

**Molekulargenetische Untersuchungen zur klonalen Evolution
epigenetischer und genetischer Veränderungen bei t(14;18) positiven
Follikulären Lymphomen**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Andrea Haake

Kiel, 2013

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung: 07.05.2013

Zum Druck genehmigt: 07.05.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl,
Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

Diese Arbeit widme ich einem ganz besonderen und einzigartigen Partner *Amigo* († 22.05.2011, Suchsdorf, Kiel), der über 14 Jahre gemeinsam mit mir sowohl schwere Zeiten durchlebte, als auch in guten Zeiten die Freude mit mir teilte.

Inhaltsverzeichnis

2.1.1	Probenmaterial für epigenetische Untersuchungen an in-situ-Follikulären Lymphomen und Follikulären Lymphomen mit partieller Lymphknoteninfiltration	28
2.1.2	Probenmaterial für die Untersuchung der Tumorentwicklung an Verlaufspalten von t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen.....	29
2.1.3	Probenmaterial für die „klassische“-PCR-basierte-Anreicherung	33
2.1.4	Kontrollen für Pyrosequenzierungsanalysen.....	33
2.1.5	Kontrollen für die Luminometrische Methylierungsanalyse	34
2.1.6	Chemikalien und Reagenzien	34
2.1.7	Geräte	35
2.1.8	Kits	36
2.1.9	Software	36
2.1.10	Puffer und Lösungen.....	37
2.1.11	Primersequenzen.....	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	DNA-Extraktion	40
2.2.1.1	Protokoll der DNA-Extraktion aus Frischgewebe	40
2.2.1.2	Protokoll der DNA-Extraktion aus Zellen in DMSO.....	41
2.2.2	Qualitätskontrolle der isolierten DNA-Proben	42
2.2.2.1	DNA-Quantifizierung mittels NanoDrop-Spektrophotometer	42
2.2.2.2	Überprüfung der DNA-Qualität mittels Agarosegelelektrophorese	43
2.2.2.3	Qualitätsbestimmung der isolierten DNA-Proben	43
2.2.2.4	Aufreinigung von DNA mittels Ethanolfällung	44
2.2.3	Nachweis einer t(14;18) und Überprüfung der Klonalität.....	45
2.2.4	Analysen zur Quantifizierung von DNA-Methylierung	45
2.2.4.1	Genomweite Abschätzung der Gesamt-DNA-Methylierung mittels Luminometrischer Methylierungsanalyse.....	46
2.2.4.2	Natrium-Bisulfitbehandlung von genomischer DNA	49

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.3	Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels HumanMethylation BeadChip von Illumina	51
2.2.4.4	Unterschied zwischen dem HumanMethylation27K und dem HumanMethylation450K	53
2.2.4.5	Auswertung von DNA-Methylierungsdaten der HumanMethylation BeadChip-Analyse.....	55
2.2.4.6	Regionenspezifische Quantifizierung von DNA-Methylierung mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung.....	56
2.2.4.7	Etablierung von Bisulfit-Pyrosequenzierungsassays	57
2.2.4.8	„klassische“-PCR-basierte-Anreicherung genomischer Regionen zur Qualitätssicherung von 454-Next-Generation-Sequencing-Verfahren	61
2.2.5	Methoden zum Nachweis genetischer Veränderungen mittels Sequenzierung.....	62
2.2.5.1	Kandidatengene für Mutationsanalysen mittels Next-Generation-Sequencing ...	62
2.2.5.2	PCR-basiertes DNA-Anreicherungsverfahren im Mikro-Droplet-Verfahren	64
2.2.5.3	DNA-Sequenzierung nach Sanger.....	66
2.2.5.4	Next-Generation-Sequencing-Verfahren	68
2.2.5.4.1	454-Technologie von Life Science (Firma Roche).....	69
2.2.5.4.2	HiSeq Verfahren von Illumina.....	70
2.2.5.5	Auswertung von Next-Generation-Sequencing-Daten	71
2.2.5.6	Rekonstruktion der klonalen Evolution basierend auf dem VDJ-Rearrangement.....	73
2.2.6	Statistische Auswertungen	74
3	Ergebnisse	75
3.1	Beschreibung eines neuen methodischen Ansatzes zur Untersuchung von inter- und intraklonalen Veränderungen der DNA-Methylierung in Tumoren mittels Next-Generation-Sequencing	77
3.1.1	Manuskript 1: Pipeline for Large-Scale Microdroplet Bisulfite PCR-based Sequencing allows the tracking of Hepitype Evolution in Tumors	79

Inhaltsverzeichnis

3.1.2	Zusätzliche Ergebnisse: „klassische“-PCR-basierte Anreicherung genomischer Regionen zur Qualitätssicherung von 454-Next-Generation-Sequencing-Verfahren.....	92
3.2	Molekulargenetische Untersuchungen bei t(14;18) positiven Vorläuferläsionen zur Identifikation von genetischen und epigenetischen Veränderungen der Tumorevolution.....	94
3.2.1	Manuskript 2: „A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma“	94
3.2.2	Zusätzliche Ergebnisse: <i>EZH2</i> Tyr641-Mutationsanalyse und Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung	98
3.2.2.1	Untersuchung der genetischen und epigenetischen Unterschiede zwischen in-situ Follikulären Lymphomen und Follikulären Lymphomen mit partieller Lymphknoteninfiltration.....	99
3.2.2.2	Untersuchung der genetischen und epigenetischen Veränderungen bei klonal verwandten Proben von in-situ Follikulären Lymphomen und klassischem Follikulären Lymphom.....	101
3.3	Longitudinale Daten-Akquise zur Analyse der klonalen Tumorevolution bei t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen	105
3.3.1	Rekonstruktion der klonalen Tumorevolution basierend auf Mutationsanalysen des V _H -Rearrangement	105
3.3.2	Analyse der Veränderung der DNA-Methylierung im Verlauf der klonalen Tumorevolution	109
3.3.2.1	Bestimmung der DNA-Methylierung mittels HumanMethylation27K.....	109
3.3.2.2	Validierung der 27K-Methylierungsanalyse mittels Infinium HumanMethylation450K von Illumina	114
3.3.2.3	Abschätzung der genomweiten Gesamt-DNA-Methylierung mittels Luminometrischer Methylierungsanalyse.....	118
3.3.3	Analyse der Häufigkeiten somatischer Mutationen bei Kandidatengenen im Verlauf der klonalen Tumorevolution	122
3.3.3.1	Validierung von Mutationen aus der Next-Generation-Sequencing-Analyse mittels Sanger-Sequenzierung	125

Inhaltsverzeichnis

3.3.3.2	Paarweise Analyse der Häufigkeiten detektierter Mutationen in den Verlaufsproben.....	127
3.3.4	Zusammenfassung der Ergebnisse aus der longitudinalen Daten-Akquise zur Analyse der klonalen Tumorevolution bei t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen.....	131
4	Diskussion.....	133
4.1	Methodische Aspekte zum Einsatz von PCR-basierten Anreicherungsverfahren und Quantifizierung von DNA-Methylierung.....	134
4.1.1	Anwendung eines Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahrens für Hochdurchsatzanalysen mittels Next-Generation-Sequencing.....	135
4.1.2	Methoden zur Quantifizierung von DNA-Methylierung.....	138
4.2	Tumorentwicklung bei t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen	140
4.2.1	Identifikation von Hepitypen durch die Detektion von DNA-basierten Einzelbasenveränderungen bei Tumoren.....	140
4.2.2	In-situ-Follikuläre Lymphome und Follikuläre Lymphome mit partieller Lymphknoteninfiltration entstammen einer ähnlichen Entwicklungsstufe der t(14;18) positiven Tumorentwicklung	141
4.2.3	Mutationen in Tyr-641 von <i>EZH2</i>	143
4.2.4	Bei Follikulären Lymphomen wurden auf der Grundlage des VDJ-Rearrangements bei Verlaufsproben drei Evolutionstypen identifiziert	144
4.2.5	Somatische Mutationen bei t(14;18) positiven FL in „Driver-Mutations-Kandidatengen“	146
4.2.6	Mutationen in einer 2,5 kb großen Region ab Transkriptionsstart als Folge einer fehlerhaften somatischen Hypermutation	149
4.3	Fazit.....	151
4.4	Ausblick.....	153
5	Zusammenfassung	154
6	Summary	156
7	Referenzen	158

Inhaltsverzeichnis

8	Anhang	177
9	Danksagung	183
10	Lebenslauf	185
11	Publikationsliste	186
12	Erklärung	190

Abkürzungen

A (Nukleotid)	Adenin
ADP	Adenosin-Diphosphat
ATP	Adenosin-Triphosphat
AID	activation-induced deaminase (Aktivierungsinduzierte Deaminase)
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
<i>BCL2</i>	B-cell lymphoma 2
<i>BCL6</i>	B-cell lymphoma 6
BCR	B-cell receptor (B-Zell-Rezeptor)
bp	base pair (Basenpaar)
<i>C2TA</i>	class II transactivator (MHC Klasse II Transaktivator)
<i>C10ORF12</i>	hypothetisches Protein LOC26148
C (Nukleotid)	Cytosin
CD	cluster of differentiation (Differenzierungsmerkmal)
<i>CDKN2A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor (Zyclin-abhängiger Kinaseinhibitor)
CGH	Comparative Genomic Hybridization (vergleichende Genomhybridisierung)
CH ₃	Methylgruppe
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CpG	Cytosin-(Phosphat)-Guanin Dinukleotid
<i>MYC</i>	myc-proto-oncogene
CREB	cAMP-response element binding protein
<i>CREBBP</i>	CREB binding protein
C-Segment	constant-segment (konstantes Gensegment des Immunglobulins)
CSR	class-switch-recombination (Klassenwechsel)
D-Segment	diversity-segment (Diversitätsgensegment des Immunglobulins)
ddNTP	Di-Desoxyribonukleinsäure-Nukleosid-Triphosphat
DLBCL	diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxyribonukleinsäure-Nukleosid-Triphosphat
ds	double strand (Doppelstrang)
<i>EP300</i>	E1A binding protein
E μ	Enhancer μ des Immunglobulin-Schwerkettengens
<i>EZH2</i>	Enhancer of zeste 2
FDC	follikulär dendritische Zellen
FL	Follikuläres Lymphom
FLIS	in-situ-Follikuläres Lymphom
G (Nukleotid)	Guanin
H	Histon
H3K4me3	bezeichnet eine Trimethylierung von Lysin (K) an Position 4 an Histon 3

Abkürzungen

HämatoSys	Systems Biology of the Haematopoetic Systems and Related Neoplasias (Systembiologie des hämatopoetischen Systems und den dazugehörigen Neoplasien)
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HMT	Histonmethyltransferase
HPF	high power field (beschreibt ein mikroskopisches Gesichtsfeld)
Ig	Immunglobulin (Protein)
IG	Immunglobulin-Gen
IgA	Immunglobulin Klasse A
IgD	Immunglobulin Klasse D
IgE	Immunglobulin Klasse E
IgG	Immunglobulin Klasse G
Ig _H	Immunglobulin heavy chain (Immunglobulin-Schwerketten) (Protein)
IGH	Immunglobulin heavy chain gene (Immunglobulin-Schwerketten-Gen) (Gen)
Igk	Immunglobulin kappa
Igλ	Immunglobulin lambda
IgM	Immunglobulin Klasse M
<i>IRF4</i>	interferon regulatory factor 4
J-Segment	joining-segment (verbindendes Segment des Immunglobulins)
K (Aminosäure)	Lysin
LK	Lymphknoten
LUMA	Luminometrischer Methylierungsassay
m	männlich
MALT	Mucosa-associated Lymphoid Tissue (Schleimhaut-assoziiertes lymphoides Gewebe)
mbr	major break point region (große Bruchpunktregion)
MCL	Mantelzell Lymphom
<i>MEF2B</i>	myocyte enhancer factor 2B
mcr	minor cluster region (kleine Clusterregion)
miRNA	Mikro-RNA
<i>MLL2</i>	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 2
MMML	Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen
<i>MYD88</i>	myeloid differentiation primary response gene
NGS	Next-Generation-Sequencing
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
N-Nukleotide	non-templated-Nukleotide
OD	optische Dichte
<i>PAX5</i>	paired box 5
PcG	Polycomb group (Polycomb Gruppe)
PCNSL	Primäres Lymphom des zentralen Nervensystems
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Probenentnahme
PFL	Folikuläres Lymphom mit partieller Lymphknoteninfiltration
<i>PIM1</i>	non-specific serine/threonine protein kinase
PPi	Pyrophosphat
PRC2	Polycomb Repressor Komplex 2
RAG (1 und 2)	recombination-activated genes (rekombinationsaktivierende Gene)
<i>REL</i>	reticuloendotheliosis viral oncogene

Abkürzungen

RSS	Rekombinationssignal Sequenz
<i>RHOH</i>	ras homolog gen family member H
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
Seq	Sequenzierung
SHM	somatic hypermutation (somatische Hypermutation)
SNP	Single Nukleotid Polymorphismen (Einzelbasenpolymorphismus)
ss	single strand (Einzelstrang)
T (Nukleotid)	Thymin
TBE	Trisborat-EDTA
TdT	Terminale Desoxynukleotidyltransferase
t-FL	transformiertes Follikuläres Lymphom
<i>TNFRSF14</i>	tumor necrosis factor receptor superfamily 14
<i>TP53</i>	tumor protein p53
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	Transkriptionsstartpunkt
U (Nukleotid)	Uracil
UTR	untranslatierte Region
V-Segment	variable-segment (variables Gensegment des Immunglobulins)
V(D)J-Umlagerung	bezieht sich auf den allgemeinen Umlagerungsprozess bei Schwerketten und Leichtketten
VDJ-umgelagert	meint die umgelagerten Gensegmente auf dem Schwerekettenlokal
w	weiblich
WGA	whole genome amplification (Gesamt-Genom-Amplifikation)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

1 Einleitung

1.1 Das Follikuläre Lymphom

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist das häufigste indolente („niedrigmaligne“) Lymphom. Es macht ca. 20-30 % aller B-Zell-Lymphome aus [1, 2]. Die malignen Lymphome gehören mit einem Anteil von 3,4 % zu den zehn häufigsten bösartigen Erkrankungen weltweit [3], wobei die Inzidenz insbesondere in der westlichen Welt in den letzten vier Jahrzehnten um 3-4 % angestiegen ist [3, 4]. In der Zeit von 1975 bis 2008 hat sich das Vorkommen der B-Zell-Lymphome bei der männlichen Bevölkerung nahezu verdoppelt, während es bei den Frauen um etwa 70 % angestiegen ist [5, 6]. Dieses ist insbesondere bei den aggressiven („hochmalignen“) Lymphomen zu beobachten, allerdings konnte auch bei den FL in den Jahren von 1992 bis 2001 ein Anstieg um 1,8 % pro Jahr verzeichnet werden [3, 7]. Von einem FL sind oftmals Erwachsene in einem Alter von über 60 Jahren betroffen, pediatriische FL sind eher selten und machen ca. 2 % aller B-Zell-Lymphome in der Altersgruppe unter 18 Jahre aus [8, 9]. Insgesamt wird die Erkrankung häufiger bei Frauen als bei Männern beobachtet, das Geschlechterverhältnis beträgt 1,7:1 [10].

Trotz intensiver Forschung und vieler verschiedener Studien ist die Ätiologie eines B-Zell-Lymphoms bis dato unklar [4, 6]. Für einige B-Zell-Lymphome, z.B. dem Burkitt-Lymphom (BL), wird eine Assoziation mit dem Epstein Barr-Virus (EBV) vermutet [3]. Tabakrauchen ist mit einem 1,4 bis 2,8 fach erhöhtem Risiko mit der Entwicklung eines B-Zell-Lymphoms assoziiert [11] und wird auch mit der Pathogenese von FL in Verbindung gebracht [12, 13]. Darüber hinaus geben epidemiologische Studien Hinweise auf ein erhöhtes Erkrankungsrisiko eines FLs durch die Belastung mit Benzol [14, 15] oder eine berufliche Belastung mit Pestiziden [16, 17]. Andere Studie, die beispielsweise den Einfluss des Alkoholkonsums oder des Body Mass Index (BMI) auf die Entwicklung eines FLs analysierten, sind eher widersprüchlich. Nach einer US-Amerikanischen Studie von Morton et al. besteht bei verstärktem Alkoholkonsum ein 10 % erhöhtes Risiko an einem FL zu erkranken, während in einer finnischen Studie keine Assoziation für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko gezeigt werden konnte [18, 19]. Die Gruppe von Skibola et al. detektierte bei Personen mit einem BMI über 30 ein dreifach erhöhtes Risiko für eine B-Zell-Lymphom-Erkrankung, verglichen mit Personen mit einem BMI zwischen 20 und 25, wohingegen Chang et al. in einer skandinavischen Population keine Verbindung zwischen Übergewicht und Risiko für ein FL nachweisen konnten [20, 21].

Einleitung

Chromosomale Veränderungen sind mit Tumoren assoziiert und werden mit der Entwicklung von B-Zell-Lymphomen in Verbindung gebracht. Beispielsweise korreliert die Anzahl und die Komplexität der Chromosomenmutationen mit dem Alter [22, 23]. Zytogenetische Analysen von Tumoren in den Jahren 1970 bis 1995 identifizierten über 600 rekurrente chromosomale Veränderungen. Dabei sind balancierte Chromosomenveränderungen, insbesondere reziproke Translokationen für Tumoren des blutbildenden Systems (z.B. Lymphome, Leukämien) typisch, bei soliden Tumoren (z.B. Pankreas-, Haut- oder Brusttumoren) dagegen nicht so häufig (siehe Abbildung 1) [22].

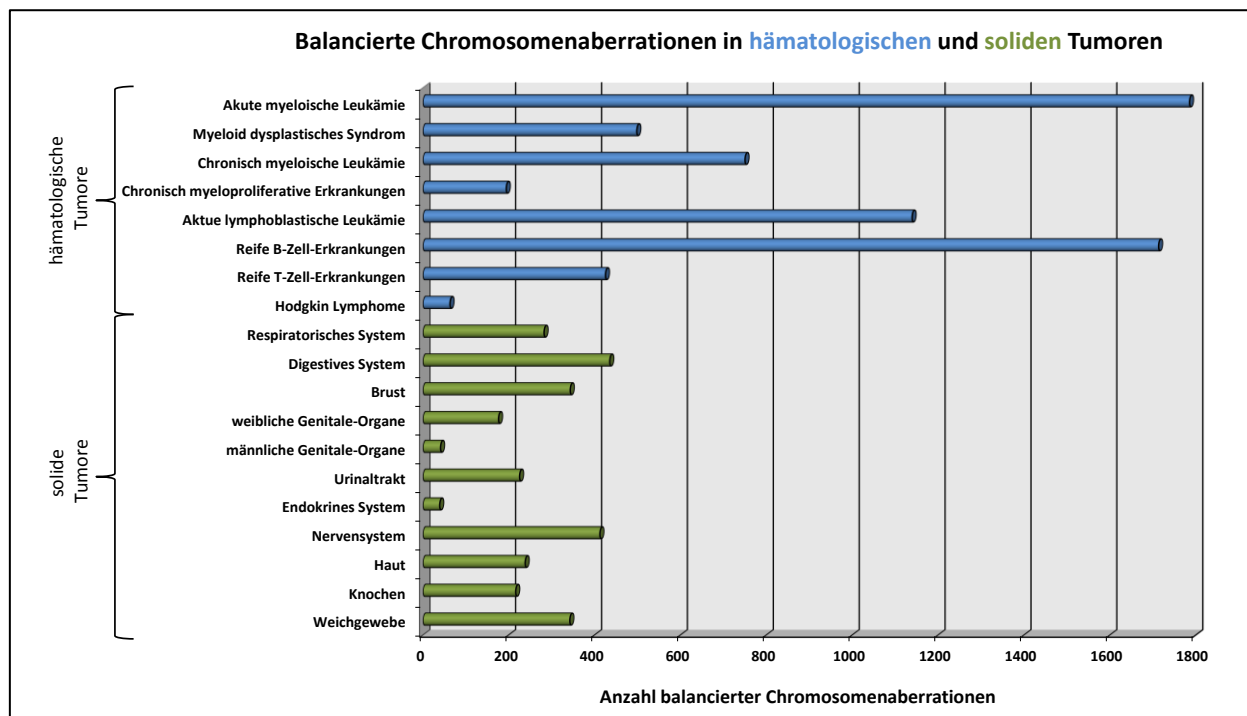


Abbildung 1: Häufigkeiten balancierter Chromosomenaberrationen in hämatologischen und soliden Tumoren aus zytogenetischen Analysen von Tumoren in den Jahren 1970 bis 1995 (basierend auf Mitelman et al., 2007 [22]).

Chromosomale Translokationen, die mit einer deregulierten Expression eines Onkogens einhergehen, sind Kennzeichen vieler reifer B-Zell-Lymphome. Zu diesen zählt beispielsweise die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$. Sie wurde als die häufigste chromosomale Anomalie in B-Zell-Lymphomen identifiziert [24-28]. Die Inzidenz der Translokation $t(14;18)(q32;q21)$ bei FL und diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DLBCL) variiert von Studie zu Studie. Einige detektierten eine Häufigkeit von bis zu 70-80 % bei FL und 30-50 % bei DLBCL [25, 29], während andere Gruppen Häufigkeiten bis zu 90 % bei FL und bis zu 20 % bei DLBCL identifizierten [24, 30].

1.2 Die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$

Bei der Translokation $t(14;18)(q32;q21)$, im Folgenden mit $t(14;18)$ bezeichnet, wird das antiapoptotische *BCL2*-Gen von Chromosom 18 unter die Regulation des aktiven Enhancers (E_{μ}) des

Einleitung

Immunglobulin-Schwerkettengens (*IGH*) von Chromosom 14 gebracht (siehe Abbildung 2) [23, 31, 32]. Da Schwerketten von Immunglobulinen (IG) im Rahmen der Antikörperproduktion ständig abgelesen und exprimiert werden, geschieht dies, für das neben den *IGH*-Lokus translozierte *BCL2*-Gen und in der Folge für das BCL2-Protein, ebenfalls. Es kommt zu einer Überexpression des BCL2-Proteins [33].

Die BCL2-Protein Familie besteht aus pro- und antiapoptotischen Regulatoren des Zellzyklus [34, 35]. Ein Verbindung zwischen dem BCL2-Protein und der Inhibierung der Apoptose wurde erstmals 1980 im Zusammenhang mit der Translokation t(14;18) bei FL beschrieben [36]. Physiologisch wird BCL2 in heranreifenden B-Lymphozyten und Gedächtnis-B-Lymphozyten exprimiert [33, 37], während in Keimzentrums-B-Zellen, die mit keinem passenden Antigen reagiert haben, die BCL2-Protein Expression herunterreguliert und der programmierte Zelltod dieser Zellen induziert wird [38]. Eine Überexpression von BCL2-Protein dagegen inhibiert den programmierten Zelltod und liefert Keimzentrums-B-Zellen einen Überlebensvorteil [34, 39, 40].

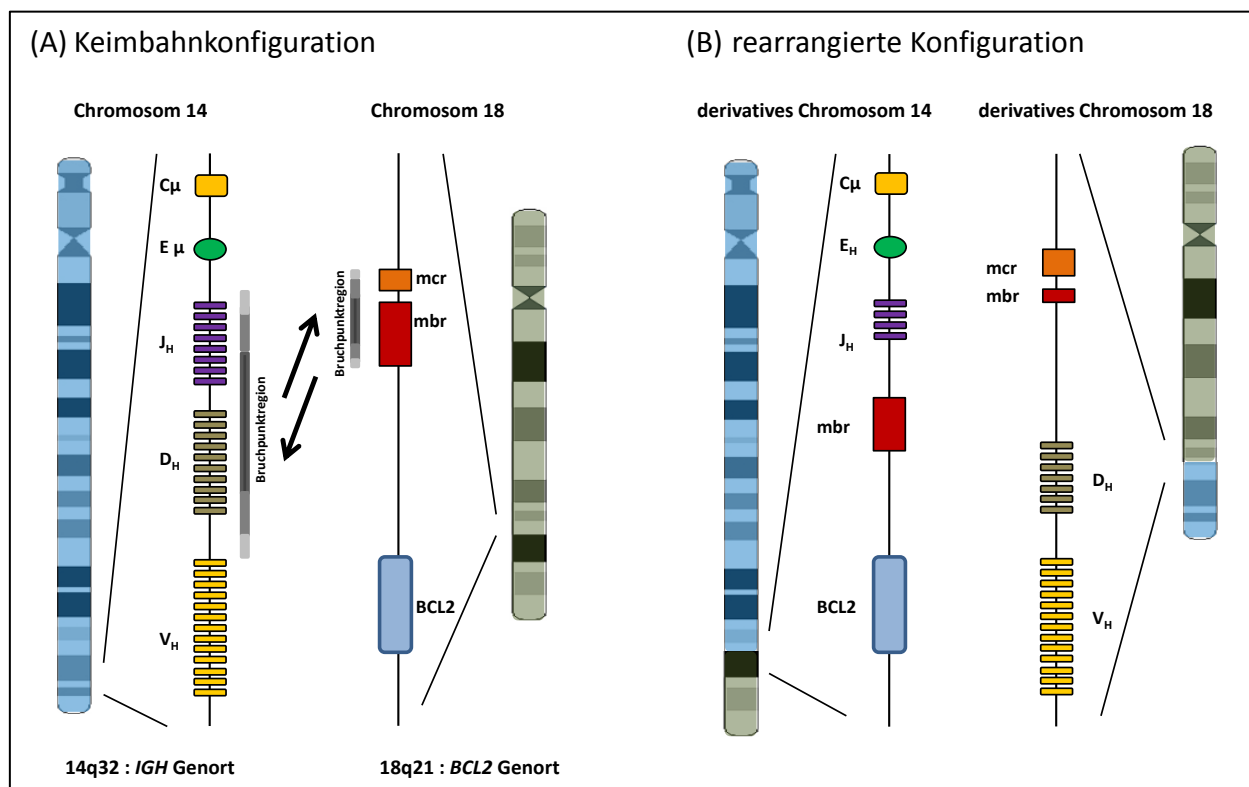


Abbildung 2: Schematische Darstellung der an der Translokation t(14;18)(q32;q21) beteiligten chromosomalen Regionen in der Keimbahnkonfiguration **(A)** und der rearrangierten Konfiguration **(B)** (modifiziert nach Nadel et al., 2001 [32]).

Gensegmente des Immunglobulins: C: constant-segment (konstantes Gensegment); J: joining-segment (verbindendes Gensegment); D: diversity-segment (Diversitätsgensegment); V: variable-segment (variables Gensegment); E μ : Enhancer μ des Immunglobulin-Schwerkettengens; H: Abkürzung für "heavy chain locus"= Schwerkettenlokus; mcr: minor cluster region (kleine Clusterregion); mbr: major break point region (große Bruchpunktregion).

Verschiedene Studien konnten die jeweiligen Bruchpunktregionen der Translokation auf den beiden derivativen Chromosomen 14 und 18 eingrenzen [31, 32, 41]. Auf Chromosom 14 wurden diese gehäuft

Einleitung

in der Immunglobulin-Diversitäts-Region (D_H) und der Immunglobulin-Joining-Region (J_H) des *IGH*-Lokus detektiert [31]. Auf Chromosom 18 sind die Bruchpunkte auf zwei Bereiche konzentriert, die mit den Begriffen „major break point region“ (mbr, große Bruchpunktregion) und „minor cluster region“ (mcr, kleine Clusterregion) bezeichnet werden [41, 42].

Die geographische Verteilung der Häufigkeit einer $t(14;18)$ unter den B-Zell-Lymphom-Subtypen ist heterogen [29, 41, 43, 44]. Beispielsweise liegt die Inzidenz eines *BCL2/IGH* Rearrangements in den Vereinigten Staaten bei etwa 80 %, während in den asiatischen und europäischen Staaten eine Häufigkeit von 48 % und 55 % verzeichnet wurde [29]. Auch unter den FL-Subtypen ist die Prävalenz der Translokation $t(14;18)$ unterschiedlich. Bei ca. 85-90 % der nodalen Lymphome ist die $t(14;18)$ nachweisbar, aber bei den primären kutanen wurde sie nur bei ca. 40 % der Fälle detektiert [45, 46]. Außerdem steht der $t(14;18)$ -Status im Zusammenhang mit dem histologischen Grad des FLs. Während sie bei ca. 70-85 % der FL Grad 3b und 30-40 % der FL Grad 3a nicht vorkommt, gibt es unter den FL Grad 1 und 2 nur einige wenige Fälle ohne die Translokation [10, 47-49]. Bei leukämisch verlaufenden (Ausschwemmung ins Blut) Lymphomen wird die Anzahl $t(14;18)$ positiver Zellen im peripheren Blut auch als molekularer Marker des Lymphoms genutzt [50-52]. Hirt et al. identifizierten, dass die Anzahl der Zellen mit einer Translokation zum Zeitpunkt der Diagnose höher ist, als die Anzahl der Zellen während einer therapeutischen Behandlung. In der Remission identifizierten sie erneut erhöhte Zellzahlen mit einer $t(14;18)$, was bereits ein Indikator für ein bevorstehendes Rezidiv sein könnte [53].

Obwohl chromosomale Translokationen charakteristisch für viele hämatologische Neoplasien sind [54], sind nicht alle Zellen, die eine Translokation tragen auch maligne [55, 56]. Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Translokation $t(14;18)$ auch in gesunden Individuen vorkommt [10, 41, 57, 58]. Beispielsweise detektierten Summers et al. bei 25 % der analysierten Personen im peripheren Blut von über 480 gesunder Individuen ein *BCL2/IGH* Rearrangement [58]. Yasukawa et al. identifizierten bei 52 % gesunder deutscher und 16 % gesunder japanischer Individuen eine $t(14;18)$ im peripheren Blut [59]. Darüber hinaus untersuchten andere Studien die Assoziationen zwischen dem Alter und der Häufigkeit einer $t(14;18)$ im peripheren Blut [60, 61]. Beispielsweise analysierte die Arbeitsgruppe von Schüler et al. peripheres Blut von 715 gesunden Probanden im Alter von 0 bis 90 Jahre. Bei Individuen bis zum 10. Lebensjahr waren keine $t(14;18)$ positiven Zellen nachweisbar, die Altersgruppe 10-50 Jahre zeigte eine Prävalenz von 66 % [61]. Weiterhin gibt es Vermutungen, dass der Kontakt mit Pestiziden das Risiko erhöht, an einem B-Zell-Lymphom zu erkranken. Studien zeigten, dass gesunde Landwirte die Pestiziden ausgesetzt waren, häufiger eine $t(14;18)$ im Blut aufwiesen als gesunde Farmer, die keinen Pestizidkontakt hatten [16, 17, 62].

Einerseits lassen die Bruchpunkte der Translokation t(14;18) einen fehlgeleiteten Entwicklungsprozess in einem frühen Stadium der B-Lymphozytenentwicklung im Knochenmark vermuten [23, 31, 32], aber andererseits zeigt die Erkrankung charakteristische immunphänotypische Merkmale eines späteren Stadiums der B-Lymphozytenentwicklung im Keimzentrum: die Tumorzellen des FLs exprimieren auf der Zelloberfläche die Immunglobuline in der Häufigkeit: IgM>IgD>IgG>IgA, und sind positiv für die Keimzentrums-B-Zell Marker BCL6, CD38 und CD10 sowie die B-Zell Marker CD19, CD20 und CD22 [9].

Zusammengefasst deuten diese Daten daraufhin, dass die Ursache für die Entstehung eines FLs noch relativ unverstanden ist. Die Anwesenheit von t(14;18) positiven Zellen scheint alleine unzureichend für eine vollständige Lymphomentwicklung zu sein [23, 63]. Um die Evolutionstheorien eines FL nachvollziehen zu können, wird im Folgenden zunächst auf die Entwicklung eines normalen B-Lymphozyten im Knochenmark und im Keimzentrum eingegangen.

1.3 B-Zellentwicklung

Die B-Lymphozyten entstammen zusammen mit den T-Lymphozyten und den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) aus gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark. Diese entwickeln sich zusammen mit einer myeloischen Vorläuferzelle aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle [64]. Die B- und T-Lymphozyten unterscheiden sich von den NK-Zellen durch die Expression von Antigenrezeptoren und untereinander durch den Ort, an dem sie ausdifferenzieren. B-Lymphozyten entwickeln sich in Keimzentren z.B. von Lymphknoten, Milz oder Tonsille, wohingegen T-Lymphozyten im Thymus zu Effektorzellen mit verschiedenen Funktionen wie z.B. T-Helferzellen differenzieren, die unter anderem B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern aktivieren können [64-66].

Im Knochenmark erfolgt die Entwicklung aus einer B-Zell lymphatischen Stammzelle über das Stadium der Pro- und Prä-B-Zelle zu einer unreifen B-Zelle (siehe Abbildung 3). In dieser Phase machen die Vorläufer-B-Zellen (Pro-B-Zellen) eine Umlagerung des Immunglobulin-Schwerkettengenortes durch und differenzieren zu großen zirkulierenden Vorläufer-B-Zellen (Prä-B-Zellen). Der Prozess der Umlagerung wird auch als V(D)J-Rearrangement bezeichnet. Er wird maßgeblich über die rekombinationsaktivierenden Gene *RAG1* und *RAG2* (engl.= recombination-activated genes; RAG) reguliert [67-70] und in Abschnitt 1.3.1 genauer beschrieben.

Unreife B-Zellen gelangen über den Blutstrom in das periphere lymphatische System (Lymphknoten, Tonsille, Milz) wo sie letztlich zu Gedächtniszellen und Antikörper-sezernierenden Plasmazellen heranreifen [66, 67]. Die Aktivierung einer B-Zelle erfolgt durch den Kontakt der B-Zelle mit einem Antigen. Diese Interaktion führt zur Initiierung der „Keimzentrumsreaktion“ und Affinitätsreifung der B-

Einleitung

Zellen gegenüber das Antigen. Die Keimzentrumsreaktion ist gekennzeichnet durch eine klonale Expansion der Zellen, sowie Klassenwechsel (class-switch-recombination; CSR) und somatische Hypermutation (somatic hypermutation; SHM) der *VH*-Gene. Dieses erfolgt unter Beteiligung der Aktivierungsinduzierten Deaminase (activation-induced deaminase, AID), ein spezifisch in B-Zellen exprimierten Enzym. Eine ausführliche Beschreibung dieser Prozesse erfolgt in Abschnitt 1.3.2. Die durch die Keimzentrumsreaktion hervorgerufene Affinitätsreifung trägt maßgeblich zur Erhöhung der Antigenvielfalt bei [71-73].

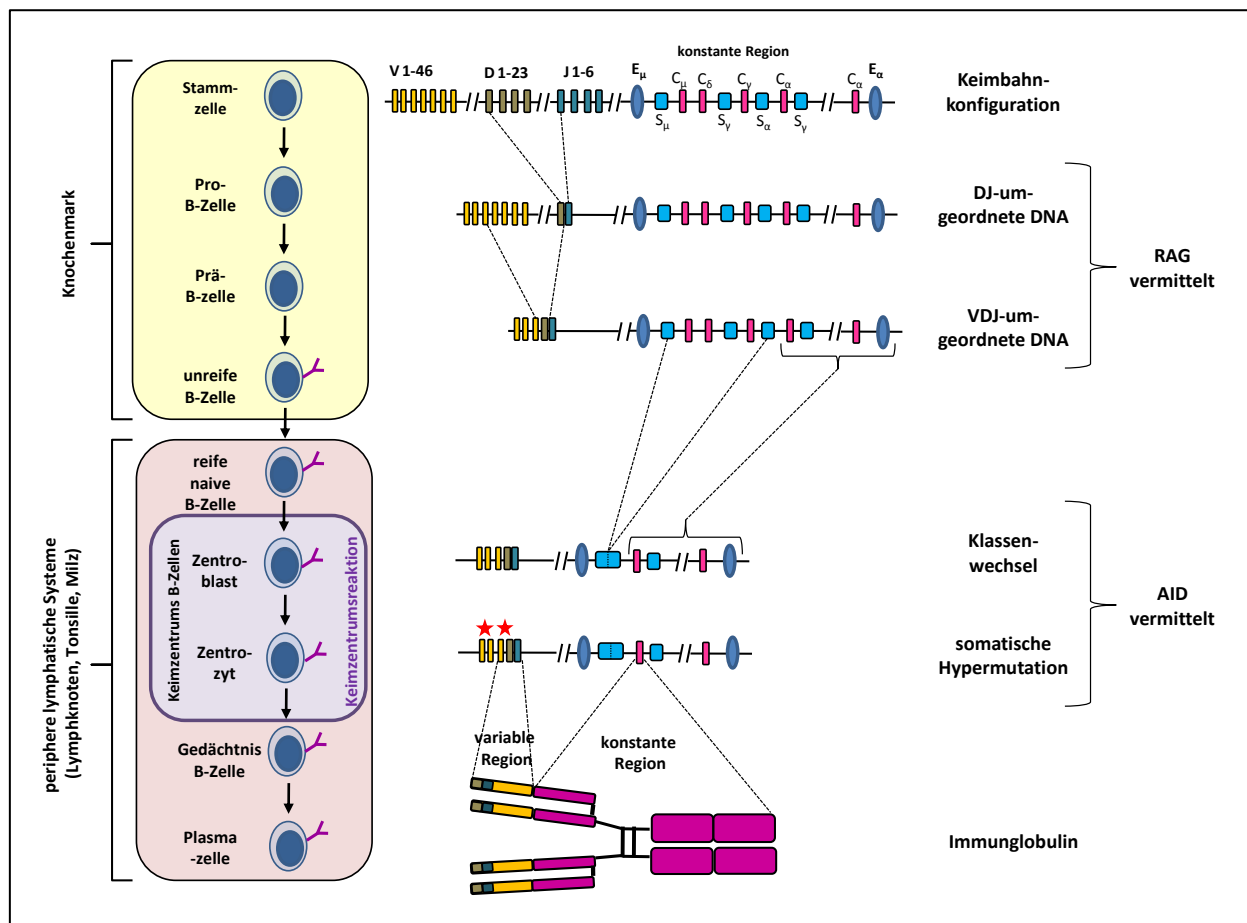


Abbildung 3: Die Entwicklung der B-Lymphozyten erfolgt über mehrere Schritte von der Stammzelle bis hin zur Plasmazelle. Die Umlagerungen der V(D)J-Segmente finden im Knochenmark statt. Die Affinitätsreifung, gekennzeichnet durch Klassenwechsel und somatischer Hypermutation, kommt in den peripheren lymphatischen Organen vor (basierend auf: Murphy et al., 2009; Martinez-Climent, 2010; Küppers et al., 2005 [39, 66, 68]).

S: switch; E: Enhancer; RAG: recombination-activated genes (rekombinationsaktivierende Gene); AID: activation-induced deaminase (Aktivierungsinduzierte Deaminase); Gensegmente des Immunglobulins: V: variable-segment (variables Gensegment); D: diversity-segment (Diversitätsgensegment); J: joining-segment (verbindendes Gensegment); C: constant-segment (konstantes Gensegment); die somatische Hypermutation ist durch Sterne dargestellt.

Die antigenerkennenden Moleküle der Lymphozyten sind die Antigenrezeptoren in Form von Immunglobulinen bei B-Lymphozyten und T-Zell-Rezeptoren bei T-Lymphozyten. Immunglobuline (Ig) der Klasse G (IgG) besitzen die Struktur eines „Y“ und bestehen aus zwei schweren Ketten und zwei leichten Ketten. Diese setzen sich aus variablen (V-Region) und konstanten Regionen (C-Region) zusammen [74, 75]. Das große Spektrum der Antigen-Spezifitäten ist bedingt durch die Unterschiede in

der Aminosäuresequenz der Antigen-Bindestelle, die von variablen Regionen der Rezeptorproteinketten gebildet werden [76]. Die variablen Regionen sind in drei Gensegmenten kodiert: V-Segment (V= variabel), D-Segment (D= diversity) und J-Segment (J= joining). Diese werden in einem sich entwickelnden Lymphozyten über somatische Rekombination zusammengefügt. Die verschiedenen Schritte der Umlagerung sind dabei charakteristisch für die jeweiligen Stadien der B-Zell-Entwicklung [66, 74].

1.3.1 V(D)J-Rearrangement im Knochenmark

Der Locus der schweren Kette (engl.= heavy chain,_H) wird als erstes umgelagert [77]. In der Phase der Pro-B-Zelle erfolgt eine irreversible Umlagerung eines der D_H-Segmente mit einem der J_H-Segmente wodurch die Zellen zu späten Pro-B-Zellen werden. In diesen späten Pro-B-Zellen lagert sich eines der V_H-Segmente um und verknüpft ein V_H-Segment mit dem umgelagerten DJ_H-Segment. Diese VDJ-Rekombination wird initiiert, indem der Protein-Komplex, bestehend aus RAG1 und RAG2, an die spezifischen Erkennungssequenzen (Rekombinations Signal Sequenz, RSS) bindet. Die RSS befinden sich direkt neben allen Antigen Rezeptor V-, D- und J-Segmenten und bestehen aus einer relativ gut konservierten Heptamer und Nonamer Sequenz [69, 78-80]. Während des Umlagerungsprozesses entstehen glatte oder einzelsträngige DNA-Enden, die anschließend von einer Terminalen Desoxynukleotidyltransferase (TdT) modifiziert werden. Das Enzym TdT kann Nukleotide in einer beliebigen Reihenfolge sowohl entfernen als auch hinzufügen. Da sie nicht in der DNA-Matritze kodiert sind, werden sie auch als N-Nukleotide (nontemplated-Nukleotids) bezeichnet [81-84].

Der erste Reifungsmechanismus der VDJ-Umlagerung ist beendet, indem eine vollständige schwere Kette eines Immunglobulins auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dieser Prä-B-Zell-Rezeptor (Prä-BCR) signalisiert den Zellen, dass eine produktive Umlagerung stattgefunden hat [70]. Die Zellen beginnen zu proliferieren und es erfolgt die Umlagerung der Leichtkettengene (engl.= light chain,_L) Kappa (κ) oder Lambda (λ). Nach dem gleichen Muster wie bei der schweren Kette, wird eine variable V_L-Region mit einem J_L-Segment verknüpft. War die Kombination der Gen-Segmente für eine schwere und eine leichte Kette erfolgreich, ist die B-Zelle in der Lage, Ig der Klasse M (IgM) zu synthetisieren und auf der Oberfläche zu präsentieren [85, 86]. War die Rekombination der Ketten nicht produktiv (z.B. durch Verschiebung des Leserasters), so hat die Zelle die Möglichkeit, jeweils das zweite Allel, beziehungsweise im Falle der leichten Ketten den zweiten Locus, d.h. κ oder λ , zu rekombinieren. Gelingt dies ebenfalls nicht, geht die Zelle in Apoptose [69, 85, 87]. Aufgrund der zufälligen Rekombinationsprozesse besteht das Risiko, dass eine B-Zelle einen BCR exprimiert, der gegen körpereigene Moleküle gerichtet ist. Diese autoreaktiven B-Zellen werden ebenfalls durch Apoptose eliminiert [88].

1.3.2 Somatische Hypermutation und Klassenwechsel im Keimzentrum

Nachdem die reifen B-Zellen das Knochenmark verlassen haben, gelangen sie über das periphere Blut in die sekundären lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Tonsille oder Milz) und zirkulieren in den Geweben bis sie auf ein Antigen treffen. Durch den Kontakt mit einem passenden Antigen und einem zusätzlichen Stimulus der T-Zellen, beginnen die B-Zellen zu proliferieren. Damit ist die Keimzentrumsreaktion initiiert (Abbildung 4) [89].

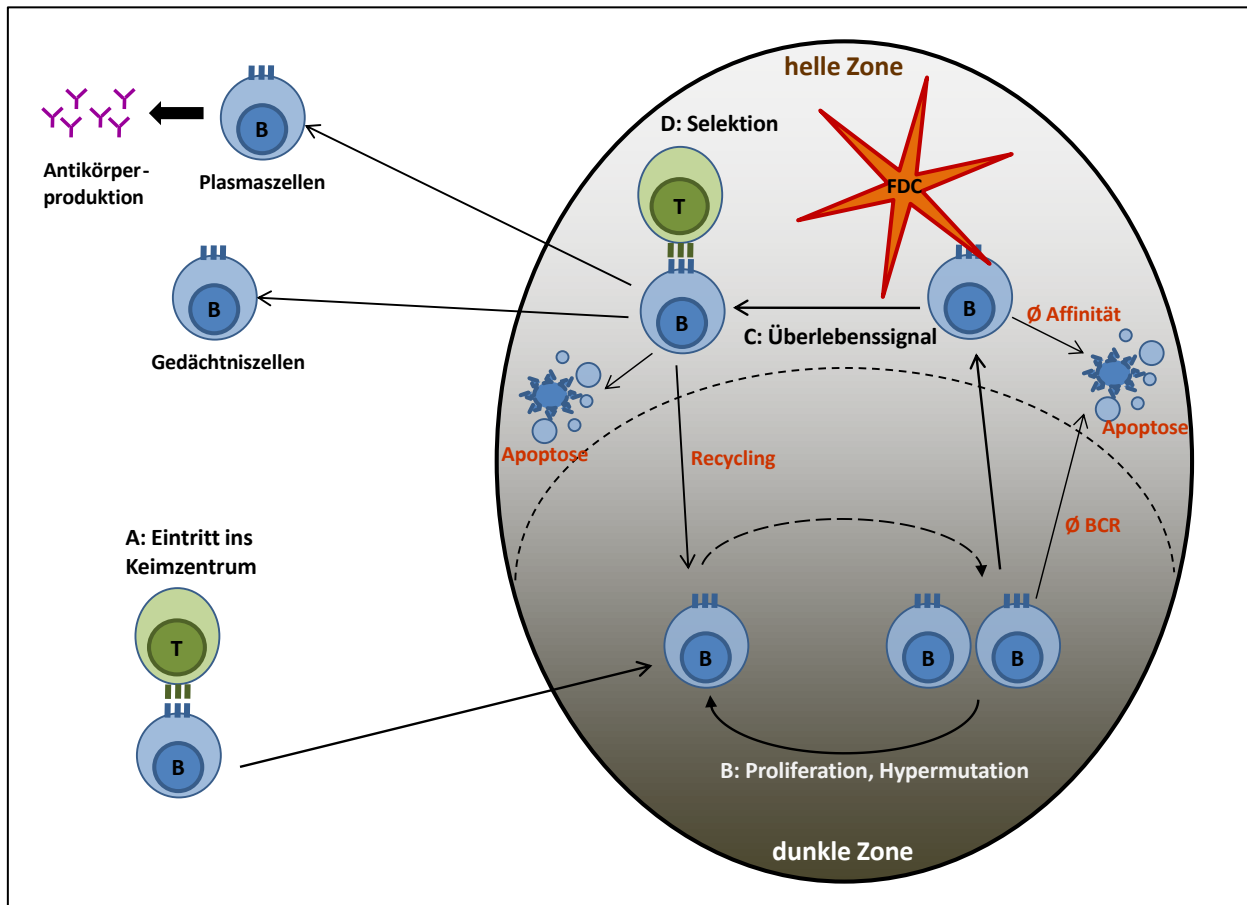


Abbildung 4: Modell einer Keimzentrumsreaktion. **A:** B-Zellen erhalten ein stimulierendes Signal von den T-Zellen, die Keimzentrumsreaktion wird initiiert. **B:** Die B-Zellen in der dunklen Zone beginnen zu proliferieren. Somatische Hypermutation erhöht die Affinität eines B-Zell-Rezeptors (BCR). Zellen, die keinen funktionalen BCR exprimieren, gehen in Apoptose. Nach einigen Zellteilungen und weiterer Affinitätsreifung wandern die überlebenden Zellen in die helle Zone. **C:** Die B-Zellen interagieren mit den Antigen-präsentierenden follikulär dendritischen Zellen (FDCs) und erhalten so ein weiteres Überlebenssignal. Die B-Zellen mit einer zu geringen Affinität gehen in Apoptose. **D:** Die B-Zellen präsentieren den T-Zellen das Oberflächenprotein und werden so weiter selektioniert. Die B-Zellen können ‚recycelt‘ werden, d.h. sie wandern zurück in die dunkle Zone, um weiter zu proliferieren und zu mutieren. Sie können aber auch das Keimzentrum verlassen und zu Antikörpersezernierenden Plasmazellen oder Gedächtniszellen differenzieren (modifiziert nach Victora et al., 2012 [73]).

B: B-Zelle; T: T-Zelle; BCR: B-cell receptor (B-Zell-Rezeptor); FDC: follikulär dendritische Zelle.

Bereits vor etwa 125 Jahren hat der Begründer der Zytogenetik, Walther Flemming, in Kiel den Begriff des Keimzentrums geprägt [90]. Anhand histologischer Analysen von humanen Tonsillen und lymphatischen Geweben der Maus ist das klassische Bild eines Keimzentrums entstanden [91]. Auf der Basis des histologischen Erscheinungsbildes sind in reifen Keimzentren zwei Bereiche zu unterscheiden:

Einleitung

die „dunkle Zone“ und die „helle Zone“. Diese Bereiche sind von naiven folliculären Mantel-B-Zellen umgeben [73, 92]. Die dunkle Zone befindet sich direkt neben der T-Zell-Zone und beinhaltet eine hohe Dichte an großen, proliferierenden B-Zellen, die auch als Zentroblasten bezeichnet werden. An dem gegenüberliegenden Pol liegt die helle Zone. In dieser befindet sich ein dichtes Netzwerk aus folliculären dendritischen Zellen (FDCs) und nur wenigen Zentroblasten. Die B-Zellen in der hellen Zone sind kleine Zellen, sogenannte Zentrozyten, die auf der Zelloberfläche Ig exprimieren [73, 89, 93, 94].

Die Affinitätsreifung in der Keimzentrumsreaktion erfolgt durch Klassenwechsel und somatische Hypermutation in den rearrangierten IG der sich differenzierenden B-Zellen. Beim Klassenwechsel werden die C_{μ} - und C_{δ} -Gene durch eines der C_{γ} ($n=4$), C_{α} ($n=2$) oder C_{ϵ} -Gene ersetzt, wodurch Immunglobuline der Klasse G, A und E gebildet werden [73]. Bei der somatischen Hypermutation werden Punktmutationen in die hypervariablen Bereiche der rekombinierten Antikörpergene eingeführt [95]. Auf diese Weise wird die Diversität der Antikörper weiter erhöht. Beide Prozesse sind abhängig von der AID. Der genaue Reaktionsmechanismus ist noch nicht aufgeklärt, aber es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass in diesem Prozess Cytidin zu Uracil desaminiert wird, welches zu einer Fehlpaarung von Uracil mit Guanin führt [96-99]. Diese Desaminierung findet ausschließlich an einzelsträngiger DNA statt, die von der RNA Polymerase II während der Transkription erzeugt wurde. Werden die von der AID erzeugten U/G Fehlpaarungen nicht erkannt, können durch die Replikation Transitionsmutationen aus C:G zu T:A entstehen [97]. Es gibt Hinweise darauf, dass die AID die Desaminierung bevorzugt an sogenannten Hotspot Sequenzen durchführt. Diese sind Cytosine, die in DGYW oder WRC-Motifen (D= A, G oder T, Y= C oder T, W= A oder T; R= A oder G;) vorkommen [97, 100, 101].

Nach der Hypermutation kommt es zur Selektion. FDCs präsentieren den B-Zellen das Antigen. Die B-Zellen, die dieses nicht mit ausreichender Affinität binden können, sterben- sie gehen in Apoptose [97, 101]. In mehreren Runden von somatischer Hypermutation und nachfolgender Selektion reichern sich B-Zellen mit einer erhöhten Affinität für das Antigen bei der Keimzentrumsreaktion stark an, so dass sich die durchschnittliche Antigenbindungsstärke der sezernierenden Antikörper nach und nach erhöht. Dieser Prozess wird als klonale Expansion bzw. Proliferation bezeichnet [66, 93].

Einige B-Zellen differenzieren nach der Antigen-Stimulation und unter der Hilfe der T-Zellen zu kurzlebigen Plasmazellen, welche Antikörper mit einer geringen Antigenspezifität produzieren. Somatisch hypermutierte Zellen können als Gedächtniszellen im Blut zirkulieren oder sich nach einem Isotypenwechsel im Knochenmark als Plasmazelle niederlassen. Bei erneutem Antigenkontakt können sie wieder ins Keimzentrum eintreten um zur Bildung von Antikörpern mit höherer Affinität erneut

Einleitung

somatisch mutiert zu werden. Außerhalb der Keimzentren können diese speziellen B-Zellen auch eine rasche Immunantwort vermitteln [102, 103].

Eine gestörte Regulation und/oder Aktivierung der B-Zell-Differenzierung, beispielsweise während der Keimzentrumsreaktion oder dem Prozess der Immunglobulin-Entwicklung, kann zur Entartung der B-Zellen führen. Diese können sich dann weiter zu einem malignen Tumor (B-Zell-Lymphom) entwickeln.

1.3.3 Keimzentrums-B-Zell-Lymphome

Histologisch ist das FL ein B-Zell-Lymphom des Keimzentrums, bestehend aus Zentroblasten und Zentrozyten. Die WHO (World Health Organization; Weltgesundheitsorganisation)-Klassifikation von 2008 nimmt anhand der Blastenzahl in einem Areal von 0,159 mm² (high power field, HPF) ein sogenanntes Grading des FLs in drei Stufen vor (siehe Tabelle 1) [1, 2]. Für die klinische Praxis ist es wichtig, das FL Grad 3b von den Lymphomen Grad 1 oder 2 zu unterscheiden, da in Deutschland FL Grad 1 oder Grad 2 wie indolente Lymphome, Grad 3b häufig jedoch nach Protokollen für aggressive Lymphome behandelt werden [104, 105].

Tabelle 1: Grading des FLs nach der WHO-Klassifikation 2008

Gradeinteilung (Grading)	Definition
Grad 1	0-5 Zentroblasten/Gesichtsfeld*
Grad 2	6-15 Zentroblasten/Gesichtsfeld*
Grad 3a	>15 Zentroblasten/Gesichtsfeld* mit einzelnen Zentrozyten
Grad 3b	>15 Zentroblasten/Gesichtsfeld* ohne Zentrozyten

*ein (mikroskopisches) Gesichtsfeld ist definiert als das mit einem 40x Objektiv und 18 mm Okular sichtbare Areal (0,159 mm²). Für die korrekte Beurteilung sollen mindestens 10 verschiedene Gesichtsfelder angesehen werden [1].

Keimzentrums-B-Zell-Lymphome zeigen charakteristische Merkmale (u.a. Translokationen, aberrante SHM) einer gestörten B-Zell-Entwicklung im Keimzentrum unter Beteiligung von Genen, die in der Zelldifferenzierung, Apoptose und/oder Zellproliferation involviert sind (siehe Abbildung 5). Häufige Translokationspartner bei B-Zell-Lymphomen sind Immunglobulingene. Beispielsweise wird in Burkitt-Lymphomen das *MYC*-Gen von Chromosom 8q24 aktiviert und dadurch verstärkt exprimiert, indem es in die Nähe eines der drei Immunglobulingene *IGH* (14q32), *IGK* (2p12) oder *IGL* (22q11) transloziert wird. Die resultierenden Translokationen t(8;14), t(2;8) und t(8;22) führen zu einer Deregulation des *MYC*-Gens, welches u.a. eine Steuerungsfunktion bei der Zellteilung wahrnimmt [37, 106]. Translokationen unter Beteiligung des *BCL6*- oder *PAX5*-Gens resultieren in einer gestörten Plasmazell-Differenzierung und verstärken die Proliferation der Keimzentrums-B-Zellen [63]. Eine Aktivierung des NF- κ B-Signalweges wie sie bei DLBCL, Marginal-Zonen-Lymphomen und Hodgkin-Lymphomen vorkommt, kann die Apoptose blockieren. Apoptose kann aber auch durch Translokation,

Einleitung

Amplifikation oder transkriptioneller Aktivierung des *BCL2*-Gens verhindert werden. Dies ist z.B. bei FL oder DLBCL der Fall [107].

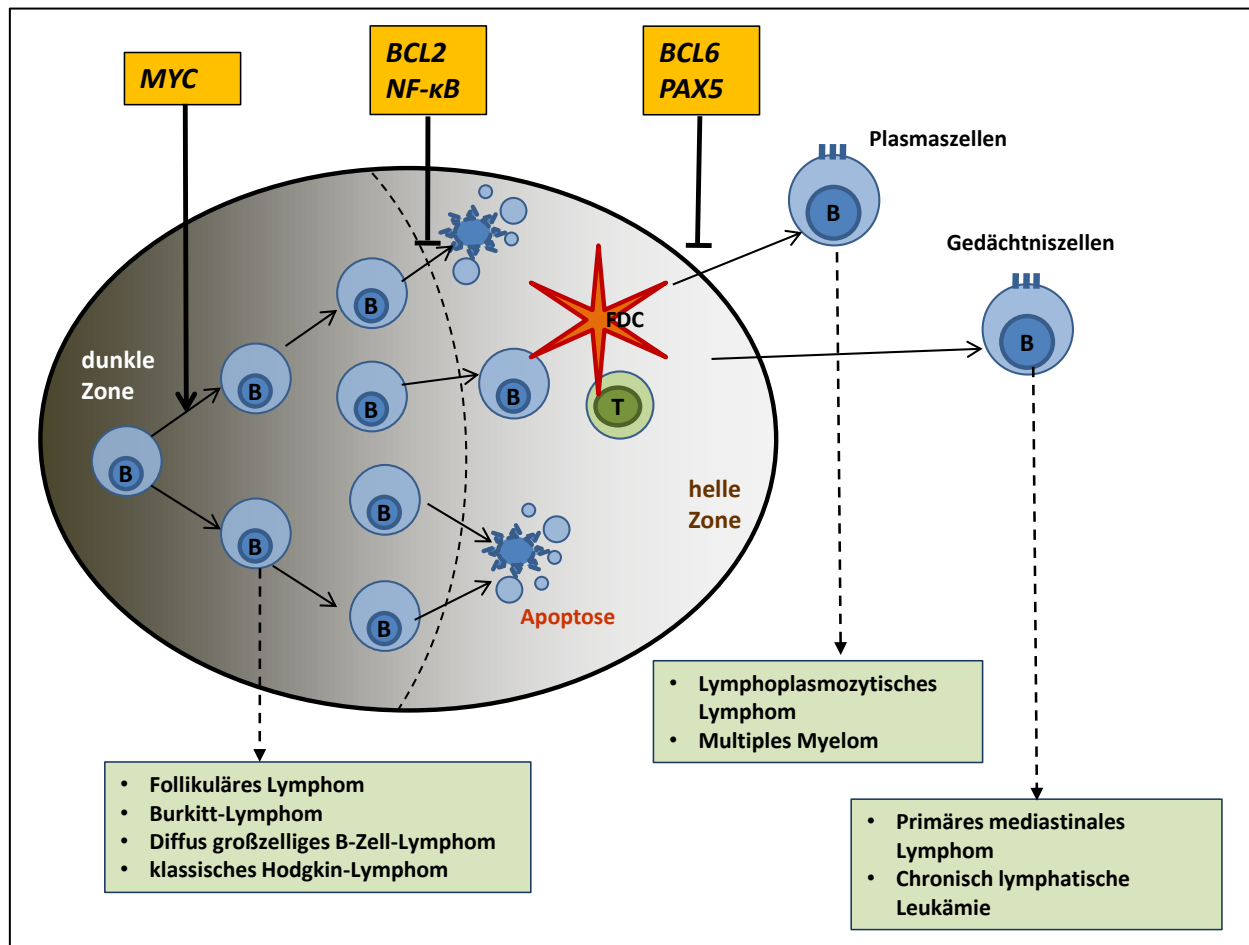


Abbildung 5: Keimzentrums-B-Zell-Lymphome und Leukämie. Aktivierte Gene durch z.B. Translokationen oder aberrante somatische Hypermutation sind gelb unterlegt. Grün unterlegt sind die hämatologischen Tumoren der B-Zell-Linie, die in den verschiedenen Stadien der B-Zell-Entwicklung entstehen können (modifiziert nach Shaffer et al., 2012; Küppers et al., 2005 [39, 63]).

B: B-Zelle; T: T-Zelle; BCR: B-cell receptor (B-Zell-Rezeptor); FDC: follikulär dendritische Zelle.

Bei der $t(14;18)$ in FL und der $t(11;14)$ in Mantelzell Lymphomen (MCL) wird ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Entstehung der Translokation und dem Prozess der D_H mit J_H -Rekombination oder der V_H mit D_HJ_H -Rekombination vermutet [32, 63, 108]. Bruchpunkte dieser Translokationen befinden sich an den RAG-assoziierten Schnittstellen in dem *IGH*-Lokus. Allerdings zeigen die Rekombinationspartner keine RSS oder ähnliche Strukturen, wie sie in der normalen V(D)J-Rekombinationsregion vorkommen [31, 63]. Da die RAG nicht in einem reifen B-Zell-Stadium exprimiert werden, geht man davon aus, dass die Translokationen noch vor der Keimzentrumsreaktion entstehen [23, 32, 70]. Darüber hinaus werden unterschiedliche Modelle für die Involvierung in den V(D)J-Rekombinationsprozess angenommen [23, 32, 109, 110]. Die Gruppe von Fenton et al., vermutet einen fehlgeleiteten *IGH*-Klassenwechsel während der Keimzentrumsreaktion [111]. Zudem gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass der Prozess der somatischen Hypermutation ebenfalls zu Translokationen führen

Einleitung

kann. Die beteiligten Translokationspartner *MYC*, *BCL6*, *PAX5* und *MUM1/IRF4* aus Translokationen wie t(8;14); t(3;14), t(9;14) und t(6;14) bei BL, DLBCL und Multiplen Myelomen sind bevorzugt in der *IGH*-Switch Region vorzufinden [9, 23].

Neben Translokationen können Gene auch durch eine aberrante SHM modifiziert werden. Pasqualucci et al. zeigten am Beispiel von *BCL6*, dass die somatische Hypermutationsmaschinerie in Keimzentrums-B-Zellen von B-Zell-Lymphomen, insbesondere bei DLBCL, dauerhaft aktiv ist. Die aus diesem Prozess resultierenden somatischen Mutationen treten nicht ausschließlich bei Immunglobulinen auf [109, 112]. Neben *BCL6*, wurden in DLBCL auch bei *MYC*, *PAX5*, *Rho/TTF* und *PIM-1* in einer 1-2 kb großen Region abwärts der Transkriptionsstartsequenz hohe Mutationsraten detektiert [49, 109, 113]. Dieser, als „aberrante SHM“ bezeichnete, Prozess kommt in normalen Keimzentrums-B-Zellen nicht vor und wird bei Lymphomen bevorzugt in einer Sequenzen mit WRCY- und RGYW-Motif detektiert [9, 114].

Die Anwesenheit von Mutationen in den IG der Tumorzellen lymphatischer Erkrankungen deutet darauf hin, dass die Zelle ein Differenzierungsstadium durchlaufen hat, in dem SHM statt gefunden hat. Bei einigen Lymphomen besitzen die Tumorzellen des malignen Klons individuelle IG-Sequenzen, was darauf hindeutet, dass der Tumor in einem Differenzierungsstadium verharret, in dem die SHM fortgeführt wird. Dieser Prozess wird als „ongoing SHM“ bezeichnet. Eine Analyse somatischer Mutationen in den rearrangierten IG von verschiedenen reifen B-Zell Erkrankungen zeigte Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens bei den verschiedenen Entitäten (siehe Tabelle 2) [63].

Tabelle 2: Charakteristika einiger reifer B-Zell-Erkrankungen (aus [63])

Erkrankung	SHM	„ongoing SHM“	„Cell of origin“ (vermutetes Stadium der Ursprungszelle *)
Mantelzell-Lymphom	(Ja**), Nein	Nein	Prä-Keimzentrum
chron. lymphatische Leukämie ***	Ja und Nein	Nein	Prä- oder Post-Keimzentrum
Burkitt-Lymphom	Ja	Ja	Keimzentrum
Follikuläres Lymphom	Ja	Ja	Keimzentrum
Marginal-Zonen-Lymphom	Ja	Ja	Keimzentrum oder Post-Keimzentrum
GCB DLBCL	Ja	Ja	Keimzentrum
ABC DLBCL	Ja	Nein	Keimzentrum
Klassisches Hodgkin-Lymphom	Ja	Nein	Keimzentrum oder Post-Keimzentrum

GCB DLBCL: diffus großzelliges B-Zell-Lymphom vom Keimzentrums-B-Zell-Typ; ABC DLBCL: diffus großzelliges B-Zell-Lymphom vom aktivierten B-Zell-Typ; SHM: somatische Hypermutation.

*Stadium einer normalen B-Zell-Differenzierung aus dem der Tumor aufgrund des Phänotyps am Wahrscheinlichsten hervorgegangen ist; ** gilt für einen geringen prozentualen Anteil; ***bei der chron. lymphatischen Leukämie gibt es zwei verschiedene Subtypen, einen Subtyp mit SHM und einen ohne SHM.

Die Identifizierung der aberranten SHM korreliert mit der AID-Expression in den Lymphomen. Die B-Zell-Tumoren, die ihren Ursprung im Keimzentrum haben, exprimieren aufgrund ihres Differenzierungsstatus konstitutiv das Enzym AID. Die stärkste Expression ist bei BL beschrieben. Etwa 66 % der FL und auch 50 % der Schleimhaut-assoziierten lymphoiden Gewebe (MALT-assoziierte

Lymphome) exprimieren das Enzym ebenfalls. Bei FL, DLBCL, BL und MALT-assoziierten Lymphomen korreliert die Expression mit der „ongoing SHM“ und/oder Klassenwechsel an dem Immunglobulin Locus. Dieses lässt schlussfolgern, dass die Lymphome kontinuierlich anfällig für Mutationen in dieser Region sind [97], die wiederum mit der Tumorevolution assoziiert werden können.

Im Folgenden wird nun darauf eingegangen, inwiefern chromosomale Aberrationen und Mutationen an dem Prozess der Tumorentwicklung beteiligt sind. In dem Zusammenhang wird das „Multi-Step-Modell“ der Tumorgenese vorgestellt.

1.4 „Multi-Step-Modell“ der Tumorentwicklung

Die Tumorgenese ist ein Prozess, der unter anderem auf eine Ansammlung von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zurückzuführen ist [115-118]. Onkogene kodieren häufig für Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren oder Apoptoseinhibitoren, die die Zellproliferation fördern. Eine fehlerhafte Aktivierung dieser Gene führt zu einer veränderten Expression oder Veränderung der Proteinstruktur. Solche Gene werden auch als ‚Protoonkogene‘ bezeichnet, so lange sie noch nicht mutiert sind. Dabei ist eine Mutation auf einem Allel bereits ausreichend, um einen Funktionsgewinn („gain of function“) zu erzielen [119]. *BCL2* ist ein klassisches Protoonkogen. Physiologisch wird bei Eintritt der B-Zellen in das Keimzentrum die *BCL2*-Expression vollständig herunterreguliert, damit diejenigen Keimzentrums-B-Zellen durch Apoptose eliminiert werden können, deren BCR bei dem Prozess der SHM nicht die erforderliche Affinität gegenüber dem auslösenden Antigen erworben hat [35]. Durch die Translokation t(14;18) wird das Gen permanent aktiviert, wodurch das *BCL2*-Protein konstitutiv exprimiert wird und verhindert wird, dass die betroffenen B-Zellen im Keimzentrum in Apoptose gehen [120, 121].

Tumorsuppressorgene kodieren hingegen für Proteine, z.B. Transkriptionsfaktoren, die das Zellwachstum hemmen oder zeitweise anhalten können. Tumorsuppressorgene wie z.B. *TP53* werden durch Zellstress oder DNA-Schäden aktiviert und sind in der Lage den Zellzyklus zu arretieren, damit beispielsweise eine DNA-Reparatur vorgenommen werden kann. Bei irreparablen Schäden wird anschließend die Apoptose eingeleitet [122]. Nach der „Two Hit Hypothese“ von Knudsen müssen bei Tumorsuppressorgenen beide Allele mutiert sein, damit ein karzinogener Effekt erzielt wird [123, 124]. Mittlerweile sind Gene bekannt, bei denen bereits die Mutation auf einem Allel ausreicht. Eine Geninaktivierung kann zum Beispiel durch genetische Mutationen oder epigenetische Veränderungen hervorgerufen werden. Diese führen zu einem Funktionsverlust oder unterdrücken die Expression des Gens [120, 125].

Einleitung

Hanahan und Weinberg formulierten sechs Eigenschaften von Tumorzellen: Unabhängigkeit gegenüber äußeren Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber äußeren wachstumshemmenden Signalen, Umgehung der Apoptose, Unbegrenzte Zellteilung, Induktion von Gefäßneubildung, Möglichkeit in Gewebe einzudringen und Metastasen zu bilden [125, 126]. Diese Eigenschaften von Tumoren wurden um weitere Charakteristika ergänzt, die den „Stress-Phänotyp“ einer Tumorzelle beschreiben und die Wechselwirkung der Faktoren untereinander berücksichtigen. Hierzu gehört z.B. der metabolische, der mitotische und der oxidative Stress (eine detaillierte Ausführung ist in der Arbeit von Luo et al. 2009 nachzulesen [127]).

Jede dieser Eigenschaften kann durch eine Reihe verschiedener genetischer oder epigenetischer Veränderungen erworben werden. Dieses geschieht in einem mehrstufigen Prozess aus Replikation, Mutation und Selektion [117, 118, 128]. Diese Mutationen können kleine strukturelle Veränderungen (z.B. Punktmutationen, Deletionen), größere strukturelle Veränderungen (z.B. Translokationen), numerische Veränderungen (z.B. Aneuploidien) oder epigenetische Veränderungen (siehe Abschnitt 1.5) [129] sein. Mutationen können zufällig entstehen (z.B. durch Cytosin Desaminierung), durch den Einfluss von karzinogenen Faktoren (z.B. Chemikalien, Viren, Bakterien) oder durch einen Fehler der Polymerase und/oder der DNA-Reparaturmechanismen [129-131]. Darüber hinaus können Mutationen in der Keimbahn oder in somatischen Zellen auftreten. Im ersten Fall tragen sie zu einer erblichen Prädisposition bei, im zweiten Fall zu sporadischen Tumoren [116, 120]. Letztlich sorgen die Veränderungen dafür, dass bestimmte Signalwege an- oder ausgeschaltet werden [120, 121].

Ein Modell für die Mehrstufen-Entwicklung der meisten malignen Tumoren wurde bereits in den 90er Jahren von Vogelstein und Kinzler am Beispiel des Kolonkarzinoms entwickelt (Abbildung 6) [115, 129, 132].

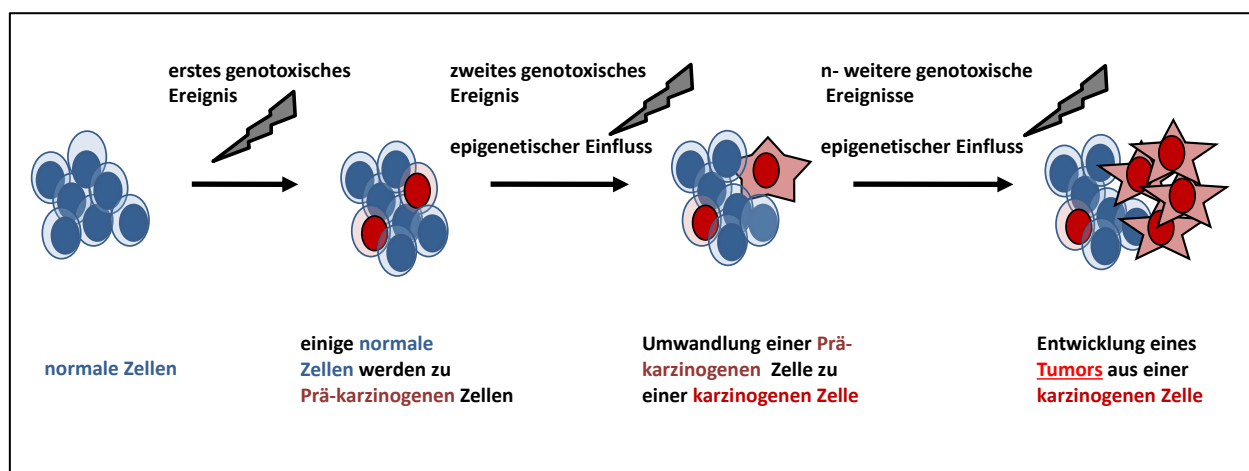


Abbildung 6: „Multi-Step-Modell“ der Tumorevolution nach Vogelstein und Kinzler. Durch eine Mutation (erstes Ereignis) wird der Prozess initiiert. Es folgen weitere genetische und epigenetische Modifikationen in Tumorsuppressorgenen oder Onkogenen. Über Tumorstufen unterschiedlicher Stadien führen sie letztlich zur Entwicklung eines ausgereiften Tumors (modifiziert nach Weinberg et al., 2006; Kinzler et al., 1996 [121, 133]).

Einleitung

Nach diesem Modell initiiert ein erstes Ereignis den Entwicklungsprozess. Die betroffene Zelle hat eine geringfügig erhöhte Proliferationstendenz. Tochterzellen dieser ersten Zelle besitzen alle dieselbe Veränderung. Je größer die „Population“ dieser veränderten Zellen wird, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine dieser Zellen eine weitere Mutation erfährt. Dieses zweite relevante Mutationsereignis könnte dann z.B. eine Gen-Aktivierung durch eine Punktmutation sein. Der entstandene Klon hat damit einen weiteren Selektionsvorteil. Im Laufe der Zeit kommen weitere Mutationsereignisse dazu, z.B. Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens *TP53*. Jede Mutation führt zu einem Selektionsvorteil einer monoklonalen Population von Tumorzellen [128, 133, 134].

Dieses klassische „klonal genetische Modell“ der Tumorentstehung wird nach dem derzeitigen Wissenstand um zwei weitere Modelle ergänzt: die „Hypothese der Tumorstammzelle“ und die „epigenetische Kontrolle über genetische Veränderungen“ [135]. Nach dem Modell der „Tumorstammzell-Hypothese“ besteht jeder Tumor aus einer heterogenen Population von Zellen, von denen einige ein größeres tumorgenetisches oder metastasierendes Potential besitzen als andere. Unter einer Tumorstammzelle wird eine Tumorzelle verstanden, die in der Lage ist, sich selbst zu erneuern und/oder zu einer anderen malignen Zelle zu werden. Diese Zellen sind verantwortlich für die Zellproliferation der Tumormasse. Während Tumorzellen durch eine gezielte Therapie eliminiert werden können, bleibt die Tumorstammzelle intakt und ist in der Lage wieder zu proliferieren. Die Tumorstammzelle kann dabei unterschiedlichen Ursprungs sein, z.B. kann sie von einer embryonalen Stammzelle, einer adulten Stammzelle, einer Progenitorzelle oder einer differenzierten Zelle abstammen [135-138]. Das dritte Modell umfasst den Einfluss epigenetischer Veränderungen (siehe Abschnitt 1.5) neben den chromosomalen Veränderungen als einen weiteren Mechanismus, der ebenfalls eine Genfunktion stören kann. Beobachtete epigenetische Veränderungen in Tumoren sind beispielsweise globale DNA-Hypomethylierung in Tumoren, Hypermethylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen und der Verlust der elterlichen Prägung (Imprinting) [135, 139].

Welches dieser drei Modelle die Entwicklung eines Tumors korrekt beschreibt und wieweit die Modelle interagieren, ist noch unklar. Sehr wahrscheinlich führt eine Kombination aller drei Modelle zu einem realistischen Gesamtmodell.

1.4.1 Pathogenese des Follikulären Lymphoms

Das FL ist überwiegend in den Lymphknoten der Patienten manifestiert, aber auch Ausbreitungen in Milz, Knochenmark und peripherem Blut werden häufig beobachtet [9, 10]. In 30-70 % der Fälle kommt es nach einer Manifestation im Lymphknoten zu einer Ausbreitung der Erkrankung im Knochenmark

[140]. Kutane FL und solche des gastrointestinalen Traktes sind dagegen eher selten und unterscheiden sich von den nodulären insbesondere in Bezug auf das Auftreten der „ongoing SHM“ [10, 45, 141].

Die klinische Entwicklung eines FLs ist sehr heterogen [141]. Bei weniger als 20 % der Patienten wird ein FL bereits in den frühen Stadien diagnostiziert, im Allgemeinen wird es erst in den fortgeschrittenen Stadien (III und IV) erkannt [142]. Häufig werden Lymphknotenschwellungen beobachtet, die meist nicht schmerzhaft sind. Charakteristisch ist ein langsamer Verlauf über acht bis zehn Jahre. Dem entsprechend ist die klinische Behandlung auch variabel und reicht von der Beobachtung ohne Medikamentengabe über eine aggressive Chemotherapie bis hin zur Stammzelltransplantation [2, 10, 143]. In den frühen Krankheitsstadien (I und II) kann eine lokale Strahlentherapie zu einer Krankheitsfreiheit von bis zu zehn Jahren führen. Allerdings können Rückfälle auch nach über zehn Jahren auftreten. Bei einer Behandlung eines Patienten im Stadium II mit einer Strahlentherapie liegt die Rückfallrate bei etwa 75 % [142, 144]. Der Einsatz der Therapie erfolgt nach umfangreicher histologischer Diagnostik, einer Stadieneinteilung nach der Ann-Arbor-Klassifikation und auf der Basis des FLIPIs. Der FLIPI, „Follicular Lymphoma International Prognostic Index“ ist ein spezifischer Index zur Risikoeinschätzung, nachdem die Patienten anhand von fünf unabhängigen Risikofaktoren in drei Gruppen mit unterschiedlichen Überlebens-Wahrscheinlichkeiten unterteilt werden [141, 145]. Patienten mit einem niedrigen FLIPI-Score haben eine gute Langzeitprognose, mit bis zu 65 % Überlebens-Wahrscheinlichkeit nach zehn Jahren. Patienten mit einem hohen FLIPI-Score haben ein medianes Überleben von rund 50 % nach fünf Jahren [145-147].

1.4.1.1 In-situ-Follikuläre Lymphome und Follikuläre Lymphome mit partieller Lymphknoteninfiltration

In-situ-Follikuläre Lymphome (FLIS) werden nach der WHO-Klassifikation als eine „intrafollikuläre Neoplasie“ definiert, die durch eine klonale Expansion von CD10 und BCL2 koexprimierenden Keimzentrums-B-Zellen charakterisiert sind [1]. Von FLIS sind bis dato nur wenige Fälle beschrieben [148-151]. FLIS sind von den FL mit einer partiellen Lymphknoteninfiltration (PFL) differenzialdiagnostisch zu unterscheiden. Diese Unterscheidung erfolgt anhand der Follikelgröße, der involvierten Follikel und der Expressionsintensität von BCL2 und CD10 [152]. Bei PFL handelt es sich häufig um Zufallsbefunde bei reaktiv erscheinenden, unaufgeklärten Lymphadenopathien oder Lymphknoten mit diffus, follikulären Schwellungen und t(14;18) positiven Zellen. Charakteristisch für FLIS und PFL ist eine BCL2-Überexpression, resultierend aus der in den Biopsaten nachweisbaren t(14;18). Immunhistochemisch unterscheiden sie sich nicht von den klassischen FL, sie sind positiv für Keimzentrums B-Zell-Marker BCL6 und CD10 [153]. Sowohl für FLIS als auch für PFL sind Fälle beschrieben, die ein manifestes FL entwickeln, z.B. in einem anderen Lymphknoten, während andere

zeigen über Jahre keine Progression [149, 154, 155]. Der klinische Verlauf dieser beiden Neoplasien, ist noch relativ unverstanden und das Risiko für die Weiterentwicklung zu einem voll entwickelten Lymphom ist noch unbekannt [156]. Eine Aufklärung der genetischen und epigenetischen Veränderungen in PFL und FLIS-Biopsaten könnte maßgeblich zum Verständnis der Tumorevolution in FL beitragen.

1.4.1.2 Modelle der Tumorevolution bei Follikulären Lymphomen

Die Vorstellung, dass eine maligne Transformation einer Zelle in einem mehrstufigen Prozess durch die Ansammlung von genetischen und molekularen Ereignissen zustandekommt, ist ein allgemein akzeptiertes Konzept. Da dieses Modell an epithelialen Tumoren etabliert wurde, macht es das Ganze schwieriger, dieses Konzept auf die Tumoren des lymphatischen Systems, deren Zellen normalerweise zirkulieren und verschiedene Gewebe besiedeln, anzuwenden [117]. Es gibt bereits erste Ansätze, die den mehrstufigen Prozess der Tumorentstehung bei FL beschreiben. Die Gruppe von Roulland et al. stellt ein Modell vor, wobei davon ausgegangen wird, dass langlebige t(14;18) positive, FL-ähnliche Gedächtnis B-Zellen im peripheren Blut von gesunden Individuen bereits eine Zwischenstufe in der frühen Lymphomentwicklung darstellen (Abbildung 7) [57].

Nach diesem Modell wird angenommen, dass die Translokation t(14;18) mit einhergehender BCL2-Überexpression bereits als ein Fehler der VDJ-Rekombination während der frühen B-Zell-Entwicklung im Knochenmark auftritt und die weiteren Schritte einer B-Zell-Entwicklung dadurch nicht verhindert werden. Auch die t(14;18) positiven B-Zellen setzen den Differenzierungsprozess fort, verlassen das Knochenmark und gelangen über den Blutstrom in das periphere lymphatische Gewebe, wie auch die reifen naiven B-Zellen. Während der Keimzentrumsreaktion, in der die B-Zellen mit einer geringen Affinität des B-Zell-Rezeptors zum Antigen über Apoptose eliminiert werden, ermöglicht die BCL2-Überexpression den t(14;18) positiven Zellen einen Schutz vor dem Zelltod. Nach klonaler Expansion und „ongoing SHM“ in diesen t(14;18) positiven Zellen, verlassen die Zellen das Keimzentrum wieder und zirkulieren mit dem Blutstrom. Auf diese Weise können die t(14;18) positiven Zellen zwischen den Follikeln wandern und bestimmte Nischen im Knochenmark oder peripheren Blut besetzen. Die Umgebung, bestehend aus Stroma-Zellen, Makrophagen und regulatorischen T-Zellen, ermöglicht den t(14;18) positiven Zellen das Überleben in diesen Nischen [5, 140, 157].

Desweiteren sind die t(14;18) positiven Zellen auch in der Lage, erneut in das Keimzentrum einzutreten und durch erneute SHM und Klassenwechsel weitere genetische Veränderungen zu erlangen. Diese Veränderungen können wiederum dazu führen, dass so aus einer Prä-malignen Zelle eine maligne Tumorzelle entsteht, die zusätzlich der klonalen Expansion der Keimzentrumsreaktion unterliegt [157].

Einleitung

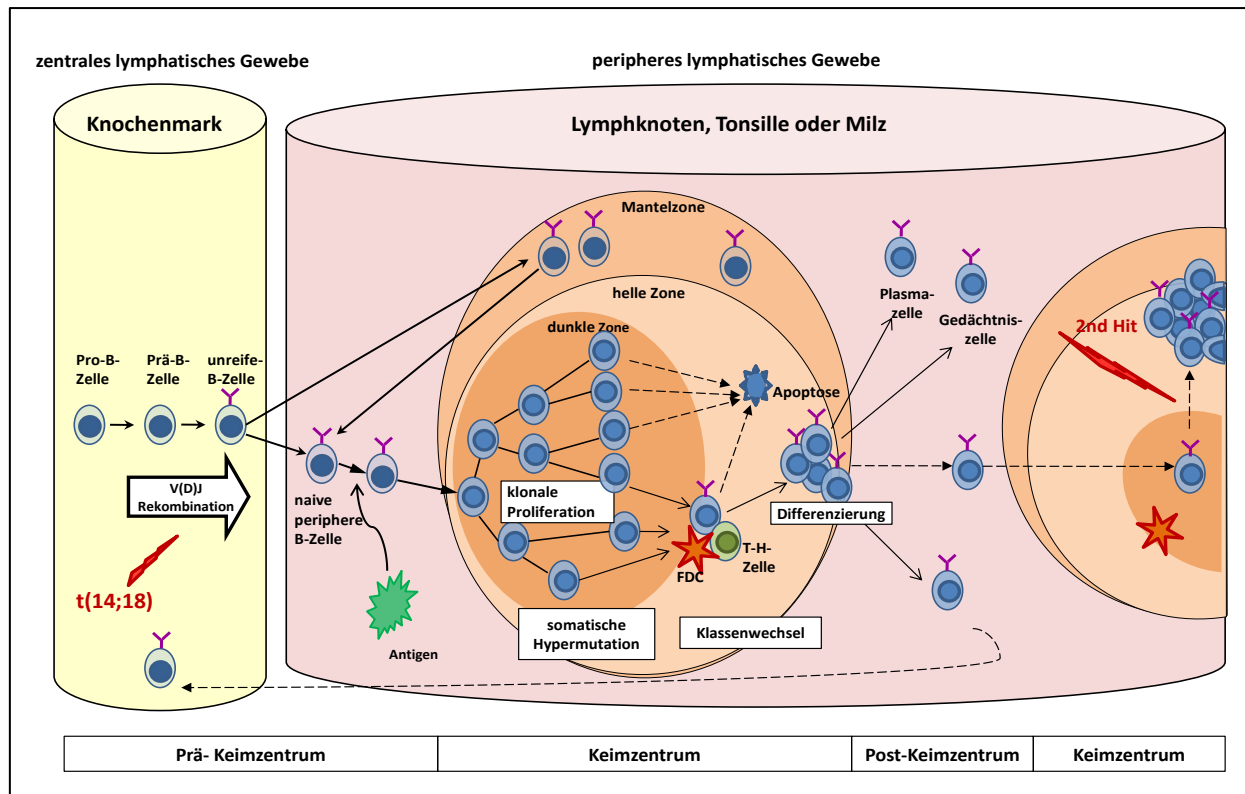


Abbildung 7: Modell der Tumorentstehung bei dem Follikulären Lymphom. Die Translokation $t(14;18)$ entsteht während einer fehlerhaften VDJ-Rekombination im Knochenmark in der frühen Entwicklungsphase der B-Zellen. Wie auch die normalen B-Zellen gelangen die $t(14;18)$ positiven Zellen ebenfalls in den Blutkreislauf und durchwandern unter Antigen-Stimulation die Keimzentrumsreaktion. Aufgrund der BCL2-Überexpression werden diese Zellen aber nicht durch Apoptose eliminiert, sie gelangen zurück in die peripheren lymphatischen Systeme und besiedeln sog. Nischen im peripheren Blut oder Knochenmark in denen die Aufrechterhaltung dieser Zellen weiterhin ermöglicht wird. In einer erneuten Keimzentrumsreaktion können weitere genetische Veränderungen durch somatische Hypermutation und Klassenwechsel die Entwicklung zu einem malignen Tumor vorantreiben (modifiziert nach Roulland et al., 2006 [57]).
FDC: follikulär dendritische Zelle; T-H-Zelle: T-Helfer-Zelle.

Patienten mit einem FL erleiden häufig einen Rückfall (Rezidiv). Das Auftreten eines Rezidivs ist charakteristisch für die Entwicklung dieser niedrigmalignen Erkrankung. Dabei geht ein Rezidiv häufig mit der Progression von einem FL Grad 1,2 und 3a in ein aggressiveres Lymphom, z.B. ein DLBCL, ein BL, ein lymphoblastisches Lymphom oder eine akute lymphoblastische Leukämie (ALL) einher [158]. Diese Progression von einem FL in ein höher malignes Lymphom wird als Transformation bezeichnet und ist mit einer ungünstigeren Prognose mit einem medianen Überleben von 1,5 Jahren assoziiert [159-161]. Die Progression von einem FL Grad 1 oder 2 zu einem FL Grad 3a wird dagegen nicht als Transformation verstanden [158]. Am häufigsten transformiert ein FL in ein DLBCL, was bei etwa 10-70 % der FL-Patienten diagnostiziert wird [158, 160, 162]. Das gleichzeitige Auftreten eines FLs mit einem DLBCL in demselben initialen Biopsat zeigt ein vermischtes histologisches Bild und gibt lediglich einen Hinweis auf eine Transformation. Um ein DLBCL von einem zum DLBCL transformierten FL (t-FL) zu unterscheiden, sind neben histologischen Merkmalen auch molekulargenetische Kennzeichen der klonalen Verwandtschaft unter den jeweiligen Tumorzellen notwendig [158]. Letzteres erfolgt anhand von Analysen des Mutationsprofils der Immunglobulin-Schwerketten bei Verlaufspuben. Die Ergebnisse

Einleitung

dieser Analysen können in Form von Stammbäumen dargestellt werden und repräsentieren den Verwandtschaftsgrad (phylogenetischen Beziehungen) der einzelnen Klone zueinander [159, 163] (siehe Abbildung 8). Bei einer klonalen Verwandtschaft zwischen den Tumorzellen einer Initialprobe und seines Rezidivs (sowohl bei einem transformierten als auch bei einem nicht transformierten FL) tragen alle Zellen die gleiche V_H -Genumlagerung, unterscheiden sich lediglich im Muster der während der Keimzentrumsreaktion neu eingeführten Mutationen. Folglich ist anhand der Rekonstruktion dieser phylogenetischen Beziehungen abzulesen, wenn die Tumorzellen der Verlaufsprobe aus einem Klon des Primärtumors hervorgegangen sind [158, 161].

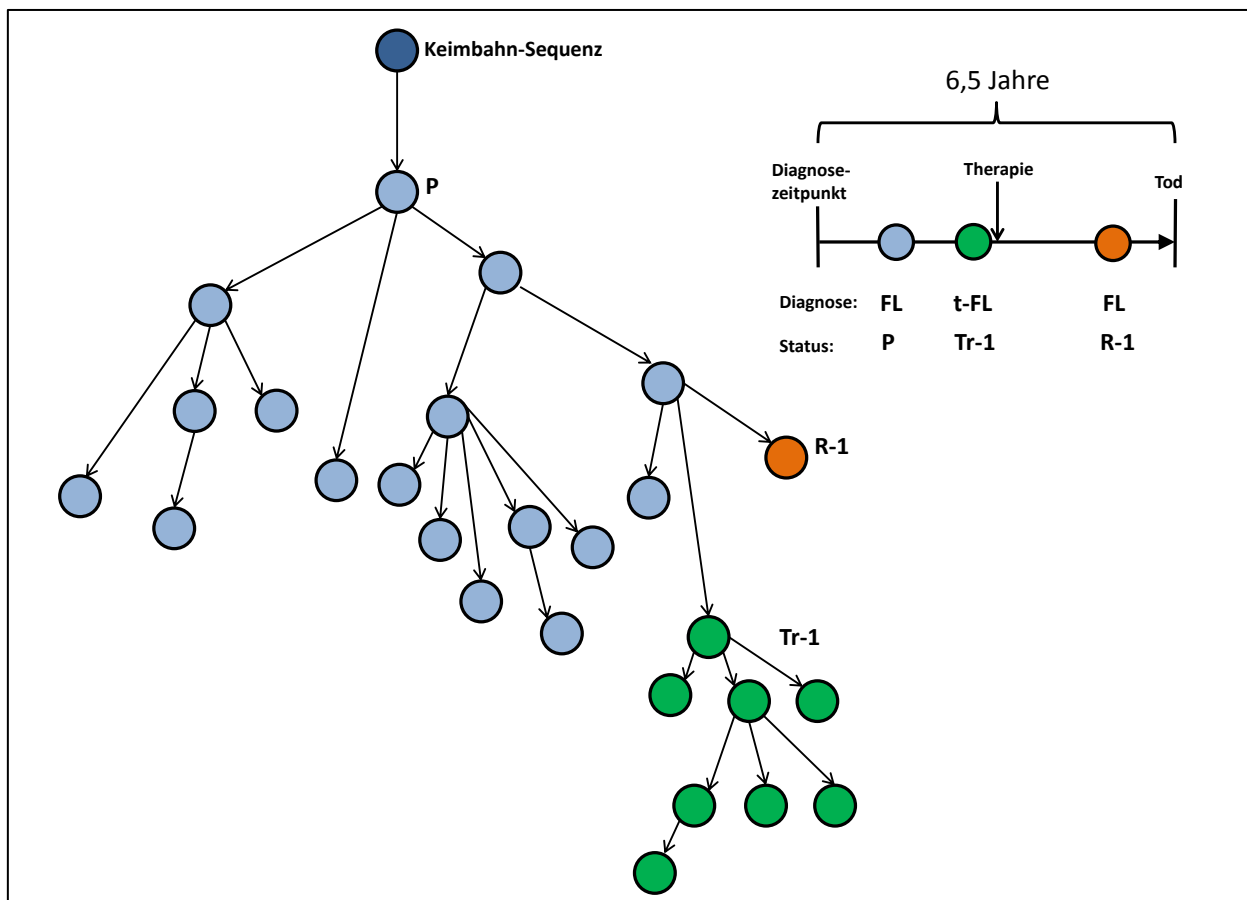


Abbildung 8: Rekonstruktion der klonalen Verwandtschaft und Darstellung der phylogenetischen Beziehungen von Tumorklonen zwischen Progression, transformiertem FL und Rezidiv-Tumor anhand der Analyse des Mutationsprofils und VDJ-Rearrangements. Der zeitliche Verlauf und die Diagnose des jeweiligen Status der drei analysierten Proben sind in der Zeitskala rechts oben im Bild dargestellt (nach Carlotti et al., 2009 [161]).

