse-Strang werden gepaart, um angrenzende Sequenzen darzustellen. Diese werden dann an ein Referenzgenom aligniert, um die Varianten zu identifizieren. Die Paired-end-Sequenzierung erlaubt die Sequenzierung der Fragmente von jeder Seite, wodurch unter anderem eine erhöhte Alignment-Effizienz erreicht wird.

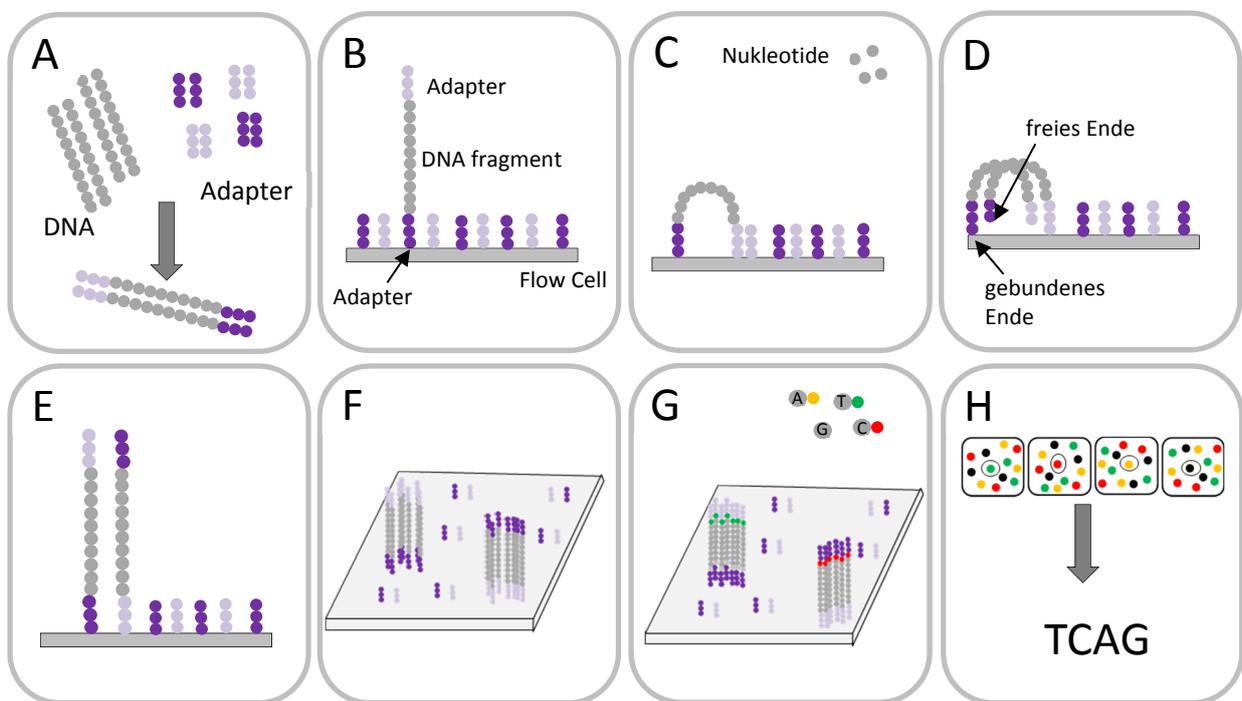


Abbildung 16: Prinzip der Clusterbildung durch „bridge amplification“.Auf der Flow Cell findet die Clustergenerierung statt. Millionen Kopien der einzelnen DNA-Fragmente werden hergestellt. Die Cluster werden schließlich über die Zwei-Kanal „Sequencing by Synthesis“-Technologie aufgenommen. Abkürzungen: DNA-Basen: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin (Abbildung erstellt nach [Internetquelle 14]).

2.2.3.10. Detektion von Varianten

Das Demultiplexen und Mappen der vom NextSeq500 generierten Sequenzen wurde unter Verwendung des Burrows-Wheeler Aligner von Mitarbeitern des Lehrstuhls für Bioinformatik durchgeführt. Als humanes Referenzgenom diente GrCh37/hg19. Die Errechnung der Abdeckungstiefe erfolgte durch einen Mitarbeiter des Lehrstuhls für Mikrobiologie der

Universität Würzburg unter Verwendung von bedtools coverage. Das Tool wurde ebenfalls verwendet, um die Anzahl der Positionen (Basen) der Zielregion zu berechnen, die eine Abdeckung über 20 hatten.

Für die Detektion der Varianten (engl. *variant calling*) wurde die Software GenSearchNGS (Phenosystems, Braine le Chateau, BEL) verwendet. Zur Identifizierung von „echten“ Varianten mit einem hohen Zuverlässigkeitsgrad wurden sehr strikte Filterkriterien gewählt. Im ersten Schritt wurden dazu die Varianten aller Proben eines Experiments in der Software aufgerufen. Um falsch-positive Varianten bzw. Sequenzierartefakte auszuschließen, wurden nur Varianten mit den folgenden Filterkriterien akzeptiert: Coverage > 20, Read count > 10 (Anzahl der Reads mit entsprechender Variante), Quality > 99 %. Die meisten durch die Software detektierten Varianten waren sowohl in den bestrahlten als auch in den Kontrollen zu finden und wurden daher ausgeschlossen. Zusätzlich wurde gegen die Massenkultur gefiltert und Varianten, die bereits in der Anfangskultur (PD = 0) vorhanden waren, gegebenenfalls entfernt. Um die Rate an falschen Varianten weiter zu minimieren wurden hypermutable Regionen mit mehr als 5 Varianten innerhalb eines 1000 bp-Bereichs ebenfalls entfernt. Im letzten Schritt wurden die so übrig gebliebenen Varianten im integrierten Genombrowser visualisiert, bewertet und mit der laborinternen Artefaktliste verglichen.

Die Nomenklatur der Sequenzveränderungen wurde entsprechend den aktuellen Empfehlungen der Human Genome Variation Society (HGVS) angegeben [177]. Die Vorhersage von funktionellen Konsequenzen der Varianten erfolgte mit dem „Ensembl Variant Effect Predictor“ [178].

2.2.4. Statistische Datenauswertung

Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Software Paket SPSS Statistics (IBM, New York, USA) für Windows. Zur übersichtlichen Darstellung wurden statistische Maßzahlen, wie Mittelwert, Minimum und Maximum über deskriptive Verfahren ermittelt. Zur Analyse von Gruppenunterschieden wurde zunächst auf Normalverteilung der Messwerte getestet. Folgte die Daten einer Normalverteilung, wurde der t-test angewandt, lag keine Normalverteilung vor, der Mann-Whitney-U-test. Um zu testen, ob Stichproben einer bestimmten Verteilung folgen, wurde der Kolmogorov-Smirnov-test herangezogen. Der exakte Test nach Fisher wurde verwendet, um auf Unabhängigkeit zwischen zwei Variablen zu testen. Das Signifikanzniveau für alle verwendeten statistischen Tests betrug 0,05.

2.2.5. Anreicherungsanalysen

Zur besseren Übersicht der biologischen Bedeutsamkeit von Genen wurden Genset-Anreicherungsanalysen durchgeführt. Verwendet wurde dazu das Enrichr Online Tool (Tabelle 6). Dieses erlaubt die Identifikation relevanter Signalwege der Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) und Gene Ontology (GO)-Terms in den drei Ontologien biologischer Prozess (GO_BP), zelluläre Komponente (GO_CC) und molekulare Funktion (GO_MF). P-Werte < 0,05 (false discovery rate (FDR)-adjusted) wurden als signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Arbeitsablauf der Studie

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die verzögerten Effekte von IR auf das Genom untersucht. Der Arbeitsablauf der Studie gliederte sich in drei Teilbereiche (Abbildung 17). Innerhalb eines Zellkulturexperiments wurden zunächst von bestrahlten und nicht bestrahlten Fibroblastenkulturen Einzelzellbasierte Zellkulturklone hergestellt und durch G-Bänderung chromosomal charakterisiert. Diese Klone dienten als Ausgangspunkt für die nachfolgenden Experimente. Nach der DNA-Isolation wurden die Klone hinsichtlich genomweiter Veränderungen der CN analysiert. Dafür wurden SNP-Arrays verwendet. Der dritte Teilbereich umfasste schließlich die Identifizierung von genomischen Abweichungen auf Ebene von einzelnen Nukleotiden durch Exom-Sequenzierungen. Für alle Analysen wurden zwei verschiedene Kontraste beleuchtet: bestrahlt vs. nicht bestrahlt, sowie chromosomal stabil vs. chromosomal instabil. Die Ergebnisse der Chromosomenanalyse und der Analyse der CN wurden in der Publikation „Genetic and epigenetic changes in clonal descendants of irradiated human fibroblasts“ in der Fachzeitschrift *Experimental Cell Research* veröffentlicht [179].

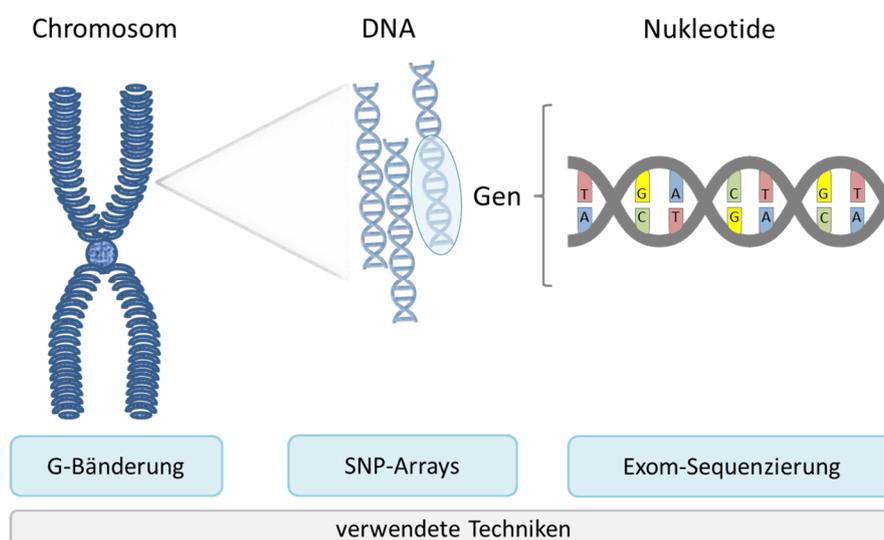


Abbildung 17: Arbeitsablauf der Studie. Die Analyse der Einzelzellklone erfolgte auf drei verschiedenen Ebenen: Chromosomen, Genkopienzahl, Einzelnukleotide. Chromosomen wurden mit Hilfe der G-Bänderung analysiert. SNP-Arrays und MLPAs wurden durchgeführt, um die Kopienzahl von Genen zu bestimmen. Exom-Sequenzierungen dienten zur Untersuchung von Veränderungen einzelner Nukleotide. Abkürzungen: DNA-Basen: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, SNP: engl. *single nucleotide polymorphism* (Abbildung erstellt nach [Internetquelle 17]).

3.2. Herstellung der Zellkulturklone und Analyse der chromosomalen Stabilität

Bei den verwendeten Fibroblasten handelte es sich um primäre Zelllinien. Diese sind nicht immortalisiert und unterliegen daher einer begrenzten Lebensdauer. Fetale Fibroblasten können theoretisch 40–60 Zellteilungen in Kultur durchlaufen, bis sie in die replikative Seneszenz eintreten [161]. Alle verwendeten Zellen hatten funktionsfähige Zellzyklus-Checkpoints und DNA-Reparaturmechanismen. Die Zellkulturklone wurden aus den Zelllinien 1 und 2 hergestellt. Da im Zellkulturlabor nur eine begrenzte Anzahl von Klonen zeitgleich kultiviert werden kann, wurden die Klonierungsexperimente nacheinander durchgeführt (Experiment 1 und Experiment 2). Die generierten Klone sollten repräsentativ den Alterungsvorgang darstellen, der zwischen der strahlentherapeutischen Behandlung und dem Auftreten von Krebserkrankungen steht.

Für die Herstellung der Zellkulturklone wurden Massenkulturen zunächst mit 2 Gy bestrahlt und anschließend für 24 Stunden weiter kultiviert, um eine Reparatur des durch Strahlung induzierten Schadens zu ermöglichen (Abbildung 18). Überlebende Einzelzellen wurden ausgesät und klonal expandiert. Nicht bestrahlte Massenkulturen wurden als Kontrollen parallel kloniert und dienten der Analyse des Alterungseffekts.

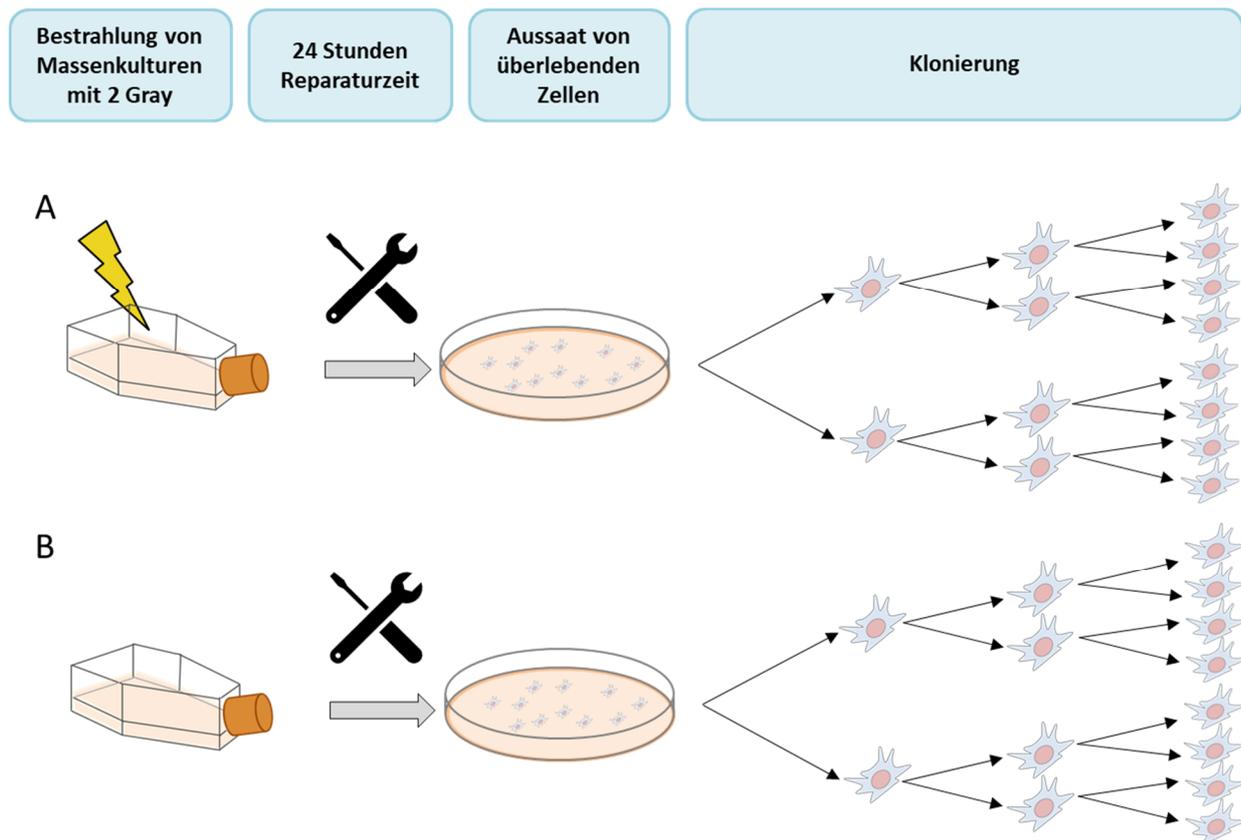


Abbildung 18: Schematische Darstellung zur Herstellung der Zellkulturklone. (A) Klonierung von bestrahlten Zellen. (B) Klonierung von nicht bestrahlten Kontrollen.

Unabhängig von der Bestrahlung zeigten viele Klone bereits vor dem Erreichen der 20. PD morphologische Anomalien, die mit dem Eintreten der replikativen Seneszenz einhergehen. Nur Zellkulturklone, die es bis zur 20. PD schafften (Tabelle 14), wurden geerntet und für die nachfolgenden Analysen verwendet. Eine detaillierte Auflistung der erstellten Klone, sowie der Technik, mit der jeder Klon analysiert wurde, ist dem Anhang zu entnehmen (Anhang-Tabelle 1).

Tabelle 14: Anzahl der erstellten Zellkulturklone.

		Anzahl erstellter Klone
Experiment 1	Kontroll-Klone	29
	bestrahlte Klone	92
Experiment 2	Kontroll-Klone	27
	bestrahlte Klone	87

Um zu bestimmen, ob und in welchem Ausmaß GI in den einzelnen Klonen induziert wurde, wurden die Klone durch klassische Bänderungsanalysen untersucht. Jedes Chromosom erhält dadurch ein individuelles Bandenmuster, sodass strukturelle und numerische Aberrationen detektiert werden können. Im Durchschnitt wurden 13 Metaphasen ausgewertet, wobei ein Bandenstadium von mindestens 300 angestrebt wurde. Nach der Analyse wurden die Klone in Abhängigkeit der Stabilität ihres Genoms in verschiedene Klassifizierungsgruppen eingeteilt. Ein stabiler Klon wurde als ein solcher gewertet, wenn alle analysierten Metaphasen einen normalen, euploiden Karyotyp besaßen (Abbildung 19A). Sollten normale und aberrante Metaphasen in einem Klon als Mosaik auftreten, so wurde dieser Klon als chromosomal instabil eingestuft (Abbildung 19B). Weiterhin beachtet wurden Klone, welche dieselbe Aberration in allen analysierten Metaphasen hatten (Abbildung 19C). Diese Klone mit stabiler Aberration wurden in Abhängigkeit zusätzlicher chromosomaler Abnormalitäten ebenfalls als stabil oder instabil gewertet. Da präparationsbedingte Chromosomenverluste nicht auszuschließen sind, wurden Monosomien nur gezählt, wenn das gleiche Chromosom in mindestens drei Metaphasen eines Klons verloren war.

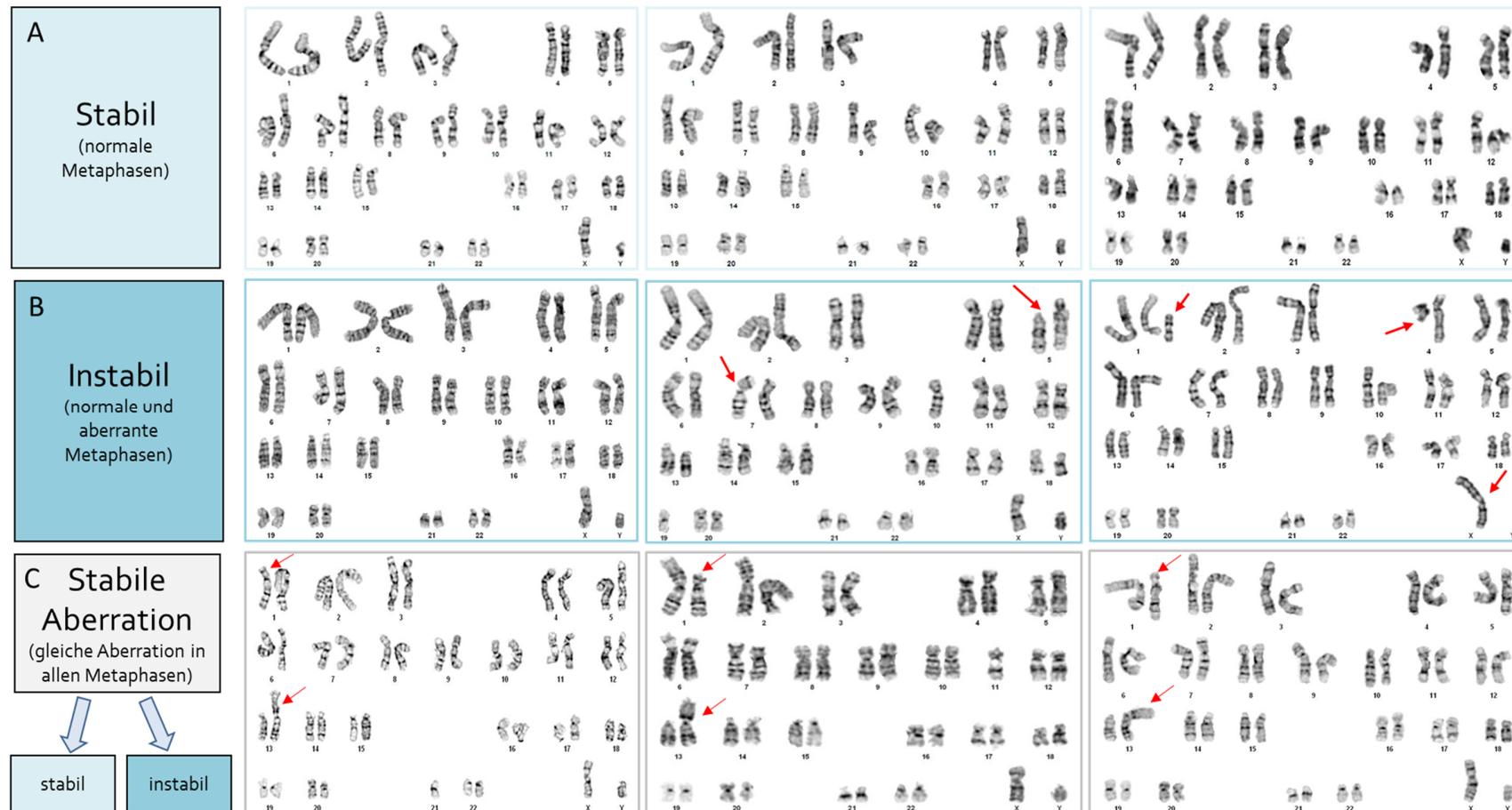


Abbildung 19: Exemplarische Darstellung von Karyogrammen für Klone der drei Klassifizierungsgruppen stabil (A), instabil (B) und stabile Aberration (C).

Die Anzahl der analysierten Klone, sowie die Ergebnisse der Karyotypisierung sind in Tabelle 15 und detailliert in Anhang-Tabelle 2 aufgeführt. Aufgrund oftmals schlechter Qualität der Chromosomenbänderung konnten nicht alle erstellten Klone klassifiziert werden.

Insgesamt zeigten im ersten Experiment 73 % der bestrahlten Klone und 25 % der nicht bestrahlten Kontroll-Klone chromosomale Auffälligkeiten. Entsprechend der Definition wurden diese Klone als instabil klassifiziert. Der Unterschied in der Anzahl der stabilen und instabilen Klone zwischen den Gruppen bestrahlt und Kontrolle war signifikant ($p = 0,005$, Fisher exakt). Für die bestrahlten Klone der instabilen Gruppe hatten 52 % der Klone mindestens drei verschiedene Zellpopulationen, d. h. neben normalen Metaphasen mindestens zwei verschiedene Typen abnormaler Metaphasen. Dieser Fall konnte in der instabilen Gruppe der nicht bestrahlten Kontrollen lediglich einmal beobachtet werden. Klone mit stabiler Aberration konnten nur in bestrahlten Klonen detektiert werden. Im zweiten Experiment wurden insgesamt 53 % der bestrahlten und 30 % der Kontroll-Klone als chromosomal instabil klassifiziert. Im Vergleich zum ersten Experiment war dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0,245$, Fisher exakt). Unter den instabilen Klonen hatten fünf bestrahlte Klone und ein Kontroll-Klon mehrere aberrante Metaphasen.

Tabelle 15: Ergebnisse der Chromosomenbänderungsanalyse.

		n	stabil	stabile Aberration		instabil	
				stabil	instabil	Klone mit einer Aberration	Klone mit multiplen Aberrationen
Experiment 1	Kontroll-Klone	12	9	–	–	2	1
	bestrahlte Klone	37	10	–	4	9	14
Experiment 2	Kontroll-Klone	10	7	–	–	2	1
	bestrahlte Klone	19	7	1	2	4	5

Aufgelistet ist die Anzahl der untersuchten Klone (n) pro Experiment, sowie die Anzahl der Klone in der jeweiligen Klassifizierungsgruppe.

Nicht bestrahlte Klone hatten im Durchschnitt 0,33 aberrante Metaphasen im ersten Experiment und 0,4 aberrante Metaphasen im zweiten Experiment (Tabelle 16). Ausgehend davon, dass stabile Aberrationen, die in allen analysierten Metaphasen eines Klons auftraten, als eine Veränderung gezählt wurden, hatten die bestrahlten Klone der ersten Kultur 1,6 aberrante Metaphasen pro Klon, ein signifikanter Anstieg um 1,27 im Vergleich zu nicht

bestrahlten Kontroll-Klonen ($p = 0,003$, Mann-Whitney-U-test). Die durchschnittliche Anzahl aberranter Metaphasen pro Klon für die bestrahlten Klone des zweiten Experiments betrug 1,32, ein Anstieg um 0,92 im Vergleich zu den nicht bestrahlten Kontroll-Klonen.

Tabelle 16: Durchschnittliche Anzahl aberranter Metaphasen ermittelt über Chromosomenbänderungsanalysen.

		n	Mittelwert	SF	p-Wert
Experiment 1	Kontroll-Klone	4	0,33	0,19	0,003
	bestrahlte Klone	60	1,62	0,23	
Experiment 2	Kontroll-Klone	4	0,4	0,22	0,126
	bestrahlte Klone	25	1,32	0,34	

Aufgelistet ist die Gesamtanzahl aberranter Metaphasen (n), sowie die Anzahl aberranter Metaphasen pro Klon pro Experiment dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler (SF). P-Werte $< 0,05$ zeigen signifikante Unterschiede zwischen bestrahlten Klonen und den entsprechenden Kontrollen.

In den einzelnen Gruppen traten unterschiedliche Aberrationstypen auf (Tabelle 17). Chromatidbrüche waren für die bestrahlten Klone beider Experimente (40,9 % für das erste Experiment und 41,7 % für das zweite Experiment) am häufigsten zu verzeichnen, gefolgt von zusätzlichem Material unbekannter Herkunft (15,2 %) in den Klonen des ersten Experiments und Chromosomenbrüche (25 %) in den Klonen des zweiten Experiments. Im Vergleich der Aberrationstypen zwischen den beiden Kontrollgruppen zeigt sich, dass für die Klone des ersten Experiments Chromatidbrüche mit einem Anteil von 50 % am häufigsten auftraten, während in den Kontroll-Klonen des zweiten Experiments mehrere Aberrationstypen mit 25 % gleich häufig zu beobachten waren.

Tabelle 17: Anteile der Aberrationstypen in den Klonen ermittelt über Chromosomenbänderungsanalysen.

		Aberrationstypen in %									
		add	chrb	chtb	del	dup	i	ins	inv	mar	t
Experiment 1	Kontroll-Klone	0	0	50	25	0	0	0	0	25	0
	bestrahlte Klone	15,2	4,5	40,9	12,1	1,5	1,5	1,5	3	7,6	12,1
Experiment 2	Kontroll-Klone	25	25	25	25	0	0	0	0	0	0
	bestrahlte Klone	12,5	25	41,7	4,2	0	4,2	0	0	0	12,5

Die Einordnung der Aberrationstypen erfolgte nach dem internationalen Standard (ISCN 2016). Abkürzungen: add: zusätzliches Material unbekannter Herkunft; chrb: Chromosomenbruch; chtb: Chromatidbruch; del: terminale oder interstitielle Deletion; dup: Dupikation i: Isochromosom; ins: Insertion; inv: parazentrische oder perizentrische Inversion; mar: Marker, t: Translokation.

Die Beteiligung der Chromosomen an der Bildung von Aberrationen ist in Tabelle 18 dargestellt. Aufgrund der geringen Anzahl an Aberrationen in den Kontrollen waren nur wenige Chromosomen involviert. Im ersten Experiment waren nur die Chromosomen 1 und 7 involviert, während im zweiten Experiment ausschließlich Chromosom 3 beteiligt war. In den bestrahlten Klonen des ersten Experiments waren die Chromosomen 1, 2 und 3 am häufigsten vertreten. Die Chromosomen 1, 5, 7 und 12 waren in den bestrahlten Klonen des zweiten Experiments am häufigsten an den auftretenden strukturellen Aberrationen beteiligt. Von den sechs gezählten Translokationsereignissen in den bestrahlten Klonen des ersten Experiments war kein Chromosom mehr als einmal involviert, während in Translokationen in den bestrahlten Klonen des zweiten Experiments in vier von fünf Fällen Chromosom 1 beteiligt war.

Tabelle 18: Prozentualer Anteil der Chromosomenbeteiligung an der Bildung von Aberrationen.

Chromosom	Experiment 1		Experiment 2	
	Kontroll-Klone (n=12)	bestrahlte Klone (n=37)	Kontroll-Klone (n=10)	bestrahlte Klone (n=19)
1	66,7	12,3	0	21,9
2	0	8,2	0	6,3
3	0	9,6	100	3,1
4	0	2,7	0	0
5	0	5,5	0	9,4
6	0	6,8	0	6,3
7	33,3	6,8	0	9,4
8	0	6,8	0	0
9	0	6,8	0	0
10	0	4,1	0	3,1
11	0	2,7	0	3,1
12	0	2,7	0	9,4
13	0	5,5	0	3,1
14	0	2,7	0	6,3
15	0	6,8	0	3,1
16	0	1,4	0	0
17	0	1,4	0	0
18	0	1,4	0	0
19	0	1,4	0	0
20	0	2,7	0	0
X	0	1,4	0	6,3
Y	0	0	0	9,4

Die Beteiligung der Chromosomen an der Bildung von Aberrationen basiert auf den Ergebnissen der Chromosomenbänderungsanalyse. Nicht beteiligte Chromosomen sind in der Tabelle nicht aufgeführt. Abkürzungen: n: Anzahl der analysierten Klone.

Beim Auftropfen der Chromosomenpräparate auf die Objektträger kann es vorkommen, dass einzelne Chromosomen verloren gehen, da sie auf dem OT zu weit von der zu analysierenden Metaphase weg liegen. Monosomien wurden daher bei der Auswertung nicht eingeschlossen, es sei denn ein spezifisches Chromosom war in mindestens drei Metaphasen nicht zu finden. Mit Hilfe der G-Bänderungsanalyse konnte ein Verlust des Y-Chromosoms (engl. *loss of y chromosome*, LOY) in allen analysierten Metaphasen von drei bestrahlten Klonen (2-2M, 2-2113, 2-244) des zweiten Experiments gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurde weder eine Monosomie X noch ein Verlust von Autosomen detektiert. Die Analyse der Kontroll-Klone zeigte keinen Chromosomenverlust.

3.3. Identifizierung von Kopienzahlvariationen

Die molekulare Karyotypisierung mit SNP-Arrays erlaubt die genomweite Identifizierung struktureller Variationen unterhalb der Auflösungsgrenze der G-Bänderung. Die Analyse diente dem Ziel zu prüfen, ob und in welchem Ausmaß *de novo* CNVs in den Nachkommen bestrahlter Zellen entstehen und ob Klone, die chromosomal stabil sind, auf CNV-Ebene Instabilitäten zeigen. Mit der Array-Analyse sollten darüber hinaus Gene identifiziert werden, deren dosisabhängige Veränderung in der Entstehung von RIGI und Krebs relevant sind. Nicht bestrahlte Kontroll-Klone wurden untersucht, um den alterungsbedingten Einfluss auf die Entstehung von *de novo* CNVs zu bestimmen. Auffällige Kandidatengene sollten im Anschluss mit Hilfe der MLPA-Methode in weiteren Klonen validiert werden.

3.3.1. Molekulare Karyotypisierung zur Analyse genomweiter Veränderungen der Kopienzahl

Pro Experiment wurden vier BeadChips analysiert. Mit jedem BeadChip können zwölf Proben untersucht werden. Eine Auflistung der analysierten Klone, sowie deren Klassifizierung ist in Tabelle 19 dargestellt.

Tabelle 19: Anzahl der Klone, die mit HumanCytoSNP-12 BeadChip Arrays analysiert wurden.

		n (gesamt)	stabil*	instabil*	nicht klassifiziert
Experiment 1	Kontroll-Klone	12	9	3	–
	bestrahlte Klone	36	10	26	–
Experiment 2	Kontroll-Klone	12	7	3	2
	bestrahlte Klone	36	9	10	17

Aufgelistet ist die Gesamtzahl (n) der untersuchten Klone pro Experiment, sowie die Anzahl der Klone in den jeweiligen Klassifizierungsgruppen. *Die Klassifizierungsergebnisse sind abhängig von der Chromosomenbänderungsanalyse.

Für jedes Experiment wurden zwölf Kontroll-Klone und 36 bestrahlte Klone analysiert. Es wurden zwei Kontroll-Klone und 17 bestrahlte Klone des zweiten Experiments analysiert, die aufgrund schlechter Bandenqualität zuvor keiner Klassifizierungsgruppe zugeordnet werden konnten.

Deletionen, Duplikationen und LOH-Regionen wurden über die BAF-Profile und LRR-Profile für jeden Klon bestimmt. Alle chromosomalen Koordinaten für die detektierten CNVs beziehen sich auf das humane Referenzgenom GrCh37/hg19.

CNVs und LOH-Regionen, die in allen Klonen eines Experiments zu beobachten waren, wurden als kulturspezifische CNVs, die schon in der Primärkultur vorhanden sind, eingestuft (Tabelle 20). Für die Analyse des Strahlen- oder Alterungseffekts wurden diese CNVs ausgeschlossen.

Tabelle 20: Kopienzahlvariationen der Primärkulturen.

Kultur	betroffene Klone	Chr	Start ^a	Ende ^a	zytogenetische Bande	Typ	CN	Größe (bp)
1	46	2	31552902	37687520	2p25.3-2p25.2	LOH	2	6134618
1	46	2	2236281	5899644	2p23.1-2p22.2	LOH	2	3663363
1	46	6	10461119	33807091	6p24.2-6p21.32	LOH	2	23345972
1	11	9	130738730	131006026	9q34.11-9q34.11	Dup	3	267296
1	46	11	2904010	2906824	11p15.4-11p15.4	Dup	4	2814
1	46	12	129466507	133770975	12q24.33-12q24.33	LOH	2	4304468
1	46	21	16784706	23813859	21q21.1-21q21.1	LOH	2	7029153
2	48	2	89427986	90247720	2p11.2-2p11.2	Dup	3	819734
2	48	3	71045000	71153110	3p13-3p13	Del	1	108110
2	48	11	48331739	51530241	11p11.2-11p11.2	Dup	3	3198502
2	48	14	106350394	106963726	14q32.33-14q32.33	Dup	3	613332
2	48	16	8906539	9224319	16p13.2-16p13.2	Dup	3	317780

Aufgelistet sind die durch SNP-Arrays detektierten CNVs, die in der Mehrheit der analysierten Klone eines Experiments auftraten. ^a chromosomale Position gemäß GRCh37 (hg19). Abkürzungen: bp: Basenpaar(e); Chr: Chromosom; CN: engl. *copy number*; Del: Deletion; Dup: Duplikation; LOH: engl. *loss of heterozygosity*.

Alle Klone der ersten Kultur zeigten eine Mikroduplikation auf Chromosom 11 in der zytogenetischen Bande p15.4. Weiterhin hatten 11 von 46 Klonen dieser Kultur eine Duplikation das Chromosom 6 betreffend. Duplikationen, die in allen Klonen der zweiten Kultur gefunden wurden, betrafen die Chromosomen 2, 11, 14 und 16. Neben den Duplikationen besaß die zweite Kultur eine Deletion auf Chromosom 3. Die restlichen Auffälligkeiten beider Kulturen waren CN-LOH-Regionen.

Eine Auflistung aller detektierten CNVs und CN-LOHs, die nicht bereits in der Primärkultur vorhanden waren, ist dem Anhang zu entnehmen (Anhang-Tabelle 3).

Die Behandlung mit IR führte zur Induktion von LOH-Regionen in drei Klonen. Die betroffene Region in dem Klon 1-2100B1 umfasste etwa 27 170 kb auf Chromosom 3. Die Analyse des

betroffenen Bereichs ergab, dass mehr als 100 Gene in dem für diese Veränderung angegebenen bp-Bereichs lagen. Weiterhin konnten zwei CN-LOHs in dem Klon 2-2310 identifiziert werden, welche die Chromosomen 13 (51 185 kb) und 20 (40 610 kb) betrafen. Insgesamt waren 148 Gene durch die Veränderung auf Chromosom 13 und 333 Gene auf Chromosom 20 betroffen. Da es bei CN-LOH-Regionen nicht zur Änderung der CN an sich kommt, wurden diese nicht in die nachfolgenden statistischen Analysen miteinbezogen.

Zwei Kontroll-Klone des ersten Experiments wurden aufgrund starker Streuung der Plots für die BAF und LRR ebenfalls ausgeschlossen. Eine zuverlässige Analyse mit den für diese Klone generierten Daten war nicht gewährleistet.

Insgesamt zeigten die Kontroll-Klone nur wenige durch Zellkultivierung entstandene CNVs, die durchschnittliche Anzahl von *de novo* CNVs in den Kontrollen des ersten Experiments belief sich auf 0,2 und in den Kontrollen des zweiten Experiments auf 0,08 (Abbildung 20). Nach Bestrahlung konnte ein 2,8-facher Anstieg ($p = 0,219$, Mann-Whitney-U-test) in der durchschnittlichen Anzahl von *de novo* CNVs im ersten Experiment und ein signifikanter 8-facher Anstieg im zweiten Experiment verzeichnet werden ($p = 0,009$, Mann-Whitney-U-test).

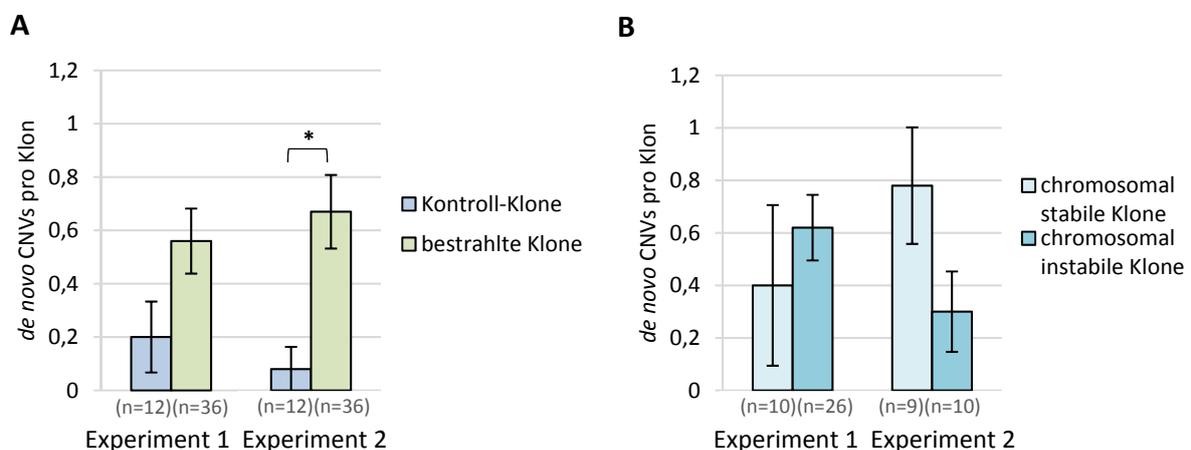


Abbildung 20: Durchschnittliche Anzahl von *de novo* CNVs pro Klon. (A) Kontroll-Klone und bestrahlte Klone. Die bestrahlten Klone wurden in Abhängigkeit vom Ergebnis der Chromosomenbänderungsanalyse in stabil und instabil klassifiziert (B). Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Signifikante Gruppenunterschiede (p -Wert $< 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) sind mit * markiert. Abkürzungen: CNVs: engl. *copy number variations*; n: Anzahl der analysierten Klone.

Im ersten Experiment war die Anzahl von *de novo* CNVs pro Klon höher in den Klonen, die bei der Chromosomenanalyse als instabil (0,4 *de novo* CNVs pro Klon) eingestuft wurden, als die

Anzahl von *de novo* CNVs in den chromosomal stabilen Klonen (0,62 *de novo* CNVs pro Klon). Diese Beobachtung konnte im zweiten Experiment nicht bestätigt werden, in dem in chromosomal stabilen Klonen im Durchschnitt eine höhere Anzahl von *de novo* CNVs (0,78 *de novo* CNVs pro Klon) verzeichnet werden konnte, als in chromosomal instabilen Klonen (0,3 *de novo* CNVs pro Klon). Die Unterschiede zwischen den beiden Klassifizierungsgruppen waren jedoch in beiden Experimenten nicht signifikant.

In den Kontroll-Klonen konnten ausschließlich Verluste der CN beobachtet werden, während für bestrahlte Klone ein Mix aus Deletionen und Duplikationen detektiert wurde. Unter den 20 CNVs der bestrahlten Klone des ersten Experiments waren elf Duplikationen und neun Deletionen. Für die bestrahlten Klone des zweiten Experiments war das Verhältnis weniger ausgeglichen, 18 von 28 CNVs waren Verluste genetischen Materials, während zehn als Duplikationen identifiziert wurden. In den chromosomal stabilen Klonen des ersten Experiments konnten geringfügig mehr Deletionen als Duplikationen detektiert werden, während in instabilen Klonen mehr Deletionen induziert wurden. Im zweiten Experiment konnte in den chromosomal stabilen Klonen ein balanciertes Verhältnis von Deletionen und Duplikationen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu waren die CNVs in den instabilen Klonen ausschließlich Deletionen.

Die Größenverteilung der CNVs in den Kontrollen des ersten Experiments lag zwischen 184 kb und 382 kb mit einem Median von 283 kb (Abbildung 21). In den Kontrollen des zweiten Experiments belief sich die Größe des CNV auf 367 kb. Die bestrahlten Klone beider Experimente zeigten eine eher heterogene Größenverteilung der CNVs mit einem Median von 358 kb für die bestrahlten Klone des ersten Experiments und einem mehr als doppelt so hohem Wert für den Median von 749 kb für die Klone des zweiten Experiments. Für beide Experimente (Experiment 1: 29 % und Experiment 2: 38 %) konnten besonders große CNVs (> 1000 kb) identifiziert werden.

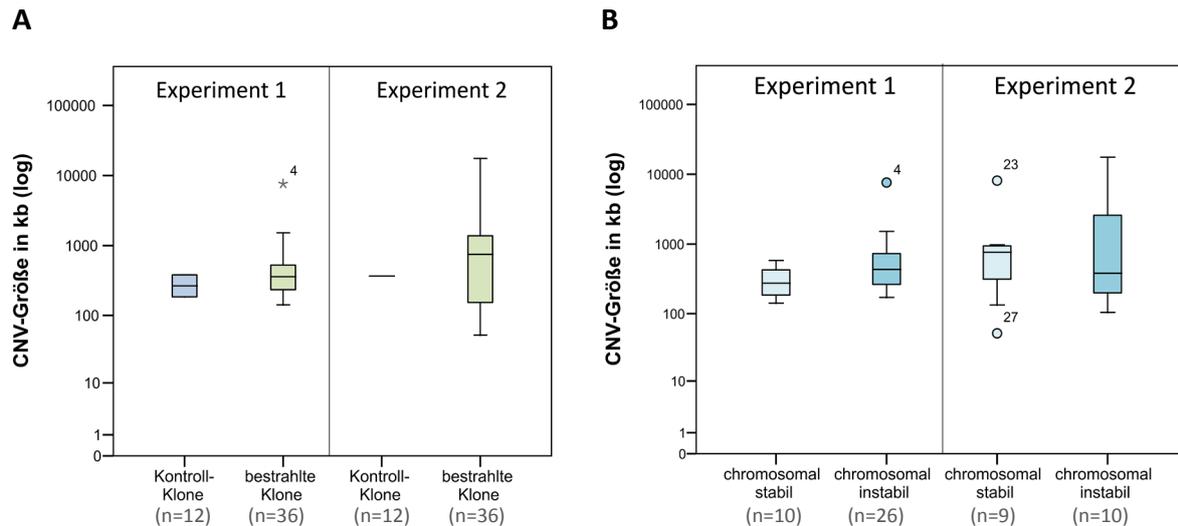


Abbildung 21: Größenverteilung der detektierten Kopienzahlvariationen angegeben in kb. (A) Kontroll-Klone und bestrahlte Klone. Die bestrahlten Klone wurden in Abhängigkeit vom Ergebnis der Chromosomenbänderungsanalyse in stabil und instabil klassifiziert (B). Der Median der Größenverteilung wird durch den schwarzen Strich in der Box repräsentiert. Die untere Box entspricht dem 25 %-Quartil und die obere Box dem 75 %-Quartil. Ausreißer der Datenreihe sind als Kreis, Extremwerte als Stern dargestellt. Es konnten keine signifikanten (p -Wert $< 0,05$, Kolmogorov-Smirnov-Test) Unterschiede in der Größenverteilung festgestellt werden. Abkürzungen: CNV: engl. *copy number variations*; kb: Kilobasenpaar(e); n: Anzahl der analysierten Klone.

Insgesamt konnte kein einheitliches Muster in der Größenverteilung stabiler und instabiler Klone in den beiden Experimenten beobachtet werden. Während im ersten Experiment die CNVs der instabilen Klone im Median größer (434 kb) waren als die der stabilen Klone (278 kb), war im zweiten Experiment gegenteiliges der Fall. Die CNVs der stabilen Klone hatten im Median eine Größe von 764 kb, die CNVs der instabilen Gruppe waren mit einem Median von 382 kb kleiner. Ein signifikanter Unterschied in der Größenverteilung konnte nicht festgestellt werden ($p = 0,856$, Kolmogorov-Smirnov-Test).

Abbildung 22 zeigt die genomische Verteilung der einzelnen CNVs und CN-LOHs. Nur wenige Chromosomen (Chromosomen 12, 19, 21, sowie die Geschlechtschromosomen) waren nicht von Veränderungen in der CN betroffen. Alle CNVs der Kontroll-Klone befanden sich auf unterschiedlichen Chromosomen. Pro Kontroll-Klon waren 1,33 proteinkodierende Gene betroffen.

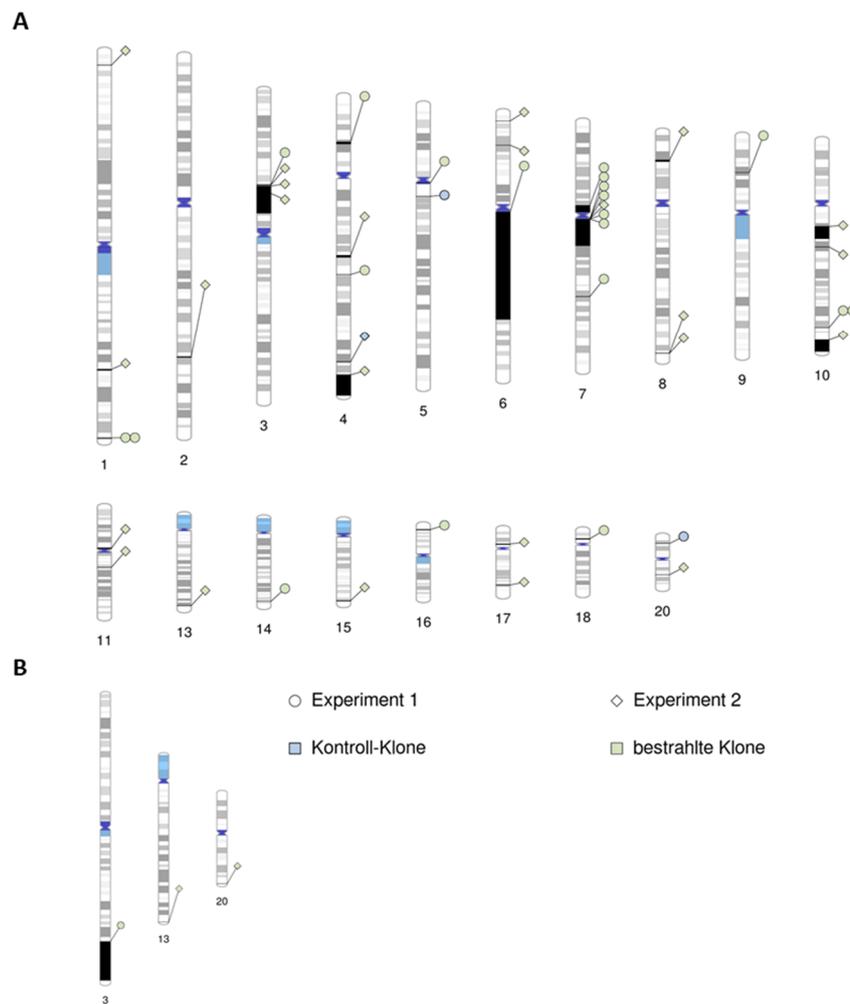


Abbildung 22: Chromosomale Positionen struktureller Veränderungen. (A) CNVs und (B) CN-LOHs detektiert in Kontroll-Klonen und bestrahlten Klonen über Analysen mit SNP-Arrays. Die in den unterschiedlichen Farbtönen hinterlegten Kreise und Rauten markieren die Gruppen aus beiden Experimenten. Schwarze Balken in einem Chromosom zeigen große chromosomale Veränderungen an. Chromosomen, in denen keine CNV oder CN-LOH detektiert wurde, sind nicht abgebildet. Abkürzungen: CN-LOH: engl. *copy neutral loss of heterozygosity*; CNV: engl. *copy number variations*; SNP: engl. *single nucleotide polymorphism*.

