

Aus dem Institut für Humangenetik
(kommissarische Direktorin: PD Dr. med. Almuth Caliebe)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Epigenetische Voralterung bei Keimzentrums-B-Zell-Lymphomen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Nina Stamer
aus Göttingen

Kiel 2019

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Ole Ammerpohl

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. Ilske Oschlies

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2020

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 28.02.2020

gez.: Prof. Dr. med. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Die Epigenetik moduliert die Genexpression	1
1.2 DNA-Methylierung und weitere epigenetische Mechanismen.....	1
1.3 Das Epigenom verändert sich während des Alterungsprozesses.....	5
1.3.1 Charakteristische Veränderungen der DNA-Methylierung während des Alterns.....	5
1.3.2 Schätzung des chronologischen Alters anhand des DNA-Methylierungsmusters	5
1.4 Tumorzellen weisen ein aberrantes DNA-Methylierungsmuster auf	6
1.5 Tumore weisen epigenetische Altersabweichungen auf	7
1.6 Während der B-Zell-Reifung kommt es zu Genumlagerungen und somatischer Hypermethylierung	8
1.7 Keimzentrums-B-Zell-Lymphome	10
1.7.1 Keimzentrums-B-Zell-Lymphome entstehen aus B-Zell-Reifestadien.....	10
1.7.2 Burkitt-Lymphom.....	11
1.7.3 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom.....	12
1.7.4 Follikuläres Lymphom.....	13
1.8 Zielsetzung der Arbeit und Hintergründe.....	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Probenmaterial.....	16
2.1.1.1 Gesunde Blutproben als Kontrollkohorte	16
2.1.1.1.1 Blutproben aus der Studie von Kolarova et al.....	17
2.1.1.1.2 Blutproben aus der Studie von Friemel et al.....	18
2.1.1.1.3 Blutproben aus dem Projekt „Schlaf, Arbeit und deren Konsequenzen für menschliche Stoffwechselkrankheiten“	18
2.1.1.2 Gesunde B-Zell-Reifestadien-Proben als Kontrollkohorte	19

2.1.1.2.1	Keimzentrums-B-Zell-Proben des Arbeitspakets WPN des ICGC MMML-Seq-Projektes	20
2.1.1.2.2	Späte B-Zell-Reifestadien-Proben aus der Studie von Kulis et al.....	20
2.1.1.2.3	Frühe B-Zell-Reifestadien-Proben aus der Studie von Lee et al.....	21
2.1.1.3	Keimzentrums-B-Zell-Lymphomproben	22
2.1.1.3.1	KZB-Lymphomproben aus dem Verbundprojekt „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen"	23
2.1.1.3.2	KZB-Lymphomproben aus dem ICGC MMML-Seq-Projekt.....	24
2.1.1.3.3	Formalin-fixierte BL-Proben aus der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister Kiel	25
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	26
2.1.3	Kits	27
2.1.4	Instrumente und Geräte.....	27
2.1.5	Software	28
2.1.6	Lösungen	28
2.2	Methoden.....	29
2.2.1	Klassifikation der Lymphomproben.....	29
2.2.2	Überprüfung der Proben anhand der Einschlusskriterien für diese Arbeit	30
2.2.2.1	Ausschluss von Lymphomproben anderer Entitäten sowie bei niedrigem Tumorzellgehalt.....	30
2.2.2.2	Ausschluss von Rezidivproben	30
2.2.2.3	Ausschluss von Co-Zwillingsproben.....	31
2.2.3	Bisulfitkonvertierung der genomischen DNA.....	31
2.2.4	Analyse der DNA-Methylierung mit dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip. 33	
2.2.5	Normalisierung der Methylierungsdaten mit der GenomeStudio-Software	37
2.2.6	Qualitätskontrolle der Methylierungsdaten	38
2.2.6.1	Qualitätskontrolle der detektierten Signalintensitäten sowie Ausschluss von Loci . 38	
2.2.6.2	Qualitätskontrolle der Verteilung der Beta-Werte	39
2.2.6.3	Qualitätskontrolle zur Identitätsprüfung der Proben	39

2.2.7	Bildung des Mittelwertes der Beta-Werte bei mehrfach hybridisierten Proben.....	40
2.2.8	Bestimmung des DNAm Alters nach Horvath.....	40
2.2.9	Bioinformatische Auswertung.....	41
2.2.9.1	Analyse von Batch-Effekten in Qlucore Omics Explorer.....	41
2.2.9.2	Statistische Analyse des chronologischen und DNAm Alters mit R.....	42
2.2.9.2.1	Berechnung des Δ -Alters.....	42
2.2.9.2.2	Prüfung der Verteilung der Stichproben mit dem Shapiro-Wilk-Test.....	42
2.2.9.2.3	Lage- und Streuungsmaße der Stichproben.....	42
2.2.9.2.4	Auswahl der statistischen Tests.....	43
2.2.9.2.5	Vergleich von chronologischem und DNAm Alter mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest.....	43
2.2.9.2.6	Korrelationsanalyse mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten.....	43
2.2.9.2.7	Gleitender Mittelwert als Trendlinie im Streudiagramm.....	44
2.2.9.2.8	Lineare Regressionsanalyse des Δ -Alters über dem chronologischen Alter.....	44
2.2.9.2.9	Vergleich des Δ -Alters zwischen den Probengruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest.....	44
2.2.9.3	Bioinformatische Auswertung der Methylierungsdaten mit Qlucore Omics Explorer.....	45
2.2.9.3.1	Normalisierung der Methylierungsdaten im Qlucore Omics Explorer.....	45
2.2.9.3.2	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis).....	45
2.2.9.3.3	Heatmaps und hierarchische Clusteranalysen.....	46
2.2.9.3.4	Statistisches Testen im Qlucore Omics Explorer.....	46
2.2.9.3.5	Differentielle Methylierungsanalyse.....	47
2.2.9.4	Analyse der altersassoziierten CpG-Loci nach Hannum.....	47
2.2.9.5	Genontologie-Analyse mit GOrilla.....	48
3	Ergebnisse	49
3.1	Ausschluss von Proben bei Nichterfüllung der Einschlusskriterien.....	49
3.2	Qualitätskontrolle der Methylierungsdaten.....	50

3.2.1	Qualitätskontrolle der detektierten Signalintensitäten sowie Ausschluss von Loci	50
3.2.2	Ausschluss von Proben mit unimodaler Verteilung der Betawerte	50
3.2.3	Ausschluss von Proben bei möglicher Probenvertauschung	51
3.2.4	Bildung des Mittelwertes der Beta-Werte bei mehrfach hybridisierten Proben.....	51
3.2.5	In der Analyse von Batch-Effekten clustern die FFPE-BL-Proben zusammen	51
3.3	Bestimmung des DNAm Alters nach Horvath	53
3.4	Statistische Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters in R	54
3.4.1	Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Blutproben	54
3.4.1.1	Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der Blutproben	54
3.4.1.2	Das DNAm Alter der Blutproben lag im Median 2,9 Jahre über dem chronologischen Alter	55
3.4.1.3	Das DNAm Alter der Blutproben korrelierte mit dem chronologischen Alter	56
3.4.1.4	Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und Δ -Alter der Blutproben...	56
3.4.1.5	Lineare Regression des Δ -Alters über dem chronologischen Alter der Blutproben .	57
3.4.2	Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der naiven B-Zellen.....	57
3.4.2.1	Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der naiven B-Zell-Proben.....	58
3.4.2.2	Verteilung des Δ -Alters der naiven B-Zell-Proben.....	58
3.4.3	Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Keimzentrums-B-Zellen.....	58
3.4.3.1	Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der Keimzentrums-B-Zell-Proben	59
3.4.3.2	Das DNAm Alter der Keimzentrums-B-Zell-Proben lag im Median 9,3 Jahre über dem chronologischen Alter	59
3.4.4	Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Plasmazellen	59
3.4.4.1	Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der Plasmazell-Proben.....	60
3.4.4.2	Das DNAm Alter der Plasmazell-Proben lag im Median 6,4 Jahre über dem chronologischen Alter	60
3.4.5	Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der B-Gedächtniszellen	61
3.4.5.1	Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der B-Gedächtniszell-Proben....	61
3.4.5.2	Verteilung des Δ -Alters der B-Gedächtniszell-Proben.....	61

3.4.6	Auswertung der frühen B-Zell-Reifestadien.....	62
3.4.7	Verlauf des DNAm Alters über dem chronologischen Alter der B-Zell-Reifestadien	62
3.4.8	Vergleich des Δ -Alters zwischen den späten B-Zell-Reifestadien	62
3.4.9	Vergleich des Δ -Alters zwischen den Blutproben und den späten B-Zell-Reifestadien	64
3.4.10	Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Burkitt Lymphom-Proben	65
3.4.10.1	Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der BL-Proben.....	65
3.4.10.2	Das DNAm Alter der BL-Proben liegt im Median 45,6 Jahre über dem chronologischen Alter	66
3.4.10.3	Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und DNAm Alter der BL-Proben	67
3.4.10.4	Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der BL-Proben	67
3.4.11	Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der DLBCL-Proben	68
3.4.11.1	Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der DLBCL-Proben.....	68
3.4.11.2	Das DNAm Alter der DLBCL-Proben liegt im Median 18,5 Jahre über dem chronologischen Alter	69
3.4.11.3	Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und DNAm Alter der DLBCL-Proben.....	69
3.4.11.4	Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der DLBCL-Proben.....	69
3.4.12	Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Follikulären Lymphom-Proben	70
3.4.12.1	Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der FL-Proben	70
3.4.12.2	Das DNAm Alter der FL-Proben lag im Median 14,9 Jahre über dem chronologischen Alter	71
3.4.12.3	Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und DNAm Alter der FL-Proben	71
3.4.12.4	Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der FL-Proben	72
3.4.13	Vergleich des Δ -Alters zwischen den Lymphomentitäten.....	73
3.4.14	Das Δ -Alter unterscheidet sich signifikant zwischen den Blut- und Lymphomproben .	74

3.4.15	Das Δ -Alter der BL-Proben unterscheidet sich signifikant von den B-Zell-Reifestadien	75
3.4.16	Vergleich des Δ -Alters zwischen den DLBCL- und B-Zell-Reifestadien-Proben	75
3.4.17	Auswertung der Cell of Origin-Untergruppen der DLBCL-Proben	76
3.4.18	Vergleich des Δ -Alters zwischen den FL- und B-Zell-Reifestadien-Proben	77
3.5	Methylierungsanalyse der CpG-Loci der epigenetischen Uhr nach Horvath	77
3.5.1	Methylierungsanalyse der DNAm Alter-CpG-Loci in den gesunden Blutproben	78
3.5.2	Vergleich der Methylierung der DNAm Alter-CpG-Loci zwischen den Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben	78
3.5.2.1	Die Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben unterscheiden sich in ihrer Methylierung der DNAm Alter-CpG-Loci	80
3.5.2.2	Die Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben ordnen sich in der PCA innerhalb ihrer Cluster nach chronologischem Alter an	80
3.5.2.3	Differentielle Methylierungsanalyse zwischen den Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben	81
3.5.3	Vergleich der Methylierung der DNAm Alter-CpG-Loci zwischen den Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben	81
3.5.3.1	Die Lymphomproben ähneln den späten B-Zell-Reifestadien-Proben in ihrer Methylierung der Horvath-CpG-Loci	82
3.5.3.2	Die Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben ordnen sich in der PCA innerhalb ihrer Zelltyp-Cluster nach chronologischem Alter an	83
3.5.3.3	Differentielle Methylierungsanalyse zwischen den Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben	84
3.6	Genontologie-Analyse der mit dem DNAm Alter-Algorithmus assoziierten Gene	85
3.7	Analyse der altersassoziierten CpG-Loci nach Hannum	86
4	Diskussion	88
4.1	Ergebnisse der Analyse der Blutproben	88
4.2	Ergebnisse der Analyse der B-Zell-Reifestadien	91
4.3	Vergleich der B-Zell-Reifestadien mit den Blutproben	96
4.4	Ergebnisse der Analyse der Keimzentrums-B-Zell-Lymphome	97

4.5	Vergleich der Lymphomproben mit den Blutproben	100
4.6	Vergleich der Lymphomproben mit den B-Zell-Reifestadien-Proben	101
4.7	Die Gene des DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath sind für verschiedene Signalwege angereichert	105
4.7.1	Das B-Zell-Rezeptor-assoziierte Protein Ig α ist mit dem DNAm Alter assoziiert	105
4.7.2	Polycomb-Zielgene sind in den positiv mit dem Alter korrelierten Horvath-CpG-Loci angereichert	106
4.8	Epigenetische Voralterung ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert	108
4.9	Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters bei FFPE-BL-Proben.....	109
4.10	Stärken und Limitationen der verwendeten Methoden	110
4.11	Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick.....	112
5	Zusammenfassung	115
6	Literaturverzeichnis	117
7	Anhang	130
8	Eidesstattliche Erklärung	159
9	Danksagung	160
10	Publikationsliste	161

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Aktivierter B-Zell-Typ (engl. <i>activated B-cell type</i>)
BL	Burkitt-Lymphom
B-NHL	B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom (engl. <i>B cell non-Hodgkin lymphoma</i>)
bp	Basenpaare
BZR	B-Zell-Rezeptor
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
COO	<i>Cell of origin</i> -Klassifikation
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Dinukleotid
D	<i>Diversity</i> -Gensegment der Immunglobulin-Gene
Δ -Alter	Delta-Alter = DNAm Alter nach Horvath - chronologisches Alter
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DLBCL	Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (engl. <i>diffuse large B-cell lymphoma</i>)
DMA	Differentielle Methylierungsanalyse
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DNAm Alter	DNA-Methylierungsalter nach Horvath
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNP	2,4-Dinitrophenol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie Fluoreszenz-markierter Zellen (engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FDR	False Discovery Rate
FDZ	Follikuläre dendritische Zellen
FFPE	Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet (engl. <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>)

FL	Folikuläres Lymphom
GCB	Keimzentrums-B-Zell-Typ (engl. <i>germinal center B-cell type</i>)
gcBC	Keimzentrums-B-Zellen (engl. <i>germinal center B-cells</i>)
GO	Genontologie
H ₀	Nullhypothese eines statistischen Tests
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (engl. <i>human immunodeficiency virus</i>)
HM450k-Array	DNA-Methylierungsarray <i>Infinium HumanMethylation450 BeadChip</i> (Illumina)
HPC	Hämatopoetische Progenitorzellen (engl. <i>hematopoietic progenitor cells</i>)
iBC	unreife B-Zellen (engl. <i>immature B-cells</i>)
ICGC	Internationales Krebsgenom-Konsortium (engl. <i>International Cancer Genome Consortium</i>)
ICGC MMML-Seq	Projekt „Internationales Krebsgenom-Konsortium: Analyse Molekularer Mechanismen in Malignen Lymphomen durch Sequenzierung“ (engl. <i>International Cancer Genome Consortium: Determining Molecular Mechanisms in Malignant Lymphoma by Sequencing</i>)
Ig	Immunglobulin
IQR	Interquartilbereich (engl. <i>interquartile range</i>)
J	<i>Joining</i> -Gensegment der Immunglobulin-Gene
KI	Konfidenzintervall
KM	Knochenmark
kNN	„ <i>K-nearest neighbors impute</i> “-Methode zur Rekonstruktion fehlender Beta-Werte
KZB-Lymphom	Keimzentrums-B-Zell-Lymphom
memBC	B-Gedächtniszellen (engl. <i>memory B-cells</i>)
MMML	Projekt „Molekulare Mechanismen bei Malignen Lymphomen“
MVR	Rekonstruktion fehlender Beta-Werte (engl. <i>Missing Value Reconstruction</i>)

naiBC	naive B-Zellen (engl. <i>naive B-cells</i>)
ncRNA	nicht codierende RNA (engl. <i>non-coding RNA</i>)
PB	Peripheres Blut
PC (BM)	Plasmazellen aus dem Knochenmark (engl. <i>plasma cells (bone marrow)</i>)
PC (T)	Plasmazellen aus Tonsillen (engl. <i>plasma cells (tonsils)</i>)
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl. <i>principal component analysis</i>)
PcG	Polycomb-Gruppe
PRC	Polycomb-Repressionskomplex (engl. <i>Polycomb repressive complex</i>)
preBI	Pro-B-Zellen (engl. <i>pre-BI-cells</i>)
preBII	Prä-B-Zellen (engl. <i>pre-BII-cells</i>)
q	für multiples Testen korrigierter q-Wert (Benjamini-Hochberg-Methode)
Q ₁	1. Quartil
Q ₃	3. Quartil
QOE	<i>Qlucore Omics Explorer</i> (Statistik-Software)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SAME	Projekt „Schlaf, Arbeit und deren Konsequenzen für menschliche Stoffwechselkrankheiten“
SHM	Somatische Hypermutation
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Tonsillen
TET	<i>ten-eleven translocation</i> -Methylcytosin-Dioxygenasen
T _H -Zellen	CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen

V	<i>Variable</i> -Gensegment der Immunglobulin-Gene
w.avg.	„ <i>Weighted Average</i> “-Clusteralgorithmus
WGA	Gesamtgenom-Amplifikation (engl. <i>whole genome amplification</i>)
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>World Health Organization</i>)
WPN	Arbeitspaket „Somatische Variation in normalen B-Zellen“ des ICGC MMML-Seq-Projekts (engl. <i>Workpackage N</i>)
\tilde{x}^*	Pseudomedian (Hodges-Lehmann-Schätzer)

1 Einleitung

1.1 Die Epigenetik moduliert die Genexpression

Die Gesamtheit aller Gene des Menschen ist in der Basenabfolge der DNA kodiert. Diese DNA-Sequenz ist in jeder kernhaltigen Zelle des menschlichen Körpers, abgesehen von wenigen Ausnahmen wie den Keimzellen und einigen Immunzellen, gleich [1]. Doch trotz des identischen genetischen Erbguts erscheinen die Zellen eines Organismus nicht uniform, sondern differenzieren zu unterschiedlichen Zellarten, welche vielfältige Funktionen in verschiedenen Geweben ausüben. Diese phänotypische Variationsbreite wird durch epigenetische Regulationsmechanismen ermöglicht, welche die Genexpression in jeder einzelnen Zelle präzise steuern und dadurch zur gewebespezifischen Differenzierung führen [2,3]. Die Epigenetik umfasst somit alle Modifikationen der Genexpression, welche nicht auf einer Veränderung der DNA-Sequenz basieren und sowohl mitotisch als auch meiotisch vererbt werden können [4]. Diese epigenetischen Regulationsmechanismen zeichnen sich zudem dadurch aus, dass sie sowohl stabil, als auch reversibel sind [5]. Die Gesamtheit aller epigenetischen Modifikationen einer Zelle wird als Epigenom bezeichnet [6].

Während das Genom eines Menschen, abgesehen von somatischen Mutationen einzelner Zellen sowie den genetischen Veränderungen in Immun- und Keimzellen, ein ganzes Leben lang konstant bleibt, kann die Genexpression jederzeit durch epigenetische Mechanismen flexibel reguliert werden. Dies ermöglicht dem Organismus, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen, sodass die Epigenetik auch als Brücke zwischen Genom und Umwelt bezeichnet wird [7]. Entsprechend konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass unterschiedliche Lebensgewohnheiten wie z.B. Rauchen, Ernährung und körperliche Bewegung zu signifikanten Modifikationen des Epigenoms führen [8–11]. Treten diese epigenetischen Veränderungen in den Keimzellen auf, kann zudem das erworbene Genexpressionsmuster an die Nachkommen weitervererbt werden [12].

1.2 DNA-Methylierung und weitere epigenetische Mechanismen

Die Epigenetik umfasst mehrere molekulare Mechanismen, welche auf verschiedenen Ebenen in die Genexpression eingreifen. Da der Schwerpunkt dieser Arbeit auf der DNA-Methylierung liegt, wird nur dieser Prozess ausführlich erläutert, während weitere epigenetische Mechanismen kurz vorgestellt werden.

Die posttranslationale, kovalente Modifikation von Histonen beeinflusst die Interaktion zwischen dem DNA-Strang und den Histonen, sodass hierdurch der Kondensationsgrad des Chromatins moduliert wird. So können Histone an ihrer N-terminalen Domäne z.B. acetyliert, methyliert, phosphoryliert oder

ubiquitinyliert werden [13]. Wenn die Modifikation zu einer verminderten Interaktion zwischen Histonen und der DNA führt, dann nimmt das Chromatin eine offene, transkriptionsaktive Struktur (Euchromatin) an. Bei einer verstärkten Interaktion zwischen DNA und Histonen wird das Chromatin in eine geschlossene Form (Heterochromatin) umgelagert, welche die Transkription hemmt [14].

Zudem gibt es RNA-basierte epigenetische Mechanismen, bei denen nicht codierende RNAs (*non-coding RNAs*, ncRNAs) die Genexpression beeinflussen. Diese ncRNAs werden nur transkribiert, ohne translatiert zu werden und codieren daher nicht für Proteine. Einige Gruppen von ncRNAs können sequenzspezifisch an komplementäre DNA- und RNA-Abschnitte binden und hierdurch die Genexpression modulieren. So binden z.B. ncRNAs im Rahmen der RNA-Interferenz an komplementäre mRNA-Segmente, welche nachfolgend vermehrt abgebaut werden und nicht mehr für die Translation zur Verfügung stehen [15].

Ein weiterer epigenetischer Mechanismus ist die räumliche Positionierung der DNA im Zellkern (engl. *Nuclear Positioning*). So wird die Genexpression durch die spezifische Lokalisation der DNA in transkriptionell aktiven, zumeist zentral gelegenen sowie transkriptionell inaktiven, überwiegend peripher gelegenen Kompartimenten des Zellkerns beeinflusst [13,16].

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf dem epigenetischen Mechanismus der DNA-Methylierung. Hierbei wird eine Methylgruppe durch eine DNA-Methyltransferase (DNMT) kovalent an das 5-Kohlenstoffatom des Pyrimidinrings des Cytosins gebunden [17]. S-Adenosylmethionin dient bei dieser Reaktion als Methylgruppen-Donor und wird zu S-Adosylhomocystein demethyliert [18] (s. Abbildung 1). Bei den DNA-Methyltransferasen werden mehrere Subtypen unterschieden. Während die DNMT3A und DNMT3B v.a. für die *de novo* Methylierung vorher unmethylierter DNA bei der Embryogenese zuständig sind, sorgen die DNMT1 für die Erhaltung des DNA-Methylierungsmusters nach der DNA-Replikation [19]. So erkennt die DNMT1 hemimethylierte DNA-Stränge nach der semikonservativen DNA-Replikation und methyliert den neu synthetisierten DNA-Strang entsprechend dem Matrizenstrang. Zudem wird für die DNMT3A und DNMT3B eine unterstützende Funktion bei der Erhaltung des Methylierungsmusters in stark methylierten DNA-Regionen diskutiert [20].

Die aktive Demethylierung des Methylcytosins wird durch *ten-eleven translocation* (TET)-Methylcytosin-Dioxygenasen vermittelt. So katalysieren TET-Enzyme die Oxidation von 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin, welches dann weiter zu 5-Formylcytosin und schließlich 5-Carboxylcytosin oxidiert wird. Die beiden zuletzt genannten modifizierten Basen werden im Rahmen der Basenexzisionsreparatur von der Thymin-DNA-Glykosylase aus dem DNA-Strang herausgeschnitten und durch unmethyliertes Cytosin ersetzt [21] (s. Abbildung 1).

Außerdem zeigt die DNMT1 eine verminderte Affinität für 5-Hydroxymethylcytosin, 5-Formylcytosin sowie 5-Carboxylcytosin auf dem Matrizenstrang, sodass sie nach der DNA-Replikation die entsprechende Cytosin-Basen auf dem neu synthetisierten Tochterstrang nur unzuverlässig methyliert. Auf diese Weise geht die Methylierung an diesen Stellen teilweise verloren [22]. 5-Formyl- und 5-Carboxylcytosin können zudem auch spontan zu unmethyliertem Cytosin reagieren, wobei dies unter physiologischen Bedingungen sehr unwahrscheinlich ist [23].

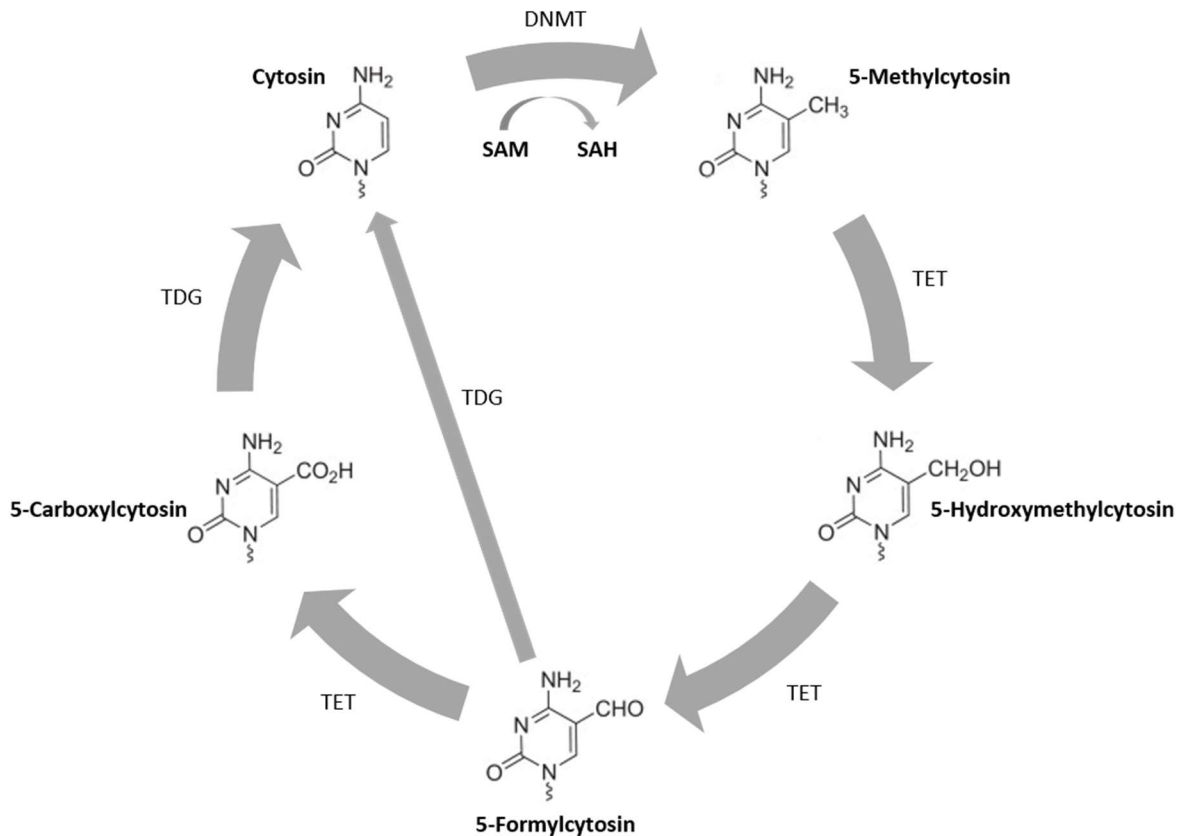


Abbildung 1: Aktive Methylierung und Demethylierung von Cytosin-Modifikationen. Cytosin wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMT) zu 5-Methylcytosin methyliert. Als Methylgruppen-Donor dient S-Adenosylmethionin (SAM), welches zu S-Adenosylhomocystein (SAH) demethyliert wird. Nachfolgend katalysieren ten-eleven translocation-Methylcytosin-Dioxygenasen (TET) die Oxidation von 5-Methylcytosin zu 5-Hydroxymethylcytosin und weiter zu 5-Formylcytosin und 5-Carboxylcytosin. 5-Formylcytosin und 5-Carboxylcytosin werden anschließend durch die Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) im Rahmen der Basenexzisionsreparatur durch unmethylierte Cytosine ersetzt. Die geschwängelte Linie am Stickstoffatom symbolisiert, dass die Base Bestandteil der DNA ist. Abbildung modifiziert nach [21] und [23].

In Säugetieren findet die DNA-Methylierung überwiegend an Cytosin-Basen statt, welchen in der DNA-Sequenz ein Guanin folgt [24]. Diese beiden Basen werden durch ein Phosphat verbunden, sodass von Cytosin-phosphatidyl-Guanin-(CpG)-Dinukleotiden gesprochen wird. Etwa 70-80% der CpG-Dinukleotide im menschlichen Genom sind methyliert, wobei sich der Anteil methylierter CpG-Loci zwischen verschiedenen Gewebearten unterscheidet [25]. Selten werden Cytosin-Basen methyliert, denen eine andere Base als Guanin folgt, sodass dies als Non-CpG-Methylierung bezeichnet wird [26].

Als Folge der DNA-Methylierung kommt es zu veränderten Interaktionen zwischen dem 5-Methylcytosin und dem Transkriptions-Initiationskomplex, welche je nach CpG-Lokalisation in Bezug auf das Gen sowohl zu einer Hemmung, als auch zu einer Steigerung der Transkription führen können [27]. Die Genrepression durch DNA-Methylierung beruht auf verschiedenen Mechanismen. So kann die zusätzliche Methylgruppe am Cytosin zur sterischen Hinderung der Transkriptionsfaktor-Bindung an die methylierte DNA führen [28]. Des Weiteren vermitteln Methyl-CpG-bindende Proteine wie MBD1, MBD2, MBD3 und MeCP2 eine Umstrukturierung des Chromatins, indem sie Histondeacetylasen rekrutieren. Die anschließende Deacetylierung der Histone führt zur Kondensation des Chromatins, wodurch die Transkription gehemmt wird [29].

Die methylierten CpG-Dinukleotide sind nicht zufällig über das menschliche Genom verteilt [17]. Der Großteil der methylierten CpG-Dinukleotide liegt in den repetitiven intergenischen und intronischen DNA-Regionen [30]. Diese enthalten u.a. transposable Elemente wie Retrotransposons und DNA-Transposons, welche auf intragenomische Parasiten zurückzuführen sind. Die Hypermethylierung der CpG-Dinukleotide in diesen repetitiven Regionen führt zur transkriptionellen Repression und Inaktivierung der Transposons. Auf diese Weise dient die DNA-Methylierung der Abwehr intragenomischer Parasiten und trägt somit zum Schutz der genomischen Integrität bei [31].

Ein weitaus geringerer Anteil der CpG-Dinukleotide von ca. 2% ordnet sich in sog. CpG-Inseln an, welche durch eine Mindestlänge von 500 Basenpaaren (bp) sowie eine starke Anreicherung von CpG-Dinukleotiden definiert sind [17]. Diese CpG-Inseln befinden sich in der Promotorregion von etwa 60% der menschlichen Gene, wo sie eine wichtige Funktion in der Regulation der Genexpression ausüben [32]. Während das Gen bei unmethylierten CpG-Inseln im Promotorbereich exprimiert wird, bewirkt eine Methylierung in dieser Region eine Hemmung der Transkription [17]. So führt die starke Methylierung von CpG-Inseln z.B. zur Inaktivierung des zweiten X-Chromosoms der Frau sowie zur selektiven Repression eines parentalen Allels im Rahmen der elterlichen Prägung (Imprinting) [32]. In gesunden Zellen ist jedoch die überwiegende Anzahl der CpG-Inseln nicht methyliert [33].

Wie bereits erwähnt, hängt der Einfluss der CpG-Methylierung auf die Genexpression von der Lokalisation in Bezug auf das Gen ab [27]. So führt eine starke DNA-Methylierung im ersten und zweiten Exon analog zur Promotormethylierung zu einer verminderten Genexpression. Im Gegensatz dazu korreliert eine vermehrte DNA-Methylierung im ersten Intron mit einer gesteigerten Transkription des Gens [34,35]. Da in mehreren Studien ein großer Unterschied im Ausmaß der DNA-Methylierung zwischen den Exons und Introns eines Gens beobachtet werden konnte, wird zudem ein regulatorischer Einfluss der DNA-Methylierung auf das Spleißen vermutet [27,36].

1.3 Das Epigenom verändert sich während des Alterungsprozesses

Altern ist ein komplexer, zeitabhängiger Prozess, welcher mit multiplen Veränderungen der Struktur und Funktionalität von Zellen assoziiert ist. Diese führen in ihrer Gesamtheit zu einer verminderten Leistungsfähigkeit und Stressresistenz des Organismus, sodass eine erhöhte Morbidität und Mortalität resultiert [37]. Dementsprechend steigt im hohen Alter u.a. das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes, Demenz und Tumorerkrankungen stark an [38].

1.3.1 Charakteristische Veränderungen der DNA-Methylierung während des Alterns

Mit zunehmendem Alter treten vermehrt molekulare Veränderungen in den Zellen auf wie z.B. die Akkumulation von DNA-Schäden, die Verkürzung der Telomere und die gesteigerte Bildung freier Radikale bei gestörter mitochondrialer Atmungskette [39]. Auch epigenetische Alterationen spielen eine wichtige Rolle bei der Alterung und werden neben weiteren Faktoren wie z.B. der genomischen Instabilität und der Erschöpfung der Stammzell-Kapazität zu den Schlüsselmerkmalen des Alterungsprozesses („Hallmarks of Aging“) gezählt [40]. So kommt es mit zunehmendem Alter zu einer Abnahme der globalen DNA-Methylierung sowie zu einer verminderten Korrelation des Methylierungsstatus benachbarter CpG-Dinukleotide [41]. Insbesondere repetitive DNA-Regionen sowie gewebespezifische Gene unterliegen der altersassoziierten Hypomethylierung [41–43]. Im Gegensatz dazu werden CpG-Inseln in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen mit dem Alter vermehrt methyliert [44,45]. Es wird daher angenommen, dass eine aberrante, altersassoziierte DNA-Methylierung einen frühen Schritt in der Karzinogenese darstellt [46,47].

Insgesamt wandelt sich somit das DNA-Methylierungsmuster während des Alterns und führt zu einer modifizierten Genexpression, welche eine veränderte Zellfunktion zur Folge hat [38,48].

1.3.2 Schätzung des chronologischen Alters anhand des DNA-Methylierungsmusters

Die Methylierung einiger CpG-Dinukleotide verändert sich so charakteristisch mit zunehmendem chronologischen Alter, dass diese als Biomarker des Alterns angesehen werden können [49,50].

So entwickelte Steve Horvath ein Regressionsmodell, welches anhand des Methylierungsstatus von 353 spezifischen CpG-Dinukleotiden das epigenetische DNA-Methylierungsalter (DNAm Alter) berechnet. Dieses DNAm Alter korreliert bei gesunden Menschen stark mit dem chronologischen Alter (Pearson-Korrelationskoeffizient $r_p=0,96$, Median der Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter $\tilde{x}_\Delta=3,6$ Jahre), sodass das chronologische Alter anhand des Methylierungsstatus der 353 CpG-Dinukleotide präzise geschätzt werden kann [49]. Diese 353 CpG-Dinukleotide formen daher in ihrer

Gesamtheit eine epigenetische Uhr. Besonders bemerkenswert ist, dass der DNAm Alter-Algorithmus in vielen verschiedenen Gewebearten präzise Altersschätzungen liefert, sodass Horvath sein Regressionsmodell als Multi-Gewebe-Altersprädiktor bezeichnet [49].

Auch Hannum et al. [50] entwickelten ein Regressionsmodell zur Altersschätzung anhand von DNA-Methylierungswerten. Hierbei identifizierten sie 71 CpG-Dinukleotide, deren Methylierungsgrad in gesunden Blutproben stark mit dem chronologischen Alter korrelierte und anhand derer das chronologische Alter der Individuen präzise geschätzt werden konnte (Pearson-Korrelationskoeffizient $r_p=0,91$). Da das primäre Regressionsmodell jedoch ausschließlich anhand von Blutproben entwickelt wurde, musste der Altersschätzer für die Anwendung auf weitere Gewebearten durch Korrekturmodelle angepasst werden [50].

1.4 Tumorzellen weisen ein aberrantes DNA-Methylierungsmuster auf

Epigenetische Alterationen haben einen großen Einfluss auf die Krebsentstehung und führen zur aberranten Genexpression in malignen Zellen [33,51]. So kann die epigenetische Repression von Tumorsuppressorgenen zur genomischen Instabilität einer Zelle beitragen, welche die Basis für die Entwicklung der Schlüsselmerkmale von Krebs („Hallmarks of Cancer“) bildet [52].

In Tumorzellen treten ähnliche Veränderungen der DNA-Methylierung wie beim Altern auf [44]. So kommt es in Krebszellen ebenfalls zu einer genomweiten Hypomethylierung, während CpG-Inseln in der Promotorregion spezifischer Gene vermehrt methyliert werden [53,54]. Diese Promotor-Hypermethylierung führt zur transkriptionellen Repression von Genen, welche u.a. wichtige Funktionen in der DNA-Reparatur, der Kontrolle des Zellzyklus sowie der Apoptose ausüben [55].

Die genomweite Hypomethylierung in Tumorzellen hat zudem eine verminderte Methylierung repetitiver DNA-Sequenzen zur Folge, wodurch mobile DNA-Elemente wie Retrotransposons reaktiviert werden und zur Steigerung der genomischen Instabilität beitragen können [33,56]. So wurden erhöhte Mutationsraten in hypomethylierten Genen beobachtet [57]. Genspezifische Hypomethylierungen von Promotorregionen vor Onkogenen können außerdem deren Expression steigern und die Zelle zur unkontrollierten Proliferation stimulieren [55,58]. So wurde z.B. in mehreren Krebsarten eine verminderte Promotormethylierung des Onkogens *MYC* beobachtet [58]. Die vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors *MYC* führt über die Aktivierung multipler proliferationsfördernder Gene zu einer gesteigerten Mitoserate der Tumorzellen.

Des Weiteren können Punktmutationen entstehen, indem 5-Methylcytosin spontan zu Thymin desaminiert wird [59]. Hierdurch ergibt sich eine Basenfehlpaarung von Thymin und Guanin, welche

von den DNA-Fehlpaarungsreparaturproteinen erkannt wird. Da das Fehlpaarungsreparatursystem in diesem Fall jedoch nicht zwischen der korrekten und der mutierten Base unterscheiden kann, wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 50% die ursprüngliche DNA-Sequenz wiederhergestellt, indem Thymin gegen Cytosin ausgetauscht wird [60]. Mit der gleichen Wahrscheinlichkeit wird jedoch anderenfalls Guanin durch Adenin ersetzt, sodass eine Punktmutation resultiert. Auf diese Weise wird die Mutationsrate am Cytosin durch die Methylierung mindestens um den Faktor 10 gesteigert, sodass 5-Methylcytosin wie ein endogenes Mutagen wirkt [61].

Eine aberrante DNA-Methylierung kann somit auf vielfältige Weise zur Tumorgenese beitragen. Epigenetische und genetische Mechanismen beeinflussen sich hierbei gegenseitig und führen in ihrer Gesamtheit zum autonomen Tumorwachstum [62].

1.5 Tumore weisen epigenetische Altersabweichungen auf

Da das epigenetische DNAm Alter nach Horvath einen Biomarker des biologischen Alters darstellt, ist es interessant zu untersuchen, ob sich die Tumorentstehung auf das DNAm Alter auswirkt. Während das DNAm Alter nach Horvath in gesunden Zellen stark mit dem chronologischen Alter des Organismus korreliert, konnte bei vielen benignen und malignen Erkrankungen eine deutliche Abweichung des DNAm Alters beobachtet werden [10,49,63]. Die überwiegende Mehrheit der verschiedenen Tumorarten weist eine epigenetische Voralterung auf, einzelne Tumorentitäten erscheinen jedoch auch epigenetisch jünger [49,63,64]. So beschreibt Horvath eine Beschleunigung des DNAm Alters bei Karzinomen der Brust, des Kolons, des Rektums, der Nieren, der Ovarien, des Endometriums, der Prostata und der Schilddrüse sowie bei Akuter myeloischer Leukämie und dem Glioblastom [49]. Auch Hannum et al. [50] beobachteten eine epigenetische Voralterung bei mehreren Tumorentitäten. Beim Lungenkarzinom wurde vor Kurzem in der Studie von Marwitz et al. [63] gezeigt, dass sich die histologischen Subtypen in ihrem DNAm Alter unterscheiden. Während Plattenepithelkarzinome der Lunge ein deutlich jüngeres DNAm Alter als das chronologische Alter des Donors zeigten, wurde bei Adenokarzinomen der Lunge ein deutlich älteres DNAm Alter beobachtet [63]. Bei mehreren Tumorentitäten konnte zudem eine Assoziation zwischen einem aberranten DNAm Alter und dem Überleben aufgezeigt werden [64].

Da bisher noch keine Studien zum DNAm Alter von Lymphomen vorliegen und eine große Probenkohorte von Keimzentrums-B-Zell-Lymphomen zur Verfügung stand, wurde im Rahmen dieser Arbeit das epigenetische Alter dieser hämatologischen Neoplasien näher untersucht.

1.6 Während der B-Zell-Reifung kommt es zu Genumlagerungen und somatischer Hypermutation

Keimzentrums-B-Zell-Lymphome stammen von sich differenzierenden B-Zellen ab. Die B-Zellen sind die Vorläuferzellen der Plasmazellen, welche hochaffine Antikörper sezernieren und somit eine wichtige Rolle im Rahmen der adaptiven, humoralen Immunantwort auf Krankheitserreger spielen. Um den Prozess der Lymphomagenese besser verstehen zu können, wird an dieser Stelle zuerst der Vorgang der B-Zell-Reifung näher erläutert (s. Abbildung 2).

Die hämatopoetischen Stammzellen sind im Knochenmark angesiedelt und generieren lymphatische Progenitorzellen, welche sich über das Stadium der Pro-B- und Prä-B-Zellen zu unreifen B-Zellen entwickeln [65]. In den Pro-B-Zellen werden die V(D)J-Gene (*Variable, Diversity, Joining*) der Antigenbindenden Domäne des B-Zell-Rezeptors umgelagert, um die Vielfalt der B-Zell-Rezeptoren zu erhöhen. Bei dieser somatischen Rekombination kommt es zu einer variablen Verknüpfung zwischen den V-, D- und J-Segmenten sowie zu Deletionen und Insertionen an den Schnittstellen, sodass die Diversität der exprimierten B-Zell-Rezeptoren nochmals um ein Vielfaches gesteigert wird [66].

Die unreifen B-Zellen differenzieren zu transitionalen B-Zellen, welche das Knochenmark verlassen und sich im peripheren Blutkreislauf zu naiven B-Zellen entwickeln [67]. Diese naiven B-Zellen präsentieren auf der Zelloberfläche ihren antigenspezifischen B-Zell-Rezeptor und wandern in sekundäre Lymphorgane wie Lymphknoten, Milz und Tonsillen ein. Sobald ein passendes Antigen an den B-Zell-Rezeptor bindet, werden die naiven B-Zellen durch CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) aktiviert. Während ein geringer Anteil der aktivierten B-Zellen zu frühen Antikörper-sezernierenden Plasmazellen differenziert, wandert der Großteil der aktivierten B-Zellen in die Lymphfollikel ein. Dort formieren sie sich zusammen mit follikulären dendritischen Zellen (FDZ) und T_H-Zellen zu einem Keimzentrum. Die aktivierten naiven B-Zellen differenzieren auf diese Weise zu Keimzentrums-B-Zellen [65].

In der histologisch dunklen Region des Keimzentrums proliferieren die Keimzentrums-B-Zellen stark und durchlaufen eine Affinitätsreifung durch somatische Hypermutation (SHM) ihrer Immunglobulin-Gene (Ig-Gene), welche durch die aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase vermittelt wird [67]. Hierbei treten vermehrt Punktmutationen in den umgelagerten Gensegmenten der variablen, antigenbindenden V-Region mit einer Mutationsrate von 10⁻³ bis 10⁻⁴ Basenpaaren (bp) pro Zellteilung auf [68]. Durch die SHM wird eine größere Vielfalt an B-Zell-Rezeptoren generiert, sodass die Affinität für das Antigen z.T. weiter gesteigert werden kann. Eine solche physiologische, genspezifische Hypermutation wurde bis jetzt nur im Rahmen der B-Zell-Reifung beobachtet und tritt in keiner anderen somatischen Zellart auf.

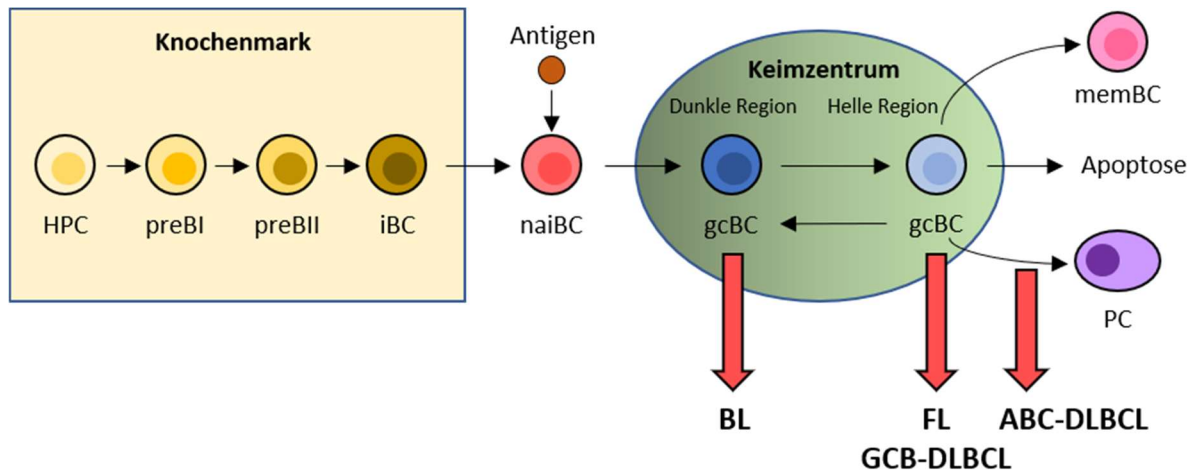


Abbildung 2: Ablauf der B-Zell-Reifung und Ursprung der Keimzentrum-B-Zell-Lymphome. Im Knochenmark entwickeln sich aus Hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC) Pro-B-Zellen (preBI), welche weiter zu Prä-B-Zellen (preBII) und unreifen B-Zellen (iBC) differenzieren. Die unreifen B-Zellen entwickeln sich zu transitionalen B-Zellen, welche das Knochenmark verlassen und in der Peripherie zu naiven B-Zellen (naiBC) differenzieren. Die naiven B-Zellen werden anschließend durch ein Antigen aktiviert und initiieren die Bildung eines Keimzentrums, wodurch die aktivierten naiven B-Zellen zu Keimzentrum-B-Zellen (gcBC) werden. Diese proliferieren zunächst stark in der dunklen Region und werden dann in der hellen Region anhand des exprimierten B-Zell-Rezeptors selektiert. Keimzentrum-B-Zellen mit hochaffinem B-Zell-Rezeptor für das Antigen differenzieren entweder zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen (PC) oder zu B-Gedächtniszellen (memBC). Nicht selektierte gcBC gehen in die Apoptose. Bei Fehlern während der B-Zell-Reifung können Lymphome entstehen. So leiten sich Burkitt Lymphome (BL) von den gcBC der dunklen Region ab, während Follikuläre Lymphome (FL) sowie Diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) des Keimzentrum-B-Zell-Subtyps (GCB) sich von gcBC der hellen Region ableiten. Die DLBCL des Aktivierten B-Zell-Subtyps (ABC) entwickeln sich aus Plasmablasten, welche normalerweise zu Plasmazellen differenzieren. Abbildung modifiziert nach [69].

Anschließend wandern die B-Zellen in die histologisch helle Region des Keimzentrums ein, wo ihnen von FDZ das Antigen präsentiert wird. Je nach Affinität des B-Zell-Rezeptors für das Antigen vermitteln die FDZ und T_H -Zellen Überlebens- oder Apoptose-fördernde Signale. Hierdurch werden die Keimzentrum-B-Zellen mit passendem, hochaffinen B-Zell-Rezeptor für das Fremdantigen selektiert, während B-Zellen mit einem niedrigaffinen B-Zell-Rezeptor für das Fremdantigen oder solche mit einer Affinität für körpereigene Strukturen in die Apoptose geschickt werden. Auf diese Weise wird die Synthese von Autoantikörpern unterbunden [65,66].

Zusätzlich vollziehen die Immunglobuline im Verlauf der Keimzentrumreaktion einen Klassenwechsel. Hierbei kommt es durch nicht-homologe, ortsspezifische Rekombination zur Deletion von C-Segmenten der Ig-Gene, welche für die konstante Region des Antikörpers kodieren [68].

Die selektierten Keimzentrum-B-Zellen differenzieren anschließend zu Plasmablasten, welche den Lymphfollikel verlassen und sich zu Plasmazellen entwickeln. Diese reifen Plasmazellen sezernieren lösliche, hochaffine Antikörper, welche gezielt an das Antigen des Krankheitserregers binden und diesen somit für die Zell- und Komplement-vermittelte Immunantwort markieren [65]. Einige selektierte Keimzentrum-B-Zellen entwickeln sich zu langlebigen B-Gedächtniszellen, welche rezirkulieren oder in einem Ruhezustand überdauern. Bei erneuter Infektion mit dem gleichen Antigen

werden sie wieder aktiviert und können schnell zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen differenzieren [65].

Dieser Prozess der B-Zell-Reifung wird durch ein abgestimmtes Zusammenspiel von epigenetischen Modifikationen und Transkriptionsfaktoren gesteuert. Während der B-Zell-Reifung kommt es daher zu typischen Veränderungen der DNA-Methylierung, sodass jedes Differenzierungsstadium ein charakteristisches DNA-Methylierungsprofil aufweist [67].

1.7 Keimzentrums-B-Zell-Lymphome

1.7.1 Keimzentrums-B-Zell-Lymphome entstehen aus B-Zell-Reifestadien

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert kommt es im Rahmen der B-Zell-Reifung zu zahlreichen Umlagerungsprozessen von Genen und somatischen Mutationen. So ist die Mutationsrate in den V-Segmenten der Ig-Gene bei der SHM um den Faktor 10^6 erhöht im Vergleich zur genomweiten Mutationsrate während der DNA-Replikation in anderen somatischen Zellen [66]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die SHM nicht ausschließlich auf Ig-Gene begrenzt ist, sondern in geringerem Ausmaß auch Non-Ig-Gene betrifft. So wurden in Keimzentrums-B-Zellen von gesunden Individuen nach SHM vermehrt Mutationen in den Genen *BCL6*, *FAS*, *CD79A* und *CD79B* nachgewiesen [70–72]. Wenn Protoonkogene von aberranter SHM betroffen sind, kann dies eine unkontrollierte Proliferation der B-Zellen auslösen und zur Entstehung von Lymphomen beitragen. Entsprechend wurden in über 50% der Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome Mutationen in den Protoonkogenen *MYC*, *PAX5*, *RHOH* und *PIM1* gefunden, welche im Rahmen der SHM entstanden waren [73]. Da diese Mutationen jedoch nicht in gesunden Keimzentrums-B-Zellen nachgewiesen werden konnten, wird ihnen eine wichtige Rolle in der Lymphomagenese zugeschrieben. Zudem treten im Bereich dieser Protoonkogene vermehrt Translokationen bei Lymphomen auf, sodass angenommen wird, dass die SHM durch Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zur genomischen Instabilität beiträgt [73]. Als Folge der genetischen und epigenetischen Alterationen und der aberranten Genexpression können sich die Keimzentrums-B-Zellen zu Keimzentrums-B-Zell-Lymphomen (KZB-Lymphome) entwickeln.

KZB-Lymphome umfassen mehrere genetisch, histologisch und klinisch unterschiedliche Entitäten und stellen mit 80% die größte Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome (B-NHL) dar [69]. Die Einteilung der B-NHL erfolgt nach der *World Health Organization* (WHO, Weltgesundheitsorganisation)-Klassifikation der Tumore der hämatopoetischen und lymphatischen Gewebe [74] anhand histomorphologischer, molekularer und klinischer Merkmale. So unterscheiden sich die malignen B-Zell-Lymphome z.B. charakteristisch in ihrem Immunphänotyp und ihrer Zytogenetik. Des Weiteren sind auch Alterationen des DNA-Methylierungsmusters typisch für lymphatische Neoplasien, wobei

genassoziierte Hypermethylierungen der Promotorregion besonders häufig bei KZB-Lymphomen im Vergleich zu anderen B-NHL auftreten [75]. Auch kommt es oft zum globalen Verlust der Methylierung intergenischer DNA-Sequenzen bei KZB-Lymphomen [76].

In dieser Arbeit wurden Proben der KZB-Lymphomentitäten Burkitt-Lymphom (BL), Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (*Diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) und Follikuläres Lymphom (FL) untersucht. All diese KZB-Lymphomentitäten leiten sich von Keimzentrums-B-Zellen ab und werden im Folgenden ausführlich dargestellt.

1.7.2 Burkitt-Lymphom

Das Burkitt-Lymphom (BL) ist ein sehr aggressives B-NHL, welches durch ein schnelles Wachstum charakterisiert ist. Es leitet sich von den hochproliferativen Keimzentrums-B-Zellen der dunklen Region des Keimzentrums ab [69]. Das molekulare Kennzeichen des BL ist eine Translokation des Onkogens *MYC* in die Nähe eines Immunglobulin-Gens, wodurch *MYC* konstitutiv exprimiert wird und die Zellproliferation stimuliert. Bei der häufigsten Translokation t(8;14) wird *MYC*, welches auf Chromosom 8 liegt, neben dem Ig-Schwerketten-Locus *IGH* auf Chromosom 14 angeordnet. Seltener treten die Translokationen t(2;8) und t(8;22) auf, bei denen *MYC* unter den Einfluss der Ig-Leichtketten-Loci *IGK* und *IgL* gestellt wird [77]. Die Mehrzahl der Bruchpunkte der Translokationen können dabei auf eine aberrante SHM zurückgeführt werden [74].

Beim BL werden drei epidemiologische Subtypen unterschieden. Das sporadische BL kommt weltweit vor und betrifft überwiegend Kinder und junge Erwachsene. Ein weiterer, späterer Manifestationsgipfel liegt bei etwa 70 Jahren. Bei 20-30% der sporadischen BL kann eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) nachgewiesen werden. Das endemische BL tritt in Äquatorialafrika und Papua-Neuguinea v.a. bei Kindern auf und ist zu über 95% mit EBV assoziiert. Am Immundefizienz-assoziierten BL erkranken überwiegend mit HIV (Humanes Immundefizienz-Virus) infizierte Patienten. Hierbei sind 25-40% der Immundefizienz-assoziierten BL EBV-positiv. Aufgrund der in allen drei Subtypen vorliegenden Assoziation wird ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der EBV-Infektion und der Lymphomagenese diskutiert [74]. In dieser Arbeit wurden nur Proben des sporadischen BL untersucht. Dieses zeigt klinisch zumeist ein extranodales Befallsmuster [74].

Das BL stellt bei Kindern mit einem Anteil von 30-50% die häufigste Entität kindlicher Lymphome dar [74,78]. Bei Erwachsenen ist das sporadische BL relativ selten und macht nur einen Anteil von 1-2% an allen Lymphomen in Westeuropa und den USA aus [74]. Bemerkenswert ist zudem, dass insgesamt doppelt bis dreifach so viele Männer wie Frauen am BL erkranken [74].

Obwohl das BL ein sehr aggressives Lymphom ist, kann es durch eine intensive Chemotherapie geheilt werden. So beträgt die Langzeit-Überlebensrate 70-90%. Kinder weisen hierbei eine deutlich bessere Prognose auf als erkrankte Erwachsene [74].

1.7.3 Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom

Das Diffuse großzellige B-Zell-Lymphom (engl. *Diffuse large B-cell lymphoma*, DLBCL) ist ebenfalls ein aggressives, hochproliferatives Lymphom, welches mit einem Anteil von ca. 40% das häufigste B-NHL bei Erwachsenen darstellt [69]. Es zeichnet sich durch ein diffuses Wachstumsmuster aus und bildet eine heterogene Entität [74]. Eine Besonderheit besteht darin, dass das DLBCL entweder *de novo* (primäres DLBCL) entsteht oder sich aus einem niedrigmalignen Lymphom wie z.B. einem FL oder einer Chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) entwickeln kann (sekundäres DLBCL) [69].

Am DLBCL erkranken v.a. ältere Menschen, sodass das mediane Erkrankungsalter bei etwa 65 Jahren liegt. Nichtsdestotrotz stellt das DLBCL bei Kindern mit einem Anteil von 20% die dritthäufigste NHL-Entität dar [78]. Ebenso wie beim BL erkranken Männer im Vergleich zu Frauen häufiger an einem DLBCL. Klinisch befällt das DLBCL entweder die Lymphknoten oder extranodale Regionen [74].

Das DLBCL leitet sich von B-Zellen verschiedener Differenzierungsstufen ab. Ein Teil der DLBCL kann auf die Keimzentrums-B-Zellen in der hellen Region des Keimzentrums zurückgeführt werden und wird als Keimzentrums-B-Zell-Subtyp (engl. *germinal center B-cell type*, GCB-Subtyp) bezeichnet. Die weiteren DLBCL leiten sich von späten Keimzentrums-B-Zellen ab, welche als Plasmablasten das Keimzentrum verlassen, um zu Plasmazellen zu differenzieren. Diese DLBCL werden als Aktivierter B-Zell-Subtyp (engl. *activated B-cell type*, ABC-Subtyp) klassifiziert [69,74]. Die beiden DLBCL-Subtypen können molekular anhand ihrer Genexpression unterschieden werden. Dabei werden ca. 60% der DLBCL-Proben als GCB-DLBCL und etwa 40% als ABC-DLBCL klassifiziert. Einige DLBCL-Proben können jedoch keinem der beiden Subtypen zugeordnet werden, sodass sie die dritte Kategorie der Type-III-DLBCL bilden [79]. Die DLBCL-Subtypen weisen nicht nur verschiedene Genexpressions-, Mutations- und chromosomale Aberrationsmuster auf, sondern unterscheiden sich zudem signifikant in ihrem Therapieansprechen und in ihrer Prognose. Während die GCB-DLBCL einen etwas milderen klinischen Verlauf zeigen, sind die ABC-DLBCL sehr aggressiv und weisen meist einen schweren klinischen Verlauf mit schlechter Prognose auf. Die Typ-III-DLBCL ähneln in ihrer Prognose den ABC-DLBCL [80].

Die DLBCL weisen vielfältige genetische Aberrationen und Mutationen auf, deren Häufigkeit meistens zwischen den DLBCL-Subtypen variiert. Am häufigsten treten Translokationen des Gens *BCL6* auf, gefolgt von *BCL2* und *MYC* [74]. Durch die konstitutive Expression dieser Gene werden die B-Zellen zur Proliferation angeregt und die terminale Differenzierung und Apoptose verhindert [69].

Die Langzeit-Überlebensrate bei DLBCL beträgt trotz intensiver Chemotherapie-Regimen etwa 65% bei Erwachsenen [74]. Pädiatrische DLBCL weisen eine deutlich bessere Prognose mit einer Langzeit-Überlebensrate von 85-95% auf [81].

1.7.4 Follikuläres Lymphom

Das Follikuläre Lymphom (FL) ist ein niedrigmalignes B-NHL, welches nur eine geringe Proliferationsrate aufweist und sich von den B-Zellen der hellen Region des Keimzentrums ableitet [69]. Die Lymphomzellen imitieren in ihrem Wachstumsmuster häufig Keimzentren, z.T. wachsen sie jedoch auch diffus ohne Follikelstrukturen zu bilden [77]. Mit steigendem Blastenanteil kann das indolente FL in ein aggressives DLBCL übergehen. Klinisch tritt das FL zumeist in Lymphknoten auf, es kann jedoch auch extranodale Regionen wie z.B. die Milz und das Knochenmark befallen [74].

Das FL ist das häufigste niedrigmaligne B-NHL bei Erwachsenen und macht einen Anteil von 20% an den adulten Lymphomen aus. Es tritt v.a. bei älteren Menschen auf und das mediane Erkrankungsalter liegt bei etwa 60 Jahren. Im Gegensatz zu vielen anderen B-NHL-Entitäten sind Frauen häufiger vom FL betroffen als Männer [74]. Kinder und Jugendliche erkranken nur sehr selten am typischen FL. Das bei Kindern auftretende Pädiatrische FL stellt nach der WHO-Klassifikation [74] eine eigene Entität dar und wird im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Über 85% der FL weisen die Translokation t(14;18) auf, bei welcher das Onkogen *BCL2* auf dem Chromosom 18 unter die Kontrolle des Ig-Schwerketten-Lokus *IGH* auf Chromosom 14 gestellt wird. Während die Expression von *BCL2* in gesunden Keimzentrums-B-Zellen reprimiert wird, führt die Translokation t(14;18) zur konstitutiven Expression von *BCL2*, dessen Genprodukt anti-apoptotisch wirkt und hierdurch zur Lymphomagenese beiträgt. Diese für FL typische Translokation wird auf Fehler in der VDJ-Rekombination im Rahmen der frühen B-Zell-Reifung im Knochenmark zurückgeführt. Die endgültige maligne Transformation dieser aberranten B-Zellen findet anschließend im Keimzentrum in den sekundären Lymphorganen statt [69,74].

Das FL kann, mit Ausnahme eines sehr frühen Stadiums mit gering ausgeprägtem Lymphknotenbefall, nicht geheilt werden. Aufgrund des sehr langsamen Wachstums liegt die mediane Überlebenszeit bei Chemotherapie jedoch bei über 12 Jahren. Im Verlauf transformieren sich ca. 30% der FL zu einem aggressiven DLBCL [74].

1.8 Zielsetzung der Arbeit und Hintergründe

Die NHL gehören zu den 10 häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland, deren Inzidenz zudem jährlich ansteigt [82,83]. Bei Kindern stellen die NHL sogar die dritthäufigste Krebserkrankung dar [84]. Lymphome betreffen somit alle Altersgruppen. Die Therapie der Lymphome setzt sich meist aus einer Kombination von intensiver Chemotherapie, Immuntherapie, Bestrahlung oder Stammzelltransplantation zusammen, welche für den Patienten mit einem beachtlichen Risiko für Therapie-assoziierte Toxizität einhergeht. Zudem verursacht die Therapie erhebliche Kosten im Gesundheitssystem. NHL haben daher eine große gesellschaftliche und sozio-ökonomische Relevanz.

Die überwiegende Mehrheit der NHL sind reife Keimzentrums-B-Zell-Lymphome (KZB-Lymphome). So machen DLBCL, FL und BL zusammen einen Anteil von ca. 80% der B-NHL aus [69]. Diese drei Entitäten zeigen jeweils typische Verteilungsmuster des Erkrankungsalters, sodass es interessant erscheint, den Zusammenhang zwischen dem Alterungsprozess und der Lymphomagenese näher zu untersuchen.