FL: Follikuläres Lymphom; t-FL: transformiertes FL; P: Progression (blaue Kreise); Tr-1: erste Transformation (grüne Kreise); R-1: erstes Rezidiv (oranger Kreis).

Die klonale Verwandtschaft zwischen Initial- und Rezidivtumoren bei FL wurde in anderen Studien bestätigt [159, 164] und konnte auch für andere lymphatische Erkrankungen, wie der ALL, gezeigt werden [165, 166]. Anhand der Analysen von klonalen Verwandtschaften bei FL-Tumorproben identifizierten Ruminy et al. den „direkten“ und „indirekten“ Pathway einer Tumorevolution bei FL. Der direkte Pathway zeigt eine schnelle Tumorentwicklung aus dem dominanten Klon, eine sogenannte

„lineare“ Evolution. Bei dem indirekten Pathway ist der Rezidiv Tumor aus einem früheren Subklon entstanden [167]. Die Arbeitsgruppe von Brodtkorb-Eide bezeichnet den zweiten Weg auch als „parallele“ Evolution. Darüber hinaus konnte in dieser und in anderen Studien gezeigt werden, dass bei der parallelen Evolution in dem Rezidiv nicht nur unterschiedliche Evolutionswege der Tumorzellen, sondern auch unterschiedliche Kopienzahlveränderungen im Zusammenhang der Tumorevolution zu beobachten sind. Während die Anzahl der Kopienzahlveränderungen bei dem parallelen Evolutionstyp groß sind, sind sie bei dem linearen Weg eher gering [162, 168-170]. Zusammengefasst geben diese Beobachtungen Hinweise darauf, dass das Rezidiv nicht aus dem initial dominierenden Klon entstanden ist, sondern aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle des FL-Tumors [162, 169].

1.4.1.3 Genetische Veränderungen bei Follikulären Lymphomen

Longitudinale Studien an FL und zu DLBCL transformierten FL identifizierten rekurrente genetische Veränderungen, die charakteristisch für die pathogene Entwicklung sind. Zu den typischen sekundären chromosomalen Veränderungen bei den t(14;18) positiven FL gehören Zugewinne in 1q, 2p, 7, 8, 12q, 18q und X, Deletionen in 1p, 6q, 10q, 13q und 17p, sowie Verluste der Heterozygotie (LOH) in 1p (siehe Abbildung 9 A) [10, 159, 170, 171].

Einige dieser Modifikationen haben eine prognostische Bedeutung, andere sind mit einem erhöhten Transformationsrisiko assoziiert [162]. Genetische Veränderungen wie z.B. Mutationen in *TP53*, Deletion und Inaktivierung von *CDKN2A* ($p16^{\text{INK4a}}$) und *CDKN2B* ($p15^{\text{INK4b}}$) oder Veränderungen im *MYC*-Gen kommen insbesondere im Zusammenhang mit einer Transformation vor [172, 173]. Andere Mutationen, wie Amplifikationen von *BCL2* und Mutationen in der 5'UTR von *BCL6* wurden ebenfalls in transformierten FL beobachtet [160, 170]. Weitere rekurrente Veränderungen in Initial- und Rezidivproben bei FL sind Mutationen im *REL*-Gen, sowie Deletionen in 9p21, die Gene *CDKN2A* ($p16^{\text{INK4a}}$) und *CDKN2B* ($p15^{\text{INK4b}}$) betreffen [168]. Cheung et al. identifizierten in 18 % der FL-Patienten eine Mutation im *TNFRSF14* Gen, die wiederum mit einer ungünstigeren Prognose der Patienten assoziiert sein soll [159, 170].

Darüber hinaus identifizierten Höglund et al. anhand rekurrenter sekundärer chromosomaler Veränderungen in über 300 FL, dass chromosomale Veränderungen in einer zeitlichen Reihenfolge mit typischen frühen und späten Veränderungen vorkommen. Mittels Principle Component Analyse charakterisierten sie vier mögliche zytogenetische Pathways eines frühen Stadiums der klonalen Evolution, die in einem späteren Evolutionsstadium in einem gemeinsamen Pfad zusammentreffen (siehe Abbildung 9 B) [174].

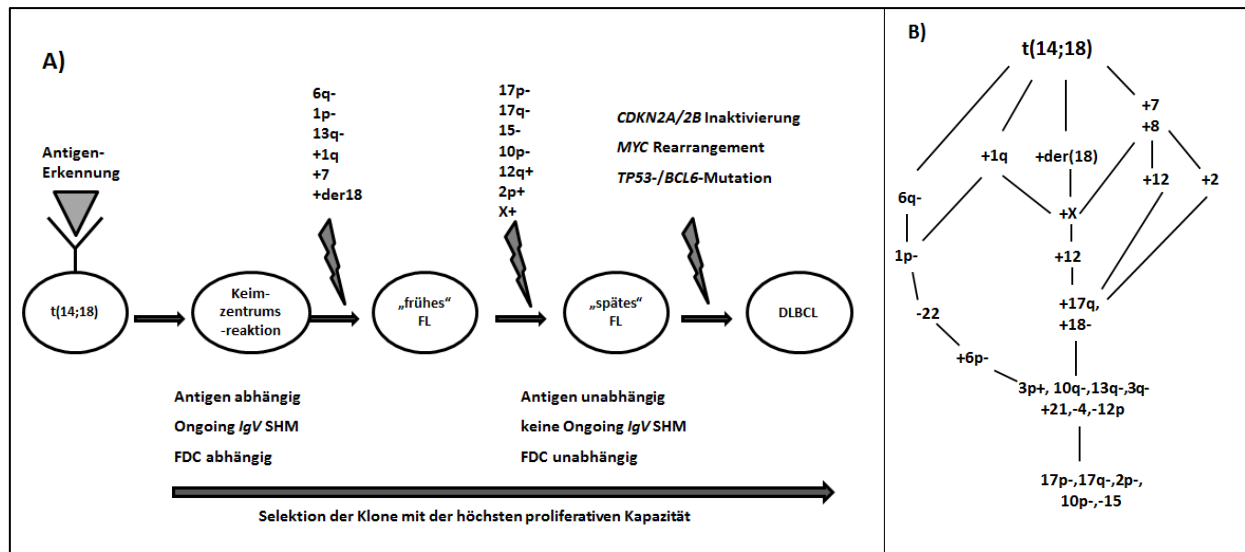


Abbildung 9: Pathogenese des Follikulären Lymphoms. **A)** Zu Beginn der Entwicklung sind die Reaktionen im Keimzentrum weitgehend abhängig von der Antigen-Stimulierung und der Aktivierung über follikulär dendritische Zellen (FDC). Im Verlauf der „ongoing SHM“ der *IgV*-Gene, geht diese Abhängigkeit verloren. Es findet ein Selektionsprozess der Klone mit der höchsten proliferierenden Kapazität statt. Im weiteren Verlauf der Tumorentwicklung kommen Verluste des langen und/oder kurzen Arms von Chr. 17, 15, 10p, sowie Zugewinne auf Chr. 12q, 2p, 1q, X hinzu. In diesem als „späten Phase“ bezeichneten Stadium der Lymphomentwicklung bestehen die Zellen weitgehend aus autonomen Blasten, die weiter entsprechend der proliferativen Kapazität selektioniert werden und eine mehr und mehr charakteristische morphologische Struktur erhalten. Durch weitere auftretende Mutationsereignisse z.B. *CDKN2A/2B*-Inaktivierung, *MYC* Rearrangement oder/und Mutationen in *TP53* und *BCL6* kann das FL zu einem aggressiveren DLBCL transformieren (modifiziert nach Bende et al., 2007 [9]). **B)** Vier zytogenetische Pathways sekundärer chromosomaler Veränderungen in t(14;18) positiven FL eines frühen Stadiums der klonalen Evolution, die in einem späteren Evolutionsstadium in einem gemeinsamen Pfad zusammentreffen (aus Höglund et al., 2004 [174]). IGV: variable Region der Immunglobulin Schwerekettenenzyme; FL: Follikuläres Lymphom; DLBCL: diffus großzelliges B-Zell-Lymphom; FDC: follikulär dendritische Zellen.

Neben genetischen Veränderungen können auch Fehlregulationen epigenetischer Prozesse mit der Entstehung benigner Erkrankungen und maligner Tumoren assoziiert sein [175-177]. Im Folgenden wird auf die epigenetischen Veränderungen bei der Entwicklung von lymphatischen Tumoren eingegangen.

1.5 Epigenetische Veränderungen bei lymphatischen Tumoren

Epigenetische Modifikationen ermöglichen die Vererbung von Zelleigenschaften, die nicht auf Änderungen der DNA-Sequenz selbst, sondern auf Veränderungen in der Genexpression beruhen [178]. Diese Veränderungen kommen an der DNA selbst oder an DNA assoziierten Proteinen vor und können während der Entwicklung unter Umwelteinflüssen entstehen. Zu diesen Mechanismen zählen Modifikationen der DNA (z.B. DNA-Methylierung) und der Histone (z.B. Histon-Acetylierung), die Expression von nicht-kodierenden RNAs und die nukleäre Positionierung von Genen [179-181].

Je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 und DNA bilden zusammen das Nukleosom, die Grundstruktur des Chromatins zur Verpackung der eukaryotischen DNA [182-184]. Die Enden der Histone, sog. „histone tails“, können durch chemische Gruppen wie Methyl-, Acetyl- und Phosphatgruppen, sowie verschiedene Grade der DNA-Methylierung (mono-, di-, tri-methylierung)

Einleitung

modifiziert werden. Weitere Modifikationen wie Ubiquitylierung, Sumoylierung, ADP-Ribosylierung, Biotinylierung können zudem in den verschiedenen Histonproteinen und an verschiedenen Histonenden (Lysin, Arginin, Serin) vorkommen [184-186]. Die Modifikationen sind spezifisch für bestimmte genomische Regionen und werden von entsprechenden Enzymen katalysiert: Histonacetyltransferasen (HATs) fügen z.B. Acetylgruppen an Lysinreste (K), während Histondeacetylasen (HDACs) diese wieder entfernen. Histonmethyltransferasen (HMTs) methylieren die Aminosäurereste von Arginin (R) und Lysin und Histondemethylasen machen die Methylierung wieder rückgängig. Im Allgemeinen sind aktivierend wirkende Veränderungen mit Acetylierungen von Lysinen oder Methylierungen von Lysin an Position 4 (K4) an Histon 3 verbunden, wohingegen Deacetylierungen oder Methylierungen von Lysin an Position 9 (K9) an Histon 3 repressive Modifikationen sein können [186].

Es gibt einige Untersuchungen zu Chromatinveränderungen und posttranslationalen Modifikationen an Histonen in dem V(D)J-Rekombinationsprozess. Mit der Ausnahme von EZH2 und dem Chromatin-Remodeling Faktor Brg1 konnten keine weiteren Chromatinregulatoren identifiziert werden, die im Zusammenhang der V(D)J-Umlagerung stehen [87, 187]. Das Polycomb-Gruppen- (PcG) Protein EZH2 interagiert innerhalb des Polycomb Repressor Komplexes 2 und 3 (PRC2/3) mit DNA Methyltransferasen, wie z.B. DNMT3a [188]. EZH2 katalysiert die Trimethylierung von Histon 3 an Lysin 27 (H3K27me3). Andere Proteine des PRC2 rekrutieren wiederum andere Polycomb Komplexe, DNA Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen und tragen so zu einer Gen-Inaktivierung bei [189]. EZH2 wird vor allem in proliferierenden Zellen aber nicht in naiven B-Zellen stark exprimiert. Eine Überexpression von EZH2 geht in soliden Tumoren wie Prostata- und Brustkrebs mit einer verstärkten Metastasierung einher und ist möglicherweise auch ein Kandidatengen bei B-Zell-Lymphomen [189].

Neben Histonen werden epigenetische Prozesse auch durch verschiedene Klassen kleiner, nichtkodierender regulatorischer RNA-Moleküle vermittelt. Dazu gehören u.a. siRNA ("small interfering" RNAs), piRNA ("PIWI-interacting" RNAs) oder auch miRNAs ("Micro"-RNAs), sowie lncRNA ("long non-coding" RNA), PARs ("promotor associated" RNAs) und eRNAs ("enhancer associated" RNAs) [179, 186, 190, 191]. Nicht kodierende regulatorische RNAs wirken maßgeblich auf die Genexpression wie z.B. spezifische lncRNAs, sogenannte lincRNA (large intergenic non-coding RNAs), die in aktiv transkribierten Genen identifiziert wurden [179, 190]. Andere lncRNAs können die Transkription spezifisch stilllegen, indem sie Chromatin-Remodeling-Komplexe rekrutieren [190]. MiRNAs interagieren mit DNA-Methyltransferasen und Histon-Deacetylasen. Andere nicht kodierende RNAs inhibieren die Transkription, regulieren den Zellzyklus oder wirken als Protoonkogene an der Tumorentstehung. Außerdem können sie als Koaktivatoren die Transkription verstärken oder post-translational wirksam sein [185, 192].

1.5.1 DNA-Methylierung

Die bislang wahrscheinlich am besten untersuchte epigenetische Modifikation ist die DNA-Methylierung. Sie stellt auch die von mir im Rahmen dieser Arbeit analysierte Modifikation dar. Über DNA-Methylierung werden sowohl einzelne Gene als auch nicht kodierende Regionen stillgelegt, indem Transkriptionsfaktoren sterisch gehindert werden, an ihre Zielregion zu binden [177]. Die DNA-Methylierung ist eine postreplikativ programmierte Modifikation, die in der C5-Position des Pyrimidin-Ringes von Cytosinen hauptsächlich innerhalb von CpG-Dinukleotiden vorkommt [176]. Cytosin-Methylierungen im Zusammenhang mit CpNpG oder CpA wurden in Maus und Pflanzenzellen beobachtet und sind in Säugern selten, bzw. kommen in embryonalen Stammzellen vor [179, 181, 193]. 2-5 % aller CpG-Dinukleotide des Genoms kommen in Clustern vor, entweder in großen repetitiven Elementen, wie Satelliten-Regionen oder zentromerischen Repeats oder in etwa 500 bp großen CG-reichen DNA-Abschnitten, den sogenannten CpG-Inseln. CpG-Inseln befinden sich bei den meisten Housekeeping-Genen in der 5'-Region (Promotoren, Untranslatierten Regionen und dem ersten Exon) und sind normalerweise unmethyliert, wohingegen repetitive Bereiche häufig methyliert sind [176, 177, 194]. Insgesamt sind etwa 3/4 der Transkriptionsstartpunkte und 88 % der Promotoren mit CpG-reichen Sequenzen assoziiert und unterliegen einer gewebs- und entwicklungsabhängigen Regulation der DNA-Methylierung [185, 186, 195].

Die DNA-Methylierung wird von einer Gruppe von Enzymen initiiert und aufrechterhalten [176]. DNA-Methyltransferasen (DNMT) nutzen das Substrat S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) als Methylgruppendonor, um eine Methylgruppe durch kovalente Addition auf das fünfte Kohlenstoffatom (C5) des Pyrimidinrings der Base Cytosin zu übertragen [180, 193]. DNMT3a und DNMT3b sind *de novo* Methyltransferasen, die bevorzugt unmethylierte Cytosine methylieren, z.B. in der frühen embryonalen Stammzelle oder in der Tumorzelle. Bei der Replikation erkennt die DNMT1 („maintenance“ DNMT) hemimethylierte Bereiche und kopiert so das Methylierungsprofil des parentalen DNA Stranges auf den neusynthetisierten Tochterstrang [176, 186, 196].

Eine genomweite DNA-Methylierungsanalyse von B-Zell-Neoplasien von Martin-Subero et al. zeigte, dass insbesondere B- und T-Zell Vorläufer-Lymphome mit einer Hypermethylierung in den Promotorregionen von Genen mit einem hohen CpG-Gehalt assoziiert sind. Darunter sind insbesondere Gene, die von dem PRC reprimiert werden [197]. Diese Beobachtungen wurden auch bei DLBCLs und PCNSL gemacht, wobei letztere primäre Lymphome des Zentralen Nervensystems sind [198]. Polycomb-Proteine bilden im Wesentlichen zwei funktionelle Einheiten, die als Polycomb Repressive Komplex 1 und 2 (PRC1 und 2) bezeichnet werden. Die Gruppe der Polycomb Proteine sind strukturell unterschiedliche aber funktionell ähnliche Proteine, deren Funktion darin besteht, über entsprechende

Histonmodifikationen, z.B. Trimethylierung von H3K27 oder Monoubiquitinierung von Lysin 119 an Histon H2A (H2AK119ub) die Transkription zu hemmen [199-201].

1.5.1.1 DNA-Methylierung bei Follikulären Lymphomen

Die Untersuchungen epigenetischer Modifikationen, wie der DNA-Methylierung, ist bei FL auf nur wenige Studien beschränkt [123, 197, 202, 203]. Insgesamt wurde übereinstimmend eine Hypermethylierung insbesondere bei den Zellzyklus-Inhibitoren *CDKN2A* (p16^{INK4a}) und *CDKN2B* (p15^{INK4b}) identifiziert [123, 197, 202]. Diese Hypermethylierung ist darüber hinaus mit einer Transformation in ein aggressiveres Lymphom assoziiert [123] und geht mit einer reduzierten Genexpression von p15 und p16 einher [202]. Andere Studien detektierten, dass in FL das Tumorsuppressorgen *DAPK1* häufig methyliert ist [187, 204] und ebenfalls mit einer reduzierten Transkription und Genexpression assoziiert ist [205]. *DAPK1* ist eine proapoptotische Kalzium-Kalmodulin-abhängige Serin/Threonin-Kinase, die an dem extrinsischen Apoptose-Pathway beteiligt [10].

In einer Array-basierten Methylierungsanalyse von Martin-Subero et al. wurde das DNA-Methylierungsprofil von B-Zell-Lymphomen mit dem von normalen B-Zellen, wie CD19 positiven B-Zellen und Keimzentrums-B-Zellen, verglichen. Über die Hälfte der in B-Zell-Lymphomen hypermethylierten Gene waren auch in FL hypermethyliert [197], was schlussfolgern lässt, dass das Epigenom der FL durch eine Hypermethylierung charakterisiert ist [10]. Außerdem konnten verschiedene Studien zeigen, dass die Hypermethylierung bei FL insbesondere Zielgene von PCRs betrifft [159, 203, 206]. Dieses ist von besonderem Interesse, da PCG-Proteine und die Methyltransferase EZH2, die eine katalytische Untereinheit des PRC2 Komplexes ist, in proliferierenden Zentroblasten des Keimzentrums, aber nicht in naiven B-Zellen exprimiert werden [197].

Desweiteren konnte die Gruppe von O' Riain eine Hypermethylierung von *IRF4* detektieren [203]. Funktionell führt die verringerte Expression von IRF4 zu einer Überexpression von BCL6, da IRF4 als Suppressor der BCL6-Transkription fungiert [187]. Die Studie von Shaknovich et al. untersuchte ein globales DNA-Methylierungsprofil von Keimzentrums-B-Zellen. Sie konnten einerseits zeigen, dass das DNA-Methylierungsprofil der Keimzentrums-B-Zellen im Vergleich zu normalen B-Zellen sehr heterogen ist und andererseits, dass Hypomethylierung alleine nicht mit verstärkter Aktivierung der Gene assoziiert ist. Desweiteren detektierte die Gruppe eine Korrelation zwischen der Histon-(H3K27) Trimethylierung in Keimzentrums-B-Zellen und der DNA-Methylierung, was letztlich mit einer Gen-Inaktivierung assoziiert ist [207].

Zusammenfassend konnten bisher nur vereinzelte Gene identifiziert werden, die aufgrund von Veränderungen im DNA-Methylierungsprofil mit der Pathogenese des FLs assoziiert sind. Unklar ist bislang, wie sich die DNA-Methylierung im Verlauf der Tumorevolution bei FL ändert und welche Veränderungen mit der Progression einhergehen bzw. wie das DNA-Methylierungsprofil in einem frühen Entwicklungsstadium der Erkrankung aussieht. Diese Erkenntnisse könnten im Zusammenhang mit genetischen Veränderungen maßgeblich zur Aufklärung des Krankheitsverlaufes der FL beitragen.

1.6 Einsatz von Next-Generation-Sequencing-Methoden zur Analyse der klonalen Tumorevolution

Nach einem von Nowell et al. vorgeschlagenen Konzept der klonalen Evolution in Tumoren, nimmt die genetische Instabilität im Verlauf der Tumorentwicklung zu, so dass in der Folge zahlreiche genetisch unterschiedliche Subklone innerhalb eines Tumors entstehen [208]. Diese genetisch unterschiedlichen Subklone sind verantwortlich für die Diversität innerhalb des Tumors [208, 209]. Alle Subklone in einem Tumor sind phylogenetisch miteinander verwandt. Dabei unterscheiden sich die Subklone untereinander und von der Ursprungszelle durch die Art und den Zeitpunkt der erworbenen Mutation. Folglich kann das Auftreten somatischer Mutationen genutzt werden, um die Progression der Tumorevolution darzustellen [117, 210]. In früheren Studien wurden verschiedene Methoden, wie z.B. Karyotypisierung einzelner Metastasen in zellbasierten Studien, Analyse von Kopienzahlveränderungen mittels der Array-CGH-Technik oder die Untersuchung von Einzelbasenveränderungen mittels der Sanger-Sequenzierung genutzt, um die Heterogenität in Tumoren zu untersuchen [211]. Durch die Entwicklung der Technologie in den letzten Jahren konnte das um 1975 von Fred Sanger etablierte Verfahren zur Sequenzierung von DNA-Molekülen um sehr viel schnellere, hochsensitive und im Großmaßstab durchführbare Sequenzierungsmethoden, dem sog. „Next-Generation-Sequencing“ (NGS) erweitert werden [212-214]. Mit Hilfe dieser NGS-Technologien ist es möglich, neben interklonaler Variabilität, auch die intraklonale Variabilität von Tumoren zu untersuchen. Aufgrund der Vielzahl analysierbarer Sequenzen, z.B. werden bis zu 700 Mio. Reads/Lauf mit dem Illumina HiSeq2500 generiert, sind sogar seltene Subklone genetischer Varianten detektierbar, die in einer von 5 000 Kopien vorkommen [210, 211]. Beispielsweise wurde die 454-Technologie genutzt, um die intraklonale Diversität an dem *IGH*-Lokus bei 22 chronisch lymphatischen Leukämie (CLL)-Patienten zu untersuchen [210]. In einer anderen Studie von Smith et al. konnten mittels Tiefensequenzierung des *TET2*-Gens bei 355 Patienten mit chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) und myelodysplastischen Syndrom (MDS) zahlreiche seltene Mutationen von den dominierenden Mutationen unterschieden werden [215]. Mitsui et al. nutzten einen Multiplex-basierten PCR-Ansatz um über 6 kb des *GBA*-Gens zu analysieren und die Region in 96 Proben parallel zu sequenzieren [216].

Ein wesentlicher Vorteil dieser Sequenzierungstechnologien ist die Möglichkeit, seltene Varianten zu detektieren, die in mindestens 1 % der Tumorzellen vorkommen [210, 217]. Der Einsatz dieser NGS-Technologie könnte auch maßgeblich zur Aufklärung der Entwicklung von t(14;18) positiven FL beitragen und insbesondere charakteristische Progressions-relevante Subklone identifizieren.

1.7 Fragestellungen

Follikuläre Lymphome (FL) sind hämatologische Neoplasien der B-Zell-Reihe, die gekennzeichnet sind durch einen langsamen, und in der Regel zunächst symptomfreien Entwicklungsverlauf. Die Translokation t(14;18)(q32;q21), die das *BCL2*-Gen unter die Regulation des aktiven Enhancers des Immunglobulin-Schwerkettengens bringt, ist eine rekurrente Translokation in Lymphomen und in ca. 80-90 % der FL sowie 20-30% der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL) nachweisbar. Derzeitige Therapiemöglichkeiten erreichen eine Heilung in zwei von drei Patienten mit einem DLBCL, aber nur selten bei FL-Patienten. Trotz der relativ indolenten Natur des FLs, transformieren jährlich circa 3 % der FL zu einem aggressiveren Lymphom, z.B. DLBCL. Die Faktoren, die zu einer Transformation, zu einem Rezidiv oder zu einer Therapie-Resistenz in t(14;18) positiven Lymphomen führen, sind bis dato weitgehend unbekannt. Zudem kommt die Translokation t(14;18) auch bei etwa 50 % der gesunden Individuen vor und ist alleine unzureichend für eine vollständige Tumorentwicklung. Es ist generell anerkannt, dass die Translokation bereits in einer Vorläufer-B-Zelle während einer frühen Phase der B-Zell-Entwicklung auftritt. Diese Zellen sind, wie auch die normalen Zellen in der Lage, in eine Keimzentrumsreaktion im Lymphknoten einzutreten, um dort zu expandieren und zu differenzieren [57]. Inzwischen sind sekundäre chromosomale Veränderungen in t(14;18) positiven FL relativ gut charakterisiert. Weitgehend unverstanden sind aber noch die genetischen und epigenetischen Veränderungen der frühen Entwicklungsstadien, sowie der Einfluss epigenetischer Faktoren auf die Progression dieser Lymphome. Vorangegangene epigenetische Studien an FL umfassten kleine Patientenkollektive und/oder fokussierten auf spezifische Kandidatengene, die mit Hilfe nicht-quantitativer Methoden analysiert wurden. Durch die Etablierung neuer arraybasierter Technologien, die insbesondere für tumorgenetische Fragestellungen optimiert sind, ist es mittlerweile möglich genomweite DNA-Methylierungsprofile zu erstellen. Darüber hinaus bieten Next-Generation-Sequencing-Methoden die Möglichkeit, spezifische Kandidatengene im Hochdurchsatz-Verfahren und mit einer wesentlich höheren Auflösung und Sensitivität zu analysieren.

In dieser Arbeit sollte die Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL untersucht werden. Im Fokus stand die Charakterisierung epigenetischer und genetischer Veränderungen im Zusammenhang der

Einleitung

Tumorevolution. Dazu sollten z.B. NGS-Methoden eingesetzt werden, um phylogenetische Beziehungen zwischen Subklonen innerhalb eines Tumors zu identifizieren.

Zur Analyse der Entwicklung von einem t(14;18) positiven FLIS und PFL, über ein klassisches FL bis hin zum Rezidiv, sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Lassen sich mittels eines PCR-basierten Anreicherungsverfahrens und „Next-Generation-Sequencing“ sowohl inter- als auch intraklonale Veränderungen der DNA-Methylierung im Progress der Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL rekonstruieren?
2. Geben chromosomale Aberrationen und epigenetische Veränderungen der DNA-Methylierung Hinweise darauf, dass es sich bei t(14;18) positiven FLIS und PFL um Vorläuferläsionen der klassischen FL handelt?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen den Folgen der genetischen und epigenetischen Veränderungen im Progress der Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL?
 - a. Lässt sich auf der Grundlage des Mutationsprofils des VDJ-Rearrangements von Verlaufsproben die klonale Evolution der FL rekonstruieren und basierend darauf eine Klassifikation hinsichtlich der Tumorevolution vornehmen?
 - b. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem somatischen Mutationsprofil des VDJ-Rearrangements und der DNA-Methylierung bei t(14;18) positiven Verlaufsproben?
 - c. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem somatischen Mutationsprofil des VDJ-Rearrangements und dem somatischen Mutationsprofil in ausgewählten Kandidatengenen?

2 Material und Methoden

In diesem Teil werden die während der Arbeit verwendeten Materialien aufgelistet und anschließend die angewandten Methoden beschrieben, sofern sie nicht in den einzelnen Manuskripten aufgeführt sind. Allgemein übliche Labormethoden, Arbeitsanweisungen, Reagenzien und Geräte werden nicht separat angegeben. Es wird darauf hingewiesen, dass molekulargenetische Untersuchungen im Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel nach den Bestimmungen der DIN EN ISO 15189:2007 durchgeführt werden und die entsprechenden Protokolle in Standard-Arbeitsanweisungen (SAA) hier übernommen wurden.

2.1 Material

Die Selektion der im folgenden Abschnitt 2.1.2 aufgeführten Probenmaterialien erfolgte im Rahmen des Forschungsverbundes „Systems Biology of the Haematopoetic Systems and Related Neoplasias (HämatoSys)“, für den ein positives Ethikvotum der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vorlag (AZ.: D 403/05; Amendment vom 09.03.2010). Probenmaterialien, die im Rahmen der jeweiligen veröffentlichten Arbeiten analysiert wurden, sind in den entsprechenden Manuskripten aufgeführt und werden hier nicht separat aufgelistet.

2.1.1 Probenmaterial für epigenetische Untersuchungen an in-situ-Follikulären Lymphomen und Follikulären Lymphomen mit partieller Lymphknoteninfiltration

Zur Untersuchung der DNA-Methylierung ausgewählter Kandidatengene und Bestimmung des *EZH2* Tyr641-Mutationsstatus bei FLIS standen mir die DNA von vier Proben mit einem diagnostizierten FL mit partieller Lymphknoteninfiltration (PFL), fünf Proben mit einem diagnostizierten in-situ FL (FLIS) sowie von fünf Fällen (10 Proben), bei denen sowohl ein FLIS als auch ein klassisches FL vorlag, zur Verfügung. Diese DNA wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Leticia Quintanilla-Martinez, Institut für Pathologie, Eberhard-Karls-Universität Tübingen bereitgestellt und sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgeführt.

Material und Methoden

Tabelle 3: DNA aus Lymphknotengewebe für die Untersuchung der DNA-Methylierung und Bestimmung des Mutationsstatus Tyr641 in *EZH2* bei PFL und FLIS

Fall-Nr.	Fall-Bezeichnung	<i>BCL2</i> -Bruch	partielle Infiltration des LKs	Geschlecht	analysiertes Gewebe
1	part.-Inf_1	nachgewiesen	60 %	weiblich	LK
2	part.-Inf_2	nicht analysiert	80 %	männlich	LK
3	part.-Inf_3	nachgewiesen	60 %	männlich	LK
4	part.-Inf_4	nachgewiesen	90 %	weiblich	LK
Fall-Nr.	Fall-Bezeichnung	<i>BCL2</i> -Bruch	Bemerkung	Geschlecht	analysiertes Gewebe
1	isFL_1	nachgewiesen	es liegen zwei Jahre zwischen den beiden FLIS-Biopsien eines Patienten	männlich	LK
	isFL_2	nachgewiesen		männlich	LK
2	isFL_3	nachgewiesen		männlich	LK
3	isFL_4	nachgewiesen		männlich	Milz
4	isFL_5	nachgewiesen		männlich	Milz

LK: Lymphknotengewebe; part.-Inf: Follikuläres Lymphom mit partieller Lymphknoteninfiltration (PFL); FLIS: in-situ-Follikuläres Lymphom (isFL).

Tabelle 4: DNA aus Lymphknotengewebe für die Untersuchung der DNA-Methylierung und Bestimmung des Mutationsstatus Tyr641 in *EZH2* bei gepaarten Proben mit FLIS und klassischem FL

Fall-Nr.	Fall-Bezeichnung	klonale Verwandtschaft?	<i>BCL2</i> -Bruch	Diagnose bei Untersuchung	Alter bei Diagnose	Geschlecht	analysiertes Gewebe
1	n10-1	nachgewiesen	nachgewiesen	FLIS	76 Jahre	männlich	LK
	n10-2		nachgewiesen	klassisches FL	76 Jahre		LK
2	n11-1	nachgewiesen	nachgewiesen	FLIS	48 Jahre	weiblich	LK
	n11-2		nachgewiesen	klassisches FL	48 Jahre		LK
3	n12-1	nachgewiesen	nachgewiesen	FLIS	55 Jahre	weiblich	LK
	n12-2		nachgewiesen	klassisches FL	57 Jahre		LK
4	n14-1	nachgewiesen	nachgewiesen	FLIS	74 Jahre	weiblich	LK
	n14-2		nachgewiesen	DLBCL	74 Jahre		LK
5	n15-1	nachgewiesen	nachgewiesen	FLIS	61 Jahre	männlich	LK
	n15-2		nachgewiesen	klassisches FL	57 Jahre		LK

LK: Lymphknotengewebe; FLIS: in-situ-Follikuläre Lymphome (isFL); FL: Follikuläres Lymphom; DLBCL: diffus großzelliges B-Zell-Lymphom.

2.1.2 Probenmaterial für die Untersuchung der Tumorentwicklung an Verlaufsproben von t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen

Um die Tumorevolution in t(14;18) positiven FL zu untersuchen, sollte das Initialmaterial (Lymphknoten, Milz, peripheres Blut oder Knochenmark) und mindestens ein zweites Material von zeitgleichen oder unterschiedlichen (Rezidiv) Entnahmezeitpunkten analysiert werden. Die Auswahl des Probenmaterials erfolgte im Rahmen und nach den Richtlinien des Forschungsverbundes „HämatoSys“. Aus den Kollektiven des Instituts für Humangenetik, des Instituts für Pathologie (Sektion Hämatopathologie) und der II. Medizinischen Klinik (Hämatologie/Onkologie) am Campus Kiel des Universitätsklinikums

Material und Methoden

Schleswig-Holstein wurde das Untersuchungskollektiv unter folgenden Selektionskriterien zusammengestellt.

1. Diagnose nach WHO-Klassifikation 2008 [1] : Follikuläres Lymphom
2. Material: Lymphknoten, Milz, peripheres Blut oder Knochenmark (formalin fixiertes Paraffinmaterial ausgeschlossen)
3. Mindestens zwei Probeneingänge
4. Die Probeneingänge sollten aus mind. zwei t(14;18) positiven Materialien von zeitgleichen oder unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten bestehen
5. Eine Mindestmenge von 10 µg DNA sollte von dem vorhandenem Material extrahierbar sein
6. Klonales Rearrangement im *IGH*-Lokus sollte an der extrahierten DNA nachweisbar sein
7. Das Material sollte einen Tumorzellgehalt von über 20 % aufweisen
8. Kein Ausschluss der anonymisierten Nutzung dieses Materials für Forschungszwecke

Ausnahme: Proben, die bereits im Rahmen des MMML-Verbundprojektes „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ analysiert wurden, wurden auch mit einem polyklonalen V_H-Rearrangement eingeschlossen.

Von einem Gesamtkollektiv, bestehend aus 662 Materialien von 167 Patienten von unterschiedlichen oder zeitgleichen Entnahmezeitpunkten mit einem diagnostizierten FL und mindestens zwei Probeneingängen, konnte nach diesen Kriterien ein Probenkollektiv aus 94 Materialien von 38 Patienten zusammengestellt werden. Dieses Material umfasste überwiegend Lymphknotenbiopsate aus Frischmaterialien oder DMSO-Zellen. Dieses Untersuchungskollektiv ist in Tabelle 5 aufgelistet und wurde für alle Analysen im Rahmen des Forschungsverbundes „HämatoSys“ verwendet.

Tabelle 5: Finales Probenkollektiv, bestehend aus t(14;18) positiven Proben von 38 Patienten (94 Materialien)

Fall-Nummer	Proben-Nummer	interne Nummer	Status	Geschlecht	Alter bei Eingang [Jahre]	Zeitraum zwischen den Eingängen [Jahre]	analysiertes Gewebe	Diagnose (WHO-Klassifikation)	geschätzter Tumorzellgehalt in % (P= am Paraffinmaterial beurteilt)	IGH-Rearrangement	Therapie Status
1	Probe-1	MPI-475	Initial	w	79		LK	DLBCL nos	70	pc	keine Angaben
	Probe-2	MPI-426	1. Rezidiv		80	1	LK	FL II	60	pc	keine Angaben
2	Probe-1	SYS-014	Initial	m	52		LK	FL I	60-P	c319	keine Angaben
	Probe-2	SYS-015	1. Rezidiv		61	8,5	LK	FL ungraduiert	45	c319	keine Angaben
3	Probe-1	SYS-016	Initial	w	46		LK	FL II	60-P	c343	keine Therapie
	Probe-2	SYS-017	1. Rezidiv		48	2	LK,	FL I	n.a.	c343	Chemo + Radioimmun
	Probe-3	SYS-120	1. Rezidiv		48		Milz	FL I	50-P	c343	Chemo + Radioimmun
	Probe-4	SYS-018	2. Rezidiv		49	0.5	LK	FL I	60-P	c343	Chemo + Radioimmun
4	Probe-1	SYS-021	Initial	m	67		LK	FL II mit Sklerose	60-P	c316	keine Angaben
	Probe-2	SYS-022	1. Rezidiv		71	3,5	Tonsille	FL ungraduiert	50	c316	Chemo + Radioimmun
5	Probe-1	SYS-025	Initial	w	54		LK	FL I	60-P	c316	keine Angaben

Material und Methoden

Fall-Nummer	Proben-Nummer	interne Nummer	Status	Geschlecht	Alter bei Eingang [Jahre]	Zeitraum zwischen den Eingängen [Jahre]	analysiertes Gewebe	Diagnose (WHO-Klassifikation)	geschätzter Tumorzellgehalt in % (P= am Paraffinmaterial beurteilt)	IGH-Rearrangement	Therapie Status
6	Probe-2	SYS-026	1. Rezidiv		56	2.5	LK	FL I, Marginalz.-diff	60-P	c316	keine Angaben
	Probe-1	MPI-777	Initial	m	38		LK	FL I	50	c315	Radioimmun
	Probe-2	MPI-778	1. Rezidiv		40	2	LK	FL II	70	c315	Radioimmun
7	Probe-1	MPI-775	Initial	w	74		LK	FL I	70	c311	keine Angaben
	Probe-2	MPI-776	1. Rezidiv		75	1,5	LK	FL II	70	c310	keine Angaben
8	Probe-1	MPI-507	Initial	w	55		LK	FL II	65	pc	Chemo
	Probe-2	MPI-907	1. Rezidiv		57	1,5	LK	FL ungraduiert	60	pc	keine Angaben
9	Probe-1	MPI-779	Initial	w	75		Tonsille	FL II	60	c335v.pc	keine Angaben
	Probe-2	MPI-774	1. Rezidiv		79	3,5	LK	FL NOS	60	c331v.pc	keine Angaben
10	Probe-1	MPI-786	Initial	w	46		LK	FL I	75	c350	Chemo + Rituximab
	Probe-2	MPI-784	1. Rezidiv		47	1	LK	FL I	70	c350	Chemo + Rituximab
11	Probe-1	MPI-787	Initial	m	62		LK	FL I	70	c317	Chemo
	Probe-2	MPI-909	1. Rezidiv		65	3	LK	FL I	70	c316	Chemo
12	Probe-1	SYS-053	Initial	m	52		LK	FL I	nicht bestimmbar	c338	keine Angaben
	Probe-2	SYS-054	1. Rezidiv		53	0,5	LK	FL I, Marginalz.-diff.	60-P	c338	keine Angaben
	Probe-3	SYS-055	2. Rezidiv		54	1,5	LK	FL I,	70-F, 60-P	c339	keine Angaben
13	Probe-1	MPI-478	Initial	m	51		LK	FL I	75	c319	Chemo
	Probe-2	MPI-460	1. Rezidiv		52	1,4	LK	FL I	55	c331	keine Angaben
	Probe-3	SYS-124	2. Rezidiv		52	0,2	LK	keine Angaben	nicht bestimmbar	c340	keine Angaben
	Probe-4	SYS-125	3. Rezidiv		52	0,1	LK	keine Angaben	nicht bestimmbar	c340	keine Angaben
14	Probe-1	SYS-065	Initial	m	38		LK	FL I,	70-P	c337	keine Therapie
	Probe-2	SYS-067	2. Rezidiv		41	2.5	LK	FL, ungraduiert	nicht bestimmbar	c337	Chemo + Radioimmun
15	Probe-1	SYS-068	Initial	w	48		LK,	FL I	30-70	c328	keine Therapie
	Probe-2	SYS-127	Initial		48		Milz	FL I	60	c328	Chemo + Radioimmun
	Probe-3	SYS-069	1. Rezidiv		53	4,7	LK	FL I	60-P	c328	Chemo + Radioimmun
16	Probe-1	MPI-772	Initial	w	52		LK	FL I	60	c300	Chemo + Radioimmun
	Probe-2	MPI-771	1. Rezidiv		59	7	LK	FL II	70	c311	Chemo + Radioimmun
17	Probe-1	MPI-867	Initial	w	61		LK	FL IIIa	70	c331v.pc	keine Angaben
	Probe-2	MPI-770	1. Rezidiv		62	1	LK	FL I	30	pc	keine Angaben
	Probe-3	MPI-828	2. Rezidiv		65	3	LK	FL II diffus	60	ks	keine Angaben
18	Probe-1	MPI-523	Initial	m	27		LK	FL I	60	c333	Chemo + Radioimmun
	Probe-2	MPI-908	1. Rezidiv		30	2.5	LK	FL I	50	c331	Chemo + Radioimmun
19	Probe-1	SYS-070	Initial	m	58		LK	FL ungraduiert	50	c334	keine Angaben
	Probe-2	SYS-071	1. Rezidiv		60	1	LK	FL II, > 50% diffus	80	c334	keine Angaben
20	Probe-1	SYS-076	Initial	w	62		LK	FL ungraduiert	60	c325	keine Angaben
	Probe-2	SYS-077	1. Rezidiv		65	2.6	LK	FL ungraduiert	70	c325	keine Angaben
21	Probe-1	SYS-080	Initial	w	65		LK	FL ungraduiert	60	c316	keine Angaben
	Probe-2.a	SYS-081.a	1. Rezidiv		66	1	LK	FL ungraduiert, folliculär und diffus	10-FL, 90-DLBCL	c316	Chemo und Radioimmun
	Probe-2.b	SYS-081.b	1. Rezidiv		66		LK		75	keine Angaben	Chemo und Radioimmun
	Probe-3	SYS-082	2. Rezidiv		69	2.6	LK	M.Hodkin, Mischtyp	nicht bestimmbar	pc	Chemo und Radioimmun
22	Probe-1	SYS-085	Initial	w	72		Tumor-PE	FL I	30-60-P	c322	keine Angaben
	Probe-2	SYS-086	1. Rezidiv		74	2	LK	kein lymph. Gewebe	kein Lymphom	bc 321/335	keine Angaben
23	Probe-1	SYS-088	Initial	w	65		LK	FL I	40-60-P	c338	keine Angaben
	Probe-2	SYS-089	1. Rezidiv		68	2.5	LK	FL I mit Nekrose	70	c338	keine Angaben
	Probe-3	SYS-132	2. Rezidiv		71	3.1	LK	keine Angaben	nicht bestimmbar	c339v.pc	keine Angaben

Material und Methoden

Fall-Nummer	Proben-Nummer	interne Nummer	Status	Geschlecht	Alter bei Eingang [Jahre]	Zeitraum zwischen den Eingängen [Jahre]	analysiertes Gewebe	Diagnose (WHO-Klassifikation)	geschätzter Tumorzellgehalt in % (P= am Paraffinmaterial beurteilt)	IGH-Rearrangement	Therapie Status
24	Probe-1	SYS-090	Initial	m	63	5.5	LK	FL II	70	c325	keine Angaben
	Probe-2	SYS-091	1. Rezidiv		64	1	LK	FL II mit Sklerose und Nekrose	70	c325	keine Angaben
25	Probe-1	SYS-095	Initial	m	60		LK	Tumornekrose B-NHL, kein vitales	30-P	c322	keine Angaben
	Probe-2	MPI-509	1. Rezidiv		60	0	LK	Lymphoplasmocytisches Lymphom	75	c323	Chemo
	Probe-3	MPI-906	3. Rezidiv		62	1.7	LK	FL I	60-P	c321v.pc	Chemo + Radioimmun
26	Probe-1	MPI-458	Initial	w	55		LK	FL I	55	c332	Radioimmun
	Probe-2	SYS-133	1. Rezidiv		60	4.7	LK	keine Angaben	nicht bestimmbar	c332	Radioimmun
	Probe-3	MPI-462	2. Rezidiv		62	2.8	LK	FL I	60	c339	Radioimmun
27	Probe-1	MPI-773	1. Rezidiv	m	48	0.7	LK	FL I	70	c320v.pc	keine Angaben
	Probe-2	MPI-785	2. Rezidiv		49	1	LK	FL I	60	c319v.pc	keine Angaben
28	Probe-1	MPI-508	Initial	m	64		LK	FL II	75	c329	keine Angaben
	Probe-2	MPI-510	1. Rezidiv		66	1.5	LK	FL II nicht graduiert	75	c330	keine Angaben
29	Probe-1	SYS-037	Initial	w	89		LK rechts	FL II ungraduiert	70	c316	keine Angaben
	Probe-2	SYS-038	Initial		89	0	LK links	FL II ungraduiert	nicht bestimmbar	c316	keine Angaben
30	Probe-1	MPI 506	1. Rezidiv	w	65	1.5	LK	FL I	70	c332	Radioimmun
	Probe-2	SYS-143	2. Rezidiv		71	5.5	LK	keine Angaben	nicht bestimmbar	c331v.pc	Chemo+ Radioimmun
31	Probe-1	SYS-004	Initial	m	35		LK	FL I	50	c321	Chemo + Radioimmun
	Probe-2	SYS-005	1. Rezidiv		39	4.1	Tumor-PE	FL I diffus	60	c321	Chemo + Radioimmun
32	Probe-1	SYS-083	Initial	w	70		LK	FL I	nicht bestimmbar	c322	keine Angaben
	Probe-2	SYS-084	1. Rezidiv (nur 7 Tage Unterschied)		70	0	LK	FL I	60-P	c322	keine Angaben
33	Probe-1	SYS-063	1. Rezidiv	w	71	2.5	Tumor-PE	FL II	60-P	c340v.pc	keine Angaben
	Probe-2	SYS-064	2. Rezidiv		72	1.5	LK	FL I mit Sklerose	60-P	c340	keine Angaben
	Probe-3	MPI-885	3. Rezidiv		74	2.7	LK	Burkitt/ DLBCL	85	c339	Radioimmun
34	Probe-1	MPI-845	Initial	w	86		LK	high B-NHL	60	oligo	keine Angaben
	Probe-2	SYS-115	1. Rezidiv (nur 6 Tage Unterschied)		86	0	LK	part. Infiltration m. FL ungraduiert	40	pc	keine Angaben
35	Probe-1	SYS-167	Initial	m	57		LK	FL I	nicht bestimmbar	c317	keine Angaben
	Probe-3	MPI-871	3. Rezidiv		62	3	LK	FL IIIa + FL 2	70	c317	Chemo + Rituximab
	Probe-4	MPI-891	4. Rezidiv		65	0.1	LK	FL II	60	c317	Chemo + Rituximab
36	Probe-1	MPI-886	Initial	m	68		LK	FL I	50	pc	keine Angaben
	Probe-2	MPI-888	1. Rezidiv		69	1.4	LK	FL II + FL IIIa	40	pc	keine Angaben
37	Probe-1	SYS-107	1. Rezidiv	m	71	0.2	Tumor-PE	FL II	60	c313v.pc	keine Angaben
	Probe-2	SYS-148	2. Rezidiv		74	0.1	BK	keine Angaben	nicht bestimmbar	bc327+347/c327	keine Angaben
	Probe-3	SYS-174	3. Rezidiv		76	2	Parotis	FL I	60	c312	keine Angaben
	Probe-4	SYS-175	3. Rezidiv		76		LK	keine Angaben	60	c312	keine Angaben
38	Probe-1	SYS-102	Initial	w	49		LK	FL I, Marginalz.-diff.	50	c325	keine Angaben
	Probe-2	MPI-868	1. Rezidiv		49	0.1	LK	FL I, Marginalz.-diff.	60	c325	keine Therapie
	Probe-3	MPI-889	2. Rezidiv		50	1	LK	FL I, Marginalz.-diff.	60	c324	Chemo + Radioimmun
	Probe-4	SYS-166	2. Rezidiv		50		Milz	FL I, Marginalz.-diff.	60	c343	keine Angaben

Abkürzungen: m: männlich; w: weiblich; LK: Lymphknoten; BK: Beckenkamtrepanat; Tumor-PE: Tumor-Probenentnahme; FL I: Follikuläres Lymphom Grad 1; FL II: Follikuläres Lymphom Grad 2; FL-IIIa: Follikuläres Lymphom Grad 3a; Marginalz.-diff: Marginalzonendifferenzierung; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; DLBCL: diiffus großzelliges B-Zell-Lymphom; M.Hodgkin: Morbus Hodgkin; c: clonal; bc: biallelisch; pc: polyklonal; v.pc: vor polyklonalem Hintergrund; c322: Anzahl der Basen/Fragmentgröße.

Korrelationsanalysen mittels SNP6.0-Array gaben Hinweis darauf, dass die Verlaufsproben von Fall 25 (SYS-095; MPI-509, MPI-906), sowie SYS-166 von Fall 38 im Sinne einer „Materialvertauschung“ nicht zusammen bzw. nicht zu den anderen Proben des Falles passen könnten. Aufgrund dieser Diskrepanzen wurden diese vier Proben aus allen Analysen vollständig ausgeschlossen, so dass ein finales Kollektiv aus 37 Patienten und 90 Proben zur Verfügung stand.

Zusammenfassung des finalen Probenkollektivs:

- 20 Patienten (n= 41 Materialien) mit einem Initial- und einem Rezidivtumor
- 8 Patienten (n= 26 Materialien) mit einem Initial- und zwei Rezidivtumoren
- 1 Patient (n= 4 Materialien) mit einem Initial- und drei Rezidivtumoren
- 5 Patienten (n= 13 Materialien) ohne Initialtumor, nur zwei bzw. drei Rezidivtumoren
- 3 Patienten (n= 6 Materialien) mit zeitgleichen Entnahmezeitpunkten (bei zwei Patienten lagen nur sechs bzw. sieben Tage zwischen den entnommenen Biopsaten)

2.1.3 Probenmaterial für die „klassische“-PCR-basierte-Anreicherung

Für die Qualitätssicherung des in Abschnitt 3.1.1 publizierten Verfahrens wurde ein „klassisches“-PCR-basiertes Anreicherungsverfahren mit anschließendem NGS zur Detektion von DNA-Methylierung durchgeführt. Dazu wurden folgende vier Proben eingesetzt:

- Lymphatische Tumorzelllinie: Daudi (Burkitt-Lymphom)
- DNA eines gesunden Individuums, bei dem kein Ausschluss der anonymisierten Nutzung dieses Materials für Forschungszwecke vorlag
- Kommerzielle methylierte DNA (Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Pool aus der DNA von fünf männlichen und fünf weiblichen gesunden Individuen, für die kein Ausschluss der anonymisierten Nutzung dieses Materials für Forschungszwecke vorlag

2.1.4 Kontrollen für Pyrosequenzierungsanalysen

Für Analysen mit dem PyroMark ID (Bisulfit-Pyrosequenzierung und LUMA) wurden standardmäßig folgende Referenzen mitgeführt:

- Kommerzielle methylierte DNA (Millipore, Darmstadt, Deutschland) als methylierte Kontrolle
- Gesamt-Genom-Amplifizierte DNA (WGA) als unmethylierte Kontrolle

Material und Methoden

Für Bisulfit-Pyrosequenzierungsanalysen wurde eine weitere Kontrolle mitgeführt:

- Pool aus der DNA von zehn männlichen und zehn weiblichen gesunden Individuen, für die kein Ausschluss der anonymisierten Nutzung dieses Materials für Forschungszwecke vorlag (repräsentiert den physiologischen DNA-Methylierungszustand für die analysierte Region).

2.1.5 Kontrollen für die Luminometrische Methylierungsanalyse

Zur Bestimmung des Bereiches der „normalen DNA-Methylierung“ in reaktiven Lymphknoten mittels Luminometrischer Methylierungsanalyse wurde die DNA von Proben mit einer chronisch unspezifischen Lymphadenitis, sowie die DNA von vier Patienten mit einem FL und einem polyklonalen VH-Rearrangement analysiert. Diese Proben sind in der Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: verwendete Kontrollen zur Bestimmung des Bereichs der „normalen DNA-Methylierung“ in reaktiven Lymphknoten für die Luminometrische Methylierungsanalyse

Patient-Nr.	Proben-Nr.	Diagnose	Bemerkung
1	1) V 18014	chronische unspezifische Lymphadenitis	
2	2) V 17996	chronische unspezifische Lymphadenitis	
3	3) V 17774	chronische unspezifische Lymphadenitis	
4	4) V 18120	chronische unspezifische Lymphadenitis	
5	5) D12-730	chronische unspezifische Lymphadenitis	
6	6) D12-731	chronische unspezifische Lymphadenitis	
7	7) D12-732	chronische unspezifische Lymphadenitis	
1	1) SYS-048	Folikuläres Lymphom	polyklonales VH-Rearrangement
	2) SYS-049	Folikuläres Lymphom	polyklonales VH-Rearrangement
2	3) SYS-044	Folikuläres Lymphom	polyklonales VH-Rearrangement
	4) SYS-045	Folikuläres Lymphom	polyklonales VH-Rearrangement
3	5) SYS-074	Folikuläres Lymphom	polyklonales VH-Rearrangement
	6) SYS-075	Folikuläres Lymphom	polyklonales VH-Rearrangement
4	7) SYS-006	Folikuläres Lymphom	polyklonales VH-Rearrangement
	8) SYS-007	Folikuläres Lymphom	polyklonales VH-Rearrangement

2.1.6 Chemikalien und Reagenzien

In der folgenden Tabelle 7 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien, sowie deren Vertreiber aufgeführt.

Tabelle 7: verwendete Chemikalien und Reagenzien und deren Hersteller

Chemikalien	bezogen von
100 bp DNA-Längenstandard	New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland
Agarose	Eurogentec, Seraing, Belgien
AmpliQ Gold Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, CA

Material und Methoden

Chemikalien	bezogen von
Aqua bidest (ddH ₂ O)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Betaine Lösung	Geyer, Hamburg, Deutschland
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphat Set	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Ethanol	Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Isopropanol	Geyer, Hamburg, Deutschland
Hpa II (Enzym)	Fermentas, St-Leon-Rot, Deutschland
Hyperladder (200-10 000 bp)	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
Methylierte DNA	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Msp I (Enzym)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Mun I (Enzym)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
PyroMark Annealing Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Binding Buffer	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Q96 Cartridge	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Q96 Vacuum Prep Trough	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark Vacuum Prep Filter Probe	Qiagen, Hilden, Deutschland
PyroMark PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pyro Gold Reagenzien	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pyro Gold SQA Reagenzien	Qiagen, Hilden, Deutschland
Streptavidin coated Sepharose Beads	GE Healthcare, München, Deutschland
10xTBE (Tris-Borat-EDTA)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in der Tabelle 8 aufgelistet, dabei sind allgemein gebräuchliche Laborgeräte (z.B. Pipetten) nicht gesondert aufgeführt.

Tabelle 8: Typenbezeichnung und Hersteller der verwendeten Geräte

Geräte	Typbeschreibung	Firma
Exicator (Methylierungsarray)	Bel-art	Illumina, Eindhoven, Niederlanden
Färbeinkubator (Methylierungsarray)	Rack-Chamber, 48Pos, Te-Flow, Tecan	Illumina, Eindhoven, Niederlanden
Geldokumentationsanlage	BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Gelkammer	Modell 41-2026	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Heizplatte mit Aufsatz für 96 Well-Platten	Heizplatte	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Hybridisierungsöfen für DNA Extraktion	Hybaid	Biometra GmbH, Göttingen, Goettingen
Hybridisierungsöfen für Methylierungsarrays	Hybrid oven	Illumina, Eindhoven, Niederlanden
Scanner (Methylierungsarray)	iScan	Illumina, Eindhoven, Niederlanden
Inkubator (Methylierungsarray)	Hybex-Microsample Incubator	Illumina, Eindhoven, Niederlanden
Kapillarsequenzierer	ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Geräte	Typbeschreibung	Firma
Kryotom	Frigocut 2800-N	Reichert-Jung, Burladingen, Deutschland
Kryotommesser	Kryotommesser	Reichert-Jung, Burladingen, Deutschland
Laborzentrifuge	Unsiversal 16	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Laborzentrifuge	Megafuge 1.OR	Heraeus Kulzer GmbH, Dormagen, Deutschland
Mikrowelle	M500	Philips, Hamburg, Deutschland
Plattenschüttler	MS3 basic	GE Healthcare, München, Deutschland
Plattenabdichter	Plate seeler, ALPS	Thermo Scientific, Erlangen, Deutschland
Pyrosequenzierer	Pyro Mark ID	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plattenschüttler (Methylierungsarray)	High-Speed Microplate Shaker	Illumina, Eindhoven, Niederlanden
Speedvac	RC 1010	Jouan, Saint Herblain, Frankreich
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000 Spectrometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Thermocycler	T3000	Biometra GmbH, Göttingen, Goettingen
Thermblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Aufreinigungssation	Vacuum Workprep Station	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vakuumpumpe	MultiScreen HTS Vacuum Manifold	Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge (Methylierungsarray)	Megafuge 40R	Heraeus Kulzer GmbH, Dormagen, Deutschland

2.1.8 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits und deren Vertreiber sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Bezeichnungen und Hersteller der verwendeten Kits

Kits	bezogen von
EpiTect Bisulfite-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
EZ DNA Methylation Kit	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
HumanMethylation 27K BeadChip Kit	Illumina, Eindhoven, Niederlanden
HumanMethylation 450K BeadChip Kit	Illumina, Eindhoven, Niederlanden
Min Elute 96 PCR Purification	Qiagen, Hilden, Deutschland
Montage SEQ96 Sequencing Reaction Clean up Kit	Millipore, Darmstadt, Deutschland
QIAmp DNA Mini and Blood Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PUREGENE DNA Isolation Kit (Genra Systems)	Qiagen, Hilden, Deutschland
GenomiPhi V2 Whole Genome Amplification Kit	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

2.1.9 Software

Die folgende Tabelle 10 enthält die in dieser Arbeit verwendete Software und Internet-Tools, sowie deren Typenbezeichnung und deren Verwendungszweck.

Material und Methoden

Tabelle 10: Typenbezeichnung und Nutzung der verwendeten Software und Internet-Tools

Software	Nutzung
ABI PRISM® AB DNA Sequencing Analysis (Version 5.2)	Auswertung der Kapillarsequenzen
Bead Studio Software (Version 3.1.3.0, Illumina Inc.)	Auswertung der 27K Methylierungsarrays
Genome Studio Software (Version 2011.1, Illumina Inc)	Auswertung der 450K Methylierungsarrays
http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway	Überprüfung der DNA-Sequenzen
http://genome.sph.umich.edu/wiki/vcfCodingSnps	zur Identifikation funktioneller Annotationen
http://www.r-project.org/ (Version 2.9.0)	Auswertung der Methylierungsdaten
http://www.samtools.sourceforge.net	Alignmenttool für Sequenzierungsanalysen
http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/	für Gene Ontology Abfrage
ND-1000 (Version 3.2.1)	Nano Drop
PyroQ-CpG, Pyrosequencing (Version 1.0.11.14)	Pyro-Firmensoftware
PyroMark design software (Version 1.0 und 2.0)	Primerdesign Software
Qluore Omics Explorer 2.3 (Version 2,3 (45))	für die Principle Component Analyse
Run 3100-Avant Data Collection (Version 2.0)	Kapillarsequenzierersoftware

2.1.10 Puffer und Lösungen

1 %iges-Agarosegel

3 g Agarose wurden mit 1xTBE-Puffer auf 300 ml aufgefüllt, durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und auf Handwärme abgekühlt. Nach Zugabe von 15 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) blieb das Gel zum Erstarren in der Vorrichtung aus Gelträger und Taschenkämmen bei 23°C RT stehen.

Waschpuffer für Pyrosequenzierung

6,5 g Tris wurden auf 5 l mit ddH₂O aufgefüllt

0,2 M Natriumhydroxid-Lösung für Pyrosequenzierung

80 g NaOH wurden auf 1 l mit ddH₂O aufgefüllt

und zur Verwendung für die Pyrosequenzierung im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt (entspricht einer 0,2 M NaOH-Lösung)

3 M Natrium-Acetat Lösung, pH 4,8

40,82 g Natriumacetat-Trihydrat (CH₃COONa)

wurden in ca. 80 ml ddH₂O gelöst,

der pH auf 4,8 mit Natronlauge eingestellt

und auf 100 ml mit ddH₂O aufgefüllt

2.1.11 Primersequenzen

Die Primersequenzen für die Bisulfit-Pyrosequenzierung in Abschnitt 3.1.2 und Abschnitt 3.2.2 sind in der folgenden Tabelle 11 aufgeführt. Dabei sind Primer, die für die DNA-Methylierungsanalysen in Abschnitt 3.1.2 verwendet wurden, mit einer „1“ gekennzeichnet (siehe auch Table S5 [218]), jene für Abschnitt 3.2.2 mit einer „2“. Für einen Standard- Reaktionsansatz für die Bisulfit-Pyrosequenzierung wurde das PyroMark-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet (siehe Abschnitt 2.2.4.7). Für die Assays EYA4, TWIST1 und DAPK1_a wurde das AmpliTaq Gold Polymerase-Kit verwendet.

Tabelle 11: Primersequenzen für die Bisulfit-Pyrosequenzierung in Abschnitt 3.1.2 und Abschnitt 3.2.2

Gen-Name	Primer-Name	Primer-Sequenz (5'...3')	Start (HG18)	Chr.	Primer-Nr.	Amplikon-länge	Anzahl CpGs	Temp.	verwendet für
			Ende (HG18)						
AGTR1	AGTR1_FP	GGATTTAGAGAGTGAGGG	149898497	3	6552	206 bp	21	55°C	1
	AGTR1_RP_Biotin	TCCCAATATAAAACCAACAAT	149898702		7216				
	AGTR1_seq1	GATTTAGAGAGTGAGGG			7217				
CCNA1	CCNA1_FP	GGTTTTAGGGGTTTGAA	35904247	13	6560	192 bp	13	55°C	1
	CCNA1_RP_Biotin	ATACCACTAAACTACCCACC	35904438		7218				
	CCNA1_seq1	AGAGAGTTAGGTGAGTAGGT			7219				
DAPK1	DAPK1_FP	GGGTAGTTAGTAATGTGTTATAGG	89302305	9	6570	201 bp	19	60°C	1, 2
	DAPK1_RP_Biotin	CCCAACTACCTACCAAA	89302505		7222				
	DAPK1_RP_seq1	AGTTTAGTAATGTGTTATAG			7223				
ETV1	ETV1_FP	TGAGGGGTTAGTAATAATAATAATG	13997466	7	6580	154 bp	11	55°C	1, 2
	ETV1_RP_Biotin	ATTTCCAAAAACCTTCTCTACA	13997619		7226				
	ETV1_seq1	AAATAATAATGGGTTGG			7227				
GAS7	GAS7_FP	TTAGGGGATTAAGGTTATGT	10042244	17	6593	205 bp	14	55°C	1, 2
	GAS7_RP_Biotin	CCTTACCTCCAACAACACTAC	10042448		7228				
	GAS7_seq1	GGTAAGGTTAGGGGT			7229				
PLS3	PLS3_FP	GGAGAGTATTAGGTTAAGTTTA	114701916	X	6633	206 bp	15	55°C	1
	PLS3_RP_Biotin	ACCACTTAATACAATAAAA	114702121		7230				
	PLS3_seq1	GTAAAGTTTAGTAGGAA			7231				
SLIT2	SLIT2_FP	TTGGGGGTGTTTTTATA	19865245	4	6653	202 bp	12	55°C	1
	SLIT2_RP_Biotin	CTAAAAACCAATACTAECTTC	19865446		7234				
	SLIT2_Seq1	GGTGTTTTTATAGG			7235				
TUSC3	TUSC3_FP	AAAGGAGGTAGAATGGATTTT	15442442	8	6661	201 bp	11	55°C	1, 2
	TUSC3_RP_Biotin	TTCAAATCAAACCTACTAACT	15442642		7236				
	TUSC3_seq1	GTGTTGTTAGGTAGTTTG			7237				
PLAGL1	PLAGL1a_NeGe_neu_FP	TGAGTTAATGGGAATAAAGTGA	144426581	6	6772	206 bp	15	60°C	1
	PLAGLa_NeGe_neu_RP_Biotin	CCCAACCACTATACACC	144426786		7269				
	PLAGLa_NeGe_neu_seq	TAATGGGAATAAAGTGA			7270				
IGF2	IGF2.NeGe.FP	AGGTTTAAAGTTTGTTTAGA	2117680	11	6703	200 bp	25	55°C	1
	IGF2_NeGe.RP_Biotin	ACTAAAAAACCCCTAACT	2117879		7241				
	IGF2_NeGe_seq1	TTTTAAGTTTGTTTAGAT			7242				
	IGF2_NeGe_seq2	ATTTGGTTGAGGTTTTAA			7310				
DNMT3B	DNMT3B.FP	GGGTTAAGTGTTTAAAGTAAATTT	30814017	20	6711	203 bp	12	55°C	1
	DNMT3B_RP_Biotin	CAACCTCCAACAACACTAA	30814219		7238				
	DNMT3B_seq1	GTGGTTAAGTAAATTTAG			7239				
DNMT1	DNMT1.FP	ATAGGTAGGGAGTTGGGTG	10166258	19	6713	203 bp	17	60°C	1
	DNMT1_RP_Biotin	ATTTCTAACCAAAAAAATACTAC	10166460		7275				
	DNMT1_seq1	GGTGGTAGTTGTTGATAG			7276				
MSH2	MSH2_b_FP	GAATAGGTTTAGGATGAGTAGTA	47602174	2	6723	203 bp	18	60°C	1
	MSH2b_RP_Biotin	AAACCATCTATTCTTCAAC	47602376		7243				
	MSH2b_seq1	AATAGGTTTAGGATGAGTAG			7244				
EYA4	EYA4_FP_Biotin	TTTTTTGGGGTAAGTGAAAGGAG	133603660	6	6250	129 bp	3	58°C	2

Material und Methoden

Gen-Name	Primer-Name	Primer-Sequenz (5'...3')	Start (HG18)	Chr.	Primer-Nr.	Amplikon-länge	Anzahl CpGs	Temp.	verwendet für
			Ende (HG18)						
	EYA4_RP	CCACTATCCATCCCCACCTACTTCTAT	133603788		6251				
	EYA4_seq	CCCCCAAATTACCTAA			6252				
TWIST1	TWIST1_FP_Biotin	GGGTAGAGTTTTAGAATTTAGAGTAGTTTAGGAAG	19124098	7	6259	193 bp	3	55°C	2
	TWIST1_RP	CCCCCAACCCCAACAAT	19124290		6260				
	TWIST1_seq	ATTACCATTACTACTATCACAACCAC			6261				
DAPK1a	DAPK1_a_FP	GAGTAGAGAGGTTGTTTAGGAGTGTGAGGAGGATAGT	89302589	9	6262	122 bp	4	55°C	2
	DAPK1_a_RP	CAAACCCCAACCCCAACCCCTA	89302710		6263				
	DAPK1_a_seq	CAAAAAACAAAATCC			6264				
GRB10	GRB10_2011_FP_Biotin	TGGTTATATAATATTGTTTTATGGTT	50817376	7	7685	247 bp	15	55°C	2
	GRB10_2011_RP	CTCTCAAATACTCAAATAAACT	50817622		7686				
	GRB10_2011_seq1	AATACTCAAATAAACTCC			7687				

Chr: Chromosom; FP: Vorwärts-Primer; RP: Rückwärtsprimer, seq: Sequenzierungsprimer.

Die Primersequenzen für die Tyr641 Mutationsanalyse in Abschnitt 3.2.2 sind in Pellissery et al. 2010 [219] aufgeführt.

2.2 Methoden

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit angewandten Methoden aufgeführt und erläutert. Andere Methoden sind in den jeweiligen veröffentlichten Publikationen angegeben. In der Übersicht in Abbildung 10 sind die von mir in dieser Arbeit verwendeten Methoden zusammengefasst.

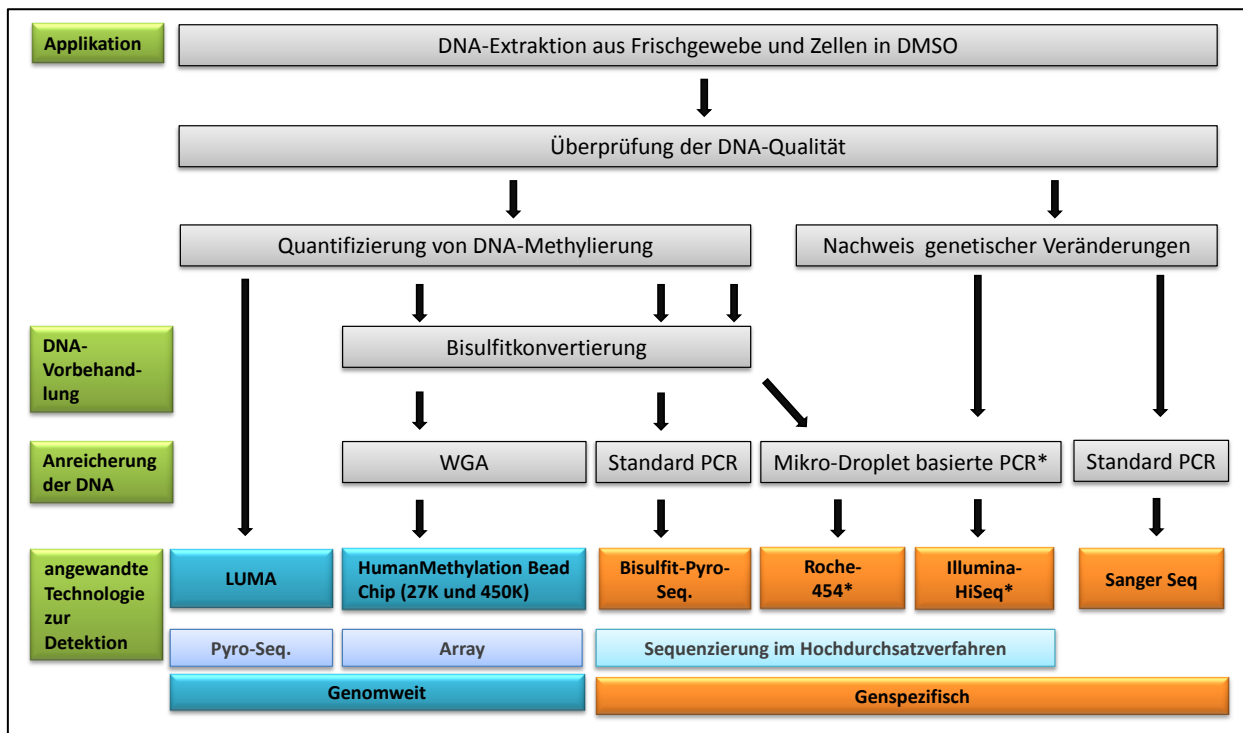


Abbildung 10: Flussdiagramm der in dieser Arbeit angewandten Methoden.

WGA: whole genome amplification (Gesamt-Genom-Amplifikation); LUMA: Luminometrischer Methylierungsassay; Seq: Sequenzierung; * die Durchführung erfolgte bei externen Anbietern.

Im Folgenden werden zunächst die unterschiedlichen Verfahren zur DNA-Isolierung und Qualitätsbestimmung beschrieben. Anschließend werden die Methoden zur Quantifizierung der DNA-Methylierung erläutert und insbesondere die Etablierung und Durchführung von Bisulfit-Pyrosequenzierungsanalysen beschrieben. Im Weiteren erfolgt eine Beschreibung der Methoden zum Nachweis genetischer Veränderungen unter Verwendung von Next-Generation-Sequencing-Methoden.

2.2.1 DNA-Extraktion

Zur Erstellung eines Gesamtkollektivs unter den 2.1.1 aufgeführten Selektionskriterien musste das Material zunächst auf Vorhandensein einer Translokation t(14;18) und Klonalität überprüft werden. Dafür habe ich von dem Gesamtkollektiv aus Frischmaterialien und DMSO-Präparaten die DNA isoliert. Für die DNA-Extraktion habe ich dafür mittels Kryotom-Technik das infiltrierte Material wie Lymphknoten, Tonsille oder Milz aus den unfixierten bei -80°C gelagerten Geweben geschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Die DNA-Extraktion erfolgte mittels QIAmp DNA Mini and Blood Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und entsprach mit einigen Modifikationen dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll (siehe Abschnitt 2.2.1.1). Für die DNA-Extraktion aus peripherem Blut und lymphominfiltrierten Lymphknoten aus bei -80 °C gelagerten DMSO-Stocks habe ich das PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra Systems, Qiagen, Hilden, Deutschland) (siehe Abschnitt 2.2.1.2) verwendet.

2.2.1.1 Protokoll der DNA-Extraktion aus Frischgewebe

Bei -80°C gelagerte Frischmaterialien habe ich mittels Kryotom-Technik geschnitten und mittels QIAmp DNA Mini Kit nach folgendem Protokoll isoliert. Um eine zügige Probenverarbeitung zu gewährleisten, wurden maximal 12 Proben parallel bearbeitet. Die verwendeten Lösungen: ATL-Puffer, AL-Puffer, AW1, AW2 und AE-Puffer waren Bestandteile des Kits.

- In Abhängigkeit der Präparatgröße wurden ca. 15-20 Schnitte mit einer Schnittdicke von 20 µm in einem 2 ml Eppendorfgefäß gesammelt und für die anschließende DNA-Extraktion bei -20°C zwischengelagert.
- Um ein Auftauen der Schnitte zu verhindern, wurden die Eppendorfgefäße aus der -20°C Truhe für die DNA Isolierung zunächst auf einem gekühlten Ständer aufbewahrt.
- Es erfolgte eine Zugabe von 360 µl ATL-Puffer und direkt anschließendes Vortexen des Eppendorfgefäßes für 10 s.
- Nach Zugabe von 40 µl Proteinase K (Bestandteil des Kits) und erneutes Vortexen wurde die Probe über Nacht in einem Thermoblock bei 56°C inkubiert.

- Vollständig lysiertes Material wurde am nächsten Tag über ein säulenbasiertes Verfahren aufgereinigt.
- Zur DNA-Aufreinigung wurden zunächst 400 µl AL-Puffer zu der Probe hinzugefügt und direkt im Anschluss für 10 s gevortext. Die Proben wurden aufeinander folgend bearbeitet um ein Ausfällen zu verhindern.
- Zur Inaktivierung der Proteinase K wurden alle Proben zusammen bei 70°C für 10 min inkubiert. Im Anschluß daran erfolgte die Aufreinigung.
- Nach Zugabe von 400 µl abs. Ethanol und 10 s Vortexen wurde der Inhalt des Eppendorfgefäßes vollständig auf je ein „MiniSpin Colum“ überführt und bei 10 000 rpm für 1 min zentrifugiert.
- Der Durchfluss wurde verworfen, je 500 µl Waschpuffer (AW1) hinzugefügt und die Säule bei 10 000 rpm für 1 min zentrifugiert.
- Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule in ein neues Sammelgefäß überführt. Nach Zugabe von je 500 µl Waschpuffer (AW2) wurde wie zuvor zentrifugiert.
- Nach diesem Waschgang wurde die Säule zum Trocknen in ein neues Sammelgefäß überführt und für 3 min bei 13 000 rpm zentrifugiert.
- Die DNA wurde dann in AE-Puffer eluiert. Dafür wurden je 200 µl AE-Puffer auf die Säule pipettiert und nach 5 minütiger Inkubation für 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, so dass die DNA am Ende in 400 µl AE-Puffer vorlag.

2.2.1.2 Protokoll der DNA-Extraktion aus Zellen in DMSO

In DMSO bei -80°C gelagerten Proben wurden nach folgendem Protokoll mit dem PUREGENE DNA Isolation Kit (Gentra Systems) isoliert.

- Die Zellen in DMSO wurden in ein 15 ml Sarstedt-Röhrchen überführt und ca. 3-5 min bei 1 500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 1 ml „Cell-Lysis-Puffer“ (Bestandteil des Kits) resuspendiert.
- Anschließend wurde die Zellsuspension bei ca. 37°C im Hybridisierungsofen inkubiert. Die Inkubation erfolgte zunächst über Nacht. Wenn das Pellet am nächsten Tag noch nicht vollständig lysiert war, wurde erneut je 2 ml Cell-Lysis-Puffer hinzugegeben und nochmals über Nacht bei 37°C inkubiert.
- Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde je 1 ml Protein-Präzipitations-Lösung (Bestandteil des Kits) zum Lysat hinzugegeben und etwa 1 min gevortext. Nach einer mind. 1 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zentrifugation für 30 min bei 4 500 U/min.

- Im Anschluss wurde der Überstand in ein neues 5 ml Röhrchen überführt und die gleiche Menge Isopropanol hinzugegeben.
- Durch leichtes vorsichtiges Schwenken des Röhrchens fiel die DNA als weißer Faden aus. Dieser wurde in ein neues Eppendorf Gefäß überführt. War kein weißer DNA-Faden sichtbar, wurde die Lösung für ca. 1 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und wie für die anderen Proben weiterverarbeitet.
- Die DNA wurde mit je 500 µl 70 % igem Ethanol einmal gewaschen und im Anschluss in der Speedvac für min. 10-20 min getrocknet und in, einer je nach Pelletgröße abhängigen Menge, Wasser (40-100 µl) aufgenommen.
- Um das Pellet zu lösen, wurde entweder über Nacht bei Raumtemperatur oder für 1 h bei etwa 65°C im Thermoblock inkubiert.

2.2.2 Qualitätskontrolle der isolierten DNA-Proben

Die Bestimmung der Konzentration und Qualität der isolierten DNA habe ich sowohl mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometers (Abschnitt 2.2.2.1) als auch mittels Agarosegelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2.2) durchgeführt. Materialien mit einer schlechten DNA-Qualität wurden daraufhin entweder über eine Ethanol-fällung (Abschnitt 2.2.2.4) aufgereinigt bzw. gegebenenfalls nachgeschnitten und erneut extrahiert.

2.2.2.1 DNA-Quantifizierung mittels NanoDrop-Spektrophotometer

Die Qualität und die Konzentration der DNA habe ich mittels NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer und der implementierten NanoDrop Software Version V.3.2.1 bestimmt. Es wurde nach der Anweisung des Herstellers verfahren und 2 µl der zu untersuchenden DNA-Lösung auf die Messapparatur pipettiert. Die ermittelten Werte wurden von der Software unmittelbar ausgegeben. Dabei wurde die optische Dichte der Probe gegen ddH₂O als Referenz bestimmt und davon ausgegangen, dass die optische Dichte (OD) doppelsträngiger DNA bei einer Konzentration von 50 µg/ml gleich 1 OD entspricht [220]. Darüber hinaus ermittelt die Software das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm sowie bei 260 nm und 230 nm. Diese Werte sind ein Maß für die Reinheit der DNA. Die Ratio 260/280 sollte idealerweise zwischen 1,8 und 2,0 liegen und die Ratio 260/230 zwischen 2,0 und 2,2. Kontaminationen durch z.B. Proteine oder Phenole verschieben dieses Verhältnis zu niedrigeren Werten und sind ein Hinweis auf eine schlechtere DNA-Qualität bzw. Reinheit.

2.2.2.2 Überprüfung der DNA-Qualität mittels Agarosegelelektrophorese

Eine grobe Abschätzung der DNA-Qualität erfolgte mittels Gelelektrophorese, einer Methode zur Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe in einem elektrischen Feld. Dabei macht man sich die Ladungseigenschaften der DNA zu Nutze, die durch ein Puffersystem mit basischem pH wie TBE aufrecht gehalten werden. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatrückgrates der DNA erfolgt die Wanderung der Moleküle in Richtung der Anode. Die Laufgeschwindigkeit linearer DNA-Fragmente hängt dabei zusätzlich von der Agarosekonzentration, der Art des Laufpuffers und der Anwesenheit interkalierender Stoffe ab. In diesem Fall wurde für die native DNA ein 1 % iges Agarosegel mit 10 mg/ml Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid wandert entgegengesetzt der DNA in Richtung Kathode und interkaliert zwischen die Basen. Dadurch wird die Intensität der Fluoreszenz-Emission von Ethidiumbromid erhöht, so dass sie unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Zum Probenauftrag wurden 2,5 µl DNA mit 3,5 µl Gel-Ladepuffer versetzt. Das Glycerin im Ladepuffer erhöht die Dichte der DNA-Lösung und verhindert das Herausdiffundieren aus den Gel-Taschen beim Auftragen der Proben. Der Farbstoff Bromphenolblau dient als Anhaltspunkt für die Wanderung der DNA im Gel. Als Marker wurde der Hyperladder-Längenstandard (Bioline, Luckenwalde, Deutschland) verwendet, anhand dessen eine Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente erfolgte. Die Auftrennung der DNA wurde bei 10 V pro 1 cm Gellänge für 40 min durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Hilfe des BioDoc Analyzers und der BioDoc Analyse Software Version 2.1 dokumentiert. Anhand des Bildes war eine evt. Fragmentierung der DNA und zudem eine grobe Abschätzung über die Menge der vorhanden DNA erkennbar.

2.2.2.3 Qualitätsbestimmung der isolierten DNA-Proben

Nach der Überprüfung der DNA-Qualität mittels Agarose-Gelelektrophorese und anhand der Werte aus der DNA-Quantifizierung mittels Nano-Drop-Spektrophotometer erfolgte eine Beurteilung über die DNA-Qualität (siehe Tabelle 12).

Ein verschobenes Absorptionsspektrum und eine Ratio 260/230 kleiner 1,5 waren ein Hinweis auf eine Verunreinigung z.B. mit Proteinen oder mit Phenolen. Verunreinigte Proben, von denen nicht ausreichend Material für eine Aufreinigung mit Ethanol oder Neuextraktion vorhanden waren, wurden unter dem Gesichtspunkt ohne weitere Bearbeitung für die Analysen verwendet, dass die Qualität der DNA eingeschränkt sein könnte. Verunreinigte Proben, die eine hochmolekulare Bande über 10 000 bp in der Gelelektrophorese aufzeigten wurden zur Aufreinigung mit Ethanol gefällt (siehe Abschnitt 2.2.2.4). Anschließend erfolgte eine erneute Qualitätsbestimmung mittels Nano-Drop-Spektrophotometer und Agarose-Gelelektrophorese. Proben, die dann ein Absorptionsspektrum-Maximum bei 260 nm, eine

Material und Methoden

Ratio 260/280 zwischen 1,8 und 2,0, eine Ratio 260/230 größer 1,5 und zudem eine hochmolekulare Bande über 10 000 bp in der Gelelektrophorese zeigten, wurde als „in Ordnung“ beurteilt und wurden für die Analysen verwendet. Proben, die diesen Kriterien nicht entsprachen wurden nachgeschnitten, erneut extrahiert und beurteilt. Verunreinigte Proben, die eine schwache Bande oder einen Bandenschmier in der Gelelektrophorese zeigten, deuteten auf geringe DNA-Menge bzw. Degradierung hin und wurden deshalb nachgeschnitten, erneut extrahiert und beurteilt. War ein Nachschneiden nicht möglich, wurden die Proben von allen Analysen ausgeschlossen. Insgesamt wurden für das Probenkollektiv 94 Materialien zusammengestellt (Abschnitt 2.1.2).

Tabelle 12: Qualitätsbestimmung der Proben anhand der Werte aus der DNA-Quantifizierung mittels Nano-Drop-Spektrophotometer und Überprüfung der DNA-Qualität mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nano-Drop-Werte	Gelbild	Beurteilung	Anzahl der Proben	Beurteilung nach erneuter Aufarbeitung	Beurteilung nach erneuter Aufarbeitung
Spektrum-Maximum bei 260 nm Ratio 260/280= 1,8-2,0 Ratio 260/230 größer 1,5	hochmolekulare Bande bei ~ 10 000 bp	in Ordnung	n= 62		
Spektrum-Maximum bei 260 nm Ratio 260/280= 1,8-2,0 Ratio 260/230 1,3-1,5	schwache hochmolekulare Bande bei ~ 10 000 bp	Probe ist verunreinigt=> zu wenig Material für Nachextraktion=> Probe verwenden	n= 6		
Spektrum-Maximum nicht bei 260 nm Ratio 260/280= 1,8-2,0 Ratio 260/230 kleiner 1,5	hochmolekulare Bande bei ~ 10 000 bp	Probe ist verunreinigt => Ethanol-fällung zur Aufreinigung durchführen	n= 16	in Ordnung: n= 13 nachschnitten: n= 3	in Ordnung: n= 3
Spektrum-Maximum nicht bei 260 nm Ratio 260/280= 1,8-2,0 Ratio 260/230 kleiner 1,5	schwache hochmolekulare Bande oder Bandenschmier bei ~ 10 000 bp	Probe ist verunreinigt bzw. degradiert=> zu wenig Material für Ethanol-fällung => Probe nachschneiden	n= 10	in Ordnung: n= 10	
Spektrum-Maximum nicht bei 260 nm Ratio 260/280= 1,8-2,0 Ratio 260/230 kleiner 1,5	Bandenschmier (aber schwach) bei ~ 10 000 bp	Probe ist verunreinigt => zu wenig Material für Ethanol-fällung und Nachextraktion=> Probe ausschließen	n= 3		

2.2.2.4 Aufreinigung von DNA mittels Ethanol-fällung

Die DNA-Proben, die in der NanoDrop-Bestimmung in der Ratio 260/230 einen Wert <1,5, aber eine hochmolekulare Bande in der Agarosegelelektrophorese aufzeigten, habe ich über das Ethanol-Präzipitationsverfahren aufgereinigt. Dieses Verfahren erfolgt über die Zugabe von Alkohol und stellt eine grundsätzliche Methode zur Präzipitation von Nukleinsäuren dar [221]. Das Prinzip der

Ethanol-fällung beruht darauf, dass durch die Zugabe von Kationen die negative Ladung der Phosphatgruppen abgeschirmt wird, so dass die DNA in stabilere Konformationen übergeht. Absoluter Ethanol entzieht der DNA die Hydrathüllen, so dass die DNA ausfällt.

Zunächst wurden 1/10 Volumen einer 3 M Natrium-Acetat Lösung, pH 4,8 und 3 Volumen abs. Ethanol zu der DNA-Lösung pipettiert und gut durchmischt. Anschließend erfolgte eine Fällung für 30 min bei -80°C und eine Zentrifugation für 30 min bei 4°C. Der Überstand wurde verworfen und dieselbe Menge 70 %iger Ethanol hinzugefügt. Dieses wurde für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand im Anschluss verworfen. In der Speedvac wurde das Pellet für mind. 30 min bei 30°C, 10 mbar und 1 200 rpm getrocknet, bevor es je nach Pelletgröße in einer geeigneten Volumen Wasser (40-100 µl) wieder aufgenommen wurde. Um das Pellet zu lösen erfolgte eine Inkubation auf dem Schüttler für mind. 30 min. Die Lösung wurde über Nacht ruhen gelassen und am nächsten Tag mit dem NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer und der Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Proben, die dann ein Absorptionsspektrum-Maximum bei 260 nm, eine Ratio 260/280 zwischen 1,8 und 2,0, eine Ratio 260/230 größer 1,5 und zudem eine hochmolekulare Bande über 10 000 bp in der Gelelektrophorese zeigten wurde als „in Ordnung“ beurteilt und für die Analysen verwendet. Proben, die diesen Kriterien nicht entsprachen wurden nachgeschnitten, erneut extrahiert und beurteilt.

2.2.3 Nachweis einer t(14;18) und Überprüfung der Klonalität

Der Nachweis einer t(14;18) an den von mir mittels Kryotom-Technik geschnittenen Präparaten sowie die Überprüfung der Klonalität an extrahierten DNA erfolgten im Rahmen des HämatoSys-Forschungsverbundes im Institut für Humangenetik und der II. Medizinischen Klinik (Hämatologie/Onkologie) am Campus Kiel des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein. Die Bruchpunkte im *BCL2*-Gen wurden mittels Fluoreszenz-insitu-Hybridisierung (FISH) nachgewiesen. Dazu wurde die break-apart Sonde für den *BCL2* Genlokus (Vysis LSI *BCL2* Dual Color Break Apart Rearrangement Probe, Abbott Molecular, Wiesbaden, Germany) verwendet. Die Klonalitätsanalyse erfolgte mittels IGH FR1-3 Konsensus PCR. Dazu wurde das BIOMED-2 IGH Tube A protocol verwendet, welches 6 Konsensus Vorwärts-Primer enthält, die an die Framework Region 1 (VH-FR1) in Kombination mit einem Konsensus-Rückwärtsprimer für alle JH-Segmente binden.

2.2.4 Analysen zur Quantifizierung von DNA-Methylierung

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich die DNA-Methylierung mittels vier verschiedener Methoden quantitativ bestimmt. Dabei diente der luminometrische Methylierungsassay (LUMA, Abschnitt 2.2.4.3) der globalen Abschätzung genomischer DNA-Methylierung in einer Probe. Mit Hilfe der Bisulfit-

Pyrosequenzierung (Abschnitt 2.2.4.6) wurde die DNA-Methylierung an ausgewählten CpG-Dinukleotiden von ausgewählten Genabschnitten ermittelt. Mittels arraybasierter Techniken wurde die DNA-Methylierung an einer Vielzahl von Genloci, die verschiedene Bereiche des gesamten Genoms abdecken, untersucht. Diese Arrays (HumanMethylation27K InfiniumBeadChip und der HumanMethylation450K InfiniumBeadChip) von Illumina (Abschnitt 2.2.4.3) erfassen pro analysierte Probe über 27 000 bzw. über 450 000 CpG-Dinukleotide von mehr als 14 000 Genen. Darüber hinaus erfolgte eine Quantifizierung der DNA-Methylierung für ausgewählte Genloci, indem die Bisulfit-konvertierte DNA über ein PCR-Verfahren im Mikro-Droplet-Ansatz (Abschnitt 2.2.5.2) angereichert wurde und anschließend mittels 454 Hochdurchsatz-Verfahren von der Firma Roche (Abschnitt 2.2.5.4.1) sequenziert wurde.

2.2.4.1 Genomweite Abschätzung der Gesamt-DNA-Methylierung mittels Luminometrischer Methylierungsanalyse

Veränderungen der DNA-Methylierung z.B. die genomweite Hypomethylierung, Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen, spielen eine wesentliche Rolle bei fast jeder Tumorentwicklung. Eine genomweite Abschätzung der DNA-Methylierung kann dabei hilfreiche Informationen über den Erkrankungsprozess liefern. Der luminometrische Methylierungsassay (LUMA) ist eine von Karimi et al. [222] entwickelte Methode und dient der Detektion der genomweiten Gesamtmethylierung an CpG-Positionen. Sie beruht auf einem Restriktionsverdau der zu untersuchenden DNA mit methylierungssensitiven und -unsensitiven Enzymen. In einer anschließenden Sequenzierungsreaktion mittels der Pyrosequenzierungs-Plattform werden die beim Verdau entstandenen Enden durch eine Polymerase aufgefüllt. Eingesetzt werden zwei isochizomere Endonukleasen, wobei das eine Enzym ausschließlich unmethylierte DNA schneidet, während das andere Enzym sowohl unmethylierte als auch methylierte DNA verdaut. *Hpa* II und *Msp* I sind die gebräuchlichsten Enzyme für diese Analysen. Beide Enzyme erkennen die Zielsequenz CCGG. Während *Hpa* II durch CpG-Methylierung blockiert ist und nicht nach einem methylierten Cytosin schneidet, wenn darauf das Guanin folgt (in der Sequenz CC^mGG), kann *Msp* I die Sequenz unabhängig vom Methylierungsstatus des Cytosins im CpG verdauen.