Die meisten CNVs der bestrahlten Klone (66 %) traten als nicht überlappende, isolierte Veränderungen auf. Zusätzlich konnten jedoch chromosomale Regionen beobachtet werden, an denen mehr als ein CNV vorkam. Ein solches Cluster wurde in Anlehnung an eine Publikation von Arlt und seinen Mitarbeitern als ein Bereich definiert, an dem mindestens zwei überlappende oder nah beieinanderliegende CNVs vorkommen [180]. In unserer Analyse wurden Cluster als solche betrachtet, wenn die entsprechenden CNVs nicht mehr als 1 Mb voneinander entfernt auftraten. Insgesamt waren 34 % der detektierten CNVs an einer Clusterbildung beteiligt. Eine detaillierte Auflistung dieser CNVs ist in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Cluster der Kopienzahlvariationen.

Klon	Klassifizierung*	Chr	Start ^a	Ende ^a	zytogenetische Bande	CN	Größe (bp)
1-2100B1	instabil	1	246886265	247340784	1q44	3	454520
1-2200E2	instabil	1	246886265	247338427	1q44	3	452163
2-210	instabil	3	60587580	60969373	3p14.2	1	381794
2-244	instabil	3	61253045	78803850	3p14.2	1	17550806
1-2200C3	instabil	3	60170083	60341773	3p14.2	3	171691
2-2309	stabil	7	62081451	79295257	7q11.21	1	17213807
1-2100B6	stabil	7	62133826	62447140	7q11.21	1	313315
1-2200A4	instabil	7	62109713	62447140	7q11.21	1	337428
1-2200A5	instabil	7	61976744	62453303	7q11.21	1	476560
1-2300E6	instabil	7	61994170	62428125	7q11.21	1	433955
1-2300F5	stabil	7	61864866	62447140	7q11.21	1	582275
2-2G	N/A	8	141601542	141660770	8q24.3	3	59229
2-2A	stabil	8	141608898	141660770	8q24.3	3	51873
1-2200B2	instabil	10	119183424	119363679	10q26.11	3	180256
1-2200D5	instabil	10	119183424	119363679	10q26.11	3	180256

*Klassifizierungen abhängig vom Ergebnis der Chromosomenbänderungsanalyse, ^a chromosomale Position gemäß GRCh37 (hg19). Abkürzungen: bp: Basenpaar(e); Chr: Chromosom; CN: engl. *copy number*.

Es konnten fünf Cluster beobachtet werden, an denen jeweils mindestens zwei CNVs vorkamen. Das Cluster mit den meisten CNVs lag auf Chromosom 7. Klone beider Kulturen zeigten hier Veränderungen in der CN. Das Cluster an dieser Position befindet sich in der zytogenetischen Bande der fragilen Stelle (FRA) 7J. Allerdings konnte nur für eine der sechs beobachteten Deletionen eine direkte Überlappung mit bekannten Genen gefunden werden. Eine weitere Deletion die chromosomalen Banden 7p12.1–7q11.1 umfassend konnte etwa 4 Mb neben dem Cluster identifiziert werden. Von den Klonen, die in 7q11.21 von Veränderungen in der CN betroffen waren, waren drei chromosomal stabil und drei chromosomal instabil.

Eine Anhäufung von CNVs konnte ebenfalls in der chromosomalen Bande 3p14.2 identifiziert werden. Hier befindet sich die FRA3B, die mit dem Gen *FHIT* (engl. *fragile histidine triad*) assoziiert ist. Direkt betroffen war das Gen allerdings nur in den Klonen 1-2200C3 und 2-210, während die Deletion im Klon 2-244 etwa 15 kb neben dem *FHIT*-Gen lag. Alle drei Klone, die in FRA3B verändert waren, wurden zuvor als chromosomal instabil klassifiziert. Neben den zwei genannten Überlappungen, überlappten weitere Cluster Bereiche, sowie isolierte CNVs, mit fragilen Stellen (Abbildung 23). Die CNVs befanden sich dabei in chromosomal stabilen, sowie in chromosomal instabilen Klonen.

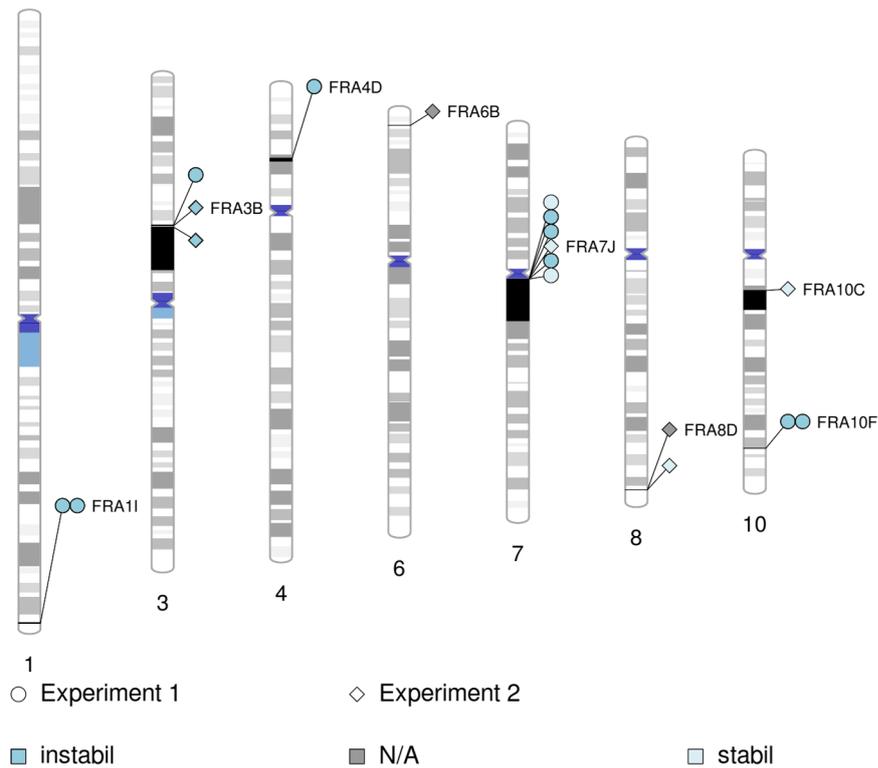


Abbildung 23: Kopyenzahlvariationen in bestrahlten Klonen, die mit fragilen Stellen des Genoms überlappen. Die Farbkodierung repräsentiert die Klassifizierungsgruppen in Abhängigkeit von der Chromosomenbänderungsanalyse. Die Formen (Kreis und Raute) kennzeichnen die beiden Experimente. Chromosomen, in denen keine CNV oder CN-LOH detektiert wurde, sind nicht abgebildet. Abkürzungen: CN-LOH: engl. *copy-neutral loss of heterozygosity*; CNV: engl. *copy number variation*, FRA: fragile Stelle; N/A: engl. *not available*: keine Klassifizierungsgruppe vorhanden.

Zusammenfassend zeigte sich eine signifikante Anreicherung der CNVs in den fragilen Stellen des Genoms ($p = 0,019$, Fisher exakt).

Zur Identifizierung von Signalwegen, die für die Destabilisierung des Genoms in Folge der Einwirkung von IR relevant sein könnten, wurden Anreicherungsanalysen durchgeführt. Gene, die von einer Veränderung in der CN betroffen waren, wurden in das Online Tool Enrichr (Tabelle 6) geladen. Die Analyse ergab keine signifikant angereicherten GO-Terms oder Signalwege für die Gruppen Kontrolle, bestrahlt, stabil oder instabil.

3.3.2. Detektion von Dosisunterschieden des Gens *FHIT*

Zur Detektion von Dosisunterschieden einzelner Exons des Gens *FHIT* in den Nachkommen bestrahlter Zellen wurden MLPA-Analysen durchgeführt.

Es wurden 72 bestrahlte Klone, die vorher nicht mit dem CytoSNP-12 analysiert wurden, untersucht. Nicht bestrahlte Kontroll-Klone (je nach Testproben: 1-C2, 1-C6, 1-C15, 2-C4, 2-C100 und 2-C14) mit einer normalen *FHIT*-CN wurden als Referenzen verwendet, um die CN der Testproben zu bestimmen. Pro Lauf wurde eine Positivkontrolle (2-244) und eine Negativkontrolle (je nach Testproben: 2-2L oder 1-2200C1) eingeschlossen. Die Positivkontrolle, die Negativkontrolle, sowie die Referenzproben wurden abhängig von den Ergebnissen der Array-Analyse ausgewählt. Die Positivkontrolle zeigte im CytoSNP-12 eine 17 550 806 bp große Deletion auf Chromosom 3. Dieser Bereich wird in dem MLPA-Kit durch die Oligonukleotide 19433-L25848 und 19414L25 abgedeckt und sollte dementsprechend bei der Analyse auffällig sein. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Proben ist dem Anhang zu entnehmen (Anhang-Tabelle 1).

Durch den Vergleich der CN, die durch die Säulenhöhe repräsentiert sind, mit den Daten der Referenzproben, lässt sich die Gendosis der Testproben bestimmen. Erwartungsgemäß konnte für die Positivkontrolle eine Dosisreduktion der Gene *PTPRG* und *CASPS* festgestellt werden (Abbildung 24). Die Säulenhöhe (0,5) entspricht einer heterozygoten Deletion. Die Säulen, welche die anderen untersuchten Loci repräsentieren, zeigten eine Ratio von 1, welches einer normalen CN entspricht.

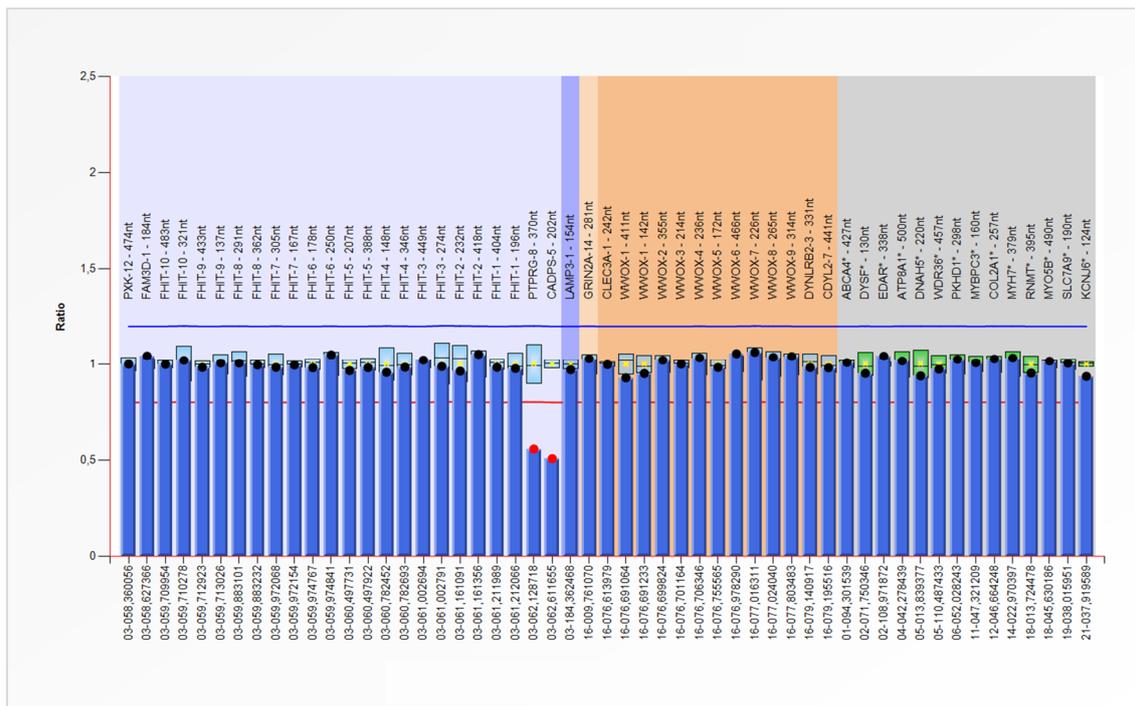


Abbildung 24: MLPA-Ergebnis der eingesetzten Positiv-Kontrolle (2-244). Eine Ratio von 1 entspricht einer normalen Kopienzahl von zwei. Die reduzierten Werte auf 0,5 für die Marker der Gene *PTPRG* und *CASPS* entsprechen einer heterozygoten Deletion, die Marker der restlichen Loci zeigen eine normale Kopienzahl (Ratio=1). Die Graphik wurde erstellt mit Coffalyser.Net. Abkürzungen: FHIT: engl. *fragile histidine triad*; nt: Nukleotide.

Die Analyse der bestrahlten Klone ergab eine heterozygote Deletion des Exons 4 des Gens *FHIT* in dem Klon 2-2P. Ersichtlich wurde dies durch eine verringerte Säulenhöhe der entsprechenden Marker (19407-L25822 und 19431-L26207) auf den Wert 0,5 (Abbildung 25). Die Marker für die restlichen Loci entsprachen einer normalen CN.

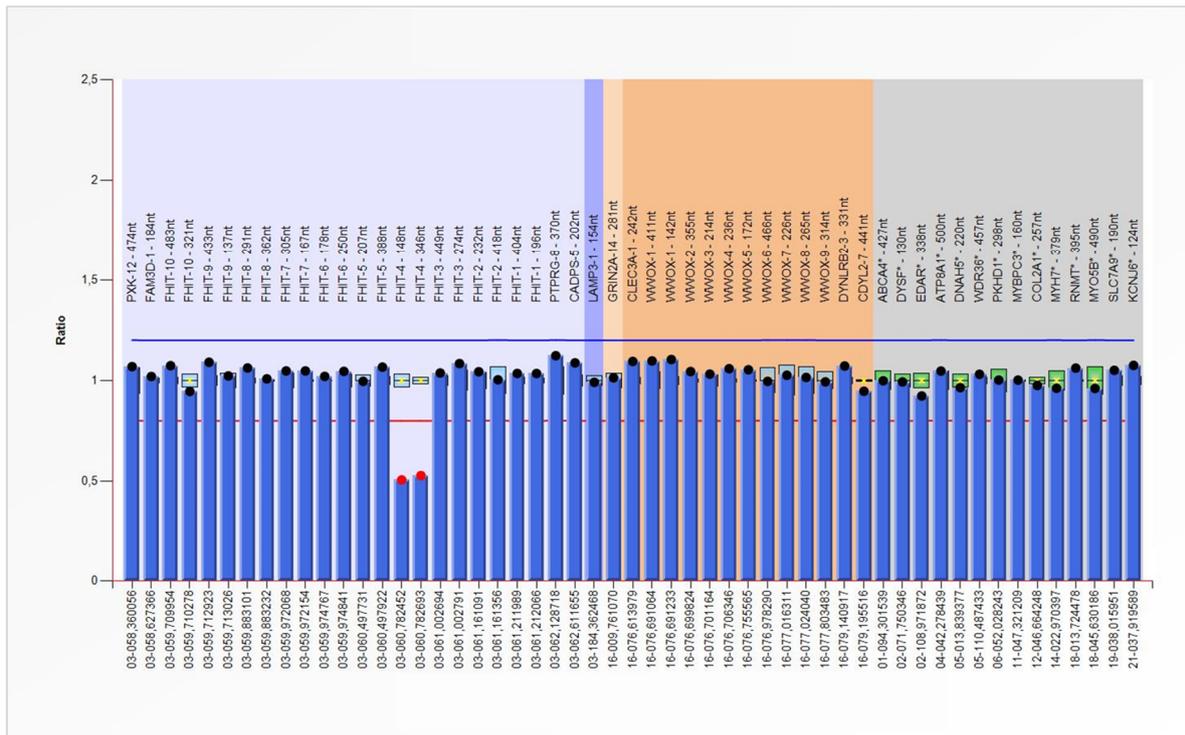


Abbildung 25: Ergebnis der MLPA-Analyse im Klon 2-2P. Die verminderte Balkenhöhe für die beiden Marker FHIT-4 (Ratio=0,5) entsprechen einer heterozygoten Deletion, die Marker der restlichen Loci zeigen eine normale Kopienzahl (Ratio=1). Die Graphik wurde erstellt mit Coffalyser.Net. Abkürzungen: FHIT: engl. *fragile histidine triad*; nt: Nukleotide.

Insgesamt war kein anderer analysierter Klon in den Ziel-Regionen auffällig. Sämtliche Marker zeigten eine normale CN.

3.4. Whole Exome Sequencing

3.4.1. Untersuchung von genomischen Veränderungen einzelner Nukleotide in bestrahlten und nicht bestrahlten Klonen

Die Array-Analyse ermöglicht zwar die genomweite Analyse struktureller Variationen in einer relativ hohen Auflösung, Informationen über Veränderungen auf dem Level von einzelnen Nukleotiden können jedoch nicht gegeben werden. Zur Ergänzung der Array-Analysen wurden daher die Exome von 25 Klonen und zwei Massenkulturen sequenziert (Tabelle 22). Anhand der Daten sollten erstmalig Mutationsraten in den Nachkommen bestrahlter Zellen definiert werden. Darüber hinaus sollten Mutationsmuster und -Signaturen identifiziert werden, die Einblicke in die potentiellen biologischen Prozesse zur Entstehung genomischer Instabilität und Krebs geben.

Tabelle 22: Übersicht der Proben für das WES.

		n	klassifiziert	stabil*	instabil*
Experiment 1	Massenkultur	1	–	–	–
	Kontroll-Klone	3	3	2	1
	bestrahlte Klone	4	2	1	1
Experiment 2	Massenkultur	1	–	–	–
	Kontroll-Klone	4	4	3	1
	bestrahlte Klone	14	9	3	6

Aufgelistet ist die Anzahl (n) der untersuchten Klone pro Experiment, sowie die Anzahl der Klone in der jeweiligen Klassifizierungsgruppe. *Die Klassifizierungen sind abhängig vom Ergebnis der Chromosomenbänderungsanalyse.

Um eine erhöhte Sequenziertiefe zu erreichen wurden pro Lauf neun Proben sequenziert. Informationen über die Verteilung der Abdeckungstiefe pro Probe ist in Abbildung 26 dargestellt. In allen Proben (Ausnahme von 2-217 und 2-2336) waren mindestens 80 % der Basen der Zielregion über 80-fach abgedeckt und 50 % der Basen mindestens 50-fach abgedeckt.

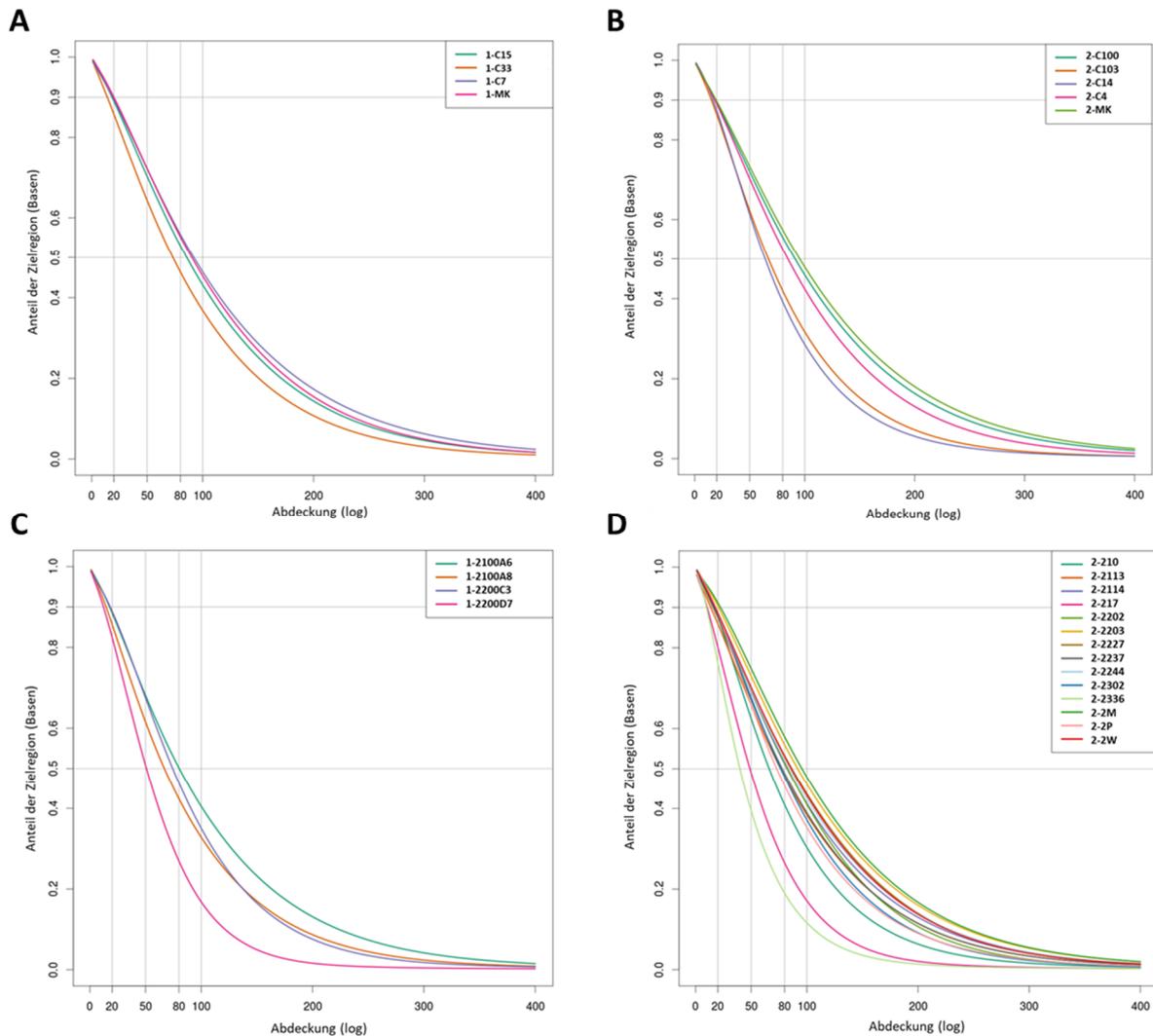


Abbildung 26: Verteilung der Abdeckungstiefe über die Zielregion pro Probe. Kontroll-Klone aus (A) Experiment 1 und (B) Experiment 2. Bestrahlte Klone aus (C) Experiment 1 und (D) Experiment 2.

Mit Hilfe der Filterstrategie (siehe Kapitel 2.2.3.10 Detektion von Varianten, S.53) wurden insgesamt 50 Varianten in den Kontroll-Klonen und 174 Varianten in den bestrahlten Klonen identifiziert (Anhang-Tabelle 4). Die Gesamtzahl der Varianten setzte sich aus Einzelnukleotid-Varianten (engl. *single nucleotide variants*, SNVs), Deletionen, Insertionen und Indels zusammen. Die Kontroll-Klone des ersten Experiments hatten dabei 4–15 Varianten mit einer durchschnittliche Anzahl von 9,7 Varianten und die Kontroll-Klone des zweiten Experiments 2–10 Varianten, mit einer mittleren Variantenzahl von 5,25 (Abbildung 27A). Nach Bestrahlung konnten in den Klonen des ersten Experiments ein 1,6-facher Anstieg auf 16 Varianten pro Klon ($p = 0,229$, Mann-Whitney-U-test) und in den Klonen des zweiten Experiments ein 1,5-facher Anstieg auf 8 Varianten ($p = 0,277$, Mann-Whitney-U-test) pro Klon

verzeichnet werden. Die Variantenzahl bewegte sich hierbei zwischen 13 und 19 im ersten und zwischen 4 und 13 im zweiten Experiment.

Im Vergleich zwischen den Kulturen zeigte sich, dass in den Klonen des ersten Experiments, sowohl durch Zellkultivierung als auch durch Bestrahlung mehr Varianten entstanden sind, als in den vergleichbaren Gruppen des zweiten Experiments.

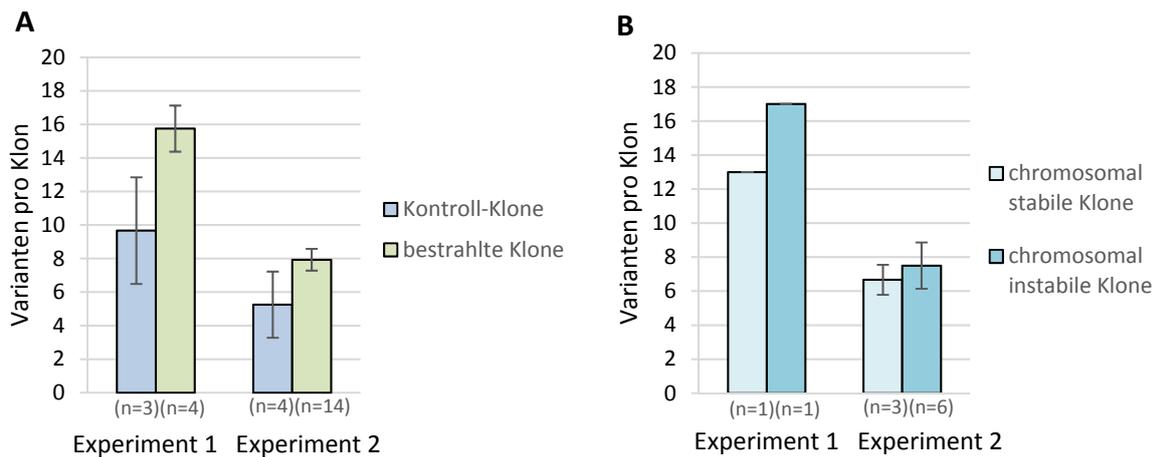


Abbildung 27: Durchschnittliche Variantenzahl basierend auf den WES-Ergebnissen. (A) Kontroll-Klone und bestrahlte Klone. Die bestrahlten Klone wurden in Abhängigkeit vom Ergebnis der Chromosomenbänderungsanalyse in stabil und instabil klassifiziert (B). Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Es wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede (p -Wert $< 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) festgestellt. Abkürzungen: n: Anzahl der analysierten Klone.

Aus dem ersten Experiment wurden jeweils nur ein chromosomal stabiler und ein chromosomal instabiler Klon sequenziert, die Werte für die Anzahl der Varianten beziehen sich somit nur auf jeweils einen Klon. Der stabile Klon hatte dabei mit 13 Varianten im Vergleich weniger Varianten als der instabile Klon mit 17 Varianten (Abbildung 27B). Vergleichbare Ergebnisse zeigte das zweite Experiment, in dem sich die durchschnittliche Variantenzahl in den instabilen Klonen auf 7,5 Varianten belief, während in den stabilen Klonen mit 6,7 weniger Varianten pro Klon entstanden ($p = 1,000$, Mann-Whitney-U-test). Zur Berechnung der Mutationsraten wurde zunächst die Mutationsfrequenz berechnet. Diese setzt sich aus der Gesamtzahl der Varianten einer Probe dividiert durch die Anzahl der Positionen der Zielregion, an denen mindestens eine Abdeckung von 20 vorlag, zusammen. Ausgehend davon, dass die Klone im Vergleich zur Massenkultur etwa 20 PDs durchlaufen haben, wurde die Mutationsrate schließlich durch Division der Mutationsfrequenz durch die Anzahl der in etwa durchlaufenen Mitosen berechnet. In beiden Experimenten war die

Mutationsrate pro bp pro Mitose in den Kontrollen geringer als in den bestrahlten Klonen (Tabelle 23). Während für die Kontrollen des ersten Experiments eine durchschnittliche Mutationsrate von $8,41 \times 10^{-9}$ pro bp pro Mitose berechnet wurden, belief sich die Rate in den bestrahlten Klonen auf $1,41 \times 10^{-8}$ ($p = 0,114$, Mann-Whitney-U-test). Für die Kontrollen des zweiten Experiments ergab sich eine Mutationsrate von $4,53 \times 10^{-9}$ pro bp und für die bestrahlten Klone eine Rate von $6,76 \times 10^{-9}$ ($p = 0,277$, Mann-Whitney-U-test). Die Berechnung der Mutationsrate ergab einen geringfügig höheren Wert für die chromosomal instabilen Klone (Experiment 1: $1,35 \times 10^{-8}$ und Experiment 2: $6,30 \times 10^{-9}$) beider Experimente im Vergleich zu den Klonen, die als chromosomal stabil (Experiment 1: $1,27 \times 10^{-8}$ und Experiment 2: $5,58 \times 10^{-9}$) eingestuft wurden (Tabelle 23).

Tabelle 23: Mittlere somatische Mutationsraten pro Basenpaar pro Mitose.

		n	Mutationsrate	SF	p-Wert
Experiment 1	Kontroll-Klone	3	$8,41 \times 10^{-9}$	$2,73 \times 10^{-9}$	0,114
	bestrahlte Klone	4	$1,41 \times 10^{-8}$	$1,64 \times 10^{-9}$	
	chromosomal stabile Klone	1	$1,27 \times 10^{-8}$	0	0,905
	chromosomal instabile Klone	1	$1,36 \times 10^{-8}$	0	
Experiment 2	Kontroll-Klone	4	$4,53 \times 10^{-9}$	$1,67 \times 10^{-9}$	0,327
	bestrahlte Klone	14	$6,76 \times 10^{-9}$	$5,73 \times 10^{-10}$	
	chromosomal stabile Klone	3	$5,58 \times 10^{-9}$	$3,47 \times 10^{-10}$	0,905
	chromosomal instabile Klone	6	$6,30 \times 10^{-9}$	$1,05 \times 10^{-9}$	

Aufgelistet ist die Anzahl (n) der untersuchten Klone pro Experiment, sowie die durchschnittlichen Mutationsraten dargestellt mit Mittelwert und Standardfehler (SF) basierend auf den Ergebnissen des WES. Die bestrahlten Klone wurden in Abhängigkeit der Chromosomenbänderungsanalyse in stabil und instabil klassifiziert. Es wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede ($p\text{-Wert} < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) festgestellt.

Insertionen (ins), Deletionen (del) und Indels (delins) konnten nur in bestrahlten Klonen identifiziert werden (Tabelle 24). Bei Letzteren handelt es sich um Varianten, die aus einer Kombination von Deletion und Insertion bestehen [177].

Tabelle 24: Identifizierte Insertionen, Deletionen und Indels.

Klon	Chr	Position ^a	Name	Gen	Typ	Auswirkung ^b
1-2100A6	11	113673923	insG	<i>USP28</i>	Frameshift-Variante	HIGH
1-2100A8	1	217665069	delinsAG	<i>GPATCH2</i>	Missense-Variante	MODERATE
2-2203	1	159888757	delCTC	<i>TAGLN2</i>	Intronische Variante	MODIFIER
2-2336	2	214013349	insG	<i>IKZF2</i>	Frameshift-Variante	HIGH
2-2W	4	113539261	delinsAC	<i>C4orf21</i>	Missense-Variante	MODERATE
2-2244	11	117060766	delT	<i>SIDT2</i>	Intronische Variante	MODIFIER
2-2302	14	105233142	delGAAA	<i>SIVA1</i>	Upstream Variante	MODIFIER

Aufgelistet sind die mit WES detektierten Insertionen, Deletionen und Indels der bestrahlten Klone. ^a chromosomale Position gemäß GRCh37 (hg19); ^b Auswirkungen der Varianten basierend auf *in silico* Bewertungen des Ensembl Variant Effect Predictors. Abkürzungen: Chr: Chromosom; del: Deletion; delins: Indel; ins: Insertion.

Die beiden detektierten Insertionen führen zum Frameshift die Gene *USP28* und *IKZF2* betreffend. *USP28* kodiert für eine Deubiquitinase, die in der DDR und in der schadensinduzierten Apoptose involviert ist. Das Genprodukt von *IKZF2* spielt eine Rolle bei der Regulation der Lymphozytenentwicklung.

Abbildung 28A zeigt die im Klon 2-2W aufgetretene Variante c.1936_1937delinsAC in Exon 7 des Gens *C4orf21*. Die Mutation führt zum Austausch der Aminosäure (AS) Glutaminsäure zu Threonin. Auch in dem Klon 1-2100A8 konnte ein Indel identifiziert werden (Abbildung 28B). Die heterozygote Variante c.1229_1230delinsAG betraf dabei Exon 8 des Gens *GPATCH2* und führt zum Austausch der AS Arginin zu Glutamin.

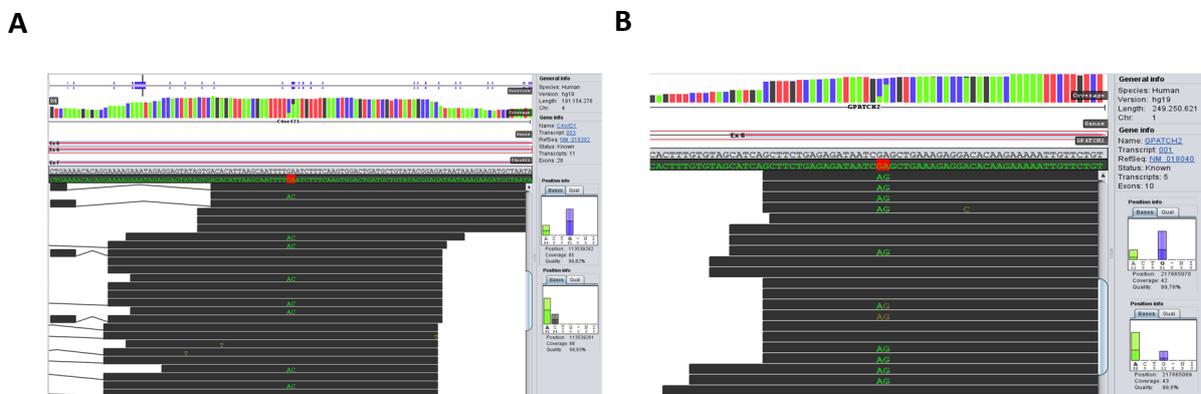


Abbildung 28: Ausschnitt aus dem Genombrowser der Software GenSearchNGS. Dargestellt sind die alignierten Reads für die Varianten (A) c.1936_1937delinsAC (2-2W) und (B) c.1229_1230delinsAG (1-2100A8).

Der Ensembl Variant Effect Predictor (Tabelle 6) wurde verwendet, um die Variantentypen der Gruppen zu bestimmen (Abbildung 29). Missense-Mutationen waren in allen Gruppen am häufigsten zu beobachten. Von den 29 induzierten Varianten in den Kontroll-Klonen des ersten Experiments waren folgend 24 % synonyme Varianten und jeweils 7 % nicht kodierende und intronische Varianten. In den Kontroll-Klonen des zweiten Experiments wurden am zweithäufigsten synonyme Varianten (14 %), sowie nicht kodierende Varianten und Varianten, die zum vorzeitigen Stopp führen mit jeweils 9,5 %, identifiziert. In den bestrahlten Klonen beider Experimente konnten intronische Varianten am zweithäufigsten verzeichnet werden (21 % für Experiment 1 und 24 % für Experiment 2), gefolgt von nicht kodierenden Varianten (17 %) in den Klonen des ersten Experiments und synonyme Varianten (14 %) in den Klonen des zweiten Experiments. Insgesamt war das Spektrum der Variantentypen nach Bestrahlung vielfältiger als in den Kontroll-Klonen.

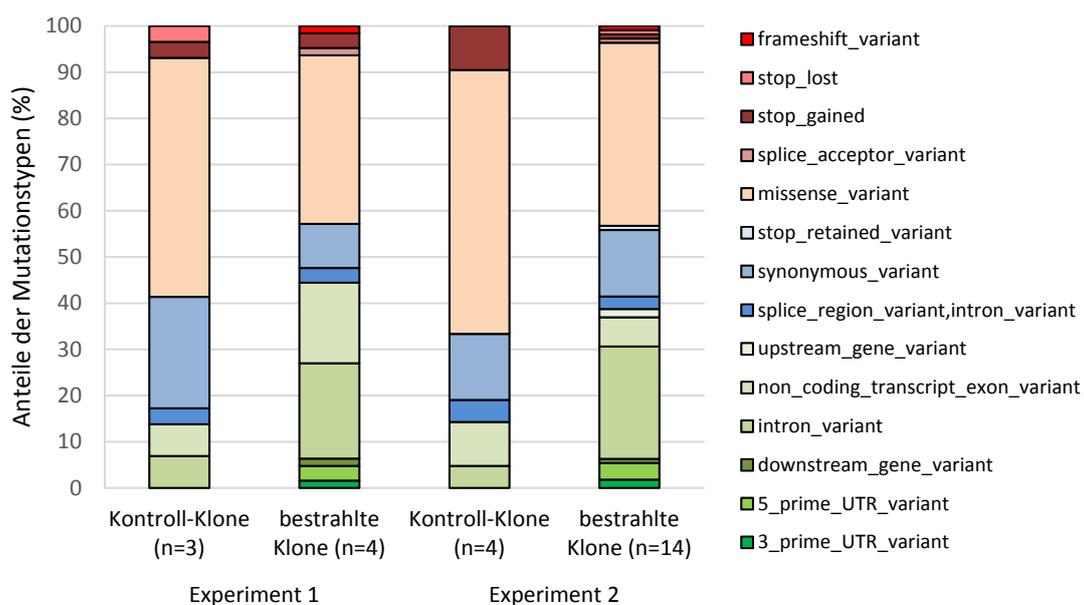


Abbildung 29: Prozentuale Anteile der Variantentypen in bestrahlten und nicht bestrahlten Klonen beider Experimente basierend auf den Ergebnissen des WES. Die Grafik wurde erstellt nach den Vorhersagen des Ensembl Variant Effect Predictors. Die unterschiedlichen Farben kodieren den Schweregrad der Auswirkung auf das Transkript: Rottöne: HIGH, orange: MODERATE, Blautöne: LOW, Grüntöne: MODIFIER. Abkürzungen: n: Anzahl der analysierten Klone; UTR: engl. *untranslated region*.

Der Ensembl Variant Effect Predictor erstellt zudem eine *in silico* Vorhersage über die Auswirkungen der einzelnen Varianten auf das Transkript. Dabei zeigte sich, dass die Kontroll-Klone beider Experimente anteilig mehr Varianten hatten, für die ein hoher (stop_lost, stop_gained, splice_acceptor_variant) und moderater (missense_variant) Einfluss

vorausgesagt wurde, als die bestrahlten Klone. Während für die Kontroll-Klone Varianten mit hoher und moderater Auswirkung 59 % bzw. 67 % der Gesamt-Varianten ausmachten, waren es für die bestrahlten Klone jeweils 43 %.

In den chromosomal stabilen Klonen konnten am häufigsten Missense-Mutationen (60 %) identifiziert werden, gefolgt von intronischen Varianten (21 %) (Abbildung 30). Für die instabilen Klone wurden ebenfalls primär intronische Varianten (37 %) und Missense-Mutationen (22 %) identifiziert.

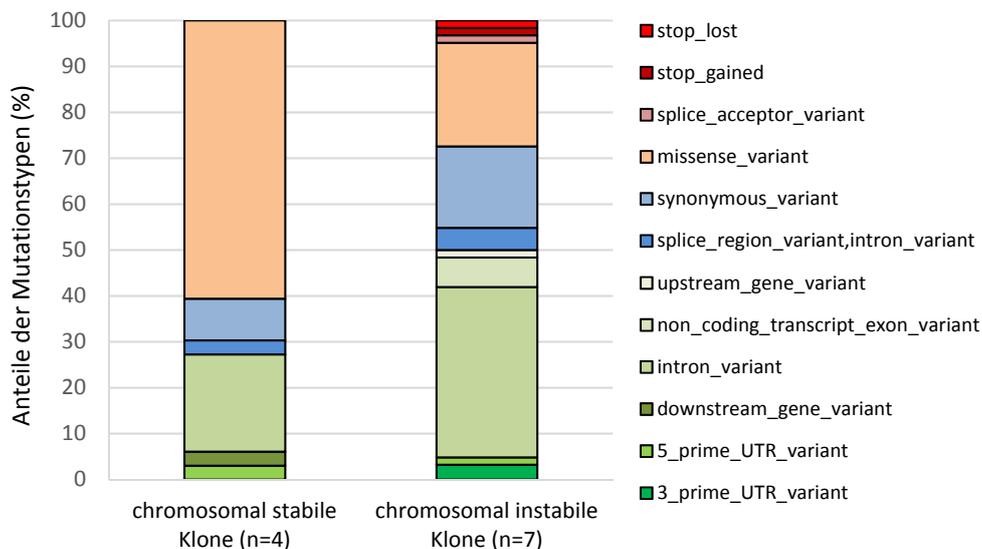


Abbildung 30: Prozentuale Anteile der Mutationstypen in chromosomal stabilen und chromosomal instabilen Klonen zusammengefasst für Experiment 1 und Experiment 2 basierend auf den Ergebnissen des WES. Die Klassifizierungen sind abhängig vom Ergebnis der Chromosomenbänderungsanalyse. Die Grafik wurde erstellt nach den Vorhersagen des Ensembl Variant Effect Predictors. Die unterschiedlichen Farben kodieren den Schweregrad der Auswirkung auf das Transkript: Rottöne: HIGH, orange: MODERATE, Blautöne: LOW, Grüntöne: MODIFIER. Abkürzungen: n: Anzahl der analysierten Klone; UTR: engl. *untranslated region*.

Das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen war in allen Gruppen zugunsten der Transversionen verschoben (Abbildung 31). Die Verschiebung war dabei deutlicher in den Klonen des ersten Experiments und innerhalb der Experimente stärker in den bestrahlten Klonen. Es konnte kein Substitutionstyp identifiziert werden, der ausschließlich in Kontrollen oder in bestrahlten Klonen vorkam. Signifikante Unterschiede bezüglich des Anteils der Transitionen und Transversionen zwischen bestrahlten Klonen und Kontrollen, sowie zwischen stabilen und instabilen Klonen fielen nicht auf (p-Werte zwischen 0,158 – 0,927, Mann-Whitney-U-test).

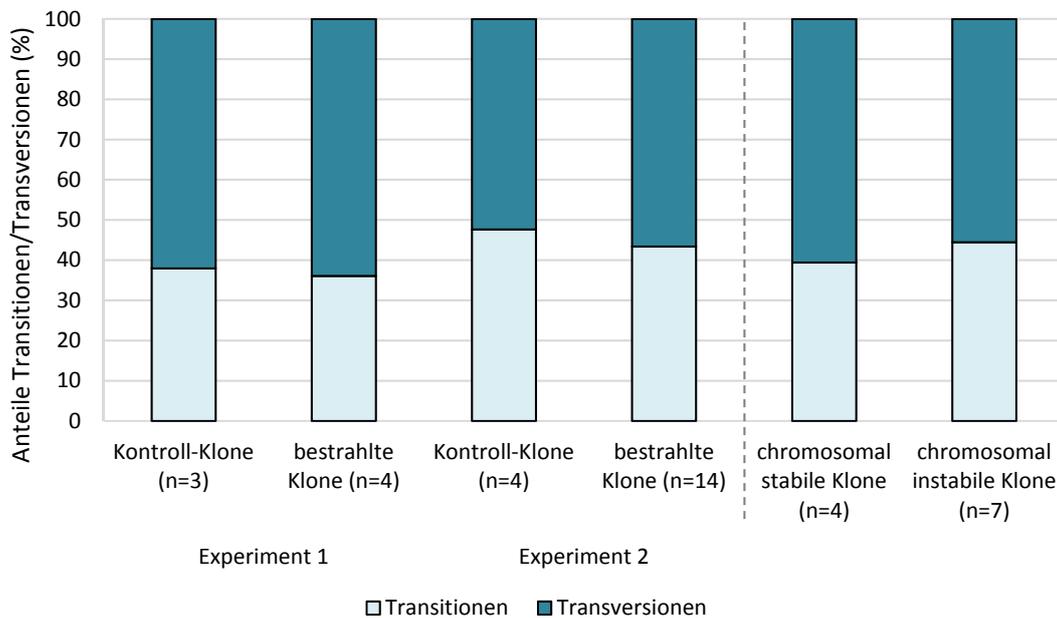


Abbildung 31: Prozentuale Anteile der Transitionen und Transversionen in den Kontroll-Klonen und bestrahlten Klonen basierend auf den Ergebnissen des WES. Die bestrahlten Klone wurden in Abhängigkeit von den Ergebnissen der Chromosomenbänderungsanalysen in stabil und instabil eingeteilt. Es wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede (p -Wert $< 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) festgestellt. Abkürzungen: n: Anzahl der analysierten Klone.

Es ist bekannt, dass die angrenzende Sequenz einer Mutation Auswirkungen auf die Mutationsrate haben kann und sollte daher bei der Analyse von Mutationen mit beachtet werden [181]. Unter Berücksichtigung der jeweils 5' und 3' zum Austausch gelegenen Base ergibt sich ein Profil aus 96 möglich mutierten Trinukleotiden, welches als Signatur bezeichnet wird. Die mathematische Analyse von Tausenden Exom- und Genomdaten verschiedener Krebsarten identifizierte 30 solcher Mutationssignaturen [182]. Ausgehend davon, dass jeder Mutationsprozess ein charakteristisches Muster im Genom hinterlässt, welches sich über spezifische Läsionen in der DNA definiert, konnte für einige der Signaturen auf die entsprechende Ursache zurück geschlossen werden [182, 183].

Die Visualisierung der Mutationsmuster ergab eine Anreicherung von C>A/G>T-Substitutionen für die bestrahlten Klone beider Experimente, sowie für die Kontroll-Klone des ersten Experiments (Abbildung 32). Unter Berücksichtigung der benachbarten Basen zeigte sich, dass bestimmte Mutationstypen spezifisch in bestrahlten bzw. in Kontroll-Klonen vorkamen. Die Kontroll-Klone des zweiten Experiments hatten eine Anreicherung von

T:A>C:G-Substitutionen im ApTpN-Kontext. Eine erhöhte Anzahl von C:G>A:T-Substitutionen an ApCpT Stellen konnte darüber hinaus in Kontrollen beider Experimente verzeichnet werden. Spezifisch für bestrahlte Klone hingegen waren C:G>A:T-Austausche in GpCpA Sequenzen, C:G>T>A-Substitutionen in ApCpA Sequenzen, sowie T:A>C:G in CpTpC und TpTpT Sequenzen. Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Mutationen konnte nur für C:G>T:A-Substitutionen im Vergleich zwischen bestrahlten Klonen und Kontroll-Klonen des zweiten Experiments verzeichnet werden ($p = 0,013$, Kolmogorov-Smirnov-test).

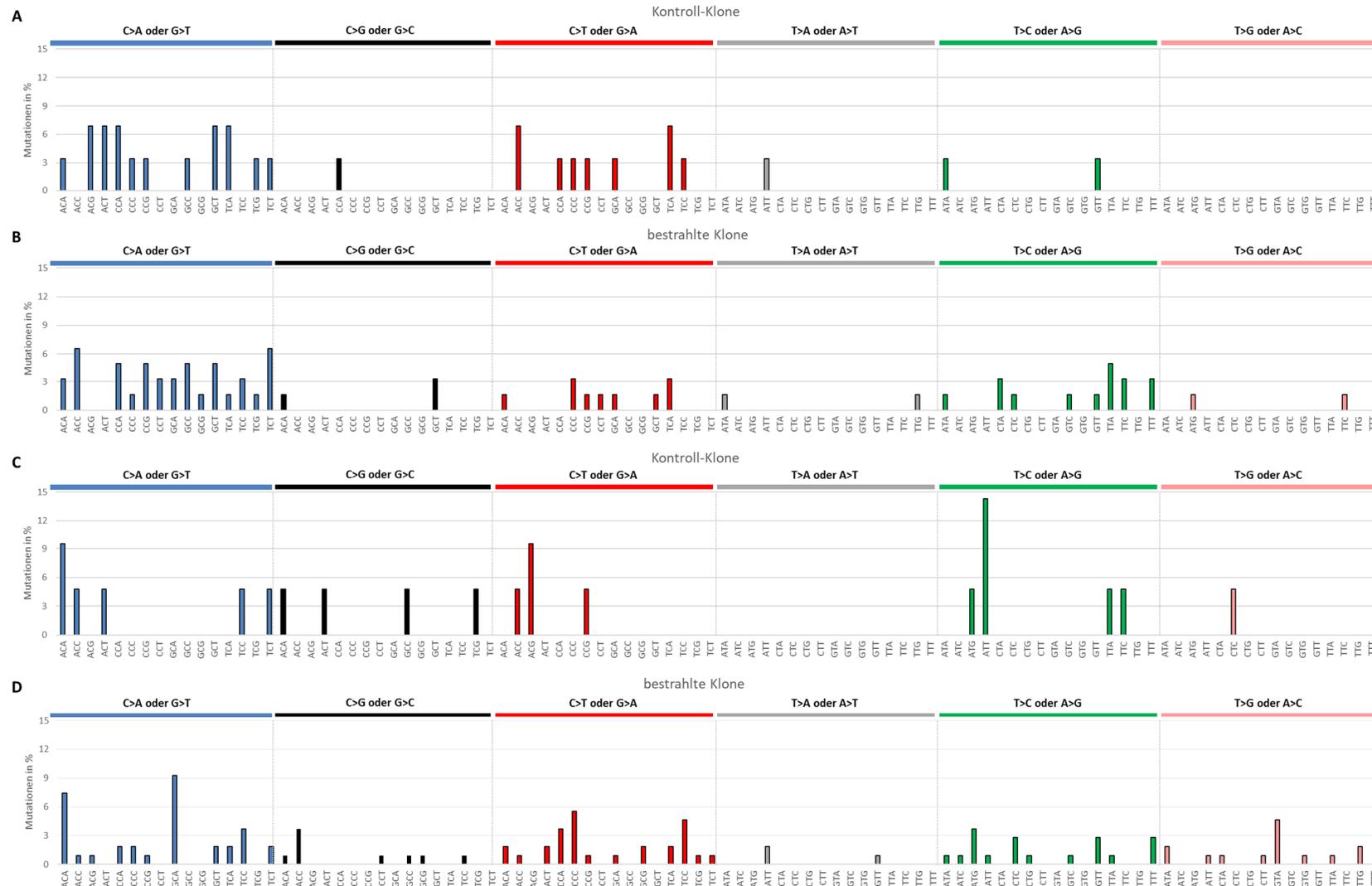


Abbildung 32: Mutationsprofile der Kontroll-Klone und bestrahlten Klone aus Experiment 1 (A+B) und Experiment 2 (C+D) basierend auf den WES-Ergebnissen. Durch Einschluss der jeweils rechts und links zum Austausch gelegenen Base ergibt sich ein Profil aus 96 möglich mutierten Trinukleotiden. Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung konnte für C:G>T:A-Substitutionen zwischen den bestrahlten Klonen und den Kontrollen des zweiten Experiments verzeichnet werden. Abkürzungen: DNA-Basen: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin.