Mit dem Altern treten charakteristische, epigenetische Modifikationen in den Zellen auf. Die altersassoziierten Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters könnten die Expression regulatorischer Gene beeinflussen und somit möglicherweise zur Tumorentstehung beitragen [47,85]. Zur Schätzung des biologischen Alters entwickelte Steve Horvath ein Regressionsmodell, welches anhand des Methylierungsstatus von 353 CpG-Dinukleotiden das epigenetische DNAm Alter berechnet [49]. In seiner Studie zeigte Horvath, dass das epigenetische DNAm Alter bei gesunden Individuen stark mit dem chronologischen Alter korreliert [49]. Bei der Anwendung dieses Alterschätzers auf verschiedene Tumorarten wurde jedoch in mehreren Studien eine signifikante epigenetische Altersabweichung festgestellt [49,63,64]. Vor Kurzem wurde zudem in einer prospektiven Studie beobachtet, dass Menschen, welche eine epigenetische Voralterung ihrer Blutzellen aufweisen, ein signifikant erhöhtes Risiko haben, im Verlauf an einem reifen B-Zell-Lymphom zu erkranken [86]. Da bisher jedoch noch keine Analysen zum epigenetischen DNAm Alter von Lymphomgewebe durchgeführt wurden, sollte dieses in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Als gesunde Kontrollen für den Vergleich mit den Lymphomproben eignen sich sowohl periphere Blutproben als auch verschiedene B-Zell-Reifestadien, von denen sich die KZB-Lymphome ableiten. Die B-Zellen weisen im Rahmen ihrer Differenzierung typische Veränderungen ihres DNA-Methylierungsmusters auf, welche das charakteristische Genexpressionsprofil der jeweiligen Reifestadien bedingen [87,88]. Bisher fehlen jedoch Untersuchungen zum möglichen Einfluss der B-Zell-Differenzierung auf das epigenetische DNAm Alter nach Horvath der reifenden B-Zellen.

Daher ergaben sich für diese Dissertation folgende Ziele:

1. Als erstes Ziel sollten die Ergebnisse der Studie von Horvath [49] zur Präzision des epigenetischen DNAm Alters als Schätzer des chronologischen Alters in der Kontrollkohorte der gesunden Blutproben in dieser Arbeit anhand der mittels *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina) durchgeführten DNA-Methylierungsanalysen überprüft werden.
2. Des Weiteren sollte der Einfluss der B-Zell-Differenzierung auf das epigenetische Alter gesunder B-Zell-Proben untersucht und den Ergebnissen der Blutproben gegenübergestellt werden.
3. Zudem sollte im Rahmen dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich die Tumorgenese der KZB-Lymphomentitäten BL, DLBCL und FL auf ihr epigenetisches DNAm Alter auswirkt. Das epigenetische DNAm Alter der KZB-Lymphome sollte anschließend mit dem DNAm Alter der gesunden Blut- und B-Zell-Proben verglichen und die CpG-Dinukleotide der epigenetischen Uhr auf signifikante Methylierungsunterschiede zwischen den Gruppen untersucht werden. Anschließend sollten die mit der epigenetischen Uhr assoziierten Gene auf angereicherte Signalwege analysiert werden, um molekulare Alterungsprozesse zu identifizieren.

2 Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und angewandten Methoden vorgestellt. Allgemein übliche Reagenzien, Geräte und Labormethoden werden nicht gesondert genannt.

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial

Zur Bearbeitung der Fragestellungen der vorliegenden Dissertation wurden genomweite DNA-Methylierungsanalysen von BL-, DLBCL- und FL-Proben unter Verwendung des DNA-Methylierungsarrays *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (HM450k, Illumina) bei 555 Lymphomproben durchgeführt. Als gesunde Kontrollen dienten 145 Proben aus peripherem Blut sowie 62 Proben von B-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien, deren DNA-Methylierungsprofil auf die gleiche Weise ermittelt wurde. Insgesamt wurden in dieser Arbeit 762 Proben untersucht, welche ein chronologisches Alter von -0,3 bis 94 Jahren aufwiesen (Details zum negativen Alter s. Abschnitt 2.1.1.2.3). Die verwendeten Proben wurden im Rahmen unterschiedlicher Studien und Projekte akquiriert und für die vorliegende Dissertation zur Verfügung gestellt. Einen Überblick über die Probenkohorten vermittelt Tabelle 1. Im Folgenden sind die Probenkohorten einzeln aufgeführt und die klinischen Eigenschaften ausführlich beschrieben.

Die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bzw. die jeweils zuständige Ethikkommission der Kooperationspartner genehmigte die Studien und stimmte der Verwendung des Probenmaterials zu Forschungszwecken zu. Die entsprechenden Ethikvoten werden bei der Beschreibung der jeweiligen Probenkohorte genannt und sind im Anhang 25 hinterlegt.

2.1.1.1 Gesunde Blutproben als Kontrollkohorte

Als Kontrollen wurden 145 Proben aus dem peripheren Blut gesunder Individuen verwendet, welche mit EDTA versetzt wurden. Hierbei wiesen die gesunden Probanden ein chronologisches Alter von 0 bis 63 Jahren mit einem Median von 38 Jahren auf (s. Tabelle 1). Diese Blutproben wurden im Rahmen der Studien von Kolarova et al. [89], Friemel et al. [90] sowie des Projekts „Schlaf, Arbeit und deren Konsequenzen für menschliche Stoffwechselkrankheiten“ (SAME) [91] gesammelt und aufbereitet. Die DNA-Methylierungsanalysen auf dem HM450k-Array erfolgten für alle drei Kohorten nach dem gleichen Protokoll im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Die Rohdaten der DNA-Methylierungsanalysen der Proben sowie die zugehörigen klinischen Daten wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Probenkohorten, welche in dieser Arbeit untersucht wurden. Aufgeführt werden Studienzugehörigkeit, Probenanzahl, Geschlechterverhältnis und chronologischer Altersbereich mit Median. k. A., keine Angaben.

Studie	Probenanzahl (Frauen/Männer)	Altersbereich in Jahren (Median)
Periphere Blutproben:	145 (76/69)	0-63 (38)
Kolarova et al. [89]	19 (13/6)	0-17 (3)
Friemel et al. [90]	10 (0/10)	21-52 (39,5)
SAME [91]	116 (63/53)	20-63 (39)
B-Zell-Reifestadien-Proben:	62 (22/15)	-0,3-66 (4)
ICGC MMML-Seq-Projekt WPN	5 (0/5)	3-30 (13)
Kulis et al. [88]	35 (22/10)	2-66 (5)
Lee et al. [87]	22 (k. A./k. A.)	-0,3 (-0,3)
KZB-Lymphomproben:	555 (246/272)	2-94 (51)
MMML-Projekt	182 (89/93)	2-94 (27)
ICGC MMML-Seq-Projekt	361 (153/171)	2-89 (55)
FFPE-BL (Sektion Hämatopathologie Kiel)	12 (4/8)	40-74 (62,5)

2.1.1.1.1 Blutproben aus der Studie von Kolarova et al.

In der Studie von Kolarova et al. [89] wurden DNA-Methylierungsanalysen mittels HM450k-Arrays bei Patienten mit mentaler Retardierung und unauffälligem Karyotyp durchgeführt. Als Kontrollen wurden 19 periphere Blutproben von gesunden Kindern und Jugendlichen ohne Entwicklungsstörung hinsichtlich ihres genomweiten Methylierungsprofils untersucht. Diese Kontrollpersonen hatten sich zur Abklärung verschiedener monogenetischer Erkrankungen im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel vorgestellt, ohne dass ein genetischer Defekt nachgewiesen werden konnte. Die Kontrollpersonen bzw. ihre Erziehungsberechtigten hatten der anonymen Nutzung des Restmaterials nach der molekularen Diagnostik für Forschungszwecke schriftlich zugestimmt, sodass die übriggebliebenen DNA-Proben aus dem peripheren Blut bzw. die Blutproben zur DNA-Methylierungsanalyse genutzt werden konnten [89]. Zudem stimmte die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel der Verwendung der Proben in ihrem Votum mit dem Aktenzeichen D 401/08 (s. Anhang 25) zu. Der Datensatz der Studie von Kolarova et al. [89] wurde im *Gene Expression Omnibus* [92] unter dem Namen GSE64380 hinterlegt.

Die Scan-Rohdaten der Kontrollproben auf dem HM450k-Array wurden freundlicherweise zur Verwendung in der vorliegenden Dissertation zur Verfügung gestellt, sodass die 19 gesunden Blutproben in die Kontrollgruppe der Blutproben in dieser Arbeit eingeschlossen werden konnten. Diese Kontrollproben aus der Studie von Kolarova et al. wiesen ein chronologisches Alter von 0 bis 17 Jahren mit einem Median von 3 Jahren auf [89].

2.1.1.1.2 Blutproben aus der Studie von Friemel et al.

In der Studie von Friemel et al. [90] wurden periphere Blutproben von Männern mit idiopathischer Infertilität bei unauffälligem Karyotyp unter Verwendung des HM450k-Arrays auf differentiell methylierte CpG-Dinukleotide im Vergleich zu fertilen Männern untersucht. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 10 gesunden, fertilen Männern zusammen, welche der Verwendung der anonymisierten Proben für molekulare Studien schriftlich zugestimmt hatten. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel begutachtete die Studie in ihrem Ethikvotum mit dem Aktenzeichen D 447/09 positiv (s. Anhang 25). Der gesamte Datensatz der Studie von Friemel et al. wurde im *Gene Expression Omnibus* [92] unter dem Namen GSE51245 veröffentlicht [90].

Freundlicherweise wurden die Scan-Rohdaten der Kontrollproben auf dem HM450k-Array für diese Arbeit zur Verfügung gestellt, sodass die 10 gesunden Blutproben in die Kontrollgruppe der Blutproben in dieser Arbeit eingeschlossen werden konnten. Diese Kontrollproben aus der Studie von Friemel et al. wiesen ein chronologisches Alter von 21 bis 52 Jahren mit einem Median von 39,5 Jahren auf [90].

2.1.1.1.3 Blutproben aus dem Projekt „Schlaf, Arbeit und deren Konsequenzen für menschliche Stoffwechselkrankheiten“

Das grenzüberschreitende deutsch-dänische Projekt „Schlaf, Arbeit und deren Konsequenzen für menschliche Stoffwechselkrankheiten“ (SAME) untersuchte den Einfluss von Schlafqualität, Lebensstil sowie unterschiedlicher Arbeitszeitmodelle wie Schichtarbeit und Nachtarbeit auf Stoffwechselerkrankungen am Beispiel monozygoter und dizygoter Zwillinge [91]. Es wurde als Interreg 4A Syddanmark-Schleswig-K.E.R.N. Projekt von der Europäischen Union gefördert.

Die dänischen Kooperationspartner (Institut für öffentliche Gesundheit, Süddänische Universität Odense, Dänemark; Institut für regionale Gesundheitsforschung, Süddänische Universität Odense, Dänemark) rekrutierten gesunde Zwillinge, welche im dänischen Zwillingsregister gelistet waren, als Probanden und führten die Datenerhebung durch. Alle Probanden hatten schriftlich in die Studienteilnahme eingewilligt und die zuständige dänische Ethikkommission (Ethikvotum S-20090065)

sowie die dänische Datenschutzbehörde (AZ 2009-41-2990) hatten der Durchführung der Studie zugestimmt.

Ziel der Studie war es, umfangreiche Gesundheitsdaten der Zwillinge zu dokumentieren, welche repräsentativ für die dänische Bevölkerung sein sollten. Hierfür füllten die Zwillinge standardisierte Fragebögen zu ihrem Lebensstil aus. Auch wurden sie anthropologisch vermessen und medizinisch untersucht [91]. Die dänischen Kooperationspartner entnahmen zudem Blutproben und führten die DNA-Extraktion aus den Leukozyten des peripheren Bluts durch. Die DNA-Proben wurden anschließend auf Trockeneis an das Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel verschickt. Dort wurden genomweite DNA-Methylierungsanalysen von 146 Blutproben unter Verwendung des HM450k-Arrays durchgeführt. Von den 146 Blutproben erfüllten 30 Proben nicht die Qualitätskriterien, sodass sie von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden und 116 Zwillingsproben für die weitere Auswertung verblieben [91].

Die Rohdaten des HM450k-Array-Scans der 116 Proben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, wurden freundlicherweise für diese Dissertation zur Verfügung gestellt. Die Zwillingsproben wiesen ein chronologisches Alter von 20 bis 63 Jahren mit einem Median von 39 Jahren auf und wurden in die Kontrollgruppe der gesunden Blutproben in dieser Arbeit eingeschlossen.

2.1.1.2 Gesunde B-Zell-Reifestadien-Proben als Kontrollkohorte

Im Rahmen der B-Zell-Differenzierung kommt es physiologisch zu zahlreichen Genumlagerungen sowie somatischer Hypermutation, sodass sich die reifenden B-Zellen sowohl genetisch als auch epigenetisch von den weiteren Blutzellen unterscheiden [67,69]. Da sich das DNA-Methylierungsmuster während der B-Zell-Reifung verändert, erschien es interessant, das DNAm Alter nach Horvath [49] in den verschiedenen Stadien der B-Zell-Differenzierung zu untersuchen.

Zudem stellen die späten B-Zell-Reifestadien eine wichtige Kontrollgruppe für die Keimzentrums-B-Zell-Lymphome dar, welche sich aus den B-Zellen während und kurz nach der Keimzentrumsreaktion entwickeln. Da sich diese B-Zell-Reifestadien jedoch, wie oben beschrieben, sowohl genetisch als auch epigenetisch von den weiteren Blutzellen unterscheiden, ist es essenziell, sie als separate Kontrollgruppe zu betrachten. Dies bietet zudem die Möglichkeit, Lymphom-spezifische von physiologischen Keimzentrums-B-Zell-spezifischen epigenetischen Mustern zu unterscheiden.

Als gesunde Kontrollen wurden in dieser Arbeit 5 Keimzentrums-B-Zell-Proben aus dem ICGC MMML-Seq Projekt Arbeitspaket WPN, 35 B-Zell-Proben später B-Zell-Differenzierungsstadien aus der Studie von Kulis et al. [88] sowie 22 frühe B-Zell-Reifestadien-Proben aus der Studie von Lee et al. [87]

verwendet. Insgesamt flossen somit 62 B-Zell-Reifestadien-Proben in die Analyse dieser Dissertation ein, welche fast alle Stadien der B-Zell-Differenzierung abbildeten. Diese B-Zell-Proben wiesen ein chronologisches Alter von -0,3 bis 66 Jahren mit einem Median von 4 Jahren auf (s. Tabelle 1).

2.1.1.2.1 Keimzentrums-B-Zell-Proben des Arbeitspakets WPN des ICGC MMML-Seq-Projektes

Das „*International Cancer Genome Consortium: Determining Molecular Mechanisms in Malignant Lymphoma by Sequencing*“-Projekt (ICGC MMML-Seq, Internationales Krebsgenom-Konsortium: Analyse Molekularer Mechanismen in Malignen Lymphomen durch Sequenzierung) war ein interdisziplinäres und multizentrisches Projekt zur umfassenden molekularen Untersuchung von Keimzentrums-B-Zell-Lymphomen (Details s. Abschnitt 2.1.1.3.2). Im Rahmen des Arbeitspakets „*Somatische Variation in normalen B-Zellen*“ (*Workpackage N*, WPN) des ICGC MMML-Seq-Projektes wurden zusätzlich gesunde Keimzentrums-B-Zell-Proben aus Tonsillen analysiert [93]. Die adenoiden Tonsillen waren operativ entfernt worden und wiesen keine neoplastischen Veränderungen auf. Mittels Durchflusszytometrie (*Fluorescence-activated Cell Sorting*, FACS) wurden die Keimzentrums-B-Zellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker (CD20⁺CD38⁺) isoliert, sodass sie selektiv untersucht werden konnten [94]. Die Aufarbeitung und Analyse der Keimzentrums-B-Zell-Proben erfolgte analog zu den Lymphomproben des ICGC MMML-Seq-Projektes.

Alle Probanden bzw. bei Minderjährigen ihre Erziehungsberechtigten hatten schriftlich ihr Einverständnis zur Verwendung des entnommenen Tonsillennaterials für Forschungszwecke gegeben. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel begutachtete das ICGC MMML-Seq-Projekt in ihrem Ethikvotum mit dem Aktenzeichen A 150/10 (s. Anhang 25) positiv.

In dieser Arbeit wurden die 5 Keimzentrums-B-Zell-Proben aus dem Arbeitspaket WPN des ICGC MMML-Seq-Projektes in die Kontrollgruppe der gesunden B-Zell-Reifestadien eingeschlossen. Die Donoren wiesen ein chronologisches Alter von 3 bis 30 Jahren mit einem Median von 13 Jahren bei Probenentnahme auf.

2.1.1.2.2 Späte B-Zell-Reifestadien-Proben aus der Studie von Kulis et al.

In der Studie von Kulis et al. [88] wurden epigenetische Veränderungen im Rahmen der B-Zell-Differenzierung untersucht. Hierzu wurden Proben von naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen und B-Gedächtniszellen aus dem peripheren Blut, den Tonsillen und dem Knochenmark gesunder Donoren entnommen und mittels Durchflusszytometrie anhand ihrer charakteristischen

Oberflächenmarker nach B-Zell-Reifestadien sortiert. Nach der DNA-Extraktion erfolgte die genomweite DNA-Methylierungsanalyse der B-Zell-Reifestadien-Proben auf dem HM450k-Array.

Insgesamt umfasste die Studie von Kulis et al. 35 B-Zell-Differenzierungsstadien-Proben. Von den 10 naiven B-Zell-Proben wurden 5 Proben aus dem peripheren Blut und 5 Proben aus Tonsillen isoliert. Die 9 Keimzentrums-B-Zell-Proben stammten ebenfalls aus Tonsillen. Von den 11 Plasmazell-Proben wurden 8 Proben aus Tonsillen und 3 Proben aus dem Knochenmark entnommen. Die 5 B-Gedächtniszell-Proben stammten aus dem peripheren Blut [88].

Die Ethikkommissionen der Universitätskliniken von Barcelona (*Hospital Clínic de Barcelona*, Spanien), Navarra (*Clínica Universidad de Navarra*, Spanien) sowie Rennes (*Centre hospitalier universitaire de Rennes*, Frankreich) stimmten der Studie von Kulis et al. zu [88]. Der gesamte Datensatz mit den DNA-Methylierungswerten der Proben wurde im *European Genome-phenome Archive* [95] unter dem Zugangscodex EGAS00001001196 hinterlegt.

Da die Rohdaten des Scans der Proben auf dem HM450k-Array freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt wurden, konnten die 35 Proben in die Kontrollkohorte der gesunden B-Zell-Reifestadien in dieser Dissertation eingeschlossen werden. Alle Proben wurden zur Anonymisierung in dieser Arbeit umbenannt.

Bei den 3 Plasmazell-Proben aus dem Knochenmark gilt es zu beachten, dass hierfür die DNA-Proben von 4 verschiedenen Donoren zu einer Probe vereinigt wurden. Dadurch konnten keine exakten Alters- und Geschlechtsangaben für diese Probe gemacht werden. Das chronologische Alter wurde für diese Proben mit 20 bis 30 Jahren angegeben [88]. Für die Analysen wurde anschließend der mittlere Wert als Altersangabe benutzt, in diesem Fall also 25 Jahre. Zudem wurde das Alter von zwei Keimzentrums-B-Zell-Proben sowie von zwei naiven B-Zell-Proben aus Tonsillen mit 2 bis 6 Jahren angegeben [88], sodass auch hier der mittlere Wert 4 Jahre für die weiteren Analysen als Altersangabe benutzt wurde.

Insgesamt wiesen die 35 B-Zell-Reifestadien-Proben von Kulis et al. [88] bei Probenentnahme ein chronologisches Alter von 2 bis 66 Jahren mit einem Median von 5 Jahren auf.

2.1.1.2.3 Frühe B-Zell-Reifestadien-Proben aus der Studie von Lee et al.

In die Analysen der Studie von Kulis et al. [88] flossen auch Proben aus einer vorherigen Studie von Lee et al. [87] ein, in welcher sehr frühe B-Zell-Reifestadien aus dem Knochenmark untersucht wurden. So umfasste die Studie von Lee et al. insgesamt 22 frühe B-Zell-Reifestadien-Proben, welche sich aus 6 Hämatopoetischen Progenitorzell-Proben, 6 Pro-B-Zell-Proben, 6 Prä-B-Zell-Proben sowie 4 unreifen B-Zell-Proben zusammensetzten [87].

Diese B-Zell-Proben von Lee et al. [87] wurden aus dem Knochenmark von 8 gesunden Feten nach elektiven Schwangerschaftsabbrüchen entnommen. Aus jeder Knochenmark-Probe wurden jeweils mittels Durchflusszytometrie die vier oben genannten B-Zell-Subpopulationen anhand ihrer typischen Oberflächenmarker separiert. Nachfolgend wurde die DNA extrahiert und mittels Natriumbisulfit konvertiert. Hierbei traten bei 8 DNA-Proben von 2 Feten technische Probleme auf, sodass nur 24 konvertierte DNA-Proben von 6 Feten anschließend unter Verwendung des HM450k-Arrays auf genomweite DNA-Methylierungsmuster untersucht wurden. Da 2 unreife B-Zell-Proben nicht die Qualitätskriterien erfüllten, wurden sie von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Es verblieben die 22 zuvor genannten B-Zell-Proben für die Analyse [87].

Die Mütter hatten der Verwendung der fetalen Proben zu Forschungszwecken schriftlich zugestimmt. Zudem hatte das Komitee zur Forschung am Menschen der Universität von Kalifornien San Francisco (*University of California San Francisco Committee on Human Research, USA*) die Studie von Lee et al. genehmigt [87].

Die Scan-Rohdaten der 22 qualitätskontrollierten B-Zell-Proben auf dem HM450k-Array wurden freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt, sodass diese in die Kontrollkohorte der gesunden B-Zell-Reifestadien in dieser Dissertation eingeschlossen werden konnten. Alle Proben wurden zur Anonymisierung in dieser Arbeit umbenannt.

Da der genaue Zeitpunkt der Konzeption unbekannt war, wurde das Alter der Feten anhand ihrer Körpergröße geschätzt und für alle Proben mit 20.-24. Schwangerschaftswoche (SSW) angegeben [87]. Wenn man den Zeitpunkt einer reifen Geburt (durchschnittlich 40. SSW) als Nullpunkt der Altersberechnung definiert, dann weisen die fetalen Proben ein negatives chronologisches Alter auf. Da die Feten im Durchschnitt in der 22. SSW entnommen wurden, wird das chronologische Alter der Proben in dieser Arbeit mit -18 Wochen bzw. -0,3 Jahren angegeben. Für die Proben aus der Studie von Lee et al. lagen keine Angaben zum Geschlecht der Donoren vor.

2.1.1.3 Keimzentrums-B-Zell-Lymphomproben

In dieser Arbeit wurden 555 Lymphomproben untersucht, welche im Rahmen des Verbundprojektes „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“ (MMML, 182 Lymphomproben), des Projektes „*International Cancer Genome Consortium: Determining Molecular Mechanisms in Malignant Lymphoma by Sequencing*“ (ICGC MMML-Seq, 361 Lymphomproben) sowie von der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister im Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel (12 Lymphomproben) erhoben wurden. Insgesamt umfasste die Lymphomproben-Stichprobe 164 BL-, 178 DLBCL- und 152 FL-Proben, welche zusammengefasst ein

chronologisches Alter von 2 bis 94 Jahren mit einem Median von 51 Jahren aufwies (s. Tabelle 1). Die DNA-Methylierungsanalysen auf dem HM450k-Array erfolgten für alle drei Studien-Kohorten nach dem gleichen Protokoll am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel. Die verschiedenen Kohorten werden nachfolgend einzeln dargestellt.

2.1.1.3.1 KZB-Lymphomproben aus dem Verbundprojekt „Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen“

Im Rahmen des multizentrischen Verbundprojektes "Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen" (MMML) wurden umfangreiche molekularbiologische Untersuchungen an B-NHL-Proben durchgeführt. Im MMML-Projekt arbeiteten Kliniker, Referenzpathologen und Wissenschaftler interdisziplinär mit dem Ziel zusammen, die Rolle genetischer Aberrationen und der Genexpression in der Pathogenese von Lymphomen aufzuklären. Zudem sollten spezifische Alterationen des Genoms, Epigenoms und Transkriptoms zur Abschätzung der Prognose und des Therapieansprechens bei individuellen Lymphomproben identifiziert werden [96].

Das MMML-Projekt wurde im Zeitraum von 2003 bis 2011 von der Deutschen Krebshilfe gefördert. In die Studie wurden sowohl Erstdiagnosen von B-NHL mit Probenentnahme vor Therapiebeginn als auch Rezidivproben der gleichen Studienpatienten eingeschlossen. Die B-NHL-Proben wurden deutschlandweit an mehreren Kliniken im Rahmen von diagnostischen Lymphknotenexstirpationen entnommen und anschließend in Referenzzentren für Lymphknotenpathologie histologisch und immunhistologisch begutachtet. Des Weiteren wurden molekulargenetische Untersuchungen sowie genomweite Genexpressions- und DNA-Methylierungsanalysen an den Proben durchgeführt. Für die epigenetischen Analysen wurde die DNA aus kryofixierten Lymphomproben extrahiert und Bisulfit-konvertiert. Anschließend wurde das DNA-Methylierungsprofil unter Verwendung des HM450k-Arrays bestimmt. Aus einigen Lymphomproben wurden mehrere DNA-Proben extrahiert, welche unabhängig voneinander auf den HM450k-Array hybridisiert wurden. Die DNA-Methylierungsanalysen wurden am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt.

Der Schwerpunkt der Rekrutierung von NHL-Studienpatienten im MMML-Projekt lag auf den KZB-Lymphomen, sodass insgesamt 182 Lymphomproben, bestehend aus 77 BL-, 69 DLBCL- und 28 FL-Proben sowie 7 hochmalignen B-Zell-Lymphomproben und einer Primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphomprobe, auf ihre DNA-Methylierung untersucht wurden.

Alle Studienpatienten bzw. bei Minderjährigen deren Erziehungsberechtigte hatten schriftlich ihr Einverständnis zur Verwendung der Lymphomproben für Forschungszwecke gegeben. Die

Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel begutachtete das MMML-Projekt in ihrem Ethikvotum mit dem Aktenzeichen D 425/03 (s. Anhang 25) positiv [94].

Die Rohdaten des HM450k-Array-Scans wurden freundlicherweise für alle Lymphomproben des MMML-Projektes für diese Dissertation zur Verfügung gestellt, sodass die 77 BL-, 69 DLBCL- und 28 FL-Proben in die Kohorte der KZB-Lymphomproben in dieser Arbeit eingeschlossen werden konnten. Die Einzelfälle anderer Lymphomentitäten wurden im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter betrachtet, da die jeweilige Probenanzahl pro Entität zu gering für eine statistische Auswertung war.

So flossen insgesamt 174 Lymphomproben aus dem MMML-Projekt in die Analyse der vorliegenden Arbeit ein, welche ein chronologisches Alter von 2 bis 94 Jahren mit einem Median von 27 Jahren aufwiesen.

2.1.1.3.2 KZB-Lymphomproben aus dem ICGC MMML-Seq-Projekt

Das „*International Cancer Genome Consortium: Determining Molecular Mechanisms in Malignant Lymphoma by Sequencing*“-Projekt (ICGC MMML-Seq, Internationales Krebsgenom-Konsortium: Analyse Molekularer Mechanismen in Malignen Lymphomen durch Sequenzierung) war ein interdisziplinäres und multizentrisches Projekt zur umfassenden Sequenzierungs-basierten Untersuchung von KZB-Lymphomen, welches die wissenschaftliche Arbeit des MMML-Projektes fortführte [97].

Das ICGC MMML-Seq-Projekt war Teil des Internationalen Krebsgenom-Konsortiums (*International Cancer Genome Consortium*, ICGC), welches ein weltweiter Zusammenschluss von internationalen Wissenschaftlern mit dem Ziel ist, die Genome verschiedener Krebsentitäten zu entschlüsseln und die Sequenzierungsdaten in Datenbanken für Forschungszwecke zugänglich zu machen [98].

Im Rahmen des ICGC MMML-Seq-Projektes wurden im Zeitraum von 2010 bis 2016 umfassende genetische und epigenetische Untersuchungen sowie Genexpressionsanalysen bei KZB-Lymphomen durchgeführt. In die Studie wurden nur Erstdiagnosen von KZB-Lymphomen eingeschlossen, bei denen die Probenentnahme vor Therapiebeginn erfolgte. Rezidivproben waren von der Studie ausgeschlossen. Die Lymphomproben wurden deutschlandweit an mehreren Kliniken im Rahmen diagnostischer Probenentnahmen gewonnen. Die histopathologische Diagnose wurde für jede Probe im Konsens der Referenzpathologen für Lymphknotenpathologie basierend auf der WHO-Klassifikation von 2008 [99] gestellt. Dabei bestand das Pathologenpanel beim ICGC MMML-Seq-Projekt aus denselben Referenzpathologen wie beim MMML-Projekt. Für die genomweite DNA-Methylierungsanalyse wurde die DNA aus kryofixierten Lymphomproben extrahiert und nach der

Bisulfit-Konvertierung auf den HM450k-Array hybridisiert. Von einigen Lymphomproben wurden mehrere DNA-Proben unabhängig voneinander untersucht. Die DNA-Methylierungsanalysen auf dem HM450k-Array wurden im Rahmen des Arbeitspakets 7 (*Workpackage 7*) des ICGC MMML-Seq-Projektes am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel nach dem gleichen Protokoll wie beim MMML-Projekt durchgeführt.

Insgesamt wurden im ICGC MMML-Seq-Projekt die Methylierungsprofile von 361 NHL-Proben bestimmt, welche sich aus 75 BL-, 109 DLBCL- und 124 FL-Proben sowie 53 Proben verschiedener weiterer Lymphomentitäten mit jeweils nur sehr geringer Stichprobengröße zusammensetzten. Bei den BL wurden nur Proben des sporadischen BL-Subtyps in die Studie eingeschlossen.

Alle Studienpatienten bzw. bei Minderjährigen deren Erziehungsberechtigte hatten schriftlich der Verwendung der entnommenen Lymphomproben für molekulare Analysen zugestimmt. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigte das ICGC MMML-Seq-Projekt in ihrem Ethikvotum mit dem Aktenzeichen A 150/10 (s. Anhang 25) [94].

Die Scan-Rohdaten der HM450k-Arrays wurden freundlicherweise für alle Lymphomproben des ICGC MMML-Seq-Projektes für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Somit konnten die 75 BL-, 109 DLBCL- und 124 FL-Proben in die Kohorte der KZB-Lymphomproben in dieser Dissertation eingeschlossen werden. Diese 308 KZB-Lymphomproben wiesen ein chronologisches Alter von 2 bis 89 Jahren mit einem Median von 55 Jahren auf. Aufgrund der jeweils sehr geringen Probenanzahl der weiteren Lymphomentitäten war eine statistische Auswertung nicht möglich, sodass diese Einzelfälle nicht in die Analysen der vorliegenden Arbeit einfließen. Die Probenamen wurden anonymisiert, sodass die Identifikation einzelner Studienpatienten nicht mehr möglich ist.

Die im Rahmen des Arbeitspakets „Somatische Variation in normalen B-Zellen“ (*Workpackage N, WPN*) des ICGC MMML-Seq-Projektes analysierten 5 Keimzentrums-B-Zell-Proben aus Tonsillen flossen, wie zuvor erläutert, in die Kontrollkohorte der gesunden B-Zell-Reifestadien in dieser Arbeit ein (Details s. Abschnitt 2.1.1.2.1).

2.1.1.3.3 Formalin-fixierte BL-Proben aus der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister Kiel

Die Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel ist ein Referenzzentrum für Lymphknotenpathologie, welches über eine umfassende Lymphomprobensammlung verfügt. Für die genomweite DNA-Methylierungsanalyse im Rahmen dieser Dissertation stellte die Sektion Hämatopathologie

freundlicherweise 12 sporadische BL-Proben zur Verfügung. Diese Proben stammten aus Lymphomen, bei denen nach der Diagnostik Gewebe übriggeblieben war und die Patienten der anonymen Nutzung des Restmaterials für wissenschaftliche Analysen schriftlich zugestimmt hatten. Die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel stimmte in ihrem Ethikvotum mit dem Aktenzeichen D 401/08 (s. Anhang 25) der Verwendung von Restmaterialien für Forschungszwecke zu.

Die BL-Proben waren im Rahmen der Diagnostik entnommen worden und, wie für die histopathologische Begutachtung üblich, in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet worden (engl. *Formalin-fixed paraffin-embedded tissue*, FFPE). Alle Proben wurden vom Referenzpathologen Herrn Prof. Dr. med. Wolfram Klapper, welcher auch Mitglied des Pathologenpanels im MMML- und ICGC MMML-Seq-Projekt gewesen war, als typische BL klassifiziert.

Die Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister Kiel, welche auch schon im ICGC MMML-Seq-Projekt im Rahmen des Arbeitspakets 3 (*Workpackage 3*) für die DNA-Präparation und Qualitätskontrolle zuständig gewesen war [100], führte die DNA-Extraktion aus den FFPE-BL-Proben durch. Nachfolgend wurden die DNA-Proben dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel für die Bisulfit-Konvertierung und anschließende DNA-Methylierungsanalyse auf dem HM450k-Array zur Verfügung gestellt. Hierbei wurde das gleiche Protokoll wie im MMML- und ICGC MMML-Seq-Projekt verwendet.

So konnten die 12 FFPE-BL-Proben, welche ein chronologisches Alter von 40 bis 74 Jahren mit einem Median von 62,5 Jahren aufwiesen, in die Kohorte der KZB-Lymphomproben in dieser Arbeit eingeschlossen werden. Eine Besonderheit dieser Probenkohorte war das relativ hohe Alter der BL-Patienten, da hauptsächlich Kinder und Adoleszenten am sporadischen BL erkranken.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
Aqua bidest (ddH ₂ O)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Formamid	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natronlauge (1 N)	Merck KGaA, Darmstadt, DE

2.1.3 Kits

Tabelle 3: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Kits

Kits	Hersteller
EZ DNA Methylation Kit	Zymo Research Corporation, Irvine, CA, USA
Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit	Illumina, Inc., San Diego, CA, USA

2.1.4 Instrumente und Geräte

Tabelle 4: Bezeichnung und Hersteller der verwendeten Instrumente und Geräte

Instrumente und Geräte	Bezeichnung	Hersteller
DNA/RNA-UV-Reinigungsbox	UVC/T-M-AR	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, DE
Exsikkator	Bel-art	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Färbeinkubator	Rack Chamber Te-Flow	Tecan Group AG, Männedorf, CH
Feinwaage	LC620P	Sartorius AG, Göttingen, DE
Hybridisierungssofen	Hybridization Oven	Illumina, Inc., San Diego, CA, USA
Platteninkubator	Hybex Microsample Incubator	SciGene Corporation, Sunnyvale, CA, USA
Plattenschüttler	High Speed Microplate Shaker	Illumina, Inc., San Diego, CA, USA
Scanner für Infinium Human-Methylation450 BeadChip	iScan	Illumina, Inc., San Diego, CA, USA
Thermoblock/Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Thermocycler	T3000 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Tischzentrifuge	Mikro200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Vakuumpumpe	Model 2534C-02	Welch, Mt. Prospect, IL, USA
Verschweißgerät für 96-Well-Platten	ALPS 25 Manual Heat Sealer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

2.1.5 Software

Tabelle 5: Bezeichnung, Version, genutzte Funktion und Hersteller/URL der verwendeten Software

Software	Nutzung/Funktion	Hersteller/URL
Illumina GenomeStudio (Version V2011.1, Methylation Module 1.9.0)	Auswertung des Infinium HumanMethylation450 BeadChip	Illumina, Inc., San Diego, CA, USA
Microsoft Office 365 (Microsoft Excel)	Datendokumentation und Auswertung	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
DNA Methylation Age Calculator	Berechnung des DNAm Alters der Proben	https://dnamage.genetics.ucla.edu/home
R (Version 3.3.2)	Datenauswertung	R Foundation for Statistical Computing, https://www.r-project.org/
Qlucore Omics Explorer 3.2	Auswertung der Methylierungsdaten	Qlucore AB, Lund, Schweden
GOrilla (Gene Ontology enRiChment anaLysis and visualizAtion tool)	Genontologie-Analyse	http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/

2.1.6 Lösungen

0,1 N Natriumhydroxid-Lösung zur Probenprozessierung (Infinium HumanMethylation450 BeadChip)

Eine 0,1 N Natriumhydroxid-Lösung wurde durch Verdünnung einer 1 N Natriumhydroxid-Lösung im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O hergestellt.

0,5 M EDTA-Lösung zur Probenprozessierung (Infinium HumanMethylation450 BeadChip)

Für diese Lösung wurden 7,3 g EDTA in 50 ml ddH₂O gelöst.

95% Formamid/1 mM EDTA-Lösung zur Probenprozessierung (Infinium HumanMethylation450 BeadChip)

Zur Herstellung dieser Lösung wurden 80 µl einer 0,5 M EDTA-Lösung zu 38 ml 100%-igem Formamid gegeben und anschließend mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 40 ml aufgefüllt.

2.2 Methoden

In diesem Abschnitt werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden erläutert.

Für die Blutproben aus den Studien von Kolarova et al. [89], Friemel et al. [90] und aus dem SAME-Projekt [91] sowie für die B-Zell-Reifestadien-Proben der Studien von Kulis et al. [88] und Lee et al. [87] wurden die Rohdaten (IDAT-Dateien) des Scans der Proben auf dem *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (HM450k, Illumina) für diese Dissertation zur Verfügung gestellt.

Die genomische DNA aller Lymphomproben wurde von der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel extrahiert und zusammen mit Angaben über die DNA-Konzentration in den Proben zur Verfügung gestellt. Die anschließenden DNA-Methylierungsanalysen auf dem HM450k-Array wurden im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

2.2.1 Klassifikation der Lymphomproben

Zur histopathologischen Diagnosestellung wurden die Lymphomproben von einem Referenzpathologen-Panel anhand der WHO-Klassifikation von 2008 [99] eingeteilt.

Zusätzlich wurde die ursprünglich zur Prognoseabschätzung nach Chemotherapie bei DLBCL-Proben entwickelte *Cell of origin*-Klassifikation (COO) auf die DLBCL-Proben des MMML- und ICGC MMML-Seq-Projektes angewendet. Hierbei werden die Genexpressionsprofile der DLBCL-Proben daraufhin untersucht, ob sie dem Genexpressionsprofil von Keimzentrums-B-Zellen (*Germinal center B-cell type*, GCB-Subtyp) oder von Plasmazellen (*Activated B-cell type*, ABC-Subtyp) ähneln. Proben, welche nicht eindeutig dem GCB- oder ABC-Subtyp zugeordnet werden können, werden als Type-III-Subtyp zusammengefasst [80]. Für die Klassifikation der DLBCL-Proben in die COO-Subtypen wurde der zuvor beschriebene *Linear Predictor Score* [79] verwendet, welcher auf den Transkriptionsdaten von 27 spezifischen Genen beruht. Obwohl die COO-Klassifikation somit auf Genexpressionsdaten basiert, sind jedoch Wechselwirkungen mit dem epigenetischen DNA-Methylierungsmuster der Lymphome wahrscheinlich. Daher wurde im Rahmen dieser Dissertation untersucht, ob sich signifikante Unterschiede im DNAm Alter zwischen den DLBCL-Untergruppen der COO-Klassifikation zeigen.

2.2.2 Überprüfung der Proben anhand der Einschlusskriterien für diese Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Proben der Keimzentrums-B-Zell-Lymphomentitäten BL, DLBCL und FL untersucht werden, welche bei *de novo* diagnostizierten Lymphomen vor Therapiebeginn entnommen worden waren. Um eine zuverlässige Auswertung zu gewährleisten, wurden nur Lymphomproben mit einem Tumorzellgehalt von mindestens 40% in der nachfolgenden Analyse berücksichtigt.

Zum Vergleich sollte jeweils eine Kontrollkohorte von gesunden, unabhängigen Blutproben bzw. B-Zell-Reifestadien-Proben analysiert werden.

Proben, welche die Einschlusskriterien für die Auswertung im Rahmen dieser Dissertation nicht erfüllten, wurden von der Analyse ausgeschlossen.

2.2.2.1 Ausschluss von Lymphomproben anderer Entitäten sowie bei niedrigem Tumorzellgehalt

Da nur die Lymphomentitäten BL, DLBCL und FL in der vorliegenden Arbeit untersucht werden sollten, wurden Proben anderer Lymphomentitäten von der Auswertung ausgeschlossen. Im Rahmen der pathologischen Analyse wurde zudem der Tumorzellgehalt der Lymphomproben bestimmt. Lymphomproben mit einem Tumorzellgehalt unter 40% wurden von den weiteren Auswertungen ausgeschlossen, da eine Analyse der geringen Tumor-DNA-Mengen als unsicher erschien.

2.2.2.2 Ausschluss von Rezidivproben

Um eine homogene Lymphomproben-Kohorte zu generieren, flossen nur Proben von Lymphom-Erstdiagnosen in die Auswertung in dieser Arbeit ein. Rezidivproben wurden von der Analyse ausgeschlossen, weil sie nicht als unabhängig vom ursprünglichen Primär-Lymphom angesehen werden können. So wurde in einer Studie von Löffler et al. [101] für FL gezeigt, dass das DNA-Methylierungsprofil von Rezidiven dem des ursprünglichen Primär-Lymphoms häufig ähnelt. Ein Teil der Proben dieser Studie von Löffler et al. [101] floss in die Kohorte des MMML-Projektes ein und ist somit in der Lymphomproben-Kohorte in dieser Arbeit enthalten.

Da Primär-Lymphom und Rezidiv somit epigenetisch nicht unabhängig voneinander sind, müssten die Proben folglich verbunden ausgewertet werden. Zudem würden bei Einschluss der Rezidivproben von einigen Patienten mehrere Lymphomproben (Primärtumor, Rezidiv) in die Analyse einfließen, sodass diese Rezidivpatienten im Vergleich zu den anderen Patienten überrepräsentiert wären und damit die Analyse verzerren würden. Da jedoch eine homogene, unverbundene Stichprobe von *de novo*

diagnostizierten Lymphomen in dieser Dissertation untersucht werden sollte, wurden die Lymphomrezidiv-Proben von der Auswertung ausgeschlossen.

2.2.2.3 Ausschluss von Co-Zwillingsproben

Monozygote und dizygote Zwillinge weisen zumeist ein sehr ähnliches DNA-Methylierungsmuster auf. Hierbei sind die epigenetischen Übereinstimmungen bei monozygoten Zwillingen ausgeprägter als bei dizygoten Zwillingen [102]. Während monozygote Zwillinge in ihren frühen Lebensjahren epigenetisch kaum zu unterscheiden sind, nehmen die Differenzen im DNA-Methylierungsmuster im Rahmen der „Epigenetic drift“ während des Alterns zu [48].

Sowohl monozygote als auch dizygote Zwillinge können daher nicht als epigenetisch unabhängig voneinander angesehen werden und müssten dementsprechend verbunden ausgewertet werden. Da die Kontrollgruppe in dieser Arbeit jedoch aus voneinander unabhängigen Blutproben bestehen sollte, wurde jeweils pro Zwillingpaar ein zufällig bestimmter Zwilling von der Analyse ausgeschlossen.

2.2.3 Bisulfitkonvertierung der genomischen DNA

Für die DNA-Methylierungsanalyse mittels HM450k-Arrays muss das Methylierungsmuster der zu untersuchenden DNA zunächst in eine Sequenzinformation übersetzt werden. Dies ist notwendig, da die DNA vor der Hybridisierung auf den HM450k-Array durch eine genomweite DNA-Amplifikation (engl. *Whole Genome Amplification*, WGA) vermehrt wird. Bei dieser WGA wird der Methylierungsstatus der Cytosin-Basen nicht berücksichtigt, sodass die amplifizierte DNA kein Methylierungsmuster mehr aufweist. Um jedoch auch nach der WGA die DNA-Methylierung auf dem HM450k-Array untersuchen zu können, wird das DNA-Methylierungsmuster zuvor durch Behandlung der DNA mit Natriumbisulfit in eine Sequenzinformation transformiert. Auf diese Weise bleibt die Information über das DNA-Methylierungsmuster auch nach einer Amplifikationsreaktion erhalten.

Im Detail wird unmethyliertes Cytosin im ersten Schritt der Bisulfit-Konvertierungsreaktion durch Addition eines Bisulfit-Ions an die 5-6-Doppelbindung zu Cytosinsulfonat sulfoniert, welches im nächsten Schritt zu Uracilsulfonat hydrolytisch desaminiert wird. Abschließend wird Uracilsulfonat unter alkalischen Reaktionsbedingungen zu Uracil desulfoniert (s. Abbildung 3). Beim methylierten Cytosin erfolgen diese Reaktionsschritte sehr viel langsamer, sodass die 5-Methylcytosine bei kurzer Reaktionszeit unverändert aus der Bisulfit-Behandlung hervorgehen [103,104]. Als Ergebnis der Bisulfitkonvertierung wurden somit die unmethylierten Cytosine zu Uracil desaminiert, während die methylierten Cytosine in der DNA-Sequenz erhalten bleiben [105].

Bei der anschließenden Amplifikationsreaktion werden die Uracil-Basen aufgrund des gleichen Basenpaarungsverhaltens durch Thymin-Basen ersetzt, während die in der ursprünglichen DNA methylierten Cytosine auch als Cytosin-Basen amplifiziert werden. Am Reaktionsende sind daher alle im ursprünglichen DNA-Strang methylierten Cytosine weiterhin als Cytosin-Basen in der DNA-Sequenz erhalten, während alle ursprünglich unmethylierten Cytosine nun zu Thymin-Basen konvertiert wurden [105]. Das ursprüngliche DNA-Methylierungsmuster ist somit in eine Sequenzinformation übersetzt worden und kann anhand von sequenzspezifischen Analyseverfahren wie dem HM450k-Array untersucht werden.

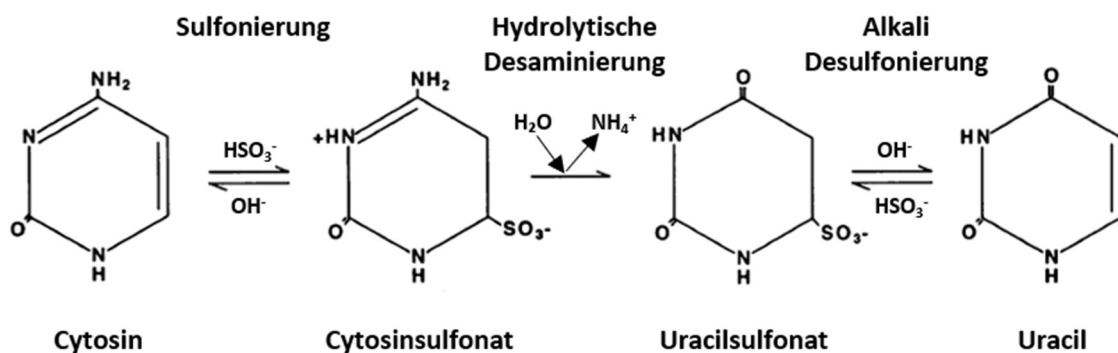


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Bisulfit-Konvertierungsreaktion. Das unmethylierte Cytosin wird durch Addition eines Bisulfit-Ions zu Cytosinsulfonat sulfoniert, welches anschließend zu Uracilsulfonat hydrolytisch desaminiert wird. Unter alkalischen Reaktionsbedingungen erfolgt schließlich die Desulfonierung von Uracilsulfonat zu Uracil. Da diese Reaktionschritte beim methylierten Cytosin sehr viel langsamer ablaufen, unterbleibt die Bisulfitkonvertierung von Methylcytosin bei kurzer Reaktionszeit. Abbildung modifiziert nach [103].

Für die Natriumbisulfit-Konvertierung der isolierten DNA-Proben wurde das von der Herstellerfirma des HM450k-Arrays (Illumina) empfohlene *EZ DNA Methylation Kit* (Zymo Research Corporation) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Nachfolgend werden die Einzelschritte beschrieben.

Zuerst wurde 1 µg genomische DNA in 45 µl bidestilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst und mit 5 µl „M-Dilution Buffer“ versetzt. Dann wurden die Proben 15 min bei 37°C in einem Thermocycler inkubiert. Für die Natriumbisulfit-Konvertierung wurden 100 µl „CT Conversion Reagent“ zu jeder Probe hinzugegeben und anschließend in einem Thermocycler 17 h lang bei 50°C und nachfolgend 10 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden 400 µl „M-Binding Buffer“ auf die „Zymo-Spin IC“-Säulen gegeben und die Proben auf die vorbereiteten Säulen pipettiert. Diese wurden dann 30 s lang bei 10.000 x g zentrifugiert. Als nächstes wurden 100 µl „M-Wash Buffer“ auf die Säulen pipettiert und die Proben erneut für 30 s bei 10.000 x g zentrifugiert.

Nachfolgend wurden 200 µl „M-Desulphonation Buffer“ für die Desulfonierungsreaktion auf die Säulen gegeben. Die Proben wurden anschließend 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 30 s bei 10.000 x g zentrifugiert. Danach erfolgten zwei Waschschrte, bei denen jeweils 200 µl „M-Wash Buffer“ auf die Säulen pipettiert und diese 30 s lang bei 10.000 x g zentrifugiert wurden. Abschließend

erfolgte die Elution der konvertierten DNA. Hierfür wurden die Säulen jeweils in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und die DNA mit 10 µl „M-Elution Buffer“ durch Zentrifugation für 30 s bei 10.000 x g von den Säulen eluiert. Die konvertierte DNA wurde entweder direkt für die Amplifikation verwendet oder bis zur Weiterbearbeitung bei -20°C gelagert.

2.2.4 Analyse der DNA-Methylierung mit dem Infinium HumanMethylation450 BeadChip

Für die genomweite Analyse des DNA-Methylierungsmusters wurde der *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (HM450k, Illumina) verwendet. Auf diesem Mikroarray können jeweils 485.577 verschiedene Loci von 12 Proben parallel auf ihren Methylierungsstatus untersucht werden. Die Loci setzen sich aus 482.241 CpG-Loci, 3091 Non-CpG-Loci und 65 Loci mit Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) zusammen. Hierdurch werden auf dem HM450k-Array insgesamt 21.231 Gene sowie 96% der CpG-Inseln des menschlichen Genoms abgebildet [106].

Um den Methylierungsstatus der Loci zu bestimmen verwendet der HM450k-Array zwei verschiedene Assay-Technologien. Den beiden Assays ist gemein, dass sie auf der BeadChip-Technologie beruhen. So sind auf der Oberfläche des Chips kleine Kügelchen, sogenannte Beads, immobilisiert, welche ein einzelsträngiges DNA-Oligonukleotid als Sonde tragen. An diese DNA-Sonden können denaturierte, Bisulfit-konvertierte DNA-Fragmente der zu analysierenden Probe sequenzspezifisch binden.

Beim „Infinium I Methylation Assay“ sind pro Locus zwei verschiedene Beadtypen auf dem Chip vorhanden, deren Sonden sich in der Base am 3'-Ende des DNA-Fragments unterscheiden, sodass sie jeweils komplementär zum methylierten (M-Bead) und unmethylierten CpG-Locus (U-Bead) sind. Da die zu untersuchende DNA Bisulfit-konvertiert und amplifiziert wurde, sind die zuvor methylierten Cytosine weiterhin als Cytosin-Basen in der DNA-Sequenz enthalten und binden an das Guanin der M-Beads, während die unmethylierten Cytosine durch Thymin-Basen ersetzt wurden und an das Adenin der U-Beads hybridisieren. Anschließend wird das gebundene DNA-Fragment entsprechend der dem untersuchten Cytosin-Locus vorangehenden Base durch ein markiertes Nukleotid verlängert (s. Abbildung 4 A). Die hierfür eingesetzten Adenin- und Thymin-Nukleotide sind mit 2,4-Dinitrophenol (DNP) markiert, während die Cytosin- und Guanin-Nukleotide mit Biotin gekennzeichnet sind. Anschließend binden Fluoreszenz-markierte Antikörper an die neu eingefügten DNA-Nukleotide. Da die in der DNA-Sequenz vorangehende Base unabhängig vom Methylierungsstatus des untersuchten Cytosin-Locus ist, wird bei beiden Beadtypen die gleiche Base im Rahmen der Einzelbasenverlängerung eingebaut, sodass das Fluoreszenzsignal für beide Beadtypen im gleichen Farbkanal des *Illumina iScan*-Messgeräts detektiert werden kann [106].

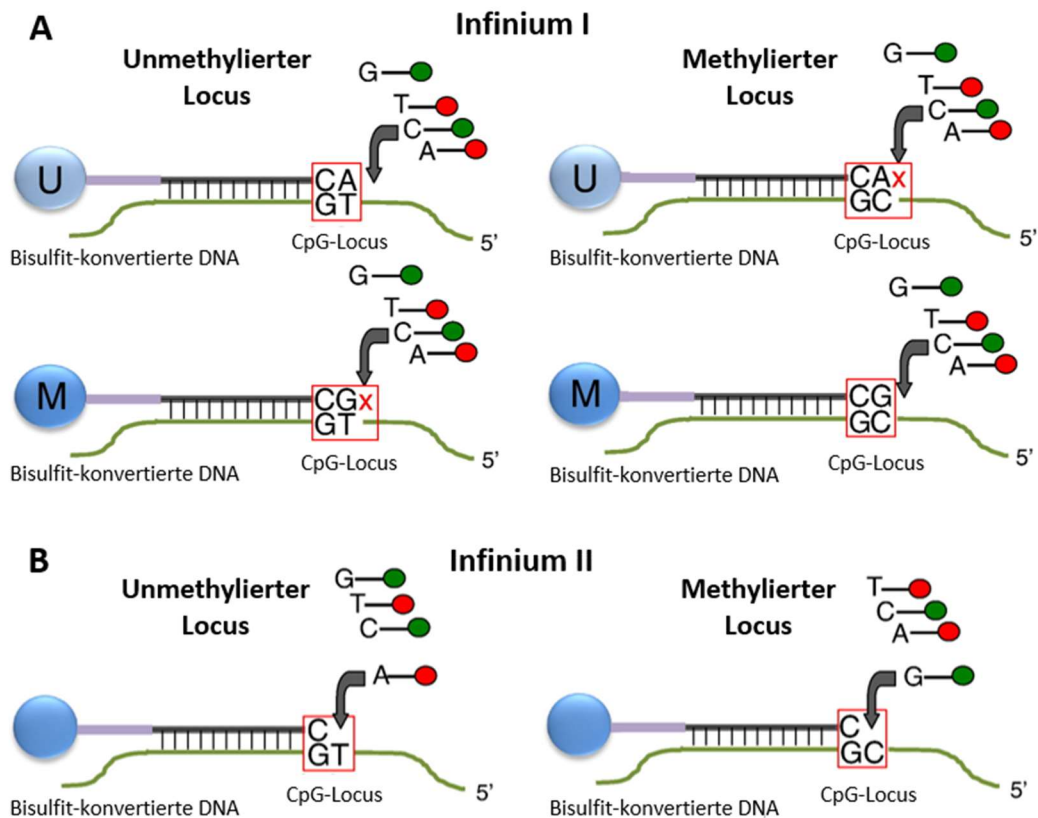


Abbildung 4: Funktionsprinzip des Infinium Methylation Assays I und II. A Funktionsprinzip des Infinium I Methylation Assays: Für jeden CpG-Locus sind zwei Beadtypen auf dem Array vorhanden, welche jeweils eine Sonden-DNA komplementär zum unmethylierten (U) bzw. methylierten (M) CpG-Locus auf der Bisulfit-konvertierten DNA tragen. Bei Bindung der DNA-Probe an einen Bead kommt es zur Einzelbasenverlängerung durch ein markiertes Nukleotid, welches anschließend mithilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert werden kann. B Funktionsprinzip des Infinium II Methylation Assays: Für jeden CpG-Locus ist jeweils nur ein Beadtyp auf dem Array vorhanden, an welchen die Bisulfit-konvertierte DNA unabhängig vom Methylierungsstatus bindet. Anschließend wird komplementär zur Sequenz des Bisulfit-behandelten CpG-Locus ein markiertes Nukleotid eingebaut, welches dann mithilfe von Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert werden kann. A, Adenin; T, Thymin; C, Cytosin; G, Guanin. Abbildung modifiziert nach [106].

Beim „Infinium II Methylation Assay“ wird jeder Locus nur durch einen Beadtyp auf dem Chip repräsentiert, dessen Sondensequenz mit einem Cytosin endet. An dieses kann sich das komplementäre Guanin anlagern, welches in der DNA-Sequenz auf das zu untersuchende Cytosin eines CpG-Locus folgt. Auf diese Weise kann die zu analysierende DNA unabhängig vom Methylierungsstatus an den Bead binden. Die anschließende Einzelbasenverlängerung der Sonden-DNA erfolgt mit den gleichen markierten Nukleotiden wie beim „Infinium I Methylation Assay“. Jedoch wird beim „Infinium II Methylation Assay“ abhängig vom ursprünglichen Methylierungsstatus des Locus entweder ein Guanin komplementär zum Cytosin (methylierter Locus) oder ein Adenin passend zum Thymin (unmethylierter Locus) eingebaut (s. Abbildung 4 B). Nachfolgend binden Fluoreszenz-markierte Antikörper, welche mit zwei verschiedenen Cyaninfarbstoffen gekoppelt sind, an die neu eingefügten DNA-Nukleotide. Während das an den Anti-DNP-Antikörper gebundene Cy3 im grünen Wellenlängenbereich fluoresziert, emittiert das an den Anti-Biotin-Antikörper gebundenen Cy5 Licht

im roten Wellenlängenbereich. Dementsprechend wird jeder Locus vom *Illumina iScan*-Messgerät einmal im roten Farbkanal für die Signale der unmethylierten Loci und einmal im grünen Farbkanal für die Signale der methylierten Loci gescannt. Die Rohdaten der Signalintensitäten werden im IDAT-Dateiformat gespeichert [106].

Für die DNA-Methylierungsanalyse der Proben in dieser Arbeit wurde der *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina) entsprechend den Anweisungen im „*Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide*“ (Illumina) verwendet. Hierfür wurden 500 ng Bisulfit-konvertierte DNA als Ausgangsmenge eingesetzt. Während die Gesamtgenom-Amplifikation und die Hybridisierung der Proben auf den HM450k-Array im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt wurden, erfolgte der Scan der Arrays mittels *iScan* im Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Nachfolgend werden die Einzelschritte erläutert.

Zuerst erfolgte die Gesamtgenom-Amplifikation der Bisulfit-konvertierten DNA-Proben. Hierfür wurden 500 ng konvertierte DNA mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 4 µl verdünnt und in eine 96-Well-Platte pipettiert. Dann wurden jeweils 20 µl „MA1“ (*Multi-Sample Amplification 1 Mix*) sowie 4 µl 0,1 N Natronlauge zu den Proben gegeben. Nachfolgend wurden die Proben 1 min lang bei 1600 rpm geschüttelt, dann für 1 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wurden 68 µl „RPM“ (*Random Primer Mix*) und 75 µl „MSM“ (*Multi-Sample Amplification Master Mix*) zu den Proben pipettiert, welche dann erneut für jeweils 1 min bei 1600 rpm geschüttelt und bei 300 x g zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Proben für 20 bis 24 h im Hybridisierungsöfen (Illumina) bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit erfolgte die enzymatische Fragmentierung der amplifizierten DNA. Dafür wurden die Proben für 1 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend mit 50 µl „FMS“ (*Fragmentation solution*) versetzt. Danach wurden die Proben 1 min lang bei 1600 rpm geschüttelt, für 1 min bei 300 x g zentrifugiert und anschließend im Heizblock 1 h lang bei 37°C inkubiert.

Für die Präzipitation der fragmentierten DNA wurden anschließend 100 µl „PM1“ (*Precipitation solution*) zu den Proben pipettiert. Dann wurden sie für 1 min bei 1600 rpm geschüttelt, für 5 min bei 37°C inkubiert und 1 min lang bei 300 x g zentrifugiert. Als Nächstes wurde die DNA durch Zugabe von 300 µl absolutem 2-Propanol ausgefällt und die 96-Well-Platte zehnmal invertiert. Die Proben wurden anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert und dann 20 min bei 3000 x g und weiterhin 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand durch schnelles Umdrehen und Ausklopfen der Platte entfernt. Diese wurde nachfolgend 1 h lang mit den Öffnungen nach unten auf einem Reagenzglasständer getrocknet.

Anschließend wurden die getrockneten DNA-Pellets wieder resuspendiert, indem 46 µl „RA1“ (*Resuspension, hybridization, and wash solution*) hinzugegeben, die 96-Well-Platte mit einer Thermoabdeckmatte verschweißt und für 1 h bei 48°C im Hybridisierungssofen inkubiert wurde. Nachfolgend wurden die Proben für jeweils 1 min bei 1800 rpm geschüttelt und bei 300 x g zentrifugiert. Dann wurden die DNA-Proben denaturiert, indem sie 20 min lang bei 95°C inkubiert wurden. Anschließend ließ man die Proben 30 min lang bei Raumtemperatur abkühlen und zentrifugierte sie für 1 min bei 300 x g.

Für die Hybridisierung der DNA-Proben auf den HM450k-Chip wurden jeweils 15 µl der Proben auf die Chips pipettiert. Danach wurden die Chips in die mit 400 µl „PB2“ (*Humidifying buffer used during hybridization*) befüllte Hybridisierungskammer gelegt und diese verschlossen. Die Hybridisierungskammer mit den Proben wurde anschließend in den Hybridisierungssofen gestellt und für 16 bis 24 h bei 48°C inkubiert. In dieser Zeit hybridisierten die DNA-Fragmente an die komplementären Sondensequenzen der Beads.

Nach erfolgter Inkubationszeit kühlte die Hybridisierungskammer 25 min lang bei Raumtemperatur ab. Anschließend wurden die Chips zur Vorbereitung der nachfolgenden Färbung gewaschen. Hierfür wurden die Chips in einem Waschbad aus 200 ml „PB1“ (*Reagent used to prepare BeadChips for hybridization*) für 3 min geschwenkt. Anschließend erfolgte der gleiche Waschschrift in einem zweiten Waschbad aus 200 ml „PB1“. Dann wurden die Chips in dem mit 150 ml „PB1“ vorbereiteten Arraybehälter platziert. Auf jeden Chip wurde ein Plastikrahmen sowie ein Glasobjektträger gelegt, die mit zwei Metallklammern befestigt wurden.

Die nachfolgenden Schritte des Waschens und der Einzelbasenverlängerung der Sonden erfolgten bei 44°C. Zunächst wurden die Chips erneut gewaschen, um nicht hybridisierte und nicht spezifisch gebundene DNA-Fragmente zu entfernen. So wurden fünf Mal hintereinander 150 µl „RA1“ (*Resuspension, hybridization, and wash solution*) auf die Chips pipettiert und für 30 s inkubiert. Anschließend erfolgte die Einzelbasenverlängerung der DNA-Sonden auf dem Array. Hierfür wurden 450 µl „XC1“ (*XStain BeadChip solution 1*) auf die Chips gegeben und 10 min lang inkubiert. Danach wurden 450 µl „XC2“ (*XStain BeadChip solution 2*) auf die Chips pipettiert und nochmal 10 min lang inkubiert. Nachfolgend wurden 200 µl „TEM“ (*Two-Color Extension Master Mix*) auf die Chips gegeben und 15 min lang inkubiert. Danach wurde 6 min mit 450 µl 95% Formamid/1 mM EDTA inkubiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Dann wurden zweimal 450 µl „XC3“ (*XStain BeadChip solution 3*) auf die Chips pipettiert und 1 min lang inkubiert.