Hpa II und *Msp* I werden in zwei unabhängigen Ansätzen jeweils zusammen mit der gleichen Menge genomischer DNA und dem Enzym *Mun* I inkubiert (siehe Abbildung 11). Der Verdau mit *Mun* I dient bei der späteren Auswertung der Normalisierung der Messung. Der Verdau erfolgt bei 37°C für maximal 16 Stunden im Thermocycler. Währenddessen erzeugen *Hpa* II und *Msp* I jeweils 5'-CG-Überhänge an der Schnittstelle, *Mun* I generiert 5'-AATT-Überhänge. Die entstandenen Enden werden anschließend in einer Pyro-Sequenzierungsreaktion von einer Polymerase aufgefüllt. Der Pyrosequenzierungs-Reaktion wird die Dispensations-Reihenfolge „ACTCGA“ vorgegeben. Dabei werden die Nukleotide „C“ und „G“

Material und Methoden

gemeinsam an der „C“-Position injiziert während für die Position „G“ ausschließlich Wasser zugefügt wird. Als erstes wird das Nukleotid „A“ injiziert und damit die *Mun* I Schnittstelle bedient. Als nächstes erfolgt die gemeinsame Zugabe der Nukleotide „C“ und „G“ für die *Hpa* II bzw. *Msp* I-Schnittstelle. Aus der Berechnung des Verhältnisses der Lichtintensitäten dieser ersten beiden Injektionen (A und C/G) erfolgt die Normalisierung der Messung für die eingesetzte DNA-Menge für jeden Ansatz. Anschließend wird durch die Injektion von „T“ die *Mun* I-Schnittstelle weiter aufgefüllt. Die gemessenen Lichtintensitäten der injizierten Nukleotide „A“ und „T“ sollten annähernd gleich sein. Die dann folgenden Nukleotide „C“ und „G“ dienen einer internen Kontrolle für die Vollendung der zweiten Injektion. Anschließend wird Wasser als Negativkontrolle injiziert und abschließend wird erneut das Nukleotid „A“ als interne Kontrolle für die Vollendung der ersten Injektion eingespritzt. Die gemessene Lichtintensität dieser letzten Injektion sollte geringer sein, als der Wert der ersten Injektion [222]. Der Ablauf der Sequenzierungsreaktion mittels der Pyrosequenzierungs-Plattform und die Detektion wird in Abschnitt 2.2.4.6 im Zusammenhang der Bisulfit-Pyrosequenzierung ausführlich beschrieben.

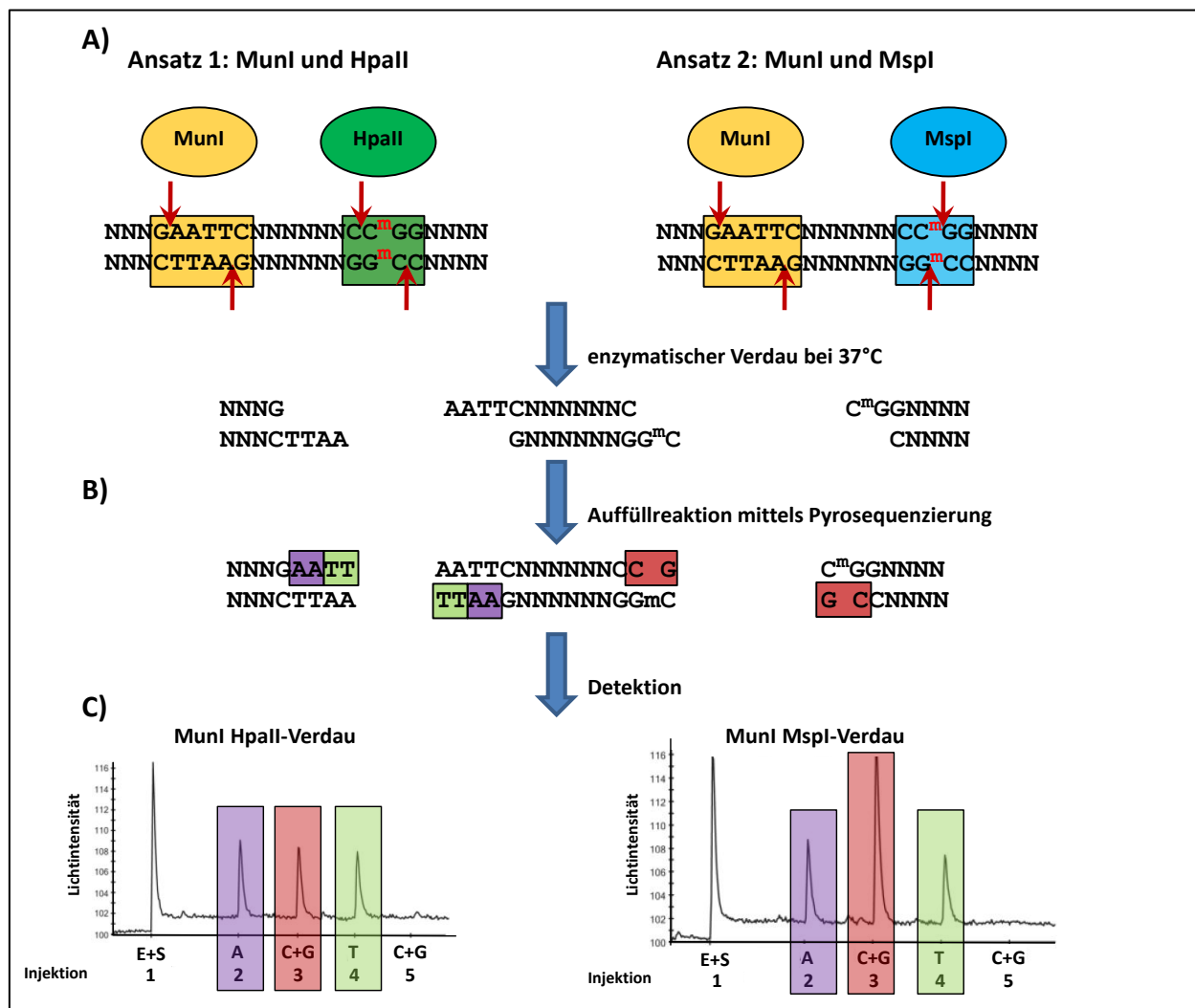


Abbildung 11: Luminometrischer Methylierungsassay (LUMA) zur Abschätzung der genomweiten DNA-Methylierung. In einem parallelen Ansatz werden das methylierungssensitive Enzym *Hpa* II (A), Ansatz 1) und das methylierungsunsensitive Enzym *Msp* I (A), Ansatz 2) jeweils zusammen mit *Mun* I und genomischer DNA bei 37°C über Nacht inkubiert. (B) Die für jede

Material und Methoden

Restriktionsschnittstelle erzeugten Enden werden in einer anschließenden Sequenzierungsreaktion mit Hilfe der Pyrosequenzierungs-Plattform von einer Polymerase mit Nucleotiden aufgefüllt. (C) Anhand der Anzahl eingebauter Nucleotide, welche proportional zum detektierten Lichtpeak sind, kann der Methylierungswert aus dem Verhältnis vom *Hpa* II zu *Msp* I Verdau ($M [\%] = (1 - (Hpa\ II / Mun\ I)) / (Msp\ I / Mun\ I) * 100\ %$) berechnet werden (modifiziert nach Karimi et al., 2006 [222]).

Protokoll für LUMA

Die Durchführung erfolgt nach einem abgewandelten Protokoll von Karimi et al. [222]. Es wird ein Doppelverdau mit *Hpa* II und *Mun* I (Ansatz 1) bzw. *Msp* I und *Mun* I (Ansatz 2) angesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgt bei 37°C über Nacht für max. 16 Stunden im Thermocycler. Eine Inaktivierung der Enzyme ist nicht erforderlich. Für die direkt anschließende Pyrosequenzierung wird der Reaktionsansatz in eine geeignete 96-Wellplatte überführt und 20 µl Annealing-Puffer hinzugegeben.

	Ansatz 1	Ansatz 2
DNA (1 µg)	x µl	x µl
Tango-Puffer (10 x)	2 µl	2 µl
<i>Hpa</i> II (10 U/µl)	1 µl	/
<i>Msp</i> I (10 U/µl)	/	1 µl
<i>Mun</i> I (10 U/µl)	1 µl	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl auffüllen	ad 20 µl auffüllen

Im Gegensatz zur herkömmlichen Pyrosequenzierung wird die Kartusche für die LUMA-Analyse nach einem abgewandelten Protokoll befüllt:

Befüllen der Kartusche für die LUMA-Analyse

Position E (Enzym): 620 µl gelöste Enzymlösung

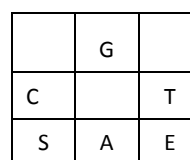
Position S (Substrat): 620 µl gelöste Substratlösung

Position A: 200 µl A-Nucleotid + 200 µl H₂O

Position T: 200 µl T-Nucleotid + 200 µl H₂O

Position C: 200 µl C-Nucleotid + 200 µl G-Nucleotid

Position G: 400 µl H₂O



↑
Etikett mit
Beschriftung

Material und Methoden

Der Pyrosequenzierungs-Reaktion wird die Dispensations-Reihenfolge „(E+S)ACTCGA“ vorgegeben (Tabelle 13).

Tabelle 13: Dispensations-Reihenfolge bei LUMA

Injektions-schritt	Dispensation	injiziertes Nukleotid	Erklärung
1.	(E+S)	(E+S)	Enzym und Substrat werden injiziert
2.	A	A	repräsentiert die <i>Mun</i> I Schnittstelle, dient der Normalisierung der Messung für die eingesetzte DNA-Menge
3.	C	C und G	repräsentiert entweder die <i>Hpa</i> II oder die <i>Msp</i> I Schnittstelle
4.	T	T	repräsentiert zusammen mit Injektion 1 die <i>Mun</i> I Schnittstelle
5.	C	C und G	erneute Injektion von C u. G, als interne Kontrolle für die Vollendung von Injektion 2
6.	G	Wasser	Wasserkontrolle
7.	A	A	A wird erneut injiziert, als interne Kontrolle für die Injektion 1

E: Enzym; S: Substrat; A: Adenin; C: Cytosin; T: Thymin; G: Guanin.

Nach Ablauf der Sequenzierungsreaktion werden die Intensitätsdaten jeder Messung zur Berechnung der DNA-Methylierung genutzt.

- jeweils für Ansatz A und Ansatz B das Verhältnis von Injektion 3 zu Injektion 2 (C/A) ermitteln. Dieses repräsentiert den *Hpa* II/*Mun* I Verdau für Ansatz 2 bzw. *Msp* I/*Mun* I Verdau für Ansatz 3 und dient der Normalisierung der Messung für die eingesetzte DNA-Menge.
- Verhältnis von *Hpa* II zu *Msp* I berechnen nach: $(Hpa\ II/Mun\ I)/(Msp\ I/Mun\ I)$; die Werte von 0 bis 1 repräsentieren den DNA-Methylierungszustand von methyliert (~0) bis unmethyliert (~1).
- ein prozentualer DNA-Methylierungswert (M) ergibt sich dementsprechend aus:

$$M\ [\%] = (1 - (Hpa\ II/Mun\ I)/(Msp\ I/Mun\ I)) * 100\ \%$$

2.2.4.2 Natrium-Bisulfitbehandlung von genomischer DNA

Zum Nachweis der DNA-Methylierung mittels HumanMethylation BeadChip (27K und 450K), Bisulfit-Pyrosequenzierung und Mikro-Droplet-basiertem Anreicherungsverfahren (siehe Abbildung 10) habe ich die DNA mit Natrium-Bisulfit vorbehandelt. Durch diese Anwendung wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, wohingegen methyliertes Cytosin unverändert bleibt [223].

Unter alkalischen Bedingungen wird der DNA-Doppelstrang zunächst denaturiert. Im ersten Schritt der Behandlung erfolgt eine oxidative Desaminierung an der Position 5, wobei eine Sulfongruppe an die C4-Position angelagert wird. Durch die anschließende hydrolytische Desaminierung wird das Cytosinsulfat in Uracilsulfat umgewandelt. Im letzten Schritt erfolgt unter alkalischen Bedingungen die Desulfonierung zu Uracil. In einer anschließenden PCR (Abschnitt 2.2.5) wird Uracil von der Polymerase durch Thymin ersetzt.

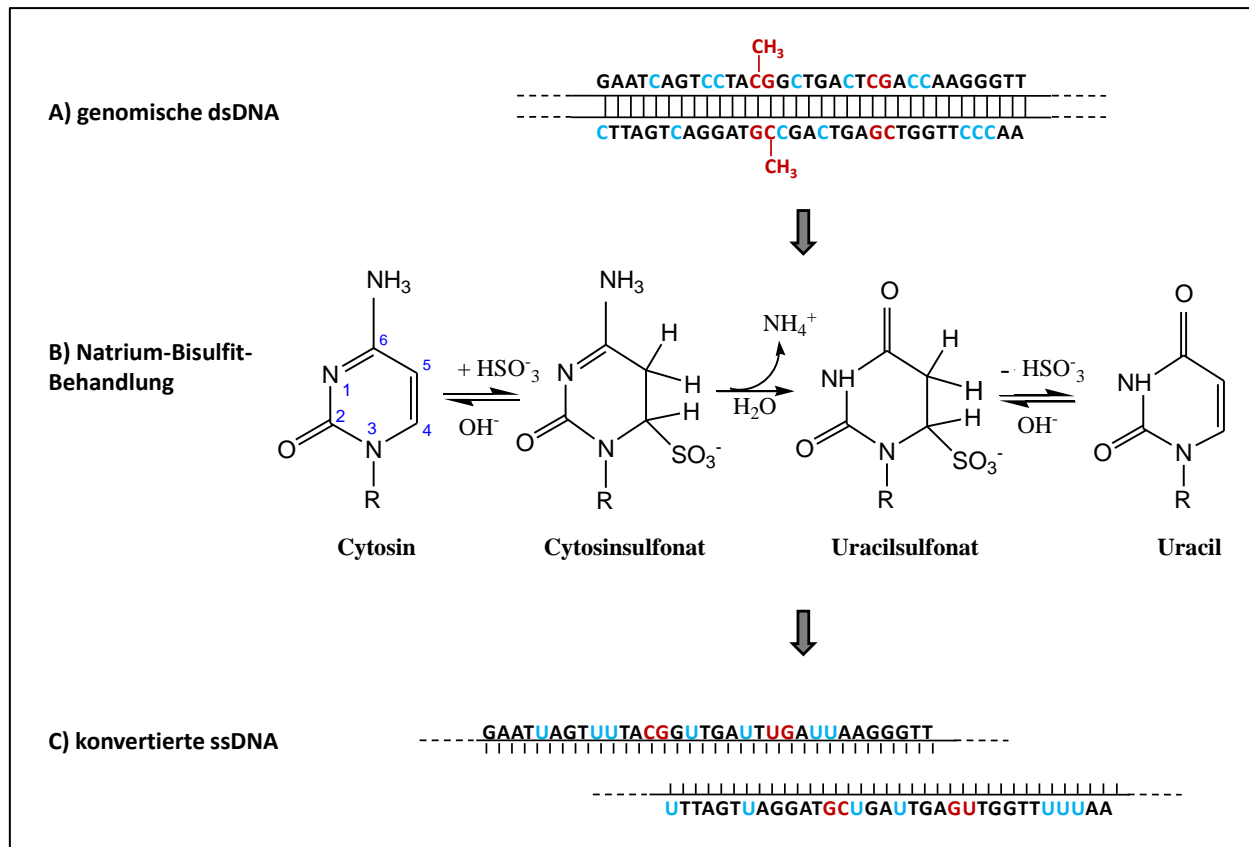


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Deaminierung von unmethyliertem Cytosin zu Uracil durch eine chemische Behandlung mit Natrium-Bisulfit. Durch die Behandlung der genomischen DNA (A) mit Natrium-Bisulfit unter alkalischen Bedingungen (B) wird unmethyliertes Cytosin zu Uracil konvertiert, wohingegen methyliertes Cytosin als Cytosin erhalten bleibt (C) (modifiziert nach Carew et al., 1985 [223]).

ds= double strand (Doppelstrang); ss= single strand (Einzelstrang); CH₃= Methylgruppe.

Protokoll der Natrium-Bisulfitbehandlung

Für die Behandlung der DNA mit Natrium-Bisulfit wurde das EpiTect Bisulfite-Kit der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Dabei wurde nach dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll verfahren.

Für die Analysen wurden je Ansatz 1 µg DNA zur Konversion eingesetzt und nach Zugabe von 85 µl Bisulfit-Mix und 35 µl DNA-Schutz-Puffer im Thermocycler nach folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung	99°C	5 min
Inkubation	60°C	25 min.
Denaturierung	99°C	5 min
Inkubation	60°C	85 min
Denaturierung	99°C	5 min
Inkubation	60°C	175 min
Pause	20°C	∞

Material und Methoden

Die Aufreinigung der Bisulfit-konvertierten DNA erfolgte über das EpiTect-Vakuum-Kit im 96-Well-Format:

1. Die Bisulfit-konvertierten Proben wurde nach der Inkubation im Thermocycler kurz an zentrifugiert und zu je 560 µl vorgelegtem BL-Puffer (Bestandteil des Kits) in jedes Well auf die EpiTect-Säule der 96-Well-Platte geladen. Anschließend wurde durch kurzes Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt.
2. Durch Anlegen eines maximalen Vakuums von 20-25 mm Hg wurde die Flüssigkeit vollständig durch die Membran gesogen.
3. Es wurden 500 µl Waschpuffer (Bestandteil des Kits) auf die Säulen gegeben und wie in Schritt 2 beschrieben, verfahren.
4. Anschließend wurden 250 µl Desulfonierungspuffer (Bestandteil des Kits) auf die Säulen pipettiert und für 15 min abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Der Inhalt wurde wie unter Schritt 2 beschrieben von der Säule entfernt.
5. Die DNA wurde zweimal mit je 500 µl Waschpuffer (Bestandteil des Kits) gewaschen, wobei die Flüssigkeit wie unter Punkt 2 beschrieben durch die Membran gesogen wurde.
6. 250 µl abs. Ethanol wurden zu jedem Well pipettiert und wie unter Punkt 2 beschrieben entfernt. Anschließend wurde das Vakuum für weitere 10 min aufrecht gehalten, um die Membran zu trocknen.
7. Nach diesem Schritt wurde der Abfallbehälter durch die Eluierungsplatte ersetzt.
8. Zur Eluierung der DNA wurden je 70 µl H₂O und 10 µl Top Elute Fluid (Bestandteil des Kits) auf die Säulen gegeben und für ca. 1 min das Vakuum angeschaltet.
9. Der Durchfluss enthielt die aufgereinigte DNA, die im Anschluss in ein geeignetes Lagerungsgefäß überführt wurde.
10. Eluierte DNA kann direkt eingesetzt werden oder laut Hersteller bei -20°C bis zu 3 Jahre gelagert werden.

2.2.4.3 Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels HumanMethylation BeadChip von Illumina

Zur quantitativen Bestimmung von DNA-Methylierung an spezifischen CpG-Positionen des Genoms wurde im Rahmen dieser Arbeit der Infinium HumanMethylation27K BeadChip und der Infinium HumanMethylation450K BeadChip von Illumina verwendet (<https://www.illumina.com>). Die Bead-Array-Technologie ist eine DNA-Chip-Technologie aus der Halbleiterfertigung, mit deren Hilfe bekannte Gene auf einem fingernagelgroßem Plastik- oder Glasplättchen, dem sog. Microarray, analysiert werden können. Die einzelnen Felder des Microarrays sind mit einzelsträngigen Oligonukleotiden beschichtet,

Material und Methoden

die mit der zu untersuchenden DNA hybridisieren. Mit dem HumanMethylation27K BeadChip lassen sich 27 578 CpG-Positionen überwiegend innerhalb von Promotorregionen (1 kb upstream und 500 bp downstream von Transkriptions-Start-Positionen) von mehr als 14 000 Genen, z.B. bekannter Tumorgene und microRNAs, analysieren [224]. Der 450K Methylation Array ist eine Weiterentwicklung des Vorgänger-Modells und umfasst mehr als 480 000 CpG Dinukleotide. Dieser Methylierungsarray analysiert zusätzlich CpG-ärmere Regionen wie „CpG-Island Shores“ und „Shelves“, 3' und 5' untranslatierte Regionen (UTR), Genkörper-Regionen, DNase hypersensitive Regionen, miRNA Promotoren und andere ncRNAs sowie SNP-Positionen [225]. Jedes CpG Dinukleotid wird mit einer durchschnittlichen zufälligen Verteilung von 15-30 Oligonukleotiden pro Array pro CpG Position repräsentiert (http://www.illumina.com/applications/epigenetics/array-based_methylation). Das Prinzip der Technologie wird im Folgenden am Beispiel des HumanMethylation27K vorgestellt.

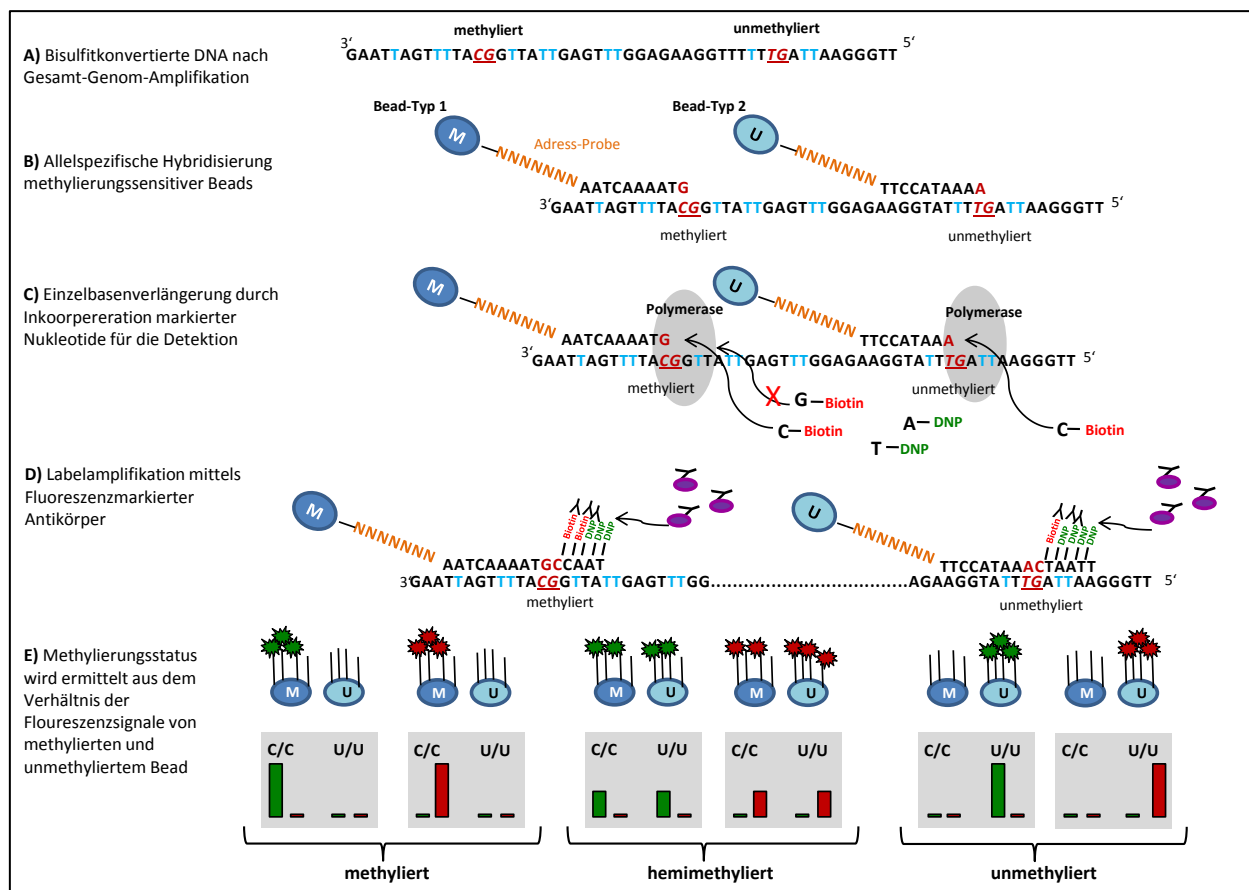


Abbildung 13: Illumina BeadArray27K-Technologie. **A)** Bisulfit-behandelte DNA wird über eine Gesamt-Genom-Amplifikationsreaktion angereichert. **B)** Allelspezifische Hybridisierung methylierungssensitiver Beads, Bead-Typ 1 bindet an zuvor methylierte Cytosine, Bead-Typ 2 an zuvor unmethylierte Cytosine, nun Thymin. **C)** Eine Einzelbasenverlängerung des komplementären Strangs erfolgt durch den Einbau Fluoreszenzmarkierter Nucleotide. **D)** Es folgt eine weitere Amplifikation mittels Fluoreszenzmarkierter Antikörper. **E)** Der Methylierungsstatus wird über das Verhältnis der detektierten Fluoreszenzsignale von methyliertem und unmethyliertem Bead bestimmt (modifiziert nach Bibikova et al., 2006; Ammerpohl et al., 2009; <https://www.illumina.com> [224, 226]).

Zunächst wird die Bisulfit-behandelte DNA amplifiziert, um die Ausgangsmenge um ein Vielfaches zu erhöhen. Dieses erfolgt in einer unter isothermalen Bedingungen ablaufenden Reaktion nach dem

Prinzip der Strangverdrängung (engl.= whole genome amplification, WGA). Zusätzlich wird bei dieser Reaktion an zuvor unmethylierten Cytosin-Positionen die Base Thymin eingebaut, während an zuvor methylierten Cytosin-Positionen die Base Cytosin erhalten bleibt (Abbildung 13 A). Die diesem Ansatz hinzugefügten methylierungssensitiven Beads (Bead-Typ 1 bindet an zuvor methylierte Cytosine, Bead-Typ 2 an zuvor unmethylierte Cytosine, nun Thymin) hybridisieren spezifisch an das jeweilige methylierte bzw. unmethylierte Allel (Abbildung 13 B). Im Anschluss daran erfolgt eine enzymatische Einzelbasenverlängerung, bei der die Polymerase markierte Nukleotide komplementär zur Ziel-Sequenz einbaut. Die Nukleotide Cytosin und Guanin sind mit Biotin, Adenin und Thymin sind mit Dinitrophenyl (DNP) markiert, an denen ein spezifischer Antikörper in einer daran anschließenden Reaktion binden kann (Abbildung 13 C). Mit Hilfe einer Kamera wird das Fluoreszenzsignal an jeder Position erfasst und der Methylierungsstatus über das Verhältnis der Intensitäten beider Fluoreszenzsignale vom methylierten und unmethylierten Allel ermittelt (Abbildung 13 D). Der Methylierungsstatus wird als β -Wert von der Bead-Studio Software berechnet und dargestellt. Dieser wird als das Verhältnis von methylierten Signal zur gesamten Signal-Intensität bestimmt (siehe auch Abbildung 14).

2.2.4.4 Unterschied zwischen dem HumanMethylation27K und dem HumanMethylation450K

Das Einsatzgebiet der Infinium Methylation Array Technik, sowohl Infinium 27K und 450K, ist die Bestimmung der DNA-Methylierung an spezifischen CpG-Positionen. Der Infinium 27K nutzt hierfür nur den Assay Typ-Infinium I wohingegen der Infinium 450K ein Hybrid aus Infinium I und Infinium II ist (siehe Abbildung 14). Der Infinium I verwendet zwei verschiedene „Probes“, die entsprechend das methylierte bzw. unmethylierte Allel detektieren. Diese sind an zwei verschiedene Bead-Typen gekoppelt. Die Signale für das methylierte und unmethylierte Allel werden in demselben Farbkanal ausgelesen. Im Gegensatz dazu bedient sich der Infinium II nur einem Bead-Typ, anhand dessen beide Allele detektiert werden. Die methylierten und unmethylierten Signale werden in dem grünen bzw. roten Kanal erzeugt. Sowohl für den Infinium I als auch für den Infinium II werden die β -Werte als ein Verhältnis des methylierten Signals zu der Summe der methylierten und unmethylierten Signale ermittelt.

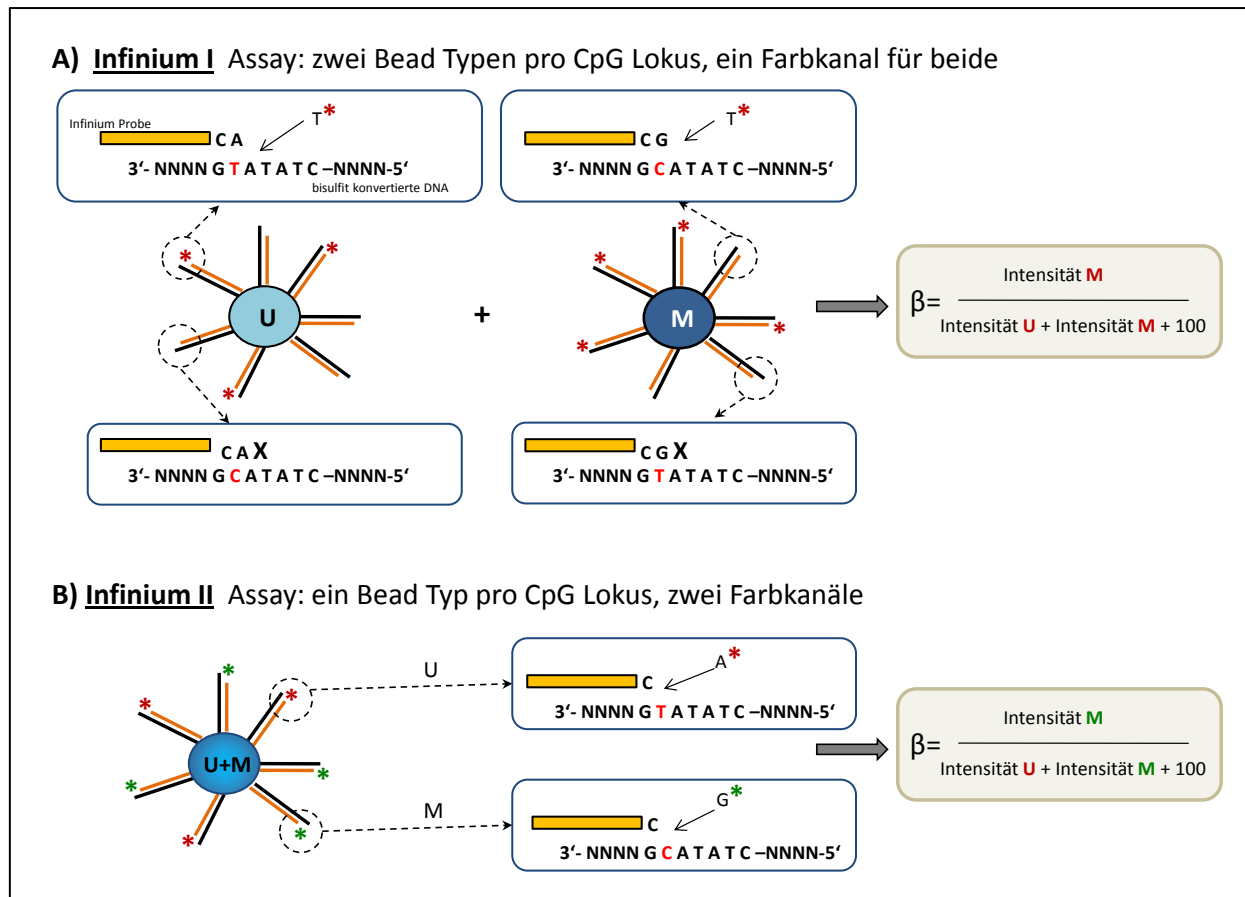


Abbildung 14: Der HumanMethylation 27K Assay nutzt ausschließlich den Infinium I Assay. Der Human Methylation 450K Assay verwendet eine Kombination aus dem Infinium I und Infinium II Assay (modifiziert nach Dedueuwaerder et al., 2011 [227]).

Protokoll des HumanMethylation InfiniumBeadChip von Illumina

Die Proben wurden für die Analyse mittels Infinium HumanMethylation27K bzw. Infinium HumanMethylation450K BeadChip von Illumina nach Angaben des „Infinium Assay Methylation Protocol Guide“ vorbereitet. Die anschließenden Arbeitsschritte erfolgten ebenfalls nach Angaben des „Infinium II Assay Lab Setup and Procedures“ und „Infinium Assay Methylation Protocol Guide“ von Illumina (<http://www.illumina.com>).

Zusammengefasst wurden zunächst 1 µg genomischer DNA mit Bisulfit mittels EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) behandelt. Die Inkubation erfolgt bei 95°C für 30 s und 50°C für 50 min in insgesamt 16 Zyklen. Im Anschluss erfolgte die Amplifikation der denaturierten DNA während einer Inkubation über Nacht. Am nächsten Tag wurde die DNA enzymatisch fragmentiert. Dabei macht man sich einem End-Punkt-Setup zu Nutze, um eine Überfragmentierung zu verhindern. Die Proben wurden in Isopropanol präzipitiert und bei 4°C zentrifugiert. Nach Resuspendieren in Hybridisierungspuffer wurden die Proben auf den Array geladen. In einer anschließenden Inkubation bei 48°C über Nacht lagern sich die amplifizierten und fragmentierten DNA Moleküle an die Lokus-spezifischen 50 mere, die wiederum kovalent an einen Bead-Typ (methylert (CG) oder unmethylerte

CpG-Position (TG)) gebunden sind. In einem Waschschrift werden alle nicht gebundenen und unspezifisch hybridisierten DNA Moleküle entfernt, so dass der Chip für die anschließende Färbung und Einzelbasenverlängerung vorbereitet ist. Bei der Einzelbasenverlängerung werden markierte Nukleotide an die gebundenen DNA-Moleküle gebracht, an die ein Fluoreszenzmarkierter Antikörper binden kann. Das von den Fluorophoren emittierte Lichtsignal wird von dem Bead Array Reader erfasst. Eine Datenauswertung erfolgt z.B. mit Hilfe der BeadStudio Software (version 3.1.3.0, Illumina Inc).

2.2.4.5 Auswertung von DNA-Methylierungsdaten der HumanMethylation BeadChip-Analyse

Die DNA-Methylierungsanalysen mittels HumanMethylation BeadChip erfolgten im Rahmen des „HämatoSys“-Projektes. Die bioinformatische Auswertung der DNA-Methylierungs-Daten wurden sowohl von mir mittels Bead Studio Software (Version 3.1.3.0, Illumina Inc.) für die 27K Daten und mittels Genome Studio-Software (Version 2011.1, Illumina Inc.) für die 450K Daten als auch durch Dipl. Inf. Markus Kreuz, Institut für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE), Universität Leipzig durchgeführt. Die von der Illumina-Software ausgegebenen β -Werte wurden zunächst normalisiert um die Batch-Effekte zu korrigieren. Anschließend wurden die Werte mittels R-Software (<http://www.r-project.org/>) graphisch dargestellt (für 450K von mir und für 27K von Markus Kreuz). Die Manhattan-Clusteranalyse [228] der 27K DNA-Methylierungsdaten wurde von mir mittels Bead Studio Software durchgeführt.

Zur Identifikation von differenziell methylierten Genen zwischen der Primär- und der Verlaufsprobe wurde jeder Fall separat analysiert. Dazu wurden die β -Werte des Primärmaterials mit denen des Verlaufsmaterials verglichen. DNA-Methylierungswerte, mit einer Differenz von mehr als 0,35 in den β -Werten ($\Delta\beta > 0,35$) zwischen Primär- und Verlaufsmaterial, wurden als „diskrepanz“ gewertet. Die Kriterien für die Auswahl dieses Grenzwertes wurden in Anlehnung an eine arraybasierte Methylierungsanalyse mittels GoldenGate Methylation Cancer Panel 1 ausgewählt, die von der Gruppe von O' Rian et al. in einer Studie von 164 FL-Proben durchgeführt wurde [203]. Andere Studien verwendeten ähnliche Kriterien, von $\Delta\beta > 0,25$ bis $\Delta\beta > 0,3$, zur Identifizierung von differenziell methylierten Genen bei Lymphomen mittels arraybasierter Methylierungsanalysen, darunter auch der HumanMethylation 27K Array [197, 229, 230].

2.2.4.6 Regionenspezifische Quantifizierung von DNA-Methylierung mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung

Mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung habe ich die DNA-Methylierung an Cytosin-Nukleotiden innerhalb von CpG-Dinukleotiden quantitativ bestimmt. Im ersten Schritt erfolgt eine Behandlung der genomischen DNA mittels Natrium-Bisulfit, die dann in einer folgenden Pyrosequenzierungsreaktion analysiert wird.

Bisulfit-Pyrosequenzierung

Bisulfit-behandelte DNA (siehe Abschnitt 2.2.4.2) wird zunächst in einer PCR spezifisch amplifiziert, wobei ein Primer mit Biotin markiert ist. Nach der PCR-Amplifikation werden die PCR-Produkte aufgereinigt, so dass nur noch die mit Biotin markierten PCR-Amplifikate als Einzelstrang vorliegen.

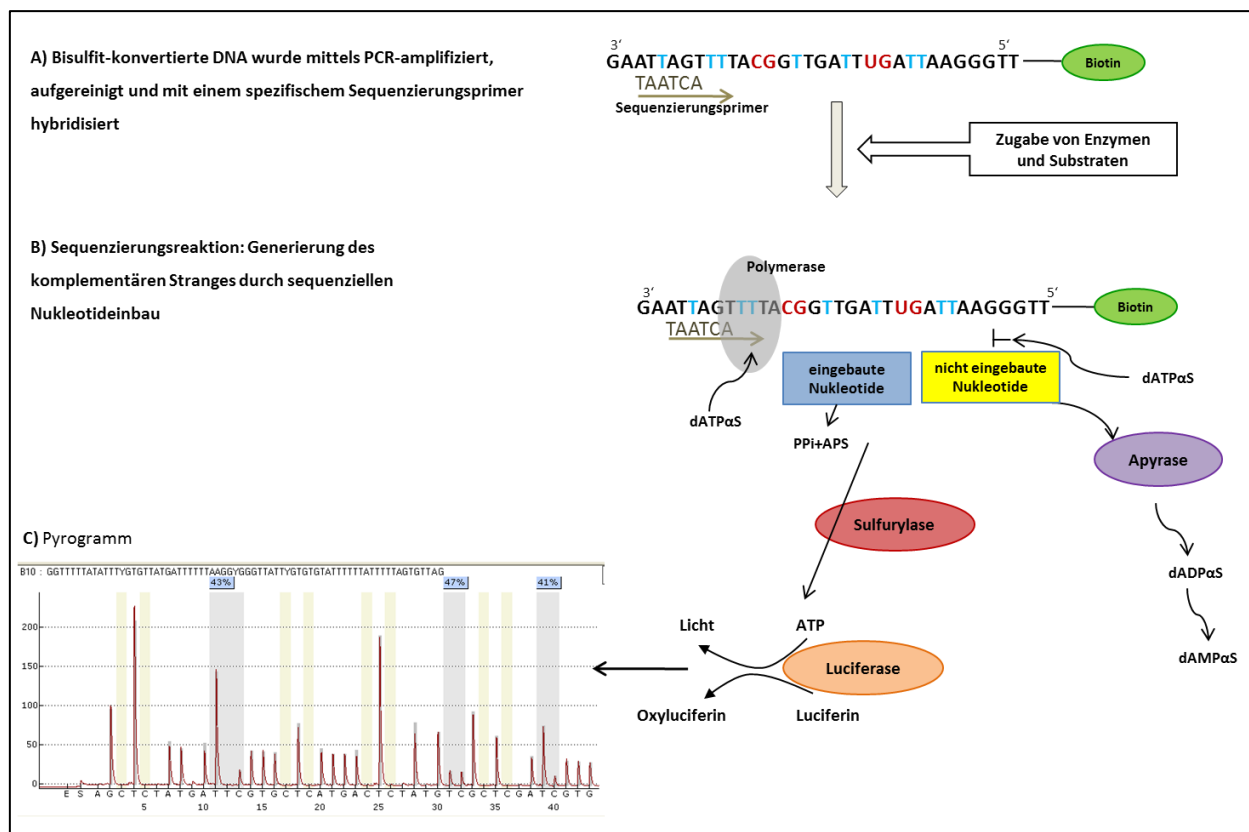


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Bisulfit-Pyrosequenzierung zur quantitativen Bestimmung von DNA-Methylierung. **A)** Nach der PCR-Amplifikation werden die PCR-Produkte aufgereinigt, so dass nur noch die mit Biotin markierten PCR-Amplifikate als Einzelstrang vorliegen. Eine Hybridisierung mit einem spezifischen Sequenzierungsprimer ermöglicht, dass diese Amplifikate in der anschließenden Sequenzierungsreaktion analysiert werden. **B)** Zunächst werden Enzyme und Substrate der Reaktion hinzugefügt. Anschließend erfolgt eine sequenzielle Zugabe der Nucleotide (dATPαS, dCTP, dGTP und dTTP) basierend auf der zu analysierenden Sequenz. Nach einem erfolgreichen Einbau des komplementären Nucleotids wird in äquimolarer Menge Pyrophosphat abgespalten (PPI). Dieses wird von der Sulfurylase in ATP umgewandelt und der Luziferase für die Umwandlung in ein Lichtsignal zur Verfügung gestellt. **C)** Die entstandenen Lichtsignale werden von einer Kamera erfasst und von einer Software in Form eines Pyrogramms ausgegeben. Die Höhe des Signals entspricht der Anzahl der eingebauten Nucleotide. Nicht eingebaute Nucleotide werden von der Apyrase zu Monophosphatnucleotiden abgebaut und stehen der Reaktion somit nicht mehr zur Verfügung (modifiziert nach Ammerpohl et al., 2009; Tost et al., 2007 [226, 231]). PPI: Pyrophosphat; dATPαS: Desoxyadenosin-5'-(alpha-thio)-Triphosphat; APS: Adenosin-5'-Phosphosulfat; ATP: Adenosin-Triphosphat; dADPαS: Desoxyadenosin-5'-(alpha-thio)-Diphosphat; dAMPαS: Desoxyadenosin-5'-(alpha-thio)-Monophosphat.

Während dieser Aufreinigung wird das biotinylierte PCR-Produkt an Streptavidin-Sepharose gebunden und mit dem Sequenzierungsprimer hybridisiert (Abbildung 15 A). Bei der Sequenzierungsreaktion werden dem Reaktionsansatz die Nukleotide einzeln und entsprechend der zu analysierenden Sequenz hinzugefügt. Die Polymerase baut nur die zur Template-DNA komplementären Nukleotide ein. Das dabei gebildete, und der Reaktion den Namen gebende Pyrophosphat (PPi) wird in einer anschließenden enzymatischen Kaskade aus ATP-Sulfurylase und Luziferase umgewandelt. Dabei wird Energie in Form eines Lichtsignals freigesetzt, welches von einer im Gerät integrierten Kamera erfasst wird (Abbildung 15 B). Die Intensität des Lichtsignals korreliert mit der Anzahl der eingebauten Nukleotide. Dieses wird mittels eines Programmes (PyroQ-CpG, Pyrosequencing ID) in Form eines Pyrogramms dargestellt (Abbildung 15 C). Da das Nukleotid dATP (Desoxyadenosin-Triphosphat) der Luziferase als Substrat dient und zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte, wird anstelle von dATP dATP α S (Desoxyadenosin-Alpha-Thiotriphosphat) zur Strangsynthese in der Reaktion verwendet. Das Enzym Apyrase ist in der Lage, die nicht eingebauten Nukleotid-Triphosphate zunächst zu Nukleotid-Diphosphaten und letztendlich zu Monophosphaten abzubauen, so dass sie der Polymerase nicht mehr als Substrat zur Verfügung stehen können.

2.2.4.7 Etablierung von Bisulfit-Pyrosequenzierungsassays

Der Nachweis von DNA-Methylierung an spezifischen CpG-Positionen von mir ausgewählten genomischen Regionen erfolgte mit Hilfe der Bisulfit-Pyrosequenzierung. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte zur Etablierung von Bisulfit-Pyrosequenzierungsassays näher beschrieben, wie ich sie für diese Arbeit im Institut für Humangenetik durchgeführt habe. In dem Zusammenhang wird zunächst auf das Primerdesign und auf die PCR-Primeraustestung, sowie die anschließende Qualitätsüberprüfung im PyroMarkID eingegangen.

Primerdesign

In Abhängigkeit der jeweiligen Fragestellung der einzelnen Projekte habe ich die zu analysierenden Regionen ausgewählt. Die Referenz-Sequenz wurde in Form eines txt-files aus dem genome browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, hg18 oder hg19) heruntergeladen. Das Primerdesign erfolgte mittels der PyroMark Assay design Software (version 1.0 und 2.0). Für das Primerdesign mit der Software-Version 1.0 wurde die zu analysierende Region +/-1 000 bp in silico konvertiert, bei dem in einem ersten Schritt alle „CG“ durch „YG“ ersetzt werden und in einem zweiten Schritt alle verbleibenden „C“ durch „T“ ausgetauscht werden. Die Software Version 2.0 führt diesen Schritt automatisch durch, so dass bei Verwendung dieser Software Version die genomische DNA-Sequenz

Material und Methoden

eingeladen werden kann. Die eingestellten Bedingungen für das Primerdesign sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Bedingungen für das Primerdesign der Methylierungsanalysen mittels der PyroMark Assay design Software

Parameter	PCR-Primer	Sequenzierungsprimer
Primerlänge minimal	18 Nukleotide	15 Nukleotide
Primerlänge maximal	45 Nukleotide	25 Nukleotide
optimale Amplikongröße	50 Nukleotide	/
maximale Amplikongröße	250 Nukleotide	/
Schmelztemperatur-Algorithmus	Nearest Neighbor	Nearest Neighbor
Schmelztemperatur minimal	50°C	29°C
Schmelztemperatur maximal	72°C	59°C
maximal erlaubte Schmelztemperatur-Differenz	10°C	/
maximale GC-Differenz	50 %	/

Die PyroMark Assay design Software gibt Vorschläge und Qualitätsmerkmale für aufeinander abgestimmte Vorwärts-, Rückwärts- und Sequenzierungsprimer vor. Dabei ist der Sequenzierungsprimer komplementär zur biotinylierten PCR-Sequenz. Diese Vorschläge wurden hinsichtlich der Qualitätsmerkmale auf Komplementarität, Duplex-Bildung, Loop-Bildung, Schmelztemperatur und Mispriming manuell überprüft. Entscheidend für die Auswahl des Primers waren letztlich die Gesamteinbußen über alle Qualitätsparameter unter Berücksichtigung der ausgewählten Sequenz. Anschließend wurden die Primervorschläge auf Single Nukleotid Polymorphismen (SNPs) innerhalb der Primersequenz mittels Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) überprüft. Enthielt der Primer einen SNP oder zu viele Mängel der Qualitätsparameter, wurde das Primerdesign wiederholt. Es wurden ausschließlich Primer ohne bekannte SNP bei der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bestellt.

Primeraustestung

Zur PCR-Optimierung habe ich die von der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) gelieferten lyophilisierten Oligonukleotide zunächst in einer Konzentration von 200 pmol/ μ l in ddH₂O durch leichtes Schütteln auf dem Schüttler für mind. 1 Stunde gelöst. Von diesen Stocklösungen wurde eine Arbeitslösung in einer Konzentration von 20 pmol/ μ l erstellt. Die Etablierung der PCR-Bedingungen wurde im Rahmen dieser Arbeit mit einem von der Firma Qiagen, Hilden Deutschland, speziell für Pyrosequenzierungsanalysen optimierten Polymerasekit (PyroMark-PCR Kit) durchgeführt.

Für einen Standard-Reaktionsansatz mit dem PyroMark-PCR Kit wurden zunächst folgende Substanzen zu einem Mastermix, entsprechend der Anzahl der Ansätze, zusammenpipettiert. Zu 24 μ l des Mastermixes wurde 1 μ l der zu untersuchenden Bisulfit-konvertierten DNA pipettiert. Bei dem Leerwert

Material und Methoden

(negative Kontrolle) wurde anstelle der DNA 1 μl ddH₂O hinzugegeben. Die Austestung der Primer habe ich an drei verschiedenen DNA-Proben durchgeführt: eine mit Bisulfit konvertierte vollständig methylierte DNA-Probe der Firma Millipore (Deutschland), eine mit Bisulfit konvertierte gepoolte DNA-Probe isoliert aus dem peripheren Blut von zehn männlichen und zehn weiblichen gesunden Individuen und eine genomische, nicht mit Bisulfit-behandelte DNA-Probe.

Standard-Reaktionsansatz mit dem PyroMark-PCR Kit:

8 μl	ddH ₂ O
12,5 μl	Pyro-Mark MasterMix
2,5 μl	Coral Load
je 0,5 μl	Primer (20 pmol/ μl)
<hr/>	
24 μl	gesamt

Als Standard Thermocycler-Protokoll wurde das folgende verwendet:

Denaturierung	95°C	15 min	} 45 Zyklen
Denaturierung	94°C	30 s	
Annealing	TM	30 s	
Elongation	72°C	30 s	
Elongation	72°C	10 min	
Pause	4°C	∞	

Zur Primeroptimierung wurden jeweils drei verschiedene Annealing-Temperaturen (TM= 55°C, 60°C und 65°C) getestet. Eine Zyklenzahl von 45 ist notwendig, damit die biotinylierten Primer möglichst vollständig eingebaut bzw. verbraucht werden. Überschüssige biotinylierte Primer werden durch die Aufreinigung nicht eliminiert und können in der Sequenzierungsreaktion zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Ich habe die Temperatur für die weiteren Analysen verwendet, bei der in einer anschließenden Gelelektrophorese (Abschnitt 2.2.2.2) eine spezifische Bande in der erwarteten Größe zu sehen war. Konnte nur eine schwache Bande des PCR-Produktes erzielt werden, wurden die Salzkonzentrationen des Mastermixes z.B. durch Zugabe von MgCl₂, Betaine-Lösung oder der im Kit enthaltenden Q-Solution verändert. Gegebenfalls wurde eine Annealingtemperatur von 53°C oder auch 63°C ausgetestet. PCR-Produkte, die eine kräftige Bande in der Gelelektrophorese zeigten, wurden für die anschließende Sequenzierungsreaktion ausgewählt.

Aufreinigung von PCR-Produkten für die Pyrosequenzierung

Amplifikate, die eine kräftige Bande in der Agarose-Gelelektrophorese zeigten habe ich auf dem Pyrosequenzierer analysiert. Zunächst erfolgte eine Aufreinigung über die zum Biotage System gehörigen Vakuum-Prep Station. Anschließend wurden die Proben entsprechend des im Programm erstellten Plattenbelegungsplan in eine 96 Well Platte transferiert und ein Gemisch aus 40 µl Binding-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 5 µl Streptavidin coated Sepharose Beads (GE Healthcare, München, Deutschland) zu jeder Probe hinzugefügt. Dieses wurde auf einem Plattenschüttler für 10 min inkubiert, um zu gewährleisten, dass die biotinylierten PCR-Produkte an die Beads binden können. Die Aufreinigung erfolgte mittels eines vakuumbasierten Aufreinigungsgstools zur parallelen Aufreinigung von 96 PCR-Produkten. Mit Hilfe der Beads blieben die PCR-Produkte während des anschließenden Waschvorganges über das an der Station angelegte Vakuum an der Spitze der Stifte haften, während die Lösungen hindurch gesogen wurden. Die Aufreinigung erfolgte mit einem Waschschrift in 70 % igen Ethanol und anschließender Denaturierung in einer 0,2 M Natriumhydroxid-Lösung. Die nun einzelsträngig vorliegenden Amplifikate wurden in Waschpuffer gewaschen und in eine mit Annealing-Puffer und Sequenzierungsprimer vorbereitete Platte überführt. Anschließend folgte eine erneute Denaturierung der PCR-Produkte bei 85°C für zwei Minuten, die während der anschließenden Abkühlung auf Raumtemperatur mit den Sequenzierungsprimern hybridisierten. Die so vorbereiteten Proben wurden auf dem Pyrosequenzierer analysiert. Dafür wurde die Kartusche mit einer von der Software errechneten Menge entsprechender Nukleotide, Substrat und Enzym befüllt und die Analyse gestartet. Zuvor wurde dem System die entsprechende zu analysierende Sequenz eingegeben, so dass eine sequenzielle Abgabe der Nukleotide entsprechend der Basenabfolge des zu analysierenden DNA-Stranges möglich war.

Auswertung von Bisulfit-Pyrosequenzierungsanalysen

Die bei der Bildung der Pyrophosphate freiwerdende Energie wird während der Pyrosequenzierungsreaktion in ein detektierbares Lumineszenz-Signal umgewandelt. Dieses wird anschließend von einer spezifischen Methylierungssoftware in Form eines Pyrogramms dargestellt. Neben der Berechnung von Methylierungswerten der einzelnen CpG-Positionen erstellt die Software Qualitätshinweise bezüglich der Auswertbarkeit (sog. general warnings) der Pyrogramme. Diese geben Auskunft über die Vollständigkeit der Bisulfitkonversion, über ein Signal-zu Hintergrundverhältnis und über die Übereinstimmung der detektierten Sequenz mit der erwarteten Sequenz. Für die folgenden Analysen wurden nur die Primer weiter verwendet, bei denen die Kontrollen keine Einschränkungen in der Qualität zeigten. Für diese Proben wurden von der Software keine Qualitätsmerkmale ausgegeben. Die Primerpaare, die in der Pyrosequenzierung leichte Qualitätseinschränkungen mit der Bezeichnung

„uncertain“ erhielten, wurden, jeweils in Abhängigkeit der angegebenen Merkmale, weiteroptimiert. Das Merkmal „uncertain due to low signal-to-noise ratio“ ist ein Hinweis auf zu wenig analysierbares Material. Für diese Einschränkung wurde z.B. die Menge des PCR-Ansatzes und/oder die eingesetzte Menge an Sequenzierungsprimer verdoppelt. Primerpaare, die mit „not analyzable (due to lack of data, due to low signal to noise ratio...)“ oder “failed due to low signal-to-noise ratio (overall)” beurteilt wurden, wurden für die folgenden Analysen nicht weiterverwendet. In Fällen, in denen die detektierte Sequenz einen Hinweis darauf gab, dass der Sequenzierungsprimer an einer falschen Position bindet, wurde ein neuer Sequenzierungsprimer generiert. Erfolgreich optimierte Primerbedingungen, sowohl in der PCR als auch in der Pyrosequenzierung, wurden zur abschließenden Testung an einem größeren Kontrollkollektiv angewendet und dann für die Analyse des Probenkollektivs freigegeben.

2.2.4.8 „klassische“-PCR-basierte-Anreicherung genomischer Regionen zur Qualitätssicherung von 454-Next-Generation-Sequencing-Verfahren

Zur Qualitätssicherung des in Abschnitt 3.1.1 publizierten Verfahrens wurde ein „klassisches“-PCR-basiertes Anreicherungsverfahren mit anschließendem NGS zur Detektion von DNA-Methylierung durchgeführt. Diese Studie erfolgte an vier Proben (siehe Abschnitt 2.1.3). Eine schematische Übersicht zum Vorgehen ist in Abbildung 16 dargestellt. Zunächst erfolgte eine Behandlung der DNA-Proben mit Natrium-Bisulfit. Um einen Fehler bei dieser Behandlung z.B. durch unvollständige Konvertierung, möglichst gering zu halten, wurden von jeder Probe fünf separate Ansätze der Bisulfit-Behandlung durchgeführt. Diese wurden nach der Aufreinigung für jede Probe in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und somit „gepoolt“. Anschließend erfolgte eine Amplifikation der insgesamt 54 genomischen Regionen für jeden konvertierten DNA-Pool. Die Auswahl dieser genomischen Regionen und Etablierung der PCR-Bedingungen ist in Abschnitt 3.1.1 nachzulesen. Die ausgewählten Genorte umfassten $n=45$ *de novo* methylierte, $n=3$ methylierte, $n=3$ imprintete und $n=3$ unmethylierte genomische Regionen. Um auch bei der Amplifikation einen Fehler, z.B. Polymerasefehler, möglichst gering zu halten, wurden von jedem konvertierten DNA-Pool vier separate PCR-Ansätze pro analysierten Genort ($n_{\text{gesamt}}=800$ PCR-Ansätze) durchgeführt. Nach der Aufreinigung dieser PCR-Produkte wurden die vier separaten Ansätze für jede Probe zusammengeführt, so dass am Ende 54 aufgereinigte PCR-Reaktionsgefäße für jede der vier untersuchten Proben vorlagen. Diese wurden mittels FLX-454-Technologie (Firma Roche) in dem Institut für Klinische Molekularbiologie, Campus Kiel, Universitäts-Klinikum Schleswig-Holstein sequenziert. Darüber hinaus wurden die angereicherten Amplifikate der Daudi-Zelllinie zusätzlich mittels Junior-454-Technologie bei der Firma Roche Applied Science in Penzberg analysiert. Zur Validierung wurden die Proben mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung von mir in dem Institut für Humangenetik untersucht.

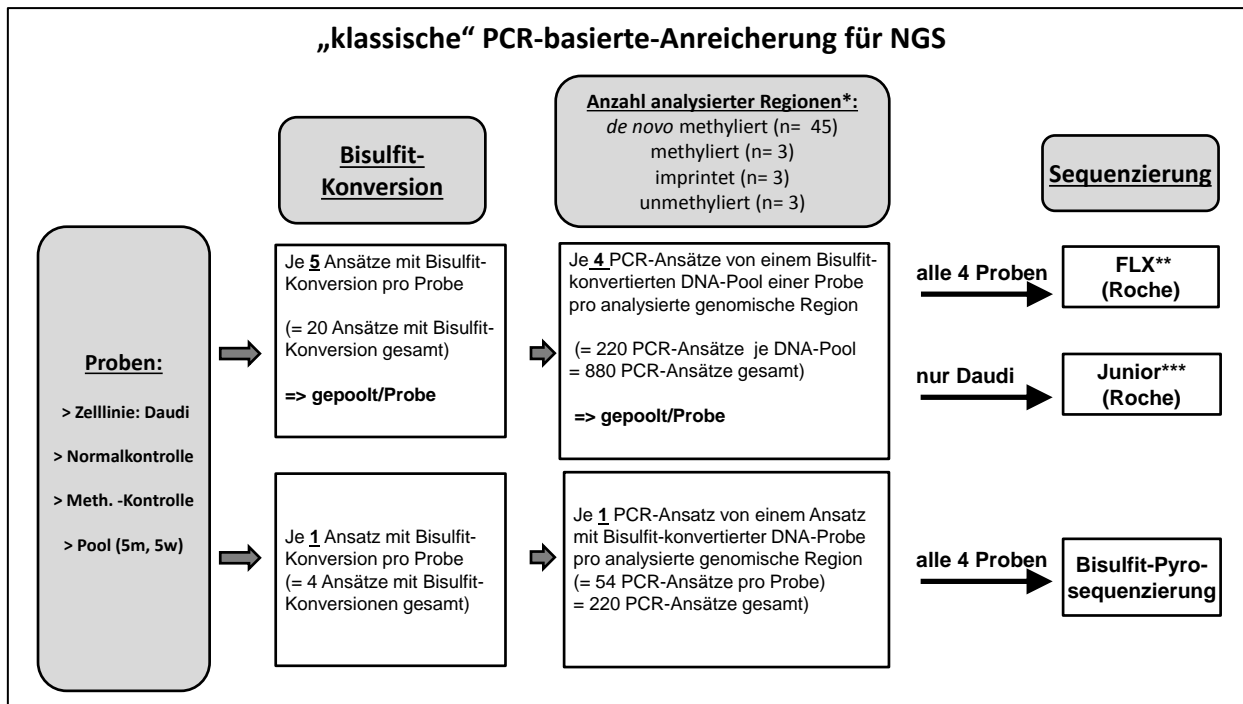


Abbildung 16: Schematische Übersicht des „klassischen“-PCR-basierten Anreicherungsverfahrens zur Quantifizierung von DNA-Methylierung mittels verschiedener Sequenzierungstechniken.

* Auswahl der Genorte ist beschrieben unter Abschnitt 3.1.1; ** die Sequenzierung erfolgte im Institut für Klinische Molekularbiologie, Campus Kiel, Universitäts-Klinikum Schleswig-Holstein; *** die Sequenzierung erfolgte bei der Firma Roche Applied Science in Penzberg.

m: männlich; w: weiblich; PCR: polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion); Meth.: Methylierte; NGS: Next-Generation-Sequencing.

2.2.5 Methoden zum Nachweis genetischer Veränderungen mittels Sequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausgewählte Genorte mittels NGS-Methoden analysiert, um die Frage hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen der Tumorentwicklung und rekurrenten Mutationen bei t(14;18) positiven FL zu klären. Eine Validierung der mittels NGS detektierten Mutationen habe ich mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt.

Im Folgenden werden zunächst die analysierten Kandidatengene aufgeführt. Anschließend wird das Anreicherungsverfahren mittels PCR sowie das Mikro-Droplet-basierte Anreicherungsverfahren für NGS erläutert. Im weiteren Verlauf werden die Sequenzierung nach Sanger und zwei NGS-Verfahren vorgestellt.

2.2.5.1 Kandidatengene für Mutationsanalysen mittels Next-Generation-Sequencing

Zur Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen somatischen Mutationen einer t(14;18) positiven Lymphomen und dem Verlauf der klonalen Tumorevolution wurden Kandidatengene ausgewählt, die nicht dem Immunglobulinlokus angehören und bereits in der Literatur in Verbindung mit somatischen

Material und Methoden

Mutationen bei B-Zell-Lymphomen, insbesondere FL und DLBCL, beschrieben wurden (siehe auch Abschnitt 1.3.3).

Somatische Mutationen bei *CREBBP*, *TNFRSF14*, *TP53*, *CDKN2A*, *C10ORF12*, *EP300*, *MLL2* und *MEF2B* sind insbesondere in den kodierenden Regionen der Gene detektiert worden. Deshalb wurden für die Analysen in dieser Arbeit für diese Gene alle Exons analysiert. Desweiteren ist beschrieben, dass die Gene *RHOH*, *PAX5*, *IRF4*, *C2TA*, *REL* und *PIM1* für eine aberrante SHM prädestiniert sind, die bevorzugt einen Bereich von etwa 2 kb ab Transkriptionsstart (TSS) betrifft. Um die somatischen Mutationen in diesen Regionen zu erfassen, wurden in dieser Arbeit daher für diese Gene ein 2,5 kb großer Bereich ab TSS gewählt. Da für *BCL2*, *BCL6* und *MYC* sowohl eine aberrante SHM als auch Mutationen in kodierenden Regionen bekannt sind, wurde von diesen drei Genen sowohl der 2,5 kb Bereich ab TSS als auch alle Exons analysiert. Des Weiteren sind somatische Mutationen in den Genen *EZH2* und *MDY88* bei FL und DLBCL bereits gut charakterisiert. Aus dem Grund wurde bei diesen Genen ausschließlich ein Bereich von ± 75 bp von der bekannten Mutationen (Tyr641 in *EZH2* und L265P in *MYD88*) analysiert. Alle analysierten Regionen der 19 Kandidatengene sind in der Tabelle 15 zusammengefasst. Die genomischen Sequenzen wurden über das Mikro-Droplet Verfahren von RainDance Technologies (Abschnitt 2.2.5.2) angereichert und anschließend mit Hilfe des Next-Generation-Sequencing-Verfahrens von Illumina sequenziert (Abschnitt 2.2.5.4.2). Diese Analysen wurden von der Firma ATLAS in Berlin durchgeführt. Die mittels dieser Technik detektierten Veränderungen habe ich anschließend mittels Sanger-Sequenzierung in dem Institut für Humangenetik (Abschnitt 2.2.5.3) validiert.

Tabelle 15: Auswahl der Genorte zur Mutationsanalyse bei t(14;18) positiven FL mittels NGS

Kodierende Information => alle Exons wurden analysiert					
Gen-Name	Anzahl	Chromosom	Start (Hg19)	Ende (Hg19)	Literatur
<i>BCL6</i>	11 Exons	3	187,439,162	187,440,391	[63, 170]
<i>BCL2</i>	3 Exons	18	60,790,576	60,795,994	[63, 170]
<i>MYC</i>	4 Exons	8	128,750,491	128,753,682	[63, 160, 170]
<i>CREBBP</i>	31 Exons	16	3,775,053	3,930,123	[232, 233]
<i>TNFRSF14</i>	7 Exons	1	2,487,802	2,495,269	[159, 170]
<i>TP53</i>	10 Exons	17	7,571,717	7,590,865	[160, 170]
<i>CDKN2A</i>	4 Exons	9	21,967,748	21,975,124	[160, 168, 170]
<i>C10ORF12</i>	8 Exons	10	98,592,799	148,581,443	[234]
<i>EP300</i>	31 Exons	22	41,488,611	41,576,083	[232, 233]
<i>MLL2</i>	54 Exons	12	49,412,755	49,449,109	[232]
<i>MEF2B</i>	13 Exons	19	19,256,373	19,303,402	[232]
Fehlerhafte somatische Hypermuation => 2,5 kb ab TSS wurden analysiert					
Gen-Name	analysierter Bereich	Chromosom	Start (Hg19)	Ende (Hg19)	Literatur
<i>BCL6</i>	etwa 2,5 kb	3	187,460,975	187,463,475	[39, 63, 235]
<i>BCL2</i>	etwa 2,5 kb	18	60,984,157	60,987,380	[39, 63]

Material und Methoden

Fehlerhafte somatische Hypermutation => 2,5 kb ab TSS wurden analysiert					
Gen-Name	analysierter Bereich	Chromosom	Start (Hg19)	Ende (Hg19)	Literatur
<i>MYC</i>	etwa 2,5 kb	8	128,747,765	128,750,815	[39, 63, 235]
<i>RHOH</i>	etwa 2,5 kb	4	40,198,527	40,201,027	[235]
<i>PAX5</i>	etwa 2,5 kb	9	37,031,976	37,034,476	[63, 235]
<i>IRF4</i>	etwa 2,5 kb	6	391,752	394,252	[109, 236]
<i>C2TA</i>	etwa 2,5 kb	12	10,971,055	10,973,555	[235]
<i>REL</i>	etwa 2,5 kb	2	61,108,752	61,111,252	[168]
<i>PIM1</i>	etwa 2,5 kb	6	37,137,922	37,140,422	[235]
ausschließlich bekannte Mutation wurde analysiert					
Gen-Name	Mutation	Chromosom	Start (Hg19)	Ende (Hg19)	Literatur
<i>MYD88</i>	L265P	3	38,179,966	38,184,514	[232, 237, 238]
<i>EZH2</i>	Trr641	7	148,504,461	148,581,443	[239-241]

2.2.5.2 PCR-basiertes DNA-Anreicherungsverfahren im Mikro-Droplet-Verfahren

Mit Hilfe der PCR lassen sich bestimmte genomische Abschnitte spezifisch amplifizieren. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht darauf, dass nach einem Denaturierungsschritt spezifische kurze Oligonukleotide (Primer) an die komplementären Sequenzen der einzelsträngigen DNA hybridisieren. Im folgenden Elongationsschritt verlängert eine hitzestabile Taq-Polymerase durch den Einbau der komplementären Nukleotide den von Primern flankierten DNA-Abschnitt. Durch die Verwendung zweier gegenläufiger Primer kann der zwischen den Primern liegende DNA-Abschnitt durch die zyklische Wiederholung der Reaktionsschritte im Thermocycler exponentiell vervielfältigt werden. Diese Reaktion wird in der Regel in einem 200 µl Reaktionsgefäß durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben dem herkömmlichen PCR-Verfahren in einem 200 µl Reaktionsgefäß ein neues DNA-Amplifikationsverfahren mit Mikro-Droplets angewendet. Dieses Verfahren von „RainDance Technologies“ (<http://www.raindancetech.com/>) ist ein NGS-basiertes Amplifikationsverfahren. Da für diese Anreicherungsverfahren spezielle Geräte erforderlich sind, wurden diese Amplifikationen von externen Anbietern bei RainDance Technologies, Lexington, USA und bei ATLAS Biolabs, Berlin, Deutschland durchgeführt. Im Folgenden wird das Mikro-Droplet-Verfahren von RainDance Technologies erläutert.

Das Mikro-Droplet-basierte Amplifikationsverfahren von RainDance Technologies ist eine speziell für Hochdurchsatz-Sequenzierungsanwendungen entwickelte Methode. Diese Technologie stellt ein Miniaturverfahren auf der Basis einer klassischen PCR dar, bei der man sich die positiven Eigenschaften von Öl in Wasser emulgierten Tropfen (Droplets) zu Nutze macht [242]. Für die PCR wird jeweils ein Droplet der Ausgangs-DNA-Bibliothek mit einem Droplet der Primer-Bibliothek vereint. Die PCR findet somit in einem einzigen Droplet statt, und verhindert, dass beispielsweise die generierten Fragmente,

oder bei Multiplex Ansätzen, die unterschiedlichen Primerpaare miteinander interagieren [243]. Aufgrund der Vielzahl kleiner Tröpfchen wird eine größere Ausbeute des Endproduktes als bei den herkömmlichen Verfahren erzielt (Abbildung 17) [242, 244].

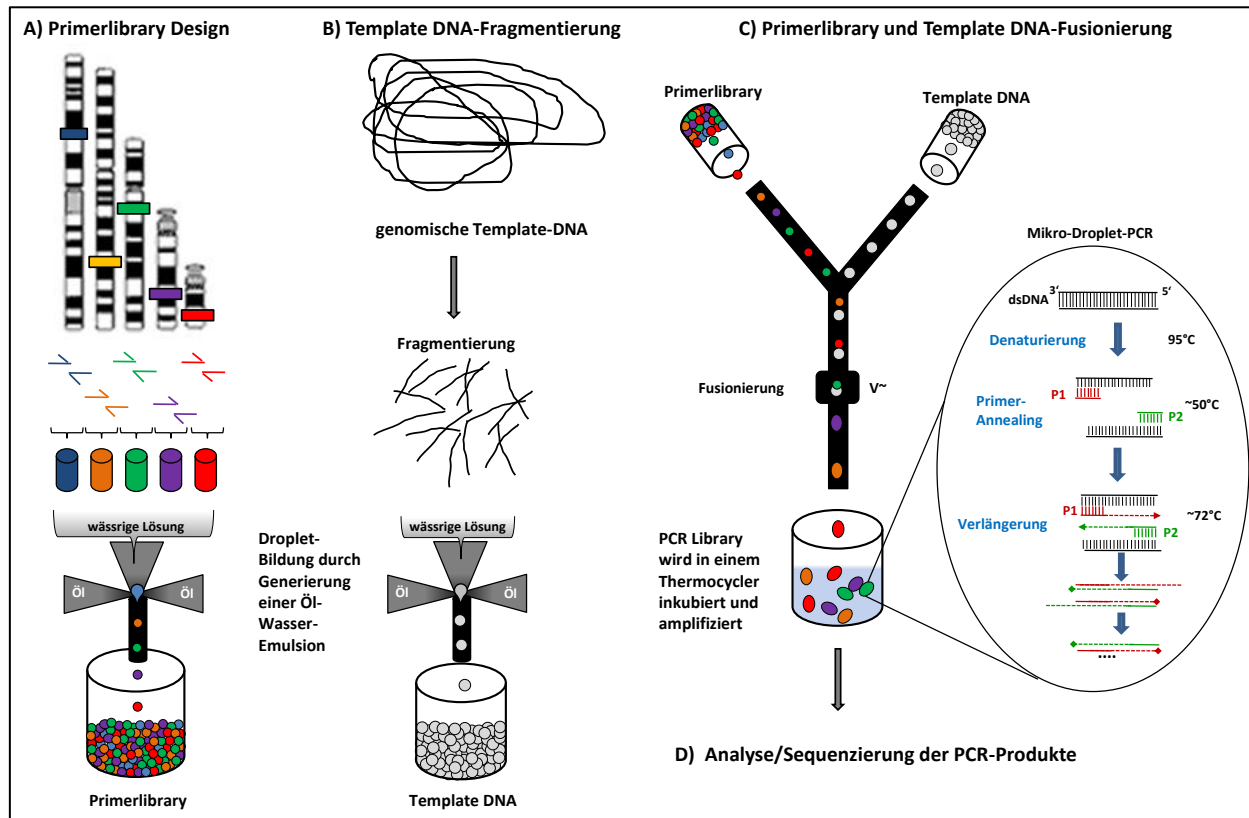


Abbildung 17: Mikro-Droplet-Verfahren (RainDance Technologies; <http://raindancetech.com/>) zur Amplifikation von genomischer DNA in einem Hochdurchsatz-Verfahren. **A)** Die Primerlibrary wird erstellt, indem für die genomische Ziel-Sequenzen Vorwärts und Rückwärtsprimer generiert werden, die über ein spezifisches Verfahren in die Form emulgierter Tropfen gebracht werden. **B)** Zur Erstellung der Template-DNA wird die genomische DNA zunächst fragmentiert und anschließend über dasselbe Verfahren in die Form emulgierter Tropfen gebracht. **C)** Über ein spannungsgesteuertes Modul werden die Anreicherungen in einem 1:1 Verhältnis miteinander fusioniert und anschließend inkubiert. Eine PCR findet in einem einzigen Tropfen statt. **D)** In Abhängigkeit der Fragestellung erfolgt eine spezifische Aufreinigung und Sequenzierung der PCR-Amplifikate (modifiziert nach Brouzes et al., 2009; Tewhey et al., 2009 [242, 244]).

Für die Fragestellungen in dieser Arbeit erfolgten diese Amplifikationen bei externen Anbietern: RainDance Technologies, Lexington, USA und bei ATLAS Biolabs, Berlin.

Für spezifisch ausgewählte Genomabschnitte werden die Primer in einem in silico-basierten Verfahren generiert und anschließend in einer wässrigen Lösung synthetisiert. Zur Erstellung der Primerlibrary werden diese über einen Kanal geschleust, an dessen flaschenhalsförmigem Ende jeweils von zwei gegenüberliegenden Seiten Fluorkohlenwasserstoff in einer öligen Flüssigkeit hinzufließt. Die Fließbewegung der Primerlösung wird auf diese Weise durch die Verengung gelenkt, dass eine uniforme Dropletbildung ermöglicht werden kann (Abbildung 17 A). Die zu untersuchende genomische DNA wird zunächst fragmentiert und anschließend über dasselbe Verfahren in die Form kleiner emulgierter Droplets gebracht, mit dem Unterschied, dass diese letzteren Tropfen größer sind, als die der Primer (Abbildung 17 B). In einem anschließenden Vereinigungsprozess macht man sich die Laufeigenschaften der unterschiedlich großen Tropfen zunutze, wobei die Kleineren die Großen aufnehmen. Die

Anreicherungen werden in einem 1:1 Verhältnis miteinander gemischt und an einer Stelle über ein spannungsinduziertes Feld miteinander vereint. Diese so vereinigten PCR-Droplets werden in einem PCR-Reaktionsgefäß gesammelt und anschließend in einem Thermocycler inkubiert (Abbildung 17 C). Eine PCR findet dabei in einem einzigen Droplet statt und ermöglicht, dass über 1,5 Millionen Amplifikationen parallel stattfinden. Die auf diese Weise hergestellten Amplifikate werden je nach anschließendem Sequenzierungsverfahren spezifisch aufgereinigt und analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Anreicherungsverfahren über die Mikro-Droplets von RainDance Technologies für zwei verschiedene Fragestellungen angewendet. Es diente der DNA-Amplifikation zur Quantifizierung von DNA-Methylierung (Abschnitt 3.1) und anschließender 454 Sequenzierung. In einer anderen Fragestellung wurde das Amplifikationsverfahren zur Analyse von rekurrenten Mutationen in ausgewählten Genorten bei t(14;18) positiven FL (Abschnitt 3.3.3) und anschließender Sequenzierung mittels HiSeq von Illumina genutzt.

2.2.5.3 DNA-Sequenzierung nach Sanger

Bei der DNA-Sequenzierung wird die Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül, z.B. PCR-Produkt bestimmt. Ich habe diese Desoxymethode nach Sanger eingesetzt, um die mittels NGS detektierten Mutationen zu validieren. Dieses Verfahren erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruchs. Eine lineare Amplifikation der DNA wird dadurch ermöglicht, dass nur ein Primer eingesetzt wird. Ausgehend von dem 3'-Ende des Sequenzierungsprimers wird der komplementäre DNA-Strang von einer DNA Polymerase synthetisiert. Der Sequenzierungsansatz enthält Didesoxy-nukleosidtriphosphate (ddNTPs), die mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Diese ddNTPs besitzen keine 3'-Hydroxylgruppe und führen zu einem Abbruch der DNA-Verlängerung wenn sie in den neusynthetisierten Strang eingebaut werden, da die OH-Gruppe am 3' C-Atom für die Verknüpfung der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids fehlt. Die ddNTPs kommen im Verhältnis zu den dNTPs in so geringer Konzentration vor, dass auch relativ lange DNA-Einzelstränge entstehen können. Die Reaktionsprodukte werden anschließend anhand ihrer Größe kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Das Chromatogramm gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

Primerdesign

Für das Primerdesign habe ich ein webbasiertes Programm (Primer 3; <http://frodo.wi.mit.edu/>) verwendet. Die Referenz-Sequenz wurde in Form eines txt-files aus dem Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>, Hg19) heruntergeladen. Die zu analysierende Region +/-1 000 bp wurde eingeladen und die Standard-Bedingungen (Primergröße: Optimum= 20 Basen (Bereich: 18-27 Basen), Primer-Temperatur-Optimum= 60°C (Bereich: 57-63°C), Primer-GC-Gehalt: Minimum= 20 %,

Material und Methoden

Maximum= 80 %) beibehalten. Die Design Software gibt Vorschläge für aufeinander abgestimmte Vorwärts- und Rückwärtsprimer aus. Diese Vorschläge wurden manuell auf SNPs innerhalb der Primersequenz mittels Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) überprüft. Enthielt der Primer einen SNP, wurde das Primerdesign wiederholt. Es wurden ausschließlich Primer ohne bekannte SNP bei der Firma Biomers (Ulm, Deutschland) bestellt.

Protokoll für einen Sequenzierungsansatz

Zunächst werden die PCR-Produkte mit dem MinElute 96 PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) in einem 96-Well Mikrotiterplatten Verfahren aufgereinigt. Es wurden ca. 40 µl dH₂O mit dem PCR-Produkt vermischt, in eine 96-Wellplatte überführt und anschließend auf dem Halter für die Vakuumpumpe platziert. Durch Anlegen eines Vakuums mit einem Druck von 20-25 mm Hg wurde die Lösung vollständig durch die Membran gesogen. Flüssigkeitsrückstände an der Unterseite der Platte wurden mit einem Zellstoff entfernt, nachdem die Platte vom Halter entfernt wurde. Zum Waschen der PCR-Produkte wurden erneut 50 µl dH₂O in jedes Well pipettiert und wie zuvor beschrieben verfahren. Abschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl dH₂O in jedes Well, ein Abdecken der Platte mit Klebefolie und ein Schütteln bei ca. 1 000-3 000 U/min für fünf Minuten auf dem Plattenschüttler. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in ein geeignetes Aufbewahrungsgefäß überführt.

Für einen Standard-Reaktionsansatz mit dem Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) wurden folgende Substanzen zusammenpipettiert. Der Vorwärts- und Rückwärtsstrang eines PCR-Fragments wurde in zwei getrennten Sequenzierungsansätzen analysiert.

15 µl	ddH ₂ O
2 µl	Big Dye Terminator-Puffer (5x)
1 µl	Big Dye Terminator
1 µl	Primer (20 pmol/µl)
<hr/>	
19 µl	gesamt

Anhand dieses Schemas habe ich einen Mastermix entsprechend der Anzahl der zu sequenzierenden PCR-Produkte erstellt.

Zu 19 µl des Mastermixes wurde 1 µl des aufgereinigten PCR-Produktes pipettiert. Als Standard Thermocycler-Protokoll wurde das Folgende verwendet:

Material und Methoden

Denaturierung	96°C	2 min	
Denaturierung	99°C	10 s	} 25 Zyklen
Annealing	57°C	5 s	
Elongation	60°C	4 min	
Pause	4°C	∞	

Die Aufreinigung der Sequenzreaktionsprodukte erfolgte über eine 96-Well-Platte mit Hilfe des Montage SEQ 96 Sequencing Reaction Cleanup Kits (Millipore, Darmstadt, Deutschland) in Analogie zu der Aufreinigung der PCR-Produkte über das vakuumbasierte Verfahren. 20 µl der zum Kit gehörigen Injektionslösung wurden zu der Sequenzierungsreaktion pipettiert und nach vorsichtigem Durchmischen in ein Well der SEQ96-Platte überführt. Zum Waschen wurden erneut 20 µl Injektionslösung auf die Säule gegeben. Die aufgereinigten Sequenzierprodukte wurden in 20 µl dH₂O aufgenommen und in ein entsprechendes Gefäß für die elektrophoretische Analyse überführt.

Kapillarelektrophorese

Für die Analyse der aufgereinigten Sequenzreaktionsprodukte mit dem Kapillarsequenzierer ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) habe ich diese zunächst 1:5 mit dH₂O verdünnt. Dafür wurden 20 µl ddH₂O mit 5 µl Sequenzierprodukt in einer für die Kapillarelektrophorese vorgesehenen 96-Well Platte luftblasenfrei zusammengeführt. Das Gerät wurde mit Hilfe des Run 3100-Avant Data Collection Version 2.0 Software (Applied Biosystems) bedient. Die Injektionszeit betrug 10 s und die Laufzeit betrug je nach erwarteter Fragmentlänge 18 oder 30 min. Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit Hilfe der ABI PRISM® AB DNA Sequencing Analysis Software Version 5.2 (Applied Biosystems). Zur Auswertung wurden die Sequenzen manuell mit den entsprechenden Referenzsequenzen der Datenbank (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) verglichen.

2.2.5.4 Next-Generation-Sequencing-Verfahren

Die derzeit führenden Anbieter im Gebiet des Next-Generation-Sequencing (NGS) nutzen unterschiedliche Prinzipien und adressieren unterschiedliche Anwendungsgebiete und Fragestellungen in der Genomforschung. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen angereicherter spezifischer PCR-Produkte (herkömmliches und Mikro-Droplet-Verfahren) wurden nach den NGS-Verfahren von 454 Life Science der Firma Roche und von Illumina analysiert. Beide Technologien werden im Folgenden vorgestellt.

Die Durchführungen dieser Sequenzierungen zur Untersuchung der inter- und intraklonalen Veränderungen der DNA-Methylierung (Abschnitt 3.1.1) und der Mutationsanalyse ausgewählter Kandidatengene (Abschnitt 3.3.3) erfolgten jeweils bei ATLAS Biolabs (Berlin, Deutschland). Darüber hinaus wurde die FLX-454-Technologie (Firma Roche) für das Validierungsexperiment zur Bestimmung der DNA-Methylierung (Abschnitt 3.1.2) eingesetzt. Diese Analysen erfolgten in dem Institut für Klinische Molekularbiologie, Campus Kiel, Universitäts-Klinikum Schleswig-Holstein. Zusätzlich wurden die angereicherten Amplifikate der Daudi-Zelllinie zusätzlich mittels Junior-454-Technologie bei der Firma Roche Applied Science in Penzberg analysiert.

2.2.5.4.1 454-Technologie von Life Science (Firma Roche)

Das NGS-Verfahren von Roche 454 Life Science/Firma Roche (<http://www.454.com/>) beruht auf dem Verfahren der Pyrosequenzierung (Abbildung 18) und wurde im Rahmen dieser Arbeit zur Quantifizierung von DNA-Methylierung (Abschnitt 3.1) eingesetzt. Während der Pyrosequenzierungsreaktion werden Pyrophosphat-Moleküle in Abhängigkeit des Nukleotideinbaus von der Polymerase abgespalten, die in einer anschließenden enzymatischen Reaktionskaskade umgewandelt werden. Die dabei freiwerdende Energie wird in Form eines detektierbaren Lichtsignals ausgegeben [245].

In einer Anreicherungsreaktion der PCR-Amplifikate, der sog. Library-Erstellung, werden zunächst werden zwei Adaptoren, A und B, an die Enden der Amplifikate ligiert. Der Adapter A ist komplementär zu den Oligonukleotiden auf den Trägerkugeln (Oligo-Beads), Adapter B enthält eine passende Sequenz für die spätere Hybridisierung des Sequenzierungsprimer. In der sogenannten Emulsions-PCR werden diese PCR-Amplifikate an der Oberfläche von Millionen kleiner Oligo-Beads vervielfältigt. Die Emulsions-PCR nutzt das Prinzip der Mizellenbildung in einer Öl-Wasser Mischung um die einzelnen Agarose-Beads voneinander zu isolieren. Jedes Bead trägt ein auf der Oberfläche hybridisierte PCR-Amplifikate in einer wässrigen Mizelle, die wiederum alle Komponenten für eine anschließende PCR enthält. Die Beads werden anschließend in einer Mikrotiter-Platte inkubiert, so dass jedes Bead am Ende hunderttausende von Kopien auf der Oberfläche enthält, welche dann in einer abschließenden Sequenzierungsreaktion analysiert werden. Das dabei entstehende Pyrogramm repräsentiert die Zahl der eingebauten Nukleotide [212, 213].

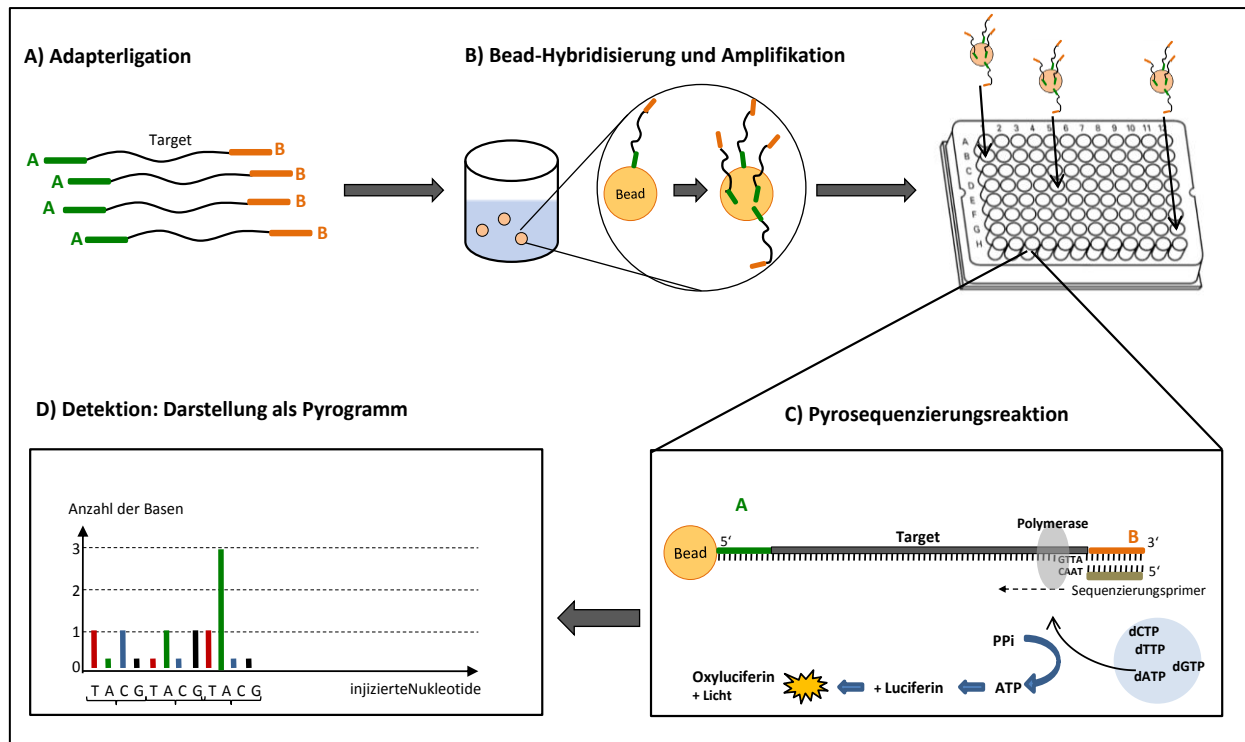


Abbildung 18: 454 Sequenzierungsverfahren von der Firma Roche. **A)** Bei der Library-Erstellung werden die Adapter A und B an die PCR-Amplifikate ligiert. **B)** Über die komplementäre Sequenz von Adapter A erfolgt eine Hybridisierung an die Beads mit anschließender Amplifikation in einer Emulsions-PCR. **C)** In einer abschließenden Pyrosequenzierungsreaktion werden die Amplifikate in der Mikrotiterplatte sequenziert. **D)** Die zyklische Zugabe der vier Nucleotide TACG wird in Form eines Pyrogramms dargestellt. Die Intensität des Lichtpeaks korreliert mit der Anzahl der injizierten Nucleotide. Die Sequenz in diesem Beispiel lautet: 5'-TCAGTAAA-3' (modifiziert nach Mardis et al., 2008 [245]).

Die Durchführungen für die Analysen in Abschnitt 3.1.1 und Abschnitt 3.3.3 erfolgten jeweils bei ATLAS Biolabs (Berlin, Deutschland). Für die Analysen in Abschnitt 3.1.2 wurden die Sequenzierungen in dem Institut für Klinische Molekularbiologie, Campus Kiel, Universitäts-Klinikum Schleswig-Holstein und bei der Firma Roche Applied Science in Penzberg durchgeführt.

2.2.5.4.2 HiSeq Verfahren von Illumina

Das von Illumina (<http://www.illumina.com/systems.ilmn>) eingeführte Verfahren basiert, wie auch das 454-Verfahren von der Firma Roche, auf dem Prinzip der „Sequenzierung durch Strangsynthese (sequencing-by-synthesis)“, SBS (Abbildung 19) [245].

Zunächst werden Adapter an die beiden Enden der Target-PCR-Amplifikate ligiert. Für eine sog. „paired-end-library“ erfolgt diese Ligation an beide Enden der PCR-Amplifikate. Ausgehend von einzelsträngigen adapterligierten Target-PCR-Amplifikaten nutzt die Illumina Technologie ein mikrofluidbasiertes Verfahren um diese Fragmente auf der Oberfläche einer „Flow-Cell“ aus Glas zu hybridisieren. Jede Flow-Cell besitzt Oligonucleotide, die komplementär zu den Adaptoren an den PCR-Fragmente sind. Nach der Hybridisierung erfolgt die sog. „Brückenamplifikation“ (Bridge-Amplification) der Fragmente unter isothermalen Bedingungen in bestimmten Arealen auf den Flow-Cell-Oberflächen. Mittels dieser Amplifikation werden zahlreiche dichtgepackte Cluster auf der Flow-Cell für die anschließende Sequenzierungsreaktion generiert. Während der Sequenzierungsreaktion werden zu jedem Areal

Polymerase, vier unterschiedlich farbig markierte Oligonukleotide, sowie Sequenzierungsprimer hinzugefügt. Die Nukleotide besitzen ein modifiziertes 3'Ende, so dass immer nur ein Nukleotid pro injektionszyklus eingebaut werden kann. Nach jedem Zyklus der Basenzugabe erfolgt ein Detektionsschritt um die eingebauten Nukleotide in dem entsprechenden Cluster zu erfassen. In einer chemischen Reaktion werden die Fluorophore wieder entfernt, bevor der nächste Zyklus der Basenzugabe und Detektion erfolgt [212, 213].