Das Online Tool MuSiCa (Mutational Signatures in Cancer, Tabelle 6) wurde verwendet, um die Mutationsprofile der Klone mit bereits in der COSMIC (catalogue of somatic mutations in cancer, Tabelle 6)-Datenbank hinterlegten Signaturen von verschiedenen Tumoren zu vergleichen (Abbildung 33) [184]. Die Klone aller Gruppen hatten zu unterschiedlichen Anteilen Übereinstimmungen mit der Signatur 18, die häufig in Neuroblastomen, Brust- und Magenkrebs vorkommt. Die Kontroll-Klone des ersten Experiments charakterisierten sich darüber hinaus hauptsächlich durch die Signaturen 24 und 30, welche in Leber- und Brustkrebs beobachtet werden konnten. Die Kontroll-Klone des zweiten Experiments zeigten Ähnlichkeiten mit den Signaturen 10 und 16. Signatur 10 entspricht dem Mutationsprofil von mehreren Krebsarten und Signatur 16 konnte mit Leberkrebs assoziiert werden. Den höchsten Anteil am Mutationsprofil der bestrahlten Klone des ersten Experiments hatten die Signaturen 14 (Uteruskarzinom), 24 (Leberkrebs) und 12 (Leberkrebs) und am Profil der bestrahlten Klone des zweiten Experiments die Signaturen 5 (alle Krebsarten) und 29 (Krebs im Mund- und Rachenraum). Die Mutationsprofile der bestrahlten Klone beider Experimente hatten Ähnlichkeiten mit der Signatur 12, jedoch nur zu einem geringen Anteil.

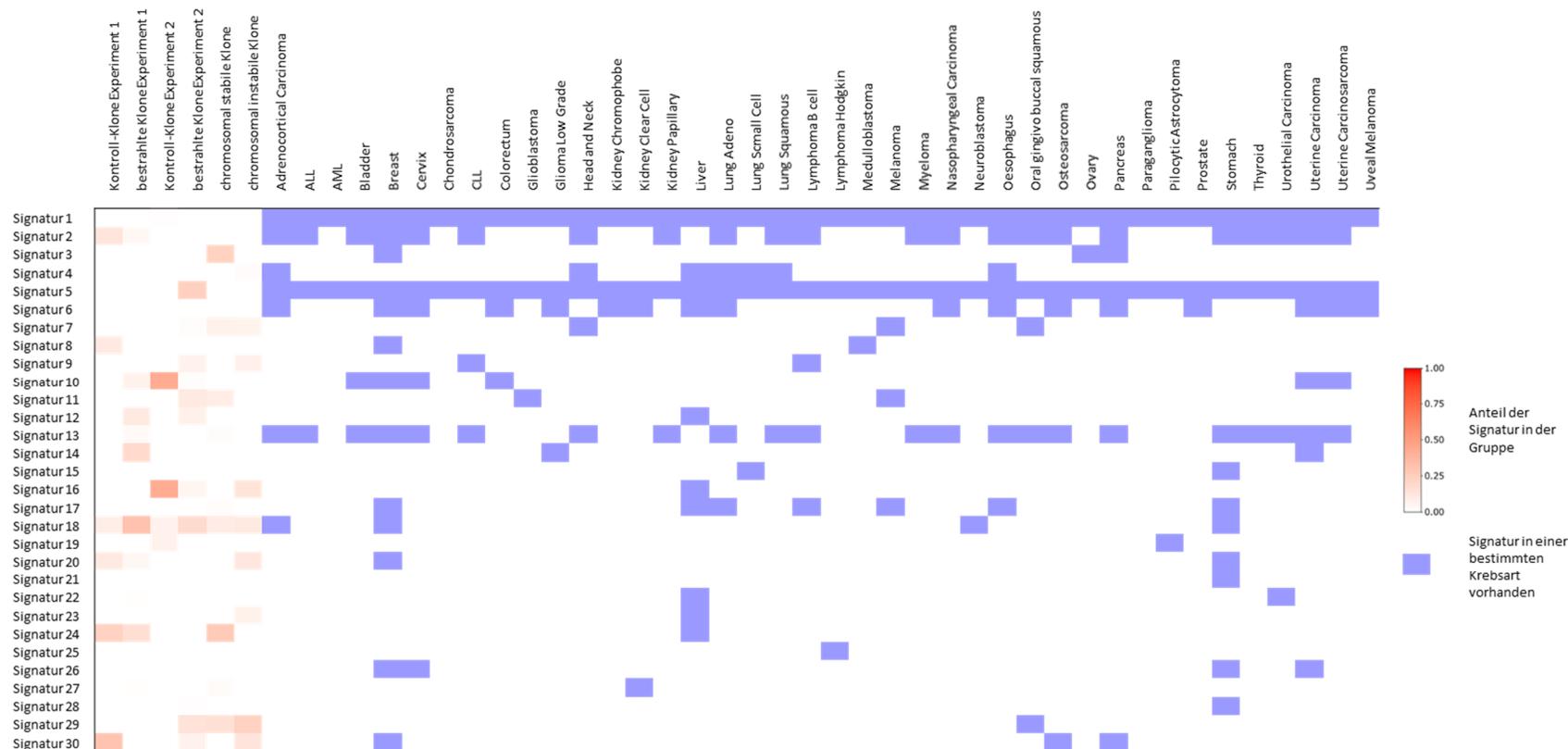


Abbildung 33: Vergleich der Mutationsprofile mit bekannten Signaturen und die damit in Verbindung stehenden Krebsarten. Die bestrahlten Klone wurden in Abhängigkeit von den Ergebnissen der Chromosomenbänderungsanalysen in stabil und instabil eingeteilt. Lila hinterlegte Felder markieren das Vorkommen einer bestimmten Signatur in einer Krebsart. Die Farbintensität (rötlich) spiegelt den Anteil einer bestimmten Signatur am Mutationsprofil einer Gruppe wider. Abkürzungen: ALL: Akute lymphatische Leukämie; AML: Akute myeloische Leukämie; CLL: Chronische lymphatische Leukämie (Abbildung erstellt abhängig von den Ergebnissen des WES mit MuSiCa [184]).

Die Verteilung aller Varianten nach chromosomaler Klassifizierungsgruppe ergab, dass Varianten der chromosomal stabilen Klone am häufigsten die Chromosomen 1 (19 %) und 7 (12,5 %) betrafen, während die Varianten instabiler Klone gleichmäßig über mehrere Chromosomen verteilt waren.

Insgesamt konnten den Varianten des ersten Experiments 78 Gene und den Varianten des zweiten Experiments 106 Gene zugeordnet werden. Es überlappte nur ein Gen (*SIMC1*) zwischen den beiden Genlisten. Rekurrente Varianten, das heißt Austausche, die in mehr als einem Klon auftreten, konnten für das erste Experiment nicht identifiziert werden. Im zweiten Experiment betrafen rekurrente Varianten die Gene *BPIFB3*, *CCL23*, *FAM183B*, *KIF5A*, *KLLN*, *NAE1*, *PTPRZ1*, *ROBO4*, *SDHAP3*, *SPTA1* und *TOM1L1*. Von den 78 betroffenen Genen des ersten Experiments waren vier Gene (*ATR*, *NSD1*, *PTCH1* und *RAP1GDS1*) in der COSMIC-Datenbank hinterlegt. Für die 106 betroffenen Gene des zweiten Experiments konnte ein Überlapp von fünf Genen (*ERCC4*, *FBXO11*, *FGFR10P*, *FAM131B* und *MSH6*) mit den in COSMIC gelisteten Genen identifiziert werden. Für beide Experimente betrafen die Gen-Überlappungen Klone aus verschiedenen Klassifizierungsgruppen.

Anreicherungsanalysen mit den von Varianten betroffenen Genen beider Bestrahlungsexperimente zeigten signifikante Anreicherungen von zwei KEGG-Signalwegen (Tabelle 25).

Tabelle 25: Signifikant angereicherte KEGG-Signalwege.

Term	Überlapp	p-Wert*	Gene	
„ECM-receptor interaction“	hsa04512	6/82	0,01	VWF; COL4A1; COL4A4; COL4A3; LAMA3; COL6A3
„Protein digestion and absorption“	hsa04974	6/90	0,01	DPP4; COL4A1; COL4A4; COL4A3; COL6A3; KCNN4

*FDR adjusted p-Wert; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Für den Vergleich zwischen chromosomal stabilen und chromosomal instabilen Klonen konnten weder signifikant angereicherte KEGG-Signalwege noch signifikant angereicherte GO-Terms identifiziert werden.

Zur Identifizierung von strahlensensitiven Regionen des Genoms wurden Bereiche gesucht, in denen mehrere Varianten clustern. Hierzu wurden die Varianten zunächst in genomische Intervalle eingeteilt, die sich an den zytopenetischen Banden der Chromosomen orientieren.

Die Positionen der Banden wurden dem UCSC Genombrowser (Tabelle 6) entnommen. Sofern mindestens zwei Varianten innerhalb einer zytogenetischen Bande lagen, wurden sie als Cluster eingestuft. Rekurrente Varianten wurden als ein Eintrag gezählt. Eine Anhäufung von Varianten konnte im langen Arm des Chromosoms 2 (2p36.3–37.3) identifiziert werden. Innerhalb eines Bereichs von 12 Mb befanden sich acht Varianten. Von den acht an dieser Stelle betroffenen Genen gehören drei zur Kollagen-Genfamilie (COL4A3, COL4A4, COL6A3). Neben diesem Cluster, konnten 17 weitere Regionen identifiziert werden, an denen mindestens zwei Varianten innerhalb einer Bande auftraten (Abbildung 35).

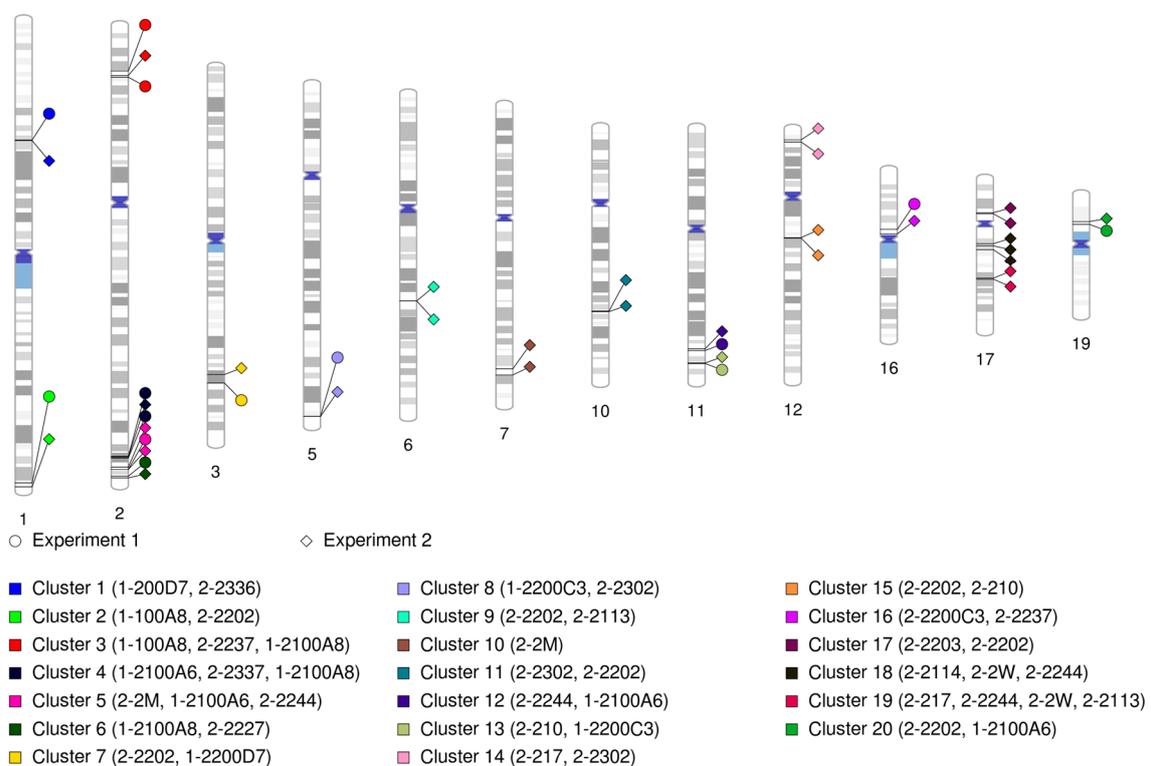


Abbildung 35: Variantencluster in bestrahlten Klonen. Die unterschiedlichen Formen kennzeichnen die beiden Experimente, jede Farbe steht für ein separates Cluster. Rekurrente Varianten wurden als ein Eintrag gezählt. Die Intervalle orientieren sich an den Positionen der zytogenetischen Banden. Chromosomen, in denen keine Variante detektiert wurde, sind nicht abgebildet.

Die Varianten, die in den Kontroll-Klonen identifiziert wurden, betrafen alle Chromosomen mit Ausnahme der Chromosomen 6, 18 und Y (Abbildung 36). In den Kontroll-Klonen des ersten Experiments war am häufigsten Chromosom 1 (17 %) betroffen, gefolgt von den Chromosomen 2 (14 %) und 7 (10 %). Varianten in den Kontroll-Klonen des zweiten Experiments betrafen primär die Chromosomen 1, 3, 5, 9, 12 und 19 mit jeweils 9,5 %.

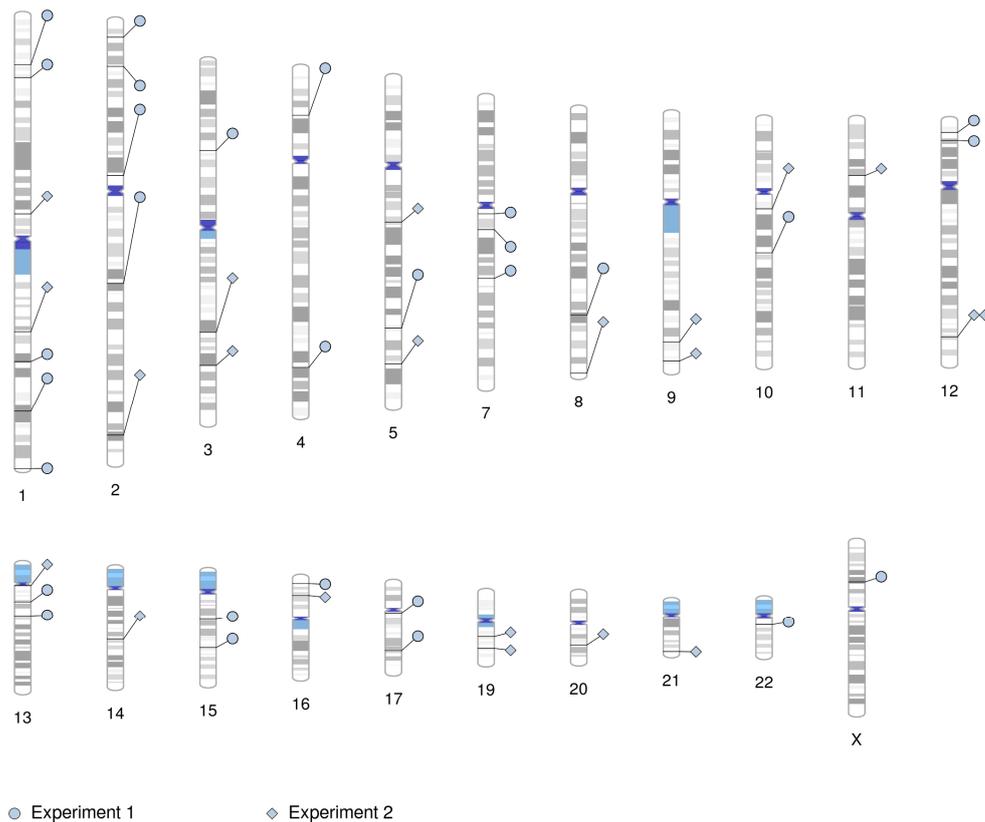


Abbildung 36: Chromosomale Verteilung von Varianten in den Kontroll-Klonen. Die unterschiedlichen Muster markieren die beiden Experimente. Chromosomen, in denen keine Variante detektiert wurde, sind nicht abgebildet.

Clusterregionen konnten für die Kontroll-Klone nicht identifiziert werden. Anreicherungsanalysen ergaben keine signifikant angereicherten KEGG-Signalwege oder GO-Terms. Insgesamt überlappten jedoch fünf Gene (*ARID1A*, *CSMD3*, *MYH11*, *NCOA1*, *WWTR1*) der Kontroll-Klone mit Genen aus der COSMIC-Datenbank.

3.4.2. Untersuchung von genomischen Veränderungen einzelner Nukleotide in Klonen mit veränderter Kopienzahl des Gens *FHIT*

Neben dem Vergleich zwischen bestrahlten und nicht bestrahlten Klonen, sowie zwischen stabilen und instabilen Klonen, diente das WES dem Vergleich zwischen drei Klonen mit veränderter CN des Gens *FHIT* (1-2200C3, 2-2P, 2-2110) und 15 Klonen ohne Veränderung der CN des Gens *FHIT*.

Die durchschnittliche Variantenzahl in den Klonen mit einer CNV im Gen *FHIT* war mit 10,7 Varianten etwas höher als die durchschnittliche Variantenzahl von 9,5 Varianten in den Klonen ohne CNV im Gen *FHIT* ($p = 0,824$, Mann-Whitney-U-test) (Abbildung 37).

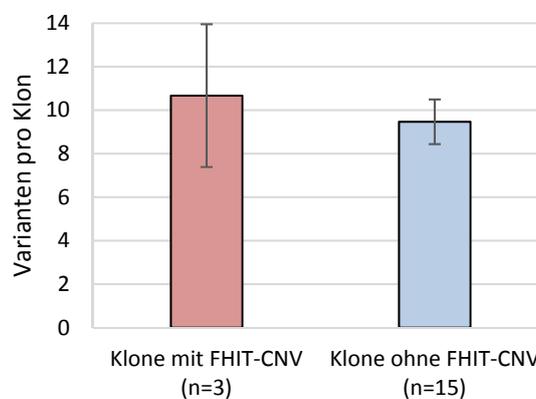


Abbildung 37: Durchschnittliche Variantenzahl in Klonen mit veränderter Kopienzahl des Gens *FHIT*, sowie in Klonen ohne *FHIT*-Veränderung. Die Daten basieren auf den WES-Ergebnissen. Veränderungen von *FHIT* wurden mit DNA-Mikroarrays oder MLPA festgestellt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Es wurde kein signifikanter Gruppenunterschied (p -Wert $< 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) festgestellt. Abkürzungen: *FHIT*: engl. *fragile histidine triad*; n: Anzahl analysierter Klone.

Sowohl für die Klone mit *FHIT*-Veränderung, als auch für die Klone ohne *FHIT*-Veränderung war das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen in Richtung der Transversionen verschoben (Abbildung 38). C>A/G>T-Substitutionen waren für beide Gruppen primär zu beobachten. Klone mit CNV in *FHIT* zeigten jedoch einen höheren Anteil (53 %) dieser Substitutionstypen als Klone ohne CNV in *FHIT* (37 %). Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte für keinen Substitutionstyp verzeichnet werden (p -Werte zwischen 0,130 – 0,912, Mann-Whitney-U-test).

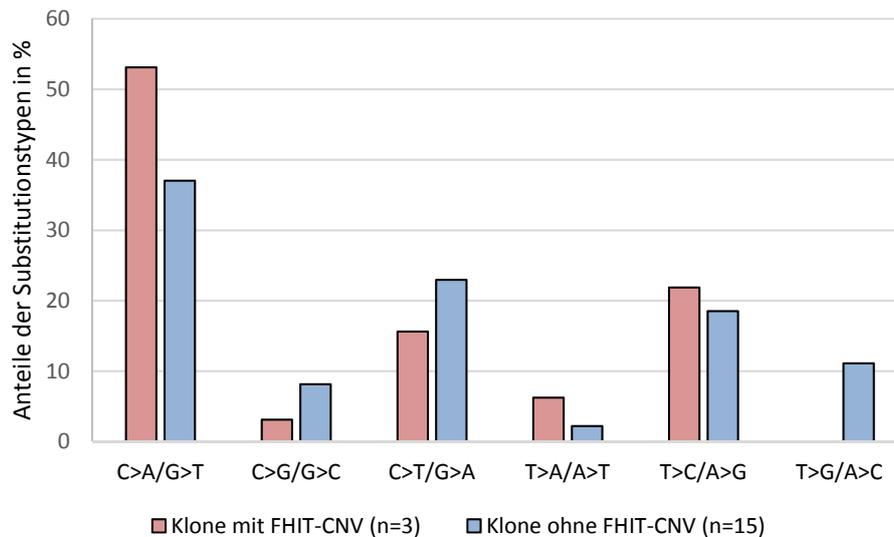


Abbildung 38: Prozentualer Anteil der sechs möglichen Substitutionstypen in Klonen mit CNV in *FHIT* und Klonen ohne CNV in *FHIT*. Die Daten basieren auf den WES-Ergebnissen. Die Veränderungen von *FHIT* wurden SNP-Arrays oder MLPA festgestellt. Es wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede (p -Wert $< 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) festgestellt. Abkürzungen: *FHIT*: engl. *fragile histidine triad*; n: Anzahl analysierter Klone.

Das Mutationsprofil der *FHIT*-Klone zeigte Übereinstimmungen mit den Signaturen 20, 24 und 2, die durch Anreicherungen der Substitutionstypen C>A/G>T, C>T/G>A und/oder T>C/A>G charakterisiert sind. Während Signatur 2 in allen Krebsarten zu finden ist, sind die Signaturen 20 und 24 spezifisch für Brust- und Magenkrebs, sowie für Leberkrebs (Abbildung 39).

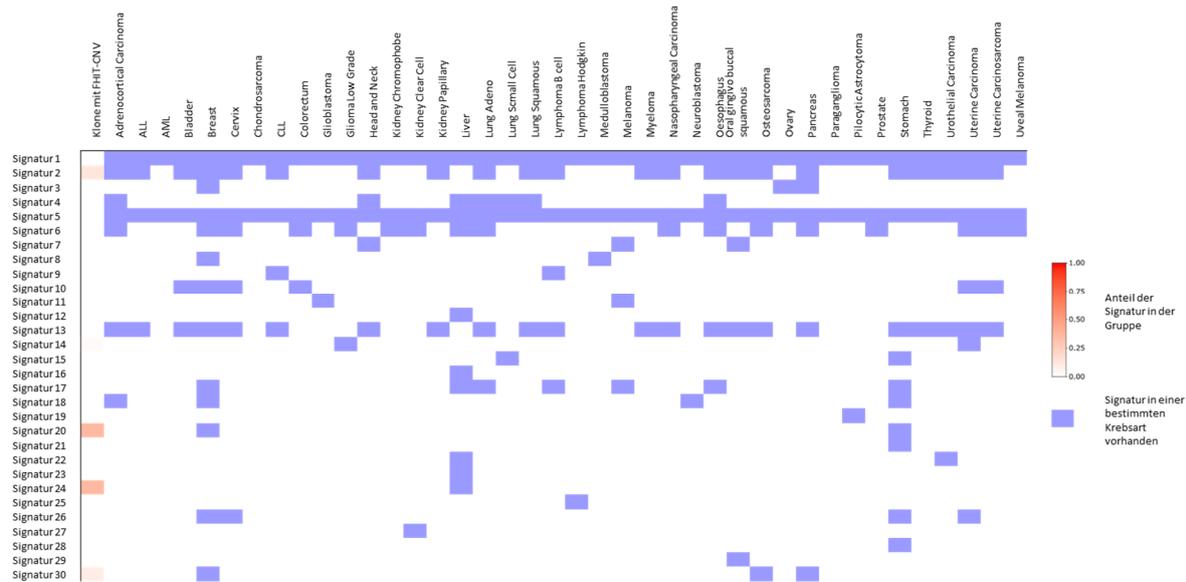


Abbildung 39: Vergleich der Mutationsprofile von Klonen mit Veränderung der Kopienzahl des Gens *FHIT* mit bekannten Signaturen und die damit in Verbindung stehenden Krebsarten. Lila hinterlegte Felder markieren das Vorkommen einer bestimmten Signatur in einer Krebsart. Die Farbtintensität (rötlich) spiegelt den Anteil einer bestimmten Signatur am Mutationsprofil der Gruppe wider. Abkürzungen: ALL: Akute lymphatische Leukämie; AML: Akute myeloische Leukämie; CLL: Chronische lymphatische Leukämie; *FHIT*: engl. fragile histidine triad. (Abbildung erstellt abhängig von den Ergebnissen des WES mit MuSiCa [184]).

Die Visualisierung der Variantenverteilung über die einzelnen Chromosomen zeigte, dass die beiden Klone mit CNV in *FHIT* aus dem zweiten Experiment (2-210 und 2-2P) verhältnismäßig viele rekurrente Varianten hatten (Abbildung 40). Diese konnten in den anderen Klonen des zweiten Experiments nicht detektiert werden. Die rekurrenten Varianten betrafen die Gene *SDHAP3*, *KLLN*, *ROBO4* und *KIF5A*. Es konnte weiterhin eine Region (11q24.2) identifiziert werden, in der alle drei Klone mit *FHIT*-Veränderung eine Punktmutation hatten. Betroffen waren in dieser Region die Gene *ROBO4* und *SLC37A2*.

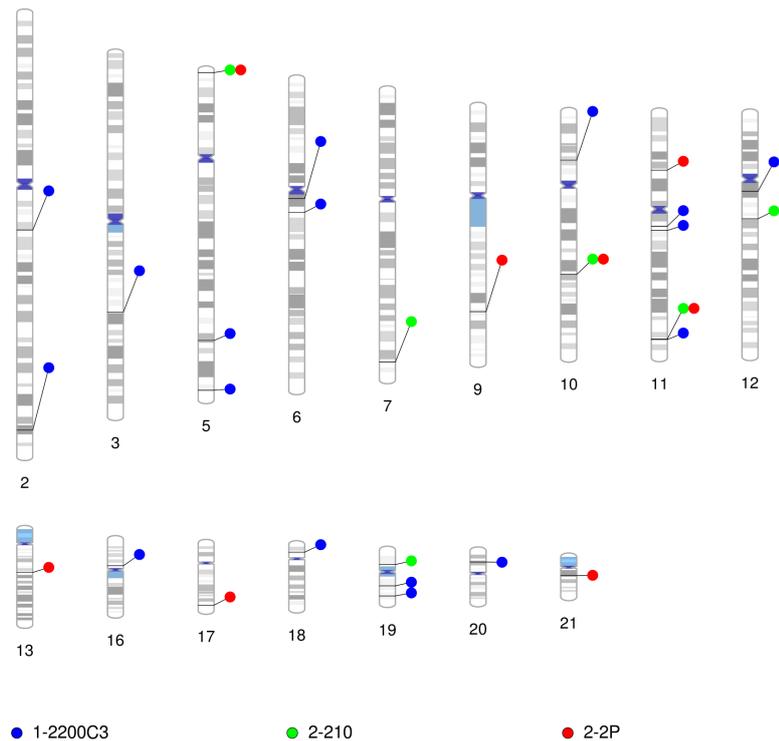


Abbildung 40: Chromosomale Verteilung der Varianten in Klonen mit veränderter *FHIT*-Kopienzahl. Die unterschiedlich farbkodierten Kreise markieren die drei Klone. Chromosomen, in denen keine Variante detektiert wurde, sind nicht abgebildet. Abkürzung: *FHIT*: engl. *fragile histidine triad*.

Eine Anreicherungsanalyse mit den mutierten Genen der *FHIT*-Klone als Eingabe ergab keine signifikant angereicherten KEGG-Signalwege oder Terms in den drei analysierten Ontologien.

3.5. Verlust des Y-Chromosoms nach Bestrahlung

3.5.1. Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Um den Effekt von Röntgenstrahlen auf die Entstehung von Aneuploidien des Y-Chromosoms tiefergehend zu analysieren, wurden zunächst FISH-Analysen an Interphasezellkernen bestrahlter Klone und nicht bestrahlter Kontroll-Klone durchgeführt, die zuvor nicht durch Chromosomenbänderungen untersucht wurden. Ausnahme bildeten zwei Klone (2-2M, 2-2113), für die bereits ein Verlust des Y-Chromosoms detektiert wurde und die daher als Positiv-Kontrollen eingebunden wurden. Da für den dritten Klon mit LOY (2-244) kein fixiertes Material mehr zur Verfügung stand, konnte keine FISH durchgeführt werden. Eine Übersicht der Anzahl der analysierten Klone ist in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Anzahl der mit FISH analysierten Klone.

		n
Experiment 1	Kontroll-Klone	17
	bestrahlte Klone	41
Experiment 2	Kontroll-Klone	15
	bestrahlte Klone	27

Aufgelistet ist die Anzahl (n) der mit FISH analysierten Klone. Abkürzung: FISH: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung.

Das verwendete Kit erlaubt die zuverlässige Detektion der Geschlechtschromosomen durch Einsatz spezifischer fluoreszenzmarkierter Sonden. Bei einem normalen, diploiden Chromosomensatz sollten bei der Visualisierung ein rotes Signal, welches das X-Chromosom kennzeichnet, sowie ein grünes Signal, welches das Y-Chromosom zeigt, sichtbar sein (Abbildung 41A). Jegliche Abweichung vom Normalzustand ist durch einen Signalverlust oder durch eine erhöhte Signalanzahl gekennzeichnet (Abbildung 41B-D).

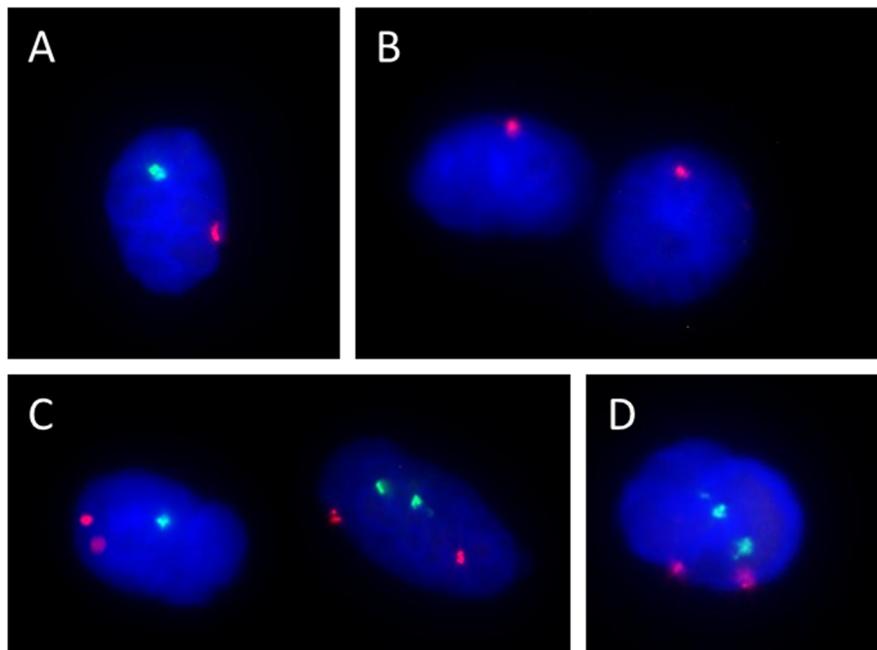


Abbildung 41: Repräsentative Bilder der FISH-Analyse von bestrahlten und nicht bestrahlten Klonen. (A) ein normaler, diploider Interphasekern kennzeichnet sich durch je ein Signal für das X-Chromosom und ein Signal für das Y-Chromosom aus. (B) der Verlust des Y-Chromosoms wird durch den Verlust des grünen Signals deutlich. (C) Mosaik aus einem Zellkern mit tetraploidem Chromosomensatz sowie einem Zellkern mit zwei Signalen für das X-Chromosom und einem Signal für das Y-Chromosom. (D) Zellkern mit tetraploidem Chromosomensatz.

Da in der G-Bänderungsanalyse kein Bestrahlungseffekt des X-Chromosoms aufgefallen war, wurde dieses Chromosom als Kontrolle angesehen. Pro Klon wurden 200 Interphasekerne

ausgezählt. Sollten mindestens 10 % der analysierten Zellen eine veränderte Chromosomenzahl zeigen, wurde der Effekt als signifikant betrachtet.

Der Verlust des Y-Chromosoms, der mittels G-Bänderung detektiert wurde, bestätigte sich in beiden Klonen (2-2M, 2-2113) durch FISH-Analysen. Ausgehend vom 10 %-Grenzwert konnte ein Verlust des Y-Chromosoms in zwei Klonen des ersten Experiments und in sechs weiteren Klonen des zweiten Experiments detektiert werden (Abbildung 41B). Der Anteil des Chromosomenverlustes lag zwischen 10,7 % und 100 % (Abbildung 42). Einer der bestrahlten Klone besaß neben Zellen mit je zwei Signalen für das X- und Y-Chromosom, welches einem tetraploiden Karyotyp entspricht, auch Zellen mit dem Karyotyp XXY (Abbildung 41C). Weiterhin war ein bestrahlter Klon ein Mosaik aus normalen und tetraploiden Zellkernen (Abbildung 41D). Ein Verlust des X-Chromosoms, sowie ein höherer Ploidiegrad wurden nicht verzeichnet.

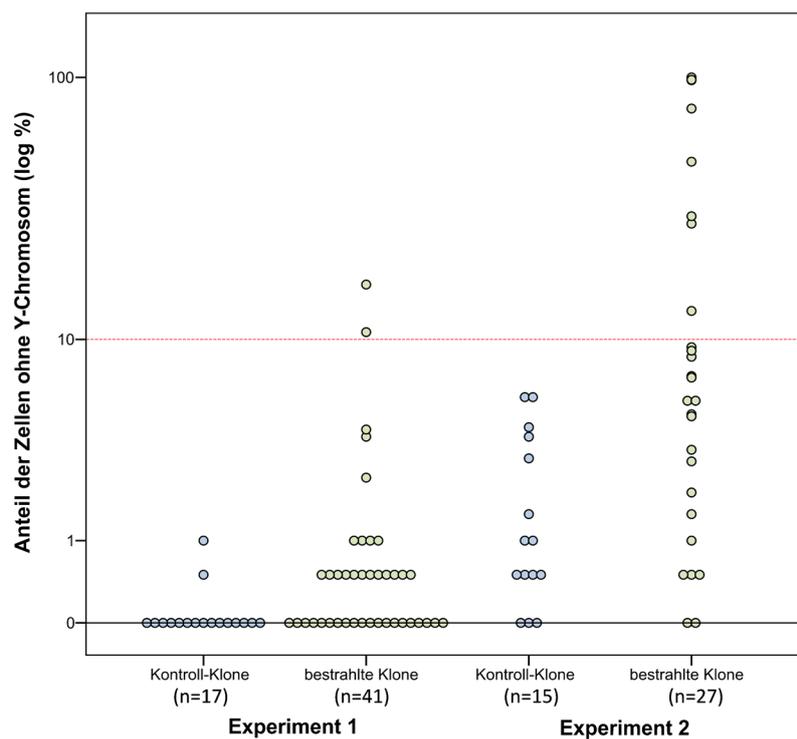


Abbildung 42: Anteil der Zellen ohne Y-Chromosom in bestrahlten Klonen und nicht bestrahlten Kontroll-Klonen ermittelt durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen. Die rote Linie markiert den Grenzwert von 10 %, bei dem der Effekt als signifikant angesehen wurde. Insgesamt konnte ein Verlust des Y-Chromosoms in über 10 % der analysierten Zellen in zwei bestrahlten Klonen des ersten Experiments und in acht Klonen des zweiten Experiments detektiert werden. Abkürzung: n: Anzahl analysierter Klone.

Keiner der analysierten Kontroll-Klone erreichte den zuvor festgelegten 10%-Grenzwert. Der Anteil der Zellen ohne Y-Chromosom war stets unter 6 %. Ein Verlust des X-Chromosoms in den Kontrollen konnte ebenfalls nicht beobachtet werden. Zwei Kontrollen waren ein Mosaik aus tetraploiden und normalen, diploiden Zellen. Zusätzlich hatten zwei Kontroll-Klone ausschließlich Zellen mit komplettem, tetraploiden Chromosomensatz. Zusammenfassend konnte ein Verlust des Y-Chromosoms in insgesamt zwei Klonen des ersten und in neun Klonen des zweiten Experiments beobachtet werden (Ergebnisse aus G-Bänderung und FISH). Die Anzahl der Klone mit Verlust des Y-Chromosoms war signifikant höher in den bestrahlten Klonen der zweiten Kultur, als in den entsprechenden Kontroll-Klonen ($p = 0,017$, Fisher exakt). In der ersten Kultur erreichte dieser Unterschied das Signifikanzniveau von $p = 0,05$ nicht ($p = 1,000$, Fisher exakt).

3.5.2. Molekulare Analyse der Klone mit Verlust des Y-Chromosoms

Von den drei durch G-Bänderung detektierten Klone mit LOY zeigten zwei Klone zusätzliche chromosomale Auffälligkeiten (2-244: 45, X/45,X,chtb(12), 2-2113: 45,X/45,X,chtb(2)(p23)/45,X, chb(5)(q11.1)/45,X,chtb(11)(q11.1)).

Der Verlust des Y-Chromosoms konnte zudem in der CNV-Analyse bestätigt werden (Abbildung 43). Auch der in der FISH aufgefallene Mosaikverlust des Y-Chromosoms (mLOY) in dem Klon 2-2244 konnte im CNV-Profil des Chromosoms detektiert werden.

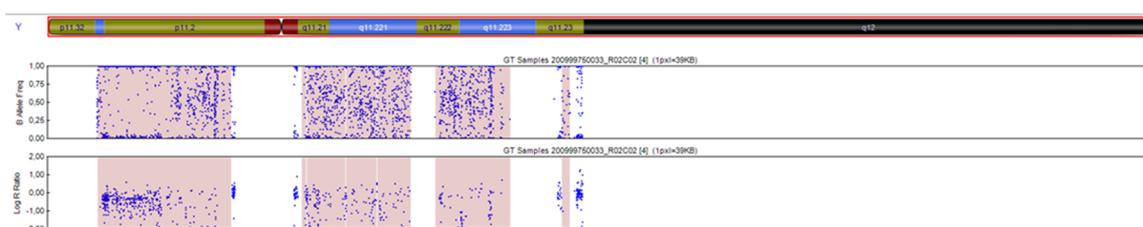


Abbildung 43: Ausschnitt aus dem Chromosomenbrowser der Software GenomeStudio. Dargestellt ist der Verlust des Y-Chromosoms, welcher sich im Array-Profil von drei Klonen bestätigte. Ein weiterer Klon zeigte einen Mosaikverlust des Y-Chromosoms (Repräsentative Darstellung für alle Klone mit Verlust des Y-Chromosoms).

Neben dem Verlust des Y-Chromosoms zeigten drei der vier mit dem SNP-Array analysierten Klone mit mLOY/LOY weitere Veränderungen in der CN (Tabelle 27). Es handelte sich ausschließlich um Deletionen. Diese betrafen die Chromosomen 1, 3 und 11.

Tabelle 27: Kopienzahlvariationen in Klonen mit Verlust des Y-Chromosoms.

Klon	Chr	Start ^a	Ende ^a	zytogenetische Bande	CN	Größe (bp)	Anzahl betroffener Gene	Gensymbol betroffener Gene*
2-2M	11	73783437	73917190	11q13.4	1	133754	2	C2CD3, PPME1
2-244	3	61253045	78803850	3p14.2-3p12.3	1	17550806	78	ADAMTS9, AER61, AK023371, AK025793, AK055831, AK094634, AK097190, AK124433, AK125532, AK307209
2-2244	1	9194614	9370911	1p36.23-1p36.22	1	176298	4	EF609116, MIR34A, H6PD, SPSB1

*Einträge der Gene auf zehn beschränkt, ^a chromosomale Position gemäß GRCh37 (hg19). Abkürzungen: bp: Basenpaar(e); Chr: Chromosom; CN: engl. *copy number*.

Zur Analyse der molekularen Ursache des Y-Chromosomenverlustes wurden die Exome von fünf Klonen mit mLOY/LOY (2-2113, 2-2202, 2-2227, 2-2244, 2-2M) sequenziert.

Die Klone mit Verlust des Y-Chromosoms hatten durchschnittlich 9 Varianten, während die Klone ohne Aneuploidie des Y-Chromosoms mit durchschnittlich 9,9 geringfügig mehr Varianten hatten ($p = 0,924$, Mann-Whitney-U-test) (Abbildung 44).

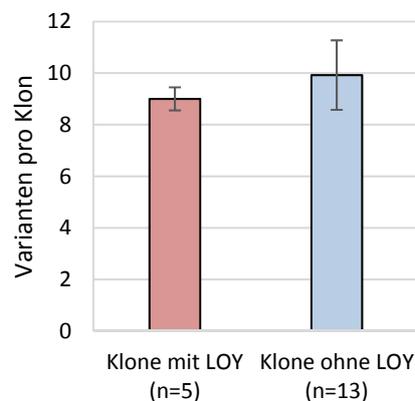


Abbildung 44: Durchschnittliche Variantenanzahl pro Klon in Klonen mit mLOY/LOY und Klonen ohne mLOY/LOY basierend auf den WES-Ergebnissen. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert \pm Standardfehler. Es wurden keine signifikanten Gruppenunterschiede (p -Wert $< 0,05$, Mann-Whitney-U-Test) festgestellt. Abkürzungen: LOY: engl. *loss of Y chromosome*, n: Anzahl der analysierten Klone.

Es konnte keine Variante identifiziert werden, die in mehreren Klonen mit mLOY/LOY auftrat. Unabhängig von der Variante war das Gen *FIG4* in zwei Klonen betroffen. Es kodiert für ein Protein, das zur Familie der „SAC domain-containing proteins“ gehört. Eine Literaturrecherche ergab jedoch keine Hinweise auf mögliche Zusammenhänge mit der Entstehung von Aneuploidien.

Obwohl einige der betroffenen Gene (*DCUN1D1*, *FGFR1OP*, *CD22*, *HK2*, *FBXO11*, *SRPK2*, *TRPM8*, *DOCK2*, *KSR2*) bereits mit der Krebsentstehung assoziiert werden konnten, zeigten Anreicherungsanalysen in dieser Hinsicht keine signifikant angereicherten KEGG-Signalweg oder GO-Term.

4. Diskussion

4.1. Chromosomale Instabilität in den klonalen Nachkommen bestrahlter Zellen

Jeder Mensch ist IR ausgesetzt. Sie befindet sich in der Luft, die wir atmen, in der Nahrung, die wir zu uns nehmen und in der Erde, auf der wir leben [93]. Zusätzlich zu den natürlich vorkommenden Quellen wird die Belastung durch künstliche, menschengemachte Strahlung erhöht [Internetquelle 18]. Besonders in der medizinischen Diagnostik und in der Tumorthherapie nimmt IR heute einen zentralen Stellenwert ein [185]. Neben der Chemotherapie, der Chirurgie und der Immuntherapie ist die Strahlentherapie eine der vier Hauptsäulen der onkologischen Therapie [186, 187]. Eine besonders bedeutende Herausforderung während der strahlentherapeutischen Behandlung von Krebserkrankungen, ist die Maximierung der Strahlendosis für die Krebszellen, ohne das umliegende, gesunde Gewebe nennenswert zu schädigen. Mittlerweile erlauben es hochauflösende bildgebende Verfahren und verbesserte Computertechnik zwar sehr gut zwischen Tumorgewebe und gesundem Gewebe zu unterscheiden, IR kann dennoch zu Veränderungen in den Zellen des Normalgewebes führen und so GI und Krebs auslösen [185]. Der Begriff GI wird verwendet, um einen Prozess zu beschreiben, bei dem sich zunehmend Veränderungen im Genom anhäufen [93, 125, 188]. RIGI kann verzögert in den klonalen Nachkommen von Zellen, die mehrere Zellzyklen vorher Strahlung ausgesetzt waren, beobachtet werden [74]. Die Instabilität wird dabei durch eine Vielzahl verschiedenster Endpunkte gemessen [93]. Die Entstehungsmechanismen von RIGI sind noch nicht abschließend geklärt und werden seit Jahrzehnten intensiv diskutiert. Nach der Entdeckung von RIGI Ende der 80er Jahre wurde berichtet, dass DNA-DSBs vorrangig an der Entstehung des Prozesses beteiligt sind [189]. Dies stützte sich auf die Beobachtung, dass verschiedene DNA-DSB-induzierende Substanzen GI auslösen [80, 190, 191]. Hinweise dazu, dass DSBs zwar nötig, aber nicht alleiniger Auslöser von RIGI sind, lieferten Experimente mit verschiedenen Restriktionsenzymen, die DSBs induzieren, aber nicht mit chromosomaler Instabilität oder anderen RIGI-Endpunkten einhergingen [190, 192]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Einbau des instabilen Radionuklids ¹²⁵Iod in Form von [¹²⁵Iod] IUdR, welches effizient in der Induktion von DSBs ist, nicht zur Entstehung chromosomaler Instabilität führte [193]. Einen bedeutenden Schritt auf diesem Gebiet machte die Gruppe um Bill Morgan und Charles Limoli mit der Etablierung von chromosomal stabilen und instabilen Subklonen aus der

GM10115-Hamster/Mensch-Hybridzelllinie, die so modifiziert wurde, dass sie ein einzelnes Humanchromosom 4 enthielt [78, 99]. Zur Herstellung der Subklone wurde die Zelllinie mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlung (0,1-10 Gy) bestrahlt, überlebende Einzelzellen expandiert und die Subklone hinsichtlich ihrer chromosomalen Stabilität untersucht [99]. Die so etablierten Klone dienten vielen Studien als Grundlage zur Erforschung von RIGI. Im Vergleich zu den Klonen, die von Limoli und seinen Kollegen etabliert wurden, besitzen die Klone, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstellt wurden, das komplette menschliche Genom, sodass der Strahleneffekt in allen Chromosomen analysiert werden kann. Von den verschiedenen Endpunkten, die RIGI charakterisieren, sind chromosomale Veränderungen am besten beschrieben und wurden daher verwendet, um RIGI nachzuweisen.

In beiden Experimenten konnten nach Bestrahlung, sowohl chromosomal stabile als auch chromosomal instabile Klone identifiziert werden. Ein stabiler Klon kennzeichnete sich dabei durch das Auftreten von ausschließlich normalen Metaphasen aus. In der direkt bestrahlten Zelle wurde entweder kein Schaden induziert oder der Schaden wurde effizient repariert. Zeigten Klone normale und auffällige Metaphasen als Mosaik, kann davon ausgegangen werden, dass in der direkt bestrahlten Zelle zunächst kein Schaden induziert wurde, die klonalen Nachkommen dieser Zelle jedoch chromosomal instabil sind. Viele instabile Klone zeigten dabei multiple aberrante Metaphasen. Ein ähnliches Bild ist auch in verschiedenen Tumoren zu beobachten, in denen sich die chromosomale Instabilität durch eine stetige Änderung des Karyotyps äußert [194, 195]. Neben den heterogenen Klonen wiesen einige Klone die gleiche Aberration in jeder analysierten Metaphase auf. In diesen Klonen ist der Schaden sehr früh nach Bestrahlung aufgetreten und an alle Tochterzellen weitergegeben worden.