Es folgte die Färbung des HM450k-Arrays mit den Fluoreszenz-markierten Antikörpern bei 32°C. Hierfür wurden 250 µl „STM“ (*Superior Two-Color Master Mix*) auf die Chips gegeben und 10 min lang

inkubiert. Die nicht gebundenen Antikörper wurden anschließend durch zweimalige Inkubation mit 450 µl „XC3“ (*XStain BeadChip solution 3*) für 6 min entfernt. Dann wurde 10 min lang mit 250 µl „ATM“ (*Anti-Stain Two-Color Master Mix*) inkubiert. Die überschüssigen Antikörper wurden erneut durch zweimalige Inkubation mit 450 µl „XC3“ (*XStain BeadChip solution 3*) für 6 min entfernt. Die letzten vier Schritte wurden wiederholt. Danach wurde noch einmal 10 min lang mit 250 µl „STM“ (*Superior Two-Color Master Mix*) inkubiert und dann zweimal 450 µl „XC3“ (*XStain BeadChip solution 3*) auf die Chips gegeben und 6 min lang inkubiert. Anschließend wurden die Glasobjektträger entfernt und die Chips 5 min lang in einem mit 310 ml „PB1“ vorbereiteten Waschbad sowie nachfolgend für 5 min in einem Bad aus „XC4“ (*XStain BeadChip solution 4*) vorsichtig geschwenkt. Danach wurden die Arrays 55 min lang in einem Vakuumexsikkator bei 680 mbar getrocknet. Zur Entfernung von getrockneten „XC4“-Rückständen wurde die Rückseite des Chips mit 2-Propanol gereinigt.

Schließlich wurden die Chips mit dem *Illumina iScan* bei zwei verschiedenen Anregungswellenlängen gescannt und die detektierten Fluoreszenzsignale als Rohdaten für jeden Farbkanal einzeln im IDAT-Dateiformat gespeichert.

2.2.5 Normalisierung der Methylierungsdaten mit der GenomeStudio-Software

Die Normalisierung der Rohdaten der Intensitätsmesswerte wurde mit der *Illumina GenomeStudio*-Software (Version V2011.1, Methylation Module 1.9.0, Illumina) unter Anwendung der Standardeinstellungen durchgeführt. Hierbei wurde die Signalintensität der gemessenen Proben gegen die Signalintensität interner Kontrollen, welche sich ebenfalls auf dem HM450k-Array befanden, normalisiert. Es erfolgte keine Subtraktion von Hintergrundsignalen. Durch die gemeinsame Normalisierung der Rohdaten aller in dieser Arbeit verwendeten Proben wurde die technische Varianz zwischen den einzelnen Messungen verringert.

Anschließend wurde im *GenomeStudio* für jede Probe der mittlere Beta-Wert (β) für jeden einzelnen Locus aus den normalisierten Intensitätsmesswerten berechnet. Dieser ergibt sich aus dem Verhältnis der Signalintensität des methylierten Locus zur Summe der Signalintensitäten des methylierten und unmethylierten Locus sowie einer empfohlenen Ausgleichskonstante (Standard $\alpha = 100$) [107]:

$$\beta = \frac{\text{Intensität methyliertes Allel}}{\text{Intensität unmethyliertes Allel} + \text{Intensität methyliertes Allel} + \alpha}$$

Der Beta-Wert zeigt somit den Methylierungsgrad eines Locus an. Er kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei 0 für einen komplett unmethylierten Locus und 1 für einen vollständig methylierten Locus steht [107]. Meistens liegen in einer Probe jedoch mehrere Kopien des gleichen Locus vor,

welche sich in ihrem Methylierungsstatus unterscheiden. Dann gibt der Beta-Wert die durchschnittliche Methylierung des Locus in der Probe in Form einer Dezimalzahl an, welche dem Anteil der methylierten Loci an der Gesamtheit der untersuchten Kopien in der Probe entspricht.

Als Ergebnis erstellt das *GenomeStudio* einen Datensatz mit den normalisierten Beta-Werten für alle untersuchten Proben. Zudem werden die CpG-Loci mit den Informationen des hg19-Referenzgenoms (GRCh37) wie z.B. den assoziierten Genen sowie deren Funktionen annotiert.

2.2.6 Qualitätskontrolle der Methylierungsdaten

2.2.6.1 Qualitätskontrolle der detektierten Signalintensitäten sowie Ausschluss von Loci

Die *GenomeStudio*-Software berechnet für jeden gemessenen Locus einer Probe den Detektions-p-Wert (*detection p-value*). Dieser zeigt an, ob sich die gemessenen Signalintensitäten eines Locus signifikant vom Signal der internen Negativkontrollen auf dem Array unterscheiden [108]. Bei einem Detektions-p-Wert $\geq 0,01$ hebt sich das gemessene Signal des Locus nicht signifikant vom Hintergrundsignal des Arrays ab. Der Detektions-p-Wert kann daher genutzt werden, um zu kontrollieren, von wie vielen Loci einer Probe das Fluoreszenzsignal sicher detektiert werden konnte. Dafür wurde für jede Probe die *Loci Detection Rate* berechnet, indem der Quotient aus der Anzahl der Loci, welche einen Detektions-p-Wert $< 0,01$ aufwiesen, und der Gesamtzahl der auf dem HM450k-Array gemessenen Loci (485.577 Loci) gebildet wurde. Für die Angabe als Prozentzahl wurde der Wert mit 100 multipliziert. Proben mit einer *Loci Detection Rate* $< 98\%$ wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Um eine verlässliche Auswertung der Methylierungsdaten sicherzustellen, wurden alle Loci, welche in mindestens einer der gemessenen Proben einen Detektions-p-Wert $\geq 0,01$ aufwiesen, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Außerdem wurden alle auf den beiden Geschlechtschromosomen X und Y lokalisierten Loci in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt, um eine geschlechtsspezifische Verzerrung der Methylierungsdaten zu verhindern.

Auf dem HM450k-Array wurden neben den CpG- und Non-CpG-Loci auch 65 Loci analysiert, welche einen Einzelnukleotid-Polymorphismus (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) enthalten. Um eine Verzerrung der Auswertung durch individuelle SNP-Profile zu vermeiden, wurden diese 65 SNP-Loci von der weiteren Methylierungsanalyse ausgeschlossen. Da jedoch die SNP-Kombination für ein Individuum charakteristisch ist, wurden die Daten der SNPs noch für die nachfolgende Identitätsprüfung der Proben verwendet (s. Abschnitt 2.2.6.3).

2.2.6.2 Qualitätskontrolle der Verteilung der Beta-Werte

Zur Überprüfung der jeweiligen Verteilung der Beta-Werte wurde für jede Probe ein Histogramm mit der *GenomeStudio*-Software erstellt. Beta-Werte können Werte zwischen 0 und 1 annehmen und spiegeln den Anteil der DNA-Kopien mit methyliertem Locus an der Gesamtheit der untersuchten DNA-Kopien in einer Probe wider. Ein Beta-Wert von 0 würde daher unter idealen Bedingungen bedeuten, dass keine DNA-Kopie in der Probe eine Methylierung des CpG-Locus trägt, während ein Beta-Wert von 1 für die vollständige Methylierung des CpG-Locus in allen DNA-Kopien stehen würde [107].

Da gesunde Gewebe meistens ein relativ homogenes DNA-Methylierungsmuster aufweisen, ergeben sich hierfür Beta-Werte nahe 0 oder nahe 1 [107]. Daraus resultiert eine bimodale Verteilung der Beta-Werte, welche für gesunde Gewebeproben typisch ist. Tumorproben weisen zumeist ein heterogeneres DNA-Methylierungsmuster auf, sodass die Verteilung der Beta-Werte häufig neben den beiden Maxima nahe 0 und 1 eine zusätzliche Häufung der Beta-Werte nahe 0,5 zeigt.

Manchmal weisen Proben jedoch als technisches Artefakt eine unimodale Verteilung ihrer Beta-Werte ähnlich einer Normalverteilung mit Maximum nahe 0,5 auf. Proben mit einer solchen suspekten unimodalen Verteilung ihrer Beta-Werte wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Anschließend wurde der Datensatz mit den Beta-Werten der Proben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, im CSV-Dateiformat aus der *GenomeStudio*-Software exportiert.

2.2.6.3 Qualitätskontrolle zur Identitätsprüfung der Proben

Im Rahmen der verschiedenen Studien wurden jeweils Qualitätskontrollen durchgeführt, um die Identität der Proben nach der Analyse auf dem HM450k-Array zu überprüfen und mögliche Probenvertauschungen aufzudecken. Die Studien von Kolarova et al. [89], Friemel et al. [90], Kulis et al. [88], Lee et al. [87] sowie das SAME-Projekt [91] stellten nur Rohdaten von Proben zur Verfügung, welche diesen Schritt der Qualitätskontrolle bestanden hatten.

Für die Proben des MMML- und ICGC MMML-Seq-Projektes wurden jeweils die Ergebnisse der Qualitätskontrolle zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung der Probenidentität nach den Messungen auf dem HM450k-Array wurden in beiden Projekten mehrere Methoden angewendet.

Da sowohl im MMML- als auch im ICGC MMML-Seq-Projekt zusätzlich zu den Analysen auf dem HM450k-Array auch DNA-Sequenzierungen der Lymphomproben durchgeführt wurden, konnten anschließend die in beiden Ansätzen jeweils ermittelten SNP-Profile einer Probe miteinander verglichen werden. Bei fehlender Übereinstimmung der SNPs zwischen den DNA-Sequenzierungs- und

den HM450k-Arraydaten eines Studienpatienten wurde von einer Vertauschung der Proben ausgegangen und die Probe von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Zudem wurden in beiden Projekten von einigen Lymphomproben mehrere unabhängige Hybridisierungen auf dem HM450k-Array durchgeführt, sodass die DNA-Methylierungswerte basierend auf der Methode nach Pearson miteinander korreliert und in einer Matrix dargestellt werden konnten. Zusätzlich erfolgte ein Abgleich der mittels HM450k-Arrayanalyse ermittelten SNP-Profile zwischen den jeweiligen Hybridisierungen eines Studienpatienten. Bei schlechter Korrelation der Mehrfach-Hybridisierungen wurde von einer Vertauschung der Proben oder technischen Problemen bei der Hybridisierung ausgegangen, sodass die Proben von der weiteren Analyse ausgeschlossen wurden.

2.2.7 Bildung des Mittelwertes der Beta-Werte bei mehrfach hybridisierten Proben

Wie im vorherigen Abschnitt erläutert wurden von einigen Lymphomproben aus dem MMML- und ICGC MMML-Seq-Projekt mehrere DNA-Proben unabhängig voneinander auf dem HM450k-Array untersucht. Damit diese Lymphomproben mit Mehrfach-Hybridisierungen nicht die Auswertung verzerren, indem sie einzelne Studienpatienten im Vergleich zu Einfach-Hybridisierungen überrepräsentieren, wurde für jeden CpG-Locus der arithmetische Mittelwert der Beta-Werte über alle Mehrfach-Hybridisierungen eines Patienten in *Microsoft Excel (Microsoft Office 365, Microsoft)* berechnet. Auf diese Weise wurden die Mehrfach-Hybridisierungen zu einer gemittelten Probe zusammengefasst.

2.2.8 Bestimmung des DNAm Alters nach Horvath

Das epigenetische DNA-Methylierungsalter (DNAm Alter) nach Horvath [49] basiert auf den DNA-Methylierungswerten von 353 spezifischen CpG-Loci und kann zur Schätzung des chronologischen Alters eines Individuums genutzt werden. Es stellt somit einen Biomarker des Alterns dar [49].

Der Algorithmus zur Berechnung des DNAm Alters wurde von Steve Horvath anhand eines Regressionsmodells basierend auf der Methode des Elastischen Netzes entwickelt. Dieses Regressionsmodell wurde auf einen Beta-Werte-Datensatz von nicht-neoplastischen Proben verschiedener Gewebearten angewendet, um das chronologische Alter der Proben zu schätzen. Hieraus resultierte ein lineares Regressionsmodell, welches die Beta-Werte von 353 selektierten CpG-Loci anhand von Koeffizienten gewichtete und somit das DNAm Alter als Schätzer des chronologischen Alters berechnete [49]. Da das Regressionsmodell für Proben verschiedener

Gewebearten präzise Altersschätzungen lieferte, wird das DNAm Alter auch als Multi-Gewebe-Altersprädiktor bezeichnet [49].

Zur Berechnung des DNAm Alters nach Horvath wird der frei zugängliche *DNA Methylation Age Calculator* auf der Website <https://dnamage.genetics.ucla.edu/home> zur Verfügung gestellt. In diesen können mittels HM450k-Arrays ermittelte Beta-Werte-Datensätze hochgeladen werden. Der *DNA Methylation Age Calculator* berechnet anschließend das DNAm Alter der Proben entsprechend der zuvor beschriebenen Methode [49] und gibt das Ergebnis in Form einer CSV-Datei aus.

Da der Datensatz mit den Beta-Werten aller auf dem HM450k-Array gemessener CpG-Loci für die in dieser Arbeit untersuchten Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben im ZIP-Dateiformat die vom *DNA Methylation Age Calculator* vorgegebene maximale Dateigröße von 800 MB überschritt, musste der Datensatz in seiner Größe reduziert werden. Entsprechend den Empfehlungen im „*Tutorial for the Online Age Calculator*“ [109] wurde der Datensatz daher auf die Minimalanforderung von 28.587 CpG-Loci gefiltert, welche in der Datei „*datMiniAnnotation.csv*“ auf der Homepage <https://horvath.genetics.ucla.edu/html/dnamage/> hinterlegt sind. Hierdurch wird die Berechnung des DNAm Alters laut dem „*Tutorial for the Online Age Calculator*“ [109] nicht beeinträchtigt. Zudem wurden alle leeren Felder im Datensatz von CpG-Loci, für die kein Beta-Wert ermittelt werden konnte, mit „NA“ ausgefüllt. Der gefilterte Datensatz mit den Beta-Werten aller in dieser Dissertation untersuchten Proben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, wurde anschließend im CSV-Dateiformat gespeichert und als ZIP-Datei komprimiert.

Anschließend wurde dieser gefilterte, komprimierte Beta-Werte-Datensatz im *DNA Methylation Age Calculator* auf der Website <https://dnamage.genetics.ucla.edu/home> hochgeladen. Dieser berechnete das DNAm Alter der analysierten Proben und gab das Ergebnis in Form einer CSV-Datei aus.

2.2.9 Bioinformatische Auswertung

Die statistische Auswertung des DNAm Alters der Proben sowie der mittels HM450k-Arrays ermittelten Methylierungsdaten erfolgte unter Verwendung verschiedener Statistikprogramme.

2.2.9.1 Analyse von Batch-Effekten in Qlucore Omics Explorer

Um zunächst einmal vor der weiteren Auswertung der Methylierungsdaten potenzielle Batch-Effekte ausschließen zu können, wurde eine unsupervidierte Analyse der Beta-Werte in der Analysesoftware *Qlucore Omics Explorer 3.2* (Qlucore AB) durchgeführt. Hierbei wurden sowohl Hauptkomponentenanalysen (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) als auch Heatmaps mit

hierarchischen Clusteranalysen zur graphischen Darstellung der Proben verwendet (Details s. Abschnitt 2.2.9.3.2 und 2.2.9.3.3). Auf diese Weise konnten Proben, welche primär nach der Zugehörigkeit zu einer Studienkohorte clusterten, visuell identifiziert werden. Da diese Proben somit wahrscheinlich von einem Batch-Effekt betroffen waren, wurden sie von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

2.2.9.2 Statistische Analyse des chronologischen und DNAm Alters mit R

Die statistische Auswertung der Proben bezüglich ihres chronologischen und DNAm Alters nach Horvath sowie die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit der Statistik-Software R (Version 3.3.2) [110].

2.2.9.2.1 Berechnung des Δ -Alters

Für den Vergleich des DNAm Alters mit dem chronologischen Alter einer Probe wurde das Δ -Alter berechnet, indem die Differenz zwischen DNAm Alter und chronologischem Alter gebildet wurde.

$$\Delta - \text{Alter} = \text{DNAm Alter} - \text{chronologisches Alter}$$

2.2.9.2.2 Prüfung der Verteilung der Stichproben mit dem Shapiro-Wilk-Test

Für die Auswahl geeigneter statistischer Tests ist es essenziell, die Verteilung der zu analysierenden Stichprobe zu kennen. Daher wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test die Verteilung des chronologischen, des DNAm sowie des Δ -Alters in den verschiedenen Stichproben untersucht. Dieser prüft die Nullhypothese H_0 , dass die Stichprobe normalverteilt ist. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt. Der Shapiro-Wilk-Test weist den Vorteil auf, dass er auch bei kleinen Stichproben eine sehr hohe Power hat [111].

2.2.9.2.3 Lage- und Streuungsmaße der Stichproben

Zur Beschreibung der Lagemaße bei nicht normalverteilten Stichproben wurden der Median und die Quartile genutzt. Die Streuung wurde mit dem Interquartilbereich (engl. *interquartile range*, IQR) und der Spannweite angegeben. Der Median ist ein besonders robustes Lagemaß, welches man auch in kleinen Stichproben und bei asymmetrischen Verteilungen anwenden kann. Zudem sind sowohl der Median, die Quartile als auch der IQR wenig anfällig gegenüber Ausreißern [111].

Graphisch wurden die Lage- und Streuungsmaße der Stichproben in Box-Whisker-Plots dargestellt.

2.2.9.2.4 Auswahl der statistischen Tests

Statistisches Testen dient der Prüfung von Hypothesen. Um die Validität eines Tests zu gewährleisten, muss die Verteilung der Stichprobe bei der Auswahl eines statistischen Tests berücksichtigt werden. Da die in dieser Arbeit untersuchten Stichproben überwiegend nicht normalverteilt waren, wurden nichtparametrische Tests ausgewählt, welche keine spezifische Verteilung der Daten vorschreiben. Diese sollten zudem bei kleineren Stichproben, wie z.T. in dieser Arbeit enthalten, bevorzugt benutzt werden. Verteilungsunabhängige Tests sind darüber hinaus robuster gegenüber Ausreißern [111].

2.2.9.2.5 Vergleich von chronologischem und DNAm Alter mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest

Um zu testen, ob das DNAm Alter nach Horvath signifikant vom chronologischen Alter der einzelnen Probengruppen abweicht, wurde die Differenz zwischen dem DNAm Alter und dem chronologischen Alter gebildet und somit das Δ -Alter berechnet. Auf dieses Δ -Alter wurde ein zweiseitiger Vorzeichen-Rangtest nach Wilcoxon angewendet. Dieser testet, ob sich das Δ -Alter in den einzelnen Gruppen signifikant von 0 unterscheidet (H_0 : Das Δ -Alter unterscheidet sich nicht signifikant von 0). Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.

2.2.9.2.6 Korrelationsanalyse mit dem Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten

Um die Korrelation von DNAm und chronologischem Alter bzw. Δ -Alter und chronologischem Alter in den jeweiligen Probenkohorten zu untersuchen, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ρ berechnet. Dieser setzt keine Normalverteilung der untersuchten Stichproben voraus.

Der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient ρ kann Werte zwischen -1 und 1 annehmen und bewertet die Stärke und die Richtung eines monotonen Zusammenhangs zwischen zwei Datenreihen. Ein Spearman-Rangkorrelationskoeffizient $\rho > 0$ zeigt hierbei eine positive Korrelation an, während bei $\rho < 0$ eine negative Korrelation vorliegt. Bei einem Spearman-Rangkorrelationskoeffizient von 0 sind beide Messwertreihen nicht miteinander korreliert und somit statistisch unabhängig voneinander. Da der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman nicht direkt auf den Messwerten, sondern auf den zugewiesenen Rängen basiert, ist er robust gegenüber Ausreißern [111,112].

Zusätzlich wurde zweiseitig anhand des Hotelling-Pabst-Tests geprüft, ob sich der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient signifikant von 0 unterschied ($H_0: \rho = 0$) [113,114]. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.

2.2.9.2.7 Gleitender Mittelwert als Trendlinie im Streudiagramm

Zur graphischen Darstellung wurde das Δ -Alter über dem chronologischen Alter für die jeweiligen Probengruppen in einem Streudiagramm aufgetragen. Um den Verlauf des Δ -Alters über dem zunehmenden chronologischen Alter visuell zu verdeutlichen, wurde die Methode des gleitenden Mittelwerts angewendet. Hierbei wurde ein Fenster mit definierter Breite (40 Jahre) um jeden Wert auf der x-Achse zentriert und der Mittelwert aller in diesem Fenster liegenden Δ -Altersangaben berechnet. Der so bestimmte Mittelwert des Δ -Alters wurde als Punkt über dem x-Wert im Streudiagramm dargestellt. Durch Verschieben des Fensters über den gesamten Wertebereich der x-Achse ergab sich so eine Trendlinie des Verlaufs des Δ -Alters [111].

2.2.9.2.8 Lineare Regressionsanalyse des Δ -Alters über dem chronologischen Alter

Um einen möglichen statistischen Zusammenhang zwischen dem Δ -Alter und dem chronologischen Alter näher zu charakterisieren, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Ziel der Regressionsanalyse war die Ermittlung einer Geradenfunktion (Lineares Modell: $y = a + b * x$) anhand der Kleinste-Quadrate-Methode, welche den Verlauf des Δ -Alters über dem chronologischen Alter bestmöglich beschreiben sollte. Anschließend wurde anhand einer zweiseitigen t-Teststatistik geprüft, ob sich der Regressionskoeffizient b signifikant von 0 unterschied ($H_0: b = 0$) [111]. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Zur Beurteilung der Güte des ermittelten linearen Regressionsmodells wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet. Dieses kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und gibt den Anteil der Streuung des Δ -Alters an, der durch das Regressionsmodell erklärt werden kann [111,112].

2.2.9.2.9 Vergleich des Δ -Alters zwischen den Probengruppen mit dem Wilcoxon-Rangsummentest

Um zu testen, ob sich das Δ -Alter signifikant zwischen zwei Probengruppen unterschied, wurde der zweiseitige Wilcoxon-Rangsummentest (Mann-Whitney-U-Test) verwendet. Dieser ist ein verteilungsunabhängiger Test und prüft die Nullhypothese H_0 , dass das jeweilige Δ -Alter von zwei unverbundenen Probengruppen nicht signifikant voneinander abweicht. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha = 0,05$ festgelegt.

Zusätzlich wurde der Pseudomedian (Hodges-Lehmann-Schätzung) der Differenz zwischen den Δ -Altersangaben der beiden verglichenen Probengruppen berechnet. Dieser entspricht dem Median aller gemittelten Paare von Differenzen und stimmt bei symmetrischer Verteilung der Differenzen mit dem Median überein [111].

Wenn sich zwei B-Zell-Probengruppen, welche zwar das gleiche B-Zell-Reifestadium aufwiesen, jedoch aus verschiedenen Gewebearten isoliert wurden, nicht signifikant im Wilcoxon-Rangsummentest in ihrem Δ -Alter unterschieden, dann wurden sie bei der weiteren Analyse der CpG-Loci der epigenetischen Uhr nach Horvath [49] als eine Probengruppe zusammen ausgewertet.

2.2.9.3 Bioinformatische Auswertung der Methylierungsdaten mit Qlucore Omics Explorer

Die Auswertung der mittels HM450k-Arrays gemessenen Methylierungsdaten erfolgte in der Analysesoftware *Qlucore Omics Explorer 3.2* (QOE, Qlucore AB).

2.2.9.3.1 Normalisierung der Methylierungsdaten im Qlucore Omics Explorer

Der Datensatz mit den Beta-Werten der auf dem HM450k-Array gemessenen, qualitätskontrollierten CpG-Loci für die Proben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, wurde in die *Qlucore Omics Explorer*-Software importiert. Hier wurden zunächst die im Datensatz fehlenden, nicht gemessenen Beta-Werte anhand der „K-nearest neighbors impute“-Methode (kNN) [115] rekonstruiert.

Anschließend wurden die Beta-Werte zur Visualisierung mit der Methode „Mean=0“ normalisiert. Hierbei wird für jeden CpG-Locus der Mittelwert der Beta-Werte über alle analysierten Proben berechnet und dann auf 0 gesetzt. Auf diese Weise werden die Beta-Werte auf der Skala verschoben und in DNA-Methylierungswerte transformiert, welche sowohl positive als auch negative Werte annehmen können. Die absoluten Abstände zwischen den Beta-Werten bleiben jedoch gleich.

Da der Fokus der Auswertungen in dieser Dissertation auf den CpG-Loci der epigenetischen Uhr nach Horvath [49] lag, wurden die CpG-Loci des Datensatzes auf diese 353 CpG-Loci gefiltert.

2.2.9.3.2 Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis)

Die Hauptkomponentenanalyse (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) ist eine unsupervidierte Analyse, welche die Methylierungswerte der Proben auf dominierende Muster untersucht und somit die Identifikation molekularer Untergruppen unterstützt. Die PCA hat zum Ziel, die Merkmale des multidimensionalen Methylierungswerte-Datensatzes in einem dreidimensionalen Koordinatensystem graphisch darzustellen, wobei jede Probe in Form einer Kugel abgebildet wird.

Bei der PCA werden die Informationen von miteinander korrelierten Dimensionen (CpG-Loci) zu Komponenten zusammengefasst und auf eine Dimension reduziert. Die Komponente, welche die maximale Varianz der Proben beschreibt, bildet die erste Hauptkomponente und wird entlang der

x-Achse dargestellt. Die zweite Hauptkomponente (y-Achse) steht senkrecht zur Ersten und wird so orientiert, dass die maximale verbleibende Streuung der Proben entlang dieser Achse verläuft. Dieses Vorgehen wird für alle Komponenten des Datensatzes fortgeführt [116]. Jedoch werden nur die ersten drei Hauptkomponenten als Achsen im dreidimensionalen Koordinatensystem dargestellt. Der Ursprung des Koordinatensystems liegt hierbei im Zentrum der Punktwolke der Proben. An den Achsen wird mit einer Prozentzahl der Anteil der Varianz der Stichprobe angegeben, welcher durch die jeweilige Komponente beschrieben wird. Proben mit ähnlichen DNA-Methylierungsmustern clustern in der PCA zusammen, sodass das Erkennen molekularer Untergruppen erleichtert wird.

2.2.9.3.3 Heatmaps und hierarchische Clusteranalysen

Heatmaps dienen der graphischen Darstellung der Methylierungswerte eines Datensatzes. Hierbei werden die Proben in Spalten und die CpG-Loci in Zeilen angeordnet und die normalisierten Beta-Werte („Mean=0“) farbkodiert dargestellt. So werden mittlere Methylierungswerte um 0 in schwarzer Farbe abgebildet, während eine Hypomethylierung in grün und eine Hypermethylierung in rot angezeigt wird. Die Reihenfolge der Anordnung der Proben und CpG-Loci in der Heatmap kann frei variiert werden.

Zusätzlich können im QOE hierarchische Clusteranalysen sowohl der Proben als auch der CpG-Loci durchgeführt werden. Hierbei werden die Proben bzw. CpG-Loci anhand des euklidischen Abstands auf molekulare Ähnlichkeiten untersucht und je nach Ausmaß der Übereinstimmungen zu Clustern zusammengefasst. Für die hierarchischen Clusteranalysen in dieser Arbeit wurde der Cluster-Algorithmus „*Weighted Average*“ gewählt, weil er sich besonders gut eignet, wenn ungleich große Cluster erwartet werden [117]. Da sich die Kohorten der Blutproben, B-Zell-Reifestadien und Lymphomentitäten sehr in ihrer Stichprobengröße unterscheiden, wurden in der vorliegenden Arbeit ungleich große Cluster erwartet.

2.2.9.3.4 Statistisches Testen im Qlucore Omics Explorer

Im QOE können zudem verschiedene statistische Tests durchgeführt werden. Hierbei wird der Test auf jeden CpG-Locus einzeln angewendet, sodass multiple Hypothesen geprüft werden. Daher berechnet der QOE anhand der Benjamini-Hochberg-Methode [118] den für multiples Testen korrigierten q-Wert, welcher sich vom p-Wert ableitet. Für den Test wird die *False discovery rate* (FDR) analog dem Signifikanzniveau als oberer Grenzwert festgelegt, bis zu dem ein q-Wert als signifikant gilt. Die FDR gibt den erwarteten Anteil falsch-positiver Ergebnissen an allen signifikanten Ergebnissen an [119].

Um zu überprüfen, welche CpG-Loci sich signifikant in ihrem Methylierungsgrad zwischen verschiedenen Probengruppen unterscheiden, wurden Differentielle Methylierungsanalysen (DMA) durchgeführt. Hierbei gilt es zu beachten, dass Beta-Werte meist eine bimodale Verteilung aufweisen und somit nicht normalverteilt sind (Details s. Abschnitt 2.2.6.2). Für eine valide Datenanalyse können daher nur verteilungsunabhängige Tests auf Beta-Werte angewendet werden. Da der QOE im Standard-Modus jedoch nur parametrische Tests anbietet, welche eine Normalverteilung der Daten voraussetzen, musste mit dem erweiterten Statistik-Modus des QOE gearbeitet werden. Hier können eigene *R*-Skripte für statistische Tests geladen werden, welche der QOE anschließend auf den Datensatz anwendet.

2.2.9.3.5 Differentielle Methylierungsanalyse

Zur Identifikation von CpG-Loci, welche sich signifikant in ihrem Methylierungsgrad zwischen zwei unabhängigen Probengruppen unterscheiden, wurde der zweiseitige Wilcoxon-Rangsummentest (Mann-Whitney-U-Test) im QOE auf den Methylierungswerte-Datensatz angewendet. Für diesen Test stellt der QOE ein *R*-Skript im erweiterten Statistik-Modus zur Verfügung, sodass dieses für die Differentielle Methylierungsanalyse genutzt werden konnte. Die FDR wurde mit $q \leq 0,01$ festgelegt.

Für eine Differentielle Methylierungsanalyse zwischen mehreren unabhängigen Probengruppen wurde der zweiseitige, verteilungsunabhängige Kruskal-Wallis-Test verwendet. Dieser überprüft, welche CpG-Loci einen signifikant unterschiedlichen Methylierungsgrad zwischen mindestens zwei der untersuchten Probengruppen aufweisen. Da im QOE kein nichtparametrischer Test zum Vergleich mehrerer unabhängiger Stichproben zur Verfügung gestellt wird, wurde ein *R*-Skript für den Kruskal-Wallis-Test geschrieben und im erweiterten Statistik-Modus des QOE auf den Methylierungswerte-Datensatz angewendet (*R*-Skript s. Anhang 1). Die FDR wurde mit $q \leq 0,01$ festgelegt.

2.2.9.4 Analyse der altersassoziierten CpG-Loci nach Hannum

Um dem DNAm Alter nach Horvath ein weiteres epigenetisches Alterskonzept gegenüberzustellen, wurden zusätzlich die von Hannum et al. [50] beschriebenen altersassoziierten CpG-Loci im Methylierungswerte-Datensatz untersucht. Auf diese Weise sollte überprüft werden, ob sich die beobachteten epigenetischen Altersabweichungen nur auf die CpG-Loci der epigenetischen Uhr nach Horvath [49] beschränkten oder aber auch in anderen altersassoziierten, vom DNAm Alter-Algorithmus unabhängigen CpG-Loci wiederzufinden waren.

Hannum et al. [50] nutzten ebenfalls die Methode des Elastischen Netzes, um ein Regressionsmodell zur Altersschätzung anhand von DNA-Methylierungsprofilen zu entwickeln. Hierbei wurden 71 CpG-Loci identifiziert, deren Methylierungsgrad in gesunden Blutproben mit dem chronologischen Alter assoziiert war. Hannum et al. berechneten anhand der Methylierungswerte dieser 71 CpG-Loci ein geschätztes Alter (*Predicted Age*), welches stark mit dem chronologischen Alter gesunder Blutproben korrelierte. Für die präzise Altersschätzung von Proben anderer Gewebearten musste das Regressionsmodell jedoch durch Korrekturfaktoren angepasst werden.

Da das Regressionsmodell zur Berechnung des *Predicted Age* nach Hannum nicht vollständig veröffentlicht wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit kein *Predicted Age* für die Proben berechnet werden. Stattdessen wurden die Methylierungswerte der Proben für die 71 Hannum-CpG-Loci im QOE untersucht. Hierfür wurde der Methylierungswerte-Datensatz zunächst auf die 71 CpG-Loci nach Hannum gefiltert. Zur Analyse der epigenetischen Alterseffekte in den Hannum-CpG-Loci wurden anschließend unsupervidierte Analysen wie PCAs und Heatmaps mit hierarchischen Clusteranalysen durchgeführt. Da kein Methylierungsalter basierend auf den Hannum-CpG-Loci berechnet werden konnte, dienten die gesunden Blutproben als Alters-Referenzgruppe für die anderen Probengruppen.

2.2.9.5 Genontologie-Analyse mit GOrilla

Für die Genontologie-Analyse wurde die frei zugängliche Software *GOrilla* (*Gene Ontology enRichment anaLysis and visualizAtion tool*) [120] verwendet, welche auf der Website <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/> zur Verfügung gestellt wird.

Hierfür wurden den CpG-Loci, welche auf dem HM450k-Array gemessen wurden, zunächst die assoziierten Gene, basierend auf dem hg19-Referenzgenom (GRCh37), zugeordnet. Nachfolgend entnahm *GOrilla* der *Gene Ontology* (GO)-Datenbank [121] die jeweiligen Annotationen der untersuchten Gene in den GO-Kategorien „Zelluläre Komponente“ (*Cellular component*), „Molekulare Funktion“ (*Molecular function*) sowie „Biologischer Prozess“ (*Biological process*). Anschließend wurden die Gene, welche mit den 353 CpG-Loci der epigenetischen Uhr nach Horvath [49] assoziiert waren, auf Anreicherungen von GO-Annotationen im Vergleich zur Referenzliste aller Gene, welche auf dem HM450k-Array nach Qualitätskontrolle abgebildet wurden, untersucht. Gene, die mit mehreren CpG-Loci assoziiert waren, flossen nur einfach in die Analyse ein. Auf diese Weise sollten funktionelle Signalwege, Prozesse sowie Zellkomponenten identifiziert werden, deren altersabhängig methylierte Gene in den Horvath-CpG-Loci angereichert waren. Da hierbei multiple Hypothesen getestet wurden, berechnete *GOrilla* neben dem p-Wert auch den für multiples Testen korrigierten q-Wert entsprechend der Benjamini-Hochberg-Methode [118]. Die FDR wurde mit $q \leq 0.05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des DNAm Alters nach Horvath [49] der Keimzentrums-B-Zell-Lymphomentitäten BL, DLBCL und FL im Vergleich zu gesunden Blutproben und B-Zellen verschiedener Reifestadien. Hierfür wurde das genomweite DNA-Methylierungsprofil von 762 Proben auf dem *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (HM450k, Illumina) analysiert. Nach erfolgter Qualitätskontrolle der Methylierungsdaten wurden ausführliche statistische Auswertungen des DNAm Alters von insgesamt 75 BL-, 119 DLBCL- und 94 FL-Proben im Vergleich zu 95 gesunden Blutproben sowie 62 B-Zell-Proben verschiedener Differenzierungsstadien durchgeführt. Zudem wurde der Verlauf des DNAm Alters während der B-Zell-Reifung untersucht. Anschließend erfolgte die Analyse der mittels HM450k-Arrays gemessenen Beta-Werte der Lymphom-, Blut- und B-Zell-Proben, um altersassoziierte Methylierungsmuster und differentiell methylierte CpG-Loci der epigenetischen Uhr nach Horvath [49] zu identifizieren. Zum Vergleich wurden zudem die Methylierungswerte der 71 altersassoziierten Hannum-CpG-Loci [50] in den Proben untersucht. Schließlich wurde eine Genontologie-Analyse durchgeführt, um signifikante Anreicherungen von Signalwegen und molekularen Funktionen in den mit der epigenetischen Uhr assoziierten Genen zu erkennen.

Die Ergebnisse dieser Analysen werden im nachfolgenden Kapitel ausführlich dargestellt.

3.1 Ausschluss von Proben bei Nichterfüllung der Einschlusskriterien

Insgesamt wurden in dieser Dissertation 762 Lymphom-, Blut- und B-Zell-Proben untersucht. Da einige Proben nicht die in Abschnitt 2.2.2 formulierten Einschlusskriterien erfüllten, wurden sie von der Analyse ausgeschlossen.

So sollten in der vorliegenden Arbeit nur die KZB-Lymphomentitäten BL, DLBCL und FL untersucht werden. Die 61 Proben anderer Lymphomentitäten wie z.B. Nodales Marginalzonenlymphom, Primär kutanes Follikelzentrumslymphom, Post-Transplantations-Lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) und Primär mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom wurden daher von der Analyse ausgeschlossen. Zudem sollten nur neu diagnostizierte Lymphome in die Auswertungen einfließen, sodass 12 Proben von Lymphomrezidiven von der Analyse ausgeschlossen wurden. Des Weiteren wurden 42 Lymphomproben von der Auswertung ausgeschlossen, weil sie einen Tumorzellgehalt von unter 40% aufwiesen.

Da die Kontrollkohorte aus voneinander unabhängigen Blutproben bestehen sollte, konnten nicht beide Proben von Zwillingspaaren in die Analyse einfließen. Die insgesamt 116 Zwillingproben aus dem SAME-Projekt stammten von 50 Zwillingspaaren sowie 16 einzelnen Zwillingproben. Daher

wurde jeweils pro Zwillingsspaar ein zufällig bestimmter Zwilling von der Analyse ausgeschlossen, sodass 50 Zwillingssproben in der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt wurden.

Insgesamt wurden 165 Proben, welche nicht die Einschlusskriterien erfüllten, von der Analyse ausgeschlossen, sodass 597 Proben für die weitere Auswertung verblieben.

3.2 Qualitätskontrolle der Methylierungsdaten

Um eine verlässliche Auswertung zu gewährleisten, wurden die mittels HM450k-Arrays erhobenen Methylierungsdaten der 597 in diese Arbeit eingeschlossenen Proben anhand mehrerer Qualitätskriterien überprüft. Dies führte zum Ausschluss von 152 Proben, sodass insgesamt 445 Lymphom-, Blut- und B-Zell-Proben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, in die finale Auswertung einfließen. Des Weiteren wurden 34.292 Loci von der Analyse ausgeschlossen, sodass insgesamt 451.285 CpG-Loci in der finalen Auswertung berücksichtigt wurden.

3.2.1 Qualitätskontrolle der detektierten Signalintensitäten sowie Ausschluss von Loci

Insgesamt wurden 485.577 Loci auf dem HM450k-Array untersucht. Alle gemessenen Proben wiesen eine *Loci Detection Rate* > 98 % auf, sodass keine Probe aufgrund von geringen Signalintensitäten von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden musste.

Um eine verlässliche Auswertung der Methylierungsdaten sicherzustellen, wurden 22.579 Loci, welche in mindestens einer der gemessenen Proben einen Detektions-p-Wert $\geq 0,01$ aufwiesen, von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Des Weiteren wurden 11.648 Loci, welche auf den Geschlechtschromosomen X (11.232 Loci) und Y (416 Loci) lokalisiert waren, sowie 65 Loci, welche laut Illumina einen SNP enthalten, in der weiteren Analyse nicht berücksichtigt, um eine geschlechts- oder individuen-spezifische Verzerrung der Methylierungsdaten zu vermeiden. Somit verblieben 451.285 autosomale CpG-Loci für die weitere Auswertung.

3.2.2 Ausschluss von Proben mit unimodaler Verteilung der Beta-Werte

Zur Überprüfung der jeweiligen Verteilung der Beta-Werte wurde für jede Probe ein Histogramm mit der *GenomeStudio*-Software (Illumina) erstellt. Hierbei wies eine Probe aus der Kohorte der FFPE-BL-Proben eine unimodale Verteilung ihrer Beta-Werte mit einem Maximum nahe 0,45 auf, sodass ein technisches Artefakt wahrscheinlich schien und die Probe von der weiteren Analyse ausgeschlossen

wurde. Das Histogramm der Beta-Werte-Verteilung dieser FFPE-BL-Probe ist in Anhang 2 abgebildet. Die Histogramme der anderen untersuchten Proben zeigten unauffällige Verteilungen der Beta-Werte.

3.2.3 Ausschluss von Proben bei möglicher Probenvertauschung

Im Rahmen der verschiedenen Studien, welche die Proben ursprünglich erhoben hatten, wurden jeweils Qualitätskontrollen durchgeführt, um die Identität der Proben nach der Analyse auf dem HM450k-Array zu überprüfen und mögliche Probenvertauschungen aufzudecken. Während die zur Verfügung gestellten Proben aus den Studien von Kolarova et al. [89], Friemel et al. [90], Kulis et al. [88], Lee et al. [87] sowie dem SAME-Projekt [91] diese Qualitätskontrollen bestanden hatten, waren in den Rohdaten des MMML- und ICGC MMML-Seq-Projektes noch Proben enthalten, bei denen eine Probenvertauschung oder technische Artefakte noch nicht ausgeschlossen worden waren.

Im MMML- und ICGC MMML-Seq-Projekt wurden jeweils mehrere verschiedene Methoden zur Überprüfung der Probenidentität nach den HM450k-Arrayanalysen verwendet (Details s. Abschnitt 2.2.6.3) und die Ergebnisse der Qualitätskontrolle für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Hierbei zeigten 55 Lymphomproben Auffälligkeiten im SNP-Vergleich sowie der Korrelationsanalyse, sodass eine Vertauschung der Proben oder technische Probleme bei der Hybridisierung wahrscheinlich schienen und diese Proben von der weiteren Analyse in dieser Arbeit ausgeschlossen wurden.

3.2.4 Bildung des Mittelwertes der Beta-Werte bei mehrfach hybridisierten Proben

Von 76 Lymphomproben aus dem MMML- und ICGC MMML-Seq-Projekt wurden mehrere DNA-Proben unabhängig voneinander auf dem HM450k-Array untersucht, sodass insgesamt 161 Proben von Mehrfach-Hybridisierungen im Datensatz enthalten waren. Damit diese Mehrfach-Hybridisierungen nicht die Auswertung verzerren, wurde für jeden CpG-Locus der arithmetische Mittelwert der Beta-Werte über alle Mehrfach-Hybridisierungen eines Patienten in *Microsoft Excel* (*Microsoft Office 365*, Microsoft) berechnet. Auf diese Weise wurden die 161 Mehrfach-Hybridisierungen zu 76 gemittelten Proben zusammengefasst, welche in die weiteren Analysen einfließen.

3.2.5 In der Analyse von Batch-Effekten clustern die FFPE-BL-Proben zusammen

Zur Untersuchung der Methylierungsdaten auf mögliche Batch-Effekte, wurde eine unsupervidierte Analyse der Methylierungswerte der Proben in der Analysesoftware *Qlucore Omics Explorer 3.2* (Qlucore AB) durchgeführt.

Hierbei lag der Fokus primär auf den CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath. Daher wurden die 451.285 CpG-Loci, welche die Qualitätskriterien erfüllten, zunächst auf die 353 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus gefiltert. Nach der Qualitätskontrolle waren jedoch nur noch 349 der 353 Horvath-CpG-Loci im Datensatz enthalten. Die CpG-Loci cg04836038, cg20524216, cg01407797 und cg03286783 der epigenetischen Uhr erfüllten nicht die Qualitätskriterien in dieser Arbeit. In einer persönlichen Korrespondenz mit Steve Horvath, dem Urheber des DNAm Alter-Algorithmus, wurde jedoch angegeben, dass die epigenetische Uhr sehr robust im Hinblick auf fehlende CpG-Werte sei und die Berechnung des DNAm Alters bei einzelnen fehlenden CpG-Werten nicht beeinträchtigt werden würde.

Bei der anschließenden unsupervidierten Analyse der Methylierungsdaten auf Batch-Effekte fiel auf, dass das DNA-Methylierungsmuster der FFPE-BL-Proben aus der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister Kiel deutlich vom Methylierungsmuster aller anderen kryofixierten Proben abwich. Im Anhang 3 ist eine Heatmap der Methylierungswerte aller 456 Blut-, B-Zell- und Lymphom-Proben, welche die bisherigen Qualitätskriterien erfüllten, für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus abgebildet. Die Proben sind nach Zelltypen angeordnet und es fällt auf, dass die Formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten (FFPE) BL-Proben ein aberrantes Methylierungsmuster im Vergleich zu den kryofixierten BL-Proben sowie allen weiteren kryofixierten Proben zeigen. Diese abweichenden Methylierungswerte treten besonders deutlich im mittig angeordneten Cluster der CpG-Loci hervor. Ebenso clustern die FFPE-BL-Proben separat von den kryofixierten BL-Proben in der PCA der Methylierungswerte der 349 DNAm Alter-CpG-Loci im Anhang 4.

Bevor ein Batch-Effekt für diese FFPE-BL-Proben angenommen werden konnte, musste jedoch ein mögliches Confounding durch unterschiedliche Altersstrukturen der BL-Kohorten der verschiedenen Projekte ausgeschlossen werden, da die FFPE-BL-Proben ein tendenziell höheres chronologisches Alter aufwiesen als die kryofixierten BL-Proben aus dem MMML- und ICGC MMML-Seq-Projekt. Daher wurde eine Heatmap der Methylierungswerte der 86 BL-Proben, welche die bisherigen Qualitätskriterien erfüllten, für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus erstellt und die Proben nach chronologischem Alter aufsteigend angeordnet (s. Anhang 5). Hierbei wurde die Fixierungsmethode sowie das chronologische Alter der Proben als Farbbalken dargestellt. In dieser Heatmap ist zu erkennen, dass das Methylierungsmuster der meisten FFPE-BL-Proben vom Methylierungsmuster der gleichaltrigen, kryofixierten BL-Proben abweicht. Besonders deutlich treten diese Methylierungsunterschiede bei den CpG-Loci hervor, welche als Cluster im unteren Teil der Heatmap angeordnet sind. Das aberrante Methylierungsmuster der FFPE-BL-Proben konnte daher nicht auf das hohe chronologische Alter der Proben zurückgeführt werden.

Um zu überprüfen, ob sich das aberrante DNA-Methylierungsmuster der FFPE-BL-Proben nur auf die CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus beschränkte oder aber in allen auf dem HM450k-Array gemessenen CpG-Loci zu beobachten war, wurde eine PCA der 86 BL-Proben für die 451.285 CpG-Loci, welche die Qualitätskriterien erfüllten, durchgeführt. Auch in dieser PCA clusterten die FFPE-BL-Proben separat von den kryofixierten BL-Proben (Abbildung 5 A). Die Hauptkomponente 3 (Achse 3) scheint hierbei die Proben primär nach der Fixierungsmethode aufzutrennen. Zudem wird im Vergleich mit der nach chronologischem Alter angefärbten PCA (Abbildung 5 B) deutlich, dass gleichaltrige kryofixierte und FFPE-BL-Proben nicht zusammen clustern.

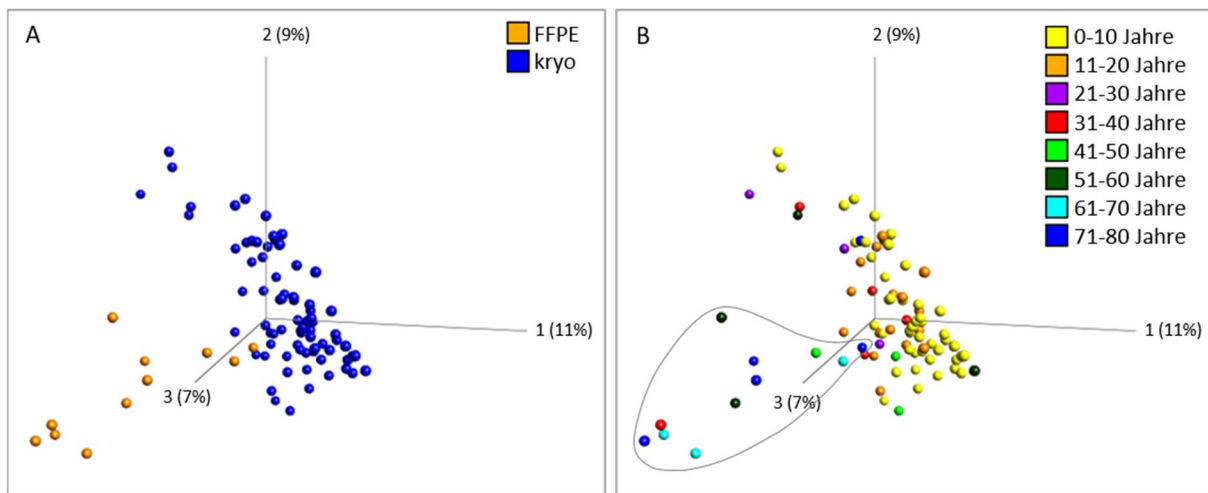


Abbildung 5: PCA der Methylierungswerte der 86 BL-Proben für die 451.285 CpG-Loci des HM450k-Arrays nach Qualitätskontrolle. A Proben nach Fixierungsmethode angefärbt: Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet (FFPE, orange), kryofixiert (kryo, blau), B Proben nach chronologischem Alter angefärbt, FFPE-BL-Proben eingekreist. Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode.

Daher scheinen die 11 FFPE-BL-Proben aus der Sektion Hämatopathologie und Lymphknotenregister Kiel von einem Batch-Effekt betroffen gewesen zu sein und wurden dementsprechend von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Ein Confounding durch ein tendenziell höheres chronologisches Alter der FFPE-BL-Proben konnte ausgeschlossen werden, da gleichaltrige kryofixierte und FFPE-Proben nicht zusammen clusterten und sich die FFPE-BL-Proben in ihrem Methylierungsmuster in der Heatmap deutlich von gleichaltrigen kryofixierten BL-Proben unterschieden.

3.3 Bestimmung des DNAm Alters nach Horvath

Zur Berechnung des epigenetischen DNA-Methylierungsalters (DNAm Alter) nach Horvath [49] wurde der frei zugängliche *DNA Methylation Age Calculator* auf der Website <https://dnamage.genetics.ucla.edu/home> genutzt.

Da der Datensatz mit den Beta-Werten der 451.285 CpG-Loci für die 445 Proben nach Qualitätskontrolle im ZIP-Dateiformat die vom *DNA Methylation Age Calculator* vorgegebene maximale Dateigröße von 800 MB überschritt, musste der Datensatz in seiner Größe reduziert werden. Hierfür wurden die 451.285 CpG-Loci entsprechend den Empfehlungen im „*Tutorial for the Online Age Calculator*“ [109] auf die Minimalanforderung von 28.587 CpG-Loci gefiltert, welche in der Datei „*datMiniAnnotation.csv*“ auf der Homepage <https://horvath.genetics.ucla.edu/html/dnamage/> hinterlegt sind. Dabei fiel auf, dass 1.600 CpG-Loci der Datei „*datMiniAnnotation.csv*“ gar nicht auf dem HM450k-Array analysiert werden, sodass nur 26.987 CpG-Loci im Datensatz gefunden wurden. In einer Korrespondenz mit dem Urheber des *DNA Methylation Age Calculator*, Steve Horvath, wurde jedoch angegeben, dass hieraus keine Beeinträchtigung der Berechnung des DNAm Alters resultiere.

Der Datensatz mit den Beta-Werten der 26.987 CpG-Loci für die 445 Proben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, wurde anschließend im ZIP-Dateiformat im *DNA Methylation Age Calculator* auf der Website <https://dnamage.genetics.ucla.edu/home> hochgeladen. Dieser gab nachfolgend das für die analysierten Blut-, B-Zell- und Lymphomproben berechnete DNAm Alter nach Horvath in einer CSV-Datei aus.

3.4 Statistische Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters in R

Die statistische Auswertung des chronologischen und DNAm Alters nach Horvath der Proben sowie die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mit der Statistik-Software *R* (Version 3.3.2) [110]. Da viele Stichproben keine Normalverteilung ihres chronologischen, DNAm oder Δ -Alters aufwiesen, wurde kein Mittelwert und keine Standardabweichung berechnet. Zudem wurden verteilungsunabhängige Tests zur Hypothesenprüfung verwendet. Für alle mit dem chronologischen, DNAm und Δ -Alter durchgeführten Tests wurde das Signifikanzniveau mit $\alpha=0,05$ festgelegt.

3.4.1 Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Blutproben

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 95 Proben aus dem peripheren Blut gesunder Individuen untersucht.

3.4.1.1 Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der Blutproben

Die gesunden Blutproben wiesen ein chronologisches Alter von 0 bis 63 Jahren mit einem Median von 37 Jahren auf. Die Spannweite des chronologischen Alters betrug somit 63 Jahre und der Interquartilabstand 21 Jahre (Q_1 : 23,5 Jahre, Q_3 : 44,5 Jahre).

Das DNAm Alter nach Horvath der Blutproben nahm Werte von 0,5 bis 69,6 Jahren mit einem Median von 40,4 Jahren an. Die Spannweite des DNAm Alters betrug somit 69,1 Jahre und der Interquartilabstand 23,0 Jahre (Q_1 : 24,5 Jahre, Q_3 : 47,5 Jahre).

Der anschließend durchgeführte Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung ergab, dass weder das chronologische ($p=9,02 \times 10^{-5}$) noch das DNAm Alter ($p=9,96 \times 10^{-5}$) der Blutproben normalverteilt waren. Die Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters der Blutproben sind in der Abbildung 6 A als Box-Whisker-Plot dargestellt.

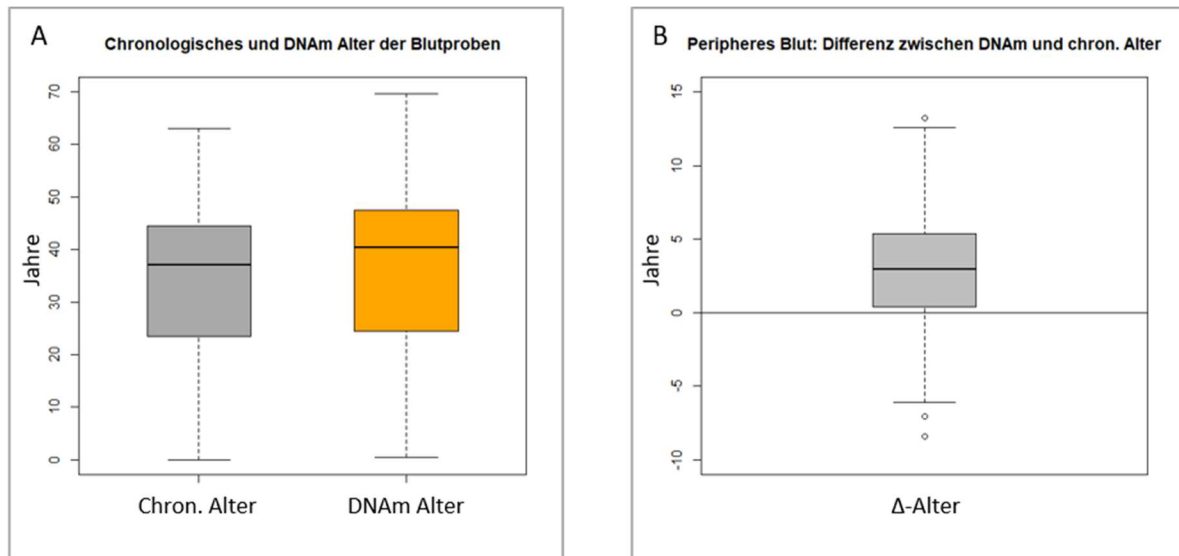


Abbildung 6: Box-Whisker-Plots der Blutproben. A Verteilung des chronologischen und DNAm Alters, B Verteilung des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

3.4.1.2 Das DNAm Alter der Blutproben lag im Median 2,9 Jahre über dem chronologischen Alter

Anschließend wurde die Differenz zwischen dem DNAm Alter und dem chronologischen Alter der Blutproben gebildet und somit das Δ -Alter berechnet. Dieses nahm Werte von -8,4 bis 13,3 Jahren an, wobei der Median bei 2,9 Jahren (95%-KI [2,1 Jahre; 3,7 Jahre]) lag. Der Interquartilabstand betrug 5,0 Jahre (Q_1 : 0,4 Jahre, Q_3 : 5,4 Jahre) und die Spannweite 21,7 Jahre.

Der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung ergab, dass das Δ -Alter der Blutproben normalverteilt war ($p=0,2539$). Die Verteilung des Δ -Alters der Blutproben ist in Abbildung 6 B als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Der anschließend durchgeführte zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zeigte, dass das Δ -Alter der Blutproben signifikant verschieden von 0 war ($p=6,89 \times 10^{-11}$). Somit unterschied sich das DNAm Alter signifikant vom chronologischen Alter der Blutproben.

3.4.1.3 Das DNAm Alter der Blutproben korrelierte mit dem chronologischen Alter

In der Abbildung 7 A wurden die Werte des DNAm Alters über dem chronologischen Alter der Blutproben in einem Streudiagramm aufgetragen. Hierbei ordnen sich die Datenpunkte nahe der eingezeichneten Winkelhalbierenden des Streudiagramms an.

Um zu überprüfen, ob das chronologische und DNAm Alter der Blutproben miteinander korrelieren, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ρ berechnet. Dieser bewertet die Stärke und Richtung eines möglichen monotonen Zusammenhangs zwischen zwei Datenreihen. In den Blutproben betrug der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient zwischen dem chronologischen und DNAm Alter $\rho=0,95247$. Zudem unterschied sich der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient signifikant von 0 (zweiseitiger Hotelling-Pabst-Test, $p < 2,2 \times 10^{-16}$).

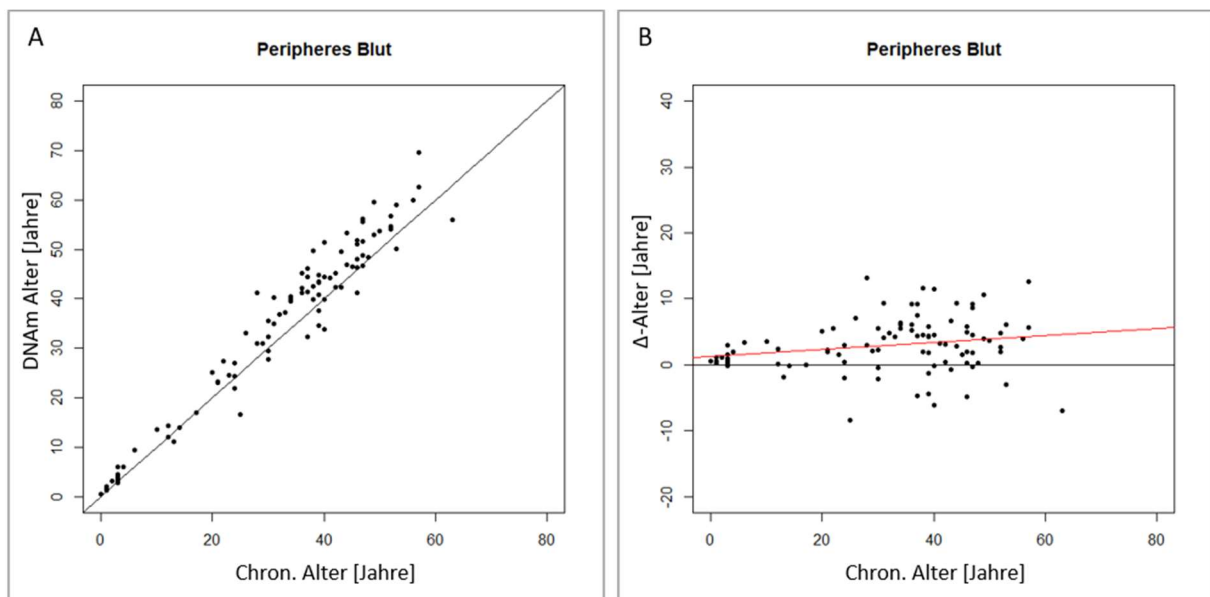


Abbildung 7: Streudiagramme der Blutproben. A Streudiagramm des DNAm Alters nach Horvath über dem chronologischen Alter. Die schwarze Gerade stellt die Winkelhalbierende chronologisches Alter=DNAm Alter dar. B Streudiagramm des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) über dem chronologischen Alter mit eingezeichneter linearer Regressionsgerade (rot) $y=a+b \cdot x$, $a=1,29$, $b=0,05$.

3.4.1.4 Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und Δ -Alter der Blutproben

In der Abbildung 7 B ist das Δ -Alter über dem chronologischen Alter der Blutproben im Streudiagramm aufgetragen. Um zu überprüfen, ob das chronologische und das Δ -Alter miteinander korrelieren, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ρ bestimmt. Dieser betrug $\rho=0,22619$ zwischen dem Δ -Alter und dem chronologischen Alter der Blutproben.

Zusätzlich wurde zweiseitig anhand der Hotelling-Pabst-Teststatistik geprüft, ob der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient signifikant von 0 abwich. Hierbei ergab sich ein p-Wert von $p=0,02752$. Der

Test zeigte somit, dass sich der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der Blutproben signifikant von 0 unterschied.

3.4.1.5 Lineare Regression des Δ -Alters über dem chronologischen Alter der Blutproben

Um den Verlauf des Δ -Alters über dem chronologischen Alter der Blutproben zu modellieren und einen möglichen statistischen Zusammenhang zwischen den beiden Größen näher zu charakterisieren, wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Hierbei wurde ein lineares Regressionsmodell entsprechend einer Geradenfunktion ($y = a + b * x$) anhand der Kleinste-Quadrate-Methode ermittelt. Dieses ergab für den Ordinatenabschnitt $a=1,2941$ (95%-KI [-0,57; 3,16]) und für die Steigung $b=0,0517$ (95%-KI [0,0002; 0,1032]).

Anschließend wurde anhand einer zweiseitigen t-Teststatistik geprüft, ob sich der Regressionskoeffizient b signifikant von 0 unterschied. Diese ergab einen p-Wert von $p=0,0491$ und zeigte somit, dass die Steigung b des Regressionsmodells signifikant von 0 abwich.

Zur Beurteilung der Güte des ermittelten linearen Regressionsmodells wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet, welches den durch das Regressionsmodell erklärbaren Anteil der Varianz des Δ -Alters angibt. Für das ermittelte lineare Regressionsmodell ergab sich ein Bestimmtheitsmaß von $R^2=0,041$.

Zur Visualisierung des berechneten linearen Regressionsmodells wurde die Regressionsgerade in das Streudiagramm der Abbildung 7 B eingezeichnet, welches den Verlauf des Δ -Alters über dem chronologischen Alter der Blutproben darstellt.

3.4.2 Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der naiven B-Zellen

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 10 naive B-Zell-Proben untersucht, von denen 5 Proben aus dem peripheren Blut (PB) und 5 Proben aus den Tonsillen (T) gesunder Individuen isoliert worden waren.

Da die naiven B-Zell-Proben aus dem peripheren Blut und den Tonsillen im zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentest keinen signifikanten Unterschied ihres Δ -Alter zeigten ($p=0,1508$), wurden sie für die weiteren Analysen der epigenetischen Uhr nach Horvath als eine Probenkohorte zusammengefasst. Die Verteilung des Δ -Alters der naiven B-Zell-Proben getrennt nach Gewebeart ist als Box-Whisker-Plot im Anhang 7 dargestellt.

Dementsprechend erfolgt hier die gemeinsame Auswertung des chronologischen, DNAm sowie Δ -Alters der 10 naiven B-Zell-Proben aus peripherem Blut und Tonsillen zusammen.

3.4.2.1 Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der naiven B-Zell-Proben

Die naiven B-Zell-Proben (PB+T) wiesen ein chronologisches Alter von 4 bis 66 Jahren mit einem Median von 16,5 Jahren auf. Die Spannweite des chronologischen Alters betrug somit 62 Jahre und der Interquartilabstand 49,8 Jahre (Q_1 : 4,0 Jahre, Q_3 : 53,8 Jahre).

