

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin Sabine Kelkenberg-Schade
geboren in Tübingen

Tag der mündlichen Prüfung: _____

**Etablierung der
subgenomischen Anreicherung
zur Next Generation Sequencing
basierten
Identifizierung genomischer
Veränderungen
sowie die Identifizierung
epigenetischer und struktureller
Veränderungen im Glioblastom**

Gutachter:

PD Dr. Stefan Wiemann

Prof. Dr. Peter Lichter

Die vorliegende Arbeit wurde am Deutschen Krebsforschungszentrum in den Abteilungen Zentrale Einheit für Genom und Proteom und Molekulare Genetik unter der wissenschaftlichen Anleitung von Prof. Dr. Maren Scharfenberger-Schmeer und Dr. Bernhard Radlwimmer ausgeführt.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Diese Dissertation wurde in dieser oder anderer Form weder bereits als Prüfungsarbeit verwendet, noch einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt. An keiner anderen Stelle ist ein Prüfungsverfahren beantragt.

Heidelberg, den 6. August 2012

Sabine Kelkenberg-Schade

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| INHALTSVERZEICHNIS | I |
| ABKÜRZUNGEN | IV |
| ZUSAMMENFASSUNG..... | VI |
| SUMMARY | VII |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Krebs..... | 1 |
| 1.1.1 Onkogene | 3 |
| 1.1.2 Tumorsuppressorgene | 4 |
| 1.2 Epigenetik und Krebs..... | 5 |
| 1.2.1 Epigenetik | 5 |
| 1.2.2 Analyse von DNA-Methylierung..... | 10 |
| 1.3 Glioblastom | 12 |
| 1.3.1 Gliome | 12 |
| 1.3.2 Astrozytome | 13 |
| 1.4 <i>Next Generation Sequencing</i> | 18 |
| 1.4.1 NGS-Technologie | 18 |
| 1.4.2 Anreicherungen..... | 22 |
| 1.5 Zielsetzung | 24 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN | 25 |
| 2.1 Material | 25 |
| 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien | 25 |
| 2.1.1 Lösungen, Medien und Antibiotika | 25 |
| 2.1.2 Enzyme | 26 |
| 2.1.3 Lösungen und Puffer | 26 |
| 2.1.4 Kommerziell erhältliche Kits | 26 |
| 2.1.5 Verbrauchsmaterialien | 27 |
| 2.1.6 Geräte | 27 |
| 2.1.7 Oligonukleotide..... | 28 |
| 2.1.8 Patientenproben für die subgenomische DNA-Methylierungsanalyse | 30 |
| 2.1.9 Kontrollen..... | 31 |
| 2.1.10 Patientenproben für Mate-Pair Sequencing | 32 |
| 2.1.11 Datenbanken | 33 |
| 2.1.12 Software..... | 33 |
| 2.2 Methoden | 34 |
| 2.2.1 PCR-basierte Methoden | 34 |
| 2.2.2 Klonierung..... | 35 |
| 2.2.3 Transformation | 35 |
| 2.2.4 Plasmid-Präparation aus Bakterien | 35 |
| 2.2.5 Gelelektrophorese | 35 |
| 2.2.6 DNA Aufreinigung | 35 |
| 2.2.7 Konzentrationsbestimmung von DNA | 36 |
| 2.2.8 DNA-Analyse mittels DNA LabChip [®] Kit | 36 |
| 2.2.9 Quantitative DNA Methylierungsanalyse (MassARRAY [®])..... | 36 |
| 2.2.10 Design des 385K CustomArray für die subgenomische DNA-Methylierungsanalyse | 37 |
| 2.2.11 Mate-Pair Sequenzierung..... | 38 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 2.2.12 | Hochdurchsatz-Sequenzierung | 39 |
| 2.2.13 | Bioinformatische Auswertung..... | 40 |
| 2.2.14 | Statistische Analysen..... | 41 |
| 3 | ERGEBNISSE | 42 |
| 3.1 | Methodenetablierung zur subgenomischen Anreicherung | 42 |
| 3.1.1 | Generierung von Bibliotheken zur Anreicherung subgenomischer Bereiche | 42 |
| 3.1.2 | Bisulfit-Anreicherung zur subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse..... | 48 |
| 3.1.3 | MID-Anreicherung..... | 58 |
| 3.2 | Anreicherung und Sequenzierung von 20 MID-Pools | 66 |
| 3.2.1 | MID-Anreicherung von 100 MID-Bibliotheken..... | 66 |
| 3.2.2 | Statistik der Sequenzierungen | 68 |
| 3.3 | Subgenomische DNA-Methylierungsanalyse im Glioblastom | 72 |
| 3.3.1 | Anreicherung von Patienten-und Kontrollproben..... | 72 |
| 3.3.2 | Statistik der Sequenzierungen | 74 |
| 3.3.3 | Methylierungsmuster..... | 78 |
| 3.3.4 | Identifizierung differentiell methylierter und exprimierter Gene..... | 79 |
| 3.3.5 | Validierung der Methylierungsmuster der Kandidatengene | 82 |
| 3.3.6 | Der Einfluss von <i>DNK1</i> , <i>RASGEF1A</i> , <i>KCNMA1</i> und <i>SEC31B</i> auf die Überlebensrate | 84 |
| 3.4 | Identifizierung von Strukturvariationen im Glioblastom..... | 86 |
| 3.4.1 | Statistik der Mate-Pair Sequenzierung..... | 86 |
| 3.4.2 | Amplifikationen und Deletionen | 88 |
| 4 | DISKUSSION | 90 |
| 4.1 | Subgenomische Anreicherung | 90 |
| 4.1.1 | Effizienz der subgenomischen Anreicherung | 90 |
| 4.1.2 | Besonderheiten bei der MID-Anreicherung..... | 92 |
| 4.2 | DNA-Methylierungsanalyse subgenomischer Bereiche im Glioblastom | 93 |
| 4.2.1 | Das Methylierungsmuster im Glioblastom | 93 |
| 4.2.2 | Die validierten Kandidatengene und ihr Einfluss auf das Gesamtüberleben | 95 |
| 4.3 | Detektion von Strukturvariationen | 98 |
| 5 | SCHLUSSBEMERKUNG UND AUSBLICK..... | 100 |
| 6 | ANHANG | 101 |
| 6.1 | DNA-Bibliotheken der subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse..... | 101 |
| 6.2 | Übersicht über die Anreicherungs-werte der einzelnen Regionen der MID-Pools A-T | 102 |
| 6.3 | Darstellung der Anreicherungs-werte der MID-Pools nach Regionen..... | 103 |
| 6.4 | Darstellung der Anreicherungs-werte der einzelnen Regionen der MID-Pools..... | 110 |
| 6.5 | Statistik der MID-Sequenzierung der 100 MID-Bibliotheken | 113 |
| 6.6 | Anreicherungs-werte der einzelnen Regionen der Glioblastom-Proben..... | 115 |
| 6.7 | Darstellung der Anreicherungs-werte der Regionen nach Gruppen | 116 |
| 6.8 | Darstellung der Anreicherungs-werte der Regionen und Proben | 117 |
| 6.9 | MassARRAY-Statistik..... | 119 |
| 6.10 | Design des 385K CustomArray für die subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse | 121 |
| | LITERATURVERZEICHNIS | 142 |
| | PUBLIKATION | 152 |
| | DANKSAGUNG | 153 |

Abkürzungen

| | |
|-------------------|---|
| AAIII | Anaplastisches Astrozytom WHO Grad III |
| AII | Diffuses Astrozytom WHO Grad II |
| AS | Aminosäure |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BC-DNA-Bibliothek | angereicherte, bisulfitbehandelte DNA-Bibliothek |
| Bio | Biotin |
| bp | Basenpaar |
| BS | Bisulfite Sequencing, Bisulfit-Sequenzierung |
| BSA | Bovine Serum Albumine, Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C | Cytosin |
| ca. | circa |
| C-DNA-Bibliothek | angereicherte DNA-Bibliothek |
| CGI | CpG Insel |
| Chr | Chromosom |
| CpG | CG Dinukleotid |
| D | Deutschland |
| dA | dATP: Desoxyadenosintriphosphat |
| dATP | Desoxyadenosintriphosphat |
| DKFZ | Deutsches Krebsforschungszentrum |
| DNA | desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| dsDNA | double-stranded DNA, doppelsträngige DNA |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| Gb | Gigabasen |
| GBIV | Glioblastom WHO Grad IV |
| GBIV | Glioblastoma multiforme |
| gDNA | genomische DNA |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | hour, Stunde |
| HAT | Histon-Acetyltransferase |
| HDAC | Histon-Deacetylase |
| HMT | Histon-Methyltransferasen |
| <i>IDH1</i> | Isocitrat-Dehydrogenase 1 |
| kb | Kilobasen |
| LINE | long interspersed nuclear elements |
| LM-PCR | Ligation-Mediated PCR |
| LOH | loss of heterozygosity, Verlust der Heterozygotie |

| | |
|-----------------------------------|--|
| MALDI | Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation |
| Mb | Megabasen |
| MID | Multiple Identifier |
| min | Minute |
| Mio. | Million |
| mut | mutiert |
| NC-DNA-Bibliothek | nicht-angereicherte DNA-Bibliothek |
| NGS | Next Generation Sequencing |
| o.g. | oben genannt |
| PCR | Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PE | Paired End |
| pGBIV | primäres Glioblastom WHO Grad IV |
| pGBIV- <i>IDH1</i> ^{wt} | primäres Glioblastom WHO Grad IV, <i>IDH1</i> -wildtyp |
| qRT-PCR | quantitative Real-time PCR |
| RNA | Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA interference |
| rpm | rounds per minute, Umdrehungen pro Minute |
| RSV | Rous-Sarkom-Virus |
| RT | Raumtemperatur |
| RTK | Rezeptor-Tyrosinkinase |
| s | Sekunde |
| s.o. | siehe oben |
| -seq | sequencing |
| sGBIV | sekundäres Glioblastom WHO Grad IV |
| sGBIV- <i>IDH1</i> ^{mut} | sekundäres Glioblastom WHO Grad IV, <i>IDH1</i> -mutiert |
| SINE | short interspersed nuclear elements |
| SR | Single Run |
| ssDNA | single-stranded DNA, einzelsträngige DNA |
| T | Thymin |
| TOF | time of flight, Flugzeitanalysator |
| TSG | Tumorsuppressorgen |
| U | Unit |
| UPL | Universal Probe Library |
| US\$ | US-Dollar |
| v.a. | vor allem |
| v/v | volume per volume |
| vgl. | vergleiche |
| WHO | World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation) |
| wt | wildtyp |

Zusammenfassung

Beim Glioblastom handelt es sich um den am häufigsten auftretenden und um den bösartigsten Gehirntumor im zentralen Nervensystem. Die mittlere Überlebensdauer liegt bei rund einem Jahr. Bei Glioblastomen unterscheidet man zwischen neu entstehendem primären und dem aus niedrig-gradigen Astrozytomen hervorgehenden sekundären Glioblastomen. Die Entstehung von Glioblastomen ist durch genetischer und epigenetischer Veränderungen verursacht. Mutationen, eine aberrante Methylierung von Promotorregionen und auch strukturelle Veränderungen können zur Aktivierung von Onkogenen oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Primäre und sekundäre Glioblastome weisen einige gemeinsame genetische Veränderungen (z.B. LOH 10q) auf, andere Veränderungen hingegen charakterisieren jeweils primäre (*EGFR*-Mutation/Amplifikationen) und sekundäre (*IDH1* Mutationen) Glioblastome.

Die (Epi-) Genomforschung profitierte in großem Maße durch die Einführung der *Next Generation Sequencing* (NGS) Technologien. Dennoch ist die Anwendung in Vergleichsstudien ganzer (Epi-) Genome vor allem aus Kostengründen kaum durchführbar. Das Verfahren der *Microarray-based Genomic Selection* (MGS) ermöglicht die Anreicherung interessierender genomische Bereiche

Ziel dieser Studie war es, mittels Next Generation Sequencing Technologien neue epigenetische und genetische Aberrationen im Glioblastom zu identifizieren. Hierzu wurde in dieser Arbeit eine auf MGS basierende Methode zu subgenomischen Anreicherung entwickelt, die eine DNA-Methylierungsanalyse erlaubt (Bisulfit-Anreicherung). Mittels Bisulfit-Anreicherung wurden dann die Promotorbereiche des häufig deletierten Chromosoms 10q untersucht. Jeweils 10 primäre und sekundäre Glioblastome sowie 6 Normalhirn-Kontrollen wurden prozessiert. Das Unsupervised Clustering nach dem Methylierungsgrad zeigte die Einteilung in primäre und sekundäre Glioblastome. Sekundäre Glioblastome weisen im Vergleich zu primären Glioblastomen eine Hypermethylierung auf. Der Vergleich der verschiedenen Probengruppen ergab eine Reihe von hypermethylierten Genen. Von denen wurden *DKK1*, *SEC31B*, *RASGEF1A* und *KCNMA1* in sekundären Glioblastomen als hypermethyliert validiert. Eine verminderte Expression dieser Kandidatengene war mit einem prognostisch ungünstigeren Verlauf für Glioblastom Patienten assoziiert.

Strukturelle Veränderungen im Glioblastom-Genom wurden durch Mate-Pair Sequenzierung untersucht. Neben bekannten Amplifikationen wurden eine unbekannte Amplifikation der Gene *COX4I2*, *BCL2L1* und *TPX2* sowie eine Deletion des Gens *TTC34* in sekundären Glioblastomen identifiziert.

Summary

Glioblastoma is the most frequent and lethal cancer originating in the central nervous system with a median survival time of one year. Two types of glioblastoma are distinguished, primary glioblastoma that arise de novo and secondary glioblastoma that develop by progression from low-grade astrocytomas. The development of glioblastoma is a consequence genetic and epigenetic aberrations. Mutations, aberrant methylation patterns as well as structural variations can lead to the activation of oncogenes or the inactivation of tumor suppressor genes. While primary and secondary glioblastomas share some genetic features (e.g. LOH 10q), other characteristics are more common in primary glioblastomas (*EGFR* amplifications/mutations) and secondary glioblastomas (*IDH1* mutation).

Comprehensive (epi)-genetic variation studies have greatly benefited from the introduction of the next-generation-sequencing (NGS) platforms. However, due to tremendous costs this technology is still not applicable for studies comparing several (epi)-genomes. The Microarray-based Genomic Selection (MGS) approach enables to capture specific regions of interest.

The aim of this study was the identification of unknown epigenetic and genetic aberrations in glioblastoma using NGS technologies. A new method named Bisulfite Capture, based on MGS, was established allowing the analysis of DNA-methylation patterns of subgenomic regions. Bisulfite Capture was used to investigate promoter regions of chromosome 10q which is frequently deleted in glioblastoma samples. 10 primary and 11 secondary glioblastoma samples as well as 6 normal brain samples were analyzed. Unsupervised clustering identified two subgroups representing primary and secondary glioblastoma. In comparison to primary glioblastoma, secondary glioblastoma was hypermethylated. Hypermethylated genes could be identified comparing different sample groups. Thereof the hypermethylation of *DKK1*, *SEC31B*, *RASGEF1A* and *KCNMA1* could be confirmed in secondary glioblastoma. Correlation with the individual outcome confirmed that a reduced gene expression of these candidate genes was associated with an unfavourable prognosis in glioblastoma patients.

Structural variations in glioblastoma were identified using Mate-Pair Sequencing. Both, known amplifications and the unknown amplification of the genes *COX4I2*, *BCL2L1* and *TPX2* as well as the deletion of *TTC34*, could be identified in secondary glioblastoma.

1 Einleitung

1.1 Krebs

Krebs ist nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (Abbildung 1), in der westlichen Welt und sogar die häufigste Todesursache weltweit. Der WHO zufolge sind 13 % aller weltweiten Todesfälle durch eine Krebserkrankung verursacht. Als krebsauslösende Faktoren kommen physikalische Karzinogene (z.B. UV-Strahlung, ionisierende Strahlung), chemische Karzinogene (z.B. Inhaltstoffe des Tabakrauchs, Asbest) oder biologische Karzinogene (z.B. HPV, *Helicobacter pylori*) in Betracht; außerdem spielen genetische Dispositionen eine Rolle.

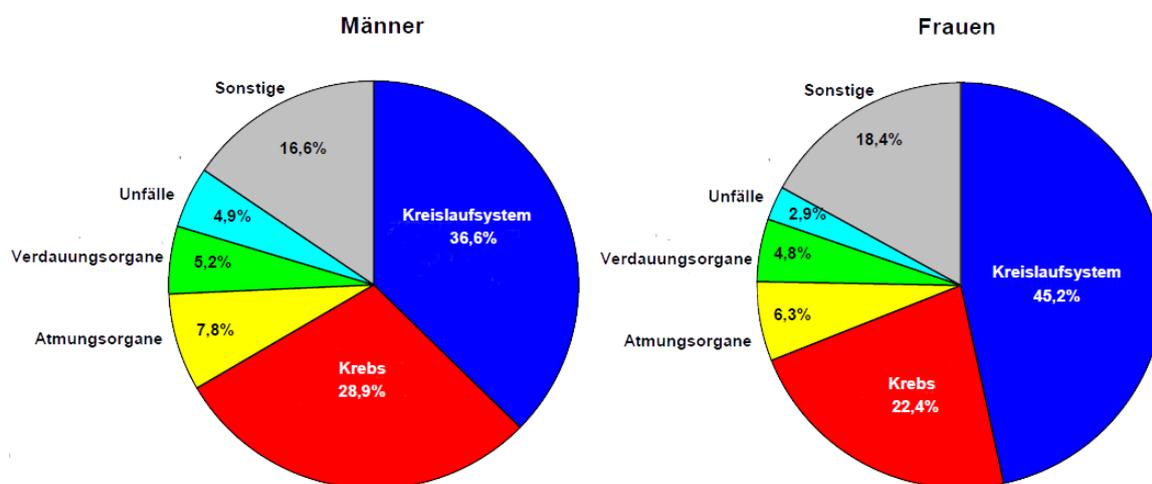


Abbildung 1 Todesursachen in Deutschland im Jahr 2010.
(Quelle Abteilung Epidemiologie von Krebserkrankungen)

Krebs ist durch eine Deregulierung von Genen verursacht, die für die Zellintegrität verantwortlich sind; dadurch kommt es zu unkontrolliertem Zellwachstum. Die Transformation einer normalen Zelle in eine Tumorzelle ist typischerweise durch verschiedenste genetische Veränderungen verursacht. Die meisten Tumore entstehen aus einer einzelnen Zelle. Es handelt sich um einen progressiven Prozess (Fearon and Vogelstein 1990), bei dem Zellen mit genetischen Veränderungen die Zellwachstum und Viabilität begünstigen einen Selektionsvorteil haben. Bei diesem Prozess der „clonal evolution“ (Nowell 1976; Axelrod, Axelrod et al. 2006) handelt es sich um eine ganze Serie von Mutationen. Jede für sich führt jeweils zu einem Wachstumsvorteil einer Zelle. Schlussendlich entsteht eine Zellpopulation, die die normalen Kontrollmechanismen zur Aufrechterhaltung der Zellintegrität umgeht und unkontrolliert proliferiert; es kommt zur Tumorbildung.

Hanahan und Weinberg (Hanahan and Weinberg 2000) definierten sechs Eigenschaften (*hallmarks of cancer*), die während und nach der malignen Transformation zu einer nachhaltigen Veränderung der Zellphysiologie führen: (1) Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen, (2) Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen, (3) Invasion und Metastasierung, (4)

unbegrenzt Repplikationspotential, (5) andauernde Angiogenese, sowie (6) Apoptoserestistenz (Abbildung 2). Zusätzlich zu diesen etablierten Eigenschaften definierten Hanahan und Weinberg kürzlich (Hanahan and Weinberg 2011) zwei weitere Eigenschaften, die in der Pathogenese einiger oder womöglich aller Krebszellen involviert sind: Umprogrammierung des Energiemetabolismus und Immunevasion. Während der Transformation normaler Zellen in Krebszellen müssen jedoch nicht alle dieser neuen Eigenschaften erworben werden (Hanahan and Weinberg 2011).