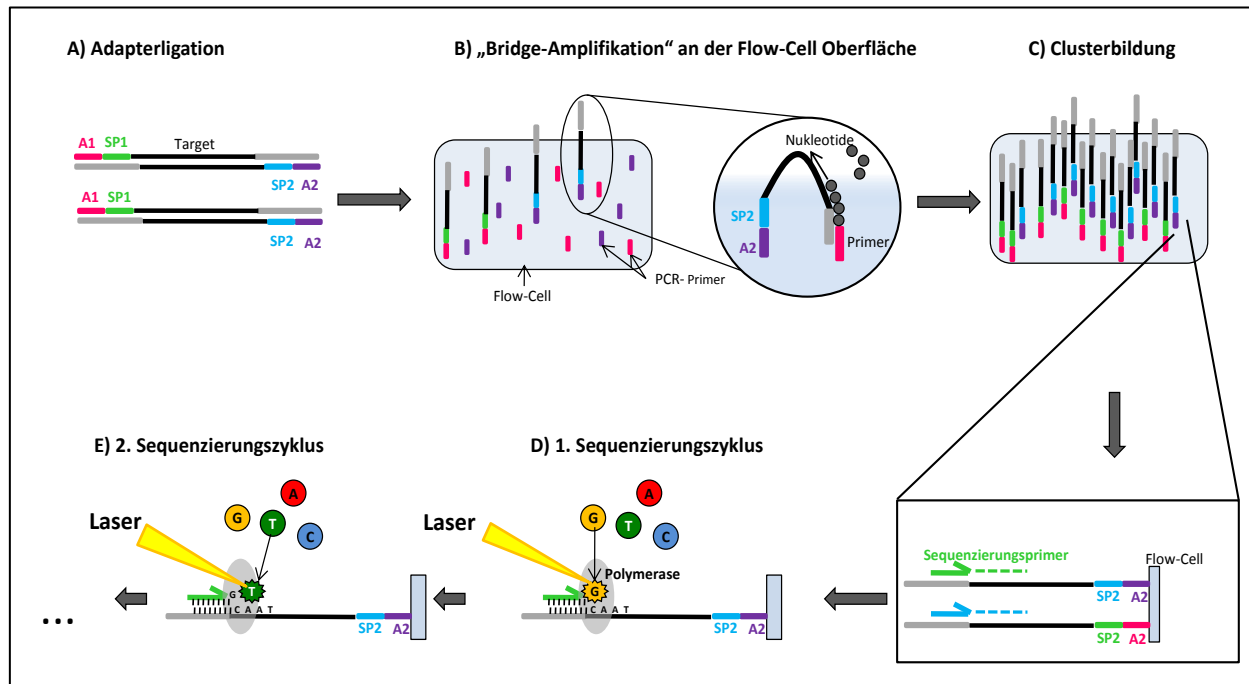


Abbildung 19: HiSeq-Verfahren von Illumina. **A)** Bei der Erstellung einer „paired-end-library“ werden Adapter an beide Enden der Target-PCR-Amplikate ligiert. **B)** Diese werden in zufälliger Reihenfolge an die „Flow-Cell-Oberfläche“ geheftet. **C)** Mittels einer sogenannten Brückenamplifikation werden zahlreiche dichtgepackte Cluster auf der Flow-Cell für die anschließende Sequenzierungsreaktion erzeugt. **D)** und **E)** Nach jedem Sequenzierungszyklus, bei dem die vier Nukleotide ATCG hinzugefügt werden, erfolgt ein Detektionsschritt (modifiziert nach Mardis et al., 2008 [245]).

Die Durchführung dieser Sequenzierung erfolgte bei der Firma ATLAS Biolabs, Berlin, Deutschland.

2.2.5.5 Auswertung von Next-Generation-Sequencing-Daten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sequenzierungen mittels 454 Life Science von der Firma Roche zur Quantifizierung von DNA-Methylierung genutzt. Die Ergebnisse dieser Methylierungs-Studie konnten bereits veröffentlicht werden, so dass die Auswertungen dieses Datensatzes in Abschnitt 3.1 nachzulesen sind. Darüber hinaus wurde die 454 Sequenzierung im Rahmen des „HämatoSys“-Projektes zur *IGH*-Mutationsanalyse und Rekonstruktion der klonalen Evolution bei Verlaufsproben von t(14;18) positiven FL eingesetzt. Auf diese Rekonstruktionen der klonalen Evolution und Identifizierung der phylogenetischen Beziehungen von Tumorklonen wird in Abschnitt 2.2.5.6 eingegangen. Die Sequenzierungen mittels HiSeq von Illumina erfolgten ebenfalls im Rahmen des „HämatoSys“-Projektes und dienten dem Nachweis somatischer Mutationen von ausgewählten Kandidatengenen. Die

Material und Methoden

bioinformatische Auswertung dieses Datensatzes wurde von Dipl. Inf. Markus Kreuz, Institut für medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE), Universität Leipzig, durchgeführt und wird im Folgenden erläutert.

Abgleichen der Sequenzen mit dem humanen Genom (Alignment)

Der von ATLAS-Biolabs erhaltene Datensatz umfasste fastq-, bam- und bai-Dateien. Zum Abgleichen der Einzelsequenzen (Reads) auf das humane Genom (hg19) wurde von Dipl. Inf. Markus Kreuz der „Segemehl-Algorithmus“ [246] mit „Default-Parametern“ verwendet. Anschließend wurde das Samtool mpileup Version 0.1.18 [247] angewendet. Die maximale Coverage betrug „-d“= 8 000 Reads. Positionen mit einer Abdeckung weniger als 1 000 Sequenzen, sowie Insertionen und Deletionen (InDels) wurden ausgeschlossen. Für jede Position wurden dann die Anzahl des Referenz und des alternativen Allels bestimmt. Dieses erfolgte separat für den Vorwärts- und Rückwärtsstrang. Es wurden ausschließlich hochqualitative Basen (HQ-Basen) mit einem Phred Qualitäts Score Q größer als 13 gewertet. Von den HQ-Basen mit einem mit $Q \geq 13$ wurden Positionen mit weniger als 500 HQ-Basen ausgeschlossen.

Qualitätsanalyse und Identifizierung der Varianten (Variant calling)

Für die Identifizierung der Varianten („Calling“) wurde das am häufigsten vorkommende alternative Allel für jede Position in jeder Patienten-Probe ermittelt. Anschließend wurde ein Filter angelegt, der alle Positionen mit einer Abdeckung („Coverage“) größer als 1 000 bp und einer hochqualitativen – Abdeckung („High-Quality Coverage“) größer als 500 bp berücksichtigt. Eine Position wird dann als „Variante“/Mutation angezeigt, wenn mehr als 10 % aller hochqualitativen Basen ein übereinstimmendes alternatives Allel aufweisen. Nach dem „Calling“ erfolgte für jede Position ein Abgleich mit der HAPMAP-CEU Datenbank und der dbSNP build 135.

Einführung weiterer Filterkriterien zur Identifizierung der Varianten

Um zu verhindern, dass falsch positive Varianten identifiziert werden, wurden zur Verbesserung der Spezifität weitere Qualitätsfilter angewendet. Varianten in Regionen, die im UCSC Genome Browser als „Repeat“ gekennzeichnet sind, sowie Positionen mit mehr als 50 % niedrigqualitativer Sequenzen, wurden ausgeschlossen. Desweiteren wurden die Varianten ausgeschlossen, bei denen der Anteil von Sense- und Antisense-Strang nicht ausgeglichen war und die logOR von mutierten und Wildtyp-Sequenzen größer sechs ($\log OR > 6$) betrug. Zusätzlich wurden funktionale Annotationen für jede Position mittels vcfCodingSnps version 1.5 (<http://genome.sph.umich.edu/wiki/vcfCodingSnps>) hinzugefügt und alle Angaben in einer Excel-Tabelle zusammengestellt. Diese Excel-Tabelle war Grundlage für die von mir durchgeführten Auswertungen in Abschnitt 3.3.3.

2.2.5.6 Rekonstruktion der klonalen Evolution basierend auf dem VDJ-Rearrangement

An dem Probenkollektiv wurden *IGH*-Mutationsanalysen zur Erstellung phylogenetischer Bäume zur Rekonstruktion der klonalen Evolution durchgeführt. Diese Analysen und Auswertungen erfolgten im Rahmen des HämatoSys-Projektes und wurden in der II. Medizinischen Klinik (Hämatologie/Onkologie) am Campus Kiel des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Zusammenarbeit mit Christian Arnold aus der Bioinformatischen Gruppe, Abteilung für Computerwissenschaft und interdisziplinäres Zentrum für Bioinformatik, Universität Leipzig erstellt. Dazu erfolgte nach Amplifikation des klonalen *IGH*-Rearrangements eine Subklonierung des klonalen *IGH* zur Sequenzvereinzelung in einen TOPO-TA-Vektor mit anschließender Isolierung und Direktsequenzierung mittels Sanger auf einem Applied Biosystems 3500 8-Kapillarsequenzierer. Alle generierten Sequenzen wurden manuell ausgewertet, auf Lesefehler kontrolliert und mittels ClustelW-Software aligned.

Zusätzlich konnte an der DNA bei 12/23 Patienten Hochdurchsatz-Sequenzierungen mittels 454-Technologie von der Firma Roche (Abschnitt 2.2.5.4.1) durchgeführt werden. Für alle Einzelsequenzen einer Probe (durchschnittlich 20 000 Reads) wurde zunächst eine de novo Konsensus-Sequenz des dominanten Klons generiert. Dazu wurde die dominante Sequenz aus allen generierten Reads einer Probe mit Hilfe von selbstgeschriebenen Perl-Skripten herausgefiltert. Auf Basis dieser Referenz-Sequenz wurde mittels samtools (www.samtools.sourceforge.net) das Alignment indexiert und mit weiterentwickelten Java-Programmen (u.a. Alt Splice Motif) nach dem semiglobalen Alignment-Algorithmus gegen alle Reads mit Berücksichtigung des Vorwärts- und Rückwärts-Strangs aligned. Die Kriterien für die Auswahl der Reads für die weiterführenden Analysen basierten auf der Definition von Campell et al. [210] und wurden auf die verwendete Junior Plattform von der Firma Roche adaptiert und validiert. Für jeden Read war mindestens eine 95 % ige Übereinstimmung mit der generierten Konsensus-Sequenz erforderlich. Detektierte Mutationen in der Sequenz wurden nur an Positionen akzeptiert, in denen die abweichende Basenposition in mehr als 1 % der gesamten Sequenzen von der Konsensus-Sequenz abweicht. Anschließend wurden alle Sequenzen mit einem in JAVA entwickelten Programmen ausgewertet, die verifizierten Mutationen ausgelesen und jeweils zu einer Haplotypen-Sequenz zusammengeführt. Fraglich zugeordnete Regionen wurden manuell bewertet. Basierend auf diesem Alignment wurden die Evolutionsbäume nach der Methode der größten Wahrscheinlichkeit mittels RAxML 7.30 [248] erstellt. Diese Evolutionsbäume stellen die phylogenetischen Beziehungen der Tumorklone, basierend auf Ähnlichkeiten unter den Sequenzen, dar. Jeder Ast entspricht einer Sequenzvariante. Ähnliche Sequenzen liegen dicht nebeneinander, wohingegen sehr unterschiedliche Sequenzen sehr weit voneinander entfernt dargestellt werden. Nachdem der wahrscheinlichste Baum generiert wurde, wurde die Astlänge entsprechend angepasst, indem die erwartete Gesamtanzahl von

Mutationen für eine Position berücksichtigt wurde. Die Daten aus der Klonierung und anschließender Sanger-Sequenzierung wurden dann mit denen aus der 454-Sequenzierung verglichen.

2.2.6 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung und die Berechnung der p-Werte habe ich mittels R-Software (<http://www.r-project.org/>) durchgeführt.

- Die Korrelation zwischen den DNA-Methylierungswerten der 27K und 450K Methylation BeadChip Analyse wurde nach der Spearman rank-Methode überprüft. Der Korrelationskoeffizient „rho“ wurde angegeben.
- Zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung der DNA-Methylierungswerte bei FLIS und klassischen FL wurde der Wilcoxon signed-rank Test für gepaarte Proben angewendet.
- Der Kruskal-Wallis-Test wurde genutzt, um die Signifikanz der Übereinstimmung unter den drei identifizierten Evolutionstypen zu überprüfen.
- Mittels Mann-Whitney-Test wurde die Signifikanz der Übereinstimmung der DNA-Methylierungswerte bei unabhängigen Proben zwischen FLIS und PFL durchgeführt.
- Mittels t-Test wurde geprüft, ob sich die Mittelwerte zweier unabhängiger Proben unterscheiden, in diesem Fall die DNA-Methylierungswerte der 450K Analyse bei Patienten mit einem parallelen Evolutionstyp und denen mit „keiner Evolution“.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL. Im Fokus der Arbeit stand die klonale Evolution von t(14;18) positiven Keimzentrums-B-Zellen, beginnend in einem frühen Entwicklungsstadium bis hin zu einem ausgereiften FL und dem Rezidiv. Bisher sind die Zusammenhänge zwischen den genetischen und epigenetischen Veränderungen im Verlauf der Tumorentwicklung von t(14;18) positiven FL noch nicht aufgeklärt. Die DNA-Methylierung stellt dabei als epigenetischer Regulator der Genaktivität die Brücke zwischen Genom, Umgebung und Erkrankung her und könnte maßgeblich zur Aufklärung der Tumorentwicklung bei FL beitragen. Um die intra- und interklonalen Veränderungen der DNA-Methylierung während der Tumorprogression zu untersuchen und phylogenetische Beziehungen der Tumorevolution zu charakterisieren, wurden NGS-Methoden angewendet. Zum Einsatz kam ein Mikro-Droplet-basiertes Anreicherungsverfahren mit anschließender Sequenzierung der Proben mittels 454-Technologie (Firma Roche). Zur Analyse der frühen Entwicklungsstufen wurden FLIS und PFL, sowie gepaarte Proben von FLIS und klassischen FL hinsichtlich sekundärer genomischer Mutationen und Veränderungen im DNA-Methylierungsprofil analysiert. Um die epigenetischen und genetischen Veränderungen im Progress der Tumorevolution zu identifizieren und Zusammenhänge zu charakterisieren, wurden Verlaufsproben (Initial-, Rezidivtumor) von Patienten mit einem FL untersucht. Zum technischen Einsatz der Untersuchung von DNA-Methylierung kamen hier sowohl LUMA, die Bisulfit-Pyrosequenzierung als auch der HumanMethylation Bead Chip von Illumina. Basierend auf der Erkenntnis, dass SHM nicht nur an IG vorkommt und es zudem möglicherweise potenzielle „Driver-Mutationen“ gibt, die in Verbindung mit verschiedenen genomischen und epigenomischen Evolutionsstrukturen stehen, wurden die Häufigkeiten somatischer Mutationen in ausgewählten genomischen Bereichen von Kandidatengenomen analysiert. Diese Analysen erfolgten in einem NGS-basierten Ansatz aus Mikro-Droplet Anreicherung und HiSeq-Sequenzierung (Illumina).

Der Ergebnisteil ist in folgende Abschnitte gegliedert:

- Abschnitt 3.1: Beschreibung eines neuen methodischen Ansatzes zur Untersuchung von inter- und intraklonalen Veränderungen der DNA-Methylierung in Tumoren mittels Next-Generation-Sequencing
 - 3.1.1: Manuskript 1: Pipeline for Large-Scale Microdroplet Bisulfite PCR-based Sequencing allows the tracking of Hepitype Evolution in Tumors“ publiziert in PLoS One. 2011;6(7):e21332.

Ergebnisse

- 3.1.2: Zusätzliche Ergebnisse: „klassische“-PCR-basierte Anreicherung genomischer Regionen zur Qualitätssicherung von 454-Next-Generation-Sequencing-Verfahren

- Abschnitt 3.2: Molekulargenetische Untersuchungen bei t(14;18) positiven Vorläuferläsionen zur Identifikation von genetischen und epigenetischen Veränderungen der Tumorevolution
 - 3.2.1: Manuskript 2: „A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma“ publiziert in Blood, 2011 118: 3442-3444.
 - 3.2.2: Zusätzliche Ergebnisse: *EZH2* Tyr641-Mutationsanalyse und Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung

- Abschnitt 3.3: Longitudinale Daten-Akquise zur Analyse der klonalen Tumorevolution bei t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen
 - 3.3.1: Rekonstruktion der klonalen Tumorevolution basierend auf Mutationsanalysen des V_H-Rearrangement
 - 3.3.2: Analyse der Veränderung der DNA-Methylierung im Verlauf der klonalen Tumorevolution
 - 3.3.3: Analyse der Häufigkeiten somatischer Mutationen bei Kandidatengenem im Verlauf der klonalen Tumorevolution
 - 3.3.4: Zusammenfassung der Ergebnisse aus der longitudinalen Daten-Akquise zur Analyse der klonalen Tumorevolution bei t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen

3.1 Beschreibung eines neuen methodischen Ansatzes zur Untersuchung von inter- und intraklonalen Veränderungen der DNA-Methylierung in Tumoren mittels Next-Generation-Sequencing

Um sowohl intra- als auch interklonale Veränderungen der DNA-Methylierung und die phylogenetischen Beziehungen von Tumorklonen bei Initial- und Rezidivtumoren von t(14;18) positiven FL zu untersuchen, sollten auch seltene Varianten, die mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % in den Tumorzellen vorkommen, detektiert werden. Im Gegensatz zu Analysen zur Detektion der DNA-Methylierung, die z.B. auf einem enzymatischen Verdau oder der Affinitätsanreicherung beruhen, bieten NGS-basierte Methoden die Möglichkeit, ausgewählte Zielregionen, aufgrund der größeren Anzahl generierter Sequenzen, in einer größeren Tiefe zu analysieren.

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen neuen methodischen Ansatz zum Nachweis der inter- und intraklonalen Veränderungen an Bisulfit-konvertierter DNA zu etablieren, um die Veränderungen der DNA-Methylierung nachzuweisen. Dabei sollte die zur Amplifikation eingesetzte Technologie in der Lage sein, Allele, die sich in einer oder mehreren Basen unterscheiden, ohne signifikante Bevorzugung anzureichern. Für eine technische Validierung sollten diese Analysen nicht nur an lymphatischen Tumoren und Leukämien, sondern auch an soliden Tumoren, hier Kolon-Karzinome, durchgeführt werden. Meine Aufgabe bestand darin, die zu analysierenden Genorte bei t(14;18) positiven FL auszuwählen und anschließend die Primer, komplementär zu Bisulfit-konvertierter DNA, zu designen. Da es sich um einen neuen methodischen Ansatz zum Nachweis der inter- und intraklonalen Veränderungen an Bisulfit-konvertierter DNA handelt, ist es für die Qualitätssicherung essenziell, eine Validierung mit einer weiteren konventionellen Methode durchzuführen. Deshalb war es meine Aufgabe, die von mir designten Primer in einem herkömmlichen PCR-basierten Amplifikations-Verfahren auf ihre Einsatzmöglichkeit zu testen, bevor sie für das NGS genutzt werden. Weiterhin bestand meine Aufgabe darin, die Proben für die NGS-Analysen, einschließlich der Behandlung mit Natrium-Bisulfit, vorzubereiten, sowie die anschließenden Validierungsanalysen mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung am gesamten Probenkollektiv durchzuführen. Abschließend habe ich mit den anderen Autoren das Manuskript verfasst. Das Projekt wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Jochen Hampe, Klinik für innere Medizin I, Campus Kiel des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein durchgeführt, welche die bioinformatische Logistik bereitstellte.

In dieser Studie wurden Verlaufspalten von Primär- und Rezidivtumoren von Patienten mit einem FL (n=6 Proben von 3 Patienten), sowie Proben von Patienten mit einem Kolon-Karzinom (n=8 Proben von

Ergebnisse

4 Patienten) und Blut-Proben von Patienten mit einer CLL (n=6 Proben von 6 Patienten) analysiert. Die anschließende Sequenzierung mittels 454 wurde in diesem Pilot-Projekt an vier Proben (n=2 FL-Proben, n=2 Kolon-Karzinom-Proben) exemplarisch durchgeführt. Basierend auf bekannten Veränderungen des jeweiligen Genortes in den lymphatischen oder soliden Tumoren wurden die jeweils zu analysierenden genomischen Regionen ausgewählt. Da mein Fokus in dieser Studie auf den FL lag, wird im Folgenden auf die Auswahl der zu untersuchenden Regionen in diesen Tumoren eingegangen. Um phylogenetische Beziehungen der Tumorklone anhand des DNA-Methylierungsmusters im Verlauf der Tumorentwicklung bei t(14;18) positiven FL charakterisieren zu können, habe ich repräsentative Kandidatengene ausgewählt, die bereits in der Literatur im Zusammenhang mit Veränderungen der DNA-Methylierung bei FL beschrieben wurden. Dabei sollte ein hoher CpG-Gehalt berücksichtigt werden, so dass die Auswahl der zu untersuchenden Regionen insbesondere CpG-Inseln bekannter Gene betraf. Die Auswahl der Gene erfolgte basierend auf den Ergebnissen einer Studie von Martin-Subero et al., 2009 [249], in der eine genomweite DNA-Methylierungsstudie an 83 reifen B-Zell-Lymphomen (u.a. t(14;18) positive BL und DLBCL) im Vergleich zu Normalkontrollen durchgeführt wurde. In dieser Studie wurden Gene identifiziert, die in den Tumoren, aber nicht in den Kontrollen methyliert sind. Diese, als „*de novo* methyliert“ bezeichneten, Gene wurden der Table S7 der Publikation [249] entnommen. Als Kontrolle wurden bekannte Genorte, z.B. imprintete Genorte, die in den sog. DMRs (differenziell methylierten Regionen) eine vom elterlichen Ursprung abhängige allelspezifische Methylierung aufzeigen, als auch methylierte- und unmethylierte Gene aus derselben Studie ausgewählt, die ebenfalls in der Table S7 [249] gelistet waren. Von insgesamt 80 Genen konnte ich mittels PyroMark Design Software (Version 2.0)(Abschnitt 2.2.4.7) 160 PCR-Primer für die Analyse von Bisulfit-konvertierter DNA erstellen. Nach Austestung in einem herkömmlichen PCR-basierten Amplifikationsverfahren für Bisulfit-konvertierte DNA (Abschnitt 2.2.4.7) wurden für 56 Primerpaare (entsprechen 112 PCR-Primer, table S2 [218]) die PCR-Bedingungen etabliert, die in der Gelelektrophorese eine spezifische Bande aufzeigten. Für die nicht lymphom-spezifischen Genorte erfolgte die Etablierung der Primersequenzen über ein in-silico-basiertes Verfahren von Herrn Alexander Herrmann (siehe Manuskript). Die Gesamtheit aller Primersequenzen waren die Grundlage für die NGS-Anreicherung und anschließende Sequenzierung. Es wurde ein Mikro-Droplet-basiertes Amplifikationsverfahren von RainDance Technologies (siehe Abschnitt 2.2.5.4) zur Anreicherung der Zielsequenzen verwendet. Weitere Informationen sind dem Manuskript zu entnehmen.

3.1.1 Manuskript 1: Pipeline for Large-Scale Microdroplet Bisulfite PCR-based Sequencing allows the tracking of Hepitype Evolution in Tumors

publiziert in PLoS One. 2011;6(7):e21332. Epub 2011 Jul 5.

In der folgenden publizierten Arbeit (Manuskript 1: Pipeline for Large-Scale Microdroplet Bisulfite PCR-based Sequencing allows the tracking of Hepitype Evolution in Tumors) konnten wir erstmals zeigen, dass sich mittels eines Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahrens und anschließender NGS mittels 454-Technologie (Firma Roche) phylogenetische Beziehungen von Tumorklonen anhand des DNA-Methylierungsmusters an Bisulfit-konvertierter DNA charakterisieren lassen. Im Folgenden werden diese phylogenetischen Beziehungen als „Hepityp“-Strukturen bezeichnet. Auf die genaue Definition eines „Hepityps“ wird erst in Abschnitt 4.2.1 eingegangen. Die Identifikation der phylogenetischen Beziehungen erfolgte anhand der Ähnlichkeiten unter den Sequenzen, die innerhalb einer Tumorprobe für den jeweiligen Genabschnitt ermittelt wurden. Da es sich um die Analyse der DNA-Methylierung handelt, wurden ausschließlich die CpG-Positionen in dem jeweiligen Genabschnitt betrachtet. Ein methylierter Hepityp besteht demnach aus einer Sequenz mit überwiegend C-Nukleotiden (C-Hepityp), wohingegen ein unmethylierter Hepityp überwiegend T-Nukleotide (T-Hepityp) enthält. Die Anzahl der detektierten Sequenzen (Reads) kongruiert mit der relativen Häufigkeit eines Hepityps.

Da der Fokus dieser Arbeit auf den t(14;18) positiven FL liegt, werde ich im Folgenden auf die Ergebnisse dieser lymphatischen Tumoren eingehen. Für den Fall Nr. 17 (MPI-770/ MPI-828) sind im Manuskript die intra- und interklonalen Veränderungen der DNA-Methylierung an drei repräsentativen genomischen Regionen (*SNRPN*, *FGF6* und *HS3ST2*) beispielhaft dargestellt. Die differenziell methylierte Region von dem imprinteten Genort *SNRPN* ist bei gesunden Individuen, aufgrund des biparentalen Ursprungs, hemimethyliert. Da ein imprintetes Gen entweder vom paternalen oder vom maternalen Allel exprimiert wird, würde man bei *SNRPN* erwarten, dass 50 % aller Allele methyliert sind bzw. 50 % aller Allele unmethyliert sind. Mittels des in dieser Studie Verfahrens identifizierten wir in den untersuchten Proben bei *SNRPN*, dass der unmethylierte T-Hepityp (identifizierte Sequenz enthält nur T-Nukleotide) 39 % und der methylierte C-Hepityp (identifizierte Sequenz enthält nur C-Nukleotide) 55 % aller analysierten Sequenzen ausmacht (siehe Manuskript, figure 5 A). Interessanterweise kamen darüber hinaus in diesem Genort unmethylierte CpG-Positionen in dem methylierten (C)-Hepityp signifikant häufiger vor als methylierte CpG-Positionen in dem unmethylierten (T)-Hepityp ($p < e^{-15}$). Diese Diskrepanzen sind möglicherweise auf den natürlichen DNA-Methylierungsvorgang durch die DNMT zurückzuführen. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die von der aktiven DNA-Methyltransferase gesteuerten Prozesse zur Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung anfällig für Fehler in somatischen Zellen sein können.

Ergebnisse

FGF6 und *HS3ST2* sind Genorte, die in der Studie von Martin-Subero et al. als unmethyliert bzw. methyliert in den analysierten Kontrollen und B-Zell-Lymphomen identifiziert wurden. Anhand der unterschiedlichen Häufigkeiten der methylierten und unmethylierten Hepitypen in diesen beiden Genorten konnten die Veränderungen der DNA-Methylierung zwischen der Initial- und Rezidivtumorprobe der FL im Verlauf der Evolution gezeigt werden. Die Hepityp Strukturen bei *HS3ST2* zeigten einen Zugewinn an DNA-Methylierung im Verlauf der Tumorevolution. Während in der Initialprobe der methylierte Hepityp 21 % und der unmethylierte Hepityp 51 % aller analysierten Sequenzen ausmachte, wurden in dem Rezidiv 81 % des methylierten und 11 % des unmethylierten Hepityps identifiziert. Gegenteiliges, und somit ein Verlust an DNA-Methylierung im Tumorprogress, wurde bei *FGF6* detektiert. Während in dem Rezidiv die Frequenz des unmethylierten Hepityps von 16 % auf 34 % zunahm, reduzierte sich die Frequenz des methylierten Hepityps im Initialtumor von 50 % auf 38 % aller analysierten Sequenzen. Darüber hinaus konnte identifiziert werden, dass die telomerisch gelegene demethylierte Position bei *FGF6* deckungsgleich mit einer TAF1-Bindestelle für den Transkriptionsfaktor TAF1 ist. Kurz gefasst dienen *FGF6* und *HS3ST2* als Beispiel dafür, sowohl interklonale Veränderungen hinsichtlich Verlust und Zugewinn von DNA-Methylierung im Verlauf der Tumorentwicklung zu analysieren als auch intraklonalen Veränderungen anhand der Hepitypstrukturen zu erkennen und funktionell relevante Positionen zu identifizieren.

Zur Validierung wurden die mittels NGS erhobenen DNA-Methylierungswerte von 248 CpG-Positionen von 16 genomischen Regionen mit den erhobenen DNA-Methylierungswerten aus der Bisulfit-Pyrosequenzierung verglichen. Die erzielten Resultate beider Methoden zeigten eine große Übereinstimmung, der Spearman rank Koeffizient rho betrug 0,87 (siehe Manuskript, figure 4 A). Darüber hinaus wurde am Beispiel von *IGF2* über die Berechnung des paarweisen Korrelationskoeffizienten die Reproduzierbarkeit der DNA-Methylierungswerte für den Vorwärts- als auch für den Rückwärtsstrang bestimmt. Für das Mikro-Droplet-basierte NGS betrug der paarweise Korrelationskoeffizient rho 0,96, während er für die Bisulfit-Pyrosequenzierung bei 0,88 lag (siehe Manuskript, figure 4b, c), welches insgesamt eine bessere Reproduzierbarkeit für das Mikro-Droplet-basierte NGS unter den Strängen schlussfolgern lässt.

Pipeline for Large-Scale Microdroplet Bisulfite PCR-Based Sequencing Allows the Tracking of Hepitype Evolution in Tumors

Alexander Herrmann^{1,9}, Andrea Haake^{2,9}, Ole Ammerpohl^{2,9}, Idoia Martin-Guerrero², Karol Szafranski³, Kathryn Stemshorn⁴, Michael Nothnagel⁵, Steve K. Kotsopoulos⁶, Julia Richter², Jason Warner⁶, Jeff Olson⁶, Darren R. Link⁵, Stefan Schreiber¹, Michael Krawczak⁵, Matthias Platzer³, Peter Nürnberg⁴, Reiner Siebert², Jochen Hampe^{1*}

1 Institute of Internal Medicine I, Christian-Albrechts University, Kiel, Germany, **2** Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts University, Kiel, Germany, **3** Genome Analysis Group, Fritz-Lipman Institute for Ageing Research, Jena, Germany, **4** Cologne Center for Genomics, University of Cologne, Cologne, Germany, **5** Institute of Medical Informatics and Statistics, Christian-Albrechts University, Kiel, Germany, **6** RainDance Technologies, Lexington, Massachusetts, United States of America

Abstract

Cytosine methylation provides an epigenetic level of cellular plasticity that is important for development, differentiation and cancerogenesis. We adopted microdroplet PCR to bisulfite treated target DNA in combination with second generation sequencing to simultaneously assess DNA sequence and methylation. We show measurement of methylation status in a wide range of target sequences (total 34 kb) with an average coverage of 95% (median 100%) and good correlation to the opposite strand ($\rho = 0.96$) and to pyrosequencing ($\rho = 0.87$). Data from lymphoma and colorectal cancer samples for *SNRPN* (imprinted gene), *FGF6* (demethylated in the cancer samples) and *HS3ST2* (methylated in the cancer samples) serve as a proof of principle showing the integration of SNP data and phased DNA-methylation information into “hepitypes” and thus the analysis of DNA methylation phylogeny in the somatic evolution of cancer.

Citation: Herrmann A, Haake A, Ammerpohl O, Martin-Guerrero I, Szafranski K, et al. (2011) Pipeline for Large-Scale Microdroplet Bisulfite PCR-Based Sequencing Allows the Tracking of Hepitype Evolution in Tumors. PLoS ONE 6(7): e21332. doi:10.1371/journal.pone.0021332

Editor: Qian Tao, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong

Received: January 13, 2011; **Accepted:** May 27, 2011; **Published:** July 5, 2011

Copyright: © 2011 Herrmann et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by the German Ministry for Education and Research through the German National Genome Research Network (NGFNplus) projects Colon Cancer Network “Oncogene”, and “EMINet”, through the Systems Biology Networks “HämatSys” and “Virtual Liver” and through “Services@MediGrid”. I. M-G. receives a stipend from the Government of the Basque Country. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: SK, JW, JO and DL are (or were at the time of the research) employees of RainDance Technologies.

* E-mail: jhampe@1med.uni-kiel.de

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Epigenetic mechanisms are key to the control of local transcriptional activity [1]. Methylation of cytosine residues at the carbon 5 position (5^mC) in the context of CpG motifs is one of the best studied epigenetic marks. DNA methylation in mammalian genomes can affect different genomic areas, such as repeat regions, gene promoters and the gene body. Whereas methylation of DNA repeats is assumed to regulate genome stability, DNA methylation of CpG islands in gene promoters and the gene proper have been inversely linked to gene expression [2,3].

Alterations in DNA methylation are not only crucial for normal development but are also characteristic of several physiologic and disease associated mechanisms, including ageing, imprinting defects and genomic instability syndromes [4]. Altered DNA methylation patterns have been particularly well studied in cancer [5,6,7]. Virtually all cancers are in some way associated with aberrant DNA methylation. High levels of DNA methylation at gene promoter regions have been described in hematologic neoplasms like germinal-center B-cell derived lymphomas and in solid tumors like colorectal, prostate and brain cancer [8,9,10]. Initially, altered methylation has been assumed to be one of the

key silencing mechanisms for tumor-suppressor-like genes [11]. Nevertheless, increasing evidence suggests that in cancer DNA-methylation is a phenomenon encompassing a wide array of gene types [10,12]. Remarkably, among methylation targets in various types of cancer, target genes of the polycomb repressive complexes (PRC1 and PRC2) in stem cells are strongly enriched. These genes regulate key developmental processes and play an important role in differentiation and the maintenance of cell fates [13,14,15]. Polycomb target gene methylation has been reported as a specific pattern of *de novo* methylation in cancer [16,17], although the stability and mechanistic interaction of this gene set in evolving cancer cells remains to be clarified [18].

Whereas much is known about the somatic patterns of DNA methylation in cancer only scarce data exist that link genetic (e.g. DNA based) predisposition to cancer to the somatic manifestation of clonal outgrowth. Given that many predisposing loci are associated with a restricted spectrum of cancers, it is intriguing to speculate that epigenetic factors are involved in the somatic manifestation of disease predisposition. This concept recently leads to the definition of “hepitypes”, i.e. the description of (DNA-based) haplotypes which change the local epigenetic landscape [19,20,21]. The analysis of such hepitypes may provide an in-

depth understanding of the biology of a given locus with a detailed analysis of both sequence variation and differential DNA methylation [3]. This is especially important in the context of the many large regions identified as polygenic risk factors for cancers such as colorectal, breast and prostate cancer through recent genome-wide association studies [22]. Ideally a parallel, deep analysis of somatic variation and methylation over continuous stretches of DNA should be conducted in order to understand the interaction of germline risk factors, somatic genetic and epigenetic evolution within the tumor [23,24], not the least because altered methylation may affect cytosine residues outside a CpG context [25].

A number of methodologies for the analysis of methylation in the human genome are available including assays based on enzymatic digestion, affinity enrichment and sodium bisulfite enrichment, which have been recently reviewed [26,27,28]. Although a number of methods have been developed in order to increase throughput and ease of methylation analysis, no universally applicable technology has emerged as of yet. One possible approach uses bisulfite conversion; i.e. treatment of genomic DNA with sodium bisulfite (BS) to convert cytosine, but not methylcytosine, to uracil, and subsequent sequencing. Single-base methylation analysis was previously achieved using this method for proportions of the human genome [29,30] and on a whole-genome level in *Arabidopsis thaliana* [31] and recently also in mammalian cells [25]. While these studies demonstrated the applicability of BS sequencing on the whole-genome level, some drawbacks including the cost of sequencing and bioinformatic alignment remain. Cost and coverage are particularly important if a quantitative assessment of the relative methylation of individual sites in a multiclonal tumor sample is attempted. We have thus adapted the recently described microdroplet PCR [32] to BS treated target DNA and established a pipeline for the simultaneous assessment of DNA sequence analysis and methylation and demonstrate the practical applicability using samples from colon cancer and follicular lymphomas.

Methods

Primer design pipeline for bisulfite-converted target DNA

Target regions for the methylation analysis with a total of 34083 base pairs of sequence were selected as detailed in Table S1. Forward and reverse strands of the target sequence were bisulfite converted *in silico*. The converted DNA was fragmented *in silico* into 200, 300 or 400 bp segments using a spacing of 5 bp. These segments were submitted to Primer3 [33] using the following parameters: target primer melting temperature $56 \pm 2^\circ\text{C}$, maximal difference between primer melting temperature 2°C , optimal primer size 20 bp [min = 18, max = 25], optimal GC content 60°C [min = 20°C , max = 90°C] and amplicon range search segment size ± 50 bp. For each sequence segment, the five best primer pairs based on the Primer3 quality score were selected. In order to minimize allelic amplification bias, primers covering the location of a HapMap annotated SNP with a minor allele frequency >0.1 or a CpG island were removed. Redundant primer pairs were eliminated and the remaining primers checked by e-PCR [34] against the whole bisulfite converted genome. All primer pairs yielding off-target products of up to 2 kb were filtered out. Using a target coverage of 2-fold for the 300 bp design and a 3-fold coverage for the 200 bp and 400 bp amplicon design, primers were each selected by increasing GC-content to the desired coverage. For regions, where the above described criteria failed to produce the target coverage, the melting temperature criteria were relaxed to $56 \pm 6^\circ\text{C}$ and the procedure repeated. A list of all primer pairs and their normalized sequencing yield is provided in Table

S2, thus providing an indication of efficiency for each PCR and sequencing reaction.

Design pipeline for non-converted DNA

Chromosomal coordinates (NCBI build 36/hg18) for the target regions were submitted to the RainDance Technologies primer design pipeline as described [32]. In brief, PCR primer pairs were designed for the target regions using a Primer3-based algorithm [33]. Known SNPs were masked prior to PCR primer design (dbSNP 129). PCR primers were designed to have a melting temperature (T_m) of $58^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ with an optimal length of 20 bases and an upper amplicon size of 600 base pairs. For target regions which were greater than 600 bp or for which a single amplicon of 600 bp was not able to be designed within parameters, an amplicon tiling strategy was used to cover the region. All PCR primer pairs were checked by *in silico* PCR [35] to identify regions of the genome other than the intended target region which could potentially be amplified. A total of 249 PCR primer pairs were designed that covered the entire 58716 bp of the target region and thus slightly more sequence than the converted design. All CpGs that are created through allelic variation in the samples are marked separately in Table S3. An overview of all variants detected in this study is provided in Table S4.

Samples and bisulfite conversion

For the proof of principle experiments, DNA was prepared from tumor (CRC-TU) and normal tissue (CRC-NT) in a 65 year old male colon cancer patient. The cancer showed no evidence of microsatellite instability. In addition, we studied two lymph node specimens of a female patient initially diagnosed at age 60 years with follicular lymphoma (FL) stage IV with bone marrow involvement [36]. The specimens analyzed were diagnosed with typical FL1/2 obtained at relapse after partial remission achieved with anthracycline-containing chemotherapy one (FL-R1) and four (FL-R2) years after initial diagnosis. The FL hallmark translocation t(14;18)(q32;q21) was detected by FISH using the LSI IGH/BCL2 probe (Abbott) in 39% and 84% of nuclei in the both samples, respectively. Breakpoints affecting the BCL6 and MYC loci as well as IGH-MYC fusion were absent in both specimens by interphase FISH using commercially available probes (LSI BCL6 BAP, LSI MYC BAP, LSI IGH/MYC all of Abbott). Lymphoma cells expressed CD20, CD10, BCL2 and BCL6 in accordance with the diagnosis. Tissues samples were used in accordance with the protocols of the Colon Cancer Network and HämatoSys Networks for which IRB approval of the Ethics Committee of the Medical Faculty of the Christian-Albrechts-University Kiel was obtained. All sample DNAs were bisulfite converted using the EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. A verification of successful bisulfite conversion is shown in Figure S1.

Droplet PCR and Optimization

PCR primers designed to amplify the desired target regions from bisulfite treated DNA were synthesized, emulsified into a primer droplet library and merged with the target DNA of interest on the RDT 1000 instrument (RainDance Technologies, Lexington, MA/USA) as described [32]. In order to optimize both template buffer conditions and PCR cycling conditions, several sequence enrichment merges were performed varying both the MgSO_4 concentrations and the annealing temperature. Following amplification and breaking of the emulsion, the sequence enriched amplicons were purified over a Qiagen MinElute column (Qiagen AG, Hilden, Germany) and eluted in 11 μL of EB buffer from the Qiagen kit. One μL of the eluted amplicons was run on an Agilent

Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, Ca/USA). The optimal annealing temperature and MgSO_4 concentration was determined by comparing the relative amplicon yields between samples at different annealing temperatures and MgSO_4 concentrations and by the amount of background noise generated by comparing the actual Agilent Bioanalyzer profiles to the calculated peak profile. The calculated peak profile is a graphical representation of the expected shape of the Agilent Bioanalyzer peak profile created by generating a histogram from the known amplicon sizes and numbers (Figure 1, Panel A). The shape of the peak profile represents what the Agilent Bioanalyzer profile should look like if all amplicons designed are present at equimolar concentrations. Figure 1 shows both the calculated peak profile (Panel A) and the actual Agilent Bioanalyzer traces for the merged samples run at different annealing temperatures (Panel B). At an annealing temperature of 50°C, the expected amplicon profile is present, however, there is a large amount of background noise present presumably due to off target amplification products at this lower annealing temperature. As the annealing temperature is increased, the background noise is decreased until it disappears at an annealing temperature of 56°C. Increasing the temperature to 58°C only decreases the amplicon yield from 307 ng to 215 ng without changing the background noise. Using this data an annealing temperature of 56°C was selected. The same procedure was used to determine the optimal MgSO_4 concentration by keeping the annealing temperature constant at 56°C and varying the MgSO_4 concentration from 1.8 mM to 2.5 mM (data not shown). Using this method it was determined that the optimal MgSO_4 concentration for PCR amplification at an annealing temperature of 56°C for this primer droplet library was 2.5 mM.

Library sequencing

Sequencing libraries were prepared according to Roche's rapid library preparation method manual (Roche, Hartford, CT/USA, release October 2009) with the following modifications: 134–288 ng of non-converted or bisulfite-converted micro droplet PCR products were used as starting material. The samples were directly subjected to fragment end repair (step 3.2) without prior nebulisation. Roche's MID-containing rapid-adapters were ligated to the samples. The fragment removal step (step 3.5) was replaced by purification with AmPure beads in order to remove excess adaptors but to retain the smaller RainDance products. The sample volume was adjusted to 50 µl with EB-Buffer (Qiagen) and the sample was added to 90 µl of AmPure XP beads (Agencourt Biosciences, Beverly, MA/USA). The sample was vortexed and incubated for 5 min at room temperature. The tube was placed for 3 min on a magnetic particle concentrator to pellet the beads. The supernatant was removed and the beads were washed two times with 500 µl 70% ethanol. Residual ethanol was removed by incubation at 37°C for 15 min. The purified sample was eluted with 50 µl TE-Buffer. Rapid libraries were quantified and diluted according to the rapid library protocol. Equal quantities of the non-bisulfite-converted samples were pooled. Titrations of the single bisulfite-converted libraries and the pooled non-bisulfite-converted libraries were performed according to Roche's emPCR method manual-Lib-L SV (October 2009). For the final bead enrichment (according to Roche's emPCR method manual-Lib-L LV, October 2009) a copy-per-bead ratio of 0.5 was used for the bisulfite-converted libraries and a copy-per-bead ratio of 1.5 was employed for the non-bisulfite-converted pool yielding enrichment rates between 7% and 12%. For each bisulfite-converted library and the pool of non-bisulfite-converted libraries a full sequencing run was performed according to Roche's protocol (Sequencing Method

Manual, October 2009). Since reads from the non-bisulfite converted sample FL-R2 were underrepresented, sequencing of this library was repeated individually on 1/2 sequencing plate. Read data was extracted using the shotgun setting of the Roche analysis module.

Analysis Pipeline

The data from the unconverted libraries were analysed as described previously [32]. The sequence reads from the converted libraries were compared to the total primer library using the string-search algorithm suggested by Ukkonen [37] allowing for a maximum of two differences per primer. Sequences without matches in the primer library, accounting for approximately 5% of reads, were eliminated. Subsequently, each sequence read was aligned to all potential amplicons compatible with the primer sequences using a modified dynamic programming alignment algorithm [38]. All sequence reads yielding a minimum of 50 matching bases and greater than 95% sequence identity to a target amplicon were selected for further analysis. This criterion was chosen in accordance to previous publications [38] to allow for variation (i.e. the 95% identity criterion to allow for differential methylation or SNPs) by requiring a minimum matching sequence length to assure the amplicon assignment. We frequency of mismatches to the predicted converted and unconverted amplicon sequence is depicted in Figure S2. It is evident, that the 95% criterion used typically in SNP discovery experiments is suitable for the converted amplicon reads as well. Using this filter criterion, a further 30–40% of reads were eliminated. Ambiguous reads mapping to different regions of the target sequence were filtered out, too. Primer sequences were removed before methylation scoring. Cytosine methylation in the mapped reads was assessed as the ratio of C to T in the aligned sequences. An overview of the raw sequence reads and the proportion used for final analysis is provided in Table 1. The software and example datasets are available for anonymous download at (<http://gengastro.1.med.uni-kiel.de/suppl/methyl454/>).

Analysis of methylation using bisulfite pyrosequencing

Analysis of methylation was performed via bisulfite pyrosequencing as described previously [8,39]. Primers were designed using the PyroMark Assay Design Software (Version 2.0). The amplification reaction was performed using the PyroMark PCR Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufactures instructions.

Hepitypes and tree analysis

For each locus of interest only continuous sequence reads covering the region of interest were considered. Only hepitypes with a frequency above 1% frequency in the observed reads for a given sample were considered. Phylogenetic trees were fitted using unrooted maximum-parsimony methods as implemented in Phylip 3.69 (<http://evolution.gs.washington.edu/phylip.html>) with default parameters. Reproducibility of the phylogenetic trees was assessed using 1000 bootstrap samples. To investigate the hypothesis that single unmethylated sites occur on the background of all-C hepitypes at the same frequency as single methylated sites do on the background of all-unmethylated hepitypes, a 2×2 count table of deviating sites was constructed. To this end, counts of methylated/unmethylated hepitypes without any deviating site formed the first column, whereas hepitype counts with at least one site deviating from the all-methylated/all-unmethylated background entered the second column. Fisher's exact test was then performed on this 2×2 table.

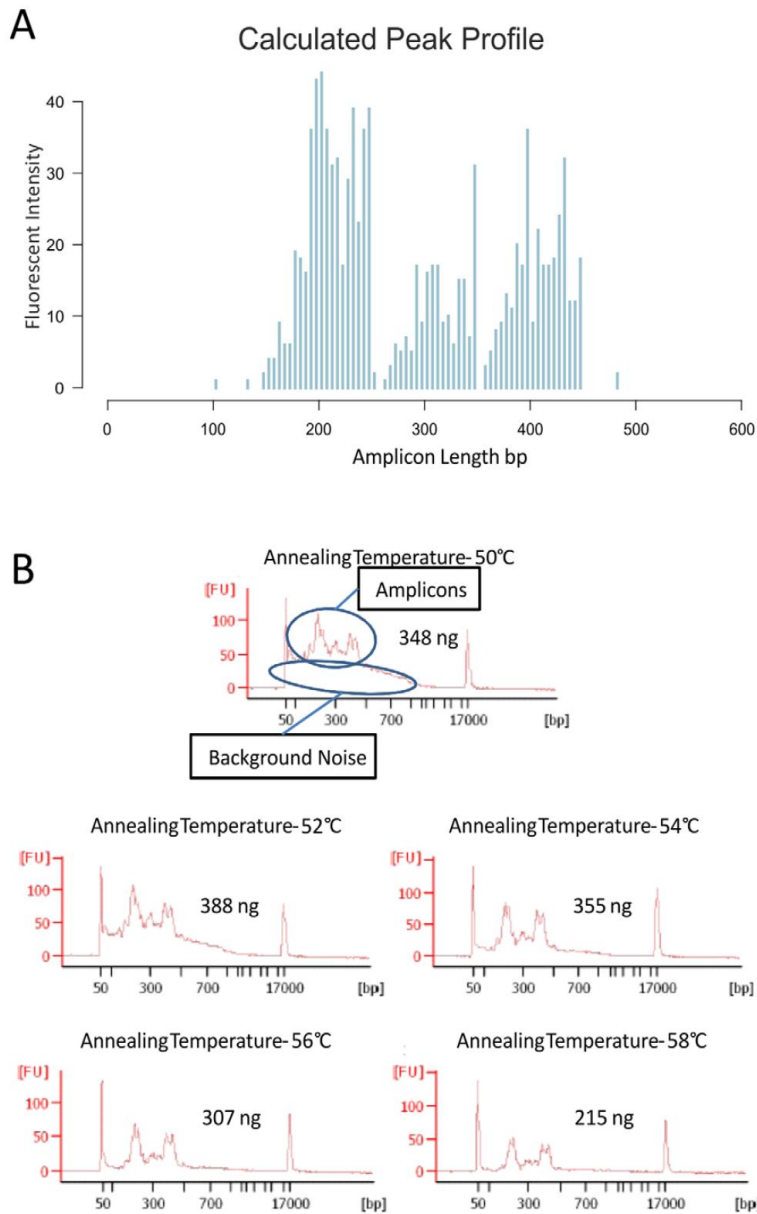


Figure 1. Annealing temperature optimization of the primer droplet library. Panel A – The calculated peak profile created by generating a histogram of the known amplicon sizes and numbers and assuming equal representation of all the amplicons after PCR amplification. Panel B – The Agilent Bioanalyzer traces of merged samples PCR amplified with different annealing temperatures. The amplicon peaks and background noise are highlighted for the 50°C annealing temperature. Background noise decreases until it disappears at 56°C. Increasing the annealing temperature to 58°C only results in a decrease in amplicon yield. doi:10.1371/journal.pone.0021332.g001

Results

Yield and coverage of target regions

We established a pipeline allowing a simultaneous, targeted assessment of DNA sequence variation and methylation. This pipeline is described graphically in Figure 2. For the predetermined genomic regions of interest, primers for microdroplet amplification of unconverted and BS treated DNA are generated, the primers libraries are synthesized and PCR conditions

optimized for maximal product yield. The removal of SNP sites in the primer sequences did not prove to be a critical restriction, than hindered successful primer design in the target regions chosen. The results of this optimization of PCR amplification conditions are depicted in Figure 1 for the 994 primer pairs covering 34083 bases of genomic sequence excluding primer sequences. 946 primer pairs were designed using the automated pipeline for the BS converted DNA. These primers designed redundantly, so as to provide a target coverage of 8-fold over the

Table 1. Overview of the samples and reads from the libraries.

Sample	Tissue	bisulfite	reads	Total sequence (bp)	Mapped reads	Mapped bp w/o primers
CRC-NT	colon	YES	302,893	57,977,571	163,971	30,388,486
CRC-TU	colon	YES	193,150	39,029,236	119,666	22,368,077
FL-R1	lymphatic	YES	857,952	186,092,051	681,836	133,755,191
FL-R2	lymphatic	YES	843,643	165,164,339	580,212	105,088,308
CRC-NT	colon	NO	152,873	61,380,483	127,151	48,206,498
CRC-TU	colon	NO	183,423	73,311,754	153,450	57,586,858
FL-R1	lymphatic	NO	167,205	66,481,618	140,562	52,358,040
FL-R2	lymphatic	NO	323,993	109,867,968	223,888	76,258,994

The table gives an overview of the samples and reads obtained from the converted (marked as bisulfite "YES") and unconverted libraries (marked as bisulfite "NO"). The raw number of sequence reads, the number of mapped reads per sample and total analysed sequence after deletion of primer sequences are listed.
doi:10.1371/journal.pone.0021332.t001

target sequence. As an additional control, 48 previously established and manually designed primer pairs for CpG islands and a control plasmid were included in the primer library [8]. The theoretical distribution of PCR products is depicted in Panel A of Figure 1. After performing droplet PCR on BS treated DNA as described in the Methods section, the size distribution of amplicons resembled the calculated distribution which is a first indication of a successful design (Figure 1, Panel B). After microdroplet PCR and FLX sequencing of the resulting PCR product library, the sequence reads were aligned to the converted genome as described in the Methods. Using the presence of at least one read of successfully aligned sequence as a criterion, the design success of the automated pipeline averaged at 95% (median 100%). Less than 0.02% of this sequence was covered by less than 20 aligned reads – the corresponding CpG sites are marked in italics in Table S3. Out of the 993 primer pairs targeting the converted human genome in the library, all primers yielded a product, although some sequences cannot be uniquely assigned to one primer pair because of the highly redundant design. Thus, regions not covered in the automated pipeline are due to the failure to design primers for this proportion of the target sequence, rather than experimental lack of amplicons for the designed primers. The one control primer pair for plasmid DNA did not yield a product in any sample.

A graphical account of the designed primers for the one of the two largest regions with the lower coverage (*IRF4*) is given in Figure 3. Details of the regions and the design and sequencing success of are provided in Tables S1 and 1. The average coverage of the non-converted library was 99.7% (median 100%).

Technical reproducibility of the levels of DNA methylation

For 248 CpG sites from 16 loci both BS sequencing data using the author's pipeline and BS pyrosequencing data using conventionally designed control assays (Table S5) were available for comparison. Overall, the degree of methylation as determined by the droplet BS PCR pipeline and by BS pyrosequencing was very similar (Figure 4, Panel A), yielding an overall pairwise Spearman correlation coefficient of 0.87. For the *IGF2* locus (see Table S1 for coordinates), methylation information from the forward and reverse strand of all CpG sites was available from the PCR product sequencing and pyrosequencing assays. Interestingly, the cross-stand reproducibility of the droplet PCR sequencing pipeline was considerably higher than for the pyrosequencing assays, as reflected by the pairwise correlation coefficients of 0.96 and 0.88,

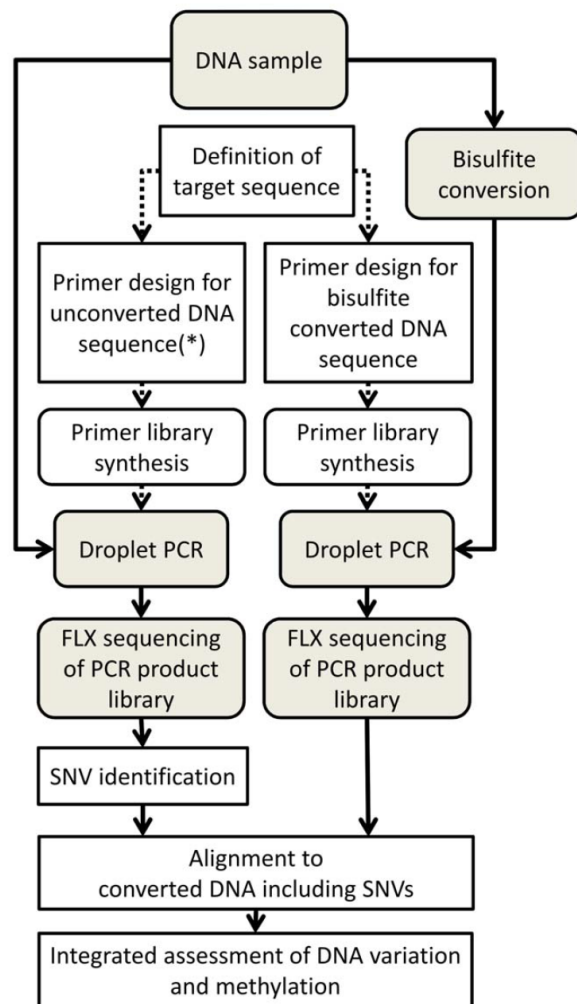


Figure 2. The Figure provides a flow chart of the pipeline for integrated analysis of DNA variation and methylation analysis as described in this manuscript. The standard design pipeline for unconverted DNA [32] is marked with an asterisk (*).
doi:10.1371/journal.pone.0021332.g002

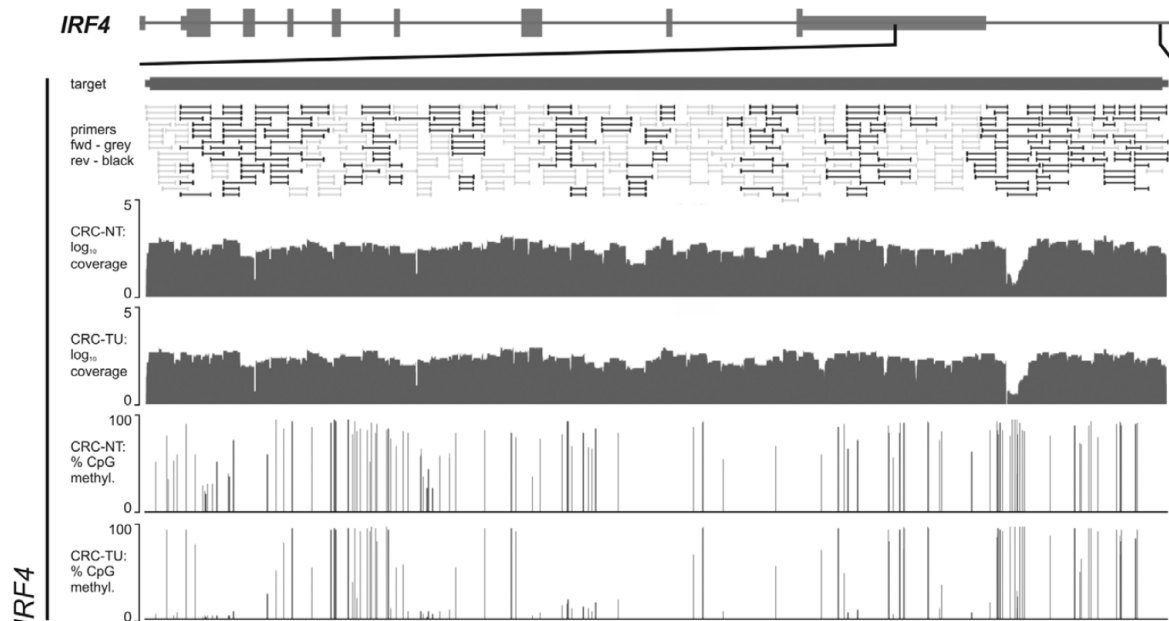


Figure 3. The Figure gives an overview of the amplicon and primer positions of the design, coverage and CpG methylation for the heptyping region *IRF4* (panel B, chromosome 6 from 352,937–366,151 bp). The location relative to the gene model, the primer positions, the log₁₀ coverage and the percentage of methylation for the two colorectal cancer samples are plotted as a function of the genomic coordinates. doi:10.1371/journal.pone.0021332.g003

respectively (Figure 4, Panels C and B). These results were obtained using primers designed specifically for the opposite strands of the converted DNA.

Analysis of DNA methylation and methylation haplotypes (“heptypes”) in tumors

A total of 2017 differentially methylated CpG sites were analyzed in this study. Table S3 provides the detailed, per site methylation information for all four samples investigated. Sites that were present due to particular SNP alleles could be readily identified using the data from the non-converted library and are annotated in Table S3, too.

The readout of the PCR products yielded an average read length of 204 bases. Owing to these relatively long stretches of continuous DNA sequence, an analysis of phased methylation information was possible. We denote the underlying methylation pattern of these phased sequence reads of converted DNA as “heptypes” [19,28]. As exemplary loci to demonstrate the feasibility and potential of this experimental approach, the *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N), *FGF6* (fibroblast growth factor 6) and *HS3ST2* (heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 2) loci were evaluated considering phased methylation covered by complete physical sequence reads. A minimum heptype frequency of 1% was required for analysis.

SNRPN (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N)

SNRPN was investigated as an example of an imprinted gene, i.e. a gene differentially methylated on and expressed from the two parental alleles. The *SNRPN* gene (OMIM 182279) is transcribed exclusively from the paternally inherited chromosome. *SNRPN* is located within an imprinted gene cluster in chromosome 15 that is associated with Prader-Willi syndrome (PWS; OMIM 176270) and Angelman syndrome (OMIM 105830) [40]. PWS arises from loss

of gene function in this region, expressed exclusively from the paternal chromosome; this suggests that *SNRPN* may play a role in its etiology. Theoretically, given the equal distribution of both parental alleles in a healthy tissue sample, one would expect 50% of all alleles in such a sample to be methylated and 50% to be unmethylated. As shown in Figure 5, the completely unmethylated heptype and completely methylated locus comprised 55% and 39% of all sequence reads in the studied normal colonic sample (CRC-NT), respectively. Data for all three other samples are almost identical (data not shown). Whereas a dichotomy of heptypes, reflected in the parsimony tree in Panel B, is expected under the differential methylation of both alleles, the higher diversity of the methylated rather than the unmethylated heptype caused by incomplete methylation of the supposedly methylated allele is intriguing. Upon formal analysis of the heptype data, single unmethylated sites on the background of the completely methylated heptype are more common when contrasted with single methylated sites on the background of the completely unmethylated heptype not only in the normal sample (CRC-NT, $p < 1.0 \times 10^{-15}$) but also in all the three tumor samples (all p -values $< 1.0 \times 10^{-15}$). This observation is graphically depicted in the histogram plotting the frequency of additional methylated or demethylated sites on the respective heptype background in Panel C of Figure 5. Overall, these findings of the in-depth BS sequencing analysis of this imprinted locus using our novel pipeline might suggest that the active DNA-methyl transferase (DNMT) driven process of DNA methylation maintenance might be prone to mistakes in somatic cells. Similar data were obtained for a second imprinted locus (*RBI*, full data in Table S3) [41].

FGF6 (fibroblast growth factor 6)

Heptypes located on the CpG island in the *FGF6* gene and the corresponding maximum-parsimony trees are depicted in Figure 6.

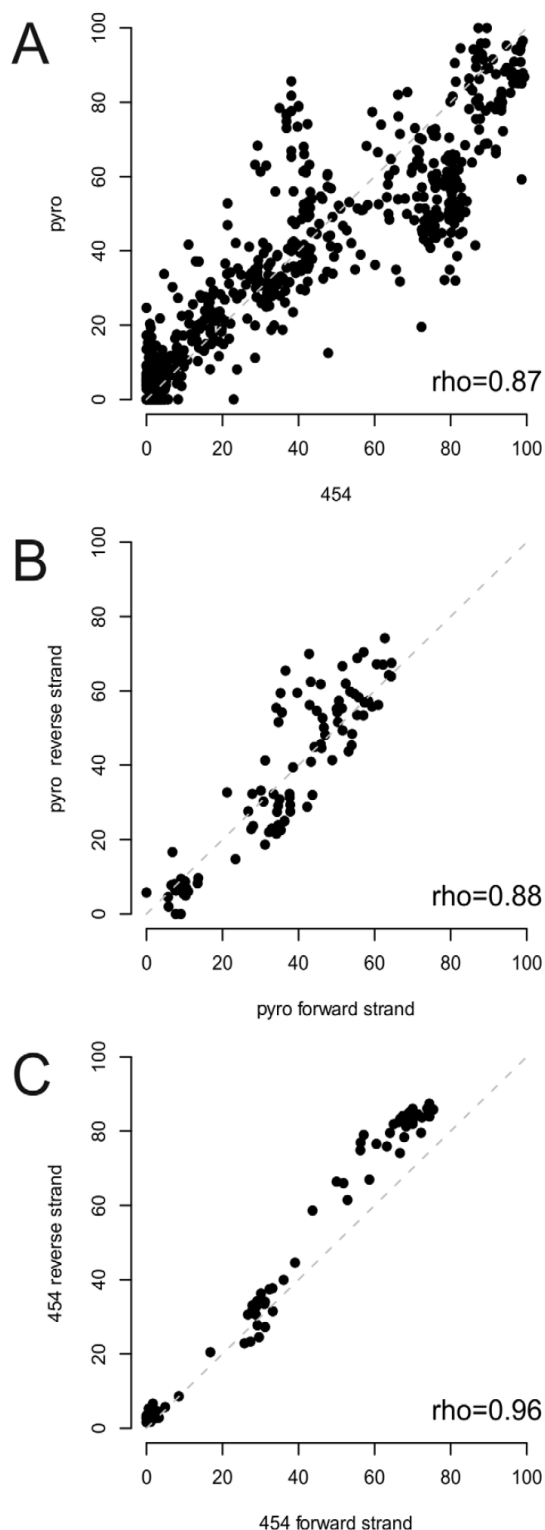


Figure 4. Panel A depicts the correlation of the degree of methylation as measured by pyrosequencing (y-axis, denoted

“pyro”) and by sequencing of the droplet-PCR products (x-axis, denoted “454”) for all 248 CpG loci studied with both methods in the panel for all four samples. The Spearman rank correlation coefficient is denoted in the Figure as “rho”. Panels B and C provide a pairwise correlation plot and analysis of the degree of methylation for the forward and reverse strand for 25 CpG sites in the *IGF2* gene.
doi:10.1371/journal.pone.0021332.g004

While the island is largely methylated in the normal colonic tissue specimen (CRC-NT), the central CpGs of this locus are demethylated in the matching colorectal tumor. The respective heptype 12 is only observed in the CRC-TU samples (25.5% frequency). The follicular lymphoma shows a different demethylation pattern (heptype 17), which nevertheless involves the same region of the CpG island. Interestingly, the frequency of the partially demethylated heptype and the degree of demethylation increases in the follicular lymphoma with disease progression in comparison of FL-R1 to FL-R2. Three sites overlap between the predominant demethylated heptypes for the follicular lymphoma and colon cancer sample (heptypes 12 and 17 in Figure 4, sites marked in bold print). The common telomeric demethylated position (at 4,424,667 bp, left most T in bold print in heptypes 12 and 17) overlaps with a TAF1 site. TAF1, a protein found at the start of transcribed genes, is a general transcription factor that is a key part of the pre-initiation complex found on the promoter and might, thus, be involved in deregulation of the *FGF6* growth factor.

HS3ST2 (heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 2)

The heptype structure of *HS3ST2* as depicted in Figure 7 shall serve as an example of a locus that is being progressively methylated in the tumor samples studied. As illustrated by the maximum-parsimony trees, heptype 37 (completely unmethylated) is the dominant heptype in the normal colon tissue (83.7% abundance), with few randomly distributed single methylated CpGs (e.g. heptypes 31 to 35). In the tumor sample, a significant proportion of sites are methylated. This process is most clearly visible in the progression of the follicular lymphoma from FLR1 to FL-R2. In the first biopsy, heptype 37 (completely demethylated) is still the dominant heptype, whereas in the second recurrence, heptype 1 (completely methylated) has increased in frequency from 21.9% to 81.8%, corresponding to a “shift” from left to right in the maximum-parsimony trees (Figure 7, panel B).

Discussion

We report the adoption of the recently described microdroplet PCR [32] to bisulfite treated target DNA and established a pipeline for the simultaneous assessment of DNA sequence analysis and methylation. We show that successful assessment of methylation status can be achieved for a wide range of target sequences, with an average of 95% of target sequence (median 100%). In principle, this approach is similar to a previously reported DNA methylation profiling experiment on chromosomes 6, 20 and 22, that also used PCR products from bisulfite converted DNA and applied Sanger sequencing to the resulting products [29]. Here, we utilize the advantages of microdroplet PCR and second-generation sequencing technology. We used approximately 1000 primer pairs to cover some 34 kb of genomic sequence – *i.e.* approximately one primer every 34 bp with a 100% success rate (see Results). The efficiency and scalability of the approach depends on the structure of the genomic regions of interest. If large numbers of small sites (e.g. well defined CpG islands) are studied, the design and sequencing overhead of primer sequences is greater, whereas

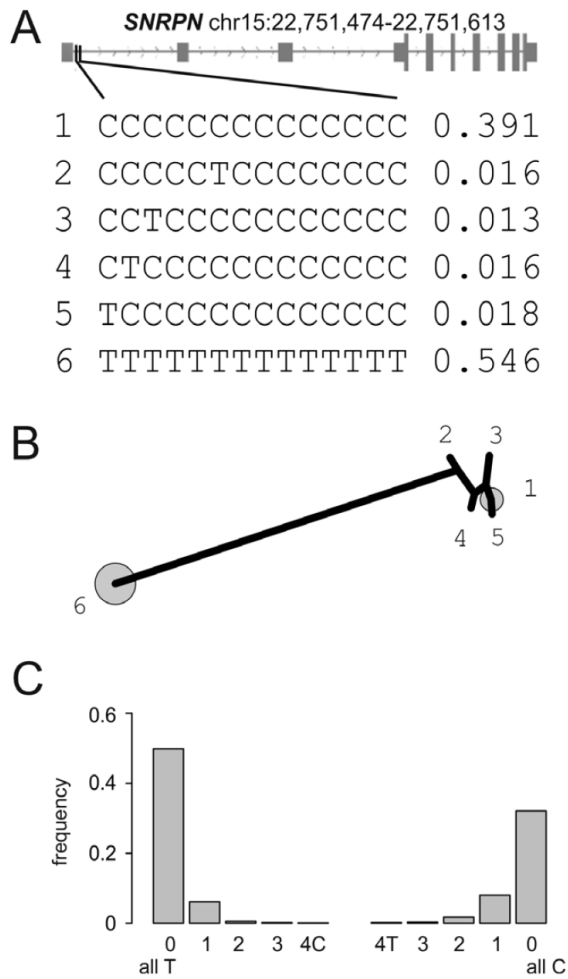


Figure 5. The figure shows the heptypes of at the CpG island at genomic coordinates on chromosome 15 (22,751,474–22,751,613 bp) at the *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N) locus for the sample CRC-NT providing an example of an imprinted gene. In panel A, the heptype frequencies and an overview of the locus structure is given. Panel B shows a maximum-parsimony tree constructed from heptypes with a minimum frequency of 1%. The numbered heptypes from panel A are annotated in the tree. The frequent heptypes are indicated by grey circles sized according to the relative heptype frequencies. Panel C summarizes the frequency of methylated and non-methylated sites on the background of the two heptypes (left completely unmethylated – all T, right – completely methylated – all C) defined by the imprinting of the locus. As detailed in the Results section, single unmethylated sites occur more frequently on the background of the all C heptype, than single methylated sites on the background of the unmethylated heptype ($p < 1 \times 10^{-15}$).
doi:10.1371/journal.pone.0021332.g005

extended heptyping regions (such as *SMAD7* and *IRF4* in this study) can be more efficiently covered. For instance, the total sequence spanned by the amplicons including primers was 42455 bp in this study. The pipeline has a considerable scalability potential, because the degree of redundancy may be reduced, the proportion of longer amplicons might be increased and larger numbers of primers (up to 4000 in the current RainDance technical specifications) may be incorporated in the libraries.

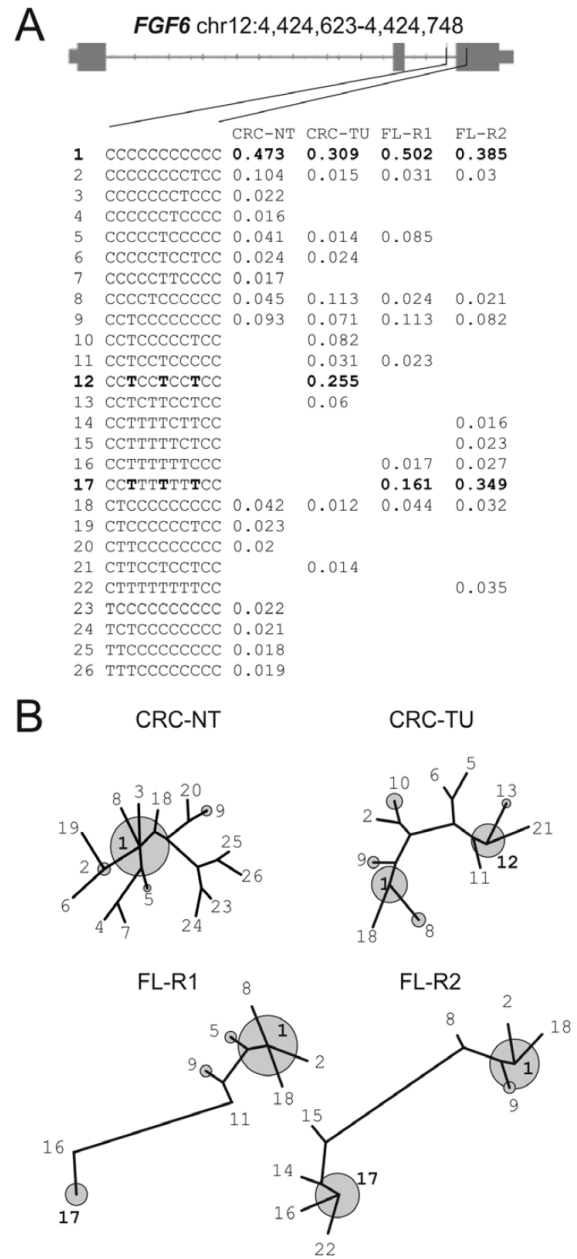


Figure 6. Hepitype diversity at the *FGF6* (fibroblast growth factor 6) locus on chromosome 12 (4,424,623–4,424,748 bp) is characterized by progressive demethylation in tumors. In panel A, the heptype frequencies in the four samples and an overview of the locus structure is given. Panel B shows maximum-parsimony trees constructed from heptypes with a minimum frequency of 1%. The numbered heptypes from panel A are annotated in the trees. The frequent heptypes are indicated by grey circles sized according to the relative frequencies. Trees have been constructed separately and branch lengths are thus not to scale. It is evident, that both in comparison between normal tissue and tumor in the colon cancer sample (CRC-NT, CRC-TU) and in comparison between the follicular lymphoma and its recurrence (FL-R1, FL-R2), the locus is characterized by progressive demethylation. The consistently demethylated sites between the colon cancer and lymphoma between heptypes 12 and 17 are marked in bold print.
doi:10.1371/journal.pone.0021332.g006

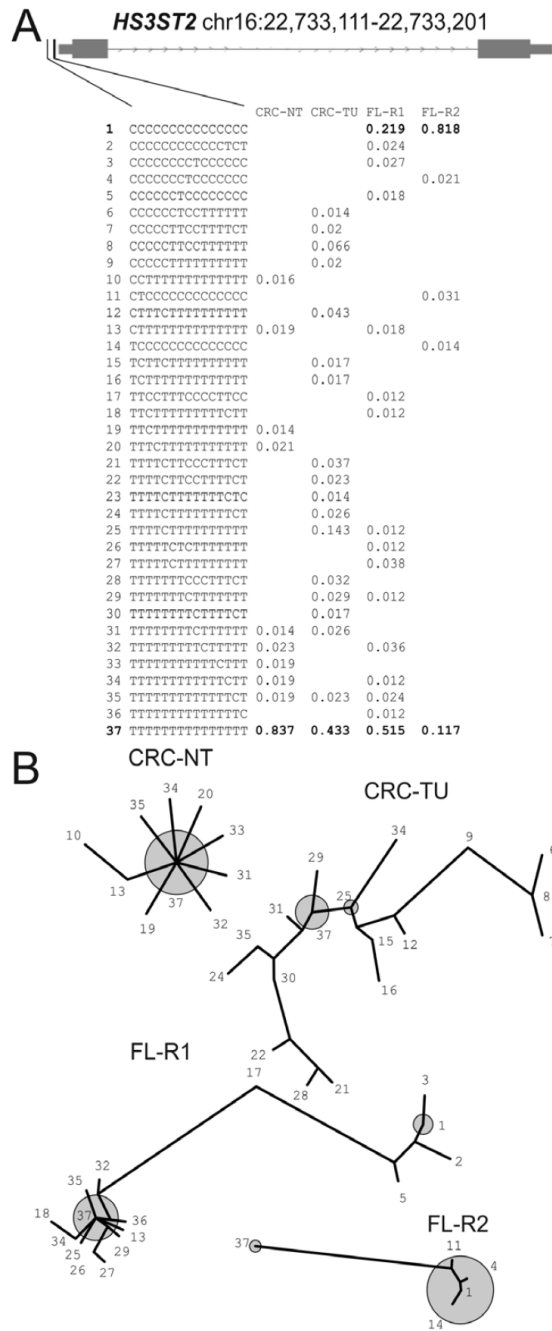


Figure 7. Hepitype diversity at the *HS3ST2* (heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 2) locus on chromosome 16 (22,733,111–22,733,201 bp) is characterized by increasing methylation in tumor samples. In panel A, the heptype frequencies in the four samples and an overview of the locus structure is given. Panel B shows maximum-parsimony trees constructed from heptypes with a minimum frequency of 1%. The numbered heptypes from panel A are annotated in the trees. The frequent heptypes are indicated by grey circles sized according to the relative frequencies. Trees have been constructed separately and branch lengths are thus not to scale. It is evident, that both in comparison between normal tissue and tumor in

the colon cancer sample (CRC-NT, CRC-TU) and in comparison between the follicular lymphoma and its recurrence (FL-R1, FL-R2), the locus is characterized by progressive methylation yielding for instance an 82% frequency of the completely methylated heptype in the recurrent lymphoma (FL-R2). doi:10.1371/journal.pone.0021332.g007

In the range of possible methods that have been developed in order to increase throughput and ease of methylation analysis [26,27,28], this targeted approach may be useful, because it allows a selective and thus economical use of sequencing resources. Sequencing depth may be adjusted to achieve the necessary precision for methylation and heptype assessment. The PCR-based approach also facilitates the alignment of the resulting sequence reads, which may lead to ambiguous results in whole-genome experiments due to the decreased complexity of sequencing reads in bisulfite-treated target sequences. The feasibility of measuring differential methylation over large regions, for example, the peak regions of a susceptibility region for a complex cancer such as colon cancer or lymphoma is demonstrated in this report (Figure 3).

We assessed the validity of the methylation readings from our pipeline approach with a set of 18 manually designed pyrosequencing assays analysing 248 CpG sites and found a good concordance yielding a pairwise correlation coefficient of 0.87. Interestingly, the reproducibility of strand readings was higher for the sequencing reads ($\rho = 0.96$) as compared to the degree of methylation as measured by pyrosequencing from both strands ($\rho = 0.88$). Thus, the comparison to BS pyrosequencing as a gold standard may be overly conservative towards the presented pipeline approach.

We deliberately chose a sequencing technology that delivers relatively long continuous stretches of sequence information, i.e. the Roche FLX system. The average read length in this experiment was 204 bases, allowing us to obtain phased methylation information and the construction of “heptypes”. These heptypes provide the potential to study phylogenetic traces of somatic evolution in cancer, such as recently demonstrated for SNP variation by Campbell et al. [23]. The potential of our pipeline in the investigation of somatic methylation evolution is demonstrated here for three exemplary loci: *SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N), an example of an imprinted gene; *FGF6* (fibroblast growth factor 6) demonstrating a locus with increasing demethylation in cancer; and *HS3ST2* (heparan sulfate 3-O-sulfotransferase 2) exhibiting a pattern of locus methylation in the progress of cancerogenesis. Due to the design as a proof-of-principle experiment, biological conclusions that might be drawn from this limited dataset must be viewed with considerable caution. However, we demonstrate a consistent and statistically significant skew in single base methylation and demethylation on the background of the imprinted heptypes at the *SNRPN* locus towards incomplete methylation of the imprinted (methylated) heptype in all samples studied. This may be due to the active nature of the methylation process. The progressive contextual heptype methylation and demethylation as seen in *FGF6* and *HS3ST2* may provide a paradigm for further studies, especially if different tumor entities with the same direction of overall methylation change but a different heptype pattern are analyzed. This approach may allow an easier pinpointing of functionally relevant sites of differential methylation as suggested in the heptype patterns at the *FGF6* locus (Figure 6).

In summary, we present a novel approach for the targeted assessment of differential methylation using microdroplet PCR and second generation sequencing and show its utility for the analysis of heptype phylogeny in the somatic evolution in cancer.

Supporting Information

Figure S1 Verification of successful bisulfite conversion: The figure shows the pyrosequencing trace of the sample CRC-TU at the SMAD7 locus (chromosome 18, position 46,448,939–46,448,969). The same converted sample, which was used for the sequencing and an analysis pipeline presented in the manuscript, was analysed with bisulfite pyrosequencing. For the internal bisulfite control position a “c” is injected before and after the converted “t”. No light signals were obtained for these positions demonstrating complete and successful bisulfite conversion. (TIF)

Figure S2 The figure provides the rationale for choosing 95% sequence identity as a criterion for the selection of converted amplicon reads in the analysis. The dashed line shows the frequency of reads with the identity to the predicted amplicon sequence on the x-axis. The 95% criterion that is customary for unconverted SNP discovery experiments thus appears to be suitable for the converted amplicons as shown in the solid lines. (TIF)

Table S1 Overview analysed regions. For some of the smaller regions only manual design using previously designed or only automatic design was attempted. Regions, where the respective design method was not used are indicated by “n/a”. The large hepityping regions were only processed through the automated pipeline. The coordinates are given according to NCBI build 36.1 (UCSC hg18). The empirical coverage by sequencing reads exactly corresponds to the theoretically expected one and is thus not provided separately. (XLS)

Table S2 List of all primer pairs and amplicon yield in the experiment: The primer sequences and target genes are provided. The mean number of aligned finished reads for

each amplicon normalized on 100,000 reads over all four libraries is provided in the column “normalized mean” in addition to the raw sequence counts per amplicon and the normalized (on 100,000 reads per library) reads for each of the four samples. (XLS)

Table S3 The table provides a list of all methylated sites in the analyzed samples. Genomic coordinates refer to NCBI build 36.1 (UCSC hg18). CpG sites that are generated through a SNP are marked in underlined italics. Sites covered by less than 20 reads are marked in non-underlined italics. Sites with no reads in the respective sample are indicated with a dash (“-”). Sites without a CpG in a particular sample are marked with “NA”. The percentage of methylation is given for each site. (XLS)

Table S4 List of all polymorphic sites (SNVs and InDels) in the individual samples. The chromosome, chromosomal position, alleles and individual genotypes are provided for all samples. (XLS)

Table S5 The table provides an overview of the 18 manually designed pyrosequencing assays for the replication of the measurement of DNA methylation at 17 selected loci. Note, that for the *IGF2* locus, an assay on the forward and the reverse strand has been designed. (XLS)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: A. Herrmann RS, J.H. Performed the experiments: A. Herrmann A. Haake OA IMG K. Szafranski K. Stenshorn SKK, JR, JW, JO, DRL. Analyzed the data: A. Herrmann A. Haake OA MN, J.H. Contributed reagents/materials/analysis tools: SS, MK, MP, PN, RS, J.H. Wrote the paper: A. Herrmann A. Haake OA MN, J.H.

References

- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6–21.
- Ball MP, Li JB, Gao Y, Lee JH, LeProust EM, et al. (2009) Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol* 27: 361–368.
- Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, et al. (2010) Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 466: 253–257.
- Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6: 597–610.
- Taylor KH, Pena-Hernandez KE, Davis JW, Arthur GL, Duff DJ, et al. (2007) Large-scale CpG methylation analysis identifies novel candidate genes and reveals methylation hotspots in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 67: 2617–2625.
- Jones PA, Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683–692.
- Gal-Yam EN, Saito Y, Egger G, Jones PA (2008) Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy. *Annu Rev Med* 59: 267–280.
- Martin-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, et al. (2009) New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling. *Blood* 113: 2488–2497.
- Robertson KD, Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 1: 11–19.
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, et al. (2000) Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 24: 132–138.
- Jones PA, Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415–428.
- Costello JF, Plass C, Cavenee WK (2000) Aberrant methylation of genes in low-grade astrocytomas. *Brain Tumor Pathol* 17: 49–56.
- Faust C, Lawson KA, Schork NJ, Thiel B, Magnuson T (1998) The Polycomb-group gene *ced* is required for normal morphogenetic movements during gastrulation in the mouse embryo. *Development* 125: 4495–4506.
- O'Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, et al. (2001) The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol* 21: 4330–4336.
- Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, et al. (2009) Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* 139: 1290–1302.
- Schlesinger Y, Strausman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, et al. (2007) Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 39: 232–236.
- Bracken AP, Helin K (2009) Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* 9: 773–784.
- Gal-Yam EN, Egger G, Iniguez L, Holster H, Einarsson S, et al. (2008) Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 12979–12984.
- Murrell A, Rakyian VK, Beck S (2005) From genome to epigenome. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1: R3–R10.
- Kerkel K, Spadola A, Yuan E, Kosek J, Jiang L, et al. (2008) Genomic surveys by methylation-sensitive SNP analysis identify sequence-dependent allele-specific DNA methylation. *Nat Genet* 40: 904–908.
- Bell CG, Beck S (2009) Advances in the identification and analysis of allele-specific expression. *Genome Med* 1: 56.
- Houlston RS, Webb E, Broderick P, Pittman AM, Di Bernardo MC, et al. (2008) Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet*.
- Campbell PJ, Pleasance ED, Stephens PJ, Dicks E, Rance R, et al. (2008) Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 13081–13086.
- Biggnell GR, Greenman CD, Davies H, Butler AP, Edkins S, et al. (2010) Signatures of mutation and selection in the cancer genome. *Nature* 463: 893–898.
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, et al. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315–322.
- Harris RA, Wang T, Coarfa C, Nagarajan RP, Hong C, et al. (2010) Comparison of sequencing-based methods to profile DNA methylation and identification of monoallelic epigenetic modifications. *Nat Biotechnol* 28: 1097–1105.
- Bock C, Tomazou EM, Brinkman AB, Muller F, Simmer F, et al. (2010) Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol* 28: 1106–1114.

28. Beck S (2010) A-Z of methylome analysis. *Methods* 52: 201–202.
29. Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, et al. (2006) DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 38: 1378–1385.
30. Zeschnick M, Martin M, Betzl G, Kalbe A, Sirsch C, et al. (2009) Massive parallel bisulfite sequencing of CG-rich DNA fragments reveals that methylation of many X-chromosomal CpG islands in female blood DNA is incomplete. *Hum Mol Genet* 18: 1439–1448.
31. Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, et al. (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452: 215–219.
32. Tewhey R, Warner JB, Nakano M, Libby B, Medkova M, et al. (2009) Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing. *Nat Biotechnol* 27: 1025–1031.
33. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365–386.
34. Schuler GD (1997) Sequence mapping by electronic PCR. *Genome Res* 7: 541–550.
35. Rotmistrovsky K, Jang W, Schuler GD (2004) A web server for performing electronic PCR. *Nucleic Acids Res* 32: W108–112.
36. Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, et al. (2006) A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 354: 2419–2430.
37. Ukkonen E (1985) Algorithms for approximate string matching. *Information and Control* 64: 100–118.
38. Taylor KH, Kramer RS, Davis JW, Guo J, Duff DJ, et al. (2007) Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Res* 67: 8511–8518.
39. Schwandt H, Vater I, Kreuz M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, et al. (2009) Chromosomal imbalances and partial uniparental disomies in primary central nervous system lymphoma. *Leukemia* 23: 1875–1884.
40. Dittrich B, Buiting K, Korn B, Rickard S, Buxton J, et al. (1996) Imprint switching on human chromosome 15 may involve alternative transcripts of the SNRPN gene. *Nat Genet* 14: 163–170.
41. Kanber D, Berulava T, Ammerpohl O, Mitter D, Richter J, et al. (2009) The human retinoblastoma gene is imprinted. *PLoS Genet* 5: e1000790.

3.1.2 Zusätzliche Ergebnisse: „klassische“-PCR-basierte Anreicherung genomischer Regionen zur Qualitätssicherung von 454-Next-Generation-Sequencing-Verfahren

Bei dem in Abschnitt 3.1.1 publizierten Verfahren handelt es sich um einen neuen methodischen Ansatz zum Nachweis der Veränderungen der DNA-Methylierung mittels eines Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahrens. Die Amplifizierbarkeit einer zu untersuchende DNA-Sequenz hängt u.a. von dem GC-Gehalt oder der Anzahl repetetiver Elemente ab. Somit ist es für die Qualitätssicherung eines neuen methodischen Ansatzes essenziell, die Eignung des Amplifikationsverfahrens zur Detektion von DNA-Methylierung zu überprüfen. Aus diesem Grund wurden die von mir in Abschnitt 3.1 ausgewählten genomischen Regionen zur Untersuchung der DNA-Methylierung in einem herkömmlichen PCR-basierten Amplifikationsverfahren („klassische“-PCR) für Bisulfit-konvertierte DNA angereichert und mittels der 454-Technologie (Firma Roche) sequenziert.

Für eine repräsentative Aussage wurde die Studie an vier verschiedenen Proben durchgeführt (Abschnitt 2.1.3). Es wurde die DNA einer lymphatischen Tumorzelllinie (Daudi), die DNA eines gesunden Individuums, eine kommerzielle methylierte DNA (Millipore, Darmstadt, Deutschland) sowie ein Pool aus der DNA von fünf gesunden männlichen und fünf gesunden weiblichen Individuen analysiert. Eine schematische Übersicht zum Vorgehen ist in Abbildung 16 (Abschnitt 2.2.4.8) dargestellt.

Die Ergebnisse der Validierung für 13 analysierte genomische Regionen (*MSH2*, *DNMT1*, *DNMT3B*, *PLAGL1*, *IGF2*, *CCNA1*, *GAS7*, *AGTR1*, *SLIT2*, *ETV1*, *TUSC3*, *DAPK1*, *PLS3*) sind exemplarisch von der Zelllinie Daudi in Abbildung 20 dargestellt.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass mittels eines „klassischen“ Amplifikationsverfahrens für NGS sowohl niedrige (1 %) als auch hohe (95 %) DNA-Methylierungswerte detektierbar sind, die sich mit den detektierten DNA-Methylierungswerten der Bisulfit-Pyrosequenzierung in 10/13 analysierten genomischen Regionen decken. Übereinstimmend wurden bei *MSH2* und *DNMT3B* mittels der drei verwendeten Sequenzierungstechniken unter 10 % DNA-Methylierung ermittelt. Bei *DNMT1* waren die Resultate unterschiedlich. Während mittels beider 454-Technologien DNA-Methylierungswerte jeweils 1 % betragen, ergab die Bisulfit-Pyrosequenzierungsanalyse einen DNA-Methylierungswert von 19 %. Übereinstimmende DNA-Methylierungswerte im Bereich von 70-95 % wurden mit den drei angewendeten Sequenzierungsmethoden bei *IGF2*, *CCNA1*, *GAS7*, *ETV1*, *TUSC3*, *DAPK1* und *PLS3* detektiert. Im Gegensatz dazu wurden mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bei *AGTR1* 17 % und bei *SLIT2* 50 % weniger DNA-Methylierung detektiert als mittels der 454-Technologien.

Ergebnisse

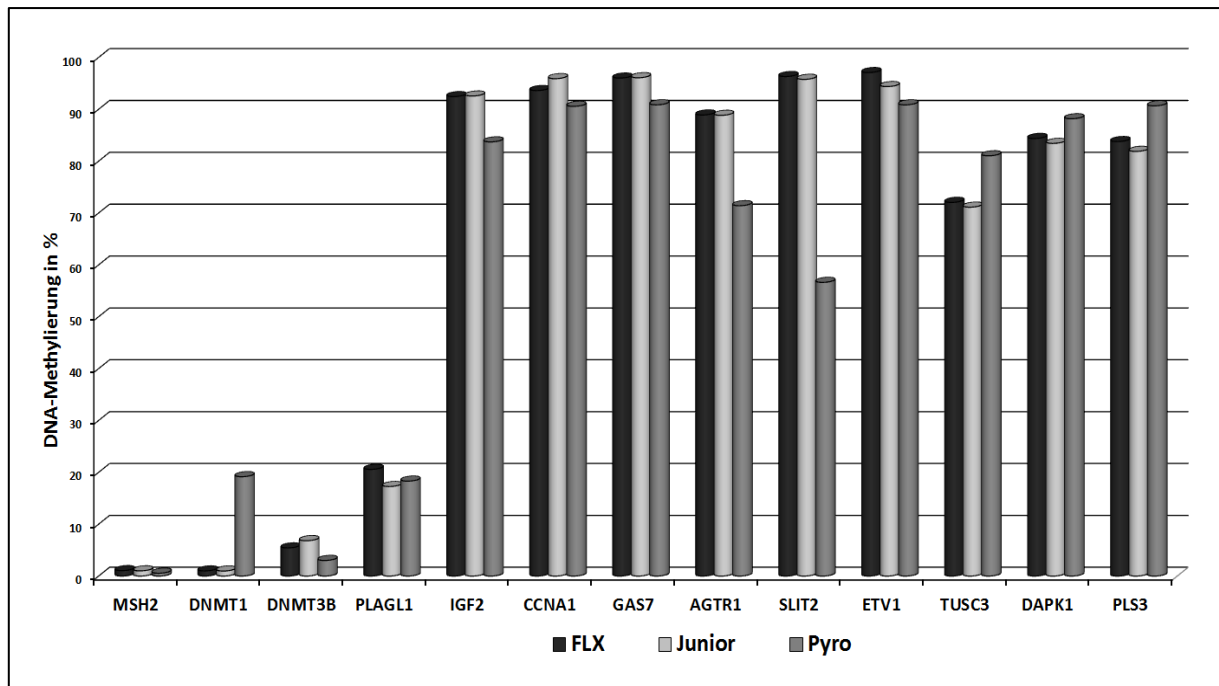


Abbildung 20: Quantifizierung der DNA-Methylierung nach „klassischer“-PCR-basierter Anreicherung von der **Daudi-Zelllinie** mittels drei verschiedener Sequenzierungsplattformen: FLX (454-Technologie von der Firma Roche), Junior (454-Technologie von der Firma Roche) und Bisulfit-Pyrosequenzierung. Insgesamt wurde eine gute Korrelation erzielt ($R^2=0.967$).