Das DNAm Alter nach Horvath der naiven B-Zell-Proben nahm Werte von 2,6 bis 57,1 Jahren mit einem Median von 14,4 Jahren an. Die Spannweite des DNAm Alters betrug somit 54,5 Jahre und der Interquartilabstand 41,4 Jahre (Q_1 : 5,3 Jahre, Q_3 : 46,7 Jahre).

Die Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters der naiven B-Zell-Proben sind im Anhang 6 A als Box-Whisker-Plot dargestellt.

3.4.2.2 Verteilung des Δ -Alters der naiven B-Zell-Proben

Nachfolgend wurde die Differenz zwischen dem DNAm Alter und dem chronologischen Alter der naiven B-Zell-Proben gebildet und somit das Δ -Alter berechnet. Dieses nahm Werte von -11,8 bis 7,3 Jahren mit einem Median von -0,7 Jahren (95%-KI [-5,3 Jahre; 3,9 Jahre]) an. Der Interquartilabstand betrug 8,7 Jahre (Q_1 : -7,6 Jahre, Q_3 : 1,1 Jahre) und die Spannweite 19,1 Jahre.

Der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung ergab, dass das Δ -Alter der naiven B-Zell-Proben normalverteilt war ($p=0,73$). Die Verteilung des Δ -Alters der naiven B-Zell-Proben ist in der Abbildung 9 A als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Der anschließend durchgeführte zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zeigte, dass sich das Δ -Alter und somit die Differenz zwischen DNAm Alter und chronologischem Alter der naiven B-Zell-Proben nicht signifikant von 0 unterschied ($p=0,375$).

3.4.3 Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Keimzentrums-B-Zellen

Insgesamt wurden 14 Keimzentrums-B-Zell-Proben untersucht, von denen 9 Proben aus der Studie von Kulis et al. [88] und 5 Proben aus dem Arbeitspaket WPN des ICGC MMML-Seq-Projektes stammten. Alle 14 Keimzentrums-B-Zell-Proben waren aus dem Tonsillengewebe gesunder Individuen isoliert worden.

Da die Keimzentrums-B-Zell-Proben aus den beiden Studien im zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentest keinen signifikanten Unterschied ihres Δ -Alters zeigten ($p=0,5185$), wurden sie für die weiteren Analysen zu einer Probenkohorte zusammengefasst. Die Verteilung des Δ -Alters der Keimzentrums-B-Zell-Proben getrennt nach Studien ist als Box-Whisker-Plot im Anhang 8 dargestellt.

Daher erfolgt hier die gemeinsame Auswertung des chronologischen, DNAm sowie Δ -Alters der Keimzentrums-B-Zell-Proben aus der Studie von Kulis et al. [88] sowie dem Arbeitspaket WPN des ICGC MMML-Seq-Projektes.

3.4.3.1 Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der Keimzentrums-B-Zell-Proben

Die Keimzentrums-B-Zell-Proben wiesen ein chronologisches Alter von 2 bis 30 Jahren mit einem Median von 5 Jahren auf. Die Spannweite des chronologischen Alters betrug somit 28 Jahre und der Interquartilabstand 2 Jahre (Q_1 : 4 Jahre, Q_3 : 6 Jahre).

Das DNAm Alter nach Horvath der Keimzentrums-B-Zell-Proben nahm Werte von 5,5 bis 38,5 Jahren mit einem Median von 15,0 Jahren an. Die Spannweite des DNAm Alters betrug somit 33,0 Jahre und der Interquartilabstand 11,8 Jahre (Q_1 : 10,7 Jahre, Q_3 : 22,6 Jahre).

Die Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters der Keimzentrums-B-Zell-Proben sind im Anhang 6 B als Box-Whisker-Plot dargestellt.

3.4.3.2 Das DNAm Alter der Keimzentrums-B-Zell-Proben lag im Median 9,3 Jahre über dem chronologischen Alter

Anschließend wurde die Differenz zwischen dem DNAm Alter nach Horvath und dem chronologischen Alter der Keimzentrums-B-Zell-Proben gebildet und somit das Δ -Alter berechnet. Dieses nahm Werte von 3,5 bis 22,2 Jahren mit einem Median von 9,3 Jahren (95%-KI [4,7 Jahre; 13,9 Jahre]) an. Der Interquartilabstand betrug 10,2 Jahre (Q_1 : 6,2 Jahre, Q_3 : 16,4 Jahre) und die Spannweite 18,7 Jahre.

Der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung des Δ -Alters ergab einen p-Wert von $p=0,3096$ und zeigte somit, dass das Δ -Alter der Keimzentrums-B-Zell-Proben normalverteilt war. Die Verteilung des Δ -Alters der Keimzentrums-B-Zell-Proben ist in der Abbildung 9 A als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Der anschließend durchgeführte zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zeigte, dass das Δ -Alter der Keimzentrums-B-Zell-Proben signifikant verschieden von 0 war ($p=0,00012$). Somit unterschied sich das DNAm Alter signifikant vom chronologischen Alter der Keimzentrums-B-Zell-Proben.

3.4.4 Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Plasmazellen

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 11 Plasmazell-Proben untersucht, von denen 8 Proben aus Tonsillen (T) und 3 Proben aus dem Knochenmark (KM) gesunder Individuen extrahiert worden waren.

Da eine statistische Auswertung der 3 Plasmazell-Proben aus dem Knochenmark bei sehr geringer Fallzahl nicht zulässig war, flossen nur die 8 Plasmazell-Proben aus den Tonsillen in die weiteren statistischen Analysen ein. Die 3 Plasmazell-Proben aus dem Knochenmark wurden jedoch z.T. in den Graphiken abgebildet. Die Plasmazell-Proben konnten nicht zu einer Kohorte vereint werden, weil die Plasmazell-Proben aus dem Knochenmark ein größeres Δ -Alter als die Plasmazell-Proben aus den Tonsillen aufwiesen, sodass ein Zusammenschluss zu einer Kohorte als unzulässig erschien. Die Verteilung des Δ -Alters der Plasmazell-Proben getrennt nach Gewebeart ist als Box-Whisker-Plot im Anhang 9 dargestellt.

Dementsprechend wird nachfolgend die statistische Auswertung der 8 Plasmazell-Proben aus den Tonsillen erläutert.

3.4.4.1 Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der Plasmazell-Proben

Die Plasmazell-Proben (T) wiesen ein chronologisches Alter von 2 bis 13 Jahren mit einem Median von 5 Jahren auf. Die Spannweite des chronologischen Alters betrug somit 11 Jahre und der Interquartilabstand 1,3 Jahre (Q_1 : 4,0 Jahre, Q_3 : 5,3 Jahre).

Das DNAm Alter nach Horvath der Plasmazell-Proben (T) nahm Werte von 5,5 bis 31,4 Jahren mit einem Median von 10,4 Jahren an. Die Spannweite des DNAm Alters betrug somit 25,9 Jahre und der Interquartilabstand 10,1 Jahre (Q_1 : 8,9 Jahre, Q_3 : 19,0 Jahre).

Die Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters der Plasmazell-Proben (T) sind im Anhang 6 C als Box-Whisker-Plot dargestellt.

3.4.4.2 Das DNAm Alter der Plasmazell-Proben lag im Median 6,4 Jahre über dem chronologischen Alter

Nachfolgend wurde die Differenz zwischen dem DNAm Alter nach Horvath und dem chronologischen Alter der Plasmazell-Proben (T) gebildet und somit das Δ -Alter berechnet. Dieses nahm Werte von 2,4 bis 18,4 Jahren mit einem Median von 6,4 Jahren (95%-KI [0,4 Jahre; 12,5 Jahre]) an. Der Interquartilabstand betrug 10,5 Jahre (Q_1 : 3,4 Jahre, Q_3 : 13,9 Jahre) und die Spannweite 16,0 Jahre.

Der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung ergab, dass das Δ -Alter der Plasmazell-Proben (T) normalverteilt war ($p=0,1543$). Die Verteilung des Δ -Alters der Plasmazell-Proben (T) ist in der Abbildung 9 A als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Anschließend wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest durchgeführt, um zu prüfen, ob sich das Δ -Alter signifikant von 0 unterschied. Dieser ergab einen p-Wert von $p=0,00781$. Er zeigte daher, dass sich das Δ -Alter und somit die Differenz zwischen DNAm Alter und chronologischem Alter der Plasmazell-Proben (T) signifikant von 0 unterschied.

3.4.5 Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der B-Gedächtniszellen

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 5 B-Gedächtniszell-Proben aus dem peripheren Blut gesunder Individuen untersucht.

3.4.5.1 Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der B-Gedächtniszell-Proben

Die B-Gedächtniszell-Proben wiesen ein chronologisches Alter von 28 bis 66 Jahren mit einem Median von 61 Jahren auf. Die Spannweite des chronologischen Alters betrug somit 38 Jahre und der Interquartilabstand 31 Jahre (Q_1 : 32 Jahre, Q_3 : 63 Jahre).

Das DNAm Alter nach Horvath der B-Gedächtniszell-Proben nahm Werte von 36,4 bis 62,1 Jahren mit einem Median von 43,4 Jahren an. Die Spannweite des DNAm Alters betrug somit 25,7 Jahre und der Interquartilabstand 3,6 Jahre (Q_1 : 42,3 Jahre, Q_3 : 45,9 Jahre).

Die Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters der B-Gedächtniszell-Proben sind im Anhang 6 D als Box-Whisker-Plot dargestellt.

3.4.5.2 Verteilung des Δ -Alters der B-Gedächtniszell-Proben

Anschließend wurde die Differenz zwischen dem DNAm Alter und dem chronologischen Alter der B-Gedächtniszell-Proben gebildet und somit das Δ -Alter berechnet. Dieses nahm Werte von -18,7 bis 11,4 Jahren mit einem Median von -4,0 Jahren (95%-KI [-22,0 Jahre; 14,1 Jahre]) an. Der Interquartilabstand betrug 25,5 Jahre (Q_1 : -17,1 Jahre, Q_3 : 8,4 Jahre) und die Spannweite 30,1 Jahre.

Der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung des Δ -Alters ergab für die B-Gedächtniszell-Proben einen p-Wert von $p=0,3077$ und zeigte somit, dass das Δ -Alter normalverteilt war. Die Verteilung des Δ -Alters der B-Gedächtniszell-Proben ist in der Abbildung 9 A als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Der anschließend durchgeführte zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zeigte, dass das Δ -Alter der B-Gedächtniszell-Proben nicht signifikant von 0 abwich ($p=0,625$). Es bestand somit kein signifikanter Unterschied zwischen dem DNAm und chronologischen Alter der B-Gedächtniszell-Proben.

3.4.6 Auswertung der frühen B-Zell-Reifestadien

Die frühen B-Zell-Reifestadien-Proben der 6 Hämatopoetischen Progenitorzell- (HPC), 6 Pro-B-Zell- (preBI), 6 Prä-B-Zell- (preBII) und 4 unreifen B-Zell-Proben (iBC) aus dem Knochenmark wiesen alle das gleiche chronologische Alter von -0,3 Jahren sowie ein sehr ähnliches DNAm (-0,6 bis -0,1 Jahre) und Δ -Alter (-0,3 bis 0,2 Jahre) auf. Im zweiseitigen Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest unterschied sich das Δ -Alter in keiner der frühen B-Zell-Reifestadien-Kohorten signifikant von 0. Die Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters der HPC, preBI, preBII und iBC sind im Anhang 10 sowie die Verteilungen des Δ -Alters im Anhang 11 als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Im anschließend durchgeführten zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentest konnte kein signifikanter Unterschied im Δ -Alter zwischen den verschiedenen frühen B-Zell-Reifestadien festgestellt werden. Da sich das Δ -Alter der HPC, preBI, preBII und iBC somit sehr stark ähnelte, ergaben sich im Wilcoxon-Rangsummentest der einzelnen frühen B-Zell-Reifestadien im Vergleich zu den weiteren Probenkohorten auch größtenteils die gleichen Ergebnisse. Während die HPC, preBI, preBII und iBC jeweils nicht signifikant in ihrem Δ -Alter von den naiven B-Zellen bzw. den B-Gedächtniszellen abwichen, unterschieden sie sich jeweils signifikant in ihrem Δ -Alter von den Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (T), Blutproben, BL- und FL-Proben. Während die HPC, preBI und preBII zudem signifikant in ihrem Δ -Alter vom Δ -Alter der DLBCL-Proben abwichen, konnte zwischen dem Δ -Alter der iBC und DLBCL-Proben kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

3.4.7 Verlauf des DNAm Alters über dem chronologischen Alter der B-Zell-Reifestadien

Um einen Überblick über den Verlauf des DNAm Alters über dem chronologischen Alter der verschiedenen B-Zell-Differenzierungsstufen zu geben, wurden die B-Zell-Reifestadien-Proben im Streudiagramm in Abbildung 8 aufgetragen. Aufgrund der geringen Probenanzahl pro Differenzierungsstadium wurden keine Korrelationsanalysen durchgeführt.

3.4.8 Vergleich des Δ -Alters zwischen den späten B-Zell-Reifestadien

Um zu testen, ob sich das Δ -Alter zwischen den verschiedenen späten B-Zell-Reifestadien signifikant unterscheidet, wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Rangsummentest zwischen jeweils zwei B-Zell-Reifestadien-Gruppen durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt. Die Verteilungen des Δ -Alters der B-Zell-Proben aufgetrennt nach Differenzierungsstadien sind zum Vergleich gemeinsam im Box-Whisker-Plot der Abbildung 9 A dargestellt, sodass ersichtlich wird, wie sich das Δ -Alter im Laufe der B-Zell-Reifung verändert.

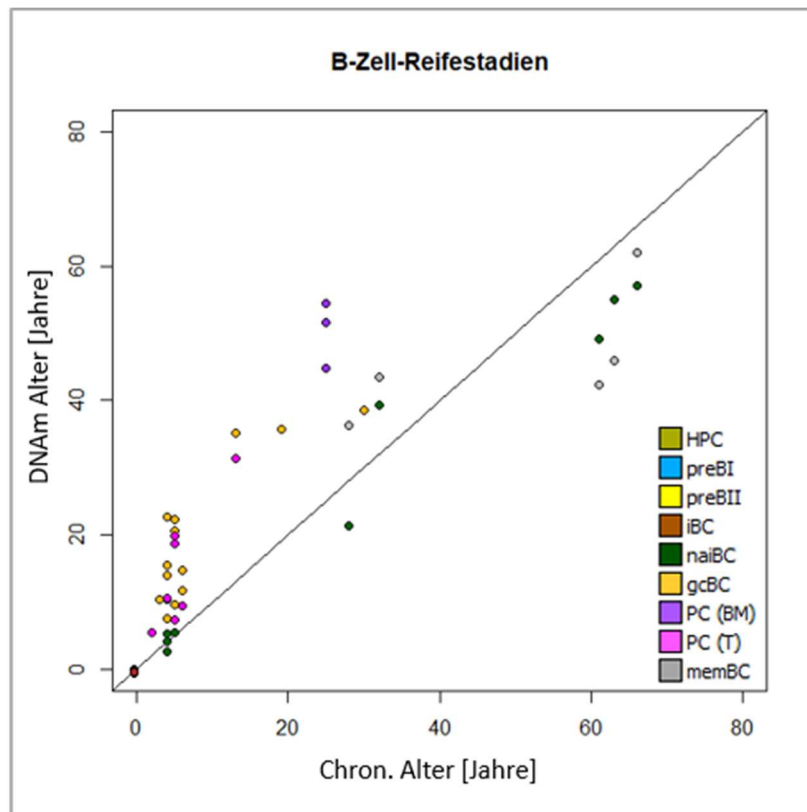


Abbildung 8: Streudiagramm des DNAm Alters über dem chronologischen Alter der B-Zell-Reifestadien-Proben: Hämatopoetische Progenitorzellen (HPC), Pro-B-Zellen (preBI), Prä-B-Zellen (preBII), unreife B-Zellen (iBC), naive B-Zellen (naiBC), Keimzentrums-B-Zellen (gcBC), Plasmazellen aus dem Knochenmark (PC (BM)), Plasmazellen aus Tonsillen (PC (T)), B-Gedächtniszellen (memBC). Da die HPC, preBI, preBII und iBC sowohl das gleiche chronologische Alter als auch ein sehr ähnliches DNAm Alter aufweisen, überlagern sich die Proben im Streudiagramm. Die schwarze Gerade stellt die Winkelhalbierende chronologisches Alter=DNAm Alter dar.

Der Wilcoxon-Rangsummentest ergab, dass sich die naiven B-Zell- und Keimzentrums-B-Zell-Proben signifikant in ihrem Δ -Alter unterschieden ($p=1,938 \times 10^{-5}$). Das Δ -Alter der Keimzentrums-B-Zell-Proben lag entsprechend dem Pseudomedian 13,6 Jahre (95%-KI [7,4 Jahre; 18,2 Jahre]) über dem Δ -Alter der naiven B-Zell-Proben. Die Differenz zwischen dem DNAm und chronologischen Alter war dementsprechend bei den Keimzentrums-B-Zellen größer als bei den naiven B-Zellen.

Zudem unterschied sich das Δ -Alter der naiven B-Zellen signifikant vom Δ -Alter der Plasmazellen (T) im Wilcoxon-Rangsummentest ($p=0,00306$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen betrug 11,4 Jahre (95%-KI [3,4 Jahre; 17,1 Jahre]), sodass die Plasmazellen (T) eine signifikant größere Differenz zwischen ihrem DNAm und chronologischen Alter zeigten als die naiven B-Zellen.

Das Δ -Alter der naiven B-Zellen wick jedoch nicht signifikant vom Δ -Alter der B-Gedächtniszellen im Wilcoxon-Rangsummentest ab ($p=0,953$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen wurde mit -3,3 Jahren (95%-KI [-17,6 Jahre; 12,8 Jahre]) angegeben.

Zwischen dem Δ -Alter der Keimzentrums-B-Zellen und der Plasmazellen (T) konnte kein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Rangsummentest festgestellt werden ($p=0,2667$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen betrug -2,3 Jahre (95%-KI [-8,6 Jahre; 3,1 Jahre]).

Auch wick das Δ -Alter der Keimzentrums-B-Zellen nicht signifikant vom Δ -Alter der B-Gedächtniszellen im Wilcoxon-Rangsummentest ab ($p=0,05573$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen wurde mit -13,9 Jahren (95%-KI [-27,4 Jahre; 0,0 Jahre]) angegeben.

Des Weiteren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Δ -Alter der Plasmazellen (T) und der B-Gedächtniszellen im Wilcoxon-Rangsummentest nachgewiesen werden ($p=0,1709$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen lag bei -10,4 Jahren (95%-KI [-25,2 Jahre; 4,9 Jahre]).

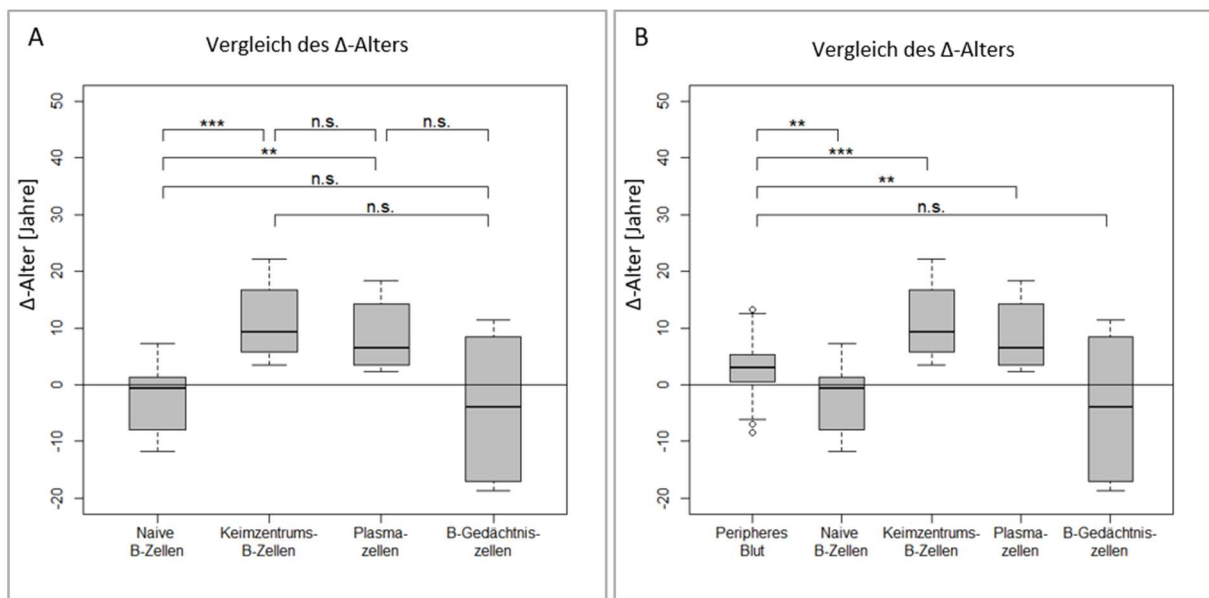


Abbildung 9: Box-Whisker-Plots der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter): A Vergleich des Δ -Alters zwischen den naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (T) und B-Gedächtniszellen. B Vergleich des Δ -Alters zwischen den Blutproben und den naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (T) und B-Gedächtniszellen. Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen den Gruppen dar (* bei $p < 0,05$; ** bei $p < 0,01$; *** bei $p < 0,001$; n.s., nicht signifikant). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns. T, Tonsillen.

3.4.9 Vergleich des Δ -Alters zwischen den Blutproben und den späten B-Zell-Reifestadien

Nachfolgend wurde das Δ -Alter der Blutproben jeweils mit dem Δ -Alter der verschiedenen B-Zell-Differenzierungsstadien unter Verwendung des zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentests verglichen. Hierbei wurde geprüft, ob sich das Δ -Alter der Blutproben und der jeweiligen B-Zell-Reifestadien-Proben signifikant voneinander unterschieden. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt. Die

Verteilungen des Δ -Alters der Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben sind zum Vergleich gemeinsam im Box-Whisker-Plot der Abbildung 9 B dargestellt

Der Wilcoxon-Rangsummentest ergab einen signifikanten Unterschied des Δ -Alters der Blut- und der naiven B-Zell-Proben ($p=0,00481$). Entsprechend dem Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen von -4,9 Jahren (95%-KI [-9,5 Jahre; -1,5 Jahre]) zeigten die naiven B-Zellen ein kleineres Δ -Alter und somit eine geringere Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter als die Blutproben.

Auch das Δ -Alter der Keimzentrums-B-Zellen wich signifikant vom Δ -Alter der Blutproben im Wilcoxon-Rangsummentest ab ($p=1,274 \times 10^{-6}$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen betrug 7,3 Jahre (95%-KI [4,2 Jahre; 11,1 Jahre]). Dementsprechend wiesen die Keimzentrums-B-Zellen ein signifikant größeres Δ -Alter und somit eine größere Differenz zwischen dem DNAm und chronologischen Alter auf als die Blutproben.

Zudem unterschied sich das Δ -Alter der Plasmazellen (T) signifikant vom Δ -Alter der Blutproben im Wilcoxon-Rangsummentest ($p=0,00567$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen zeigte mit 4,4 Jahren (95%-KI [1,2 Jahre; 10,1 Jahre]), dass das Δ -Alter und somit die Differenz zwischen dem DNAm und chronologischen Alter der Plasmazellen (T) größer war als bei den Blutproben.

Zwischen dem Δ -Alter der Blut- und B-Gedächtniszell-Proben konnte kein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Rangsummentest festgestellt werden ($p=0,3869$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen betrug -6,9 Jahre (95%-KI [-19,8 Jahre; 6,1 Jahre]).

3.4.10 Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Burkitt Lymphom-Proben

Insgesamt wurden in dieser Arbeit 75 Burkitt Lymphom-Proben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, statistisch ausgewertet. Diese Proben stammten alle aus kryofixiertem Lymphomgewebe.

3.4.10.1 Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der BL-Proben

Die BL-Proben wiesen ein chronologisches Alter von 2 bis 76 Jahren mit einem Median von 9 Jahren auf. Die Spannweite des chronologischen Alters betrug somit 74 Jahre und der Interquartilabstand 9 Jahre (Q_1 : 5,5 Jahre, Q_3 : 14,5 Jahre).

Das DNAm Alter nach Horvath der BL-Proben nahm Werte von 10,2 bis 127,2 Jahren mit einem Median von 57,0 Jahren an. Die Spannweite des DNAm Alters betrug somit 117,0 Jahre und der Interquartilabstand 35,0 Jahre (Q_1 : 44,5 Jahre, Q_3 : 79,5 Jahre).

Der Shapiro-Wilk-Test zeigte, dass weder das chronologische ($p=2,804 \times 10^{-11}$) noch das DNAm Alter ($p=0,02725$) der BL-Proben normalverteilt war. Die Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters der BL-Proben sind zusammen im Box-Whisker-Plot der Abbildung 10 A dargestellt.

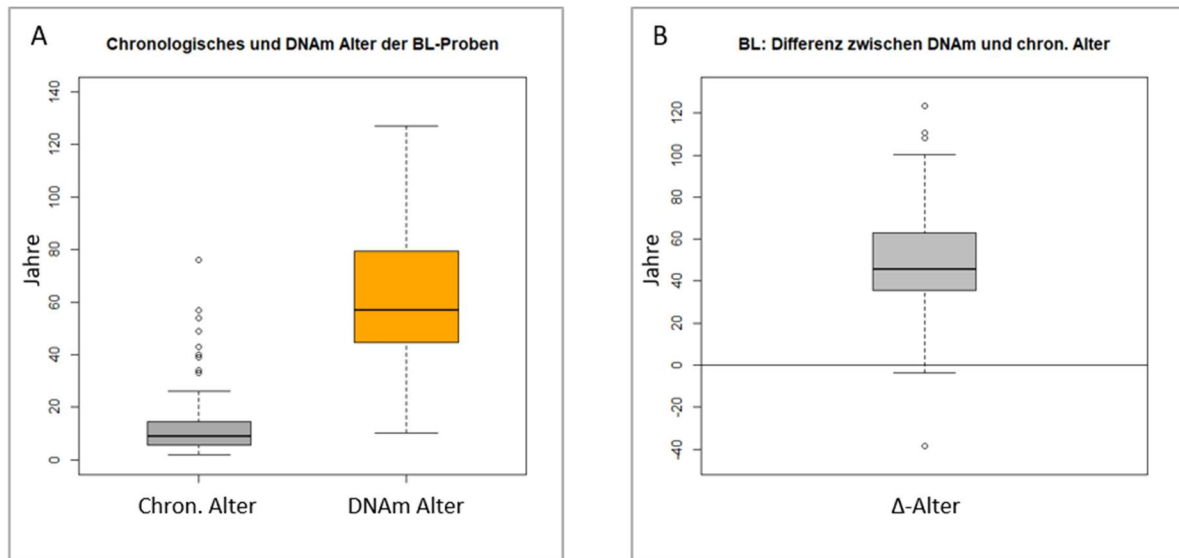


Abbildung 10: Box-Whisker-Plots der BL-Proben. A Verteilungen des chronologischen und des DNAm Alters, B Verteilung des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

3.4.10.2 Das DNAm Alter der BL-Proben liegt im Median 45,6 Jahre über dem chronologischen Alter

Anschließend wurde die Differenz zwischen dem DNAm Alter nach Horvath und dem chronologischen Alter der BL-Proben gebildet und somit das Δ -Alter berechnet. Dieses nahm Werte von -38,3 bis 123,2 Jahren mit einem Median von 45,6 Jahren (95%-KI [40,7 Jahre; 50,6 Jahre]) an. Der Interquartilabstand betrug 27,3 Jahre (Q_1 : 35,5 Jahre, Q_3 : 62,8 Jahre) und die Spannweite 161,5 Jahre.

Der Shapiro-Wilk-Test ergab, dass das Δ -Alter der BL-Proben nicht normalverteilt war ($p=0,00762$). Die Verteilung des Δ -Alters der BL-Proben ist in der Abbildung 10 B als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Der anschließend durchgeführte zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zeigte, dass das Δ -Alter der BL-Proben signifikant von 0 abwich ($p < 2,2 \times 10^{-16}$). Somit unterschied sich das DNAm Alter signifikant vom chronologischen Alter der BL-Proben.

3.4.10.3 Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und DNAm Alter der BL-Proben

In der Abbildung 11 A ist das DNAm Alter nach Horvath über dem chronologischen Alter der BL-Proben im Streudiagramm aufgetragen. Die Datenpunkte weichen hierbei von der eingezeichneten Winkelhalbierenden des Streudiagramms ab. Um zu überprüfen, ob das chronologische und DNAm Alter nach Horvath in den BL-Proben miteinander korrelieren, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ρ berechnet. Dieser betrug $\rho=0,38382$ zwischen dem chronologischen und DNAm Alter der BL-Proben und unterschied sich signifikant von 0 im zweiseitigen Hotelling-Pabst-Test ($p=0,00068$).

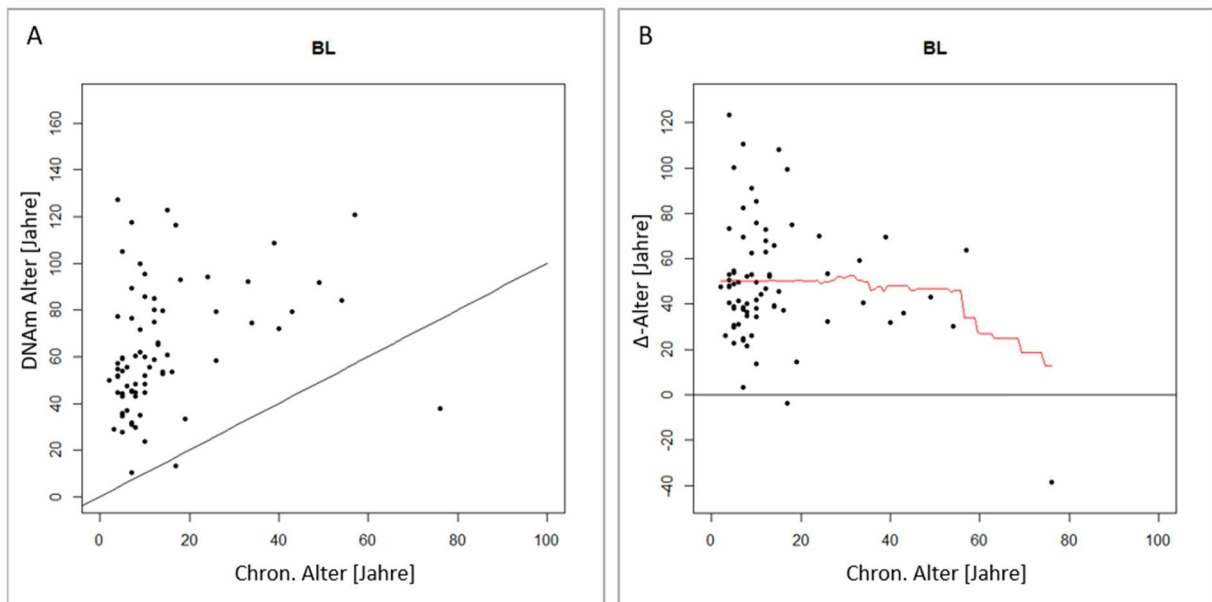


Abbildung 11: Streudiagramme der BL-Proben. A Streudiagramm des DNAm Alters nach Horvath über dem chronologischen Alter. Die schwarze Gerade stellt die Winkelhalbierende chronologisches Alter=DNAm Alter dar. B Streudiagramm des Δ -Alters über dem chronologischen Alter mit eingezeichnetem gleitendem Mittelwert (rot, Fensterbreite 40 Jahre).

3.4.10.4 Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der BL-Proben

In der Abbildung 11 B ist das Δ -Alter über dem chronologischen Alter der BL-Proben im Streudiagramm aufgetragen. Zusätzlich wurde der gleitende Mittelwert mit einer Fensterbreite von 40 Jahren eingezeichnet, um den Verlauf des Δ -Alters über dem chronologischen Alter zu verdeutlichen.

Um zu überprüfen, ob das Δ -Alter und das chronologische Alter der BL-Proben miteinander korrelieren, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ρ berechnet. Dieser betrug $\rho=0,0029$ zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der BL-Proben und unterschied sich nicht signifikant von 0 (zweiseitiger Hotelling-Pabst-Test, $p=0,9803$). Es lag also kein signifikanter monotoner Zusammenhang zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der BL-Proben vor.

Da das chronologische und das Δ -Alter der BL-Proben dementsprechend nicht miteinander korreliert waren und auch die Datenpunkte im Streudiagramm (Abbildung 11 B) keinen linearen Zusammenhang

vermuten ließen, wurde für die BL-Proben kein lineares Regressionsmodell des Verlaufs des Δ -Alters über dem chronologischen Alter berechnet.

3.4.11 Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der DLBCL-Proben

Insgesamt wurden in dieser Dissertation 119 DLBCL-Proben statistisch ausgewertet, welche alle aus kryofixiertem Lymphomgewebe stammten.

3.4.11.1 Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der DLBCL-Proben

Die DLBCL-Proben wiesen ein chronologisches Alter von 3 bis 93 Jahren mit einem Median von 67 Jahren auf. Die Spannweite des chronologischen Alters betrug somit 90 Jahre und der Interquartilabstand 25,5 Jahre (Q_1 : 54,5 Jahre, Q_3 : 80,0 Jahre).

Das DNAm Alter nach Horvath der DLBCL-Proben nahm Werte von 12,6 bis 169,8 Jahren mit einem Median von 80,2 Jahren an. Die Spannweite des DNAm Alters betrug somit 157,2 Jahre und der Interquartilabstand 40,1 Jahre (Q_1 : 65,6 Jahre, Q_3 : 105,7 Jahre).

Während der Shapiro-Wilk-Test für das chronologische Alter der DLBCL-Proben keine Normalverteilung ergab ($p=1,155 \times 10^{-6}$), konnte für das DNAm Alter eine Normalverteilung nachgewiesen werden ($p=0,5314$). Die Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters der DLBCL-Proben sind zusammen im Box-Whisker-Plot der Abbildung 12 A dargestellt.

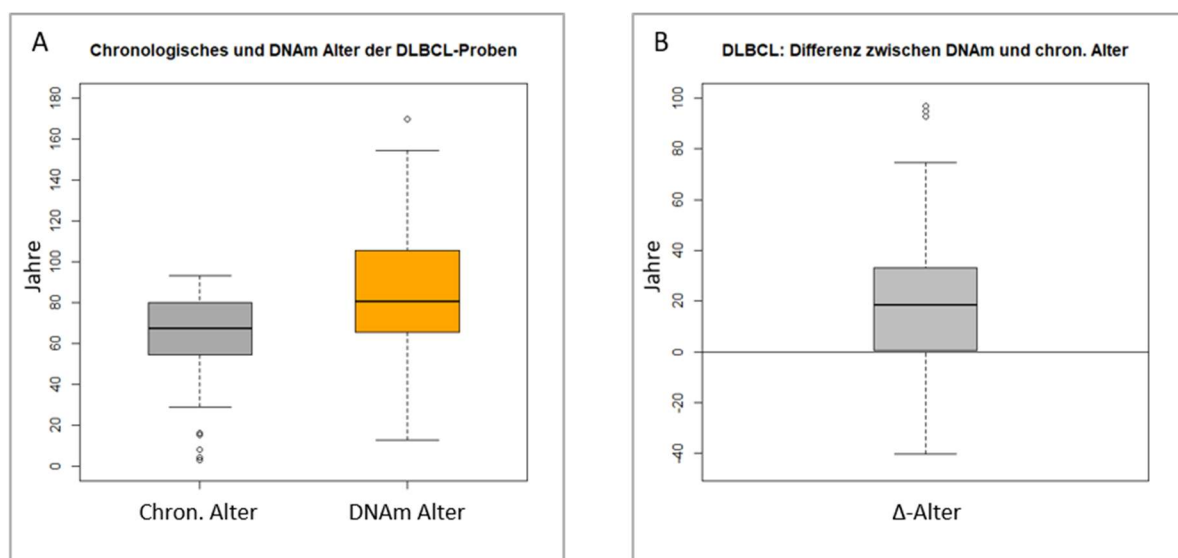


Abbildung 12: Box-Whisker-Plots der DLBCL-Proben. A Verteilungen des chronologischen und des DNAm Alters nach Horvath, B Verteilung des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

3.4.11.2 Das DNAm Alter der DLBCL-Proben liegt im Median 18,5 Jahre über dem chronologischen Alter

Nachfolgend wurde die Differenz zwischen dem DNAm Alter nach Horvath und dem chronologischen Alter der DLBCL-Proben gebildet und somit das Δ -Alter berechnet. Dieses nahm Werte von -40,4 bis 97,1 Jahren mit einem Median von 18,5 Jahren (95%-KI [13,8 Jahre; 23,3 Jahre]) an. Der Interquartilabstand betrug 32,6 Jahre (Q_1 : 0,4 Jahre, Q_3 : 33,0 Jahre) und die Spannweite 137,5 Jahre.

Der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung des Δ -Alters ergab einen p-Wert von $p=0,00768$ und zeigte somit, dass das Δ -Alter der DLBCL-Proben nicht normalverteilt war. Die Verteilung des Δ -Alters der DLBCL-Proben ist in der Abbildung 12 B als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Anschließend wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest durchgeführt, um zu prüfen, ob sich das Δ -Alter der DLBCL-Proben signifikant von 0 unterschied. Der ermittelte p-Wert von $p=1,742 \times 10^{-13}$ zeigte, dass das Δ -Alter und somit die Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter der DLBCL-Proben signifikant von 0 abwich.

3.4.11.3 Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und DNAm Alter der DLBCL-Proben

In der Abbildung 13 A ist das DNAm Alter über dem chronologischen Alter der DLBCL-Proben im Streudiagramm aufgetragen. Hierbei streuen die Datenpunkte um die eingezeichnete Winkelhalbierende des Koordinatensystems. Um zu testen, ob das DNAm Alter mit dem chronologischen Alter der DLBCL-Proben korreliert, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ρ berechnet. Dieser betrug $\rho=0,43675$ zwischen dem chronologischen und dem DNAm Alter der DLBCL-Proben und unterschied sich zudem signifikant von 0 im zweiseitigen Hotelling-Pabst-Test ($p=6,842 \times 10^{-7}$).

3.4.11.4 Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der DLBCL-Proben

In der Abbildung 13 B ist das Δ -Alter über dem chronologischen Alter der DLBCL-Proben aufgetragen. Zur Verdeutlichung des Verlaufs des Δ -Alters wurde der gleitende Mittelwert mit einer Fensterbreite von 40 Jahren als Trendlinie eingezeichnet.

Nachfolgend wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ρ berechnet, um zu überprüfen, ob das chronologische und das Δ -Alter der DLBCL-Proben miteinander korrelieren. Dieser betrug $\rho=-0,22839$ zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der DLBCL-Proben und unterschied sich signifikant von 0 (zweiseitiger Hotelling-Pabst Test, $p=0,01248$).

Aufgrund der starken Streuung der Datenpunkte in der Abbildung 13 B erschien eine Modulation des Verlaufs des Δ -Alters über dem chronologischen Alter anhand einer linearen Regression nicht angemessen [111]. Dementsprechend wurde kein lineares Regressionsmodell für die DLBCL-Proben berechnet.

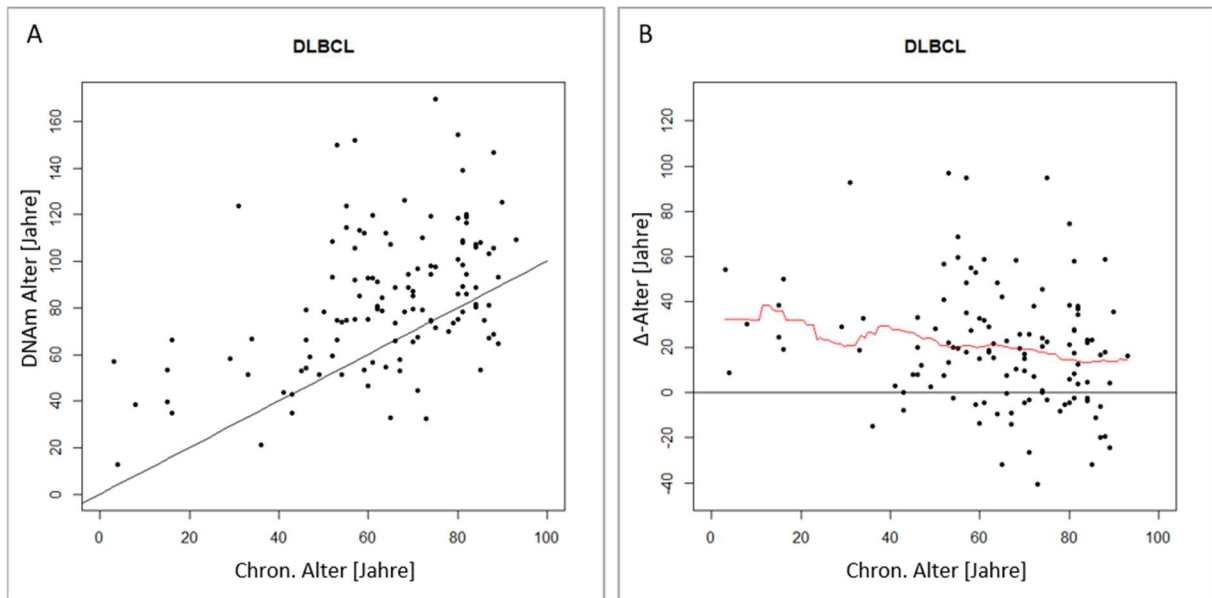


Abbildung 13: Streudiagramme der DLBCL-Proben. A Streudiagramm des DNAm Alters nach Horvath über dem chronologischen Alter. Die schwarze Gerade stellt die Winkelhalbierende chronologisches Alter=DNAm Alter dar. B Streudiagramm des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) über dem chronologischen Alter mit eingezeichnetem gleitendem Mittelwert (rot, Fensterbreite 40 Jahre).

3.4.12 Analyse des chronologischen, DNAm und Δ -Alters der Follikulären Lymphom-Proben

In dieser Arbeit wurden 94 Follikuläre Lymphom-Proben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, statistisch ausgewertet. Diese Proben waren alle aus kryofixiertem Lymphomgewebe extrahiert worden.

3.4.12.1 Verteilung des chronologischen und DNAm Alters der FL-Proben

Die FL-Proben wiesen ein chronologisches Alter von 22 bis 80 Jahren mit einem Median von 61,5 Jahren auf. Die Spannweite des chronologischen Alters betrug somit 58 Jahre und der Interquartilabstand 19,8 Jahre (Q_1 : 51,0 Jahre, Q_3 : 70,8 Jahre).

Das DNAm Alter nach Horvath der FL-Proben nahm Werte von 34,4 bis 131,2 Jahren mit einem Median von 73,0 Jahren an. Die Spannweite des DNAm Alters betrug somit 96,8 Jahre und der Interquartilabstand 24,2 Jahre (Q_1 : 63,7 Jahre, Q_3 : 87,9 Jahre).

Der Shapiro-Wilk-Test ergab, dass weder das chronologische ($p=0,00311$) noch das DNAm Alter ($p=0,01307$) der FL-Proben normalverteilt war. Die Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters der FL-Proben sind zusammen im Box-Whisker-Plot der Abbildung 14 A dargestellt.

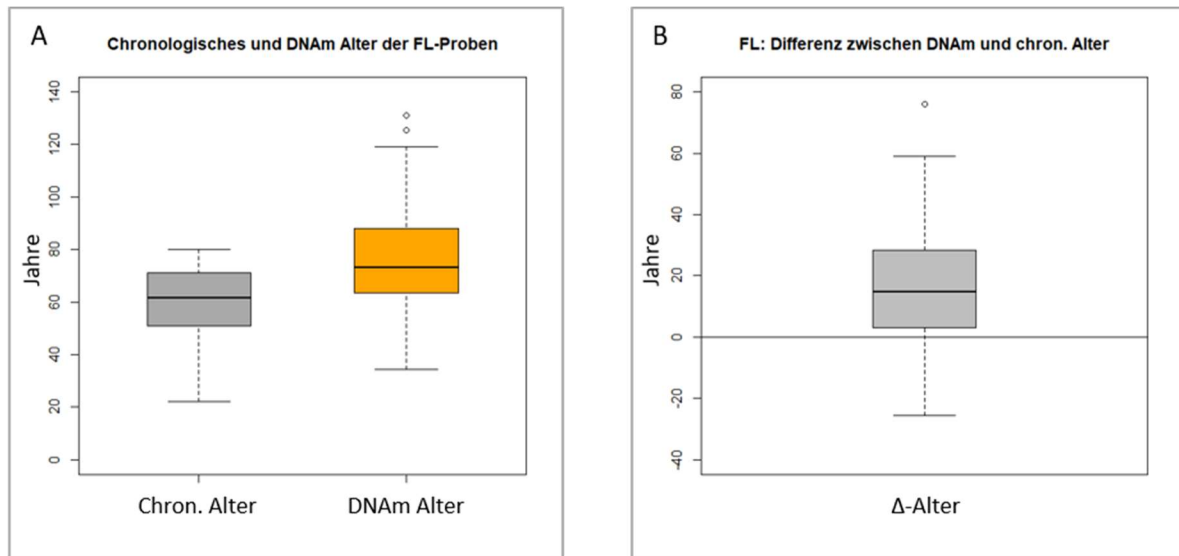


Abbildung 14: Box-Whisker-Plots der FL-Proben. A Verteilungen des chronologischen und des DNAm Alters nach Horvath, B Verteilung des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

3.4.12.2 Das DNAm Alter der FL-Proben lag im Median 14,9 Jahre über dem chronologischen Alter

Anschließend wurde die Differenz zwischen dem DNAm Alter nach Horvath und dem chronologischen Alter der FL-Proben gebildet und somit das Δ -Alter berechnet. Dieses nahm Werte von -25,5 bis 76,1 Jahren mit einem Median von 14,9 Jahren (95%-KI [10,8 Jahre; 19,0 Jahre]) an. Der Interquartilabstand betrug 24,7 Jahre (Q_1 : 3,3 Jahre, Q_3 : 28,0 Jahre) und die Spannweite 101,6 Jahre.

Der Shapiro-Wilk-Test ergab, dass das Δ -Alter der FL-Proben normalverteilt war ($p=0,09592$). Die Verteilung des Δ -Alters der FL-Proben ist in der Abbildung 14 B als Box-Whisker-Plot dargestellt.

Der nachfolgend durchgeführte zweiseitige Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zeigte, dass das Δ -Alter der FL-Proben signifikant von 0 abwich ($p=3,092 \times 10^{-14}$). Somit unterschied sich das DNAm Alter signifikant vom chronologischen Alter der FL-Proben.

3.4.12.3 Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und DNAm Alter der FL-Proben

In der Abbildung 15 A ist das DNAm Alter nach Horvath über dem chronologischen Alter der FL-Proben im Streudiagramm aufgetragen. Um zu überprüfen, ob das chronologische und das DNAm Alter der

FL-Proben miteinander korrelieren, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ρ berechnet. Dieser betrug $\rho=0,2514$ zwischen dem chronologischen und dem DNAm Alter der FL-Proben und unterschied sich zudem signifikant von 0 im zweiseitigen Hotelling-Pabst-Test ($p=0,01452$).

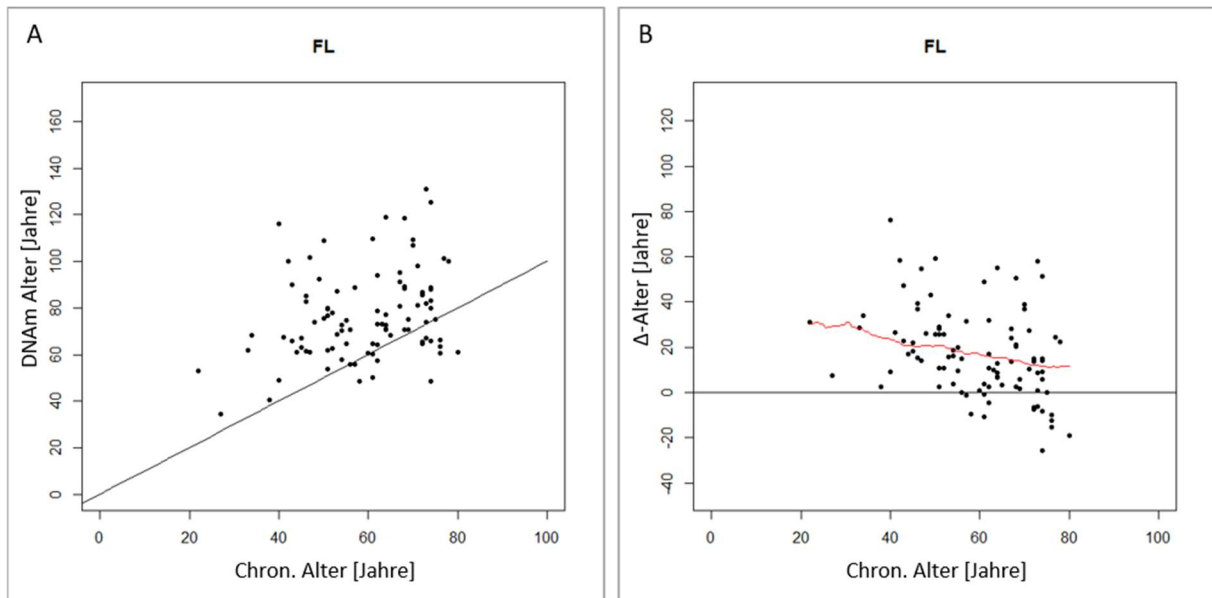


Abbildung 15: Streudiagramme der FL-Proben. A Streudiagramm des DNAm Alters nach Horvath über dem chronologischen Alter. Die schwarze Gerade stellt die Winkelhalbierende chronologisches Alter=DNAm Alter dar. B Streudiagramm des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) über dem chronologischen Alter mit eingezeichnetem gleitendem Mittelwert (rot, Fensterbreite 40 Jahre).

3.4.12.4 Korrelationsanalyse zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der FL-Proben

In der Abbildung 15 B ist das Δ -Alter über dem chronologischen Alter der FL-Proben aufgetragen. Zudem wurde der gleitende Mittelwert mit einer Fensterbreite von 40 Jahren als Trendlinie eingezeichnet.

Um zu überprüfen, ob das Δ -Alter und das chronologische Alter der FL-Proben miteinander korrelieren, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ρ berechnet. Dieser betrug $\rho=-0,40711$ zwischen dem chronologischen und dem Δ -Alter der FL-Proben und unterschied sich signifikant von 0 (zweiseitiger Hotelling-Pabst-Test, $p=4,658 \times 10^{-5}$).

Für die FL-Proben wurde kein lineares Regressionsmodell zur Beschreibung des Verlaufs des Δ -Alters über dem chronologischen Alter ermittelt, weil die Datenpunkte in der Abbildung 15 B stark streuten und eine Modulation des Δ -Alters anhand einer linearen Regression nicht angemessen erschien [111].

3.4.13 Vergleich des Δ -Alters zwischen den Lymphomentitäten

Um zu testen, ob sich das Δ -Alter zwischen den Lymphomentitäten signifikant unterschied, wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Rangsummentest zwischen dem Δ -Alter von jeweils zwei Lymphomentitäten durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt. Die Verteilungen des Δ -Alters der BL-, DLBCL- und FL-Proben sind gemeinsam als Box-Whisker-Plot in der Abbildung 16 dargestellt.

Der Wilcoxon-Rangsummentest ergab, dass sich das Δ -Alter der BL-Proben signifikant vom Δ -Alter der DLBCL-Proben unterschied ($p=2,781 \times 10^{-14}$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen von 29,6 Jahren (95%-KI [22,3 Jahre; 36,1 Jahre]) zeigte, dass die BL-Proben ein größeres Δ -Alter und somit eine größere Differenz zwischen dem DNAm und dem chronologischen Alter im Vergleich zu den DLBCL-Proben aufwiesen.

Zudem unterschied sich das Δ -Alter der BL-Proben signifikant vom Δ -Alter der FL-Proben im Wilcoxon-Rangsummentest ($p < 2,2 \times 10^{-16}$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen betrug 31,0 Jahre (95%-KI [24,7 Jahre; 37,2 Jahre]), sodass die BL-Proben eine signifikant größere Differenz zwischen dem DNAm und chronologischen Alter zeigten als die FL-Proben. Somit unterschieden sich die BL-Proben in ihrem Δ -Alter sowohl von den DLBCL- als auch von den FL-Proben.

Zwischen dem Δ -Alter der DLBCL- und FL-Proben konnte kein signifikanter Unterschied im Wilcoxon-Rangsummentest festgestellt werden ($p=0,5726$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen wurde mit 1,6 Jahren (95%-KI [-4,4 Jahre; 7,6 Jahre]) angegeben.

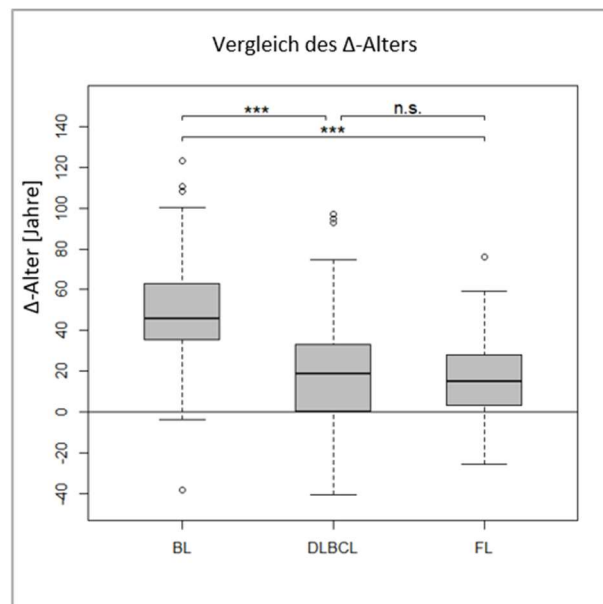


Abbildung 16: Box-Whisker-Plot mit Vergleich der Verteilungen des Δ -Alters der BL-, DLBCL- und FL-Proben. Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen den Gruppen dar (* bei $p < 0,05$; ** bei $p < 0,01$; *** bei $p < 0,001$; n.s., nicht signifikant). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

3.4.14 Das Δ -Alter unterscheidet sich signifikant zwischen den Blut- und Lymphomproben

Zur Klärung der Fragestellung, ob sich das Δ -Alter der BL-, DLBCL- und FL-Proben jeweils signifikant vom Δ -Alter der Blutproben unterschied, wurde ein zweiseitiger Wilcoxon-Rangsummentest zwischen dem Δ -Alter der Blutproben und je einer Lymphomentität durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt. Die Verteilungen des Δ -Alters der Blut-, BL-, DLBCL- und FL-Proben sind zum Vergleich gemeinsam als Box-Whisker-Plot in der Abbildung 17 A dargestellt.

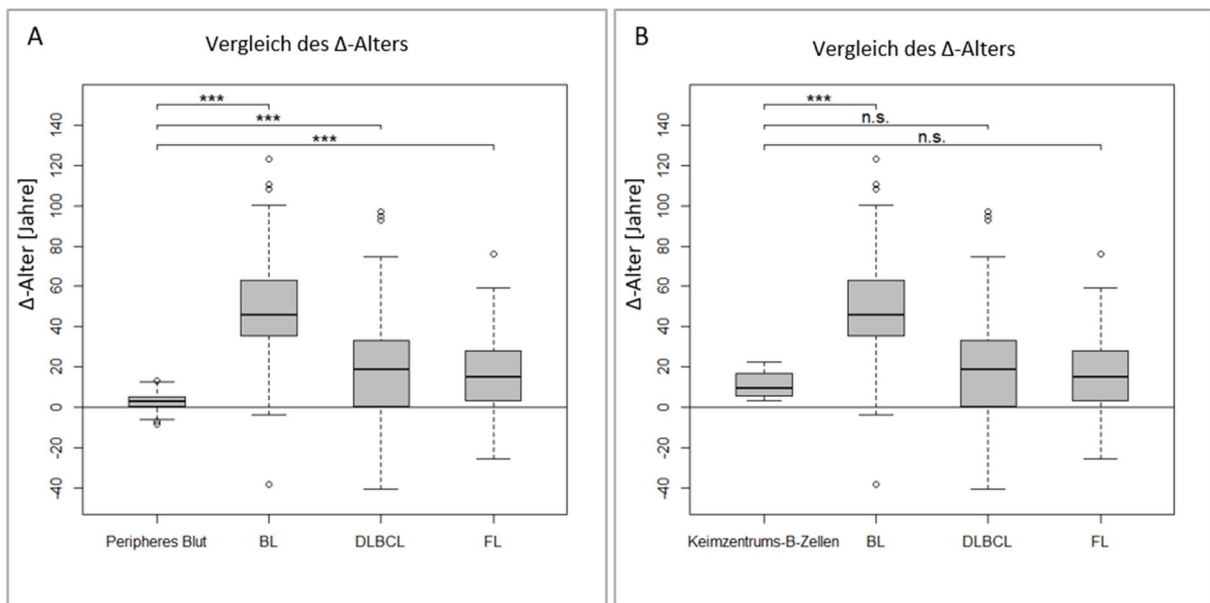


Abbildung 17: Box-Whisker-Plots der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter): A Vergleich des Δ -Alters zwischen den Blutproben und den BL-, DLBCL- und FL-Proben. B Vergleich des Δ -Alters zwischen den Keimzentrams-B-Zell-Proben und den BL-, DLBCL- und FL-Proben. Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen den Gruppen dar (* bei $p<0.05$; ** bei $p<0.01$; *** bei $p<0.001$; n.s., nicht signifikant). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

Der Wilcoxon-Rangsummentest zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen dem Δ -Alter der Blut- und BL-Proben ($p<2,2 \times 10^{-16}$). Das Δ -Alter der BL-Proben lag entsprechend dem Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen um 42,3 Jahre (95%-KI [38,1 Jahre; 46,9 Jahre]) höher als das Δ -Alter der Blutproben.

Auch wick das Δ -Alter der DLBCL-Proben signifikant vom Δ -Alter der Blutproben im Wilcoxon-Rangsummentest ab ($p=8,331 \times 10^{-9}$). Der Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen betrug 15,2 Jahre (95%-KI [10,8 Jahre; 18,8 Jahre]) und zeigte daher, dass die DLBCL-Proben eine größere Differenz zwischen dem DNAm und dem chronologischen Alter aufwiesen als die Blutproben.

Zudem unterschied sich das Δ -Alter der FL-Proben signifikant vom Δ -Alter der Blutproben im Wilcoxon-Rangsummentest ($p=9,434 \times 10^{-11}$). Entsprechend dem Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters

zwischen den beiden Gruppen von 11,9 Jahren (95%-KI [8,4 Jahre; 15,8 Jahre]) zeigten die FL-Proben ein höheres Δ -Alter und somit eine größere Differenz zwischen dem DNAm und dem chronologischen Alter als die Blutproben.

Zum Vergleich zwischen den Blut- und Lymphomproben wurde außerdem in einem Streudiagramm im Anhang 12 das DNAm Alter über dem chronologischen Alter der Blut-, BL-, DLBCL- und FL-Proben dargestellt.

3.4.15 Das Δ -Alter der BL-Proben unterscheidet sich signifikant von den B-Zell-Reifestadien

Anschließend wurde getestet, ob sich das Δ -Alter zwischen den BL und den B-Zellen der verschiedenen Differenzierungsstadien signifikant voneinander unterschied. Hierfür wurde jeweils ein zweiseitiger Wilcoxon-Rangsummentest zwischen dem Δ -Alter der BL- und je einer B-Zell-Reifestadien-Probenkohorte durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt. Die Verteilungen des Δ -Alters der BL-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell (T)- sowie der B-Gedächtniszell-Proben sind zum Vergleich gemeinsam als Box-Whisker-Plot im Anhang 13 dargestellt. Zudem zeigt Abbildung 17 B die Verteilungen des Δ -Alters der Keimzentrums-B-Zell-, BL-, DLBCL- und FL-Proben zusammen in einem Box-Whisker-Plot.

Der Wilcoxon-Rangsummentest zeigte einen signifikanten Unterschied des Δ -Alters zwischen den BL- und den naiven B-Zell-Proben ($p=9,44 \times 10^{-10}$, Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters $\tilde{x}^*=47,9$ Jahre). Zudem unterschied sich das Δ -Alter der BL-Proben signifikant vom Δ -Alter der Keimzentrums-B-Zell-Proben ($p=3,681 \times 10^{-10}$, $\tilde{x}^*=34,4$ Jahre). Auch wick das Δ -Alter der BL-Proben signifikant vom Δ -Alter der Plasmazell-Proben (T) ab ($p=4,492 \times 10^{-7}$, $\tilde{x}^*=36,1$ Jahre). Des Weiteren wurde ein signifikanter Unterschied zwischen dem Δ -Alter der BL- und B-Gedächtniszell-Proben festgestellt ($p=6,905 \times 10^{-6}$, $\tilde{x}^*=51,8$ Jahre).

Daher wiesen die BL-Proben ein signifikant höheres Δ -Alter und somit eine größere Differenz zwischen ihrem DNAm und chronologischen Alter auf als die B-Zell-Proben der verschiedenen Differenzierungsstufen.

3.4.16 Vergleich des Δ -Alters zwischen den DLBCL- und B-Zell-Reifestadien-Proben

Um zu überprüfen, ob sich das Δ -Alter zwischen den DLBCL- und den verschiedenen B-Zell-Reifestadien-Proben signifikant voneinander unterschied, wurde jeweils ein zweiseitiger Wilcoxon-Rangsummentest zwischen dem Δ -Alter der DLBCL- und je einer B-Zell-Reifestadien-Probenkohorte durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt. Die Verteilungen des Δ -Alters der

DLBCL-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell (T)- sowie B-Gedächtniszell-Proben sind zum Vergleich gemeinsam als Box-Whisker-Plot im Anhang 14 dargestellt.

Der Wilcoxon-Rangsummentest ergab, dass sich die DLBCL- und naiven B-Zell-Proben signifikant in ihrem Δ -Alter unterschieden ($p=0,00118$, Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters $\tilde{x}^*=19,9$ Jahre). Hingegen konnte kein signifikanter Unterschied im Δ -Alter zwischen den DLBCL- und Keimzentrums-B-Zell-Proben nachgewiesen werden ($p=0,1757$, $\tilde{x}^*=6,9$ Jahre). Auch wich das Δ -Alter der DLBCL-Proben nicht signifikant vom Δ -Alter der Plasmazell-Proben (T) ab ($p=0,1456$, $\tilde{x}^*=9,4$ Jahre). Zwischen dem Δ -Alter der DLBCL- und B-Gedächtniszell-Proben wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ($p=0,02465$, $\tilde{x}^*=21,5$ Jahre).

Somit wiesen die DLBCL-Proben ein signifikant höheres Δ -Alter im Vergleich zu den naiven B-Zell- und den B-Gedächtniszell-Proben auf, wohingegen sich zwischen dem Δ -Alter der DLBCL-Proben und den Keimzentrums-B-Zell- bzw. Plasmazell-Proben (T) kein signifikanter Unterschied zeigte.