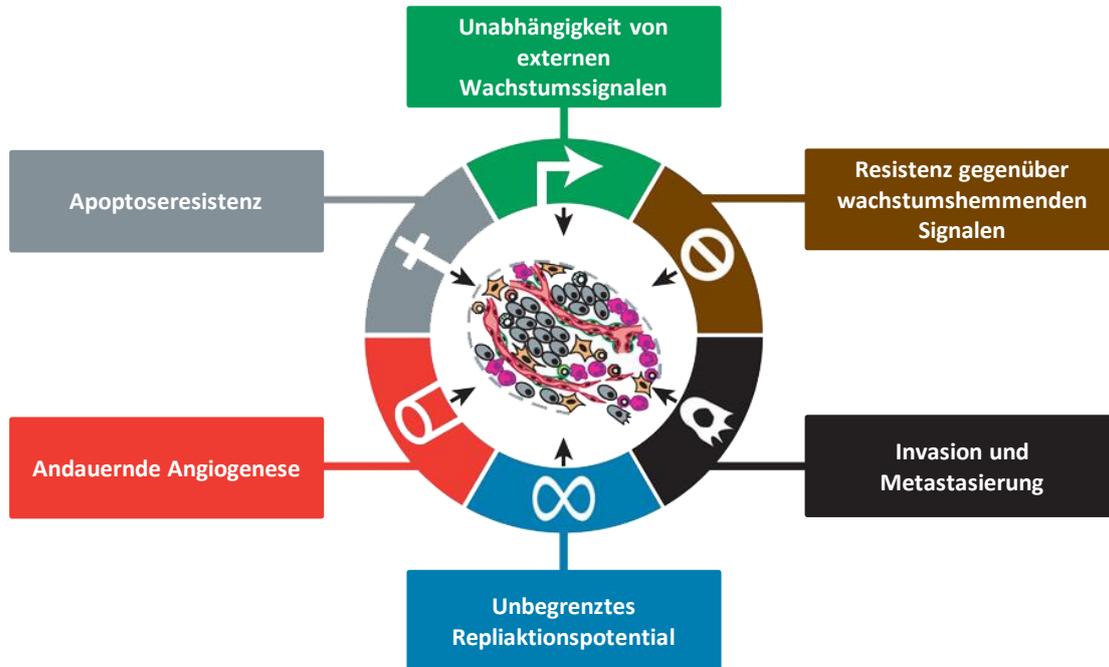


Abbildung 2 „Hallmarks of Cancer“, erworbene Fähigkeiten von Krebszellen.
[Modifiziert nach (Hanahan und Weinberg, 2011)]

All diese erworbenen Eigenschaften resultieren aus den Veränderungen von Genen, die für Proliferation, Differenzierung und Apoptose zuständig sind. Proliferation, Differenzierung und Apoptose sind aber physiologische Prozesse, die unter bestimmten Umständen in allen Zellarten auftreten. Das Gleichgewicht dieser drei Prozesse ist zur Aufrechterhaltung der Integrität des Organismus streng reguliert.

Die Entstehung von Krebs ist eine Folge von Mutationen in Zellen. Mutationen betreffen entweder die DNA-Sequenz direkt oder es kommt zu Änderungen in der DNA-Methylierung. Direkte Veränderungen der DNA-Sequenz können durch Punktmutationen, Deletionen oder Amplifikationen größerer oder kleinerer Bereiche oder durch Translokationen verursacht werden. Epimutationen (Änderungen in der Chromatinstruktur sowie der DNA-Methylierung) verändern nicht die DNA-Sequenz selbst können aber auch zu unkontrolliertem Zellwachstum und damit zur Tumorformation führen. Mutationen, die zur Krebsentstehung führen, betreffen vor allem zwei Klassen von Genen: Onkogene und Tumorsuppressorgene. In Onkogenen führen Mutationen meist zu einem dominanten Funktionszugewinn, wohingegen Mutationen in Tumorsuppressorgenen zu einem rezessiven Funktionsverlust führen (Weinberg 2007).

1.1.1 Onkogene

Bei Onkogenen handelt es sich um Gene, deren unkontrollierte Aktivierung zu unkontrolliertem Zellwachstum, Differenzierung und zur Apoptoserestistenz führen. Onkogene entstehen aus Proto-Onkogenen, die streng kontrolliert für die normale Zellphysiologie verantwortlich sind (Weinberg 2007). Proto-Onkogene sind oftmals an Signaltransduktionswegen und bei der Ausschüttung von mitogenen Signalen beteiligt (Todd and Wong 1999).

Onkogene wurden erstmals im Rous-Sarkom-Virus (RSV) beschrieben. Der Ursprung der onkogenen Sequenzen liegt allerdings in den Wirtszellen, die vom Virus während der Replikation aufgenommen wurden (Duesberg and Vogt 1970; Martin 1970; Stehelin, Varmus et al. 1976).

Mutationen, die zur Aktivierung von Proto-Onkogenen führen, können in zwei Klassen eingeteilt werden: Solche die zu Strukturveränderungen des codierten Proteins führen und solche die zu einer Überexpression des Gens bzw. Proteins führen.

Zu den strukturverändernden Mutationen zählen Punktmutationen, die zu einer konstitutiven Aktivierung des codierten Proteins oder zu einer erhöhten Proteinaktivität führen können, beispielsweise *RAS* (Tabin, Bradley et al. 1982). Aktivierende *RAS* Mutationen können in rund 20 % aller Tumoren gefunden werden (Bos 1989). Das aktivierte *RAS* Protein trägt hierbei durch die Deregulierung des Zellwachstums, Apoptose, Invasion und Angiogenese zum Krebsphänotyp bei (Shields, Pruitt et al. 2000). Desweiteren gehören chromosomale Translokationen ebenso zu den strukturverändernden Mutationen. Die Translokation $t(9;22)(q34;q11)$, bekannt als das Philadelphia-Chromosom, führt in Chronisch Myeloischer Leukämie (CML) zum Fusionsgen *BRC-ABL*, das unkontrolliertes Zellwachstum hervorruft (Nowell and Hungerford 1960). Translokationen können nicht nur zu Strukturveränderungen führen, sondern ebenso eine Überexpression des Gens bzw. Proteins hervorrufen. Durch eine Translokation wird das *MYC* im Burkitt-Lymphom unter die Kontrolle einer Enhancer-Sequenz von Immunglobulinen gestellt; dadurch kommt es zur Überexpression von *Myc* und einer gesteigerten Zellproliferation (Hecht and Aster 2000). Eine Erhöhung der Kopienanzahl von genomischen Bereichen (Gen-Amplifikation) kann ebenfalls zu einer gesteigerten Genexpression führen. Amplifikationen im Bereich des *EGFR*-Gens auf Chromosom 7 führen in bis zu 70 % der primären Glioblastome zu einer Überexpression von *EGFR*, die ursächlich mit der Pathogenese von Gliomen im Zusammenhang steht (Huang, Xu et al. 2009).

Solche „Gain-of-Function“-Mutationen, die aktivierend auf Onkogene wirken, sind auf zellulärer Ebene meist dominant.

1.1.2 Tumorsuppressorgene

Kennzeichnend für alle Tumorsuppressorgene (TSG) ist, dass sie die Zelle vor der malignen Transformation bewahren. Dabei nehmen TSG regulierende Funktionen u.a. im Zellzyklus, bei Apoptose und Zelladhäsion ein.

TSG können in zwei Klassen eingeteilt werden: (1) „Caretaker“, diese Klasse von TSG ist für die Integrität und die Stabilisierung des Genoms zuständig. Durch solche Mutationen kommt es nicht direkt zur Tumorbildung, vielmehr führen solche zu einer erhöhten Mutationsrate aller Gene, einschließlich den (2) „Gatekeeper“. Diese Klasse von Genen ist direkt an der Regulierung von Proliferation oder Apoptose beteiligt (Kinzler and Vogelstein 1997).

Als Voraussetzung zur Tumorentstehung müssen nach der „two-hit“-Hypothese von Alfred Knudson (Nordling 1953; Knudson 1971) beide, maternales und paternales Allel der „Caretaker“ und „Gatekeeper“ funktionsunfähig sein.

Funktionsverluste von TSG können genetischen (Punktmutation, Deletion) oder epigenetischen (Promotorhypermethylierung) Ursprungs sein. So zählt z.B. *TP53* zu den am häufigsten mutierten Genen bei Krebserkrankungen (Vogelstein, Lane et al. 2000). Epigenetische Mutationen, die mit der Inaktivierung von TSG einhergehen, wurden beispielweise von *SFRP* (Suzuki, Watkins et al. 2004), von *CDKN2A* (Holst, Nuovo et al. 2003) oder *HIC-1* (Wales, Biel et al. 1995) beschrieben.

Dabei sind die Mechanismen zur Inaktivierung der beiden Allele in den meisten Fällen unterschiedlich.

Einer Inaktivierung des ersten Allels durch Punktmutation oder Promotorhypermethylierung (1. Hit) folgt die Inaktivierung oder Eliminierung des zweiten Allels (2. Hit). Der *loss of heterozygosity* (LOH, Verlust des heterozygoten Zustands) führt dann zum vollständigen Funktionsverlust des TSG (Weinberg 2007). Der LOH kann dabei durch Deletion, Genkonversion, mitotische Rekombination oder Fehlsegregation („Non-Disjunction“) verursacht sein (Wijnhoven, Kool et al. 2001). So ist beispielsweise in Glioblastomen das TSG *PTEN* mutiert bzw. heterozygot deletiert. Im Umkehrschluss (Osborne and Hamshere 2000) können daher in häufig heterozygot deletierten Bereichen (z.B. langer Arm des Chromosom 10 in Glioblastomen) TSG vermutet werden, die durch (Epi-) Mutation im ersten Allel funktionsuntüchtig sind.

Ausnahmen in der „two-hit“-Hypothese stellen solche TSG dar, die eine Haploinsuffizienz aufweisen. Bei solchen TSG genügt die Inaktivierung eines der beiden Allele; die normale Funktion des TSG ist gestört es kommt zur Tumorgenese. Im Gegensatz zu klassischen TSG, deren Funktionsfähigkeit unempfindlich gegenüber eines stark verringerten Expressionslevels oder Proteinaktivität ist, erzeugen haploinsuffiziente TSG schon bei halbiertem Expressionslevel bzw. Proteinaktivität einen abnormen Phänotyp. Bei *TP53* handelt es sich beispielsweise um solch ein haploinsuffizientes TSG (Berger, Knudson et al. 2011).

Es wird vermutet, dass der Verlust von TSG wesentlich häufiger ursächlich an der Krebsentstehung beteiligt ist, als die Aktivierung von Onkogenen (Weinberg 2007).

1.2 Epigenetik und Krebs

1.2.1 Epigenetik

Der Begriff „Epigenetik“ wurde von Conrad Waddington (1905-1975) geprägt, der damit den „Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, welche den Phänotyp hervorbringen“ beschrieb (Waddington 1939). Heutzutage werden unter dem Begriff Epigenetik vielmehr alle vererbaren Chromosomenmodifikationen zusammengefasst, die nicht auf der Veränderung der DNA-Sequenz beruhen (Berger, Kouzarides et al. 2009).

Die Epigenetik spielt eine grundlegende Rolle in der Regulation vieler zellulärer Prozesse wie Genexpression (Holliday and Pugh 1975), Suppression von Transposons (Walsh, Chaillet et al. 1998), Zell-Differenzierung, Embryogenese (Meissner 2010), X-Inaktivierung (Lyon 1961) und *genomic imprinting* (Surani, Barton et al. 1984).

Veränderungen der Chromatinstruktur nehmen direkt positiv oder negativ regulatorischen Einfluss auf zelluläre Prozesse wie die Kontrolle der Genexpression, DNA-Reparatur und DNA-Replikation. Die Gesamtheit dieser epigenetischen Regulationsmechanismen wird als Epigenom bezeichnet (Abbildung 3).

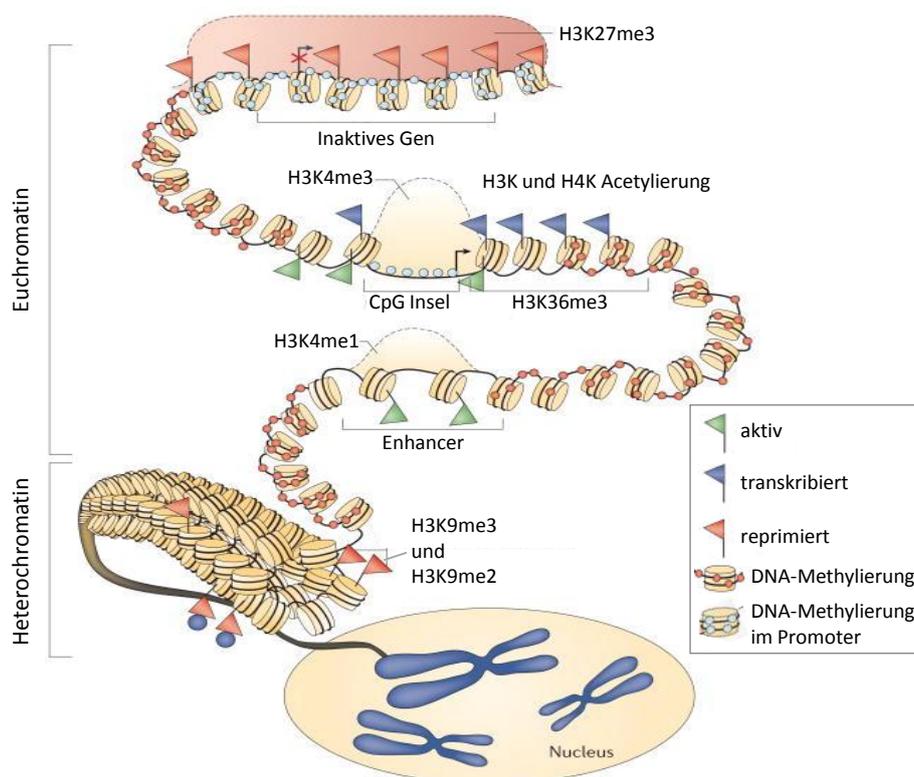


Abbildung 3 Das Epigenom. Die Gesamtheit der epigenetischen Regulationsmechanismen aus DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen, Nukleosom-Remodelling und ncRNAs charakterisieren das Epigenom jeder Zelle. Euchromatin kennzeichnet aktive, transkriptionszugängliche Bereiche mit charakteristisch acetyliertem und tri-methyliertem H3K4 und H3K36. Heterochromatin kennzeichnet transkriptionsinaktive (unzugängliche) Bereiche mit methylierten CpGs sowie der Di- und Tri-methylierung von H3K9 und H3K27. [Modifiziert nach (Baylin and Jones 2011)]

Zu den epigenetischen Modifikationen gehören DNA-Methylierung (Bird 2002), „Nucleosome Remodelling“ (Vaquero, Loyola et al. 2003), Histon-Modifikationen (Kouzarides 2007), sowie RNAi vermittelte Mechanismen (non-coding RNA, ncRNA) (Volpe, Kidner et al. 2002). All diese epigenetischen Mechanismen führen zu lokalen Veränderungen in der Chromatinstruktur. Epigenome unterscheiden sich nicht nur zwischen einzelnen Organismen - eineiige Zwillinge besitzen unterschiedliche Epigenome (Fraga, Ballestar et al. 2005) - sondern sind spezifisch für einzelne Gewebe oder sogar Zelltypen.

Die Epigenetik besitzt eine große Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der normalen Zellphysiologie. Viele Krankheiten, vor allem auch Krebs, entstehen, wenn falsche epigenetische Markierungen (DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen) neu entstehen oder zur falschen Zeit an der falschen Stelle positioniert werden (Esteller 2002).

1.2.1.1 Histon-Modifikationen

Histonproteine spielen in der Epigenetik eine zentrale Rolle und sind als Bestandteil des Chromatins für die Verpackung und Expression der DNA zuständig. Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Nukleosom. Ein Nukleosom wird aus acht Histonproteinen, je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 und einem 147 bp DNA-Abschnitt gebildet. Die benachbarten Nucleosome sind durch einen 50 bp DNA-Abschnitt (Linker-DNA) voneinander getrennt. Mit dieser Linker-DNA ist das Histon H1 assoziiert. Alle Histone bestehen aus einem globulären Kern und unstrukturierten, flexiblen N-terminalen Armen aus überwiegend basischen Aminosäuren (AS). Diese N-terminale Arme sind Gegenstand posttranslationaler Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinylierung, SUMOylierung oder ADP-Ribosylierung.

Histon-Modifikationen spielen bei der Kontrolle der Transkription, alternativem Spleißen, DNA-Reparatur und -Replikation eine wichtige Rolle und werden von einer ganzen Reihe von Proteinen katalysiert (Kouzarides 2007; Luco, Pan et al. 2010). Darunter fallen Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC), die die Acetylierung bzw. Deacetylierung von Lysinresten katalysieren. Durch die Acetylierung eines Lysinrests wird dessen positive Ladung teilweise neutralisiert und die Bindung mit der negativ geladenen DNA aufgelockert. Die Transkriptionsmaschinerie kann sich an die DNA anlagern; es kommt zur transkriptionellen Aktivierung.

Histon-Methyltransferasen (HMT) katalysieren den Transfer von bis zu drei Methylgruppen auf Lysin- oder Argininreste von Histonen. Methylierte Histone können je nach Positionierung der Methylgruppen entweder aktivierend oder reprimierend auf die Transkription wirken. Dabei bewirken die Histon-Modifikationen eine Veränderung im Chromatin (s.o.) oder dienen als Erkennungs- bzw. Bindungsstelle für weitere Effektorproteine.

Der Transkriptionsstatus des Genoms lässt sich anhand der Chromatinkondensation in zwei Stadien einteilen: (1) Transkriptionell aktives Euchromatin weist einen hohen Acetylierungsgrad

und Trimethylierung von H3K4¹, H3K36 und H3K79 auf. (2) Transkriptionell inaktives Heterochromatin besitzt eine geringe Acetylierung, aber eine Methylierung von H3K9, H3K27, und H4K20 (Li, Carey et al. 2007) (Abbildung 3).

1.2.1.2 DNA-Methylierung

Die am besten untersuchte epigenetische Modifikation der DNA ist die Methylierung an der C5-Position von Cytosinen (Abbildung 4). In normalen Zellen konzentriert sich die DNA-Methylierung auf repetitive genomische Bereiche einschließlich Satelliten-DNA (LINEs, SINEs), sowie endogene Retrovirus-Sequenzen (Yoder, Walsh et al. 1997).

Die DNA-Methylierung von Cytosinen wird in Säugerzellen durch DNA-Methyltransferasen katalysiert (DNMT). Zur Familie der DNMT gehören Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt3L² (Bestor 2000; Chen and Li 2004; Chedin 2011). Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt3L sind de novo Methyltransferasen. Dabei sind Dnmt3a und Dnmt3b für die Methylierung von embryonalen Stammzellen oder auch Krebszellen verantwortlich (Okano, Bell et al. 1999). Das Methylierungsmuster, das während der Gametogenese durch das *Imprinting* der mütterlichen Allele entsteht, wird durch Dnmt3L vermittelt (Turek-Plewa and Jagodzinski 2005). Dnmt1 ist für die Aufrechterhaltung des Methylierungsmusters während der Replikation zuständig („maintenance Methyltransferase“). Diese Methyltransferase erkennt und methyliert hemimethylierte CpG-Dinukleotide (Groth, Rocha et al. 2007).

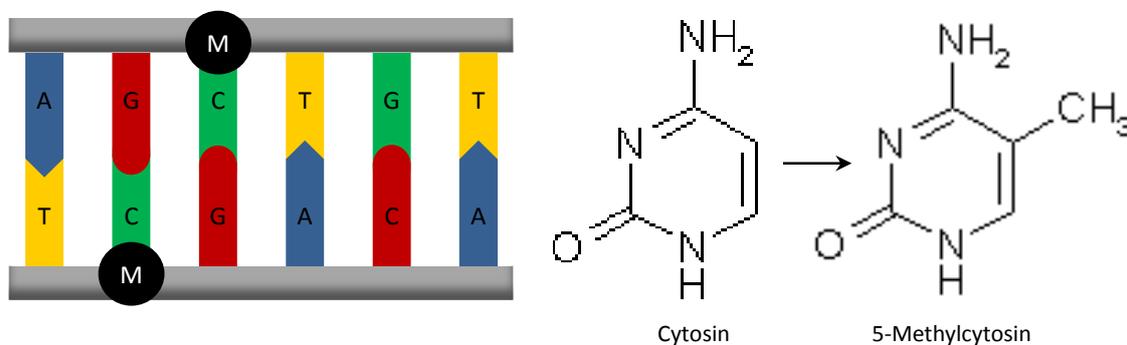
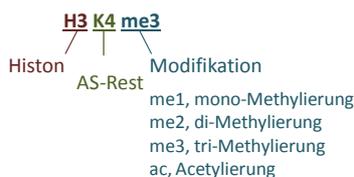


Abbildung 4 Methylierung von CpG-Dinukleotiden in der DNA.
A= Adenin, T= Thymin, G= Guanin, C= Cytosin, M= Methylgruppe

¹ Nomenklatur der Histon-Modifikationen



² Dnmt2 (heute TRDMT1) besitzt Sequenzhomologien zu den DNMT. 2006 wurde gezeigt, dass Dnmt2 die Methylierung eines Aspartatrestes in tRNA katalysiert Goll, M. G., F. Kirpekar, et al. (2006). "Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2." Science 311(5759): 395-398.