Auch in den Kontroll-Klonen kam es zum Auftreten sporadischer Aberrationen, die auf Replikationsfehler während der Langzeitkultivierung zurückzuführen sind. Insgesamt zeigten aber deutlich mehr bestrahlte Klone chromosomale Auffälligkeiten, als nicht bestrahlte Kontrollen. Die beobachteten Häufigkeiten chromosomaler Instabilität (erstes Experiment: 6 % pro Gray, zweites Experiment: 5 % pro Gray, ausgehend von 1,62 bzw. 1,32 aberranten Metaphasen pro Klon bei 2 Gy und 13 analysierten Metaphasen pro Klon) waren vergleichbar mit den von Limoli und seinen Kollegen beschriebenen Werte. Analysen an der GM10115-Hamster/Mensch-Hybridzelllinie zeigten, dass GI mit einer Frequenz von 3 % pro Gray Röntgenstrahlung (Niedrig-LET-Strahlung) auftritt [99]. Diese Frequenz erhöhte sich auf

4 % nach Bestrahlung mit schweren Ionen (Hoch-LET-Strahlung) [91, 100]. Kadhim und seine Mitarbeiter analysierten die klonalen Nachkommen muriner hämatopoetischer Stammzellen nach Bestrahlung mit alpha-Partikeln und zählten karyotypische Auffälligkeiten in 40–60 % der Zellen [77]. Im Einklang mit diesen Ergebnissen beschrieben Sabatier und seine Kollegen, dass chromosomale Instabilitäten in über 50 % der analysierten Metaphasen humaner dermaler Fibroblasten nach Bestrahlung mit Schwerionen auftraten [101]. Die chromosomalen Veränderungen konnten dabei bis zur 25. Passage nach Bestrahlung detektiert werden [101]. Der Vergleich beider Experimente unserer Studie zeigte, dass mehr bestrahlte Klone des ersten Experiments chromosomal instabil waren als Klone des zweiten Experiments. Die Variabilität in der Entstehung chromosomaler Instabilitäten zwischen den beiden Kulturen ist auf den allgemeinen interindividuellen Unterschied in der Strahlensensitivität zurückzuführen [196, 197].

Der am häufigsten detektierte Aberrationstyp in den bestrahlten Klonen beider Experimente waren Chromatidbrüche. Es ist weitgehend anerkannt, dass Chromatidbrüche das Resultat unreparierter DSBs sind und daher nach Bestrahlung auftreten können [198-201]. Die Bestrahlung von Tumorzellen und Zellen von Patienten mit Krebsprädispositionssyndromen resultierte in einem erhöhten Anteil von Chromatidbrüchen im Vergleich zu normalen Zellen [202, 203]. Die Häufigkeit von Chromatidbrüchen nahm zudem in diesen Zellen mit der Zeit nach Bestrahlung zu, während Chromatidbrüche in normalen Zellen mit zunehmender Zeit weniger wurden [202, 203]. Das häufige Auftreten dieses Aberrationstyps in den beeinträchtigten Zellen wird als Resultat einer defizienten DNA-Reparatur angesehen [202, 203]. Neben Chromatidbrüchen wurden in den Klonen primär Chromosomenbrüche, Deletionen und Translokationen, sowie zusätzliches Material unbekannter Herkunft identifiziert. Letzterer Aberrationstyp kann ebenfalls das Resultat von Translokationsereignissen sein. Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich nach Bestrahlung von Lymphozyten und fetalen Fibroblasten [204, 205].

Im ersten Experiment waren Chromosomen der A-Gruppe am häufigsten in Chromosomenaberrationen involviert, während im zweiten Experiment Chromosomen verschiedener Gruppen beteiligt waren. Die Ergebnisse entsprechen den Beobachtungen aus vorherigen Studien, in denen die Chromosomen 1, 3, 5, 7 und 12 wiederholt betroffen waren [206-209]. Barrios und seine Kollegen zeigten, dass häufig diejenigen Chromosomen strahlensensitiv waren, welche auch in Tumoren aberrant sind und schlussfolgerten eine

mögliche Verbindung [207]. Die Autoren berichteten, dass die Beteiligung bestimmter Chromosomen an den strahleninduzierten strukturellen Veränderungen mit dem DNA-Gehalt zusammenhängen könnte [210, 211]. Bestätigt werden konnte dies jedoch in anderen Studien nicht [212, 213]. Die Gruppe um Cigarrán zeigte in ihrer Studie, dass kleine Chromosomen häufiger als erwartet und große Chromosomen weniger häufig als erwartet strukturell verändert waren. Eine mögliche Erklärung dafür sahen die Autoren in den Territorien der einzelnen Chromosomen im Nukleus [211].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass ähnlich zu den Subklonen von Limoli, in einem relativ stabilen Zelltyp RIGI ausgelöst wurde. Obwohl diese Subklone in den letzten 20 Jahren Ausgangspunkt zahlreicher Studien waren und so die verschiedensten Endpunkte gut charakterisiert werden konnten, bleiben die Mechanismen zur Entstehung von RIGI bislang ein Rätsel [214]. Basierend auf Studien, die zeigten, dass Veränderungen die DNA-Sequenz betreffend allein nicht zur Entstehung von RIGI führten, rückten epigenetische Mechanismen in den Vordergrund. Veränderungen in der DNA-Methylierung spielen eine wichtige Rolle in der Krebsentstehung und konnten bereits direkt nach Bestrahlung beobachtet werden [215-219]. Die Detektion von Methylierungsunterschieden zwischen chromosomal stabilen und instabilen Subklonen der GM11015 Zelllinie ergab jedoch keine mit RIGI assoziierten epigenetischen Veränderungen [220]. Auch die Analyse von Methylierungsmustern in den chromosomal stabilen und instabilen Klonen der vorliegenden Arbeit blieb ohne Erfolg [179]. Neben epigenetischen Regulationen wurde oxidativer Stress als potentieller biochemischer Mechanismus für die Einleitung und Aufrechterhaltung von RIGI diskutiert. Erste Anzeichen dafür beobachteten Clutton und seine Mitarbeiter bereits 1996 [221]. Erhöhte Level an oxidativem Stress und Hinweise für Schäden, die durch freie Radikale entstehen, konnten schließlich auch in den instabilen Subklonen von Limoli detektiert und so direkt mit RIGI assoziiert werden [107, 166]. Die Behandlung von Zellen mit Substanzen, die chronisch oxidativen Stress auslösen, führte ebenfalls zu chromosomalen Instabilitäten [222, 223]. Dem entgegen, reduzierte Sauerstoffmangel (2 % Sauerstoff) die Entstehung verzögerter strahleninduzierter Effekte, wie chromosomale Veränderungen, der Zelltod und die Bildung von Riesenzellen, im Vergleich zu normalen Sauerstoffbedingungen (20 %) [224]. Zusätzlich zu dem Problem, wie oxidativer Stress RIGI aufrechterhält, blieb die Frage nach der Quelle für ROS [214]. Untersuchungen des Membranpotentials zeigten, dass instabile Klone im Vergleich zu stabilen Klonen eine erhöhte Anzahl dysfunktionaler Mitochondrien hatten [107].

Mutationen in Genen, die für die Succinat-Dehydrogenase-Untereinheiten kodieren und an der mitochondrialen Elektronentransportkette beteiligt sind, lösten zudem oxidativen Stress und GI in Hamster-Fibroblasten aus [225]. ROS, dysfunktionale Mitochondrien und RIGI scheinen über chronische Entzündungsprozesse miteinander in Verbindung zu stehen. Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems führt dabei über die Freisetzung von Zytokinen und ROS zur Runterregulierung von DNA-Reparatur-Signalwegen und Zellzyklus-Checkpoints, wodurch GI ausgelöst wird [226]. Die Analyse von mRNA- und microRNA-Expressionsmustern in den GM10115-Subklonen ergaben eine Anreicherung von Signalwegen, die mit oxidativem Stress, Mitochondrien und zellulären Stoffwechselprozessen in Verbindung stehen [220]. Proteomanalysen zeigten zudem veränderte Level von Proteinen, die gegen oxidativen Stress und Apoptose schützen [167]. Die mitochondriale Dysfunktion manifestiert sich, sowohl auf Ebene veränderter Proteinlevel, als auch auf Expressionsebene, was darauf hindeutet, dass doch epigenetische Regulationen beteiligt sein könnten [167].

Zusammenfassend scheint es keinen allgemeingültigen Weg für die Entstehung von verzögerten Strahleneffekten zu geben, ein Zusammenspiel verschiedener zellulärer Prozesse ist daher naheliegend. Viele involvierte Komponenten sind vermutlich noch unentdeckt. Die Rolle von RIGI in der Krebsentstehung nach Bestrahlung, zeigt die Notwendigkeit diese Komponenten und Prozesse zu verstehen. Die in der vorliegenden Arbeit erstellten Klone sollten daher als Ausgangspunkt zur Identifizierung weiterer potentiell involvierter Faktoren und Mechanismen dienen. Anders als in vielen anderen Studien, welche RIGI untersuchen, handelte es sich in der vorliegenden Arbeit um nicht-immortalisierte, primäre Zellen, welche der *in vivo* Situation näherkommen als etablierte Zelllinien. Sie besitzen das komplette menschliche Genom mit intakten Zellzyklus-Checkpoints und DNA-Reparaturmechanismen. Die Klone eines Spenders haben das gleiche biologische Alter, sodass strikt zwischen dem Strahleneffekt und dem zellkultivierungsbedingten Alterungseffekt unterschieden werden kann. Darüber hinaus haben die Klone den gleichen genetischen Hintergrund, sodass zahlreiche Störfaktoren, die normalerweise beachtet werden müssen, ausgeschlossen werden können.

4.2. Verlust des Y-Chromosoms als Marker für RIGI und Krebs

Neben strukturellen Aberrationen zeigten einige Klone numerische Veränderungen, die sich ausschließlich auf das Y-Chromosom beschränkten. Aneuploidien stellen eine Untergruppe chromosomaler Aberrationen dar. Ergebnisse aus verschiedenen Studien deuten an, dass IR zu Veränderungen in der Chromosomenzahl führen kann [72, 227, 228]. Von primärem Studieninteresse waren dabei die Chromosomen 1 und 4, da diese als besonders strahlensensitiv gelten [207, 211, 212]. Angesichts dieser Tatsache untersuchten Cho und seine Kollegen den Effekt von Röntgenstrahlung auf die verzögerte Entstehung von numerischen Chromosomenaberrationen in normalen humanen Fibroblasten [229]. Die Zellen wurden mit 20, 50 und 100 cGy bestrahlt und die Chromosomen 1 und 4 zu verschiedenen Zeitpunkten unter Verwendung des Mikronukleustests analysiert. Die Aneuploidierate beider Chromosomen stieg mit zunehmender Strahlendosis an. Ein signifikantes Ergebnis wurde jedoch nur beim Vergleich der Zeitpunkte 28 Stunden und 240 Stunden nach Bestrahlung mit 100 cGy in Bezug auf Chromosom 1 erzielt. Im Vergleich zu den Daten der vorliegenden Arbeit sind die Aneuploidieraten von Cho sehr gering. Von 1000 ausgezählten binukleären Zellen war mit nur 12 aneuploiden Zellen der höchste Wert unter der Bedingung 100 cGy, 240 Stunden erreicht. In der vorliegenden Arbeit ergab die G-Bänderungsanalyse einen Verlust des Y-Chromosoms in allen analysierten Metaphasen von drei bestrahlten Klonen des zweiten Experiments. Im Vergleich dazu konnte weder ein Verlust des X-Chromosoms, noch der Verlust eines Autosoms detektiert werden. Um eine mögliche Verbindung zwischen dem Verlust des Y-Chromosoms und der Strahlenexposition zu prüfen, wurden Interphase FISH-Analysen an zusätzlichen Klonen beider Kulturen durchgeführt. Die Untersuchung ergab, dass das Y-Chromosom in zwei bestrahlten Klonen des ersten Experiments und sechs bestrahlten Klonen des zweiten Experiments verloren war. Keiner der analysierten Kontroll-Klone erreichte den Grenzwert von 10 % Y-Chromosomenverlust. Der Grad des Chromosomenverlustes in den bestrahlten Klonen variierte zwischen 11 % und 100 %. Der Unterschied im Grad des Mosaiks deutet darauf hin, dass Aneuploidien des Y-Chromosom direkt nach Bestrahlung (in zwei Klonen), häufiger aber verzögert (in neun Klonen) nach der Strahlenexposition auftreten können. Unter diesem Gesichtspunkt könnte der Verlust des Y-Chromosoms ein neuer Endpunkt für RIGI sein.

Das Y-Chromosom ist das kleinste menschliche Chromosom und wurde lange abfällig als genetische Wüste beschrieben [230]. Es besteht zu 50 % aus repetitiven Sequenzen und besitzt im Vergleich zu anderen Chromosomen relativ wenig proteinkodierende Gene [231]. Der Großteil des Y-Chromosoms (etwa 95 %) besteht aus der *male-specific region of Y chromosome* (MSY), eine Region, die auf beiden Seiten durch pseudoautosomale Regionen (PARs) flankiert ist [232]. Im Vergleich zur MSY sind die PARs Crossing-over fähig. Neben der Geschlechtsdeterminierung und der Spermatogenese wurde dem Y-Chromosom lange Zeit keine zentrale Funktion zugeschrieben [231]. Diese Sichtweise änderte sich jedoch mit der Entdeckung, dass mehr als die Hälfte der aktiven Gene auf dem Y-Chromosom auch in Geweben außerhalb der Gonaden exprimiert werden [230].

Schon seit einigen Jahrzehnten ist bekannt, dass Männer mit zunehmendem Alter ihr Y-Chromosom verlieren können [233, 234]. mLOY stellt dabei eine der am häufigsten auftretenden chromosomalen Veränderung in den Blutzellen von Männern dar [235-238]. Da die klinische Bedeutsamkeit dieses Verlustes lange unklar war, wurde angenommen, dass mLOY phänotypisch neutral ist und mit dem normalen Alterungsprozess einhergeht [235, 239]. Aktuellere Studien deuten jedoch an, dass der Verlust des Y-Chromosoms mit einer Vielzahl von Risikofaktoren und komplexen Erkrankungen assoziiert ist. Die Analyse von 6.014 Männern aus drei unabhängigen Kohorten zeigte, dass Raucher ein 4-fach erhöhtes Risiko hatten ihr Y-Chromosom in Blutzellen zu verlieren und dieser Effekt zudem dosisabhängig war [236]. Die Autoren stellten jedoch auch fest, dass ehemalige Raucher ein im Durchschnitt ähnliches mLOY-Level hatten wie Nichtraucher. Sie schlussfolgerten daraus, dass mLOY ein dynamischer und rückgängiger Prozess ist. Neben dem Rauchen konnte eine besonders starke Assoziation zwischen dem Verlust des Y-Chromosoms und einem erhöhten Risiko an Alzheimer zu erkranken beobachtet werden [237]. Es wird außerdem angenommen, dass der Verlust des Y-Chromosoms bei der Entstehung seltener Autoimmunerkrankungen, wie Autoimmunthyreopathien und der primär biliären Zirrhose, beteiligt ist [240, 241].

Von zentraler Bedeutsamkeit scheint das Y-Chromosom auch bei der Krebsentstehung bei Männern zu sein, was aus der Vielzahl hoch publizierter Studien der letzten Jahre hervorgeht. Bereits in einem 2014 erschienenen Artikel beschrieb die Gruppe um Forsberg eine erhöhte Sterblichkeitsrate unter Männern, bei denen das Y-Chromosom in Blutzellen verloren war. Männer mit mLOY starben dabei im Durchschnitt 5,5 Jahre früher als Männer ohne mLOY. Die Wissenschaftler beobachteten weiterhin, dass Männer mit mLOY ein erhöhtes

Krebsdiagnoserisiko hatten, sowie ein erhöhtes Risiko an nicht-hämatologischem Krebs zu sterben [235]. Insgesamt war das Spektrum der Krebsarten zwischen den beiden untersuchten Gruppen gleich. Die Verbindung zwischen mLOY/LOY und einem erhöhten Krebsrisiko konnte durch Studien an Patienten mit Prostatakrebs, Blasenkrebs und Darmkrebs von anderen Gruppen bestätigt werden [238, 242]. Die Autoren vermuten, dass das erhöhte Krebsrisiko durch einen Defekt in der Immunabwehr, der mit dem Verlust des Y-Chromosoms einhergeht, zusammenhängt [235-237, 239, 243]. Die Unterdrückung des Tumorwachstums ist eine zentrale Funktion des Immunsystems, die bei einem Defekt gestört sein könnte. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass Patienten, die mit Immunsuppressiva behandelt wurden, ein erhöhtes Krebsrisiko haben [244]. Weiterhin wird spekuliert, dass der Verlust des Y-Chromosoms neben den Blutzellen auch andere Gewebe betrifft und so die Entartung von Zellen außerhalb des hämatopoetischen Systems stimuliert wird [235]. Die mögliche Rolle des Y-Chromosoms in der Tumorunterdrückung wird durch zahlreiche Studien aufgegriffen. Männer mit Azoospermie haben ein erhöhtes Krebsrisiko [245]. Darüber hinaus ist das Y-Chromosom in einer Vielzahl verschiedener Tumorarten deletiert [Internetquelle 19]. Besonders Prostatakrebs und Brustkrebs sind hier zu nennen [246-248]. Die Analyse zweier unabhängiger Kohorten männlicher Brustkrebspatienten ergab eine LOY-Frequenz von 16 % in Tumorzellen [248]. Das Y-chromosomale Gen *TMSB4Y* wurde im Zuge dessen als Kandidat für einen Tumorsuppressor identifiziert [248]. *TMSB4Y* interagiert direkt mit β -Aktin, dem Hauptbestandteil des Zytoskeletts und Modulator im Zellzyklus [249, 250]. Wissenschaftler zeigten außerdem, dass das Brustkrebsrisiko von Frauen durch männliche Zellen um bis zu einem Drittel gesenkt werden kann [251]. Die Funktion des Y-Chromosoms als Tumorsuppressor bestätigte sich durch die Beobachtung, dass der Transfer des Y-Chromosoms in eine humane Prostatakrebszelllinie, der das Y-Chromosom fehlte, die Tumorentstehung in athymischen Mäusen unterdrückte [252].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass alle Klone mit mLOY/LOY und vorhandenen Chromosomen-, bzw. CNV-Daten zusätzliche Anzeichen eines instabilen Genoms haben. Diese Beobachtungen unterstützen die Hypothese, dass LOY ein neuer Endpunkt für RIGI sein könnte. Der Verlust des Y-Chromosoms könnte bei der strahlenbedingten Tumorentstehung relevant sein.

Aberrationen des Y-Chromosoms im Zusammenhang mit Strahlung beschrieben auch Premi und seine Kollegen [253]. Die Autoren untersuchten das Y-Chromosom von 390 Männern des

süindischen Staats Kerala, in dem die natürliche Hintergrundstrahlung 10-mal höher ist als der weltweite Durchschnitt [253]. Die Strahleneinwirkung führte zu einem erhöhten Level an Mikrodeletionen und Mikroduplikationen Y-chromosomaler Gene in der Region des Azoospermie-Faktors [253].

Die molekulare Ursache des Y-Chromosomenverlustes ist noch nicht vollständig geklärt. Die Aufrechterhaltung des diploiden Karyotyps benötigt eine ordnungsgemäße Segregation der Chromosomen [254]. Die dafür zuständige Maschinerie ist nicht fehlerfrei und Defekte in beteiligten Strukturen können zu Aneuploidien führen [254]. Zu den potentiellen Angriffspunkten gehören das Zentrosom, der SAC, sowie die Bindung zwischen Spindelmikrotubuli und Kinetochor [254, 255]. Sowohl in Zellkulturen, als auch in Tumorproben konnten Chromosomen beobachtet werden, die auch nach dem Einsetzen der Anaphase in der Äquatorialebene zurückbleiben (Abbildung 45) [70-72]. Ein überaktivierter SAC konnte damit verbunden in Tumorzellen beobachtet werden. Dieser führt zu einer verlängerten Mitose und dazu, dass das Kinetochor einzelner Schwesterchromatide nicht wie normalerweise mit Kinetochor-Mikrotubuli eines Pols, sondern mit Kinetochor-Mikrotubuli von gegenüberliegenden Polen verbunden ist, wodurch Aneuploidien entstehen [70]. Viele Schlüsselkomponenten des SACs sind Zielstrukturen des Rb-Tumorsuppressor-Signalwegs und daher in den meisten Tumoren runterreguliert [73]. Experimente belegen, dass auch die Einwirkung von IR zu in der Äquatorialebene zurückbleibenden Chromosomen führt [69].

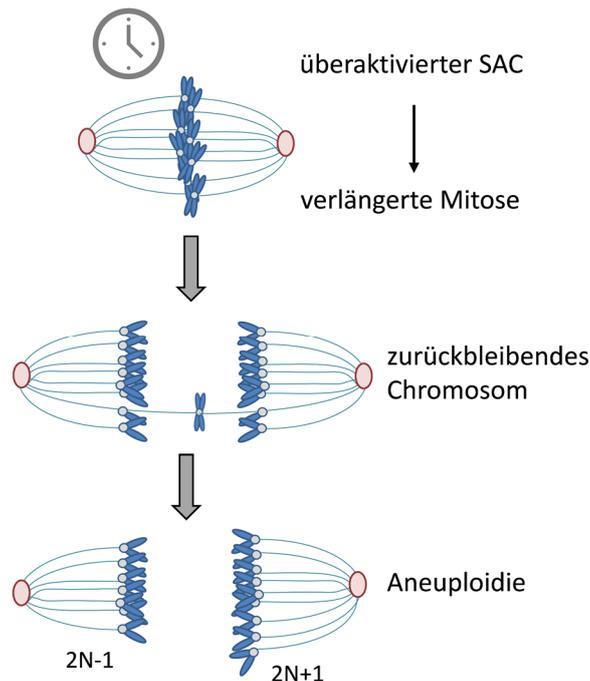


Abbildung 45: Schematische Darstellung zur Entstehung von Aneuploidien durch einen überaktivierten SAC. Die Überaktivierung des Checkpoints kann zu einer verlängerten Mitose und dadurch zu Chromosomen, die auch nach dem Einsetzen der Anaphase in der Äquatorialebene zurückbleiben, führen. Aneuploide Chromosomensätze sind die Folge. Abkürzung: 2N: zweifacher Chromosomensatz; SAC: engl. *spindle assembly checkpoint* (Abbildung erstellt nach [73]).

Um zu analysieren, ob der strahleninduzierte Verlust des Y-Chromosoms mit Mutationen in Genen assoziiert ist, welche die fehlerfreie Chromosomensegregation gewährleisten, wurden fünf Klone mit mLOY/LOY durch WES analysiert. Die durchschnittliche Variantenzahl war in Klonen mit Y-Chromosomenverlust nicht höher als in den Klonen ohne mLOY/LOY. Darüber hinaus ergab die Analyse der Gene, die in den mLOY/LOY-Klonen von Varianten betroffen waren, keine signifikante Anreicherung in bestimmten KEGG-Signalwegen oder GO-Terms. Die Ergebnisse deuten dennoch darauf hin, dass der strahleninduzierte Verlust des Y-Chromosoms in einzelnen Klonen durch Varianten in Genen, die bei der Entstehung von Aneuploidien beteiligt sind, hervorgerufen wird. So betrafen SNVs im Klon 2-2113 unter anderem die Gene *CHTF18* und *FGFR10P*. *CHTF18* ist als Teil des Replikationsfaktors C an der Beladung des Proliferating-Cell-Nuclear-Antigens auf die DNA im Rahmen der Replikation zuständig. Verluste von *CTF18* in Hefen resultierten in ineffizienter Herstellung der Schwesterchromatid-Kohäsion, genomischer Instabilität und Aneuploidie [256, 257]. Störungen des Gens führten außerdem zu Defekten in der meiotischen Rekombination in männlichen Mäusen und zur verzögerten Reparatur von DSBs während des Crossing-overs

[258]. Das Genprodukt von *FGFR1OP* spielt eine entscheidende Rolle bei der Verankerung der Mikrotubuli an den Zentrosomen. Es wäre daher denkbar, dass auch Mutationen in diesem Gen zu Aneuploidien führen [259]. Es konnte außerdem eine Variante im Gen *TUBGCP4* im Klon 2-2244 detektiert werden. Das Gen kodiert für eine Komponente des γ -Tubulin-Ringkomplexes. Dieser ist für die Bildung und Regulation von Mikrotubuli nötig. Reduzierte Level des Ringkomplexes resultierten in einer veränderten Mikrotubuli-Organisation, einer abnormalen Kernform, sowie in Aneuploidien in Fibroblasten [260]. Die beschriebenen Gene sind direkt oder indirekt an der fehlerfreien Segregation der Chromosomen beteiligt und könnten an dem Verlust des Y-Chromosoms beteiligt sein. Da zentrale Störungen der Mitose jedoch alle Chromosomen betreffen müssten, sind vermutlich noch weitere Mechanismen involviert. Inwiefern die anderen identifizierten Gene ebenfalls den Verlust des Y-Chromosoms fördern ist weniger eindeutig. Einigen der von Varianten betroffenen Gene (*DCUN1D1*, *FGFR1OP*, *CD22*, *HK2*, *FBXO11*, *SRPK2*, *TRPM8*, *DOCK2*, *KSR2*) wird eine Rolle in der Tumorentstehung zugesprochen, welches auf eine mögliche Rolle zwischen dem Verlust des Y-Chromosoms und Krebs hinweist [261-269].

Zur Identifizierung genetischer Signaturen von mLOY analysierte die Gruppe um Wright Array- und Sequenzier-Daten von etwa 85.000 Männer verschiedener Kohorten [270]. Die Autoren fanden insgesamt 19 genomische Loci, die mit mLOY assoziiert sind. Anreicherungsanalysen zeigten eine signifikante Anreicherung für den KEGG-Signalweg „Apoptose“. Viele der identifizierten Gene spielen eine entscheidende Rolle beim Zellzyklus, in der Krebsentstehung oder sind mit genomischer Instabilität assoziiert. Ein Vergleich der von Wright und seinen Kollegen identifizierten Varianten, mit den Varianten der mLOY/LOY-Klone in der vorliegenden Arbeit, zeigte eine Übereinstimmung des SNPs rs1122138 das Gen *TCL1A* betreffend. Neben den mLOY/LOY-Klonen tauchte dieser SNP allerdings auch in allen anderen sequenzierten Klonen der zweiten Kultur, sowie in der Massenkultur auf. Der SNP ist nicht durch Strahlung induziert, sondern bereits in der Primärkultur vorhanden. In der oben genannten Studie zeigte dieser SNP die signifikanteste Assoziation mit mLOY [270]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die zweite Kultur eine Prädisposition für den Verlust des Y-Chromosoms hat. Der Verlust des Y-Chromosoms in den Klonen könnte daher primär durch die Alterung in Zellkultur entstanden sein. Obwohl der LOY-Effekt in der zweiten Kultur sicherlich mit der SNP-induzierten Prädisposition zusammenhängt, scheint die Bestrahlung einen nicht zu unterschätzenden Einfluss zu haben. Kein analysierter Kontroll-Klon erreichte

den Grenzwert von 10 % LOY. Darüber hinaus war ein Verlust des Y-Chromosoms auch in zwei bestrahlten Klonen der ersten Kultur zu beobachten ohne, dass ein bekannter, mit LOY assoziierter SNP in der Originalkultur vorlag. Einige Varianten in den mLOY/LOY-Klonen befanden sich in Genen, die an der Entstehung von Aneuploidien beteiligt sein könnten. Weitere mutierte Gene könnten eine bisher unbekannte Rolle spielen. Besonders *FIG4* wäre dabei genauer zu untersuchen, da es in zwei unabhängigen Klonen verändert ist. Darüber hinaus könnten Methylierungsanalysen zeigen, ob LOY epigenetisch reguliert ist.

Die Tatsache, dass alle Klone mit mLOY/LOY und vorhandenen Chromosomen-, bzw. CNV-Daten auch auf chromosomaler und/oder CNV-Ebene instabil sind, unterstützt nicht nur die Hypothese, dass LOY ein neuer Endpunkt für RIGI sein könnte, sondern zeigt auch, dass diese Veränderung als Biomarker für die strahleninduzierte Krebsentstehung bei Männern dienen könnte. Die Ergebnisse belegen deutlich, dass der Verlust des Y-Chromosoms nicht nur in Blutzellen, sondern auch in anderen Zellen relevant ist.

4.3. Strahleninduzierte Kopienzahlvariationen

CNVs sind sehr wichtig für die genetische Variation, aber auch an der Entstehung verschiedenster Krankheiten beteiligt. Zur Identifizierung von Instabilitäten auf Ebene der CN wurden bestrahlte Klone und nicht bestrahlte Kontrollen mit CytoSNP-12 DNA BeadChips analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass Nachkommen bestrahlter Zellen auch auf Ebene der CN instabil sind. Eine sehr geringe Anzahl (0,1-0,2 Varianten pro Klon) spontan induzierter CNVs konnte zudem in nicht bestrahlten Klonen beobachtet werden. Diese durch die Alterung in Zellkultur hervorgerufenen Veränderungen in der CN waren eher klein und betrafen nur ein bis drei proteinkodierende Gene pro Klon. Insgesamt war der Unterschied in der Entstehung von *de novo* CNVs zwischen Kontroll-Klonen und bestrahlten Klonen sehr hoch, ein signifikanter Unterschied wurde jedoch nur für das zweite Experiment erreicht. Die Effektivität von IR in der Induktion von CNVs konnte bereits in mehreren Studien beschrieben werden [271-275]. Die meisten Studien dazu wurden jedoch bisher nicht an normalen, humanen Zellen, sondern an Tumorzelllinien oder anderweitig veränderten Zellen oder Geweben durchgeführt. Mit dem Ziel Keimbahnmutationen zu identifizieren, die durch Strahlenexposition induziert werden, wurden Labormäuse mit Röntgenstrahlung mit einer Dosis von 3 Gy bestrahlt. Array-Experimente zeigten eine signifikant erhöhte Frequenz an CNVs in den Nachkommen bestrahlter Mäuse im Vergleich zu den nicht bestrahlten

Kontroll-Familien [276]. Ähnliche Beobachtungen machten auch Arlt und seine Kollegen 2014 unter Verwendung von SNP-Arrays [271]. hTERT-immortalisierte Fibroblasten eines weiblichen Spenders wiesen nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen (1,5-3 Gy) Röntgenstrahlung eine signifikant erhöhte Entstehung von CNVs im Vergleich zu nicht bestrahlten Zellen auf. Die CNV-Frequenz nahm dabei mit zunehmender Strahlendosis zu. Vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurden *de novo* CNVs mit einer geringen Frequenz auch in nicht bestrahlten Kontrollen beobachtet. Insgesamt konnte in der Studie von Arlt und seinen Mitarbeitern keine bedeutende Prävalenz für Deletionen oder Duplikationen nach Bestrahlung detektiert werden. Dieses Ergebnis zeigte sich auch in den bestrahlten Klonen des ersten Experiments, in dem nur geringfügig mehr Duplikationen als Deletionen identifiziert wurden. Beobachtungen aus früheren Studien deuten jedoch darauf hin, dass hohe Dosen γ -Strahlung vorrangig Verluste der CN auslösen [84, 274, 277]. Diese Deletionen gehen auf eine defekte bzw. unvollständige DNA-Reparatur, sowie eine fehlerhafte Zellzykluskontrolle zurück [274]. Im Einklang mit diesen Studien konnten für die bestrahlten Klone des zweiten Experiments deutlich mehr Deletionen als Duplikationen identifiziert werden.

Beim Vergleich der CNV-Größe zeigte sich, dass die strahleninduzierten CNVs, sowohl in der Studie von Arlt (288 kb) als auch in der vorliegenden Arbeit (453 kb) im Median größer waren als die CNVs der Kontrollen (Arlt: 261 kb, vorliegende Arbeit: 311 kb).

Insgesamt konnte weder für die durchschnittliche CNV-Zahl, noch für das Verhältnis von Deletionen zu Duplikationen, ein einheitliches Ergebnis in chromosomal stabilen und chromosomal instabilen Klonen beider Experimente erzielt werden. Acht Klone, die anhand des Chromosomenstatus als stabil eingestuft wurden, hatten auf CNV-Ebene ein instabiles Genom.

In den bestrahlten Klonen beider Experimente wurden mehrere CNVs detektiert, die eine Größe über 1000 kb hatten. Durch strukturelle Veränderungen in diesem Ausmaß sind häufig viele proteinkodierende Gene betroffen, wodurch sich potentiell schwerwiegende Effekte ergeben. Zumindest für das erste Experiment wurde hierbei ein RIGI-Effekt beobachtet, da besonders große CNVs primär in instabilen Klonen auftraten. Dieser Zusammenhang konnte in der zweiten Kultur nicht bestätigt werden.

Obwohl angenommen wird, dass der Strahleneffekt zufällig ist, beobachtete die Gruppe um Arlt, dass fast 20 % ihrer CNVs in sogenannten Hotspots auftraten. Hierbei handelt es sich um

Cluster-Regionen, in denen mehr CNVs auftreten als es aufgrund einer zufälligen Verteilung zu erwarten wäre [180]. Im Einklang mit diesen Beobachtungen wurden ebenfalls in der vorliegenden Arbeit Anhäufungen von CNVs in bestimmten chromosomalen Regionen beobachtet. Insgesamt überlappten (direkte Überlappung oder eine maximale Distanz von 1 Mb) zehn strahleninduzierte CNVs mit CNVs aus der Arlt Studie (Abbildung 46). Dies deutet auf eine nicht zufällige CNV-Entstehung hin. Eine Hotspot-Region mit besonders vielen CNVs identifizierten Arlt und seine Kollegen in der chromosomalen Bande 7q11.22 innerhalb des Gens *AUTS2*, welches mit Autismus und anderen neurologischen Erkrankungen assoziiert ist. In der vorliegenden Arbeit konnten in einer benachbart gelegenen Region (7q11.21) ebenfalls sechs Deletionen identifiziert werden. Eine zusätzliche Deletion betraf die Bande 7p12.1-7q11.1. Diese Region scheint besonders strahlensensitiv zu sein. Da an diesem Cluster chromosomal stabile und instabile Klone beteiligt sind, handelt es sich jedoch nicht um eine mit RIGI assoziierte Region.

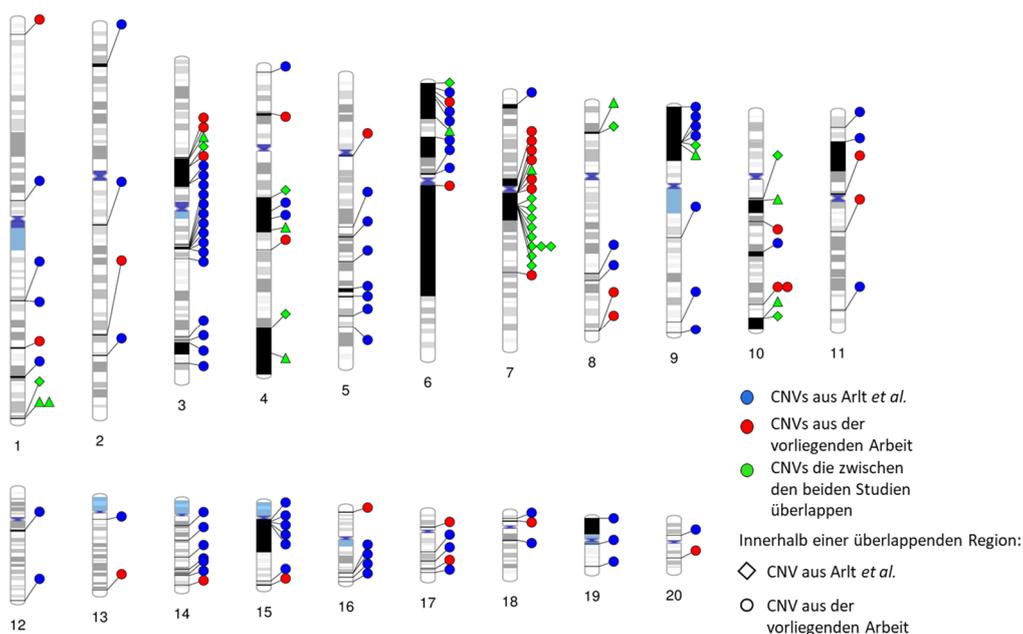


Abbildung 46: Vergleich strahleninduzierter CNVs der vorliegenden Arbeit mit den CNVs aus einer Studie von Arlt und seinen Kollegen [271]. Rote Kreise stehen für CNVs der vorliegenden Arbeit, blaue Kreise für CNVs aus der Studie von Arlt und seinen Mitarbeitern und grüne Symbole repräsentieren CNVs, die zwischen den beiden Studien überlappen. Innerhalb der Überlappungsregionen steht ein grüner Kreis für eine CNV der vorliegenden Arbeit, eine grüne Raute für eine CNV aus der Studie von Arlt und seinen Kollegen. Abkürzung: CNV: engl. *copy number variation*.

Die Autoren der Studie beobachteten darüber hinaus, dass viele ihrer identifizierten Hotspots mit Regionen übereinstimmen, die auch nach Einwirkung der replikationsstressinduzierenden Substanzen Aphidicolin (APH) und Hydroxyurea (HU) von CNVs betroffen waren [180]. Sie schlussfolgerten daraus, dass der CNV-Entstehungsmechanismus nach Einwirkung von IR, HU und APH ähnlich ist [180]. Neben den zwei Hauptmechanismen, der nicht-allelischen HR, sowie dem NHEJ rückt immer mehr ein Mechanismus der CNV-Entstehung in den Vordergrund, der auf Fehlern in der DNA-Replikation beruht [278, 279]. Experimentelle Unterstützung dazu lieferte insbesondere die Gruppe um Arlt, die herausfand, dass Substanzen, welche die Replikation stören, zur CNV-Entstehung führen [180, 280]. Ähnliche CNVs konnten auch in embryonalen Stammzellen der Maus, sowohl bei Anwesenheit als auch Abwesenheit des NHEJ-Proteins XRCC4 induziert werden, was für einen NHEJ-unabhängigen Mechanismus spricht [281]. Obwohl DSBs als die gefährlichsten strahleninduzierten Läsionen angesehen werden, ist es für Arlt und seine Kollegen unwahrscheinlich, dass zufällig induzierte DSBs und deren Reparatur über NHEJ bei der CNV-Entstehung beteiligt sind [271]. Dafür spricht, dass die Anzahl der von ihnen beobachteten CNVs nicht mit den 12-36 strahleninduzierten DSBs pro Zelle, die zu erwarten wären, in Einklang zu bringen ist [271]. Wenn die DSBs zufällig verteilt sein sollten, stellt sich außerdem die Frage, wieso die Verteilungsmuster der strahleninduzierten CNVs und der CNVs, die durch replikationsstressinduzierende Substanzen entstehen, so ähnlich sind [271]. Die Autoren gehen daher davon aus, dass ein replikationsabhängiger Mechanismus zur Entstehung strahleninduzierter CNVs führt. Pro Gray werden etwa 500–1000 Einzelstrangbrüche in einer Zelle induziert [15]. Diese Läsionen können während der Replikation zum Zusammenbruch der Replikationsgabel führen [149]. Als Folge des Zusammenbruchs entsteht ein freies Doppelstrangende (Abbildung 47A). Die Resektion des 5'-Endes resultiert in einem 3'-Überhang (Abbildung 47B) [282]. Es kommt zum *template switching*, bei dem der 3'-Überhang in eine andere Region eindringt und an ein neues einzelsträngiges DNA-Template bindet (Abbildung 47C). Voraussetzung dafür ist die Mikrohomologie der beiden Sequenzen, sowie die Nähe des neuen Template zum 3'-Ende [149, 278]. Die DNA-Synthese beginnt. Der verlängerte Doppelstrang wird vom Template getrennt und der Vorgang wiederholt sich (Abbildung 47D–F). Dieser Prozess wird als *microhomology-mediated break-induced replication* (MMBIR) bezeichnet und geht mit der Entstehung von CNVs einher [278]. Die Entstehung einer Deletion oder Duplikation ist dabei abhängig von der Position der

Neusynthese in Relation zur Position des Zusammenbruchs der Replikationsgabel [149, 282]. Aufgrund der geringen Prozessivität der Polymerase kann es zu multiplen Abspaltungen und Einwanderungen in neue Templates kommen, sodass komplexe Umlagerungen resultieren [282]. LOH-Regionen entstehen in diesem Zusammenhang, wenn anstelle des Schwesterchromatids die Anlagerung mit dem homologen Chromosom erfolgt [149].

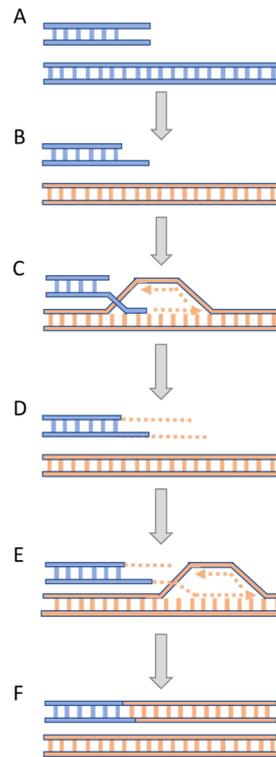


Abbildung 47: Mechanismus des „Microhomology-mediated break induced replication“. (A) Die Replikationsgabel bricht aufgrund einer DNA-Läsion zusammen. (B + C) Die Resektion des 5'-Endes resultiert in einem 3'-Überhang, welcher in ein anderes, homologes Template eindringt. (D – F) Durch die DNA-Synthese wird der Strang verlängert, die Stränge trennen sich und der Vorgang wird wiederholt. Jede Linie repräsentiert einen Strang; die Polarität wird durch Pfeile am 3'-Ende angezeigt (Abbildung erstellt nach [278]).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Beobachtungen aus vorherigen Studien, die einen replikationsabhängigen CNV-Entstehungsmechanismus postulieren. Zum einen konnten wir eine Überlappung mit strahleninduzierten CNVs der Arlt Studie identifizieren, zum anderen überlappten von uns detektierte Clusterbereiche und isolierte CNVs mit CNVs die durch Replikationsstress (APH und HU) induziert sind [180].

Obwohl viele CNVs der bestrahlten Klone mit Genen überlappten, die in der Krebsentstehung relevant sind (*ABCC5*, *ALDH3A1*, *BCL6*, *BTG2*, *CASP3*, *CCDC6*, *CHI3L1*, *EGFR*, *FHIT*, *MEG3*, *MIR34A*, und *PCDH7*), konnten dahingehend keine signifikanten Anreicherungen ermittelt

werden. Strahleninduzierte CNVs zeigten jedoch eine signifikante Anreicherung in fragilen Stellen des Genoms.

Fragile Stellen (engl. *fragile sites*, FSs) sind Bereiche von Metaphase-Chromosomen, die eine erhöhte Brüchigkeit haben, wenn die Zellen Kulturbedingungen ausgesetzt sind, die Replikationsstress auslösen [283]. FSs replizieren spät in der S-Phase und befinden sich häufig in großen Genen [284, 285]. Die Brüche in FSs entstehen durch eine unvollständige DNA-Replikation in der S-Phase. Während nicht fragile Regionen den Replikationsstress durch die Replikationsinitiation an zusätzlichen Replikationsursprüngen umgehen können, sorgt ein Mangel an Replikationsursprüngen in den Zentren der FSs für Instabilität [286, 287]. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Kollision zwischen den Replikationsgabeln und der Transkriptionsmaschinerie, die aufgrund der mit den FSs assoziierten großen Gene möglich ist. Damit verbunden ist auch die Bildung von sogenannten R-Loops (RNA:DNA-Hybride), die das Voranschreiten der Replikationsgabel stören [288, 289].

Eine Konsequenz von nicht replizierter DNA in FSs ist die Bildung von CNVs. Es konnte gezeigt werden, dass replikationsstressinduzierende Substanzen zur Bildung von CNVs in mit FSs assoziierten Genen führen [180]. Diese Überlappungsbereiche sind mit sehr großen aktiven Transkriptionseinheiten (>1 Mb), die sich in spät replizierenden Domänen befinden, assoziiert [180]. In diesen Domänen verläuft die Replikationsgabel von den Grenzen aus auch nach innen [180]. Aufgrund dieser Beobachtungen beschrieben die Autoren einen Mechanismus, bei dem Replikationsstress über Störungen der Replikationsdynamik zur lokus- und zelltypspezifischen genomischen Instabilität dieser Regionen führt [180]. Zusammengefasst ist dies im Modell „*transcription-dependent double-fork failure*“. Die Instabilität entsteht dabei durch den zeitgleichen Zusammenbruch zweier Replikationsgabeln, sowie die nicht vorhandene Möglichkeit ungenutzte Replikationsursprünge in Folge des Replikationsstresses zu aktivieren und so dem Zusammenbruch entgegenzuwirken [180]. Die daraus resultierende Entstehung von CNVs ist noch nicht abschließend geklärt, obwohl vermutet wird, dass der Zusammenbruch der Replikationsgabeln in Verbindung mit MMBIR eine zentrale Rolle spielt [180, 286].

Veränderungen in der CN führen zur Aktivierung von Onkogenen und zur Inaktivierung von Tumorsuppressoren. Strukturelle Variationen betreffen dabei einen größeren Bereich des Genoms von Krebszellen als jede andere somatische genetische Veränderung [290]. Veränderungen in FSs und die damit verbundene Inaktivierung ihrer Genprodukte ist ein

charakteristisches Merkmal von instabilen Krebszellen. Einige der mit FSs assoziierten Gene fungieren vermutlich als Tumorsuppressoren. Viele dieser Gene sind in der DDR involviert und daher als sogenannte Caretaker für die Aufrechterhaltung der Genomintegrität und Stabilität zuständig [283, 291]. Der dazu beschriebene Mechanismus besagt, dass während der Tumorentstehung die Überexpression von Onkogenen über die Deregulation der Replikation zur Entstehung von Replikationsstress führt [292, 293]. Als Folge dessen, kommt es zur chromosomalen Instabilität, die sich zunächst auf fragile Stellen beschränkt und sich schließlich auf das gesamte Genom ausweitet [291, 292].

Es ist daher plausibel anzunehmen, dass strahleninduzierter Replikationsstress und die damit verbundene Aktivierung von FSs und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressoren bei der mit RIGI assoziierten Kanzerogenese eine Rolle spielen. Ein Vergleich der von CNVs betroffenen Gene mit Genen, die in der Tumorsuppressorgen-Datenbank (TSGene) gelistet sind, zeigte jedoch, dass sowohl Gene aus chromosomal instabilen als auch aus chromosomal stabilen Klonen überlappten. Fragile Stellen waren darüber hinaus ebenfalls in Klonen beider Klassifizierungsgruppen von CNVs betroffen.

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass strahleninduzierter Replikationsstress zwar spezifisch zur Aktivierung fragiler Stellen führt, aber nicht jede aktive fragile Stelle im Genom gleichermaßen in genomischer Instabilität resultiert. Es wird kontrovers diskutiert, ob mit FSs assoziierte Gene „Passenger“ sind, also solche, die der Zelle keinen Wachstumsvorteil geben und nicht zur malignen Entartung führen oder „Driver“, die zur Krebsentstehung beitragen [291, 294-296].

4.4. Beteiligung von *FHIT* an der Destabilisierung des Genoms nach Bestrahlung

Eine abnormale CN des Gens *FHIT* konnte in drei Klonen 1-2200C3, 2-210, 2-2P detektiert werden. Darüber hinaus betraf eine weitere große Deletion im Klon 2-244 zwar *FRA3B*, aber nicht *FHIT* direkt. Strahleninduzierte Veränderungen präferentiell *FRA3B* betreffend konnten bereits in Zellen des Adenokarzinoms detektiert werden [297].