3.4.17 Auswertung der Cell of Origin-Untergruppen der DLBCL-Proben

Die DLBCL-Proben wurden zudem anhand der *Cell of Origin*-Klassifikation (COO) nach der jeweiligen Ursprungszelle der Lymphomagenese aufgeteilt. Hierbei ergaben sich drei Untergruppen bestehend aus 60 GCB- (*Germinal center B-cell type*), 34 ABC- (*Activated B-cell type*) und 14 Type-III-DLBCL-Proben. 11 DLBCL-Proben konnten nicht nach der COO-Klassifikation eingeteilt werden. Die COO-DLBCL-Untergruppen wurden jeweils separat auf ihr DNAm und Δ -Alter untersucht und anschließend mittels eines zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentests (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$) miteinander verglichen. Hierbei konnte zwischen keiner der COO-DLBCL-Untergruppen ein signifikanter Unterschied im Δ -Alter festgestellt werden. Die Verteilungen des Δ -Alters der COO-DLBCL-Untergruppen sind im Anhang 15 in Form eines Box-Whisker-Plots dargestellt.

Zusätzlich wurden die COO-DLBCL-Untergruppen mittels eines zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentests (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$) jeweils mit den verschiedenen B-Zell-Reifestadien anhand ihres Δ -Alters verglichen. Während sich die GCB-DLBCL-Proben in ihrem Δ -Alter signifikant von den naiven B-Zell- und B-Gedächtniszell-Proben unterschieden, konnte eine solche signifikante Abweichung des Δ -Alters von den Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell (T)-Proben nicht nachgewiesen werden. Die ABC-DLBCL-Proben wiesen sowohl im Vergleich zu den naiven B-Zell-, den Keimzentrums-B-Zell-, den Plasmazell (T)- als auch den B-Gedächtniszell-Proben einen signifikanten Unterschied ihres Δ -Alters auf. Die Type-III-DLBCL-Proben unterschieden sich in ihrem Δ -Alter nur von den naiven B-Zell-Proben signifikant, während keine signifikante Abweichung des Δ -Alters im Vergleich zu den Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell (T)- und B-Gedächtniszell-Proben nachgewiesen werden konnte. Die

Verteilungen des Δ -Alters der COO-DLBCL-Untergruppen im Vergleich zu den B-Zell-Reifestadien-Proben sind als Box-Whisker-Plots in den Anhängen 16-18 abgebildet.

3.4.18 Vergleich des Δ -Alters zwischen den FL- und B-Zell-Reifestadien-Proben

Zur Klärung der Fragestellung, ob sich das Δ -Alter zwischen den FL- und den B-Zell-Proben der verschiedenen Differenzierungsstadien signifikant voneinander unterschied, wurde jeweils ein zweiseitiger Wilcoxon-Rangsummentest zwischen dem Δ -Alter der FL- und je einer B-Zell-Reifestadien-Probenkohorte durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ festgelegt. Die Verteilungen des Δ -Alters der FL-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell (T)- sowie B-Gedächtniszell-Proben sind zum Vergleich gemeinsam als Box-Whisker-Plot im Anhang 19 dargestellt.

Der Wilcoxon-Rangsummentest zeigte einen signifikanten Unterschied des Δ -Alters zwischen den FL- und naiven B-Zell-Proben ($p=0,00012$, Pseudomedian der Differenz des Δ -Alters $\tilde{x}^*=17,5$ Jahre). Im Gegensatz dazu wick das Δ -Alter der FL-Proben nicht signifikant vom Δ -Alter der Keimzentrums-B-Zell-Proben ab ($p=0,2942$, $\tilde{x}^*=4,3$ Jahre). Auch wurde kein signifikanter Unterschied zwischen dem Δ -Alter der FL- und Plasmazell-Proben (T) festgestellt ($p=0,1929$, $\tilde{x}^*=7,0$ Jahren). Jedoch wick das Δ -Alter der FL-Proben signifikant vom Δ -Alter der B-Gedächtniszell-Proben ab ($p=0,01575$, $\tilde{x}^*=19,8$ Jahre).

Ähnlich den Ergebnissen der DLBCL-Proben wiesen auch die FL-Proben ein signifikant höheres Δ -Alter als die naiven B-Zell- und die B-Gedächtniszell-Proben auf. Zudem konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen dem Δ -Alter der FL-Proben und der Keimzentrums-B-Zell- bzw. Plasmazell-Proben (T) nachgewiesen werden.

3.5 Methylierungsanalyse der CpG-Loci der epigenetischen Uhr nach Horvath

Anschließend wurde eine Analyse der mittels HM450k-Arrays gemessenen Methylierungswerte der 445 Blut-, B-Zell- und Lymphomproben in der Software *Qlucore Omics Explorer 3.2* (Qlucore AB) durchgeführt. Hierfür wurden einzelne fehlende Beta-Werte im Datensatz anhand der „*K-nearest neighbors impute (kNN)*“-Methode [115] rekonstruiert (*Missing Value Reconstruction, MVR*) und die Beta-Werte anschließend entsprechend der Methode „Mean=0“ normalisiert.

Da der Fokus dieser Dissertation auf dem DNAm Alter nach Horvath [49] lag, wurden primär die CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus untersucht. Daher wurden die 451.285 CpG-Loci des HM450k-Arrays, welche die Qualitätskriterien erfüllten, zunächst auf die 353 Horvath-CpG-Loci gefiltert. Wie im Abschnitt 3.2.5 erläutert, waren jedoch nach der Qualitätskontrolle nur noch 349 der 353 Horvath-CpG-Loci im Datensatz enthalten.

Wie schon in den vorherigen Auswertungen des DNAm Alters nach Horvath wurden die naiven B-Zellen aus dem peripheren Blut und den Tonsillen sowie die Keimzentrums-B-Zellen aus der Studie von Kulis et al. [88] sowie dem ICGC MMML-Seq-Projekt Arbeitspaket WPN jeweils zu einer Probenkohorte zusammengefasst, weil sie sich nicht signifikant in ihrem Δ -Alter unterschieden. Da die Plasmazellen aus dem Knochenmark und den Tonsillen einen Unterschied ihres Δ -Alters aufwiesen, wurden sie weiterhin getrennt untersucht.

3.5.1 Methylierungsanalyse der DNAm Alter-CpG-Loci in den gesunden Blutproben

Insgesamt wurden 95 Blutproben gesunder Probanden auf altersassoziierte Methylierungsmuster in den 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus untersucht. Diese Blutproben wiesen ein chronologisches Alter von 0 bis 63 Jahren auf.

In der Abbildung 18 wurden die Methylierungswerte der 349 Horvath-CpG-Loci für die 95 gesunden Blutproben in einer Heatmap dargestellt. In dieser Heatmap sind die Blutproben nach ihrem chronologischen Alter angeordnet, sodass man den Verlauf der Methylierungswerte über das zunehmende chronologische Alter der Blutproben nachvollziehen kann. Die 349 CpG-Loci wurden anhand des „*Weighted Average*“-Algorithmus (w.avg.) hierarchisch geclustert.

In der Heatmap wird deutlich, dass sich zwar die Methylierung der Horvath-CpG-Loci mit zunehmendem chronologischen Alter verändert, jedoch sind die absoluten Unterschiede der normalisierten Beta-Werte mit maximal 0,09 (entsprechend einer Veränderung des Anteils methylierter Loci von 9%, s. Farblegende der Heatmap) nicht sehr ausgeprägt. Die Methylierung der CpG-Loci, welche sich in der unteren Hälfte der Heatmap als Cluster anordnen, unterscheidet sich z.T. zwischen gleichaltrigen Blutproben, sodass dies visuell als vertikale Streifen in der Heatmap imponiert. Zudem ist zu erkennen, dass sich der Methylierungsgrad der meisten CpG-Loci deutlich zwischen den Blutproben mit einem chronologischen Alter jünger bzw. älter als 10 Jahre verändert.

3.5.2 Vergleich der Methylierung der DNAm Alter-CpG-Loci zwischen den Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben

Anschließend wurde das Methylierungsmuster der 349 Horvath-CpG-Loci zwischen den Blut- und den B-Zell-Reifestadien-Proben verglichen. In diese Analyse flossen die 95 Blut-, 10 naiven B-Zell-, 14 Keimzentrums-B-Zell-, 8 Plasmazell (T)-, 3 Plasmazell (KM)- und 5 B-Gedächtniszell-Proben ein, welche die Qualitätskriterien erfüllten.

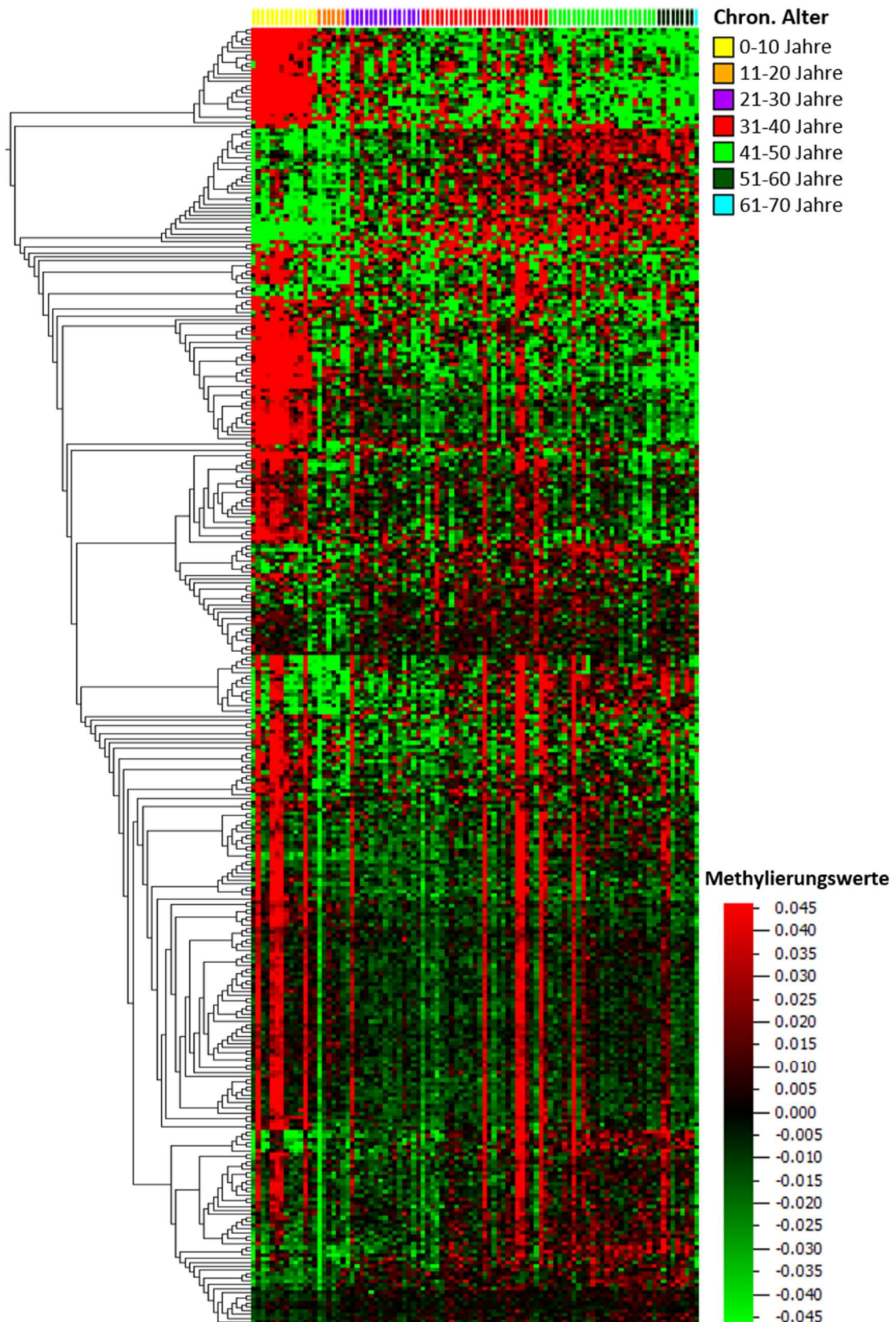


Abbildung 18: Heatmap der Methylierungswerte der 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus in den gesunden Blutproben. Proben nach chronologischem Alter ansteigend angeordnet und farbcodiert, CpG-Loci hierarchisch geclustert nach w.avg.-Methode, Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode. Die Proben sind in Spalten und die CpG-Loci in Zeilen angeordnet. Hohe Methylierungswerte sind in rot, niedrige Methylierungswerte in grün dargestellt.

3.5.2.1 Die Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben unterscheiden sich in ihrer Methylierung der DNAm Alter-CpG-Loci

Zunächst wurde eine PCA der Methylierungswerte der Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus durchgeführt. Die PCA mit den Proben angefärbt nach Zelltyp ist in der Abbildung 19 A dargestellt. In dieser PCA ordnen sich die Blutproben, die naiven B-Zell-Proben sowie die späten B-Zell-Reifestadien der Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben jeweils in drei separaten, länglichen Clustern an. Das Cluster der naiven B-Zell-Proben nimmt dabei eine mittlere Position zwischen dem Cluster der Blutproben und dem Cluster der späten B-Zell-Reifestadien ein. Die erste Hauptkomponente (Achse 1) scheint somit einerseits die Blut- von den B-Zell-Proben zu separieren sowie andererseits die B-Zell-Proben nach Differenzierungsstadien aufzutrennen. Während im Cluster der späten B-Zell-Reifestadien die Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben aus den Tonsillen zusammen clustern, ordnen sich die B-Gedächtniszell- und Plasmazell-Proben aus dem Knochenmark zusammen am Ende des langgestreckten Clusters an. Zudem kann man erkennen, dass die Plasmazellen aus dem Knochenmark klar getrennt von den Plasmazellen aus den Tonsillen clustern.

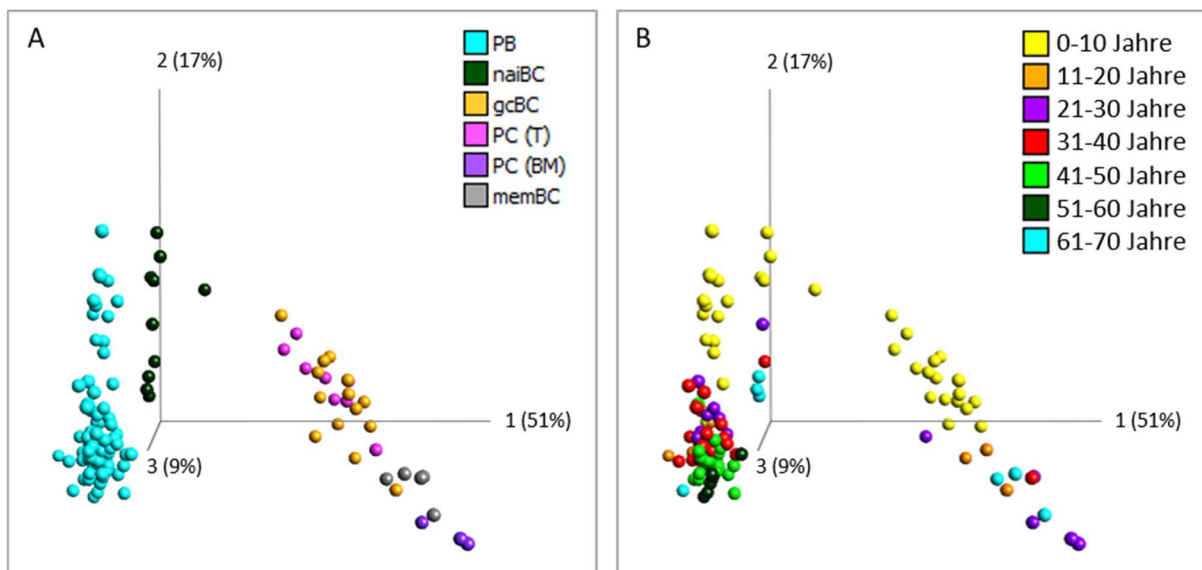


Abbildung 19: PCA der Methylierungswerte der peripheren Blut- (PB), naiven B-Zell- (naiBC), Keimzentrums-B-Zell- (gcBC), Plasmazell-Proben (PC) aus Tonsillen (T) und Knochenmark (BM) sowie B-Gedächtniszell-Proben (memBC) für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus. A Proben nach Zelltyp angefärbt, B Proben nach chronologischem Alter angefärbt. Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode.

3.5.2.2 Die Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben ordnen sich in der PCA innerhalb ihrer Cluster nach chronologischem Alter an

In der Abbildung 19 B wurden die Proben in der PCA entsprechend ihrem chronologischen Alter angefärbt. Hierbei wird ersichtlich, dass sich die Proben innerhalb der drei dominierenden Cluster nach

chronologischem Alter anordnen. Die Hauptkomponente 2 (Achse 2) scheint dabei die Proben v.a. nach chronologischem Alter aufzutrennen. In allen drei Hauptclustern ordnen sich die Proben mit einem chronologischen Alter unter 11 Jahren separat von den älteren Proben an. So entsprechen die Untergruppen der Blut- und naiven B-Zell-Proben, welche sich schon in der Abbildung 19 A abzeichnen, der Aufteilung der Proben in die Altersgruppen jünger und älter als 10 Jahre. Zudem fällt auf, dass die Blutproben mit einem chronologischen Alter über 10 Jahren viel näher beieinander clustern als die jüngeren Blutproben. Im Cluster der späten B-Zell-Reifestadien überschneidet sich die Auftrennung der Proben in Altersgruppen jünger und älter als 10 Jahre mit der Auftrennung nach den einzelnen Differenzierungsstadien.

Eine PCA der Methylierungswerte der Blut- und aller B-Zell-Reifestadien-Proben inkl. der frühen Differenzierungsstadien aus dem Knochenmark für die 349 Horvath-CpG-Loci ist im Anhang 20 abgebildet. In dieser PCA clustern die frühen B-Zell-Reifestadien-Proben der Hämatopoetischen Progenitorzellen, Pro-B-Zellen, Prä-B-Zellen und unreifen B-Zellen dicht beisammen und setzen sich deutlich von den Clustern der Blut-, naiven B-Zell- und späten B-Zell-Reifestadien-Proben ab.

3.5.2.3 Differentielle Methylierungsanalyse zwischen den Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben

Um zwischen den Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben differentiell methylierte CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus zu identifizieren, wurde ein zweiseitiger Kruskal-Wallis-Test zwischen den Methylierungswerten der Blut-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell (T)-, Plasmazell (KM)- und B-Gedächtniszell-Proben für die 349 Horvath-CpG-Loci durchgeführt. Die *False Discovery Rate* (FDR) wurde mit $q \leq 0,01$ festgelegt. Der Kruskal-Wallis-Test ergab, dass 271 der 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus signifikant unterschiedlich zwischen mindestens zwei der untersuchten Probengruppen methyliert waren.

3.5.3 Vergleich der Methylierung der DNAm Alter-CpG-Loci zwischen den Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben

Nachfolgend wurde das Methylierungsmuster der 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus zwischen den Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben verglichen. In die Analyse flossen die 95 Blut- (PB), 6 hämatopoetischen Progenitorzell- (HPC), 6 Pro-B-Zell- (preBI), 6 Prä-B-Zell- (preBII), 4 unreifen B-Zell- (iBC), 10 naiven B-Zell- (naiBC), 14 Keimzentrums-B-Zell- (gcBC), 8 Plasmazell (T)- (PC(T)), 3 Plasmazell (KM)- (PC(BM)), 5 B-Gedächtniszell- (memBC), 75 BL-, 119 DLBCL- und 94 FL-Proben ein. Insgesamt wurden somit alle 445 Proben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, gemeinsam analysiert.

3.5.3.1 Die Lymphomproben ähneln den späten B-Zell-Reifestadien-Proben in ihrer Methylierung der Horvath-CpG-Loci

Zunächst wurde eine PCA der Methylierungswerte der Blut-, B-Zell-Reifestadien- und KZB-Lymphomproben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus durchgeführt, welche in der Abbildung 20 mit den Proben angefärbt nach Zellart dargestellt ist. In dieser PCA ordnen sich jeweils die Blutproben, die frühen B-Zell-Reifestadien-Proben (HPC, preBI, preBII, iBC), die naiven B-Zell-Proben und die Lymphomproben zusammen mit den späten B-Zell-Reifestadien-Proben (gcBC, PC (T), PC (BM), memBC) in separaten Clustern an. Die Cluster der Blutproben, der frühen B-Zell-Reifestadien sowie der naiven B-Zellen sind nah beieinander lokalisiert und grenzen sich deutlich vom Cluster der Lymphom- und späten B-Zell-Reifestadien-Proben ab. Hierbei scheint v.a. die Komponente 1 zwischen den Blut-/frühen B-Zell-Reifestadien-Proben einerseits und den späten B-Zell-Reifestadien-/Lymphomproben andererseits zu differenzieren und die B-Zell-Proben nach ihren Differenzierungsstadien aufzutrennen.

In der PCA ist zu erkennen, dass das Cluster der Blutproben in zwei Untergruppen zerfällt. Die naiven B-Zellen bilden ein ähnliches längliches Cluster wie die Blutproben. Die sehr frühen Differenzierungsstadien der B-Zell-Reifung HPC, preBI, preBII und iBC clustern sehr nah beisammen, wobei innerhalb dieses Clusters die B-Zellen nach Reifestadien zusammen clustern und aufeinanderfolgende Differenzierungsstadien nebeneinander angeordnet sind.

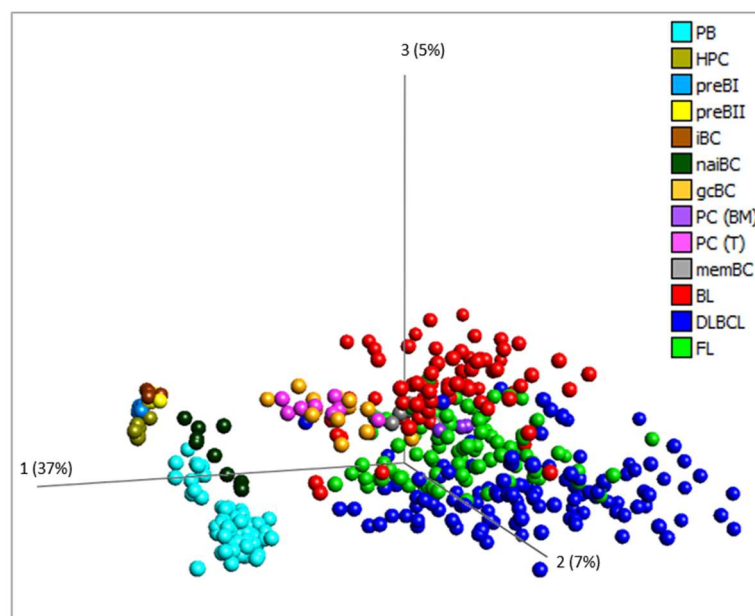


Abbildung 20: PCA der Methylierungswerte der Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus. Proben nach Zelltyp angefärbt. PB, peripheres Blut; HPC, hämatopoetische Progenitorzellen; preBI, Pro-B-Zellen; preBII, Prä-B-Zellen; iBC, unreife B-Zellen; naiBC, naive B-Zellen; gcBC, Keimzentrums-B-Zellen; PC (BM), Plasmazellen (Knochenmark); PC (T), Plasmazellen (Tonsillen); memBC, B-Gedächtniszellen; BL, Burkitt Lymphom; DLBCL, Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; FL, Follikuläres Lymphom. Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode.

Ähnlich wie im Abschnitt 3.5.2.1 beschrieben, clustern die späten B-Zell-Reifestadien gcBC, PC (T), PC (BM) und memBC separat von den frühen B-Zell-Differenzierungsstadien und den Blutproben. Die Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben (T) ordnen sich nah beieinander an, während versetzt daneben die B-Gedächtniszell- und Plasmazell-Proben (KM) folgen. Dieses Cluster der späten B-Zell-Reifestadien überschneidet sich mit dem Cluster der Lymphomproben. Während die Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben (T) am Rand des Lymphomclusters nahe den BL- und FL-Proben lokalisiert sind, liegen die B-Gedächtniszell- und Plasmazell-Proben (KM) mittig im Lymphomcluster.

Die KZB-Lymphomproben clustern in der PCA zusammen, wobei sich die Proben innerhalb des Lymphomclusters anhand der Hauptkomponente 3 nach Entitäten auftrennen. Das Subcluster der FL-Proben ordnet sich hierbei zwischen den Subclustern der BL- und DLBCL-Proben an. Außerdem weisen die Lymphomproben aller drei Entitäten in der PCA eine stärkere Streuung als die Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben auf. Die DLBCL-Proben streuen dabei am stärksten entlang der Hauptkomponente 1.

Zusätzlich ist im Anhang 21 eine Heatmap der Methylierungswerte der Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus abgebildet. In dieser Heatmap wird deutlich, dass die Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben ein homogeneres Methylierungsmuster innerhalb ihrer Kohorten aufweisen als die Lymphomproben.

3.5.3.2 Die Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben ordnen sich in der PCA innerhalb ihrer Zelltyp-Cluster nach chronologischem Alter an

In der Abbildung 21 ist die PCA der Methylierungswerte der Blut-, B-Zell-Reifestadien-, BL-, DLBCL- und FL-Proben für die 349 Horvath-CpG-Loci einmal mit den Proben angefärbt nach Zellart und daneben mit den Proben angefärbt nach chronologischem Alter zum Vergleich dargestellt.

Wie schon in den vorherigen PCAs ist in der nach chronologischem Alter angefärbten PCA der Abbildung 21 B zu erkennen, dass die beiden Untergruppen der Blutproben, welche sich auch schon in Abbildung 21 A abzeichnen, auf Unterschieden im chronologischen Alter basieren. So clustern die Blutproben im Alter von 0 bis 10 Jahren separat von den Blutproben älter als 10 Jahre. Ebenso verhält es sich mit den naiven B-Zell-Proben, bei denen sich die Proben innerhalb des Clusters nach chronologischem Alter anordnen und die Proben unter 11 Jahren abgesetzt von den älteren Proben clustern.

Die frühen B-Zell-Reifestadien-Proben der HPC, preBI, preBII und iBC wurden alle bei Feten in der 22. SSW entnommen und weisen daher ein negatives Alter auf (Details s. Abschnitt 2.1.1.2.3). In der

PCA sind sie in der Verlängerung der Achse der Anordnung der Blutproben nach chronologischem Alter lokalisiert.

Auch die späten B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben ordnen sich innerhalb ihres Clusters tendenziell nach chronologischem Alter an. Hierbei weisen die Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell (T)- und BL-Proben größtenteils ein jüngeres chronologisches Alter auf und clustern zusammen. Während sich die Blut- und naiven B-Zell-Proben im Alter von 0 bis 10 Jahren jedoch nah beieinander anordnen, clustern die BL-, gcBC- und PC (T)-Proben separat von den gleichaltrigen Blut- und naiven-B-Zell-Proben. Die Plasmazell- (KM) und B-Gedächtniszell-Proben weisen tendenziell eher mittlere Alterswerte auf und clustern in der Nähe der jüngeren BL-, gcBC- und PC (T)-Proben. Die ältesten DLBCL-Proben ordnen sich am äußeren Rand des Lymphomclusters an. Da die drei KZB-Lymphomkohorten unterschiedliche Altersstrukturen aufweisen, gilt es zu beachten, dass sich die Cluster der Lymphomproben nach Entität und nach chronologischem Alter teilweise in der PCA decken.

Als Ergänzung ist im Anhang 22 eine PCA der Methylierungswerte der Blut- und Lymphomproben ohne die B-Zell-Proben für die 349 Horvath-CpG-Loci einmal mit den Proben angefärbt nach Zellart und darunter mit den Proben angefärbt nach chronologischem Alter zum Vergleich abgebildet.

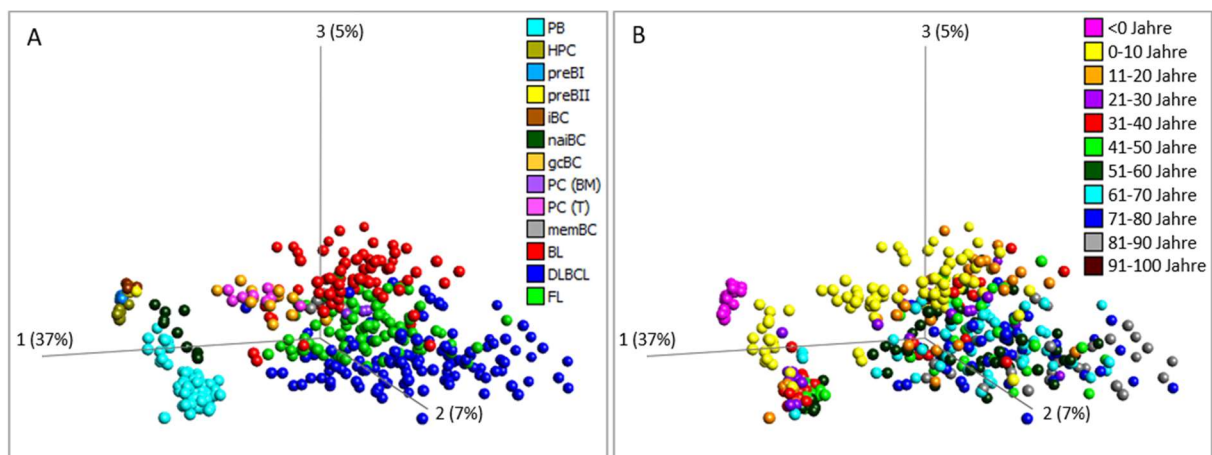


Abbildung 21: PCA der Methylierungswerte der Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus. A Proben nach Zelltyp angefärbt, B Proben nach chronologischem Alter angefärbt. PB, peripheres Blut; HPC, hämatopoetische Progenitorzellen; preBI, Pro-B-Zellen; preBII, Prä-B-Zellen; iBC, unreife B-Zellen; naiBC, naive B-Zellen; gcBC, Keimzentrums-B-Zellen; PC (BM), Plasmazellen (Knochenmark); PC (T), Plasmazellen (Tonsillen); memBC, B-Gedächtniszellen; BL, Burkitt Lymphom; DLBCL, Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; FL, Follikuläres Lymphom. Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode.

3.5.3.3 Differentielle Methylierungsanalyse zwischen den Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben

Anschließend wurde ein Kruskal-Wallis-Test zwischen den Methylierungswerten der 349 Horvath-CpG-Loci der Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben durchgeführt, um zwischen den

Probengruppen differentiell methylierte CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus zu identifizieren. Die *False Discovery Rate* wurde mit $q \leq 0,01$ festgelegt. Der Kruskal-Wallis-Test ergab, dass 338 der 349 DNAm Alter-CpG-Loci zwischen mindestens zwei der untersuchten Probengruppen signifikant unterschiedlich methyliert waren.

Der nachfolgend durchgeführte Kruskal-Wallis-Test zwischen den BL-, DLBCL- und FL-Proben zeigte, dass 229 der 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus zwischen mindestens zwei Lymphomentitäten einen signifikanten Methylierungsunterschied aufwiesen.

Zudem wurde ein Kruskal-Wallis-Test zwischen den Methylierungswerten der Blut-, BL-, DLBCL- und FL-Proben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus durchgeführt. Dieser ergab, dass 313 der 349 Horvath-CpG-Loci signifikant unterschiedlich zwischen mindestens zwei der untersuchten Probengruppen methyliert waren.

Im Kruskal-Wallis-Test zwischen den Methylierungswerten der Keimzentrums-B-Zell-, BL-, DLBCL- und FL-Proben zeigten 276 der 349 DNAm Alter-CpG-Loci einen signifikanten Methylierungsunterschied zwischen mindestens zwei der untersuchten Probenkohorten.

Der Kruskal-Wallis-Test auf differentiell methylierte CpG-Loci zwischen den späten B-Zell-Reifestadien-Proben naiBC, gcBC, PC(T), PC(BM) und memBC sowie den BL-, DLBCL- und FL-Proben zeigte, dass sich 314 der 349 DNAm Alter-CpG-Loci signifikant in ihrer Methylierung zwischen mindestens zwei der untersuchten Probengruppen unterschieden.

3.6 Genontologie-Analyse der mit dem DNAm Alter-Algorithmus assoziierten Gene

Anschließend wurde eine Genontologie (GO)-Analyse mit der Software *GORilla* durchgeführt. Hierbei sollten die Gene, welche mit den 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus assoziiert waren, auf Anreicherungen von GO-Annotationen untersucht werden. Die Zuordnung der Gene zu den CpG-Loci erfolgte anhand des hg19-Referenzgenoms (GRCh37), wobei einige CpG-Loci mit mehreren Genen assoziiert waren. Gene, welche mit mehreren CpG-Loci assoziiert waren, flossen nur einmal pro Liste in die Analyse ein. Die Zielliste der Gene, welche mit den 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus nach der Qualitätskontrolle assoziiert waren, enthielt 380 verschiedene Gene. Als repräsentative Referenzliste dienten die Gene, welche durch die CpG-Loci auf dem HM450k-Array nach der Qualitätskontrolle abgebildet wurden. Diese Referenzliste enthielt 20.232 verschiedene Gene.

Nachfolgend entnahm die *GORilla*-Software die GO-Annotationen für die entsprechenden Gene aus der *Gene Ontology*-Datenbank und führte dann eine Genontologie-Analyse durch. Diese GO-Analyse ergab in keiner der GO-Kategorien „Zelluläre Komponente“, „Molekulare Funktion“ und „Biologischer

Prozess“ eine signifikante Anreicherung von GO-Annotationen in den mit dem DNAm Alter-Algorithmus assoziierten Genen im Vergleich zur Referenzliste (FDR $q \leq 0.05$).

3.7 Analyse der altersassoziierten CpG-Loci nach Hannum

Um zu untersuchen, ob sich die in den CpG-Loci der epigenetischen Uhr nach Horvath [49] gefundenen epigenetischen Altersabweichungen auch in weiteren altersassoziierten, vom DNAm Alter nach Horvath unabhängigen CpG-Loci beobachten lassen, wurden die Methylierungswerte der von Hannum et al. [50] beschriebenen 71 altersassoziierten CpG-Loci in den Proben analysiert. Beim Filtern des Methylierungswerte-Datensatzes auf diese Hannum-CpG-Loci fiel auf, dass nur 70 der 71 CpG-Loci die Qualitätskriterien in dieser Arbeit erfüllten und ein Hannum-CpG-Locus dementsprechend nicht in die Analysen einfluss. 6 der 70 untersuchten Hannum-CpG-Loci waren zudem auch im DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath enthalten.

Anschließend wurden sowohl PCAs als auch Heatmaps mit hierarchischen Clusteranalysen zur Untersuchung der Methylierungswerte der 70 Hannum-CpG-Loci erstellt. Da kein Methylierungsalter basierend auf den Hannum-CpG-Loci berechnet werden konnte, dienten die gesunden Blutproben als Alters-Referenzgruppe für die anderen Probengruppen. Dementsprechend flossen auch nur die Blutproben in die Berechnung der PCAs ein, während die anderen Proben lediglich graphisch im Koordinatensystem dargestellt wurden. Die Heatmap in Abbildung 22 zeigt den Verlauf der Methylierungswerte der Blutproben mit zunehmendem chronologischen Alter für die 70 Hannum-CpG-Loci.

Bei der Analyse der Hannum-CpG-Loci wurden die B-Zell-Proben, welche zwar das gleiche Reifestadium aufwiesen, jedoch aus unterschiedlichen Geweben isoliert wurden, als getrennte Kohorten untersucht, weil die zuvor ermittelten Übereinstimmungen des auf dem DNAm Alter nach Horvath basierenden Δ -Alters nicht auf die Hannum-CpG-Loci übertragen werden konnten. Im Anhang 23 ist eine PCA der Blutproben abgebildet, in welcher die B-Zell-Proben zusätzlich graphisch dargestellt werden. In dieser PCA ist zu erkennen, dass sich die Blutproben entlang der Hauptkomponente 1 nach chronologischem Alter anordnen. Die Blutproben im Alter von 0-10 Jahren streuen dabei stärker als die Blutproben in älteren Altersgruppen. Die B-Zell-Reifestadien-Proben ordnen sich in der PCA zusammen mit den Blutproben an. Hierbei clustern die frühen B-Zell-Reifestadien-Proben (HPC, PreBI, PreBII, iBC) nah beieinander und ordnen sich entsprechend ihrem sehr jungen Alter neben den Blutproben jünger als 11 Jahre an. Während die naiven B-Zell-Proben (PB, T) zusammen mit gleichaltrigen Blutproben clustern, scheinen die Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben (T) in Bezug auf ihr chronologisches Alter teilweise entlang der Komponente 1 in Richtung älterer Blutproben versetzt zu

sein. Die Plasmazell- (KM) und B-Gedächtniszell-Proben ordnen sich zusammen am Ende des länglichen Clusters neben den Blutproben mit höherem chronologischen Alter an. Somit clustern die älteren PC (BM) und memBC neben gleichaltrigen Blutproben, während die jüngeren PC (BM) und memBC in Bezug auf ihr Alter entlang der Komponente 1 in Richtung älterer Blutproben versetzt zu sein scheinen.

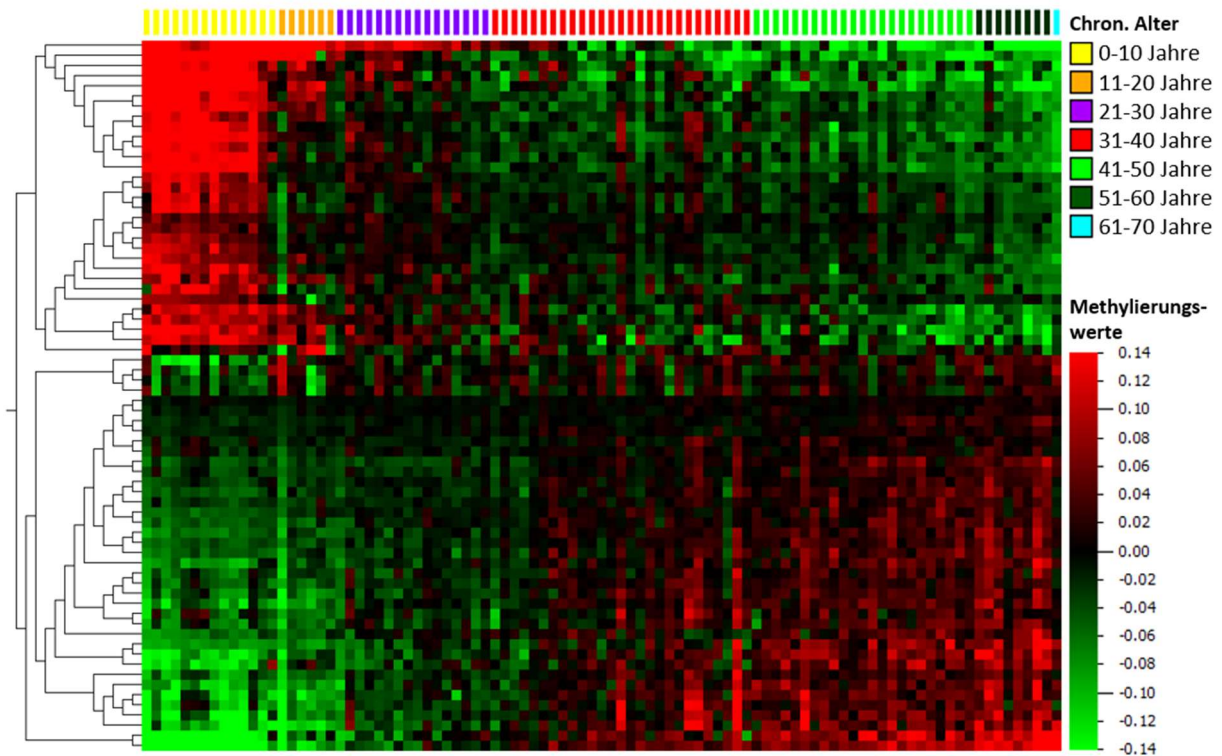


Abbildung 22: Heatmap der Methylierungswerte der 70 Hannum-CpG-Loci in den Blutproben. Proben nach chronologischem Alter aufsteigend angeordnet und farbcodiert, CpG-Loci hierarchisch geclustert nach w.avg.-Methode, Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode. Die Proben sind in Spalten und die CpG-Loci in Zeilen angeordnet. Hohe Methylierungswerte sind in rot, niedrige Methylierungswerte in grün dargestellt.

Zudem ist im Anhang 24 eine PCA der Blutproben mit zusätzlicher graphischer Darstellung aller B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben abgebildet. Während sich die meisten B-Zell-Reifestadien-Proben nah bei den Blutproben anordnen, clustern die Lymphomproben größtenteils separat von den Blutproben. Die Plasmazell- (KM) und B-Gedächtniszell-Proben sind hierbei in der Mitte des Lymphomclusters lokalisiert. Innerhalb des Lymphomclusters ordnen sich die Proben einerseits nach Entitäten und andererseits tendenziell nach chronologischem Alter an. Allerdings scheint das Lymphomcluster bezüglich des chronologischen Alters der Proben im Vergleich zu gleichaltrigen Blutproben entlang der Hauptkomponente 1 in Richtung eines höheren Alters versetzt zu sein. Aufgrund des fehlenden Hannum-Methylierungsalters der Proben ist der Unterschied jedoch nicht quantifizierbar.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des epigenetischen DNAm Alters nach Horvath [49] in den Keimzentrums-B-Zell-Lymphomentitäten BL, DLBCL und FL im Vergleich zu gesunden Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben. Hierfür wurde das anhand der Beta-Werte der 349 Horvath-CpG-Loci berechnete DNAm Alter mit dem jeweiligen chronologischen Alter der Proben verglichen und die Differenz zwischen dem DNAm und chronologischen Alter als Δ -Alter definiert. Anhand des Δ -Alters konnte somit beurteilt werden, ob die Proben in ihrem epigenetischen DNAm Alter signifikant von ihrem chronologischen Alter abwichen. Zudem war anhand des Δ -Alters ein Vergleich der epigenetischen Altersabweichung zwischen den verschiedenen Probenkohorten möglich. In der anschließenden Analyse der Methylierungswerte der 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus wurden zudem differentiell methylierte CpG-Loci der B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben identifiziert. Die epigenetischen Altersabweichung in der epigenetischen Uhr nach Horvath [49] konnten nachfolgend anhand der 71 altersassoziierten CpG-Loci nach Hannum [50] bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Auswertungen werden in diesem Kapitel diskutiert und mit den Erkenntnissen aus anderen Studien verglichen.

4.1 Ergebnisse der Analyse der Blutproben

Zunächst wurde in dieser Arbeit überprüft, ob sich die von Horvath [49] beschriebenen Ergebnisse zur Präzision der epigenetischen Uhr in der Blutprobenkohorte reproduzieren ließen. Tatsächlich korrelierte das DNAm Alter nach Horvath der gesunden Blutproben stark mit dem chronologischen Alter. Der in dieser Arbeit beobachtete Spearman-Rangkorrelationskoeffizient von $\rho=0,95$ zeigte eine ähnliche Tendenz wie der von Horvath in seiner Originalarbeit [49] beschriebene Pearson-Korrelationskoeffizient von $r_s=0,96$, auch wenn es sich hierbei um unterschiedliche statistische Methoden handelte. Da jedoch weder das chronologische noch das DNAm Alter der Blutproben in dieser Arbeit normalverteilt waren, konnte kein Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet werden. Trotz der starken Korrelation wich das DNAm Alter aber signifikant vom chronologischen Alter der Blutproben ab. Der Median der Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter lag in dieser Arbeit bei 2,9 Jahren und entsprach somit dem von Horvath beobachteten Median der Abweichung in seinem Trainingsdatensatz, während die Abweichung in seinem Testdatensatz sogar im Median bei 3,6 Jahren lag [49]. Das DNAm Alter nach Horvath schätzte somit das chronologische Alter der Blutproben in dieser Arbeit recht genau, auch wenn es das chronologische Alter im Median um 2,9 Jahre überschätzte. Die von Horvath beschriebene Präzision seines DNAm Alter-Algorithmus konnte somit in dieser Arbeit bestätigt werden.

Jedoch wurde in dieser Arbeit eine leichte Zunahme des Δ -Alters mit steigendem chronologischen Alter der Blutproben festgestellt, sodass das DNAm Alter im hohen Alter stärker vom chronologischen Alter abwich als bei jungen Proben. So betrug der Spearman-Rangkorrelationskoeffizient zwischen dem chronologischen und Δ -Alter $\rho=0,226$ und zeigte einen schwachen positiven monotonen Zusammenhang an. Die berechnete Lineare Regressionsgerade zur Modulation des Verlaufs des Δ -Alters über dem chronologischen Alter nahm ebenfalls eine positive Steigung von $b=0,052$ an. Jedoch beschrieb sie die Daten nur unzureichend, da das Bestimmtheitsmaß mit $R^2=0,041$ sehr gering war. Die Beobachtungen in dieser Arbeit lassen somit vermuten, dass der DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath eine systematische Abweichung im höheren Altersbereich enthält und daher das chronologische Alter der Donoren im höheren Altersbereich tendenziell überschätzt. Zur Überprüfung einer möglichen systematischen Abweichung sollte der DNAm Alter-Algorithmus in einer weiteren, großen Blutprobenkohorte evaluiert werden, welche einen ausgedehnten Altersbereich insbesondere mit vielen Proben im hohen Altersbereich abdeckt. Falls sich eine systematische Abweichung im hohen Altersbereich bestätigen sollte, könnte eine Korrekturformel für den DNAm Alter-Algorithmus entwickelt werden.

In der Analyse der Methylierungswerte der Blutproben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus fiel sowohl in der PCA als auch in der Heatmap auf, dass sich die Blutproben im Alter von 0-10 Jahren in ihrem Methylierungsprofil stark von den älteren Blutproben unterschieden. Dieser Übergang zwischen den Blutproben jünger und älter als 10 Jahre stellte die ausgeprägteste Methylierungsveränderung der Horvath-CpG-Loci über dem gesamten chronologischen Altersverlauf der Blutproben dar. Auch Horvath stellte stärkere Veränderungen des Methylierungsmusters der DNAm Alter-CpG-Loci bei jüngeren Proben fest [49]. Er interpretierte diese als ein schnelleres Schlagen der epigenetischen Uhr bis zum Erreichen des Erwachsenenalters und führte sie auf das Wachstum des Organismus und die damit verbundene vermehrte Zellteilung zurück [49]. Auch bei der Untersuchung der 71 CpG-Loci des Hannum-Altersalgorithmus in den Blutproben in dieser Arbeit zeigten sich die stärksten Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters zwischen Proben jünger und älter als 10 Jahre, sodass die Vermutung nahe liegt, dass es sich um einen generelleren Wandel des DNA-Methylierungsprofils in diesem Altersbereich handelt, welcher nicht auf die Horvath-CpG-Loci begrenzt ist.

Während die jungen Blutproben im Alter von 0-10 Jahren zudem eine größere Heterogenität ihres Methylierungsmusters der Horvath-CpG-Loci aufwiesen, ähnelten sich die Blutproben älter als 10 Jahre stärker in ihrem Methylierungsprofil. Da diese Blutproben älter als 10 Jahre sowohl in der PCA als auch in der hierarchischen Clusteranalyse in der Heatmap nur noch andeutungsweise nach ihrem chronologischen Alter clusterten, scheint die Methylierung der 349 DNAm Alter-CpG-Loci ab dem Alter

von 10 Jahren nur noch teilweise altersabhängig zu sein. Auf der anderen Seite muss jedoch berücksichtigt werden, dass die absoluten Änderungen der Beta-Werte der überwiegenden Mehrheit der 349 Horvath-CpG-Loci über dem chronologischen Alter der Blutproben insgesamt nur sehr gering waren. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Horvath, welcher ebenfalls nur geringe, absolute Beta-Werte-Veränderungen mit zunehmendem Alter feststellte [49]. Die Präzision des DNAm Alters beruht daher weniger auf ausgeprägten altersabhängigen Beta-Wert-Veränderungen, sondern auf der fein abgestimmten Gewichtung der Beta-Werte durch Regressionskoeffizienten im DNAm Alter-Algorithmus. Diese Gewichtung der CpG-Loci im DNAm Alter-Algorithmus wird in der PCA und der Clusteranalyse in der Heatmap nicht berücksichtigt, da hier alle CpG-Loci gleichermaßen in die Analyse einfließen. Zudem muss bei der Auswertung des chronologischen Alters in der PCA sowie der hierarchischen Clusteranalyse beachtet werden, dass die Proben in dieser Arbeit zur Verbesserung der Übersichtlichkeit in relativ willkürliche Alterskategorien von 10 Jahren eingeteilt wurden, obwohl der Prozess des Alterns ein Kontinuum darstellt. So wurden Proben mit einem Alter am Ende einer Dekade und solche mit einem Alter am Anfang der darauffolgenden Dekade zwar in zwei verschiedene Alterskategorien eingeteilt, die Werte ihres chronologischen Alters lagen jedoch nicht weiter auseinander als bei den Proben innerhalb einer Alterskategorie. Dies sollte bei der Interpretation bedacht werden, wenn zwei aufeinanderfolgende Alterskategorien zusammen clustern.

Die DNA für die Methylierungsanalyse wurde aus den Leukozyten der peripheren Blutproben isoliert. Diese stellen jedoch keine homogene Zellpopulation dar, sondern setzen sich aus den verschiedenen Zellklassen der Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten zusammen [122], welche sich in ihrem spezifischen DNA-Methylierungsprofil unterscheiden [123]. Der Anteil dieser Zellklassen an den Leukozyten variiert im Laufe des Lebens. Während sich die absolute Granulozytenanzahl während des Alterns nicht verändert, verringert sich die absolute Lymphozytenanzahl mit steigendem Lebensalter [124]. Die Reduktion der Lymphozytenanzahl findet hierbei in zwei Phasen statt. In den ersten 20 Lebensjahren verringert sich die absolute Lymphozytenanzahl um 60-70%, wobei der stärkste Abfall zwischen der ersten und zweiten Lebensdekade zu beobachten ist [124]. Nach dem 20. Lebensjahr bleibt die absolute Lymphozytenanzahl für etwa 30 Jahre konstant, bis sie ab dem 50. Lebensjahr wieder langsam bis ins hohe Alter abfällt [124]. Außerdem nimmt mit steigendem Alter der Anteil der B-Zellen an den Lymphozyten zu, während der Anteil der T-Zellen abfällt [125].

In früheren Studien konnte daher gezeigt werden, dass die zelluläre Zusammensetzung der Leukozyten in einer Blutprobe sich auf die gemessenen Methylierungswerte einiger CpG-Loci auswirkte, während die Methylierung anderer CpG-Loci scheinbar nicht von der zellulären Heterogenität des Blutes beeinflusst wurde [126–129]. Es ist somit möglich, dass sich die altersabhängige Veränderung der Leukozyten-Zusammensetzung als Confounder auf die gemessene Methylierung der 349 Horvath-CpG-

Loci in dieser Arbeit auswirkte. Bei einem solchen Confounding würden die beobachteten Methylierungsunterschiede folglich nicht auf einer altersabhängigen Veränderung der DNA-Methylierung in einzelnen Zellen, sondern auf einer variierten zellulären Zusammensetzung der Leukozyten beruhen. Die ausgeprägten Veränderungen der Methylierungswerte zwischen den Blutproben jünger und älter als 10 Jahre könnten dementsprechend mit dem zuvor beschriebenen starken Abfall der Lymphozytenanzahl im Blut in diesem Lebensalter erklärt werden [124]. Auf der anderen Seite wurde jedoch auch gezeigt, dass sich eine heterogene zelluläre Zusammensetzung der Leukozyten nicht bei jedem CpG-Locus auf die gemessenen Methylierungswerte auswirkt [127–129]. Zudem wurden die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath anhand von DNA-Proben aus 51 verschiedenen Gewebe- und Zellarten selektiert und basieren somit nicht ausschließlich auf peripheren Blutproben [49]. Horvath konnte zudem keinen signifikanten Unterschied im DNAm Alter zwischen DNA-Proben aus Vollblut, Granulozyten insgesamt und den isolierten Zellpopulationen von Neutrophilen, Eosinophilen, CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, CD19⁺ B-Zellen, CD56⁺ natürlichen Killerzellen sowie CD14⁺ Monozyten von gesunden Individuen feststellen [49]. Die Zellzusammensetzung der Blutproben scheint somit, wenn überhaupt, nur einen schwachen Einfluss auf das DNAm Alter nach Horvath auszuüben.

Da für die Blutproben in dieser Arbeit keine Angaben zur zellulären Zusammensetzung vorlagen, konnten die Methylierungswerte hierfür nicht berichtigt werden. Ein mögliches Confounding der Methylierungswerte durch eine interindividuell heterogene Zellzusammensetzung des peripheren Blutes kann somit nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei zukünftigen Studien der DNA-Methylierung in Blutproben empfiehlt es sich daher, die Methylierungswerte vor der weiteren Analyse für die Zusammensetzung der Leukozyten zu berichtigen [126].

4.2 Ergebnisse der Analyse der B-Zell-Reifestadien

Da sich die Keimzentrums-B-Zell-Lymphome von reifenden B-Zellen ableiten, wurde zunächst das DNAm Alter sowie die Methylierung der 349 Horvath-CpG-Loci bei B-Zellen verschiedener Differenzierungsstadien untersucht.

Während sich das DNAm Alter der frühen B-Zell-Reifestadien der Hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC), Pro-B-Zellen (preBI), Prä-B-Zellen (preBII), unreifen B-Zellen (iBC) und naiven B-Zellen (naiBC) nicht signifikant vom chronologischen Alter der Proben unterschied, lag das DNAm Alter der Keimzentrums-B-Zellen (gcBC) und Plasmazellen (PC) signifikant höher als das chronologische Alter. Die B-Gedächtniszell-Proben (memBC) wiesen wiederum keinen signifikanten Unterschied zwischen dem DNAm und dem chronologischen Alter auf, wobei es sich hier aber auch nur um eine sehr kleine

Probenkohorte handelte. Somit scheint sich die epigenetische Altersabweichung im Laufe der B-Zell-Reifung zu verändern. Diese Ergebnisse konnten durch die Auswertungen der 71 CpG-Loci des Altersalgorithmus nach Hannum [50] in den B-Zell-Reifestadien-Proben bestätigt werden, sodass die epigenetische Voralterung der gcBC und PC kein auf die Horvath-CpG-Loci begrenztes Phänomen darstellte. Bei der Interpretation der Ergebnisse der Hannum-CpG-Loci sollte jedoch bedacht werden, dass dieser Altersalgorithmus nur anhand von Blutproben entwickelt wurde [50] und somit Gewebespezifischer ist als der DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath.

In dieser Arbeit wurde somit gezeigt, dass der DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath auch in den isolierten, reinen B-Zell-Subpopulationen der HPC, preBI, preBII, iBC, naiBC und memBC das chronologische Alter der Proben präzise schätzt. Dies ist bemerkenswert, da der DNAm Alter-Algorithmus nicht anhand von reinen Zellpopulationen, sondern an Gewebeproben entwickelt wurde [49]. Auch Horvath konnte, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, keinen signifikanten Unterschied im DNAm Alter zwischen isolierten Leukozytenpopulationen gesunder Individuen feststellen [49]. Diese Beobachtungen stützen die These, dass das DNAm Alter intrinsische epigenetische Prozesse in den Zellen abbildet und nicht auf altersassoziierten Veränderungen der Zellzusammensetzungen in den Geweben und dem Blut beruht.

Da der Zeitpunkt einer reifen Geburt (40. SSW) in dieser Arbeit als Nullpunkt der chronologischen Altersberechnung definiert wurde, wiesen die in der 22. SSW entnommenen HPC-, preBI-, preBII- und iBC-Proben ein negatives chronologisches Alter auf. Bemerkenswerterweise nahm auch das DNAm Alter für all diese B-Zell-Proben negative Werte an und unterschied sich nicht signifikant vom chronologischen Alter der Proben. Demzufolge kann der DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath auch das fetale Alter von Proben recht genau schätzen.

Bei den Auswertungen der B-Zell-Proben muss jedoch berücksichtigt werden, dass nur kleine Stichproben untersucht wurden. Insbesondere die Kohorten der HPC, preBI, preBII, iBC, PC (BM) und memBC umfassten jeweils nur wenige Proben, sodass die Ergebnisse für diese Differenzierungsstufen vorsichtig interpretiert werden sollten.

Sowohl die Keimzentrums-B-Zellen als auch die Plasmazellen wiesen eine epigenetische Voralterung auf. So lag das DNAm Alter der Keimzentrums-B-Zellen im Median 9,3 Jahre über dem chronologischen Alter, während das DNAm Alter in den Plasmazellen das chronologische Alter der Proben im Median um 6,4 Jahre überschätzte. Zudem konnte kein signifikanter Unterschied in der epigenetischen Voralterung zwischen diesen beiden B-Zell-Reifestadien festgestellt werden. Aufgrund dieser großen Übereinstimmung in der epigenetischen Voralterung verhielten sich die Keimzentrums-B-Zellen und Plasmazellen auch gleich gegenüber den anderen B-Zell-Differenzierungsstadien. So unterschieden

sich die Keimzentrums-B-Zellen und die Plasmazellen jeweils signifikant in ihrer epigenetischen Voralterung von den frühen B-Zell-Reifestadien HPC, preBI, preBII, iBC und naiBC. Zwischen den B-Gedächtniszellen und den Keimzentrums-B-Zellen bzw. Plasmazellen bestand jeweils kein signifikanter Unterschied in der epigenetischen Altersabweichung. Möglicherweise ist die in den Keimzentrums-B- und Plasmazellen beobachtete epigenetische Voralterung daher durch Veränderungen des Methylierungsmusters der DNAm Alter-CpG-Loci während der Antigen-Aktivierung und der anschließenden Keimzentrumsreaktion mit starker Proliferation und somatischer Hypermethylierung bedingt. Eine solche epigenetische Voralterung in gesunden Zellen ist besonders. Während Horvath für sehr viele verschiedene Gewebearten eine sehr hohe Korrelation zwischen DNAm und chronologischem Alter feststellte, beschrieb er nur für gesundes Brustgewebe und Endometrium eine epigenetische Voralterung, welche er auf hormonelle Einflüsse und die wiederkehrende Proliferation während des Menstruationszyklus zurückführte [49].

Während die sehr frühen B-Zell-Reifestadien HPC, preBI, preBII und iBC ein sehr homogenes Methylierungsmuster der 349 Horvath-CpG-Loci aufwiesen, ähnelten sich auch die späten B-Zell-Differenzierungsstadien der gcBC, PC und memBC in ihrem Methylierungsprofil. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in der PCA wieder, wo man ein Cluster der sehr frühen B-Zellen aus dem Knochenmark, ein Cluster der Antigen-unerfahrenen naiven B-Zellen sowie ein Cluster der Antigen-erfahrenen späten B-Zell-Reifestadien unterscheiden kann. Hierbei fällt auf, dass sich in der Differenzierung aufeinanderfolgende B-Zell-Reifestadien in der PCA auch nebeneinander anordnen. Dies weist auf die Akkumulation epigenetischer Veränderungen im Laufe der B-Zell-Differenzierung hin, welche auch schon in der Literatur beschrieben wurde [67]. Diese Beobachtungen der ausgeprägten Methylierungsveränderungen während der B-Zell-Reifung stimmen auch mit den Ergebnissen anderer Studien überein [67,130]. So wurde für jedes einzelne B-Zell-Reifestadium ein charakteristisches DNA-Methylierungsprofil identifiziert, welches sich mit Fortschreiten der Differenzierung zum nächsten Reifestadium verändert [67]. Damit stellen die B-Zellen wahrscheinlich die menschliche Zelllinie mit den stärksten epigenetischen Veränderungen während der Differenzierung dar [67]. So unterschieden sich auch in dieser Arbeit 277 der 349 Horvath-CpG-Loci signifikant in ihrem Methylierungsgrad zwischen den verschiedenen Differenzierungsstufen der B-Zell-Reifung.

Studien zeigten, dass während der B-Zell-Reifung die Methylierung von Differenzierungsstadium-spezifischen Enhancern und Promotoren sowie von Heterochromatin abnimmt, während es zur Hypermethylierung von Zielgenen der Polycomb-Gruppen-Proteine (PcG-Proteine) kommt [67]. Interessanterweise werden ähnliche epigenetische Veränderungen wie die globale Hypomethylierung von Heterochromatin sowie die Hypermethylierung von PcG-Protein-Zielgenen auch bei Krebs und

Alterung beobachtet [67]. Das modulierte Methylierungsmuster während der B-Zell-Reifung führt zur spezifischen Expression von Transkriptionsfaktoren, welche sich einerseits auf die Genexpression und andererseits wiederum auf die DNA-Methylierung auswirken und letztlich zur präzisen Regulation der Differenzierung führen [67,87,130].

Die starke Veränderung des DNA-Methylierungsmusters und der epigenetischen Voralterung zwischen den naiven und den Keimzentrums-B-Zellen resultiert wahrscheinlich aus der Antigen-Aktivierung und Keimzentrumsreaktion. So wurden auch in der Studie von Lai et al. die ausgeprägtesten Veränderungen des DNA-Methylierungsmuster während der Keimzentrumsreaktion beobachtet [130]. Diese werden wahrscheinlich einerseits passiv durch die starke Proliferation und andererseits aktiv durch die Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase verursacht, welche neben der somatischen Hypermutation zur aktiven Demethylierung der DNA führt [67]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen anderer Studien [130] wurde auch in dieser Arbeit beobachtet, dass sich die Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen und B-Gedächtniszellen epigenetisch ähneln. Trotz dieses ähnlichen Methyloms weisen die Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen und B-Gedächtniszellen jedoch ein unterschiedliches Genexpressionsprofil auf, sodass sich hier noch weitere molekulare Mechanismen auf die Transkription auszuwirken scheinen [67,130].

Die Keimzentrums-B-Zellen und die Plasmazellen aus den Tonsillen ähnelten sich besonders stark in ihrem Methylierungsmuster der 349 Horvath-CpG-Loci. Da die Plasmazellen aus den Tonsillen isoliert wurden, handelte es sich wahrscheinlich um noch recht junge Plasmazellen, welche gerade erst das Keimzentrum verlassen hatten und noch keine weiteren Veränderungen des Methylierungsmusters akquiriert hatten. Im Gegensatz dazu unterschieden sich die langlebigen Plasmazellen aus dem Knochenmark in ihrem Methylierungsmuster und in ihrer epigenetischen Voralterung von den jungen Plasmazellen aus den Tonsillen und wiesen stattdessen größere epigenetische Übereinstimmungen mit den B-Gedächtniszellen auf. Aufgrund der sehr geringen Probenanzahl der Plasmazellen aus dem Knochenmark sollten diese Beobachtungen jedoch nur als Tendenzen interpretiert werden. In anderen Studien wurden jedoch ebenfalls epigenetische Unterschiede zwischen den neu generierten Plasmazellen aus Tonsillen und den bereits langlebigen Plasmazellen aus dem Knochenmark beobachtet, sodass dies wahrscheinlich auf die unterschiedliche bisherige Lebenszeit der Plasmazellen zurückgeführt werden kann [67].