Insgesamt zeigten die eingesetzten Sequenzierungs-Technologien eine gute Korrelation unter allen detektierten DNA-Methylierungswerten ($R^2=0,967$) über alle 13 „klassisch“ angereicherten genomischen Regionen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass PCR-basierte Anreicherungsverfahren mit anschließender 454-Sequenzierung eine geeignete Methode zur Detektion von DNA-Methylierung darstellen.

3.2 Molekulargenetische Untersuchungen bei t(14;18) positiven Vorläuferläsionen zur Identifikation von genetischen und epigenetischen Veränderungen der Tumorevolution

In-situ-Follikuläre Lymphome (FLIS) und FL mit partieller Lymphknoteninfiltration (PFL) sind charakterisiert durch Keimzentrums B-Zellen, bei denen eine Translokation t(14;18) nachweisbar ist und die zudem positiv für den Keimzentrumsmarker CD10 und die Expression des Proteins BCL2 sind. Die Architektur des lymphatischen Gewebes und der Keimzentren erscheinen normal, so dass es sich bei FLIS und PFL häufig um Zufallsbefunde von reaktiv erscheinenden Lymphknoten handelt. Bei einigen Patienten sind voll ausgebildete FL an anderer Stelle nachweisbar, andere Patienten entwickeln zu einem späteren Zeitpunkt ein typisches FL oder ein anderes Lymphom, z.B. DLBCL [149]. In wieweit die FLIS und PFL eine Vorstufe von FL darstellen ist noch weitgehend unverstanden.

In dieser Studie sollten genetische Veränderungen identifiziert werden, die zur Progression von einem FLIS zu einem klassischen FL beitragen. Dazu wurden chromosomale Veränderungen in zwei verschiedenen Lymphknotenbiopsaten eines 78-jährigen Patienten mittels Array-CGH-Technologie auf der Human Genome CGH Microarray 244K Plattform (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) analysiert.

3.2.1 Manuskript 2: „A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma“

publiziert in Blood, 2011 118: 3442-3444. doi:10.1182/blood-2011-07-368944

In dieser Arbeit konnten wir nachweisen, dass bei dem vorgestellten Patienten (Manuskript 2: „A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma“) in dem FLIS, im Vergleich zu dem klassischen FL keine weiteren chromosomalen Veränderungen neben der t(14;18) im Vergleich zu dem manifestierten FL vorlagen. Mit diesem Fallbeispiel konnten wir einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der klonalen Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL beitragen.

Bei dem vorgestellten Patienten lagen zwei verschiedene Lymphknotenbiopsate vor. Das größere Lymphknotenbiopsat zeigte eine typische histologische Morphologie eines FL Grad I/II, mit charakteristischem Phänotyp (positiv für die immunhistochemischen Marker CD20, CD10 und BCL6) aber keine immunhistochemisch detektierbare BCL2-Protein Expression. Letzteres ist auf eine mittels Sanger-Sequenzierung bestätigte Punkt-Mutation in dem Epitop, das von dem BCL2-Antikörper erkannt wird, zurückzuführen. Das andere Biopsat zeigte eine normale Architektur, aber eine starke BCL2-

Expression in einigen morphologisch reaktiven Keimzentren, die als FLIS diagnostiziert werden konnten. Sowohl in dem klassischen FL als auch in dem FLIS wurde eine Translokation t(14;18) mittels FISH nachgewiesen und darüber hinaus ergab die *IGH*-PCR eine klonale Verwandtschaft zwischen den Tumorzellen der beiden analysierten Proben. Mittels Array CGH wurden in dem FLIS keine weiteren sekundären Veränderungen als benigne Polymorphismen, von denen 50 % mit denen des ausgereiften FL identisch waren, detektiert. Im Gegensatz dazu zeigte das ausgereifte FL chromosomale Zugewinne in 6p sowie chromosomale Verluste in 6q und 8p.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit eine klonale Verwandtschaft zwischen einem FLIS und einem ausgereiften FL identifiziert werden, die zeitgleich bei demselben Patienten vorkommen und bei dem das FLIS keine weiteren chromosomalen Veränderungen neben der t(14;18) im Vergleich zu dem manifestierten FL zeigte. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Ansammlung von numerischen Chromosomenaberrationen und Mutationen in dem ausgereiften FL im Vergleich zu den gleichzeitig vorhandenen FLIS-Zellen eher eine Veränderung des Ursprungsklons sind und somit ein frühes Stadium der Lymphomentwicklung repräsentieren.

blood

2011 118: 3442-3444
doi:10.1182/blood-2011-07-368944

A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma

Irina Bonzheim, Itziar Salaverria, Andrea Haake, Günther Gastl, Patrick Adam, Reiner Siebert, Falko Fend and Leticia Quintanilla-Martinez

To the editor:

A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma

Follicular lymphoma in situ (FLIS) is characterized by the presence of a B-cell population with immunophenotypic and genotypic features of follicular lymphoma (FL) but exclusively localized to germinal centers (GCs) in morphologically reactive lymph nodes.¹ FLIS lesions are monoclonal and carry the t(14;18)(q32;q21) translocation, which juxtaposes the *BCL2* gene to the immunoglobulin heavy chain (*IGH*) locus, causing constitutive expression of the antiapoptotic protein BCL2. Most of the cases described showed no evidence of manifest FL (mFL) at diagnosis, however, some individuals had synchronous evidence of mFL at another site or developed mFL during follow-up.²⁻³ This latter finding suggests that FLIS might represent a very early stage in the development of mFL. However, the genetic events responsible for progression of FLIS to mFL are largely unknown. Here we report a case of FLIS with BCL2 expression synchronously presenting with a BCL2 negative mFL, both lesions clonally related and carrying the t(14;18)(q32;q21) translocation. The case occurred in a 78-year-old man with stage III disease and FLIPI intermediate risk. The

diagnostic biopsy was composed of 2 lymph nodes. The larger one showed the typical morphology of FL grade I/II with the characteristic phenotype (CD20+, CD10+, BCL6+), except for lack of BCL2 expression. The small lymph node showed normal architecture, but with strong BCL2 expression in some morphologically reactive GCs diagnostic of FLIS (Figure 1A-B). FISH analysis using a *BCL2* break-apart probe (LSI *BCL2* BAP, Vysis) confirmed a *BCL2* breakpoint in both areas suggestive of the t(14;18)(q32;q21) translocation (Figure 1B; insert). *IGH* PCR clonality analysis performed in microdissected tissue showed identical monoclonal peaks in both lesions (Figure 1C-D). Sequence analysis of the *BCL2* breakpoint region confirmed the clonal identity of both lesions (Figure 1E). To explain the discordant BCL2 reactivity, exon 1 of the *BCL2* gene, where the epitope of the BCL2 antibody resides, was amplified and sequenced. A point mutation resulting in amino acid substitution (c.144 C > G; p.I48M ATC-ATG) was found in the mFL, whereas the FLIS showed a wild type sequence (Figure 1F-G). Array CGH (244K platform, Agilent Technologies)

analysis was performed on DNA from microdissected tissue of both FLIS and mFL.⁴ mFL showed gains in 6p22.2-p12.3 and losses in 6q14.1-qter and 8pter-p23.1. Subsequent FISH using probes for 6q21 and 6q27 confirmed 6q deletions in 80% of the mFL cells (Figure 1H-J). In contrast, the FLIS counterpart showed no pathogenetic alterations by array CGH. Nevertheless, 32 benign polymorphisms (CNPs) were observed, of which 16 (50%) were also detected in the mFL confirming the same patient origin.

This is the first description of a FLIS clonally related to the mFL where secondary genetic alterations are demonstrated, probably representing clonal evolution as sign of disease progression. Our findings provide evidence that FLIS is in fact a very early lesion carrying the t(14;18)(q32;q21) translocation without additional secondary genetic alterations.⁵⁻⁶ In this case, acquisition of numeric chromosomal aberrations and *BCL2* mutation indicates that the synchronous FLIS represents cells of the founder clone rather than early colonization of reactive GCs by mFL.

*Irina Bonzheim

Institute of Pathology, Eberhard-Karls-University of Tübingen,
Comprehensive Cancer Center Tuebingen, University Hospital Tuebingen,
Tuebingen, Germany

*Itziar Salaverria

Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts University,
University Hospital Schleswig-Holstein,
Kiel, Germany

Andrea Haake

Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts University,
University Hospital Schleswig-Holstein,
Kiel, Germany

Günther Gastl

Department of Internal Medicine, Innsbruck Medical University,
Innsbruck, Austria

Patrick Adam

Institute of Pathology, Eberhard-Karls-University of Tübingen,
Comprehensive Cancer Center Tuebingen, University Hospital Tuebingen,
Tuebingen, Germany

Reiner Siebert

Institute of Human Genetics, Christian-Albrechts University,
University Hospital Schleswig-Holstein,
Kiel, Germany

Falko Fend

Institute of Pathology, Eberhard-Karls-University of Tübingen,
Comprehensive Cancer Center Tuebingen, University Hospital Tuebingen,
Tuebingen, Germany

Leticia Quintanilla-Martinez

Institute of Pathology, Eberhard-Karls-University of Tübingen,
Comprehensive Cancer Center Tuebingen, University Hospital Tuebingen,
Tuebingen, Germany

Acknowledgments: The authors thank the technical staff of the laboratories in Tübingen and in Kiel for expert technical assistance. The work of R.S. on clonal evolution of t(14;18)-positive lymphomas is supported from Bundesministerium für Bildung und Forschung through the network "HämatoSys" The work of L.Q.-M., F.F. and I.B. is supported by the SFB 685.

Contribution: I.B., I.S. and A.H. performed research and analyzed data; G.G. contributed with vital patient information; P.A. analyzed data; and R.S., F.F. and L.Q.-M. designed the research, analyzed data and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Leticia Quintanilla-Martinez, Institute of Pathology, University Hospital Tuebingen, Liebermeisterstrasse 8, 72076 Tuebingen, Germany; e-mail: leticia.quintanilla-fend@med.uni-tuebingen.de.

*I.B. and I.S. contributed equally to this article.

References

- Harris NL, Swerdlow SH, Jaffe ES, et al. Follicular lymphoma. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, eds. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon, France: IARC Press; 2008:220-226.
- Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. *Blood*. 2002;99(9):3376-3382.
- Montes-Moreno S, Castro Y, Rodriguez-Pinilla SM, et al. Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: review of a series of 13 cases. *Histopathology*. 2010;56(5):658-662.
- Fend F, Quintanilla-Martinez L, Kumar S, et al. Composite low grade B-cell lymphomas with two immunophenotypically distinct cell populations are true bi-clonal lymphomas. A molecular analysis using laser capture microdissection. *Am J Pathol*. 1999;154(6):1857-1866.
- Roulland S, Navarro JM, Grenot P, et al. Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis. *J Exp Med*. 2006;203(11):2425-2431.
- Roulland S, Lebaillly P, Lecluse Y, Heutte N, Nadel B, Gauduchon P. Long-term clonal persistence and evolution of t(14;18)-bearing B cells in healthy individuals. *Leukemia*. 2006;20(1):158-162.

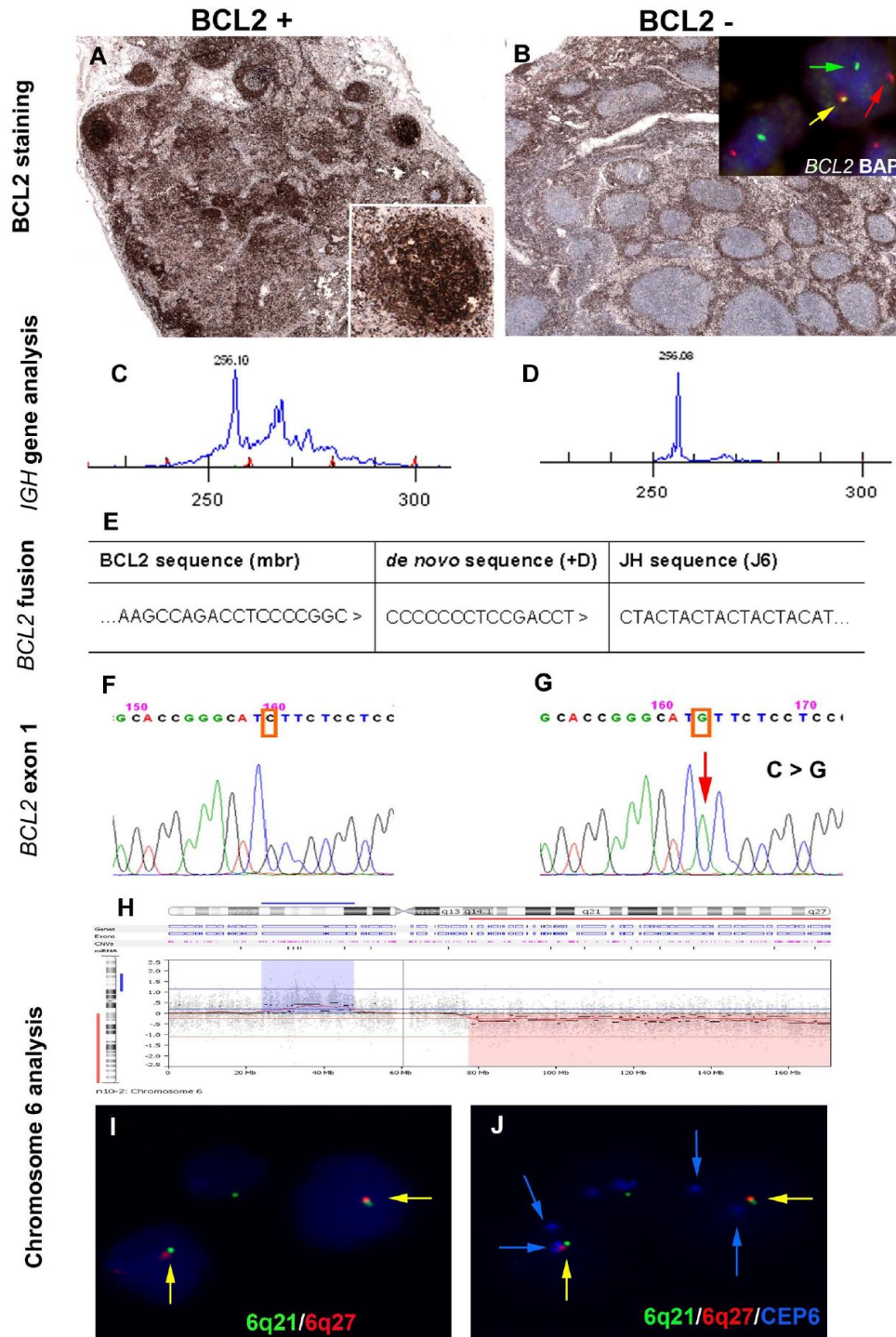


Figure 1. Immunophenotypic, molecular, and molecular cytogenetic findings in a synchronous, clonally related in situ and manifest follicular lymphoma. Immunohistochemical analysis of BCL2. (A) BCL2 expression in some germinal centers of a morphologically reactive lymph node. Inset: higher magnification of a BCL2 positive germinal center. (Labvision, BCL2 clone 100/D5). (B) Lymph node biopsy with the manifest follicular lymphoma, BCL2 negative. Inset: Interphase FISH analysis using double-color BCL2 break-apart probe (Abbott, Vysis; LSI BCL2 BAP) shows one allele with a normal co-localized signal (yellow arrow) and the second allele with a split of the red and green signal (arrows red and green), indicating a BCL2 break. (C-D) Clonality analysis of the IGH framework 2 (FR2) region shows an identical monoclonal peak of 256 base pairs in both lesions. (E) Sequence analysis of the major BCL2 breakpoint region showed an identical de novo sequence (+D) in both lesions. (F-G) Sequence analysis of BCL2 gene, exon 1 shows a wild-type sequence in the FLIS lesion (left), whereas the mFL shows a point mutation in residue 48 resulting in amino acid substitution (c.144 C > G, p.I48M ATC-ATG). (H) Array-CGH profile of chromosome 6 ideogram reveals loss in 6q14-qter (red label) and gain in 6p22.2-p12.3 (blue label) in the mFL. (I-J) Interphase FISH analysis using FISH probes for 6q21 (RP3-515A4 Spectrum green), 6q27 (RP3-450D5 Spectrum red), and a centromeric probe for chromosome 6 (CEP6 Spectrum aqua; Abbott, Vysis) False color display of the same area in panels I and J. Blue channel in panel I is DAPI counterstain whereas in panel J is Spectrum Aqua (CEP6). Nuclei contain only 1 6q21 and 6q27 signal (green, red) but 2 blue signals (CEP6) indicating deletion in 6q21 and q27 in line with the array CGH. FISH images were acquired with a 100x/1.40 oil-immersion objective in a Zeiss Axioskop fluorescence microscope (Zeiss) equipped with the appropriate filter sets and were documented and processed using the ISIS imaging system (MetaSystems). PCR analysis for IGH gene rearrangements was performed with BIOMED-2 primers for **Figure 1 (continued)** FR2 and FR3 using Phusion hot start DNA polymerase (Finnzymes) with adequate amplification conditions and D4-fluorescent dye primer modification (Sigma-Aldrich). The products were separated by capillary electrophoresis on the GenomeLab GeXP Genetic Analysis System and analyzed with GenomeLab GeXP 10.2 software (Beckman Coulter). Genomic DNA from residue 29-96 of the BCL2 gene was amplified using AmpliTaq Gold DNA Polymerase. PCR products were cloned into the pGEM-T easy vector and transfected into JM109 competent cells. Bacterial plasmids were processed according to standard procedures, and mFL and FLIS clones were subjected to dye terminator cycle sequencing (DTCS-Quick Start Master Mix) using M13 primers and capillary electrophoresis on the GenomeLab GeXP Genetic Analysis System 10.2 software. Array CGH of mFL and FLIS samples was performed on a Human Genome CGH Microarray 244K platform (Agilent Technologies) using Bio Prime Array-CGH Genomic Labeling Kit and hybridized using the manufacturer's protocol (Invitrogen). Slides were scanned with a GenePix 4000B microarray reader (Molecular Devices Corporation). Signal intensities from the generated images were measured and evaluated with Feature Extraction 9.5.3 and DNA Analytics v4.0.81 software packages, respectively (Agilent Technologies). Array CGH gains and losses were defined by use of a trial version of Nexus 6.0 β Discovery Edition.

3.2.2 Zusätzliche Ergebnisse: *EZH2* Tyr641-Mutationsanalyse und Quantifizierung der DNA-Methylierung mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung

Bereits in einer ersten eigenen publizierten Vorarbeit konnten wir zeigen, dass FLIS im Gegensatz zu einem ausgereiften FL weniger chromosomale Veränderungen besitzen (siehe Manuskript 2: „A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma“). Diese molekulargenetischen Untersuchungen in Abschnitt 3.2.1 beziehen sich jedoch nur auf einen Patienten. Um die Entwicklung eines FLIS zu einem ausgereiften FL besser verstehen zu können, ist es notwendig auch epigenetische Veränderungen von FLIS zu analysieren und mit anderen t(14;18) positiven FL-Proben zu vergleichen.

Weiterhin ist bekannt, dass Mutationen im Kodon 641 des *EZH2* Gens bei Keimzentrums-B-Zell-Lymphomen rekurrent vorkommen [240]. In den meisten Fällen führen diese Mutationen zu einer veränderten enzymatischen Aktivität von der Methyltransferase *EZH2* und gehen mit einer verstärkten Tri-Methylierung von Histon H3 an Lysin 27 einher, welches eine repressive Chromatinmodifikation darstellt [241]. Unbekannt ist jedoch, zu welchem Zeitpunkt im Verlauf der klonalen Tumorevolution eines FL diese Mutationen auftreten und wie häufig sie bei FLIS vorkommen. Zu diesem Zweck sollte an einem größeren Probenkollektiv mikrodissektierter Lymphknotengewebeproben von PFL, FLIS, sowie klonal verwandter Proben aus FLIS und voll ausgebildeten FL bzw. DLBCL die DNA-Methylierungsanalysen genomischer Regionen ausgewählter Kandidatengene durchgeführt werden und darüber hinaus der Mutationsstatus in Tyr641 des *EZH2*-Gens in diesen Proben bestimmt werden.

Das Probenkollektiv konnte auf Materialien von vier Patienten (n=4 Proben) mit einem PFL, vier Patienten mit einem FLIS (n=5 Proben), vier Patienten, bei denen sowohl ein FLIS als auch ein ausgereiftes FL vorlag (n=8 Proben), sowie einen Patienten, bei dem sowohl ein FLIS als auch ein DLBCL (n=2 Proben) diagnostiziert wurde, ausgeweitet werden (siehe Abschnitt 2.1.1, Tabelle 3 und Tabelle 4). Der in der oben genannten Publikation untersuchte Patient wurde in dieses Kollektiv miteingeschlossen (Fall-Nr: n10.1 und n10.2). Die Auswahl der Genorte für die Bisulfit-Pyrosequenzierung erfolgte in Analogie zur Studie in Abschnitt 3.1, basierend auf den Ergebnissen von Martin-Subero et al., 2009 [197, 249]. Aus den Listen der *de novo* methylierten Gene bei FL im Vergleich zu nicht-neoplastischen B-Zell-Lymphomen (table S4 aus [197] und table S7 aus [249]) wurden jene sieben Genorte (*EYA4*, *TWIST1*, *DAPK1*, *ETV1*, *TUSC3*, *GRB10* und *GAS7*) für die Analysen der DNA-Methylierung ausgewählt, die in beiden Publikationen vorkamen und darüber hinaus bereits von mir für Bisulfit-Pyrosequenzierungsanalysen etabliert werden konnten (Abschnitt 3.1). Für das Gen *DAPK1* waren für zwei Assays die PCR Bedingungen optimiert, die jeweils unterschiedliche Bereiche des Gens abdecken. Der Nachweis der Translokation t(14;18) in den lymphominfiltrierten Geweben erfolgte mittels

Ergebnisse

Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Die klonale Verwandtschaft dieser mikrodisssektierten Gewebe wurde mit Hilfe einer PCR des *IGH*-Lokus überprüft und bestätigt.

3.2.2.1 Untersuchung der genetischen und epigenetischen Unterschiede zwischen in-situ Follikulären Lymphomen und Follikulären Lymphomen mit partieller Lymphknoteninfiltration

Da sowohl FLIS als auch PFL als Vorläuferläsionen von klassischen FL erachtet werden, stellte sich die Frage, inwieweit sich t(14;18) positive FLIS und t(14;18) positive PFL sowohl genetisch als auch epigenetisch unterscheiden. In Analogie zur Publikation (Manuskript 2: „A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma“, Abschnitt 3.2.1) wurden mittels Array-CGH die chromosomalen Imbalancen dieser Patienten detektiert. Bei 2/4 PFL-Proben und 3/5 FLIS-Proben wurden keine chromosomalen Veränderungen in dem analysierten Probenmaterial detektiert. Es wurde ein Karyotyp, der dem eines gesunden Individuums entspricht, diagnostiziert (Tabelle 16). In drei anderen Proben wurden eher kleine, meist subklonale, Zugewinne auf Chromosom 1q, 7, 8q22, 11q 12p, 14 und 16p und Verluste auf Chromosom 1p, 10q und 16p identifiziert. Darüber hinaus konnte in 1/3 Proben mit PFL und in 1/4 untersuchten Proben mit einem FLIS eine Mutation in Tyr641 von *EZH2* nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Detektion chromosomaler Veränderungen mittels Array-CGH-Analyse und Bestimmung des Mutationsstatus Tyr641 in *EZH2* bei PFL und FLIS

Fall-Nr.	Fall-Bezeichnung	part.-Inf. d. Lymphknotens	Karyotyp nach Array CGH-Analyse (ISCN 2013)	<i>EZH2</i> Tyr641 – Mutationsstatus
1	part.-Inf_1	60%	arr(7)x2~3,8q22.2qter(99,347,066-14,6274826)x2~3,(12)x2~3,14q11.1q32.33(18,819,058-106,368,584)x2~3, (16)x2~3	mutiert
2	part.-Inf_2	80%	arr 1q31.1q44(186,538,190-247,249,719)x3,(7)x3,10q22.3q24.2(81,541,167-99,894,631)x1	nicht mutiert
3	part.-Inf_3	60%	arr(1-22)x2,(XY)x1	n.a.
4	part.-Inf_4	90%	arr(1-22,X)x2	nicht mutiert
1	isFL_1		arr(1-22)x2,(XY)x1	nicht mutiert
	isFL_2		arr(2)x2~3,(16)x2~3	mutiert
2	isFL_3		arr(1-22)x2,(XY)x1	n.a.
3	isFL_4		arr 1p36.33p35.2(0-30,941,376)x1,1q21.1qter(144,299,324- 247,249,719)x3,10q23.1q25.1(83,319,377-109,193,047)x1,11q23.2-qter(114,720,464-134,452,384)x2~3,16p13.3p13.11 (0-14,855,070)x1	nicht mutiert
4	isFL_5		arr(1-22)x2,(XY)x1	nicht mutiert

part.-Inf.: Follikuläres Lymphom mit partieller Lymphknoteninfiltration, PFL; isFL: in-situ-Follikuläre Lymphome, FLIS; n.a.: nicht analysiert.

Ergebnisse

Kurzgefasst zeigen FLIS und PFL keine charakteristischen genetischen Unterschiede, was Hinweis darauf gibt, dass es sich um ähnliche Läsionen handelt, die dementsprechend einer ähnlichen Entwicklungsstufe der t(14;18) positiven Tumorentwicklung entstammen.

Anschließend wurde die DNA-Methylierung in den genomischen Regionen von *EYA4*, *TWIST1*, *DAPK1*, *ETV1*, *TUSC3*, *GRB10* und *GAS7* bei 4/4 PFL und 2/5 Proben FLIS bestimmt (Tabelle 17).

Tabelle 17: DNA-Methylierungsanalysen von sieben genomischen Regionen bei vier Proben mit einem PFL und zwei Proben mit einem FLIS

Fall-Nr.	Fall-Bezeichnung	partielle Infiltration des Lymphknotens	<i>EYA4</i>	<i>TWIST 1</i>	<i>DAPK1_a</i>	<i>DAPK1</i>	<i>ETV1</i>	<i>TUSC3</i>	<i>GRB10</i>	<i>GAS7</i>
			3 CpGs	3 CpGs	4 CpGs	13 CpGs	6 CpGs	8 CpGs	15 CpGs	8 CpGs
1	part.-Inf_1	60 %	20.3	20.7	14.2	10.7	5.8	28.0	48.2	75.9
2	part.-Inf_2	80 %	11.0	9.2	28.6	22.4	44.9	46.2	54.7	87.2
3	part.-Inf_3	60 %	13.2	10.6	7.6	20.2	1.1			
4	part.-Inf_4	90 %	9.7	8.5	7.6		15.1	30.2	47.5	48.7
1	isFL_1		5.1	6.3	7.0	14.3	5.7	20.0	63.1	55.6
	isFL_2		7.4	8.8	16.7	23.0	6.8	38.3	53.9	69.3
	Kontrolle	MK	87.8	86.3	92.8	88.1	80.3	90.3	90.3	92.6
		WGA	2.6	0.0	3.1	1.3	2.2	3.7	2.8	1.4

Angegeben ist jeweils der mittlere Methylierungswert, wobei der DNA-Methylierungsgrad zusätzlich farblich hervorgehoben ist: grün= wenig DNA-Methylierung, rot= viel DNA-Methylierung, weiß=nicht analysiert. Die Anzahl der analysierten CpGs ist aufgeführt.

MK: methylierte Kontrolle; WGA: whole genome amplification (Gesamt-Genom-Amplifikation), hier: unmethylierte Kontrolle; part.-Inf.: Follikuläres Lymphom mit partieller Lymphknoteninfiltration (PFL); isFL: in-situ-Follikuläre Lymphome (FLIS).

Insgesamt waren die DNA-Methylierungswerte unter den analysierten Proben relativ ähnlich, wobei Fall 2 mit leichten Abweichungen auffiel. Während die DNA-Methylierung bei 4/5 analysierten PFL und FLIS Proben bei *ETV1* zwischen 1-15 % und bei *TUSC3* zwischen 20-38 % lag, wurden bei Fall 2 höhere DNA-Methylierungswerte detektiert. Dieser Fall 2 (part.-Inf_2) wies bei *ETV1* 80 % und *TUSC3* 45 % DNA-Methylierung auf. *ETV1* ist auf Chromosom 7 lokalisiert und kodiert für ein Mitglied der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren. Vor dem Hintergrund, dass ausschließlich bei diesem Patienten ein Zugewinn auf Chromosom 7pter-qter mittels Array-CGH detektiert wurde, könnte dieses eine Erklärung für den Zugewinn der DNA-Methylierung in *ETV1* sein. Weiterführende Untersuchungen sollten die Hypermethylierung bei diesem Fall 2 in *ETV1* und *TUSC3* klären. Eine prognostisch signifikante Bedeutung konnte bisher nur für eine gleichzeitige Methylierung von *MGMT* und *DAPK1* gezeigt werden [250] und ist für *ETV1* und *TUSC3* bisher noch nicht beschrieben.

Als nächstes sollte eine statistische Analyse mittels t-test für unabhängige Proben Aufschluss darüber geben, ob sich PFL und FLIS in einer der analysierten Regionen epigenetisch voneinander unterscheiden. Es konnte kein signifikanter Unterschied in den DNA-Methylierungswerten bei 7/8 analysierten

Ergebnisse

genomischen Regionen und zwischen den beiden Gruppen detektiert werden (t-test für unabhängige Proben, $p=0.206-0,89$). Nur für den Genort *EYA4* wurde bei den PFL ein geringfügig höherer DNA-Methylierungswert (t-test für unabhängige Proben, $p=0.05$) ermittelt. Da diese Ergebnisse auf eine sehr geringe Anzahl analysierter Proben basieren, ist die Stichhaltigkeit einer differenziellen DNA-Methylierung zwischen einem PFL und einem FLIS in *EYA4* nicht gesichert und sollte an einem größeren Probenkollektiv überprüft werden.

Zusammengefasst wurden mittels Array-CGH Analysen sowohl bei PFL und FLIS keine bis wenige chromosomale Veränderungen detektiert und darüber hinaus wurde in beiden Läsionstypen jeweils bei einem Patienten eine Mutation in *EZH2* Tyr641 nachgewiesen. Des Weiteren ergab ein statistischer Vergleich der DNA-Methylierungswerte in den genomischen Regionen von *EYA4*, *TWIST1*, *DAPK1*, *ETV1*, *TUSC3*, *GRB10* und *GAS7* zwischen den PFL und den FLIS keinen signifikanten Unterschied. Diese epigenetischen und genetischen Ähnlichkeiten unter den PFL und FLIS zeigen, dass diese Läsionen eine sich genetisch und epigenetisch ähnelnde Entwicklungsstufe der Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL darstellen.

3.2.2.2 Untersuchung der genetischen und epigenetischen Veränderungen bei klonal verwandten Proben von in-situ Follikulären Lymphomen und klassischem Follikulären Lymphom

Anschließend wurden dieselben Analysen wie bei den PFL und den FLIS an klonal verwandten Proben von fünf Patienten durchgeführt, bei denen sowohl das Material eines t(14;18) positiven FLIS und eines voll ausgereiften t(14;18) positiven FL bzw. DLBCL vorlag. Die Ergebnisse der genetischen Untersuchungen sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Interessanterweise konnten mittels Array CGH-Analyse bei allen analysierten FLIS keine chromosomalen Veränderungen im Vergleich zu allen dazugehörigen ausgereiften FL oder DLBCL nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden bei dem ausgereiften FL und dem DLBCL Zugewinne in 1q, 2q, 5p, 6p, 7p, 9q, 13q, 12q, 18p sowie Verluste in 6q, 8p, 4q, 9q, 10q, 13q und 20q detektiert. Eine Mutation in *EZH2* Tyr641 konnte bei zwei klassischen FL und dem DLBCL nachgewiesen werden, aber in keiner der analysierten FLIS-Proben. Dieses zeigt, dass eine Ansammlung von numerischen Chromosomenaberrationen und Mutationen in dem ausgereiften t(14;18) positiven FL im Vergleich zu den t(14;18) positiven FLIS-Zellen einen Hinweis darauf sind, dass chromosomale Veränderung zugewonnene Ereignisse im Progress der Tumorevolution darstellen.

Ergebnisse

Tabelle 18: Detektion von chromosomalen Veränderungen mittels Array-CGH-Analyse und Bestimmung des Mutationsstatus Tyr641 in *EZH2* bei gepaarten Proben von Patienten mit einem FLIS und klassischen FL bzw. DLBCL

Fall-Nr.	Fall-Bezeichnung	Diagnose	Karyotyp nach Array CGH-Analyse (ISCN 2013)	<i>EZH2</i> Tyr641 –Mutationsstatus
1*	n10-1	FLIS	arr(1-22)x2,(XY)x1	nicht mutiert
	n10-2	klassisches FL	arr 6p22.2p12.3(24,108,759-48,023,092)x3,6q14.1qter (77,575,764-17,899,992)x1,8pterp23.1(0-7,088,822)x1	nicht mutiert
2	n11-1	FLIS	arr(1-22,X)x2	nicht mutiert
	n11-2	klassisches FL	arr 10q23.1q25.1(82,461,550-109,401,991)x1	mutiert
3	n12-1	FLIS	arr(1-22,X)x2	nicht mutiert
	n12-2	klassisches FL	arr1q31.2qter(189,673,655-23,8267,832)x3,2q36.3q37.3(227,592,916-241,226,324)x3	mutiert
4	n14-1	FLIS	arr(1-22,X)x2	nicht mutiert
	n14-2	DLBCL	arr 1p36.33p36.23(0-7,430,265)x1,1q21.2q41(148,307,079-217,073,158)x3,2p21p15(47,539,067-63,926,279)x4,4q12q22.2(58,874,780-94,918,671)x1,5p15.33q35.3(0-180,857,866)x3,7p22.3q36.3(0-15,8821,424)x3,9q22.31q22.33(94,943,486-98,551,088)x1,9q22.33q34.2(98,551,088-135,828,837)x3,13q11q14.11(18,231,771-40,488,323)x3,13q14.11q14.3(40,539,035-49,846,552)x1,13q14.3q34(49,903,826-11,4069,648)x3,18p11.32q11.2(0-18,880,150)x3,18q11.2q12.3(18,880,151-38,425,257)x4,20q11.23q13.33(34,342,181-603,356,648)x1,21q11.2q22.3(13,511,936-33,432)x3	mutiert
5	n15-1	FLIS	arr(1-22)x2,(XY)x1	nicht mutiert
	n15-2	klassisches FL	arr 1p36.33p36.22(0-10,126,268)x1,1q12q23.2(142,397,209-15,7950,778)x3,1q23.2q23.3(157,986,299-160,907,313)x4,1q32.1q31.1(160,978,176-184,073,350)x3,1q32.1(198,989,941-202,890,494)x3,3p24.3p24.2(23,533,679-25,348,396)x1,3p24.2p22.1(25,348,396-39,493,452)x3,3p22.1(39,493,452-40,226,945)x1,3p22.1p14.2(40,226,945-59,399,068)x3,5q11.1q14(18,035,891-37,669,900)x1,8q24.23q24.3(137,826,383-146,274,826)x3,11p15.5q13.4(0-73,879,979)x3,17p13.3p11.2(0-18,640,667)x1,17p11.2qter(18,668,445-78,706,284)x3,(X)x3,Yp11.31q11.23(2,300,402-27,013,292)x1	nicht mutiert

FLIS: in-situ-FL; FL: Follikuläres Lymphom; DLBCL: diffus großzelliges B-Zell Lymphom

* bereits publiziert (siehe Abschnitt 3.2.1).

Die DNA-Methylierung in den genomischen Regionen von *EYA4*, *TWIST1*, *DAPK1*, *ETV1*, *TUSC3*, *GRB10* und *GAS7* wurde in 9/10 gepaarten Proben analysiert (Tabelle 19). Insgesamt unterschieden sich die DNA-Methylierungswerte der FLIS-Proben von den DNA-Methylierungswerten der korrespondierenden Partnerprobe. Zur statistischen Überprüfung der Signifikanz unterschiedlicher DNA-Methylierungswerte wurde eine Analyse mittels Wilcoxon signed-rank Test für gepaarte Proben durchgeführt. Bei 2/5 untersuchten Patienten wurde ein signifikanter Unterschied in der DNA-Methylierung zwischen den klonal verwandten Proben über alle analysierten genomischen Regionen identifiziert. Bei Patient 12 und Patient 14 waren die DNA-Methylierungswerte in dem FLIS signifikant niedriger als in dem klonal

Ergebnisse

verwandtem klassischen FL bei Patient 12 und dem zugehörigen DLBCL bei Patient 14 ($p=0.012$, Wilcoxon signed-rank Test, Abbildung 21).

Tabelle 19: DNA-Methylierungsanalysen von sieben genomischen Regionen bei gepaarten Proben von Patienten mit einem FLIS und einem klassischen FL bzw. DLBCL

Fall-Nr.	Fall-Bezeichnung	Diagnose	<i>EYA4</i>	<i>TWIST 1</i>	<i>DAPK1_α</i>	<i>DAPK1</i>	<i>ETV1</i>	<i>TUSC3</i>	<i>GRB10</i>	<i>GAS7</i>
			3 CpGs	3 CpGs	4 CpGs	13 CpGs	6 CpGs	8 CpGs	15 CpGs	8 CpGs
1*	n10-1	FLIS	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	n10-2	klassisches FL	17.3	30.7	33.6	35.1	40.4	51.3	69.9	82.6
2	n11-1	FLIS	5.7	19.5	6.4	3.1	5.4	14.9	73.9	36.3
	n11-2	klassisches FL	4.8	32.6	6.5	9.6	4.3	30.3	46.2	20.6
3	n12-1	FLIS	7.4	9.7	4.9	1.2	12.5	13.9	43.9	70.2
	n12-2	klassisches FL	25.7	42.3	22.3	27.6	51.9	69.2	68.8	80.7
4	n14-1	FLIS	9.9	22.7	11.1	15.2	13.6	25.8	45.1	62.9
	n14-2	DLBCL	63.3	78.3	50.8	54.7	57.3	69.7	73.1	92.2
5	n15-1	FLIS	15.4	34.7	32.7	32.2	16.0	40.0	48.5	62.5
	n15-2	klassisches FL	27.5	36.7	19.9	32.5	21.0	41.3	59.8	74.9
	Kontrollen	MK	87.8	86.3	92.8	88.1	80.3	90.3	90.3	92.6
		WGA	2.6	0.0	3.1	1.3	2.2	3.7	2.8	1.4

* Fall aus der Publikation (siehe Abschnitt 3.2.1). Angegeben ist jeweils der mittlere Methylierungswert, wobei der DNA-Methylierungsgrad zusätzlich farbig hervorgehoben ist: grün=wenig DNA-Methylierung, rot=viel DNA-Methylierung. Die Anzahl der analysierten CpGs ist aufgeführt.

MK: methylierte Kontrolle; WGA: whole genome amplification (Gesamt-Genom-Amplifikation), hier: unmethylierte Kontrolle; n.a.: nicht analysiert; FLIS: in-situ-FL; FL: Follikuläres Lymphom; DLBCL: diffus großzelliges B-Zell-Lymphom.

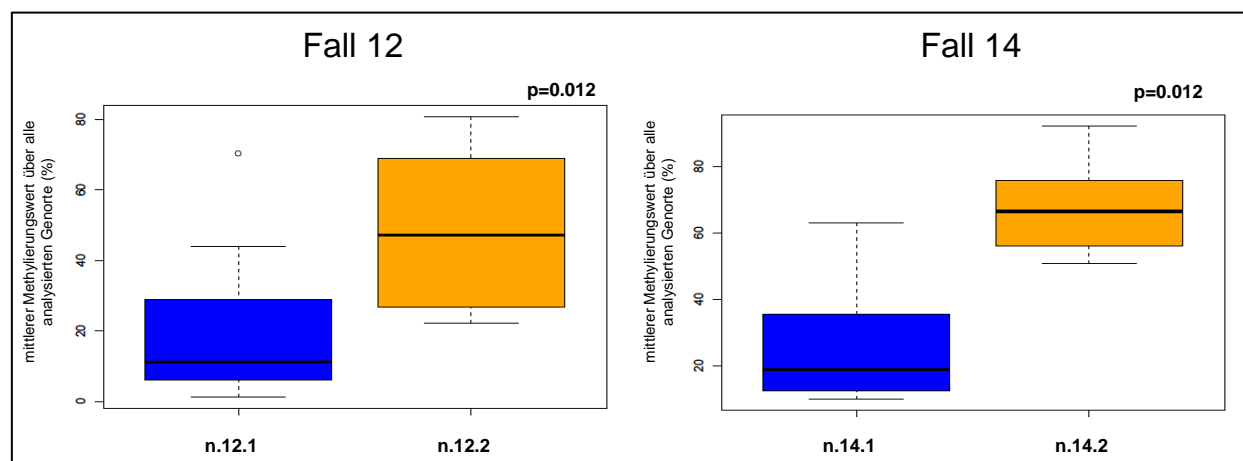


Abbildung 21: Wilcoxon signed-rank Test für gepaarte Proben. Bei Patient 12 und Patient 14 wurde ein signifikanter Unterschied in der DNA-Methylierung zwischen den gepaarten Proben identifiziert ($p=0.012$).

Bei dem Patient n.12 wurde im Alter von 55 Jahren ein FLIS, und zwei Jahre später ein klassisches FL diagnostiziert. Neben chromosomalen Zugewinnen auf 1q31.2-qter und 2q36.3-q37.3 wurde zudem in dem klassischen FL eine Mutation in Tyr-641 von *EZH2* detektiert. Bei Patient n.14 wurde ebenfalls eine Mutation Tyr-641 von *EZH2* nachgewiesen, allerdings wurde bei diesem Patienten neben einem FLIS ein DLBCL zum selben Zeitpunkt diagnostiziert. Ich konnte hiermit nun erstmals zeigen, dass die Proben

Ergebnisse

dieser Patienten zudem einen signifikanten epigenetischen Unterschied aufweisen und darüber hinaus eine Mutation in Tyr-641 von *EZH2* tragen. Insgesamt geben diese Resultate weitere Hinweise darauf, dass im Verlauf der Tumorentwicklung die Ansammlung von numerischen Chromosomenaberration zusammen mit einer Mutation in dem *EZH2*-Gen und Veränderungen in der DNA-Methylierung Indikatoren für eine Tumorprogression sind, die auf Veränderung des Ursprungsklons zurückzuführen sind.

Zusammengefasst zeigte die Array CGH Analyse bei klonal verwandten Proben von Patienten mit einem FLIS und einem klassischen FL oder DLBCL, dass, neben der t(14;18) die in allen Proben detektiert wurde, nur in den klassischen FL und dem DLBCL, aber nicht in dem FLIS weitere chromosomale Veränderungen vorliegen. Eine Mutation in *EZH2* Tyr641 konnte ebenfalls nicht in den FLIS, aber bei zwei klassischen FL und dem DLBCL nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied in den DNA-Methylierungswerte in den genomischen Regionen von *EYA4*, *TWIST1*, *DAPK1*, *ETV1*, *TUSC3*, *GRB10* und *GAS7* zwischen den klonal verwandten Proben wurde bei einem Patienten mit einem FLIS und einem klassischen FL sowie einem Patienten mit einem FLIS und einem DLBCL detektiert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass nicht nur genetische Veränderungen, sondern auch epigenetische Veränderungen eine wesentliche Rolle bei der Tumorentwicklung spielen und weitere Modifikationen im Verlauf der Tumorentwicklung bei FL darstellen.

3.3 Longitudinale Daten-Akquise zur Analyse der klonalen Tumorevolution bei t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen

Um die Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL zu untersuchen, sollte, basierend auf dem klonalen V_H-Gen-Rearrangement die Evolution von t(14;18) positiven FL hinsichtlich epigenetischer Veränderung in der DNA-Methylierung und den funktionalen Veränderungen an ausgewählten Kandidatengenen untersucht werden. Zur Charakterisierung der klonalen Evolution bei FL wurden Tumorproben von dem Initialmaterial und mindestens einem zweiten Material von zeitgleichen oder unterschiedlichen (Rezidiv) Entnahmezeitpunkten analysiert. Diese Arbeiten wurden im Rahmen und gemäß den Richtlinien des Forschungsverbundes „Systems Biology of the Haematopoetic Systems and Related Neoplasias (HämatoSys)“ durchgeführt. Die Auswahl des zu untersuchenden Probenkollektivs ist unter Abschnitt 2.1.1 ausführlich beschrieben. Dieses Probenkollektiv wurde genutzt, um zunächst *IGH*-Mutationsanalysen zur Erstellung phylogenetischer Beziehungen von Tumorklonen zur Rekonstruktion der klonalen Evolution der FL durchzuführen (Abschnitt 3.3.1). Anschließend erfolgte die Charakterisierung der Veränderungen der DNA-Methylierung (Abschnitt 3.3.2) sowie die Analyse somatischer Mutationen bei Kandidatengenen in den DNA-Proben (Abschnitt 3.3.3). Die folgenden Analysen und Darstellungen basieren auf einen Datenstand vom 22.12.2012.

3.3.1 Rekonstruktion der klonalen Tumorevolution basierend auf Mutationsanalysen des V_H-Rearrangement

Analysen des Mutationsprofils von Immunglobulin-Schwerkettengenen bei Initial- und Rezidivtumoren geben Aufschluss über den Verwandtschaftsgrad der einzelnen Klone zueinander. Durch die VDJ-Rekombination im Knochenmark tragen die Nachkommen eines Zellklons die gleiche V_H-Genumlagerung, unterscheiden sich jedoch im Muster der während der Keimzentrumsreaktion neu eingeführten Mutationen. Vor diesem Hintergrund wurden Mutationsanalysen des *IGH*-Lokus am gesamten Probenkollektiv durchgeführt und die phylogenetischen Beziehungen der klonalen Evolution rekonstruiert. Die Analysen und Auswertungen sind in Abschnitt 2.2.5.6 beschrieben.

Insgesamt konnten für 23/37 Patienten (umfasste 47 Lymphknotenbiopsate) die phylogenetischen Beziehungen der klonalen Evolution rekonstruiert werden. In vielen Fällen war jedoch entweder die DNA-Qualität oder ein geringer Tumorzellgehalt problematisch, so dass trotz wiederholter Klonierungsversuche kein auswertbares Ergebnis aus den Klonierungsexperimenten erzielt werden konnte. In der Abbildung 22 sind Bäume an drei repräsentativen Beispielen dargestellt.

Ergebnisse

A) Parallele Evolution:

Charakteristisch:

zwei separate Äste, die jeweils nur die Sequenzen entweder des Initial- oder des Rezidivtumors enthalten

Bsp.: Fall-Nr.16

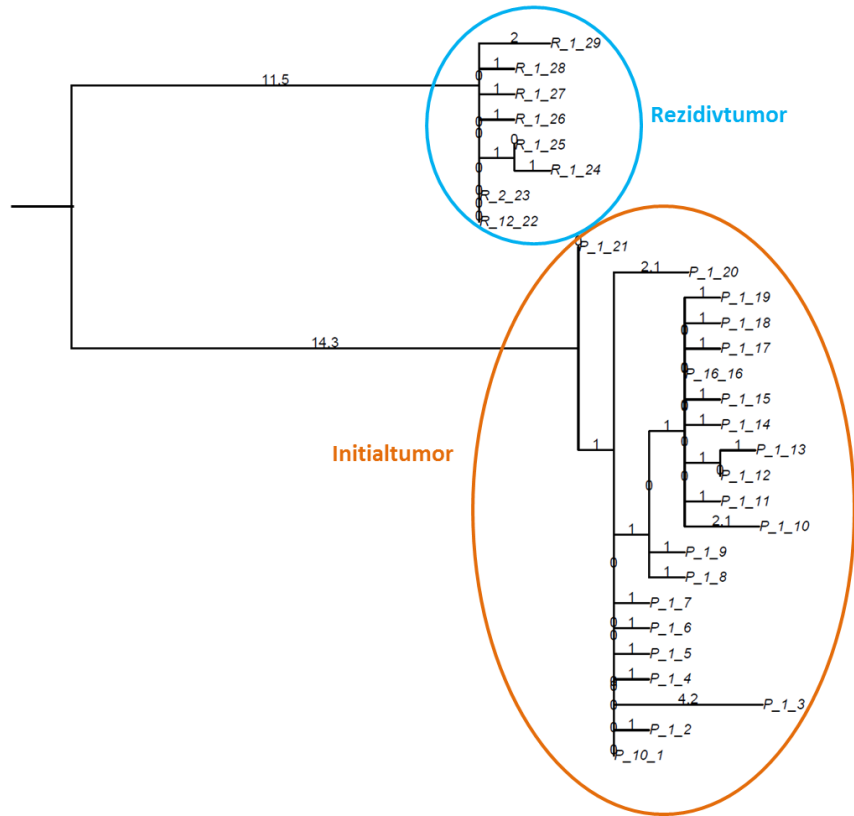
Initialtumor: MPI-772 (P)

Rezidivtumor: MPI-771 (R)

Anzahl der Reads, die zur Modellierung dieses Baumes hinzugezogen wurden:

P: 45 Reads

R: 20 Reads



B. Sequenzielle Evolution:

Charakteristisch:

nur ein Cluster für den Rezidivtumor, wobei die Sequenzen aus einem Ast des Initialtumors entstanden sind

Bsp.: Fall-Nr.20

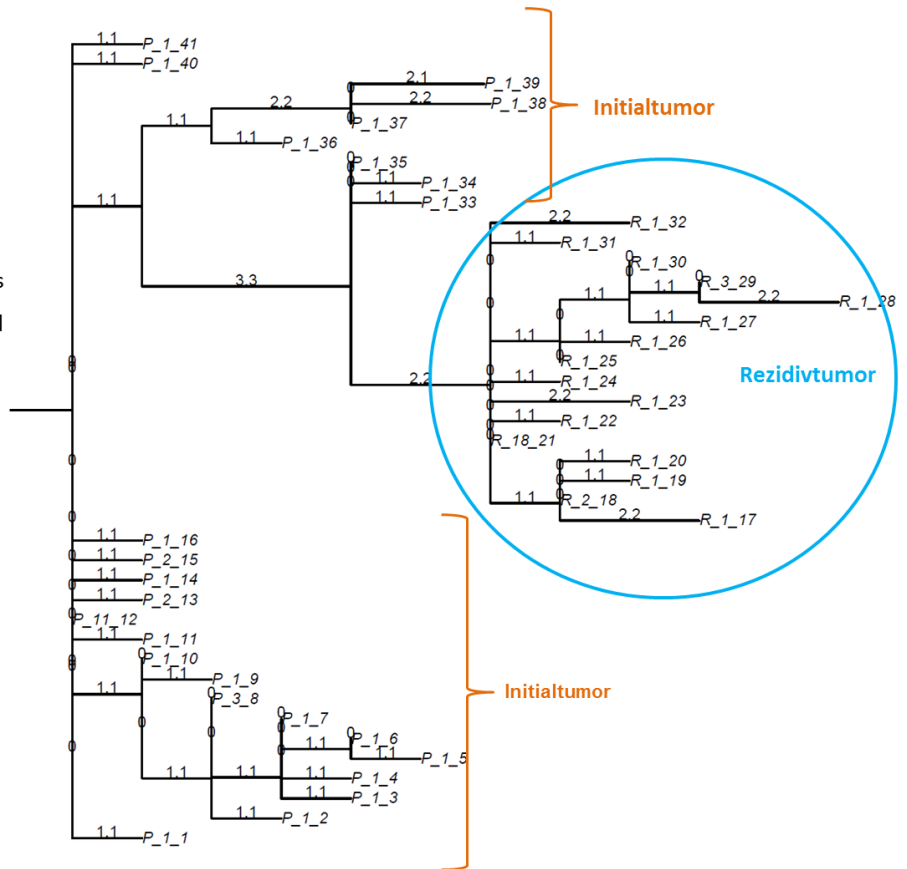
Initialtumor: SYS-076 (P)

Rezidivtumor: SYS-077 (R)

Anzahl der Reads, die zur Modellierung dieses Baumes hinzugezogen wurden:

P: 39 Reads

R: 36 Reads



Ergebnisse

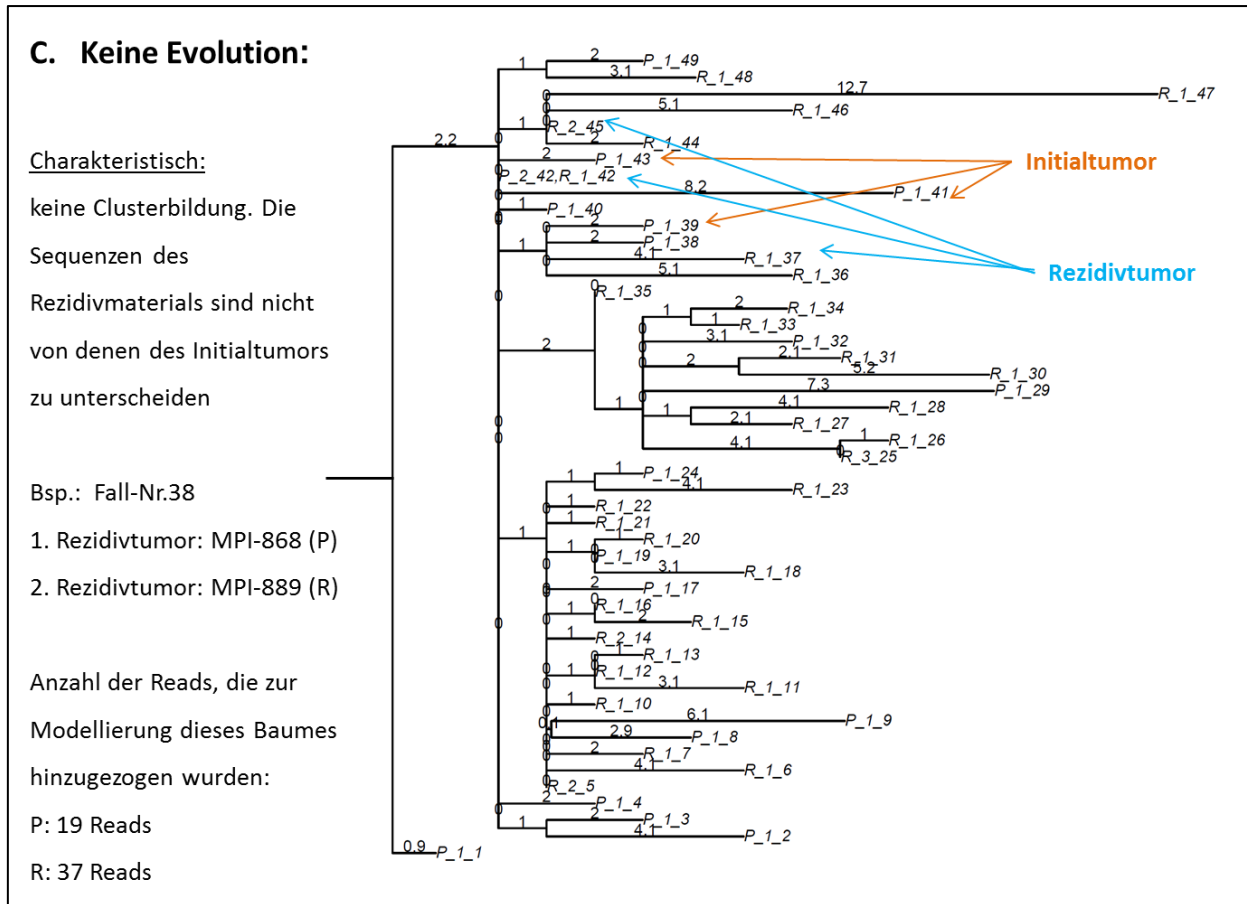


Abbildung 22: Evolutionstypen bei t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen. Anhand des V_H Rearrangements konnten drei verschiedene Evolutionstypen in Follikulären Lymphomen identifiziert werden: **A)** 5/23 Fälle zeigten eine parallele Evolution **B)** 4/23 eine sequenzielle und **C)** in 6/23 war keine Evolution ablesbar. 8/23 analysierten Patienten konnten keinem dieser drei Evolutionstypen zugeordnet werden. Für diese Darstellung wurden die modellierten Bäume aus der Klonierung mit anschließender Sanger-Sequenzierung verwendet.

Legende: Bsp.: P_1_19: P= Sequenzen des Primärtumors, bzw. der ersten analysierten Probe, R= Sequenzen des Primärtumors, bzw. der zweiten analysierten Probe. Die erste Zahl gibt an, wie oft diese Sequenzen im Datensatz vorkommen (identische Sequenzen erscheinen im Baum nicht mehrfach). Die zweite Zahl ist ein Label und unterscheidet die Sequenzen untereinander. Die Astlänge gibt jeweils die geschätzte Anzahl der Mutationen auf dem Ast an (bezogen auf das ganze Alignment). Die Abbildungen sind mit Genehmigung des HämatoSys-Verbundes (WP3.3). Stand der Datenanalyse: 29.11.2012.

Die Daten für die Rekonstruktion wurden für 23 Fälle sowohl mittels Klonierung und anschließender Sanger-Sequenzierung, als auch für 11/23 Patienten mittels NGS erhoben. Davon wurden in 6/11 Fällen gleiche Evolutionstypen zwischen den rekonstruierten Bäumen aus der Klonierung mit anschließender Sanger-Sequenzierung und den aus NGS erhobenen phylogenetischen Beziehungen identifiziert, wohingegen bei 5/11 Fälle unterschiedliche Evolutionstypen zugeordnet wurden. Dieses ist u.a. darauf zurückzuführen, dass mittels NGS ein kürzerer Sequenzabschnitt analysiert wurde als mittels Sanger-Sequenzierung. Da mittels NGS eine erhebliche größere Anzahl auswertbarer Sequenzen (Reads) generiert werden, die entsprechend zu ausgedehnten Baummodellen führen, sind in der Darstellung von Abbildung 22 die rekonstruierten Bäume gezeigt, die auf dem Datensatz der Klonierung mit anschließender Sanger-Sequenzierung beruhen.

Ergebnisse

Insgesamt konnte anhand der Rekonstruktion der klonalen Evolution basierend auf den *IGH*-Mutationen eine Klassifizierung der analysierten Fälle in drei Evolutionstypen vorgenommen werden. Bei dem ersten Evolutionstyp ließen sich die Sequenzen des Initialtumor klar von denen des Rezidivtumors unterscheiden und der jeweilige „Busch“ enthielt nur die Sequenzen des Initial- bzw. des Rezidivtumors. Dieser Evolutionstyp wird im Folgenden als „parallel“ bezeichnet und wurde bei 5/23 Patienten beobachtet. Charakteristisch für den zweiten Evolutionstyp ist, dass die Sequenzen des Rezidivtumors ein Cluster bilden und aus einem Ast des Initialtumors hervorgegangen sind. Dieser Typ konnte bei 4/23 Patienten detektiert werden und wird im Folgenden als „sequenziell“ bezeichnet. Bei dem dritten Typ ist keine Clusterbildung der Sequenzen und bzw. keine Evolution abzulesen, die Sequenzen des Initialtumors sind mit denen des Rezidivtumors vermischt. Diesen Typ zeigten 6/23 untersuchter Patienten und wird als „nicht unterscheidbar/ keine Evolution“ bezeichnet. Bei 8/23 Patienten war keine Zuordnung zu einem dieser drei Evolutionstypen möglich. Bei diesen unklaren Fällen konnte beispielsweise anhand der Sequenzen aus der Klonierung ein anderer Evolutionstyp zugeordnet werden als aus den Analysen mittels NGS. Bei einem Fall zeigte der rekonstruierte Baum, dass die Sequenzen des Initialtumors aus denen des Rezidivtumors hervorgingen, und nicht wie erwartet umgekehrt. In der Tabelle 20 ist eine Übersicht der Klassifikation bei 23/37 analysierter Patienten aufgeführt.

Tabelle 20: Klassifikation des Evolutionstyps. Stand der Datenanalyse: 29.11.2012

Evolutionstyp	Fall-Nr. (interne Nr.)	Evolutionstyp	Fall-Nr. (interne Nr.)
Parallele Evolution n= 5	3 (SYS-016/ SYS-017/SYS-018) 5 (SYS-025/ SYS-026) 6 (MPI-777/ MPI-778) 13 (MPI-478/ MPI-460) 16 (MPI-772/ MPI-771)	keine Evolution n= 6	7 (MPI-775/ MPI-776) 10 (MPI-786/ MPI-784) 11 (MPI-787/ MPI-909) 28 (MPI-508/ MPI-510) 30 (MPI-506/ SYS-143) 38 (MPI-868/ MPI-889)
Sequenzielle Evolution n= 4	2 (SYS-014/ SYS-015) 12 (SYS-053/ SYS-054/ SYS-055) 20 (SYS-076/ SYS-077) 24 (SYS-090/ SYS-091)	Keine/ keine eindeutige Zuordnung n= 8	14 (SYS-065/ SYS-067) 15 (SYS-068/ SYS-069) 18 (MPI-523/ MPI-908) 19 (SYS-070/ SYS-071) 23 (SYS-088/ SYS-089) 26 (MPI-458/ MPI-462) 33 (SYS-064/ MPI-885) 35 (MPI-871/ MPI-891)

Zusammengefasst konnten, anhand der Rekonstruktion der klonalen Evolution basierend auf dem V_H Rearrangement, 65 % (15/23) der analysierten Patienten entweder dem parallelen, dem sequenziellen oder dem Typ mit keiner Evolution zugeordnet werden. Aus diesen Ergebnissen ergab sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen den Evolutionstypen und der zeitlichen Entwicklung zwischen dem Initialtumor und des Rezidivs gibt. Bei den 15 analysierten Patienten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Evolutionstyp und dem Zeitraum zwischen Initial- und Rezidivtumor ermittelt werden ($p=0,118$, Kruskal-Wallis-Test) (Abbildung 23). Somit lässt sich schlussfolgern, dass der Umfang der Unterschiede nicht mit der Zeitspanne zwischen Initial- und Rezidivtumor korreliert.

Ergebnisse

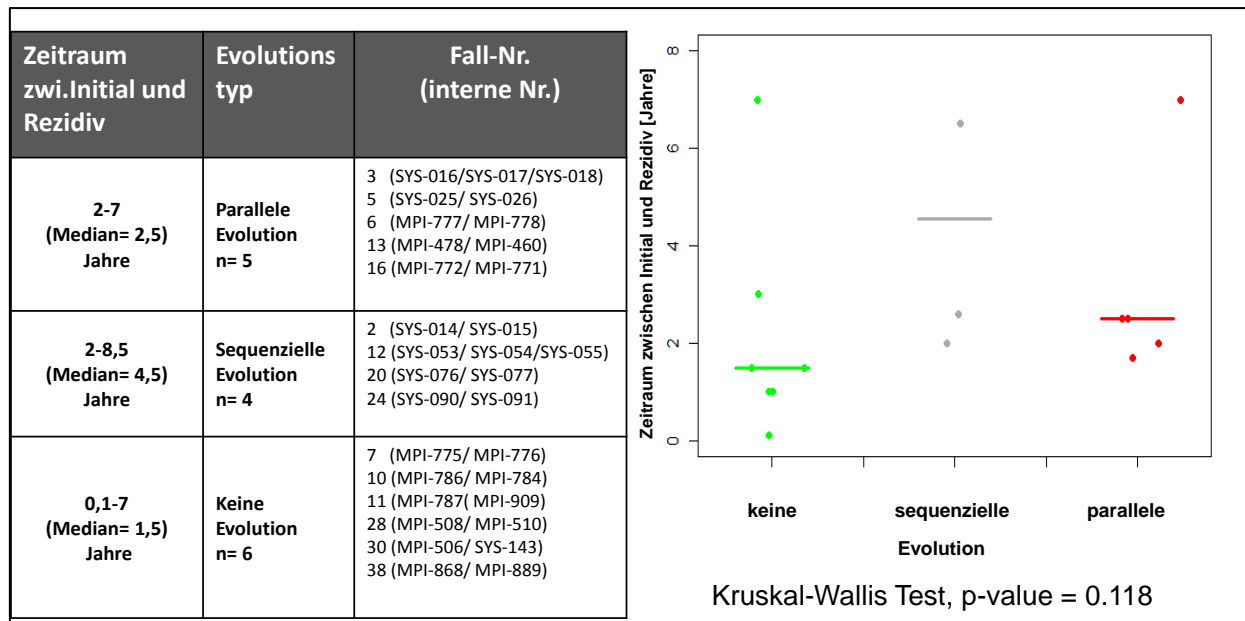


Abbildung 23: Statistische Überprüfung der Signifikanz (Kruskal-Wallis-Test) des Zeitraums zwischen Initial- und Rezidivtumor bei 15 Fällen mit einem zugeordneten Evolutionstyp. Aufgeführt ist der Zeitraum zwischen Initial- und Rezidivtumor in Jahren und die jeweilige Zuordnung der Patienten zu dem Evolutionstyp. Bei den 15 analysierten Patienten konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Evolutionstyp und dem Zeitraum zwischen Initial- und Rezidivtumor ermittelt werden ($p=0,118$, Kruskal-Wallis-Test).

3.3.2 Analyse der Veränderung der DNA-Methylierung im Verlauf der klonalen Tumorevolution

Im Anschluss an die Rekonstruktion der klonalen Evolution und Klassifizierung des Evolutionstyps anhand des V_H Rearrangements sollten die Veränderungen der DNA-Methylierung im Verlauf der Tumorentwicklung analysiert werden. Dazu wurde eine DNA-Methylierungsanalyse mittels Infinium HumanMethylation27K von Illumina am gesamten Probenkollektiv durchgeführt (Abschnitt 3.3.2.1). Eine Validierung dieser Ergebnisse erfolgte bei 18 Proben von 9 Patienten mittels Infinium HumanMethylation450K von Illumina (Abschnitt 3.3.2.2). Anschließend wurde die genomweite DNA-Methylierung am gesamten Probenkollektiv mittels LUMA bestimmt (Abschnitt 3.3.2.3).

3.3.2.1 Bestimmung der DNA-Methylierung mittels HumanMethylation27K

Der Infinium HumanMethylation27K Methylierungsarray detektiert 27 578 verschiedene CpG-Positionen von 14 495 Genen, die überwiegend in den CpG-Inseln von Promotorregionen lokalisiert sind. Insgesamt konnten 35/37 Patienten (entspricht 87 Proben) mittels HumanMethylation27K Methylierungsarrays analysiert werden. Um zu überprüfen, ob es große Unterschiede zwischen dem DNA-Methylierungsprofil des Initial- und des Rezidivtumors oder zwischen den drei ermittelten Evolutionstypen gibt, wurde zunächst eine unsupervidierte Clusteranalyse des gesamten Datensatzes durchgeführt (Abbildung 24). Mit einer unsupervidierten Clusteranalyse werden Ähnlichkeitsstrukturen

Ergebnisse

in großen Datenbeständen überprüft, in diesem Fall DNA-Methylierungswerte für bestimmte CpG-Positionen, ohne eine „Gruppenzugehörigkeit“ vorzugeben [251].

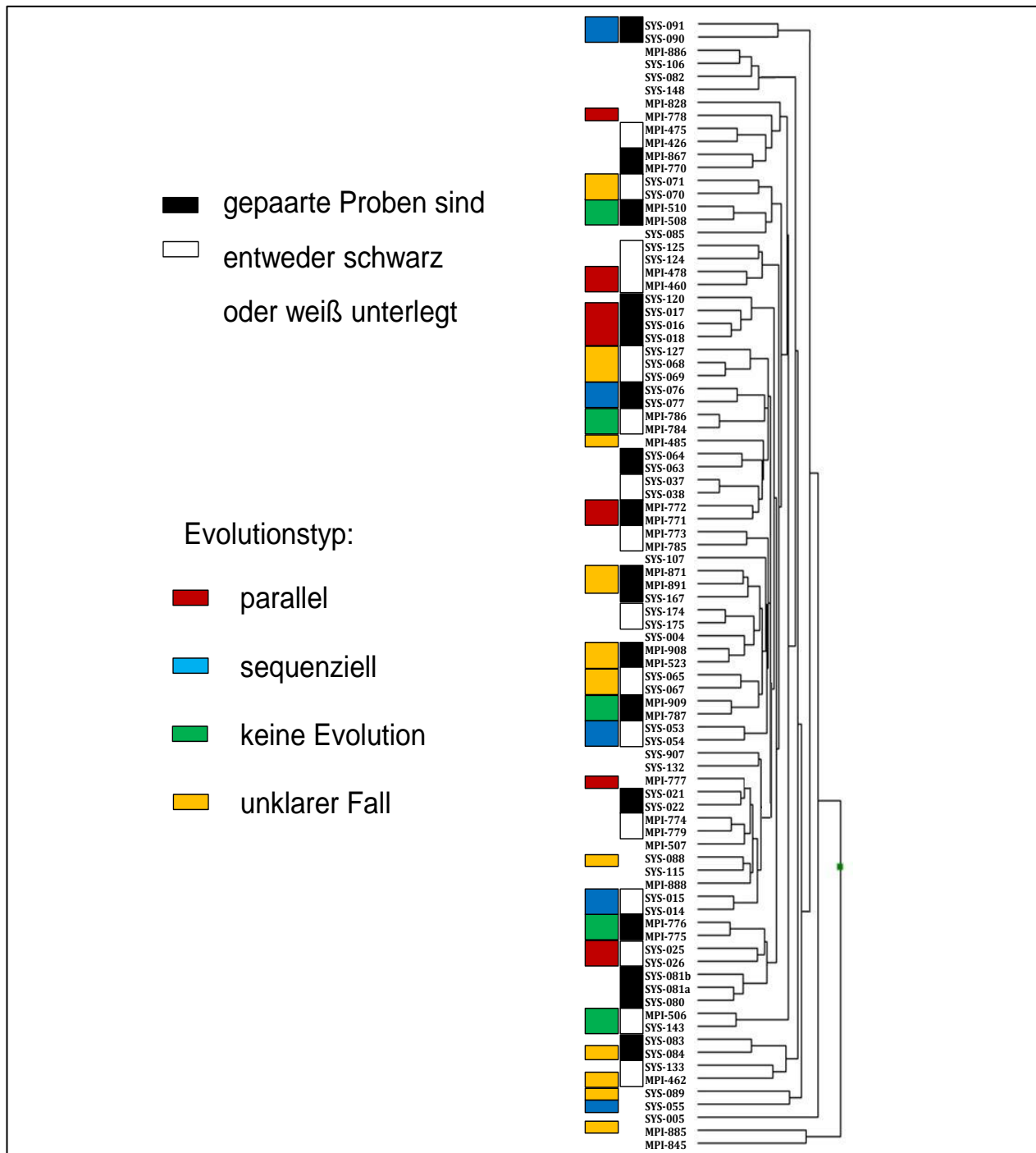


Abbildung 24: Unsupervidierte Clusteranalyse des HumanMethylation 27K Datensatzes aller 87 analysierten Proben. Das DNA-Methylierungsprofil von Verlaufspuben der FL-Patienten ist unter den Verlaufspuben des desselben Patienten ähnlicher als das DNA-Methylierungsprofil unter den zugeordneten Evolutionstypen oder den Initial- bzw. Rezidivtumoren.

Jeder Ast repräsentiert einen Fall. Der Evolutionstyp wurde auf der Grundlage des V_H -Rearrangements erstellt und ist entsprechend markiert (rot: parallel, blau: sequenziell, grün: keine Evolution, gelb: unklarer Fall). Zusammengehörige Proben eines Patienten sind entweder weiß oder schwarz unterlegt. Keine Markierung bedeutet, dass die nebeneinanderliegenden Proben von unterschiedlichen Patienten stammen.

Ergebnisse

Die unsupervidierte Clusteranalyse des gesamten 27K Methylierungsdatensatzes zeigte, dass bei 82 % (29/35 Fälle) die Verlaufspuren eines Patienten miteinander clusterten, wohingegen bei nur wenigen Fällen (6/35) die geclusterten Proben von unterschiedlichen Patienten stammten. Eine Gruppierung hinsichtlich der zugeordneten Evolutionstypen, basierend auf der Rekonstruktion der klonalen Evolution der 23 Patienten, war nicht abzulesen. Ebenfalls nicht nachzuweisen war eine Gruppenbildung hinsichtlich des Verlaufsmaterials, es lag keine Clusterbildung nach Initial- oder Rezidivtumor vor.

Zusammenfassend ist das mittels 27K Methylation BeadChip detektierte DNA-Methylierungsprofil bei den t(14;18) positiven FL unter den Verlaufspuren desselben Patienten ähnlicher, als das DNA-Methylierungsprofil unter den zugeordneten Evolutionstypen oder den Initial- bzw. Rezidivtumoren. Das lässt schlussfolgern, dass die Tumorzellen der Verlaufspuren aus einer gemeinsamen Ursprungszelle entstanden sind, die für jede Tumorentwicklung einzigartig ist, was wiederum zu der Annahme führt, dass die Ursprungszelle bereits diese ähnlichen Veränderungen erworben hat.

Um die Veränderungen der DNA-Methylierung im Zusammenhang der klonalen Evolution bei Verlaufspuren der Patienten näher zu charakterisieren, wurde ein paarweiser Vergleich durchgeführt und jeder Fall separat analysiert. Dazu wurden die detektierten β -Werte der DNA-Methylierung des Primärmaterials mit denen des Verlaufsmaterials verglichen. Dieses diente der Untersuchung, ob es differenziell methylierte Gene unter den Verlaufspuren eines jeweiligen Patienten gibt. DNA-Methylierungswerte, mit einer Differenz von mehr als 0,35 in den β -Werten ($\Delta\beta > 0,35$) zwischen Primär- und Verlaufspure, wurden als „diskrepanz“ gewertet (zur Auswahl der Kriterien siehe Abschnitt 2.2.4.5). Die Anzahl diskrepanter CpG-Dinukleotide wurde anschließend unter den zugeordneten Evolutionstypen verglichen (siehe Abbildung 25).

Interessanterweise zeigten die Patienten, denen ein paralleler Evolutionstyp zugewiesen wurde, zwischen 0.33-1.97 % (Median= 1.14 %) diskrepanz CpG-Dinukleotide zwischen dem Initial- und dem Rezidivtumor. Die Patienten, bei denen die Sequenzen ununterscheidbar waren, hatten weniger diskrepanz CpGs (Bereich: 0.01-0.39 %, Median= 0.05 %). Dahingegen lagen die Fälle mit einem sequenziellen Evolutionstyp in der Mitte, der Bereich diskrepanter CpGs reichte von 0.22-1.04 % (Median= 0.45 %) ($p=0,019$, Kruskal-Wallis-Test).

Ergebnisse

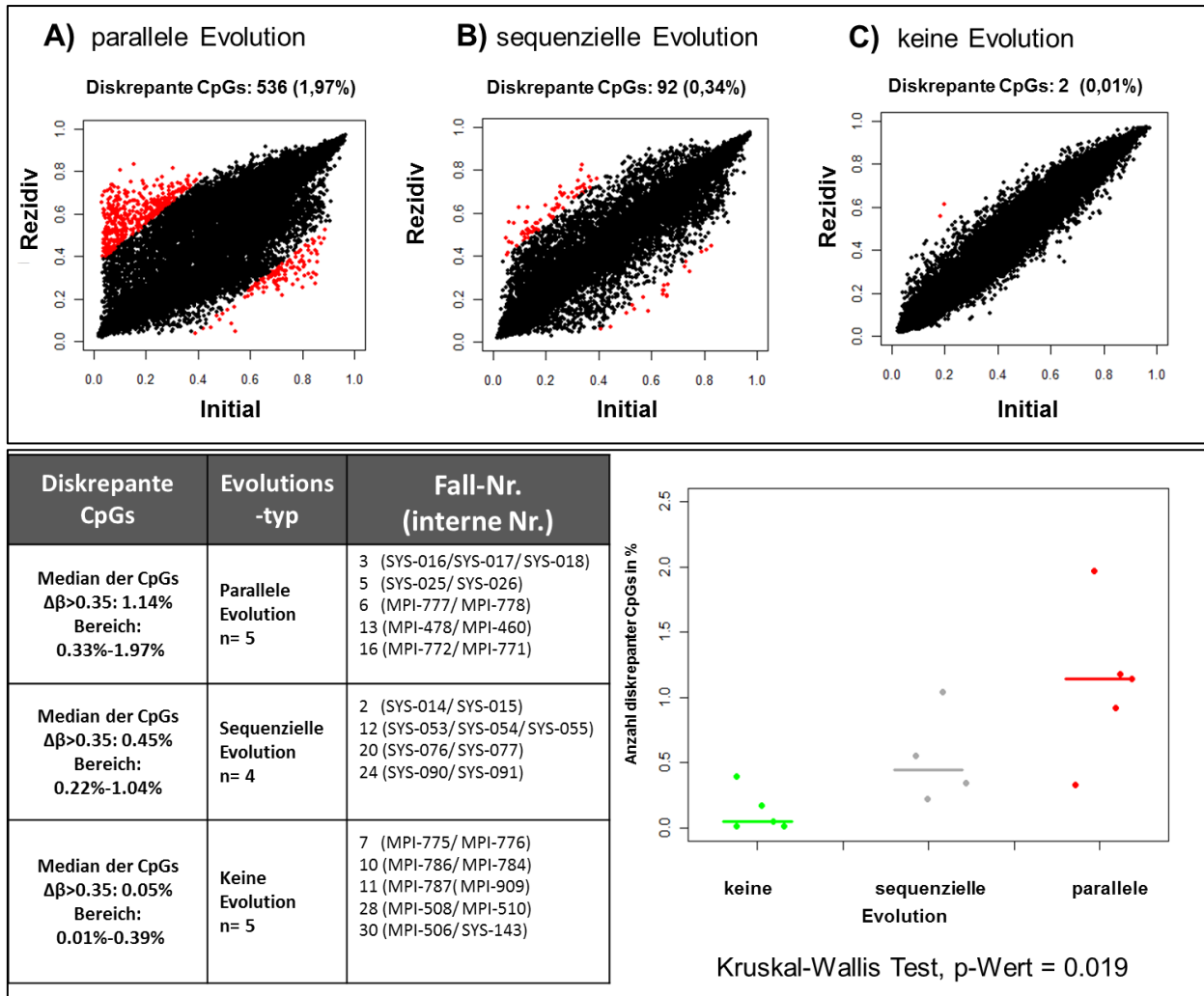


Abbildung 25: Vergleich der DNA-Methylierungswerte von Initial- und Rezidivtumor desselben Patienten. **Oben:** Aufgetragen sind die β -Werte aus der Infinium HumanMethylation 27K Methylierungsanalyse. DNA-Methylierungswerte, mit einer Differenz von mehr als 0,35 in den β -Werten ($\Delta\beta > 0,35$) zwischen Initial- und Rezidivtumor wurden als diskrepant gewertet und in rot markiert. Hier, exemplarisch dargestellt, für je einen Patienten mit paralleler Evolution (A=> MPI-777/MPI-778), sequenzieller Evolution (B=> SYS-076/SYS-077) und keiner Evolution (C=> MPI-775/MPI-776). **Unten:** Statistische Überprüfung der Signifikanz (Kruskal-Wallis-Test) der DNA-Methylierungswerte aus der 27K-Methylierungsanalyse bei 14 Fällen mit einem zugeordneten Evolutionstyp. Aufgeführt sind die Anzahl der diskrepanten CpGs ($\Delta\beta > 0,35$) und die jeweilige Zuordnung der Patienten zu dem Evolutionstyp. Bei 14 analysierten Patienten konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem zugeordneten Evolutionstyp und der Anzahl der diskrepanten CpG-Dinukleotide zwischen dem Initial- und Rezidivtumor identifiziert werden ($p=0,019$, Kruskal-Wallis-Test). Stand der Datenanalyse: 17.04.2012.

Zusammenfassend konnte bei 14 analysierten Patienten ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem zugeordneten Evolutionstyp und der Anzahl der diskrepanten CpG-Dinukleotide zwischen dem Initial- und Rezidivtumor identifiziert werden. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Folgen der erworbenen genetischen und epigenetischen Veränderungen miteinander interagieren und an unterschiedlichen Entwicklungsstadien der klonalen Tumorevolution zu unterschiedlichen Evolutionstypen der Pathogenese und Entwicklung bei t(14;18) positiven FL beitragen.

Aus diesen Erkenntnissen ergab sich die Frage, ob die Gene der differenziell methylierten CpG-Dinukleotide einem bestimmten biologischen Signalweg zugeordnet werden können. Zur Klärung der Frage wurde eine Gene Ontology Abfrage (<http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/>) für die Gene aller

Ergebnisse

diskrepanter CpGs der 14 Patienten durchgeführt, denen durch die *IGH*-Mutationsanalyse anhand der Rekonstruktion der klonalen Evolution ein Evolutionstyp zugeordnet wurde. Ein Auszug des Ergebnisses ist in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Auszug einer Gene Ontology Abfrage für Gene, bei denen in der 27K Methylierungsanalyse die $\Delta\beta$ -Werte größer als 0,35 zwischen Initial- und Rezidivtumor waren

GO-Bezeichnung	Beschreibung	p-Wert	FDR q-Wert	Anreicherung
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	1.43e ⁻⁰⁹	1.58e ⁻⁰⁵	1.84
GO:0051239	regulation of multicellular organismal process	4.64e ⁻⁰⁸	2.56e ⁻⁰⁴	1.59
GO:0032502	developmental process	7.62e ⁻⁰⁸	2.81e ⁻⁰⁴	1.36
GO:0048646	anatomical structure formation involved in morphogenesis	8.09e ⁻⁰⁸	2.23e ⁻⁰⁴	1.75
GO:0023051	regulation of signaling	9.43e ⁻⁰⁸	2.08e ⁻⁰⁴	1.55
GO:0048856	anatomical structure development	1.02e ⁻⁰⁷	1.87e ⁻⁰⁴	1.49
GO:0009887	organ morphogenesis	1.11e ⁻⁰⁷	1.75e ⁻⁰⁴	2.32
GO:0010646	regulation of cell communication	1.16e ⁻⁰⁷	1.60e ⁻⁰⁴	1.55
GO:0050793	regulation of developmental process	4.80e ⁻⁰⁷	5.90e ⁻⁰⁴	1.62
GO:0048869	cellular developmental process	5.29e ⁻⁰⁷	5.84e ⁻⁰⁴	1.53
GO:0044057	regulation of system process	6.08e ⁻⁰⁷	6.10e ⁻⁰⁴	2.17
GO:0045595	regulation of cell differentiation	4.08e ⁻⁰⁶	3.75e ⁻⁰³	1.69
GO:0009966	regulation of signal transduction	4.15e ⁻⁰⁶	3.53e ⁻⁰³	1.51
GO:2000026	regulation of multicellular organismal development	4.23e ⁻⁰⁶	3.34e ⁻⁰³	1.65
GO:0030154	cell differentiation	4.46e ⁻⁰⁶	3.29e ⁻⁰³	1.59
GO:0003008	system process	5.02e ⁻⁰⁶	3.47e ⁻⁰³	1.69
GO:0007605	sensory perception of sound	5.63e ⁻⁰⁶	3.66e ⁻⁰³	3.5
GO:0022603	regulation of anatomical structure morphogenesis	5.94e ⁻⁰⁶	3.64e ⁻⁰³	1.91
GO:0050954	sensory perception of mechanical stimulus	7.49e ⁻⁰⁶	4.35e ⁻⁰³	3.43
GO:0044699	single-organism process	7.94e ⁻⁰⁶	4.39e ⁻⁰³	1.27

Es zeigte sich eine signifikante Anreicherung für Gene, die an Entwicklungsprozessen beteiligt sind.
FDR: false discovery rate.

Es zeigte sich, dass die Gene aller diskrepanter CpGs dieser 14 Patienten signifikant für die Entwicklung der anatomischen Struktur, für die Regulation von multizellulären Prozessen, sowie für Entwicklungsprozesse der Organe ($p = 9.43e^{-8} - 1.43e^{-9}$) angereichert sind. Es liegt nahe, dass die zwischen den Verlaufspalten differenziell methylierten Gene mit Zielgenen des Polycomb-Repressor Komplex (PRC) in embryonalen Stammzellen assoziiert sind. Polycomb Proteine sind ein Multiprotein Komplex, die mit DNMT interagieren und die Genexpression epigenetisch stilllegen können [200]. Vorangegangene Studien von Bracken et al. und Lee et al. konnten zeigen, dass hypermethylierte Gene in Tumoren für die Gene angereichert sind, die von dem PRC2 in embryonalen Stammzellen reprimiert werden [206, 252]. Weitere Untersuchungen könnten klären, ob die zwischen den Verlaufspalten differenziell methylierten Gene ebenfalls Zielgene des Polycomb-Repressor Komplexes sind.

Ergebnisse

Zusammenfassend konnte ich zeigen, dass das DNA-Methylierungsprofil unter den Verlaufsproben eines Patienten ähnlicher ist, als das DNA-Methylierungsprofil unter den Evolutionstypen. Im Gegensatz dazu ergab ein paarweiser Vergleich der DNA-Methylierungswerte einen signifikanten Unterschied zwischen der Anzahl diskrepanter CpGs (diskrepanz = $\Delta\beta > 0,35$) unter den Verlaufsproben eines Patienten und dem jeweils zugeordneten Evolutionstyp. Dabei zeigten die Patienten mit einem parallelem Evolutionstyp die meisten (Median = 1,14 %) und die Fälle mit keiner Evolution die wenigsten (Median = 0,05 %) differenziell methylierten CpG-Dinukleotide zwischen den Verlaufsproben. Die Fälle mit einem sequenziellen Evolutionstyp lagen in der Mitte (Median = 0,45 %). Darüber hinaus sind die Gene, von denen die CpG-Dinukleotide eine diskrepante DNA-Methylierung unter den Verlaufsproben zeigen, signifikant für die Entwicklung der anatomischen Struktur, für die Regulation von multizellulären Prozessen sowie für Entwicklungsprozesse der Organe angereichert.

3.3.2.2 Validierung der 27K-Methylierungsanalyse mittels Infinium HumanMethylation450K von Illumina

Für eine Qualitätssicherung ist es essentiell, die mittels HumanMethylation27K analysierten Veränderungen der DNA-Methylierung im Verlauf der klonalen Tumorevolution zu validieren. Dazu wurde der HumanMethylation450K Bead Array verwendet. Dieser DNA-Methylierungsarray ist eine Weiterentwicklung des 27K Vorgänger-Modells und analysiert mit über 480 000 CpG Dinukleotiden fast 18x mehr CpG-Dinukleotide als der 27K Methylierungsarray. Darüber hinaus sind diese CpG-Positionen des 450K Bead Arrays genomweit so verteilt, dass sie nicht nur 96 % der CpG-Inseln abdecken, sondern auch zahlreiche CpG-Shores und CpG-Positionen, die außerhalb von CpG-Inseln lokalisiert sind (siehe Abschnitt 2.2.4.3) [227]. Folglich können mittels dieses Assays einerseits zuvor detektierte Veränderungen aus 27K DNA-Methylierungsarray-Analyse überprüft werden und zudem weitere Einsichten über die Veränderungen der DNA-Methylierung im Verlauf der klonalen Tumorevolution erlangt werden.

Es wurden neun Patienten (n = 18 Materialien) mittels HumanMethylation 450K Array analysiert. In Analogie zur Auswertung des Datensatzes der 27K DNA-Methylierungsanalyse wurden die β -Werte des 450K Datensatzes zwischen der Primär- und der Verlaufsprobe für jeden Fall separat verglichen. Dabei wurden DNA-Methylierungswerte, mit einer Differenz von mehr als 0,35 in den β -Werten ($\Delta\beta > 0,35$) zwischen Primär- und Verlaufsprobe, ebenfalls als „diskrepanz“ gewertet. Darüber hinaus erfolgte ein Vergleich der β -Werte von 25 962 CpG-Dinukleotiden zwischen der 450K und der 27K Methylierungsanalyse. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 für zwei Fälle exemplarisch dargestellt.

Ergebnisse

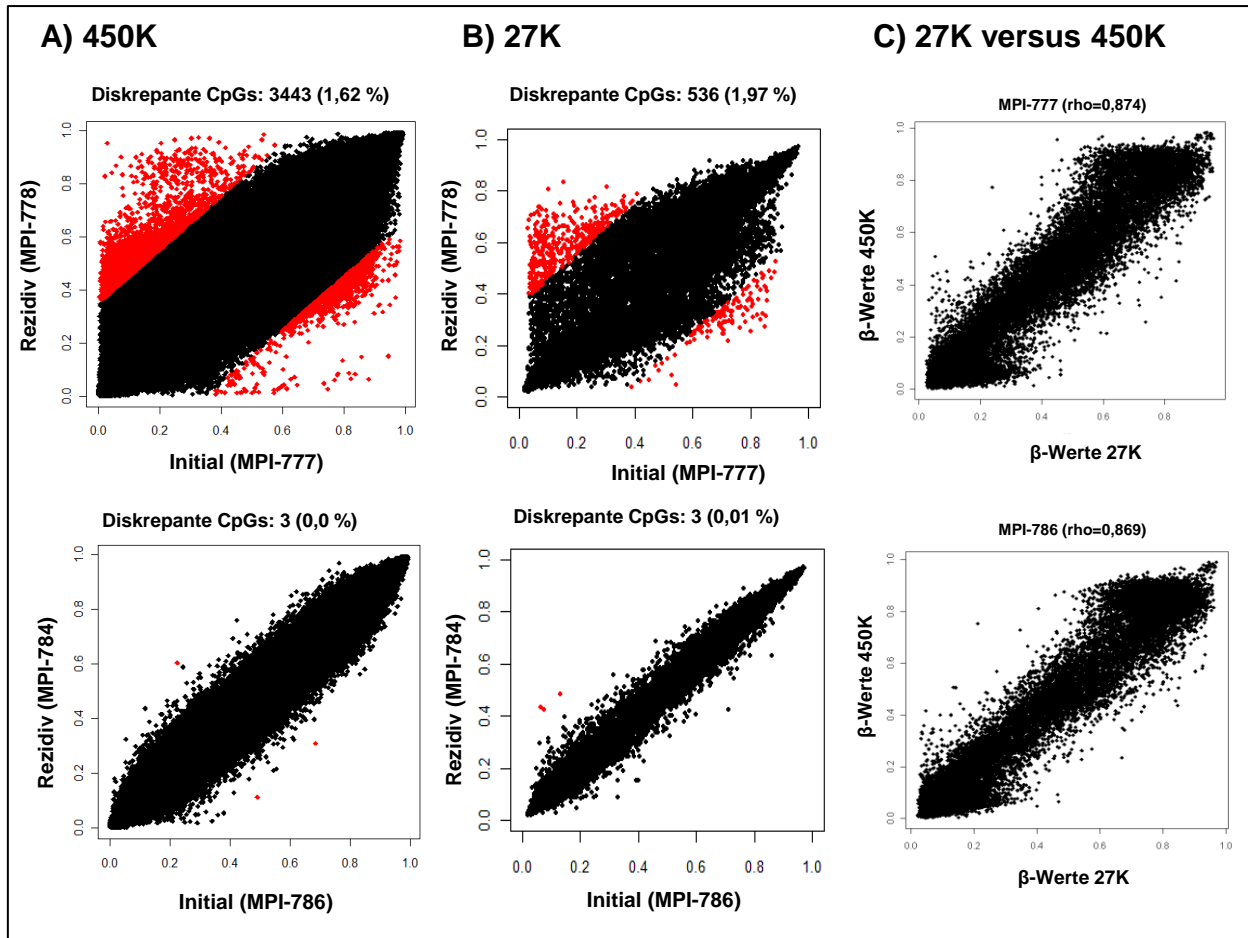


Abbildung 26: Vergleich der Datensätze zwischen 450K mit 27K HumanMethylation BeadChip Analyse von Initial- und Rezidivtumor von zwei Patienten. **A)** Aufgetragen sind die β -Werte aus Human Methylation 450K Methylierungsanalyse. **B)** Aufgetragen sind die β -Werte aus der 27K Methylierungsanalyse. **C)** Vergleich der β -Werte von 25 962 CpG-Dinukleotiden zwischen der 27K und der 450K Methylierungsanalyse. DNA-Methylierungswerte, mit einer Differenz von mehr als 0,35 in den β -Werten ($\Delta\beta > 0,35$) zwischen Initial- und Rezidivtumor wurden als diskrepant gewertet und in rot markiert. Ein Vergleich von 25 962 CpG-Dinukleotiden zwischen 27K und 450K Methylierungsanalyse ergab eine gute Korrelation ($\rho = 0,874$ und $0,869$). Stand der Datenanalyse: August 2012.