FRA3B ist einer der aktivsten fragilen Loci in humanen Lymphoblasten und überlappt etwa 500 kb des 1,5-Mb großen Gens *FHIT* [298]. In dieser Region befindet sich der Kern der *FRA3B*-Instabilität, die von den Exons 5-7 des *FHIT*-Gens gebildet wird [299]. Der Verlust des *FHIT*-Proteins ist in mindestens 50 % der humanen Krebsarten beschrieben, das Gen ist damit das am zweithäufigsten deletierte Gen in Tumoren [294, 295, 300]. Veränderungen von *FHIT*

gehen häufig auf die FRA3B-Fragilität zurück und führen damit verbunden zu *FHIT*-Deletionen, die in einem Verlust oder in einer abnormalen Genexpression resultieren [298]. Darüber hinaus konnten Veränderungen in *FHIT* in präkanzerösen Läsionen verschiedener Krebserkrankungen identifiziert werden [301-304]. Aberrante Transkripte von *FHIT* wurden in 86 % der präkanzerösen Barrett-Metaplasien, sowie in 93 % der präkanzerösen Läsionen von Lungenkrebs identifiziert [305, 306]. Der Verlust von *FHIT* war dabei signifikant höher in Tumoren von Rauchern als in Tumoren von Nichtrauchern. Der Verlust der Heterozygotie im 3p-Lokus wurde weiterhin auch im normalen Bronchialepithel von Rauchern entdeckt [307, 308]. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass *FHIT* eine wichtige Rolle bei der Tumorsuppression in sehr frühen Stadien der Krebsentstehung hat. Experimentelle Unterstützung dazu lieferte auch die Gruppe um Zanesi und Fong mit ihren Beobachtungen, dass *Fhit*-knockout Mäuse, im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, anfälliger für, sowohl karzinogeninduzierte als auch für spontane Tumore waren [309, 310]. Aufbauend auf den Ergebnissen von Saldivar und seinen Kollegen, die beschrieben, dass der Verlust von *FHIT* die Entstehung genomischer Instabilität fördert, wurde *FHIT* schließlich eine Rolle als Caretaker zugeschrieben [291]. Die Autoren zeigten, dass *FHIT*-defiziente Zelllinien im Vergleich zu Wildtyp-Zelllinien ein erhöhtes Level an replikationsstressinduzierten DSBs hatten. DNA-Combing-Experimente ergaben außerdem, dass *FHIT* das korrekte Voranschreiten der Replikationsgabel fördert [291]. In *FHIT*-defizienten Zellen hingegen war dieser Mechanismus defekt [291]. Die weiteren Ergebnisse der Studie wurden schließlich im Modell „*FHIT* loss-induced genome instability“ zusammengefasst [295]. Der Verlust der *FHIT* Caretaker-Funktion führt zur Herunterregulierung der Thymidinkinase 1 (TK1) und damit verbunden zu reduzierten Desoxythymidintriphosphat (dTTP)-Level [295]. Das Ungleichgewicht im Nukleotid-Pool löst Replikationsstress aus, der zum Zusammenbruch der Replikationsgabel und zur Entstehung spontaner DSBs führt [295]. Auf chromosomaler Ebene äußerte sich dies in einer erhöhten Aneuploidierate in *FHIT*-stillgelegten Zellen, sowie in einem 2-fachen Anstieg in der Frequenz von Brüchen pro Metaphase im Vergleich zu Wildtyp-Zellen [291]. Darüber hinaus kommt es zum 3-fachen Anstieg in der Mikronukleus-Frequenz [291]. Die replikationsstressinduzierten DNA-Schäden gingen ohne die Aktivierung von Zellzykluscheckpoints einher [291]. Die Schäden werden so über die Mitose fortlaufend an die Tochterzellen weitergegeben und führen zur Anhäufung instabiler Zellen [295]. Der Verlust von *Fhit* ist außerdem mit der Aktivierung weiterer FSs verbunden

[311]. Es wird vermutet, dass der Verlust des Gens verhältnismäßig milden Replikationsstress auslöst, der über viele Zellzyklen bestehen bleibt [295]. Die daraus resultierenden Schäden erreichen den Grenzwert, der nötig ist, um die Zellzyklus-Checkpoints zu aktivieren, nicht [295].

Die Identifizierung von vier Klonen mit Veränderung der *FHIT*/FRA3B-CN spricht dafür, dass dieser Locus auch in fetalen Fibroblasten sensitiv auf Strahlung reagiert. Im Zuge dessen, was über das Gen bereits bekannt ist, könnte die strahlenbedingte Veränderung von *FHIT* über die Destabilisierung des Genoms zur Tumorentstehung beitragen. Ein Hinweis dafür ist, dass die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Klone mit *FHIT*-Aberration (zu denen Chromosomendaten vorliegen) chromosomal instabil sind.

Obwohl die Ergebnisse der beschriebenen Studien dafürsprechen, dass *FHIT* als Caretaker zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität verantwortlich ist, bleibt die Frage zu klären, inwiefern der Verlust von *FHIT* den Zellen einen Wachstumsvorteil liefert und zur Tumorentstehung beiträgt [295]. Im Vergleich zu normalen Zellen, weist das Genom von Tumorzellen Tausende Mutationen auf [312]. Insgesamt betreffen aber nur wenige Mutationen Gene, die tatsächlich das Tumorwachstum fördern [295]. Die Frage, wie es in Tumoren zur Anhäufung einer hohen Anzahl von Mutationen kommen kann, wird durch die „Mutator“-Hypothese beantwortet [133, 312]. Schon früh in der Tumorentstehung kommt es durch Mutationen in Caretaker-Genen zur Störung der genomischen Integrität, wodurch die Mutationsrate in den Tochterzellen stark erhöht wird [295]. Unter den entstehenden Mutationen begünstigen einige die Tumorentstehung [133, 312].

Um zu testen, ob die strahleninduzierte Veränderung von *FHIT* einen solchen „Mutator“-Phänotyp induziert, wurden die Exome von drei Klonen mit CNV in *FHIT* (1-2200C3, 2-2P und 2-210) sequenziert. Die durchschnittliche Variantenzahl war in den Klonen mit *FHIT*-CNV nur geringfügig höher als in den Klonen mit normaler CN des Gens. Ein deutlicheres Ergebnis erzielten Paisie und seine Kollegen mit Exomsequenzierungen embryonaler Mausfibroblasten (MEFs) und Nierenzellen [313]. Zellen und Gewebe, die aus *Fhit*-knockout Mäusen stammten, zeigten fast 4-mal mehr SNVs als wildtypische Zellen [313]. Die Analyse der Mutationsprofile dieser Zellen ergab eine Anreicherung von C>T und T>C-Mutationen, die auf spontane Desaminierung, bzw. Replikationsfehler (C>T) und auf ein Ungleichgewicht im Nukleotid-Pool (T>C) zurück zu führen sind [313]. Signaturen, die durch eine Anhäufung von C>T-Mutationen charakterisiert sind, konnten in allen Krebsarten identifiziert werden [182].

Verantwortlich dafür sind *apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like* (APOBEC)-Cytidin-Desaminasen [182]. Die APOBEC-Kinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Virusinfektionen, indem sie, spezifisch in einzelsträngige DNAs, Mutationen einführen [314, 315]. Die Enzyme sind hoch prozessiv, sodass in Tumoren Mutationscluster und Hypermutationen entstehen können [316-318]. Eine Überexpression von APOBEC3B konnte auch in FHIT-defizienten Tumoren detektiert werden [319]. Es wird angenommen, dass der Replikationsstress, der aus dem FHIT-Verlust entsteht, zur vermehrten Bereitstellung von Substraten (einzelsträngige DNAs) führt, wodurch die Aktivität des APOBEC3B-Enzyms erhöht wird [319]. Dies trägt zur Entstehung des „Hypermulator“-Phänotyps in FHIT-defizienten Zellen bei [295]. Interessanterweise zeigte das Mutationsprofil der Klone mit *FHIT*-CNV Ähnlichkeiten zur Signatur 2, dessen Mutationsmuster vermutlich auf die Aktivität von APOBEC-Kinasen zurückgeht. Neben Signatur 2 konnten Übereinstimmungen mit den Signaturen 20 und 24 identifiziert werden. Die Ursache für Signatur 20 ist vermutlich ein Defekt in der DNA-Mismatch-Reparatur (MMR). Signatur 24 ist durch eine Anhäufung von C>A/G>T-Substitutionen charakterisiert, die, sowohl in den Klonen mit *FHIT*-Veränderung, als auch in den Klonen ohne *FHIT*-Veränderung primär zu finden waren. Klone mit aberranter CN des Gens *FHIT* zeigten dabei einen noch höheren Anteil (53 %) dieser Substitutionstypen als Klone ohne *FHIT*-Veränderung (36 %). Signaturen, die primär durch C>A/G>T-Substitutionen charakterisiert sind, konnten gehäuft in Krebsarten identifiziert werden, die mit dem Rauchen assoziiert sind [182]. Die angereicherten C>A-Mutationen deuten auf Guanin-Schäden hin [182]. Aufgrund ihres geringen Oxidationspotentials ist die Guaninbase sehr anfällig für oxidativen Stress [320]. C>A/G>T-Transversionen sind häufig unter dem Einfluss von oxidativem Stress zu beobachten und entstehen durch die Paarung des Oxidationsprodukts 8-oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoG) mit Adenin während der Replikation [321]. Die Anhäufung dieser Mutationen könnte daher auf erhöhten oxidativen Stress in beiden Gruppen hindeuten, der in den Klonen mit veränderter *FHIT*-CN jedoch noch etwas höher ist.

Die von Paisie und seinen Mitarbeitern identifizierten SNVs betrafen Gene (*Mutyh*, *Tpx2*, *Nek9*, *Zfat*, und *Dlc1*), die an der DNA-Reparatur, an chromosomaler Instabilität, Replikationsstress, dem Zellüberleben und bei der Regulation des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs beteiligt sind [313]. Neben Punktmutationen entdeckten Miura und seine Kollegen, dass *Fhit*^{-/-}-MEFs eine erhöhte Anzahl von CNVs im Vergleich zu *Fhit*^{+/+}-MEFs hatten [322]. Detektiert werden konnte dabei unter anderem eine Amplifikation

des Onkogens *Mdm2* [322]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die durch den FHIT-Verlust induzierte GI Mutationen und CNVs auslöst, die der Zelle einen Wachstumsvorteil liefern [322].

Von den 34 Genen, die in den Klonen mit *FHIT*-CNV von Varianten betroffen waren, spielten zwei eine Rolle bei der Kontrolle von Zellzyklus-Checkpoints (*ATR*, *KLLN*). *ATR* ist als Transduktor entscheidend in der Regulierung der DDR (siehe Kapitel 1.2 DNA-Schadensantwort, S.3). Durch Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints unterstützt *ATR* die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität. *KLLN* ist ein DNA-bindendes Protein, welches die DNA-Synthese inhibiert und den Apoptose-gekoppelten S-Phase Arrest fördert [323]. Die Aktivität von *KLLN* wird durch p53 reguliert [323]. Studien deuten darauf hin, dass Mutationen in *ATR* bzw. die Runterregulierung von *KLLN* das Tumorstadium fördern [324, 325]. *In silico* Bewertungen der detektierten Varianten sagten jedoch keine schwerwiegenden Auswirkungen vorher.

Die Analyse von Bereichen, in denen Varianten clustern, ergab, dass alle *FHIT*-Klone Varianten in der chromosomalen Bande 11q24.2 (*ROBO4* und *SLC37A2*) hatten. In dieser Bande befindet sich auch das Gen *CHEK1*, welches für eine Kinase kodiert, die den Zellzyklusarrest in Folge von DNA-Schäden oder nicht replizierter DNA reguliert. Eine Interaktion zwischen den von SNVs betroffenen Genen *ROBO4* und *SLC37A2* mit *CHEK1* ist in der Literatur jedoch nicht bekannt. Im Vergleich zur Studie von Miuma und seinen Kollegen konnten in den *FHIT*-Klonen keine weiteren Veränderungen in der CN detektiert werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Veränderungen in der *FHIT*/*FRA3B* -Region die Tumorentstehung über GI fördern könnten. Ein Hinweis dafür ist, dass die Klone mit *FHIT*-Aberration auch auf chromosomaler Ebene instabil sind. Ähnlich wie im Modell „*FHIT loss-induced genomic instability*“ könnte der Verlust von *FHIT* zur Runterregulierung von *TK1* und damit verbunden zum Ungleichgewicht im Nukleotidpool führen (Abbildung 48). Als Folge dessen ist das korrekte Voranschreiten der Replikation gestört, es kommt zum Zusammenbruch der Replikationsgabel und zum Replikationsstress, welches sich, unter anderem, in der Entstehung von spontanen DSBs äußert. Die in den Klonen mit veränderter *FHIT*-CN beobachteten Chromatidbrüche repräsentieren dabei potentielle DSBs. Das Mutationsprofil der *FHIT*-Klone scheint durch die Aktivität von APOBEC-Kinasen beeinflusst zu sein, die in Tumoren überexprimiert sind und so zur Entstehung eines „Hypermutator“-Phänotyps beitragen.

Insgesamt konnten wir die mit dem Verlust der FHIT Caretaker-Funktion einhergehende erhöhte Aktivierung von FSs, sowie die Entstehung von weiteren CNVs nicht bestätigen. Darüber hinaus betrafen die Punktmutationen zwar Gene, die wichtig für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität sind, eine erhöhte Mutationsrate konnte damit verbunden allerdings nicht verzeichnet werden. Dies könnte vor allem daran liegen, dass die Varianten, laut *in silico* Vorhersage, keine nennenswerten Auswirkungen haben. Es ist erwähnenswert, dass *FHIT* in den Klonen nur heterozygot deletiert ist. Zudem stellt sich die Frage, ob allgemein Duplikationen von *FHIT* auch zu genomischer Instabilität führen kann, da die Literatur dazu bisher keine Einträge liefert. Die Tatsache, dass nur wenige instabile Klone in *FHIT* verändert sind, deutet darauf hin, dass die Destabilisierung des Genoms nach Strahleneinwirkung durch verschiedene Signalwege reguliert wird.

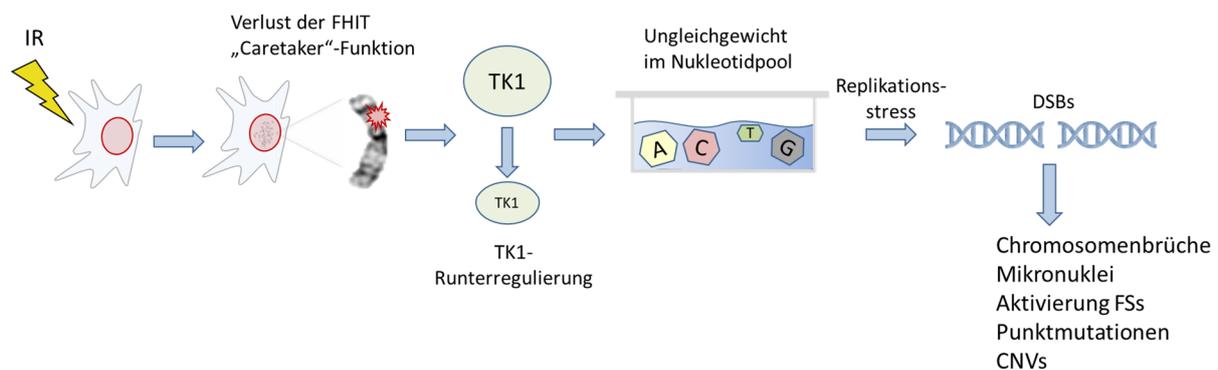


Abbildung 48: Schematische Darstellung des Modells *FHIT loss-induced genomic instability*. Der Verlust der FHIT Caretaker-Funktion führt zur Runterregulierung von TK1 und zum Ungleichgewicht im Nukleotidpool. Replikationsstress induziert spontane DSBs, die mit verschiedenen Veränderungen einhergehen. Abkürzungen: DNA-Basen: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin; CNVs: engl. *copy number variations*; DSBs: engl. *double-strand breaks*; FHIT: engl. *fragile histidine triad*; FSs: engl. *fragile sites*; IR: engl. *ionizing radiation*, TK1: Thymidinkinase 1.

4.5. Exomweite Analyse von Veränderungen einzelner Nukleotide

Die Wechselwirkung von IR mit der DNA resultiert in verschiedenen Schadensklassen und kann die Entstehung von Tumoren fördern [15]. SNVs sind dabei vorwiegend Basenschäden zuzuschreiben. Obwohl die Einführung der NGS-Techniken die Mutationssignaturen verschiedener Tumore offenbarte und so zum Verständnis der Mechanismen, die der Krebsentstehung unterliegen, beitrugen, ist die tiefere genomweite Konsequenz der Strahleneinwirkung auf Normalgewebe noch unklar [182]. Die wenigen in der Literatur

vorhandenen Ergebnisse dazu stammen aus Studien an Überlebenden von Atomkatastrophen und deren Nachkommen [326]. Die Trio-Analyse von drei Familien, in denen jeweils der Vater als Überlebender einer Atomkatastrophe akute Symptome einer Strahleneinwirkung zeigte, ergab, dass die Nachkommen keine signifikanten genetischen Effekte hatten [326]. Ähnliche Ergebnisse wurden durch nicht NGS-basierte Techniken erzielt [327, 328].

In normalen Zellen kommt es während des Alterungsprozesses zur Anhäufung von Mutationen. Basenfehlpaarungen, Insertionen und Deletionen entstehen dabei durch Replikationsfehler, die geringe Rate an Hintergrundmutationen reflektiert jedoch die Effizienz der Reparaturmechanismen [329]. In der vorliegenden Arbeit resultierte die Alterung in Zellkultur in einer Zunahme in der Anzahl von Varianten in den Klonen im Vergleich zur Massenkultur. Für die Kontroll-Klone resultierte dies in einer durchschnittlichen Mutationsrate von $8,4 \times 10^{-9}$, bzw. $4,5 \times 10^{-9}$.

Obwohl bisher kein einheitliches Modell zur Berechnung der Mutationsrate existiert, bewegen sich die errechneten Werte verschiedener Studien in etwa im gleichen Größenrahmen. Nach Sequenzierung von einzelnen humanen Fibroblasten, errechneten Milholland und seine Mitarbeiter eine somatische Mutationsrate von $2,66 \times 10^{-9}$ [330]. Die von den Autoren beobachtete absolute SNV-Anzahl war mit 850 jedoch geringer als die in humanen Neuronen beschriebene Anzahl von 1500 [331]. Die Autoren erklären diese Unterschiede durch Fehler, die bei der Gesamt-Genom-Amplifikation von Einzelzellen entstehen können, was bei der Analyse der Neuronen nicht beachtet wurde [330]. Ihre Hypothese sehen die Autoren durch die Ergebnisse einer weiteren Studie an Neuronen bestätigt, die ohne Amplifikation nur etwa 100 SNVs pro Zelle detektierte [332]. Die genomweite Analyse von Dünn- und Dickdarmzellen von jungen Spendern resultierte ebenfalls in einigen hundert Mutationen pro Zelle [333]. Beachtet werden muss jedoch, dass sich die genannten Studien auf Daten stützen, die sich auf das gesamte Genom beziehen. Die Gruppe um Sardo beschrieb zwischen 10 und 30 SNVs in den Exomen induzierter pluripotenter Stammzellen (iPS-Zellen), die aus Blutzellen von Spendern im Alter von 21 bis 100 Jahren hergestellt wurden [330, 334]. Jüngere Spender hatten dabei eine geringere Anzahl an SNVs als ältere Spender [334]. Im Einklang mit anderen Studien an iPS-Zellen würde dies hochgerechnet auf das Genom etwa 50–1500 Mutationen pro Zelle ergeben [330, 335, 336]. Obwohl die beschriebenen Studien einen starken Gewebe- und Alterungseffekt zeigen und der direkte Vergleich der SNV-Raten daher schwierig ist, bewegen sich die beobachteten durchschnittlichen Mutationsraten in der vorliegenden

Arbeit in etwa im gleichen Größenbereich, wie die bisher publizierten Werte. Ausgehend davon, dass das Exom etwa 2 % des Genoms ausmacht, würden sich für die Kontrollklone vereinfacht gerechnet 100–750 Varianten pro Klon pro Genom ergeben.

Viele, aber nicht alle Umweltkarzinogene tragen über einen Anstieg der somatischen Mutationsrate zur Krebsentstehung bei [337]. Das karzinogene Potential IR ist schon lange bekannt, daher ist es nachvollziehbar anzunehmen, dass IR ein für sich spezifisches Mutationsmuster auslöst, welches mit der Krebsentstehung assoziiert ist.

Entgegen den Erwartungen führte die Bestrahlung nur zu einem geringen Anstieg in der durchschnittlichen Variantenzahl im Vergleich zu den Kontrollen. Nach Abzug der theoretisch durch Replikationsfehler induzierten Mutationen bleiben durchschnittlich 6 bzw. 3 durch Strahlung induzierte Varianten pro Klon übrig. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die meisten IR-induzierten Varianten effektiv repariert werden. Ähnliche Ergebnisse erzielten Studien, die IR-sensitive embryonale Stammzellen und mit Strahlung assoziierte Zweittumore analysierten [337, 338]. Damit im Einklang konnte auch in den Nachkommen bestrahlter Mäuse keine signifikant erhöhte SNV-Rate detektiert werden [276]. Die Autoren erklären ihre Beobachtungen anhand der Tatsache, dass eine Zelle sowieso täglich 30.000 DNA-Läsionen reparieren muss, sodass die 1000–2000 pro Gray induzierten zusätzlichen Basenschäden, keine Herausforderung für die Reparaturmaschinerie darstellen [276]. Anders verhält es sich mit DSBs, deren Reparatur sich schwieriger gestaltet und deren fehlerhafte Reparatur zu CNVs oder Indels führen kann [276]. Diesen Studien entgegen stehen die Ergebnisse von Exom-Sequenzierungen primärer Fibroblasten, die von Nath und seinen Mitarbeitern erhoben wurden [165]. Die Bestrahlung der Zellen mit 0,2 Gy und 2 Gy resultierte in etwa in 100 SNVs. Nach Bestrahlung mit 5 Gy und 10 Gy verzeichneten sie einen SNV-Anstieg mit einem besonders starken Effekt (etwa 400 SNVs) nach 10 Gy [165]. Es sollte beachtet werden, dass diese Studie an Massenkulturen durchgeführt wurde und nicht an Einzelzellen oder Einzelzellbasierten Klonen.

Die verschiedenen Varianten haben unterschiedliche biologische Auswirkungen. Sowohl in den Kontrollen, als auch in den bestrahlten Klonen traten primär Missense-Mutationen auf, was darauf hindeutet, dass viele Mutationen unabhängig von der Bestrahlung entstanden sind. *In silico* Bewertungen sagten für diese Mutationen einen moderaten Einfluss vorher. Varianten mit moderatem Einfluss zerstören das Leseraster nicht, könnten sich jedoch auf das Protein auswirken. Entgegen den Erwartungen wurden für die Varianten der bestrahlten Klone

im Vergleich zu den Varianten der Kontroll-Klone nicht häufiger schwerwiegende Auswirkungen vorhergesagt. Komplexe Varianten, wie Insertionen, Deletionen und Indels konnten jedoch nur in bestrahlten Klonen identifiziert werden. Anders als bei SNVs bilden DSBs die Grundlage für die Entstehung von Insertionen, Deletionen und Indels. Auffällig war, dass diese Varianten nur in instabilen Klonen und nicht klassifizierten Klonen beobachtet wurden. Einige der hierbei betroffenen Gene sind zudem interessanterweise in der DDR und Tumorentstehung relevant (*USP28*, *GPATCH2*, *SIVA1*, *TAGLN2*).

Mutageninduzierte Tumore zeigen häufig Mutationssignaturen, die auf den Entstehungsmechanismus der entsprechenden Läsion schließen lässt [182]. Für strahleninduzierte Tumore ist die mit Ultraviolett (UV)-Strahlung assoziierte Mutationssignatur bisher am besten charakterisiert. Diese kennzeichnet sich durch eine Anhäufung von C>T-Substitutionen aus, welche mit der Entstehung von Pyrimidindimeren und anderen Läsionen, die durch NER repariert werden, in Verbindung stehen [182]. Im Vergleich dazu ist eine allgemeingültige, mit IR assoziierte Mutationssignatur noch nicht beschrieben. Die Analyse von strahleninduzierten Zweitumorgewebe aus *Nf1*-mutierten Mäusen ergab eine Anreicherung von C>T-Substitutionen [339]. Darüber entdeckten die Autoren, dass die benachbarte Base die Rate an C>G- und T>G-Substitutionen beeinflussen kann [339]. In ihrer Studie an primären Fibroblasten beschrieb die Gruppe um Nath, dass unter allen experimentellen Bedingungen die Rate an Transitionen höher war als die der Transversionen [165]. Innerhalb der Transitionen war das Verhältnis der ausgetauschten Basen relativ balanciert mit einer geringen Anreicherung von T>C-Substitutionen nach 10 Gy [165]. In allen Gruppen, besonders deutlich aber in den bestrahlten Klonen, war das Verhältnis von Transitionen zu Transversionen zu Gunsten der Transversionen verschoben. Die bestrahlten Klone beider Experimente, sowie die Kontroll-Klone des ersten Experiments zeigten Ähnlichkeiten zu Signaturen (24 und 29), die mit Guanin-Schäden assoziiert sind. Wie bereits diskutiert, stehen diese Schäden mit erhöhtem oxidativen Stress in Verbindung (siehe Kapitel 4.3 Strahleninduzierte Kopienzahlvariationen, S. 112). Erhöhter oxidativer Stress ist vermutlich mit dem natürlichen Alterungsvorgang assoziiert und wird durch geschädigte Mitochondrien produziert [340]. Es wäre daher denkbar, dass erhöhter oxidativer Stress aufgrund der Alterung in Zellkultur zur Anreicherung von C>A/G>T-Substitutionen in den Klonen führte. Spezifisch für die Klone der zweiten Kultur konnten außerdem Übereinstimmungen mit Signaturen (5 und 16) identifiziert werden, die durch einen hohen

Anteil an T>C-Mutationen in ApTpN-Sequenzen charakterisiert sind. Die Ursache dieser Signatur ist unbekannt. Da diese Mutationen jedoch sowohl nach Bestrahlung, als auch ohne Bestrahlung beobachtet wurden, könnte es sich auch hier um einen Alterungseffekt handeln. Das Profil der Kontroll-Klone des zweiten Experiments zeigte zudem Ähnlichkeiten zur Signatur 10, deren Mutationsmuster durch eine veränderte Aktivität der fehleranfälligen Polymerase POLE hervorgerufen wird. Sowohl das Mutationsprofil der chromosomal stabilen Klone, als auch das Mutationsprofil der chromosomal instabilen Klone stimmten mit Signaturen (3 und 20) überein, die mit fehlerhaften DNA-Reparatursystemen (Signatur 3: HR, Signatur 20: MMR) assoziiert sind. Sowohl die HR, als auch die MMR spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität und können fehlerhaft ausgeführt in Chromosomenaberrationen, genomischer Instabilität und Krebs resultieren [341-344]. Insgesamt sind die Entstehungsmechanismen für viele Signaturen, die Ähnlichkeiten mit den Mutationsmustern der Klone hatten, noch ungeklärt.

IR-induzierte DNA-Sequenzveränderungen unterliegen generell einer statistischen Zufallsverteilung, bestimmte chromosomale Banden fielen jedoch bei der Analyse als Hotspot-Regionen für Punktmutationen auf. In Tumoren ist die ungleichmäßige Verteilung der somatischen Mutationen auf Unterschiede in der DNA-Reparatur aufgrund der Chromatinorganisation zurückzuführen [345]. Stark kondensierte, heterochromatische Bereiche behindern die DNA-Reparatur [346]. Höhere Mutationsraten sind dementsprechend in heterochromatischen, spät replizierenden Regionen zu finden, während in früh replizierenden euchromatischen Regionen weniger Mutationen auftreten [346]. Die nicht zufällige Mutationsverteilung in den bestrahlten Klonen könnte ebenfalls auf Unterschiede in der DNA-Reparatur zurückzuführen sein.

Besonders auffällig war ein Cluster-Bereich auf Chromosom 2, der mit mehreren Varianten in Kollagen-Genen einherging. Kollagen-Gene spielen eine wichtige Rolle bei der Wundheilung. Eine exzessive Produktion von Matrixkomponenten wie Kollagene erfolgt im Rahmen der Strahlenfibrose (engl. *radiation-induced fibrosis*, RIF). RIF ist eine späte Nebenwirkung der Strahlentherapie und betrifft die Haut, subkutanes Gewebe, die Lunge, sowie den Gastrointestinal- und Urogenitaltrakt [347]. Die Entstehung der RIF ist in verschiedene Schritte eingeteilt. Trifft IR auf Gewebe kommt es zur Schädigung der Zelle und zur Produktion proinflammatorischer Zytokine [347]. Neutrophile, Lymphozyten und Monozyten gelangen zur Schadensstelle [347]. Die Produktion von TGF- β durch M2-Makrophagen stimuliert die

Transdifferenzierung von rekrutierten Fibroblasten in Myofibroblasten [347]. Im Laufe der Zeit kommt es zum exzessiven, bzw. unkontrollierten Umbau der extrazellulären Matrix und daraus folgend zur Fibrose [347]. Im Gegensatz zur normalen Wundheilung bleiben die Myofibroblasten während der Fibrose permanent aktiv und sekretieren Matrixproteine wie Kollagene im Übermaß [348].

Neben den genannten Genen im Cluster konnten weitere Varianten in Genen identifiziert werden, die mit der extrazellulären Matrix assoziiert sind. Dies äußerte sich in einer signifikanten Anreicherung des KEGG-Signalwegs „ECM-receptor interaction“. Die extrazelluläre Matrix reguliert die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Gewebemöostase, ihre Dysregulation kann aber auch zur Tumorentstehung beitragen [349, 350]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, dass entzündungsähnliche Mechanismen nach Bestrahlung die Tumorentstehung fördern. Dieser Effekt ist unabhängig von typischen RIGI-Endpunkten, da Klone beider Klassifizierungsgruppen von SNVs in entsprechenden Genen betroffen waren. Insgesamt konnte auf Exomebene kein Unterschied zwischen chromosomal stabilen und instabilen Klonen detektiert werden. Basenschäden scheinen somit in der Entstehung und Aufrechterhaltung von RIGI weniger relevant zu sein als DSBs. Läsionen, die aus DSBs entstehen, konnten aufgrund fehlender Chromosomenklassifikationen nicht ausschließlich instabilen Klonen zugeschrieben werden. Weitere Analysen sind daher notwendig, um zu klären, ob RIGI mit einer spezifischen Signatur aus DSB-basierten Schäden auf Nukleotidebene einhergeht.

Zusammengefasst waren die beobachteten Mutationsraten im Einklang mit den Literaturdaten. Ausgehend von den Chromosomen- und CNV-Ergebnissen war die Rate an strahleninduzierten Varianten geringer als erwartet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die meisten IR-induzierten Basenschäden zuverlässig repariert werden. Fehlerhaft reparierte Schäden akkumulieren in spezifischen Bereichen und könnten zusammen mit weiteren schwerwiegenden Läsionen, die aus DSBs hervorgehen, den Grundstein für die strahleninduzierte Tumorentstehung legen.

Insgesamt sollte angemerkt werden, dass die zur Detektion von Varianten verwendeten Filterkriterien sehr strikt gewählt wurden, um die Rate an falsch-positiven Varianten möglichst gering zu halten. Es ist denkbar, dass einige der „echten“ Varianten, die mit einer sehr geringen Frequenz vorkommen, unter Verwendung der gewählten Filterkriterien übersehen wurden. Für zukünftige Experimente sollte die Auswertungsstrategie durch Verwendung

spezieller Tools, welche auch geringfrequentierte Varianten detektieren können, optimiert werden [351, 352].

4.6. Interindividuelle Strahlensensitivität

Die Analyse der Chromosomen, CNVs und Varianten deutete darauf hin, dass die beiden Kulturen, aus denen die Klone erstellt wurden, unterschiedlich strahlensensitiv sind. Die interindividuellen Unterschiede in der Strahlensensitivität werden allgemein der Variation in genetischen Faktoren zugeschrieben, welche die DDR regulieren [353]. Diese Variation wird besonders deutlich in Patienten, die unter genetischen Syndromen leiden, die durch eine erhöhte Strahlensensitivität und einem erhöhten Krebsrisiko gekennzeichnet sind. Es ist weitgehend akzeptiert, dass Mutationen in Genen der DDR für diese Syndrome verantwortlich sind. Die DDR beinhaltet die Wahrnehmung des Schadens, die Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoint und DNA-Reparaturmechanismen oder die Einleitung der Apoptose als Folge eines von außen, bzw. von innen wirkenden Stimulus [22]. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Polymorphismen in Genen der DNA-Reparatur die Strahlensensitivität beeinflussen [354, 355]. Durch Array-Experimente identifizierten Li und seine Kollegen zudem CNVs, die angereichert in Zellen von strahlensensitiven Patienten auftreten. Diese Entdeckung deutet daraufhin, dass eine dosisabhängige Veränderung der Genexpression den strahlensensitiven Phänotyp auslöst [356]. Die betroffenen Gene könnten dabei Negativ-Regulatoren von Genen sein, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind [356]. Eines dieser Gene ist *CDKN1C*, ein Inhibitor verschiedener G1 Cyclin/Cdk1-Komplexe und Negativ-Regulator der Zellproliferation. Mutationen in diesem Gen führen zum Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) [357]. Patienten mit BWS charakterisieren sich unter anderem durch Großwuchs und einem erhöhten Krebsrisiko [357]. Eine Duplikation der BWS kritischen Bande 11p15.4 konnte auch in der Primärkultur, die Ausgangspunkt für die erste Klonierung war, identifiziert werden. Im Gegensatz dazu konnte in der Primärkultur des zweiten Experiments kein proteinkodierendes Gen detektiert werden, das mit einem strahlensensitiven Gen aus der Studie von Li und seinen Mitarbeitern überlappt. Der Unterschied in der Strahlensensitivität der beiden Kulturen könnte daher mit der CNV das Gen *CDKN1C* betreffend assoziiert sein.

4.7. Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Einzelzellklone von primären Fibroblasten mit intakten Zellzyklus-Checkpoints und DNA-Reparaturmechanismen verwendet, um die verzögerten Effekte von IR und ihre Auswirkung auf die Krebsentstehung zu untersuchen. Auf allen untersuchten Ebenen (Chromosomen, CNVs und Einzelnukleotide) zeigten sich strahlenbedingte Veränderungen, welche die Tumorentstehung begünstigen könnten. Darüber hinaus wurden geringfügige, zellkultivierungsbedingte Effekte, die auf den normalen Alterungsprozess zurückgehen, beobachtet. Obwohl speziell Veränderungen im *FHIT/FRA3B*-Lokus und der Verlust des Y-Chromosoms über die Destabilisierung des Genoms zur Krebsentstehung beizutragen scheinen, waren die meisten Beobachtungen der vorliegenden Arbeit unabhängig von chromosomaler Instabilität. Letztendlich scheint RIGI einem Zusammenspiel aus mehreren zellulären Prozessen, sowie stochastischen Faktoren, zu unterliegen. Weitere Klone sollten etabliert werden, um die statistische Aussagekraft der bisherigen Ergebnisse zu erhöhen. Die Verwendung von Zellen zusätzlicher Spender könnte bessere Einblicke in die beobachteten interindividuellen Unterschiede geben.

Es ist anzumerken, dass die verwendeten, primären und nicht immortalisierten Zellen nach rund 20 PDs die Seneszenz erreichten. Aufgrund der begrenzten Teilungsfähigkeit stehen daher keine Zellen für nachfolgende Analysen zur Verfügung. Der frühe Eintritt in die Seneszenz könnte auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Dazu gehört, dass für die Studie nicht biopsierte, sondern bereits vom Fötus abgestoßene Zellen verwendet wurden. Zwischen dem Gewinn des Materials und der Klonierung lag zudem eine gewisse Zeitspanne, innerhalb derer sich die Zellen bereits in Kultur befanden und so einige Passagen durchliefen. Wenn Zellen vom Organismus explantiert und für die Kultivierung voneinander getrennt werden, kommt es zu drastischen Veränderungen in ihrer physischen Umgebung, in der Interaktion mit anderen Zellen, sowie zu Änderungen hinsichtlich der natürlichen Faktoren, die das Zellwachstum fördern. Anstelle der Wachstumsförderung, die Zellen natürlicherweise durch benachbarte Zellen erhalten, werden Zellen in Kultur durch Serum stimuliert, welches nur während der Blutgerinnung entsteht [358]. Es konnte gezeigt werden, dass das Wachstum von Zellen durch Zugabe von Medium, in dem bereits andere Zellen kultiviert wurden, stark erhöht werden kann [359]. Zellen sind zudem während der Kultivierung durch das stetige Wechseln des Mediums direkt der Luft ausgesetzt, sodass die auf die Zellen einwirkende Sauerstoffkonzentration sehr viel höher ist als der Sauerstoffgehalt, der im Gewebe auf die

Zellen wirkt [358]. Auch die Temperatur scheint eine nicht zu unterschätzende Rolle zu spielen. Während das Teilungspotential humaner Zellen bei 40 °C bereits nach 20–42 Zellteilungen erschöpft war, durchliefen Zellen der gleichen Herkunft bei 37 °C bis zu 66 Populationsverdopplungen [360]. Insgesamt wäre es für zukünftige Experimente daher von Vorteil, die Zellen und Bedingungen so zu optimieren, dass eine Langzeitkultivierung möglich ist. Kulturen, die über 20 PDs hinaus proliferieren, würden die Analyse genomischer Instabilität zu verschiedenen Zeitpunkten erlauben. Der Vergleich von verschiedenen Zeitpunkten in Subklonen (z. B. nach 40 PDs) könnte zeigen, inwiefern die beobachteten genetischen Veränderungen miteinander verknüpft sind, ob bestimmte Veränderungen andere auslösen, also ihnen vorausgehen oder zeitgleich auftreten und sie damit aufrechterhalten.

Die in der Arbeit verwendeten Techniken haben eine hohe Auflösung, die Exom-Sequenzierung erlaubt sogar die Analyse von einzelnen Nukleotiden. Da das Exom jedoch nur 2 % des gesamten Genoms ausmacht, wären genomweite Analysen von Varianten von Interesse. Diese könnten zeigen, ob RIGI mit Veränderungen in nicht kodierenden Bereichen einhergeht. Die vorliegende Arbeit diene der Grundlagenforschung und identifizierte Marker (CNVs, LOY), die für die Diagnose und Prognose strahleninduzierter Tumore relevant sein könnten. Tumore entstehen in der Regel aus epitheliale Gewebe, in dem eventuell andere Mechanismen relevant sind. Folgestudien an epithelialen Zellen oder im Tiermodell sollten daher angeschlossen werden, um zu zeigen, ob die in der Arbeit gewonnen Erkenntnisse auf andere Gewebe übertragbar sind.

5. Referenzen

5.1. Literaturverzeichnis

1. Goldman, M., *Ionizing radiation and its risks*. West J Med, 1982. **137**(6): p. 540-7.
2. Reisz, J.A., et al., *Effects of ionizing radiation on biological molecules--mechanisms of damage and emerging methods of detection*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(2): p. 260-92.
3. Karger, C.P. and O. Jäkel, *Physikalische Grundlagen*, in *Radiologie*, M. Reiser, F. Kuhn, and J. Debus, Editors. 2017, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 15-36.
4. Kauffmann, G.W., E. Moser, and R. Sauer, *Strahlenarten*, in *Radiologie*, A. Beilmann and A. Gattnarzik, Editors. 2006, Urban&Fischer Verlag: München. p. 9-10.
5. Bücheler, E., K. Lackner, and M. Thelen, *Geschichte und physikalisch-technische Grundlagen*, in *Einführung in die Radiologie*. 2006, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 6.
6. Weber, K.-J. and F. Wenz, *Strahlenbiologische Grundlagen*, in *Strahlentherapie*, M. Wannemacher, F. Wenz, and J. Debus, Editors. 2013, Springer Verlag: Heidelberg. p. 47-86.
7. Munro, T.R., *The site of the target region for radiation-induced mitotic delay in cultured mammalian cells*. Radiat Res, 1970. **44**(3): p. 747-57.
8. Zirkle, R.E. and W. Bloom, *Irradiation of parts of individual cells*. Science, 1953. **117**(3045): p. 487-93.
9. Saha, G.B., *Radiation Biology*, in *Physics and Radiobiology of Nuclear Medicine*. 2001, Springer: New York. p. 183-211.
10. Krieger, H., *Grundlagen zur Strahlenbiologie der Zelle*, in *Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzgesetzes*, U. Sandten, Editor. 2012, Springer Spektrum: Wiesbaden. p. 391-475.
11. Martin, R.F. and W.A. Haseltine, *Range of radiochemical damage to DNA with decay of iodine-125*. Science, 1981. **213**(4510): p. 896-8.
12. Münter, M. and K.-J. Weber, *Strahlenbiologie*, in *Radiologie*, M. Reiser, F. Kuhn, and J. Debus, Editors. 2017, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 37-62.
13. Desouky, O., N. Din, and G. Zhou, *Targeted and non-targeted effects of ionizing radiation*. Vol. 67. 2015.
14. Kauffmann, G.W., E. Moser, and R. Sauer, *Strahlenbiologie*, in *Radiologie*, A. Beilmann and A. Gattnarzik, Editors. 2006, Urban&Fischer Verlag: München. p. 35-61.
15. Powell, S. and T.J. McMillan, *DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation*. Radiother Oncol, 1990. **19**(2): p. 95-108.
16. Kavanagh, J.N., et al., *DNA double strand break repair: a radiation perspective*. Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(18): p. 2458-72.
17. Vaz, B., M. Popovic, and K. Ramadan, *DNA-Protein Crosslink Proteolysis Repair*. Trends Biochem Sci, 2017. **42**(6): p. 483-495.
18. Olive, P.L., *The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation*. Radiat Res, 1998. **150**(5 Suppl): p. S42-51.
19. Marechal, A. and L. Zou, *DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(9).
20. Niida, H. and M. Nakanishi, *DNA damage checkpoints in mammals*. Mutagenesis, 2006. **21**(1): p. 3-9.

21. Zhang, Y. and T. Hunter, *Roles of Chk1 in cell biology and cancer therapy*. Int J Cancer, 2014. **134**(5): p. 1013-23.
22. Khanna, K.K. and S.P. Jackson, *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection*. Nat Genet, 2001. **27**(3): p. 247-54.
23. Harper, J.W. and S.J. Elledge, *The DNA damage response: ten years after*. Mol Cell, 2007. **28**(5): p. 739-45.
24. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. Nature, 2003. **421**(6922): p. 499-506.
25. Rogakou, E.P., et al., *DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139*. J Biol Chem, 1998. **273**(10): p. 5858-68.
26. Stucki, M., et al., *MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks*. Cell, 2005. **123**(7): p. 1213-26.
27. Kuo, L.J. and L.X. Yang, *Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks*. In Vivo, 2008. **22**(3): p. 305-9.
28. Cortez, D., et al., *ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1713-6.
29. de Klein, A., et al., *Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice*. Curr Biol, 2000. **10**(8): p. 479-82.
30. Liu, Q., et al., *Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint*. Genes Dev, 2000. **14**(12): p. 1448-59.
31. Zou, L. and S.J. Elledge, *Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes*. Science, 2003. **300**(5625): p. 1542-8.
32. Falck, J., et al., *The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis*. Nature, 2001. **410**(6830): p. 842-7.
33. Deckbar, D., P.A. Jeggo, and M. Lobrich, *Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2011. **46**(4): p. 271-83.
34. Khosravi, R., et al., *Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 14973-7.
35. Shi, D. and W. Gu, *Dual Roles of MDM2 in the Regulation of p53: Ubiquitination Dependent and Ubiquitination Independent Mechanisms of MDM2 Repression of p53 Activity*. Genes Cancer, 2012. **3**(3-4): p. 240-8.
36. Harper, J.W., et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(4): p. 387-400.
37. DiPaola, R.S., *To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis*. Clin. cancer res., 8: 3512-3519, 2002. Clin Cancer Res, 2002. **8**(11): p. 3311-4.
38. Püschel, G., et al., *Molekularbiologie*, in *Biochemie*. 2011, Georg Thieme Verlag Stuttgart. p. 363-395.
39. Hermeking, H., et al., *14-3-3sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression*. Mol Cell, 1997. **1**(1): p. 3-11.
40. Hein, A.L., M.M. Ouellette, and Y. Yan, *Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (review)*. Int J Oncol, 2014. **45**(5): p. 1813-9.
41. Davis, A.J. and D.J. Chen, *DNA double strand break repair via non-homologous end-joining*. Transl Cancer Res, 2013. **2**(3): p. 130-143.
42. Grabarz, A., et al., *Initiation of DNA double strand break repair: signaling and single-stranded resection dictate the choice between homologous recombination, non-*

- homologous end-joining and alternative end-joining*. Am J Cancer Res, 2012. **2**(3): p. 249-68.
43. Kakarougkas, A. and P.A. Jeggo, *DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism*. Br J Radiol, 2014. **87**(1035): p. 20130685.
 44. Traut, W., *Struktur und Funktion der meiotischen Chromosomen*, in *Chromosomen Klassische und molekulare Cytogenetik*. 1991, Springer Verlag: Berlin-Heidelberg. p. 205-250.
 45. Rothkamm, K., et al., *Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(16): p. 5706-15.
 46. Sengupta, S. and C.C. Harris, *p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(1): p. 44-55.
 47. Wyman, C., D. Ristic, and R. Kanaar, *Homologous recombination-mediated double-strand break repair*. DNA Repair (Amst), 2004. **3**(8-9): p. 827-33.
 48. Nowsheen, S. and E.S. Yang, *The intersection between DNA damage response and cell death pathways*. Exp Oncol, 2012. **34**(3): p. 243-54.
 49. Eriksson, D. and T. Stigbrand, *Radiation-induced cell death mechanisms*. Tumour Biol, 2010. **31**(4): p. 363-72.
 50. Zhang, Y., et al., *Plasma membrane changes during programmed cell deaths*. Cell Res, 2018. **28**(1): p. 9-21.
 51. Wouters, B., *Cell death after irradiation: how, when and why cells die*, in *Basic Clinical Radiobiology*, M. Joiner and A. van der Kogel, Editors. 2009, Taylor&Francis Group: Florida. p. 27-40.
 52. Maier, P., et al., *Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(1).
 53. Day, R.M., A.L. Snow, and R.A. Panganiban, *Radiation-induced accelerated senescence: a fate worse than death?* Cell Cycle, 2014. **13**(13): p. 2011-2.
 54. Chen, J. and M.S. Goligorsky, *Premature senescence of endothelial cells: Methusaleh's dilemma*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **290**(5): p. H1729-39.
 55. Panganiban, R.A. and R.M. Day, *Inhibition of IGF-1R prevents ionizing radiation-induced primary endothelial cell senescence*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e78589.
 56. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2825-37.
 57. Han, J.S., et al., *Bimodal activation of BubR1 by Bub3 sustains mitotic checkpoint signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(40): p. E4185-93.
 58. Schiebel, E., *Segregation der Chromosomen: Zellzyklus, Mitose und Meiose*, in *Molekulare Genetik*, A. Nordheim and R. Knippers, Editors. 2015, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 199-218.
 59. Lara-Gonzalez, P., F.G. Westhorpe, and S.S. Taylor, *The spindle assembly checkpoint*. Curr Biol, 2012. **22**(22): p. R966-80.
 60. Angelogianni, P. and C. Gianoulakis, *Prenatal exposure to ethanol alters the ontogeny of the beta-endorphin response to stress*. Alcohol Clin Exp Res, 1989. **13**(4): p. 564-71.
 61. van Gent, D.C. and R. Kanaar, *Exploiting DNA repair defects for novel cancer therapies*. Mol Biol Cell, 2016. **27**(14): p. 2145-8.
 62. Hall, E.J. and A.J. Giaccia, *Molecular Mechanisms of DNA and Chromosome Damage and Repair*, in *Radiobiology for the Radiologist*, C.W. Mitchell, Editor. 2012, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS: Philadelphia. p. 12-34.

63. Hall, E.J. and A.J. Giaccia, *Radiation Carcinogenesis*, in *Radiobiology for the Radiologist*, C.W. Mitchell, Editor. 2012, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS: Philadelphia. p. 135-158.
64. Karger, C.P. and O. Jäkel, *Grundlagen des Strahlenschutzes*, in *Radiologie*, M. Reiser, F. Kuhn, and J. Debus, Editors. 2017, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 63-72.
65. Han, W. and K.N. Yu, *Ionizing Radiation, DNA Double Strang Breaks and Mutation*, in *Advances in Genetics Research*, K. Urbano, Editor. 2010, Nova Science Publishers, Inc.: New York (USA). p. 197-210.
66. Pfeiffer, P., et al., *DNA lesions and repair*. *Mutat Res*, 1996. **366**(2): p. 69-80.
67. Nakano, M., et al., *Detection of stable chromosome aberrations by FISH in A-bomb survivors: comparison with previous solid Giemsa staining data on the same 230 individuals*. *Int J Radiat Biol*, 2001. **77**(9): p. 971-7.
68. Lloyd, D.C. and G.W. Dolphin, *Radiation-induced chromosome damage in human lymphocytes*. *Br J Ind Med*, 1977. **34**(4): p. 261-73.
69. Bakhoun, S.F., et al., *Numerical chromosomal instability mediates susceptibility to radiation treatment*. *Nature Communications*, 2015. **6**: p. 5990.
70. Cimini, D., et al., *Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells*. *J Cell Biol*, 2001. **153**(3): p. 517-27.
71. Thompson, S.L. and D.A. Compton, *Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells*. *J Cell Biol*, 2008. **180**(4): p. 665-72.
72. Bakhoun, S.F., et al., *DNA-damage response during mitosis induces whole-chromosome missegregation*. *Cancer Discov*, 2014. **4**(11): p. 1281-9.
73. Schvartzman, J.-M., R. Sotillo, and R. Benezra, *Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease*. *Nature Reviews Cancer*, 2010. **10**: p. 102.
74. Huang, L., A.R. Snyder, and W.F. Morgan, *Radiation-induced genomic instability and its implications for radiation carcinogenesis*. *Oncogene*, 2003. **22**(37): p. 5848-54.
75. Lorimore, S.A., P.J. Coates, and E.G. Wright, *Radiation-induced genomic instability and bystander effects: inter-related nontargeted effects of exposure to ionizing radiation*. *Oncogene*, 2003. **22**(45): p. 7058-69.
76. Holmberg, K., et al., *Delayed chromosomal instability in human T-lymphocyte clones exposed to ionizing radiation*. *Int J Radiat Biol*, 1995. **68**(3): p. 245-55.
77. Kadhim, M.A., et al., *Transmission of chromosomal instability after plutonium alpha-particle irradiation*. *Nature*, 1992. **355**(6362): p. 738-40.
78. Marder, B.A. and W.F. Morgan, *Delayed chromosomal instability induced by DNA damage*. *Mol Cell Biol*, 1993. **13**(11): p. 6667-77.
79. Pampfer, S. and C. Streffer, *Increased chromosome aberration levels in cells from mouse fetuses after zygote X-irradiation*. *Int J Radiat Biol*, 1989. **55**(1): p. 85-92.
80. Chang, W.P. and J.B. Little, *Persistently elevated frequency of spontaneous mutations in progeny of CHO clones surviving X-irradiation: association with delayed reproductive death phenotype*. *Mutat Res*, 1992. **270**(2): p. 191-9.
81. Harper, K., S.A. Lorimore, and E.G. Wright, *Delayed appearance of radiation-induced mutations at the Hprt locus in murine hemopoietic cells*. *Exp Hematol*, 1997. **25**(3): p. 263-9.
82. Weissenborn, U. and C. Streffer, *Analysis of structural and numerical chromosomal anomalies at the first, second, and third mitosis after irradiation of one-cell mouse embryos with X-rays or neutrons*. *Int J Radiat Biol*, 1988. **54**(3): p. 381-94.