DNA-Methylierung findet vor allem in CpG-Dinukleotiden statt; die meisten CpGs liegen dabei methyliert vor. Eine Methylierung von CpGs wird im gesamten Genom beobachtet. Einzige Ausnahme stellen hierbei die meist unmethyliert vorliegenden CpG-Inseln (CGI) dar. Diese mindestens 200 bp großen Regionen sind mit 5'-Regionen von Genen assoziiert, haben einen (C+G)-Gehalt von mindestens 55 % in einem theoretischen Verhältnis von beobachteten CpGs zu erwarteten CpGs von 0,65, Alu Elemente sind hiervon ausgeschlossen (Gardiner-Garden and Frommer 1987; Takai and Jones 2002). Diese CGI repräsentieren ca. 0,7 % des menschlichen Genoms, enthalten aber rund 7 % aller CpGs (Fazzari and Grealley 2004). Ungefähr 60 % der humanen Promotoren sind mit CGI assoziiert. Andere Promotoren hingegen weisen keinerlei dieser definierten CGI auf. Dennoch konnten gewebsspezifische Methylierungsmuster nachgewiesen werden, die in Zusammenhang mit aktiver Transkription stehen. So korreliert die Expression von *POU5F1 (OCT4)* und *NANOG* mit dem Methylierungsmuster ihrer Promotoren. Dennoch besitzen diese Gene keine annotierten CGI im Promotor (Blelloch, Wang et al. 2006). In transkriptionsinaktiven Bereichen, wie das inaktivierte X-Chromosom des weiblichen Phänotyps sowie das inaktivierte Allel von *imprinted genes*, sind die Promotor-assoziierten CGI generell methyliert und diese Methylierung ist essentiell für den transkriptionsinaktiven Status. Die DNA-Methylierung von Promotoren reguliert die Genexpression durch zwei unterschiedliche Mechanismen. Zum einen kann DNA-Methylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindern (Watt and Molloy 1988). Zum anderen dient die DNA-Methylierung als Signal zur Chromatinmodifikation durch Methyl-CpG-bindende Proteine (MBD). Diese MBDs (bekanntestes Protein: MECP2) vermitteln die Kondensation des Chromatins (zu Heterochromatin). Durch die mit den MBD assoziierten Co-Repressoren kommt es zur Repression der Transkription (Robertson 2002).

1.2.1.3 Epigenetische Veränderungen in Tumoren

Im klassischen Sinn wird Krebs als eine Erkrankung betrachtet, die durch eine Reihe von progressiven genetischen Veränderungen hervorgerufen wird. Dies beinhaltet Mutationen in TSG und Onkogenen, sowie chromosomale Strukturveränderungen (vgl. Kapitel 1.1). Krebs ist jedoch auch eine Krankheit, deren Ursachen in epigenetischen Veränderungen liegen (Abbildung 5).

Eine globale Abnahme der DNA-Methylierung (Hypomethylierung) wurde 1983 als erste epigenetische Abnormität in Krebszellen beschrieben (Feinberg and Vogelstein 1983). Globale Hypomethylierung in Krebszellen ist durch den Verlust der Methylierung der repetitiven Sequenzen sowie der Demethylierung von codierenden Bereichen und Introns zurückzuführen. Dies kann zur Instabilität des Genoms - einem Charakteristikum von Krebs - beitragen (Hanahan and Weinberg 2011). Die Demethylierung von spezifischen Promotoren kann zur Aktivierung von Onkogenen oder zu einem *loss of imprinting (LOI)* führen (Cruz-Correa, Cui et al. 2004; Esteller 2008). Beispielsweise führt eine Hypomethylierung von *PAX2* zur Aktivierung dieses Gens, das für einen Transkriptionsfaktor codiert, der im Zusammenhang mit Proliferation beschrieben wurde (Wu, Chen et al. 2005). Der Verlust von Methylgruppen, der zu einem LOI des *IGF2* Gens

führt, steht im Zusammenhang mit Brust-, Leber-, Lungen- sowie Darmkrebs (Ito, Koessler et al. 2008). Fehlerhaftes *Imprinting* durch Hypomethylierung wird ebenfalls beim Wilms-Tumor beschrieben (Steenman, Rainier et al. 1994).

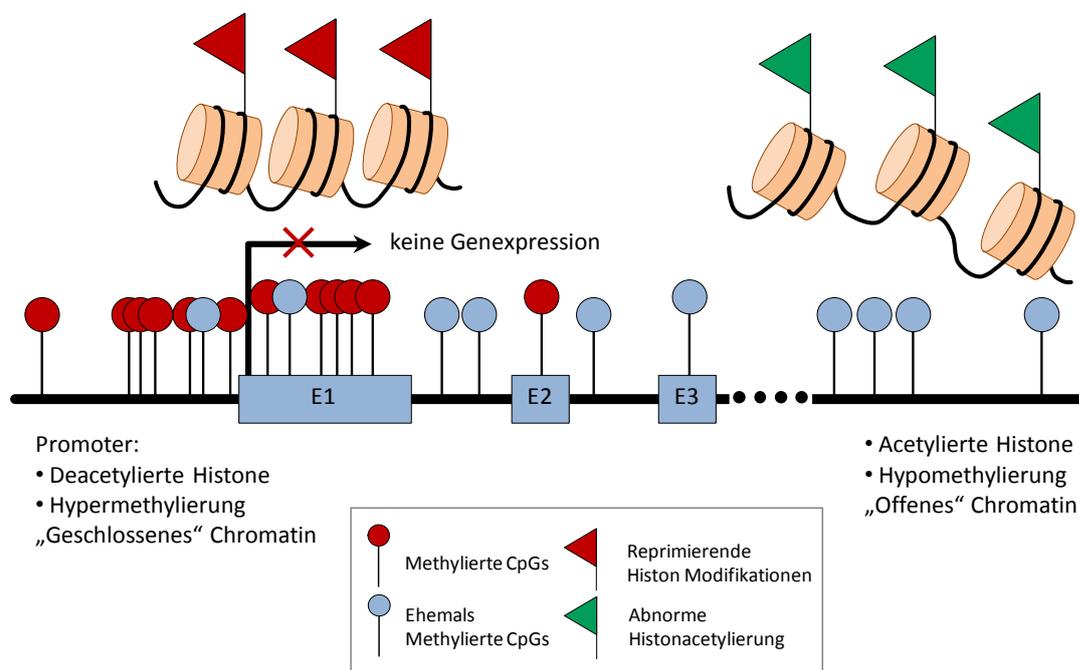


Abbildung 5 Epigenetische Veränderungen in Tumoren. Hypermethylierung und Deacetylierung von Histonen in Promotorbereichen kennzeichnen transkriptionsinaktive Gene. Globale Hypomethylierung sowie hyperacetylierte Histone führen zu einer gelockerten Chromatinstruktur und damit zu genomischer Instabilität.

[Modifiziert nach (Baylin and Jones 2011)]

Der globalen Hypomethylierung gegenüber steht die lokale Hypermethylierung von CGI in Promotorregionen von TSG. Diese Hypermethylierung führt oftmals zur transkriptionellen Inaktivierung der TSG (Jones and Laird 1999). Erstmals beschrieben wurde eine Promotorhypermethylierung im Zusammenhang mit der Inaktivierung des *RB1* Gens (Greger, Passarge et al. 1989). Aber auch weitere TSG wie *CDKN2A*, *MLH1* und *BRCA* sind von diesem Mechanismus betroffen (für eine Übersicht von hypermethylierten, inaktivierten TSG siehe (Herman and Baylin 2003; Baylin and Ohm 2006)). Die transkriptionelle Inaktivierung betrifft dabei Gene, die für DNA-Reparatur, Zellzykluskontrolle oder Apoptose zuständig sind. All diese Gene stehen im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs (Herman and Baylin 2003; Esteller 2007). Epigenetische Veränderungen können prinzipiell zu jedem Zeitpunkt in der Tumorgenese auftreten. Dennoch wird beobachtet, dass epigenetische Veränderungen vor allem in frühen Stadien der Tumorgenese auftreten (Feinberg and Tycko 2004). So können sich beispielsweise in Zellen mit inaktiviertem *MGMT* spezifische Mutationen anhäufen, die durch die Unfähigkeit zur DNA-Reparatur von 6-O-Methylguanin entstehen (Esteller, Hamilton et al. 1999).

Nicht nur TSG können durch Promotorhypermethylierung inaktiviert werden, die genomweite Expression von miRNAs ist durch Hypermethylierung ihrer Promotoren deutlich reduziert (Lujambio, Ropero et al. 2007).

Die bekannteste Veränderung von Histon-Modifikationen ist die globale Abnahme von monoacetyliertem H4K16 (Fraga, Ballestar et al. 2005). Die Deacetylierung wird von HDACs katalysiert, die in vielen Tumoren überexprimiert oder mutiert sind (Zhu, Martin et al. 2004; Ropero, Fraga et al. 2006). Mutationen oder Deletionen in HATs (katalysieren die Acetylierung von Histonen) führen ebenso zu einem Ungleichgewicht bei der Histon-Acetylierung (Moore, Herrick et al. 2004). Die Promotoren von inaktivierten Genen besitzen zusätzlich zur DNA-Hypermethylierung reprimierende Markierungen wie die Deacetylierung von H3K9, eine Zunahme von H3K27me3, sowie einer Reduktion von H3K4me3, einem Zeichen für Transkriptionsaktivität (Bachman, Park et al. 2003).

1.2.2 Analyse von DNA-Methylierung

Die Entdeckung, dass die Behandlung von denaturierter genomischer DNA mit Natriumbisulfit, NaHSO₃ (im Folgenden genannt: Bisulfit) zur chemischen Desaminierung von Cytosinen führt, revolutionierte die DNA-Methylierungsanalyse (Wang, Gehrke et al. 1980; Frommer, McDonald et al. 1992). Diese Bisulfitbehandlung der DNA überführt die epigenetische Markierung in eine genetische Sequenzveränderung; unmethyliertes Cytosin wird zu Uracil desaminiert und nach PCR-Amplifikation zu Thymin konvertiert. Methyliertes Cytosin (5'-Methylcytosin, Abbildung 4) bleibt unverändert (Abbildung 6).

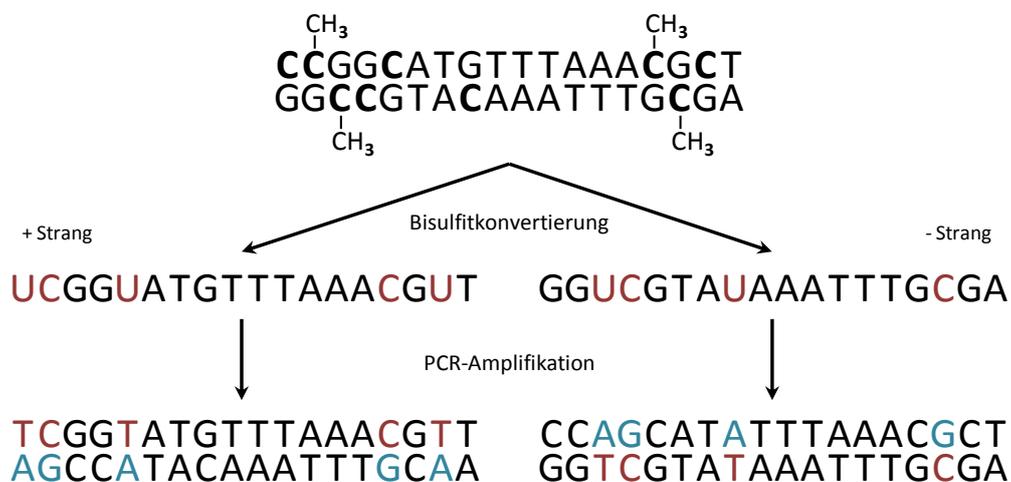


Abbildung 6 Bisulfitkonvertierung von DNA. Unmethylierte Cytosine werden durch alkalische Bisulfitbehandlung zu Uracil desaminiert. 5' Methylcytosin wird durch eine Bisulfitbehandlung nicht verändert. Die methylierungsabhängigen Sequenzveränderungen der DNA können basenspezifisch durch Sequenzierung detektiert werden (Frommer, McDonald et al. 1992).

Die heute gängigen Methoden zur Methylierungsanalyse können grob in zwei Kategorien aufgeteilt werden: Das *Typing* und das *Profiling*. Beim *Typing* wird Locus-spezifisch der DNA-Methylierungsstatus einzelner CpGs untersucht, wohingegen das *Profiling* zur genomweiten DNA-Methylierungsanalyse eingesetzt wird. Für beide Anwendungsfälle gibt es die unterschiedlichsten Verfahren und Methoden (Abbildung 7).

Heutzutage gibt es eine ganze Reihe von Methoden zur Locus-spezifischen DNA-Methylierungsanalyse. Dazu zählen PCR-basierte Methoden wie *methylationspecific-PCR* (MSP) (Herman, Graff et al. 1996) oder MethyLight (Eads, Danenberg et al. 2000). COBRA (Xiong and Laird 1997) kombiniert PCR und Restriktionsverdau zur Methylierungsanalyse. Beim MassARRAY® werden die Spaltprodukte von PCR-Amplikons massenspektrometrisch analysiert (Ehrich, Nelson et al. 2005). Die Sanger Sequenzierung (Sanger and Coulson 1975) in Kombination mit Bisulfitkonvertierung (BS) war lange Zeit der Goldstandard zur DNA-Methylierungsanalyse. Die Vorteile der Methode liegen im eindeutigen Readout und der basengenauen Auflösung. Als Nachteile der BS kann der geringe Durchsatz angeführt werden, daher ist die BS nur für die DNA-Methylierungsanalyse einzelner Loci einsetzbar.

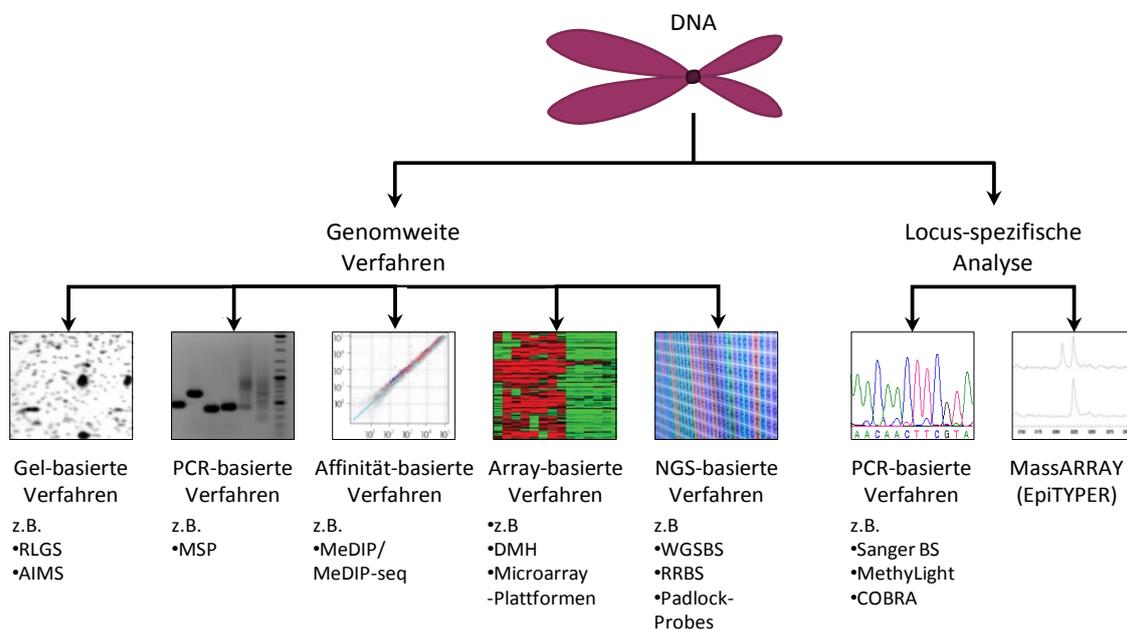


Abbildung 7 Methoden zur Analyse von DNA-Methylierung. Es kann unterschieden werden zwischen Verfahren, die sich eher zur Analyse kleiner Bereiche eignen und Verfahren mit denen der Methylierungsstatus des gesamten Genoms analysiert werden kann. AIMS, amplification of intermethylated sites; BS, bisulfite sequencing; CHARM, comprehensive high throughput arrays; COBRA, combined bisulfite restriction analysis; DMH, differential methylation hybridization; MeDIP, methylated DNA immunoprecipitation; MSP, methylation-specific PCR; NGS, Next Generation Sequencing; RLGS, restriction landmark genomic scanning; RRBS, reduced representation bisulfate sequencing; -seq, anschließende Sequenzierung; WGSBS, whole-genome shotgun bisulfite sequencing. Für eine sehr detaillierte Auflistung aller Methoden zur DNA-Methylierungsanalyse siehe (Esteller 2007; Huang, Huang et al. 2010; Laird 2010).

Die Methoden zur genomweiten DNA-Methylierungsanalyse reichen von Gel-basierten Verfahren wie *Restriction Landmark Genomic Scanning*; RLGS (Costello, Fruhwald et al. 2000) oder *Amplification of InterMethylated Sites*; AIMS (Frigola, Ribas et al. 2002) über PCR-basierte Verfahren wie *Methylation-Specific PCR*; MSP. Hierbei wird die DNA nach Bisulfitkonvertierung mit Primern amplifiziert, die für methylierte bzw. unmethylierte Sequenzen spezifisch sind (Herman, Graff et al. 1996).

Für Affinität-basierte Methoden wie MeDIP werden Fragmente von methylierter DNA mit einem für 5-Methylcytosin spezifischen Antikörper immunopräzipitiert. Alternativ kann die Präzipitation

von methylierter DNA auch mit MBD-Proteinen (Affinitätschromatographie) oder mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP/ChIP-on-Chip) erfolgen (Weber, Davies et al. 2005; Zhang, Yazaki et al. 2006; Penterman, Zilberman et al. 2007; Down, Rakyan et al. 2008).

Bei der *Differential Methylation Hybridization*, DMH (Huang, Perry et al. 1999; Deatherage, Potter et al. 2009) oder den kommerziellen Microarray-Plattformen findet die DNA-Methylierungsanalyse mittels verschiedenartiger Arrays statt. Mit den kommerziellen Microarray-Plattformen können eine begrenzte Anzahl vordefinierter CpGs schnell und mit sehr guter Reproduzierbarkeit analysiert werden (Huang, Huang et al. 2010).

Die in den letzten Jahren etablierten Next Generation Sequencing (NGS) Technologien können nicht nur zur DNA-Sequenzierung, sondern auch zur DNA-Methylierungsanalyse eingesetzt werden. Verfahren wie *Reduced Representation Sequencing* (RRBS) (Meissner, Gnirke et al. 2005), BS-seq (Cokus, Feng et al. 2008), MethylC-seq (Lister, O'Malley et al. 2008) oder *Whole-Genome Shotgun Bisulfite Sequencing* (WGSBS) (Bock, Kiskinis et al. 2011; Heyn, Vidal et al. 2012) basieren alle auf einer Bisulfitkonvertierung der DNA, der Generierung einer DNA-Bibliothek und anschließender Hochdurchsatz-Sequenzierung. Dabei variiert die Reihenfolge von Bisulfitkonvertierung und Generierung der DNA-Bibliothek je nach Verfahren.

1.3 Glioblastom

1.3.1 Gliome



Abbildung 8 Gliom
(Bast, Kufe et al. 2000)

1926 wurde der Begriff Glioblastom (früher: Glioblastoma multiforme) erstmals von Percival Bailey und Harvey Cushing verwendet, basierend auf der Vorstellung, dass sich diese Art Hirntumor aus primitiven Vorstufen von Gliazellen entwickelt (MacKenzie 1926). Gliazellen (gr. Gliocyti; abgeleitet aus dem griechischen Wort *glia* für „Leim“), 1846 von Rudolf Virchow entdeckt, sind nicht nur als Halte- und Stützapparat, sowie zur elektrischen Isolation der Neurone von Bedeutung, sondern spielen auch beim Nährstoff- und Flüssigkeitstransport oder der Informationsverarbeitung eine wichtige Rolle (Parpura, Heneka et al. 2012). Die Gruppe der Gliazellen lässt sich weiter in Astrozyten,

Oligodendrozyten, Mikroglia und Ependymzellen untergliedern. Entgegen des etablierten Modells, das entwicklungs-geschichtlich eine frühe Trennung der Gliazellen und Neurone postuliert, fungieren einige Gliazellen als Vorläuferzellen oder Neuronale Stammzellen (NSC) (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009).

Die Inzidenz eines Hirntumors liegt bei ca. sieben pro 100.000 Einwohner und Jahr (Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) 2012). In Deutschland erkranken somit ca. 6000 Menschen an einem primären

Hirntumor³. In rund 80 % der Fälle handelt es sich dabei um Gliome⁴. Gliome werden histologisch und immun-histochemisch in Astrozytome, Oligodendrogliome, Ependyome und Oligoastrozytome klassifiziert. Astrozytome sind die dabei am häufigsten auftretenden Gliome (Schwartzbaum, Fisher et al. 2006; Louis, Ohgaki et al. 2007).