Insgesamt konnten mittels der 450K Methylierungsanalyse für die 18 analysierten Proben die DNA-Methylierungsmuster aus dem 27K Datensatz bestätigt werden (siehe Tabelle 22). Fälle, die in der 27K-Methylierungsanalyse zwischen dem ersten und dem zweiten Biopsat 0,9-1,97 % diskrepante CpGs zeigten, wiesen auch in der 450K Methylierungsanalyse 0,9-1,6 % diskrepante CpG-Dinukleotide auf. Dasselbe traf auch für die Fälle mit wenigen bis gar keinen (0,01-0,24 %) unterschiedlich methylierte CpG-Positionen zu. Ein Vergleich der β -Werte von 25 962 CpG-Dinukleotiden zwischen der 27K und der 450K Methylierungsanalyse ergab eine gute Korrelation zwischen den DNA-Methylierungswerten der beiden Array-Analysen. Der Spearman rank Korrelations-Koeffizient ρ lag zwischen 0,903 und 0,834 (siehe Tabelle 22).

Ergebnisse

Tabelle 22: Vergleich der Datensätze zwischen 450K mit 27K HumanMethylation BeadChip Analyse von Initial- und Rezidivtumoren von neun Patienten (18 Proben).

Fall-Nr	interne Nr.	Evolutionstyp	Untersuchungsstand	450K Analyse		27K Analyse		rho (zwischen 450K und 27K)
				diskrepante CpGs	in %	diskrepante CpGs	in %	
6	MPI-777	parallel	Initial	7843	1,62	536	1,97	0,874
	MPI-778	parallel	1.Rezidiv					0,862
13	MPI-478	parallel	Initial	7576	1,56	254	0,92	0,877
	MPI-460	parallel	1.Rezidiv					0,879
16	MPI-772	parallel	Initial	4823	0,99	323	1,18	0,896
	MPI-771	parallel	1.Rezidiv					0,899
7	MPI-775	keine Ev.	Initial	93	0,02	2	0,01	0,862
	MPI-776	keine Ev.	1.Rezidiv					0,834
10	MPI-786	keine Ev.	Initial	3	0,0	3	0,01	0,869
	MPI-784	keine Ev.	1.Rezidiv					0,878
11	MPI-787	keine Ev.	Initial	369	0,08	14	0,05	0,866
	MPI-909	keine Ev.	1.Rezidiv					0,884
14	SYS-065	fraglicher Typ	Initial	35	0,01	30	0,11	0,896
	SYS-067	fraglicher Typ	2.Rezidiv					0,901
18	MPI-523	fraglicher Typ	Initial	127	0,03	10	0,04	0,895
	MPI-908	fraglicher Typ	1.Rezidiv					0,896
35	MPI-871	fraglicher Typ	3.Rezidiv	1128	0,23	70	0,25	0,903
	MPI-891	fraglicher Typ	4.Rezidiv					0,895

Zusammenfassend konnten die mittels HumanMethylation27K detektierten Veränderungen der DNA-Methylierung im Verlauf der klonalen Tumorevolution mittels HumanMethylation 450K Methylierungsanalyse reproduziert werden, so dass die Qualität dieser Daten mittels zwei Array-Analysen sichergestellt wurde.

Mittels HumanMethylation450K wurden insgesamt neun Patienten analysiert, von denen drei Patienten ein paralleler Evolutionstyp, drei Patienten ein Typ mit keiner Evolution und drei Patienten kein Evolutionstyp zugewiesen worden war (Tabelle 22 und Abschnitt 3.3.1). Mittels t-Test für unabhängige Proben wurde zunächst überprüft, inwieweit sich die DNA-Methylierungswerte eines parallelen Evolutionstyps von den DNA-Methylierungswerten des Typs mit keiner Evolution unterscheiden. Bei 1040 CpG-Positionen gab es einen signifikanten Unterschied in den DNA-Methylierungswerten zwischen dem parallelen Evolutionstyp und dem Typ mit keiner Evolution (t-test, false discovery rate, fdr, korrigiert für multiples testing: $q < 0,05$). Anschließend erfolgte ein Vergleich der DNA-Methylierungswerte von diesen 1040 CpG-Positionen zwischen allen neun analysierten Fällen. Die Ergebnisse sind mittels Principle Component Analyse für differenziell methylierte Gene in Abbildung 27 dargestellt.

Ergebnisse

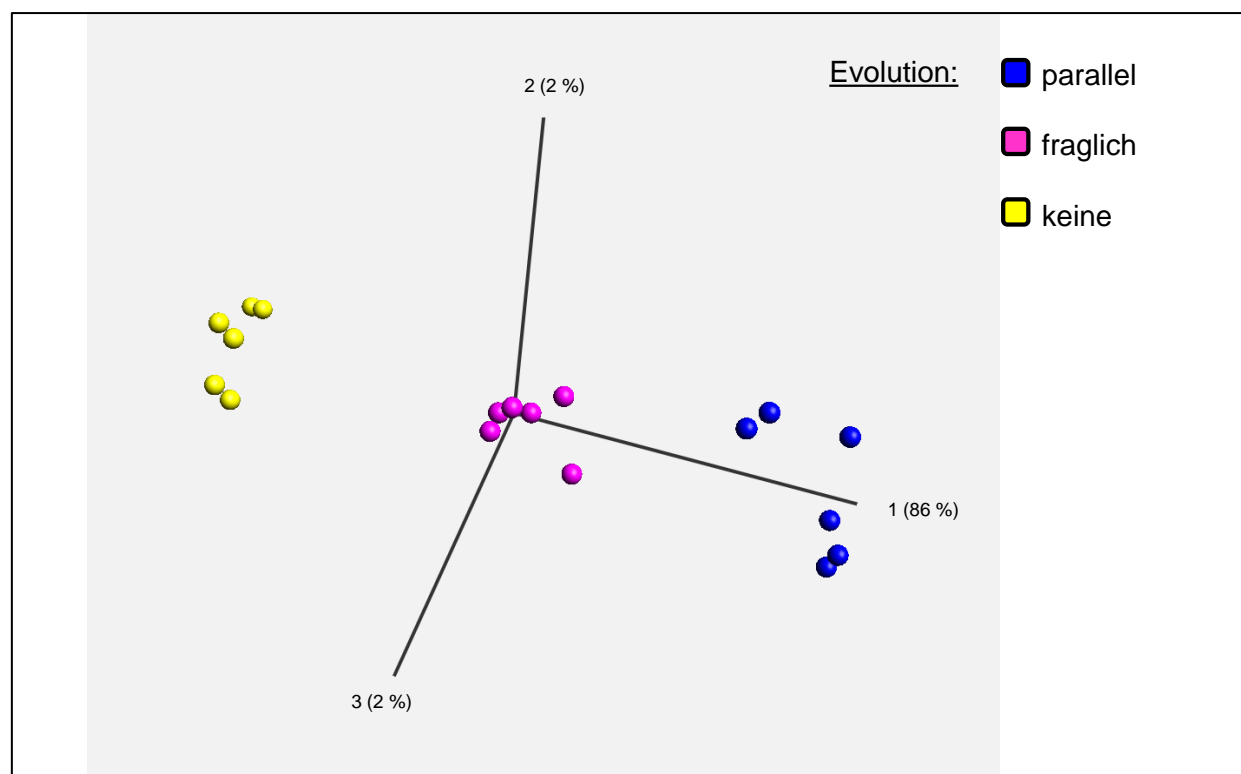


Abbildung 27: Principle Component Analyse (PCA) basierend auf differenziell methylierten Genen des 450K DNA-Methylierungsdatensatzes von 18 Verlaufproben von neun Patienten. 1040 CpG-Loci sind zwischen dem parallelen Evolutionstyp und dem Typ mit keiner Evolution signifikant differenziell methyliert (t-Test; fdr: $q < 0.05$). Sechs Proben von drei Patienten mit einem fraglichen Evolutionstyp zeigten weder mit den Fällen des parallelen Evolutionstyps noch mit den Fällen des Typs mit keiner Evolution Ähnlichkeiten in den DNA-Methylierungswerten dieser 1040 CpG-Positionen.

Interessanterweise ähnelten die DNA-Methylierungswerte der 1040 CpG-Positionen bei allen drei Fällen mit einem fraglichen Evolutionstyp weder den DNA-Methylierungswerten der Fälle des parallelen Evolutionstyps noch den DNA-Methylierungswerten der Fälle des Typs mit keiner Evolution. Das lässt schlussfolgern, dass die Folgen unterschiedlicher epigenetischer Veränderungen an unterschiedlichen Entwicklungsstadien der klonalen Tumorevolution zu unterschiedlichen Evolutionstypen der Pathogenese und Entwicklung bei t(14;18) positiven FL führen.

Daran anschließend stellte sich die Frage, ob diese 1040 CpG Loci, die zwischen den Evolutionstypen differenziell methyliert sind, für eine bestimmte biologische Funktion signifikant angereichert sind. Mittels einer Gene Ontology Abfrage stellte sich heraus, dass diese Gene insbesondere für spannungsabhängige aktive Kanäle angereichert sind (Tabelle 23; $p = 9,86e^{-04} - 8,36e^{-05}$).

Tabelle 23: Gene Ontology Abfrage der 1040 differenziell methylierten Gene aus dem Vergleich DNA-Methylierungswerten der 450K Analyse bei Loci von dem Vergleich des parallelen Evolutionstyps mit dem Typ keiner Evolution.

GO-Bezeichnung	Beschreibung	p-Wert	FDR q-Wert	Anreicherung
GO:0022843	voltage-gated cation channel activity	$8.36e^{-05}$	$3.20e^{-01}$	4.08
GO:0005113	patched binding	$3.12e^{-04}$	$5.97e^{-01}$	20.19
GO:0022832	voltage-gated channel activity	$9.86e^{-04}$	$1.00e^{+00}$	3.07
GO:0005244	voltage-gated ion channel activity	$9.86e^{-04}$	$9.45e^{-01}$	3.07

Ergebnisse

Zusammenfassend konnten mittels HumanMethylation 450K Methylierungsanalyse die mittels HumanMethylation27K analysierten Veränderungen der DNA-Methylierung im Verlauf der klonalen Tumorevolution bei 18 Verlaufspröben von neun Patienten reproduziert werden. Mittels t-Test für unabhängige Proben wurden in diesem Datensatz 1040 differenziell methylierte CpG-Loci zwischen dem parallelen Evolutionstyp und dem Typ mit keiner Evolution identifiziert (t-Test; fdr: $q < 0.05$), die darüber hinaus keine Ähnlichkeit mit den DNA-Methylierungswerten des fraglichen Evolutionstyps aufzeigten (PCA, t-Test; fdr: $q < 0.05$, 1040 CpG-Dinukleotide) und für spannungsabhängige aktive Kanäle angereichert sind.

3.3.2.3 Abschätzung der genomweiten Gesamt-DNA-Methylierung mittels Luminometrischer Methylierungsanalyse

Für einen repräsentativen Gesamteindruck über die Veränderungen der DNA-Methylierung im Verlauf der Tumorevolution ist es essenziell, nicht nur zahlreiche ausgewählte CpG-Dinukleotide von Zielregionen zu analysieren, sondern auch die genomweiten Veränderungen der DNA-Methylierung zu erfassen. Dazu wurde eine Luminometrische Methylierungsanalyse (LUMA) durchgeführt, die, im Vergleich zu den vorangegangenen arraybasierten DNA-Methylierungsanalysen, den genomweiten Methylierungsstatus erfasst (siehe Abschnitt 2.2.4.1).

Zunächst erfolgte eine Bestimmung von Normalwertgrenzen der DNA-Methylierung in Lymphknotengewebe von reaktiven Keimzentrums-B-Zellen mittels LUMA. Dazu wurden sieben DNA-Proben von Patienten mit einer chronisch unspezifischen Lymphadenitis, sowie acht DNA-Proben von vier Patienten, bei denen ein polyklonales V_H-Gen-Rearrangement vorlag und ein t(14;18) positives FL diagnostiziert wurde, analysiert. Es wurde der Mittelwert der DNA-Methylierung dieses Kontrollkollektivs bestimmt und die dreifache Standardabweichung (\pm) berechnet (Abbildung 28 A). Als Kontrollen dienten eine kommerzielle vollständig methylierte DNA sowie eine WGA (Whole Genome Amplifizierte) unmethylierte DNA.

Der Normalbereich der DNA-Methylierung in reaktiven Lymphknotengeweben konnte von 44,5-89,8 % eingegrenzt werden. Insgesamt waren 80/90 Proben von 32/37 Patienten analysierbar. Die Ergebnisse dieser LUMA-Untersuchung sind in Abbildung 28 B dargestellt. Die detektierten DNA-Methylierungswerte des Probenkollektivs von 75/80 analysierten Proben lagen mit 45,2-78,9 % innerhalb der als „normale DNA-Methylierung in reaktiven Lymphknoten“ bestimmten Grenzen. Bei 5/80 analysierten Proben wurden niedrigere DNA-Methylierungswerte verzeichnet. Die DNA-Methylierungswerte reichten von 34,1 % bis 43,3 %.

Ergebnisse

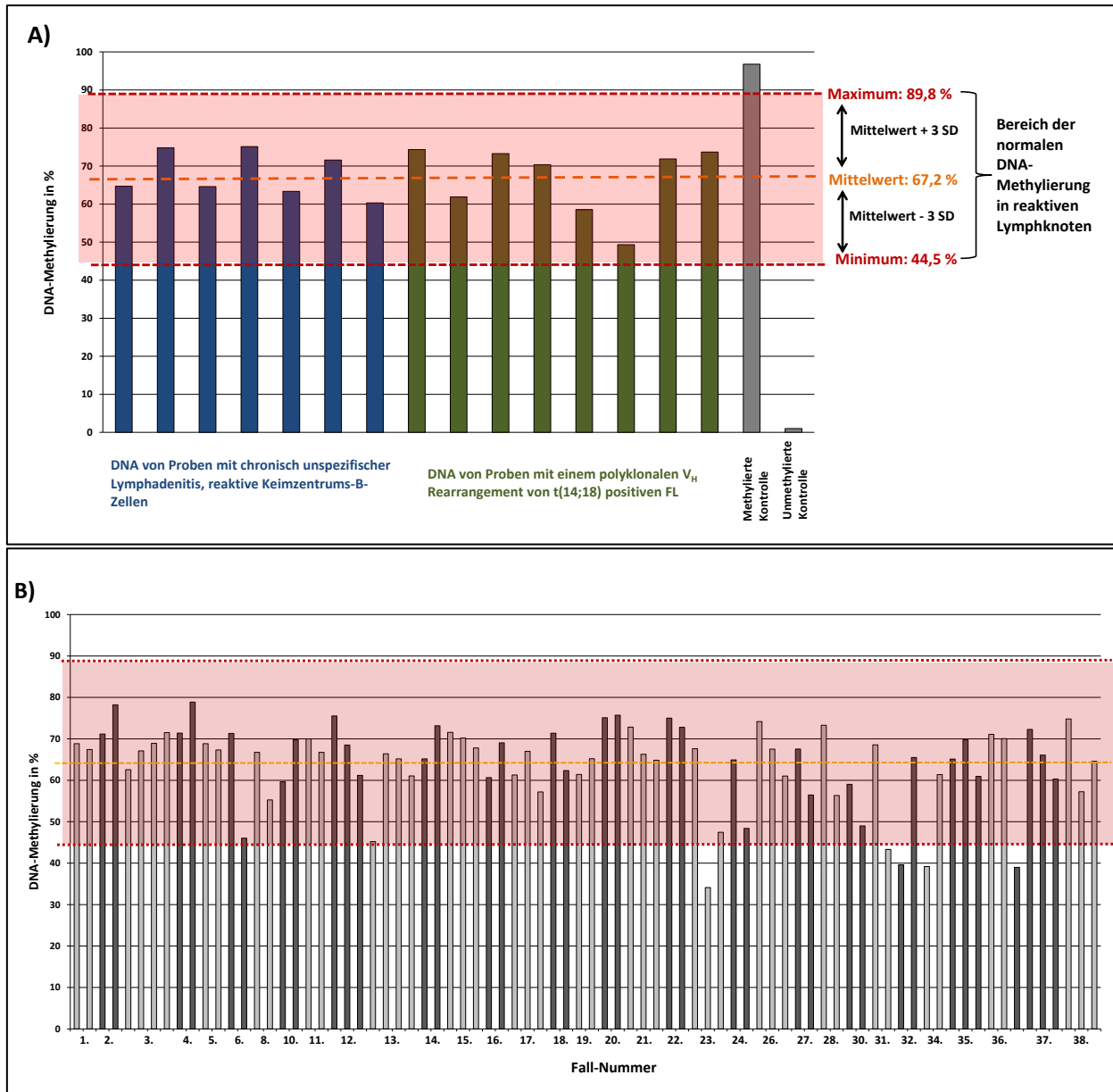


Abbildung 28: LUMA-Ergebnisse. Dargestellt ist der prozentuale DNA-Methylierungswert für jede analysierte Probe. **A)** Bestimmung des Normalbereichs anhand der DNA von DNA-Proben von Patienten mit einer chronisch unspezifischer Lymphadenitis und DNA-Proben von Patienten, bei denen ein polyklonales V_H-Gen-Rearrangement vorlag und ein t(14;18) positives FL diagnostiziert wurde. Der Normalbereich ist definiert, als die 3fache Standardabweichung des Mittelwertes der analysierten Proben. Als Kontrollen dienten eine kommerzielle vollständig methylierte DNA sowie eine WGA (whole genome amplification (Gesamt-Genom-Amplifiziert) unmethylierte DNA. **B)** Detektierte DNA-Methylierungswerte des Probenkollektivs. Zusammengehörige Proben eines Patienten sind entweder in hellgrau oder dunkelgrau eingefärbt und die entsprechenden Fall-Nummern angegeben. Der in A ermittelte Bereich der „normalen DNA-Methylierung in reaktiven Lymphknoten“ ist gekennzeichnet. Stand der Datenanalyse: April 2012.
SD: Standardabweichung

In Analogie zu den vorangegangenen arraybasierten Auswertungen (Abschnitt 3.3.2.1 und Abschnitt 3.3.2.2) wurde jeder Fall separat analysiert und die Differenz der detektierten DNA-Methylierung zwischen der ersten Probe und der letzten Verlaufsprobe bestimmt. Die Werte sind in der folgenden Tabelle 24 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tabelle 24: Bestimmung der Differenz der DNA-Methylierung zwischen der ersten und der letzten Verlaufsprobe eines Patienten und Angabe des zugeordneten Evolutionstyps

Verlust an DNA-Methylierung					Verlust an DNA-Methylierung					Zugewinn an DNA-Methylierung							
Fall	Probe	%-Meth.	Differenz	Evolutionstyp	Fall	Probe	%-Meth.	Differenz	Evolutionstyp	Fall	Probe	%-Meth.	Differenz	Evolutionstyp			
36	MPI-886	71.09	1.05	nicht benannt	38	SYS-102	74.81	10.22	keine	20	SYS-076	75.11	0.60	sequenziell			
	MPI-888	70.04				MPI-868	57.22				SYS-077	75.70					
1	MPI-475	68.84	1.43	nicht benannt		MPI-889	64.59			11.09	nicht benannt	19	SYS-070	61.40	3.79	unklar	
	MPI-426	67.41			MPI-773	67.54	SYS-071	65.19									
5	SYS-025	68.83	1.51	parallel	27	MPI-785	56.45	11.47	nicht benannt	2	SYS-014	71.16	7.05	sequenziell			
	SYS-026	67.32				MPI-507	66.73				SYS-015	78.21					
22	SYS-085	74.99	2.20	nicht benannt	8	MPI-907	55.25	13.14	unklar	4	SYS-021	71.38	7.49	nicht benannt			
	SYS-086	72.79				MPI-458	74.16				SYS-022	78.86					
11	MPI-787	70.00	3.25	keine	26	SYS-133	67.51	14.35	sequenziell	14	SYS-065	65.16	7.99	unklar			
	MPI-909	66.75				MPI-462	61.02				SYS-067	73.16					
15	SYS-068	71.56	3.76	unklar	12	SYS-053	75.54	16.95	keine	16	MPI-772	60.64	8.41	parallel			
	SYS-127	70.21				SYS-054	68.50				MPI-771	69.05					
	SYS-069	67.79				SYS-055	61.19			3	SYS-016	62.56	8.95	parallel			
17	MPI-867	61.29	4.10	nicht benannt	28	MPI-508	73.28	19.29	unklar		10	MPI-786			59.63	10.15	keine
	MPI-770	66.98				MPI-510	56.33					SYS-017			67.08		
	MPI-828	57.19				SYS-088	67.62			SYS-018		71.51					
35	SYS-167	65.11	4.17	unklar	23	SYS-089	34.01	19.92	sequenziell	13	MPI-478	45.01	14.96	parallel			
	MPI-871	69.77				SYS-132	47.45				MPI-460	66.38					
	MPI-891	60.95				SYS-090	64.91				SYS-124	65.16					
21	SYS-080	72.82	7.97	nicht benannt	24	SYS-091	48.38	25.23	nicht benannt	34	SYS-125	61.06	19.85	nicht benannt			
	SYS-081.b	66.27				31	SYS-004				68.55	6			MPI-777	71.30	
	SYS-082	64.85					SYS-005				43.32				MPI-778	46.05	
30	MPI 506	59.04	8.12	keine	6		25.26	parallel	37	SYS-107	39.11		21.21	nicht benannt			
	SYS-143	49.97				SYS-148				72.28							
18	MPI-523	71.37	9.03	unklar					SYS-174	66.09							
	MPI-908	62.34							SYS-175	60.32							

Insgesamt konnte zwischen 0,6 % und 25 % Differenz in den DNA-Methylierungswerten zwischen der ersten und der letzten Verlaufsprobe ermittelt werden. Weiter wurden die Abweichungen hinsichtlich Verlust und Zugewinn der DNA-Methylierung unterschieden. Bei 21/32 Fällen konnte ein Verlust der DNA-Methylierung von 1 % bis 25 % detektiert werden. Ein Zugewinn an DNA-Methylierung zwischen der ersten und der letzten Verlaufsprobe lag bei 0,6 % bis 21 % und konnte bei 11/32 Fälle verzeichnet werden. Zusammengefasst wurde zwischen den Verlaufsproben des analysierten Probenkollektivs häufiger eine Hypo- als eine Hypermethylierung detektiert.

Anschließend wurde überprüft, ob es einen statistisch signifikanten Unterschied in den mittels LUMA detektierten Differenzen der DNA-Methylierungswerte von erster und letzter Verlaufsprobe unter den zugeordneten Evolutionstypen gibt. Dazu wurde ein Kruskal-Wallis Test durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 29 dargestellt.

Ergebnisse

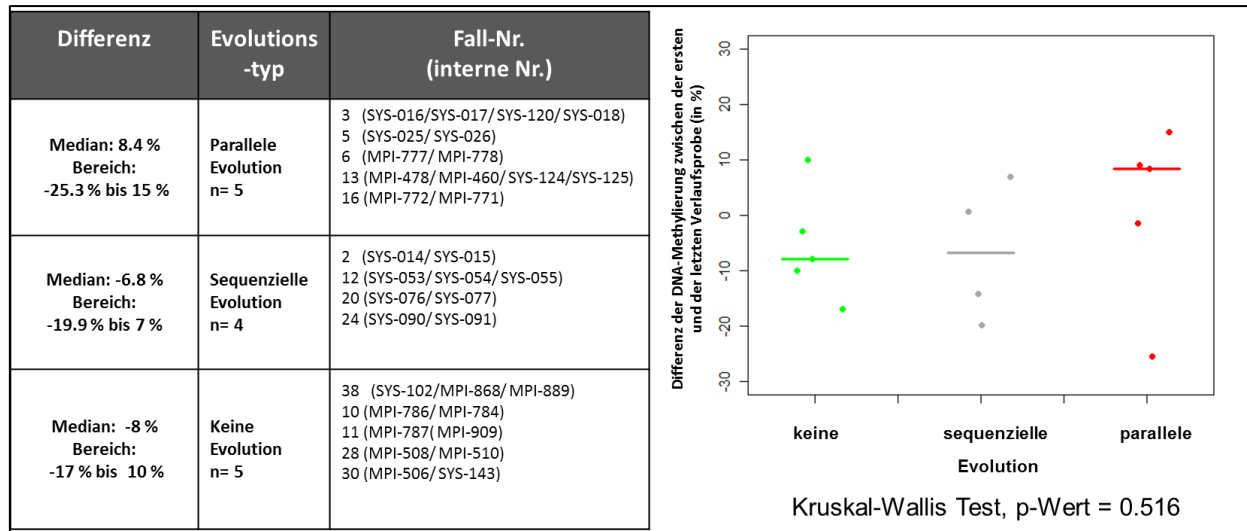


Abbildung 29: Statistische Überprüfung der Signifikanz (Kruskal-Wallis-Test) der Differenz der DNA-Methylierungswerte aus der LUMA bei 14 Fällen mit einem zugeordneten Evolutionstyp. Angegeben ist die Differenz der DNA-Methylierung zwischen der ersten und der letzten Verlaufsprobe (Werte aus Tabelle 24, negative Werte bedeuten „Verlust an DNA-Methylierung“ und positive Werte bedeuten „Zugewinn an DNA-Methylierung“) und die jeweilige Zuordnung der Patienten zu dem Evolutionstyp.

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied in den mittels LUMA detektierten Differenzen der DNA-Methylierungswerte von erster und letzter Verlaufsprobe unter den zugeordneten Evolutionstypen detektiert werden ($p=0.516$, Kruskal-Wallis-Test). Sowohl für den parallelen, als auch für den sequenziellen Evolutionstyp sowie dem Typ mit keiner Evolution wurden Differenz-Werte der DNA-Methylierung zwischen der ersten und letzten Verlaufsprobe von kleiner -17 % und größer 7 % ermittelt (Median-Werte: parallel: 8,4 %, sequenziell: -6,8 %, keine Evolution: -8 %).

Zusammengefasst konnte ich mittels LUMA bei 94 % der analysierten Proben eine innerhalb der als „normale DNA-Methylierung in reaktiven Lymphknoten“ bestimmten Grenzen liegende genomweite DNA-Methylierung von 45,2 % bis 78,9 % detektieren. Ein paarweiser Vergleich der DNA-Methylierungswerte unter den Verlaufsproben wies zwar insgesamt mehr Hypomethylierung (66 %) als Hypermethylierung auf, ergab jedoch keine statistisch signifikante Veränderung der DNA-Methylierung unter den zugeordneten Evolutionstypen ($p=0.516$, Kruskal-Wallis-Test). Im Hinblick auf die Ergebnisse aus den vorangegangenen arraybasierten Methylierungsanalysen lässt sich schlussfolgern, dass die unterschiedlichen epigenetischen Veränderungen bei den unterschiedlichen Evolutionstypen nicht auf der gesamt-genomischen Ebene vorliegen, sondern auf bestimmte regulatorische Bereiche des Genoms beschränkt sind.

3.3.3 Analyse der Häufigkeiten somatischer Mutationen bei Kandidatengenem im Verlauf der klonalen Tumorevolution

Es ist bekannt, dass die Translokation t(14;18) zwar in über 80 % der Patienten mit einem FL vorkommt, aber dennoch alleine unzureichend für eine vollständige Tumorentwicklung ist. Tumorzellen, die ein identisches V_H-Rearrangement aufzeigen, sich aber hinsichtlich der somatischen Mutationen unterscheiden, geben einen Hinweis darauf, dass die veränderte Ursprungszelle bereits im Anschluss an die VDJ-Rekombination entstanden ist, aber dass die somatischen Veränderungen erst im Progress der Tumorevolution hinzugekommen sind. Um die Zusammenhänge zwischen somatischen Mutationen einer t(14;18) positiven Ursprungszelle und den Verlauf der klonalen Tumorevolution zu charakterisieren, wurden die Häufigkeiten der somatischen Mutationen von insgesamt 19 genomischen Regionen ausgewählter Kandidatengene (siehe Tabelle 15, Abschnitt 2.2.5) bestimmt und analysiert. Im Hinblick auf die Identifikation von Mutationen, die den Progress der Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL beeinflussen und sog. „Driver-Mutationen“ sein können, wurden die kodierenden Regionen (alle Exone) der Kandidatengene untersucht. Bei den Genen *EZH2* und *MYD88* wurden die Häufigkeiten der in FL und DLBCL bereits gut charakterisierten somatischen Mutationen, Tyr641 in *EZH2* [240] und L265P in *MYD88* [237] ± 75 bp analysiert. Desweiteren wurden die Häufigkeiten somatischer Mutationen der Kandidatengene bestimmt, die als Folge einer fehlerhaften SHM der AID in einem genomischen Bereich von 2,5 kb ab TSS entstanden sein können. Um eine repräsentative Aussage über die Frequenz somatischer Mutationen machen zu können, sollten auch Mutationen identifiziert werden, die in mindestens 1 % der Tumorzellen vorkommen. Dazu sollte mittels des verwendeten Analyseverfahrens eine Abdeckung der Zielregion (Coverage on Target) von 1 000-10 000 Sequenzen (Reads) erreicht werden. Dabei versteht man unter einer „Coverage on Target“ die Anzahl der Reads für eine bestimmte Position, die diese Position in dem amplifizierten genomischen Bereich enthält. Dagegen ist die „mittlere Coverage“ die Summe der Längen aller Reads geteilt durch die Länge des amplifizierten genomischen Bereichs [253, 254]. Der im Folgenden verwendete Begriff „Coverage“ meint die „Coverage on target“. Aufgrund der positiven Erfahrungen aus dem vorherigen Projekt (Abschnitt 3.1) wurde zur Amplifikation der ausgewählten genomischen Bereiche der Kandidatengene ebenfalls das Mikro-Droplet-basierte Verfahren von RainDance Technologies genutzt. Das NGS erfolgte im Anschluss mittels HiSeq von Illumina. Die Auswertungen basieren auf einen Datenstand vom 19.12.2012.

Mittels „Segemehl-Algorithmus“ und Samtools mpileup (Abschnitt 2.2.5.5) erfolgten die Auswertungen des Sequenzdatensatzes der 82/90 analysierten Proben (33/37 Patienten). Insgesamt wurden 98 468 Basen der genomischen Regionen der 19 Kandidatengene untersucht. Über alle 82 analysierten Proben wurde bei mehr als 85,7 % (Median= 97,4 %) aller angereicherten Positionen eine Coverage von mehr

Ergebnisse

als 1 000 (Median= 4 195) erreicht (Abbildung 30 (A)). Eine Probe (MPI-886) zeigte im Vergleich zu den anderen Proben eine höhere Coverage (Median= 5 494). Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die ausgewählten genomischen Regionen erfolgreich amplifiziert werden konnten. Bei 2,2 % der angereicherten Positionen wurde eine geringere Coverage als 1 000 in 50 % der analysierten Proben, darunter 0,6 % mit einer niedrigeren Coverage als 1 000 in allen 82 Proben, detektiert. Für diese Positionen sind z.B. Probleme bei der Amplifikation eine mögliche Ursache.

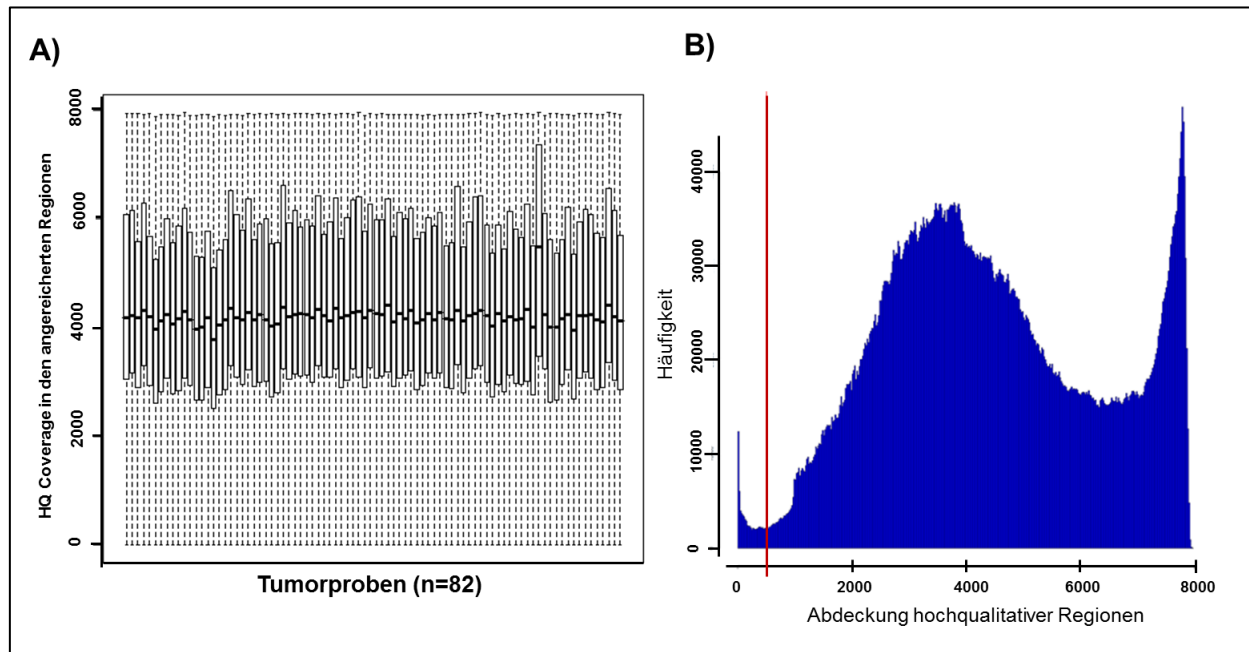


Abbildung 30: **A)** Coverage der hochqualitativen (High Quality, HQ) Basen (Phred Quality Score $Q \geq 13$) pro Fall. Die mediane Coverage aller HQ-Basen über alle Proben liegt bei 4 195. **B)** Coverage hochqualitativer Basen ($Q \geq 13$) über alle analysierten Positionen und alle analysierten Lymphomproben. Die Auswertungen erfolgten mittels Samtools mpileup. Hochqualitative Reads mit einer Coverage kleiner 500 (angedeutet durch die rote Linie) und größer 8 000 werden vernachlässigt. Stand der Datenanalyse: 19.12.2012.

Für die weiteren Analysen wurden weniger zuverlässig detektierte Varianten/Mutationen mit einer Coverage kleiner 500 oder größer 8 000 hochqualitativer Basen ausgeschlossen (Abbildung 30 (B)). So sollte vermieden werden, dass Fehlinterpretationen hinsichtlich der Frequenz einer Mutation entstanden sind, die auf eine zu geringe oder zu hohe Coverage zurückzuführen sind.

Insgesamt wurden 6 232 Varianten mit einer Coverage zwischen 500 und 8 000 bei 82 analysierter Proben (33 Patienten) identifiziert, von denen 3 359 Varianten dem genomischen Bereich von 2,5 kb ab TSS (Regionen der somatischen Hypermutation) und 2 873 Varianten den kodierenden Regionen der analysierten Kandidatengene zugeordnet werden konnten (siehe Abbildung 31 (A)).

Ergebnisse

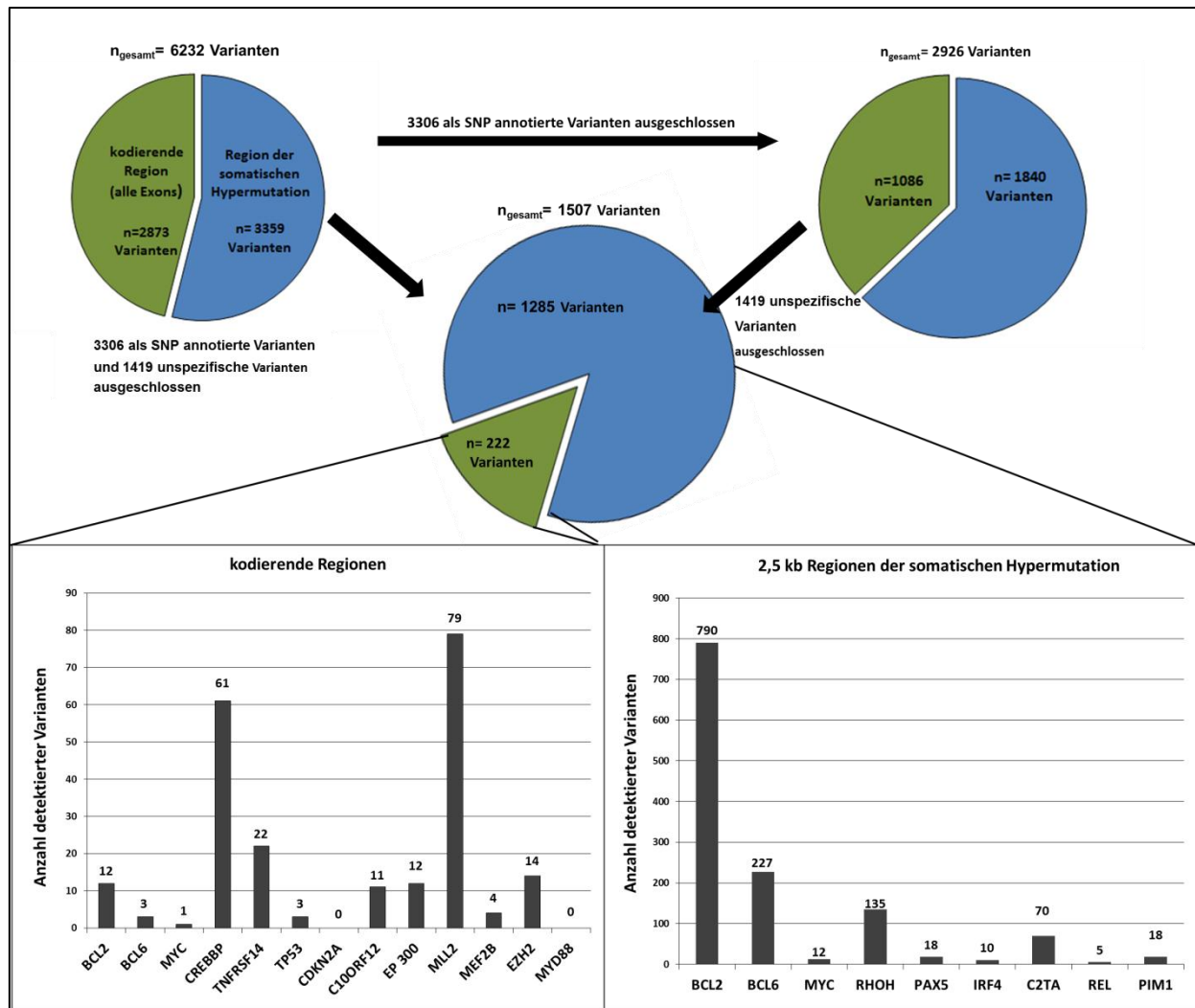


Abbildung 31: Verteilung der Varianten über alle analysierten genomischen Regionen nach Mikro-Droplet Amplifikation und HiSeq-Next-Generation-Sequencing von 82 Proben (33 Patienten). Die kodierenden Regionen umfassen mit Ausnahme von *BCL2*, *EZH2* und *MDY88*, alle Exons der Kandidatengene. Bei *BCL2* wurden Exon 1 und Exon 2 der 2,5 kb Region der somatischen Hypermutation zugerechnet. Bei *EZH2* und *MYD88* wurden ausschließlich die in FL und DLBCL charakterisierten Mutationen (Tyr641 in *EZH2* [240] und L265P in *MYD88* [237]) analysiert. Bei den Regionen der somatischen Hypermutation wurde ein genomischer Bereich von 2,5 kb ab Transkriptionsstartpunkt (TSS) der Kandidatengene analysiert, in denen somatische Mutationen als Folge einer fehlerhaften SHM entstanden sein können. Stand der Datenanalyse: 19.12.2012.

Die Anzahl der Varianten pro Fall lag zwischen 41 und 147 Varianten (Median = 71 Varianten). Von der Gesamtheit der detektierten Varianten waren etwa die Hälfte (53,4 %, entsprechen 3 306 Varianten) bereits in der dbSNP-Datenbank (build 135) annotiert. Durch die Anwendung weiterer Filterkriterien (Abschnitt 2.2.5.5) konnten weitere 1 419 unspezifische Varianten identifiziert werden, so dass ein Bias von falsch positiv oder falsch negativ detektierter Mutation verhindert werden sollten. Unspezifische Varianten sind Varianten in Regionen, die im UCSC Genome Browser als „Repeat“ gekennzeichnet sind, Positionen mit mehr als 50 % niedrigqualitativer Sequenzen, Varianten mit einem unausgeglichenen Anteil von Sense- und Antisense-Strang (\log_{OR} von mutierten und Wildtyp-Sequenzen größer sechs, $\log_{OR} > 6$). Nach Ausschluss der als bekannte SNP annotierten Varianten und der unspezifischen Varianten verblieben 1 507 Varianten, von denen 1 285 Varianten den Regionen der somatischen

Ergebnisse

Hypermutation und 222 Varianten den kodierenden Regionen der Kandidatengene zugeordnet werden konnte (Abbildung 31 (A)).

Eine Verteilung der 220 Varianten der kodierenden Regionen zeigte, dass über alle 82 analysierten Proben 35,6 % (79/220) und 27,5 % (61/222) der detektierten Varianten in den Exonen von *MLL2* und *CREBBP* vorkommen. Dabei handelt es sich bei den Mutationen in *MLL2* überwiegend (50/79; 63,3 %) um STOP-Mutationen während die Mutationen in *CREBBP* überwiegend (48/61; 78 %) mit einem Aminosäure-Austausch einhergehen (siehe auch Tabelle 25, eine vollständige Liste ist im Anhang 1 aufgeführt). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls STOP-Mutationen in *MLL2* und Aminosäure-Austausche bei *CREBBP* detektierten [232, 233, 255]. Dagegen wurden nur 10 % (22/222) der detektierten Varianten dem Gen *TNFRSF14* zugewiesen und 5-6 % den Genen *BCL2* (12/222), *EZH2* (14/222), *C10ORF12* (11/222) und *EP300* (12/222). Darüber hinaus waren Mutationen bei *BCL6*, *MYC*, *TP53* und *MEF2B* in allen 82 Proben eher selten und machten weniger als 2 % (1 bis 4/222) aller detektierten Varianten der kodierenden Region aus. Keine Mutationen wurden unter den angewendeten Filter-Kriterien in den kodierenden Regionen von *CDKN2A* und in L265P von *MYD88* identifiziert.

Die Verteilung der detektierten Varianten in den genomischen Regionen von 2,5 kb ab TSS wies unter den analysierten Kandidatengenen über alle 82 Proben eine deutliche Selektivität auf. Im Vergleich zu der Gesamtzahl der detektierten Mutationen, wurden mit 61,5 % (790/1285) über die Hälfte der Mutation der genomischen Region von *BCL2* zugewiesen. Die Anzahl der detektierten Mutationen von *BCL2* machen zusammen mit den identifizierten Mutationen von *BCL6* (17,7 %, 227/1285) und *RHOH* (10,5 %, 135/1285) etwa 90 % aller detektierten Mutationen in den analysierten genomischen Bereichen von 2,5 kb ab TSS der Kandidatengene aus. Weitere 70/1285 erfasste Varianten (entsprechen 5,4 % aller detektierten Varianten) konnten *C2TA* zugeordnet werden. Die verbleibenden 5 % teilen sich auf sechs Gene auf (*PIM1* (1,4 %, 18/1285), *PAX5* (1,4 %, 18/1285), *MYC* (0,9 %, 12/1285), *IRF4* (0,8 %, 10/1285) und *REL* (0,4 %, 5/1285)) und sind somit deutlich seltener als Mutationen in *C2TA*. Insgesamt gibt die hohe Mutationsrate in diesen Kandidatengenen Hinweise darauf, dass die somatische Hypermutationsmaschinerie dauerhaft aktiv ist und folglich maßgeblich zu der Heterogenität der Lymphome beiträgt.

3.3.3.1 Validierung von Mutationen aus der Next-Generation-Sequencing-Analyse mittels Sanger-Sequenzierung

Mutationen, die einen hohen Informationsgehalt für die Entwicklung eines t(14;18) positiven FLs besitzen sollten mit einer weiteren Methode bestätigt werden. Dazu wurden Mutationen, die mit einer

Ergebnisse

funktionellen Proteinveränderung in den Genen *CREBBP*, *TNFRSF14*, *TP53*, *CDKN2A*, *MYD88*, *EZH2*, *C10ORF12*, *EP300*, *MLL2* und *MEF2B* einhergehen, mittels Sanger-Sequenzierung validiert. Um zu verhindern, dass Mutationen mittels NGS nicht detektiert wurden, da sie z.B. in weniger als 10 % aller hochqualitativen Basen ein übereinstimmendes alternatives Allel aufzeigen und somit die Filterkriterien für eine detektierbare Mutation nicht erfüllt haben, sollten immer alle Verlaufsproben eines Patienten analysiert werden, wenn in mindestens einer Verlaufsprobe des Patienten eine Mutation mittels NGS identifiziert wurde. Dieses soll am Beispiel von *EZH2* demonstriert werden, da hier zur Überprüfung der Fehlerrate der NGS-Analysen alle 82 Proben analysiert wurden. Mittels NGS wurden insgesamt 14 Mutationen detektiert, die auch alle mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt werden konnten. Darüber hinaus konnte mittels Sanger-Sequenzierung über den Paarvergleich in einer weiteren Probe eine Mutation identifiziert werden, die in nur 7,2 % aller hochqualitativen Basen ein übereinstimmendes alternatives Allel aufwies und somit bei den Analysen durch die Filterkriterien ausgeschlossen wurde. Somit wurde insgesamt bei 15 Proben eine Mutation in *EZH2* nachgewiesen. Insgesamt konnten bei 57 Proben übereinstimmend keine Mutation in der genomischen Region von *EZH2* mittels NGS oder mittels Sanger-Sequenzierung detektiert werden.

Tabelle 25: Validierung der mittels NGS detektierten Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung

Gen-Name	Aminosäureaustausch	Stop-Mutation	Mutation in Splice-Stelle	Anzahl zu validierender Mutationen*	Anzahl analysierter Proben	Bestätigt mit Sanger		fraglicher Fall		nicht bestätigte Mutation		über Paarvergleich detektierte Mutation	
						Anzahl	in %	Anzahl	in %	Anzahl	in %	Anzahl	in %
<i>CREBBP</i>	48	2	4	54	71	51	94,4	0	0	3	5,6	3	5,6
<i>TNFRSF14</i>	8	8	2	18	22	16	88,9	2	9,1	0	0,0	0	0,0
<i>TP53</i>	3	0	0	3	8	3	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>C10ORF12</i>	5	4	0	9	9	9	100,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
<i>EP300</i>	8	0	0	8	14	4	50,0	0	0,0	4	50,0	0	0,0
<i>MLL2</i>	7	50	4	61	88	60	98,4	1	1,1	0	0,0	4	6,6
<i>MEF2B</i>	2	0	0	2	4	2	100,0	0	0	0	0,0	1	50,0
<i>EZH2</i>	2	12	0	14	82	14	100,0	0	0	0	0,0	1	7,1
Summe	83	76	10	169*	298	159	94,1	3	1,3	7	4,6	9	5,9

* eine vollständige Liste unter Angaben der Position und der Art der Mutation ist in Anhang 1 aufgeführt.

Insgesamt konnte ich mittels Sanger-Sequenzierung 94,1 % (159/169) der mittels NGS detektierten Mutationen bestätigen (siehe Tabelle 25, alle bestätigten Mutationen sind in Anhang 1 aufgeführt). Die Fehlerrate lag bei 4,1 % für nicht bestätigte Mutationen und 5,3 % für Mutationen die aufgrund der

Ergebnisse

stringenteren Filterkriterien nicht erfasst wurden. Zusammenfassend zeigt die hohe Reproduzierbarkeit eine zuverlässige Vorgehensweise zur Identifikation relevanter Mutationen.

3.3.3.2 Paarweise Analyse der Häufigkeiten detektierter Mutationen in den Verlaufspuben

Um die Verteilung der Mutationen unter den FL-Tumorproben zu untersuchen, wurde jeder Fall separat analysiert und die Frequenz der detektierten Mutationen unter den Verlaufspuben eines Patienten miteinander verglichen. Zunächst wurden die mittels Sanger-Sequenzierung bestätigten Mutationen bei *CREBBP*, *TNFRSF14*, *TP53*, *C10ORF12*, *EP300*, *MLL2*, *MEF2B* und *EZH2* ausgewertet. Ein Vergleich aller analysierten Mutationen unter den Verlaufspuben zeigte, dass 83,6 % (133/159) der Mutationen in den Verlaufspuben vorkommen und nur wenige Mutationen unter den Proben einzigartig sind. Von den verbleibenden 16,4 % kommen etwa die Hälfte (8,8 %) der detektierten Mutationen ausschließlich im Initialtumor vor, während 5,6 % nur im ersten 1. Rezidiv und 1,8 % nur im 2. oder 3. Rezidiv einzigartig sind (Tabelle 26). Diese Ergebnisse zeigen, dass der Anteil der Mutationen die in den Kandidatengenomen im Verlauf der Tumorentwicklung hinzukommen oder verloren gehen, gering ist. Schlussfolgernd gibt der hohe Anteil gemeinsamer Mutationen einen weiteren Hinweis darauf, dass die Mutationen bereits in der Ursprungszelle vorhanden gewesen sind, aus der sich die folgenden Tumorzellen entwickelt haben.

Tabelle 26: Verteilung der mittels Sanger-Sequenzierung bestätigten Mutationen unter den Verlaufspuben

Gen-Name	Gesamt-Mutationen	Gemeinsame Mutationen	Mutationen nur im Initialtumor	Mutationen nur im 1. Rezidiv	Mutationen nur im 2. oder 3. Rezidiv
<i>CREBBP</i>	51	47	1	2	1
<i>TNFRSF14</i>	16	13	3	0	0
<i>TP53</i>	3	0	0	1	2
<i>C10ORF12</i>	9	9	0	0	0
<i>EP 300</i>	4	4	0	0	0
<i>MLL2</i>	60	46	9	5	0
<i>MEF2B</i>	2	1	0	1	0
<i>EZH2</i>	14	13	1	0	0
Summe	159	133 (83,6 %)	14 (8,8 %)	9 (5,6 %)	3 (1,8 %)

Anschließend wurde die Heterogenität aller detektierten Varianten in den Kandidatengenomen untersucht, um eine Aussage über die Diversität der somatischen Mutationen machen zu können. Dazu wurde der Anteil identischer und unterschiedlicher Mutationen im Verhältnis zu der jeweiligen Gesamtzahl detektierter Mutationen in der jeweiligen genomischen Region bestimmt. Unter einer „gleichen/identischen Mutation“ ist eine Mutation zu verstehen, die an einer bestimmten Position

Ergebnisse

vorkommt und auch in mindestens in einer weiteren Probe an derselben Position anzutreffen ist. Handelt es sich um eine Mutation an einer anderen Position, wird sie als „unterschiedliche Mutation“ bezeichnet. Dieses soll am Beispiel von *EZH2* demonstriert werden (siehe Tabelle 27). In einem genomischen Bereich von 37 bp in dem Exon 15 von *EZH2* wurden insgesamt 14 Mutationen in dem gesamten Probenkollektiv detektiert. Diese 14 Mutationen kommen an vier unterschiedlichen Positionen vor. Folglich sind 4/14 (29 %) Mutationen unterschiedliche Mutationen, wohingegen 10/14 (71 %) identische Mutationen sind.

Tabelle 27: Mittels NGS detektierte Mutationen bei *EZH2* (Vergleich gemeinsamer und unterschiedlicher Mutationen)

Position auf Chr 7 (Hg19)	Mutation	Anzahl der 14 detektierten Mutationen (hier insgesamt 4 unterschiedliche Mutationen)
148508727	Tyr641Phe	2 identische (in 2 Proben detektiert)
148508728	Tyr641Asn	8 identische (in 8 Proben detektiert)
148508749	Lys634Glu	2 identische (in 2 Proben detektiert)
148508714	Splice Site	2 identische (in 2 Proben detektiert)

Insgesamt lag die Anzahl der identischen Mutationen in den analysierten Regionen der kodierenden Region sowie der 2,5 kb Region der somatischen Hypermuation der Kandidatengene bei 45 % (± 15 %) (siehe Abbildung 32). Eine Ausnahme waren *MYC* und *MEF2B*, in denen nur eine bzw. 2 Mutationen insgesamt identifiziert wurden.

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass ~55 % aller detektierten Mutationen unter allen analysierten Verlaufsproben unterschiedlich sind, was darauf zurückzuführen ist, dass immer mindestens zwei analysierte Proben einem Patienten zugeordnet werden können. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass es sich bei den detektierten Mutationen überwiegend um gemeinsame Mutationen der Verlaufsproben handelt. Die Erkenntnis, dass Mutationen für jede Tumorentwicklung einzigartig sind unterstützt die Theorie, dass eine gemeinsame Ursprungszelle bereits die Mutationen erfährt und im Verlauf der Tumorentwicklung diese erworbenen Veränderungen an die Nachkommenzellen weitergibt. Die Mutationen der jeweiligen Ursprungszellen sind unter den Patienten und somit für jede Tumorentwicklung individuell.

Ergebnisse

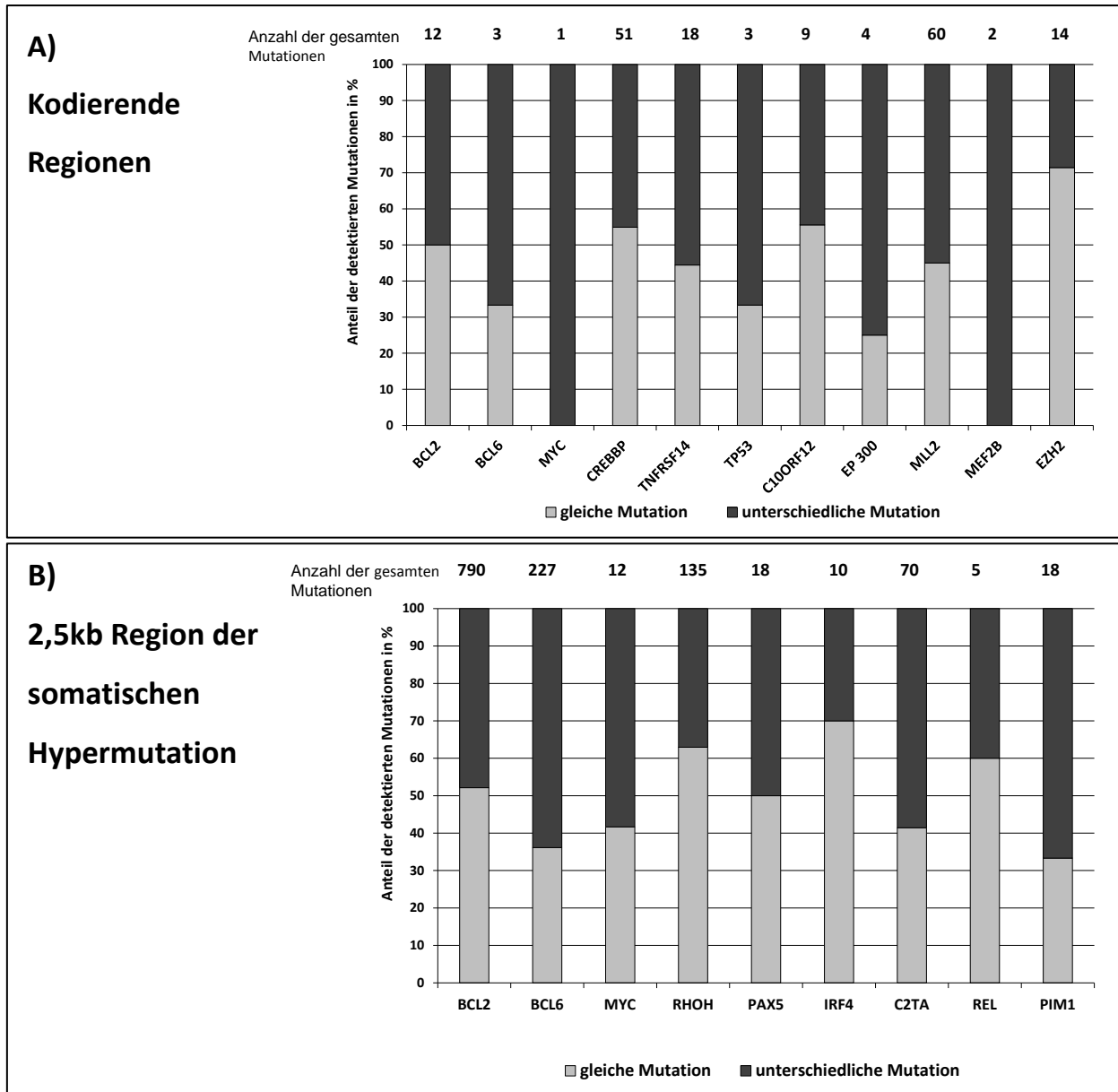


Abbildung 32: Anteil der gleichen und unterschiedlichen Mutationen für die **A)** kodierenden Regionen und die **B)** 2,5 kb Region der somatischen Hypermutation. Der Anteil wurde an der Gesamtanzahl detektierter Mutationen für die jeweilige analysierte Region gemessen. Es handelt sich um eine gleiche Mutation, wenn dieselbe Mutation an einer bestimmten Position auch in mind. einer weiteren Probe an derselben Position vorkommt. Andernfalls handelt es sich um unterschiedliche Mutationen.

Als nächstes wurden alle detektierten Mutationen unter den Verlaufsproben eines Patienten miteinander verglichen. Dazu wurde zwischen konkordanten Varianten (Mutationen, die in beiden Proben vorkommen) und diskordanten Varianten (Mutationen, die nur in einer Probe vorkommen) unterschieden, die dann zwischen der Initialprobe und der Verlaufsprobe miteinander verglichen wurden (siehe Abbildung 33 oben).

Interessanterweise zeigten die Patienten, denen in der V_H -Analyse ein paralleler Evolutionstyp zugeordnet wurde, mit 3-76 (Median= 14) diskordanten Mutationen die meisten unterschiedlichen Mutationen zwischen den Verlaufsproben eines analysierten Patienten. Dahingegen waren bei den

Ergebnisse

Fällen des sequenziellen Evolutionstyps mehr gemeinsame, aber weniger unterschiedliche Mutationen (0-9 (Median= 4,5) diskordante Mutationen) zu verzeichnen. Die Patienten des dritten Evolutionstyps wiesen mit 0-2 (Median= 1) diskordanten Mutationen die meisten gemeinsamen Mutationen zwischen dem ersten und zweiten Biopsat auf. Dass die Anzahl der diskordanten Mutationen unter den Evolutionstypen signifikant unterschiedlich ist, wurde mittels Kruskal-Wallis-Test überprüft und bestätigt ($p=0.013$, Abbildung 33 unten).

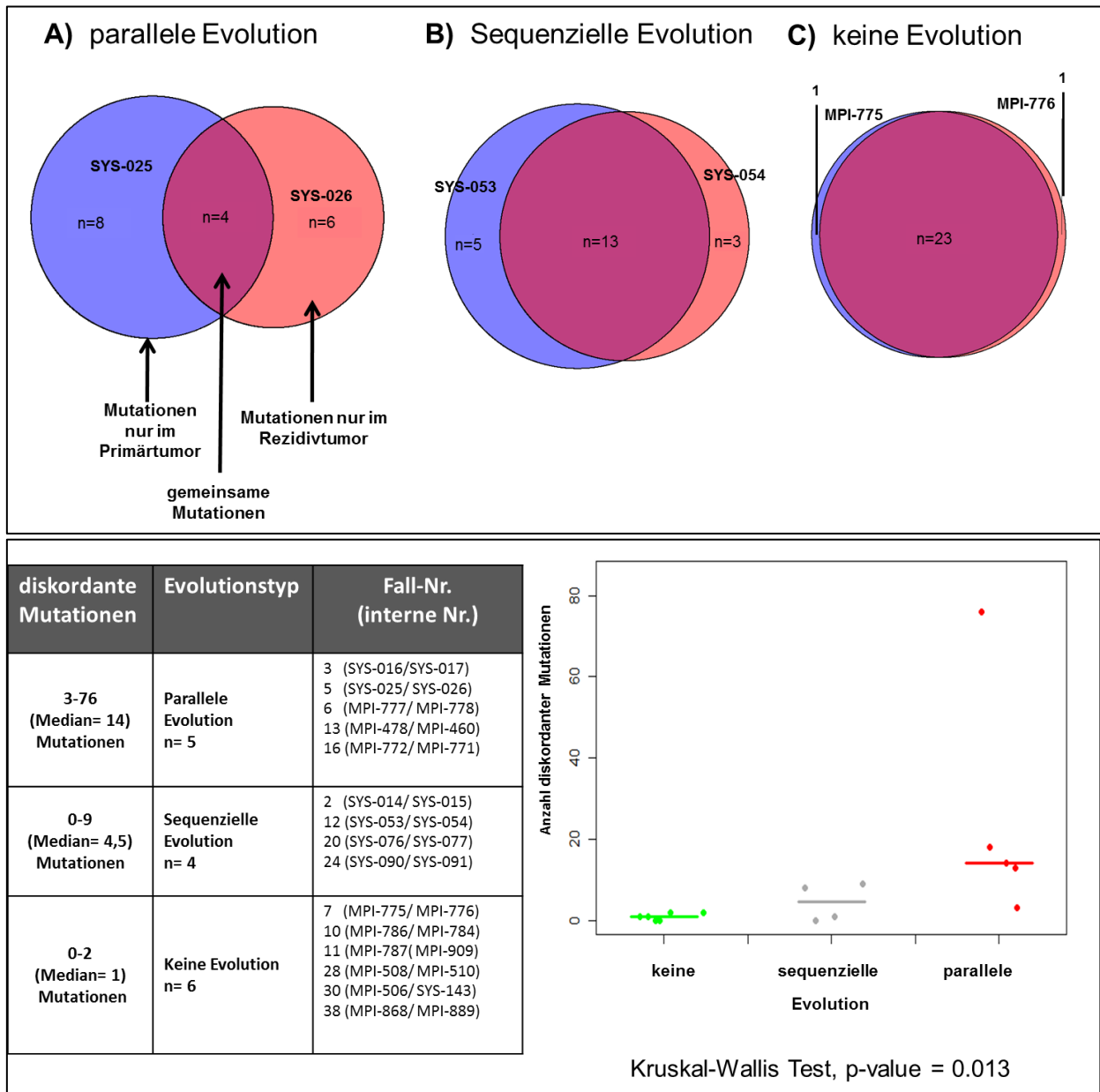


Abbildung 33: Vergleich der mittels NGS detektierten konkordanten (gemeinsam in den Verlaufspben) und diskordanten (nur in einer Verlaufspbe vorkommend) Mutationen in den genomischen Regionen der 19 analysierten Kandidatengene unter den Verlaufspben eines Patienten. **Oben:** Die Venn-Diagramme von drei repräsentativen Beispielen der zugeordneten Evolutionstypen zeigen die Mutationen, die ausschließlich im Primärtumor vorkommen (blauer Kreis), die Mutationen die ausschließlich im Rezidivtumor vorkommen (oranger Kreis) und die Mutationen, die in beiden Proben gemeinsam sind (überlappenden Bereich in rosa). **Unten:** Statistische Überprüfung der Signifikanz (Kruskal-Wallis-Test) der diskordanten Mutationen bei 14 Fällen mit einem zugeordneten Evolutionstyp. Aufgeführt sind die Anzahl der diskordanten Mutationen und die jeweilige Zuordnung der Patienten zu dem Evolutionstyp. Stand der Datenanalyse: 19.12.2012.

Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass Mutationen in Kandidatengenomen dahingehend einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorevolution der t(14;18) positiven FL haben, indem sie im Progress der Tumorentwicklung mit den Folgen der anderen genetischen und epigenetischen Veränderungen interagieren und dass diese Interaktionen zur Entwicklung der unterschiedlichen Evolutionstypen beitragen.

3.3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse aus der longitudinalen Daten-Akquise zur Analyse der klonalen Tumorevolution bei t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen

In dieser Studie sollten t(14;18) positive Lymphomgewebeproben (überwiegend Initial- und Rezidivtumor) auf Veränderungen des Epigenoms und Genoms zu untersucht werden, um die während der Tumorevolution entstehende Heterogenität der Tumorzellen zu beschreiben. Dazu wurde zunächst die klonale Evolution in den Verlaufsproben, basierend auf den Mutationen von Immunglobulin-Schwerkettengenomen (V_H -Rearrangements) in Form von Stammbaumstrukturen rekonstruiert, um die phylogenetischen Beziehungen der klonalen Tumorentwicklung zu ermitteln. Vergleichende Analysen unter den jeweiligen Verlaufsproben eines jeden Patienten zeigten, dass diese Evolutionsmuster auch auf anderen Ebenen des Epigenoms (DNA-Methylierung) und Genoms (somatische Mutationen in Kandidatengenomen) wiederzufinden sind. Die wesentlichen Ergebnisse sind in der Tabelle 28 zusammengestellt, eine ausführliche Liste ist in Anhang 2 aufgeführt.

Basierend auf den Sequenzen des V_H -Rearrangements der Verlaufsproben der Patienten konnten drei Evolutionstypen identifiziert werden: „parallele Evolution“, „sequenzielle Evolution“ und „keine Evolution“ (Abbildung 22). Während der „sequenzielle“ Evolutionstyp und der Typ mit „keiner Evolution“ dadurch gekennzeichnet sind, dass ein Vorläuferklon der Rezidivprobe bereits in dem Initialtumor zu sehen ist, wird bei dem „parallelen“ Evolutionstyp eine frühe gemeinsame Vorläuferzelle für Initial- und Rezidivtumor vermutet, deren Spuren allerdings nicht in diesen analysierten Sequenzen wiederzufinden waren. Interessanterweise zeigte der „parallele“ Evolutionstyp nicht nur die meisten differenziell methylierten Gene (diskrepanten CpGs, $\Delta\beta > 0,35$) zwischen dem Initial- und dem Rezidivtumor (Abbildung 25), sondern auch die meisten unterschiedlichen Mutationen (diskordante Mutationen), wohingegen bei die anderen beiden Typen weniger bis gar keine Unterschiede beobachtet wurden (Abbildung 33). Darüber hinaus ergaben vergleichende Analysen aller Proben, dass das DNA-Methylierungsprofil unter den Verlaufsproben desselben Patienten ähnlicher ist, als das DNA-Methylierungsprofil unter den zugeordneten drei Evolutionstypen (Abbildung 24). Zudem konnte gezeigt werden, es sich bei den detektierten Mutationen überwiegend um gemeinsame Mutationen der

Ergebnisse

Verlaufspuren handelt, während insgesamt ~55 % aller detektierten Mutationen bei allen analysierten Regionen der Kandidatengene unterschiedlich sind (Abbildung 32).

Tabelle 28: Zusammenfassung wesentlicher Ergebnisse aus paarweisen Vergleichen zwischen den Verlaufspuren der t(14;18) positiven FL (überwiegend Initial- und Rezidivtumor) und die jeweilige Zuordnung der Patienten zu dem Evolutionstyp

Evolutionstyp	Fall-Nr. (interne Nr.)	27K-Methylierungsanalyse	NGS –Mutationsanalyse	Zeitraum zwischen Initial und Rezidivtumor	genomweite DNA-Methylierungsanalyse (LUMA)
parallele Evolution n= 5	3 (SYS-016/ SYS-017/SYS-018) 5 (SYS-025/ SYS-026) 6 (MPI-777/ MPI-778) 13 (MPI-478/ MPI-460) 16 (MPI-772/ MPI-771)	0,33-1,97 % (Median= 1,14 %) diskrepante CpGs	3-76 diskordante Mutationen (Median= 14) diskordante Mutationen	2-7 Jahre (Median= 2,5 Jahre)	-25,3-15 % (Median= -8,4 %) Differenz
sequenzielle Evolution n= 4	2 (SYS-014/ SYS-015) 12 (SYS-053/ SYS-054/ SYS-055) 20 (SYS-076/ SYS-077) 24 (SYS-090/ SYS-091)	0,22-1,04 % (Median= 0,45 %) diskrepante CpGs	0-9 diskordante Mutationen (Median= 4,5) diskordante Mutationen	2-8,5 Jahre (Median= 4,5 Jahre)	-19,9-7 % (Median= -6,8 %) Differenz
keine Evolution n= 6	7 (MPI-775/ MPI-776) 10 (MPI-786/ MPI-784) 11 (MPI-787/ MPI-909) 28 (MPI-508/ MPI-510) 30 (MPI-506/ SYS-143) 38 (MPI-868/ MPI-889)	0,01-0,39 % (Median= 0,05 %) diskrepante CpGs	0-2 diskordante Mutationen (Median= 1) diskordante Mutationen	0,1-7 Jahre (Median= 1,5 Jahre)	-17-10 % (Median= -8 %) Differenz
p-Wert (Kruskal-Wallis-Test) signifikant wenn p<0,05		0,019	0,013	0,118	0,936

Stand der Datenanalyse: 19.12.2012. Eine Liste der Ergebnisse dieser Arbeit, die im Rahmen des HämatoSys-Projektes erhoben wurden, ist in Anhang 2 aufgeführt.

Zusammengefasst lässt sich schlussfolgern, dass die Folgen genetischer und epigenetischer Veränderungen an unterschiedlichen Entwicklungsstadien der klonalen Tumorevolution miteinander interagieren und zu unterschiedlichen Evolutionstypen der Pathogenese und Entwicklung bei t(14;18) positiven FL führen. Darüber hinaus weisen die größeren Ähnlichkeiten des Epigenoms und Genoms unter den Verlaufspuren im Vergleich zu allen analysierten Proben darauf hin, dass die Entstehung des Tumors auf eine gemeinsame Ursprungszelle in der frühen Entwicklungsphase der Tumorevolution vor der Entstehung der klonalen Diversität zurückzuführen ist, die wiederum für jede Tumorentwicklung eines Patienten individuell (Lymphom-spezifisch) ist.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die klonale Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL untersucht, um die epigenetischen und genetischen Veränderungen, beginnend in einem frühen Entwicklungsstadium (FLIS und PFL) bis hin zu einem ausgereiften FL und dem Rezidiv zu charakterisieren. In diesem Zusammenhang wurden intra- und interklonale Veränderungen der DNA-Methylierungsmuster und deren phylogenetischen Beziehungen, sowie Häufigkeiten somatischer Mutationen bei ausgewählten Kandidatengenomen mittels NGS-Techniken identifiziert. An Verlaufsproben (Initial-, Rezidivtumor) wurden die epigenetischen Veränderungen im Progress der Tumorevolution mittels LUMA und arraybasierter DNA-Methylierungsassays erfasst, sowie Häufigkeiten somatischer Mutationen in ausgewählten genomischen Bereichen von Kandidatengenomen, die entweder „Driver-Mutationen“ sein können oder als Konsequenz einer aberranten SHM entstanden sind, bestimmt.

Zusammengefasst wurden im Rahmen dieser Arbeit folgende Ergebnisse erzielt:

1. Die Etablierung eines Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahrens von RainDance Technologies und anschließendem Next-Generation-Sequencing zur Detektion von DNA-basierten Einzelbasenveränderungen lieferte einen neuen Ansatz zur Bestimmung der DNA-Methylierung und Identifikation von Hepitypen bei Tumoren.
2. Bei den Lymphomvorstufen (FLIS und PFL; $n_{\text{gesamt}}=9$ Proben) wurden keine, bzw. nur wenige sekundäre genetische Veränderungen detektiert. Darüber hinaus wiesen die Proben untereinander ein ähnliches DNA-Methylierungsprofil bei ausgewählten Kandidatengenomen auf, was schlussfolgern lässt, dass FLIS und PFL einer ähnlichen Entwicklungsstufe der t(14;18) positiven Tumorentwicklung entstammen.
3. Zellen klonal verwandter FLIS und deren ausgereiftes Lymphom, waren sowohl genetisch als auch epigenetisch signifikant unterschiedlich. Außerdem wurden neben der t(14;18), die in allen Proben nachgewiesen wurde (n=10 Proben), nur in den ausgereiften Lymphomen, aber nicht in dem FLIS chromosomale Veränderungen identifiziert. Das zeigt, dass die Ansammlung von Chromosomenaberrationen und Veränderungen der DNA-Methylierung Kennzeichen eines Evolutionsverlaufs von FL sind und FLIS, im Vergleich zu ausgereiften Lymphomen, ein frühes Stadium der Lymphomentwicklung repräsentieren.

4. Mutationen in Tyr-641 von *EZH2* wurden sowohl bei PFL und FLIS (2/7), als auch in dem ausgereiften Lymphom von klonal verwandten FLIS und ausgereiften Lymphom (3/10) detektiert.
5. Auf der Grundlage des VDJ-Rearrangements bei Verlaufspröben wurden drei Evolutionstypen (Typ 1: parallele Evolution, Typ 2: sequenzielle Evolution, Typ 3: keine Evolution) identifiziert, die sich sowohl epigenetisch, hinsichtlich der Veränderungen der DNA-Methylierung, als auch genetisch, hinsichtlich der erworbenen somatischen Mutationen, signifikant voneinander unterscheiden. Dabei korrelierte der Umfang der Unterschiede nicht mit der Zeitspanne zwischen Initial- und Rezidivtumor und wurde zudem auch nicht auf der Ebene der genomweiten Gesamt-DNA-Methylierung beobachtet.
6. In dem analysierten Probenkollektiv (82 t(14;18) positive Proben von 33 Patienten) wurden somatische Mutationen am häufigsten in den „Driver-Mutations-Kandidatengen“ *MLL2* (96%), *CREBBP* (72 %) und *EZH2* (12 %) detektiert, wohingegen somatische Mutationen in den Exonen von *CDKN2A* (0 %) und L265P von *MYD88* (0 %) nicht vorkommen.
7. Die höchste Mutationsrate in einer 2,5 kb großen Region ab TSS, die als Konsequenz einer fehlerhaften SHM entstanden sein kann, wurde bei *BCL2* (95 %), *RHOH* (84 %) und *BCL6* (57 %) detektiert. Dagegen war die Mutationsrate der Gene *PIM1* (7 %) und *REL* (6 %) bei den 82 t(14;18) positiven Proben der 33 analysierten Patienten deutlich geringer.

In diesem Teil der Arbeit möchte ich zunächst die methodischen Aspekte der in dieser Arbeit angewandten Methoden diskutieren und anschließend auf die biologische Bedeutung der gewonnenen Erkenntnisse hinsichtlich der epigenetischen und genetischen Zusammenhänge im Progress der Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL eingehen. Eine detaillierte Diskussion der publizierten Ergebnisse ist in den Original Arbeiten (Abschnitt 3.1 und Abschnitt 3.2) bereits aufgeführt.

4.1 Methodische Aspekte zum Einsatz von PCR-basierten Anreicherungsverfahren und Quantifizierung von DNA-Methylierung

In der folgenden Diskussion wird zunächst die Anwendung eines Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahrens für Hochdurchsatzanalysen mittels NGS diskutiert (Abschnitt 4.1.1) und anschließend auf die Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit angewendeten Techniken zur Analyse der DNA-Methylierung (Abschnitt 4.1.2) eingegangen.

4.1.1 Anwendung eines Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahrens für Hochdurchsatzanalysen mittels Next-Generation-Sequencing

Für Hochdurchsatzanalysen mittels NGS gibt es verschiedene Anreicherungsverfahren (siehe auch Übersichtsartikel von Mamanova et al. [256]), von denen die folgenden drei Methoden häufig bei NGS zum Einsatz kommen. Bei der einen Methode, der „Hybrid-Capture“, wird die DNA der zu untersuchenden Probe zunächst mit Nukleotiden hybridisiert, die komplementär zur Zielregion sind. Um die Zielsequenzen anschließend zu isolieren, werden die hybridisierten Fragmente physikalisch „eingefangen“, z.B. Array-basiert oder in Lösung [257]. Die zweite Methode basiert auf einer Multiplex-Amplifikation von Zielsequenzen mit selektiver Ringbildung von Ziel-DNA-Fragmenten über array-synthetisierte Padlock-Proben (sog. Molekulare Inversions Proben, MIP). Nach der Hybridisierung der universellen Primer an die Ziel-DNA erfolgt eine Auffüllreaktion mit anschließender Ligation zur Generierung eines geschlossenen Zirkels [258]. Die dritte Methode, „Mikro-Droplet“-basiert, bedient sich der klassischen PCR [242, 244] und wurde im Rahmen dieser Arbeit für zwei verschiedene Fragestellungen eingesetzt (Abschnitt 3.1.1 und Abschnitt 3.3.3). Diese drei Anreicherungsverfahren unterscheiden sich nicht nur in ihrer Technik, sondern auch in der Einsatzmöglichkeit und hinsichtlich der Qualitätskriterien (siehe Tabelle 29).

Ein wesentliches Qualitätsmerkmal zur Beurteilung einer Anreicherungs- und Sequenzierungsmethode ist die Gleichmäßigkeit der Sequenzabdeckung. Diese gibt Auskunft über die mittlere Tiefe, mit der die Proben analysiert wurden [242]. Wenn z.B. die Zielsequenzen den zu analysierenden Bereich unterschiedlich stark abdecken, muß man tiefer sequenzieren, um eine effektive und gleichmäßige Abdeckung zu erreichen, so dass die Varianten optimal benannt werden können. Bei dem Mikro-Droplet-Verfahren beispielsweise lässt sich die Tiefe der zu analysierenden Regionen über die Anzahl der eingesetzten Droplets verändern [256, 259]. In dieser Arbeit wurde mittels des Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahrens für Bisulfit-konvertierte DNA eine 95 %ige Sequenzabdeckung (Abschnitt 3.1.1) und für die Analyse der genomischen Regionen eine ~97 %ige Abdeckung (Abschnitt 3.3.3) erzielt. Diese Werte entsprechen den detektierten Werten für ein Mikro-Droplet-basiertes Anreicherungsverfahren von Tewhey et al. (Mikro-Droplet: 98 %, [242]). Auch für die anderen beiden Methoden ist eine Abdeckung der Zielsequenz von 98 % (MIP-basiert, [258]) und 88 % (Hybrid-Capture, [257]) beschrieben (siehe Tabelle 29). Insgesamt sprechen die Zahlen bei allen drei Methoden für eine gleichmäßige Abdeckung der Zielregion. Allerdings werden bei einem MIP-basierten Anreicherungsverfahren etwa 34-42 % der Sequenzen von den Primersequenzen oder den MIP-linker Sequenzen abgedeckt [258]. Dieser Effekt spiegelt sich wiederum in den Werten der Detektionsrate der Varianten wieder. Während diese Rate bei einem Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahren bei

Diskussion

94 % liegt (Tewhey et al. [242] und diese Arbeit), werden bei MIP-basierter Anreicherung nur 75 % [258] und bei der Hybrid-Capture 64-89 % [257] der Varianten detektiert.

Tabelle 29: Qualitätsmerkmale verschiedener Anreicherungsverfahren

Referenz	verwendete Anreicherungsverfahren	Einsatzbereich	Abdeckung der Zielsequenz*	Varianten-Detektionsrate	Calling-Genauigkeit der Sequenzvarianten	Reproduzierbarkeit	Gesamtgröße der Zielsequenz	eingesetzte DNA-Menge
Tewhey et al., 2009 [242]	Mikro-Droplet-PCR	Resequenzierung kleiner genomischer Bereiche	~ 98 %	94,5 %	falsch positiv-Rate: <1,6 %	intersample: $r^2=0,88$ traditionell, $r^2=0,91$ Mikro-Droplet	1,35 Mb	7,5 µg
Turner et al., 2009 [258]	MIP-basiert	z.B. gesamte Exome	98 %	75 %	falsch positiv-Rate: <1 %	keine Angaben	1,4 Mb	>10 µg
Gnrirke et al., 2009 [257]	Hybrid-Capture	z.B. gesamte Exome	88 %	64-89 %	falsch positiv-Rate: <1 %	keine Angaben	3,7 Mb	>10 µg
eigene Arbeiten								
Bisulfit-konvertierte DNA (Abschnitt 3.1.1)	Mikro-Droplet-PCR	Resequenzierung genomischer Bereiche	95 % (Median 100 %)	keine Angaben	keine Angaben	„cross-strand“-Reproduzierbarkeit Mikro-Droplet, $\rho=0,96$ und $0,87$ (Pyro)	34 kb	8 µg für die Bisulfit-Konversion
Analyse somatischer Mutationen (Abschnitt 3.3.3)	Mikro-Droplet-PCR	Resequenzierung genomischer Bereiche	97,4 %	94 %	falsch positiv-Rate: 4,1 %	keine Angaben	98 kb	4 µg

* % aller Basen, die mind. von einer Sequenz abgedeckt werden

Neben der Variantendetektionsrate spielt auch die „Calling-Genauigkeit“ der Varianten, das heißt die Fehlerrate von falsch positiven Varianten, eine Rolle. Während die Rate bei Turner et al. und Gnrirke et al. bei unter einem Prozent lag [257, 258], detektierten Tewhey et al. weniger als 1,6 % falsch positive Varianten [242]. In dieser Arbeit wurde für die Detektion der Mutationsraten bei Kandidatengenomen mit 4,1 % eine höhere Fehlerrate als bei Turner und Gnrirke et al. für falsch-positive Varianten detektiert. Dieser geringfügig höhere Wert ist vermutlich eher auf die Auswertestrategie als auf die Anreicherungsverfahren selbst zurückzuführen.

Ein weiteres Qualitätsmerkmal für eine optimale Anreicherungsverfahren ist die Reproduzierbarkeit. Tewhey et al. überprüften die Reproduzierbarkeit für das Mikro-Droplet-basierte Anreicherungsverfahren im Vergleich zu einem klassischen PCR-Verfahren anhand der mittleren Abdeckung der Amplikons von zwei Proben. Der Lin's Koeffizient r^2 lag bei 0,88 für das klassische Verfahren und bei 0,91 für das Mikro-Droplet-Verfahren [242]. In dieser Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit für den Vorwärts- als auch für den Rückwärtsstrang im Vergleich zur Bisulfit-Pyrosequenzierung am Beispiel von *IGF2* bestimmt. Für das Mikro-Droplet-basierte NGS betrug der paarweise Korrelations-Koeffizient ρ 0,96, während er für die Bisulfit-Pyrosequenzierung bei nur 0,88 lag. Auch wenn es sich hier um zwei unterschiedliche Analysen handelt, zeigen diese Ergebnisse, dass

Diskussion

mittels Mikro-Droplet-basiertem NGS eine effizientere Reproduzierbarkeit erzielt wird, als mit einer konventionellen Methode. Somit stellt das Mikro-Droplet-basierte Anreicherungsverfahren eine zuverlässige und effiziente Amplifikationsmethode dar.

Die Auswahl eines Amplifikationsverfahrens wird u.a. auch durch die einzusetzende DNA-Menge beeinflusst. Beispielsweise erfordern die „Hybrid-Capture Methode“ und die „MIP“-basierte Anreicherungsverfahren mehr als 10 µg DNA pro Ansatz [260]. Diese Menge DNA kann aber nicht immer aufgebracht werden. Insbesondere wenn es sich, wie in dieser Arbeit, um kryoasservierte Lymphknotenbiopsate handelt. Diese Lymphknotenbiopsate waren teilweise schon bis zu 30 Jahre alt und wurden bereits für zahlreiche andere Studien und Untersuchungen genutzt, oder die vorhandene DNA-Menge mußte auf mehrere Analysen aufgeteilt werden. Für ein Mikro-Droplet-basiertes Anreicherungsverfahren sind als weniger 10 µg DNA erforderlich. Während in dieser Arbeit für die Bisulfit-Konvertierung 8 µg Ausgangs-DNA (Abschnitt 3.1.1) eingesetzt wurden, wurden bei der Anreicherung der Kandidatengene (Abschnitt 3.3.3) insgesamt nur 4 µg verwendet. Im Vergleich dazu, nutzte auch die Gruppe von Tewhey et al. im Jahre 2009 noch 7,5 µg DNA, aber eine Optimierung für den Einsatz von 2 µg in einem Mikro-Droplet-basierten Ansatz sollten nach Angaben der Autoren bereits in Arbeit sein [242].

Das Mikro-Droplet-basierte Einsatzverfahren kommt nicht nur zur Resequenzierung von genomischen Regionen zum Einsatz, sondern wird auch für andere Analysen eingesetzt, wie z.B. der Anreicherung von Einzel-DNA-Molekülen [261] und Einzel-RNA-Molekülen [262]. Überdies werden Droplet-basierte Anreicherungsverfahren auch bei anderen NGS-Technologien eingesetzt. Beispielsweise konnte die Gruppe von Mohr et al. die Droplet-Technologie mit einem Mikro-PCR Chip kombinieren und somit 60 bp große Fragmente amplifizieren [263]. Beer et al. entwickelten Picoliter Droplets für die PCR Amplifikation für Fluoreszenz-basierte Real-Time Messungen. Dieses System ist sowohl für Taqman-basierte FRET-Proben als auch für die Generierung von cDNA aus dem komplementären RNA Template bei RT-PCR nutzbar [264]. Inzwischen wird das Mikro-Droplet-basierte Anreicherungsverfahren auch in der Diagnostik angewendet und ermöglicht eine zuverlässige und schnelle Diagnose Erstellung, was die frühzeitig Erkennung einer Erkrankung unterstützt [265, 266].

Zusammengefasst stellt ein PCR-basiertes Anreicherungsverfahren eine besonders effiziente und vielseitig einsetzbare Technologie dar, die zuverlässig und effektiv zur Resequenzierung genomischer Bereiche genutzt werden kann, aber auch mit anderen Techniken kombinierbar ist und zudem die Schnelligkeit in der Routine-Diagnostik unterstützt.

4.1.2 Methoden zur Quantifizierung von DNA-Methylierung

In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden zur Quantifizierung der DNA-Methylierung eingesetzt (siehe Abschnitt 2.2). Die Reproduzierbarkeit von Methylierungsdaten stellt ein wesentliches Qualitätskriterium für die Zuverlässigkeit der Technologie dar. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich die Reproduzierbarkeit sowohl für die Sequenzierungs-basierte Methylierungsanalyse (Abschnitt 3.1.2) als auch für die arraybasierte DNA-Methylierungsanalyse zeigen (Abschnitt 3.3.2.2).

Bei der Sequenzierungs-basierten DNA-Methylierungsanalyse (Abschnitt 3.1.2) konnte ich am Beispiel von der Zelllinie Daudi zeigen, dass die mittels NGS detektierten DNA-Methylierungswerte von 13 analysierten Genorten insgesamt eine gute Übereinstimmung mit den DNA-Methylierungswerten aus der Bisulfit-Pyrosequenzierung ergeben ($R^2=0,967$). Bei nur 3/13 der analysierten Genorte wurden unterschiedliche DNA-Methylierungswerte zwischen der Bisulfit-Pyrosequenzierung und der NGS-Methode bestimmt. Dabei wurde sowohl mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bis zu 19 % mehr DNA-Methylierung (*DNMT1*) als auch 17 % (*AGTR1*) und 50 % (*SLIT2*) weniger DNA-Methylierung detektiert als mittels NGS. Andere Studien identifizierten bei Vergleichen von arraybasierter Methoden mit der Bisulfit-Pyrosequenzierung ebenfalls Differenzen zwischen den DNA-Methylierungswerten [267, 268]. Beispielsweise hat die Gruppe von Roessler et al. die β -Werte für Zelllinien und für Primärtumoren aus der 450K-Methylierungsanalyse den detektierten DNA-Methylierungswerten aus der Bisulfit-Pyrosequenzierung gegenübergestellt. Dabei wurden in einer Primär-Tumor-Probe bei ~20 % der CpG-Dinukleotide (von 352 analysierter CpG-Positionen) mehr als 15 % Unterschied in den detektierten DNA-Methylierungswerten der beiden Methoden beobachtet. Bei den Zelllinien waren es ~33 % der CpG-Dinukleotide (von 340 analysierten CpG-Dinukleotiden), die mehr als 15 % Unterschied in den detektierten DNA-Methylierungswerten zeigten [267]. Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen DNA-Methylierungswerte der arraybasierten Methylierungsanalyse zur Bisulfit-Pyrosequenzierung könnten z.B. die unterschiedlichen Denaturierungstemperaturen zwischen der methylierten und der unmethylierten genomischen DNA sein. Dieses führt zu einer Allel-spezifischen Amplifikation und folglich zu falsch positiven Resultaten [269]. Weiterhin können auch SNP das DNA-Methylierungslevel beeinflussen [227]. Außerdem sind Sequenz-basierte DNA-Methylierungsanalysen wie auch die Bisulfit-Pyrosequenzierung oft fehleranfällig. Aufgrund des 3-Basen-Codes stellen insbesondere Repeatreiche und CG-reiche Regionen beim Abbilden der Bisulfit-konvertierten Sequenzen auf das Referenz-Genom häufig ein Problem dar [270, 271].

In dieser Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit von der arraybasierten Methylierungsanalyse gezeigt: Ein Vergleich der β -Werte von 25 962 CpG-Dinukleotiden zwischen der 27K und der 450K Methylierungsanalyse ergab eine gute Korrelation zwischen den DNA-Methylierungswerten der beiden

Diskussion

Array-Analysen, der Spearman rank Korrelations-Koeffizient ρ lag zwischen 0.903 und 0.834 (Abschnitt 3.3.2.2). Auch bei der Analyse technischer Replikate, siehe Abbildung 34, wurde eine gute Korrelation erzielt. Der Spearman-Korrelations Koeffizient lag bei 0,994 und 0,986.

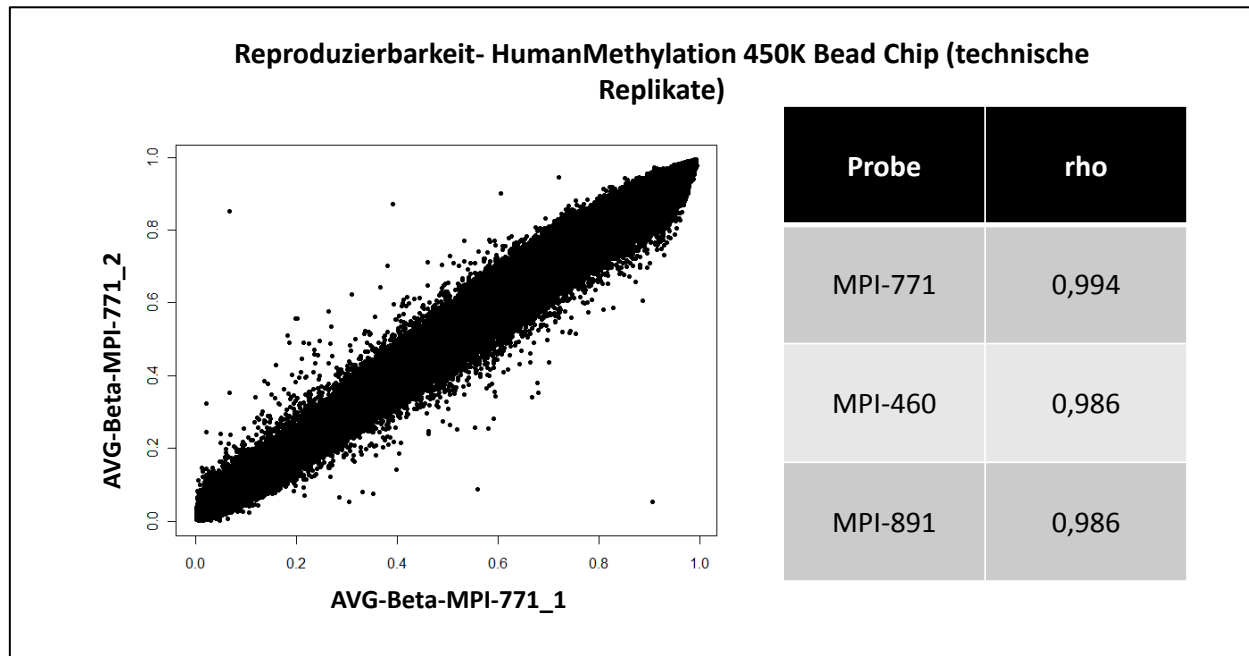


Abbildung 34: Überprüfung der Reproduzierbarkeit von DNA-Methylierungsanalysen mittels HumanMethylation 450K Bead Chip. Der Spearman-Korrelations-Koeffizient ρ bei drei analysierten Proben in Duplikaten lag bei 0,994 und 0,986.