83. Kadhim, M.A., S.J. Marsden, and E.G. Wright, *Radiation-induced chromosomal instability in human fibroblasts: temporal effects and the influence of radiation quality*. Int J Radiat Biol, 1998. **73**(2): p. 143-8.
84. Little, J.B., et al., *Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenetic effects of X rays and alpha particles*. Radiat Res, 1997. **148**(4): p. 299-307.
85. Grosovsky, A.J., et al., *Clonal analysis of delayed karyotypic abnormalities and gene mutations in radiation-induced genetic instability*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(11): p. 6252-62.
86. Jamali, M. and K.R. Trott, *Increased micronucleus frequency in the progeny of irradiated Chinese hamster cells*. Int J Radiat Biol, 1996. **69**(3): p. 301-7.
87. Piao, C.Q. and T.K. Hei, *Gene amplification and microsatellite instability induced in tumorigenic human bronchial epithelial cells by alpha particles and heavy ions*. Radiat Res, 2001. **155**(1 Pt 2): p. 263-267.
88. McIlrath, J., et al., *Radiation-induced genomic instability in immortalized haemopoietic stem cells*. Int J Radiat Biol, 2003. **79**(1): p. 27-34.
89. Mendonca, M.S., et al., *Delayed apoptotic responses associated with radiation-induced neoplastic transformation of human hybrid cells*. Cancer Res, 1999. **59**(16): p. 3972-9.
90. Evans, H.H., et al., *Diverse delayed effects in human lymphoblastoid cells surviving exposure to high-LET (56)Fe particles or low-LET (137)Cs gamma radiation*. Radiat Res, 2001. **156**(3): p. 259-71.
91. Limoli, C.L., et al., *Genomic instability induced by high and low LET ionizing radiation*. Adv Space Res, 2000. **25**(10): p. 2107-17.
92. Little, J.B., *Radiation-induced genomic instability*. Int J Radiat Biol, 1998. **74**(6): p. 663-71.
93. Morgan, W.F., *Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects in vitro*. Radiat Res, 2003. **159**(5): p. 567-80.
94. Morgan, W.F., et al., *Genomic instability induced by ionizing radiation*. Radiat Res, 1996. **146**(3): p. 247-58.
95. Ullrich, R.L. and C.M. Davis, *Radiation-induced cytogenetic instability in vivo*. Radiat Res, 1999. **152**(2): p. 170-3.
96. Watson, G.E., S.A. Lorimore, and E.G. Wright, *Long-term in vivo transmission of alpha-particle-induced chromosomal instability in murine haemopoietic cells*. Int J Radiat Biol, 1996. **69**(2): p. 175-82.
97. Watson, G.E., et al., *In vivo chromosomal instability and transmissible aberrations in the progeny of haemopoietic stem cells induced by high- and low-LET radiations*. Int J Radiat Biol, 2001. **77**(4): p. 409-17.
98. Wright, E.G., *Inherited and inducible chromosomal instability: a fragile bridge between genome integrity mechanisms and tumourigenesis*. J Pathol, 1999. **187**(1): p. 19-27.
99. Limoli, C.L., et al., *Critical target and dose and dose-rate responses for the induction of chromosomal instability by ionizing radiation*. Radiat Res, 1999. **151**(6): p. 677-85.
100. Limoli, C.L., et al., *Chromosomal instability induced by heavy ion irradiation*. Int J Radiat Biol, 2000. **76**(12): p. 1599-606.
101. Sabatier, L., B. Dutrillaux, and M.B. Martin, *Chromosomal instability*. Nature, 1992. **357**: p. 548.
102. Weinhold, B., *Epigenetics: the science of change*. Environ Health Perspect, 2006. **114**(3): p. A160-7.

103. Kovalchuk, O. and J.E. Baulch, *Epigenetic changes and nontargeted radiation effects-- is there a link?* Environ Mol Mutagen, 2008. **49**(1): p. 16-25.
104. Pogribny, I., et al., *Dose-dependence, sex- and tissue-specificity, and persistence of radiation-induced genomic DNA methylation changes.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(4): p. 1253-61.
105. Aypar, U., W.F. Morgan, and J.E. Baulch, *Radiation-induced genomic instability: are epigenetic mechanisms the missing link?* Int J Radiat Biol, 2011. **87**(2): p. 179-91.
106. Kaup, S., et al., *Radiation-induced genomic instability is associated with DNA methylation changes in cultured human keratinocytes.* Mutat Res, 2006. **597**(1-2): p. 87-97.
107. Limoli, C.L., et al., *Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells.* Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3107-11.
108. Lorimore, S.A., et al., *Inflammatory-type responses after exposure to ionizing radiation in vivo: a mechanism for radiation-induced bystander effects?* Oncogene, 2001. **20**(48): p. 7085-95.
109. Lorimore, S.A. and E.G. Wright, *Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review.* Int J Radiat Biol, 2003. **79**(1): p. 15-25.
110. Dayal, D., et al., *Hydrogen peroxide mediates the radiation-induced mutator phenotype in mammalian cells.* Biochem J, 2008. **413**(1): p. 185-91.
111. Dayal, D., et al., *Mitochondrial complex II dysfunction can contribute significantly to genomic instability after exposure to ionizing radiation.* Radiat Res, 2009. **172**(6): p. 737-45.
112. Laiakis, E.C., J.E. Baulch, and W.F. Morgan, *Interleukin 8 exhibits a pro-mitogenic and pro-survival role in radiation induced genomically unstable cells.* Mutat Res, 2008. **640**(1-2): p. 74-81.
113. Werner, E., H. Wang, and P.W. Doetsch, *Role of Pro-inflammatory Cytokines in Radiation-Induced Genomic Instability in Human Bronchial Epithelial Cells.* Radiat Res, 2015. **184**(6): p. 621-9.
114. Burt, J.J., P.A. Thompson, and R.M. Lafrenie, *Non-targeted effects and radiation-induced carcinogenesis: a review.* J Radiol Prot, 2016. **36**(1): p. R23-35.
115. Little, J.B., *Genomic instability and bystander effects: a historical perspective.* Oncogene, 2003. **22**(45): p. 6978-87.
116. Nagasawa, H. and J.B. Little, *Induction of sister chromatid exchanges by extremely low doses of alpha-particles.* Cancer Res, 1992. **52**(22): p. 6394-6.
117. Nagasawa, H. and J.B. Little, *Bystander effect for chromosomal aberrations induced in wild-type and repair deficient CHO cells by low fluences of alpha particles.* Mutat Res, 2002. **508**(1-2): p. 121-9.
118. Shao, C., et al., *Targeted cytoplasmic irradiation induces bystander responses.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13495-500.
119. Azzam, E.I., et al., *Oxidative metabolism modulates signal transduction and micronucleus formation in bystander cells from alpha-particle-irradiated normal human fibroblast cultures.* Cancer Res, 2002. **62**(19): p. 5436-42.
120. Yang, H., N. Asaad, and K.D. Held, *Medium-mediated intercellular communication is involved in bystander responses of X-ray-irradiated normal human fibroblasts.* Oncogene, 2005. **24**(12): p. 2096-103.

121. Mothersill, C. and C. Seymour, *Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells*. Int J Radiat Biol, 1997. **71**(4): p. 421-7.
122. Lewis, D.A., et al., *Production of delayed death and neoplastic transformation in CGL1 cells by radiation-induced bystander effects*. Radiat Res, 2001. **156**(3): p. 251-8.
123. Belyakov, O.V., et al., *Bystander-induced apoptosis and premature differentiation in primary urothelial explants after charged particle microbeam irradiation*. Radiat Prot Dosimetry, 2002. **99**(1-4): p. 249-51.
124. Little, J.B., *Radiation carcinogenesis*. Carcinogenesis, 2000. **21**(3): p. 397-404.
125. UNSCEAR, *Effects of Ionizing Radiation UNSCEAR 2006 Report to the General Assembly with Scientific Annexes*, in *UNSCEAR 2006 Report*, U.N.S.C.o.t.E.o.A. Radiation, Editor. 2006, United Nations: New York.
126. Little, J.B., *Genomic instability and radiation*. J Radiol Prot, 2003. **23**(2): p. 173-81.
127. Streffer, C., *Strong association between cancer and genomic instability*. Radiat Environ Biophys, 2010. **49**(2): p. 125-31.
128. Shiloh, Y., *Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart*. Annu Rev Genet, 1997. **31**: p. 635-62.
129. Cooper, G., *Tumor Suppressor Genes*, in *The Cell: A Molecular Approach*. 2000, Sinauer Associates: Sunderland, MA, USA.
130. Hall, E.J. and A.J. Giaccia, *Cancer Biology*, in *Radiobiology for the Radiologist*, C.W. Mitchell, Editor. 2012, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS: Philadelphia. p. 273-302.
131. Caldas, C. and A.R. Venkitaraman, *Tumor Suppressor Genes*, in *Encyclopedia of Genetics*, S. Brenner and J.H. Miller, Editors. 2001, Academic Press: New York. p. 2081-2088.
132. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Modelling the molecular circuitry of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**: p. 331.
133. Loeb, L.A., *Human Cancers Express a Mutator Phenotype: Hypothesis, Origin, and Consequences*. Cancer Res, 2016. **76**(8): p. 2057-9.
134. Roukos, D.H., *Assessing both genetic variation (SNPs/CNVs) and gene-environment interactions may lead to personalized gastric cancer prevention*. Expert Rev Mol Diagn, 2009. **9**(1): p. 1-6.
135. Ionita-Laza, I., et al., *Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis*. Genomics, 2009. **93**(1): p. 22-6.
136. Schneider, J.A., et al., *DNA variability of human genes*. Mech Ageing Dev, 2003. **124**(1): p. 17-25.
137. Collins, F.S., L.D. Brooks, and A. Chakravarti, *A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation*. Genome Res, 1998. **8**(12): p. 1229-31.
138. Syvanen, A.C., *Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(12): p. 930-42.
139. Ghosh, K. and A. Gorakshakar, *Innumerable studies on single nucleotide polymorphisms: What could be its utility?* Indian J Hum Genet, 2013. **19**(4): p. 381-3.
140. Easton, D.F., et al., *Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci*. Nature, 2007. **447**(7148): p. 1087-93.
141. Diabetes Genetics Initiative of Broad Institute of, H., et al., *Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels*. Science, 2007. **316**(5829): p. 1331-6.
142. Moffatt, M.F., et al., *Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 470-3.

143. Duerr, R.H., et al., *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. Science, 2006. **314**(5804): p. 1461-3.
144. Zhang, F., et al., *Copy number variation in human health, disease, and evolution*. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2009. **10**: p. 451-81.
145. Redon, R., et al., *Global variation in copy number in the human genome*. Nature, 2006. **444**(7118): p. 444-54.
146. Sebat, J., et al., *Large-scale copy number polymorphism in the human genome*. Science, 2004. **305**(5683): p. 525-8.
147. Iafrate, A.J., et al., *Detection of large-scale variation in the human genome*. Nat Genet, 2004. **36**(9): p. 949-51.
148. Nord, A., S.J. Salipante, and C. Pritchard, *Copy Number Variant Detection Using Next-Generation Sequencing*, in *Clinical Genomics*, S. Kulkarni and J. Pfeifer, Editors. 2015, Elsevier: London. p. 166-187.
149. Hastings, P.J., et al., *Mechanisms of change in gene copy number*. Nat Rev Genet, 2009. **10**(8): p. 551-64.
150. Radke, D.W. and C. Lee, *Adaptive potential of genomic structural variation in human and mammalian evolution*. Brief Funct Genomics, 2015. **14**(5): p. 358-68.
151. Perry, G.H., et al., *Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation*. Nat Genet, 2007. **39**(10): p. 1256-60.
152. Stingele, S., et al., *Global analysis of genome, transcriptome and proteome reveals the response to aneuploidy in human cells*. Mol Syst Biol, 2012. **8**: p. 608.
153. Tang, Y.C. and A. Amon, *Gene copy-number alterations: a cost-benefit analysis*. Cell, 2013. **152**(3): p. 394-405.
154. Almal, S.H. and H. Padh, *Implications of gene copy-number variation in health and diseases*. J Hum Genet, 2012. **57**(1): p. 6-13.
155. Zare, F., et al., *An evaluation of copy number variation detection tools for cancer using whole exome sequencing data*. BMC Bioinformatics, 2017. **18**(1): p. 286.
156. Alberts, B., et al., *Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family*, in *Molecular Biology of the Cell*. 2002, Garland Science: New York.
157. McAnulty, R.J., *Fibroblasts and myofibroblasts: their source, function and role in disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2007. **39**(4): p. 666-71.
158. Li, B. and J.H. Wang, *Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing: force generation and measurement*. J Tissue Viability, 2011. **20**(4): p. 108-20.
159. Clark, D.P. and N.J. Pazdernik, *Molekularbiologie von Krebs*, in *Molekulare Biotechnologie*, U.G. Goltmann and M. Barth, Editors. 2009, Springer Verlag: Heidelberg. p. 475-498.
160. Schmitz, S., *Zellbiologische Grundlagen*, in *Der Experimentator Zellkultur*, U.G. Moltmann and B. Saglio, Editors. 2011, Spektrum: Heidelberg. p. 14-37.
161. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
162. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
163. Schneider, E.L. and Y. Mitsui, *The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(10): p. 3584-8.
164. Martin, G.M., C.A. Sprague, and C.J. Epstein, *Replicative life-span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue, and genotype*. Lab Invest, 1970. **23**(1): p. 86-92.
165. Nath, N., et al., *Exome Sequencing Discloses Ionizing-radiation-induced DNA Variants in the Genome of Human Gingiva Fibroblasts*. Health Phys, 2018. **115**(1): p. 151-160.

166. Limoli, C.L., et al., *Apoptosis, reproductive failure, and oxidative stress in Chinese hamster ovary cells with compromised genomic integrity*. *Cancer Res*, 1998. **58**(16): p. 3712-8.
167. Thomas, S.N., et al., *Quantitative proteomic analysis of mitochondrial proteins reveals prosurvival mechanisms in the perpetuation of radiation-induced genomic instability*. *Free Radic Biol Med*, 2012. **53**(3): p. 618-28.
168. Rieder, C.L. and R.E. Palazzo, *Colcemid and the mitotic cycle*. *J Cell Sci*, 1992. **102 (Pt 3)**: p. 387-92.
169. Speicher, M., *Zytogenetik*, in *Taschenlehrbuch Humangenetik*, J. Murken, T. Grimm, and E. Holinski-Feder, Editors. 2006, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 125-233.
170. Buselmaier, W., *Chromosomen des Menschen*, in *Biologie für Mediziner*, W. Buselmaier, Editor. 2015, Springer Verlag: Heidelberg. p. 155-170.
171. Verma, P.S. and V.K. Agarwal, *Human Cytogenetics and Syndromes*, in *Genetics*. 2014, S.Chand&Company PVT. LTD.: New Delhi, IND. p. 568-584.
172. ISCN, *An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016)*, ed. J. McGowan-Jordan, A. Simons, and M. Schmid. 2016, Basel, Freiburg: Karger Verlag.
173. LaFramboise, T., *Single nucleotide polymorphism arrays: a decade of biological, computational and technological advances*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(13): p. 4181-93.
174. Adler, A.J., G.B. Wiley, and P.M. Gaffney, *Infinium assay for large-scale SNP genotyping applications*. *J Vis Exp*, 2013(81): p. e50683.
175. Attiyeh, E.F., et al., *Genomic copy number determination in cancer cells from single nucleotide polymorphism microarrays based on quantitative genotyping corrected for aneuploidy*. *Genome Res*, 2009. **19**(2): p. 276-83.
176. Schouten, J.P., et al., *Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(12): p. e57.
177. den Dunnen, J.T., et al., *HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update*. *Hum Mutat*, 2016. **37**(6): p. 564-9.
178. McLaren, W., et al., *The Ensembl Variant Effect Predictor*. *Genome Biology*, 2016. **17**(1): p. 122.
179. Flunkert, J., et al., *Genetic and epigenetic changes in clonal descendants of irradiated human fibroblasts*. *Exp Cell Res*, 2018.
180. Wilson, T.E., et al., *Large transcription units unify copy number variants and common fragile sites arising under replication stress*. *Genome Res*, 2015. **25**(2): p. 189-200.
181. Ellegren, H., N.G. Smith, and M.T. Webster, *Mutation rate variation in the mammalian genome*. *Curr Opin Genet Dev*, 2003. **13**(6): p. 562-8.
182. Alexandrov, L.B., et al., *Signatures of mutational processes in human cancer*. *Nature*, 2013. **500**(7463): p. 415-21.
183. Helleday, T., S. Eshtad, and S. Nik-Zainal, *Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers*. *Nat Rev Genet*, 2014. **15**(9): p. 585-98.
184. Díaz-Gay, M., et al., *Mutational Signatures in Cancer (MuSiCa): a web application to implement mutational signatures analysis in cancer samples*. *BMC Bioinformatics*, 2018. **19**(1): p. 224.
185. Wannemacher, M., F. Wenz, and J. Debus, *Allgemeine Grundlagen*, in *Strahlentherapie*, H. Seutemann, Editor. 2013, Springer Verlag: Heidelberg. p. 3-10.
186. Emens, L.A., et al., *Cancer immunotherapy: Opportunities and challenges in the rapidly evolving clinical landscape*. *Eur J Cancer*, 2017. **81**: p. 116-129.

187. Schulz-Ertner, D., F. Sterzing, and C.P. Karger, *Strahlentherapie*, in *Radiologie*, M. Reiser, F. Kuhn, and J. Debus, Editors. 2017, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 7-150.
188. Smith, L.E., et al., *Radiation-induced genomic instability: radiation quality and dose response*. *Health Phys*, 2003. **85**(1): p. 23-9.
189. Suzuki, K., et al., *Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability*. *Oncogene*, 2003. **22**(45): p. 6988-93.
190. Limoli, C.L., et al., *Differential induction of chromosomal instability by DNA strand-breaking agents*. *Cancer Res*, 1997. **57**(18): p. 4048-56.
191. Limoli, C.L., et al., *Induction of chromosome aberrations and delayed genomic instability by photochemical processes*. *Photochem Photobiol*, 1998. **67**(2): p. 233-8.
192. Morgan, W.F., et al., *DNA double-strand breaks, chromosomal rearrangements, and genomic instability*. *Mutat Res*, 1998. **404**(1-2): p. 125-8.
193. Griffin, C.S., et al., *Absence of delayed chromosomal instability in a normal human fibroblast cell line after 125I iododeoxyuridine*. *Int J Radiat Biol*, 2000. **76**(7): p. 963-9.
194. Thompson, S.L. and D.A. Compton, *Chromosomes and cancer cells*. *Chromosome Res*, 2011. **19**(3): p. 433-44.
195. Sansregret, L. and C. Swanton, *The Role of Aneuploidy in Cancer Evolution*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017. **7**(1).
196. Vral, A., et al., *Chromosomal aberrations and in vitro radiosensitivity: intra-individual versus inter-individual variability*. *Toxicol Lett*, 2004. **149**(1-3): p. 345-52.
197. Pajic, J., et al., *Inter-individual variability in the response of human peripheral blood lymphocytes to ionizing radiation: comparison of the dicentric and micronucleus assays*. *Radiat Environ Biophys*, 2015. **54**(3): p. 317-25.
198. Sanford, K.K., et al., *Radiation-induced chromatid breaks and DNA repair in blood lymphocytes of patients with dysplastic nevi and/or cutaneous melanoma*. *J Invest Dermatol*, 1997. **109**(4): p. 546-9.
199. Parshad, R. and K.K. Sanford, *Radiation-induced chromatid breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2001. **37**(2): p. 87-96.
200. Ensminger, M., et al., *DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair*. *J Cell Biol*, 2014. **206**(1): p. 29-43.
201. Bryant, P.E., *Mechanisms of radiation-induced chromatid breaks*. *Mutat Res*, 1998. **404**(1-2): p. 107-11.
202. Parshad, R., K.K. Sanford, and G.M. Jones, *Chromatid damage after G2 phase x-irradiation of cells from cancer-prone individuals implicates deficiency in DNA repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1983. **80**(18): p. 5612-6.
203. Parshad, R., et al., *Chromosomal radiosensitivity of human tumor cells during the G2 cell cycle period*. *Cancer Res*, 1984. **44**(12 Pt 1): p. 5577-82.
204. Holmberg, K., et al., *Clonal chromosome aberrations and genomic instability in X-irradiated human T-lymphocyte cultures*. *Mutat Res*, 1993. **286**(2): p. 321-30.
205. Lee, C.L., S.H. Lee, and O.P. Kamra, *Studies on isolated cloned populations from irradiated human embryonic cell cultures*. *Cytogenet Cell Genet*, 1979. **24**(3): p. 150-9.
206. Bauchinger, M. and G. Gotz, *Distribution of radiation induced lesions in human chromosomes and dose-effect relation analysed with G-banding*. *Radiat Environ Biophys*, 1979. **16**(4): p. 355-66.
207. Barrios, L., et al., *Cytogenetic effects of radiotherapy. Breakpoint distribution in induced chromosome aberrations*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1989. **41**(1): p. 61-70.
208. Lee, C.L. and O.P. Kamra, *The pattern of radiation-induced transmissible aberrations in a human cell culture*. *Hum Genet*, 1981. **57**(4): p. 380-4.

209. Kano, Y. and J.B. Little, *Site-specific chromosomal rearrangements induced in human diploid cells by x-irradiation*. *Cytogenet Cell Genet*, 1986. **41**(1): p. 22-9.
210. Tucker, J.D., D.A. Lee, and D.H. Moore, 2nd, *Validation of chromosome painting. II. A detailed analysis of aberrations following high doses of ionizing radiation in vitro*. *Int J Radiat Biol*, 1995. **67**(1): p. 19-28.
211. Cigarran, S., et al., *Relationship between the DNA content of human chromosomes and their involvement in radiation-induced structural aberrations, analysed by painting*. *Int J Radiat Biol*, 1998. **74**(4): p. 449-55.
212. Boei, J.J., S. Vermeulen, and A.T. Natarajan, *Differential involvement of chromosomes 1 and 4 in the formation of chromosomal aberrations in human lymphocytes after X-irradiation*. *Int J Radiat Biol*, 1997. **72**(2): p. 139-45.
213. Barquinero, J.F., et al., *DNA-proportional distribution of radiation-induced chromosome aberrations analysed by fluorescence in situ hybridization painting of all chromosomes of a human female karyotype*. *Int J Radiat Biol*, 1998. **74**(3): p. 315-23.
214. Kim, G.J., K. Chandrasekaran, and W.F. Morgan, *Mitochondrial dysfunction, persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability: a review*. *Mutagenesis*, 2006. **21**(6): p. 361-7.
215. Antwi, D.A., et al., *Radiation-induced epigenetic DNA methylation modification of radiation-response pathways*. *Epigenetics*, 2013. **8**(8): p. 839-48.
216. Eden, A., et al., *Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation*. *Science*, 2003. **300**(5618): p. 455.
217. Ehrlich, M., *DNA hypomethylation in cancer cells*. *Epigenomics*, 2009. **1**(2): p. 239-59.
218. Sharma, S., T.K. Kelly, and P.A. Jones, *Epigenetics in cancer*. *Carcinogenesis*, 2010. **31**(1): p. 27-36.
219. Wilson, A.S., B.E. Power, and P.L. Molloy, *DNA hypomethylation and human diseases*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1775**(1): p. 138-62.
220. Baulch, J.E., et al., *Genetic and epigenetic changes in chromosomally stable and unstable progeny of irradiated cells*. *PLoS One*, 2014. **9**(9): p. e107722.
221. Clutton, S.M., et al., *Radiation-induced genomic instability and persisting oxidative stress in primary bone marrow cultures*. *Carcinogenesis*, 1996. **17**(8): p. 1633-9.
222. Limoli, C.L. and E. Giedzinski, *Induction of chromosomal instability by chronic oxidative stress*. *Neoplasia*, 2003. **5**(4): p. 339-46.
223. Hunt, C.R., et al., *Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress*. *Cancer Res*, 1998. **58**(17): p. 3986-92.
224. Roy, K., et al., *Hypoxia relieves X-ray-induced delayed effects in normal human embryo cells*. *Radiat Res*, 2000. **154**(6): p. 659-66.
225. Slane, B.G., et al., *Mutation of succinate dehydrogenase subunit C results in increased O₂·, oxidative stress, and genomic instability*. *Cancer Res*, 2006. **66**(15): p. 7615-20.
226. Mavragani, I.V., et al., *Complex DNA Damage: A Route to Radiation-Induced Genomic Instability and Carcinogenesis*. *Cancers (Basel)*, 2017. **9**(7).
227. Sudo, H., et al., *Karyotypic instability and centrosome aberrations in the progeny of finite life-span human mammary epithelial cells exposed to sparsely or densely ionizing radiation*. *Radiat Res*, 2008. **170**(1): p. 23-32.
228. Hille, A., et al., *Spontaneous and radiation-induced chromosomal instability and persistence of chromosome aberrations after radiotherapy in lymphocytes from prostate cancer patients*. *Radiat Environ Biophys*, 2010. **49**(1): p. 27-37.
229. Cho, Y.H., et al., *Delayed Numerical Chromosome Aberrations in Human Fibroblasts by Low Dose of Radiation*. *Int J Environ Res Public Health*, 2015. **12**(12): p. 15162-72.

230. Maan, A.A., et al., *The Y chromosome: a blueprint for men's health?* Eur J Hum Genet, 2017. **25**(11): p. 1181-1188.
231. Quintana-Murci, L. and M. Fellous, *The Human Y Chromosome: The Biological Role of a "Functional Wasteland"*. J Biomed Biotechnol, 2001. **1**(1): p. 18-24.
232. Skaletsky, H., et al., *The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes*. Nature, 2003. **423**(6942): p. 825-37.
233. Pierre, R.V. and H.C. Hoagland, *Age-associated aneuploidy: loss of Y chromosome from human bone marrow cells with aging*. Cancer, 1972. **30**(4): p. 889-94.
234. Guttenbach, M., et al., *Sex chromosome loss and aging: in situ hybridization studies on human interphase nuclei*. Am J Hum Genet, 1995. **57**(5): p. 1143-50.
235. Forsberg, L.A., et al., *Mosaic loss of chromosome Y in peripheral blood is associated with shorter survival and higher risk of cancer*. Nat Genet, 2014. **46**(6): p. 624-8.
236. Dumanski, J.P., et al., *Mutagenesis. Smoking is associated with mosaic loss of chromosome Y*. Science, 2015. **347**(6217): p. 81-3.
237. Dumanski, J.P., et al., *Mosaic Loss of Chromosome Y in Blood Is Associated with Alzheimer Disease*. Am J Hum Genet, 2016. **98**(6): p. 1208-1219.
238. Zhou, W., et al., *Mosaic loss of chromosome Y is associated with common variation near TCL1A*. Nat Genet, 2016. **48**(5): p. 563-8.
239. Forsberg, L.A., D. Gisselsson, and J.P. Dumanski, *Mosaicism in health and disease - clones picking up speed*. Nat Rev Genet, 2017. **18**(2): p. 128-142.
240. Lleo, A., et al., *Y chromosome loss in male patients with primary biliary cirrhosis*. J Autoimmun, 2013. **41**: p. 87-91.
241. Persani, L., et al., *Increased loss of the Y chromosome in peripheral blood cells in male patients with autoimmune thyroiditis*. J Autoimmun, 2012. **38**(2-3): p. J193-6.
242. Noveski, P., et al., *Loss of Y Chromosome in Peripheral Blood of Colorectal and Prostate Cancer Patients*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146264.
243. Forsberg, L.A., *Loss of chromosome Y (LOY) in blood cells is associated with increased risk for disease and mortality in aging men*. Hum Genet, 2017. **136**(5): p. 657-663.
244. Vial, T. and J. Descotes, *Immunosuppressive drugs and cancer*. Toxicology, 2003. **185**(3): p. 229-40.
245. Eisenberg, M.L., et al., *Increased risk of cancer among azoospermic men*. Fertil Steril, 2013. **100**(3): p. 681-5.
246. Konig, J.J., et al., *Gain and loss of chromosomes 1, 7, 8, 10, 18, and Y in 46 prostate cancers*. Hum Pathol, 1996. **27**(7): p. 720-7.
247. Haapala, K., et al., *Chromosomal changes in locally recurrent, hormone-refractory prostate carcinomas by karyotyping and comparative genomic hybridization*. Cancer Genet Cytogenet, 2001. **131**(1): p. 74-8.
248. Wong, H.Y., et al., *TMSB4Y is a candidate tumor suppressor on the Y chromosome and is deleted in male breast cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(42): p. 44927-40.
249. Heng, Y.W. and C.G. Koh, *Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(10): p. 1622-33.
250. Thery, M. and M. Bornens, *Cell shape and cell division*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(6): p. 648-57.
251. Kamper-Jorgensen, M., *Microchimerism and survival after breast and colon cancer diagnosis*. Chimerism, 2012. **3**(3): p. 72-3.
252. Vijayakumar, S., et al., *The human Y chromosome suppresses the tumorigenicity of PC-3, a human prostate cancer cell line, in athymic nude mice*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **44**(4): p. 365-72.

253. Premi, S., et al., *Unique signatures of natural background radiation on human Y chromosomes from Kerala, India*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4541.
254. Gordon, D.J., B. Resio, and D. Pellman, *Causes and consequences of aneuploidy in cancer*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(3): p. 189-203.
255. Compton, D.A., *Mechanisms of aneuploidy*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(1): p. 109-13.
256. Kim, J. and S.A. MacNeill, *Genome stability: a new member of the RFC family*. Curr Biol, 2003. **13**(22): p. R873-5.
257. Hanna, J.S., et al., *Saccharomyces cerevisiae CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(9): p. 3144-58.
258. Berkowitz, K.M., et al., *Disruption of CHTF18 causes defective meiotic recombination in male mice*. PLoS Genet, 2012. **8**(11): p. e1002996.
259. Yan, X., R. Habedanck, and E.A. Nigg, *A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(2): p. 634-44.
260. Scheidecker, S., et al., *Mutations in TUBGCP4 alter microtubule organization via the gamma-tubulin ring complex in autosomal-recessive microcephaly with chorioretinopathy*. Am J Hum Genet, 2015. **96**(4): p. 666-74.
261. Bossi, D., et al., *Functional characterization of a novel FGFR1OP-RET rearrangement in hematopoietic malignancies*. Mol Oncol, 2014. **8**(2): p. 221-31.
262. Broderick, S.R., et al., *SCCRO promotes glioma formation and malignant progression in mice*. Neoplasia, 2010. **12**(6): p. 476-84.
263. Yamamoto, K., et al., *Mixed Phenotype Acute Leukemia with t(12;17)(p13;q21)/TAF15-ZNF384 and Other Chromosome Abnormalities*. Cytogenet Genome Res, 2016. **149**(3): p. 165-170.
264. Patra, K.C., et al., *Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer*. Cancer Cell, 2013. **24**(2): p. 213-228.
265. Duan, S., et al., *FBXO11 targets BCL6 for degradation and is inactivated in diffuse large B-cell lymphomas*. Nature, 2012. **481**(7379): p. 90-3.
266. Wang, J., et al., *SRPK2 promotes the growth and migration of the colon cancer cells*. Gene, 2016. **586**(1): p. 41-7.
267. Grolez, G.P. and D. Gkika, *TRPM8 Puts the Chill on Prostate Cancer*. Pharmaceuticals (Basel), 2016. **9**(3).
268. Wang, L., et al., *DOCK2 regulates cell proliferation through Rac and ERK activation in B cell lymphoma*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **395**(1): p. 111-5.
269. Fernandez, M.R., M.D. Henry, and R.E. Lewis, *Kinase suppressor of Ras 2 (KSR2) regulates tumor cell transformation via AMPK*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(18): p. 3718-31.
270. Wright, D.J., et al., *Genetic variants associated with mosaic Y chromosome loss highlight cell cycle genes and overlap with cancer susceptibility*. Nat Genet, 2017. **49**(5): p. 674-679.
271. Arlt, M.F., et al., *Copy number variants are produced in response to low-dose ionizing radiation in cultured cells*. Environ Mol Mutagen, 2014. **55**(2): p. 103-13.
272. Kang, H.M., et al., *DNA copy number alterations and expression of relevant genes in mouse thymic lymphomas induced by gamma-irradiation and N-methyl-N-nitrosourea*. Cancer Genet Cytogenet, 2006. **166**(1): p. 27-35.
273. Kimmel, R.R., et al., *DNA copy-number instability in low-dose gamma-irradiated TK6 lymphoblastoid clones*. Radiat Res, 2008. **169**(3): p. 259-69.

-
274. Muradyan, A., et al., *Acute high-dose X-radiation-induced genomic changes in A549 cells*. Radiat Res, 2011. **175**(6): p. 700-7.
275. Zitzelsberger, H. and K. Unger, *DNA copy number alterations in radiation-induced thyroid cancer*. Clin Oncol (R Coll Radiol), 2011. **23**(4): p. 289-96.
276. Adewoye, A.B., et al., *The genome-wide effects of ionizing radiation on mutation induction in the mammalian germline*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6684.
277. Finn, S.P., et al., *Array comparative genomic hybridisation analysis of gamma-irradiated human thyrocytes*. Virchows Arch, 2004. **445**(4): p. 396-404.
278. Hastings, P.J., G. Ira, and J.R. Lupski, *A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation*. PLoS Genet, 2009. **5**(1): p. e1000327.
279. Lee, J.A., C.M. Carvalho, and J.R. Lupski, *A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders*. Cell, 2007. **131**(7): p. 1235-47.
280. Arlt, M.F., et al., *Hydroxyurea induces de novo copy number variants in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(42): p. 17360-5.
281. Arlt, M.F., et al., *De novo CNV formation in mouse embryonic stem cells occurs in the absence of Xrcc4-dependent nonhomologous end joining*. PLoS Genet, 2012. **8**(9): p. e1002981.
282. Ottaviani, D., M. LeCain, and D. Sheer, *The role of microhomology in genomic structural variation*. Trends Genet, 2014. **30**(3): p. 85-94.
283. Hazan, I., T.G. Hofmann, and R.I. Aqeilan, *Tumor Suppressor Genes within Common Fragile Sites Are Active Players in the DNA Damage Response*. PLoS Genet, 2016. **12**(12): p. e1006436.
284. Smith, D.I., et al., *Common fragile sites, extremely large genes, neural development and cancer*. Cancer Lett, 2006. **232**(1): p. 48-57.
285. Smith, D.I., et al., *Large common fragile site genes and cancer*. Semin Cancer Biol, 2007. **17**(1): p. 31-41.
286. Glover, T.W., T.E. Wilson, and M.F. Arlt, *Fragile sites in cancer: more than meets the eye*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(8): p. 489-501.
287. Ozeri-Galai, E., et al., *Failure of origin activation in response to fork stalling leads to chromosomal instability at fragile sites*. Mol Cell, 2011. **43**(1): p. 122-31.
288. Helmrich, A., M. Ballarino, and L. Tora, *Collisions between replication and transcription complexes cause common fragile site instability at the longest human genes*. Mol Cell, 2011. **44**(6): p. 966-77.
289. Thys, R.G., et al., *DNA secondary structure at chromosomal fragile sites in human disease*. Curr Genomics, 2015. **16**(1): p. 60-70.
290. Zack, T.I., et al., *Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration*. Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1134-40.
291. Saldivar, J.C., et al., *Initiation of genome instability and preneoplastic processes through loss of Fhit expression*. PLoS Genet, 2012. **8**(11): p. e1003077.
292. Gorgoulis, V.G., et al., *Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 907-13.
293. Bartkova, J., et al., *DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis*. Nature, 2005. **434**(7035): p. 864-70.
294. Bignell, G.R., et al., *Signatures of mutation and selection in the cancer genome*. Nature, 2010. **463**(7283): p. 893-8.

295. Karras, J.R., et al., *Fragile Genes That Are Frequently Altered in Cancer: Players Not Passengers*. Cytogenet Genome Res, 2016. **150**(3-4): p. 208-216.
296. Huebner, K. and C.M. Croce, *FRA3B and other common fragile sites: the weakest links*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 214-21.
297. Muradyan, A., et al., *Acute High-Dose X-Radiation-Induced Genomic Changes in A549 Cells*. Radiation Research, 2011. **175**(6): p. 700-707.
298. Waters, C.E., et al., *The FHIT gene product: tumor suppressor and genome "caretaker"*. Cell Mol Life Sci, 2014. **71**(23): p. 4577-87.
299. Durkin, S.G., et al., *Replication stress induces tumor-like microdeletions in FHIT/FRA3B*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(1): p. 246-51.
300. Beroukhi, R., et al., *The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers*. Nature, 2010. **463**(7283): p. 899-905.
301. Birrer, M.J., et al., *Abnormal Fhit expression in malignant and premalignant lesions of the cervix*. Cancer Res, 1999. **59**(20): p. 5270-4.
302. Butler, D., et al., *Loss of Fhit expression as a potential marker of malignant progression in preinvasive squamous cervical cancer*. Gynecol Oncol, 2002. **86**(2): p. 144-9.
303. Ahmadian, M., et al., *Analysis of the FHIT gene and FRA3B region in sporadic breast cancer, preneoplastic lesions, and familial breast cancer probands*. Cancer Res, 1997. **57**(17): p. 3664-8.
304. Yuge, T., et al., *Loss of FHIT expression in squamous cell carcinoma and premalignant lesions of the larynx*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2005. **114**(2): p. 127-31.
305. Michael, D., et al., *Frequent deletions of FHIT and FRA3B in Barrett's metaplasia and esophageal adenocarcinomas*. Oncogene, 1997. **15**(14): p. 1653-9.
306. Sozzi, G., et al., *Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions*. Cancer Res, 1998. **58**(22): p. 5032-7.
307. Wistuba, II, et al., *Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers*. J Natl Cancer Inst, 1997. **89**(18): p. 1366-73.
308. Mori, M., et al., *Altered expression of Fhit in carcinoma and precarcinomatous lesions of the esophagus*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1177-82.
309. Fong, L.Y., et al., *Muir-Torre-like syndrome in Fhit-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4742-7.
310. Zanesi, N., et al., *The tumor spectrum in FHIT-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10250-5.
311. Hosseini, S.A., et al., *Common chromosome fragile sites in human and murine epithelial cells and FHIT/FRA3B loss-induced global genome instability*. Genes Chromosomes Cancer, 2013. **52**(11): p. 1017-29.
312. Loeb, K.R. and L.A. Loeb, *Genetic instability and the mutator phenotype. Studies in ulcerative colitis*. Am J Pathol, 1999. **154**(6): p. 1621-6.
313. Paisie, C.A., et al., *Exome-wide single-base substitutions in tissues and derived cell lines of the constitutive Fhit knockout mouse*. Cancer Sci, 2016. **107**(4): p. 528-35.
314. Refsland, E.W. and R.S. Harris, *The APOBEC3 family of retroelement restriction factors*. Curr Top Microbiol Immunol, 2013. **371**: p. 1-27.
315. Smith, H.C., et al., *Functions and regulation of the APOBEC family of proteins*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(3): p. 258-68.
316. Pham, P., L. Chelico, and M.F. Goodman, *DNA deaminases AID and APOBEC3G act processively on single-stranded DNA*. DNA Repair (Amst), 2007. **6**(6): p. 689-92; author reply 693-4.

317. Chelico, L., et al., *APOBEC3G DNA deaminase acts processively 3' --> 5' on single-stranded DNA*. Nat Struct Mol Biol, 2006. **13**(5): p. 392-9.
318. Roberts, S.A. and D.A. Gordenin, *Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(12): p. 786-800.
319. Waters, C.E., et al., *FHIT loss-induced DNA damage creates optimal APOBEC substrates: Insights into APOBEC-mediated mutagenesis*. Oncotarget, 2015. **6**(5): p. 3409-19.
320. Steenken, S. and S.V. Jovanovic, *How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution*. Journal of the American Chemical Society, 1997. **119**(3): p. 617-618.
321. Kino, K., et al., *Generation, repair and replication of guanine oxidation products*. Genes Environ, 2017. **39**: p. 21.
322. Miura, S., et al., *Fhit deficiency-induced global genome instability promotes mutation and clonal expansion*. PLoS One, 2013. **8**(11): p. e80730.
323. Cho, Y.J. and P. Liang, *Killin is a p53-regulated nuclear inhibitor of DNA synthesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5396-401.
324. Chen, C.F., et al., *ATR Mutations Promote the Growth of Melanoma Tumors by Modulating the Immune Microenvironment*. Cell Rep, 2017. **18**(10): p. 2331-2342.
325. Wang, Y., et al., *Transcription factor KLLN inhibits tumor growth by AR suppression, induces apoptosis by TP53/TP73 stimulation in prostate carcinomas, and correlates with cellular differentiation*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(3): p. E586-94.
326. Horai, M., et al., *Detection of de novo single nucleotide variants in offspring of atomic-bomb survivors close to the hypocenter by whole-genome sequencing*. J Hum Genet, 2018. **63**(3): p. 357-363.
327. Kodaira, M., et al., *No evidence of radiation effect on mutation rates at hypervariable minisatellite loci in the germ cells of atomic bomb survivors*. Radiat Res, 2004. **162**(4): p. 350-6.
328. Satoh, C., et al., *Genetic analysis of children of atomic bomb survivors*. Environ Health Perspect, 1996. **104 Suppl 3**: p. 511-9.
329. Deman, J. and N. Van Larebeke, *Carcinogenesis: mutations and mutagens*. Tumour Biol, 2001. **22**(3): p. 191-202.
330. Milholland, B., et al., *Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice*. Nature Communications, 2017. **8**: p. 15183.
331. Lodato, M.A., et al., *Somatic mutation in single human neurons tracks developmental and transcriptional history*. Science, 2015. **350**(6256): p. 94-98.
332. Hazen, J.L., et al., *The Complete Genome Sequences, Unique Mutational Spectra, and Developmental Potency of Adult Neurons Revealed by Cloning*. Neuron, 2016. **89**(6): p. 1223-1236.
333. Blokzijl, F., et al., *Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life*. Nature, 2016. **538**: p. 260.
334. Lo Sardo, V., et al., *Influence of donor age on induced pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(1): p. 69-74.
335. Young, M.A., et al., *Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(5): p. 570-82.
336. Cheng, L., et al., *Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(3): p. 337-44.

337. Behjati, S., et al., *Mutational signatures of ionizing radiation in second malignancies*. Nat Commun, 2016. **7**: p. 12605.
338. Nguyen, V., et al., *A Genomic Study of DNA Alteration Events Caused by Ionizing Radiation in Human Embryonic Stem Cells via Next-Generation Sequencing*. Stem Cells Int, 2016. **2016**: p. 1346521.
339. Sherborne, Amy L., et al., *Mutational Analysis of Ionizing Radiation Induced Neoplasms*. Cell Reports, 2015. **12**(11): p. 1915-1926.
340. Sergiev, P.V., O.A. Dontsova, and G.V. Berezkin, *Theories of aging: an ever-evolving field*. Acta Naturae, 2015. **7**(1): p. 9-18.
341. Moynahan, M.E. and M. Jasin, *Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 196-207.
342. Bishop, A.J. and R.H. Schiestl, *Homologous Recombination and Its Role in Carcinogenesis*. J Biomed Biotechnol, 2002. **2**(2): p. 75-85.
343. Vaish, M. and B. Mittal, *DNA mismatch repair, microsatellite instability and cancer*. Indian J Exp Biol, 2002. **40**(9): p. 989-94.
344. Harfe, B.D. and S. Jinks-Robertson, *DNA mismatch repair and genetic instability*. Annu Rev Genet, 2000. **34**: p. 359-399.
345. Schuster-Bockler, B. and B. Lehner, *Chromatin organization is a major influence on regional mutation rates in human cancer cells*. Nature, 2012. **488**(7412): p. 504-7.
346. Supek, F. and B. Lehner, *Differential DNA mismatch repair underlies mutation rate variation across the human genome*. Nature, 2015. **521**(7550): p. 81-4.
347. Straub, J.M., et al., *Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy*. J Cancer Res Clin Oncol, 2015. **141**(11): p. 1985-94.
348. Judge, J.L., et al., *Ionizing radiation induces myofibroblast differentiation via lactate dehydrogenase*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015. **309**(8): p. L879-87.
349. Pickup, M.W., J.K. Mouw, and V.M. Weaver, *The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer*. EMBO Rep, 2014. **15**(12): p. 1243-53.
350. Venning, F.A., L. Wullkopf, and J.T. Eler, *Targeting ECM Disrupts Cancer Progression*. Front Oncol, 2015. **5**: p. 224.
351. Cibulskis, K., et al., *Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 213-9.
352. Koboldt, D.C., et al., *VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing*. Genome Res, 2012. **22**(3): p. 568-76.
353. Schnarr, K., et al., *Individual radiosensitivity and its relevance to health physics*. Dose Response, 2007. **5**(4): p. 333-48.
354. Bolegenova, N.K., et al., *Genetic polymorphisms and expression of minisatellite mutations in a 3-generation population around the Semipalatinsk nuclear explosion test-site, Kazakhstan*. Int J Hyg Environ Health, 2009. **212**(6): p. 654-60.
355. Iarmarcovai, G., et al., *Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature*. Mutat Res, 2008. **658**(3): p. 215-33.
356. Li, X., et al., *Common copy number variations in fifty radiosensitive cell lines*. Genomics, 2012. **99**(2): p. 96-100.
357. Baskin, B., et al., *High frequency of copy number variations (CNVs) in the chromosome 11p15 region in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome*. Hum Genet, 2014. **133**(3): p. 321-30.
358. Rubin, H., *Cell aging in vivo and in vitro*. Mech Ageing Dev, 1997. **98**(1): p. 1-35.
359. Gilchrist, B.A., et al., *Autocrine and paracrine growth stimulation of cells derived from human skin*. J Cell Physiol, 1983. **117**(2): p. 235-40.

360. Thompson, K.V. and R. Holliday, *Effect of temperature on the longevity of human fibroblasts in culture*. Exp Cell Res, 1973. **80**(2): p. 354-60.