1.3.2 Astrozytome

Jährlich erhalten ca. vier von 100.000 Menschen die Diagnose eines Astrozytoms. Männer sind dabei ca. 1,5-fach häufiger betroffen als Frauen (Louis, Ohgaki et al. 2007). Die einzig bekannten Risikofaktoren sind die Exposition gegenüber hohen Dosen ionisierender Strahlung, die Erbkrankheiten Neurofibromatose 1/2, Tuberöse Sklerose, Retinoblastom, Li-Fraumeni-Syndrom und Turcot-Syndrom (Schwartzbaum, Fisher et al. 2006).

Astrozytome werden wie alle Gliome anhand der WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems in Grad I bis IV eingeteilt. Die Zuordnung erfolgt gemäß dem Malignitätsgrad, der anhand von histologischen Auffälligkeiten sowie genetischen Veränderungen festgelegt wird (Tabelle 1).

Tabelle 1 WHO-Klassifikation der Tumoren des zentralen Nervensystems (Louis, Ohgaki et al. 2007)

| WHO Grad | Bezeichnung | Kriterien |
|----------|---------------------------|--|
| I | Pilozytisches Astrozytom | Nicht infiltrierend Klar abgegrenzt |
| II | Diffuses Astrozytom | Diffus infiltrierende Kernatypien |
| III | Anaplastisches Astrozytom | Diffus infiltrierend Kernatypien Mitosen |
| IV | Glioblastom | Diffus infiltrierend Kernatypien Mitosen Mikrovaskuläre Proliferation Nekrosen |

Grad I Astrozytome sind gutartig und können nach vollständiger chirurgischer Resektion als geheilt angesehen werden. Grad II Astrozytome (AII) haben einen langen klinischen Verlauf und sind diffus infiltrierend, was eine vollständige Resektion und Heilung unmöglich macht. Grad III Astrozytome (AIII) kennzeichnen erhebliche Kernatypien und Mitoseaktivität, die mittlere Überlebenszeit liegt bei zwei bis drei Jahren. Grad IV Astrozytome (Glioblastome, GBIV) weisen zusätzlich mikrovaskuläre Proliferation sowie nekrotische Bereiche auf, sind resistent gegenüber

³ Sekundäre Hirntumore: Hirnmetastasen anderer Tumore v.a. bei Lungen- und Brustkrebs vorkommend

⁴ Bei den restlichen 20 % handelt es sich beispielsweise um Tumore der Meningen (z.B. Meningeom) oder der kranialen und spinalen Nerven (z.B. Neurinom)

Radio- und Chemotherapie und führen im Allgemeinen innerhalb von 12 Monaten zum Tode (Furnari, Fenton et al. 2007).

1.3.2.1 Primäre und sekundäre Glioblastome⁵

Basierend auf dem klinischen Erscheinungsbild werden GBIV weiter in primäre Glioblastome (pGBIV) und sekundäre Glioblastome (sGBIV) unterteilt. pGBIV stellen den Großteil (90 %) der GBIV-Fälle dar und werden überwiegend in älteren Patienten diagnostiziert. sGBIV (10 %) hingegen sind selten und treten überwiegend in Patienten auf, die jünger als 45 Jahre alt sind. sGBIV entstehen de novo ohne jegliche Hinweise auf vorhergehende niedrig-gradige Vorstufen. Im Gegensatz dazu entstehen sekundäre Glioblastome durch Progression aus den niedrig-gradigeren Astrozytomen Grad II und Grad III. Obwohl pGBIV und sGBIV histologisch nicht zu unterscheiden sind, besitzt jeder Tumortyp auf molekularer Ebene sein eigenes rekurrentes Muster an chromosomalen und genetischen Veränderungen (Furnari, Fenton et al. 2007). Abbildung 9 gibt einen Überblick über chromosomale und genetische Aberrationen pGBIV und sGBIV, sowie den niedrig-gradigeren Astrozytomen (AII, AIII), aus denen das sGBIV hervorgeht.

Molekulare Veränderungen im Glioblastom

Charakteristische molekulare Läsion in pGBIV sind die Mutation oder Amplifikation von *EGFR*, sowie die Mutation oder Deletion des TSG *PTEN* auf Chromosom 10. LOH des Chromosom 10q ist die am häufigsten vorkommende chromosomale Aberration in GBIV (60 % bis 80 % der Fälle). Sowohl pGBIV als auch sGBIV sind hiervon betroffen (Batchelor, Betensky et al. 2004; Ohgaki, Dessen et al. 2004). Patienten, bei denen ein LOH von 10q detektiert werden kann, zeigen eine deutlich schlechtere Prognose (Weller, Felsberg et al. 2009). Chromosom 10q können mehrere potentielle TSG zugeordnet werden (Assem, Sibenaller et al. 2012). Daher ist zu vermuten, dass sich in dieser Region auch TSG befinden, die in der Pathogenese von GBIV eine Rolle spielen (Kanu, Mehta et al. 2009; Ohgaki and Kleihues 2009). Andere Aberrationen, die sich sowohl in pGBIV als auch in sGBIV zeigen, sind die Deletion von 9p einschließlich *CDKN2A*, sowie ein Zugewinn von 7q (Rao, Edwards et al. 2010; Brennan 2011). sGBIV sind gekennzeichnet durch *TP53* Mutationen und eine, überwiegend in sGBIV (80 %) vorkommende, Mutation von *IDH1* (Isocitrat Dehydrogenase 1). Punktmutationen von *IDH1* führen zum Austausch einer Arginins (R132) (Parsons, Jones et al. 2008; Yan, Parsons et al. 2009). Diese *IDH1* Mutation wird inzwischen als molekularer Marker für sGBIV herangezogen (Ducray, El Hallani et al. 2009; Riemenschneider, Jeuken et al. 2010).

⁵ Diese Arbeit konzentriert sich auf WHO Grad IV Astrozytome (Glioblastome)

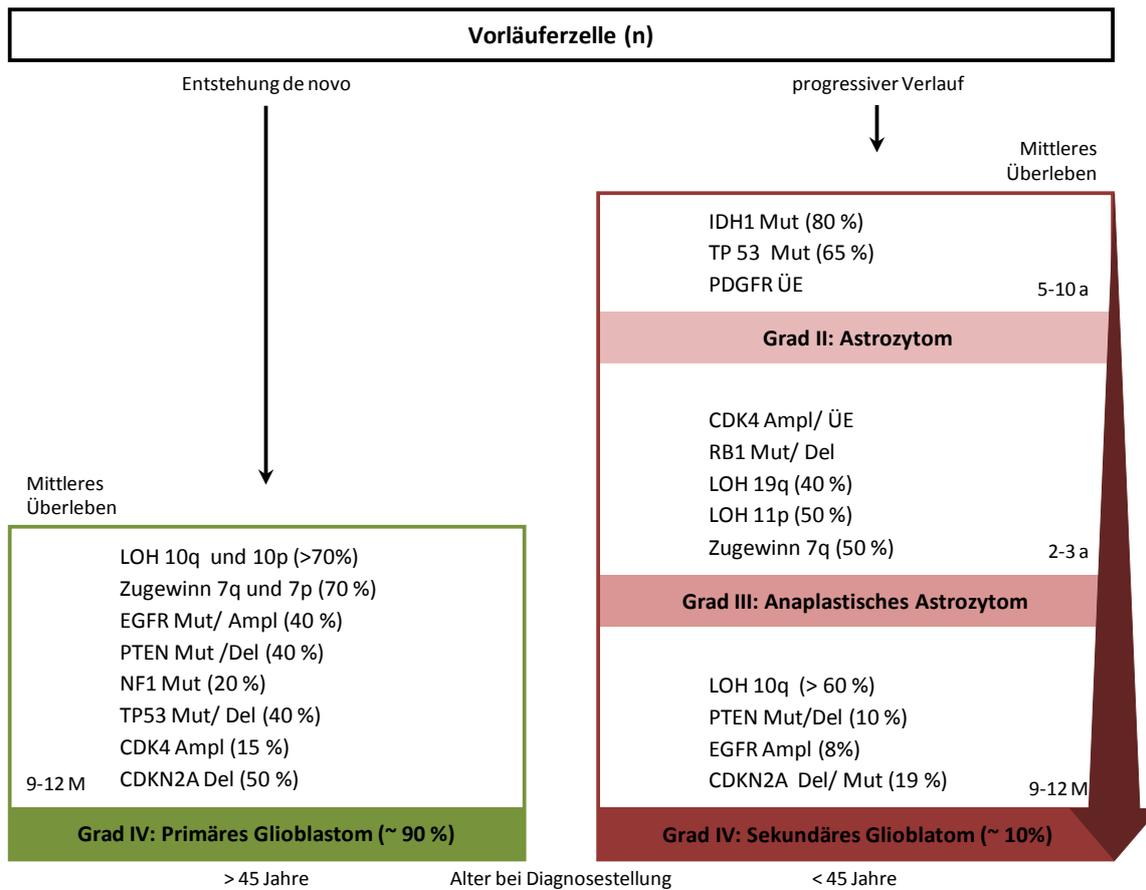


Abbildung 9 Chromosomale und genetische Veränderungen von Glioblastomen. Primäre Glioblastome entstehen de novo. Sekundäre Glioblastome entwickeln sich langsam aus niedrig-graden Astrozytomen. Mut= Mutation, Ampl= Amplifikation, Del= Deletion, ÜE= Überexpression, a= Jahre, M= Monate.

[Modifiziert nach (Furnari, Fenton et al. 2007; Parsons, Jones et al. 2008; The Cancer Genome Atlas 2008; Ohgaki and Kleihues 2009; Riemenschneider, Jeuken et al. 2010)]

Viele dieser genetischen Veränderungen haben eine diagnostische oder prognostische Implikation. Da o.g. genetischen Veränderungen jedoch nur zur Definition von Subgruppen oder des Malignitätsgrads Verwendung finden, werden diese nicht als Biomarker für pGBIV eingesetzt (Riemenschneider, Jeuken et al. 2010).

Anhand des Expressionsmusters lassen sich pGBIV in die Subgruppen *Proneural*, *Neural*, *Classical* und *Mesenchymal* einteilen, die auch eine prognostische Bedeutung besitzen (Phillips, Kharbanda et al. 2006; Verhaak, Hoadley et al. 2010). Die Subgruppen *Proneural*, *Classical* und *Mesenchymal* treten gleich häufig auf. Die Subgruppe *Classical* kennzeichnet EGFR Amplifikation, Deletion von *PTEN* und *P16*; *Mesenchymal* weist Mutationen und/oder Verlust von *NF1*, *TP53* und *CDKN2A (INK4a/ARF)* auf. *Proneural* zeigt einige *high-level* Amplifikationen von *PDGFRA*, *CDK4/6* und *MET*. Die in pGBIV sehr seltenen *IDH1* Mutationen können überwiegend in dieser Subgruppe identifiziert werden. Die vierte Subgruppe *Neural* kommt im Vergleich seltener vor und weist variable Genotypen auf.

Glioblastom-assoziierte Signalwege

Chromosomale und genetischen Veränderung, die gehäuft in pGBIV und sGBIV auftreten, können hauptsächlich drei Signalwegen zugeordnet werden (Abbildung 10): (1) RTK/RAS/PI(3)K-Signalweg in 88 % der GBIV, (2) p53-Signalweg in 87 % der GBIV, (3) Rb-Signalweg in 78 % der GBIV (The Cancer Genome Atlas 2008).

RTK/RAS/PI(3)K-Signalweg (Abbildung 10 a)

Die Aktivierung von Wachstumsfaktorrezeptoren (EGFR, PDGFRA, ERBB2 oder MET) durch Mutation oder Amplifikation sind häufig in pGBIV und führen zu einer verstärkten Proliferation, Translation und Überleben. Nach Rezeptor-Aktivierung durch die Bindung extrazellulärer Liganden kommt es zur Homodimerisierung der Rezeptoren und zur Aktivierung der intrinsischen Kinasedomäne gefolgt von der Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste des cytoplasmatischen Rezeptoranteils. Effektorproteine werden rekrutiert und aktivieren verschiedene Signalwege.

Aktivierende Mutationen oder Amplifikationen von *EGFR*, *ERBB2* und *PDGFR*, sowie inaktivierende Mutationen von *NF1* führen zu einer konstitutiven Aktivierung des RAS-Signalwegs. Die konstitutive Aktivierung der PI3K-Signaltransduktion wird durch *MET*-Amplifikationen und inaktivierende *PTEN*-Mutationen/Deletionen vermittelt (Ohgaki and Kleihues 2009; Brennan 2011).

Rb- und p53-Signalweg (Abbildung 10 b, c)

Die meisten GBIV zeigen inaktivierende Mutationen im p53- und/oder Rb-Signalweg. Beide Signalwege sind für die Regulation des Zellzyklus, insbesondere für den Übergang von G1 in die S-Phase zuständig und interagieren miteinander. p53, der „Wächter des Genoms“, wird bei Zellstress (u.a. DNA-Schäden) aktiviert, der Zellzyklus wird gestoppt oder Apoptose ausgelöst, es kommt zur Transkription von Genen wie *p21^{Waf/Cip1}*. Der Verlust von *TP53* durch Mutationen oder Deletionen von 17p ist ein häufiges und frühes Ereignis überwiegend in der Pathogenese des sGBIV. *MDM2*, ein negativer Regulator von p53, wird durch den Tumorsuppressor *CDKN2A* inhibiert (Abbildung 10 b). Rb wiederum kontrolliert den G1/S-Übergang, indem es die Familie der E2F Transkriptionsfaktoren bindet und damit verhindert, dass es zur Transkription von Genen kommt, die zu einem Fortschreiten des Zellzyklus führen. Die Inaktivierung der Rb-vermittelten Zellzykluskontrolle (Abbildung 10 c) erfolgt durch genetische Aberrationen der Gene *RB1*, *CDK4*, *CDKN2A/B* (Kanu, Mehta et al. 2009; Brennan 2011).

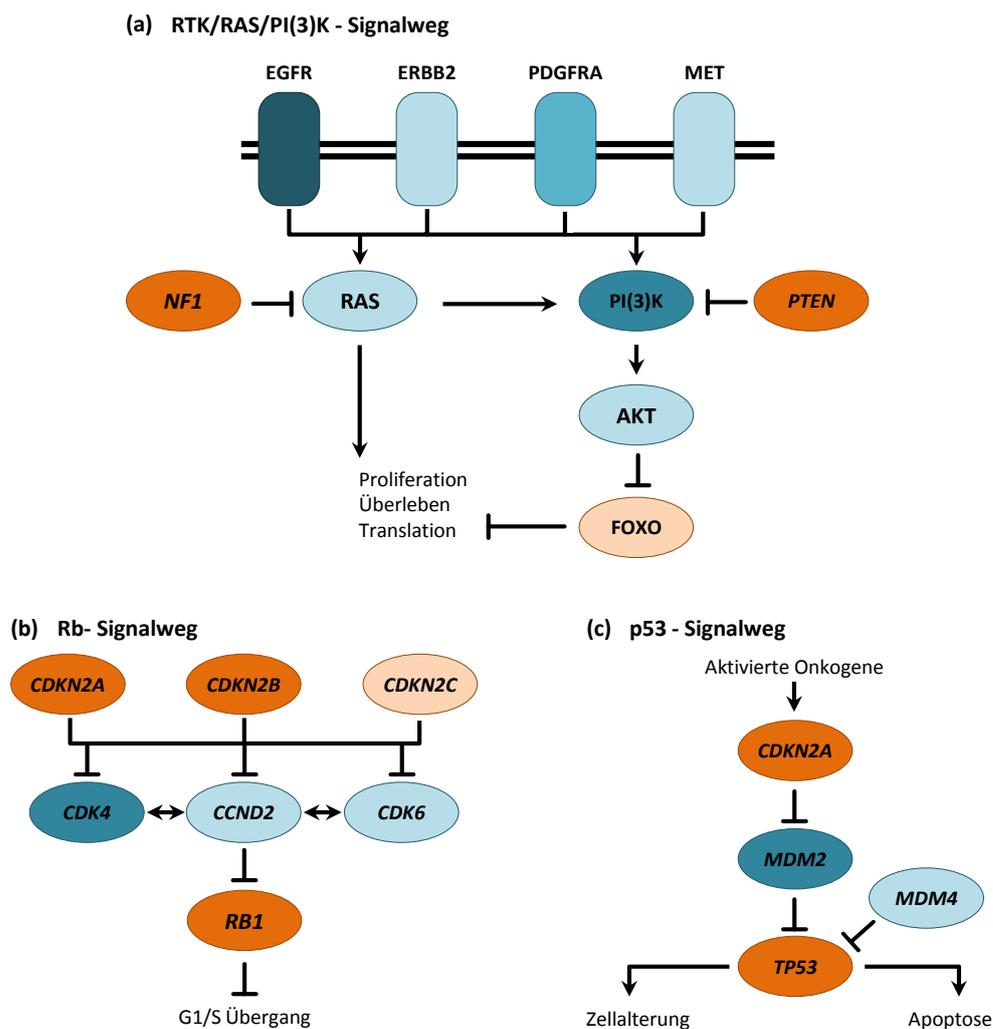


Abbildung 10 Häufige genetische Veränderungen von drei kritischen Signalwegen. Darstellung der Aberrationen von Mitgliedern des RTK/RAS/PI(3)K (a), Rb (b) und p53 (c) Signalwegs. Aktivierende Veränderungen sind in blau, inaktivierende Veränderung in orange dargestellt, je dunkler die Schattierungen, desto häufiger auftretend. [Modifiziert nach (The Cancer Genome Atlas 2008)]

Methylierungsmuster

Globale Hypomethylierung kann in GBIV beobachtet werden und kann durch die damit verbundene Aktivierung von Onkogenen, LOI oder durch die dadurch ausgelöste genomische Instabilität zur Pathogenese von GBIV beitragen (Cadieux, Ching et al. 2006). Zusätzlich wird eine Promotorhypermethylierung von klassischen TSG (*RB1*, *EMP3*, *RASSF1A*, *CITED4*), von Zellzyklus-regulierenden Genen (*p16^{INK4a}*, *p14^{INK4b}*), von Genen, die an der DNA-Reparatur beteiligt (*MGMT*, *MLH1*) und von Genen, die bei Invasion und Apoptose eine Rolle spielen (*DAPK*, *TIMP3*) beobachtet (Nakamura, Watanabe et al. 2001; Alaminos, Davalos et al. 2005; Tews, Roerig et al. 2007; Kanu, Mehta et al. 2009).

Das Methylierungsmuster von GBIV unterscheidet sich eindeutig zwischen pGBIV und sGBIV. So sind alle oben beschriebenen Veränderungen des Methylierungsmusters überwiegend in sGBIV zu finden (Kanu, Mehta et al. 2009). Dieser GBIV-CpG Island hyperMethylator Phenotype (G-CIMP

Status) korreliert exklusiv mit dem Auftreten von *IDH1* Mutationen und wird daher in sGBIV sowie in als *Proneural* klassifizierten pGBIV mit *IDH1* Mutationen identifiziert (Noushmehr, Weisenberger et al. 2010; Turcan, Rohle et al. 2012).

Die *MGMT* Promotorhypermethylierung wird ebenfalls häufiger in sGBIV (75 %) als in pGBIV (36 %) beobachtet (Nakamura, Watanabe et al. 2001). *MGMT* kodiert für eine O6-Methylguanin-Methyltransferase, die Alkylgruppen von der O-6 Position von Guanin entfernt. Patienten mit *MGMT* Promotorhypermethylierung zeigen eine Sensitivität gegenüber alkylierenden Wirkstoffen (wie Temozolomid) und haben eine bessere Prognose. Die *MGMT* Promotorhypermethylierung findet daher als molekularer Biomarker in GBIV-Patienten Verwendung (Riemenschneider, Jeuken et al. 2010).

1.4 Next Generation Sequencing

Die vollständige Sequenzierung des humanen Genoms (Humangenomprojekt) im Jahr 2001 ist eine der wichtigsten Errungenschaften in der Geschichte der Wissenschaft (Lander, Linton et al. 2001; Venter, Adams et al. 2001; International Human Genome Sequencing Consortium 2004). In den letzten 30 Jahren war die Didesoxymethode nach Sanger die Standardmethode zur DNA-Sequenzierung und erlebte beim Humangenomprojekt ihre Hochphase. Trotz vieler technischer Verbesserungen der automatisierten Sanger Sequenzierung während dieser Ära, gibt es doch eine klare Grenze für die Anwendung der Sanger Sequenzierung bei der Entschlüsselung einer großen Anzahl von menschlichen Genomen. Die Anforderungen immer größere Mengen an Sequenzdaten zu produzieren, so schnell und so billig wie möglich, führte zur Entwicklung der *Next Generation Sequencing* (NGS) Technologien. Mit der Einführung der NGS Techniken, mit denen Millionen von Sequenzen parallel gelesen werden können, wurde die DNA-Sequenzierung revolutioniert und eröffnete damit ein breites Spektrum von Anwendungsmöglichkeiten. Diese reichen von de novo Sequenzierungen neuer Genome über die Re-Sequenzierung humaner Genome (The 1000 Genomes Project 2010), die Entschlüsselung von Krebsgenomen (International Cancer Genome Consortium 2010) und Epigenomen (Human Epigenome Project 2008) und RNA-Sequenzierung (Wang, Gerstein et al. 2009) bis hin zur personalisierten Medizin.