Diese detektierten Werte entsprechen den detektierten Werten aus anderen Studien, die ebenfalls die Reproduzierbarkeit von 450K Methylierungsanalysen überprüften [272, 273]. Sandoval et al. detektierten beim Vergleich von DNA-Methylierungswerten in Replikaten normaler Kolon-Proben einen Spearman-Korrelations-Koeffizienten ρ von 0,9739 [272], während Bibikova et al. einen Korrelations-Koeffizienten von R^2 für technische Replikate von 0,992 detektierten [273]. Beide Gruppen führten ebenfalls eine technische Validierung durch, indem sie die DNA-Methylierungswerte aus der 450K-Analyse mit denen aus der 27K-Analyse verglichen. Dabei ermittelten Sandoval et al. einen Spearman-Korrelations-Koeffizienten ρ von 0,8770 [272], während Bibikova et al. einen Korrelations-Koeffizienten R^2 von 0,95 detektierten [273].

Insgesamt sprechen die guten Korrelationskoeffizienten für eine robuste und zuverlässige Methode zur Detektion von DNA-Methylierung. Da diese Methoden jedoch alle auf eine Vorbehandlung der DNA mit Natrium-Bisulfit beruhen, sollte bedacht werden, dass eine unvollständige Bisulfit-Konvertierung einen Bias erzeugen kann [227]. Beispielsweise führt eine unvollständige Denaturierung oder eine partielle Renaturierung während der Bisulfit-Behandlung dazu, dass unmethylierte Cytosinreste nicht mit Bisulfit reagieren und so fälschlicherweise als Methylcytosine interpretiert werden [274]. Insbesondere sind CpG-reiche Regionen aufgrund der hohen Stabilität der Cytosin-Guanin-Bindung anfällig für eine

unvollständige Denaturierung, welches falsch positive Ergebnisse hinsichtlich zu viel Methylierung liefert. Eine Renaturierung der DNA-Stränge wird z.B. durch den hohen Salzgehalt der Reaktion begünstigt [226]. Darüber hinaus können bei einer Bisulfit-Behandlung auch etwa 2-3 % der Methylcytosine zu Uracilen konvertiert werden. Dieses führt wiederum zu falschen Ergebnissen hinsichtlich zu wenig DNA-Methylierung [275].

4.2 Tumorentwicklung bei t(14;18) positiven Follikulären Lymphomen

In der folgenden Diskussion werden die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse der klonalen Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL hinsichtlich der biologischen Zusammenhänge von genetischen und epigenetischen Veränderungen im Progress der klonalen Tumorevolution betrachtet.

4.2.1 Identifikation von Hepitypen durch die Detektion von DNA-basierten Einzelbasenveränderungen bei Tumoren

Mittels eines Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahrens von RainDance Technologies wurde ein neuer Ansatz zur Bestimmung der DNA-Methylierung und Identifikation von Hepitypen durch die Detektion von DNA-basierten Einzelbasenveränderungen bei Tumoren etabliert. Dabei versteht man unter einem Hepityp die Assoziation zwischen einem SNP-Haplotyp und Veränderungen der DNA-Methylierung in einer bestimmten SNP-Position [276-278]. In diesem Zusammenhang bezeichnet ein klassisch genetischer Haplotyp eine Gruppe von SNP auf einem Chromosom eines Chromosomenpaares, die miteinander in Verbindung stehen [279] und darüber hinaus u.a. auch mit einer bestimmten Erkrankung assoziiert sein können [276]. Somit beschreibt ein Hepityp die mit dem Phänotyp oder einer Erkrankung in Verbindung stehende Interaktion von epigenetischen und genetischen Veränderungen.

Es gibt bereits Studien, die zeigen konnten, dass es eine Assoziation zwischen identifizierten Haplotypen und epigenetischen Veränderungen der DNA-Methylierung in SNP-Positionen gibt [276, 280]. Beispielsweise identifizierten Murrell et al. [276] vier SNP-Positionen (T123C, G358A, T382G und A402G) in der DMR0 von *IGF2*, die in drei Haplotypen (TGTA, CATG und CAGA) vorkommen und mit einer Prädisposition für das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) assoziiert sind. Von diesen drei Haplotypen wurde der CAGA-Haplotyp signifikant häufiger bei BWS-Patienten beobachtet, als in einer vergleichenden Kontrollgruppe und war darüber hinaus signifikant bei BWS-Patienten assoziiert, die in der KvDMR einen Verlust der DNA-Methylierung zeigten. Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass das G Allel in der SNP-Position T382G vom CAGA Haplotyp mit dem Verlust der DNA Methylierung in der KvDMR assoziiert ist und für ein BWS prädispositioniert [276]. Eine andere Studie von Martin-Guerrero

et al. [280] identifizierte, dass der Haplotyp „TCGTTCTTATCGT“ in dem *ATM*-Gen mit einer Prädisposition für eine CLL assoziiert ist. Weiterhin detektierten dieselbe Gruppe, dass zwei Polymorphismen in CpG-Positionen die Ursache für eine Hypomethylierung in dem Gen-Körper von *ATM* sind. Diese Veränderungen könnten den Mechanismus erklären, über den Polymorphismen in dem benannten Haplotyp eine Prädisposition für eine CLL übertragen [280].

Auch für das FL konnten genomweite Assoziationsstudien bereits SNP in dem humanen Leukozyten Antigen-Lokus (HLA) auf Chromosom 6p21.32-33 identifizieren, die statistisch signifikant mit einem Risiko für ein FL assoziiert sind [281-283]. Beispielsweise ist der Haplotyp DBR1*15-DQA1*01-DQB1*06 signifikant mit einem FL Risiko-Lokus, rs2647012 assoziiert [281]. Wrench et al. konnten in ihrer Studie bestätigen, dass die Einzelbasenpolymorphismen rs10484561 und rs6457327 mit einem erhöhten Risiko für eine Transformation des FLs assoziiert sind [283]. Eine Untersuchung von Hepitypen hat es bisher für das FL noch nicht gegeben. Da Veränderungen der DNA-Methylierung im Verlauf der Tumorevolution von FL eine wesentliche Rolle spielen, wie unter anderem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, könnte die Aufklärung von Hepitypen in FL einen weiteren Einblick die Rolle von HLA Allelen und Methylierung von SNP-Positionen in der FL-Pathogenese geben.

4.2.2 In-situ-Follikuläre Lymphome und Follikuläre Lymphome mit partieller Lymphknoteninfiltration entstammen einer ähnlichen Entwicklungsstufe der t(14;18) positiven Tumorentwicklung

In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass das DNA-Methylierungsprofil bei *EYA4*, *TWIST1*, *DAPK1*, *ETV1*, *TUSC3*, *GRB10* und *GAS7* bei denen Lymphomvorstufen gehaltenen t(14;18) positiven FLIS und PFL ($n_{\text{gesamt}}=6$ Proben) ähnlich ist. Weiterhin konnte ich zeigen, dass bei 2/5 Patienten ($n_{\text{gesamt}}=10$ Proben), bei denen sowohl ein FLIS als auch ein ausgereiftes Lymphom vorlag, signifikante Unterschiede in dem DNA-Methylierungsprofil in diesen sieben Genen vorkommen. Dabei zeigten die ausgereiften Lymphome jeweils einen Zugewinn an DNA-Methylierung im Vergleich zu den FLIS in den ausgewählten Genorten.

Bis dato sind noch keine Methylierungsstudien zu lymphatischen Vorläuferläsionen wie FLIS oder PFL bekannt. Für andere lymphatische Erkrankungen wie der CLL und den MCL sind ebenfalls Vorläuferläsionen beschrieben. Hierzu gehört die monoklonale B-Zell-Lymphozytose (MBL) als Vorläuferläsion der CLL [284] und die in-situ-MCL als Vorläuferläsion bei MCL [153]. Aber auch für diese Läsionen sind keine DNA-Methylierungsanalysen bekannt. Für solide Tumoren konnten wir bereits in eigenen Arbeiten zeigen, dass sich das DNA-Methylierungsprofil von Tumorstufen signifikant von dem DNA-Methylierungsprofil eines zugehörigen ausgereiften Lymphoms unterscheidet [285]. In der

Diskussion

Studie an soliden Tumoren wurde das DNA-Methylierungsprofil von Leberzellkarzinomen, Leberzirrhosen und normalem Lebergewebe mittels HumanMethylation 27K Array untersucht. In den meisten Fällen entwickelt sich ein Leberzellkarzinom aus einer Leberzirrhose, wobei die Leberzirrhose als Tumorstufe erachtet wird. Mittels einer paarweisen supervidierten PCA zwischen normalem Lebergewebe, Leberzirrhose und Leberzellkarzinom konnten wir eindrucksvoll zeigen, dass acht Loci signifikant unterschiedliche DNA-Methylierungswerte zwischen diesen drei Gruppen aufzeigen ($p < 0,0001$). Von diesen acht Loci, wiesen fünf Loci die höchsten DNA-Methylierungswerte in den Leberzellkarzinomen, mittlere DNA-Methylierungswerte bei den Leberzirrhosen und die niedrigsten DNA-Methylierungswerte in dem Normalgewebe (*LOC55908*, *CELSR1*, *CRMP1*, *GNRH2*, *ALOX12* und *ANGPTL7*) auf, wohingegen zwei Loci die gegenteilige Richtung zeigten (*SPRR3* und *TNFSF15*) [285]. Somit zeigt diese Studie, dass Tumoren derselben Entwicklungsstufe ein ähnliches DNA-Methylierungsprofil besitzen, welches sich signifikant von dem DNA-Methylierungsprofil einer anderen Entwicklungsstufe unterscheiden kann. Überträgt man diese Erkenntnisse auf die in dieser Studie detektierten Ergebnisse, dann bestätigt es die Tatsache, dass Vorläuferläsionen durchaus ein verändertes DNA-Methylierungsprofil zu ausgereiften Tumoren besitzen können, welches mit der Progression der Tumorentwicklung assoziiert werden kann.

Die detektierte Hypermethylierung der sieben Gene bei den ausgereiften Lymphomen steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studien, die ebenfalls zeigen konnten, dass Keimzenters-B-Zell-Lymphome im Vergleich zu normalen Kontrollen eine Hypermethylierung in diesen Genen aufzeigen [10, 197, 203, 286]. Beispielsweise konnte eine Golden Gate Methylierungsarray-Analyse von O’Riain et al. [203] zeigen, dass die Gene *EYA4*, *TWIST1*, *DAPK1*, *ETV1*, *TUSC3*, *GRB10* und *GAS7* zu den 133 identifizierten Genen gehören, die in FL im Vergleich zu Nicht-Tumor-Kontrollproben aus Lymphknoten signifikant hypermethyliert ($\Delta\beta > 0,34$) sind (Supplementary Table S4, [203]). Von diesen sind *DAPK1*, *GAS7*, *TUSC3* und *GRB10* wiederum mit einer reduzierten Genexpression assoziiert (Supplementary Table S8, [203]). Auch andere Studien identifizierten eine Hypermethylierung des Tumorsuppressorgens *DAPK1* bei FL [187, 204], und bestätigten eine reduzierte Transkription und Genexpression [205]. In FL unterstützt eine *DAPK1* Promotor-Methylierung möglicherweise die anti-apoptotische Funktion von BCL2 und führt zur Deregelation des intrinsischen Apoptose-Pathways [10]. Killian et al. [286] identifizierten ebenfalls mittels Golden Gate, dass die Gene *ETV1*, *EYA4* und *GRB10* bei FL im Vergleich zu einer reaktiven Follikulären Hyperplasie hypermethyliert sind ($\Delta\beta > 0,15$; Supplementary Table 1 [286]). Reaktive Follikuläre Hyperplasien unterscheiden sich nicht nur morphologisch und histologisch von einem ausgereiften FL, sondern sind zudem auch BCL2 negativ (Details siehe [287]). In der Literatur ist derzeit noch kein Fall bekannt, dass sich aus einer reaktiven Follikulären Hyperplasie im Lymphknoten ein klassisches FL entwickelt hat, so dass eine Follikuläre Hyperplasie auch als eine

„Normalkontrolle reaktiver Lymphknoten“ erachtet wird und einen gewebsspezifischen Vergleich zum Tumorgewebe erlaubt.

Warum nur bei 2/5 der ausgereiften Lymphome im Vergleich zu den FLIS eine Hypermethylierung in den sieben Genen beobachtet wurde, ist spekulativ. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass ein zu hoher Anteil normaler Bystander-Zellen das tumorspezifische Methylierungsprofil überdecken [10]. Zwar wurde der Tumorzellgehalt in diesen Proben nicht bestimmt, aber da es sich hier aber um mikrodissizierte Biopsate handelt, würde man eigentlich von einem hohen Tumorzellgehalt (>80 %) ausgehen. Eine weitere Ursache könnte sein, dass hypermethylierte Gene bei FL nicht die Ursache für die Tumorentwicklung, sondern vielmehr eine Folge des Tumorprogresses sind und nur zufällig bestimmte Gene betrifft [203]. Weiterhin sollte bedacht werden, dass die mittels Arraybasierter Analysen identifizierten Gene aus den anderen Studien nicht dieselben CpG-Positionen abdecken, wie sie in dieser Studie analysiert wurden. Somit könnte das ebenfalls ein Grund dafür sein, dass bei 3/5 Patienten zwischen den analysierten Proben kein signifikanter Unterschied in den detektierten DNA-Metylierungswerten bestimmt wurde.

4.2.3 Mutationen in Tyr-641 von *EZH2*

In einer Studie von Morin et al. aus dem Jahre 2010 wurden rekurrente Mutationen mittels Next-Generation-Sequencing bei Keimzentrums-B-Lymphomen im Exon 15 des *EZH2*-Gens detektiert. Insbesondere identifizierten sie einen Aminosäureaustausch von Tyrosin in der SET-Domäne des *EZH2* Proteins [240]. Diese Missense-Mutation wurde bei 7-12 % der FL beobachtet und führt zu einer reduzierten H3K27me3 Aktivität in über 20 % der Keimzentrums-B-Zell-Lymphome [159, 189, 241]. Diese Erkenntnisse ließen vermuten, dass eine Mutation in Tyr-641 zusammen mit der t(14;18) ein frühes und möglicherweise sogar ursächliches Ereignis der Tumorentwicklung bei FL darstellen könnte. Aus dem Grund wurde der Mutationsstatus von Tyr-641 in *EZH2* in dem Probenkollektiv aus FLIS, PFL und den klonal verwandten Tumorzellen des FLIS und deren ausgereiften Lymphomen zu untersucht. Mittels Sanger-Sequenzierung wurde eine Mutation in Tyr-641 von *EZH2* sowohl bei PFL und FLIS (2/7), als auch in dem ausgereiften Lymphom von klonal verwandten FLIS und ausgereiften Lymphom (3/10) detektiert (Abschnitt 3.2.2). Darüber hinaus wurde der *EZH2*-Mutationsstatus mittels NGS in dem Probenkollektiv bestehend aus Verlaufsproben von FL untersucht und bei 10/82 Proben mind. eine Mutation in Tyr-641 detektiert (Abschnitt 3.3.3).

Unter der Berücksichtigung des gesamten analysierten Probenkollektiv aus Abschnitt 3.3.2 liegt die Häufigkeit einer Mutation in Tyr-641 in FLIS (n=9) und PFL (n=3) bei 16 % (2/12) und in den ausgereiften Lymphomen bei 60 % (3/5). Betrachtet man allerdings die FLIS und PFL unabhängig von den klonal

verwandten Tumorzellen des FLIS und ausgereiften Lymphoms, liegt die Häufigkeit bei 28 % (2/7) in FLIS und PFL und 30 % (3/10) in den gepaarten Proben. Im Vergleich dazu wurde in dem Probenkollektiv der Verlaufspalten aus Abschnitt 3.3.3 eine Mutationsrate von 12 % detektiert. Letzteres steht im Einklang mit den vorherigen Analysen [159, 189, 241]. Die Stichhaltigkeit der erhöhten Mutationsraten in dem Probenkollektiv aus Abschnitt 3.3.2 ist aufgrund der geringen Anzahl analysierter Proben ($n_{\text{gesamt}} = 17$) nicht gesichert und sollte deshalb an einem größeren Probenkollektiv überprüft werden. Dennoch kann festgehalten werden, dass Mutationen in Tyr-641 von *EZH2* bereits in frühen Stadien der Lymphomentwicklung vorkommen. Ob diese Mutationen gar ursächlich für die Lymphomentwicklung sind, müssten weitere Analysen erst zeigen. Beispielsweise untersuchte die Gruppe Bödör et al. bei 221 FL-Patienten die Verbindung zwischen dem *EZH2*-Mutationsstatus und der Überlebenswahrscheinlichkeit, sowie der Wahrscheinlichkeit einer Transformation, der *EZH2*-Protein-Expression und dem Methylierungsstatus in H3K27me3. In keinem der analysierten Aspekte konnte eine Assoziation detektiert werden, so dass sich schlussfolgern lässt, dass der Umfang der Mitwirkung einer Tyr-641 Mutation von *EZH2* an der Tumorentwicklung noch weitgehend unverstanden ist. Jüngste Studien identifizierten weitere Gene (*MLL2*, *EP300*, *CREBBP*), die mit Mutationen in Histonmodifizierenden Genen assoziiert sind. Möglicherweise stehen diese Gene ebenfalls in einem engen Zusammenhang mit der Lymphomentstehung bei FL und sind möglicherweise sogar ursächlich für die Tumorentwicklung bei FL. Auf diese Gene wird in Abschnitt 4.2.5 näher eingegangen, da sie mittels NGS an dem Probenkollektiv der Verlaufspalten von FL untersucht wurden.

4.2.4 Bei Follikulären Lymphomen wurden auf der Grundlage des VDJ-Rearrangements bei Verlaufspalten drei Evolutionstypen identifiziert

Auf der Grundlage des klonalen VDJ-Rearrangements bei Verlaufspalten wurden bei t(14;18) positiven FL drei Evolutionstypen (Typ 1: „parallele“ Evolution, Typ 2: „sequenzielle“ Evolution, Typ 3: „keine Evolution“ (Abbildung 22)) identifiziert, die sich sowohl epigenetisch, hinsichtlich der Veränderungen der DNA-Methylierung, als auch genetisch, hinsichtlich der erworbenen somatischen Mutationen, signifikant voneinander unterscheiden. Dabei ist die klonale Evolution ein charakteristisches Kennzeichen der Tumorentwicklung und der Entstehung von Rezidiven. Auch für andere B-Zell-Erkrankungen wie z.B. der CLL sind verschiedene Evolutionstypen beschrieben [288]. Die Gruppe von Landau et al. untersuchte die inter- und intraklonalen Veränderungen im Verlauf der Tumorevolution bei der CLL und analysierte darüber hinaus den Einfluss einer klinischen Behandlung auf die klonale Evolution bei CLL, indem sie die Evolutionsprofile von zwei Entnahmezeitpunkten miteinander verglichen. Insgesamt identifizierten sie bei 18 Patienten zwei Evolutionstypen: keine Evolution und Evolution. Während in dem ersten Profil die Anzahl der Subklone relativ gleichbleibend war, konnte bei

Diskussion

dem zweiten Evolutionsprofil beobachtet werden, dass einige Subklone dominierten. Dabei erhielten 10/12 eine Behandlung mit Chemotherapie und wurden dem Typ mit einer Evolution zugeordnet. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass bei Patienten, die keine klinische Behandlung erhalten haben, mehr Zeit aufgebracht werden muß, damit ein neuer dominierender Klon entsteht, während bei einer therapeutischen Behandlung die Subklone eliminiert werden und so ein neues Mutationsprofil entsteht, was zu dem Typ „mit Evolution“ führt. Letzteres ist wiederum mit der Entwicklung von aggressiveren Subklonen assoziiert und möglicherweise eine Erklärung dafür, dass die Behandlung von Rezidiven weniger erfolgreich ist [288].

Es gibt Gemeinsamkeiten zwischen FL und CLL, wie z.B. B-Zellerkrankung (FL=Keimzentrums-B-Zell-Lymphom, CLL=Post-Keimzentrums-B-Zell-Lymphom), langsamer Entwicklungsverlauf, Entstehung von Rezidiven), so dass diese Erkenntnisse der Tumorentwicklung bei CLL mit der Tumorentwicklung der FL vergleichbar sind. Das ein Rezidiv schlechter auf eine klinische Behandlung als ein Primärtumor anspricht, ist sowohl bei den FL als auch bei CLL charakteristisch. Möglicherweise ist die Ansammlung von weiteren Mutationen, die letztlich zu der Diversität des Tumors führen, auf das schlechtere Ansprechen auf eine Therapie zurückzuführen [289]. Vielleicht könnte eine Identifikation von Driver-Mutationen die Auswahl der Therapie mitbestimmen und letztlich verhindern, dass dominierende Subklone zu einer aggressiveren Tumorentwicklung führen [288, 289].

Weiter wurde in dieser Arbeit identifiziert, dass der Umfang der genetischen und epigenetischen Unterschiede nicht mit der Zeitspanne zwischen Initial- und Rezidivtumor korreliert und zudem nicht auf der genomweiten Gesamt-DNA-Methylierungsebene vorkommt. Außerdem waren im Verlauf der Tumorentwicklung die Veränderungen der DNA-Methylierung und der somatischen Mutationen unter den Verlaufspuren eines Patienten ähnlicher, als jene Veränderungen anderer Patienten. Dass die Heterogenität der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit der Lymphomentstehung steht, konnte eine erst kürzlich veröffentlichte Publikation von De et al. zeigen [290]. Die Gruppe detektierte, dass bei FL und DLBCL unter den Patienten (inter-individuell) eine auffällige Diversität in dem Profil der Cytosin-Methylierung vorhanden ist. Desweiteren identifizierten sie, dass die epigenetische Vielfalt, ausgehend von normalen B-Zellen, mit der Aggressivität der Lymphomerkrankung korreliert und mit einem geringeren klinischen Überleben assoziiert ist [290]. Die Erkenntnisse der inter-individuellen Heterogenität von De et al. stehen im Einklang mit denen in dieser Arbeit detektierten Resultate. Ich konnte mittels einer unsupervidierten Clusteranalyse des 27K Datensatzes von t(14;18) positiven Verlaufspuren zeigen, dass das DNA-Methylierungsprofil unter den Verlaufspuren eines Patienten, und somit innerhalb einer Tumorentwicklung (intra-tumoral), ähnlicher ist, als das DNA-Methylierungsprofil zwischen den Patienten (inter-individuell). Desweiteren konnte ich zeigen, dass die größte Heterogenität der DNA-Methylierung, gemessen an der Anzahl der diskrepanten CpG-

Dinukleotide, bei den Patienten vorkam, denen anhand der Rekonstruktion des V_H-Rearrangements ein paralleler Evolutionstyp zugeordnet wurde. Diese Ergebnisse geben zwar, wie es bei De et al. beschrieben wurde, keinen Hinweis auf die Aggressivität der Lymphomerkrankung, lassen aber dennoch annehmen, die epigenetische Heterogenität mit einem Funktionsverlust von spezifischen Regulatoren zusammenhängt, die normalerweise das DNA-Methylierungsprofil aufrecht erhalten [290].

4.2.5 Somatische Mutationen bei t(14;18) positiven FL in „Driver-Mutations-Kandidatengen“

Zahlreiche vorangegangene Studien, in jüngster Zeit insbesondere NGS-Analysen, konnten rekurrente Mutationen in zahlreichen Genen identifizieren, die im Zusammenhang mit der Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL stehen [232, 233, 291]. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit detektierten Häufigkeiten der Mutationen bei Kandidatengen mit denen in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten verglichen. Eine ausführliche Auseinandersetzung mit der Literatur erfolgt jeweils nur beispielhaft für einige Gene.

In den kodierenden Regionen von denen in dieser Arbeit untersuchten Gene *BCL6* (4 % versus 6-14 % [292, 293]), *MYC* (0 % versus 1 % [235]), *TP53* (3 % versus < 5 % [294, 295]), *TNFRSF14* (27% versus 18-46 % [291, 296]), *MLL2* (96 % versus 89 % [232]), *MEF2B* (5 % versus 15 % [232]), *EP300* (15 % versus 9 % [232]), *EZH2* (12% versus 7-12% [239, 240]) wurden gute Übereinstimmungen mit den detektierten Häufigkeiten somatischer Mutationen der Literatur detektiert (siehe Tabelle 30). Dagegen wurde bei *BCL2* (5% versus 85 % [36]) und *CREBBP* (72 % versus 33 % [232, 233]) abweichende Häufigkeiten detektiert. Weiterhin wurden keine somatische Mutationen in den Exonen von *CDKN2A* (0 %) und L265P von *MYD88* (0 %) beobachtet. Letzteres steht insofern im Einklang mit der Literatur, dass die Mutation L265P in dem *MYD88*-Gen bisher noch nicht als rekurrente Mutation bei FL beschrieben wurde. Die Gruppe von Morin et al. detektierte diese bei 29 % der DLBCLs, bei denen sie zum Austausch von Leucin zu Prolin an der Position 265 in der kodierenden Region der TIR-Domäne führt und darüber hinaus bei aktivierten B-Zell-Lymphomen (ABC-DLBCLs) mit einem besseren Überleben assoziiert ist [232, 237, 238]. Die Ursache dafür, dass keine Mutation L265P in *MYD88* in diesem analysierten Probenkollektiv nachgewiesen wurde kann sowohl Analyse-technisch bedingt, als auch biologisch bedingt sein. Wenn beispielweise die Mutation in weniger als 10 % aller hochqualitativen Basen ein übereinstimmendes alternatives Allel aufzeigte, erfüllte sie nicht die Filterkriterien für eine detektierbare Mutation (siehe Abschnitt 2.2.5.5) und wurde nicht erfasst. Wenn in mindestens einer Verlaufsprobe die Mutation detektiert worden wäre, wären alle Verlaufsproben des Patienten analysiert worden und man hätte die falsch negativen Proben erfasst. Da aber in keiner der 82 Proben anhand dieser Filterkriterien mittels NGS detektiert wurden, wurde auch keine der Proben auf diese

Diskussion

Mutation mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Der biologische Aspekt könnte sein, dass bei FL eine Mutation in *MYD88* nicht an Position L265P \pm 75 bp vorkommt, sondern an einer anderen Position in dem Gen.

Mutationen in *CDKN2A* sind mit der Tumorentwicklung bei Glioblastomen assoziiert [289]. Die Gruppe von Sottoriva et al. untersuchte die intratumorale Diversität in humanen Glioblastomen, eine der häufigsten und aggressiven Gehirntumoren. Eine Rekonstruktion der phylogenetischen Mutationsprofile bei elf Patienten mit einem Glioblastom identifizierte, dass Modifikationen in *CDKN2* als frühe Ereignisse des Tumorprogresses in diesen Tumoren vorkommen [289].

Tabelle 30: Vergleich detektierter Mutationshäufigkeiten in Kandidatengenomen mit der Literatur

Gen-Name	Effekt	analysierter Bereich	detektierte Häufigkeit in dieser Studie *	detektierte Häufigkeit in anderen Studien	Referenz
<i>BCL2</i>	BCL2-Überexpression durch IGH/BCL2 Translokation	alle Exons	5 %	85 %	[36]
<i>BCL6</i>	BCL6-Überexpression durch BCL6 Translokation	alle Exons	4 %	6-14 %	[292, 293]
<i>MYC</i>	MYC-Überexpression durch MYC Translokation	Exon 2	1 %	0 %	[235]
<i>TP53</i>	Tumorsuppressor Verlust	alle Exons	3 %	< 5 %	[294, 295]
<i>TNFRSF14</i>	unbekannt	alle Exons	27 %	18-46 %	[291, 296]
<i>CDKN2A</i>	unbekannt	alle Exons	0 %	bei Glioblastomen rekurrent	[289]
<i>C10ORF12</i>	unbekannt	alle Exons	13 %	34 %	[234]
<i>MEF2B</i>	Histone Modifikation	alle Exons	5 %	15 %	[232]
<i>MLL2</i>	Histone Modifikation	alle Exons	96 %	89 %	[232]
<i>EP300</i>	Histone Modifikation	alle Exons	15 %	9 %	[232, 233]
<i>CREBBP</i>	Histone Modifikation	alle Exons	72 %	33 %	[232, 233]
<i>EZH2</i>	Onkogene H3K27me3	Mutation	12 %	7 %-12 %	[239, 240]
<i>MYD88</i>	unbekannt	Mutation	0 %	29 % bei DLBCL	[232]

* Gesamtanzahl der analysierten t(14;18) positiven FL-Proben betrug 82.

Die Gruppe von Morin et al. identifizierte, dass die an der Histon-Modifikationen beteiligten Gene *MLL2*, *CREBBP*, *MEF2B* und *EP300* bei B-Zell-Lymphomen häufig somatische Mutationen zeigen. Insbesondere konnte die Gruppe bei 89 % der FL und 32 % der DLBCLs Mutationen im *MLL2*-Gen identifizieren. In dem von mir untersuchten Probenkollektiv konnte ich eine Mutation in *MLL2* bei 96 % der analysierten Proben identifizieren. Möglicherweise stehen die detektierten STOP-Mutationen im Gen *MLL2* in einem engen Zusammenhang mit der Translokation t(14;18) und stellen eine weitere relevante Voraussetzung der Tumorprogression bei FL dar [232], oder aber diese Mutationen sind eher sekundäre Mutationen, sog. Passenger-Mutationen [297]. Um dem nachzugehen, könnte beispielsweise eine Untersuchung der Häufigkeiten somatischer Mutationen von *MLL2* in den Vorläuferläsionen FLIS und PFL einen weiteren entscheidenden Hinweis liefern.

Diskussion

Die Gruppe von Pasqualucci et al. identifizierte, dass Deletionen und/oder somatische Mutationen auch bei den Histon-Acetyltransferasen *CREBBP* und *EP300* in etwa 41 % der FL vorkommen. In dieser Studie konnte ich eine Mutation in *EP300* bei 12 % der Fälle und eine Mutation in *CREBBP* bei 72 % der Fälle identifizieren, wobei letzteres keine Übereinstimmung mit den Literaturwerten ist. Allerdings ordneten Green et al. 6/6 detektierter Mutationen in *CREBBP* der HAT-Domäne von *CREBBP* zu [297], im Vergleich konnte ich 74 % (35/51) detektierter Mutationen derselben Region zuordnen, was wiederum im Einklang mit der Literatur steht. Dabei sind Mutationen in *CREBBP* mit einer veränderten Expression von *BCL6* Zielgenen assoziiert [297] und stehen möglicherweise im Zusammenhang mit einem Verlust der HAT-Aktivität [232]. Außerdem ist eine verringerte Acetylierung von *BCL6* durch *CREBBP* mit einer verstärkten Aktivität des *BCL6* Onkogens assoziiert [233] und könnte möglicherweise auch mit der Tumorentstehung der FL in Verbindung stehen.

In dieser Arbeit wurde eine Mutationshäufigkeit von nur 5 % in den kodierenden Regionen bei *BCL2* identifiziert. Dieses steht im Widerspruch zu den in der Literatur beschriebenen Häufigkeiten [232, 255], (Tsujiimoto et al. detektierten 84 % [36]) und kann dadurch begründet werden, dass sich die detektierten 5 % nur auf das dritte Exon von *BCL2* beziehen. Das erste und zweite Exon wurden im Zusammenhang einer aberranten SHM Hypermutation analysiert und hier nicht separat betrachtet. Mutationen in *BCL2* könnten bereits ein Indikator für eine positive Selektion einer funktionellen Mutation sein [232], oder andererseits gar nicht für die Tumorentstehung der FL verantwortlich sein [255].

Zusammengefasst konnten die bei in t(14;18) positiven FL gehäuft auftretenden Mutationen in bei Histon modifizierenden Genen wie *MLL2*, *EZH2*, *CREBBP*, *EP300* und *MEF2B* weitgehend bestätigt werden. Die hohe Rekurrenz dieser Mutationen zeigt, dass eine Interaktion von genetischen und epigenetischen Veränderungen maßgeblich an der Evolution dieser Erkrankung beteiligt ist. Das lässt schlussfolgern, dass Mutationen in Genen die an Histonmodifikation und DNA-Methylierung beteiligt sind, einen zusätzlichen genetischen „Hit“ in vielen *BCL2*-rearrangierten Keimzentrums-B-Zellen darstellen. Dieses könnte wiederum einen Einfluss auf die Auswahl der Therapie eines Patienten haben. Die Gruppe von Chase et al. konnte einen synergistischen Effekt für eine kombinierte Behandlung mit DNA demethylierenden Agenzien und Histon Deacetylase Inhibitoren bereits zeigen [189], was zeigt, dass die Auswahl der Therapie durchaus in einem engen Zusammenhang mit dem Zusammenhang mit der DNA-Methylierung steht. Desweiteren konnten De et al. zeigen, dass lymphomspezifische Regulatoren wie *BCL6* und *EZH2* die DNA-Methylierung in einer genspezifischen Weise stören [290], was wiederum ein Ansatzpunkt für eine Therapie sein könnte.

4.2.6 Mutationen in einer 2,5 kb großen Region ab Transkriptionsstart als Folge einer fehlerhaften somatischen Hypermutation

Physiologisch kommt die von der AID erzeugte SHM im Verlauf der normalen B-Zell Entwicklung in den variablen Regionen der IGV Gene vor, um die Affinität der Antikörper zu erhöhen [49]. Eine aberrante SHM kann auch Protoonkogene betreffen und in der Folge zur genomischen Instabilität beitragen. Untersuchungen an AID defizienten Mausmodellen konnten bereits den Zusammenhang zwischen einer aberranten SHM und der Lymphomentstehung zeigen [109]. Eine aberrante SHM ist dadurch gekennzeichnet, dass die von der AID erzeugten Uracile aus der Cytosin-Desaminierung während des Basenexcisions-Pathways oder des Fehlpaarungsreparatur-Pathways fehlerhaft repariert werden und charakteristische Mutationsprofile hinterlassen [235]. Der Unterschied einer aberrante SHM zu einer SMH an IGV Loci ist, dass die Mutationshäufigkeit in IGV Genen etwa 50 bis 100 mal höher ist, als die SHM in den „Nicht-IGV“ [298] und dass diese fehlerhafte SHM insbesondere bei Keimzentrums-B-Zell-Lymphomen wie DLBCL und FL in einer genomischen Region von etwa 2 kb zwischen TSS und Genkörper von Protoonkogenen vorkommt [112]. Die folgende Tabelle 31 zeigt einen Vergleich der in dieser Studie detektierten Mutationshäufigkeiten mit vier anderen Studien.

Tabelle 31: Vergleich detektierter Mutationshäufigkeiten in Kandidatengenens dieser Studie mit denen aus der Literatur

Gen-Name	detektierte Häufigkeit in dieser Studie	Pasqualucci et al., 2001 [235] (Supplementary Table 5)	Halldorsdottir et al., 2008 [299] (Table 2)	Schuetz et al., 2012 [30] (Table 2)	Khodabakshi et al., 2012 [300] (Table 1)
analysierte Proben	82 t(14;18) positive Lymphomproben	37 FL ¹ / 28 DLBCL ² / 30 endemische BL mit t(8;14) ³	32 low grade FL ¹ / 26 transformierte FL ²	26 FL ¹ , 89 DLBCL ² ,	40 DLBCL
<i>BCL2</i>	95 %	n.a.	n.a.	84 % ¹ , 37 % ²	28 %
<i>BCL6</i>	57 %	37 % ¹ ; 71 % ² ; 37 % ³	48 % ¹ , 50 % ²	9 % ²	67 %
<i>MYC</i>	13 %	0 % ¹ , 32 % ² , 100 % ³	19 % ¹ , 12 % ²	1 % ²	8 %
<i>RHOH</i>	84 %	16 % ¹ , 46 % ² , 15 % ³	16 % ¹ , 31 % ²	0 % ²	42 %
<i>PAX5</i>	11 %	9 % ¹ , 57 % ² , 10 % ³	34 % ¹ , 23 % ²	6 % ²	18 %
<i>PIM1</i>	7 %	0 % ¹ , 43 % ² , 0 % ³	16 % ¹ , 35 % ²	28 % ²	18 %
<i>IRF4</i>	12 %	n.a.	n.a.	n.a.	10 %
<i>C2TA</i>	37 %	n.a.	n.a.	n.a.	23 %
<i>REL</i>	6 %	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Eine aberrante SHM insbesondere der vier Gene *PIM1*, *PAX5*, *RHOH* und *MYC* wurde bei DLBCL [30, 235, 299, 300] aber bei auch bei anderen lymphatischen Erkrankung bereits intensiv untersucht [301, 302]. Insgesamt wurden in dieser Arbeit, bis auf bei *RHOH*, ähnliche Mutationsraten wie in der Literatur beschrieben detektiert (siehe Tabelle 31). Beispielsweise unterschieden sich die in dieser Arbeit detektierten Mutationsraten bei *BCL6* (57 %), *MYC* (13 %), *PAX5* (11 %) und *PIM1* (7 %) in den t(14;18) positiven FL um 7-20 % von den detektierten Häufigkeiten bei Pasqualucci et al. [235] (*BCL6* (37 %), *MYC* (0 %), *PAX5* (9 %) und *PIM1* (0 %)) und Halldorsdottir et al. [299] (*BCL6* (48-50 %), *MYC* (12-19 %),

Diskussion

PAX5 (23-34 %) und *PIM1* (16-35 %)) die ebenfalls die Mutationsraten in diesen Genen bei FL untersuchten. Auch bei *BCL2* lag die detektierte Mutationsrate dieser Arbeit mit 95 % nur um 11 % unter dem detektierten Wert von Schütz et al (84 %). Interessanterweise wurde in dieser Arbeit die höchste Mutationsrate bei *RHOH* detektiert (84 %), wohingegen Pasqualucci et al. 16 % und Halldorsdottir et al. 16-31 % identifizierten. Auch bei DLBCL oder BL wurde keine so hohe Mutationsrate in *RHOH* detektiert (DLBCL: 46 %, 0 %, 42 %, BL: 15 %). Vermutlich können die Unterschiede zwischen den detektierten Mutationsraten in dieser Arbeit und den Literaturwerten darauf zurückgeführt werden, dass sich die detektierten Häufigkeiten in dieser Arbeit auf alle erfassten Mutationen in den analysierten Proben beziehen, während Halldorsdottir et al. sich auf die Mutationen beziehen, die mit den Kennzeichen einer aberranten SHM übereinstimmen. Zu diesen Kennzeichen gehören u.a., dass die Mutationen Cytosine in den Hot-Spot Sequenzen, WRCY oder RGYW, betreffen und dass die Mutationshäufigkeit exponentiell mit einer zunehmenden Entfernung vom TSS abnimmt. Vergleichsweise konnte die Gruppe von Khodabakhshi et al. zeigen, dass es durchaus Gene mit einer hohen Mutationsrate gibt, die aber nicht die Kennzeichen einer aberranten SHM aufweisen [300]. Darüber hinaus sollte bedacht werden, dass in dieser Studie mit 82 t(14;18) positiven FL-Proben eine doppelt so große Anzahl an Proben analysiert wurde als in den anderen Studien (37 FL-Proben, 32 low-grade FL, 26 transformierte FL). Weiterhin ist in den anderen Studien nicht angegeben, ob die Translokation t(14;18) nachgewiesen wurde. Somit ist nicht auszuschließen, dass t(14;18) negative FL durchaus weniger häufig von der aberranten SHM betroffen sind.

Eine aberrante SHM betrifft nicht immer dieselben Kandidatengene in allen Lymphom-Suptypen, die dem Keimzentrum oder dem Post-Keimzentrum entstammen [300]. Beispielsweise wurde identifiziert, dass von diesen vier analysierten Genen, bei nodulären Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphomen (NLPHL) und klassischen Hodgkin-Lymphomen (cHL) das Gen *PAX5* am Häufigsten von der aberranten SHM (7/9 NLPHL, 2/9 cHL) betroffen ist [301]. Dagegen wurde die höchste Mutationsrate in der 5'kb Region von *MYC* am Häufigsten bei endemischen BL (30/30) detektiert, die zudem eine t(11;14) tragen. Die Mutationen bei BL wurden zudem gehäuft in dem ersten Exon/ersten Intron Bereich von *MYC* detektiert und waren darüber hinaus mit einer veränderten Transkription von *MYC* assoziiert [235]. *MYC* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der in der Zell-Zyklus-Kontrolle, Proliferation und Differenzierung involviert ist. In dieser Arbeit sind die 12 Mutationen ebenfalls in dem Bereich des ersten Exons/ersten Introns (Chr.8: 128,748,989-128,750,692) von *MYC* lokalisiert. Da in keiner der 12 Fälle mit einer Mutation eine Translokation t(11;14) (unveröffentlichte Daten) nachgewiesen werden konnte, lässt sich vermuten, dass die Translokations-unabhängigen Mutationen in t(14;18) positiven FL möglicherweise die Funktion und die Expression von *MYC* verändern können.

Weiter spielt die aberrante SHM bei der Entstehung von Translokationen bei Lymphomen eine Rolle. Bei der SHM werden in der DNA Doppelstrangbrüche erzeugt die ebenfalls mit einer fehlerhaften Kombination chromosomaler Abschnitte assoziiert wird [65]. Beispiele sind *BCL2*, *BCL6* und *MYC*, welche durch die Translokation unter die Regulation der IG gebracht werden und mit einer fehlerhaften Expression assoziiert sind [23]. Eine Korrelation von aberranter SHM und genomischen Rearrangements ist für *BCL2* und *BCL6* bereits beschrieben und intensiv untersucht [292, 303]. Die Gruppe von Khodabakhshi et al. konnte in einer Studie zur genomweiten Identifikation von Zielgenen der aberranten SHM zeigen, dass auch *PIM1*, *MYC* und *C2TA* in Translokationen involviert sind, aber nicht mit einer aberranten SHM zusammenhängen und demzufolge Tumorspezifische Ereignisse repräsentieren[300].

4.3 Fazit

Die Entwicklung eines Follikulären Lymphoms ist ein mehrstufiger Prozess, der durch die Ansammlung chromosomaler Aberrationen und Mutationen in Kandidatengenen, die den betroffenen Zellen einen Proliferationsvorteil verschaffen, gekennzeichnet ist. Ausgehend von einer t(14;18) positiven Ursprungszelle, über Vorläuferstufen, dem initialen FL bis hin zum Rezidiv und der Transformation tragen sowohl genetische als auch epigenetische Veränderungen maßgeblich zur Entwicklung der Erkrankung bei. Ich konnte hierzu zeigen, dass die Folgen der genetischen und epigenetischen Veränderungen im Progress der Tumorevolution an unterschiedlichen Entwicklungsstadien der klonalen Tumorevolution zu unterschiedlichen Evolutionstypen der Pathogenese und Entwicklung bei t(14;18) positiven FL führen. Somit konnte ich einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der komplexen Signalwege der Tumorevolution beitragen und das Verständnis über die Progression der Tumorevolution bei FL verbessern. In jüngster Zeit konnte das allgemeine Verständnis der Tumorevolution bei FL insbesondere durch den Einsatz der NGS-Techniken weiterentwickelt werden, so dass die bereits vorhandenen Modelle zur Pathogenese der FL um die daraus gewonnen Erkenntnisse erweitert wurde. In einer Übersichtsarbeit von Kridel et al., (Oktober 2012) wird ein Konzept der Tumorevolution bei FL vorgestellt, wie es nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft anzunehmen ist [304]. Dieses Modell wird von den in dieser Arbeit gewonnen Resultaten unterstützt und kann darüber hinaus um die Merkmale der klonalen Tumorzellen bei dem parallelen und sequenziellen Evolutionstyp erweitert werden (siehe Abbildung 35).

Ausgehend von einer t(14;18) positiven Ursprungszelle kommen im Verlauf der Tumorevolution weitere genetische und epigenetische Veränderungen hinzu, wobei Mutationen in *MLL2*, *TNFRSF14*, *CREBBP*, *EP300*, *MEF2B* und *EZH2* Mutationen Ereignisse der frühen Entwicklungsphase darstellen [304]. Diese

Diskussion

Erkenntnisse sind eine Erweiterung des von Bende et al. vorgestellten pathogenetischen Modells aus dem Jahre 2007 [9]. Hochregulation von *MYC*, *TP53*-Mutation, *CDKN2A*-Deletion und *BCL6*-Translokation sind spätere Ereignisse [9, 304]. Weiterhin sind von der Entstehung eines Rezidivs aus dem Initialtumor zwei verschiedene Evolutionswege bekannt [161, 162, 167], die ebenfalls in dem untersuchten Probenkollektiv dieser Arbeit beobachtet wurden. Ich konnte mit dieser Arbeit erstmalig zeigen, dass die epigenetischen und die genetischen Unterschiede bei dem parallelen Evolutionstyp signifikant größer sind als bei dem Typ mit sequenzieller Evolution und dem Typ ohne Evolution.

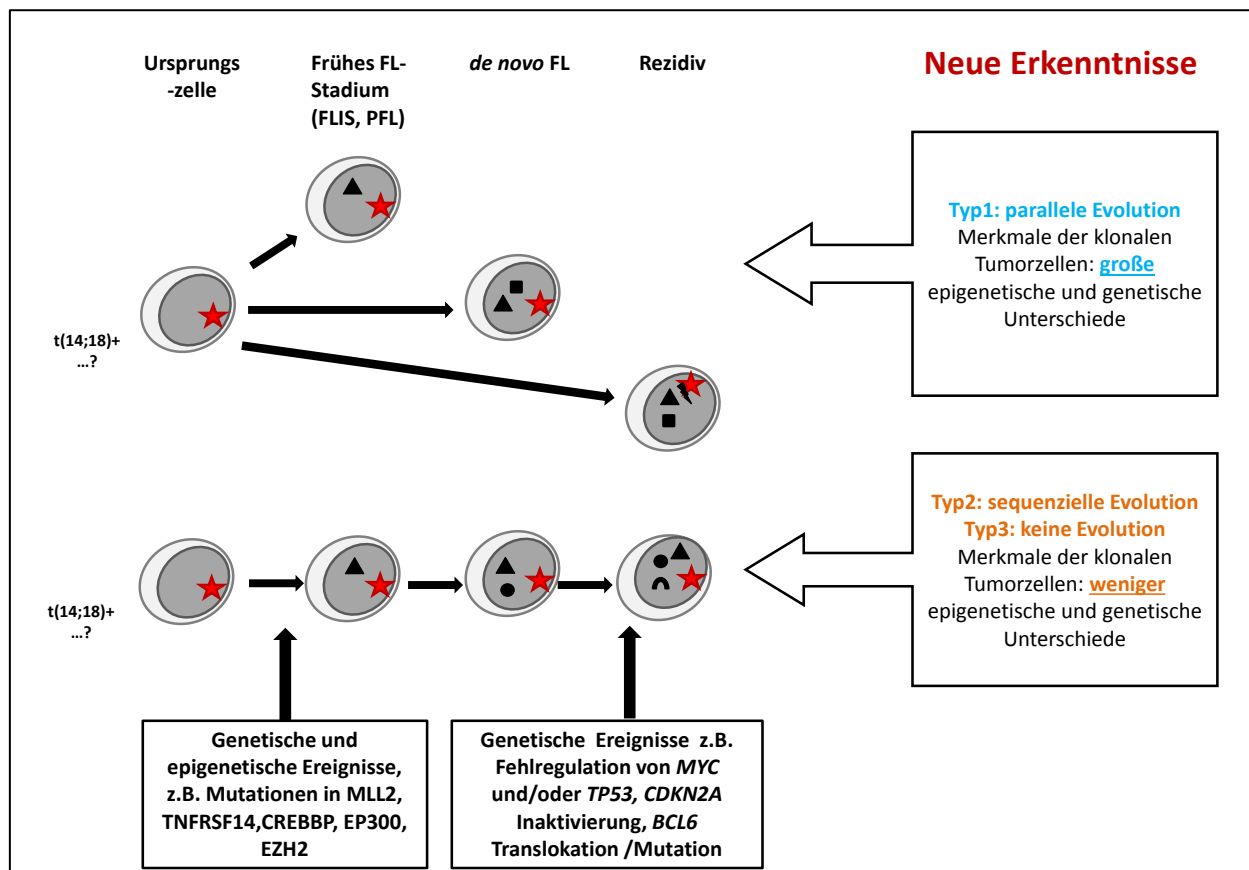


Abbildung 35: Das Modell der Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL. Das Modell der Tumorevolution bei t(14;18) positiven FL nach Kridel et al. wird von den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen unterstützt und kann darüber hinaus um die Merkmale der klonalen Tumorzellen des parallelen und sequenziellen Evolutionstyps ergänzt werden (modifiziert nach Kridel et al. [304]).

Die Kreise mit einem roten Stern repräsentieren eine t(14;18) positive Tumorzelle. Die Ansammlung genetischer und epigenetischer Modifikationen im Verlauf der Evolution wird durch unterschiedliche Symbole innerhalb der Kreise symbolisiert.

Zusammengefasst liefern diese Ergebnisse einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Tumorevolution bei t(14;18) FL, und können für die Etablierung von Modellen zur Entstehung der Lymphome und den Einfluss der Therapie auf ihre Evolution für die Optimierung von Diagnose- und Therapiestrategien nutzbar gemacht werden.

4.4 Ausblick

Insgesamt wurden 15/23 analysierter Patienten einem Evolutionstyp zugeordnet werden. Bei acht Fällen war keine eindeutige Zuordnung anhand des detektierten Mutationsprofils möglich, was bereits darauf hindeutet, dass diese Art der Klassifikation noch ausbaufähig ist. Auch wenn insgesamt eine gute Korrelation zwischen den detektierten epigenetischen und genetischen Unterschieden der Verlaufspalten mit den jeweiligen Evolutionstypen identifiziert wurde, sollte bedacht werden, dass diese Klassifikation ausschließlich auf dem Mutationsprofil des VDJ-Rearrangements beruht, aber die genetischen und epigenetischen Veränderungen nicht zahlenmäßig berücksichtigt. Somit sind, ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit, weiterführende bioinformatische Analysen notwendig um die Tumorevolution der t(14;18) positiven FL zu charakterisieren. Beispielsweise könnten sog. Hamming-Distanzen entsprechende Parameter erfassen und einem Plot graphisch dargestellt werden. Hamming-Distanzen beruhen auf einer Messung von Abweichungen zwischen den beiden Proben eines Patienten. Dieses würde eine genauere und zeitgleiche Beschreibung aller detektierten Veränderungen im Verlauf der Evolution ermöglichen.

Weiterhin wurden die Ergebnisse dieser Arbeit im Rahmen des Forschungsverbundes „Systems Biology of the Haematopoietic Systems and Related Neoplasias (HämatoSys)“ erhoben. Unter diesen Richtlinien sollte, in Anlehnung an das bestehende Modell der hämatopoetischen Stammzelle, ein in silico generiertes einzelzellbasiertes Modell der Keimzentrumsreaktion und der dort entstehenden t(14;18) positiven indolenten FL entwickelt werden. Insgesamt konnten die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der genetischen und epigenetischen Veränderungen einen wesentlichen Beitrag zur Generierung dieser Modelle liefern. Da in dieser Arbeit ein repräsentatives Probenkollektiv aus 94 Proben von 38 Patienten zur Verfügung stand und darüber hinaus Lymphomvorstufen charakterisiert werden konnten, wird dieses in silico Modell besondere Einblicke geben, inwieweit somatische Mutationen entstehen und wie sie die Lymphomentstehung voranbringen. Insgesamt wird so ein besseres Verständnis über die immense Heterogenität individueller Tumore mit unterschiedlichem klinischen Outcome erlangt. Durch dieses Modell werden neue diagnostische Strategien möglich, die zur Optimierung von Behandlungsprotokollen in klinischen Studien führen. Somit ergeben sich wiederum neue Therapieoptionen für z.B. eine individualisierte Behandlung der Patienten mit einem FL.

5 Zusammenfassung

Follikuläre Lymphome (FL) sind die zweithäufigsten B-Zell-Lymphome in der westlichen Welt. Charakteristisch für FL ist die Translokation $t(14;18)(q32;q21)$, von der angenommen wird, dass sie bereits in einer frühen Phase der B-Zell-Entwicklung im Knochenmark entsteht. Diese Translokation findet man nicht nur bei Lymphomen, sie ist auch bei ca. 25 % gesunder Individuen nachweisbar. Die genauen Mechanismen der Tumorevolution bei FL sind noch weitgehend unbekannt. Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung epigenetischer und genetischer Veränderungen, sowie die Bestimmung phylogenetischer Beziehungen zwischen Initial- und Rezidivtumoren in der Evolution $t(14;18)$ positiver FL.

Zunächst sollte ein neuer Ansatz zur Bestimmung von inter- und intraklonalen Veränderungen der DNA-Methylierung im Progress der Tumorevolution bei Tumoren etabliert werden. Mit Hilfe eines Mikro-Droplet-basierten Anreicherungsverfahrens von RainDance Technologies und anschließender 454-Next-Generation-Sequenzierung (NGS) wurde ein neuer methodischer Ansatz zur Identifikation von „Hepitypen“ an Bisulfit-konvertierter DNA etabliert. Die Ergebnisse dieser Pilotstudie sind in Manuskript 1 aufgeführt und zeigen die Charakterisierung phylogenetischer Beziehungen der Tumorklone anhand ihres DNA-Methylierungsmusters im Verlauf der Tumorentwicklung exemplarisch bei einem Patienten mit einem $t(14;18)$ positiven FL.

Um die frühen Entwicklungsstadien einer $t(14;18)$ positiven Lymphomentwicklung zu charakterisieren, sollten chromosomale Aberrationen und Veränderungen der DNA-Methylierung bei denen als Vorläuferläsionen erachteten $t(14;18)$ positiven FL mit partieller Lymphknoteninfiltration (PFL) ($n=4$) und in-situ Follikuläre Lymphome (FLIS) ($n=5$) analysiert werden. Zunächst konnte mittels Array-CGH-Analysen gezeigt werden, dass FLIS und PFL gar keine, bzw. nur wenige, sekundäre genetische Veränderungen besitzen. Bisulfit-Pyrosequenzierungsanalysen detektierten untereinander ein ähnliches DNA-Methylierungsprofil in den Genen *TWIST1*, *DAPK1*, *ETV1*, *TUSC3*, *GRB10* und *GAS7*. Dies lässt schlussfolgern, dass FLIS und PFL einer gemeinsamen Entwicklungsstufe entstammen. Gleiche Analysen an DNA-Proben von fünf Patienten ($n_{\text{gesamt}}=10$ Proben), bei denen sowohl ein FLIS als auch ein vollständig entwickeltes Lymphom diagnostiziert wurde, und bei denen die $t(14;18)$ sowie eine klonale Verwandtschaft unter den Läsionen bestätigt wurde, gaben weitere Einsichten in die Evolution $t(14;18)$ positiver FL. Bei 2/5 untersuchter Patienten wurden in den o.g. Genen signifikante Unterschiede im DNA-Methylierungsprofil detektiert. Darüber hinaus wurden, neben der $t(14;18)$, nur in den ausgereiften Lymphomen, aber nicht in den FLIS weitere chromosomale Veränderungen wie z.B.

Zusammenfassung

Zugewinne in 1q, 7p, 18p und Verluste in 6q, 13q identifiziert. Dies zeigt, dass die Ansammlung von numerischen Chromosomenaberrationen und Veränderungen der DNA-Methylierung in dem ausgereiften FL im Vergleich zu den gleichzeitig vorhandenen FLIS-Zellen eher eine Veränderung des Ursprungsklons sind und FLIS somit ein frühes Stadium der Lymphomentwicklung repräsentieren.

In dem dritten Teil dieser Arbeit wurden genetische und epigenetische Veränderungen der Tumorevolution bei FL an t(14;18) positiven Initial- und Rezidivtumorproben (94 Lymphom-Gewebeproben von 38 Patienten) untersucht. Zunächst konnte mittels Sequenzierung auf der Grundlage des Mutationsprofils des VDJ-Rearrangements die klonale Evolution in diesen Verlaufsproben rekonstruiert werden. Anhand dessen wurden drei Evolutionstypen identifiziert: Typ 1: „parallele“ Evolution, Typ 2: „sequenzielle“ Evolution und Typ 3: „keine Evolution“. Arraybasierte DNA-Methylierungsanalysen (27K und 450K MethylationBead Chip von Illumina) und NGS-Analysen (Mikro-Droplet-Anreicherung und HiSeq-Sequenzierung) zeigten, dass diese Evolutionstypen sich sowohl epigenetisch in den erworbenen Veränderungen der DNA-Methylierung, als auch genetisch, hinsichtlich der erworbenen somatischen Mutationen, signifikant voneinander unterscheiden. Dabei korrelierte der Umfang der Unterschiede nicht mit der Zeitspanne zwischen der Entstehung eines Initial- und Rezidivtumors und wurde auch nicht bei der genomweiten Gesamt-DNA-Methylierung (Luminometrische Methylierungsanalyse, LUMA) beobachtet. Weiterhin waren im Verlauf der Tumorentwicklung, die Veränderungen der DNA-Methylierung und der somatischen Mutationen unter den Verlaufsproben eines Patienten ähnlicher, als jene Veränderungen anderer Patienten. Zur Identifikation potenzieller „Driver-Mutationen“, die mit verschiedenen genomischen und epigenomischen Veränderungen der Evolution assoziiert sind, wurden kodierende Regionen bei Kandidatengenen untersucht. Mutationen in diesem analysierten Probenkollektiv wurden am häufigsten in den Genen *MLL2* (96%), *CREBBP* (72 %), *EP300* (15 %), *TNFRSF14* (27 %) und *EZH2* (12 %) detektiert. Darüber hinaus sind bestimmte Onkogene bei Keimzentrams-B-Zell-Lymphomen mit einer aberranten somatischen Hypermuation in einer 2,5 kb großen Region ab Transkriptionsstartpunkt assoziiert. In dem analysierten Probenkollektiv dieser Arbeit ähnelten die Mutationsraten, mit Ausnahme von *RHOH* (84 %), bei *BCL2* (95 %), *BCL6* (57 %), *MYC* (13 %), *PAX5* (11 %), *PIM1* (7 %), *IRF4* (12 %), *C2TA* (37 %) und *REL* (6 %) denen, die in der Literatur beschrieben sind.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die Folgen der erworbenen genetischen und epigenetischen Veränderungen miteinander interagieren und letztlich zu den unterschiedlichen Evolutionstypen der Pathogenese und Entwicklung der FL führen. Dabei ist die Entstehung des Initial- und Rezidivtumors auf eine gemeinsame Ursprungszelle in der frühen Entwicklungsphase der Tumorevolution zurückzuführen, die einem Zeitpunkt vor der Entstehung der klonalen Vielfalt entspricht und wiederum für jede Tumorentwicklung eines Patienten unterschiedlich und einzigartig ist.

6 Summary

Follicular lymphoma (FL) is the second most common B-cell-lymphoma in the western countries. A characteristic hallmark of FL is the translocation t(14;18), suppose to occur at an early B-cell developmental stage in the bone marrow. This translocation is not unique to lymphoma but is also seen in up to 25 % of healthy individuals. The exact mechanisms leading to tumour progression in FL are still largely unknown. Therefore the aim of this study was to characterise epigenetic and genetic changes and to identify the phylogenetic relationships between initial and relapse tumor samples in the progress of evolution of t(14;18) positive FL.

First of all a new approach should be adapted to determine inter- and intraclonal changes in DNA-methylation in the progress of tumour evolution. With the help of a micro-droplet based PCR from Raindance Technologies in combination with 454 next-generation sequencing (NGS) a new technical procedure was adopted to identify “hepitypes” in bisulfite treated DNA. The results of these pilot-project are shown in manuscript 1 representing the characterisation of phylogentic relationships of tumourclones on the basis of DNA-methylation in the progress of tumour evolution exemplarily for one patient with t(14;18) positive FL.

To characterise the the early developmental stage of a t(14;18) positive lymphoma evolution chromosomal aberrations and epigenetic changes in DNA methylation were analysed in t(14;18) positive samples of partial involvement by FL (PFL) (n=4) and follicular lymphoma in situ (FLIS) (n=5) considered as ealy leasons of lymphoma. At first array CGH analysis detects no, or only a few, genetic secondary aberrations in FLIS and PFL. Bisulfite Pyrosequencing analysis discovered a similar methylation pattern between FLIS and PFL in *TWIST1*, *DAPK1*, *ETV1*, *TUSC3*, *GRB10* and *GAS7* genes. These findings provide evidence that FLIS and PFL originate from the same developmental stage. Identical analysis from t(14;18) positive DNA of five patients of paired samples (n_{total}=10 samples) from clonally related FLIS and full blown lymphoma were analysed to gain more insights in the evolution of t(14;18) positive lymphoma. 2/5 patients analysed showed significant differences in DNA-methylation profile in the genes mentioned above. Further chromosomal alterations for example gain in 1q, 7p, 18p and losses in 6q and 13q in addition to t(14;18) were detected only in full blown lymphoma but not in FLIS. This shows that the accumulation of numeric chromosomal aberrations and changes in DNA-methylation pattern in the full blown FL in comparison to the simultaneously existing FLIS cells present in fact a very early stage of lymphoma development.

Summary

In the third part of this thesis genetic and epigenetic changes of tumour evolution of FL, t(14;18) positive from initial- and relapse tumours (94 lymphoma tissue samples from 38 patients) were analysed. First of all sequencing analysis allowed the reconstruction of mutation profiles of immunoglobulin-heavy chain rearrangement and the identification of three types of evolution (type 1: “parallel” evolution, type 2: “sequential” evolution, type 3: “no evolution”). Array-based DNA-methylation analysis (27K and 450K Methylation BeadChip) and NGS analysis (Mikro-Droplet enrichment and HiSeq sequencing) showed that these types of evolution are significantly different in gained epigenetics and genetics. These epigenetic differences belong to gained changes in DNA-methylation whereas genetic differences belong to gained somatic mutations. Thereby the complexity of changes did not correlate with the time period between initial and relapse sample and was not seen at the genome wide global-DNA-methylation level (luminometric methylation analysis, LUMA). Moreover, during tumour evolution changes in DNA-methylation and somatic mutations within tumour samples from the same patient were more similar to each other than to variations of tumour samples from other patients. In order to identify potential “driver mutations” linked to different genomic and epigenomic evolution patterns the coding parts of candidate genes were analysed. In accordance with the literature somatic mutations in the analysed sample cohort were more frequent in *MLL2* (96%), *CREBBP* (72 %), *EP300* (15 %), *TNFRSF14* (27 %) and *EZH2* (12 %). Moreover, certain oncogene loci in germinal center B-cell-lymphoma are associated with aberrant somatic hypermutation in a region of 2.5 kb from transcription start site. In the analysed panel of this thesis, except for *RHOH* (84 %), the mutation rates in *BCL2* (95 %), *BCL6* (57 %) *MYC* (13 %), *PAX5* (11 %), *PIM1* (7 %), *IRF4* (12 %), *C2TA* (37 %) und *REL* (6 %) were largely similar to mutation rates described in the literature.

In summary, this study showed that the effects of gained genetic and epigenetic changes interact with each other leading to different evolutions types of pathogenesis of FL. Thereby the origin of a initial and relapse tumour seems to trace back to a common cell of origin during early stage of tumour evolution which comes from a time point prior to clonal divergence and is unique to tumour evolution of each patient.

7 Referenzen

1. Swerdlow HC, E.; Harris, N.L.; Jaffe, E.S.; Pileri, S.A.; Stein, H.; Thiele, J.; Vardiman, J.W.: **WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. *International Agency for Research on Cancer* 2008, **4th Edition**.
2. Vitolo U, Ferreri AJ, Montoto S: **Follicular lymphomas**. *Critical reviews in oncology/hematology* 2008, **66**(3):248-261.
3. Huh J: **Epidemiologic overview of malignant lymphoma**. *The Korean journal of hematology* 2012, **47**(2):92-104.
4. Bassig BA, Lan Q, Rothman N, Zhang Y, Zheng T: **Current understanding of lifestyle and environmental factors and risk of non-hodgkin lymphoma: an epidemiological update**. *Journal of cancer epidemiology* 2012, **2012**:978930.
5. Carbone A, Gloghini A, Cabras A, Elia G: **Differentiating germinal center-derived lymphomas through their cellular microenvironment**. *American journal of hematology* 2009, **84**(7):435-438.
6. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Chang ET, Cole P, Mandel JS, Trichopoulos D: **The non-Hodgkin lymphomas: a review of the epidemiologic literature**. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2007, **120 Suppl 12**:1-39.
7. Morton LM, Wang SS, Devesa SS, Hartge P, Weisenburger DD, Linet MS: **Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001**. *Blood* 2006, **107**(1):265-276.
8. Oschlies I, Salaverria I, Mahn F, Meinhardt A, Zimmermann M, Woessmann W, Burkhardt B, Gesk S, Krams M, Reiter A *et al*: **Pediatric follicular lymphoma--a clinico-pathological study of a population-based series of patients treated within the Non-Hodgkin's Lymphoma--Berlin-Frankfurt-Munster (NHL-BFM) multicenter trials**. *Haematologica* 2010, **95**(2):253-259.
9. Bende RJ, Smit LA, van Noesel CJ: **Molecular pathways in follicular lymphoma**. *Leukemia* 2007, **21**(1):18-29.
10. Leich E, Ott G, Rosenwald A: **Pathology, pathogenesis and molecular genetics of follicular NHL**. *Best practice & research Clinical haematology* 2011, **24**(2):95-109.
11. Kroll ME, Murphy F, Pirie K, Reeves GK, Green J, Beral V, Million Women Study C: **Alcohol drinking, tobacco smoking and subtypes of haematological malignancy in the UK Million Women Study**. *British journal of cancer* 2012, **107**(5):879-887.
12. Herrinton LJ, Friedman GD: **Cigarette smoking and risk of non-Hodgkin's lymphoma subtypes**. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 1998, **7**(1):25-28.
13. Talamini R, Polesel J, Montella M, Maso LD, Crispo A, Spina M, Franceschi S, Crovatto M, La Vecchia C: **Smoking and non-Hodgkin lymphoma: case-control study in Italy**. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* 2005, **115**(4):606-610.
14. Ambinder AJ, Shenoy PJ, Malik N, Maggioncalda A, Nastoupil LJ, Flowers CR: **Exploring risk factors for follicular lymphoma**. *Advances in hematology* 2012, **2012**:626035.
15. Cocco P, t'Mannetje A, Fadda D, Melis M, Becker N, de Sanjose S, Foretova L, Mareckova J, Staines A, Kleefeld S *et al*: **Occupational exposure to solvents and risk of lymphoma subtypes:**

Referenzen

- results from the Epilymph case-control study.** *Occupational and environmental medicine* 2010, **67**(5):341-347.
16. Chiu BC, Dave BJ, Blair A, Gapstur SM, Zahm SH, Weisenburger DD: **Agricultural pesticide use and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2006, **108**(4):1363-1369.
 17. Roulland S, Lebailly P, Lecluse Y, Briand M, Pottier D, Gauduchon P: **Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides.** *Cancer research* 2004, **64**(6):2264-2269.
 18. Morton LM, Zheng T, Holford TR, Holly EA, Chiu BC, Costantini AS, Stagnaro E, Willett EV, Dal Maso L, Serraino D *et al*: **Alcohol consumption and risk of non-Hodgkin lymphoma: a pooled analysis.** *The lancet oncology* 2005, **6**(7):469-476.
 19. Chang ET, Clarke CA, Canchola AJ, Lu Y, Wang SS, Ursin G, West DW, Bernstein L, Horn-Ross PL: **Alcohol consumption over time and risk of lymphoid malignancies in the California Teachers Study cohort.** *American journal of epidemiology* 2010, **172**(12):1373-1383.
 20. Skibola CF, Holly EA, Forrest MS, Hubbard A, Bracci PM, Skibola DR, Hegedus C, Smith MT: **Body mass index, leptin and leptin receptor polymorphisms, and non-hodgkin lymphoma.** *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2004, **13**(5):779-786.
 21. Chang ET, Hjalgrim H, Smedby KE, Akerman M, Tani E, Johnsen HE, Glimelius B, Adami HO, Melbye M: **Body mass index and risk of malignant lymphoma in Scandinavian men and women.** *Journal of the National Cancer Institute* 2005, **97**(3):210-218.
 22. Mitelman F, Johansson B, Mertens F: **The impact of translocations and gene fusions on cancer causation.** *Nature reviews Cancer* 2007, **7**(4):233-245.
 23. Kupperts R, Dalla-Favera R: **Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas.** *Oncogene* 2001, **20**(40):5580-5594.
 24. Aamot HV, Torlakovic EE, Eide MB, Holte H, Heim S: **Non-Hodgkin lymphoma with t(14;18): clonal evolution patterns and cytogenetic-pathologic-clinical correlations.** *Journal of cancer research and clinical oncology* 2007, **133**(7):455-470.
 25. Chang CM, Wang SS, Dave BJ, Jain S, Vasef MA, Weisenburger DD, Cozen W, Davis S, Severson RK, Lynch CF *et al*: **Risk factors for non-Hodgkin lymphoma subtypes defined by histology and t(14;18) in a population-based case-control study.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2011, **129**(4):938-947.
 26. Matolcsy A, Casali P, Warnke RA, Knowles DM: **Morphologic transformation of follicular lymphoma is associated with somatic mutation of the translocated Bcl-2 gene.** *Blood* 1996, **88**(10):3937-3944.
 27. Wang XQ, Sino USLCSOS: **[Cytogenetic study on 155 cases of non-Hodgkin' s lymphoma].** *Zhonghua xue ye xue za zhi = Zhonghua xueyexue zazhi* 2006, **27**(10):656-660.
 28. Khokhar MT, Brito-Babapulle V, Matutes E, Catovsky D: **Cytogenetic abnormalities in the leukemic phase of non-Hodgkin lymphoma.** *Cancer genetics and cytogenetics* 1995, **83**(1):18-24.
 29. Biagi JJ, Seymour JF: **Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation.** *Blood* 2002, **99**(12):4265-4275.
 30. Schuetz JM, Johnson NA, Morin RD, Scott DW, Tan K, Ben-Nierah S, Boyle M, Slack GW, Marra MA, Connors JM *et al*: **BCL2 mutations in diffuse large B-cell lymphoma.** *Leukemia* 2012, **26**(6):1383-1390.

Referenzen

31. Jaeger U, Karth GD, Knapp S, Friedl J, Laczika K, Kusec R: **Molecular mechanism of the t(14;18)--a model for lymphoid-specific chromosomal translocations.** *Leukemia & lymphoma* 1994, **14**(3-4):197-202.
32. Nadel B, Marculescu R, Le T, Rudnicki M, Bocskor S, Jager U: **Novel insights into the mechanism of t(14;18)(q32;q21) translocation in follicular lymphoma.** *Leukemia & lymphoma* 2001, **42**(6):1181-1194.
33. Husson H, Carideo EG, Neuberg D, Schultze J, Munoz O, Marks PW, Donovan JW, Chillemi AC, O'Connell P, Freedman AS: **Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays.** *Blood* 2002, **99**(1):282-289.
34. Thomadaki H, Scorilas A: **BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer.** *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 2006, **43**(1):1-67.
35. Cory S, Adams JM: **The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.** *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(9):647-656.
36. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM: **Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation.** *Science* 1984, **226**(4678):1097-1099.
37. Aukema SM, Siebert R, Schuurin E, van Imhoff GW, Kluin-Nelemans HC, Boerma EJ, Kluin PM: **Double-hit B-cell lymphomas.** *Blood* 2011, **117**(8):2319-2331.
38. Galteland E, Sivertsen EA, Svendsrud DH, Smedshammer L, Kresse SH, Meza-Zepeda LA, Myklebost O, Suo Z, Mu D, Deangelis PM *et al*: **Translocation t(14;18) and gain of chromosome 18/BCL2: effects on BCL2 expression and apoptosis in B-cell non-Hodgkin's lymphomas.** *Leukemia* 2005, **19**(12):2313-2323.
39. Kuppers R: **Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis.** *Nature reviews Cancer* 2005, **5**(4):251-262.
40. Tischner D, Woess C, Ottina E, Villunger A: **Bcl-2-regulated cell death signalling in the prevention of autoimmunity.** *Cell death & disease* 2010, **1**:e48.
41. Nambiar M, Raghavan SC: **Prevalence and analysis of t(14;18) and t(11;14) chromosomal translocations in healthy Indian population.** *Annals of hematology* 2010, **89**(1):35-43.
42. Weinberg OK, Ai WZ, Mariappan MR, Shum C, Levy R, Arber DA: **"Minor" BCL2 breakpoints in follicular lymphoma: frequency and correlation with grade and disease presentation in 236 cases.** *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 2007, **9**(4):530-537.
43. Seite P, Hillion J, d'Agay MF, Gaulard P, Cazals D, Badoux F, Berger R, Larsen CJ: **BCL2 gene activation and protein expression in follicular lymphoma: a report on 64 cases.** *Leukemia* 1993, **7**(3):410-417.
44. Poetsch M, Weber-Matthiesen K, Plendl HJ, Grote W, Schlegelberger B: **Detection of the t(14;18) chromosomal translocation by interphase cytogenetics with yeast-artificial-chromosome probes in follicular lymphoma and nonneoplastic lymphoproliferation.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1996, **14**(3):963-969.
45. Takata K, Sato Y, Nakamura N, Kikuti YY, Ichimura K, Tanaka T, Morito T, Tamura M, Oka T, Kondo E *et al*: **Duodenal and nodal follicular lymphomas are distinct: the former lacks activation-induced cytidine deaminase and follicular dendritic cells despite ongoing somatic hypermutations.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2009, **22**(7):940-949.
46. Streubel B, Scheucher B, Valencak J, Huber D, Petzelbauer P, Trautinger F, Weihsengruber F, Mannhalter C, Cerroni L, Chott A: **Molecular cytogenetic evidence of t(14;18)(IGH;BCL2) in a**

Referenzen

- substantial proportion of primary cutaneous follicle center lymphomas. *The American journal of surgical pathology* 2006, **30**(4):529-536.**
47. Bosga-Bouwer AG, van Imhoff GW, Boonstra R, van der Veen A, Haralambieva E, van den Berg A, de Jong B, Krause V, Palmer MC, Coupland R *et al*: **Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive.** *Blood* 2003, **101**(3):1149-1154.
 48. Leich E, Salaverria I, Bea S, Zettl A, Wright G, Moreno V, Gascoyne RD, Chan WC, Braziel RM, Rimsza LM *et al*: **Follicular lymphomas with and without translocation t(14;18) differ in gene expression profiles and genetic alterations.** *Blood* 2009, **114**(4):826-834.
 49. Gagy E, Balogh Z, Bodor C, Timar B, Reiniger L, Deak L, Csomor J, Csernus B, Szepesi A, Matolcsy A: **Somatic hypermutation of IGVH genes and aberrant somatic hypermutation in follicular lymphoma without BCL-2 gene rearrangement and expression.** *Haematologica* 2008, **93**(12):1822-1828.
 50. Bretherick KL, Bu R, Gascoyne RD, Connors JM, Spinelli JJ, Brooks-Wilson AR: **Elevated circulating t(14;18) translocation levels prior to diagnosis of follicular lymphoma.** *Blood* 2010, **116**(26):6146-6147.
 51. Rabkin CS, Hirt C, Janz S, Dolken G: **t(14;18) Translocations and risk of follicular lymphoma.** *Journal of the National Cancer Institute Monographs* 2008(39):48-51.
 52. Lambrechts AC, Hupkes PE, Dorssers LC, van't Veer MB: **Translocation (14;18)-positive cells are present in the circulation of the majority of patients with localized (stage I and II) follicular non-Hodgkin's lymphoma.** *Blood* 1993, **82**(8):2510-2516.
 53. Hirt C, Dolken G: **Quantitative detection of t(14;18)-positive cells in patients with follicular lymphoma before and after autologous bone marrow transplantation.** *Bone marrow transplantation* 2000, **25**(4):419-426.
 54. Halder R, Halder K, Sharma P, Garg G, Sengupta S, Chowdhury S: **Guanine quadruplex DNA structure restricts methylation of CpG dinucleotides genome-wide.** *Molecular bioSystems* 2010, **6**(12):2439-2447.
 55. Janz S, Potter M, Rabkin CS: **Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals.** *Genes, chromosomes & cancer* 2003, **36**(3):211-223.
 56. Brassesco MS: **Leukemia/lymphoma-associated gene fusions in normal individuals.** *Genetics and molecular research : GMR* 2008, **7**(3):782-790.
 57. Roulland S, Navarro JM, Grenot P, Milili M, Agopian J, Montpellier B, Gauduchon P, Lebailly P, Schiff C, Nadel B: **Follicular lymphoma-like B cells in healthy individuals: a novel intermediate step in early lymphomagenesis.** *The Journal of experimental medicine* 2006, **203**(11):2425-2431.
 58. Summers KE, Goff LK, Wilson AG, Gupta RK, Lister TA, Fitzgibbon J: **Frequency of the Bcl-2/IgH rearrangement in normal individuals: implications for the monitoring of disease in patients with follicular lymphoma.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2001, **19**(2):420-424.
 59. Yasukawa M, Bando S, Dolken G, Sada E, Yakushijin Y, Fujita S, Makino H: **Low frequency of BCL-2/J(H) translocation in peripheral blood lymphocytes of healthy Japanese individuals.** *Blood* 2001, **98**(2):486-488.
 60. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA: **BCL2 translocation frequency rises with age in humans.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(19):8910-8914.

Referenzen

61. Schuler F, Dolken L, Hirt C, Kiefer T, Berg T, Fusch G, Weitmann K, Hoffmann W, Fusch C, Janz S *et al*: **Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2009, **124**(4):958-963.
62. Agopian J, Navarro JM, Gac AC, Lecluse Y, Briand M, Grenot P, Gauduchon P, Ruminy P, Lebailly P, Nadel B *et al*: **Agricultural pesticide exposure and the molecular connection to lymphomagenesis.** *The Journal of experimental medicine* 2009, **206**(7):1473-1483.
63. Shaffer AL, Rosenwald A, Staudt LM: **Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation.** *Nature reviews Immunology* 2002, **2**(12):920-932.
64. Harris NL, Stein H, Coupland SE, Hummel M, Favera RD, Pasqualucci L, Chan WC: **New approaches to lymphoma diagnosis.** *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2001:194-220.
65. Wang JH, Gostissa M, Yan CT, Goff P, Hickernell T, Hansen E, Difilippantonio S, Wesemann DR, Zarrin AA, Rajewsky K *et al*: **Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells.** *Nature* 2009, **460**(7252):231-236.
66. Murphy KMT, P.; Walport, M.; : **Janeway Immunologie.** *Spektrum Akademischer Verlag* 2009, **Auflage 7.**
67. Zhang M, Srivastava G, Lu L: **The pre-B cell receptor and its function during B cell development.** *Cellular & molecular immunology* 2004, **1**(2):89-94.
68. Martinez-Climent JA, Fontan L, Gascoyne RD, Siebert R, Prosper F: **Lymphoma stem cells: enough evidence to support their existence?** *Haematologica* 2010, **95**(2):293-302.
69. Linterman MA, Pierson W, Lee SK, Kallies A, Kawamoto S, Rayner TF, Srivastava M, Divekar DP, Beaton L, Hogan JJ *et al*: **Foxp3+ follicular regulatory T cells control the germinal center response.** *Nature medicine* 2011, **17**(8):975-982.
70. Hillion S, Rochas C, Youinou P, Jamin C: **Signaling pathways regulating RAG expression in B lymphocytes.** *Autoimmunity reviews* 2009, **8**(7):599-604.
71. LeBien TW, Tedder TF: **B lymphocytes: how they develop and function.** *Blood* 2008, **112**(5):1570-1580.
72. Maul RW, Gearhart PJ: **Controlling somatic hypermutation in immunoglobulin variable and switch regions.** *Immunologic research* 2010, **47**(1-3):113-122.
73. Victora GD, Nussenzweig MC: **Germinal centers.** *Annual review of immunology* 2012, **30**:429-457.
74. Schütt CB, B.: **Grundwissen Immunologie.** *Spektrum Akademischer Verlag* 2011, **3.**
75. Tonegawa S: **Somatic generation of antibody diversity.** *Nature* 1983, **302**(5909):575-581.
76. Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD: **The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination.** *Genes & development* 2004, **18**(1):1-11.
77. Matsuda F, Honjo T: **Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus.** *Advances in immunology* 1996, **62**:1-29.
78. Schatz DG: **V(D)J recombination.** *Immunological Reviews* 2004.
79. Swanson PC, Kumar S, Raval P: **Early steps of V(D)J rearrangement: insights from biochemical studies of RAG-RSS complexes.** *Advances in experimental medicine and biology* 2009, **650**:1-15.

Referenzen

80. Drejer-Teel AH, Fugmann SD, Schatz DG: **The beyond 12/23 restriction is imposed at the nicking and pairing steps of DNA cleavage during V(D)J recombination.** *Molecular and cellular biology* 2007, **27**(18):6288-6299.
81. Schatz DG, Swanson PC: **V(D)J recombination: mechanisms of initiation.** *Annual review of genetics* 2011, **45**:167-202.
82. Ramsden DA, Weed BD, Reddy YV: **V(D)J recombination: Born to be wild.** *Semin Cancer Biol* 2010, **20**(4):254-260.
83. Jones JM, Gellert M: **Intermediates in V(D)J recombination: a stable RAG1/2 complex sequesters cleaved RSS ends.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, **98**(23):12926-12931.
84. Grundy GJ, Ramon-Maiques S, Dimitriadis EK, Kotova S, Biertumpfel C, Heymann JB, Steven AC, Gellert M, Yang W: **Initial stages of V(D)J recombination: the organization of RAG1/2 and RSS DNA in the postcleavage complex.** *Molecular cell* 2009, **35**(2):217-227.
85. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW: **Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus.** *Annual review of immunology* 2006, **24**:541-570.
86. Wang LD, Clark MR: **B-cell antigen-receptor signalling in lymphocyte development.** *Immunology* 2003, **110**(4):411-420.
87. Spicuglia S, Franchini DM, Ferrier P: **Regulation of V(D)J recombination.** *Current opinion in immunology* 2006, **18**(2):158-163.
88. Herzog S, Jumaa H: **Self-recognition and clonal selection: autoreactivity drives the generation of B cells.** *Current opinion in immunology* 2012, **24**(2):166-172.
89. Gatto D, Brink R: **The germinal center reaction.** *The Journal of allergy and clinical immunology* 2010, **126**(5):898-907; quiz 908-899.
90. Flemming W: **Historical Paper. Contributions to the Knowledge of the Cell and Its Vital Processes.** *The Journal of cell biology* 1965, **25**:SUPPL:1-69.
91. Swartzendruber DC, Hanna MG, Jr.: **Electron microscopic autoradiography of germinal center cells in mouse spleen.** *The Journal of cell biology* 1965, **25**(3):Suppl:109-119.
92. Victora GD, Dominguez-Sola D, Holmes AB, Deroubaix S, Dalla-Favera R, Nussenzweig MC: **Identification of human germinal center light and dark zone cells and their relationship to human B-cell lymphomas.** *Blood* 2012, **120**(11):2240-2248.
93. Schmidlin H, Diehl SA, Blom B: **New insights into the regulation of human B-cell differentiation.** *Trends in immunology* 2009, **30**(6):277-285.
94. Hess J, Laumen H, Muller KB, Wirth T: **Molecular genetics of the germinal center reaction.** *Journal of cellular physiology* 1998, **177**(4):525-534.
95. Faili A, Aoufouchi S, Gueranger Q, Zober C, Leon A, Bertocci B, Weill JC, Reynaud CA: **AID-dependent somatic hypermutation occurs as a DNA single-strand event in the BL2 cell line.** *Nature immunology* 2002, **3**(9):815-821.
96. Maul RW, Saribasak H, Martomo SA, McClure RL, Yang W, Vaisman A, Gramlich HS, Schatz DG, Woodgate R, Wilson DM, 3rd *et al*: **Uracil residues dependent on the deaminase AID in immunoglobulin gene variable and switch regions.** *Nature immunology* 2011, **12**(1):70-76.
97. Gu X, Shivarov V, Strout MP: **The role of activation-induced cytidine deaminase in lymphomagenesis.** *Current opinion in hematology* 2012, **19**(4):292-298.
98. Di Noia JM, Neuberger MS: **Immunoglobulin gene conversion in chicken DT40 cells largely proceeds through an abasic site intermediate generated by excision of the uracil produced by**

Referenzen

- AID-mediated deoxycytidine deamination.** *European journal of immunology* 2004, **34**(2):504-508.
99. Kavli B, Andersen S, Otterlei M, Liabakk NB, Imai K, Fischer A, Durandy A, Krokan HE, Slupphaug G: **B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil.** *The Journal of experimental medicine* 2005, **201**(12):2011-2021.
100. Kracker S, Durandy A: **Insights into the B cell specific process of immunoglobulin class switch recombination.** *Immunology letters* 2011, **138**(2):97-103.
101. Casellas R, Yamane A, Kovalchuk AL, Potter M: **Restricting activation-induced cytidine deaminase tumorigenic activity in B lymphocytes.** *Immunology* 2009, **126**(3):316-328.
102. Calame KL, Lin KI, Tunyaplin C: **Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells.** *Annual review of immunology* 2003, **21**:205-230.
103. Denepoux S, Fournier N, Peronne C, Banchereau J, Lebecque S: **T cells can induce somatic mutation in B cell receptor-engaged BL2 Burkitt's lymphoma cells independently of CD40-CD40 ligand interactions.** *Journal of immunology* 2000, **164**(3):1306-1313.
104. Salaverria IS, R.: **Follicular Lymphoma grade 3B.** *Clinical Haematology* 2011.
105. Salaverria I, Siebert, R.: **The Gray Zone Between Burkitt's Lymphoma and Diffuse Large B-Cell lymphoma From a Genetic Perspective.** *JCO* 2011.
106. Gaidano G, Pasqualucci L, Capello D, Berra E, Deambrogi C, Rossi D, Maria Larocca L, Ghoghini A, Carbone A, Dalla-Favera R: **Aberrant somatic hypermutation in multiple subtypes of AIDS-associated non-Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2003, **102**(5):1833-1841.
107. Klapper W, Szczepanowski M, Heidorn K, Muschen M, Liedtke S, Sotnikova A, Andersen NS, Greeve J, Parwaresch R: **Immunoglobulin class-switch recombination occurs in mantle cell lymphomas.** *The Journal of pathology* 2006, **209**(2):250-257.
108. Tsai AG, Lieber MR: **Mechanisms of chromosomal rearrangement in the human genome.** *BMC genomics* 2010, **11 Suppl 1**:S1.
109. Pasqualucci L, Bhagat G, Jankovic M, Compagno M, Smith P, Muramatsu M, Honjo T, Morse HC, 3rd, Nussenzweig MC, Dalla-Favera R: **AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis.** *Nature genetics* 2008, **40**(1):108-112.
110. Vaandrager JW, Schuurin E, Philippo K, Kluijn PM: **V(D)J recombinase-mediated transposition of the BCL2 gene to the IGH locus in follicular lymphoma.** *Blood* 2000, **96**(5):1947-1952.
111. Fenton JA, Vaandrager JW, Aarts WM, Bende RJ, Heering K, van Dijk M, Morgan G, van Noesel CJ, Schuurin E, Kluijn PM: **Follicular lymphoma with a novel t(14;18) breakpoint involving the immunoglobulin heavy chain switch mu region indicates an origin from germinal center B cells.** *Blood* 2002, **99**(2):716-718.
112. Pasqualucci L, Migliozza A, Fracchiolla N, Williams C, Neri A, Baldini L, Chaganti RS, Klein U, Kuppers R, Rajewsky K *et al*: **BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(20):11816-11821.
113. Preudhomme C, Roumier C, Hildebrand MP, Dallery-Prudhomme E, Lantoin D, Lai JL, Daudignon A, Adenis C, Bauters F, Fenaux P *et al*: **Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma.** *Oncogene* 2000, **19**(16):2023-2032.

Referenzen

114. Stamatopoulos K, Kosmas C, Belessi C, Stavroyianni N, Kyriazopoulos P, Papadaki T: **Molecular insights into the immunopathogenesis of follicular lymphoma**. *Immunol Today* 2000, **21**(6):298-305.
115. Hahn WC, Weinberg RA: **Modelling the molecular circuitry of cancer**. *Nature reviews Cancer* 2002, **2**(5):331-341.
116. Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjoblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J *et al*: **The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers**. *Science* 2007, **318**(5853):1108-1113.
117. Heng HH, Stevens JB, Bremer SW, Ye KJ, Liu G, Ye CJ: **The evolutionary mechanism of cancer**. *Journal of cellular biochemistry* 2010, **109**(6):1072-1084.
118. Beerenwinkel N, Antal T, Dingli D, Traulsen A, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Nowak MA: **Genetic progression and the waiting time to cancer**. *PLoS Comput Biol* 2007, **3**(11):e225.
119. Duquette ML, Huber MD, Maizels N: **G-rich proto-oncogenes are targeted for genomic instability in B-cell lymphomas**. *Cancer research* 2007, **67**(6):2586-2594.
120. Vogelstein B, Kinzler KW: **Cancer genes and the pathways they control**. *Nature medicine* 2004, **10**(8):789-799.
121. Weinberg RA: **The biology of Cancer**. *Taylor and Francis, Garland Science* 2006, **1. Auflage**.
122. Jolliffe AK, Derry WB: **The TP53 signaling network in mammals and worms**. *Briefings in functional genomics* 2012.
123. Hayslip J, Montero A: **Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review**. *Molecular cancer* 2006, **5**:44.
124. Knudsen KE, Weber E, Arden KC, Cavenee WK, Feramisco JR, Knudsen ES: **The retinoblastoma tumor suppressor inhibits cellular proliferation through two distinct mechanisms: inhibition of cell cycle progression and induction of cell death**. *Oncogene* 1999, **18**(37):5239-5245.
125. Strachan TR, A. P.: **Molekulare Humangenetik**. *Spektrum Akademischer Verlag* 2005, **3. Auflage**.
126. Hanahan D, Weinberg RA: **The hallmarks of cancer**. *Cell* 2000, **100**(1):57-70.
127. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ: **Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction**. *Cell* 2009, **136**(5):823-837.
128. Jones S, Chen WD, Parmigiani G, Diehl F, Beerenwinkel N, Antal T, Traulsen A, Nowak MA, Siegel C, Velculescu VE *et al*: **Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(11):4283-4288.
129. Baudot A, Real FX, Izarzugaza JM, Valencia A: **From cancer genomes to cancer models: bridging the gaps**. *EMBO reports* 2009, **10**(4):359-366.
130. Duesberg P: **Chromosomal chaos and cancer**. *Scientific American* 2007, **296**(5):52-59.
131. Loeb LA, Bielas JH, Beckman RA: **Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications**. *Cancer research* 2008, **68**(10):3551-3557; discussion 3557.
132. Masramon L, Vendrell E, Tarafa G, Capella G, Miro R, Ribas M, Peinado MA: **Genetic instability and divergence of clonal populations in colon cancer cells in vitro**. *Journal of cell science* 2006, **119**(Pt 8):1477-1482.
133. Kinzler KW, Vogelstein B: **Lessons from hereditary colorectal cancer**. *Cell* 1996, **87**(2):159-170.
134. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: **Genetic instability in colorectal cancers**. *Nature* 1997, **386**(6625):623-627.