5.2. Online Quellen

[Internetquelle 1] Bundesamt für Strahlenschutz: Krebs und Leukämie (2018) [Online im Internet:] URL: <https://www.bfs.de/DE/themen/ion/wirkung/krebs/einfuehrung/einfuehrung.html> (aufgerufen am 18.06.2018)

[Internetquelle 2] Molecular Abott: VYSIS FISH Chromosome Search (2018) [Online im Internet:] URL: <https://www.molecular.abbott/int/en/chromosome/y> (aufgerufen am 24.08.2018)

[Internetquelle 3] Rottenfusser, R., Wilson, E.E., Davidson, M.W.: Zeiss: Basic Concepts in Microscopy: Introduction to Microscopy [Online im Internet:] URL: <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/fluorescence.html> (aufgerufen am: 24.08.2018)

[Internetquelle 4] Illumina: Genome-Wide DNA Analysis Bead Chips (2013) [Online im Internet:] URL: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/brochures/datasheet_omni_whole-genome_arrays.pdf (aufgerufen am: 24.08.2018)

[Internetquelle 5] Illumina: Infinium HumanCytoSNP12 v2.1 Bead Chip (2017) [Online im Internet:] URL: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/cytosnp-12-data-sheet-1570-2016-003.pdf> (aufgerufen am: 24.08.2018)

[Internetquelle 6] Illumina: Infinium Assay Workflow (2012) [Online im Internet:] URL: http://www.bea.ki.se/documents/workflow_infinium.pdf (aufgerufen am: 24.08.2018)

[Internetquelle 7] Illumina: Interpreting Infinium Assay Data for Whole-Genome Structural Variation (2010) [Online im Internet:] URL: https://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_cytoanalysis.pdf (aufgerufen am 24.08.2018)

[Internetquelle 8] MRC-Holland: MLPA General Protocol (2018) [Online im Internet:] URL: https://www.mlpa.com/WebForms/WebFormDBData.aspx?FileOID=_g2hKwvshD9I. (aufgerufen am 18.08.2018)

[Internetquelle 9] Illumina: Nextera DNA Exome (2017) [Online im Internet:] URL: <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/datasheets/nextera-dna-exome-data-sheet-770-2015-018.pdf> (aufgerufen am 24.08.2018)

[Internetquelle 10] Illumina: Nextera Rapid Capture Exomes (2015) [Online im Internet:] URL: https://www.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_nextera_rapid_capture_exome.pdf. (aufgerufen am 24.08.2018)

[Internetquelle 11] Illumina: Ausführen des NextSeq500-Systems (2014) [Online im Internet:] URL: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/nextseq/qrc/translations/running-nextseq-500-quick-ref-card-15053003-a-deu.pdf (aufgerufen am 24.08.2018)

[Internetquelle 12] Illumina: NextSeq550 Systemhandbuch (2016) [Online im Internet:] URL: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/system_documentation/nextseq/translations/nextseq-500-system-guide-15046563-02-deu.pdf (aufgerufen am 24.08.2018)

[Internetquelle 13]: Illumina: Sequencing Overview (2013) [Online im Internet:] URL: http://www.well.ox.ac.uk/ogc/wp-content/uploads/2017/09/Illumina_Sequencing_Overview_15045845_D.pdf

[Internetquelle 14] Illumina: Illumina Sequencing Technology (2010) [Online im Internet:] URL: https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf (aufgerufen am 24.08.2018)

[Internetquelle 15] Illumina: An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology (2017) [Online im Internet:] URL: https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf (aufgerufen am 24.08.2018)

[Internetquelle 16] Illumina: Illumina Two-Channel SBS Technology (2016) [Online im Internet:] URL: http://www.well.ox.ac.uk/ogc/wp-content/uploads/2017/09/techspotlight_two-channel_sbs.pdf (aufgerufen am 24.08.2018)

[Internetquelle 17] National Cancer Institute: Dictionary of Genetic Terms: Nucleotide (2015) [Online im Internet:] URL: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/genetics-dictionary/def/nucleotide> (aufgerufen am 15.09.2018)

[Internetquelle 18] Umweltinstitut München: Radioaktivität und Gesundheit: Natürliche Radioaktivität (2012) [Online im Internet:] URL: <http://www.umweltinstitut.org/themen/radioaktivitaet/radioaktivitaet-und-gesundheit/natuerliche-radioaktivitaet.html> (aufgerufen am 23.08.2018)

[Internetquelle 19] Mitelman Database of Chromosome Aberrations and Gene Fusions in Cancer (2018). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), [Online im Internet:] URL: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman> (aufgerufen am 23.08.2018)

6. Verzeichnisse

6.1. Abkürzungsverzeichnis

	∞	Unendlichzeichen
	%	Prozent
	°C	Grad Celsius
	µg	Mikrogramm
	µl	Mikroliter
A	A	Adenin (DNA-Base)
	ad.	auffüllen auf
	add	zusätzliches Material unbekannter Herkunft (engl. <i>additional material of unknown origin</i>)
	APH	Aphidicolin
	APOBEC	engl. <i>apolipoprotein B mRNA editing catalytic polypeptide-like</i>
	Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
	ATM	engl. <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
	ATR	engl. <i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-related protein</i>
	AS	Aminosäure
B	BAF	B-Allelfrequenz
	bp	Basenpaar
	BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
	bzw.	beziehungsweise
C	C	Cytosin (DNA-Base)
	CCD	Charge Coupled Device
	CDKs	cyclinabhängige Kinasen (engl. <i>cyclin-dependent kinases</i>)
	CEP	engl. <i>chromosome/centromeric enumeration probe</i>
	cGy	Zentigray
	Chk	Checkpointkinase
	Chr	Chromosom
	chrB	Chromosomenbruch (engl. <i>chromosome break</i>)
	chtB	Chromatidbruch (engl. <i>chromatid break</i>)
	CN	Kopienzahl (engl. <i>copy number</i>)
	CN-LOH	Verlust der Heterozygotie ohne Veränderung der Kopienzahl (engl. <i>copy neutral loss of heterozygosity</i>)
	CNV	Kopienzahlvariation (engl. <i>copy number variation</i>)
	CO ₂	Kohlenstoffdioxid
	cSNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus in einem kodierenden Bereich (engl. <i>coding single nucleotide polymorphism</i>)
	Cy3	Cyanin3
D	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol (engl. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
	ddH ₂ O	destilliertes Wasser

	DDR	DNA-Schadensantwort (engl. <i>DNA damage response</i>)
	del	Deletion
	delins	Indel
	der	Derivatchromosom
	D-Loop	engl. <i>displacement loop</i>
	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
	DNA-PKcs	DNA-abhängige Proteinkinase, katalytische Untereinheit (engl. <i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>)
	DSB	Doppelstrangbruch (engl. <i>double-strand break</i>)
	dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	EP	Elution premix
	ECM	extrazelluläre Matrix (engl. <i>extracellular matrix</i>)
	et al.	lat. <i>et alia</i> (und andere/ weitere)
	EtOH	Ethanol
F	FDR	engl. <i>false discovery rate</i>
	FHIT	engl. <i>fragile histidine triad</i>
	FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
	FKS	fetales Kälberserum
	FS/FRA	fragile Stelle
G	g	Gramm
	G	Guanin (DNA-Base)
	G-Bänderung	von GTG-Bänderung engl. <i>G-bands by Trypsing using Giemsa</i>
	gDNA	genomische DNA
	GI	genomische Instabilität
	G-Phase	G=engl. <i>gap</i>
	Gy	Gray
H	H ₂ O	Wasser
	HCl	Salzsäure
	HGVS	Human Genome Variation Society
	HR	homologe Rekombination (engl. <i>homologous recombination</i>)
	HU	Hydroxyurea
I	i	Isochromosom
	IGF-1R	engl. <i>Insulin-like growth factor 1 receptor</i>
	ins	Insertion
	inv	Inversion
	iPS	induzierte pluripotente Stammzellen
	ISCN	engl. <i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
	IR	ionisierende Strahlung (engl. <i>ionizing radiation</i>)

K	K ₂ PO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat	
	kb	Kilobasenpaar	
	KCl	Kaliumchlorid	
	KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	
L	L	Liter	
	LET	linearer Energietransfer	
	LOY	Verlust des Y-Chromosoms (engl. <i>loss of Y chromosome</i>)	
	LRR	LogR-Ratio	
M	M	Mol	
	mar	Markerchromosom	
	Mb	Megabase	
	MEF	engl. <i>mouse embryonic fibroblast</i>	
	mg	Milligramm	
	MgCl ₂	Magnesiumchlorid	
	min	Minute	
	ml	Milliliter	
	mLOY	Mosaik-Verlust des Y-Chromosoms (engl. <i>mosaic loss of Y chromosome</i>)	
	mm	Millimeter	
	mM	millimolar	
	mm ²	Quadratmillimeter	
	MMBIR	<i>microhomology-mediated break-induced replication</i>	
	MMR	DNA-Mismatch-Reparatur	
	mol	Einheit Stoffmenge	
	M-Phase	Mitosephase	
	MSY	engl. <i>male specific region of Y chromosome</i>	
	N	N	Normalität
		n	Probenzahl
Na ₂ HPO ₄		Dinatriumhydrogenphosphat	
NaCl		Natriumchlorid	
NAHR		nicht-allelischen homologen Rekombination (engl. <i>non-allelic homologous recombination</i>)	
NAOH		Natriumhydroxid	
ng		Nanogramm	
NGS		engl. <i>Next Generation Sequencing</i>	
NHEJ		Nicht-homologe Endverknüpfung (engl. <i>non-homologous end joining</i>)	
nM		Nanomolar	
O		OGs	Onkogene
	P	p	kurzer Chromosomenarm
PAR		pseudoautosomale Regionen	
PBS		Phosphat-gepuffertes Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)	
PCR		Polymerasekettenreaktion	

	PD	Populationsverdopplung (engl. <i>population doubling</i>)
	pH	lat. <i>potentia hydrogeneii</i>
	pM	Picomolar
	p-Wert	engl. <i>probability value</i>
Q	q	langer Chromosomenarm
R	RIF	Strahlenfibrose (engl. <i>radiation-induced fibrosis</i>)
	RIGI	Strahleninduzierte Genominstabilität (engl. <i>radiation-induced genomic instability</i>)
	RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
	ROS	reaktive oxidative Spezies
	RPA	engl. <i>replication protein A</i>
	rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
	RT	Raumtemperatur
S	s	Sekunde
	SAC	Spindel-Assembly-Checkpoint (engl. <i>spindle assembly checkpoint</i>)
	SPBs	Sample Purification Beads
	SBS	engl. <i>Sequencing by Synthesis</i>
	SF	Standardfehler
	SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
	SNV	Einzelnukleotid-Variante (engl. <i>single nucleotide variant</i>)
	S-Phase	Synthesephase
	SSB	Einzelstrangbruch (engl. <i>single-strand break</i>)
	ssDNA	einzeusträngige DNA (engl. <i>single stranded DNA</i>)
	SSC	engl. <i>saline-sodium citrate</i>
T	t	Translokation
	T	Thymin (DNA-Base)
	TK1	Thymidinkinase 1
	TSG	Tumorsuppressorgen
U	U	engl. <i>unit(s)</i> (Enzymeinheit)
	UCSC	engl. <i>University of California, Santa Cruz</i>
	UTR	engl. <i>untranslated region</i>
	UV	Ultraviolett
V	vs.	lat. <i>versus</i>
W	WES	engl. <i>whole exome sequencing</i>
Z	z. B.	zum Beispiel

6.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strahleninduzierte DNA-Schäden	2
Abbildung 2: Organisation der DNA-Schadensantwort.....	4
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Aktivierung von Zellzyklus-Checkpoints.....	7
Abbildung 4: Reparaturmechanismen für DNA-Doppelstrangbrüche	9
Abbildung 5: Modelle zellulärer Antworten auf ionisierende Strahlung.	14
Abbildung 6: Schematisches Modell für strahleninduzierte Genominstabilität.	15
Abbildung 7: Schematische Darstellung des mehrstufigen Mechanismus der Krebsentstehung über den Mutator-Phänotyp.....	18
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Herstellung von Zellkulturklonen.....	31
Abbildung 9: Chromosomenideogramme für die Sonden des verwendeten FISH-Kits.	34
Abbildung 10: Infinium Assay Arbeitsablauf	38
Abbildung 11: Repräsentative Plots der B-Allelfrequenz (BAF) und der LogR-Ratio (LRR) erstellt mit GenomeStudio.	39
Abbildung 12: Darstellung einer Region mit Verlust der Heterozygotie ohne Veränderung der Kopienzahl erstellt mit GenomeStudio.....	40
Abbildung 13: Prinzip der MLPA.....	41
Abbildung 14: Ausschnitt einer Analyse der Genkopienzahl mit Coffalyser.Net.	42
Abbildung 15: Arbeitsschritte des Truseq Rapid Exome Library Kits.	44
Abbildung 16: Prinzip der Clusterbildung durch „bridge amplification“.....	53
Abbildung 17: Arbeitsablauf der Studie.	56
Abbildung 18: Schematische Darstellung zur Herstellung der Zellkulturklone.....	58
Abbildung 19: Exemplarische Darstellung von Karyogrammen	60
Abbildung 20: Durchschnittliche Anzahl von <i>de novo</i> CNVs pro Klon.....	67
Abbildung 21: Größenverteilung der detektierten Kopienzahlvariationen	69
Abbildung 22: Chromosomale Positionen struktureller Veränderungen.....	70
Abbildung 23: Kopienzahlvariationen in bestrahlten Klonen, die mit fragilen Stellen des Genoms überlappen.....	72
Abbildung 24: MLPA-Ergebnis der eingesetzten Positiv-Kontrolle (2-244).....	74
Abbildung 25: Ergebnis der MLPA-Analyse im Klon 2-2P.....	75
Abbildung 26: Verteilung der Abdeckungstiefe über die Zielregion pro Probe.	77
Abbildung 27: Durchschnittliche Variantenzahl basierend auf den WES-Ergebnissen.	78
Abbildung 28: Ausschnitt aus dem Genombrowser der Software GenSearchNGS.....	80
Abbildung 29: Prozentuale Anteile der Variantentypen in bestrahlten und nicht bestrahlten Klonen	81

Abbildung 30: Prozentuale Anteile der Mutationstypen in chromosomal stabilen und chromosomal instabilen Klonen	82
Abbildung 31: Prozentuale Anteile der Transitionen und Transversionen in den Kontroll-Klonen und bestrahlten Klonen	83
Abbildung 32: Mutationsprofile der Kontroll-Klone und bestrahlten Klone.....	85
Abbildung 33: Vergleich der Mutationsprofile mit bekannten Signaturen und die damit in Verbindung stehenden Krebsarten.	87
Abbildung 34: Chromosomale Verteilung von Varianten in bestrahlten Klonen.....	88
Abbildung 35: Variantencluster in bestrahlten Klonen.	90
Abbildung 36: Chromosomale Verteilung von Varianten in den Kontroll-Klonen.	91
Abbildung 37: Durchschnittliche Variantenanzahl in Klonen mit veränderter Kopienzahl des Gens <i>FHIT</i> , sowie in Klonen ohne <i>FHIT</i> -Veränderung.	92
Abbildung 38: Prozentualer Anteil der sechs möglichen Substitutionstypen in Klonen mit CNV in <i>FHIT</i> und Klonen ohne CNV in <i>FHIT</i>	93
Abbildung 39: Vergleich der Mutationsprofile von Klonen mit Veränderung der Kopienzahl des Gens <i>FHIT</i> mit bekannten Signaturen und die damit in Verbindung stehenden Krebsarten. .	94
Abbildung 40: Chromosomale Verteilung der Varianten in Klonen mit veränderter <i>FHIT</i> -Kopienzahl.	95
Abbildung 41: Repräsentative Bilder der FISH-Analyse von bestrahlten und nicht bestrahlten Klonen.	96
Abbildung 42: Anteil der Zellen ohne Y-Chromosom in bestrahlten Klonen und nicht bestrahlten Kontroll-Klonen	97
Abbildung 43: Ausschnitt aus dem Chromosomenbrowser der Software GenomeStudio.....	98
Abbildung 44: Durchschnittliche Variantenanzahl pro Klon in Klonen mit mLOY/LOY und Klonen ohne mLOY/LOY	99
Abbildung 45: Schematische Darstellung zur Entstehung von Aneuploidien durch einen überaktivierten SAC.	110
Abbildung 46: Vergleich strahleninduzierter CNVs der vorliegenden Arbeit mit den CNVs aus einer Studie von Arlt und seinen Kollegen.....	114
Abbildung 47: Mechanismus des „Microhomology-mediated break induced replication“	116
Abbildung 48: Schematische Darstellung des Modells <i>FHIT loss-induced genomic instability</i>	123

6.3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Index Adaptersequenzen für das WES.....	23
Tabelle 2: Kommerzielle Kit-Systeme mit Herstellerangaben.....	24
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben.....	24
Tabelle 4: Verwendete Medien, Puffer und Lösungen mit Angaben zur Zusammensetzung.....	25
Tabelle 5: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben.....	26
Tabelle 6: Verwendete Programme und Online-Tools.....	28
Tabelle 7: Thermocyclerprogramm der MLPA Reaktion.....	41
Tabelle 8: Relative Dosisquotienten und Kopienzahl.....	42
Tabelle 9: Tagmentation: Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen.....	45
Tabelle 10: Erste Amplifikation: Reaktionsbedingungen.....	46
Tabelle 11: Erste Hybridisierung: Reaktionsansatz.....	47
Tabelle 12: Erste Hybridisierung: Reaktionsbedingungen.....	48
Tabelle 13: Zweite PCR: Reaktionsbedingungen.....	50
Tabelle 14: Anzahl der erstellten Zellkulturklone.....	58
Tabelle 15: Ergebnisse der Chromosomenbänderungsanalyse.....	61
Tabelle 16: Durchschnittliche Anzahl aberranter Metaphasen.....	62
Tabelle 17: Anteile der Aberrationstypen in den Klonen.....	63
Tabelle 18: Prozentualer Anteil der Chromosomenbeteiligung an der Bildung von Aberrationen.....	64
Tabelle 19: Anzahl der Klone, die mit HumanCytoSNP-12 BeadChip Arrays analysiert wurden.....	65
Tabelle 20: Kopienzahlvariationen der Primärkulturen.....	66
Tabelle 21: Cluster der Kopienzahlvariationen.....	71
Tabelle 22: Übersicht der Proben für das WES.....	76
Tabelle 23: Mittlere somatische Mutationsraten pro Basenpaar pro Mitose.....	79
Tabelle 24: Identifizierte Insertionen, Deletionen und Indels.....	80
Tabelle 25: Signifikant angereicherte KEGG-Signalwege.....	89
Tabelle 26: Anzahl der mit FISH analysierten Klone.....	96
Tabelle 27: Kopienzahlvariationen in Klonen mit Verlust des Y-Chromosoms.....	99
Anhang-Tabelle 1: Auflistung der erstellten Klone mit Information zur Methode, mit der jeder Klon analysiert wurde.....	162
Anhang-Tabelle 2: Ergebnisse der Chromosomenbänderungsanalyse.....	166
Anhang-Tabelle 3: Vollständige Liste der Kopienzahlvariationen und Regionen mit Verlust der Heterozygotie, die mit dem SNP-Array detektiert wurden.....	169

Anhang-Tabelle 4: Vollständige Liste der Varianten, die mit der Exom-Sequenzierung detektiert wurden.

..... 176

7. Publikationen und Kongressbeiträge

7.1. Publikationen

Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and *ex vivo* studies.

Horvath S, Oshima J, Martin GM, Lu AT, Quach A, Cohen H, Felton S, Matsuyama M, Lowe D, Kabacik S, Wilson JG, Reiner AP, Maierhofer A, Flunkert J, Aviv A, Hou L, Baccarelli AA, Li Y, Stewart JD, Whitsel EA, Ferrucci L, Matsuyama S, Raj K.

Aging (Albany NY). 2018 Jul 26;10(7):1758-1775. doi: 10.18632/aging.101508.

Genetic and epigenetic changes in clonal descendants of irradiated human fibroblasts.

Flunkert J, Maierhofer A, Dittrich M, Müller T, Horvath S, Nanda I, Haaf T.

Exp Cell Res. 2018 Jun 28. pii: S0014-4827(18)30377-X. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.06.034. [Epub ahead of print]

Generation of a human induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 51-year-old female with attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD) carrying a duplication of SLC2A3.

Jansch C, Günther K, Waider J, Ziegler GC, Forero A, Kollert S, Svirin E, Pühringer D, Kwok CK, Ullmann R, Maierhofer A, Flunkert J, Haaf T, Edenhofer F, Lesch KP.

Stem Cell Res. 2018 Apr;28:136-140. doi: 10.1016/j.scr.2018.02.005. Epub 2018 Feb 13.

Analysis of global DNA methylation changes in primary human fibroblasts in the early phase following X-ray irradiation.

Maierhofer A [#], Flunkert J[#], Dittrich M, Müller T, Schindler D, Nanda I, Haaf T.

PLoS One. 2017 May 10;12(5):e0177442. doi: 10.1371/journal.pone.0177442. eCollection 2017.

[#] Contributed equally

Accelerated epigenetic aging in Werner syndrome.

Maierhofer A, Flunkert J, Oshima J, Martin GM, Haaf T, Horvath S.

Aging (Albany NY). 2017 Apr;9(4):1143-1152. doi: 10.18632/aging.101217.

7.2. Kongressbeiträge

Radiation-induced loss of Y chromosome in human fibroblast clones.

Flunkert J., Maierhofer A., Nanda I., Haaf T

Poster presentation: 29th Conference of the German Society of Human Genetics, Münster, Germany (2018)

Copy number variations in radiation-induced chromosomally unstable human fibroblast clones.

Flunkert J., Maierhofer A., Nanda I., Haaf T

Poster presentation: 27th Conference of the German Society of Human Genetics, Lübeck, Germany (2016)

8. Danksagung

9. Anhang

Anhang-Tabelle 1: Auflistung der erstellten Klone mit Information zur Methode, mit der jeder Klon analysiert wurde.

Experiment	Dosis (Gy)	Klon	verwendete Technik	Experiment	Dosis (Gy)	Klon	verwendete Technik
1	0	1-C1	G-Bänderung, SNP-Array	2	0	2-C1	FISH
1	0	1-C2	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA	2	0	2-C2	FISH
1	0	1-C3	G-Bänderung, SNP-Array	2	0	2-C3	G-Bänderung, SNP-Array
1	0	1-C5	FISH	2	0	2-C4	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA, Exom-Sequenzierung
1	0	1-C6	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA	2	0	2-C9	G-Bänderung, SNP-Array
1	0	1-C7	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung	2	0	2-C14	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA, Exom-Sequenzierung
1	0	1-C9	FISH	2	0	2-C15	FISH
1	0	1-C10	FISH	2	0	2-C19	FISH
1	0	1-C11	FISH	2	0	2-C20	G-Bänderung, SNP-Array
1	0	1-C12	FISH	2	0	2-C23	FISH
1	0	1-C13	FISH	2	0	2-C24	FISH
1	0	1-C15	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA, Exom-Sequenzierung	2	0	2-C42	SNP-Array
1	0	1-C16	FISH	2	0	2-C46	FISH
1	0	1-C17	FISH	2	0	2-C52	SNP-Array
1	0	1-C18	FISH	2	0	2-C55	FISH
1	0	1-C22	FISH	2	0	2-C100	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA, Exom-Sequenzierung
1	0	1-C23	FISH	2	0	2-C101	G-Bänderung, SNP-Array
1	0	1-C24	FISH	2	0	2-C103	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung
1	0	1-C25	G-Bänderung, SNP-Array	2	0	2-C104	G-Bänderung, SNP-Array
1	0	1-C28	FISH	2	0	2-C107	FISH
1	0	1-C29	FISH	2	0	2-C116	FISH
1	0	1-C30	G-Bänderung, SNP-Array	2	0	2-C118	FISH
1	0	1-C31	FISH	2	0	2-C120	FISH
1	0	1-C32	G-Bänderung, SNP-Array	2	0	2-C121	G-Bänderung, SNP-Array
1	0	1-C33	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung	2	0	2-C123	FISH
1	0	1-C34	G-Bänderung, SNP-Array	2	0	2-C125	FISH
1	0	1-C35	FISH	2	0	2-C126	FISH
1	0	1-C37	FISH	2	2	2-2A	G-Bänderung, SNP-Array
1	0	1-C39	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2B	SNP-Array
1	2	1-2100A1	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2D	MLPA
1	2	1-2100A3	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2E	MLPA

1	2	1-2100A32	MLPA	2	2	2-2F	MLPA
1	2	1-2100A4	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2G	SNP-Array
1	2	1-2100A6	FISH, MLPA, Exom-Sequenzierung	2	2	2-2L	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA
1	2	1-2100A8	FISH, MLPA, Exom-Sequenzierung	2	2	2-2M	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2100B1	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2N	MLPA
1	2	1-2100B2	FISH	2	2	2-2P	MLPA, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2100B22	MLPA	2	2	2-2W	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2100B3	MLPA	2	2	2-21	G-Bänderung, SNP-Array
1	2	1-2100B4	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-23	SNP-Array
1	2	1-2100B6	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-24	SNP-Array
1	2	1-2100B62	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-27	MLPA
1	2	1-2100B7	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-28	SNP-Array
1	2	1-2100B8	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-29	G-Bänderung, SNP-Array
1	2	1-2100C1	FISH, MLPA	2	2	2-210	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2100D1	FISH	2	2	2-211	SNP-Array
1	2	1-2100i3	FISH	2	2	2-213	MLPA
1	2	1-2100i4	FISH	2	2	2-214	SNP-Array
1	2	1-2200A2	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-216	MLPA
1	2	1-2200A4	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-217	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2200A5	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-219	MLPA
1	2	1-2200A6	FISH	2	2	2-221	MLPA
1	2	1-2200A7	MLPA	2	2	2-222	MLPA
1	2	1-2200B2	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-244	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA
1	2	1-2200B6	FISH	2	2	2-246	MLPA
1	2	1-2200B7	FISH	2	2	2-252	MLPA
1	2	1-2200C1	G-Bänderung, SNP-Array, MLPA	2	2	2-2100	SNP-Array
1	2	1-2200C2	FISH	2	2	2-2101	FISH
1	2	1-2200C3	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung	2	2	2-2103	G-Bänderung, SNP-Array
1	2	1-2200C4	FISH	2	2	2-2103a	SNP-Array
1	2	1-2200C5	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2104	FISH, MLPA
1	2	1-2200C7	FISH	2	2	2-2105	FISH, MLPA
1	2	1-2200C8	FISH	2	2	2-2106	G-Bänderung, SNP-Array
1	2	1-2200D1	FISH	2	2	2-2107	FISH
1	2	1-2200D3	FISH	2	2	2-2108	MLPA
1	2	1-2200D4	FISH	2	2	2-2111	FISH
1	2	1-2200D5	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2113	G-Bänderung, FISH, SNP-Array, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2200D6	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2114	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2200D7	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung	2	2	2-2200	SNP-Array
1	2	1-2200E2	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2201	FISH, MLPA

1	2	1-2200E5	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2202	FISH, MLPA, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2200E7	FISH, MLPA	2	2	2-2203	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2200F1	MLPA	2	2	2-2204	FISH, MLPA
1	2	1-2200F2	FISH	2	2	2-2205	G-Bänderung, SNP-Array
1	2	1-2200F3	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2206	SNP-Array
1	2	1-2200F4	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2207	MLPA
1	2	1-2200F5	FISH	2	2	2-2209	MLPA
1	2	1-2200F6	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2214	FISH, MLPA
1	2	1-2200G3	FISH	2	2	2-2220	FISH, MLPA
1	2	1-2200G4	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2222	FISH, MLPA
1	2	1-2200G5	FISH	2	2	2-2226	MLPA
1	2	1-2200G6	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2227	FISH, MLPA, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2200G7	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2228	FISH, MLPA
1	2	1-2200G8	MLPA	2	2	2-2231	FISH, MLPA
1	2	1-2200H1	FISH, MLPA	2	2	2-2232	FISH, MLPA
1	2	1-2200H5	FISH	2	2	2-2233	MLPA
1	2	1-2200H52	FISH	2	2	2-2234	FISH, MLPA
1	2	1-2200H7	FISH, MLPA	2	2	2-2235	FISH, MLPA
1	2	1-2300A2	FISH	2	2	2-2237	G-Bänderung, SNP-Array, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2300A22	FISH, MLPA	2	2	2-2239	FISH, MLPA
1	2	1-2300A3	FISH, MLPA	2	2	2-2240	FISH, MLPA
1	2	1-2300A4	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2244	FISH, MLPA, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2300A7	FISH, MLPA	2	2	2-2246	FISH, MLPA
1	2	1-2300B1	FISH	2	2	2-2300	SNP-Array
1	2	1-2300B2	FISH, MLPA	2	2	2-2301	G-Bänderung, SNP-Array
1	2	1-2300B3	FISH	2	2	2-2302	G-Bänderung, FISH, SNP-Array, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2300B4	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2303	SNP-Array
1	2	1-2300B7	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2307	MLPA
1	2	1-2300B8	FISH	2	2	2-2308	G-Bänderung, SNP-Array
1	2	1-2300C1	FISH	2	2	2-2309	SNP-Array
1	2	1-2300C2	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2310	SNP-Array
1	2	1-2300C4	MLPA	2	2	2-2315	MLPA
1	2	1-2300C6	MLPA	2	2	2-2320	FISH, MLPA
1	2	1-2300C7	MLPA	2	2	2-2321	MLPA
1	2	1-2300D1	G-Bänderung	2	2	2-2325	MLPA
1	2	1-2300D4	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2326	FISH
1	2	1-2300D5	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2327	MLPA
1	2	1-2300D6	FISH	2	2	2-2330	MLPA
1	2	1-2300D7	MLPA	2	2	2-2333	FISH

1	2	1-2300E1	FISH	2	2	2-2336	MLPA, Exom-Sequenzierung
1	2	1-2300E6	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2337	SNP-Array
1	2	1-2300E7	MLPA	2	2	2-2340	MLPA
1	2	1-2300F1	G-Bänderung, SNP-Array	2	2	2-2347	MLPA
1	2	1-2300F2	FISH	2	2	2-2012	MLPA
1	2	1-2300F4	MLPA				
1	2	1-2300F5	G-Bänderung, SNP-Array				
1	2	1-2300F6	FISH				
1	2	1-2300F7	FISH, MLPA				
1	2	1-2300F8	MLPA				
1	2	1-2300G1	FISH, MLPA				
1	2	1-2300G32	MLPA				

Abkürzungen: FISH: Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

Anhang-Tabelle 2: Ergebnisse der Chromosomenbänderungsanalyse.

Experiment	Dosis (Gy)	Klon	n (aberrante Metaphasen)	Karyotyp(en)	Klassifizierung
1	0	1-C1	0	46, XY	stabil
1	0	1-C2	0	46, XY	stabil
1	0	1-C3	0	46, XY	stabil
1	0	1-C6	0	46, XY	stabil
1	0	1-C15	0	46, XY	stabil
1	0	1-C30	0	46, XY	stabil
1	0	1-C32	0	46, XY	stabil
1	0	1-C33	0	46, XY	stabil
1	0	1-C39	0	46, XY	stabil
1	0	1-C7	1	46, XY/47, XY+mar	instabil
1	0	1-C34	1	46, XY/46, XY, chtb(7)(q)	instabil
1	0	1-C25	2	46, XY/46, XY, del(1)(p)/46, XY, chtb(7)(q)	instabil
1	2	1-2100B6	0	46, XY	stabil
1	2	1-2100B62	0	46, XY	stabil
1	2	1-2200C1	0	46, XY	stabil
1	2	1-2200D7	0	46, XY	stabil
1	2	1-2200E5	0	46, XY	stabil
1	2	1-2200F6	0	46, XY	stabil
1	2	1-2200G4	0	46, XY	stabil
1	2	1-2300B4	0	46, XY	stabil
1	2	1-2300D4	0	46, XY	stabil
1	2	1-2300F5	0	46, XY	stabil
1	2	1-2100A4	1	46, XY/46, XY, chtb(8)(q24.1)	instabil
1	2	1-2100B8	1	46, XY/46, XY, chtb(2)(q33)	instabil
1	2	1-2300F1	1	46, XY/46, XY, del(19)(p?)	instabil
1	2	1-2200A2	1	46, XY/47, XY, +9(q)	instabil
1	2	1-2200A5	1	46, XY/46, XY, add(1)(p36.3), chtb(7)(q)	instabil
1	2	1-2300D5	1	46, XY/46, XY, der(5)chr(5)(q13)t(5;14)(q14;q32)	instabil
1	2	1-2200A4	1	46, XY/46, XY, chtb(6)(q27)	instabil
1	2	1-2200D5	1	46, XY/46, XY, chtb(15)(q22)	instabil
1	2	1-2100B1	2	46, XY, t(3;6)(q10;p10)/46, XY, chtb(1)(q21), t(3;6)(q10;p10)	instabil
1	2	1-2100B4	2	46, XY, ins(11)(p15q23)/46, XY, chtb(2)(q31), ins(11)(p15q23)	instabil
1	2	1-2200F4	1	46, XY, der(1)	instabil
1	2	1-2200C5	2	46, XY/45, XY, chr(7)(q31)/46, XY, add(15)(p11.2)	instabil
1	2	1-2200G7	2	46, XY/46, XY, chtb(1)(q13)/46, XY, chtb(12)(q24.1)	instabil
1	2	1-2200B2	2	46, XY/46, XY, der(8)t(8;20)(p23;q13.2)/46, XY, add(9)(q31), add(13)(p11.2)	instabil
1	2	1-2100A3	2	46, XY/46, XY, chtb(14)(q24)/47, XY+mar	instabil

1	2	1-2100A1	2	46, XY/46, XY, add(8)(p23)/46, XY, der(13)add(13)(p11.2)	instabil
1	2	1-2300A4	2	46, XY/46, XY, inv(3)(q)/47, X,+mar,+mar	instabil
1	2	1-2200D6	3	46, XY, t(1;13)(p10;p10)/46, XY, t(1;13)(p10;p10), chtb(6)(q) /46, XY, t(1;13)(p10;p10), chtb(3)(p)	instabil
1	2	1-2300B7	3	46, XY/46, XY, chtb(1)(p31)/46, XY, chtb(3)(q21), add(7)(q22)/46, XY, chtb(6)(q21)	instabil
1	2	1-2300E6	3	46, XY/46, XY, chtb(6)(q21)/46, XY, chrb(9)(p10)/46, XY, add(15)(q26)	instabil
1	2	1-2200E2	3	46, XY/46, XY, del(2)(q31), del(4)(q31)/46, XY, del(4)(q31)/46, XY, del(5)(q31)	instabil
1	2	1-2300C2	3	46, XY/46, XY, chtb(1)(p13)[2]/46, XY, der(11)(2;11)(q31;p15)	instabil
1	2	1-2100B7	3	46, XY/46, XY, chtb(12)(p10)/46, XY, i(15)(q10)/47, XY, +mar	instabil
1	2	1-2300D1	3	46, XY, dup(18)(q12q23)/46, XY, del(2)(q21), chtb(3)(q12), dup(18)(q12q23)/46, XY, der(7)t(7;9)(q36;q13), dup(18)(q12q23)	instabil
1	2	1-2200C3	5	46, XY/46, XY, chtb(5)(q31)/47, XY, del(9)(q10)+mar/46, XY, del(10)(q24), inv(17)(q12q25)/47, XY, +16/46, XY, der(20)t(10;20)(q25;13.3)	instabil
1	2	1-2200F3	4	46, XY/46, XY, chtb(3)(q25)/46, XY, chtb(8)(q24.1)/46, XY, del(10)(q10)/46, XY, chtb(13)(p11.2)	instabil
1	2	1-2200G6	5	46, XY/46, XY, chtb(1)(p36.2)/46, XY, chtb(2)(q21)/46, XY, chtb(3)(q27)/46, XY, der(8)t(8;18)(p23;q10)/46, XY, add(15)(p11.2)	instabil
2	0	2-C104	0	46, XY	stabil
2	0	2-C101	0	46, XY	stabil
2	0	2-C14	0	46, XY	stabil
2	0	2-C20	0	46, XY	stabil
2	0	2-C9	0	46, XY	stabil
2	0	2-C100	0	46, XY	stabil
2	0	2-C103	0	46, XY	stabil
2	0	2-C3	2	46, XY/46, XY, chtb(3)(p23)/46, XY, add(3)(q21)	instabil
2	0	2-C121	1	46, XY/46, XY, chrb(3)(p10)	instabil
2	0	2-C4	1	46, XY/46, XY, del(3)(q21)	instabil
2	2	2-21	0	46, XY	stabil
2	2	2-29	0	46, XY	stabil
2	2	2-217	0	46, XY	stabil
2	2	2-2106	0	46, XY	stabil
2	2	2-2114	0	46, XY	stabil
2	2	2-2301	0	46, XY	stabil
2	2	2-2205	0	46, XY	stabil
2	2	2-2A	0	46, XY	stabil
2	2	2-2M	1	45, X	stabil
2	2	2-210	1	46, XY/46, XY, chtb(1)(q25)	instabil
2	2	2-2203	1	46, XY/46, XY, chrb(10)(q21)	instabil
2	2	2-2L	1	46, XY/46, XY, chtb(5)(q34), add(13)(q34)	instabil
2	2	2-2W	2	46, XY/46, XY, chrb(7)(q11.2)/46, XY, chtb(12)(q21)	instabil

2	2	2-2237	2	46, XY/47, XY, i(14)(q10)/46, XY, add(15)(p11.2)	instabil
2	2	2-2113	4	45, X/45, X, chtb(2)(p23)/45, X, chrb(5)(p12)/45, X, chrb(11)(q12)	instabil
2	2	2-2302	3	46, XY/46, XY, der(1)t(X;1)(q10;p36.3)/46, XY, chtb(6)(q22)/46, XY, add(12)(p13)	instabil
2	2	2-2103n	4	46, XY/47, XY, chrb(1)(q22)/46, XY, t(1;2)(p10;q10)/46, del(3)(q23)/46, XY, chtb(7)(q32)	instabil
2	2	2-2308	4	46, XY/46, XY, chrb(1)(p13)/46, XY, t(1;5)(q21;q31)/46, XY, chtb(6)(q22)/46, XY, chtb(7)(q11.2)	instabil
2	2	2-244	2	45, X/45, X, chtb(12)(q13)	Instabil

Aufgelistet sind die mit G-Bänderung analysierten Klone, die Anzahl (n) aberranter Metaphasen für jeden Klon (stabile Aberrationen, die in allen analysierten Metaphasen eines Klons auftraten, wurden als eine aberrante Metaphase gezählt), die Karyotypen für jeden Klon und die vom Karyotyp abhängige Klassifizierungsgruppe. Die Einordnung der Aberrationstypen erfolgte nach dem internationalen Standard (ISCN 2016). Abkürzungen: add: zusätzliches Material unbekannter Herkunft; chrb: Chromosomenbruch; chtb: Chromatidbruch; del: terminale oder interstitielle Deletion; der: Derivatchromosom, dup: Dupikation i: Isochromosom; ins: Insertion; inv: paracentrische oder perizentrische Inversion; mar: Marker, t: Translokation.

Anhang-Tabelle 3: Vollständige Liste der Kopienzahlvariationen und Regionen mit Verlust der Heterozygotie, die mit dem SNP-Array detektiert wurden.

Experiment	Dosis (Gy)	Klon	Klassifizierung	Chr	Start (hg19)	Ende (hg19)	zytogenetische Bande	Typ	CN	Größe (bp)	Anzahl betroffener Gene	Gensymbol betroffener Gene*
1	0	1-C25	instabil	20	8330470	8712123	20p12.3	Del	1	381654	1	<i>PLCB1</i>
1	0	1-C3	stabil	5	58550823	58735591	5q11.2	Del	1	184769	2	<i>PDE4D, BX641110</i>
1	2	1-2300F5	stabil	4	113281951	113423989	4q25	Dup	3	142039	4	<i>ALPK1, FLJ00302, KIAA1527, CR590073</i>
1	2	1-2300F5	stabil	7	61864866	62447140	7q11.21	Del	1	582275	0	no genes
1	2	1-2300F5	stabil	9	23517331	23759368	9p21.3	Del	1	242038	2	<i>ELAVL2, CR627240</i>
1	2	1-2300E6	instabil	7	61994170	62428125	7q11.21	Del	1	433955	0	no genes
1	2	1-2300B7	instabil	4	29203881	30725696	4p15.1	Dup	3	1521816	1	<i>PCDH7</i>
1	2	1-2200E2	instabil	1	246886265	247338427	1q44	Dup	3	452163	11	<i>SCCPDH, LOC149134, AHCTF1, elys, ZNF695, ZNF670, ZNF669, C1orf229, ZNF124, AK131017, BC043220</i>
1	2	1-2200D6	instabil	6	63364838	131809920	6q12-6q23.2	Dup	3	68445082	348	<i>LGSN, PTP4A1, PHF3, EYS, CR600797, ZC3H11A, UNQ9424, MCART3P, LOC648232, CR595314, BAI3, BAI 3, LMBRD1, COL19A1, COL9A1, FAM135A, KIAA1411, C6orf57, SMAP1, B3GAT2, OGFRL1, DM004170, MIR30C2, DM119476, MIR30A, C6orf155, RIMS1, Nbla00761, KCNQ5, KHDC1, KHDC1L, BC031876, AL832252, C6orf147, DPPA5, C6orf221, OOEP, DDX43, C6orf150, MTO1, DKFZp586P1420, EEF1A1, EEF1A2, LENG7, SLC17A5, HP59, AK124950, CD109, AF086303, COL12A1, COX7A2, TMEM30A, EF565086, FILIP1, SENP6, KIAA0797, MYO6, KIAA0389, IMPG1, HTR1B, IRAK1BP1, PHIP, WDR11, HMG3, BC042096, BC070061, LCA5, SH3BGR2, RNY4, ELOVL4, TTK, BCKDHB, FAM46A, BC038576, IBTK, KIAA1417, TPBG, UBE2CBP, H10BH, DOPEY1, AK023685, PGM3, RWDD2A, ME1, PRSS35, SNAP91, KIAA0656, RIPPLY2, CYB5R4, MRAP2, KIAA1009, TBX18, AK024998, NT5E, SNX14, SYNCRIP, SNHG5, SNORD50A, SNORD50B, HTR1E, CGA, ZNF292, GJB7, C6orf162, C6orf163, AK092941, C6orf164, C6orf165, SLC35A1, AK299432, RARS2, LATHEO, ORC3L, AKIRIN2, hCG_1779191, AY927641, SPACA1, CNR1, HCE1, RNGTT, PNRC1, SFRS13B, PM20D2, GABRR1, GABRR2, UBE2J1, RRAGD, DKFZp761H171, ANKRD6, KIAA0957, LYRM2, MDN1, CASP8AP2, GJA10, BACH2, CR625825, MAP3K7, BC037927, EPHA7, TSG1, MANEA, FUT9, KIAA0776, FHL5, GPR63, NDUFAF4, C6orf66, KIAA1900, KLHL32, MIR548H3, C6orf167, AK091365, MIR2113, POU3F2, FBXL4, FBL4, C6orf168, COQ3, SFRS18, DQ599242, USP45, BX647075, BC047952, CCNC, PRDM13, MCHR2, SIM1, ASCC3, DKFZp762E1710, GRIK2, KIAA1320, HACE1, LIN28B, BVES, RP11-99L11.2, POP3, POPDC3, PREP, PRDM1, ATG5, DKFZp686F0183, AIM1, RTN4IP1, QRSL1, AK124400, AK025967, LOC553137, C6orf203, BEND3, PDSS2, SOBP, SCML4, SEC63, OSTM1, AJ420489, AF520419, NR2E1, SNX3, SNX, 3A, LACE1,</i>

FOXO3, AY927449, AY927448, AY927447, AY927445, ARMC2, SESN1, C6orf182, AK094715, C6orf184, CCDC162, C6orf185, CD164, PPIL6, SMPD2, MICAL1, ZBTB24, KIAA0441, C6orf224, AKD1, FIG4, GPR6, WASF1, CDC40, DDO, C6orf186, SLC22A16, CDC2L6, BC047513, KIAA1028, AMD1, GTF3C6, BXDC1, RPF2, CR619557, LOC442245, SLC16A10, KIAA1919, hREV3, REV3L, BX647114, AF216583, TRAF3IP2, FYN, CR598940, wisp3, varinat, WISP3, TUBE1, C6orf225, LAMA4, RFPL4B, MARCKS, BC037331, FLJ34503, HDAC2, HDAC1, BC042098, HS3ST5, FRK, LOC728402, NT5DC1, COL10A1, TSPYL4, SART-2, AK093256, TSPYL1, AK095123, DSE, FAM26F, BET3L, FAM26E, FAM26D, RWDD1, RSPH4A, ZUFSP, AX746765, KPNA5, FAM162B, GPRC6A, RFX6, VGLL2, ROS1, GOPC, DCBLD1, AJ420595, NUS1, SLC35F1, C6orf204, FT002, PLN, MCM9, ASF1A, C6orf60, FAM184A, MIR548B, MAN1A1, AK097101, C6orf170, GJA1, HSF2, BC022047, SERINC1, KIAA1253, PKIB, FABP7, DKFZp547J2313, SMPDL3A, RLBP1L2, TRDN, AL832096, NKAIN2, TCBA1, STL, IBRD1, RNF217, TPD52L1, HDDC2, NS5ATP2, BC036196, HEY2, NCOA7, DKFZp761B2210, HINT3, TRMT11, C6orf173, AK127472, RSP03, RNF146, ECHDC1, DKFZp762M1110, KIAA0408, C6orf174, C6orf58, THEMIS, C6orf190, PTPRK, LAMA2, BC035400, MacGAP, ARHGAP18, C6orf191, L3MBTL3, SAMD3, TMEM200A, LOC285733, EPB41L2, DKFZp564J1082, AKAP7

1	2	1-2200D6	instabil	14	101312869	101539131	14q32.2-14q32.31	Dup	3	226263	109	MEG3, hCG_25025, MIR770, CR593817, MIR493, CS548410, MIR337, MIR665, RTL1, MIR431, MIR433, DM004396, MIR127, MIR432, MIR136, DM004411, MEG8, SNORD113-1, SNORD113-2, SNORD113-4, SNORD113-5, SNORD113-6, SNORD113-7, SNORD113-9, SNORD114-1, SNORD114-2, SNORD114-3, SNORD114-4, SNORD114-5, SNORD114-6, SNORD114-7, SNORD114-8, SNORD114-9, SNORD114-10, SNORD114-11, SNORD114-12, SNORD114-13, SNORD114-14, SNORD114-15, SNORD114-16, SNORD114-17, SNORD114-18, SNORD114-19, SNORD114-20, SNORD114-21, SNORD114-22, SNORD114-23, SNORD114-24, SNORD114-25, SNORD114-26, SNORD114-27, SNORD114-28, SNORD114-29, SNORD114-30, SNORD114-31, MIR379, DM004801, MIR411, DM004490, MIR299, MIR380, DM004802, MIR1197, MIR323, DM004496, MIR758, MIR329-1, MIR329-2, MIR494, DM004840, MIR543, MIR495, DM004696, MIR376C, MIR376A2, MIR654, MIR376B, MIR376A1, DM004798, MIR300, MIR1185-1, MIR1185-2, DM004803, MIR381, MIR487B, MIR539, MIR889, MIR655, MIR487A, MIR382, DM004804, MIR134, DM004407, MIR668, MIR485, MIR453, DM004429, MIR154, MIR496, DM004799, MIR377, MIR541, MIR409, MIR412, MIR369, DM004697, MIR410, MIR656, AK094562
1	2	1-2200D5	instabil	10	119183424	119363679	10q26.11	Dup	3	180256	1	EMX2
1	2	1-2200C5	instabil	16	5184911	6556442	16p13.3	Del	1	1371532	2	BC108660, A2BP1