1.4.1 NGS-Technologie

Zu den kommerziell erhältlichen NGS-Technologien gehören die Plattformen von Roche, Illumina und Life TechnologiesTM. Die einzelnen Schritte auf dem Weg zur DNA-Sequenz lassen sich in drei Abschnitte gliedern: (1) Herstellung einer DNA-Bibliothek. (2) parallele, klonale Amplifikation der DNA. (3) Sequenzierung. (Abbildung 11).

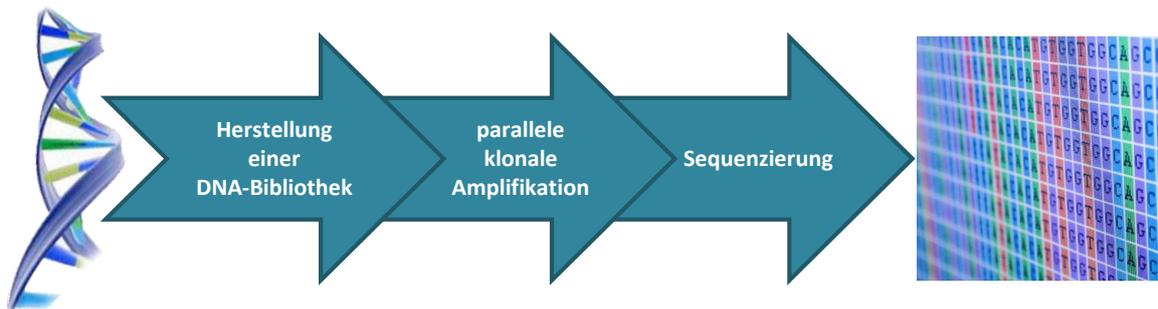


Abbildung 11 Einzelschritte von der DNA zur Sequenz.

1.4.1.1 Die NGS-Plattformen von Roche und Illumina

Herstellung der DNA-Bibliothek

Die prinzipiellen Schritte bei der Herstellung der DNA-Bibliothek sind: (1) Physikalische Fragmentierung der DNA. (2) Reparatur der zufällig entstanden Fragmente. (3) Ligation von Adaptern an beide Seiten der DNA-Fragmente.

Klonale Amplifikation

Die beiden grundlegenden Methoden zur Amplifikation des Templates sind Emulsions-PCR (Dressman, Yan et al. 2003) und die Festphasen-Amplifikation bzw. Bridge-PCR (Fedurco, Romieu et al. 2006). Bei der Emulsion-PCR wird die einzelsträngige DNA-Bibliothek über die Adapter an Beads gebunden. Die Amplifikation der Bead-gebundenen DNA erfolgt in den Tröpfchen einer Öl-in-Wasser Emulsion (Abbildung 12 a). Nach der Amplifikation und Anreicherung der Fragmentbedeckten Beads werden diese in den Wells einer PicoTiterPlate (PTP) immobilisiert.

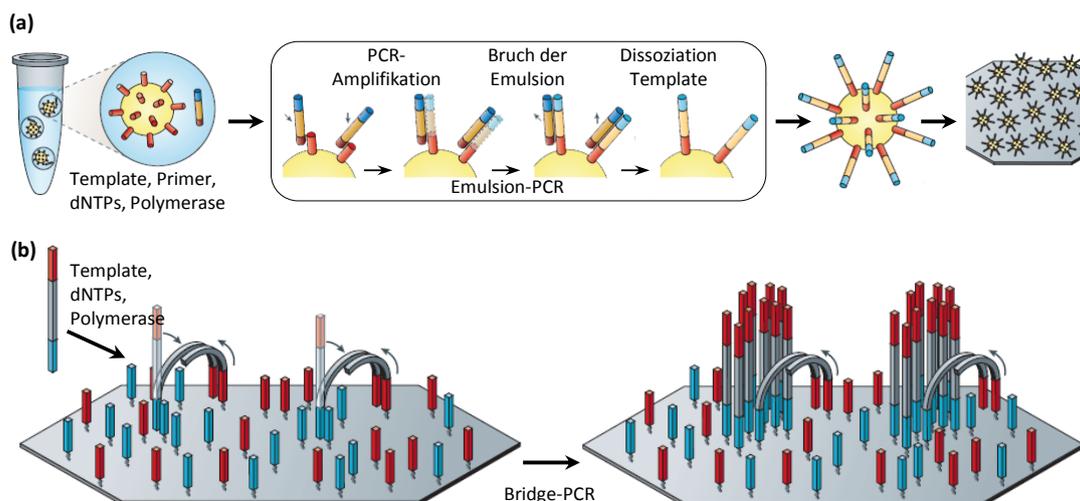


Abbildung 12 Parallele, klonale Amplifikation. Die DNA-Bibliothek wird auf eine feste Oberfläche fixiert und durch (a) Emulsions-PCR (Roche) oder (b) Bridge-PCR (Illumina) amplifiziert. Es entstehen klonale DNA-Fragmente.

[Modifiziert nach (Metzker 2010)]

Die Bridge-PCR erfolgt auf einem Glass-Slide (Flow Cell). Auch hier werden die DNA-Fragmente über die Adapter gebunden, Vorwärts- und Rückwärts-Primer sind kovalent auf der Flow Cell gebunden. Pro DNA-Fragment entstehen durch Amplifikation einzelne, getrennte Cluster klonaler Fragmente (Abbildung 12 b).

Sequenzierung

Die Pyrosequenzierung (Abbildung 13 a), die Grundlage der Roche Technologie ist, basiert auf der Messung der Biolumineszenz, die durch die ATP-abhängige katalytische Spaltung von Luciferin emittiert wird (Ronaghi, Uhlen et al. 1998). Ein Zyklus der Sequenzierreaktion besteht aus je vier einzelnen Synthesereaktionen. Nach dem Einbau des komplementären dNTP pausiert die Polymerase, bis dann das nächste komplementäre dNTP eingebaut werden kann. Durch den Einbau der Nukleotide an den wachsenden DNA-Strang wird durch die Polymerase Pyrophosphat abgespalten. Pyrophosphat, APS und Luciferin werden von Sulfurylase und Luciferase katalytisch in Licht und Oxyluciferin umgewandelt. Die Reihenfolge und Intensität der Licht-Peaks werden als Diagramm (Abbildung 13 b) von einer CCD-Kamera aufgezeichnet und repräsentiert die DNA-Sequenz (Margulies, Egholm et al. 2005).

Sequenzbedingt können im Template Homopolymere (z.B. TTTTT) vorliegen. Da die Nukleotide an der 3'-OH Gruppe nicht blockiert sind, können mehrere identische Nukleotide hintereinander eingebaut werden; die emittierte Lichtintensität ist proportional zur Anzahl der abgespaltenen PP_i -Moleküle. Bei Homopolymeren von mehr als sechs Nukleotiden liegt die Lichtintensität außerhalb des linearen Bereichs, so dass die genaue Anzahl der Nukleotide im Homopolymer nicht mehr bestimmt werden kann. Dies spielt v.a. bei der Bisulfitsequenzierung eine wichtige Rolle, da es durch den degenerierten Basencode mit nur drei unterschiedlichen Nukleotiden oft zu langen T-Homopolymeren kommt. Deletionen oder Insertionen von Basen sind daher die häufigsten Sequenzierfehler (Mardis 2008).

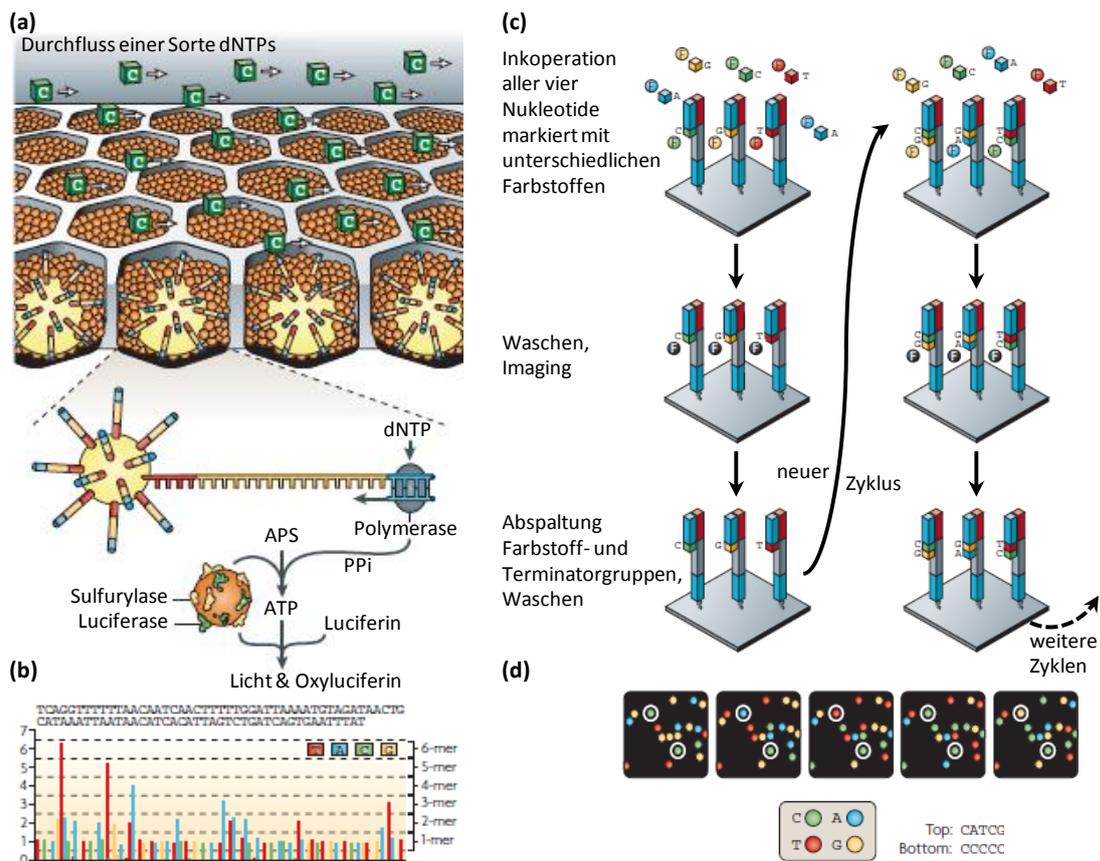


Abbildung 13 Grundlagen der Sequenzierungstechnologien von Roche und Illumina. Das (a) Pyrosequencing (Roche) basiert auf der Messung von Biolumineszenz. Beim (b) Sequencing-by-Synthesis (Illumina) erfolgt das Auslesen der Sequenz durch Fluoreszenz-markierte Nucleotide. [Modifiziert nach (Metzker 2010)]

Die Sequencing-by-Synthesis Methode (Illumina) bedient sich der *Cyclic Reversible Termination* (CRT). Alle vier Nucleotide sind mit einem unterschiedlichen Fluorophor gekoppelt und am 3'-Ende durch eine Azidomethylgruppe, die Terminatorgruppe, modifiziert. Während eines Reaktionszyklus (Abbildung 13 c) werden der Polymerase gleichzeitig alle vier Nucleotide zur Strangsynthese angeboten. Nach Einbau eines komplementären Nucleotids ist eine Strangverlängerung durch die blockierte 3'OH-Gruppe nicht mehr möglich. Die vier Farben der Fluorophore werden mittels *Total Internal Reflection Fluorescence* (TRIF) Imaging detektiert (Abbildung 13 d), die Fluorophorgruppen und die Terminatorgruppe werden abgespalten, ein neuer Syntheseyklus beginnt (Bentley, Balasubramanian et al. 2008).

Durch die Verwendung der CRT besteht hier nicht die Gefahr von Basendeletionen oder Insertionen, auch lange Homopolymere stellen kein Problem dar. Die größte Fehlerquelle liegt hier bei der Substitution einzelner Basen v.a. nach dem Einbau eines Guanins (Dohm, Lottaz et al. 2008).

1.4.2 Anreicherungen

Die Einführung der NGS Technologien führte zu einer enormen Reduktion der Sequenzierkosten (Metzker 2010). Im Jahr 2001 lagen die Kosten pro Mb DNA-Sequenz bei knapp 10.000 US\$ und sanken im Verlauf von 10 Jahren bis auf wenige Cent ab (Abbildung 14).

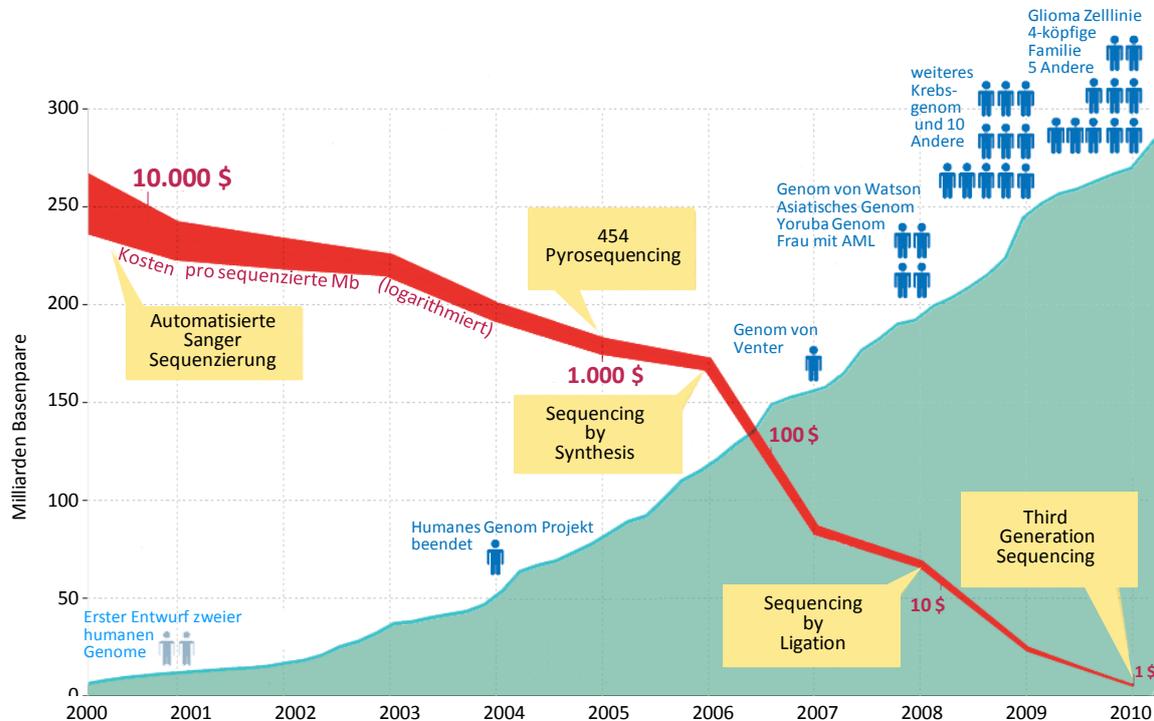


Abbildung 14 Entwicklung der Kosten pro sequenzierter Mb DNA-Sequenz. Im Jahr 2001 lagen die Kosten für eine Mb DNA-Sequenz bei knapp 10.000 US\$. Eine rapide Abnahme der Kosten war ab der zweiten Jahreshälfte 2007 zu verzeichnen. [Modifiziert nach Nature | Vol464 | 1st April 2010]

Nichtsdestotrotz sind die Sequenzierung ganzer Genome bis heute kostenintensive Projekte. Eine Einsparung von Kosten und Zeitaufwand kann durch die Reduktion der Komplexität des Genoms zur zielgerichteten Sequenzierung (*target enrichment*) erreicht werden. Dabei handelt es sich um die Anreicherung bestimmter interessierender Regionen wie Exons, codierende Gene, bestimmte Genfamilien oder Gene bzw. genomische Bereiche, die mit Krankheiten in Verbindung stehen.

Mehrere Techniken zur Anreicherung interessierender genomischer Zielregionen wurden entwickelt. Darunter fallen: (Abbildung 15 a) die *Microdroplet PCR* (The RainStorm Plattform, entwickelt von RainDance TechnologiesTM), die - ähnlich der Emulsions-PCR - die parallele Generierung 1000er von Amplikons ermöglicht; (b) die *Molecular Inversion Probes* (MIP) basierte Methode (Nilsson, Malmgren et al. 1994; Landegren, Schallmeiner et al. 2004), bei der einzelsträngige Oligos (*ss-Probes*) an ihr komplementäres Template hybridisieren; durch enzymatische Schritte kommt es zur Zirkularisierung der Oligos, die dann den interessierenden Bereich enthalten; (c) *Solution Hybrid Selection*, Hybridisierung in Flüssigphase (Gnirke, Melnikov et al. 2009), bei der biotinylierte RNA-Oligos an komplementären DNA-Fragmente hybridisieren, und über die Biotinmarkierung selektiert werden können; (d) die *Microarray Genomic Selection*

(MGS), Array-basierte Hybridisierung (Albert, Molla et al. 2007; Hodges, Xuan et al. 2007; Okou, Steinberg et al. 2007).

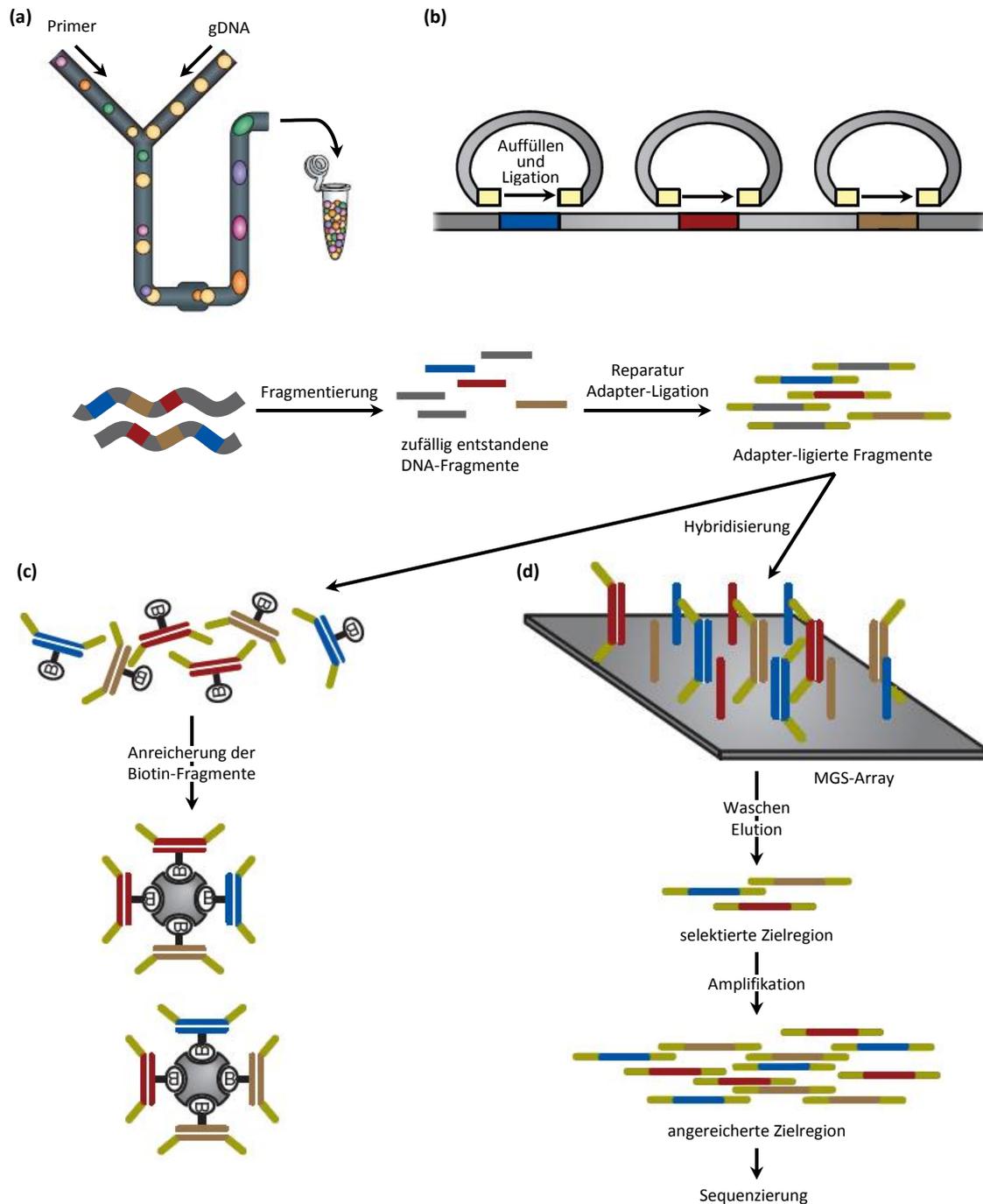


Abbildung 15 Methoden zur Anreicherung von interessierenden genomischen Zielregionen. (a) *Microdroplet PCR*, (b) *Molecular Inversion Probes*, (c) *Solution Hybrid Selection*, (d) *Microarray-based Genomic Selection (MGS)*: gDNA wird fragmentiert, repariert und Adapter ligiert. Die Fragmente werden auf einen Glas-Array hybridisiert. Nach Waschen, Elution und Amplifikation erfolgt die Sequenzierung.