Während das Methylierungsprofil der 349 Horvath-CpG-Loci der B-Zell-Proben primär durch das Differenzierungsstadium beeinflusst wird, scheint das DNA-Methylierungsmuster zusätzlich auch Altersinformationen zu enthalten. So clustern die B-Zell-Proben in der PCA und der hierarchischen Clusteranalyse in der Heatmap primär nach ihrem Reifestadium und sekundär innerhalb ihrer Cluster

nach chronologischem Alter. Während sich die frühen B-Zell-Reifestadien HPC, preBI, preBII, iBC und naiBC präzise nach ihrem chronologischen Alter innerhalb ihrer Cluster anordnen, clustern die späten B-Zell-Reifestadien gcBC, PC (T), PC (BM) und memBC nur teilweise nach chronologischem Alter. So clustern die gcBC und PC (T) im Alter von 0 bis 10 Jahren nah beieinander, während sich die späten B-Zell-Reifestadien-Proben älter als 10 Jahre kaum nach chronologischem Alter anordnen. Somit scheint ein Teil der Altersinformation im Methylierungsmuster der 349 Horvath-CpG-Loci während der Keimzentrumsreaktion verloren zu gehen.

Da verschiedene B-Zell-Subpopulationen z.T. aus der gleichen Gewebeart isoliert wurden und somit unter dem Einfluss der gleichen Mikroumgebung (eng. *microenvironment*) standen [67,131], könnten sich möglicherweise gewebespezifische Methylierungsmuster mit B-Zell-Reifestadien- und Altersspezifischen Methylierungsmustern gegenseitig beeinflusst haben. So ist bei den sehr frühen B-Zell-Differenzierungsstadien der HPC, preBI, preBII, iBC nicht eindeutig beurteilbar, ob die ausgeprägte Übereinstimmung der Methylierung der 349 DNAm Alter-CpG-Loci auf den geringen epigenetischen Unterschieden zwischen diesen frühen B-Zell-Differenzierungsstadien, dem ähnlichen chronologischen und DNAm Alter oder dem Einfluss der gleichen Mikroumgebung im Knochenmark beruht. Da sich die Plasmazell-Proben, welche ebenfalls aus dem Knochenmark extrahiert wurden, jedoch stark von diesen frühen B-Zell-Reifestadien in der Methylierung der Horvath-CpG-Loci unterscheiden, scheint es sich nicht um ein gewebespezifisches epigenetisches Muster des Knochenmarks zu handeln.

Bei den Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Kohorten (T) muss ebenfalls beachtet werden, dass sie einerseits ein ähnliches chronologisches Alter aufweisen, beide in direkter Verbindung zur Keimzentrumsreaktion stehen und andererseits beide aus Tonsillengewebe isoliert wurden. Somit könnte das ähnliche Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci der beiden B-Zell-Reifestadien möglicherweise nicht nur auf dem ähnlichen chronologischen Alter und den aufeinanderfolgenden B-Zell-Differenzierungsstadien, sondern auch auf der gleichen Gewebeherkunft der Proben beruhen. Die naiven B-Zellen, welche ebenfalls aus Tonsillen extrahiert wurden, weisen jedoch größere Unterschiede ihres Methylierungsmusters im Vergleich zu den Keimzentrums-B-Zellen und Plasmazellen (T) auf, sodass ein ausschließlicher Gewebeeffekt unwahrscheinlich erscheint.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit geschlossen werden, dass das Methylierungsmuster der B-Zell-Reifestadien-Proben primär durch das Differenzierungsstadium der Proben bedingt zu sein scheint. Erst sekundär beeinflusst das chronologische Alter der Proben die Methylierung der Horvath-CpG-Loci. Nichtsdestotrotz weisen die Auswertungen darauf hin, dass auch im Methylierungsmuster der isolierten B-Zell-Subpopulationen Altersinformationen enthalten sind,

sodass der DNAm Alter-Algorithmus für die frühen B-Zell-Reifestadien das chronologische Alter der Proben präzise schätzen kann. Die späten B-Zell-Reifestadien der Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben zeigen hingegen eine epigenetische Voralterung, sodass die epigenetische Uhr möglicherweise durch die Antigen-Aktivierung und Keimzentrumsreaktion mit starker Proliferation und Somatischer Hypermutation beeinflusst wird. Diese Beobachtung ist besonders interessant, da sich die Keimzentrums-B-Zell-Lymphome von diesen B-Zell-Reifestadien ableiten [69].

4.3 Vergleich der B-Zell-Reifestadien mit den Blutproben

Alle B-Zell-Reifestadien-Subpopulationen wiesen ein von den Blutproben abweichendes DNA-Methylierungsmuster der 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus auf und unterschieden sich, mit Ausnahme der B-Gedächtniszell-Proben, jeweils signifikant in ihrem Δ -Alter von den Blutproben. Dies bestätigt noch einmal die Wichtigkeit, die B-Zell-Reifestadien als von den Blutproben getrennte Kontrollproben zu betrachten. Die Heterogenität der Blut- und B-Zell-Differenzierungsstadien-Proben spiegelt sich auch im Ergebnis des Kruskal-Wallis-Tests wider, der zeigte, dass 77% (271 CpG-Loci) der 349 Horvath-CpG-Loci zwischen den Blut-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben differentiell methyliert waren.

Die größten Ähnlichkeiten im Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci mit den Blutproben zeigten die naiven B-Zellen, welche sich auch in der PCA mit ihrem Cluster in der Nähe des Blutprobenclusters anordneten und diesem mit ihrem langgestreckten Verlauf mit Ausrichtung der Proben nach chronologischem Alter ähnelten. Wie bei den Blutproben veränderte sich auch bei den isolierten B-Zell-Subpopulationen die altersabhängige Methylierung der Horvath-CpG-Loci am stärksten zwischen den Proben jünger und älter als 10 Jahre, sodass diese markante Alterssignatur sowohl im Methylierungsmuster der Blut- als auch der B-Zell-Differenzierungsstufen enthalten war. Diese Beobachtung spricht dafür, dass es sich bei dieser ausgeprägten Veränderung der DNA-Methylierung am Übergang der ersten zur zweiten Lebensdekade um einen intrinsischen epigenetischen Prozess in den Zellen handelt, welcher nicht allein durch eine veränderte zelluläre Zusammensetzung des Bluts erklärbar ist.

Da sich in den B-Zell-Subpopulationen der HPC, preBI, preBII, iBC, naiBC und memBC das DNAm Alter im Gegensatz zu den Blutproben nicht signifikant vom chronologischen Alter der Proben unterschied, schätzte der DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath das chronologische Alter in diesen B-Zell-Differenzierungsstadien sogar präziser als in den Blutproben. Beim Vergleich der Blut- mit den B-Zell-Reifestadien-Proben sollte dennoch bedacht werden, dass die Blutproben aus einer Vielzahl verschiedener Zellen bestehen [122], während die B-Zell-Proben nach reinen Differenzierungsstadien

sortiert wurden. Wie zuvor beschrieben, ergibt der DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath aber sowohl für Gewebeproben als auch für isolierte Zellpopulationen genaue Schätzungen des chronologischen Alters der Proben [49]. Zudem sollte bedacht werden, dass die B-Zell-Reifestadien z.T. im peripheren Blut enthalten sind. Bei einem Lymphozytenanteil von 16-45% an den Leukozyten [122] sowie einem B-Zell-Anteil von etwa 9% an den Lymphozyten [132] beläuft sich der Anteil der B-Zellen an den Leukozyten im Blut auf etwa 1-4%. Diese teilen sich auf die verschiedenen B-Zell-Differenzierungsstufen auf, wobei die naiven B-Zellen mit 65% die größte Fraktion stellen [132]. Letztendlich ist somit der Anteil der einzelnen B-Zell-Reifestadien, wenn sie denn überhaupt ins periphere Blut ausgeschwemmt werden, an der Gesamtheit der Leukozyten nur sehr gering. Ein Vergleich der B-Zell-Reifestadien-Proben mit den Blutproben erscheint daher zulässig.

4.4 Ergebnisse der Analyse der Keimzentrums-B-Zell-Lymphome

In allen drei Keimzentrums-B-Zell-Lymphomentitäten BL, DLBCL und FL unterschied sich das DNAm Alter signifikant vom chronologischen Alter der Proben. Die größte Differenz zeigten die BL-Proben, bei denen das DNAm Alter im Median 45,6 Jahre über dem chronologischen Alter lag. Bei den DLBCL-Proben überschätzte das DNAm Alter das chronologische Alter im Median um 18,5 Jahre und bei den FL-Proben um 14,9 Jahre. Hiermit waren alle drei KZB-Lymphomentitäten im Vergleich zu ihrem chronologischen Alter epigenetisch vorgealtert, wobei dieser Effekt bei den BL-Proben am stärksten ausgeprägt war. So waren die BL-Proben jeweils signifikant stärker epigenetisch vorgealtert als die DLBCL- bzw. FL-Proben, während sich die DLBCL- und FL-Proben nicht signifikant im Ausmaß ihrer epigenetischen Voralterung unterschieden. Eine ähnliche epigenetische Voralterung konnte auch schon bei verschiedenen anderen Tumorarten beobachtet werden [49,50,64].

Bei der Analyse des DNA-Methylierungsmusters der 71 Alters-CpG-Loci nach Hannum [50] in den Lymphomproben zeigten diese ebenfalls tendenziell eine epigenetische Voralterung. Da jedoch kein Methylierungsalter nach Hannum für die Lymphomproben berechnet werden konnte, war die epigenetische Voralterung nicht quantifizierbar. So konnten nur die Blutproben als Altersreferenz für den Vergleich mit den Lymphomproben genutzt werden. Dieser Ansatz war jedoch nur eingeschränkt beurteilbar, da die Blutproben lediglich ein Alter von 0-63 Jahren aufwiesen und somit für die älteren Lymphomproben keine Referenzproben zum Vergleich vorhanden waren.

In Anbetracht der epigenetischen Voralterung ist es nicht verwunderlich, dass in allen drei KZB-Lymphomentitäten das DNAm Alter nach Horvath nur schwach mit dem chronologischen Alter der Proben korrelierte. Während bei den Blutproben eine leichte Zunahme der epigenetischen Altersabweichung mit zunehmendem chronologischen Alter beobachtet wurde, veränderte sich die

epigenetische Voralterung der BL-Proben nicht signifikant mit dem Altern. Jedoch enthielt die BL-Kohorte auch nur wenige ältere BL-Proben, sodass möglicherweise ein Effekt aufgrund der geringen Probenanzahl im hohen Altersbereich nicht signifikant nachgewiesen werden konnte. So zeigte die älteste BL-Probe im Alter von 76 Jahren im Streudiagramm einen negativen Trend des Δ -Alters im hohen Alter an. Hierbei könnte es sich jedoch auch um einen Ausreißer handeln. Zur Klärung dieses Aspekts wäre die Untersuchung einer BL-Kohorte mit zahlreichen älteren BL-Proben notwendig. In den DLBCL- und FL-Proben war das Δ -Alter negativ mit dem chronologischen Alter korreliert, d.h. mit zunehmendem chronologischen Alter verringerte sich die Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter der Proben. Diese Abnahme der epigenetischen Voralterung während des Alterns war bei den FL-Proben stärker ausgeprägt als bei den DLBCL-Proben.

Insgesamt ähnelten sich die KZB-Lymphomentitäten jedoch sehr in ihrem Methylierungsmuster der 349 Horvath-CpG-Loci. In vorherigen Studien wurde bereits gezeigt, dass KZB-Lymphome gemeinsame epigenetische Muster wie eine globale Hypomethylierung mit einer verminderten Methylierung v.a. des Heterochromatins aufweisen [76]. Diese Hypomethylierung von intergenischen DNA-Sequenzen geschieht wahrscheinlich größtenteils passiv während der starken Proliferation der Lymphomzellen [76]. Zudem kommt es während der Lymphomagenese zur gezielten Hyper- und Hypomethylierung von Enhancern sowie weiterer Bindungsstellen spezifischer Transkriptionsfaktoren, sodass diese die Genexpression beeinflussen [76]. Des Weiteren werden in Lymphomen bestimmte Gene vermehrt methyliert, welche in Stammzellen durch PcG-Proteine reprimiert werden [76,133]. Dies zeigt, dass auch unterschiedliche Lymphomentitäten teilweise die gleichen epigenetischen Merkmale aufweisen. Eine globale Hypomethylierung in Verbindung mit der Hypermethylierung von PcG-Zielgenen wird interessanterweise auch zu den Schlüsselmerkmalen (engl. *hallmarks*) des Alterns gezählt [40].

Zusätzlich zu diesem KZB-Lymphom-spezifischen Methylierungsprofil wiesen die BL-, DLBCL- und FL-Proben jedoch auch Entitäten-spezifische Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci auf. Die Übergänge zwischen den Methylierungsprofilen der Entitäten waren hierbei fließend. Dies zeigte sich u.a. in der PCA, wo die Entitätencluster wie Schichten aufeinanderlagen. Die FL-Proben ordneten sich hierbei zwischen dem BL- und DLBCL-Cluster an und wiesen somit ein Übergangsmuster der DNA-Methylierung zwischen den BL- und DLBCL-Proben auf. Dies deckt sich mit der Annahme, dass BL und DLBCL die extremen Ausprägungen eines Kontinuums an morphologisch, immunphänotypisch und transkriptionell ähnlichen reifen, aggressiven B-Zell-Lymphomen darstellen [134]. Auch FL können bei Vorliegen eines „Double hit“, also dem gleichzeitigen Auftreten einer *MYC*-Translokation und einer weiteren onkogenen Translokation z.B. *BCL2* betreffend, zu diesem Kontinuum der Intermediate-Lymphome gezählt werden [134]. Jedoch wiesen in dieser Arbeit nur 2 der 94 FL-Proben eine *MYC*-Translokation auf, sodass die überwiegende Mehrheit der FL-Proben keine Intermediate-Lymphome

waren. Bei der Analyse des *MYC*-Translokationsstatus in den Lymphomproben (in dieser Arbeit nicht dargestellt) zeigten sich zudem keine signifikanten Unterschiede im DNAm Alter und der epigenetischen Voralterung.

Die epigenetische Ähnlichkeit der KZB-Lymphome zeigte sich auch in der differentiellen Methylierungsanalyse, welche ergab, dass nur 66% (229 CpG-Loci) der 349 Horvath-CpG-Loci signifikant unterschiedlich zwischen den BL-, DLBCL- und FL-Proben methyliert waren. Die KZB-Lymphomentitäten ähnelten sich somit stärker in ihrem Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci als die B-Zell-Reifestadien (79% differentiell methylierte CpG-Loci) oder die Blut- und späten B-Zell-Reifestadien-Proben naiBC, gcBC, PC (T), PC (BM) und memBC (78% differentiell methylierte CpG-Loci).

Bei der Analyse des chronologischen Alters fiel auf, dass in den einzelnen Entitäten die epigenetischen Altersinformationen in den Hintergrund traten und durch Lymphom-spezifische DNA-Methylierungsmuster überlagert wurden. So ähnelten sich bei den BL-Proben zwar die jungen Proben im Alter von 0-10 Jahren in ihrem Methylierungsmuster, jedoch ließen die älteren BL-Proben keine klaren Altersstrukturen in der PCA erkennen. Auch die DLBCL-Proben enthielten nur noch unpräzise epigenetische Altersinformationen. So ordneten sich die DLBCL-Proben in der PCA nur andeutungsweise nach ihrem chronologischen Alter an. Die FL-Proben ließen keine Anordnung der Proben nach chronologischem Alter in der PCA erkennen und schienen keine epigenetischen Altersinformationen zu enthalten. Ohne diese epigenetische Altersinformation kann der DNAm Alter-Algorithmus jedoch kein präzises chronologisches Alter für die Lymphomproben schätzen. Dies erklärt somit auch, warum sowohl die DNAm Alter-Werte als auch die hieraus abgeleiteten Δ -Alter-Werte in den Lymphomkohorten so stark streuten.

Andererseits fiel bei der gemeinsamen Betrachtung aller drei Entitäten in der PCA auf, dass sich die sehr jungen KZB-Lymphomproben im Alter von 0-10 Jahren sowie die sehr alten KZB-Lymphomproben mit einem Alter von über 80 Jahren an den entgegengesetzten Enden des Lymphomclusters anordneten. Die Lymphomproben im mittleren Alter dazwischen clusterten alle zusammen und ordneten sich nicht nach chronologischem Alter an. Möglicherweise enthalten die KZB-Lymphomproben der verschiedenen Entitäten somit die gleichen epigenetischen Altersinformationen, welche jedoch aufgrund des jeweils begrenzten Altersbereichs, der in dieser Arbeit untersucht wurde, bei den einzelnen Entitäten nicht so klar hervortreten. Diese epigenetischen Altersinformationen würden hauptsächlich zwischen den extremen Ausprägungen der ganz jungen und ganz alten Lymphomproben differenzieren können, während die Auftrennung der mittelalten Proben nach Alter nur marginal wäre. Wie schon zuvor erläutert, sollte bei der Analyse der Altersstrukturen in der PCA sowie der hierarchischen Clusteranalyse jedoch beachtet werden, dass die Proben in dieser Arbeit zur

Verbesserung der Übersichtlichkeit in Alterskategorien von 10 Jahren eingeteilt wurden, sodass Proben mit einem Alter am Ende einer Dekade und Proben mit einem Alter am Anfang der darauffolgenden Dekade zwar in zwei verschiedene Alterskategorien eingeteilt wurden, jedoch von den Werten ihres chronologischen Alters nicht weiter auseinander lagen als Proben innerhalb einer Alterskategorie. Dies sollte bedacht werden, wenn Lymphomproben aufeinanderfolgender Alterskategorien im mittleren Altersbereich scheinbar unabhängig vom chronologischen Alter zusammen clustern.

Da es sich bei den sehr jungen Lymphomproben im Alter von 0-10 Jahren überwiegend um BL-Proben und bei den sehr alten Lymphomproben ausschließlich um DLBCL-Proben handelte, ist es jedoch auch möglich, dass dieser Eindruck der Auftrennung der Lymphomproben nach chronologischem Alter in der PCA eigentlich durch das Clustern nach Entitäten hervorgerufen wird. Andererseits ordneten sich einzelne sehr junge DLBCL-Proben auch in der Nähe der sehr jungen BL-Proben in der PCA an. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Lymphomentitäten würden Kohorten mit ähnlichen Altersstrukturen benötigt. Da die verschiedenen Lymphomentitäten jedoch unterschiedliche charakteristische Manifestationsalter aufweisen [74], ist die Rekrutierung solcher Lymphomkohorten mit ähnlicher Altersstruktur schwierig.

Zusammenfassend zeigen diese Auswertungen, dass das Entitäten-spezifische Methylierungsmuster der 349 Horvath-CpG-Loci in den Lymphomproben dominiert, während eine altersabhängige Methylierung allenfalls sekundär das Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci beeinflusst.

4.5 Vergleich der Lymphomproben mit den Blutproben

Alle drei KZB-Lymphomentitäten waren im Vergleich zu den Blutproben stärker epigenetisch vorgealtert. Die epigenetische Voralterung der BL-Proben wich mit 42,3 Jahren am ausgeprägtesten von der epigenetischen Altersabweichung der Blutproben ab, während sich die epigenetische Voralterung der DLBCL-Proben mit 15,2 Jahren und der FL-Proben mit 11,9 Jahren weniger stark von den Blutproben unterschied.

Diese epigenetische Voralterung beruhte auf einem aberranten Methylierungsmuster der 349 Horvath-CpG-Loci in den KZB-Lymphomen. So unterschieden sich 90% (313 CpG-Loci) der 349 Horvath-CpG-Loci signifikant in ihrem Methylierungsgrad zwischen den Blut- und Lymphomproben. Insgesamt wiesen die Lymphomproben zudem eine größere Heterogenität des Methylierungsmusters der Horvath-CpG-Loci als die Blutproben auf, was sich in einer größeren Streuung in der PCA im Vergleich zu den Blutproben äußerte.

Interessanterweise folgte die angedeutete Anordnung der Lymphomproben nach chronologischem Alter in der PCA der Ausrichtung der nach chronologischem Alter angeordneten Blutproben. Während sich die Blutproben im Alter von 0 bis 10 Jahren jedoch stark in ihrem Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci von den älteren Blutproben unterschieden, erfolgte eine solch scharfe Abgrenzung der jungen von den älteren Lymphomproben nicht. Obwohl die Blutproben mit einem chronologischen Alter über 10 Jahren eine epigenetisch homogenere Probengruppe darstellten als die Lymphomproben über 10 Jahren, wiesen jedoch weder die Blut- noch die Lymphomproben eine präzise Auftrennung nach chronologischem Alter in der PCA auf.

Diese ähnlichen Beobachtungen bei den Blut- und Lymphomproben bekräftigen die Annahme, dass auch die KZB-Lymphome noch epigenetische Altersinformationen enthalten, welche z.T. mit den epigenetischen Altersinformationen der Blutproben übereinstimmen. Diese epigenetischen Altersinformationen scheinen jedoch bei den Lymphomproben verschoben zu sein, sodass ein höheres DNAm Alter als das chronologische Alter resultiert. Die unterschiedlichen Altersstrukturen der Entitätenkohorten treten zwar als mögliche Confounder bei dieser Altersanalyse auf, dennoch kann die Übereinstimmung der Ausrichtung der nach chronologischem Alter angeordneten Blut- und Lymphomproben in der PCA nicht ausschließlich auf die Entitätenzugehörigkeit zurückgeführt werden.

4.6 Vergleich der Lymphomproben mit den B-Zell-Reifestadien-Proben

Da sich die KZB-Lymphome von aktivierten B-Zellen ableiten, ist ein Vergleich zwischen den Entitäten und den einzelnen B-Zell-Reifestadien besonders interessant. Nach der Keimzentrumsreaktion mit somatischer Hypermutation sowie anschließender Selektion unterscheiden sich die B-Zellen sowohl genetisch als auch epigenetisch von den frühen B-Zell-Reifestadien vor der Keimzentrumsreaktion sowie von den weiteren Blutzellen [67,69]. Da die Keimzentrums-B- und Plasmazellen schon physiologisch epigenetisch vorgealtert waren, war ein Vergleich der Lymphomproben mit den Keimzentrums-B- und Plasmazellen erforderlich, um Lymphom-spezifische von B-Zell-spezifischer epigenetischer Voralterung unterscheiden zu können.

Die BL-Proben wiesen eine deutlich stärkere epigenetische Voralterung als die späten B-Zell-Reifestadien-Proben der naiBC, gcBC, PC und memBC auf. Da sich die BL aus Keimzentrums-B-Zellen der dunklen Region des Keimzentrums entwickeln [69], ist der Vergleich zwischen diesen beiden Kohorten besonders interessant. In dieser Arbeit lag das Δ -Alter der BL 34,4 Jahre über dem Δ -Alter der Keimzentrums-B-Zellen. Somit kann die in den BL-Proben beobachtete epigenetische Voralterung nicht allein auf der schon in den Keimzentrums-B-Zellen in geringerem Ausmaß festgestellten

epigenetischen Voralterung basieren. Der Prozess der epigenetischen Voralterung scheint sich daher im Rahmen der Lymphomagenese der BL fortzusetzen und extremere Ausmaße anzunehmen.

Während sich die DLBCL-Proben in ihrer epigenetischen Voralterung signifikant von den naiven B-Zellen und den B-Gedächtniszellen unterschieden, konnte kein signifikanter Unterschied in der epigenetischen Voralterung zwischen den DLBCL- und Keimzentrums-B-Zell-Proben sowie den DLBCL- und Plasmazell-Proben festgestellt werden. Besonders interessant ist hierbei die Berücksichtigung der *Cell of Origin*-Klassifikation (COO), welche die DLBCL entsprechend der jeweiligen Ursprungszelle der Lymphomagenese unterscheidet. So leiten sich die GCB-DLBCL (*Germinal center B-cell type*) von Keimzentrums-B-Zellen der hellen Zone des Keimzentrums ab, während sich die ABC-DLBCL (*Activated B-cell type*) aus späten Keimzentrums-B-Zellen, sogenannten Plasmablasten, entwickeln, welche die Vorstufen der Plasmazellen darstellen [69]. DLBCL-Proben, welche weder eindeutig als GCB- oder ABC-Subtyp klassifiziert werden können, werden als Type-III-DLBCL zusammengefasst.

Zwischen den GCB-, ABC- und Type-III-DLBCL bestand kein signifikanter Unterschied im Ausmaß ihrer epigenetischen Voralterung. Trotzdem wurden in dieser Arbeit Unterschiede zwischen den einzelnen COO-Subtypen im Vergleich zu den B-Zell-Reifestadien beobachtet. So wich das Δ -Alter der GCB-DLBCL signifikant vom Δ -Alter der naiven B-zellen und B-Gedächtniszellen ab, während kein Unterschied in der epigenetischen Voralterung zwischen den GCB-DLBCL- und den Keimzentrums-B-Zell- bzw. Plasmazell-Proben bestand. Die in den GCB-DLBCL-Proben beobachtete Voralterung ist daher möglicherweise allein auf die in den Keimzentrums-B-Zellen beobachtete epigenetische Voralterung zurückzuführen und verändert sich nicht signifikant während der Lymphomagenese.

Die ABC-DLBCL-Proben wiesen im Vergleich zu den GCB-DLBCL-Proben eine tendenziell stärkere epigenetische Voralterung auf, auch wenn der Unterschied nicht signifikant war. So zeigten die ABC-DLBCL-Proben ein signifikant höheres Δ -Alter als die naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben. Damit basiert die in den ABC-DLBCL-Proben beobachtete epigenetische Voralterung nicht ausschließlich auf der in den Keimzentrums- und Plasmazellen beobachteten epigenetischen Voralterung. Dieser Prozess scheint sich stattdessen im Rahmen der Lymphomagenese weiter fortzusetzen und größere Ausmaße anzunehmen.

Die Type-III-DLBCL-Proben unterschieden sich nur von den naiven B-Zellen signifikant in ihrem Δ -Alter, während im Vergleich zu den Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Somit könnte auch die epigenetische Voralterung der Type-III-DLBCL-Proben allein durch die epigenetische Voralterung der Keimzentrums-B- und Plasmazellen erklärt werden.

Während bei den GCB- und Type-III-DLBCL-Proben somit keine zusätzliche epigenetische Voralterung im Rahmen der Lymphomagenese festgestellt werden konnte, die signifikant über das schon in den Keimzentrums-B- und Plasmazellen beobachtete Ausmaß hinausging, waren die ABC-DLBCL-Proben stärker epigenetisch vorgealtert als die Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben. Somit zeigen ABC-DLBCL möglicherweise doch eine tendenziell stärkere epigenetische Voralterung als die GCB- und Type-III-DLBCL, auch wenn ein signifikanter Unterschied in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Zur Klärung dieser Fragestellung sind weitere Studien an großen DLBCL-Stichproben notwendig, um auch kleine Effekte mit größerer Sicherheit feststellen zu können. Falls tatsächlich eine stärkere epigenetische Voralterung bei den ABC- im Vergleich zu den GCB-DLBCL bestehen sollte, könnte diese mit dem bei ABC-DLBCL beobachteten aggressiveren Wachstum sowie der geringeren Überlebensrate nach Chemotherapie assoziiert sein [79,80].

Ebenso wie die DLBCL-Proben unterschieden sich auch die FL-Proben signifikant in ihrem Δ -Alter von den naiven B-Zell- und B-Gedächtniszell-Proben, während kein signifikanter Unterschied in der epigenetischen Voralterung der FL-Proben im Vergleich zu den Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben festgestellt wurde. Da sich die FL von den Keimzentrums-B-Zellen der hellen Zone des Keimzentrums ableiten [69] ist es möglich, dass die in den FL-Proben beobachtete epigenetische Voralterung allein auf der epigenetischen Voralterung der Keimzentrums-B-Zellen beruht, ohne dass sich diese während der Lymphomagenese der FL signifikant verändert.

Sowohl die BL-, DLBCL- als auch die FL-Proben wiesen zudem eine signifikante epigenetische Voralterung im Vergleich zu den sehr frühen B-Zell-Reifestadien HPC, preBI, preBII und iBC auf, mit Ausnahme der DLBCL- und iBC-Proben, zwischen denen kein signifikanter Unterschied im Δ -Alter festgestellt wurde. Diese Ergebnisse sollten jedoch vorsichtig interpretiert werden, da die jeweiligen Stichproben der frühen B-Zell-Reifestadien nur klein waren.

Die epigenetische Ähnlichkeit zwischen den späten B-Zell-Reifestadien und den Lymphomproben zeigte sich auch in ihrem Methylierungsmuster der 349 Horvath-CpG-Loci, wo sich die späten B-Zell-Reifestadien-Proben der Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen und B-Gedächtniszellen zusammen mit den Lymphomproben in ihrem Methylierungsmuster ähnelten. Vergleichbare Beobachtungen wurden auch in Studien bei anderen hämatologischen Neoplasien wie der Chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) und dem Mantelzell-Lymphom gemacht, welche ebenfalls größere epigenetische Ähnlichkeiten mit den gesunden B-Zell-Stadien aufwiesen, von welchen sie sich ableiteten [135,136]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Lymphome stark durch das Epigenom ihrer Ursprungszellen geprägt sind, welches dann durch das Lymphom-spezifische DNA-Methylierungsmuster modifiziert wird [76]. Von den KZB-Lymphomentitäten wiesen die BL-Proben die

größten Ähnlichkeiten im Methylierungsmuster mit den gcBC und PC (T) auf, gefolgt von den FL-Proben. Die PC (BM) und die memBC stimmten epigenetisch am stärksten mit den FL-Proben überein, gefolgt von den BL-Proben. Auch in anderen Studien wurde bereits beobachtet, dass B-Zell-Neoplasien epigenetisch große Ähnlichkeiten mit langlebigen Plasmazellen und B-Gedächtniszellen aufweisen, welche möglicherweise auf die starke Proliferation in der Vorgeschichte der Zellen und die Langlebigkeit zurückzuführen sind [67]. Während der Lymphomagenese scheinen sich daher epigenetische Prozesse fortzusetzen, welche auch während der physiologischen B-Zell-Reifung in Plasma- und B-Gedächtniszellen auftreten [67,76]. Die B-Zell-Reifestadien-Proben zeichneten sich jedoch durch eine größere Homogenität der DNA-Methylierung der Horvath-CpG-Loci aus, während die Methylierungswerte in den Lymphomproben eine größere Streuung aufwiesen.

Beim Vergleich der Keimzentrums-B-Zellen mit den KZB-Lymphomproben zeigten 79% (276 CpG-Loci) der Horvath-CpG-Loci ein differentielles Methylierungsmuster zwischen den Kohorten. Da allein zwischen den KZB-Lymphomentitäten schon 66% der Horvath-CpG-Loci aberrant methyliert waren, unterstrich diese differentielle Methylierungsanalyse die große epigenetische Ähnlichkeit zwischen den Keimzentrums-B-Zellen und den KZB-Lymphomen. Zudem ähnelten die Keimzentrums-B-Zellen in ihrem Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci sogar mehr den Lymphom- als den gesunden Blutproben. Der deutliche Unterschied in der DNA-Methylierung zwischen den Keimzentrums-B-Zellen und den Blutproben beruht wahrscheinlich auf den ausgeprägten epigenetischen Veränderungen während der Keimzentrumsreaktion. Diese epigenetische Prägung durch die Keimzentrumsreaktion der gcBC bleibt auch bei den KZB-Lymphomen erhalten.

Im Gegensatz zur großen Ähnlichkeit im Methylierungsprofil zwischen den Lymphomproben sowie den späten B-Zell-Reifestadien gcBC, PC (T), PC (BM) und memBC, unterschieden sich die naiven B-Zellen deutlich von den Lymphomproben in ihrer DNA-Methylierung und ähnelten stärker den Blutproben.

Bei der gemeinsamen Analyse des chronologischen Alters der B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben fiel auf, dass die jungen Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben (T) im Alter von 0 bis 10 Jahren den jungen BL-Proben in ihrem Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci ähnelten. Auch die Plasmazell- (KM) und B-Gedächtniszell-Proben wiesen Ähnlichkeiten im Methylierungsmuster mit gleichaltrigen FL-Proben auf. Dies lässt vermuten, dass die in den Lymphomproben enthaltenen epigenetischen Altersinformationen mit den späten B-Zell-Reifestadien-Proben übereinstimmen. Es ist daher möglich, dass die Ähnlichkeiten im Methylierungsmuster der Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben (T) im Vergleich zu den BL-Proben, sowie die epigenetischen Ähnlichkeiten zwischen den Plasmazell- (KM) und B-Gedächtniszell-Proben im Vergleich zu den FL-Proben teilweise durch das ähnliche chronologische Alter bedingt sind. Dies würde bedeuten, dass die

Altersinformationen so präsent im DNA-Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci enthalten sind, dass sie auch durch die Lymphomagenese nicht verloren gehen. Die epigenetische Uhr schlägt somit grundsätzlich sowohl in den späten B-Zell-Reifestadien als auch in den KZB-Lymphomen im gleichen Takt. Sie scheint jedoch in den späten B-Zell-Reifestadien und den KZB-Lymphomen im Vergleich zu den Blut- und naiven B-Zell-Proben verschoben zu sein, sodass sich größere Unterschiede im Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci zwischen gleichaltrigen Proben der Blut- und naïvBC-Proben einerseits und den Lymphom- und späten B-Zell-Reifestadien-Proben andererseits ergeben.

4.7 Die Gene des DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath sind für verschiedene Signalwege angereichert

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Genontologie-Analyse der mit dem DNAm Alter-Algorithmus assoziierten Gene im Vergleich zu allen auf dem HM450k-Array repräsentierten Genen zeigte keine signifikanten Anreicherungen von Genontologie-Annotationen in den Kategorien Zelluläre Komponente, Molekulare Funktion und Biologischer Prozess. Da die mit der epigenetischen Uhr assoziierten 380 Gene im Vergleich zu den 20.232 Genen, welche auf dem HM450k-Array durch CpG-Loci abgebildet werden, nur eine relativ kleine Anzahl an Genen darstellen, ist es möglich, dass GO-Anreicherungen aufgrund der geringen Stichprobengröße in der Analyse nicht signifikant waren.

In der von Horvath durchgeführten Analyse der Signalwege der mit den DNAm Alter-CpG-Loci assoziierten Gene stellte er signifikante Anreicherungen der Signalwege von Proliferation, Zelltod und Zellüberleben, Embryonalentwicklung, Entwicklung des Organismus und der Gewebe, Entwicklung und Funktion des hämatologischen Systems sowie Krebs fest [49]. Der Großteil dieser Signalwege spielt auch bei der Lymphomagenese eine wichtige Rolle.

4.7.1 Das B-Zell-Rezeptor-assoziierte Protein $Ig\alpha$ ist mit dem DNAm Alter assoziiert

In dem von Horvath identifizierten, angereicherten Signalnetzwerk des hämatologischen Systems ist u.a. das Gen *CD79A* enthalten, welches durch einen CpG-Locus auf dem Chromosom 19 in der epigenetischen Uhr repräsentiert wird [49]. Dieser CpG-Locus wird mit zunehmendem Alter vermehrt methyliert. Das Gen *CD79A* codiert für das Transmembranprotein $Ig\alpha$, welches zusammen mit $Ig\beta$ die Signaltransduktion bei Antigen-Bindung an den B-Zell-Rezeptor (BZR) naiver B-Zellen vermittelt. Dieses BZR-Signal führt zur Aktivierung der mitogenen MAP-Kinasen-Kaskade, sodass die naive B-Zelle in einen proliferationsbereiten Zustand versetzt wird [66]. Während der Keimzentrumsreaktion ist das Gen *CD79A*, obwohl es sich um ein Non-Ig-Gen handelt, von der Somatischen Hypermutation (SHM) in

den Keimzentrums-B-Zellen betroffen [72]. In der Studie von Gordon et al. [72] betrug die Mutationsfrequenz von *CD79A* in Keimzentrums-B-Zelllinien etwa 0,5-5% der Mutationsfrequenz der Ig-Gene. Eine während der SHM entstandene Mutation im *CD79A* kann sich auch auf die Methylierung der assoziierten CpG-Loci auswirken [62]. So war der mit dem *CD79A*-Gen assoziierte DNAm Alter-CpG-Locus cg05921699 in dieser Arbeit zwischen den naiven B-Zellen und Keimzentrums-B-Zellen differentiell methyliert. Diese Ergebnisse unterstützen die Vermutung, dass die SHM während der Keimzentrumsreaktion die epigenetische Uhr der B-Zellen beeinflussen und hierdurch zu der in dieser Arbeit festgestellten epigenetischen Voralterung der Keimzentrums-B-Zellen und Plasmazellen führen könnte. Der CpG-Locus cg05921699 könnte somit beispielhaft für weitere DNAm Alter-CpG-Loci stehen, welche ebenfalls in ihrem Methylierungsgrad durch die SHM beeinflusst werden.

4.7.2 Polycomb-Zielgene sind in den positiv mit dem Alter korrelierten Horvath-CpG-Loci angereichert

Zudem untersuchte Horvath die CpG-Loci der epigenetischen Uhr getrennt nach den 193 positiv korrelierten CpG-Loci, welche mit zunehmendem Alter hypermethyliert werden, und den 160 negativ korrelierten CpG-Loci, deren Methylierungsgrad mit dem Alter abnimmt. Während die positiv korrelierten CpG-Loci vermehrt in der Nähe von Polycomb-Gruppen (PcG)-Zielgenen lokalisiert sind, besteht keine Assoziation zwischen den negativ korrelierten CpG-Loci und PcG-Zielgenen [49].

PcG-Proteine vermitteln die transkriptionelle Repression einer Vielzahl von Genen, welche eine Schlüsselrolle in der Entwicklung des Organismus sowie der Zelldifferenzierung spielen [137]. Mehrere PcG-Proteine lagern sich hierbei zusammen zu einem Polycomb-Repressionskomplex (PRC), welcher u.a. Modifikationen an Histonen durchführt und somit zur Bildung von transkriptionell inaktivem Heterochromatin führt [138]. Auch vermittelt das PcG-Protein EZH2 die spezifische Methylierung von Genen durch Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen [138]. Durch die präzise Repression von Entwicklungs-steuernden Genen kontrollieren die PcG-Proteine sowohl den Erhalt der Pluripotenz bei Stammzellen als auch die Zelldifferenzierung [139].

Auch während der B-Zell-Reifung üben PcG-Proteine eine wichtige Funktion zur Steuerung der Differenzierung aus. So wird z.B. in Keimzentrums-B-Zellen das PcG-Protein EZH2 vermehrt exprimiert und induziert einerseits die starke Proliferation der B-Zellen, während andererseits die weitere Differenzierung durch vorübergehende Repression von Zielgenen unterdrückt wird [69]. Außerdem kommt es während der B-Zell-Reifung ab der Keimzentrumsreaktion zur zunehmenden Methylierung von PcG-Zielgenen [67]. Da die Hypermethylierung der PcG-Zielgene, welche im DNAm Alter-Algorithmus enthalten sind, mit einem höheren Alter assoziiert sind [49], könnte diese vermehrte

Methylierung der PcG-Zielgene in den aktivierten B-Zellen zu einem erhöhten DNAm Alter führen und somit die epigenetische Voralterung der Keimzentrums-B-Zellen und Plasmazellen bedingen.

Neben ihrer physiologischen Funktion zur Wahrung der Zellidentität, spielen PcG-Proteine jedoch auch eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung [138]. So können die PRC die Expression von Tumorsuppressorgenen reprimieren, sodass u.a. eine Apoptoseresistenz der Zellen resultiert. Auch können PRC ein aberrantes, Stammzell-ähnliches Genexpressionsmuster induzieren, welches zur Dedifferenzierung der malignen Zellen und einem großen Replikationspotenzial führen könnte [138]. Insgesamt treten in Tumoren Promotor-Hypermethylierungen bei Stammzell-typischen PcG-Zielgenen sehr viel häufiger auf als bei Non-PcG-Zielgenen [47].

Außerdem unterliegen mehrere Stammzell-typische PcG-Zielgene einer altersabhängigen Zunahme der Methylierung in gesunden Zellen [47]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass mit steigendem Alter ein Stammzell-ähnliches Genexpressionsprofil durch PcG-Proteine etabliert wird, welches zu einem erhöhten Risiko für Tumore im hohen Alter führen könnte [47].

In den KZB-Lymphomen BL, DLBCL und FL konnte in der Studie von van Kemenade et al. eine aberrante Expression von PcG-Proteinen im Vergleich zu gesunden Keimzentrums-B-Zellen nachgewiesen werden [140]. Hierbei korrelierte das Ausmaß der Koexpression der PcG-Proteine BMI-1 und EZH2 mit dem Grad der Malignität und der Expression des Proliferationsmarkers Ki-67 [140]. Auch weisen die KZB-Lymphome eine verstärkte Methylierung von PcG-Zielgenen auf [76,88,94]. Es wird vermutet, dass diese vermehrte Methylierung der PcG-Zielgene durch die starke Proliferation der Lymphomzellen entsteht, jedoch sind die kausalen Zusammenhänge bisher nicht geklärt [76]. Bis jetzt ist zudem unklar, in wieweit sich diese Hypermethylierung von PcG-Zielgenen auf die Genexpression auswirkt, da diese Regionen meist schon zuvor durch Histonmethylierungen reprimiert wurden und daher ein sogenanntes „Epigenetic Switching“ stattfindet [76].

Die Hypermethylierung der PcG-Zielgene in den KZB-Lymphomen könnte somit zu einem erhöhten DNAm Alter führen und daher die in dieser Arbeit beobachtete epigenetische Voralterung der KZB-Lymphome erklären. Falls die vermehrte Methylierung der PcG-Zielgene tatsächlich auf die Proliferation der Lymphomzellen zurückzuführen wäre, würde dies die stärkere epigenetische Voralterung der aggressiveren KZB-Lymphome BL und ABC-DLBCL erklären. Auf der anderen Seite betont Horvath jedoch, dass das DNAm Alter kein Mitosealter der Zellen darstellt, da in gesunden Individuen sowohl hochproliferative Gewebe wie Wangen- und Darmschleimhaut als auch post-mitotische Gewebe wie Hirngewebe das gleiche DNAm Alter aufweisen, ohne dass für die Gewebeart korrigiert werden muss [49].

4.8 Epigenetische Voralterung ist mit einer erhöhten Mortalität assoziiert

All diese Beobachtungen der epigenetischen Voralterung bei späten B-Zell-Reifestadien und KZB-Lymphomen werfen Fragen nach der biologischen Bedeutung und den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen des Methylierungsalters auf.

Grundsätzlich schätzen sowohl das Methylierungsalter-Modell nach Horvath [49] als auch nach Hannum et al. [50] das chronologische Alter eines Individuums anhand des Methylierungsprofils spezifischer CpG-Loci. Die Differenz zwischen dem geschätzten Methylierungsalter und dem chronologischen Alter kann zur Beurteilung des biologischen Alterungsprozesses herangezogen werden. So wiesen in einer Studie von Horvath et al. Italiener im Alter von 105-109 Jahren ein geringeres epigenetisches als chronologisches Alter auf [141]. Ein vermindertes epigenetisches Alter könnte somit einen gesunden Alterungsprozess widerspiegeln und ein Zeichen für Langlebigkeit sein.

Im Gegensatz hierzu konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die epigenetische Voralterung sowohl im DNAm Alter-Modell nach Horvath [49] als auch z.T. im Methylierungsalter-Modell nach Hannum et al. [50] mit dem Ausmaß der Gebrechlichkeit, der Krebsinzidenz und -sterblichkeit als auch mit der Gesamtmortalität korreliert ist [142–144]. So wiesen Studienteilnehmer mit einem stärkeren epigenetischen Voralterung ein erhöhtes Risiko auf, an Krebs zu erkranken und letztendlich daran zu versterben [86,144,145].

All diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass das DNAm Alter als Marker des biologischen Alters eines Individuums interpretiert werden kann [49]. Trotz dieser beobachteten Assoziationen konnten jedoch noch keine kausalen Zusammenhänge zwischen dem DNAm Alter und alterstypischen Phänotypen hergestellt werden. Es bleibt somit unklar, ob das DNAm Alter lediglich durch die gleichen Komponenten beeinflusst wird, welche auch alterstypische Erkrankungen auslösen, oder aber eine kausale Rolle im Alterungsprozess spielt. Zudem konnte das altersabhängige DNA-Methylierungsmuster der Horvath-CpG-Loci bis heute nicht mit einem charakteristischen altersabhängigen Genexpressionsprofil assoziiert werden [49]. Zum jetzigen Zeitpunkt ist außerdem nicht geklärt, ob ein übergeordneter Mechanismus die Methylierung der epigenetischen Uhr-CpG-Loci aktiv steuert und hierdurch das DNAm Alter beeinflusst, oder ob es sich eher um einen passiven, altersabhängigen Prozess handelt. Es bedarf somit weiterer Studien, um die biologische Bedeutung des DNAm Alters weiter aufzuklären.

4.9 Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters bei FFPE-BL-Proben

Bei der Analyse der Proben auf mögliche Batch-Effekte in dieser Arbeit fiel auf, dass die in Formalin fixierten und anschließend in Paraffin eingebetteten (engl. *formalin-fixed paraffin-embedded*, FFPE) BL-Proben ein deutlich aberrantes DNA-Methylierungsmuster im Vergleich zu den kryofixierten BL-Proben zeigten. Eine solche Abweichung der auf dem HM450k-Array gemessenen Methylierungswerte bei FFPE-Proben im Vergleich zu kryofixierten Proben wurde bereits in früheren Studien beobachtet [146,147]. Zwar kommt es durch die Formalin-Fixierung und Paraffin-Einbettung nicht zu direkten Veränderungen der DNA-Methylierung [148], doch führt die Formalin-Fixierung zur Denaturierung der DNA mit chemischer Veränderung der Basen, Quervernetzung sowie Fragmentation zu 150-300 bp langen DNA-Bruchstücken [149,150]. Das Protokoll des HM450k-Arrays beinhaltet jedoch eine Gesamtgenom-Amplifikationsreaktion, welche eine Mindestlänge der Ausgangs-DNA von 1000 bp erfordert [150]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass bei Verwendung des HM450k-Array-Protokolls die fragmentierte FFPE-DNA nicht ausreichend amplifiziert wird und dementsprechend zu einer fehlerhaften Messung der Methylierungswerte führt [150]. Die Annahme, dass das abweichende Methylierungsmuster der FFPE-DNA-Proben bei der Messung auf dem HM450k-Array auf einem technischen Artefakt beruht, wird gestützt durch die Ergebnisse der Studie von Marwitz et al. [146], in welcher Methylierungsanalysen von FFPE-Proben sowohl unter Verwendung des HM450k-Arrays als auch mittels Bisulfitpyrosequenzierung durchgeführt wurden. In dieser Studie wurde beobachtet, dass bei der Methylierungsanalyse mittels Bisulfitpyrosequenzierung, welche keine Gesamtgenom-Amplifikation erfordert, kein Unterschied im DNA-Methylierungsmuster zwischen den kryofixierten und FFPE-Proben gefunden werden konnte [146].

Da die Kohorte der FFPE-BL-Proben in dieser Arbeit jedoch ein tendenziell höheres chronologisches Alter als die Kohorte der kryofixierten BL-Proben aufwies, musste zunächst der Altersunterschied als möglicher Confounder des Methylierungsunterschieds zwischen diesen beiden Probengruppen ausgeschlossen werden. Jedoch zeigten gleichaltrige kryofixierte und FFPE-BL-Proben deutliche Unterschiede in ihrem Methylierungsmuster, sodass das auffällige Methylierungsprofil der FFPE-BL-Proben nicht durch altersabhängige Methylierungsveränderungen zu erklären war. Eine FFPE-BL-Probe war außerdem schon zuvor während der Qualitätskontrolle von der Auswertung ausgeschlossen worden, weil sie eine auffällige, unimodale Verteilung ihrer Beta-Werte zeigte. Da somit ein technisches Artefakt bei der Prozessierung der FFPE-Proben sehr viel wahrscheinlicher erschien als ein biologischer Effekt wurden die FFPE-BL-Proben von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Bei zukünftigen genomweiten DNA-Methylierungsanalysen mittels HM450k-Arrays sollte, wenn möglich, kryofixiertes dem FFPE-Probenmaterial vorgezogen werden. Die überwiegende Mehrheit der Gewebeproben in pathologischen Archiven wurde jedoch Formalin-fixiert und in Paraffin eingebettet,

da dies eine bessere histopathologische Auswertbarkeit im Vergleich zu kryofixierten Proben bietet. Bei der Verwendung von FFPE-Proben für DNA-Methylierungsanalysen auf dem HM450k-Array könnten zur Reduktion von Artefakten spezielle Reparaturprotolle angewendet werden, welche auf einer Verlängerung der DNA-Fragmente vor der Amplifikation beruhen [150]. In vorherigen Studien führte die Verwendung des Reparatur-Protokolls nach Thirlwell et al. [150] bei FFPE-Proben zwar zu verbesserten Methylierungsmessungen im Vergleich zur Prozessierung der FFPE-Proben ohne den Reparaturschritt [150], jedoch bestanden auch bei den reparierten FFPE-DNA-Proben weiterhin signifikante Abweichungen des gemessenen Methylierungsmusters im Vergleich zu den kryofixierten DNA-Proben [147]. In der Studie von Moran et al. [151] wurden bei Verwendung eines kommerziell erhältlichen Reparaturkits kaum Unterschiede im Methylierungsmuster zwischen kryofixierten und FFPE-Proben festgestellt. Als Kompromiss zwischen der Fixierung der histologischen Morphologie und der Konservierung der Nukleinsäuren in Gewebeproben könnte zudem die HOPE-Fixierungstechnik (*Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect*) [152] angewendet werden. Die genomweite DNA-Methylierung HOPE-fixierter Gewebeproben kann zuverlässig mit dem HM450k-Array gemessen werden und zeigt große Ähnlichkeiten mit dem Methylierungsmuster kryofixierter Proben [146]. Es bieten sich somit mehrere Möglichkeiten, das Risiko fehlerhafter Methylierungswertmessungen bei FFPE-Proben zu reduzieren bzw. zu vermeiden, sodass diese bei zukünftigen DNA-Methylierungsanalysen auf HM450k-Arrays berücksichtigt werden sollten.

4.10 Stärken und Limitationen der verwendeten Methoden

Um möglichst große Stichproben untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit sowohl Blut-, B-Zell-Reifestadien- als auch Lymphomproben verschiedener Studien jeweils zu Kohorten vereint. Die Zusammenfassung von Proben verschiedener Studien birgt allerdings das Risiko, dass die Proben unterschiedlich prozessiert und klassifiziert wurden. Alle Lymphomproben wurden jedoch von Referenzpathologen beurteilt. Auch wurden alle Blut-, Lymphom- und ein Teil der B-Zell-Proben im Institut für Humangenetik am Campus Kiel nach dem gleichen Protokoll prozessiert, sodass dies zu einer möglichst homogenen Stichprobe führen sollte. Zudem wurden Proben, welche einen Batch-Effekt vermuten ließen, von der Analyse in dieser Arbeit ausgeschlossen.

Die Vereinigung der Lymphomproben verschiedener Projekte führte zu einer besonders großen, repräsentativen KZB-Lymphomkohorte, sodass dies eine verlässliche Auswertung auch kleinerer Effekte ermöglichte. Als große Kontrollkohorte wurde eine umfangreiche Blutproben-Stichprobe untersucht. Wie schon zuvor erläutert sollten bei zukünftigen Untersuchungen die DNA-Methylierungswerte für die zelluläre Zusammensetzung des peripheren Bluts berichtet werden.

Zudem wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene B-Zell-Reifestadien-Proben untersucht, um einen bestmöglichen Vergleich der KZB-Lymphomproben mit ihren Ursprungszellen zu ermöglichen. Jedoch waren die Stichproben der einzelnen B-Zell-Differenzierungsstadien relativ klein, sodass weitere Studien mit größeren B-Zell-Kohorten zu empfehlen sind, um die in dieser Arbeit beobachteten Tendenzen zu überprüfen und auch kleine Effekte mit ausreichender statistischer Power nachweisen zu können. Für einen optimalen Vergleich zwischen B-Zellen und Lymphomen wäre es zudem wünschenswert, dass beide Stichproben neben weiteren Parametern eine ähnliche Altersstruktur aufwiesen.

Gemäß den Empfehlungen zur statistischen Auswertung bei z.T. geringen Stichprobengrößen wurden in dieser Arbeit nur nichtparametrische Testverfahren ausgewählt [111]. Zudem waren sowohl das chronologische, DNAm als auch Δ -Alter vieler Probengruppen nicht normalverteilt, sodass nur verteilungsunabhängige Tests verwendet werden konnten. Diese weisen selbst bei der Anwendung auf normalverteilte Daten immer noch 95% der Power des entsprechenden parametrischen Tests auf, wobei ein höherer Fehler 2. Art in Kauf genommen wird, sodass konservativere Testentscheidungen getroffen werden [111,112]. Als weiterer Vorteil sind nichtparametrische Tests robuster gegenüber Ausreißern. Auch bei der Auswertung der bimodal verteilten Beta-Werte der DNA-Methylierung wurde auf die Verwendung verteilungsunabhängiger Tests geachtet und die Testoptionen in der Analyse-Software *QluCore Omics Explorer* um eigene Skripte ergänzt.

Die Bisulfitkonvertierung der DNA führt zur Übersetzung des DNA-Methylierungsmusters in eine Sequenzinformation. Dies ermöglicht die anschließende Amplifikationsreaktion ohne Verlust der Methylierungsinformationen, sodass schon geringe DNA-Mengen als Ausgangsmaterial für die Methylierungsanalyse ausreichen [104]. Eine potenzielle Fehlerquelle bei dieser Methode ist jedoch die Möglichkeit, dass die Bisulfitkonvertierung unmethylierter Cytosine nur unvollständig abläuft und diese dementsprechend als Cytosine in der DNA-Sequenz erhalten bleiben [153,154]. In der anschließenden Analyse werden diese ursprünglich unmethylierten Cytosine dann irrtümlich als methylierte Cytosine interpretiert, sodass es zu einer Überschätzung der DNA-Methylierung kommt. Der Anteil der unvollständig konvertierten, unmethylierten Cytosine ist jedoch bei Verwendung der Standardprotokolle nur gering, sodass der Einfluss auf die Auswertungen nur marginal ist [153].

Die Verwendung des *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina) bietet den großen Vorteil der hochqualitativen, genomweiten Methylierungsanalyse von über 485.000 Loci bei Verwendung relativ geringer DNA-Ausgangsmengen [106]. Zudem zeigten Bibikova et al., dass die mit dem HM450k-Array gemessenen DNA-Methylierungswerte stark mit den Ergebnissen der Gesamtgenom-Bisulfitsequenzierung übereinstimmten [106]. Ein Nachteil des HM450k-Arrays ist die Verwendung von

zwei verschiedenen Assay-Technologien auf dem gleichen Array, welche sich leicht in der Verteilung der gemessenen Beta-Werte unterscheiden [106,155]. Dedeurwaerder et al. stellten zudem fest, dass die mit dem Infinium II Assay gemessenen Beta-Werte ungenauer und weniger reproduzierbar waren im Vergleich zum Infinium I Assay [155]. Insgesamt stellt der HM450k-Array jedoch eine gute, kosten- und zeiteffiziente Methode zur genomweiten DNA-Methylierungsanalyse dar.

Der DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath [49] wurde anhand des DNA-Methylierungsprofils von Proben verschiedenster Gewebearten entwickelt und schätzt dementsprechend als Multi-Gewebe-Altersprädiktor präzise das chronologische Alter von Proben verschiedenster Gewebearten [49]. Im Gegensatz hierzu basieren die 71 altersassoziierten CpG-Loci nach Hannum [50] ausschließlich auf Blutproben, sodass die Anwendbarkeit auf andere Gewebearten nur eingeschränkt gegeben ist. Da der Methylierungsalter-Algorithmus nach Hannum nicht vollständig veröffentlicht wurde, konnte zudem in dieser Arbeit kein Methylierungsalter nach Hannum für die Proben berechnet werden, sodass epigenetische Altersunterschiede nicht quantifiziert werden konnten. Insgesamt weist somit der DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath viele Vorteile im Vergleich zum Methylierungsalter-Algorithmus nach Hannum auf. Nichtsdestotrotz stellten die altersassoziierten Hannum-CpG-Loci eine interessante Ergänzung der epigenetischen Altersanalysen dar, sodass dem DNAm Alter nach Horvath noch ein weiteres Alterskonzept gegenübergestellt werden konnte. Auf diese Weise konnte untersucht werden, ob die beobachtete epigenetische Voralterung ein auf die Horvath-CpG-Loci begrenztes Phänomen oder aber einen auch bei anderen Alters-CpG-Loci feststellbaren, intrinsischen epigenetischen Prozess widerspiegelt.

Insgesamt stellt die DNA-Methylierung einen komplexen, dynamischen und multipel beeinflussbaren epigenetischen Mechanismus dar [11,156]. Bekannte Einflussfaktoren wurden, soweit möglich, von der Analyse ausgeschlossen, jedoch kann ein weiteres Confounding durch nicht identifizierte Einflussgrößen nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden.

4.11 Zusammenfassung der Ergebnisse und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass sich sowohl in Blutzellen als auch in den frühen B-Zell-Reifestadien vor der Keimzentrumsreaktion (HPC, preBI, preBII, iBC, naiBC) die DNA-Methylierung der Horvath-CpG-Loci so charakteristisch mit dem Alter ändert, dass sie als epigenetische Uhr aufgefasst werden können, welche präzise das chronologische Alter der Proben schätzt. Auch die späten B-Zell-Differenzierungsstadien der Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen und B-Gedächtniszellen enthalten weiterhin Altersinformationen in ihrem DNA-Methylierungsmuster, jedoch sind diese im Vergleich zu den Blutzellen und frühen B-Zell-Reifestadien zu höheren Alterswerten hin verschoben, sodass ein

erhöhtes epigenetisches Alter resultiert. Als mögliche Ursache dieser epigenetischen Voralterung bei gesunden Keimzentrums-B-Zellen und Plasmazellen kommt die starke Umstrukturierung des Genoms und Epigenoms im Rahmen der Keimzentrumsreaktion mit starker Proliferation und somatischer Hypermutation in Betracht [67,69].

Die Keimzentrums-B-Zell-Lymphome BL, DLBCL und FL leiten sich von den späten B-Zell-Reifestadien ab und machen zusammen einen Anteil von 80% der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome aus, welche zu den 10 häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland gezählt werden [69,82]. Während das BL typischerweise bei Kindern auftritt, erkranken an DLBCL und FL v.a. ältere Menschen [74]. Aufgrund dieses typischen Verteilungsmusters des Erkrankungsalters schien es interessant, den Zusammenhang zwischen der Lymphomagenese und dem Alterungsprozess näher zu untersuchen.

Auch die KZB-Lymphome enthalten weiterhin Altersinformationen in ihrem DNA-Methylierungsmuster, jedoch weisen alle drei Entitäten eine epigenetische Voralterung im Vergleich zu ihrem chronologischen Alter auf. Während die epigenetische Uhr durch die Lymphomagenese der FL sowie der GCB-DLBCL im Vergleich zu den Ursprungszellen der Keimzentrums-B-Zellen nicht signifikant beeinflusst wird, weisen die BL und ABC-DLBCL eine noch stärkere epigenetische Voralterung als die Keimzentrums-B- und Plasmazellen auf. Dementsprechend scheint sich der schon bei den Keimzentrums-B-Zellen beobachtete Prozess der epigenetischen Voralterung während der BL- und ABC-DLBCL-Lymphomagenese fortzusetzen. Diese weitere Steigerung der epigenetischen Voralterung könnte mit der größeren Aggressivität dieser Lymphomentitäten im Vergleich zu den weniger aggressiven FL und GCB-DLBCL in Zusammenhang stehen [74,79,80].

Möglicherweise spielt zudem die Methylierung von PcG-Zielgenen eine wichtige Rolle bei der epigenetischen Voralterung, da diese sowohl während des Alterns als auch während der B-Zell-Reifung und der Lymphomagenese differentiell methyliert werden [47,67,76].

Letztlich bleibt auch am Ende dieser Arbeit weiterhin unklar, ob das epigenetische Methylierungsalter in einem kausalen Zusammenhang mit Alterungsprozessen und der Krebsentstehung steht. Für ein tiefergehendes Verständnis der molekularen Prozesse bei epigenetischer Voralterung wäre es daher interessant, die DNA-Methylierungsanalysen und epigenetischen Altersuntersuchungen von Lymphomen an einem großen Patientenkollektiv zusätzlich noch durch Untersuchungen der Histonmodifikationen, der microRNA, des Chromatinstatus sowie der Genexpression zu ergänzen. Von einer solchen umfassenden Analyse würde man sich neben Erkenntnissen zur Lymphomagenese auch tiefere Einblicke in die molekularen Mechanismen des Alterns sowie deren Wechselwirkungen erhoffen. So könnten möglicherweise Zielstrukturen identifiziert werden, um in Zukunft einen gesunden Alterungsprozess durch Modulation des Epigenoms zu beeinflussen.

Eine prospektive Studie von Dugué et al. zeigte bereits, dass Menschen mit einer epigenetischen Voralterung ihrer peripheren Blutzellen ein erhöhtes Risiko aufweisen, an einem reifen B-Zell-Lymphom zu erkranken [86]. Zudem wiesen Menschen mit epigenetisch vorgealtertem Blut auch erhöhte Inzidenzen von weiteren Tumorarten auf [86,142,144,145], sodass das DNAm Alter von Blutzellen zum Screening und zur Früherkennung von Lymphomen und weiteren Krebsarten genutzt werden könnte. Nichtsdestotrotz ist der Einsatz von Tumormarkern zum Screening asymptomatischer Personen aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität umstritten, da falsch-positive Ergebnisse bei gesunden Menschen zu einer starken Verunsicherung sowie Belastung durch die Folgediagnostik führen können [157].

Insgesamt konnte in mehreren Studien eine erhöhte Krebs- und Gesamtmortalität bei epigenetisch vorgealterten Blutzellen festgestellt werden [142,144]. Es wäre somit spannend, in zukünftigen Studien das Therapieansprechen, die Rezidivrate und das Überleben mit der epigenetischen Voralterung von Lymphomproben zu korrelieren, um mögliche Zusammenhänge aufzudecken und das DNAm Alter als potenziellen Marker für die Therapieplanung, Risikostratifikation und die Prognoseabschätzung zu evaluieren.

Falls in zukünftigen Studien kausale Zusammenhänge zwischen dem DNA-Methylierungsprofil, der epigenetischen Voralterung und der Lymphomagenese aufgedeckt würden, könnten diese einerseits zur Prävention und andererseits für epigenetische Therapieansätze genutzt werden. So sind bereits einige DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und Histon-Deacetylase-Inhibitoren zur Tumorthherapie zugelassen, während weitere epigenetische Therapieansätze in klinischen Studien geprüft werden [158,159]. Hämatologische Neoplasien scheinen hierbei empfänglicher für epigenetische Therapien zu sein als solide Tumoren und gehörten zu den ersten Entitäten, für welche epigenetische Therapien entwickelt wurden [158,159]. Die epigenetische Reprogrammierung maligner Zellen bietet somit neue und vielversprechende Perspektiven in der Tumorthherapie.

Wie zuvor bereits erwähnt, konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass eine verstärkte epigenetische Voralterung mit einer erhöhten Mortalität und somit einer verkürzten Lebenserwartung assoziiert ist [144,160]. Falls in Zukunft kausale Einflüsse des DNA-Methylierungsmusters sowie weiterer epigenetischer Mechanismen auf den Alterungsprozess nachgewiesen würden, dann könnten diese eventuell durch epigenetische Medikamente gezielt moduliert werden. Auf diese Weise könnte möglicherweise systematisch in den Alterungsprozess eingegriffen und dieser gegebenenfalls verlangsamt, aufgehalten oder sogar teilweise rückgängig gemacht werden. Dies könnte zu einer Verzögerung des Auftretens altersassoziierter Erkrankungen sowie zu einer Verlängerung der Lebenszeit führen.