1	2	1-2200C3	instabil	3	60170083	60341773	3p14.2	Dup	3	171691	1	<i>FHIT</i>
1	2	1-2200B2	instabil	10	119183424	119363679	10q26.11	Dup	3	180256	1	<i>EMX2</i>
1	2	1-2200A5	instabil	7	61976744	62453303	7q11.21	Del	1	476560	0	no genes
1	2	1-2200A4	instabil	7	62109713	62447140	7q11.21	Del	1	337428	0	no genes
1	2	1-2100B6	stabil	7	62133826	62447140	7q11.21	Del	1	313315	0	no genes
1	2	1-2100B4	instabil	7	111166165	111524959	7q31.1	Dup	3	358795	4	<i>IMMP2L, DOCK4, BC043243, KIAA0716</i>
1	2	1-2100B4	instabil	18	10056184	11176068	18p11.22-18p11.21	Del	1	1119885	9	<i>AX747048, APCDD1, NAPG, FAM38B, AK127627, AK095053, C18orf30, AX747416, C18orf58</i>
1	2	1-2100B1	instabil	1	246886265	247340784	1q44	Dup	3	454520	11	<i>SCCPDH, LOC149134, AHCTF1, elys, ZNF695, ZNF670, ZNF669, C1orf229, ZNF124, AK131017, BC043220</i>
1	2	1-2100B1	instabil	3	170671429	197845233	3q26.2-3q27.2	LOH	2	27173804	102	<i>ABCC5, ABCF3, ACTL6A, AHSB, ALG3, AP2M1, APOD, ATP11B, BCL6, BDH1, CAMK2N2, CENTB2, CHRD, CLCN2, CPN2, DGKG, DLG1, DNAJC19, DVL3, ECE2, ECT2, EHHADH, EPHB3, ETV5, FBXO45, FETUB, FGF12, FNDC3B, FXR1, FYT1D1, GHSR, GNB4, GP5, HES1, HRASL5, HRY, HTR3D, IGF2BP2, IL1RAP, IQCG, KCNM2, KCNM3, KLHL24, KLHL6, KNG1, LAMP3, LEPREL1, LIPH, LMLN, LPP, LRCH3, LSG1, MAGEF1, MAP3K13, MASP1, MCCC1, MCF2L2, MF12, MFN1, NAALADL2, NCBP2, NCEH1, NLGN1, OPA1, PAK2, PARL, PCYT1A, PEX5L, PIGX, PIGZ, PIK3CA, PLD1, POLR2H, PSMD2, PYDC2, RFC4, RTP4, SDHALP1, SDHALP2, SENP2, SENP5, SLC2A2, SMRP, SOX2, SOX2OT, SST, TBCCD1, TBL1XR1, TERC, THPO, TMEM212, TNFSF10, TNK1, TNK2, TP63, TPRG1, TRA2B, TTC14, UBXN7, USP13, VPS8, ZMAT3</i>
1	2	1-2100A4	instabil	7	53454892	57789531	7p12.1-7q11.1	Del	1	7619303	35	<i>HPVC1, VSTM2A, SEC61G, EGFR, LANCL2, VOPP1, FKBP9L, SEPT14, ZNF713, MRPS17, GBAS, PSPH, CCT6A, SNORA15, SUMF2, DKFZp566i1024, PHKG1, CHCHD2, LOC389493, DQ593490, DQ574659, DQ599872, LOC650226, BC036258, DKFZp434L192, BC035176, DQ581928, DQ573852, DQ597892, DQ574506, ZNF479, LOC642006, DQ598473, ZNF716, L37717</i>
1	2	1-2100A3	instabil	5	49874330	50181789	5q11.1	Dup	3	307460	1	<i>PARP8</i>
2	0	2-C101	stabil	4	169358017	169725161	4q32.3	Del	1	367145	3	<i>DDX60L, DKFZp781D1175, PALLD</i>
2	2	2-2W	instabil	17	68706023	68810338	17q24.3	Del	1	104316	0	no genes
2	2	2-2M	stabil	11	73783437	73917190	11q13.4	Del	1	133754	2	<i>C2CD3, PPME1</i>
2	2	2-2G	N/A	8	141601542	141660770	8q24.3	Dup	3	59229	1	<i>EIF2C2</i>
2	2	2-2B	N/A	4	177612566	190880409	4q34.3-4q35.2	Del	1	13267844	69	<i>NEIL3, AGA, AK094945, LOC285501, AF088005, AK056196, MGC45800, ODZ3, MIR1305, DCTD, FAM92A3, C4orf38, WWDC2, BOMB, BX537950, CLDN22, CDKN2AIP, BC038563, ING2, RWDD4A, C4orf41, STOX2, AK001394, ENPP6, MGC24125, AK126253, IRF2, CASP3, CCDC111, KLIP1, MLF1IP, ACSL1, UNQ9368, BC016366, AY429594, AK096134, AY429595, HELT, BC043280, SLC25A4, KIAA1430, SNX25, LRP2BP, ANKRD37, UFSP2, CR595267, C4orf47, CCDC110, PDLIM3, SORBS2, TLR3, FAM149A, MST119, CYP4V2,</i>

UNQ2560, KLKB1, F11, BC034307, BC038717, MTNR1A, FAT1, ZFP42, TRIML2, FLJ25801, TRIML1, AY494056, AK095968, BC087857, FRG1

2	2	2-2B	N/A	10	127656067	135430043	10q26.2-10q26.3	Dup	3	7773977	63	FANK1, CR611911, ADAM12, C10orf90, DOCK1, FAM196A, AX747123, NPS, BC132944, FOXI2, CLRN3, PTPRE, MKI67, AK124226, MGMT, EBF3, DKFZp66710324, EU250747, CR592586, GLRX3, TCERG1L, PPP2R2D, AK125699, BNIP3, AX746857, JAKMIP3, DKFZp686B1027, DPYSL4, STK32C, LRRC27, KIAA1674, PWWP2B, C10orf91, AF086154, INPP5A, NKX6-2, DKFZp434A1721, AK310947, C10orf93, AK125849, GPR123, KNDC1, UTF1, VENTX, MIR202, CS548341, ADAM8, TUBGCP2, ZNF511, BC047942, CALY, PRAP1, C10orf125, ECHS1, PAOX, PAO, MTG1, SPRN, FLJ00268, LOC619207, CYP2E1, SYCE1, FLJ44653
2	2	2-2B	N/A	20	46646976	47212441	20q13.13	Del	1	565466	1	LOC284749
2	2	2-2A	stabil	8	141608898	141660770	8q24.3	Dup	3	51873	1	EIF2C2
2	2	2-29	stabil	2	192349702	193085020	2q32.3	Dup	3	735319	3	OBFC2A, SDPR, TMEFF2
2	2	2-29	stabil	3	65904425	66668365	3p14.1	Dup	3	763941	3	MAGI1, SLC25A26, LRIG1
2	2	2-28	N/A	10	67960463	68041535	10q21.3	Del	1	81073	1	CTNNA3
2	2	2-28	N/A	13	110937707	111118948	13q34	Del	1	181242	1	COL4A2
2	2	2-244	instabil	3	61253045	78803850	3p14.2-3p12.3	Del	1	17550806	78	ADAMTS9, AER61, AK023371, AK025793, AK055831, AK094634, AK097190, AK124433, AK125532, AK307209, AK308660, AK310745, AL832184, ARL6IP5, ATXN7, AX747367, BC015590, BC038210, BC039495, BC040624, BC040632, BC041886, BC111371, C3orf14, C3orf49, C3orf64, CADPS, CNTN3, CR620595, DKFZp547J226, DKFZp586M2023, DQ584669, EIF4E3, FAM19A4, FAM86B1, FAM86D, FEZF2, FLJ10213, FOXP1, FRG2C, FRMD4B, GLT8D4, GPR27, hFKHLB, Id2B, KBTBD8, KIAA1013, KIAA1121, KIAA1568, KIAA1842, LMOD3, LOC285401, LRIG1, MAGI1, MIR1284, MIR1324, MIR548A2, MITF, MITF-C, PDZRN3, PPP4R2, PRICKLE2, PROK2, PSMD6, PTPRG, ROBO1, ROBO2, RYBP, SCA7, SHQ1, SLC25A26, SNTN, SUCLG2, THOC7, TMF1, UBA3, UBE1C, ZNF717

2	2	2-2310	N/A	13	115059765	63874837	13q14.3-13q34	LOH	2	51184928	148	A2LD1, ABCC4, ABHD13, ALG11, ANKRD10, ARGLU1, ARHGEF7, ATP11A, ATP4B, ATP7B, BAFF, BCMS, BIVM, BTF3L1, CARKD, CAR52, CCDC70, CDC16, CKAP2, CLDN10, CLN5, CLYBL, COL4A1, COL4A2, COMMD6, CUL4A, DACH1, DAOA, DCT, DCUN1D2, DHRS12, DIAPH3, DIS3, DLEU7, DNAJC3, DOCK9, DZIP1, EDNRB, EFN2, ERCC5, F10, F7, FARP1, FBXL3, FGF14, FKSG29, G72, GAS6, GPC5, GPC6, GPR18, GPR180, GPR183, GRK1, GRTP1, GUCY1B2, GW112, HNRNPA1L2, HS6ST3, ING1, INTS6, IPO5, IRS2, ITGBL1, ITR, KCTD12, KDELC1, KLF12, KLF5, KLHL1, LAMP1, LECT1, LIG4, LMO7, MBLL, MBNL2, MCF2L, MOAT-B, MST076, MYCBP2, MYO16, NALCN, NDFIP2, NEK3, OLFM4, OXGR1, PCCA, PCDH17, PCDH20, PCDH8, PCDH9, PCH68, PCID2, PIBF1, POU4F1, PROZ, PRR20, PRR20B, PRR20C, PRR20D, PRR20E, RAB20, RAP2A, RASA3, RBM26, RNASEH2B, RNF113B, RNF219, RP11-155N3.2, SCA8, SCEL, SERPINE3, SLAIN1, SLC10A2, SLC15A1, SLITRK1, SLITRK5, SLITRK6, SOX1, SOX21, SPRY2, STK24, SUGT1, TBC1D4, TBC1D6, TDRD3, TFDP1, TGDS, THSD1, TM9SF2, TMC03, TMTC4, TNFSF13B, TPP2, TUBGCP3, UBAC2, UCHL3, UGCGL2, UGGT2, UPF3, UPF3A, UTP14C, VGCNL1, VPS36, WDF2, WDFY2, ZIC2, ZIC5
2	2	2-2310	N/A	20	62724698	22115143	20q12-20q13.33	LOH	2	40609555	333	PTPRT, BC040166, SFRS6, L3MBTL, KIAA0681, SGK2, IFT52, MYBL2, GTSF1L, TOX2, JPH2, C20orf111, BC032458, BC019858, CR623134, BC036500, GDAP1L1, FITM2, R3HDML, NR2A1, HNF4A, BC071794, AF143870, C20orf62, TTPAL, SERINC3, PKIG, ADA, CR616794, AK090842, CR597563, WISP2, KCNK15, RIMS4, YWHAB, PABPC1L, C20orf119, URCC3, TOMM34, AK057198, STK3, STK4, KCNS1, WFDC5, WFDC12, PI3, SEMG1, SEMG2, SLPI, MATN4, RBPJL, RBPSUHL, SDC4, SYS1, DBNDD2, SYS1-DBNDD2, TP53TG5, PIG-T, PIGT, WFDC2, SPINT3, WFDC6, SPINLW1, EPPIN, WFDC8, WFDC9, WFDC10A, WFDC11, WFDC10B, WFDC13, SPINT4, WFDC3, DNTTIP1, UBE2C, TNNC2, SNX21, C20orf161, ACOT8, hNAACTE, ZSWIM3, ZSWIM1, C20orf165, NEURL2, CTSA, PLTP, PCIF1, ZNF335, AK054694, MMP9, SLC12A5, KIAA1176, NCOA5, KIAA1637, CD40, CDH22, SLC35C2, OVCOV1, ELMO2, DKFZp547G0215, LOC100240726, ZNF334, DKFZp572F2170, C20orf123, SLC13A3, NADC3, TP53RK, SLC2A10, EYA2, ZMYND8, KIAA1125, hCG_2018772, AK098067, BC047609, NCOA3, BC036778, SULF2, RP5-1049G16.1, BX648826, LOC284749, PREX1, ARFGFE2, FKSG56, CSE1L, STAU1, DDX27, ZNF1, C20orf199, SNORD12C, MIR1259, SNORD12B, SNORD12, AK055386, KCNB1, PTGIS, B4GALT5, KIAA0939, SLC9A8, SPATA2, RNF114, SNAI1, UBE2V1, TMEM189-UBE2V1, P/OKcl.19, TMEM189, CEBPB, AK307192, LOC284751, PTPN1, MIR645, FAM65C, PARD6B, BCAS4, ADNP, DPM1, MOCS3, KCNG1, NFATC2, ATP9A, KIAA0611, SALL4, ZFP64, TSHZ2, AK056432, ZNF217, SUMO1P1, BCAS1, AIBC1, CYP24A1, PFDN4, DOK5, CBLN4, MC3R, C20orf108, AURKA, CSTF1, CASS4, C20orf43, GCNT7, C20orf106, C20orf107, TFAP2C, BMP7, BC037891, SPO11, RAE1,

RBM38, HMGB1L1, BORIS, CTCFL, PCK1, ZBP1, PMEPA1, CR612603, C20orf85, PPP4R1L, RAB22A, VAPB, VAP-B, AK123388, APCDD1L, AK091704, AK054637, STX16, NPEPL1, BC007940, MIR296, DM004486, MIR298, GNAS1, GNAS, AK093534, TH1L, TH1, CTSZ, AK310046, TUBB1, ATP5E, SLMO2, C20orf45, ZNF831, EDN3, PHACTR3, SCAPIN1, SYCP2, DKFZp566K0247, C20orf177, PPP1R3D, CDH26, C20orf197, CR590645, AK309218, AX747739, CDH4, AK097866, AK025855, MIR1257, TAF4, LSM14B, PSMA7, SS18L1, KIAA0693, GTPBP5, DKFZp434C0935, HRH3, AK126744, OSBPL2, KIAA0772, ADRM1, LAMA5, RPS21, CABLES2, C20orf151, GATA5, C20orf200, C20orf166, DM004122, MIR1-1, DM004215, MIR133A2, SLC04A1, OATP-E, LOC100135777, NTSR1, AX747649, BC141903, C20orf20, OGFR, COL9A3, TCFL5, DPH3B, DIDO1, C20orf11, SLC17A9, BHLHE23, AK128329, NCRNA00029, HAR1B, HAR1A, DM004389, MIR124-3, YTHDF1, BIRC7, NKAIN4, FLJ16779, ARFGAP1, ARF1GAP, HRIHFB2281, COL20A1, CHRNA4, AK056267, KCNQ2, EFF1A2, PPDPF, PTK6, SRMS, C20orf195, PRIC285, RP4-697K14.11, GMEB2, STMN3, KIAA1088, RTEL1, TNFRSF6B, ARFRP1, ZGPAT, LIME1, SLC2A4RG, Si-1-2-19, ZBTB46, BC002534, C20orf135, OK/SW-cl.69, TPD52L2, DNAJC5, MIR941-1, FLJ00118, MIR941-2, MIR941-3, DQ590112, UCKL1, URKL1, MIR1914, MIR647, UCKL1AS, ZNF512B, SAMD10, PRPF6, NCRNA00176, SOX18, TCEA2, RGS19, OPRL1, C20orf201

2	2	2-2309	N/A	7	62081451	79295257	7q11.21-7q21.11	Del	1	17213807	187	ABHD11, AF290475, AK095583, AK097499, AK097702, AK123141, AK124308, AK125429, AK127026, AK301806, AK310313, AK311103, AL831977, AL832384, AM413008, ASL, AUTS2, AX747594, AY927540, BAZ1B, BC006435, BC017910, BC018166, BC037783, BC038424, BC040831, BC042811, BC044608, BC047594, BC053669, BC070376, BC071617, BC073780, BC090058, BC110795, BCL7B, BX649060, C7orf42, CALN1, CCDC146, CCL24, CCL26, CCT6P1, CLDN3, CLDN4, CLIP2, CRCP, DKFZp686G04235, DKFZp686O05147, DNAJC30, DQ574660, DQ575011, DQ586658, DQ590432, DQ594001, DQ596928, DQ599874, DQ601342, DTX2, EIF4H, ELN, ERV3, FDPSL2A, FGL2, FKBP36, FKBP6, FLJ25037, FZD9, GATSL1, GATSL2, GTF2I, GTF2IP1, GTF2IRD1, GTF2IRD2, GTF2IRD2B, GUSB, hCPE-R, HIP1, hPMS6, HSP27, HSPB1, INTS4L1, KCTD7, KIAA0705, KIAA1528, LAT2, LIMK1, LOC100132832, LOC100133091, LOC100287704, LOC100287834, LOC389527, LOC401379, LOC402538, LOC441242, LOC493754, LOC541473, LOC554248, LOC641746, LOC643955, LOC649395, LOC728927, LOC729156, MAGI2, MDH2, MGC34774, MIR590, MKSTYX, MLXIPL, NCF1, NCF1B, NCF1C, NCRNA00174, NSUN5, NSUN5B, NSUN5C, PHTF2, PION, PMS2L11, PMS2L12, PMS2L14, PMS2L15, PMS2L3, PMS2L5, POM121, POM121-2, POM121C, POMZP3, POR, PTPN12, Rabex5, RABGEF1, RBAP2, RFC2, RHBDD2, RSNB1L, SBDS, SBDSP, SEPHS1, SNORA14A, SNORA22, SPDYE3, SPDYE5, SPDYE7P, SPDYE8P,
---	---	--------	-----	---	----------	----------	-----------------	-----	---	----------	-----	--

												SRCRB4D, SRCRB-S4D, SRRM3, STAG3L1, STAG3L2, STAG3L3, STAG3L4, STX1A, STYXL1, TBL2, TMEM120A, TMEM60, TMPIT, TPST1, TRIM50, TRIM73, TRIM74, TYW1, TYW1B, UPK3B, VKORC1L1, VPS37D, WBSCR14, WBSCR16, WBSCR17, WBSCR20C, WBSCR22, WBSCR26, WBSCR27, WBSCR28, WBSCR5, YWHAG, ZNF107, ZNF117, ZNF138, ZNF273, ZNF679, ZNF680, ZNF727, ZNF735, ZNF92, ZP3
2	2	2-2303	N/A	1	203131285	203902482	1q32.1	Dup	3	771198	20	ADORA1, A1, FMOD, MYBPH, AK095458, CHI3L1, BC034684, FLJ00314, CHIT1, AK024293, AK309664, BTG2, PRELP, OPTC, ATP2B4, U42379, SNORA77, LAX1, ZC3H11A, SNRPE
2	2	2-2303	N/A	8	18192279	19297051	8p22-8p21.3	Dup	3	1104773	5	NAT2, PSD3, SH2D4A, CSGALNACT1, ChGn
2	2	2-2303	N/A	17	18322254	19692809	17p11.2	Dup	3	1370556	43	BC040601, LOC339240, AK296148, AK301679, LGALS9C, t132, FAM106A, CCDC144B, TBC1D28, ZNF286B, FKHL1P2, TRIM16L, FBXW10, FAM18B, PRPSAP2, SLC5A10, BC029877, FAM83G, BC112347, GRAP, DL492381, GRAPL, BC058012, EPN2, AX748411, B9D1, b9, MIR1180, MAPK7, DM110819, MFAP4, RNF112, BFP/ZNF179, AB055772, SLC47A1, SNORA59B, ALDH3A2, SLC47A2, MATE2-K, ALDH3A1, ULK2, AKAP10, CYTSB
2	2	2-2301	stabil	11	50407140	51316920	11p11.12	Del	1	909781	0	no genes
2	2	2-2300	N/A	4	101082943	102475025	4q23-4q24	Del	1	1392083	5	DDIT4L, EMCN, PPP3CA, AK000028, BANK1
2	2	2-2244	N/A	1	9194614	9370911	1p36.23-1p36.22	Del	1	176298	4	EF609116, MIR34A, H6PD, SPSB1
2	2	2-2200	N/A	6	5562546	5751269	6p25.1	Del	1	188724	1	FARS2
2	2	2-2106	stabil	15	98330746	99307109	15q26.2-15q26.3	Dup	3	976364	4	LOC91948, ARRD4, FAM169B, IGF1R
2	2	2-210	instabil	3	60587580	60969373	3p14.2	Del	1	381794	1	FHIT
2	2	2-21	stabil	10	54950356	63063557	10q21.1-10q21.2	Del	1	8113202	51	ACOT11, FAM151A, C1orf175, TTC4, DKFZp434K085, PARS2, TTC22, C1orf177, DHCR24, TMEM61, BSND, PCSK9, USP24, AK127270, PPAP2B, PRKAA2, C1orf168, DKFZp686O04253, BC048114, C8A, C8B, DAB1, MIR548D2, BC047487, BC033978, AX746780, OMA1, TACSTD2, KIAA1915, MYSM1, JUN, AK055150, AK296298, LOC729467, FGGY, BC042048, HOOK1, CYP2J2, C1orf87, AK097193, BC030753, NFIA, KIAA1439, TM2D1, INADL, hINADL, L1TD1, KANK4, USP1, DOCK7, ANGPTL3
2	2	2-24	N/A	6	21065787	21149064	6p22.3	Dup	3	83278	1	CDKAL1

Aufgelistet sind alle Klone, in denen Kopienzahlvariationen (CNVs) mit SNP-Arrays detektiert wurden, Informationen zur genauen chromosomalen Position, sowie Größe der CNV, sowie betroffene Gene. Die Klassifizierungen sind abhängig vom Ergebnis der Chromosomenbänderungsanalyse, *Gene, die laut GenomeStudio innerhalb des bp-Bereichs einer CNV liegen. Abkürzungen: bp: Basenpaar(e), Chr: Chromosom, CN: *copy number*, Del: Deletion, Dup: Duplikation, LOH: engl. *loss of heterozygosity*, N/A: engl. *not available*, keine Klassifizierung verfügbar.

Anhang-Tabelle 4: Vollständige Liste der Varianten, die mit der Exom-Sequenzierung detektiert wurden.

Experiment	Dosis (Gy)	Klon	Chr	Position (hg19)	Name	Qualität	Frequenz	Abdeckung	Reads	Gene	Transkript	Variantentyp	Auswirkung	Bekannt
1	0	1-C33	1	27092970	G>A	0,997	0,533	30	16	<i>ARID1A</i> <i>RN7SL501P</i>	ENST00000324856	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C33	2	144384212	G>A	0,998	0,5	48	24	<i>ARHGAP15</i>	ENST00000295095	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	0	1-C33	16	4937131	C>A	1	0,353	34	12	<i>PPL</i> <i>UBN1</i>	ENST00000345988	splice_region_variant, intron_variant	LOW	Nein
1	0	1-C33	1	217784312	C>A	0,996	0,459	233	107	<i>GPATCH2</i>	ENST00000366935	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C33	1	249144546	C>A	0,995	0,183	60	11	<i>ZNF692</i> <i>ZNF672</i>	ENST00000306601	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C33	2	84848410	C>T	0,997	0,424	151	64	<i>DNAH6</i>	ENST00000389394	synonymous_variant	LOW	Nein
1	0	1-C33	4	164393683	G>T	0,996	0,221	358	79	<i>TKTL2</i>	ENST00000280605	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C33	7	72985105	C>T	0,998	0,333	261	87	<i>TBL2</i>	ENST00000305632	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C33	12	10958920	C>T	0,998	0,453	128	58	<i>TAS2R8</i> <i>TAS2R9</i> <i>TAS2R7</i>	ENST00000240615	synonymous_variant	LOW	Nein
1	0	1-C33	13	46539447	G>T	0,994	0,309	68	21	<i>ZC3H13</i>	ENST00000282007	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C15	1	190129924	G>T	1	0,234	124	29	<i>BRINP3</i>	ENST00000367462	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C15	10	73766996	G>A	0,997	0,299	211	63	<i>CHST3</i>	ENST00000373115	synonymous_variant	LOW	Nein
1	0	1-C15	1	34066579	G>T	0,999	0,292	168	49	<i>CSMD2</i>	ENST00000373381	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C15	8	113364700	G>T	0,997	0,14	272	38	<i>CSMD3</i>	ENST00000297405	missense_variant	MODERATE	COSM1551200
1	0	1-C15	X	35993398	C>G	0,998	0,296	98	29	<i>CXorf22</i>	ENST00000297866	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C15	15	69561386	G>T	0,998	0,17	112	19	<i>GLCE</i>	ENST00000261858	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C15	22	23261839	A>G	0,998	0,113	247	28	<i>IGLC6</i> <i>IGLJ6</i> <i>IGLJ7</i> <i>IGLC7</i> <i>IGLC5</i>	ENST00000410078	non_coding_transcript _exon_variant	MODIFIER	Nein
1	0	1-C15	13	33635384	A>T	0,999	0,177	113	20	<i>KL</i>	ENST00000380099	missense_variant	MODERATE	rs368793454
1	0	1-C15	3	49159627	G>A	1	0,115	104	12	<i>LAMB2</i> <i>USP19</i>	ENST00000418109	stop_gained	HIGH	Nein
1	0	1-C15	12	6635297	G>T	0,998	0,19	100	19	<i>NCAPD2</i>	ENST00000315579	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C15	2	24916137	G>T	0,998	0,116	181	21	<i>NCOA1</i>	ENST00000288599	synonymous_variant	LOW	Nein
1	0	1-C15	5	137780108	C>T	0,997	0,231	65	15	<i>REEP2</i>	ENST00000378339	missense_variant	MODERATE	Nein
1	0	1-C15	7	64498787	G>T	0,999	0,208	53	11	<i>RP11-460N20.3</i> <i>CCT6P3</i>		non_coding_transcript _exon_variant	modifier	Nein
1	0	1-C15	4	25849051	A>G	0,998	0,131	137	18	<i>SEL1L3</i>	ENST00000399878	stop_lost	HIGH	Nein
1	0	1-C15	17	26919755	C>A	0,998	0,124	202	25	<i>SPAG5</i> <i>RP11-192H23.4</i>	ENST00000321765	synonymous_variant	LOW	Nein
1	0	1-C7	15	43820235	G>T	0,996	0,174	69	12	<i>MAP1A</i>	ENST00000399453	synonymous_variant	LOW	Nein

1	0	1-C7	7	99722166	C>T	1	0,117	171	20	CNPY4 RP11-506M12.1 MBLAC1 TAF6	ENST00000262932	synonymous_variant	LOW	Nein
1	0	1-C7	17	61987939	G>T	1	0,101	179	18	CSHL1	ENST00000346606	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	0	1-C7	2	8919842	G>T	0,992	0,106	104	11	KIDINS220	ENST00000256707	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200C3	2	118693043	G>T	0,995	0,529	34	18	CCDC93 <i>AC009303.3</i> HTR5BP	ENST00000376300	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200C3	2	228860335	C>A	0,993	0,294	68	20	SPHKAP	ENST00000344657	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200C3	3	142257536	T>C	0,999	0,597	67	40	ATR	ENST00000350721	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200C3	5	148586647	C>G	0,999	0,442	77	34	ABLIM3 RP11-331K21.1	ENST00000309868	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200C3	5	175740724	C>A	0,994	0,37	46	17	SIMC1 RP11-844P9.3	ENST00000341199	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200C3	6	65301410	T>C	0,991	0,11	255	28	EYS	ENST00000503581	synonymous_variant	LOW	Nein
1	2	1-2200C3	6	72858303	C>A	0,998	0,427	131	56	RIMS1	ENST00000521978	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200C3	10	26581421	G>A	0,996	0,405	111	45	GAD2	ENST00000376261	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200C3	11	64889326	C>A	0,997	0,571	35	20	FAU SYVN1 MRPL49 ZNHIT2 AP003068.12	ENST00000529639	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200C3	11	62415526	C>A	0,992	0,372	43	16	INTS5 GANAB RP11- 831H9.11	ENST00000330574	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200C3	11	124933280	C>A	0,991	0,413	300	124	SLC37A2	ENST00000308074	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200C3	12	42862403	A>G	0,998	0,425	160	68	PRICKLE1 RP11-328C8.4	ENST00000345127	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200C3	16	31391259	C>A	0,993	0,537	41	22	ITGAX	ENST00000268296	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200C3	18	9257005	C>T	0,995	0,136	235	32	ANKRD12 <i>RP11-888D10.4 RP11-21J18.1</i>	ENST00000262126	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200C3	19	43092972	G>T	0,998	0,417	48	20	CEACAM8 LIPE-AS1	ENST00000244336	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200C3	19	55668562	C>A	0,996	0,579	38	22	TNNI3 CTD-2587H24.4 DNAAF3 CTD- 2587H24.5		intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200C3	20	13797838	G>A	0,998	0,492	120	59	NDUFAF5	ENST00000378106	synonymous_variant	LOW	Nein
1	2	1-2100A6	6	50825121	T>C	0,997	0,343	140	48	RPS17P5	ENST00000498293	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A6	11	25610174	C>A	0,997	0,47	168	79	RPL36AP40	ENST00000473882	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A6	11	113673923	insG	0,998	0,492	189	93	USP28	ENST00000003302	frameshift_variant	HIGH	Nein
1	2	1-2100A6	11	118005671	C>T	0,997	0,469	96	45	SCN4B	ENST00000324727	3_prime_UTR_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A6	12	76532074	G>T	0,994	0,286	49	14	RP11-453D16.2 <i>RNU6-1271P</i>	ENST00000553021	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein

1	2	1-2100A6	19	15884911	T>C	0,994	0,579	95	55	<i>CYP4F24P</i> <i>249E10.1</i>	<i>LLNLR-</i>	ENST00000586049	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A6	2	227917048	G>T	0,996	0,362	80	29	<i>COL4A4</i>		ENST00000396625	synonymous_variant	LOW	Nein
1	2	1-2100A6	2	234726762	G>T	0,998	0,566	113	64	<i>MROH2A</i>		ENST00000389758	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2100A6	4	99313158	A>G	0,996	0,436	78	34	<i>RAP1GDS1</i>		ENST00000408927	synonymous_variant	LOW	Nein
1	2	1-2100A6	5	132038339	C>A	0,998	0,471	70	33	<i>KIF3A AC004237.1</i>		ENST00000378746	stop_gained	HIGH	Nein
1	2	1-2100A6	6	556565	G>T	0,995	0,349	106	37	<i>EXOC2</i>		ENST00000230449	splice_acceptor_variant	HIGH	Nein
1	2	1-2100A6	6	31674681	C>T	0,997	0,548	186	102	<i>MEGT1 LY6G6F XXbac-BPG32J3.20 ABHD16A LY6G6E</i>			5_prime_UTR_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A6	10	6531394	C>A	0,997	0,452	155	70	<i>PRKCQ</i>		ENST00000263125	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A6	16	4650267	C>T	0,996	0,159	170	27	<i>C16orf96</i>		ENST00000444310	synonymous_variant	LOW	Nein
1	2	1-2100A8	1	244798778	T>C	0,995	0,566	53	30	<i>C1orf101</i>		ENST00000366531	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	2	171608497	T>C	0,992	0,455	77	35	<i>EIF2S2P4 AC007405.4</i>		ENST00000461070	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	2	24342439	C>A	0,997	0,4	35	14	<i>PFN4 FAM228B RP11-507M3.1</i>			splice_region_variant,intron_variant	LOW	Nein
1	2	1-2100A8	4	8961474	T>G	0,995	0,391	69	27	<i>UNC93B8</i>		ENST00000511903	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	9	14922032	C>T	1	0,492	65	32	<i>LDHAP4</i>		ENST00000397561	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	16	48531919	C>T	0,997	0,405	37	15	<i>MOCS1P1</i>		ENST00000564020	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	17	25410166	G>T	0,996	0,452	42	19	<i>TUFMP1</i>		ENST00000581294	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	20	12059364	C>A	1	0,425	40	17	<i>ZNF700 ZNF763 ZNF763 CTD-2006C1.12</i>		ENST00000254321	missense_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	1	35260356	T>G	1	0,362	47	17	<i>GJA4 SMIM12</i>		ENST00000342280	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2100A8	1	217665069	A>G	0,993	0,256	43	11	<i>GPATCH2 RP11-361K17.2</i>		ENST00000366935	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2100A8	1	217665070	G>A	0,996	0,262	42	11	<i>GPATCH2 RP11-361K17.2</i>		ENST00000366935	missense_variant	MODERATE	rs183060038
1	2	1-2100A8	10	99968674	C>A	0,995	0,315	54	17	<i>R3HCC1L</i>		ENST00000314594	5_prime_UTR_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	11	60637902	C>A	0,996	0,229	48	11	<i>ZP1</i>		ENST00000278853	stop_gained	HIGH	Nein
1	2	1-2100A8	13	110864867	G>T	0,998	0,582	55	32	<i>COL4A1</i>		ENST00000375820	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	2	238244895	G>T	0,996	0,373	59	22	<i>COL6A3</i>		ENST00000295550	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2100A8	2	27715641	C>A	0,997	0,586	128	75	<i>FNDC4 IFT172 GCKR</i>		ENST00000264703	missense_variant	MODERATE	Nein

1	2	1-2100A8	5	176700714	C>A	0,997	0,48	204	98	NSD1	ENST00000439151	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2100A8	8	98943670	C>A	0,995	0,576	59	34	MATN2	ENST00000254898	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2100A8	2	133075813	A>G	0,999	0,184	76	14	ZNF806	ENST00000438300	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2100A8	7	97535345	T>C	0,997	0,271	48	13	AC079781.1 AC007875.2 AC079781.7	ENST00000408121	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200D7	1	63870119	T>A	1	0,525	59	31	ALG6	ENST00000371108	splice_region_variant,intron_variant	LOW	Nein
1	2	1-2200D7	14	51097657	G>C	1	0,412	51	21	ATL1 SAV1	ENST00000358385	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200D7	10	115891758	A>G	1	0,439	57	25	C10orf118	ENST00000369287	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200D7	14	74424938	T>A	0,998	0,425	160	68	COQ6 ENTPD5		missense_variant	moderate	Nein
1	2	1-2200D7	2	116283531	G>T	0,998	0,449	49	22	DPP10	ENST00000410059	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200D7	1	6149123	C>G	0,996	0,43	86	37	KCNAB2	ENST00000378097	intron_variant	MODIFIER	Nein
1	2	1-2200D7	15	65540505	G>T	0,996	0,714	49	35	PARP16	ENST00000261888	downstream_gene_variant	modifier	Nein
1	2	1-2200D7	1	12884924	C>T	0,994	0,436	149	65	PRAMEF11 RP5-845O24.8	ENST00000535591	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200D7	1	98212101	T>C	0,996	0,404	57	23	PTCH1	ENST00000331920	intron_variant	modifier	Nein
1	2	1-2200D7	1	41092211	C>A	0,996	0,229	96	22	RIMS3	ENST00000372684	missense_variant	MODERATE	Nein
1	2	1-2200D7	3	113184578	A>G	0,997	0,31	71	22	SPICE1	ENST00000295872	synonymous_variant	LOW	Nein
1	2	1-2200D7	15	54592505	C>A	1	0,24	50	12	UNC13C	ENST00000260323	missense_variant	MODERATE	COSM962977
1	2	1-2200D7	3	167245635	C>A	0,997	0,395	38	15	WDR49	ENST00000308378	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C100	3	149260186	G>A	0,996	0,446	83	37	WWTR1	ENST00000465804	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C100	5	157216476	A>G	0,998	0,454	328	149	CLINT1	ENST00000411809	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C100	8	145009409	G>C	0,997	0,383	115	44	PLEC	ENST00000322810	synonymous_variant	LOW	Nein
2	0	2-C100	9	125448738	A>G	0,998	0,274	95	26	TLK1P1	ENST00000456760	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
2	0	2-C100	9	135926220	G>A	0,992	0,346	182	63	GTF3C5	ENST00000372097	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C100	10	49983764	C>A	0,999	0,521	190	99	WDFY4	ENST00000325239	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C100	14	64408834	A>G	0,998	0,63	127	80	SYNE2	ENST00000344113	synonymous_variant	LOW	Nein
2	0	2-C100	19	40903080	G>T	0,997	0,411	129	53	PRX	ENST00000324001	synonymous_variant	LOW	Nein
2	0	2-C100	19	51628475	G>C	0,997	0,405	37	15	SIGLEC9 SIGLEC18P	ENST00000250360	missense_variant	MODERATE	Nein

2	0	2-C100	21	46314896	A>G	0,999	0,454	238	108	ITGB2	ENST00000355153	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C103	1	109633512	C>G	0,997	0,447	38	17	TMEM167B <i>RP5-1065J22.8</i>	ENST00000338272	splice_region_variant, intron_variant	LOW	Nein
2	0	2-C103	3	167249046	T>G	0,994	0,467	120	56	WDR49	ENST00000308378	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C103	5	79855494	C>A	0,998	0,553	94	52	ANKRD34B	ENST00000338682	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C103	12	118839804	G>T	1	0,328	61	20	SUDS3	ENST00000543473	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C103	13	19255261	T>C	0,999	0,484	31	15	TERF1P5 <i>LINC00387</i>	ENST00000477545	non_coding_transcript _exon_variant	MODIFIER	Nein
2	0	2-C103	16	15880506	A>G	0,998	0,511	233	119	MYH11	ENST00000300036	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C103	20	47691893	C>T	0,997	0,5	118	59	CSE1L	ENST00000262982	stop_gained	HIGH	Nein
2	0	2-C14	1	201334279	C>G	0,998	0,564	110	62	TNNT2	ENST00000367322	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	0	2-C14	2	227942706	G>A	0,995	0,602	108	65	COL4A4	ENST00000396625	stop_gained	HIGH	Nein
2	0	2-C4	11	30928212	C>G	0,996	0,406	133	54	DCDC1	ENST00000452803	missense_variant	MODERATE	Nein
2	0	2-C4	12	118839804	G>T	0,998	0,322	59	19	SUDS3	ENST00000543473	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-210	5	1576702	C>A	0,997	0,429	70	30	SDHAP3	ENST00000515467	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-210	7	149489222	C>A	0,996	0,342	76	26	SSPO	ENST00000465639	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-210	10	89622026	T>C	0,997	0,47	232	109	KLLN <i>PTEN</i>	ENST00000445946	non_coding_transcript _exon_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-210	11	124763574	G>T	0,998	0,475	99	47	ROBO4 <i>RP11-664I21.6</i>	ENST00000306534	non_coding_transcript _exon_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-210	12	57975017	A>T	1	0,593	27	16	KIF5A	ENST00000455537	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-210	19	17370757	A>G	0,997	0,203	69	14	USHBP1 <i>AC010646.3</i>	ENST00000252597	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2113	3	182673287	C>A	1	0,423	26	11	DCUN1D1 <i>RP11-531F16.3</i>	ENST00000460975	3_prime_UTR_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2113	4	87809341	A>C	0,997	0,521	96	50	C4orf36	ENST00000295898	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2113	6	110113966	A>G	0,999	0,523	44	23	FIG4	ENST00000230124	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2113	6	167453635	T>C	0,996	0,256	78	20	FGFR1OP <i>RP11-517H2.6</i>	ENST00000366847	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2113	9	125315760	C>T	0,999	0,44	302	133	OR1N2	ENST00000373688	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2113	15	58853198	C>G	0,997	0,487	80	39	LIPC	ENST00000299022	non_coding_transcript _exon_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2113	16	842730	C>T	0,997	0,421	38	16	CHTF18 <i>RPUSD1</i>	ENST00000262315	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2113	16	56269224	G>T	0,998	0,411	56	23	GNAO1	ENSG0000087258	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2113	17	53848395	A>C	1	0,48	25	12	PCTP	ENST00000268896	synonymous_variant	LOW	Nein

2	2	2-2113	18	29125637	T>G	0,995	0,34	50	17	DSG2 RP11-75N4.2		synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2114	1	158615111	A>C	1	0,469	143	67	SPTA1	ENST00000368147	5_prime_UTR_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2114	7	38725691	G>T	0,998	0,468	188	88	FAM183B	ENST00000409072	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2114	7	121653161	C>A	1	0,377	53	20	PTPRZ1	ENST00000393386	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2114	16	66847746	C>T	1	0,486	35	17	NAE1	ENST00000290810	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2114	17	15907546	A>G	0,999	0,488	297	145	TTC19 ZSWIM7	ENST00000261647	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2114	17	34340901	C>A	0,998	0,521	215	112	CCL23 RP11-104J23.2 RP11-104J23.1	ENST00000293280	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2114	20	31659961	C>G	0,998	0,515	165	85	BPIFB3	ENST00000375494	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-217	3	38159323	C>T	0,998	0,679	28	19	DLEC1 ACAA1	ENST00000346219	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-217	10	36811934	G>A	0,998	0,5	128	64	NAMPTL	ENST00000440465	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-217	10	70741270	C>T	0,998	0,508	61	31	DDX21	ENST00000354185	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-217	12	6080932	G>A	0,998	0,47	100	47	VWF	ENST00000261405	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-217	17	52992024	C>T	1	0,5	96	48	TOM1L1	ENST00000575882	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2202	1	246797324	C>A	1	0,58	81	47	CNST RP11-452J6.2	ENST00000366513	5_prime_UTR_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2202	2	75101054	G>T	0,997	0,482	220	106	HK2	ENST00000290573	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2202	3	162873302	G>T	0,998	0,444	63	28	DPP4	ENST00000360534	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2202	6	110059637	T>C	0,998	0,497	288	143	FIG4	ENST00000230124	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2202	10	97918368	A>C	0,998	0,494	83	41	ZNF518A	ENST00000371192	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2202	12	57532378	C>A	1	0,591	22	13	LRP1	ENST00000243077	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2202	17	18602587	A>C	0,993	0,206	97	20	TRIM16L	ENST00000395671	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2202	19	14578759	G>A	1	0,457	46	21	PKN1 PTGER1	ENST00000242783	synonymous_variant	LOW	rs201676903
2	2	2-2202	19	35832752	A>G	0,996	0,478	92	44	CD22 MIR5196	ENST00000085219	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2203	1	159888757	delICT C	0,999	0,325	40	13	TAGLN2	ENST00000368097	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2203	4	81082766	T>C	0,999	0,36	172	62	RP11-162K6.1	ENST00000467439	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2203	7	107545782	A>C	0,997	0,375	40	15	DLD	ENST00000205402	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2203	10	14950479	T>C	0,999	0,483	116	56	DCLRE1C SUV39H2	ENST00000378246	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2203	12	60098637	G>A	0,999	0,37	135	50	SLC16A7	ENST00000261187	splice_region_variant,intron_variant	LOW	Nein
2	2	2-2203	17	18047179	C>T	0,998	0,504	345	174	MYO15A snoU13	ENST00000205890	stop_retained_variant	LOW	Nein

2	2	2-2227	1	158615111	A>C	0,998	0,515	167	86	SPTA1	ENST00000368147	5_prime_UTR_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2227	2	239149189	G>A	0,993	0,444	27	12	AC096574.4 HES6 PER2	ENST00000409160	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2227	7	38725691	G>T	0,997	0,412	199	82	FAM183B	ENST00000409072	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2227	7	121653161	C>A	0,997	0,528	53	28	PTPRZ1	ENST00000393386	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2227	16	66847746	C>T	1	0,519	27	14	NAE1	ENST00000290810	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2227	17	34340901	C>A	0,998	0,494	156	77	CCL23 RP11-104J23.2 RP11-104J23.1	ENST00000293280	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2227	17	3169328	A>G	0,997	0,6	50	30	OR1D3P	ENST00000573526	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	rs186519443
2	2	2-2227	20	31659961	C>G	0,997	0,438	185	81	BPIFB3	ENST00000375494	upstream_gene_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2237	2	26686341	C>G	0,998	0,249	201	50	OTOF	ENST00000272371	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2237	4	62933975	A>G	1	0,562	32	18	LPHN3 RP11-84A1.3	ENST00000545650	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2237	5	77523390	G>A	0,994	0,547	139	76	AP3B1	ENST00000255194	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2237	6	89650810	A>C	0,999	0,66	97	64	RNGTT	ENST00000369485	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2237	11	18257441	G>T	1	0,36	100	36	SAA4 SAA2-SAA4 SAA2		splice_region_variant,intron_variant,non_coding_transcript_variant	LOW	Nein
2	2	2-2237	16	33738665	C>T	0,998	0,517	29	15	ARHGAP23P1 IGHV3OR16-7	ENST00000562773	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2244	1	172548385	A>C	1	0,44	50	22	SUCO	ENST00000263688	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2244	1	202569561	G>C	0,998	0,455	143	65	SYT2 RP11-569A11.1	ENST00000367268	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2244	2	48032056	T>C	0,997	0,424	255	108	MSH6 FBXO11	ENST00000234420	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2244	2	234847663	A>G	0,998	0,59	100	59	TRPM8	ENST00000324695	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2244	7	104751224	A>G	0,999	0,235	136	32	KMT2E SRPK2		missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2244	11	117060766	delT	0,996	0,478	90	43	SIDT2	ENST00000324225	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2244	13	20978822	T>G	1	0,338	77	26	CRYL1	ENST00000298248	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2244	15	43668770	C>A	0,998	0,424	172	73	TUBGCP4	ENST00000260383	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2244	17	52992024	C>T	0,997	0,495	105	52	TOM1L1	ENST00000575882	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2244	17	37564840	G>A	0,999	0,276	76	21	MED1 CTB-131K11.1	ENST00000300651	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2302	2	228145304	G>T	0,997	0,507	213	108	COL4A3 AC097662.2	ENST00000396578	3_prime_UTR_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2302	3	75478399	T>C	0,991	0,644	45	29	FAM86DP	ENST00000477247	downstream_gene_variant	MODIFIER	Nein

2	2	2-2302	3	156647392	A>T	0,992	0,541	61	33	LEKR1	ENST00000491763	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2302	5	175751628	T>C	0,995	0,515	66	34	SIMC1	ENST00000341199	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2302	7	65705610	C>T	0,995	0,522	113	59	TPST1	ENST00000304842	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2302	10	97698457	G>T	0,998	0,543	46	25	C10orf131 ENTPD1-AS1	ENST00000423344	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2302	12	7171405	G>T	0,998	0,401	142	57	C15	ENST00000328916	intron_variant,non_coding_transcript_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2302	12	123874677	G>A	0,995	0,457	129	59	SETD8	ENST00000330479	missense_variant,splice_region_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2302	14	105233142	delGAA	0,998	0,344	64	22	SIVA1 RP11-982M15.2 AKT1	ENST00000329967	splice_region_variant,intron_variant	LOW	Nein
2	2	2-2302	16	14021827	C>T	0,996	0,477	65	31	ERCC4 CTD-2135D7.2	ENST00000311895	stop_lost	HIGH	Nein
2	2	2-2302	16	67694039	G>T	0,997	0,475	59	28	ACD PARD6A RLTPR ENKD1	ENST00000219251	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2302	18	21453172	C>T	0,996	0,502	253	127	LAMA3	ENST00000313654	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2302	19	44278490	C>G	0,999	0,425	127	54	KCNN4	ENST00000262888	upstream_gene_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2336	1	63998467	T>G	0,994	0,433	30	13	EFCAB7 ITGB3BP RN7SL488P RNU7-123P		5_prime_UTR_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2336	1	158615111	A>C	0,997	0,475	99	47	SPTA1	ENST00000368147	frameshift_variant	HIGH	Nein
2	2	2-2336	2	214013349	insG	0,996	0,455	66	30	IKZF2 RP11-105N14.1	ENST00000374319	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2336	7	38725691	G>T	0,999	0,483	118	57	FAM183B	ENST00000409072	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2336	7	121653161	C>A	0,994	0,6	25	15	PTPRZ1	ENST00000393386	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2336	12	83359385	G>A	0,998	0,453	75	34	TMTC2	ENST00000321196	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2336	16	66847746	C>T	1	0,333	12	4	NAE1	ENST00000290810	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2336	17	34340901	C>A	0,996	0,425	80	34	CCL23 RP11-104J23.2 RP11-104J23.1	ENST00000293280	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2336	18	56204198	C>A	0,993	0,474	38	18	ALPK2 RP11-1151B14.4		missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2336	20	31659961	C>G	0,996	0,342	73	25	BPIFB3	ENST00000375494	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2M	2	233386495	C>A	0,994	0,385	39	15	PRSS56 CHRND	ENST00000449534	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2M	5	7520954	T>C	0,998	0,429	168	72	ADCY2	ENST00000338316	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2M	5	169482412	G>T	0,992	0,538	52	28	DOCK2	ENST00000256935	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2M	7	139737583	G>C	0,998	0,553	47	26	PARP12	ENST00000263549	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2M	7	143053723	G>T	0,998	0,462	143	66	FAM131B CLCN1	ENST00000443739	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2M	11	55927092	G>A	0,996	0,393	122	48	OR8K5	ENST00000313447	missense_variant	MODERATE	Nein

2	2	2-2M	12	117964886	C>A	0,999	0,367	98	36	KSR2	ENST00000425217	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2M	22	19340939	G>T	0,998	0,468	171	80	HIRA C22orf39		synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2P	5	1576702	C>A	0,998	0,432	74	32	SDHAP3	ENST00000515467	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2P	9	112899818	A>G	1	0,314	86	27	PALM2-AKAP2 AKAP2		intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2P	10	89622026	T>C	0,998	0,421	240	101	KLLN PTEN	ENST00000445946	intron_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2P	11	31815126	C>T	1	0,268	209	56	PAX6	ENST00000379123	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2P	11	124763574	G>T	0,995	0,452	93	42	ROBO4 RP11-664I21.6	ENST00000306534	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2P	12	57975017	A>T	1	0,535	43	23	KIF5A	ENST00000455537	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2P	13	52585442	G>T	0,996	0,217	300	65	ATP7B ALG11	ENST00000242839	non_coding_transcript_exon_variant	MODIFIER	Nein
2	2	2-2P	17	74750133	G>A	0,993	0,351	57	20	MFS11 RNU6-97P	ENST00000588460	stop_gained	HIGH	Nein
2	2	2-2P	21	22656597	G>T	0,998	0,449	214	96	NCAM2	ENST00000400546	synonymous_variant	LOW	Nein
2	2	2-2W	1	48694979	C>A	0,997	0,683	41	28	SLC5A9 RP5-1024N4.4		missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2W	4	113539261	A>C	1	0,279	86	24	C4orf21	ENST00000505019	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2W	4	113539261	A>C	1	0,279	86	24	C4orf21	ENST00000505019	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2W	17	52992024	C>T	0,997	0,512	129	66	TOM1L1	ENST00000575882	missense_variant	MODERATE	Nein
2	2	2-2W	17	35609963	G>C	0,998	0,217	230	50	ACACA	ENST00000353139	splice_acceptor_variant	HIGH	Nein

Aufgelistet sind die Klone, in denen Varianten über Exom-Sequenzierungen detektiert wurden, sowie Informationen zur Art der Variante, zur Coverage an der Stelle der Variante, zur Frequenz der Variante und zur Anzahl der Reads, in denen die Variante auftritt. Außerdem sind die von der Variante betroffenen Gene (direkt betroffene Gene sind fett markiert), das Transkript, der Variantentyp, der *in silico* vorhergesagte Schweregrad der Auswirkung auf das Transkript (Ensembl Variant Effect Predictor), sowie Informationen, ob die Variante bereits bekannt ist, gelistet. Abkürzungen: DNA-Basen: A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin. Chr: Chromosom.