[Modifiziert nach (Mamanova, Coffey et al. 2010; Metzker 2010)]

Bei der MGS, auf deren Grundlage vorliegende Arbeit basiert, wird genomische DNA physikalisch fragmentiert, repariert und Adapter ligiert. Die so entstandene DNA-Bibliothek wird auf einen

Array hybridisiert. Die *custom-designed* ca. 60-80 bp langen Oligos, auf der Glasoberfläche fixiert, sind komplementär zur interessierenden Zielregion. Nach Waschen, Elution und Amplifikation liegt eine für die interessierenden Zielregionen angereicherte DNA-Bibliothek vor, deren DNA-Sequenz mittels NGS analysiert werden kann.

Mehrere Modifikationen der MGS wurden publiziert (Bau, Schracke et al. 2009; D'Ascenzo, Meacham et al. 2009; Hodges, Rooks et al. 2009; Igartua, Turner et al. 2010; Summerer, Schracke et al. 2010). Seitdem wurden zahlreiche Arbeiten veröffentlicht, in denen die zielgerichtete Sequenzierung durch die Anreicherung von Zielregionen eingesetzt wurde (D'Ascenzo, Meacham et al. 2009; Lee, O'Connor et al. 2009; Ng, Turner et al. 2009; Burbano, Hodges et al. 2010; Nikopoulos, Gilissen et al. 2010; Chang, Jackson et al. 2011; Keller, Harz et al. 2011; Meder, Haas et al. 2011).

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es mit der *Next Generation Sequencing* Technologie neue epigenetische und genetische Aberrationen zu identifizieren, die bei der Pathogenese oder der Prognose von primären und sekundären Glioblastomen eine Rolle spielen.

Hierzu sollte im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zur Kostenersparnis eine Methode zur Anreicherung subgenomischer Bereiche etabliert werden, mit der eine subgenomische DNA-Methylierungsanalyse erfolgen kann.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollten dann eine subgenomische DNA-Methylierungsanalyse potentielle Tumorsuppressorgene des Chromosoms 10q identifiziert werden, die durch differentielle Methylierung reguliert sind.

Im dritten Teil der Arbeit sollten mittels *Mate-Pair Sequencing* neue genomische Strukturvariationen in Glioblastomen identifiziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

| Name | Hersteller |
|---------------------------------------|---|
| Agar Agar | GERBU Biotechnik, Wieblingen, D |
| Bovine Serum Albumine (BSA) | NEB, Frankfurt am Main, D |
| Eisessig | Merck, Darmstadt, D |
| Ethanol | VWR, Darmstadt, D |
| Ethidiumbromid | Applichem, Darmstadt, D |
| Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA) | Merck, Darmstadt, D |
| Glycerin | Roth, Karlsruhe, D |
| Hefeextrakt | GERBU Biotechnik, Wieblingen, D |
| LE Agarose | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D |
| NaCl | Applichem, Darmstadt, D |
| Natronlauge | Applichem, Darmstadt, D |
| Nuclease-free Water | Qiagen, Hilden, D |
| Trizma [®] Base | Sigma-Aldrich, München, D |
| Trypton | Applichem, Darmstadt, D |
| TWEEN [®] 20 | Sigma-Aldrich, München, D |

2.1.1 Lösungen, Medien und Antibiotika

| Lösung | Zusammensetzung |
|---------------|---|
| 50 x TAE | 2 M TRIS 1 M Eisessig 0,05 M EDTA-Na ₂ * 2 H ₂ O in H ₂ O |
| Ampicilin | Stocklösung: 100 mg/ml in H ₂ O Arbeitskonzentration: 100 µg/ml |
| LB-Medium | 10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl in H ₂ O, pH=7.5 |
| S.O.C. Medium | 20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl 2.5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose in H ₂ O, pH=7 |

2.1.2 Enzyme

| Enzym | Hersteller |
|---|--------------------------------|
| FastStart High Fidelity PCR System | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| Hot StarTaq DNA Polymerase | Qiagen, Hilden, D |
| T4 DNA Ligase (400 U/μl) | NEB, Frankfurt am Main, D |
| T4 DNA Polymerase (3 U/μl) | NEB, Frankfurt am Main, D |
| T4 Polynucleotide Kinase, 3' minus(10 U/μl) | NEB, Frankfurt am Main, D |
| Taq DNA Polymerase | Qiagen, Hilden, D |

2.1.3 Lösungen und Puffer

| Name | Hersteller |
|---------------------------------------|--------------------------------|
| ATP | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| Carrier RNA | Qiagen, Hilden, D |
| dATP | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| Gelelektrophorese Ladepuffer (6 x) | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| GeneRuler DNA Ladder Mix | Fermentas, St. Leon-Rot, D |
| Human COT-1 DNA | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| Human Genomic DNA: Male | Promega, Madison, USA |
| Sequence Capture Hybridisation Kit | Roche NimbleGen, Madison, USA |
| Sequence Capture Wash and Elution Kit | Roche NimbleGen, Madison, USA |
| Universal ProbeLibrary Probes | Roche Diagnostics, Mannheim, D |

2.1.4 Kommerziell erhältliche Kits

| Kit | Hersteller |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| DNA 1000 Kit | Agilent Technologies, Böblingen, D |
| EZ DNA Methylation Kit | Zymo Research, Irvine, USA |
| High Sensitivity DNA Kit | Agilent Technologies, Böblingen, D |
| LightCycler 480 Probes Master | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| Mate Pair Library Prep Kit | Illumina, San Diego, Kalifornien, USA |
| MinElute Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden, D |
| MinElute PCR Purification | Qiagen, Hilden, D |
| Plasmid Purification Kit | Qiagen, Hilden, D |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden, D |
| QuantiFast Sybr Green PCR Kit | Qiagen, Hilden, D |
| SC Array Hybridization and Wash Kit | Roche NimbleGen, Inc., Madison, USA |
| TOPO® XL PCR Cloning Kit | Invitrogen, Karlsruhe, D |

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

| Name | Hersteller |
|--|---|
| AMPure XP | Beckman Coulter, Krefeld, D |
| Barrier Tips (10 µl, 100 µl, 1000 µl) | Neptune, San Diego, USA |
| Direktverdrängerspitzen | Gilson, Middleton, USA |
| Falcon™-Röhrchen, konisch (15 ml; 50 ml) | BD Biosciences, Heidelberg, D |
| LightCycler 480 Multiwell Plate 384 | Roche Diagnostics, Mannheim, D |
| micro TUBE snap-cap | Covaris, Woburn, D |
| OneShot® TOP10 Competent Cells | Invitrogen, Karlsruhe, D |
| PCR Platten | Nunc, Wiesbaden, D |
| PCR SoftTubes 0,2 ml | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D |
| Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml) | Eppendorf, Hamburg, D |
| Rotilabo-Einmal-Pinzetten, steril | Roth, Karlsruhe, D |
| Single Cap 8er-SoftStrips 0,2 ml | Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D |
| Sterile Einmalskalpelle | VWR, Darmstadt, D |
| X1 Mixer | Roche NimbleGen, Madison, USA |

2.1.6 Geräte

| Gerät | Hersteller |
|-----------------------------------|--|
| Bioanalyser 2100 | Agilent Technologies, Böblingen, D |
| Centrifuge 5415 R | Eppendorf, Hamburg, D |
| Cluster Station | Illumina, San Diego, USA |
| Covaris™ S2 | Covaris, Inc., Woburn, USA |
| DNA Engine Thermal Cycler | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Electrophoresis Power Supply | Consort, Turnhout, Belgien |
| Elutionsstation | Roche NimbleGen, Madison, USA |
| Eppendorf Research Pipetten | Eppendorf, Hamburg, D |
| Gelkammer | Owl Scientific, Woburn, USA |
| Genome Analyzer Iix | Illumina, San Diego, USA |
| Heizblock QBT | Grant, Cambridge, GB |
| Hybridisierungsstation | Roche NimbleGen, Madison, USA |
| Hydroshear | Digilab, Holliston, USA |
| Luminescent Image Analyzer | Fujifilm, Düsseldorf, D |
| NanoDrop® ND-1000 Spectrometer | NanoDrop, Wilmington, USA |
| PMAT | Roche NimbleGen, Madison, USA |
| SpeedVac® Savant Vakuumzentrifuge | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA |
| Thermomixer comfort | Eppendorf, Hamburg, D |
| Vortex Genie 2-Mixer | Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz |
| Wasserbad | Neslab Instruments, Portsmouth, USA |

2.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden HPLC-aufgereinigt von Sigma-Aldrich, München, D bezogen.

2.1.7.1 Primer für subgenomische Anreicherungen

| Name | Sequenz (5'-3') |
|------------|--|
| PE-PCR.FOR | AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT |
| PE-PCR.REV | CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGGTCTCGGCATTCTGCTGAACCGCTCTTCCGATCT |

2.1.7.2 Primer für qRT-PCR (UPL-System)

| Name | Vorwärts Sequenz (5'-3') | Rückwärts Sequenz (5'-3') | Probe |
|---------|--------------------------|---------------------------|-------|
| NSC247 | GGCCGACAGACAATACAGAGA | CCACAGTAAGCAGGGGTGAC | 24 |
| NSC268 | TCGCTTAACCAGACTCATCTACTG | GGCTCAGCTGTATGAAGTTG | 64 |
| NSC272 | GGGCAACAACAGCCATATTT | GGCAGCCTGTACCTGAGC | 66 |
| METTL10 | GCAGATCTACCAATGGCACTC | CACAAAAGTCTCCCAACC | 34 |
| MGMT | TTGAAACCCAGGTGTGTTAGG | GGAGGGAGCAGAGGACT | 1 |
| WNT8B | CTTTGAGGATCCCCAGTGC | TGGGACTCTGCTCCTTCTGT | 30 |
| MCM5 | CCCAGGAGGAGGAGGAGT | CGATGCTCTTGGAGATGACC | 71 |
| KCNE1 | CTGGCAAGAGAAGGACAAGG | CAACGACATAGCACGACCTG | 66 |
| DDB2 | TTGTATTACGCCCCAGGAAC | CCCTTCGCACAGAGCTTC | 1 |
| ELAC2 | CCCAAACACCGTGTACCTG | GAACTCGGAGAAGACGTAGAGC | 77 |
| CDKN1B | CCCTAGAGGGCAAGTACGAGT | AGTAGAACTCGGGCAAGCTG | 39 |

2.1.7.3 Primer für MassARRAY®

| Name | Sequenz (5'-3') |
|------------------|---|
| DKK1_001_10F | AGGAAGAGAGAAGGTAAGATTGGGAGTAAATTTG |
| DKK1_001_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTTTAAATCCTTCAATTACCCTCCTC |
| GSTO_001_10F | AGGAAGAGAGGGATTTTTGATGTAGAGGAGTTTT |
| GSTO_001_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTATCTACAAACCAAACCAAACT |
| HHEX_001_10F | AGGAAGAGAGGAGGTTTTTAAATGAAATTAGGTGGA |
| HHEX_001_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTCCCTAAAACTCCAAACACCC |
| KCNMA1_001_10F | AGGAAGAGAGAGTGGGATGGATTTTTTAAATTTT |
| KCNMA1_001_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTAATAAAAAATTACCCCAACCAATA |
| KCNMA1_002_10F | AGGAAGAGAGGTATTGGTTGGGGTAATTTTTTAT |
| KCNMA1_002_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTAATAAACTTTCCTAACCTCCTCCAT |
| OGDHL_001_10F | AGGAAGAGAGTAGGATTTAGGAGAGAGGAGTTGTG |
| OGDHL_001_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTATAAACTTTCATAACATTCCCATTTT |
| RASGEF1A_002_10F | AGGAAGAGAGGTAGTTTTATTGGGGTTTTAGGAAT |
| RASGEF1A_002_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTACCAAACAACTCCTCCTAAC |

| | |
|------------------|---|
| RASGEF1A_003_10F | AGGAAGAGAGTTGTTTTTGTGGTTGAAAGGG |
| RASGEF1A_003_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTCCCATACCCTAAACCCTATACTAA |
| SEC31B_001_10F | AGGAAGAGAGGTAAGGTAGTAGTGAATAGGGAGATTT |
| SEC31B_001_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTATCACAAAATAAATAAAAAAACCC |
| ZMIZ1_001_10F | AGGAAGAGAGGGGAATTAGGAGTTAGGAGAAGA |
| ZMIZ1_001_T7R | CAGTAATACGACTCACTATAGGGAGAAGGCTAACTATTCTATTTCAAAAAACCC |

2.1.7.4 Adapter

| Name | Sequenz (5'-3') |
|----------------|---|
| PE-Adaptor.FOR | GATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| PE-Adaptor.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT |
| PE-Meth.FOR | GATC _m GGAAGAGC _m GGTTC _m AGC _m AGGAATGC _m C _m GAG |
| PE-Meth.REV | AC _m AC _m TC _m TTTC _m C _m C _m TAC _m AC _m GAC _m GC _m TC _m TTC _m C _m GATC _m T |
| MID1.FOR | TGGTTA GATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID1.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT AACCAT |
| MID2.FOR | TCAGTA GATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID2.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT ACTGAT |
| MID3.FOR | TTCTTA GATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID3.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT AGGAAT |
| MID4.FOR | GCATGA GATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID4.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CATGCT |
| MID5.FOR | GTTGGAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID5.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CCAAC T |
| MID6.FOR | GGCCGAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID6.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT CGGCC T |
| MID7.FOR | CCTTCAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID7.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GAAGGT |
| MID8.FOR | CGCGCAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID8.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GCGCG T |
| MID9.FOR | CAACCAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID9.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT GCTTGT |
| MID10.FOR | AGCTAAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID10.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TAGCTT |
| MID11.FOR | ACTGAAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID11.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TCAGTT |
| MID12.FOR | ATGCAAGATCGGAAGAGCGGTTTCAGCAGGAATGCCGAG |
| MID12.REV | ACACTCTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCT TGCATT |

rot markiert= MID-Sequenz



Abbildung 16: Gegabelte Adapter (a) ohne und (b) mit MID-Sequenz.

2.1.8 Patientenproben für die subgenomische DNA-Methylierungsanalyse

Alle Patientenproben (DNA aus Tumorproben) wurden von Prof. Dr. med. Guido Reifenberger, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die *IDH1* Mutation wurde als Marker für die Einteilung in pGBIV und sGBIV verwendet (pGBIV-*IDH1*^{wt} bzw. sGBIV-*IDH1*^{mut}).

Das Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf liegt vor.

| Name | Geschlecht | IDH1 Status | Überleben [Tage] |
|---------|------------|-------------|------------------|
| GB 112 | F | wt | 34 |
| GB 949 | M | wt | 1611 |
| GB 963 | F | wt | 162 |
| GB 964 | M | wt | 195 |
| GB 971 | M | wt | 484 |
| GB 976 | M | wt | 371 |
| GB 978 | M | wt | 245 |
| GB 973 | M | wt | 646 |
| GB 974 | M | wt | 994 |
| GB 954 | F | wt | 474 |
| GB 875 | M | R132H | 375 |
| GB 975 | F | R132H | 462 |
| GB 119 | M | R132H | 297 |
| 161-01 | N/A | R132H | N/A |
| 1094-01 | F | R132S | 71 |
| 2705-07 | F | R132H | N/A |
| 2728-06 | M | R132H | 65 |
| 802-07 | F | R132H | N/A |
| 88-02 | M | R132H | N/A |
| AA 181 | M | R132H | 1731 |
| 85-03 | F | R132H | N/A |

Geschlecht: M= männlich, W= weiblich, N/A= keine Angabe

2.1.9 Kontrollen

Alle Kontrollproben (DNA) wurden über die BioCat GmbH, Heidelberg kommerziell erworben. Bei NB Pool 0 handelt es sich um eine fertige Mischung der DNA von fünf Spendern. NB Pool 1-5 wurden jeweils aus der DNA der einzelnen Großhirnlappen gemischt. Dabei wurde versucht eine gleichmäßige Altersverteilung im Pool zu erzielen. Es wurde ebenso vermieden in einem Pool die DNA unterschiedlicher Lappen eines Spenders zu mischen.

| Name | Gehirnlappen | Alter | Geschlecht | Donor Info |
|-----------|--------------|-------|------------|--------------|
| NB Pool 0 | Großhirn | | | Lot # 208220 |
| NB Pool 1 | Temporal | 41 | M | N30 |
| | Frontal | 66 | M | H11058 |
| | Parietal | 20 | M | B307123 |
| | Okzipital | 33 | M | B105115 |
| NB Pool 2 | Temporal | 24 | M | B307125 |
| | Frontal | 70 | W | A709138 |
| | Parietal | 41 | M | B307122 |
| | Okzipital | 22 | M | A706061 |
| NB Pool 3 | Temporal | 20 | M | B307126 |
| | Frontal | 60 | W | B302062 |
| | Parietal | 24 | M | B307124 |
| | Okzipital | 82 | W | B301059 |
| NB Pool 4 | Temporal | 75 | M | A706063 |
| | Frontal | 42 | W | B302063 |
| | Parietal | 33 | M | B302140 |
| | Okzipital | 20 | M | B307121 |
| NB Pool 5 | Temporal | 33 | M | B302143 |
| | Frontal | 60 | M | B302061 |
| | Parietal | 26 | M | A701012 |
| | Okzipital | 41 | M | B307120 |

Geschlecht: M= männlich, W= weiblich

2.1.10 Patientenproben für Mate-Pair Sequencing

Alle Patientenproben (DNA aus Tumorproben) wurden von Prof. Dr. med. Guido Reifenberger, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Die *IDH1* Mutation wurde als Marker für die Einteilung in pGBIV und sGBIV verwendet (pGBIV-*IDH1*^{wt} bzw. sGBIV-*IDH1*^{mut}).

Das Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf liegt vor.

| Name | Geschlecht | IDH1 Status | Überleben [Tage] |
|---------|------------|-------------|------------------|
| GS 72 | M | wt | 588 |
| GB 112 | F | wt | 34 |
| GB 954 | F | wt | 474 |
| GB 949 | M | wt | 1611 |
| GB 963 | F | wt | 162 |
| GB 964 | M | wt | 195 |
| GB 973 | M | wt | 646 |
| GB 974 | M | wt | 994 |
| GB 976 | M | wt | 371 |
| 1094-01 | F | R132S | 71 |
| 2705-07 | F | R132H | N/A |
| 2728-06 | M | R132H | 65 |
| 802-07 | F | R132H | N/A |
| 88-02 | M | R132H | N/A |
| AA 181 | M | R132H | 1731 |
| GB 119 | M | R132H | 297 |
| GB 875 | M | R132H | 375 |
| GB 975 | F | R132H | 462 |

Geschlecht: M= männlich, W= weiblich, N/A= keine Angabe

2.1.11 Datenbanken

| Name | Beschreibung | URL |
|-----------|---|--|
| DAVID | D atabase for A nnotation, V isualization and I ntegrated D iscovery | http://david.abcc.ncifcrf.gov/ |
| Ensembl | Ensembl Genome Browser Assembly= GRCh37 | http://www.ensembl.org/ index.html |
| R2 | microarray analysis and visualization platform Glioblastoma TCGA dataset n=540 | http://r2.amc.nl |
| Rembrandt | R epository for m olecular b rain n eoplasia d ata | https://caintegrator.nci.nih. gov/rembrandt/home.do |
| UCSC | UCSC Genome Bioinformatics Assembly= Feb 2009 (GRCh37/hg19) | http://genome.ucsc.edu/ |

2.1.12 Software

| Name | Quelle |
|---------------------------------------|---|
| Agilent Expert 2100 | Agilent Technologies, Böblingen, D |
| DNAMAN | http://www.lynnon.com/ |
| EpiDesigner | http://www.epidesigner.com/ |
| Integrative Genomics Viewer (IGV) 2.0 | http://www.broadinstitute.org/software/igv/ |
| LightCycler® 480 SW 1.5 | Roche Applied Science |
| Microsoft Excel 2007 | Microsoft, Redmond, USA |
| Microsoft PowerPoint 2007 | Microsoft, Redmond, USA |
| Primer3 | http://frodo.wi.mit.edu/ |
| SequenceScanner 1.0 | http://www.appliedbiosystems.com/ |

2.2 Methoden

2.2.1 PCR-basierte Methoden

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die spezifische exponentielle Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten. Das Prinzip der PCR beruht auf zyklischen Wiederholungen von Denaturierung, Annealing von Primern und Elongation durch eine thermostabile Polymerase (Saiki, Gelfand et al. 1988).