5 Zusammenfassung

Die Keimzentrums-B-Zell-Lymphomentitäten Burkitt-Lymphom, Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom und Follikuläres Lymphom machen insgesamt einen Anteil von 80% an den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen aus und leiten sich von Antigen-aktivierten Keimzentrums-B-Zellen ab. Da diese drei Lymphomentitäten jeweils spezifische Verteilungen des Erkrankungsalters aufweisen, schien es interessant, den Zusammenhang zwischen dem Altern und der Lymphomagenese zu untersuchen. Altern ist ein komplexer Prozess, der sich sowohl auf molekulare Funktionen in den einzelnen Zellen als auch auf den gesamten Organismus auswirkt. Auch epigenetische Mechanismen, welche durch die flexible Regulation der Genexpression zwischen den Genen und der Umwelt vermitteln, weisen altersabhängige Veränderungen auf. In dieser Arbeit wurde das von Steve Horvath beschriebene DNA-Methylierungsalter als epigenetischer Biomarker des biologischen Alters untersucht. Dieses basiert auf der DNA-Methylierung von 353 spezifischen Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Loci (CpG-Loci) und wird anhand eines Regressionsmodells berechnet. Während das DNA-Methylierungsalter nach Horvath bei gesunden Individuen präzise das chronologische Alter schätzt, wurden bei mehreren Tumorarten stärkere Abweichungen des epigenetischen DNA-Methylierungsalters vom chronologischen Alter festgestellt. Da bisher keine Studien zum epigenetischen Alter von Lymphomen veröffentlicht wurden, sollte in dieser Arbeit das DNA-Methylierungsalter nach Horvath von Keimzentrums-B-Zell-Lymphomen im Vergleich zu gesunden Blutproben sowie gesunden B-Zell-Proben verschiedener Differenzierungsstadien untersucht werden. Hierfür wurde das genomweite DNA-Methylierungsprofil von 95 gesunden Blutproben, 62 gesunden B-Zell-Proben verschiedener Differenzierungsstadien (6 hämatopoetischen Progenitorzell-, 6 Pro-B-Zell-, 6 Prä-B-Zell-, 4 unreifen B-Zell-, 10 naiven B-Zell-, 14 Keimzentrums-B-Zell-, 11 Plasmazell-, 5 B-Gedächtniszell-Proben), 75 Burkitt-Lymphom-, 119 Diffusen großzelliges B-Zell-Lymphom- und 94 Follikulären Lymphom-Proben auf dem Methylierungsarray *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina) gemessen. Anhand der Methylierungswerte wurde das epigenetische DNA-Methylierungsalter der Proben berechnet und anschließend mit dem chronologischen Alter verglichen. Wie in der Studie von Steve Horvath wich auch in dieser Arbeit das DNA-Methylierungsalter der gesunden Blutproben im Median um 2,9 Jahre vom chronologischen Alter ab, sodass die von Horvath beschriebenen Angaben zur Präzision des DNA-Methylierungsalters bestätigt werden konnten. Während das DNA-Methylierungsalter der gesunden hämatopoetischen Progenitorzell-, Pro-B-Zell-, Prä-B-Zell-, unreifen B-Zell-, naiven B-Zell- und B-Gedächtniszell-Proben mit dem chronologischen Alter übereinstimmte, wiesen die Keimzentrums-B-Zell- und Plasmazell-Proben sowie die Lymphomproben aller drei Entitäten ein signifikant höheres DNA-Methylierungsalter verglichen mit ihrem chronologischen Alter auf. Die epigenetische Voralterung der Keimzentrums-B-Zellen und Plasmazellen im Vergleich zu den frühen B-Zell-

Reifestadien lässt sich wahrscheinlich auf die starke Proliferation und die somatische Hypermutation im Rahmen der Keimzentrumsreaktion zurückführen. Von den Keimzentrums-B-Zellen leiten sich die Keimzentrums-B-Zell-Lymphome ab, welche ebenfalls epigenetisch vorgealtert waren. Hierbei wiesen die Burkitt-Lymphomproben die stärkste epigenetische Voralterung mit einem im Median um 45,6 Jahre älteren DNA-Methylierungsalter im Vergleich zu ihrem chronologischen Alter auf, während die epigenetische Voralterung bei den Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom-Proben mit 18,5 Jahren und bei den Follikulären Lymphomproben mit 14,9 Jahren weniger stark ausgeprägt war. Zudem unterschieden sich die Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom- und Follikulären Lymphomproben nicht signifikant im Ausmaß ihrer epigenetischen Voralterung von den Keimzentrums-B-Zell-Proben, während die Burkitt-Lymphomproben eine signifikant größere epigenetische Voralterung als die Keimzentrums-B-Zell-Proben aufwiesen. Somit scheint sich der Prozess der epigenetischen Voralterung, welcher schon bei den Keimzentrums-B-Zellen beobachtet wurde, während der Lymphomagenese der Burkitt-Lymphome fortzusetzen, wohingegen das epigenetische DNA-Methylierungsalter der Diffusen großzelligen B-Zell-Lymphome und der Follikulären Lymphome nicht signifikant durch die Lymphomagenese beeinflusst wird. Da in den Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Loci des DNA-Methylierungsalter-Algorithmus nach Horvath die Zielgene der Polycomb-Gruppen-Proteine angereichert sind, könnte die differentielle Methylierung dieser Zielgene in den späten B-Zell-Reifestadien sowie den Keimzentrums-B-Zell-Lymphomen die beobachtete epigenetische Voralterung in diesen Probengruppen erklären. Die Polycomb-Gruppen-Proteine üben eine wichtige Funktion bei der Steuerung der Genexpression in Stammzellen und während der Differenzierung aus. Sowohl während des Alterungsprozesses als auch während der B-Zell-Reifung werden die Zielgene der Polycomb-Gruppen-Proteine hypermethyliert, welche bei Stammzellen normalerweise reprimiert werden. Diese spezifische Hypermethylierung könnte zu einer Dedifferenzierung der Zellen führen und ein erhöhtes Risiko der malignen Entartung zur Folge haben. Da eine epigenetische Voralterung bereits mit einer erhöhten Mortalität assoziiert wurde, könnte das DNA-Methylierungsalter der Lymphome in Zukunft zur Therapieauswahl und zur Abschätzung der Prognose genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Murrell, A., Rakan, V. K., Beck, S. (2005): From genome to epigenome. *Hum Mol Genet*, 14, 3–10
2. Cantone, I., Fisher, A. G. (2013): Epigenetic programming and reprogramming during development. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 282–289
3. Shiota, K. (2004): DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res*, 105, 325–334
4. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P. A. (2004): Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429, 457–463
5. Santos, F., Dean, W. (2004): Epigenetic reprogramming during early development in mammals. *Reproduction*, 127, 643–651
6. National Institutes of Health: What is epigenetics?
<https://ghr.nlm.nih.gov/primer/howgeneswork/epigenome> (letzter Zugriff am 14.02.19)
7. Ammerpohl, O., Gutwein, J., Siebert, R. (2013): Epigenetik. Die Brücke zwischen Umwelt und Genom. *umwelt medizin gesellschaft*, 26, 263–269
8. Gao, X., Jia, M., Zhang, Y., Breitling, L. P., Brenner, H. (2015): DNA methylation changes of whole blood cells in response to active smoking exposure in adults. A systematic review of DNA methylation studies. *Clin Epigenetics*, 7, 113
9. Heijmans, B. T., Tobi, E. W., Stein, A. D., Putter, H., Blauw, G. J., Susser, E. S., Slagboom, P. E., Lumey, L. H. (2008): Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 17046–17049
10. Horvath, S., Erhart, W., Brosch, M., Ammerpohl, O., Schönfels, W. von, Ahrens, M., Heits, N., Bell, J. T., Tsai, P.-C., Spector, T. D., Deloukas, P., Siebert, R., Sipos, B., Becker, T., Röcken, C., Schafmayer, C., Hampe, J. (2014): Obesity accelerates epigenetic aging of human liver. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111, 15538–15543
11. Alegría-Torres, J. A., Baccarelli, A., Bollati, V. (2011): Epigenetics and lifestyle. *Epigenomics*, 3, 267–277
12. Jablonka, E. (2013): Epigenetic inheritance and plasticity. The responsive germline. *Prog Biophys Mol Biol*, 111, 99–107
13. Bártoová, E., Krejčí, J., Harnicarová, A., Galiová, G., Kozubek, S. (2008): Histone modifications and nuclear architecture. A review. *J Histochem Cytochem*, 56, 711–721
14. Bannister, A. J., Kouzarides, T. (2011): Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 21, 381–395

15. Agrawal, N., Dasaradhi, P. V. N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., Mukherjee, S. K. (2003): RNA interference. Biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev*, 67, 657–685
16. Shachar, S., Misteli, T. (2017): Causes and consequences of nuclear gene positioning. *J Cell Sci*, 130, 1501–1508
17. Caiafa, P., Zampieri, M. (2005): DNA methylation and chromatin structure. The puzzling CpG islands. *J Cell Biochem*, 94, 257–265
18. Luczak, M. W., Jagodzinski, P. P. (2006): The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol*, 44, 143–154
19. Robertson, K. D. (2001): DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*, 20, 3139–3155
20. Jones, P. A., Liang, G. (2009): Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet*, 10, 805–811
21. Kohli, R. M., Zhang, Y. (2013): TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*, 502, 472–479
22. Hashimoto, H., Liu, Y., Upadhyay, A. K., Chang, Y., Howerton, S. B., Vertino, P. M., Zhang, X., Cheng, X. (2012): Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucleic Acids Res*, 40, 4841–4849
23. Cadet, J., Wagner, J. R. (2014): TET enzymatic oxidation of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 764-765, 18–35
24. Jones, P. A., Takai, D. (2001): The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science*, 293, 1068–1070
25. Ehrlich, M., Gama-Sosa, M. A., Huang, L. H., Midgett, R. M., Kuo, K. C., McCune, R. A., Gehrke, C. (1982): Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues or cells. *Nucleic Acids Res*, 10, 2709–2721
26. Yan, J., Zierath, J. R., Barrès, R. (2011): Evidence for non-CpG methylation in mammals. *Exp Cell Res*, 317, 2555–2561
27. Jones, P. A. (2012): Functions of DNA methylation. Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13, 484–492
28. Tate, P. H., Bird, A. P. (1993): Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, 3, 226–231
29. Newell-Price, J., Clark, A. J., King, P. (2000): DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol Metab*, 11, 142–148

30. Miranda, T. B., Jones, P. A. (2007): DNA methylation. The nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol*, 213, 384–390
31. Yoder, J. A., Walsh, C. P., Bestor, T. H. (1997): Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 13, 335–340
32. Bird, A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16, 6–21
33. Jones, P. A., Baylin, S. B. (2002): The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3, 415–428
34. Kreck, B., Richter, J., Ammerpohl, O., Barann, M., Esser, D., Petersen, B. S., Vater, I., Murga Penas, E. M., Bormann Chung, C. A., Seisenberger, S., Lee Boyd, V., Smallwood, S., Drexler, H. G., Macleod, R. A. F., Hummel, M., Krueger, F., Häsler, R., Schreiber, S., Rosenstiel, P., Franke, A., Siebert, R. (2013): Base-pair resolution DNA methylome of the EBV-positive endemic Burkitt lymphoma cell line DAUDI determined by SOLiD bisulfite-sequencing. *Leukemia*, 27, 1751–1753
35. Li, Y., Zhu, J., Tian, G., Li, N., Li, Q., Ye, M., Zheng, H., Yu, J., Wu, H., Sun, J., Zhang, H., Chen, Q., Luo, R., Chen, M., He, Y., Jin, X., Zhang, Q., Yu, C., Zhou, G., Sun, J., Huang, Y., Zheng, H., Cao, H., Zhou, X., Guo, S., Hu, X., Li, X., Kristiansen, K., Bolund, L., Xu, J., Wang, W., Yang, H., Wang, J., Li, R., Beck, S., Wang, J., Zhang, X. (2010): The DNA methylome of human peripheral blood mononuclear cells. *PLoS Biol*, 8, e1000533
36. Laurent, L., Wong, E., Li, G., Huynh, T., Tsiganos, A., Ong, C. T., Low, H. M., Kin Sung, K. W., Rigoutsos, I., Loring, J., Wei, C.-L. (2010): Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome Res*, 20, 320–331
37. Simm, A., Nass, N., Bartling, B., Hofmann, B., Silber, R.-E., Navarrete Santos, A. (2008): Potential biomarkers of ageing. *Biol Chem*, 389, 257–265
38. Li, Y., Tollefsbol, T. O. (2016): Age-related epigenetic drift and phenotypic plasticity loss. Implications in prevention of age-related human diseases. *Epigenomics*, 8, 1637–1651
39. Rensing, L., Rippe, V. (2014): *Altern. Zelluläre und molekulare Grundlagen, körperliche Veränderungen und Erkrankungen, Therapieansätze*. Springer Spektrum, Berlin
40. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., Kroemer, G. (2013): The hallmarks of aging. *Cell*, 153, 1194–1217
41. Heyn, H., Li, N., Ferreira, H. J., Moran, S., Pisano, D. G., Gomez, A., Diez, J., Sanchez-Mut, J. V., Setien, F., Carmona, F. J., Puca, A. A., Sayols, S., Pujana, M. A., Serra-Musach, J., Iglesias-Platas, I., Formiga, F., Fernandez, A. F., Fraga, M. F., Heath, S. C., Valencia, A., Gut, I. G., Wang, J., Esteller, M. (2012): Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 10522–10527
42. Jintaridith, P., Mutirangura, A. (2010): Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences. *Physiol Genomics*, 41, 194–200

43. Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., Litonjua, A., Tarantini, L., Suh, H., Sparrow, D., Vokonas, P., Baccarelli, A. (2009): Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mech Ageing Dev*, 130, 234–239
44. Issa, J.-P. (1999): Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*, 32, 31–43
45. Maegawa, S., Hinkal, G., Kim, H. S., Shen, L., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, N., Liang, S., Donehower, L. A., Issa, J.-P. J. (2010): Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res*, 20, 332–340
46. Richardson, B. (2003): Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev*, 2, 245–261
47. Teschendorff, A. E., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Ramus, S. J., Weisenberger, D. J., Shen, H., Campan, M., Nouchmehr, H., Bell, C. G., Maxwell, A. P., Savage, D. A., Mueller-Holzner, E., Marth, C., Kocjan, G., Gayther, S. A., Jones, A., Beck, S., Wagner, W., Laird, P. W., Jacobs, I. J., Widschwendter, M. (2010): Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res*, 20, 440–446
48. Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y.-Z., Plass, C., Esteller, M. (2005): Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 10604–10609
49. Horvath, S. (2013): DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol*, 14, R115
50. Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J.-B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., Zhang, K. (2013): Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Mol Cell*, 49, 359–367
51. Ting, A. H., McGarvey, K. M., Baylin, S. B. (2006): The cancer epigenome-components and functional correlates. *Genes Dev*, 20, 3215–3231
52. Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2011): Hallmarks of cancer. The next generation. *Cell*, 144, 646–674
53. Baylin, S. B., Ohm, J. E. (2006): Epigenetic gene silencing in cancer. A mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer*, 6, 107–116
54. Kim, M. S., Lee, J., Sidransky, D. (2010): DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 29, 181–206
55. Kanwal, R., Gupta, S. (2012): Epigenetic modifications in cancer. *Clin Genet*, 81, 303–311
56. Feinberg, A. P., Vogelstein, B. (1983): Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301, 89–92
57. Chen, R. Z., Pettersson, U., Beard, C., Jackson-Grusby, L., Jaenisch, R. (1998): DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. *Nature*, 395, 89–93

58. Cheung, H.-H., Lee, T.-L., Rennert, O. M., Chan, W.-Y. (2009): DNA methylation of cancer genome. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 87, 335–350
59. Coulondre, C., Miller, J. H., Farabaugh, P. J., Gilbert, W. (1978): Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature*, 274, 775–780
60. Liu, D., Keijzers, G., Rasmussen, L. J. (2017): DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutat Res*, 773, 174–187
61. Rideout, W. M., Coetzee, G. A., Olumi, A. F., Jones, P. A. (1990): 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science*, 249, 1288–1290
62. Shen, H., Laird, P. W. (2013): Interplay between the cancer genome and epigenome. *Cell*, 153, 38–55
63. Marwitz, S., Heinbockel, L., Scheufele, S., Kugler, C., Reck, M., Rabe, K. F., Perner, S., Goldmann, T., Ammerpohl, O. (2018): Fountain of youth for squamous cell carcinomas? On the epigenetic age of non-small cell lung cancer and corresponding tumor-free lung tissues. *Int J Cancer*, 143, 3061–3070
64. Lin, Q., Wagner, W. (2015): Epigenetic aging signatures are coherently modified in cancer. *PLoS Genet*, 11, e1005334
65. Lüllmann-Rauch, R., Paulsen, F. (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 4. Aufl. Thieme, Stuttgart
66. Müller-Esterl, W. (2011): Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. 2. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
67. Martin-Subero, J. I., Oakes, C. C. (2018): Charting the dynamic epigenome during B-cell development. *Semin Cancer Biol*, 51, 139–148
68. Rajewsky, K. (1996): Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381, 751–758
69. Basso, K., Dalla-Favera, R. (2015): Germinal centres and B cell lymphomagenesis. *Nat Rev Immunol*, 15, 172–184
70. Pasqualucci, L., Migliazza, A., Fracchiolla, N., William, C., Neri, A., Baldini, L., Chaganti, R. S. K., Klein, U., Kuppers, R., Rajewsky, K., Dalla-Favera, R. (1998): BCL-6 mutations in normal germinal center B cells. Evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 11816–11821
71. Müschen, M., Re, D., Jungnickel, B., Diehl, V., Rajewsky, K., Küppers, R. (2000): Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med*, 192, 1833–1840
72. Gordon, M. S., Kanegai, C. M., Doerr, J. R., Wall, R. (2003): Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Ig β , CD79b) and mb1 (Ig α , CD79a). *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 4126–4131

73. Pasqualucci, L., Neumeister, P., Goossens, T., Nanjangud, G., Chaganti, R. S., Küppers, R., Dalla-Favera, R. (2001): Hypermethylation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature*, 412, 341–346
74. Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J. (Hrsg.) (2017): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4., überarb. Aufl. International Agency for Research on Cancer, Lyon
75. Martin-Subero, J. I., Ammerpohl, O., Bibikova, M., Wickham-Garcia, E., Agirre, X., Alvarez, S., Brüggemann, M., Bug, S., Calasanz, M. J., Deckert, M., Dreyling, M., Du, M. Q., Dürig, J., Dyer, M. J. S., Fan, J.-B., Gesk, S., Hansmann, M.-L., Harder, L., Hartmann, S., Klapper, W., Küppers, R., Montesinos-Rongen, M., Nagel, I., Pott, C., Richter, J., Román-Gómez, J., Seifert, M., Stein, H., Suela, J., Trümper, L., Vater, I., Prosper, F., Haferlach, C., Cruz Cigudosa, J., Siebert, R. (2009): A comprehensive microarray-based DNA methylation study of 367 hematological neoplasms. *PLoS One*, 4, e6986
76. Oakes, C. C., Martin-Subero, J. I. (2018): Insight into origins, mechanisms, and utility of DNA methylation in B-cell malignancies. *Blood*, 132, 999–1006
77. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., Höfler, G., Kreipe, H. H., Moch, H. (Hrsg.) (2012): Pathologie. 5. Aufl. Urban & Fischer in Elsevier, München
78. Cairo, M. S., Raetz, E., Lim, M. S., Davenport, V., Perkins, S. L. (2005): Childhood and adolescent non-Hodgkin lymphoma. New insights in biology and critical challenges for the future. *Pediatr Blood Cancer*, 45, 753–769
79. Wright, G., Tan, B., Rosenwald, A., Hurt, E. H., Wiestner, A., Staudt, L. M. (2003): A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 9991–9996
80. Rosenwald, A., Wright, G., Chan, W. C., Connors, J. M., Campo, E., Fisher, R. I., Gascoyne, R. D., Muller-Hermelink, H. K., Smeland, E. B., Giltmane, J. M., Hurt, E. M., Zhao, H., Averett, L., Yang, L., Wilson, W. H., Jaffe, E. S., Simon, R., Klausner, R. D., Powell, J., Duffey, P. L., Longo, D. L., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Sanger, W. G., Dave, B. J., Lynch, J. C., Vose, J., Armitage, J. O., Montserrat, E., López-Guillermo, A., Grogan, T. M., Miller, T. P., LeBlanc, M., Ott, G., Kvaloy, S., Delabie, J., Holte, H., Krajci, P., Stokke, T., Staudt, L. M. (2002): The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*, 346, 1937–1947
81. Miles, R. R., Raphael, M., McCarthy, K., Wotherspoon, A., Lones, M. A., Terrier-Lacombe, M. J., Patte, C., Gerrard, M., Auperin, A., Sposto, R., Davenport, V., Cairo, M. S., Perkins, S. L. (2008): Pediatric diffuse large B-cell lymphoma demonstrates a high proliferation index, frequent c-Myc

- protein expression, and a high incidence of germinal center subtype. Report of the French-American-British (FAB) international study group. *Pediatr Blood Cancer*, 51, 369–374
82. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut (2016): Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Robert Koch-Institut, Berlin
 83. Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2017): Krebs in Deutschland für 2013/2014. Robert Koch-Institut, Berlin
 84. Kaatsch, P., Grabow, D., Spix, C. (2018): Deutsches Kinderkrebsregister. Jahresbericht 2017 (1980-2016). Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
 85. Klutstein, M., Nejman, D., Greenfield, R., Cedar, H. (2016): DNA methylation in cancer and aging. *Cancer Res*, 76, 3446–3450
 86. Dugué, P.-A., Bassett, J. K., Joo, J. E., Jung, C.-H., Ming Wong, E., Moreno-Betancur, M., Schmidt, D., Makalic, E., Li, S., Severi, G., Hodge, A. M., Buchanan, D. D., English, D. R., Hopper, J. L., Southey, M. C., Giles, G. G., Milne, R. L. (2018): DNA methylation-based biological aging and cancer risk and survival. Pooled analysis of seven prospective studies. *Int J Cancer*, 142, 1611–1619
 87. Lee, S.-T., Xiao, Y., Muench, M. O., Xiao, J., Fomin, M. E., Wiencke, J. K., Zheng, S., Dou, X., Smith, A. de, Chokkalingam, A., Buffler, P., Ma, X., Wiemels, J. L. (2012): A global DNA methylation and gene expression analysis of early human B-cell development reveals a demethylation signature and transcription factor network. *Nucleic Acids Res*, 40, 11339–11351
 88. Kulis, M., Merkel, A., Heath, S., Queirós, A. C., Schuyler, R. P., Castellano, G., Beekman, R., Raineri, E., Esteve, A., Clot, G., Verdaguer-Dot, N., Duran-Ferrer, M., Russiñol, N., Vilarrasa-Blasi, R., Ecker, S., Pancaldi, V., Rico, D., Agueda, L., Blanc, J., Richardson, D., Clarke, L., Datta, A., Pascual, M., Agirre, X., Prosper, F., Alignani, D., Paiva, B., Caron, G., Fest, T., Muench, M. O., Fomin, M. E., Lee, S.-T., Wiemels, J. L., Valencia, A., Gut, M., Flicek, P., Stunnenberg, H. G., Siebert, R., Küppers, R., Gut, I. G., Campo, E., Martín-Subero, J. I. (2015): Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat Genet*, 47, 746–756
 89. Kolarova, J., Tangen, I., Bens, S., Gilllessen-Kaesbach, G., Gutwein, J., Kautza, M., Rydzanicz, M., Stephani, U., Siebert, R., Ammerpohl, O., Caliebe, A. (2015): Array-based DNA methylation analysis in individuals with developmental delay/intellectual disability and normal molecular karyotype. *Eur J Med Genet*, 58, 419–425
 90. Friemel, C., Ammerpohl, O., Gutwein, J., Schmutzler, A. G., Caliebe, A., Kautza, M., Otte, S. von, Siebert, R., Bens, S. (2014): Array-based DNA methylation profiling in male infertility reveals allele-specific DNA methylation in PIWIL1 and PIWIL2. *Fertil Steril*, 101, 1097-1103

91. Gutwein, J. (2015): Auswirkungen ausgewählter Einflussfaktoren auf die genomweite DNA-Methylierung beim Menschen. Math.-Nat. Diss., Kiel
92. Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A. E. (2002): Gene Expression Omnibus. NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res*, 30, 207–210
93. ICGC MMML-Seq: WPN. Somatische Variation in normalen B-Zellen. <http://www.uni-kiel.de/icgc/index.php?id=113&L=1%20AND%201=2%20UNION%20SELECT%200x6461726b31636f6465--.html> (letzter Zugriff am 03.01.19)
94. Kretzmer, H., Bernhart, S. H., Wang, W., Haake, A., Weniger, M. A., Bergmann, A. K., Betts, M. J., Carrillo-de-Santa-Pau, E., Doose, G., Gutwein, J., Richter, J., Hovestadt, V., Huang, B., Rico, D., Jühling, F., Kolarova, J., Lu, Q., Otto, C., Wagener, R., Arnolds, J., Burkhardt, B., Claviez, A., Drexler, H. G., Eberth, S., Eils, R., Flicek, P., Haas, S., Humme, M., Karsch, D., Kerstens, H. H. D., Klapper, W., Kreuz, M., Lawerenz, C., Lenzek, D., Loeffler, M., López, C., MacLeod, R. A. F., Martens, J. H. A., Kulis, M., Martín-Subero, J. I., Möller, P., Nage, I., Picelli, S., Vater, I., Rohde, M., Rosenstiel, P., Rosolowski, M., Russell, R. B., Schilhabel, M., Schlesner, M., Stadler, P. F., Szczepanowski, M., Trümper, L., Stunnenberg, H. G., Küppers, R., Ammerpohl, O., Lichter, P., Siebert, R., Hoffmann, S., Radlwimmer, B. (2015): DNA methylome analysis in Burkitt and follicular lymphomas identifies differentially methylated regions linked to somatic mutation and transcriptional control. *Nat Genet*, 47, 1316–1325
95. Lappalainen, I., Almeida-King, J., Kumanduri, V., Senf, A., Spalding, J. D., Ur-Rehman, S., Saunders, G., Kandasamy, J., Caccamo, M., Leinonen, R., Vaughan, B., Laurent, T., Rowland, F., Marin-Garcia, P., Barker, J., Jokinen, P., Torres, A. C., Argila, J. R. de, Llobet, O. M., Medina, I., Puy, M. S., Alberich, M., La Torre, S. de, Navarro, A., Paschall, J., Flicek, P. (2015): The European Genome-phenome Archive of human data consented for biomedical research. *Nat Genet*, 47, 692–695
96. MMML, Berger, H.: Kompetenznetz Maligne Lymphome. Verbundprojekt "Molekulare Mechanismen der malignen Lymphome". <http://www.lymphome.de/Projekte/MMML/index.jsp> (letzter Zugriff am 05.01.19)
97. ICGC MMML-Seq: Das Projekt. Über ICGC MMML-Seq. <http://www.uni-kiel.de/icgc/index.php?id=99.html> (letzter Zugriff am 05.01.19)
98. ICGC: International Cancer Genome Consortium. <https://icgc.org/content/icgc-home-0> (letzter Zugriff am 05.01.19)
99. Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J. W. (Hrsg.) (2008): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. Aufl. International Agency for Research on Cancer, Lyon
100. ICGC MMML-Seq: WP3. DNA/RNA Präparation und Qualitätskontrolle. <http://www.uni-kiel.de/icgc/index.php?id=115.html> (letzter Zugriff am 06.01.19)

101. Loeffler, M., Kreuz, M., Haake, A., Hasenclever, D., Trautmann, H., Arnold, C., Winter, K., Koch, K., Klapper, W., Scholtysik, R., Rosolowski, M., Hoffmann, S., Ammerpohl, O., Szczepanowski, M., Herrmann, D., Küppers, R., Pott, C., Siebert, R. (2015): Genomic and epigenomic co-evolution in follicular lymphomas. *Leukemia*, 29, 456–463
102. Kaminsky, Z. A., Tang, T., Wang, S.-C., Ptak, C., Oh, G. H. T., Wong, A. H. C., Feldcamp, L. A., Virtanen, C., Halfvarson, J., Tysk, C., McRae, A. F., Visscher, P. M., Montgomery, G. W., Gottesman, I. I., Martin, N. G., Petronis, A. (2009): DNA methylation profiles in monozygotic and dizygotic twins. *Nat Genet*, 41, 240–245
103. Clark, S. J., Harrison, J., Paul, C. L., Frommer, M. (1994): High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*, 22, 2990–2997
104. Laird, P. W. (2010): Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. *Nat Rev Genet*, 11, 191–203
105. Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., Paul, C. L. (1992): A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 1827–1831
106. Bibikova, M., Barnes, B., Tsan, C., Ho, V., Klotzle, B., Le, J. M., Delano, D., Zhang, L., Schroth, G. P., Gunderson, K. L., Fan, J.-B., Shen, R. (2011): High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics*, 98, 288–295
107. Du, P., Zhang, X., Huang, C.-C., Jafari, N., Kibbe, W. A., Hou, L., Lin, S. M. (2010): Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*, 11, 587
108. Kuan, P. F., Wang, S., Zhou, X., Chu, H. (2010): A statistical framework for Illumina DNA methylation arrays. *Bioinformatics*, 26, 2849–2855
109. Horvath, S.: DNA methylation age and the epigenetic clock.
<https://horvath.genetics.ucla.edu/html/dnamage/> (letzter Zugriff am 10.01.19)
110. R Core Team (2016): R. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Wien
111. Hedderich, J., Sachs, L. (2016): *Angewandte Statistik*. 15. Aufl. Springer Spektrum, Berlin
112. Caliebe, A., Hedderich, J., Krawczak, M. (2013): *Methodik des wissenschaftlichen Arbeitens*. Institut für Medizinische Informatik und Statistik der Christian-Albrechts-Universität, Kiel
113. Wollschläger, D. (2014): *Grundlagen der Datenanalyse mit R*. 3. Aufl. Springer Spektrum, Berlin
114. Hotelling, H., Pabst, M. R. (1936): Rank correlation and tests of significance involving no assumption of normality. *Ann Math Statist*, 7, 29–43
115. Troyanskaya, O., Cantor, M., Sherlock, G., Brown, P., Hastie, T., Tibshirani, R., Botstein, D., Altman, R. B. (2001): Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics*, 17, 520–525

116. Basler, M. (2000): Principal Components. Datentransformation II. Institut für Geographie der Friedrich-Schiller-Universität, Jena
117. Legendre, P., Legendre, L. (2012): Numerical ecology. 3. Aufl. Elsevier, Amsterdam
118. Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995): Controlling the False Discovery Rate. A practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*, 57, 289–300
119. Qlucore (2016): Qlucore Omics Explorer Tutorial. Qlucore, Lund
120. Eden, E., Navon, R., Steinfeld, I., Lipson, D., Yakhini, Z. (2009): GOrilla. A tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics*, 10, 48
121. Gene Ontology Consortium: Gene Ontology Consortium. <http://www.geneontology.org/> (letzter Zugriff am 13.01.19)
122. Renz-Polster, H., Krautzig, S. (2012): Basislehrbuch Innere Medizin. 5. Aufl. Urban & Fischer in Elsevier, München
123. Sun, Y. V., Turner, S. T., Smith, J. A., Hammond, P. I., Lazarus, A., van de Rostyne, J. L., Cunningham, J. M., Kardia, S. L. R. (2010): Comparison of the DNA methylation profiles of human peripheral blood cells and transformed B-lymphocytes. *Hum Genet*, 127, 651–658
124. MacKinney, A. A. (1978): Effect of aging on the peripheral blood lymphocyte count. *J Gerontol*, 33, 213–216
125. Díaz-Jouanen, E., Strickland, R. G., Williams, R. C. (1975): Studies of human lymphocytes in the newborn and the aged. *Am J Med*, 58, 620–628
126. Movérare-Skrtic, S., Mellström, D., Vandenput, L., Ehrich, M., Ohlsson, C. (2009): Peripheral blood leukocyte distribution and body mass index are associated with the methylation pattern of the androgen receptor promoter. *Endocrine*, 35, 204–210
127. Adalsteinsson, B. T., Gudnason, H., Aspelund, T., Harris, T. B., Launer, L. J., Eiriksdottir, G., Smith, A. V., Gudnason, V. (2012): Heterogeneity in white blood cells has potential to confound DNA methylation measurements. *PLoS One*, 7, e46705
128. Talens, R. P., Boomsma, D. I., Tobi, E. W., Kremer, D., Jukema, J. W., Willemsen, G., Putter, H., Slagboom, P. E., Heijmans, B. T. (2010): Variation, patterns, and temporal stability of DNA methylation. Considerations for epigenetic epidemiology. *FASEB J*, 24, 3135–3144
129. Bell, J. T., Tsai, P.-C., Yang, T.-P., Pidsley, R., Nisbet, J., Glass, D., Mangino, M., Zhai, G., Zhang, F., Valdes, A., Shin, S.-Y., Dempster, E. L., Murray, R. M., Grundberg, E., Hedman, A. K., Nica, A., Small, K. S., Dermitzakis, E. T., McCarthy, M. I., Mill, J., Spector, T. D., Deloukas, P. (2012): Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genet*, 8, e1002629
130. Lai, A. Y., Mav, D., Shah, R., Grimm, S. A., Phadke, D., Hatzi, K., Melnick, A., Geigerman, C., Sobol, S. E., Jaye, D. L., Wade, P. A. (2013): DNA methylation profiling in human B cells reveals immune

- regulatory elements and epigenetic plasticity at Alu elements during B-cell activation. *Genome Res*, 23, 2030–2041
131. Nera, K.-P., Kyläniemi, M. K., Lassila, O. (2015): Regulation of B cell to plasma cell transition within the follicular B cell response. *Scand J Immunol*, 82, 225–234
132. Morbach, H., Eichhorn, E. M., Liese, J. G., Girschick, H. J. (2010): Reference values for B cell subpopulations from infancy to adulthood. *Clin Exp Immunol*, 162, 271–279
133. Martín-Subero, J. I., Kreuz, M., Bibikova, M., Bentink, S., Ammerpohl, O., Wickham-Garcia, E., Rosolowski, M., Richter, J., Lopez-Serra, L., Ballestar, E., Berger, H., Agirre, X., Bernd, H.-W., Calvanese, V., Cogliatti, S. B., Drexler, H. G., Fan, J.-B., Fraga, M. F., Hansmann, M. L., Hummel, M., Klapper, W., Korn, B., Küppers, R., MacLeod, R. A. F., Möller, P., Ott, G., Pott, C., Prosper, F., Rosenwald, A., Schwaenen, C., Schübeler, D., Seifert, M., Stürzenhofecker, B., Weber, M., Wessendorf, S., Loeffler, M., Trümper, L., Stein, H., Spang, R., Esteller, M., Barker, D., Hasenclever, D., Siebert, R. (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
134. Salaverria, I., Siebert, R. (2011): The gray zone between Burkitt's lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma from a genetics perspective. *J Clin Oncol*, 29, 1835–1843
135. Oakes, C. C., Seifert, M., Assenov, Y., Gu, L., Przekopowicz, M., Ruppert, A. S., Wang, Q., Imbusch, C. D., Serva, A., Koser, S. D., Brocks, D., Lipka, D. B., Bogatyrova, O., Weichenhan, D., Brors, B., Rassenti, L., Kipps, T. J., Mertens, D., Zapatka, M., Lichter, P., Döhner, H., Küppers, R., Zenz, T., Stilgenbauer, S., Byrd, J. C., Plass, C. (2016): DNA methylation dynamics during B cell maturation underlie a continuum of disease phenotypes in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*, 48, 253–264
136. Queirós, A. C., Beekman, R., Vilarrasa-Blasi, R., Duran-Ferrer, M., Clot, G., Merkel, A., Raineri, E., Russiñol, N., Castellano, G., Beà, S., Navarro, A., Kulis, M., Verdaguer-Dot, N., Jares, P., Enjuanes, A., Calasanz, M. J., Bergmann, A., Vater, I., Salaverria, I., van de Werken, H. J. G., Wilson, W. H., Datta, A., Flicek, P., Royo, R., Martens, J., Giné, E., Lopez-Guillermo, A., Stunnenberg, H. G., Klapper, W., Pott, C., Heath, S., Gut, I. G., Siebert, R., Campo, E., Martín-Subero, J. I. (2016): Decoding the DNA methylome of mantle cell lymphoma in the light of the entire B cell lineage. *Cancer Cell*, 30, 806–821
137. Golbabapour, S., Majid, N. A., Hassandarvish, P., Hajrezaie, M., Abdulla, M. A., Hadi, A. H. A. (2013): Gene silencing and Polycomb group proteins. An overview of their structure, mechanisms and phylogenetics. *OMICS*, 17, 283–296
138. Sparmann, A., van Lohuizen, M. (2006): Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 846–856

139. Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K., Koseki, H., Fuchikami, T., Abe, K., Murray, H. L., Zucker, J. P., Yuan, B., Bell, G. W., Herbolsheimer, E., Hannett, N. M., Sun, K., Odom, D. T., Otte, A. P., Volkert, T. L., Bartel, D. P., Melton, D. A., Gifford, D. K., Jaenisch, R., Young, R. A. (2006): Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 125, 301–313
140. van Kemenade, F. J., Raaphorst, F. M., Blokzijl, T., Fieret, E., Hamer, K. M., Satijn, D. P., Otte, A. P., Meijer, C. J. (2001): Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood*, 97, 3896–3901
141. Horvath, S., Pirazzini, C., Bacalini, M. G., Gentilini, D., Di Blasio, A. M., Delledonne, M., Mari, D., Arosio, B., Monti, D., Passarino, G., Rango, F. de, D'Aquila, P., Giuliani, C., Marasco, E., Collino, S., Descombes, P., Garagnani, P., Franceschi, C. (2015): Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging (Albany NY)*, 7, 1159–1170
142. Perna, L., Zhang, Y., Mons, U., Holleccek, B., Saum, K.-U., Brenner, H. (2016): Epigenetic age acceleration predicts cancer, cardiovascular, and all-cause mortality in a German case cohort. *Clin Epigenetics*, 8, 64
143. Breitling, L. P., Saum, K.-U., Perna, L., Schöttker, B., Holleccek, B., Brenner, H. (2016): Frailty is associated with the epigenetic clock but not with telomere length in a German cohort. *Clin Epigenetics*, 8, 21
144. Zheng, Y., Joyce, B. T., Colicino, E., Liu, L., Zhang, W., Dai, Q., Shrubsole, M. J., Kibbe, W. A., Gao, T., Zhang, Z., Jafari, N., Vokonas, P., Schwartz, J., Baccarelli, A. A., Hou, L. (2016): Blood epigenetic age may predict cancer incidence and mortality. *EBioMedicine*, 5, 68–73
145. Levine, M. E., Hosgood, H. D., Chen, B., Absher, D., Assimes, T., Horvath, S. (2015): DNA methylation age of blood predicts future onset of lung cancer in the women's health initiative. *Aging (Albany NY)*, 7, 690–700
146. Marwitz, S., Kolarova, J., Reck, M., Reinmuth, N., Kugler, C., Schädlich, I., Haake, A., Zabel, P., Vollmer, E., Siebert, R., Goldmann, T., Ammerpohl, O. (2014): The tissue is the issue. Improved methylome analysis from paraffin-embedded tissues by application of the HOPE technique. *Lab Invest*, 94, 927–933
147. Jasmine, F., Rahaman, R., Roy, S., Raza, M., Paul, R., Rakibuz-Zaman, M., Paul-Brutus, R., Dodsworth, C., Kamal, M., Ahsan, H., Kibriya, M. G. (2012): Interpretation of genome-wide Infinium methylation data from ligated DNA in formalin-fixed, paraffin-embedded paired tumor and normal tissue. *BMC Res Notes*, 5, 117
148. Kitazawa, S., Kitazawa, R., Maeda, S. (2000): Identification of methylated cytosine from archival formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Lab Invest*, 80, 275–276

- 149.Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S. (2002): Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*, 161, 1961–1971
- 150.Thirlwell, C., Eymard, M., Feber, A., Teschendorff, A., Pearce, K., Lechner, M., Widschwendter, M., Beck, S. (2010): Genome-wide DNA methylation analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue using the Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip. *Methods*, 52, 248–254
- 151.Moran, S., Vizoso, M., Martínez-Cardús, A., Gomez, A., Matías-Guiu, X., Chiavenna, S. M., Fernandez, A. G., Esteller, M. (2014): Validation of DNA methylation profiling in formalin-fixed paraffin-embedded samples using the Infinium HumanMethylation450 Microarray. *Epigenetics*, 9, 829–833
- 152.Olert, J., Wiedorn, K. H., Goldmann, T., Köhl, H., Mehraein, Y., Scherthan, H., Niketeghad, F., Vollmer, E., Müller, A. M., Müller-Navia, J. (2001): HOPE fixation. A novel fixing method and paraffin-embedding technique for human soft tissues. *Pathol Res Pract*, 197, 823–826
- 153.Warnecke, P. M., Stirzaker, C., Song, J., Grunau, C., Melki, J. R., Clark, S. J. (2002): Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods*, 27, 101–107
- 154.Ammerpohl, O., Martín-Subero, J. I., Richter, J., Vater, I., Siebert, R. (2009): Hunting for the 5th base. Techniques for analyzing DNA methylation. *Biochim Biophys Acta*, 1790, 847–862
- 155.Dedeurwaerder, S., Defrance, M., Calonne, E., Denis, H., Sotiriou, C., Fuks, F. (2011): Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. *Epigenomics*, 3, 771–784
- 156.Ammerpohl, O., Bens, S., Siebert, R. (2013): Der Über-Code der DNA. Epigenetische Mechanismen und deren Bedeutung für die Entstehung von Krankheiten. *J Lab Med*, 37, 317–328
- 157.Duffy, M. J. (2015): Use of biomarkers in screening for cancer. *Adv Exp Med Biol*, 867, 27–39
- 158.Ahuja, N., Sharma, A. R., Baylin, S. B. (2016): Epigenetic therapeutics. A new weapon in the war against cancer. *Annu Rev Med*, 67, 73–89
- 159.Dawson, M. A., Kouzarides, T. (2012): Cancer epigenetics. From mechanism to therapy. *Cell*, 150, 12–27
- 160.Levine, M. E., Lu, A. T., Quach, A., Chen, B. H., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A. A., Stewart, J. D., Li, Y., Whitsel, E. A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., Horvath, S. (2018): An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging (Albany NY)*, 10, 573–591

7 Anhang

Anhang 1: R-Skript des Kruskal-Wallis-Tests für *Qlucore Omics Explorer*

```
test <- function(data.matrix, formel, predictor.df, coeff) {  
  if (is.null(rownames(data.matrix)))  
    rownames(data.matrix) <- 1:nrow(data.matrix)  
  
  fm <- formula(paste(c("u", formel), collapse = ""))  
  
  mainfactors <- attr(terms(fm), "term.labels")  
  
  res <- apply(data.matrix, 1, function(u) {  
    kruskal.test(fm, data = cbind(u, predictor.df))  
  })  
  
  pvals <- sapply(res, function(u) u$p.value)  
  
  stats <- sapply(res, function(u) u$statistic)  
  
  names(pvals) <- names(stats) <- rownames(data.matrix)  
  
  return(list(pvals = pvals, stats = stats))  
}
```

```
test.info <- function(testData) {  
  testData$test_type = 2  
  
  testData$batch_effect = 0  
  
  testData$unique_test_name = "kruskal_wallis"  
  
  return(testData)  
}
```

Anhang 2: Histogramm der auffälligen Verteilung der Beta-Werte der FFPE-BL-Probe

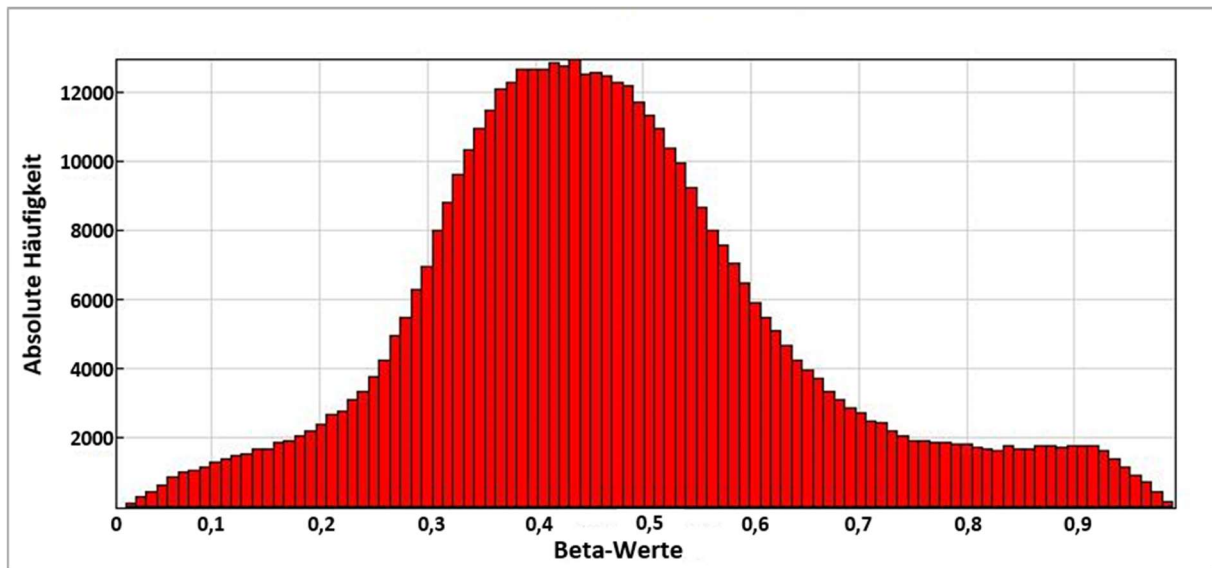


Abbildung 23: Histogramm der Beta-Werte-Verteilung der FFPE-BL-Probe, welche aufgrund ihrer auffälligen unimodalen Verteilung der Beta-Werte von der Auswertung ausgeschlossen wurde.

Anhang 3: Heatmap der Methylierungswerte der Blut-, Lymphom- und B-Zell-Proben vor Ausschluss der FFPE-BL-Proben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus

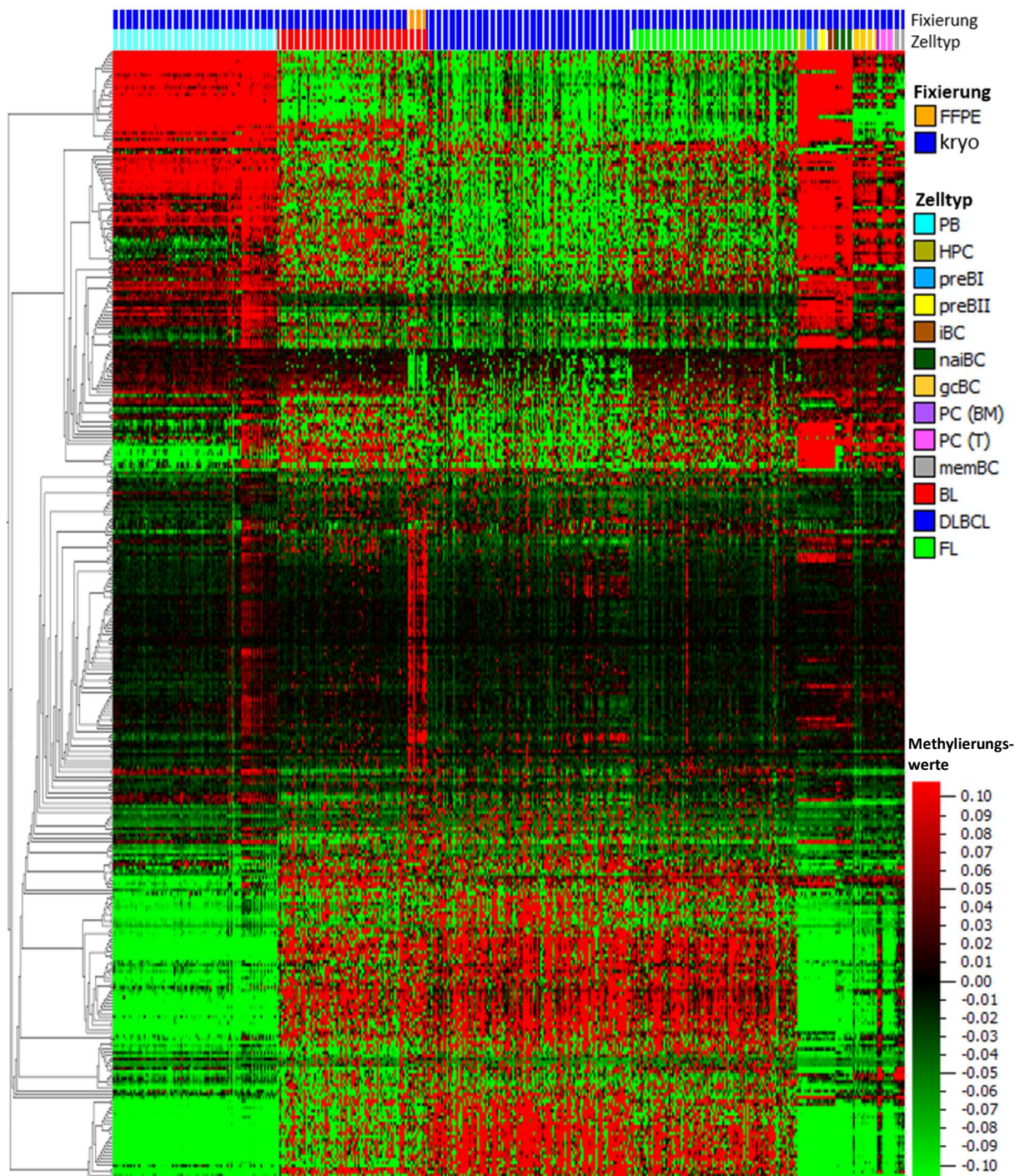


Abbildung 24: Heatmap der Methylierungswerte der 456 Blut-, Lymphom- und B-Zell-Reifestadien-Proben, welche die Qualitätskriterien abgesehen von der Batch-Effekt-Analyse erfüllten, für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus. Proben nach Zelltyp angeordnet und nach Fixierungsmethode sowie Zelltyp farbcodiert, CpG-Loci hierarchisch geclustert nach w.avg.-Methode, Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode. Die Proben sind in Spalten und die CpG-Loci in Zeilen angeordnet. Hohe Methylierungswerte sind in rot, niedrige Methylierungswerte in grün dargestellt. FFPE, Formalin-fixiert Paraffin-eingebettet; kryo, kryofixiert; PB, peripheres Blut; HPC, hämatopoetische Progenitorzellen; preBI, Pro-B-Zellen; preBII, Prä-B-Zellen; iBC, unreife B-Zellen; naiBC, naive B-Zellen; gcBC, Keimzentrums-B-Zellen; PC (BM), Plasmazellen (Knochenmark); PC (T), Plasmazellen (Tonsillen); memBC, B-Gedächtniszellen; BL, Burkitt-Lymphom; DLBCL, Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; FL, Follikuläres Lymphom.

Anhang 4: PCA der Methylierungswerte der 86 kryofixierten und FFPE-BL-Proben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus

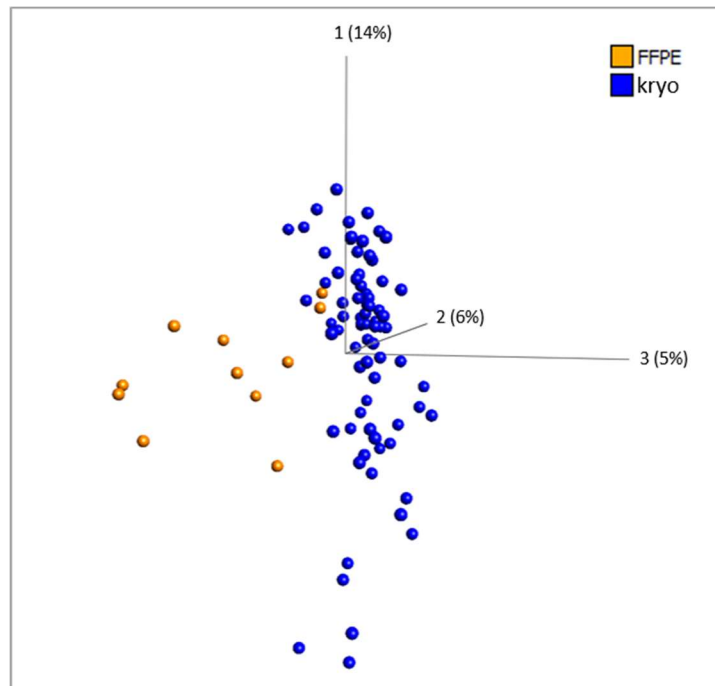


Abbildung 25: PCA der Methylierungswerte der 86 BL-Proben, welche die Qualitätskriterien abgesehen von der Batch-Effekt-Analyse erfüllten, für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus. Proben nach Fixierungsmethode angefärbt: Formalinfixiert Paraffin-eingebettet (FFPE, orange), kryofixiert (kryo, blau). Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode.

Anhang 5: Heatmap der Methylierungswerte der 86 kryofixierten und FFPE-BL-Proben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus

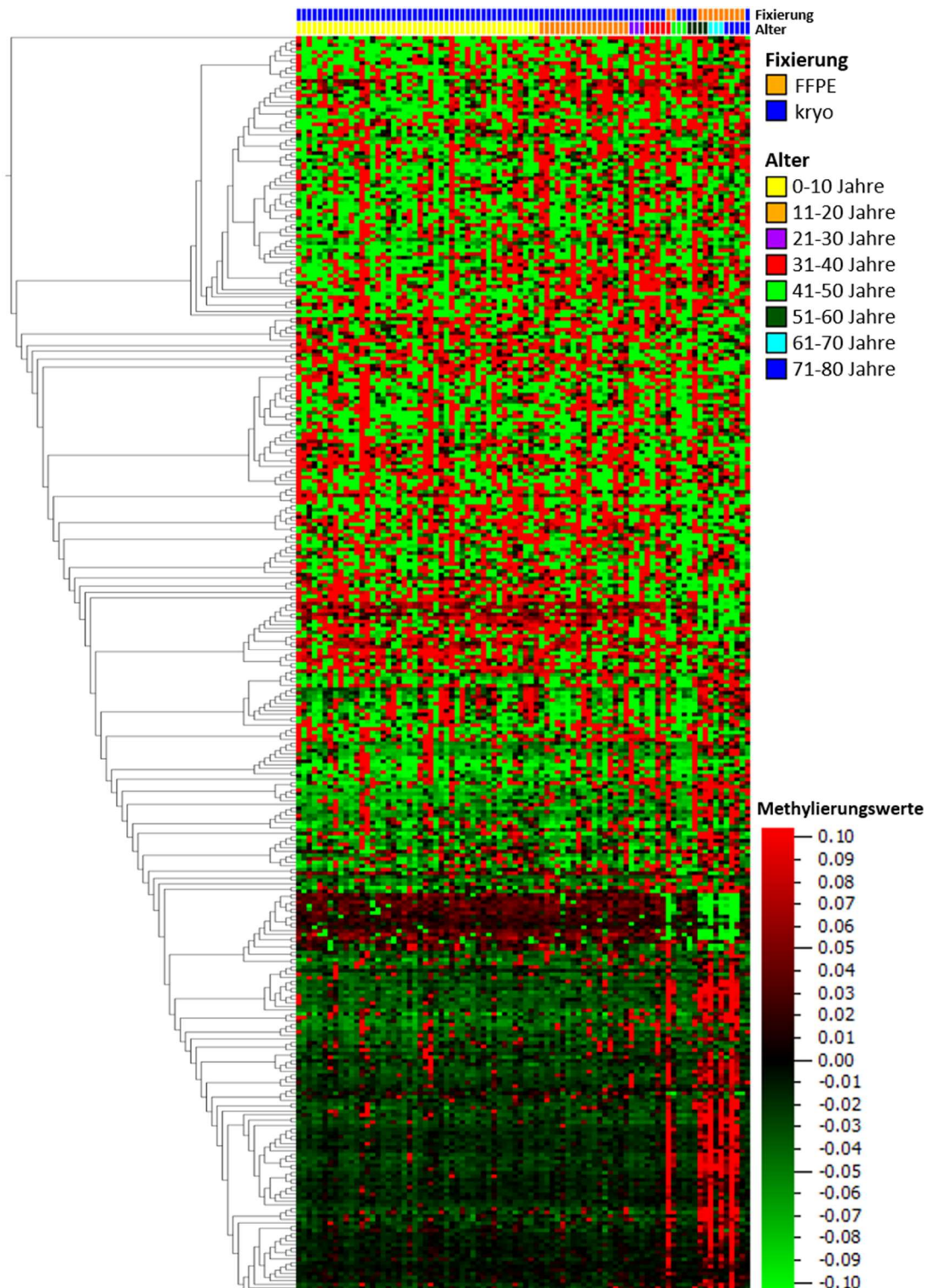


Abbildung 26: Heatmap der Methylierungswerte der 86 BL-Proben, welche die Qualitätskriterien abgesehen von der Batch-Effekt-Analyse erfüllten, für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus. Proben nach chronologischem Alter aufsteigend angeordnet und nach Fixierungsmethode sowie chronologischem Alter farbcodiert, CpG-Loci hierarchisch geclustert nach w.avg.-Methode, Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode. Die Proben sind in Spalten und die CpG-Loci in Zeilen angeordnet. Hohe Methylierungswerte sind in rot, niedrige Methylierungswerte in grün dargestellt. FFPE, Formalin-fixiert Paraffin eingebettet; kryofixiert, kryofixiert.

Anhang 6: Box-Whisker-Plots der Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters nach Horvath der späten B-Zell-Reifestadien-Proben

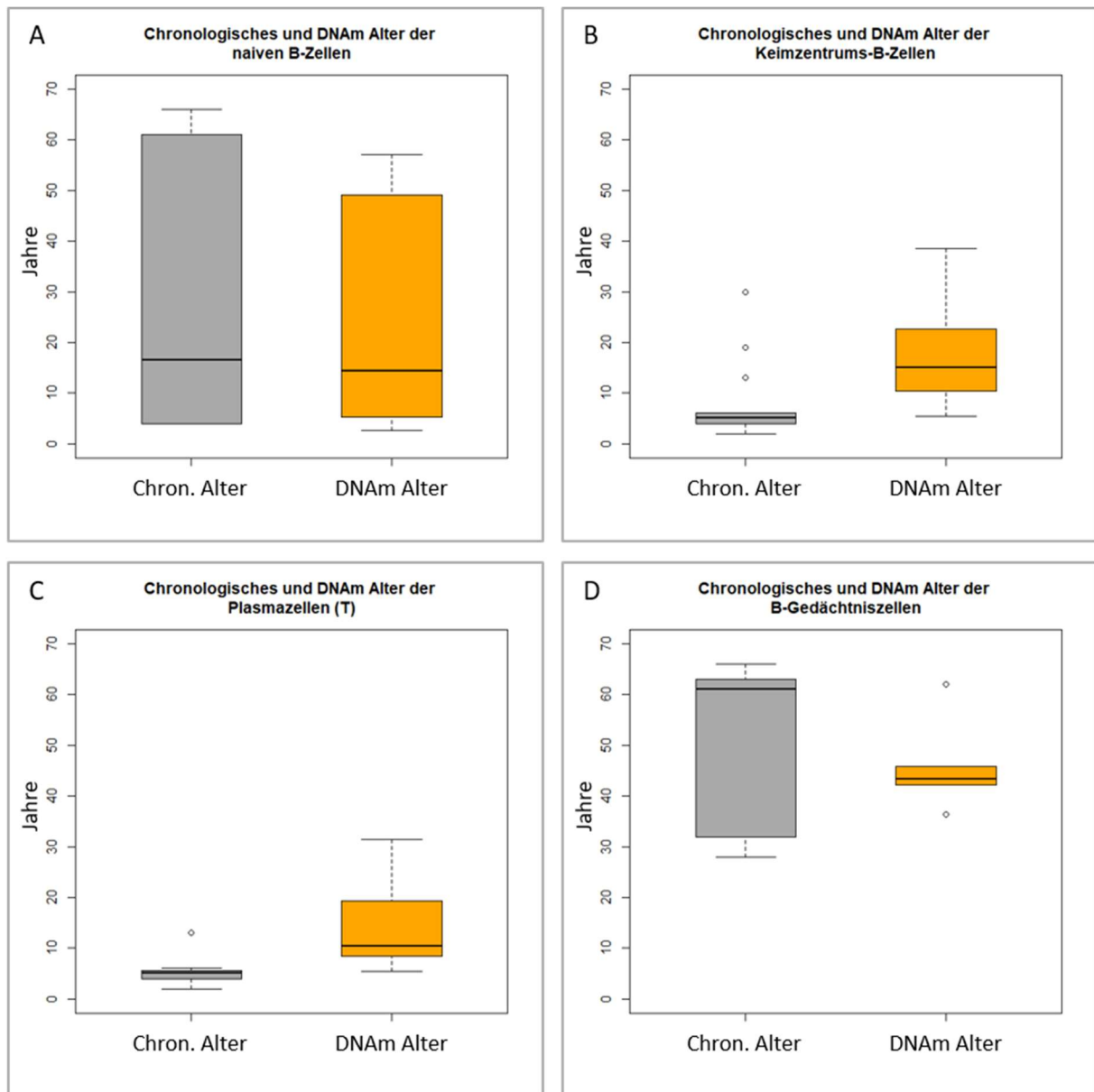


Abbildung 27: Box-Whisker-Plots der Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters nach Horvath der späten B-Zell-Reifestadien-Proben. A Naive B-Zellen aus PB und T, B Keimzentrums-B-Zellen aus T (ICGC MMML-Seq WPN, Kulis et al. [88]), C Plasmazellen aus T, D B-Gedächtniszellen aus PB. Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns. PB, Peripheres Blut; T, Tonsillen.