Referenzen

135. Hatziapostolou M, Iliopoulos D: **Epigenetic aberrations during oncogenesis.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2011, **68**(10):1681-1702.
136. Bomken S, Fiser K, Heidenreich O, Vormoor J: **Understanding the cancer stem cell.** *British journal of cancer* 2010, **103**(4):439-445.
137. Shibata D: **Mutation and epigenetic molecular clocks in cancer.** *Carcinogenesis* 2011, **32**(2):123-128.
138. Kaneko K: **Characterization of stem cells and cancer cells on the basis of gene expression profile stability, plasticity, and robustness: dynamical systems theory of gene expressions under cell-cell interaction explains mutational robustness of differentiated cells and suggests how cancer cells emerge.** *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2011, **33**(6):403-413.
139. Sandoval J, Esteller M: **Cancer epigenomics: beyond genomics.** *Current opinion in genetics & development* 2012, **22**(1):50-55.
140. Rajnai H, Bodor C, Balogh Z, Gagyi E, Csomor J, Krenacs T, Toth E, Matolcsy A: **Impact of the reactive microenvironment on the bone marrow involvement of follicular lymphoma.** *Histopathology* 2012, **60**(6B):E66-75.
141. Salles GA: **Clinical features, prognosis and treatment of follicular lymphoma.** *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program* 2007:216-225.
142. Czuczman MS, Gregory SA: **The future of CD20 monoclonal antibody therapy in B-cell malignancies.** *Leukemia & lymphoma* 2010, **51**(6):983-994.
143. de Jong D: **Molecular pathogenesis of follicular lymphoma: a cross talk of genetic and immunologic factors.** *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005, **23**(26):6358-6363.
144. Horning SJ, Rosenberg SA: **The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas.** *N Engl J Med* 1984, **311**(23):1471-1475.
145. Buske C, Hoster E, Dreyling M, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W: **The Follicular Lymphoma International Prognostic Index (FLIPI) separates high-risk from intermediate- or low-risk patients with advanced-stage follicular lymphoma treated front-line with rituximab and the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) with respect to treatment outcome.** *Blood* 2006, **108**(5):1504-1508.
146. Nooka AK, Nabhan C, Zhou X, Taylor MD, Byrtek M, Miller TP, Friedberg JW, Zelenetz AD, Link BK, Cerhan JR *et al*: **Examination of the follicular lymphoma international prognostic index (FLIPI) in the National LymphoCare study (NLCS): a prospective US patient cohort treated predominantly in community practices.** *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2012.
147. Saguna C, Mut ID, Lupu AR, Tevet M, Bumbea H, Dragan C: **Immunotherapy with rituximab in follicular lymphomas.** *Maedica* 2011, **6**(2):100-108.
148. Cheung MC, Bailey D, Pennell N, Imrie KR, Berinstein NL, Amato D, Ghorab Z: **In situ localization of follicular lymphoma: evidence for subclinical systemic disease with detection of an identical BCL-2/IGH fusion gene in blood and lymph node.** *Leukemia* 2009, **23**(6):1176-1179.
149. Montes-Moreno S, Castro Y, Rodriguez-Pinilla SM, Garcia JF, Mollejo M, Castillo ME, Bas-Vernal A, Barrionuevo-Cornejo C, Sanchez-Verde L, Menarguez J *et al*: **Intrafollicular neoplasia/in situ follicular lymphoma: review of a series of 13 cases.** *Histopathology* 2010, **56**(5):658-662.

Referenzen

150. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES: **In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection.** *Blood* 2002, **99**(9):3376-3382.
151. Bonzheim I, Salaverria I, Haake A, Gastl G, Adam P, Siebert R, Fend F, Quintanilla-Martinez L: **A unique case of follicular lymphoma provides insights to the clonal evolution from follicular lymphoma in situ to manifest follicular lymphoma.** *Blood* 2011, **118**(12):3442-3444.
152. Jegalian AG, Eberle FC, Pack SD, Mirvis M, Raffeld M, Pittaluga S, Jaffe ES: **Follicular lymphoma in situ: clinical implications and comparisons with partial involvement by follicular lymphoma.** *Blood* 2011, **118**(11):2976-2984.
153. Carbone A, Santoro A: **How I treat: diagnosing and managing "in situ" lymphoma.** *Blood* 2011, **117**(15):3954-3960.
154. Li JN, Zhang WY, Tang Y, Li GD, Dong DD: **In situ follicular lymphoma with progressive transformation of the germinal centers confirmed by laser capture microdissection, IGH gene rearrangement analysis, and fluorescence in situ hybridization for t(14;18).** *Human pathology* 2012, **43**(1):138-143.
155. Carbone A, Della Libera D, Zannier L, Selva A, Ceolin P, Gualeni A, Canal B, Gloghini A: **In situ follicular lymphoma associated with overt B- or T-cell lymphomas in the same lymph node.** *American journal of hematology* 2011, **86**(12):E66-70.
156. Carbone A, Gloghini A: **"Intrafollicular neoplasia" of nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma: description of a hypothetic early step of the disease.** *Human pathology* 2012, **43**(5):619-628.
157. Adam P, Schoof J, Hartmann M, Schwarz S, Puppe B, Ott M, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK: **Cell migration patterns and ongoing somatic mutations in the progression of follicular lymphoma.** *Cytogenetic and genome research* 2007, **118**(2-4):328-336.
158. Lossos IS, Gascoyne RD: **Transformation of follicular lymphoma.** *Best practice & research Clinical haematology* 2011, **24**(2):147-163.
159. Wrench D, Montoto S, Fitzgibbon J: **Molecular signatures in the diagnosis and management of follicular lymphoma.** *Current opinion in hematology* 2010, **17**(4):333-340.
160. Vaidyanathan G, Ngamphaiboon N, Hernandez-Ilizaliturri FJ: **Clinical spectrum and prognosis of follicular lymphoma with blastoid transformation: case series and a review of the literature.** *Annals of hematology* 2011, **90**(8):955-962.
161. Carlotti E, Wrench D, Matthews J, Iqbal S, Davies A, Norton A, Hart J, Lai R, Montoto S, Gribben JG *et al*: **Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone.** *Blood* 2009, **113**(15):3553-3557.
162. Eide MB, Liestol K, Lingjaerde OC, Hystad ME, Kresse SH, Meza-Zepeda L, Myklebost O, Troen G, Aamot HV, Holte H *et al*: **Genomic alterations reveal potential for higher grade transformation in follicular lymphoma and confirm parallel evolution of tumor cell clones.** *Blood* 2010, **116**(9):1489-1497.
163. Matolcsy A: **High-grade transformation of low-grade non-Hodgkin's lymphomas: mechanisms of tumor progression.** *Leukemia & lymphoma* 1999, **34**(3-4):251-259.
164. Weigert O, Kopp N, Lane AA, Yoda A, Dahlberg SE, Neuberg D, Bahar AY, Chapuy B, Kutok JL, Longtine JA *et al*: **Molecular ontogeny of donor-derived follicular lymphomas occurring after hematopoietic cell transplantation.** *Cancer discovery* 2012, **2**(1):47-55.

Referenzen

165. Anderson K, Lutz C, van Delft FW, Bateman CM, Guo Y, Colman SM, Kempinski H, Moorman AV, Tittley I, Swansbury J *et al*: **Genetic variegation of clonal architecture and propagating cells in leukaemia.** *Nature* 2011, **469**(7330):356-361.
166. Notta F, Mullighan CG, Wang JC, Poepl A, Doulatov S, Phillips LA, Ma J, Minden MD, Downing JR, Dick JE: **Evolution of human BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia-initiating cells.** *Nature* 2011, **469**(7330):362-367.
167. Ruminy P, Jardin F, Picquenot JM, Parmentier F, Contentin N, Buchonnet G, Tison S, Rainville V, Tilly H, Bastard C: **S(mu) mutation patterns suggest different progression pathways in follicular lymphoma: early direct or late from FL progenitor cells.** *Blood* 2008, **112**(5):1951-1959.
168. Berglund M, Enblad G, Thunberg U, Amini RM, Sundstrom C, Roos G, Erlanson M, Rosenquist R, Larsson C, Lagercrantz S: **Genomic imbalances during transformation from follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma.** *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2007, **20**(1):63-75.
169. Nakamura Y, Sato Y, Yoshida K, Kakegawa E, Ito Y, Seyama A, Kayano H, Bessho M: **A molecular analysis of biclonal follicular lymphoma: further evidence for bone marrow origin and clonal selection.** *European journal of haematology* 2009, **82**(5):398-403.
170. Cheung KJ, Delaney A, Ben-Neriah S, Schein J, Lee T, Shah SP, Cheung D, Johnson NA, Mungall AJ, Telenius A *et al*: **High resolution analysis of follicular lymphoma genomes reveals somatic recurrent sites of copy-neutral loss of heterozygosity and copy number alterations that target single genes.** *Genes, chromosomes & cancer* 2010, **49**(8):669-681.
171. Kristoffersson U, Heim S, Mandahl N, Olsson H, Ranstam J, Akerman M, Mitelman F: **Prognostic implication of cytogenetic findings in 106 patients with non-Hodgkin lymphoma.** *Cancer genetics and cytogenetics* 1987, **25**(1):55-64.
172. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, Lee A, Last KW, Weisenburger DD, Chan WC, Delabie J, Braziel RM, Campo E *et al*: **Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms.** *British Journal of Haematology* 2007, **136**(2):286-293.
173. Gentles AJ, Alizadeh AA, Lee SI, Myklebust JH, Shachaf CM, Shahbaba B, Levy R, Koller D, Plevritis SK: **A pluripotency signature predicts histologic transformation and influences survival in follicular lymphoma patients.** *Blood* 2009, **114**(15):3158-3166.
174. Hoglund M, Sehn L, Connors JM, Gascoyne RD, Siebert R, Sall T, Mitelman F, Horsman DE: **Identification of cytogenetic subgroups and karyotypic pathways of clonal evolution in follicular lymphomas.** *Genes, chromosomes & cancer* 2004, **39**(3):195-204.
175. Handel AE, Ebers GC, Ramagopalan SV: **Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease.** *Trends in molecular medicine* 2010, **16**(1):7-16.
176. Brena RM, Huang TH, Plass C: **Toward a human epigenome.** *Nature genetics* 2006, **38**(12):1359-1360.
177. Esteller M: **Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps.** *Nature reviews Genetics* 2007, **8**(4):286-298.
178. Waddington CH: **The epigenotype.** *Endeavour* 1942, **1**:18-20.
179. Hassler MR, Egger G: **Epigenomics of cancer - emerging new concepts.** *Biochimie* 2012.
180. Tsai HC, Baylin SB: **Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine.** *Cell research* 2011, **21**(3):502-517.
181. Feil R, Fraga MF: **Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications.** *Nature reviews Genetics* 2011, **13**(2):97-109.

Referenzen

182. Minucci S, Pelicci PG: **Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer.** *Nature reviews Cancer* 2006, **6**(1):38-51.
183. Margueron R, Reinberg D: **Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information.** *Nature reviews Genetics* 2010, **11**(4):285-296.
184. Szyf M: **6_The early life environment and the epigenome.** *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1790**(9):878-885.
185. Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T: **The context and potential of epigenetics in oncology.** *British journal of cancer* 2009, **100**(4):571-577.
186. Kanwal R, Gupta S: **Epigenetic modifications in cancer.** *Clinical genetics* 2012, **81**(4):303-311.
187. Choi JH, Li Y, Guo J, Pei L, Rauch TA, Kramer RS, Macmill SL, Wiley GB, Bennett LB, Schnabel JL *et al*: **Genome-wide DNA methylation maps in follicular lymphoma cells determined by methylation-enriched bisulfite sequencing.** *PLoS One* 2010, **5**(9).
188. Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM *et al*: **The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation.** *Nature* 2006, **439**(7078):871-874.
189. Chase A, Cross NC: **Aberrations of EZH2 in cancer.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2011, **17**(9):2613-2618.
190. Kaikkonen MU, Lam MT, Glass CK: **Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics.** *Cardiovascular research* 2011, **90**(3):430-440.
191. Licatalosi DD, Darnell RB: **RNA processing and its regulation: global insights into biological networks.** *Nature reviews Genetics* 2010, **11**(1):75-87.
192. Sato F, Tsuchiya S, Meltzer SJ, Shimizu K: **MicroRNAs and epigenetics.** *The FEBS journal* 2011, **278**(10):1598-1609.
193. Poetsch AR, Plass C: **Transcriptional regulation by DNA methylation.** *Cancer treatment reviews* 2011, **37 Suppl 1**:S8-12.
194. Suzuki MM, Bird A: **DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics.** *Nature reviews Genetics* 2008, **9**(6):465-476.
195. Fan S, Zhang X: **CpG island methylation pattern in different human tissues and its correlation with gene expression.** *Biochemical and biophysical research communications* 2009, **383**(4):421-425.
196. Reik W, Dean W, Walter J: **Epigenetic reprogramming in mammalian development.** *Science* 2001, **293**(5532):1089-1093.
197. Martin-Subero JI, Ammerpohl O, Bibikova M, Wickham-Garcia E, Agirre X, Alvarez S, Bruggemann M, Bug S, Calasanz MJ, Deckert M *et al*: **A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms.** *PLoS One* 2009, **4**(9):e6986.
198. Richter J, Ammerpohl O, Martin-Subero JI, Montesinos-Rongen M, Bibikova M, Wickham-Garcia E, Wiestler OD, Deckert M, Siebert R: **Array-based DNA methylation profiling of primary lymphomas of the central nervous system.** *BMC cancer* 2009, **9**:455.
199. Richly H, Aloia L, Di Croce L: **Roles of the Polycomb group proteins in stem cells and cancer.** *Cell death & disease* 2011, **2**:e204.
200. Gil J, Bernard D, Peters G: **Role of polycomb group proteins in stem cell self-renewal and cancer.** *DNA and cell biology* 2005, **24**(2):117-125.

Referenzen

201. Hahn MA, Hahn T, Lee DH, Esworthy RS, Kim BW, Riggs AD, Chu FF, Pfeifer GP: **Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation.** *Cancer research* 2008, **68**(24):10280-10289.
202. Baur AS, Shaw P, Burri N, Delacretaz F, Bosman FT, Chaubert P: **Frequent methylation silencing of p15(INK4b) (MTS2) and p16(INK4a) (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas.** *Blood* 1999, **94**(5):1773-1781.
203. O'Riain C, O'Shea DM, Yang Y, Le Dieu R, Gribben JG, Summers K, Yeboah-Afari J, Bhaw-Rosun L, Fleischmann C, Mein CA *et al*: **Array-based DNA methylation profiling in follicular lymphoma.** *Leukemia* 2009, **23**(10):1858-1866.
204. Li Y, Nagai H, Ohno T, Yuge M, Hatano S, Ito E, Mori N, Saito H, Kinoshita T: **Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype.** *Blood* 2002, **100**(7):2572-2577.
205. Rossi D, Capello D, Gloghini A, Franceschetti S, Paulli M, Bhatia K, Saglio G, Vitolo U, Pileri SA, Esteller M *et al*: **Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia.** *Haematologica* 2004, **89**(2):154-164.
206. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K *et al*: **Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells.** *Cell* 2006, **125**(2):301-313.
207. Shaknovich R, Cerchietti L, Tsikitas L, Kormaksson M, De S, Figueroa ME, Ballon G, Yang SN, Weinhold N, Reimers M *et al*: **DNA methyltransferase 1 and DNA methylation patterning contribute to germinal center B-cell differentiation.** *Blood* 2011, **118**(13):3559-3569.
208. Nowell PC: **The clonal evolution of tumor cell populations.** *Science* 1976, **194**(4260):23-28.
209. Henry CJM, A.; DeGregori, J.: **Ageing-associated changes in hematopoiesis and leukemogenesis: What's the connection?** *AGING* 2011.
210. Campbell PJ, Pleasance ED, Stephens PJ, Dicks E, Rance R, Goodhead I, Follows GA, Green AR, Futreal PA, Stratton MR: **Subclonal phylogenetic structures in cancer revealed by ultra-deep sequencing.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(35):13081-13086.
211. Brosnan JA, Iacobuzio-Donahue CA: **A new branch on the tree: next-generation sequencing in the study of cancer evolution.** *Seminars in cell & developmental biology* 2012, **23**(2):237-242.
212. Ansorge WJ: **Next-generation DNA sequencing techniques.** *New biotechnology* 2009, **25**(4):195-203.
213. Mardis ER: **Next-generation DNA sequencing methods.** *Annual review of genomics and human genetics* 2008, **9**:387-402.
214. Marziali A, Akeson M: **New DNA sequencing methods.** *Annual review of biomedical engineering* 2001, **3**:195-223.
215. Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gaken J, Lea NC, Przychodzen B, Mian SA, Nasser EE, Shooter C *et al*: **Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value.** *Blood* 2010, **116**(19):3923-3932.
216. Mitsui J, Fukuda Y, Azuma K, Tozaki H, Ishiura H, Takahashi Y, Goto J, Tsuji S: **Multiplexed resequencing analysis to identify rare variants in pooled DNA with barcode indexing using next-generation sequencer.** *Journal of human genetics* 2010, **55**(7):448-455.
217. Capra JA, Carbone L, Riesenfeld SJ, Wall JD: **Genomics through the lens of next-generation sequencing.** *Genome biology* 2010, **11**(6):306.

Referenzen

218. Herrmann A, Haake A, Ammerpohl O, Martin-Guerrero I, Szafranski K, Stemshorn K, Nothnagel M, Kotsopoulos SK, Richter J, Warner J *et al*: **Pipeline for large-scale microdroplet bisulfite PCR-based sequencing allows the tracking of hepitype evolution in tumors.** *PLoS One* 2011, **6**(7):e21332.
219. Pellissery S, Richter J, Haake A, Montesinos-Rongen M, Deckert M, Siebert R: **Somatic mutations altering Tyr641 of EZH2 are rare in primary central nervous system lymphoma.** *Leukemia & lymphoma* 2010, **51**(11):2135-2136.
220. Wilfinger WW, Mackey K, Chomczynski P: **Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.** *Biotechniques* 1997, **22**(3):474-476, 478-481.
221. Szumanski MB, Toth TE, Caceci T: **Ethanol precipitation to concentrate DNA excised from agarose gel.** *Biotechniques* 1990, **9**(6):708, 710.
222. Karimi M, Johansson S, Stach D, Corcoran M, Grandner D, Schalling M, Bakalkin G, Lyko F, Larsson C, Ekstrom TJ: **LUMA (LUMinometric Methylation Assay)--a high throughput method to the analysis of genomic DNA methylation.** *Experimental cell research* 2006, **312**(11):1989-1995.
223. Carew JA, Feldberg RS: **Recognition of a cytosine base lesion by a human damage-specific DNA binding protein.** *Nucleic acids research* 1985, **13**(1):303-315.
224. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, Chudin E, Garcia EW, Wu B, Doucet D, Thomas NJ, Wang Y, Vollmer E *et al*: **High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays.** *Genome research* 2006, **16**(3):383-393.
225. Touleimat N, Tost J: **Complete pipeline for Infinium((R)) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation.** *Epigenomics* 2012, **4**(3):325-341.
226. Ammerpohl O, Martin-Subero JI, Richter J, Vater I, Siebert R: **3_Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation.** *Biochimica et biophysica acta* 2009, **1790**(9):847-862.
227. Dedeurwaerder S, Defrance M, Calonne E, Denis H, Sotiriou C, Fuks F: **Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology.** *Epigenomics* 2011, **3**(6):771-784.
228. Ester M, Sander, J.: **Knowledge Discovery in Database, Techniken und Anwendungen.** Springer, Berlin 2000.
229. Eberle FC, Rodriguez-Canales J, Wei L, Hanson JC, Killian JK, Sun HW, Adams LG, Hewitt SM, Wilson WH, Pittaluga S *et al*: **Methylation profiling of mediastinal gray zone lymphoma reveals a distinctive signature with elements shared by classical Hodgkin's lymphoma and primary mediastinal large B-cell lymphoma.** *Haematologica* 2011, **96**(4):558-566.
230. Nordlund J, Milani L, Lundmark A, Lonnerholm G, Syvanen AC: **DNA methylation analysis of bone marrow cells at diagnosis of acute lymphoblastic leukemia and at remission.** *PLoS One* 2012, **7**(4):e34513.
231. Tost J, Gut IG: **DNA methylation analysis by pyrosequencing.** *Nature protocols* 2007, **2**(9):2265-2275.
232. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, Johnson NA, Severson TM, Chiu R, Field M *et al*: **Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma.** *Nature* 2011, **476**(7360):298-303.
233. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, Kasper LH, Lerach S, Tang H, Ma J *et al*: **Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma.** *Nature* 2011, **471**(7337):189-195.

Referenzen

234. Bug S: **Identification and characterization of pathogenetically relevant genes in lymphatic neoplasia with particular regard to chromosome 10 and 22.** *Dissertation, CAU-Kiel* 2009.
235. Pasqualucci L, Neumeister P, Goossens T, Nanjangud G, Chaganti RS, Kuppers R, Dalla-Favera R: **Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas.** *Nature* 2001, **412**(6844):341-346.
236. Shaffer AL, Emre NC, Romesser PB, Staudt LM: **IRF4: Immunity. Malignancy! Therapy?** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2009, **15**(9):2954-2961.
237. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim KH, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H *et al*: **Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma.** *Nature* 2011, **470**(7332):115-119.
238. Jeelall YS, Horikawa K: **Oncogenic MYD88 mutation drives Toll pathway to lymphoma.** *Immunology and cell biology* 2011, **89**(6):659-660.
239. Bodor C, O'Riain C, Wrench D, Matthews J, Iyengar S, Tayyib H, Calaminici M, Clear A, Iqbal S, Quentmeier H *et al*: **EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma.** *Leukemia* 2011, **25**(4):726-729.
240. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, Paul JE, Boyle M, Woolcock BW, Kuchenbauer F *et al*: **Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin.** *Nature genetics* 2010, **42**(2):181-185.
241. Ryan RJ, Nitta M, Borger D, Zukerberg LR, Ferry JA, Harris NL, Iafrate AJ, Bernstein BE, Sohani AR, Le LP: **EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas.** *PLoS One* 2011, **6**(12):e28585.
242. Tewhey R, Warner JB, Nakano M, Libby B, Medkova M, David PH, Kotsopoulos SK, Samuels ML, Hutchison JB, Larson JW *et al*: **Microdroplet-based PCR enrichment for large-scale targeted sequencing.** *Nature biotechnology* 2009, **27**(11):1025-1031.
243. Zhang Y, Ozdemir P: **Microfluidic DNA amplification--a review.** *Analytica chimica acta* 2009, **638**(2):115-125.
244. Brouzes E, Medkova M, Savenelli N, Marran D, Twardowski M, Hutchison JB, Rothberg JM, Link DR, Perrimon N, Samuels ML: **Droplet microfluidic technology for single-cell high-throughput screening.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009, **106**(34):14195-14200.
245. Mardis ER: **The impact of next-generation sequencing technology on genetics.** *Trends in genetics : TIG* 2008, **24**(3):133-141.
246. Hoffmann S, Otto C, Kurtz S, Sharma CM, Khaitovich P, Vogel J, Stadler PF, Hackermuller J: **Fast mapping of short sequences with mismatches, insertions and deletions using index structures.** *PLoS Comput Biol* 2009, **5**(9):e1000502.
247. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, Genome Project Data Processing S: **The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.** *Bioinformatics* 2009, **25**(16):2078-2079.
248. Stamatakis A: **RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models.** *Bioinformatics* 2006, **22**(21):2688-2690.
249. Martin-Subero JI, Kreuz M, Bibikova M, Bentink S, Ammerpohl O, Wickham-Garcia E, Rosolowski M, Richter J, Lopez-Serra L, Ballestar E *et al*: **New insights into the biology and origin of mature aggressive B-cell lymphomas by combined epigenomic, genomic, and transcriptional profiling.** *Blood* 2009, **113**(11):2488-2497.

Referenzen

250. Krajnovic M, Radojkovic M, Davidovic R, Dimitrijevic B, Krtolica K: **Prognostic significance of epigenetic inactivation of p16, p15, MGMT and DAPK genes in follicular lymphoma.** *Medical oncology* 2013, **30**(1):441.
251. Bacher JP, A.; Wenzig, K: **Clusteranalyse: Anwendungsorientierte Einführung in Klassifikationsverfahren.** Oldenbourg Wissenschaftsverlag 2010, **3.Auflage.**
252. Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K: **Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions.** *Genes & development* 2006, **20**(9):1123-1136.
253. Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G: **The impact of next-generation sequencing on genomics.** *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* 2011, **38**(3):95-109.
254. Healy J, Thomas EE, Schwartz JT, Wigler M: **Annotating large genomes with exact word matches.** *Genome research* 2003, **13**(10):2306-2315.
255. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, Cruz-Gordillo P, Knoechel B, Asmann YW, Slager SL *et al*: **Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(10):3879-3884.
256. Mamanova L, Coffey AJ, Scott CE, Kozarewa I, Turner EH, Kumar A, Howard E, Shendure J, Turner DJ: **Target-enrichment strategies for next-generation sequencing.** *Nature methods* 2010, **7**(2):111-118.
257. Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, Rogov P, LeProust EM, Brockman W, Fennell T, Giannoukos G, Fisher S, Russ C *et al*: **Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing.** *Nature biotechnology* 2009, **27**(2):182-189.
258. Turner EH, Lee C, Ng SB, Nickerson DA, Shendure J: **Massively parallel exon capture and library-free resequencing across 16 genomes.** *Nature methods* 2009, **6**(5):315-316.
259. Lin X, Tang W, Ahmad S, Lu J, Colby CC, Zhu J, Yu Q: **Applications of targeted gene capture and next-generation sequencing technologies in studies of human deafness and other genetic disabilities.** *Hearing research* 2012, **288**(1-2):67-76.
260. Mertes F, Elsharawy A, Sauer S, van Helvoort JM, van der Zaag PJ, Franke A, Nilsson M, Lehrach H, Brookes AJ: **Targeted enrichment of genomic DNA regions for next-generation sequencing.** *Briefings in functional genomics* 2011, **10**(6):374-386.
261. Musyanovych A, Mailander V, Landfester K: **Miniemulsion droplets as single molecule nanoreactors for polymerase chain reaction.** *Biomacromolecules* 2005, **6**(4):1824-1828.
262. Nakano M, Nakai N, Kurita H, Komatsu J, Takashima K, Katsura S, Mizuno A: **Single-molecule reverse transcription polymerase chain reaction using water-in-oil emulsion.** *Journal of bioscience and bioengineering* 2005, **99**(3):293-295.
263. Markey AL, Mohr S, Day PJ: **High-throughput droplet PCR.** *Methods* 2010, **50**(4):277-281.
264. Beer NR, Hindson BJ, Wheeler EK, Hall SB, Rose KA, Kennedy IM, Colston BW: **On-chip, real-time, single-copy polymerase chain reaction in picoliter droplets.** *Analytical chemistry* 2007, **79**(22):8471-8475.
265. Jones MA, Bhide S, Chin E, Ng BG, Rhodenizer D, Zhang VW, Sun JJ, Tanner A, Freeze HH, Hegde MR: **Targeted polymerase chain reaction-based enrichment and next generation sequencing for diagnostic testing of congenital disorders of glycosylation.** *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2011, **13**(11):921-932.
266. Valencia CA, Ankala A, Rhodenizer D, Bhide S, Littlejohn MR, Keong LM, Rutkowski A, Sparks S, Bonnemann C, Hegde M: **Comprehensive Mutation Analysis for Congenital Muscular**

Referenzen

- Dystrophy: A Clinical PCR-Based Enrichment and Next-Generation Sequencing Panel.** *PLoS One* 2013, **8**(1):e53083.
267. Roessler J, Ammerpohl O, Gutwein J, Hasemeier B, Anwar SL, Kreipe H, Lehmann U: **Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc.** *BMC research notes* 2012, **5**:210.
268. Brakensiek K, Wingen LU, Langer F, Kreipe H, Lehmann U: **Quantitative high-resolution CpG island mapping with Pyrosequencing reveals disease-specific methylation patterns of the CDKN2B gene in myelodysplastic syndrome and myeloid leukemia.** *Clinical chemistry* 2007, **53**(1):17-23.
269. David J. Bunyan¹ HMSB, Margaret Lever¹, Sasi D. Saminathan², Wee Teik Keng², Roziana Araffin², David O. Robinson^{1,3}: **Different denaturation rates between methylated and non-methylated genomic DNA can result in allele-specific PCR amplification.** *Open Journal of Genetics* 2011, **1**:13-14.
270. Ledergerber C, Dessimoz C: **Base-calling for next-generation sequencing platforms.** *Briefings in bioinformatics* 2011, **12**(5):489-497.
271. Fonseca NA, Rung J, Brazma A, Marioni JC: **Tools for mapping high-throughput sequencing data.** *Bioinformatics* 2012, **28**(24):3169-3177.
272. Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, Esteller M: **Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome.** *Epigenetics* 2011, **6**(6):692-702.
273. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL *et al*: **High density DNA methylation array with single CpG site resolution.** *Genomics* 2011, **98**(4):288-295.
274. Dahl C, Guldborg P: **DNA methylation analysis techniques.** *Biogerontology* 2003, **4**(4):233-250.
275. Hayatsu H, Shiraishi M, Negishi K: **Bisulfite modification for analysis of DNA methylation.** *Current protocols in nucleic acid chemistry / edited by Serge L Beaucage [et al]* 2008, **Chapter 6**:Unit 6 10.
276. Murrell A, Heeson S, Cooper WN, Douglas E, Apostolidou S, Moore GE, Maher ER, Reik W: **An association between variants in the IGF2 gene and Beckwith-Wiedemann syndrome: interaction between genotype and epigenotype.** *Human molecular genetics* 2004, **13**(2):247-255.
277. Bell CG, Beck S: **Advances in the identification and analysis of allele-specific expression.** *Genome medicine* 2009, **1**(5):56.
278. Kerkel K, Spadola A, Yuan E, Kosek J, Jiang L, Hod E, Li K, Murty VV, Schupf N, Vilain E *et al*: **Genomic surveys by methylation-sensitive SNP analysis identify sequence-dependent allele-specific DNA methylation.** *Nature genetics* 2008, **40**(7):904-908.
279. International HapMap C: **A haplotype map of the human genome.** *Nature* 2005, **437**(7063):1299-1320.
280. Martin-Guerrero I, Enjuanes A, Richter J, Ammerpohl O, Colomer D, Ardanaz M, Marco F, Salas A, Campo E, Siebert R *et al*: **A putative "hepitype" in the ATM gene associated with chronic lymphocytic leukemia risk.** *Genes, chromosomes & cancer* 2011, **50**(11):887-895.
281. Lu Y, Abdou AM, Cerhan JR, Morton LM, Severson RK, Davis S, Cozen W, Rothman N, Bernstein L, Chanock S *et al*: **Human leukocyte antigen class I and II alleles and overall survival in diffuse large B-cell lymphoma and follicular lymphoma.** *TheScientificWorldJournal* 2011, **11**:2062-2070.

Referenzen

282. Skibola CF, Bracci PM, Halperin E, Conde L, Craig DW, Agana L, Iyadurai K, Becker N, Brooks-Wilson A, Curry JD *et al*: **Genetic variants at 6p21.33 are associated with susceptibility to follicular lymphoma.** *Nature genetics* 2009, **41**(8):873-875.
283. Wrench D, Leighton P, Skibola CF, Conde L, Cazier JB, Matthews J, Iqbal S, Carlotti E, Bodor C, Montoto S *et al*: **SNP rs6457327 in the HLA region on chromosome 6p is predictive of the transformation of follicular lymphoma.** *Blood* 2011, **117**(11):3147-3150.
284. Shanafelt TD, Ghia P, Lanasa MC, Landgren O, Rawstron AC: **Monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL): biology, natural history and clinical management.** *Leukemia* 2010, **24**(3):512-520.
285. Ammerpohl O, Pratschke J, Schafmayer C, Haake A, Faber W, von Kampen O, Brosch M, Sipos B, von Schonfels W, Balschun K *et al*: **Distinct DNA methylation patterns in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 2012, **130**(6):1319-1328.
286. Killian JK, Bilke S, Davis S, Walker RL, Killian MS, Jaeger EB, Chen Y, Hipp J, Pittaluga S, Raffeld M *et al*: **Large-scale profiling of archival lymph nodes reveals pervasive remodeling of the follicular lymphoma methylome.** *Cancer research* 2009, **69**(3):758-764.
287. Weiss LM, Loera S, Bacchi CE: **Immunoglobulin light chain immunohistochemistry revisited, with emphasis on reactive follicular hyperplasia versus follicular lymphoma.** *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry* 2010, **18**(3):199-205.
288. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, Sougnez C, Stewart C, Sivachenko A, Wang L *et al*: **Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia.** *Cell* 2013, **152**(4):714-726.
289. Sottoriva A, Spiteri I, Piccirillo SG, Touloumis A, Collins VP, Marioni JC, Curtis C, Watts C, Tavaré S: **Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013.
290. De S, Shaknovich R, Riester M, Elemento O, Geng H, Kormaksson M, Jiang Y, Woolcock B, Johnson N, Polo JM *et al*: **Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity.** *PLoS genetics* 2013, **9**(1):e1003137.
291. Cheung KJ, Johnson NA, Affleck JG, Severson T, Steidl C, Ben-Neriah S, Schein J, Morin RD, Moore R, Shah SP *et al*: **Acquired TNFRSF14 mutations in follicular lymphoma are associated with worse prognosis.** *Cancer research* 2010, **70**(22):9166-9174.
292. Lo Coco F, Ye BH, Lista F, Corradini P, Offit K, Knowles DM, Chaganti RS, Dalla-Favera R: **Rearrangements of the BCL6 gene in diffuse large cell non-Hodgkin's lymphoma.** *Blood* 1994, **83**(7):1757-1759.
293. Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe ES, Raffeld M: **Analysis of LAZ3 (BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas: results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences.** *Blood* 1995, **85**(10):2877-2884.
294. Johnson NA, Savage KJ, Ludkovski O, Ben-Neriah S, Woods R, Steidl C, Dyer MJ, Siebert R, Kuruvilla J, Klasa R *et al*: **Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations: the critical factors associated with survival.** *Blood* 2009, **114**(11):2273-2279.
295. Akasaka T, Lossos IS, Levy R: **BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma.** *Blood* 2003, **102**(4):1443-1448.
296. Launay E, Pangault C, Bertrand P, Jardin F, Lamy T, Tilly H, Tarte K, Bastard C, Fest T: **High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis.** *Leukemia* 2012, **26**(3):559-562.

Referenzen

297. Green MR, Gentles AJ, Nair RV, Irish JM, Kihira S, Liu CL, Kela I, Hopmans ES, Myklebust JH, Ji H *et al*: **Hierarchy in somatic mutations arising during genomic evolution and progression of follicular lymphoma.** *Blood* 2013.
298. Odegard VH, Schatz DG: **Targeting of somatic hypermutation.** *Nature reviews Immunology* 2006, **6**(8):573-583.
299. Halldorsdottir AM, Fruhwirth M, Deutsch A, Aigelsreiter A, Beham-Schmid C, Agnarsson BA, Neumeister P, Richard Burack W: **Quantifying the role of aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma.** *Leukemia research* 2008, **32**(7):1015-1021.
300. Khodabakhshi AH, Morin RD, Fejes AP, Mungall AJ, Mungall KL, Bolger-Munro M, Johnson NA, Connors JM, Gascoyne RD, Marra MA *et al*: **Recurrent targets of aberrant somatic hypermutation in lymphoma.** *Oncotarget* 2012, **3**(11):1308-1319.
301. Liso A, Capello D, Marafioti T, Tiacci E, Cerri M, Distler V, Paulli M, Carbone A, Delsol G, Campo E *et al*: **Aberrant somatic hypermutation in tumor cells of nodular-lymphocyte-predominant and classic Hodgkin lymphoma.** *Blood* 2006, **108**(3):1013-1020.
302. Rossi D, Berra E, Cerri M, Deambrogi C, Barbieri C, Franceschetti S, Lunghi M, Conconi A, Paulli M, Matolcsy A *et al*: **Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma.** *Haematologica* 2006, **91**(10):1405-1409.
303. Willis TG, Dyer MJ: **The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies.** *Blood* 2000, **96**(3):808-822.
304. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD: **Pathogenesis of follicular lymphoma.** *The Journal of clinical investigation* 2012, **122**(10):3424-3431.

8 Anhang

Anhang 1: Zusammenfassung der mittels Sanger-Sequenzierung bestätigten Mutationen

Fall-Nr.	HämatoSys-Nr	Name der Region	chr	Position (Hg19)	Ref-Base	detekt. Base	Mutationsbeschreibung (angegeben ist die detektierte Mutation und die zugehörige Isoform)
C10ORF12 (n= 9)							
2	SYS-014	C10ORF12_EXON_9	chr10	98741952	G	C	NP_056467:Gly579Arg[+]; Q8N655:Gly269Arg[+]
2	SYS-015	C10ORF12_EXON_9	chr10	98741952	G	C	NP_056467:Gly579Arg[+]; Q8N655:Gly269Arg[+]
12	SYS-053	C10ORF12_EXON_9	chr10	98744566	C	T	Q8N655:Thr1140Met[+]
12	SYS-054	C10ORF12_EXON_9	chr10	98744566	C	T	Q8N655:Thr1140Met[+]
12	SYS-055	C10ORF12_EXON_9	chr10	98744566	C	T	Q8N655:Thr1140Met[+]
16	MPI-771	C10ORF12_EXON_9	chr10	98743121	T	A	STOP_GAINED=Q8N655:Cys658stop[+]
16	MPI-772	C10ORF12_EXON_9	chr10	98743121	T	A	STOP_GAINED=Q8N655:Cys658stop[+]
30	MPI-506	C10ORF12_EXON_9	chr10	98741965	C	A	STOP_GAINED=NP_056467:Ser583stop[+]; Q8N655:Ser273stop[+]
30	SYS-143	C10ORF12_EXON_9	chr10	98741965	C	A	STOP_GAINED=NP_056467:Ser583stop[+]; Q8N655:Ser273stop[+]
CREBBP (n= 51)							
4	SYS-021	CREBBP_EXON_31	chr16	3779308	C	T	Q92793:Val1914Met[-]; NP_001073315:Val1876Met[-]
4	SYS-022	CREBBP_EXON_31	chr16	3779308	C	T	Q92793:Val1914Met[-]; NP_001073315:Val1876Met[-]
29	SYS-037	CREBBP_EXON_30	chr16	3781417	C	T	Q92793:Val1650Ile[-]; NP_001073315:Val1612Ile[-]
29	SYS-038	CREBBP_EXON_30	chr16	3781417	C	T	Q92793:Val1650Ile[-]; NP_001073315:Val1612Ile[-]
27	MPI-773	CREBBP_EXON_29	chr16	3781805	A	C	Q92793:Leu1621Arg[-]; NP_001073315:Leu1583Arg[-]
27	MPI-785	CREBBP_EXON_29	chr16	3781805	A	C	Q92793:Leu1621Arg[-]; NP_001073315:Leu1583Arg[-]
23	SYS-088	CREBBP_EXON_28	chr16	3786117	C	T	Q92793:Glu1550Lys[-]; NP_001073315:Glu1512Lys[-]
23	SYS-089	CREBBP_EXON_28	chr16	3786117	C	T	Q92793:Glu1550Lys[-]; NP_001073315:Glu1512Lys[-]
3	SYS-016	CREBBP_EXON_27	chr16	3786704	A	C	Q92793:Tyr1503Asp[-]; NP_001073315:Tyr1465Asp[-]
3	SYS-017	CREBBP_EXON_27	chr16	3786704	A	C	Q92793:Tyr1503Asp[-]; NP_001073315:Tyr1465Asp[-]
3	SYS-120	CREBBP_EXON_27	chr16	3786704	A	C	Q92793:Tyr1503Asp[-]; NP_001073315:Tyr1465Asp[-]
13	MPI-460	CREBBP_EXON_27	chr16	3786704	A	C	Q92793:Tyr1503Asp[-]; NP_001073315:Tyr1465Asp[-]
16	MPI-771	CREBBP_EXON_27	chr16	3786704	A	C	Q92793:Tyr1503Asp[-]; NP_001073315:Tyr1465Asp[-]
16	MPI-772	CREBBP_EXON_27	chr16	3786704	A	C	Q92793:Tyr1503Asp[-]; NP_001073315:Tyr1465Asp[-]
13	MPI-460	CREBBP_EXON_27	chr16	3786752	G	A	Q92793:His1487Tyr[-]; NP_001073315:His1449Tyr[-]
13	MPI-478	CREBBP_EXON_27	chr16	3786752	G	A	Q92793:His1487Tyr[-]; NP_001073315:His1449Tyr[-]
13	SYS-124	CREBBP_EXON_27	chr16	3786752	G	A	Q92793:His1487Tyr[-]; NP_001073315:His1449Tyr[-]
13	SYS-125	CREBBP_EXON_27	chr16	3786752	G	A	Q92793:His1487Tyr[-]; NP_001073315:His1449Tyr[-]
12	SYS-053	CREBBP_EXON_27	chr16	3786760	A	G	Q92793:Phe1484Ser[-]; NP_001073315:Phe1446Ser[-]
12	SYS-054	CREBBP_EXON_27	chr16	3786760	A	G	Q92793:Phe1484Ser[-]; NP_001073315:Phe1446Ser[-]
12	SYS-055	CREBBP_EXON_27	chr16	3786760	A	G	Q92793:Phe1484Ser[-]; NP_001073315:Phe1446Ser[-]
4	SYS-021	CREBBP_EXON_27	chr16	3786763	A	C	Q92793:Ile1483Ser[-]; NP_001073315:Ile1445Ser[-]
4	SYS-022	CREBBP_EXON_27	chr16	3786763	A	C	Q92793:Ile1483Ser[-]; NP_001073315:Ile1445Ser[-]
37	SYS-107	CREBBP_EXON_27	chr16	3786787	G	C	Q92793:Pro1475Arg[-]; NP_001073315:Pro1437Arg[-]
37	SYS-174	CREBBP_EXON_27	chr16	3786787	G	C	Q92793:Pro1475Arg[-]; NP_001073315:Pro1437Arg[-]
37	SYS-175	CREBBP_EXON_27	chr16	3786787	G	C	Q92793:Pro1475Arg[-]; NP_001073315:Pro1437Arg[-]
24	SYS-090	CREBBP_EXON_26	chr16	3788605	T	C	Q92793:Tyr1450Cys[-]; NP_001073315:Tyr1412Cys[-]
24	SYS-091	CREBBP_EXON_26	chr16	3788605	T	C	Q92793:Tyr1450Cys[-]; NP_001073315:Tyr1412Cys[-]
36	MPI-888	CREBBP_EXON_26	chr16	3788606	A	G	Q92793:Tyr1450His[-]; NP_001073315:Tyr1412His[-]
21	SYS-080	CREBBP_EXON_26	chr16	3788617	C	T	Q92793:Arg1446His[-]; NP_001073315:Arg1408His[-]
21	SYS-081-a	CREBBP_EXON_26	chr16	3788617	C	T	Q92793:Arg1446His[-]; NP_001073315:Arg1408His[-]
21	SYS-081-b	CREBBP_EXON_26	chr16	3788617	C	T	Q92793:Arg1446His[-]; NP_001073315:Arg1408His[-]
22	SYS-086	CREBBP_EXON_26	chr16	3788617	C	T	Q92793:Arg1446His[-]; NP_001073315:Arg1408His[-]
26	MPI-458	CREBBP_EXON_26	chr16	3788618	G	A	Q92793:Arg1446Cys[-]; NP_001073315:Arg1408Cys[-]
26	MPI-462	CREBBP_EXON_26	chr16	3788618	G	A	Q92793:Arg1446Cys[-]; NP_001073315:Arg1408Cys[-]
26	SYS-133	CREBBP_EXON_26	chr16	3788618	G	A	Q92793:Arg1446Cys[-]; NP_001073315:Arg1408Cys[-]
37	SYS-107	CREBBP_EXON_26	chr16	3788618	G	A	Q92793:Arg1446Cys[-]; NP_001073315:Arg1408Cys[-]
31	SYS-004	CREBBP_EXON_26	chr16	3788645	T	A	Q92793:Ile1437Phe[-]; NP_001073315:Ile1399Phe[-]
31	SYS-005	CREBBP_EXON_26	chr16	3788645	T	A	Q92793:Ile1437Phe[-]; NP_001073315:Ile1399Phe[-]
11	MPI-787	CREBBP_EXON_26	chr16	3788650	T	C	Q92793:Asp1435Gly[-]; NP_001073315:Asp1397Gly[-]
11	MPI-909	CREBBP_EXON_26	chr16	3788650	T	C	Q92793:Asp1435Gly[-]; NP_001073315:Asp1397Gly[-]

Anhang

Fall-Nr.	HämatoSys-Nr	Name der Region	chr	Position (Hg19)	Ref-Base	detekt. Base	Mutationsbeschreibung (angegeben ist die detektierte Mutation und die zugehörige Isoform)
2	SYS-014	CREBBP_EXON_26	chr16	3788651	C	T	Q92793:Asp1435Asn[-];NP_001073315:Asp1397Asn[-]
2	SYS-015	CREBBP_EXON_26	chr16	3788651	C	T	Q92793:Asp1435Asn[-];NP_001073315:Asp1397Asn[-]
8	MPI-907	CREBBP_EXON_25	chr16	3789586	T	G	Q92793:Asn1425His[-];NP_001073315:Asn1387His[-]
5	SYS-025	CREBBP_EXON_23	chr16	3794894	C	T	SPLICE_SITE:Q92793[-];NP_001073315[-]
5	SYS-026	CREBBP_EXON_23	chr16	3794894	C	T	SPLICE_SITE:Q92793[-];NP_001073315[-]
35	MPI-871	CREBBP_EXON_22	chr16	3795274	T	A	SPLICE_SITE:Q92793[-];NP_001073315[-]
14	SYS-065	CREBBP_EXON_14	chr16	3820660	G	A	STOP_GAINED=Q92793:Gln931stop[-];NP_001073315:Gln893stop[-]
14	SYS-067	CREBBP_EXON_14	chr16	3820660	G	A	STOP_GAINED=Q92793:Gln931stop[-];NP_001073315:Gln893stop[-]
14	SYS-065	CREBBP_EXON_13	chr16	3823912	C	T	Q92793:Arg768Gln[-];NP_001073315:Arg730Gln[-]
14	SYS-067	CREBBP_EXON_13	chr16	3823912	C	T	Q92793:Arg768Gln[-];NP_001073315:Arg730Gln[-]
EP300 (n= 4)							
24	SYS-090	EP300_EXON_17	chr22	41551061	G	A	Q09472:Asp1069Asn[+]
24	SYS-091	EP300_EXON_17	chr22	41551061	G	A	Q09472:Asp1069Asn[+]
29	SYS-037	EP300_EXON_26	chr22	41565533	G	A	Q09472:Ser1400Asn[+]
29	SYS-038	EP300_EXON_26	chr22	41565533	G	A	Q09472:Ser1400Asn[+]
EZH2 (n= 14)							
9	MPI-774	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508714	T	G	SPLICE_SITE: B727L6[-];Q96F16[-];B2RAQ1[-];Q15910[-];B7Z1D6[-]
9	MPI-779	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508714	T	G	SPLICE_SITE: B727L6[-];Q96F16[-];B2RAQ1[-];Q15910[-];B7Z1D6[-]
9	MPI-774	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508727	T	A	B727L6:Tyr590Phe[-];Q96F16:Tyr646Phe[-];B2RAQ1:Tyr602Phe[-];Q15910:Tyr641Phe[-];B7Z1D6:Tyr632Phe[-]
9	MPI-779	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508727	T	A	B727L6:Tyr590Phe[-];Q96F16:Tyr646Phe[-];B2RAQ1:Tyr602Phe[-];Q15910:Tyr641Phe[-];B7Z1D6:Tyr632Phe[-]
4	SYS-022	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508728	A	T	B727L6:Tyr590Asn[-];Q96F16:Tyr646Asn[-];B2RAQ1:Tyr602Asn[-];Q15910:Tyr641Asn[-];B7Z1D6:Tyr632Asn[-]
6	MPI-777	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508728	A	T	B727L6:Tyr590Asn[-];Q96F16:Tyr646Asn[-];B2RAQ1:Tyr602Asn[-];Q15910:Tyr641Asn[-];B7Z1D6:Tyr632Asn[-]
8	MPI-507	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508728	A	T	B727L6:Tyr590Asn[-];Q96F16:Tyr646Asn[-];B2RAQ1:Tyr602Asn[-];Q15910:Tyr641Asn[-];B7Z1D6:Tyr632Asn[-]
8	MPI-907	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508728	A	T	B727L6:Tyr590Asn[-];Q96F16:Tyr646Asn[-];B2RAQ1:Tyr602Asn[-];Q15910:Tyr641Asn[-];B7Z1D6:Tyr632Asn[-]
27	MPI-773	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508728	A	T	B727L6:Tyr590Asn[-];Q96F16:Tyr646Asn[-];B2RAQ1:Tyr602Asn[-];Q15910:Tyr641Asn[-];B7Z1D6:Tyr632Asn[-]
27	MPI-785	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508728	A	T	B727L6:Tyr590Asn[-];Q96F16:Tyr646Asn[-];B2RAQ1:Tyr602Asn[-];Q15910:Tyr641Asn[-];B7Z1D6:Tyr632Asn[-]
28	MPI-508	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508728	A	T	B727L6:Tyr590Asn[-];Q96F16:Tyr646Asn[-];B2RAQ1:Tyr602Asn[-];Q15910:Tyr641Asn[-];B7Z1D6:Tyr632Asn[-]
28	MPI-510	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508728	A	T	B727L6:Tyr590Asn[-];Q96F16:Tyr646Asn[-];B2RAQ1:Tyr602Asn[-];Q15910:Tyr641Asn[-];B7Z1D6:Tyr632Asn[-]
27	MPI-773	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508749	T	C	B727L6:Lys583Glu[-];Q96F16:Lys639Glu[-];B2RAQ1:Lys595Glu[-];Q15910:Lys634Glu[-];B7Z1D6:Lys625Glu[-]
27	MPI-785	EZH2_Mutation_Y641	chr7	148508749	T	C	B727L6:Lys583Glu[-];Q96F16:Lys639Glu[-];B2RAQ1:Lys595Glu[-];Q15910:Lys634Glu[-];B7Z1D6:Lys625Glu[-]
MEF2B (n= 2)							
19	SYS-071	MEF2B_EXON_6	chr19	19260235	T	C	B8ZZJ5:Thr67Ala[-];NP_001139257:Thr20Ala[-];
1	MPI-475	MEF2B_EXON_5	chr19	19261535	T	C	B8ZZJ5:Lys51Glu[-];NP_001139257:Lys4Glu[-]
MLL2 (n= 60)							
21	SYS-080	MLL2_EXON_53	chr12	49415897	C	A	STOP_GAINED=NP_003473:Glu5484stop[-]
21	SYS-081-a	MLL2_EXON_53	chr12	49415897	C	A	STOP_GAINED=NP_003473:Glu5484stop[-]
21	SYS-081-b	MLL2_EXON_53	chr12	49415897	C	A	STOP_GAINED=NP_003473:Glu5484stop[-]
22	SYS-086	MLL2_EXON_53	chr12	49415897	C	A	STOP_GAINED=NP_003473:Glu5484stop[-]
34	MPI-845	MLL2_EXON_52	chr12	49416133	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg5448stop[-]
26	MPI-462	MLL2_EXON_48	chr12	49420460	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg5448stop[-]
26	SYS-133	MLL2_EXON_48	chr12	49420460	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg5448stop[-]
37	SYS-107	MLL2_EXON_48	chr12	49420576	A	T	NP_003473:Val5058Glu[-]
37	SYS-174	MLL2_EXON_48	chr12	49420576	A	T	NP_003473:Val5058Glu[-]
12	SYS-053	MLL2_EXON_40	chr12	49424741	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg4536stop[-]
18	MPI-908	MLL2_EXON_40	chr12	49424771	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln4326stop[-]
12	SYS-053	MLL2_EXON_39	chr12	49425374	T	A	STOP_GAINED=NP_003473:Lys4372stop[-]
12	SYS-054	MLL2_EXON_39	chr12	49425374	T	A	STOP_GAINED=NP_003473:Lys4372stop[-]
12	SYS-055	MLL2_EXON_39	chr12	49425374	T	A	STOP_GAINED=NP_003473:Lys4372stop[-]
15	SYS-068	MLL2_EXON_39	chr12	49425827	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln4221stop[-]
15	SYS-069	MLL2_EXON_39	chr12	49425827	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln4221stop[-]
15	SYS-127	MLL2_EXON_39	chr12	49425827	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln4221stop[-]
22	SYS-085	MLL2_EXON_39	chr12	49426955	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln3845stop[-]
1	MPI-426	MLL2_EXON_39	chr12	49427450	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln3845stop[-]

Anhang

Fall-Nr.	HämatoSys-Nr	Name der Region	chr	Position (Hg19)	Ref-Base	detekt. Base	Mutationsbeschreibung (angegeben ist die detektierte Mutation und die zugehörige Isoform)
1	MPI-475	MLL2_EXON_39	chr12	49427450	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln3845stop[-]
35	MPI-871	MLL2_EXON_35	chr12	49428593	A	G	ESSENTIAL_SPLICE_SITE=NP_003473[-]
35	MPI-891	MLL2_EXON_35	chr12	49428593	A	G	ESSENTIAL_SPLICE_SITE=NP_003473[-]
35	SYS-167	MLL2_EXON_35	chr12	49428593	A	G	ESSENTIAL_SPLICE_SITE=NP_003473[-]
2	SYS-014	MLL2_EXON_34	chr12	49430938	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln3401stop[-]
2	SYS-015	MLL2_EXON_34	chr12	49430959	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln3394stop[-]
22	SYS-085	MLL2_EXON_34	chr12	49431160	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln3327stop[-]
26	MPI-458	MLL2_EXON_34	chr12	49431466	C	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gly3225stop[-]
11	MPI-787	MLL2_EXON_34	chr12	49432486	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln2885stop[-]
11	MPI-909	MLL2_EXON_34	chr12	49432486	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln2885stop[-]
13	MPI-460	MLL2_EXON_34	chr12	49432738	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2801stop[-]
38	MPI-868	MLL2_EXON_33	chr12	49433060	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2771stop[-]
38	MPI-889	MLL2_EXON_33	chr12	49433060	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2771stop[-]
38	SYS-102	MLL2_EXON_33	chr12	49433060	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2771stop[-]
21	SYS-080	MLL2_EXON_32	chr12	49433388	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2687stop[-]
21	SYS-081-a	MLL2_EXON_32	chr12	49433388	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2687stop[-]
21	SYS-081-b	MLL2_EXON_32	chr12	49433388	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2687stop[-]
22	SYS-086	MLL2_EXON_32	chr12	49433388	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2687stop[-]
29	SYS-037	MLL2_EXON_31	chr12	49433575	C	A	STOP_GAINED=NP_003473:Glu2660stop[-]
29	SYS-038	MLL2_EXON_31	chr12	49433575	C	A	STOP_GAINED=NP_003473:Glu2660stop[-]
4	SYS-021	MLL2_EXON_31	chr12	49433650	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2635stop[-]
4	SYS-022	MLL2_EXON_31	chr12	49433650	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2635stop[-]
6	MPI-777	MLL2_EXON_31	chr12	49433946	A	G	NP_003473:Phe2536Ser[-]
6	MPI-778	MLL2_EXON_31	chr12	49433946	A	G	NP_003473:Phe2536Ser[-]
8	MPI-507	MLL2_EXON_31	chr12	49434142	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2471stop[-]
8	MPI-907	MLL2_EXON_31	chr12	49434142	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Arg2471stop[-]
29	SYS-037	MLL2_EXON_29	chr12	49435753	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln2044stop[-]
29	SYS-038	MLL2_EXON_29	chr12	49435753	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln2044stop[-]
16	MPI-772	MLL2_EXON_27	chr12	49436342	A	C	SPLICE_SITE=NP_003473[-]
31	SYS-004	MLL2_EXON_23	chr12	49437493	T	C	NP_003473:Ser1798Gly[-]
31	SYS-005	MLL2_EXON_23	chr12	49437493	T	C	NP_003473:Ser1798Gly[-]
9	MPI-774	MLL2_EXON_23	chr12	49437526	T	A	STOP_GAINED=NP_003473:Lys1787stop[-]
9	MPI-779	MLL2_EXON_23	chr12	49437526	T	A	STOP_GAINED=NP_003473:Lys1787stop[-]
6	MPI-777	MLL2_EXON_14	chr12	49441789	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln1399stop[-]
6	MPI-778	MLL2_EXON_14	chr12	49441789	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln1399stop[-]
6	MPI-777	MLL2_EXON_10	chr12	49444987	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln827stop[-]
6	MPI-778	MLL2_EXON_10	chr12	49444987	G	A	STOP_GAINED=NP_003473:Gln827stop[-]
20	SYS-077	MLL2_EXON_10	chr12	49445971	C	A	STOP_GAINED=NP_003473:Glu499stop[-]
8	MPI-507	MLL2_EXON_6	chr12	49447270	G	T	STOP_GAINED=NP_003473:Cys276stop[-]
8	MPI-907	MLL2_EXON_6	chr12	49447270	G	T	STOP_GAINED=NP_003473:Cys276stop[-]
19	SYS-070	MLL2_EXON_5	chr12	49447843	G	T	STOP_GAINED=NP_003473:Cys197stop[-]
TNFRSF14 (n= 15)							
6	MPI-777	TNFRSF14_EXON_1	chr1	2488104	A	G	B4DU65:Met1Val[+];B9DI88:Met1Val[+];B9DI89:Met1Val[+]; B9DI88:Met1Val[+]
6	MPI-778	TNFRSF14_EXON_1	chr1	2488104	A	G	B4DU65:Met1Val[+];B9DI88:Met1Val[+];B9DI89:Met1Val[+]; B9DI88:Met1Val[+]
28	MPI-508	TNFRSF14_EXON_1	chr1	2488107	G	T	STOP_GAINED=B4DU65:Glu2stop[+];B9DI88:Glu2stop[+]; B9DI89:Glu2stop[+];B9DI88:Glu2stop[+]
28	MPI-510	TNFRSF14_EXON_1	chr1	2488107	G	T	STOP_GAINED=B4DU65:Glu2stop[+];B9DI88:Glu2stop[+]; B9DI89:Glu2stop[+];B9DI88:Glu2stop[+]
8	MPI-507	TNFRSF14_EXON_1	chr1	2488139	G	A	STOP_GAINED=B4DU65:Trp12stop[+];B9DI88:Trp12stop[+]; B9DI89:Trp12stop[+];B9DI88:Trp12stop[+]
8	MPI-907	TNFRSF14_EXON_1	chr1	2488139	G	A	STOP_GAINED=B4DU65:Trp12stop[+];B9DI88:Trp12stop[+]; B9DI89:Trp12stop[+];B9DI88:Trp12stop[+]
31	SYS-005	TNFRSF14_EXON_1	chr1	2488139	G	A	STOP_GAINED=B4DU65:Trp12stop[+];B9DI88:Trp12stop[+]; B9DI89:Trp12stop[+];B9DI88:Trp12stop[+]
16	MPI-772	TNFRSF14_EXON_2	chr1	2489221	C	G	B4DU65:Cys42Trp[+];B9DI88:Cys42Trp[+];B9DI89:Cys42Trp[+]; B9DI88:Cys42Trp[+]
1	MPI-426	TNFRSF14_EXON_3	chr1	2489899	G	T	B4DU65:Cys99Phe[+];B9DI88:Cys99Phe[+];B9DI89:Cys99Phe[+]; B9DI88:Cys99Phe[+]
1	MPI-475	TNFRSF14_EXON_3	chr1	2489899	G	T	B4DU65:Cys99Phe[+];B9DI88:Cys99Phe[+]; B9DI89(uc001ajr.2):Cys99Phe[+];B9DI88(uc001ajs.2):Cys99Phe[+]
20	SYS-076	TNFRSF14_EXON_4	chr1	2491260	A	T	SPLICE_SITE=B9DI88[+];B9DI89[+];B9DI88[+]
20	SYS-077	TNFRSF14_EXON_4	chr1	2491260	A	T	SPLICE_SITE=B9DI88[+];B9DI89[+];B9DI88[+]
31	SYS-004	TNFRSF14_EXON_4	chr1	2491399	C	T	STOP_GAINED=B9DI88:Gln148stop[+];B9DI89:Gln148stop[+];

Anhang

Fall-Nr.	HämatoSys-Nr	Name der Region	chr	Position (Hg19)	Ref-Base	detekt. Base	Mutationsbeschreibung (angegeben ist die detektierte Mutation und die zugehörige Isoform)
							B9DI88:Gln148stop[+]
24	SYS-090	TNFRSF14_EXON_6	chr1	2493110	A	T	SPLICE_SITE=B9DI89[+]
24	SYS-091	TNFRSF14_EXON_6	chr1	2493110	A	T	SPLICE_SITE=B9DI89[+]
4	SYS-022	TNFRSF14_EXON_8	chr1	2494711	G	C	STOP_LOST=B9DI89:stop284Ser[+]
TP53 (n= 3)							
37	SYS-107	TP53_EXON_4	chr17	7578413	C	T	Q1MSW9:Val173Met[-];Q3LRW4:Val173Met[-];Q3LRW1:Val41Met[-];Q3LRW2:Val41Met[-];Q3LRW3:Val41Met[-];Q3LRW4:Val173Met[-];NP_001119586:Val173Met[-];NP_001119584:Val173Met[-];NP_000537:Val173Met[-];Q3LRW2:Val80Met[-];Q3LRW2:Val41Met[-];Q1MSW9:Val134Met[-];
37	SYS-174	TP53_EXON_4	chr17	7578529	A	C	Q1MSW9:Phe134Cys[-];Q3LRW4:Phe134Cys[-];Q3LRW1:Phe2Cys[-];Q3LRW2:Phe2Cys[-];Q3LRW3:Phe2Cys[-];Q3LRW4:Phe134Cys[-];NP_001119586:Phe134Cys[-];NP_001119584:Phe134Cys[-];NP_000537(uc002gij.2):Phe134Cys[-];Q3LRW2:Phe41Cys[-];Q3LRW2:Phe2Cys[-];Q1MSW9:Phe95Cys[-];
37	SYS-175	TP53_EXON_4	chr17	7578529	A	C	Q1MSW9:Phe134Cys[-];Q3LRW4:Phe134Cys[-];Q3LRW1:Phe2Cys[-];Q3LRW2:Phe2Cys[-];Q3LRW3:Phe2Cys[-];Q3LRW4:Phe134Cys[-];NP_001119586:Phe134Cys[-];NP_001119584:Phe134Cys[-];NP_000537(uc002gij.2):Phe134Cys[-];Q3LRW2:Phe41Cys[-];Q3LRW2:Phe2Cys[-];Q1MSW9:Phe95Cys[-];

Anhang 2: Zusammenfassung aller Ergebnisse aller analysierten Fälle aus Abschnitt 3.3. Stand der Datenanalyse: Dezember 2012.

Fall-Nummer.	Proben-Nummer	interne Nummer	Status	Evolutionstyp (Klonierung und Sanger-Sequenzierung ¹ , 454-Sequenzierung ²)	Anzahl der diskrepanten CpGs mittels 27K bei $\Delta\beta > 0,35$ (%)	Anzahl der diskrepanten CpGs mittels 450K bei $\Delta\beta > 0,35$ (%)	LUMA Methylierungs- wert [%]	Anzahl detektierter Varianten aus NGS- Paar-Anaysen (gemeinsam=G, unterschiedlich=U)
1	Probe-1	MPI-475	Initial	n.a.	1 (0 %)	n.a.	68.8	n.a.
	Probe-2	MPI-426	1. Rezidiv	n.a.				
2	Probe-1	SYS-014	Initial	Sequenziell ¹	61 (0.22 %)	n.a.	71.2	G: 5; U: 3
	Probe-2	SYS-015	1. Rezidiv	Sequenziell ¹				
3	Probe-1	SYS-016	Initial	Parallel ¹	35 (0.13 %)/ 42 (0.15 %)/ 92 (0.33 %)	n.a.	62.5	G: 6; U: 0
	Probe-2	SYS-017	1. Rezidiv	Parallel ¹				
	Probe-3	SYS-120	1. Rezidiv	n.a.				
	Probe-4	SYS-018	2. Rezidiv	Parallel ¹				
4	Probe-1	SYS-021	Initial	n.a.	11 (0.04 %)	n.a.	71.4	n.a.
	Probe-2	SYS-022	1. Rezidiv	n.a.				
5	Probe-1	SYS-025	Initial	Parallel ^{1,2}	314 (1.14 %)	n.a.	68.8	G: 4; U: 9
	Probe-2	SYS-026	1. Rezidiv	Parallel ^{1,2}				
6	Probe-1	MPI-777	Initial	Parallel ¹	536 (1.97 %)	7843 (1.62 %)	71.3	G: 6; U: 21
	Probe-2	MPI-778	1. Rezidiv	Parallel ¹				
7	Probe-1	MPI-775	Initial	keine Evolution ^{1,2}	2 (0.01 %)	93 (0.02 %)	63.2	G: 23; U: 3
	Probe-2	MPI-776	1. Rezidiv	keine Evolution ^{1,2}				
8	Probe-1	MPI-507	Initial	n.a.	116 (0.42 %)	n.a.	66.7	n.a.
	Probe-2	MPI-907	1. Rezidiv	n.a.				
9	Probe-1	MPI-779	Initial	n.a.	17 (0.06 %)	n.a.	n.a.	n.a.
	Probe-2	MPI-774	1. Rezidiv	n.a.				
10	Probe-1	MPI-786	Initial	keine Evolution ¹	3 (0.01 %)	3 (0.0 %)	59.6	G: 18; U: 2
	Probe-2	MPI-784	1. Rezidiv	keine Evolution ¹				
11	Probe-1	MPI-787	Initial	keine Evolution ¹	14 (0.05 %)	369 (0.08 %)	70.0	G: 5; U: 0
	Probe-2	MPI-909	1. Rezidiv	keine Evolution ¹				
12	Probe-1	SYS-053	Initial	Sequenziell ¹	287 (1.04 %)/ 596 (2.35 %)	n.a.	75.5	G: 13; U: 6
	Probe-2	SYS-054	1. Rezidiv	Sequenziell ¹				
	Probe-3	SYS-055	2. Rezidiv	Sequenziell ¹				
13	Probe-1	MPI-478	Initial	Parallel ^{1,2}	254(0.9 %)/ 261 (0.95 %)/ 600 (2.18 %)	7576 (1.56 %)	45.2	G: 4; U: 4
	Probe-2	MPI-460	1. Rezidiv	Parallel ^{1,2}				
	Probe-3	SYS-124	2. Rezidiv	n.a.				
	Probe-4	SYS-125	3. Rezidiv	n.a.				

Anhang

Fall-Nummer.	Proben-Nummer	interne Nummer	Status	Evolutionstyp (Klonierung und Sanger-Sequenzierung ¹ , 454-Sequenzierung ²)	Anzahl der diskrepanten CpGs mittels 27K bei $\Delta\beta > 0,35$ (%)	Anzahl der diskrepanten CpGs mittels 450K bei $\Delta\beta > 0,35$ (%)	LUMA Methylierungs- wert [%]	Anzahl detektierter Varianten aus NGS- Paar-Anaysen (gemeinsam=G, unterschiedlich=U)	
14	Probe-1	SYS-065	Initial	Sequenziell ¹ , keine Ev. ^{2*}	30 (0.11 %)	35 (0.01 %)	65.2	G: 18; U: 4	
	Probe-2	SYS-067	2. Rezidiv	Sequenziell ¹ , keine Ev. ^{2*}			73.2	G: 18; U: 3	
15	Probe-1	SYS-068	Initial	Sequenziell ² /keine Ev. ¹	14 (0.05 %)/ 3 (0.01 %)	n.a.	71.6	G: 11; U: 1	
	Probe-2	SYS-127	Initial	n.a.		n.a.	70.2	n.a.	
	Probe-3	SYS-069	1. Rezidiv	Sequenziell ² /keine Ev. ¹		33 (0.12)	n.a.	67.8	G: 11; U: 1
16	Probe-1	MPI-772	Initial	Parallel ^{1,2}	323 (1.18 %)	4823 (0,99 %)	60.6	G: 6; U: 8	
	Probe-2	MPI-771	1. Rezidiv	Parallel ^{1,2}			69.1	G: 6; U: 10	
17	Probe-1	MPI-867	Initial	n.a.	10 (0.04 %)/ 256 (0.93 %)	n.a.	61.3	n.a.	
	Probe-2	MPI-770	1. Rezidiv	n.a.		n.a.	67.0	n.a.	
	Probe-3	MPI-828	2. Rezidiv	n.a.		525 (1.9 %)	n.a.	57.2	n.a.
18	Probe-1	MPI-523	Initial	unklar ¹ :Sequenziell/keine Ev.	10 (0.04 %)	127 (0.03 %)	71.4	G: 6; U: 2	
	Probe-2	MPI-908	1. Rezidiv	unklar ¹ :Sequenziell/keine Ev.			62.3	G: 6; U: 10	
19	Probe-1	SYS-070	Initial	unklar: keine Ev. ^{1*}	492 (1.79 %)	n.a.	61.4	G: 10; U: 8	
	Probe-2	SYS-071	1. Rezidiv	unklar: keine Ev. ^{1*}		n.a.	65.2	G: 10; U: 1	
20	Probe-1	SYS-076	Initial	Sequenziell ^{1,2}	92 (0.34 %)	n.a.	75.1	G: 6; U: 0	
	Probe-2	SYS-077	1. Rezidiv	Sequenziell ^{1,2}		n.a.	75.7	G: 6; U: 2	
21	Probe-1	SYS-080	Initial	n.a.	25 (0.1 %)/ 58 (0.2 %)/ 2626 (9.64 %)	n.a.	72.8	n.a.	
	Probe-2.a	SYS-081.a	1. Rezidiv	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.	
	Probe-2.b	SYS-081.b	1. Rezidiv	n.a.		15 (0.06 %)/ 2593 (9.51 %)	n.a.	66.3	n.a.
	Probe-3	SYS-082	2. Rezidiv	n.a.		2045 (7.6 %)	n.a.	64.8	n.a.
22	Probe-1	SYS-085	Initial	n.a.	4214 (15,3 %)	n.a.	75.0	n.a.	
	Probe-2	SYS-086	1. Rezidiv	n.a.		n.a.	72.8	n.a.	
23	Probe-1	SYS-088	Initial	unklar ¹ :keine Ev./Parallel	57 (0.22 %)/ 192 (0.7 %)	n.a.	67.6	G: 4; U: 1	
	Probe-2	SYS-089	1. Rezidiv	unklar ¹ :keine Ev. Parallel		n.a.	34.2	G: 4; U: 7	
	Probe-3	SYS-132	2. Rezidiv	n.a.		307 (1.17 %)	n.a.	47.5	n.a.
24	Probe-1	SYS-090	1. Rezidiv	Sequenziell ^{1,2}	131 (0.55 %)	n.a.	64.9	G: 12; U: 0	
	Probe-2	SYS-091	2. Rezidiv	Sequenziell ^{1,2}		n.a.	48.4	G: 12; U: 1	
25**	Probe-1	SYS-095	Initial	n.a.	241 (0.8 %)/ 286 (1.04 %)	n.a.	n.a.	n.a.	
	Probe-2	MPI-509	1. Rezidiv	Parallel ¹		n.a.	n.a.	G: 1; U: 10	
	Probe-3	MPI-906	3. Rezidiv	Parallel ¹		207 (0.75 %)	n.a.	n.a.	G: 1; U: 8
26	Probe-1	MPI-458	Initial	Sequenziell ² /Parallel ¹	880 (3.27 %)/ 1705 (6.2 %)	n.a.	74.2	G: 8; U: 4	
	Probe-2	SYS-133	1. Rezidiv	n.a.		n.a.	67.5	n.a.	
	Probe-3	MPI-462	2. Rezidiv	Sequenziell ² /Parallel ¹		232 (0.86 %)	n.a.	61.0	G: 8; U: 10
27	Probe-1	MPI-773	1. Rezidiv	n.a.	58 (0.21 %)	n.a.	67.5	G ; U:	
	Probe-2	MPI-785	2. Rezidiv	n.a.		n.a.	56.4	G ; U:	
28	Probe-1	MPI-508	Initial	keine Evolution ¹	47 (0.17 %)	n.a.	73.3	G: 20; U: 4	
	Probe-2	MPI-510	1. Rezidiv	keine Evolution ¹		n.a.	56.3	G: 20; U: 4	
29	Probe-1	SYS-037	Initial	n.a.	0 (0 %)	n.a.	69.2	n.a.	
	Probe-2	SYS-038	Initial	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.	
30	Probe-1	MPI 506	1. Rezidiv	keine Evolution ¹	106 (0.39 %)	n.a.	59	G: 19; U: 2	
	Probe-2	SYS-143	2. Rezidiv	keine Evolution ¹		n.a.	49	G: 19; U: 0	
31	Probe-1	SYS-004	Initial	n.a.	2218 (8.06 %)	n.a.	68.5	n.a.	
	Probe-2	SYS-005	1. Rezidiv	n.a.		n.a.	43.3	n.a.	
32	Probe-1	SYS-083	Initial	n.a.	49 (0.19 %)	n.a.	n.a.	n.a.	
	Probe-2	SYS-084	1. Rezidiv (7 Tage Unterschied)	n.a.		n.a.	n.a.	n.a.	
33	Probe-1	SYS-063	1. Rezidiv	n.a.	4 (0.01 %)/ 3063 (11.4 %)	n.a.	n.a.	n.a.	
	Probe-2	SYS-064	2. Rezidiv	Parallel ² /Sequenziell. ^{1*}		n.a.	n.a.	n.a.	
	Probe-3	MPI-885	3. Rezidiv	Parallel ² /Sequenziell. ^{1*}		1392 (5.2 %)	n.a.	57.6	n.a.
34	Probe-1	MPI-845	Initial	n.a.	4459 (16.26 %)	n.a.	39.4	n.a.	
	Probe-2	SYS-115	1. Rezidiv (6 Tage Unterschied)	n.a.		n.a.	61.4	n.a.	
35	Probe-1	SYS-167	Initial	n.a.	165 (0.6 %)/ 151 (0.5 %)	n.a.	65.1	n.a.	
	Probe-3	MPI-871	3. Rezidiv	Sequenziell ¹ /Parallel ²		1128 (0.23 %)	69.8	G: 31; U: 35	
	Probe-4	MPI-891	4. Rezidiv	Sequenziell ¹ /Parallel ²		70 (0.25 %)	n.a.	61.0	G: 31; U: 7
36	Probe-1	MPI-886	Initial	n.a.	54 (0.2 %)	n.a.	71.1	n.a.	
	Probe-2	MPI-888	1. Rezidiv	n.a.		n.a.	70.04	n.a.	
37	Probe-1	SYS-107	1. Rezidiv	n.a.	2113 (7.7 %)/ 91 (0.3 %)/ 120 (0.44 %)	n.a.	39.1	n.a.	
	Probe-2	SYS-148	2. Rezidiv	n.a.		n.a.	72.3	n.a.	

Anhang

Fall-Nummer.	Proben-Nummer	interne Nummer	Status	Evolutionstyp (Klonierung und Sanger-Sequenzierung ¹ , 454-Sequenzierung ²)	Anzahl der diskrepanten CpGs mittels 27K bei $\Delta\beta > 0,35$ (%)	Anzahl der diskrepanten CpGs mittels 450K bei $\Delta\beta > 0,35$ (%)	LUMA Methy- lierungs- wert [%]	Anzahl detektierter Varianten aus NGS- Paar-Anaysen (gemeinsam=G, unterschiedlich=U)
	Probe-3	SYS-174	3. Rezidiv	n.a.	983 (3.4 %)/ 633 (2.3 %)	n.a.	66.1	n.a.
	Probe-4	SYS-175	3. Rezidiv	n.a.	5 (0.02 %)	n.a.	60.3	n.a.
38	Probe-1	SYS-102	Initial	n.a.	378 (1.4 %)/ 49 (0.2 %)/ 206 (0.75 %)	n.a.	74.8	n.a.
	Probe-2	MPI-868	1. Rezidiv	keine Evolution ^{1,2}		n.a.	57.2	G: 14; U: 4
	Probe-3	MPI-889	2. Rezidiv	keine Evolution ^{1,2}	506 (1.8 %)/ 562 (2.07 %)	n.a.	64.6	G: 14; U: 4
	Probe-4	SYS-166 **	2. Rezidiv	n.a.	474 (1.7 %)	n.a.	66.9	n.a.

* möglicherweise Labelvertauschung deshalb Evolutionstyp nicht eindeutig zuzuordnen; ** Fall-Nr.25 und SYS-166 aufgrund möglicher Vertauschung aus allen Analysen ausgeschlossen; n.a.: nicht analysiert.

9 Danksagung

Ich möchte mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation auf vielfältigste Weise unterstützt haben:

Bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Arnold für die Übernahme des Hauptreferates und die Betreuung meiner Doktorarbeit,

bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Scheidig für die Übernahme des Zweitgutachtens,

bei Herrn Prof. Dr. med. Reiner Siebert für das interessante Dissertationsthema und die sich daraus ergebene intensive Mitwirkung an dem „HämatoSys-Projekt“. Weiterhin bedanke ich mich für die Betreuung und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Ich danke allen Kooperationspartnern des „HämaotSys“-Work-projects (WP) 3.3 für die konstruktive Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft. Mein besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Monika Szczepanoswski und Olivera Bartic für die hilfsbereite Unterstützung und Betreuung beim Anfertigen der Schnitte am Kryotom und Extraktion der DNA im Institut für Pathologie. Darüber hinaus danke ich allen Kooperationspartnern aus Leipzig, insbesondere Dipl. Inf. Markus Kreuz für die Durchführung der bioinformatischen Analysen und die konstruktive Zusammenarbeit, sowie Herrn Prof. Dr. Löffler für die interessanten und in Erinnerung gebliebenen Leipziger Verbundtreffen mit gemütlichem Beisammensein in der Baumwollspinnerei.

Ein weiterer ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ole Ammerpohl, der mir nicht mit vielen hilfreichen Ratschlägen, sondern auch bei der Niederschrift dieser Arbeit begleitend zur Seite stand und vor allem früh morgens immer ein guter Ansprechpartner war.

Für die Hilfe bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten und die gute Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich bei Claudia Becher, Gabi Riesen, Ute Jacobsen, Dorit Schuster und Raina Zühlke-Jenisch bedanken.

Dr. rer. nat. Julia Richter, Dr. med. Anke Bergmann, Dr. rer. nat. Inga Nagel, Dr. rer. nat. Inga Vater danke ich für die hilfreiche Kritik und das kritische Korrekturlesen dieser Arbeit.

Desweiteren danke ich Dipl. Biol. Jana Gutwein, Dipl. Mol. Med. Julia Kolarova, Dipl. Mol. Biomed. Rabea Wagener, Dr. med. Susanne Bens, Kerstin Runde und Cordula Fischer für das harmonische und angenehme Arbeitsumfeld.

Danksagung

Ein weiterer Dank gilt allen Teilnehmern meiner Sportstunden, die ein besonderer, und vor allem Kraft- und Motivationsgebender Ausgleich zur Labor- und Schreibtischarbeit waren,

Gudrun Donoth, für ihr Vertrauen in mich und die Möglichkeit, dass ich um ihr Pferd Mo (Rasmodin) kümmern darf,

sowie meinen Freunden von „zu Hause“ Annika Spille, Henrike Vogt, Jasmin Volkmann und Dorothea Ruthenberg, die mich seit der Kindergartenzeit begleiten.

Ich danke meiner Familie insbesondere für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und ihre Ermutigung, die sie mir trotz der großen Entfernung und meiner fachspezifischen Dissertation entgegengebracht haben.

Vor allem aber geht mein allergrößter Dank an meinen Freund Joscha Kleber, der mir immer mit Rat und Zuspruch zur Seite stand, mich aufgefangen und ermutigt hat in allen Phasen dieser Doktorarbeit und den dazugehörigen Hochs und Tiefs und mir damit immer wieder viel Kraft und Unterstützung in jeglicher Weise gegeben hat.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Andrea Haake
Akademischer Grad	Diplom-Biochemikerin (Dipl-Biochem.)
Anschrift	Holtenauer Str. 325 24106, Kiel
Geburtstag	19.06.1981
Geburtsort	Oldenburg, Niedersachsen
Familienstand	ledig

Schulbildung und beruflicher Werdegang

1987-1991	Grundschule, Hahn-Lehmden
1991-1993	Orientierungsstufe, Rastede
1993-2000	Kooperative Gesamtschule, Rastede
2000	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2000-2003	Ausbildung zur Biologielaborantin in Oldenburg im Institut für Tiergesundheit der LUFA Nord-West, Oldenburg
2003-2004	Angestellte Biologielaborantin im Bereich Mikrobiologie und Molekularbiologie des Institutes für Futtermittel der LUFA Nord-West, Oldenburg
2004-2009	Studium Molekularbiologie und Biochemie (Diplom) an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel,
2008	Diplom-Hauptprüfung 1. Hauptfach: Biochemie/ Molekularbiologie 2. Hauptfach: Humangenetik
10/2007-02/2008	Projektarbeit am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
10/2008-06/2009	Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Titel: „Konstitutionelle und Somatische Veränderungen der DNA-Methylierung an imprinteten Genorten“
07/2009-12/2012	wissenschaftliche Angestellte am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit Zielrichtung Promotion
seit 02/2013	studentische Hilfskraft am Institut für Humangenetik der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

11 Publikationsliste

Originalarbeiten und Letter:

Ammerpohl, O., **A. Haake**, S. Pellissery, M. Giefing, J. Richter, B. Balint, M. Kulis, J. Le, M. Bibikova, H. G. Drexler, M. Seifert, R. Shaknovic, B. Korn, R. Kuppers, J. I. Martin-Subero and R. Siebert. "Array-Based DNA Methylation Analysis in Classical Hodgkin Lymphoma Reveals New Insights into the Mechanisms Underlying Silencing of B Cell-Specific Genes." *Leukemia* 26, no. 1 (2012): 185-8.

Ammerpohl, O., J. Pratschke, C. Schafmayer, **A. Haake**, W. Faber, O. von Kampen, M. Brosch, B. Sipos, W. von Schonfels, K. Balschun, C. Rocken, A. Arlt, B. Schniewind, J. Grauholm, H. Kalthoff, P. Neuhaus, F. Stickel, S. Schreiber, T. Becker, R. Siebert and J. Hampe. "Distinct DNA Methylation Patterns in Cirrhotic Liver and Hepatocellular Carcinoma." *Int J Cancer* 130, no. 6 (2012): 1319-28.

Barbaro, M., S. Bens, **A. Haake**, M. Peter, J. Bramswig, P. M. Holterhus, J. P. Lopez-Siguero, U. Menken, M. Mix, W. G. Sippell, A. Wedell and F. G. Riepe. "Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Analysis of the Nr0b1(Dax1) Locus Enables Explanation of Phenotypic Differences in Patients with X-Linked Congenital Adrenal Hypoplasia." *Horm Res Paediatr* 77, no. 2 (2012): 100-7.

Begemann, M., S. Spengler, D. Kanber, **A. Haake**, M. Baudis, I. Leisten, G. Binder, S. Markus, T. Rupprecht, H. Segerer, S. Fricke-Otto, R. Muhlenberg, R. Siebert, K. Buiting and T. Eggermann. "Silver-Russell Patients Showing a Broad Range of Icr1 and Icr2 Hypomethylation in Different Tissues." *Clin Genet* 80, no. 1 (2011): 83-8.

Bens, S., **A. Haake**, H. Tonnies, I. Vater, U. Stephani, P. M. Holterhus, R. Siebert and A. Caliebe. "A De Novo 1.1mb Microdeletion of Chromosome 19p13.11 Provides Indirect Evidence for Eps15l1 to Be a Strong Candidate for Split Hand Split Foot Malformation." *Eur J Med Genet* 54, no. 5 (2011): e501-4.

Bonzheim, I., I. Salaverria, **A. Haake**, G. Gastl, P. Adam, R. Siebert, F. Fend and L. Quintanilla-Martinez. "A Unique Case of Follicular Lymphoma Provides Insights to the Clonal Evolution from Follicular Lymphoma in Situ to Manifest Follicular Lymphoma." *Blood* 118, no. 12 (2011): 3442-4.

Eckmann-Scholz, C., S. Gesk, I. Nagel, **A. Haake**, S. Bens, S. Heidemann, M. Kautza, C. Timke, R. Siebert and A. Caliebe. "Conflicting Results of Prenatal Fish with Different Probes for Down's Syndrome Critical

Publikationsliste

Regions Associated with Mosaicism for a De Novo Del(21)(Q22) Characterised by Molecular Karyotyping: Case Report." *Mol Cytogenet* 3, (2010): 16.

Herrmann, A., **A. Haake**, O. Ammerpohl, I. Martin-Guerrero, K. Szafranski, K. Stemshorn, M. Nothnagel, S. K. Kotsopoulos, J. Richter, J. Warner, J. Olson, D. R. Link, S. Schreiber, M. Krawczak, M. Platzer, P. Nurnberg, R. Siebert and J. Hampe. "Pipeline for Large-Scale Microdroplet Bisulfite Pcr-Based Sequencing Allows the Tracking of Hepitype Evolution in Tumors." *PLoS One* 6, no. 7 (2011): e21332.

Pellissery, S., J. Richter, **A. Haake**, M. Montesinos-Rongen, M. Deckert and R. Siebert. "Somatic Mutations Altering Tyr641 of Ezh2 Are Rare in Primary Central Nervous System Lymphoma." *Leuk Lymphoma* 51, no. 11 (2010): 2135-6.

Bens, S., **A. Haake**, J. Richter, J. Leohold, J. Kolarova, I. Vater, F.G. Riepe, K. Buiting, T. Eggermann, G. Gillessen-Kaesbach, K. Platzer, D. Prawitt, A. Caliebe, R. Siebert. "Frequency and characterization of DNA methylation defects in children born SGA". *European journal of human genetics* 10, no. 262 (2012):1-6.

veröffentlichte Tagungsbeiträge:

Haake, A., J.Richter, O. Ammerpohl, J.I. Martin-Subero, R.Siebert. „Loss of Imprinting is a recurrent phenomenon in malignant lymphoma cell lines“. 20. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), 1.-3. April 2009, Aachen, Deutschland, Medizinische Genetik, Heft 1, März 2009.

Haake, A., J.I. Martin-Subero, O. Ammerpohl, J. Richter, R. Shaknovic, A. Melnick, C. Caldwell, M. Seifert, R. Küppers, B. Korn, R. Siebert. „DNA methylation patterns in classical Hodgkin as compared to other B-cell lymphoma cell lines“. 4. Mildred Scheel Cancer Conference, 19.-21. Mai 2010, Königswinter bei Bonn, Deutschland,

Haake, A., I. Nagel, J. Richter, O. Ammerpohl, J. I. Martin-Subero, G. Gillessen-Kaesbach, R. Siebert. „Methylation analysis of the imprinted *MEG3* locus supports the random parental origin of the del(14)(q24q32) in B-cell malignancies“. 21. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), 2.-4. März 2010, Hamburg, Deutschland, Medizinische Genetik, Heft 1, März 2010.

Haake, A., J. I. Martin-Subero, O. Ammerpohl, J. Richter, I. Nagel, A. Caliebe, G. Gillessen-Kaesbach, R. Siebert. „DNA methylation mapping of the *DLK1* locus in 14q32“. 22. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), 16.-18. März 2011, Regensburg, Deutschland, Medizinische Genetik, Heft 1, März 2011.

Publikationsliste

Haake, A., M. Kreuz, H. Trautmann, L. Theil, M. Szczepanowski, K. Koch, D. Herrmann, R. Küppers, R. Scholtysik, W. Klapper, C. Arnold, D. Hasenclever, M. Löffler, C. Pott, R. Siebert. „Longitudinal study of t(14;18) positive Follicular Lymphomas identifies different patterns of genetic and epigenetic evolution“. 23. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) gemeinsam mit der European Journal of Human Genetics (ESHG), 23.-26. Juni 2012, Nürnberg, Deutschland.

Bens S, J. Kolarova, **A. Haake**, J. Richter, T. Eggermann, K. Buiting, S. Thiele-Schmitz, G. Gillessen-Kaesbach, D. Prawitt, O. Ammerpohl, B. Horsthemke, R. Siebert, A. Caliebe. „Frequency and Characterization of Multiple Locus Methylation Defects (MLMD) amongst patients with classical Imprinting disorders“. 23. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) gemeinsam mit der European Journal of Human Genetics (ESHG), 23.-26. Juni 2012, Nürnberg, Deutschland.

Bens S, J. Kolarova, **A. Haake**, J. Richter, J. Leohold, I. Vater, F.G. Riepe, K. Buiting, T. Eggermann, G. Gillessen-Kaesbach, K. Platzer, D. Prawitt, A. Caliebe, R. Siebert. „DNA-Methylierungsanalysen bei SGA-geborenen Kindern im Rahmen des BMBF-geförderten Imprintingnetzwerks “Diseases caused by imprinting defects: clinical spectrum and pathogenetic mechanisms“. 30. Norddeutsches Humangenetiker Treffen, 5. November 2012, Bremen, Deutschland.

Siebert, R., J. Richter, A. Bergmann, J. Gutwein, J. Kolarova, **A. Haake**, B. Radlwimmer, D. Kabelitz, M. Schrappe, P. Lichter, O. Ammerpohl. „DNA-Methylation Profiling of Normal and Malignant B- and T-Cells. Blueprint-Epigenome: International Human Epigenome Consortium (IHEC)-Treffen, 6.-8. September, Seoul, Südkorea.

Trautmann H., D. Herrmann, **A. Haake**, C. Arnold, M. Füllgrabe, M. Kreuz, M. Szczepanowski, M. Brüggemann, M. Kneba, W. Klapper, D. Hasenclever, M. Löffler, R. Siebert, R. Küppers, C. Pott. „Patterns of clonal evolution in follicular lymphomas detected by 454 next-generation-sequencing of immunoglobulin heavy chain genes“. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie (DGHO), 19-23. Oktober 2012, Stuttgart, Deutschland.

Bens S, **A. Haake**, J. Richter, J. Leohold, J. Kolarova, G. Gillessen-Kaesbach, K. Buiting, A. Caliebe, R. Siebert. „Frequency of altered DNA methylation at imprinted loci in children born SGA“. 23. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH) gemeinsam mit der European Journal of Human Genetics (ESHG), 23.-26. Juni 2012, Nürnberg, Deutschland, Medizinische Genetik, Heft 1, Juni 2012.

Buiting K., J. Beygo, L. Neumann, **A. Haake**, S. Bens, B. Horsthemke. „Angelman and Prader-Willi syndromes.“ Idibell Cancer Conference (ICC) on Genomic Imprinting and Beyond, Tagung, 21.-23. September 2011, Barcelona, Spanien.

Publikationsliste

Lohmann K., H. Tönnies, S. B. Bressman, I. Nagel, A. Rakovic, **A. Haake**, J. I. Martín Subero, K. Wiegers, F. Hinrichs, Y. Hellenbroich, D. Raymond, L. J. Ozelius, E. Schwinger, R. Siebert, R. Saunders-Pullman, C. Klein. „Mechanism of recurrent expansion of a 700 kb deletion on chromosome 14q causing dopa-responsive dystonia and ptosis“. American Society of Human Genetics (ASHG)-Tagung, 11-15. Oktober 2011, Montreal, Canada.

Bens S., **A. Haake**, H. Tönnies, I. Vater, U. Stephani, P. M. Holterhus, R. Siebert, A. Caliebe. „A *de novo* 1.1 Mb microdeletion of chromosome 19p13.11 narrows down the candidate region for split hand split foot malformation and tetralogy of Fallot to *EPS15L1* and *CALR3*“. 22. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), 16.-18. März 2011, Regensburg, Deutschland, Medizinische Genetik, Heft 1, März 2011.

Glodek A., M. Szaumkessel, J. Richter, **A. Haake**, O. Ammerpohl, R. Siebert, M. Giefing. „Pyrosequencing based methylation analysis of the *CHD2*, *GNG7*, *IRF4* and *SYK* genes in classical Hodgkin lymphoma cell lines“. 22. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), 16.-18. März 2011, Regensburg, Deutschland, Medizinische Genetik, Heft 1, März 2011.

Caliebe A., J. Richter, O. Ammerpohl, **A. Haake**, D. Kanber, K. Buiting, I. Vater, H. Tönnies, I. Nagel, J. I. Martín-Subero, C. von Kaisenberg, M. Kautza, L. Seidmann, F. Riepe, S. Metzger, D. Mackay, N. Sebire, E. Jüttner, B. Horsthemke, K. Temple, R. Siebert. „A familial disorder with genome-wide disturbance of DNA methylation at both paternally and maternally imprinted loci“. 22. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik (GfH), 16.-18. März 2011, Regensburg, Deutschland, Medizinische Genetik, Heft 1, März 2011.

12 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit, abgesehen von der Beratung durch meine Betreuer, nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Diese Arbeit wurde bis jetzt weder ganz noch teilweise einer anderen Stelle im Rahmen des Promotionsverfahrens vorgelegt.

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits publiziert (siehe Abschnitt 11-Publikationsliste). Eine Verfügung über das Recht zur Zweitveröffentlichung für die in Abschnitt 3.1.1 und Abschnitt 3.2.1 aufgeführten Beiträge von den jeweiligen Verlagen (Blood und PLOSOne) vor.

Diese Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Kiel, den