2.2.1.1 Ligation-Mediated PCR (LM-PCR)

Auf beiden Seiten der DNA-Fragmente werden Adapter ligiert, die die Primerbindungsstellen beinhalten. So lässt sich ein Pool genomischer DNA-Fragmente sequenzunabhängig amplifizieren. Die LM-PCR wurde bei der Qualitätskontrolle von DNA-Bibliotheken eingesetzt, um sicherzustellen, dass genügend DNA-Fragmente beidseits Adapter besitzen und sich somit zur Sequenzierung amplifizieren lassen (Protokoll vgl. Kapitel 3.1).

2.2.1.2 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time PCR ermöglicht u.a. die Quantifizierung von DNA. Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Fluoreszenz interkalierender Farbstoffe oder FRET basierender Hybridisierungssonden.

Zur Überprüfung der Anreicherung der Zielregionen wurde mit dem Universal ProbeLibrary System von Roche Applied Science gearbeitet. Die Primer für die qRT-PCR wurden mit dem „Universal ProbeLibrary Assay Design Center“ von Roche Applied Science erstellt (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000>). Dabei wurden für Kontrollregionen, Zielregionen und Nicht-Zielregionen Assays entwickelt (vgl. Kapitel 3.1).

Zur Bestimmung der Effizienz der Adapter-Ligation bei der Herstellung der DNA-Bibliotheken (vgl. Kapitel 3.1.1) wurde das QuantiFast SYBR Green PCR System von Invitrogen verwendet. Die qRT-PCR erfolgte hier als LM-PCR, d.h. die Primerbindungsstellen liegen in den, an die DNA-Fragmente ligierten, Adaptern. Dadurch lässt sich zurückrechnen, wieviel Prozent der eingesetzten DNA-Bibliothek beidseits Adapter trägt. Ein qRT-PCR-Ansatz bestand aus:

5 µl (2 x) QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix, 2 µl (10 pmol) PE-PCR Primer Mix, 2 µl H₂O und 1 µl DNA. qRT-PCR-Protokoll: 95 °C für 5 min (Ramp Rate [°C/s] 4,8); 40 Zyklen mit 95 °C für 10 s (Ramp Rate [°C/s] 4,8), 58 °C für 20 s (Ramp Rate [°C/s] 2,5), 72 °C für 1 s (Ramp Rate [°C/s] 4,8); 40 °C für 1 min (Ramp Rate [°C/s] 2,5). Eine Standardkurve wurde aus Verdünnungen (50 pg/µl, 5 pg/µl, 0,5 pg/µl, 0,05 pg/µl) bereits amplifizierter (nach PCR-Amplifikation liegen 100 % Adapter-ligierte Fragmente vor) DNA-Bibliothek erstellt.

Bei beiden Methoden wurden die einzelnen Proben jeweils in Triplikaten gemessen, um Messungenauigkeiten zu kompensieren.

2.2.2 Klonierung

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurde das TOPO XL PCR Cloning Kit von Invitrogen nach Angaben des Herstellers benutzt. Verwendet man für PCR Reaktionen Taq Polymerase ohne 3'-5' Exonuclease-Aktivität, so weisen die PCR-Produkte am 3'-Ende ein einzelnes Adenosin auf. Der linearisierte Vektor des Kits besitzt am 5'-Ende ein einzelnes Thymin. So kann das PCR-Produkt spezifisch in den Vektor ligiert werden.

2.2.3 Transformation

One Shot® TOP10 chemisch kompetente *E.coli* wurden zur Amplifikation von Plasmid-DNA verwendet. 2 µl des TOPO XL Ligationsansatzes (s.o.) wurden zu den kompetenten Bakterien pipettiert und 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 30 s gefolgt von einer zweiminütigen Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 350 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 350 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension auf vorgewärmten LB-Selektionsplatten mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gepickt in 3ml LB-Medium mit 0,1 mg/ml Ampicillin überführt und erneut über Nacht bei 37 °C und 350 rpm inkubiert.

2.2.4 Plasmid-Präparation aus Bakterien

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das Plasmid Mini Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Elution erfolgte in 50 µl EB-Puffer.

2.2.5 Gelelektrophorese

DNA kann, bedingt durch ihre negative Ladung, elektrophoretisch der Größe nach in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Zur Herstellung des Agarosegels wurde die benötigte Menge Agarose 1-4 % (v/w) in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und in einen Elektrophoreseschlitten gegossen. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde der GeneRuler™ DNA Ladder Mix von Fermentas verwendet. Anschließend wurde das Gel bei einer Spannung zwischen 90 und 120 V für 1 h gefahren. Bei einer 10-minütigen Färbung im Ethidiumbromid-Bad interkaliert der Farbstoff in die α -Helix. Durch UV-Licht lässt sich die DNA sichtbar machen.

2.2.6 DNA Aufreinigung

2.2.6.1 Aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen wurde die interessierende Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Das Lösen des Gelstücks in QG-Puffer wurde bei 37 °C durchgeführt

2.2.6.2 Aus Reaktionsansätzen

Zur Aufreinigung von DNA aus Reaktionsansätzen wurde das MinElute PCR Purification Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zur Aufreinigung von DNA und zur zeitgleichen Abtrennung kleiner Fragmente wurde mit dem Agencourt AMPure XP System von Beckman Coulter Genomics gearbeitet (vgl. Kapitel 3.1.1.).

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von DNA

2.2.7.1 NanoDrop®

Die Konzentration wässriger DNA-Lösung kann photometrisch bestimmt werden. Nukleinsäuren zeigen aufgrund der in ihnen enthaltenen Basen ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=260$ nm. Bei 260 nm entspricht eine Absorption von 1 bei einem Lichtweg von 1 cm jeweils einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA. Das Verhältnis zwischen den gemessenen Absorptionen bei 260 und 280 nm gibt Aufschluss über eine eventuelle Verunreinigung der DNA oder RNA-Probe mit Proteinen. Bei reinen Nukleinsäure-Lösungen liegt der Quotient A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0. Für die Bestimmung der DNA-Konzentrationen wurde u.a. der NanoDrop® ND-1000 verwendet, mit dem sich die Konzentration kleiner Probenvolumina (1-2 μl) messen lässt.

2.2.7.2 Qubit®

Mit dem Qubit® von Life Technologies lässt sich ebenfalls die Konzentration wässriger DNA-Lösungen messen. Eine Konzentration ab 10 $\text{pg}/\mu\text{l}$ kann mit dem Qubit® System gemessen werden. Das System arbeitet mit einem fluoreszierenden Farbstoff, der an die DNA bindet und erst dann fluoresziert. Die Durchführung des Qubit dsDNA HS Assay erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.8 DNA-Analyse mittels DNA LabChip® Kit

Hierfür wurde die 2100 Bioanalyzer Plattform von Agilent verwendet. Die Methode beruht auf dem Prinzip der Kapillargelelektrophorese und ermöglicht die Messung von DNA-Größe und -Konzentration. DNA-Bibliotheken in einem Konzentrationsbereich von unter 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ wurden mit dem High Sensitivity DNA Kit analysiert. Für DNA-Bibliotheken mit einer Konzentration von mehr als 10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ wurde das DNA 1000 Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

2.2.9 Quantitative DNA Methylierungsanalyse (MassARRAY®)

Zur Validierung der gefundenen Methylierungsmuster wurde mit dem EpiTYPER-MassARRAY System von Sequenom gearbeitet (Ehrich, Nelson et al. 2005). Diese Methode erlaubt eine Hochdurchsatz-Methylierungsanalyse von CpGs. Hierfür wird die DNA einer Bisulfitbehandlung unterzogen, bei der alle unmethylierten Cytosine zu Thymin konvertiert werden. Methylierte

Cytosine werden von der Behandlung nicht verändert. Ausgewählte Promotorregionen werden mittels PCR amplifiziert, in vitro in RNA transkribiert und basenspezifisch durch Endonucleasen geschnitten. Durch MALDI-TOF Massenspektrometrie lassen sich Massenspektren der Spaltprodukte erstellen. Die Fragmente unterscheiden sich in ihrer Masse. Dies beruht auf den Sequenzveränderungen der DNA (C-zu-T-Konversion), die durch die anfängliche Bisulfit-Behandlung hervorgerufen wurden.

2.2.9.1 Bisulfitbehandlung

Die Bisulfitbehandlung von 1 µg DNA wurde mit dem EZ DNA Methylation Kit von Zymo Research nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für 16 h bei 50 °C. Die Elution erfolgte mit 50 µl EB-Puffer von Qiagen.

2.2.9.2 Design der Bisulfit-PCR-Primer

Die Primer für die Bisulfit-PCR wurden mit dem EpiDesigner (<http://www.epidesigner.com/>) erstellt. Die Voreinstellungen des EpiDesigners wurden weitestgehend übernommen. Änderungen wurden lediglich bei der Strangspezifität (Einstellung: „both“) vorgenommen. Außerdem wurde die Einstellung „Analyze CpGs in T Reaction“ abgewählt.

2.2.9.3 PCR

Ein PCR Reaktionsansatz bestand aus: 3,26 µl H₂O, 0,5 µl (10 x) PCR-Puffer, 0,1 µl (10 mM) dNTPs, 0,1 µl (10 µM) Primer-Mix, 0,04 µl Hot StarTaq Polymerase und 1 µl (~ 10-20 ng) bisulfitbehandelte DNA. Amplikons für die Regionen KCNMA1_001, OGDHL, DKK1, RASGEF1A_002 und SEC31B wurden mit folgendem PCR-Protokoll generiert: 95 °C für 15 min; 45 Zyklen mit 95 °C für 30 s, 55 °C für 30 s, 72 °C für 1 min; 5 min bei 72 °C, 4 °C. Die Regionen GSTO2, KCNMA1_002, RASGEF1A_003, HHEX, ZMIZ1 wurden mit folgendem PCR-Protokoll generiert: 95 °C für 15 min; 8 Zyklen mit 95 °C für 30 s, 52 °C für 30 s, 72 °C für 1 min; 37 Zyklen mit 95 °C für 30 s, 65 °C für 30 s, 72 °C für 1 min; 5 min bei 72 °C, 4 °C. Stichprobenartig wurden einzelne Amplikons ausgewählt und auf einem 1,5 % Agarosegel überprüft.

Die in-vitro Transkription, die Massenspektrometrie, sowie die statistische Auswertung wurden von der Abteilung Epigenomik und Krebsrisikofaktoren des DKFZ durchgeführt.

2.2.10 Design des 385K CustomArray für die subgenomische DNA-Methylierungsanalyse

Für das Design der 385K CustomArrays von Roche NimbleGen, die für die Methylierungsanalyse subgenomischer Bereiche verwendet wurden, wurde mittels ENSEMBL die TSS der proteincodierenden Gene („known“ und „novel“) von Chromosom 10q herausgesucht. Die Promotorregion wurde 1500 bp upstream und 300 bp downstream der TSS definiert. Die

Gesamtgröße dieser 1298 einzelnen Bereiche beläuft sich auf 2.510.110 bp. Das eigentliche Design des Arrays wurde von NimbleGen anhand dieser Genliste berechnet. Hochrepetitive Sequenzbereiche, die in den Zielregionen lagen, wurden entfernt. Daraus resultierten dann 2852 einzelne Zielregionen einer Gesamtgröße von 2.031.616 bp. In diesen Zielregionen sind 536 der 741 Gene mit RefSeq Annotation vertreten. Rund 80,9 % der interessierenden Basen und somit 83.516 CpGs können angereichert werden.

Der Array besteht aus 385.000 Probes (Oligonukleotide), die 60 bis 80 Nukleotide lang und komplementär zur Zielregion sind. Mit solch einem 385K CustomArray kann eine Zielregion von bis zu 5 Mb abgedeckt werden. Die Chromosomenpositionen der Zielregionen für die subgenomische DNA-Methylierungsanalyse (Kapitel 3.3) sind in Anhang 6.10 verzeichnet.

2.2.11 Mate-Pair Sequenzierung

Das Potential der Methode leitet sich von der Art und Weise der Herstellung der DNA-Bibliotheken ab. Der initiale Schritt besteht aus der Fragmentierung der genomischen DNA auf eine definierte Größe. Die Reparatur der Enden wird mit biotinylierten dNTPs durchgeführt. Nach Zirkularisierung der DNA-Fragmente und erneuter Fragmentierung werden die biotinylierten Fragmente selektiert. Nach Adapter-Ligation und finaler Größenselektion wird die Sequenzierung der DNA- Bibliothek als PE-Lauf durchgeführt: Dabei werden beide Enden der ursprünglichen DNA-Fragmente ansequenziert. Durch das Mapping auf das Referenzgenom können dann Insertionen, Deletionen, Amplifikationen und Translokationen detektiert werden (Abbildung 17). (Korbel, Urban et al. 2007)

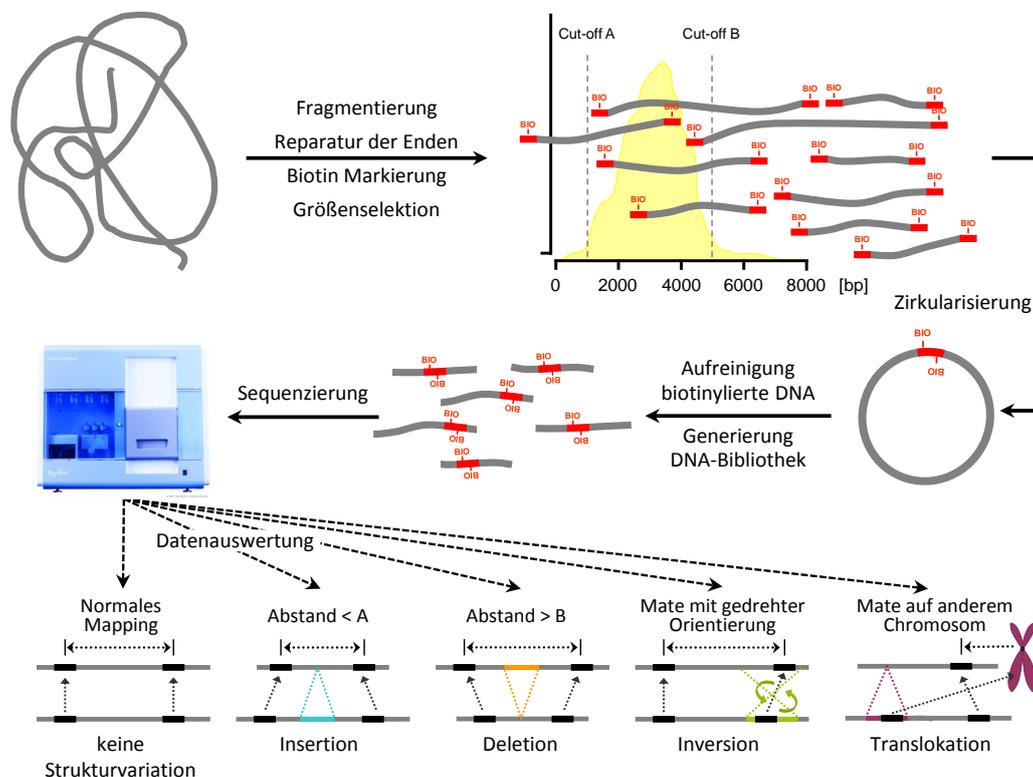


Abbildung 17 Mate-Pair Sequenzierung. [Modifiziert nach (Korbel, Urban et al. 2007)]

Die Präparation der Mate-Pair Bibliotheken wurde mit dem Mate Pair Library Prep Kit v2 von Illumina mit folgenden Modifikationen durchgeführt. Die initiale Fragmentierung wurde mit dem HydroShear durchgeführt und die Einstellungen so gewählt (Cycles 20, Assembly / Speed Code 14), dass Fragmente eine Länge von 3 kb zu erwarten waren. Bei der Gelextraktion wurde ein Größenbereich von 2,9 - 3,1 kb ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit dem Qubit® (1.0) Fluorometer. Aus Konzentrationsgründen konnte nicht in allen Fällen 600 ng DNA in die Zirkularisierungsreaktion eingesetzt werden, daher wurde in Folge dessen die gesamte Ausbeute der Gelextraktion eingesetzt. Zur Fragmentierung der zirkularisierten DNA auf 500 bp wurde das Covaris® S2 System mit den micro TUBEs und folgenden Einstellungen verwendet: Duty Cycle 5 %, Intensity 3, Cycles per Burst 200, Time 90 s, Frequency Sweeping on, Temperatur des Wasserbads 4 °C.

Zur Anreicherung Adapter-ligierter DNA-Fragmente wurde die PCR laut Hersteller-Protokoll durchgeführt. Zur Verringerung von PCR-Artefakten konnte die Zyklenzahl auf 15 reduziert werden. Bei der anschließenden Gelextraktion wurde ein Bereich von 400 bp +/- 50 bp ausgeschnitten. Die DNA Bibliothek wurde auf dem 2100 Bioanalyzer und High Sensitivity DNA Kit analysiert (Größenverteilung, Konzentration), eine zweite Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Qubit.

Die Auswertung beinhaltet nur Deletionen und Amplifikationen, die in mindestens zwei Proben identifiziert werden könnten. Bei den Amplifikationen sind nur solche mit einer Mindestkopienanzahl von fünf berücksichtigt. Amplifikationen und Deletionen, die in Bereichen bekannter Polymorphismen liegen, wurden nicht berücksichtigt.

2.2.12 Hochdurchsatz-Sequenzierung

Die Hochdurchsatz-Sequenzierungen der Bisulfit-Anreicherungen und der MID-Anreicherungen liefen auf dem Genome Analyzer Ix von Illumina (Bentley, Balasubramanian et al. 2008). Die Sequenzierungen erfolgten nach den Protokollen des Herstellers. Eine möglichst exakte Konzentrationsbestimmung ist für eine maximale Datenausbeute unerlässlich. Im ersten Schritt wurde die DNA mittels NanoDrop® vermessen. Auf dieser Konzentration basierend wurde eine Verdünnung der Probe auf 5 ng/µl hergestellt. Dann wurde die Verdünnung der Probe mittels 2100 Bioanalyzer und High Sensitivity DNA Kit vermessen. Basierend auf der Messung mit dem 2100 Bioanalyzer wurde die (5 ng/µl) Probe auf 10 nM verdünnt und für die Sequenzierung eingesetzt.

Hochdurchsatz-Sequenzierungen auf der Roche Plattform (Margulies, Egholm et al. 2005) wurden bei den Methodenetablierungen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Sequenzierungen für die Methodenetablierungen wurden von André Leischwitz, Zentrale Einheit für Genom und Proteom, DKFZ durchgeführt. Sequenziert wurden hier: 36 bp Paired-End Läufe, 100 bp Single-Read Läufe, 100 bp Paired-End Läufe.

Die Sequenzierungen des Kooperationsprojekts mit dem Universitätsklinikum Ulm wurden von André Leischwitz, Zentrale Einheit für Genom und Proteom, DKFZ durchgeführt. Sequenziert wurden hier: 100 bp Paired-End Läufe.

Die Sequenzierungen für das Projekt „Subgenomische DNA-Methylierungsanalyse im Glioblastomen“ wurden zusätzlich von André Leischwitz, Zentrale Einheit für Genom und Proteom, DKFZ durchgeführt. Sequenziert wurden hier: 100 bp Single-Read Läufe.

Die Sequenzierungen des Projekts „Identifizierung von Strukturvariationen im Glioblastom“ erfolgten in der Genomics Core Facility am EMBL Heidelberg. Sequenziert wurden hier: 36 bp Paired-End Läufe.

2.2.13 Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatischen Auswertungen bei der Methodenetablierung wurden von Berit Haldemann, Zentrale Einheit für Genom und Proteom, DKFZ durchgeführt.

Die bioinformatischen Auswertungen des Projekts „Subgenomische DNA-Methylierungsanalyse im Glioblastom“ (Kapitel 3.3) wurden v.a. von Volker Hovestadt, Abteilung Molekulare Genetik, DKFZ und auch von Berit Haldemann, Zentrale Einheit für Genom und Proteom, DKFZ durchgeführt.

Zum Alignment der Sequenzdaten mit dem humanen Genom wurde Bowtie (<http://bowtie-bio.sourceforge.net>) (Langmead, Trapnell et al. 2009) verwendet. Bei den Sequenzdaten handelte es sich, verursacht durch die Bisulfitbehandlung, um einen degenerierten Basencode. Zum Mapping der Reads wurden daher alle Cytosine (potentiell methyliert) zu Thyminen konvertiert. Das Alignment erfolgte an das C zu T (Watson Strang) oder G zu A (Crick Strang) konvertierte Genom (UCSC hg19). Reads, die an mehrere Stellen mappen, wurden entfernt. Bei den Reads, die an die gleiche 5' Position mappen (Duplikate), wurde nur derjenige Reads behalten, der den besten Phred Quality Score aufwies.