Anhang 7: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der naiven B-Zell-Proben aus peripherem Blut (PB) und Tonsillen (T)

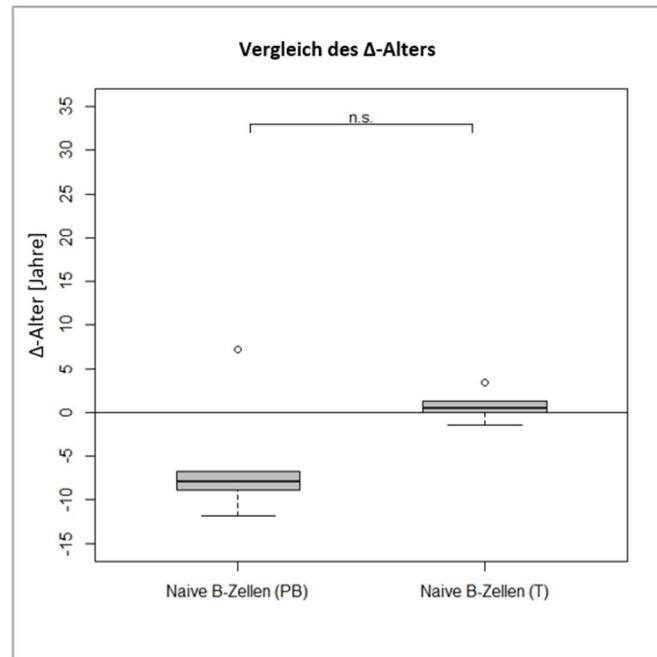


Abbildung 28: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) der naiven B-Zell-Proben aus peripherem Blut (PB, n=5) und Tonsillen (T, n=5). Der zweiseitige Wilcoxon-Rangsummentest zeigte keinen signifikanten Unterschied des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen ($p=0,1508$), dargestellt durch n.s. (nicht signifikant) über der Klammer. Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

Anhang 8: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der Keimzentrums-B-Zell-Proben aus dem ICGC MMML-Seq-Projekt Arbeitspaket WPN und der Studie von Kulis et al. [88]

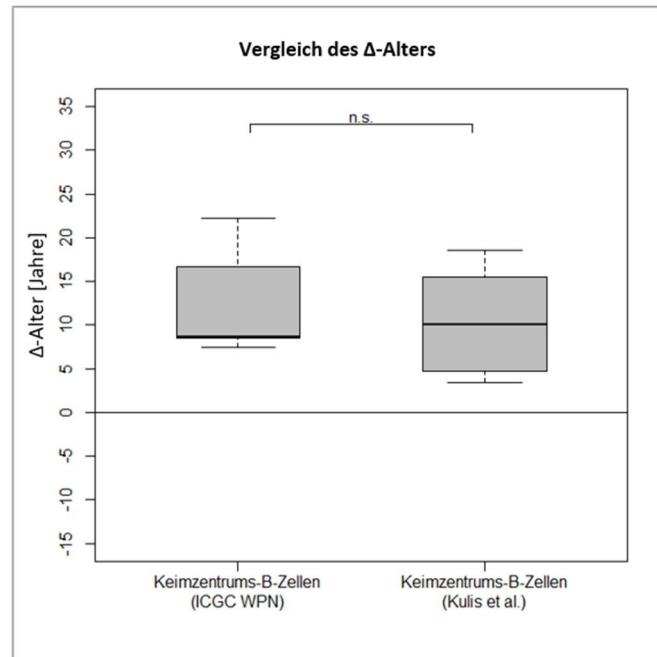


Abbildung 29: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) der Keimzentrums-B-Zell-Proben aus dem ICGC MMML-Seq-Projekt Arbeitspaket WPN (n=5) und der Studie von Kulis et al. [88] (n=9). Der zweiseitige Wilcoxon-Rangsummentest zeigte keinen signifikanten Unterschied des Δ -Alters zwischen den beiden Gruppen ($p=0,5185$), dargestellt durch n.s. (nicht signifikant) über der Klammer. Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskererenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze).

Anhang 9: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der Plasmazell-Proben aus dem Knochenmark (KM) und den Tonsillen (T)

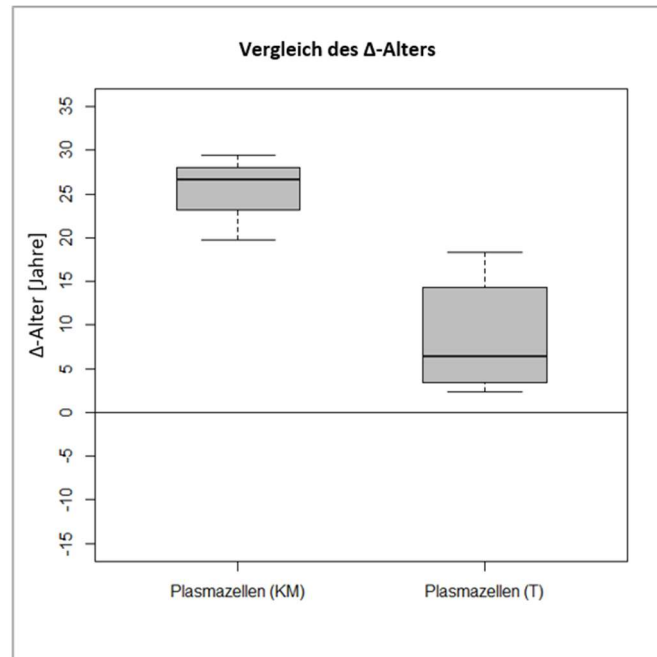


Abbildung 30: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) der Plasmazell-Proben aus dem Knochenmark (KM, n=3) und den Tonsillen (T, n=8). Statistisches Testen zwischen den beiden Gruppen schien bei geringer Fallzahl unzulässig. Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze).

Anhang 10: Box-Whisker-Plots der Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters nach Horvath der frühen B-Zell-Reifestadien-Proben

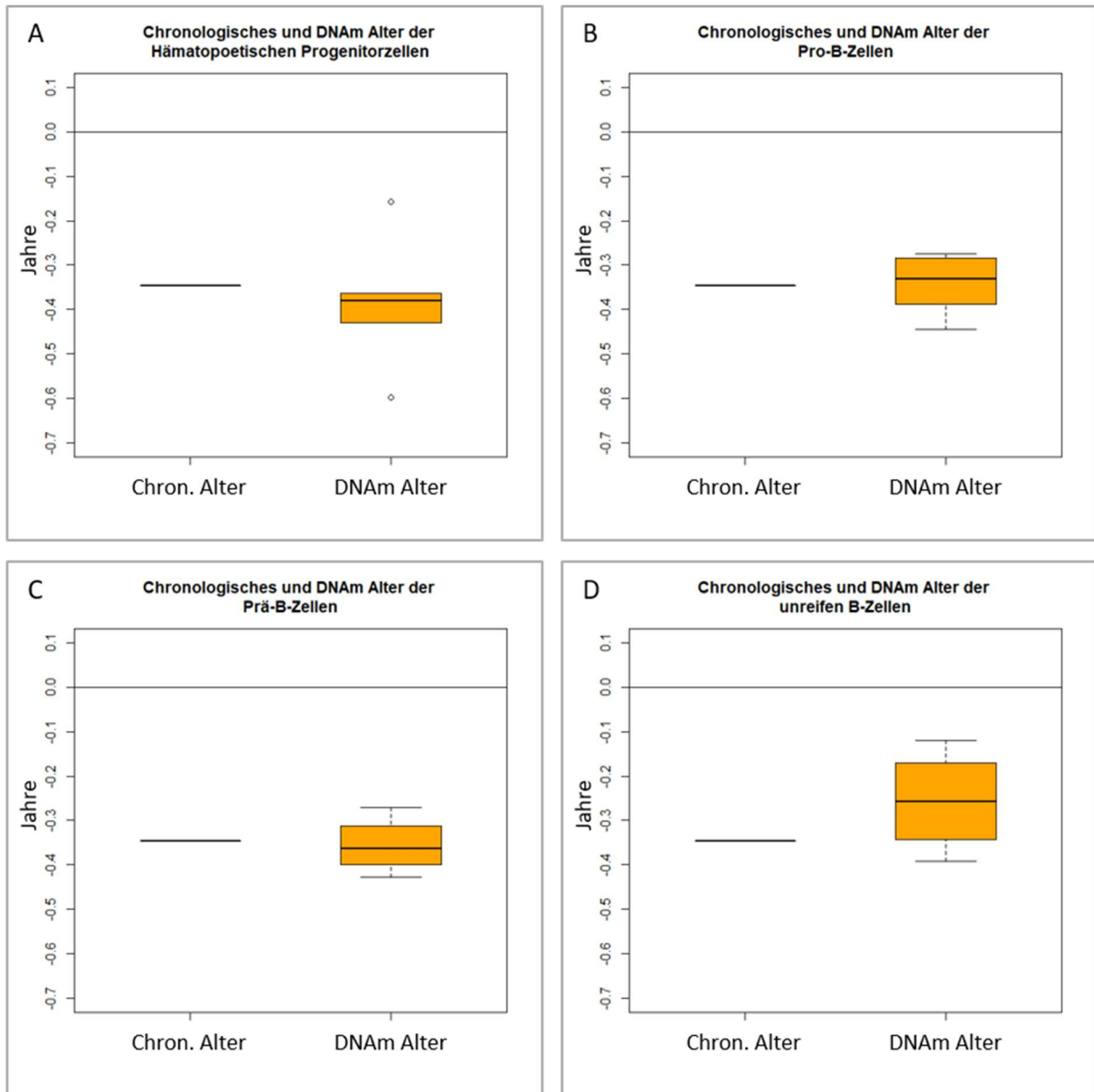


Abbildung 31: Box-Whisker-Plots der Verteilungen des chronologischen und DNAm Alters nach Horvath der frühen B-Zell-Reifestadien-Proben. A Hämatoopoetische Progenitorzellen, B Pro-B-Zellen, C Prä-B-Zellen, D unreife B-Zellen. Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

Anhang 11: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der Hämatopoetischen Progenitorzellen, Pro-B-Zellen, Prä-B-Zellen und unreifen B-Zellen

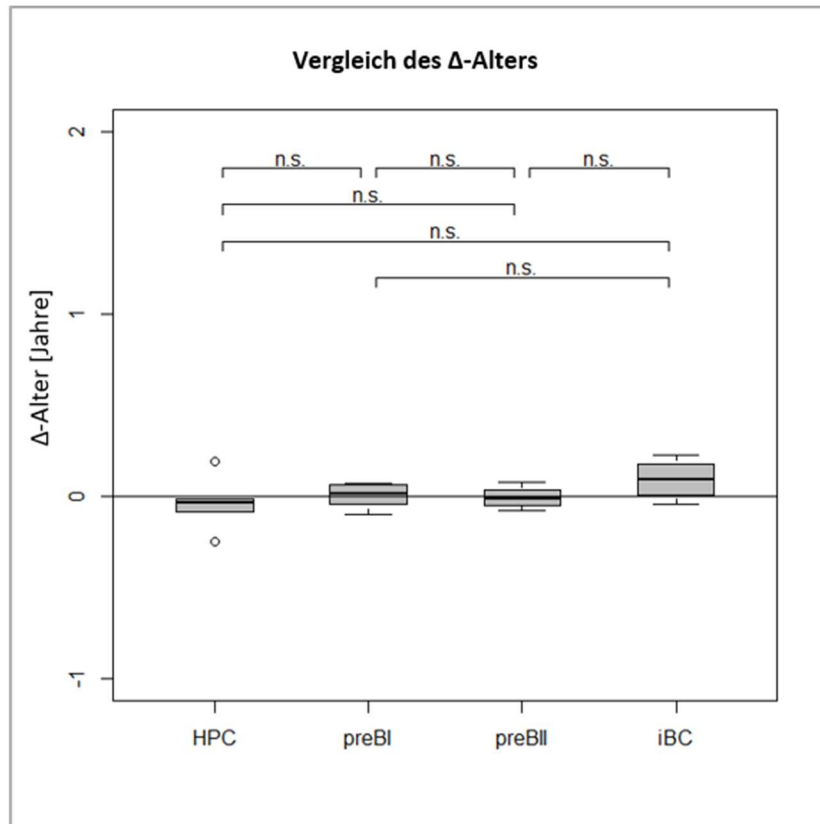


Abbildung 32: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) der Hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC), Pro-B-Zellen (preB1), Prä-B-Zellen (preBII) und unreifen B-Zellen (iBC). Im zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentest bestand kein signifikanter Unterschied im Δ -Alter zwischen den frühen B-Zell-Reifestadien (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$), dargestellt durch n.s. (nicht signifikant) über den Klammern. Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

Anhang 12: Streudiagramm des DNAm Alters nach Horvath über dem chronologischen Alter der Blut-, BL-, DLBCL- und FL-Proben

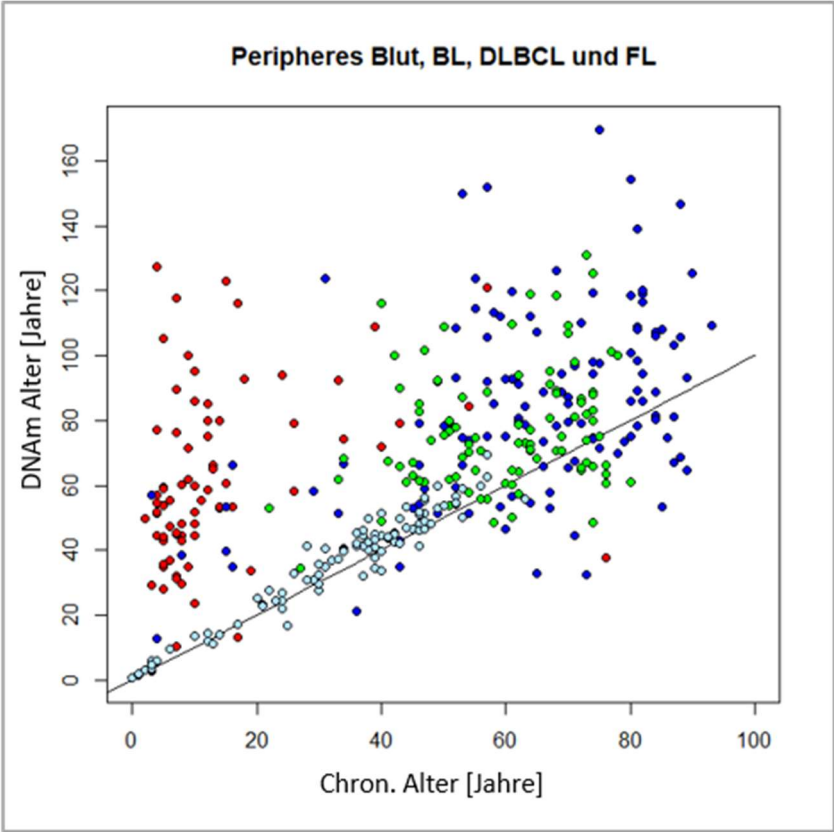


Abbildung 33: Streudiagramm des DNAm Alters nach Horvath über dem chronologischen Alter der Blut- (hellblau), BL- (rot), DLBCL- (dunkelblau) und FL-Proben (grün). Die schwarze Gerade stellt die Winkelhalbierende chronologisches Alter=DNAm Alter dar.

Anhang 13: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der BL-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben

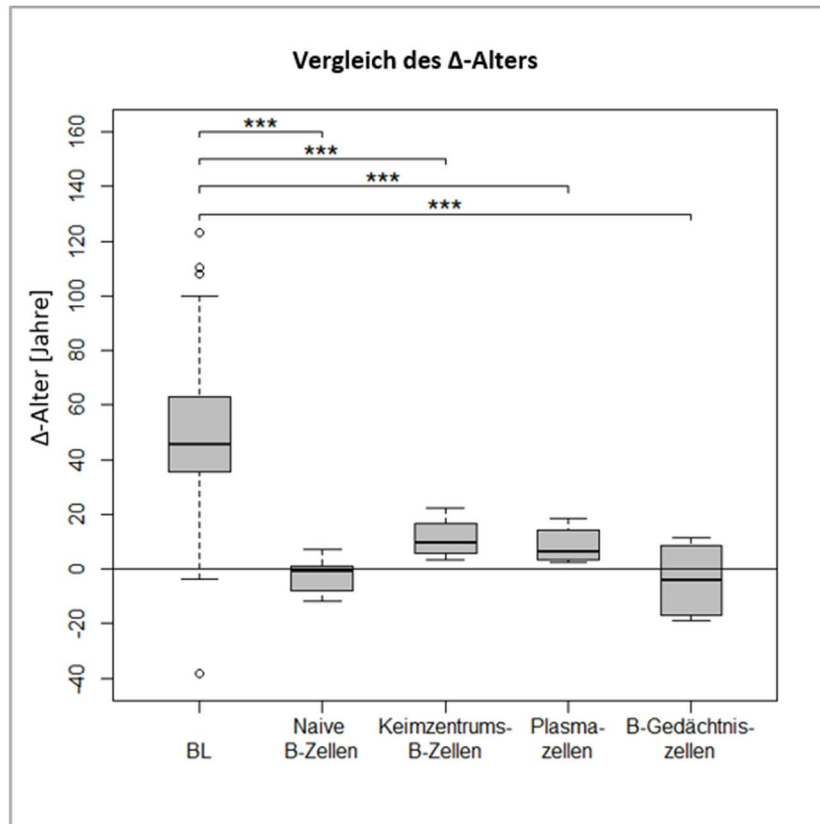


Abbildung 34: Box-Whisker-Plot mit Vergleich der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) zwischen den BL-Proben und den naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (Tonsillen) und B-Gedächtniszellen. Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen den Gruppen dar (* bei $p < 0.05$; ** bei $p < 0.01$; *** bei $p < 0.001$; n.s., nicht signifikant). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

Anhang 14: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der DLBCL-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben

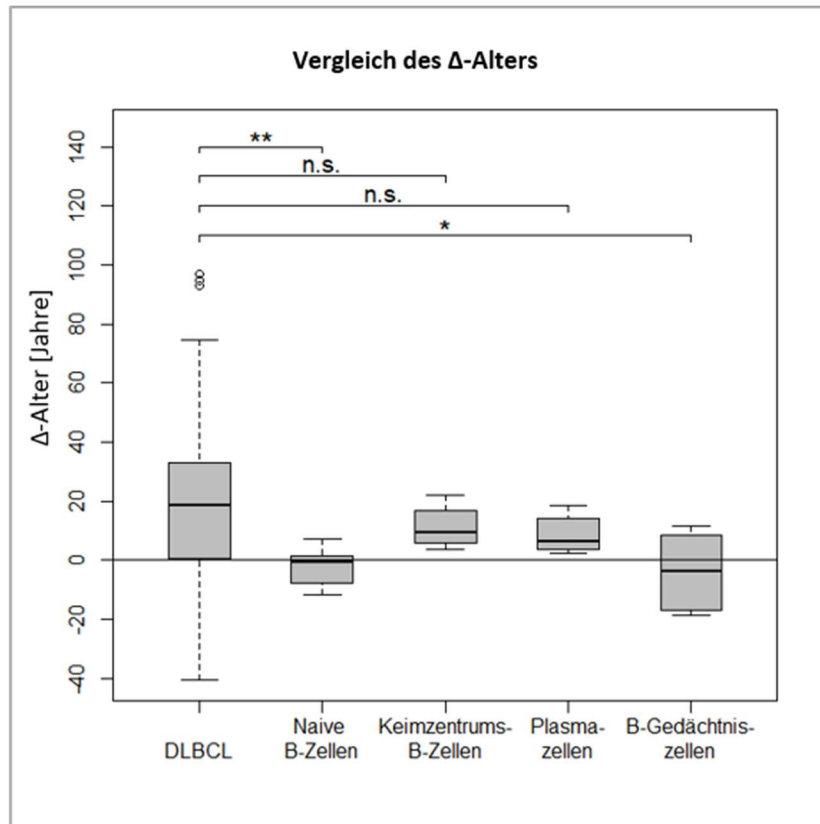


Abbildung 35: Box-Whisker-Plot mit Vergleich der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) zwischen den DLBCL-Proben und den naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (Tonsillen) und B-Gedächtniszellen. Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen den Gruppen dar (* bei $p < 0.05$; ** bei $p < 0.01$; *** bei $p < 0.001$; n.s., nicht signifikant). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

Anhang 15: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der GCB-DLBCL-, ABC-DLBCL- und Type-III-DLBCL-Proben (*Cell of Origin*-Klassifikation)

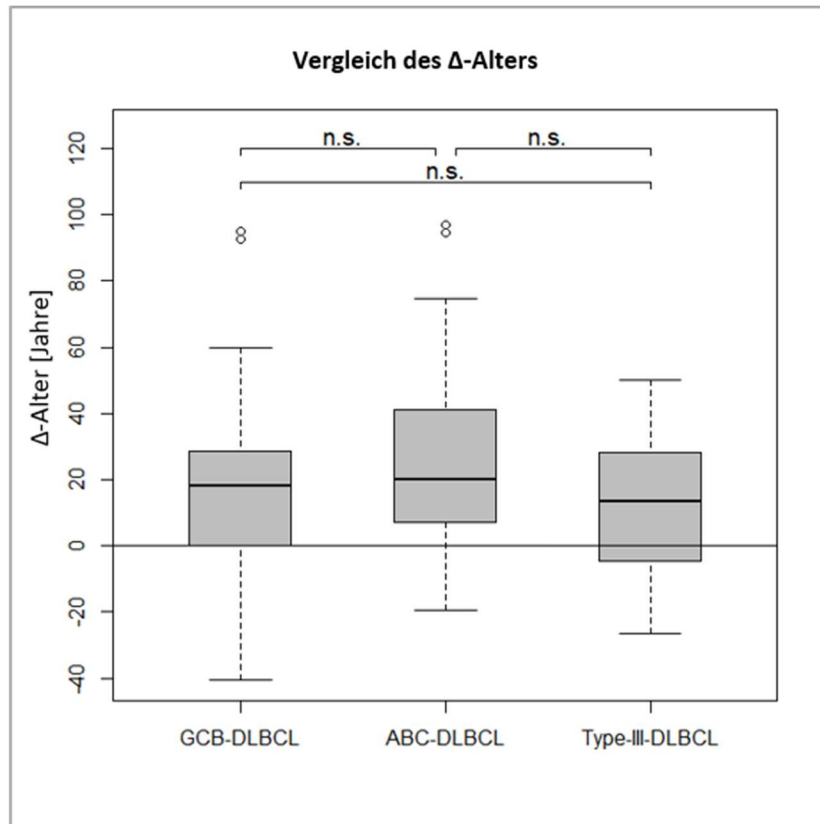


Abbildung 36: Box-Whisker-Plot mit Vergleich der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) zwischen den DLBCL-Untergruppen nach der Cell of Origin (COO)-Klassifikation GCB- (n=60), ABC- (n=34) und Type-III-DLBCL (n=14). Im zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentest bestand kein signifikanter Unterschied im Δ -Alter zwischen den COO-Untergruppen der DLBCL (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen dem Δ -Alter der Gruppen dar (n.s., nicht signifikant). 11 DLBCL-Proben waren nicht nach der COO-Klassifikation eingeteilt worden. Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns. GCB, germinal center B-cell subtype; ABC, activated B-cell subtype.

Anhang 16: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der GCB-DLBCL-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben

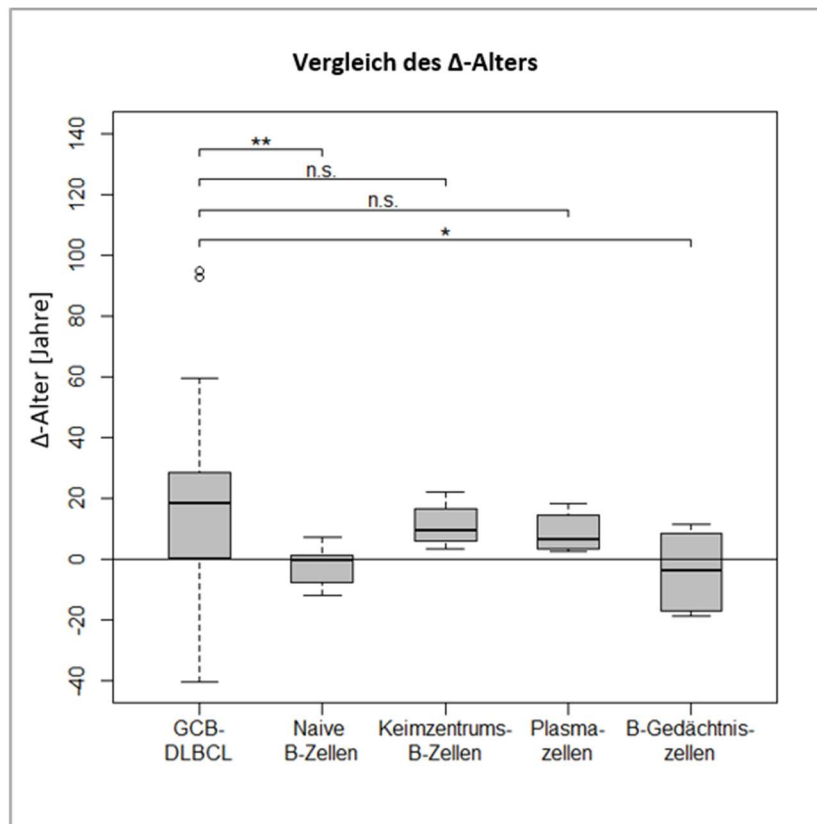


Abbildung 37: Box-Whisker-Plot mit Vergleich der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) zwischen den GCB-DLBCL-Proben und den naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (Tonsillen) und B-Gedächtniszellen. Während im zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentest das Δ -Alter der GCB-DLBCL-Proben signifikant sowohl vom Δ -Alter der naiven B-Zellen als auch der B-Gedächtniszellen abwich, konnte kein signifikanter Unterschied im Δ -Alter jeweils zwischen den GCB-DLBCL- und den Keimzentrums-B-Zell- bzw. Plasmazellproben festgestellt werden (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen dem Δ -Alter der Gruppen dar (* bei $p<0,05$; ** bei $p<0,01$; *** bei $p<0,001$; n.s., nicht signifikant). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns. GCB, germinal center B-cell subtype.

Anhang 17: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der ABC-DLBCL-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben

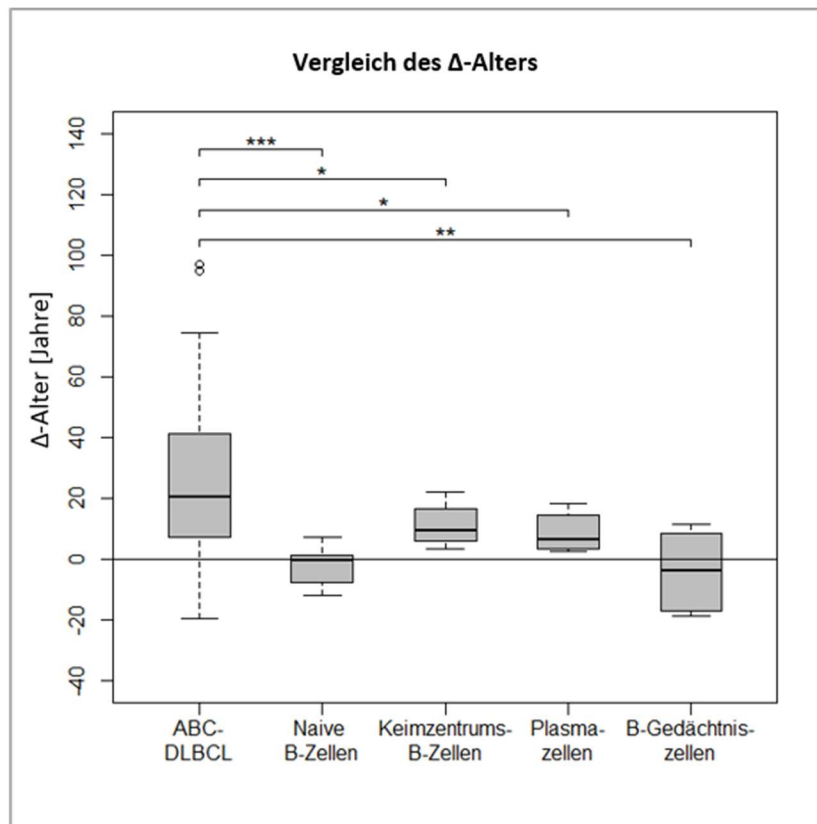


Abbildung 38: Box-Whisker-Plot mit Vergleich der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) zwischen den ABC-DLBCL-Proben und den naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (Tonsillen) und B-Gedächtniszellen. Im zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentest unterschied sich das Δ -Alter der ABC-DLBCL-Proben jeweils signifikant vom Δ -Alter der naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (Tonsillen) sowie B-Gedächtniszellen (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen dem Δ -Alter der Gruppen dar (* bei $p<0,05$; ** bei $p<0,01$; *** bei $p<0,001$; n.s., nicht signifikant). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns. ABC, activated B-cell subtype.

Anhang 18: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der Type-III-DLBCL-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben

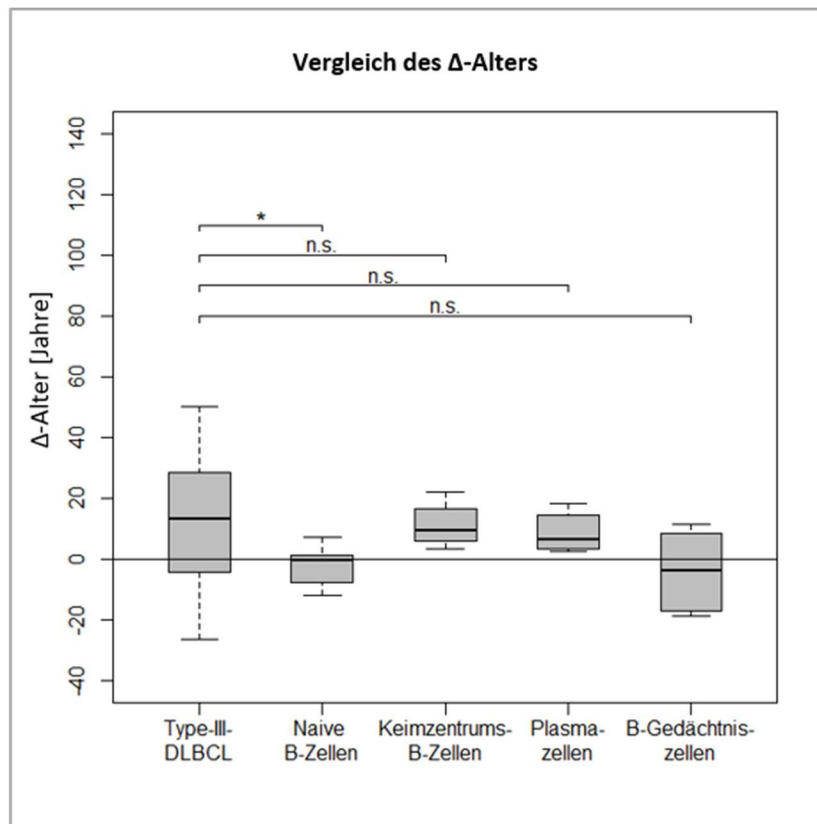


Abbildung 39: Box-Whisker-Plot mit Vergleich der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAM und chronologischem Alter) zwischen den Type-III-DLBCL-Proben und den naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (Tonsillen) und B-Gedächtniszellen. Während im zweiseitigen Wilcoxon-Rangsummentest das Δ -Alter der Type-III-DLBCL-Proben signifikant vom Δ -Alter der naiven B-Zellen abwich, konnte kein signifikanter Unterschied im Δ -Alter jeweils zwischen den Type-III-DLBCL- und den Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- bzw. B-Gedächtniszell-Proben festgestellt werden (Signifikanzniveau $\alpha=0,05$). Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen dem Δ -Alter der Gruppen dar (* bei $p<0,05$; ** bei $p<0,01$; *** bei $p<0,001$; n.s., nicht signifikant). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze).

Anhang 19: Box-Whisker-Plot der Verteilungen des Δ -Alters der FL-, naiven B-Zell-, Keimzentrums-B-Zell-, Plasmazell- und B-Gedächtniszell-Proben

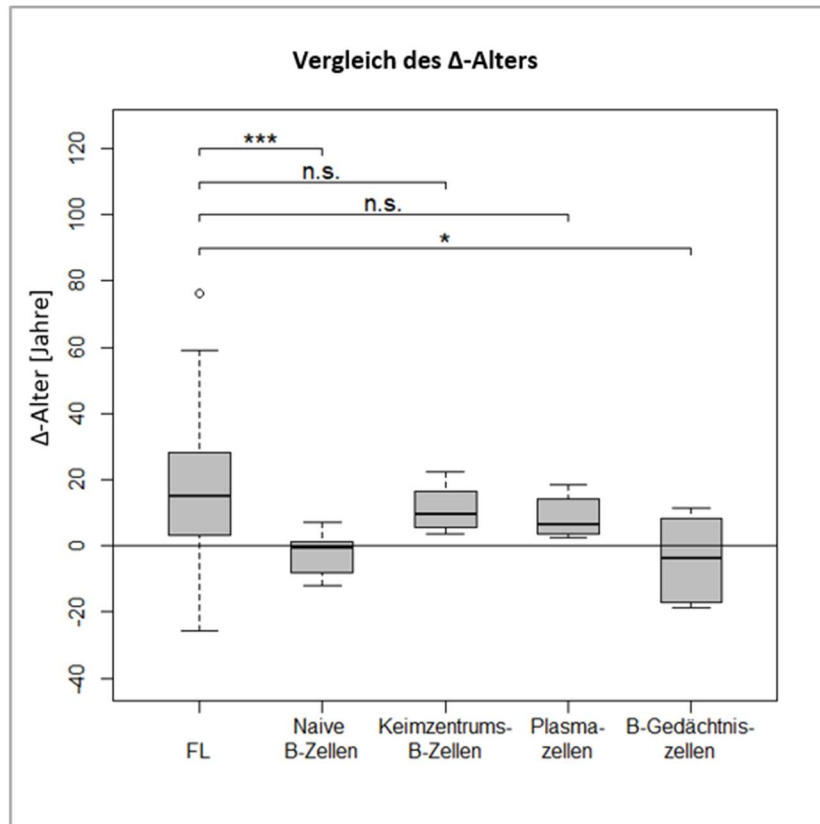


Abbildung 40: Box-Whisker-Plot mit Vergleich der Verteilungen des Δ -Alters (Differenz zwischen DNAm und chronologischem Alter) zwischen den FL-Proben und den naiven B-Zellen, Keimzentrums-B-Zellen, Plasmazellen (Tonsillen) und B-Gedächtniszellen. Die Zeichen über den Klammern stellen den p-Wert des Wilcoxon-Rangsummentests zwischen den Gruppen dar (* bei $p < 0.05$; ** bei $p < 0.01$; *** bei $p < 0.001$; n.s., nicht signifikant). Die Boxgrenzen sind durch das 1. und 3. Quartil definiert. Die Linie in der Box stellt den Median dar. Die Whiskerenden reichen bis zum minimalen bzw. maximalen Wert innerhalb des inneren Zauns (1,5-facher IQR ab Boxgrenze). Als mögliche Ausreißer gekennzeichnete Werte (o) liegen außerhalb des inneren Zauns.

Anhang 20: PCA der Methylierungswerte der Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus

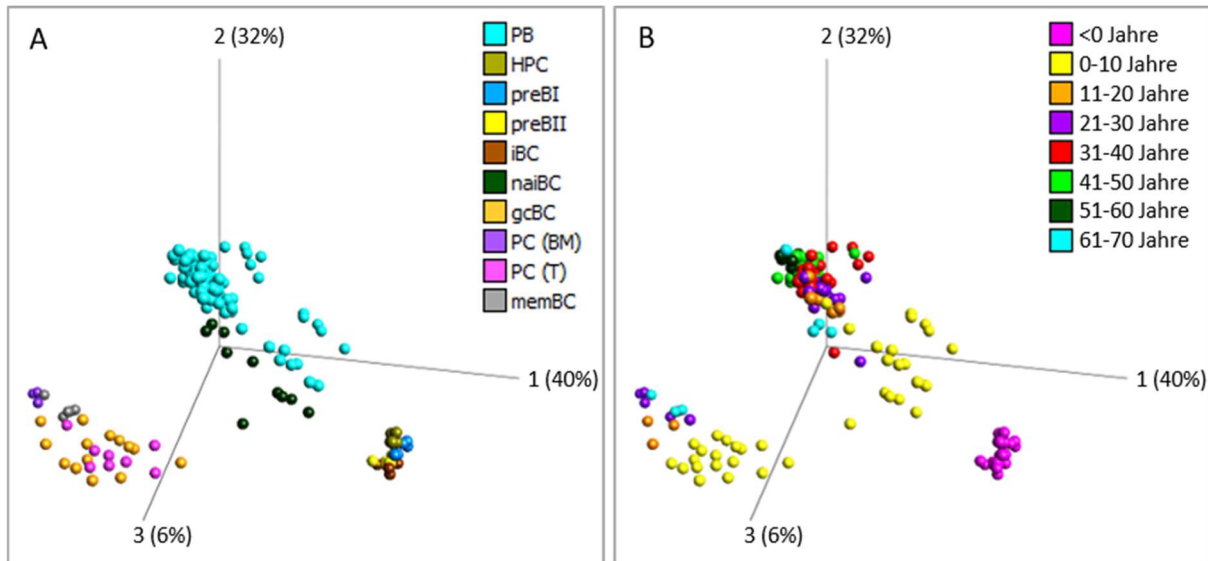


Abbildung 41: PCA der Methylierungswerte der Blut- und B-Zell-Reifestadien-Proben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus nach Horvath. A Proben nach Zelltyp angefärbt, B Proben nach chronologischem Alter angefärbt. Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode. PB, peripheres Blut; HPC, hämatopoetische Progenitorzellen; preBI, Pro-B-Zellen; preBII, Prä-B-Zellen; iBC, unreife B-Zellen; naiBC, naive B-Zellen; gcBC, Keimzentrums-B-Zellen; PC (BM), Plasmazellen (Knochenmark); PC (T), Plasmazellen (Tonsillen); memBC, B-Gedächtniszellen.

Anhang 21: Heatmap der Methylierungswerte der 445 Blut-, B-Zell- und Lymphomproben nach der Qualitätskontrolle für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus

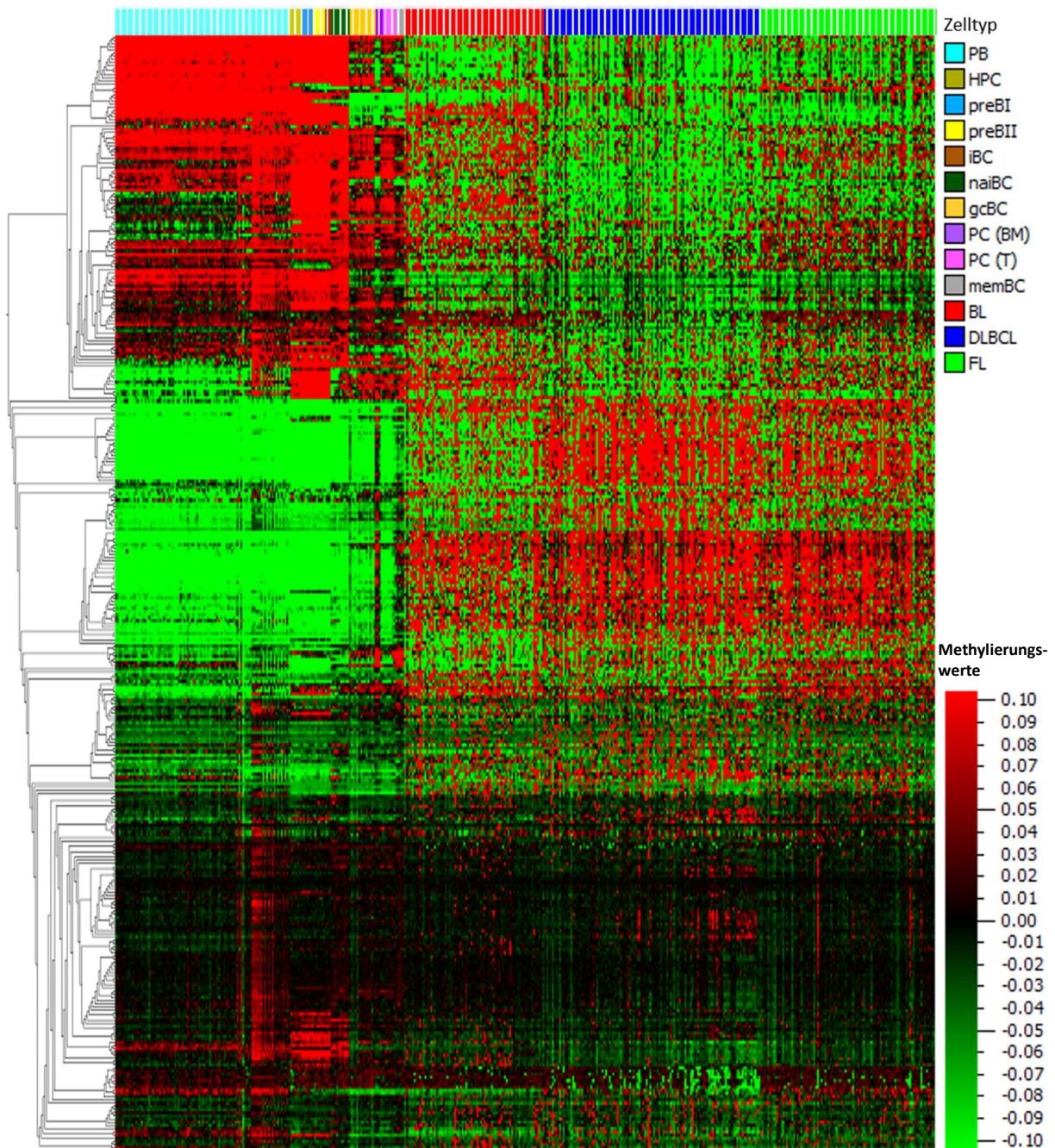


Abbildung 42: Heatmap der Methylierungswerte der 445 Blut-, B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben, welche die Qualitätskriterien erfüllten, für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus. Proben nach Zelltyp angeordnet und farbcodiert, CpG-Loci hierarchisch geclustert nach w.avg.-Methode, Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode. Die Proben sind in Spalten und die CpG-Loci in Zeilen angeordnet. Hohe Methylierungswerte sind in rot, niedrige Methylierungswerte in grün dargestellt. PB, peripheres Blut; HPC, hämatopoetische Progenitorzellen; preBI, Pro-B-Zellen; preBII, Prä-B-Zellen; iBC, unreife B-Zellen; naïBC, naive B-Zellen; gcBC, Keimzentrums-B-Zellen; PC (BM), Plasmazellen (Knochenmark); PC (T), Plasmazellen (Tonsillen); memBC, B-Gedächtniszellen; BL, Burkitt-Lymphom; DLBCL, Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; FL, Follikuläres Lymphom.

Anhang 22: PCA der Methylierungswerte der Blut- und Lymphomproben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus

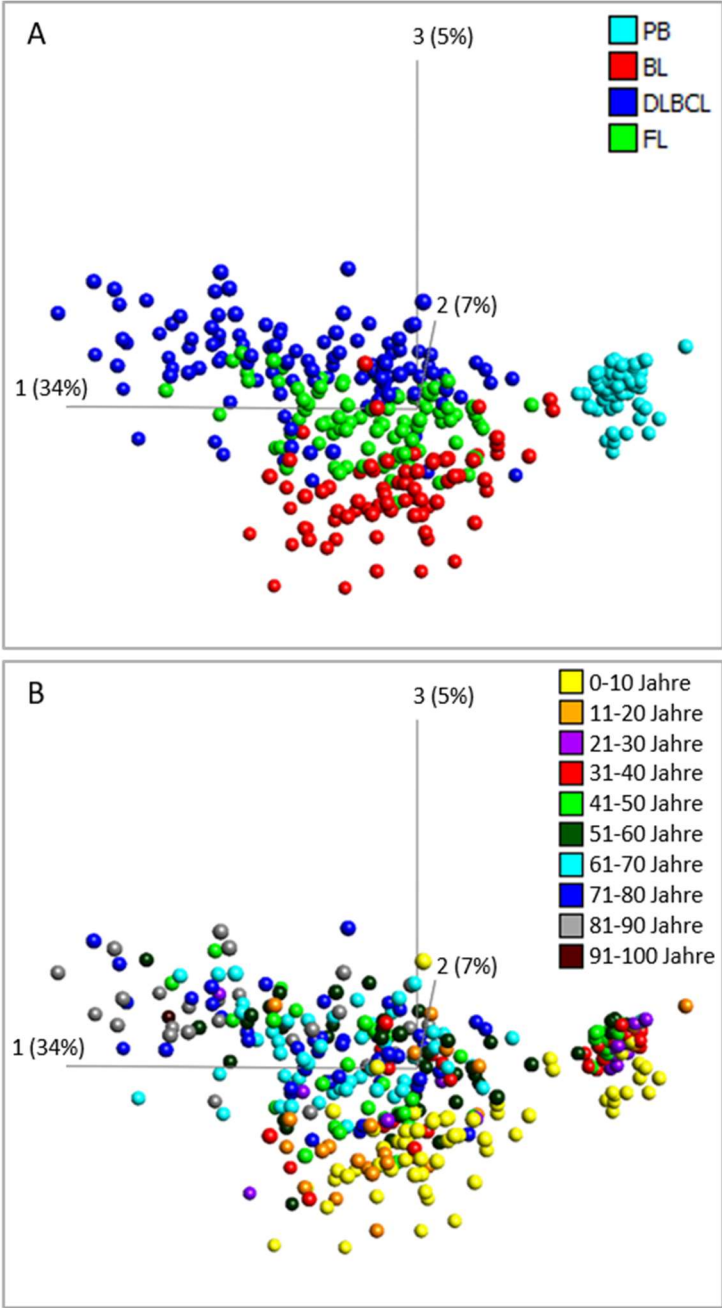


Abbildung 43: PCA der Methylierungswerte der peripheren Blut- (PB), BL-, DLBCL- und FL-Proben für die 349 CpG-Loci des DNAm Alter-Algorithmus. A Proben nach Zelltyp angefärbt, B Proben nach chronologischem Alter angefärbt. Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode.

Anhang 23: PCA der Methylierungswerte der Blutproben für die 70 Hannum-CpG-Loci mit graphischer Darstellung der B-Zell-Reifestadien-Proben

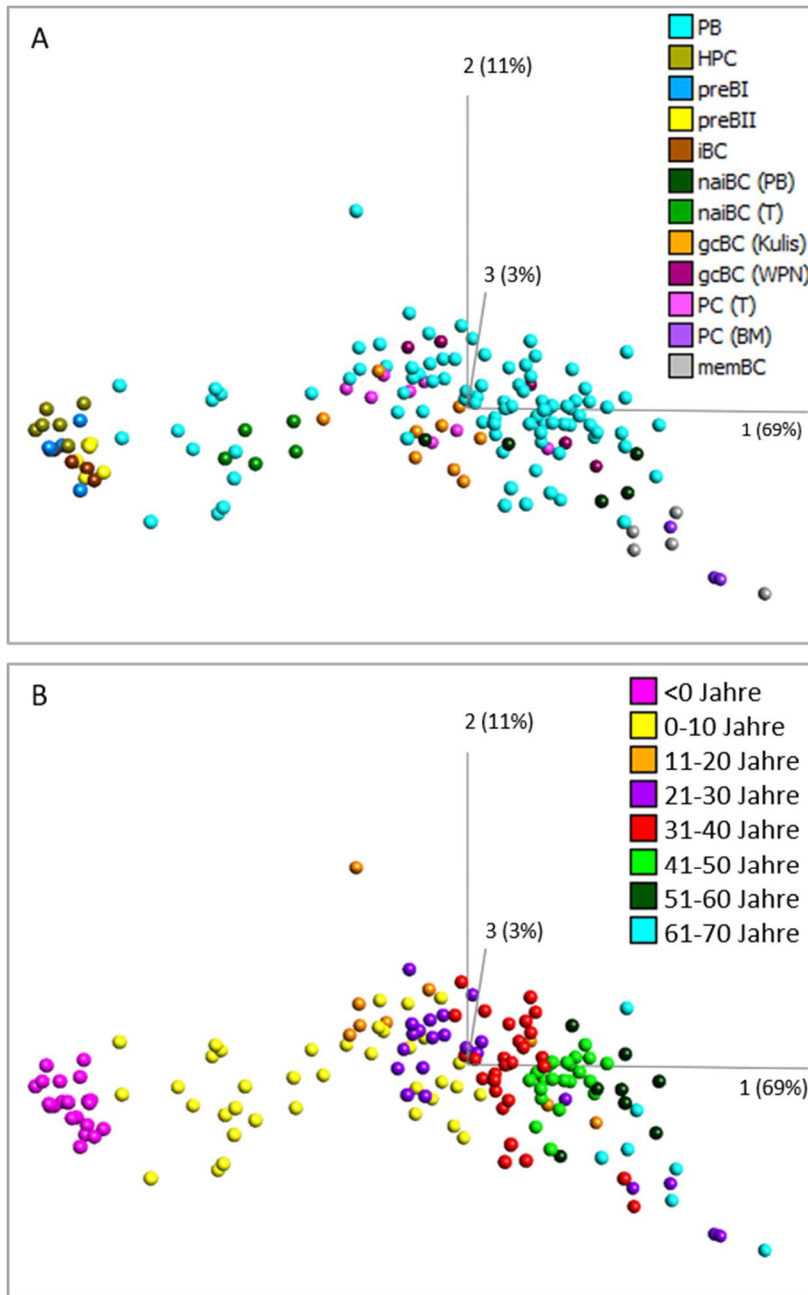


Abbildung 44: PCA der Methylierungswerte der peripheren Blutproben (PB) für die 70 Hannum-CpG-Loci. Zusätzlich werden die B-Zell-Reifestadien-Proben der hämatopoetischen Progenitorzellen (HPC), Pro-B-Zellen (preBI), Prä-B-Zellen (preBII), unreifen B-Zellen (iBC), naiven B-Zellen (peripheres Blut, naiBC(PB)), naiven B-Zellen (Tonsillen, naiBC(T)), Keimzentrums-B-Zellen aus Kulis et al. [88] (gcBC (Kulis)), Keimzentrums-B-Zellen aus ICGC MMML-Seq WPN (gcBC (WPN)), Plasmazellen (Tonsillen, PC (T)), Plasmazellen (Knochenmark, PC (BM)) und B-Gedächtniszellen (memBC) graphisch dargestellt. A Proben nach Zelltyp angefärbt, B Proben nach chronologischem Alter angefärbt. Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode.

Anhang 24: PCA der Methylierungswerte der Blutproben für die 70 Hannum-CpG-Loci mit graphischer Darstellung der B-Zell-Reifestadien- und Lymphomproben

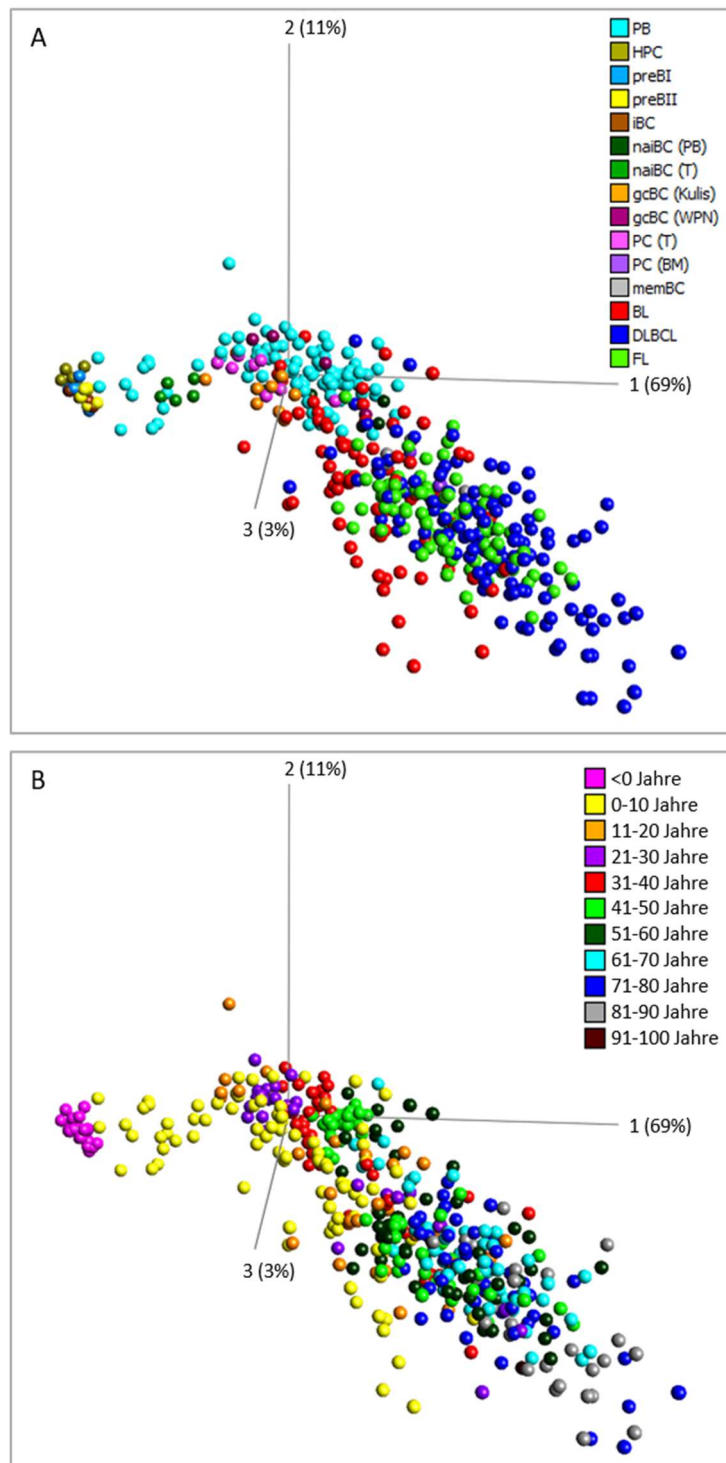


Abbildung 45: PCA der Methylierungswerte der peripheren Blutproben (PB) für die 70 Hannum-CpG-Loci. Zusätzlich werden die B-Zell-Reifestadien- sowie die BL-, DLBCL- und FL-Proben graphisch dargestellt. A Proben nach Zelltyp angefärbt, B Proben nach chronologischem Alter angefärbt. Rekonstruktion fehlender Beta-Werte mit kNN-Methode, Normalisierung mit „Mean=0“-Methode. PB, peripheres Blut; HPC, hämatopoetische Progenitorzellen; preBI, Pro-B-Zellen; preBII, Prä-B-Zellen; iBC, unreife B-Zellen; naïBC (PB), naive B-Zellen (PB); naïBC (T), naive B-Zellen (Tonsillen); gcBC (Kulis), Keimzentrums-B-Zellen aus Kulis et al. [88]; gcBC (WPN), Keimzentrums-B-Zellen aus ICGC MMML-Seq WPN; PC (T), Plasmazellen (Tonsillen); PC (BM), Plasmazellen (Knochenmark); memBC, B-Gedächtniszellen; BL, Burkitt-Lymphom; DLBCL, Diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom; FL, Follikuläres Lymphom.

Anhang 25: Voten der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 597-18 09
Telefax 04 31 / 597-18 31

Herrn
Prof. Dr. med. R. Siebert
Institut für Humangenetik
Schwanenweg 24
24105 Kiel

Datum:

29.1.2008


Aktenzeichen AZ: D 401/08 (bitte stets angeben)

**Einwilligungserklärung zur Aufbewahrung und Verwendung
von genetischem Untersuchungsmaterial für Forschungs-
zwecke**

Ihr Schreiben vom: 16.1.2008

Sehr geehrter, lieber Herr Siebert,
vielen Dank für Ihr Schreiben mit der Einwilligungserklärung zu dem obengenannten Projekt. Nach Durchsicht der Unterlagen durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission und durch die Geschäftsstelle bestehen weder berufsrechtlich noch berufsethisch Bedenken gegen die Einwilligungserklärung.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

Weiterleiten an:
Eing.: 31. JAN. 2008
Erledigt:.....
Ablage:.....



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Herrn Prof. Dr. med. R. Siebert
Institut für Humangenetik
UKSH, Campus Kiel
Schwanenweg 24
24105 Kiel



Schwanenweg 20
D-24105 Kiel
Telefon 0431 / 597-18 09
Telefax 0431 / 597-18 31
Datum: 9.12.2009

AZ.: D 447/09 (bitte stets angeben)
Studienplan: Studie zur Bedeutung von epigenetischen Veränderungen bei multifaktoriellen Erkrankungen und Phänotypen
Antrag, Eltern-/Betreuer-/Patienteninformation und Einverständniserklärung
Projektleiter: Prof. Dr. med. R. Siebert, Institut für Humangenetik, UKSH, Campus Kiel
Ihr Schreiben vom: 25.11.2009

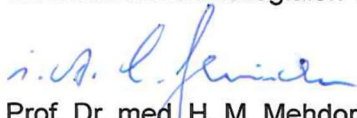
Sehr geehrter, lieber Herr Siebert,

die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel nimmt den obengenannten Antrag zur Kenntnis. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung des Projektes keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Es wird darauf hingewiesen, dass künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission



ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Prof. Dr. Reiner Siebert
Institut für Humangenetik
UKSH, Campus Kiel
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 10
24105 Kiel

Weiterleiten an	
Eing.: 25. JAN. 2011	Schwanenweg 20 D-24105 Kiel Telefon 04 31 / 597-18 09 Telefax 04 31 / 597-18 31 Datum: 18.1.2011
Erledigt:	
Ablage:	

AZ: A 150/10
Studienplan:

(bitte stets angeben)
International Cancer Genome Consortium: Probenakquirierung im Rahmen von ICGC MML-Seq

Studienplan, ICGC Guidelines,
Schreiben des Datenverantwortlichen zur Aufnahme des Projektes in
das DKFZ-Datenschutz-Verfahrensverzeichnis Heidelberg vom 26.11.10,
Anschreiben an Patienten (NHL-BFM und DSHNHL/ GLSG),
Informationsbroschüren und Einwilligungserklärungen für:
- erwachsene Patienten - Version 5.12.10
- minderjährige Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten-Version 5.12.10
- Jugendliche (13-18 Jahre) - Version 5.12.10
- Jugendliche (13-18 Jahre) ohne maligne Erkrankung - Version 6.12.10
- Studienteilnehmer ohne maligne Erkrankungen - Version 5.12.10

Studienleiter:

**Prof. Dr. Reiner Siebert, Institut für Humangenetik, UKSH,
Campus Kiel**

Datum des

Erstantrages: 30.7.2010 / 3.8.2010

Datum des

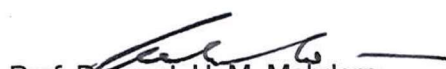
überarb. Antrages: 6.12.2010


V o t u m

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel hat die zu dem oben bezeichneten Versuchsplan eingereichten Unterlagen auf mögliche berufsethische und berufsrechtliche Bedenken hin überprüft. Die Kommission stimmt darin überein, dass gegen die Durchführung der Studie nunmehr keine Bedenken bestehen.

Es wird darauf hingewiesen, dass künftig eventuell für zweckmäßig und notwendig erachtete Änderungen und Erweiterungen des Versuchsplanes der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.

Nach Abschluß der Studie erbittet die Kommission einen kurzen Bericht mit einem Hinweis, ob im Laufe der Studie ethische oder juristische Probleme aufgetreten sind.


Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

Nachfolgend sind die Mitglieder der Ethik-Kommission aufgeführt, die diese Studie im Umlaufverfahren beurteilt haben:

Frau Prof. Dr. med. R. Fölster-Holst (Dermatologie)

Prof. Dr. med. N. Frey (Innere Medizin und Kardiologie)

Prof. Dr. med. E. Henze (Nuklearmedizin)

Prof. Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch (Rechtsmedizin)

Prof. Dr. med. H.M. Mehdorn (Neurochirurgie)

Frau E. Mosch-Brockstedt (Pastorin)

Frau PD Dr. med. S. Nikolaus (Innere Medizin)

PD Dr. med. D. Proppe (Innere Medizin und Klinische Pharmakologie)

Prof. Dr. med. M. Schrappe (Pädiatrie)

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Klinikum · Schwannenweg 20 · 24105 Kiel

Herrn
Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Parwaresch
Institut für Hämatopathologie und Lymphknotenregister
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
Niemannsweg 11
24105 Kiel

Schwannenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 0431 / 307-16100
Telefax 0431 / 307-16111

Datum: 31. Oktober 2003

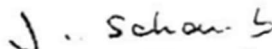
**Az.: D 425/03
Verbundprojekt Molekulare Mechanismen bei malignen Lymphomen
Antrag Nr. 70-3173-TR3**

Lieber Herr Parwaresch,

besten Dank für Ihr Schreiben vom 10.10.2003.

Wenn das entnommene Material vollständig anonymisiert ist, das heißt, wenn kein Personenbezug mehr hergestellt werden kann, hat die Ethik-Kommission weder juristische noch ethische Bedenken, die o.g. Studie durchzuführen.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft angefertigt habe. Hierbei wurden ergänzend zur wissenschaftlichen Beratung durch meinen akademischen Betreuer nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Zudem versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit weder vollständig noch in Teilen bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht und zuvor auch noch keine Promotionsversuche unternommen habe.

Ausschnitte der vorliegenden Arbeit wurden im Rahmen folgender wissenschaftlicher Kongresse als Poster präsentiert und veröffentlicht:

- Stamer, N., Horvath, S., ICGC MMML-Seq und MMML-Consortium, Dalgård, C., Dittmar, M., Ohm Kyvik, K., Ammerpohl, O. (2016): Epigenetic pre-aging in germinal center derived B cell lymphomas. *Medizinische Genetik*, 28, 131
27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 16.-18. März 2016, Lübeck
- Stamer, N., Horvath, S., ICGC MMML-Seq und MMML-Consortium, Gutwein, J., Kolarova, J., Dalgård, C., Paul, U., Dittmar, M., Richter, J., Bens, S., Wagener, R., Ohm Kyvik, K., Siebert, R., Ammerpohl, O. (2017): Epigenetic age acceleration in germinal center B cell lymphomas. *Medizinische Genetik*, 29, 125-126
28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 29.-31. März 2017, Bochum

Kiel, den 26.06.2019

Nina Stamer

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich während meiner Arbeit an dieser Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ammerpohl für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit, die hilfreichen Ratschläge und die konstruktive Zusammenarbeit auch über z.T. weitere Distanzen hinweg.

Zudem möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Siebert, ehemaliger Direktor des Instituts für Humangenetik Kiel, für die Vermittlung der Doktorarbeit und die wertvolle Unterstützung bei den Kongressbeiträgen bedanken. Weiterhin gilt mein Dank Frau PD Dr. med. Caliebe, kommissarische Direktorin des Instituts für Humangenetik Kiel, für die freundliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Lorena Valles für die Prozessierung der Proben sowie deren Hybridisierung auf den *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* (Illumina) bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik für die angenehme Zusammenarbeit. Mein Dank gilt insbesondere allen Mitarbeitern, welche zur Zusammenstellung der Datensätze beigetragen haben.

Zudem bedanke ich mich bei allen Kooperationspartnern für die freundliche Überlassung der Probanden, welche die Untersuchung einer solch großen Lymphom-, B-Zell- und Blutprobenkohorte erst ermöglicht haben.

Schließlich möchte ich mich herzlich bei meiner Familie und meinem Freund Moritz Minges für die motivierenden Gespräche, die unermüdliche Geduld und die umfassende Unterstützung in arbeitsintensiven Zeiten bedanken.

10 Publikationsliste

Veröffentlichte Tagungsbeiträge:

Stamer, N., Horvath, S., ICGC MMML-Seq und MMML-Consortium, Dalgård, C., Dittmar, M., Ohm Kyvik, K., Ammerpohl, O. (2016): Epigenetic pre-aging in germinal center derived B cell lymphomas. *Medizinische Genetik*, 28, 131. 27. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 16.-18. März 2016, Lübeck

Stamer, N., Horvath, S., ICGC MMML-Seq und MMML-Consortium, Gutwein, J., Kolarova, J., Dalgård, C., Paul, U., Dittmar, M., Richter, J., Bens, S., Wagener, R., Ohm Kyvik, K., Siebert, R., Ammerpohl, O. (2017): Epigenetic age acceleration in germinal center B cell lymphomas. *Medizinische Genetik*, 29, 125-126. 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 29.-31. März 2017, Bochum