Die bioinformatische Auswertung des Projekts „Identifizierung von Strukturvariationen im Glioblastom“ wurde von Dr. Marc Zapatka, Abteilung Molekulare Genetik, DKFZ durchgeführt. Das Alignment der Sequenzdaten an das Referenzgenom (UCSC hg19) erfolgte mittels Burrows-Wheeler Aligner (BWA; <http://bio-bwa.sourceforge.net>) (Li and Durbin 2009). Bei einigen Proben wurden mehrere Lanes sequenziert. Für die Vereinigung der Sequenzdaten der gleichen Proben und zur Entfernung der Duplikate wurde Picard (<http://picard.sourceforge.net>) verwendet. Zur Identifikation von Kopienzahlveränderungen wurde aus der Anzahl der Reads in 1 kb Fenstern die Log Ratio von Tumor zum Normalgewebe bestimmt und diese mittels GLAD (Hupe, Stransky et al. 2004) segmentiert. Die Identifikation von Insertionen und Deletionen erfolgte mittels Breakdancer (Chen, Wallis et al. 2009).

2.2.14 Statistische Analysen

Für die Methylierungsanalyse der CpGs in den Zielregionen wurde die Signifikanz mittels Zweistichproben-t-Test überprüft. Die Individuellen p-Werte wurden mittels der Benjamini-Hochberg-Methode für Multiples Testen korrigiert.

Die statistischen Analysen bei der Datenauswertung des MassARRAY[®] wurden von Dr. Rainer Claus, Abteilung Epigenomik und Krebsrisikofaktoren, DKFZ durchgeführt, hierbei wurde mit dem Wilcoxon-Test (Rangsummentest) auf Signifikanz getestet. Dieser parameterfreie Test wird eingesetzt, wenn nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden kann.

In den Kaplan-Meier-Plots wird die Verknüpfung zwischen Genexpression und Überleben dargestellt, die Berechnung erfolgte mittels Log-Rang-Test und Cox-Regression.

Als Signifikanzniveau wurde in allen Fällen 5 % ($p \leq 0,05$) festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Methodenetablierung zur subgenomischen Anreicherung

3.1.1 Generierung von Bibliotheken zur Anreicherung subgenomischer Bereiche

Grundlage für das hier etablierte und optimierte Protokoll zur Generierung von DNA-Bibliotheken zur subgenomischen Anreicherung war der *NimbleGen Arrays User's Guide: Sequence Capture Array Delivery* von Roche NimbleGen und das Protokoll des *Paired-End Sample Prep Kit* von Illumina. Basierend auf diesen Grundlagen wurde ein Protokoll entwickelt, für das die halbierte DNA-Startmenge (10 µg) ausreicht und in dem die Aufreinigungsschritte minimiert sind, da es hierbei immer zu DNA-Verlusten kommt. Desweiteren sollten die Sequenzierung der angereicherten Proben nicht auf den Roche Plattform sondern auf dem Illumina GAIIx durchgeführt werden. Bei der Roche 454 Pyrosequenzierung können Homopolymere von mehr als sechs Nukleotiden nicht mehr eindeutig detektiert werden (vgl. Kapitel 1.4.1.1). Dies spielt vor allem bei der Bisulfit-Anreicherung (siehe folgendes Kapitel 3.1.2) eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund mussten die Roche-Adapter gegen die Illumina-Adapter ausgetauscht.

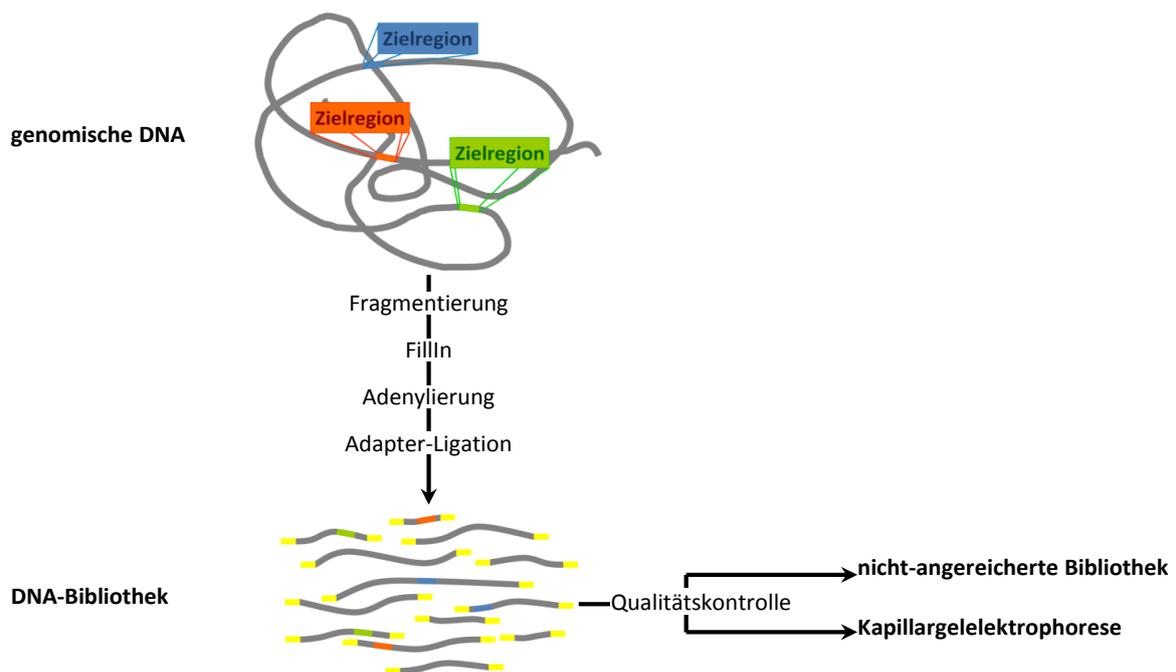


Abbildung 18 Schematische Darstellung des Ablaufs der Präparation von DNA-Bibliotheken.

Fragmentierung

Die Fragmentierung der genomischen DNA erfolgte mit dem Covaris[®] S2 System. Dieses System bietet gegenüber der Nebulisierung (vorgeschlagen in: *NimbleGen Arrays User's Guide: Sequence Capture Array Delivery* und *Illumina Paired-End Sample Prep Kit*) den Vorteil, dass während der Fragmentierung keine DNA-Verluste auftreten. Bei den getesteten Nebulisierungen lag die Verlustrate bei bis zu 50 % (Daten nicht gezeigt). Eine Aufreinigung der fragmentierten DNA ist beim Covaris[®] S2 System nicht notwendig, da der Prozess in Wasser, EB oder TE-Puffer durchgeführt wird. Bei der Nebulisierung findet spezieller Nebulisierungspuffer mit einem hohen Glycerinanteil Verwendung. Eine anschließende Aufreinigung muss erfolgen; weitere DNA-Verluste sind dadurch unvermeidbar.

Für die Größe der DNA-Fragmente wurde eine Verteilung um 200-250 bp angestrebt. Bei dieser Größe haben Scherkräfte nur geringen Einfluss auf die Fragmente, so dass bei der Weiterverarbeitung mit weniger DNA-Verlusten zu rechnen ist. Ein weiteres Auswahlkriterium für diesen Größenbereich war die mögliche Anreicherung von Exons. Ein durchschnittliches Exon ist ca. 200 bp lang (Zhang 1998). Durch die Anreicherung kann dann mit Fragmenten gerechnet werden, die einen hohen Exon-Anteil aufweisen. So kann die Menge an sequenzierten Basen, die in der Zielregion liegen maximiert werden. Die maximale Read-Länge bei einer Sequenzierung mit dem GAlIx von Illumina lag bei 75 bp (Stand 2009, inzwischen bis zu 150 bp). Bei einem Paired-End Lauf mit 2 x 75 bp hätte also eine Fragmentgröße von ca. 150 bp abgedeckt werden können. (Die maximale Read-Länge wurde während der Anfertigung vorliegender Arbeit sukzessive erhöht, so dass die Sequenzierung der angereicherten Proben mit einer Read-Länge von 100 bp durchgeführt werden konnte).

Protokoll

10 µg genomische DNA wurden in 120 µl H₂O in ein „micro TUBE“ gefüllt und in den THQ micro HOLDER eingelegt. Das Wasserbad des Geräts wurde auf 20 °C vorgeheizt. Die Einstellungen für die Fragmentierung waren: Duty Cycle 10 %, Intensity 5, Cycles per Burst 200, Time 180 s. Zur Überprüfung, ob die Fragmentierung die gewünschte Größenverteilung ergeben hat, wurde eine Aliquot mittels 1000 DNA-Chip auf dem Bioanalyzer 2100 analysiert.

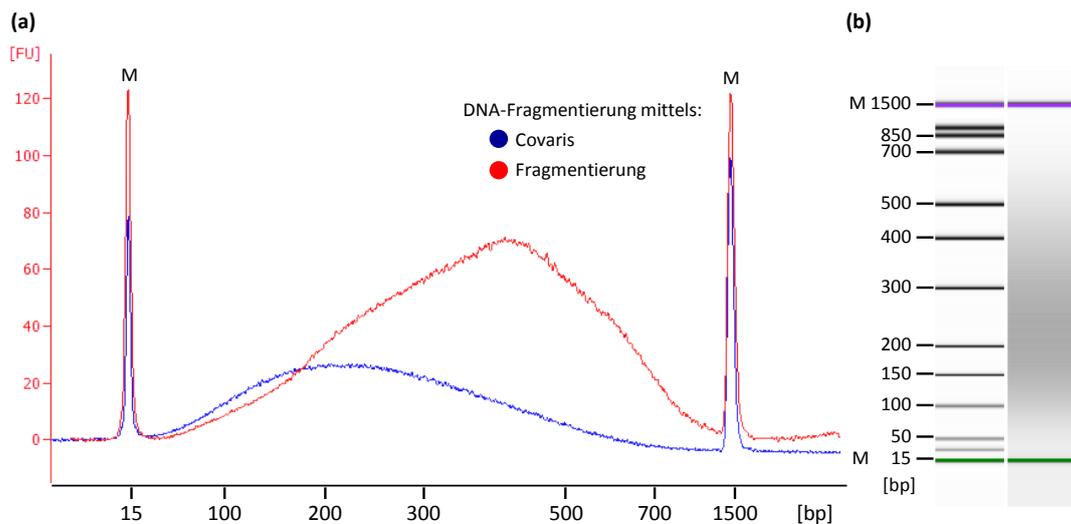


Abbildung 19 Größenverteilung nach Fragmentierung. Bei der Nebulisierung (rot) liegt nur ein geringer Anteil der DNA-Fragmente im gewünschten Größenbereich (150 bp-350 bp). Bei der DNA-Fragmentierung mittels Covaris (blau) ergibt sich die gewünschte Verteilung. (a) Elektropherogramm und (b) Gelansicht der Covaris-Probe, beide erzeugt mittels Bioanalyzer. M= Marker-Peaks bei 15 bp und 1500 bp.

Die Analyse der fragmentierten DNA zeigt, dass die DNA-Fragmente durch die Fragmentierung mit dem Covaris[®] S2 System in der gewünschten Größenverteilung vorliegen. Durch die Fragmentierung lässt sich zwar kein definierter, scharfer Peak erzielen, dennoch liegt der Großteil der DNA-Fragmente im gewünschten Bereich von 150 -350 bp, mit einem Peak bei rund 200 bp. Bei der Nebulisierung hingegen liegt der Großteil der DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 200 -700 bp mit einem Peak bei rund 450 bp (Abbildung 19). Der Großteil der DNA-Fragmente liegt somit außerhalb des angestrebten Größenbereichs.

FillIn

Nach der Fragmentierung sind die Enden der DNA-Fragmente beschädigt. Dies äußert sich in einzelsträngigen 5'- und/oder 3'-Enden der DNA. Nach der *FillIn*-Reaktion, liegen dann wieder *blunt ends* vor, die am 5'-Ende phosphoryliert sind. Erst dann ist eine effiziente Weiterverarbeitung der DNA-Fragmente möglich.

Protokoll

Die 120 µl fragmentierter DNA wurden mit 12 µl (10 x) Puffer 2,1 µl (10 mg/ml) BSA, 5 µl (100 µM) dNTPs, 1 µl (100 mM) ATP, 6 µl (3 U/µl) T4 DNA Polymerase und 6 µl (10 U/µl) T4 Polynukleotid Kinase (3' phosphatase minus) hinzugefügt und 20 min bei 12 °C, 20 min bei 25 °C und 20 min bei 75 °C im Thermocycler inkubiert.

Die Puffersysteme der *FillIn*-Reaktion, der Adenylierung und der Adapter-Ligation (siehe nachfolgende Schritte) wurden dahingehend optimiert, so dass keine Aufreinigung zwischen den einzelnen Reaktionen stattfinden musste und die DNA-Verluste hierdurch minimiert werden konnten.

Adenylierung

Nach der *FillIn*-Reaktion liegen die DNA-Fragmente mit blunt ends vor. Zur Verhinderung der Bildung von Concatemeren, wird durch eine Adenylierungsreaktion ein 3' dA Überhang generiert (*dA-tailing*).

Protokoll

Dem *FillIn*-Reaktionsansatz wurden 16,5 µl H₂O, 3 µl (10 x) Puffer 2, 4,5 µl (100 mM) MgSO₄, 3 µl (100 mM) dATP und 3 µl (5 U/µl) Taq Polymerase hinzugefügt und 45 min bei 72 °C im Thermocycler inkubiert.

Adapter-Ligation

Zur Vermeidung der Selbstligation der Adapter haben diese eine spezielle gegabelte Form (vgl. Abbildung 16 und Abbildung 21), die durch die nur teilweisen komplementären Adapter-Oligos bedingt ist. Der einzelne dT-Überhang am 5'-Ende verhindert ebenfalls eine Selbstligation, gleichzeitig schafft er *sticky ends* für die Ligation mit den DNA-Fragmenten.

Protokoll

Der Adenylierungsreaktionsansatz wurde durch 23 µl H₂O, 5 µl (10 x) Puffer 2, 4 µl (100 mM) rATP, 10 µl (400 U/µl) T4 Ligase und 8 µl Adapter ergänzt und mindestens 2 h bei 21 °C inkubiert.

Aufreinigung

Die Read-Länge bei der Sequenzierung liegt bei 75 oder 100 bp. Die Fragmente sollten daher eine Mindestgröße von 100 bp besitzen, so dass die Read-Länge voll ausgenutzt werden kann. Die beiden Adapter besitzen zusammen eine Größe von 66 bp. Die unterste Größengrenze der DNA-Bibliothek sollte somit bei rund 150 bp liegen; bei der Aufreinigung der DNA-Bibliothek werden gleichzeitig überschüssige Adapter und Fragmente kleiner als 150 bp abgetrennt.

Protokoll

Zur Aufreinigung wurde das Agencourt AMPure[®] XP PCR Purification Kit verwendet. Das Volumen des Adapter-Ligationsansatzes wurde mit EB-Puffer (Qiagen) auf 298 µl eingestellt, 2 µl 10 % Tween20 (v/v) zugegeben und für 10 min bei 37 °C äquilibriert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 330 µl (25 °C warmen) AMPure XP Beads. Die Mischung wurde bei 25 °C und 350 rpm für 10 min inkubiert. Während dieser Inkubationszeit binden die DNA-Fragmente an die paramagnetischen Beads. Die Größenselektion lässt sich durch das „DNA-Lösung-zu-Bead-Lösung-Verhältnis“ beeinflussen. Hier wurde ein Verhältnis von 1:1,1 gewählt, um Fragmente kleiner als 150 bp abzutrennen. Die Beads wurden mit Hilfe eines Magnets pelletiert und der Überstand verworfen. Darauffolgend wurden das Pellet in 500 µl 70 % Ethanol

resuspendiert und kurz abzentrifugiert. Die Beads wurden erneut pelletiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt; das Pellet dann bei 37 °C getrocknet. Durch die Zugabe von 55 µl EB-Puffer geht die gebundene DNA in Lösung. Die Beads wurden erneut pelletiert, der Überstand, der die DNA enthält, wurde abgenommen, die DNA-Konzentration bestimmt und je nach Verwendungszweck bei 4 °C oder bei -20 °C gelagert.

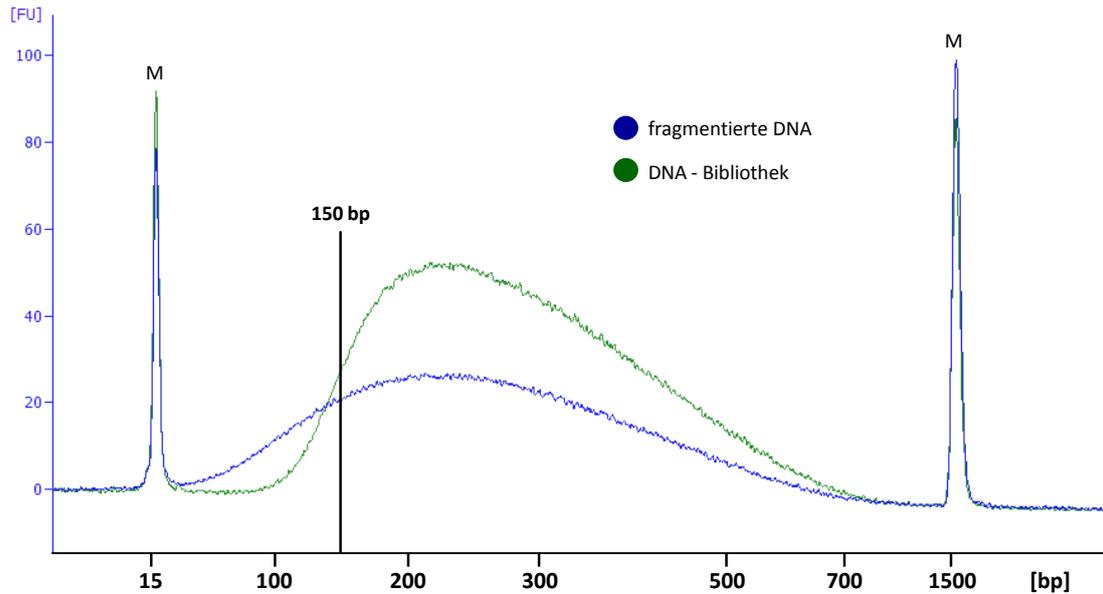


Abbildung 20 Größenvergleich der fragmentierten DNA und der DNA-Bibliothek. Die Größe der Bibliothek (blau) weist einen Peak bei rund 215 bp auf. Dies entspricht einer DNA-Fragmentlänge (grün) von ca. 170 bp. Die Anteile der DNA-Bibliothek kleiner als 150 bp wurden abgetrennt. M= Marker-Peaks bei 15 bp und 1500 bp.

Qualitätskontrolle: LM-PCR der DNA-Bibliothek und Kapillargelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle der DNA-Bibliotheken wurde eine LM-PCR mit einem Aliquot DNA-Bibliothek durchgeführt. Die Primer sind hierfür komplementär zu den Adaptern, so können nur solche Fragmente amplifiziert werden, die auf beiden Seiten Adapter besitzen (Abbildung 21). Bei einer definierten Templatemenge von 5 ng, wurde nur mit solchen Bibliotheken weitergearbeitet, bei denen nach Aufreinigung eine Konzentration von mindestens 125 ng/µl gemessen werden konnte. Durch diesen Grenzwert wurde sichergestellt, dass nach der Anreicherung genügend amplifizierbare Fragmente vorliegen.

Protokoll

Für die LM-PCR wurde mit dem FastStart High Fidelity PCR System von Roche Applied Science gearbeitet: 5 µl PCR-Puffer 2, 0,5 µl (100 mM) dNTPs, 1,25 µl (40 µM) PE-PCR Primer Mix, 1 µl (5 U/µl) Fast Start High Fidelity Polymerase und 5 ng (gemessen mit Nanodrop) DNA-Bibliothek in 25 µl H₂O. PCR-Protokoll: 95 °C für 2 min; 20 Zyklen mit 95 °C für 30 s, 65 °C für 20 s, 72 °C für 30 s; 7 min bei 72 °C, 4 °C. Der PCR-Ansatz mittels MinElute PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 15 µl EB-

Puffer. Das PCR-Produkt der nicht-angereicherten (NC) DNA-Bibliothek wurde bei -20 °C gelagert.

Zur Überprüfung der Größenverteilung der DNA-Bibliotheken wurde ein Aliquot der DNA-Bibliothek und ein Aliquot der NC-DNA-Bibliothek mittels 1000 DNA-Chip auf dem Bioanalyzer 2100 analysiert.

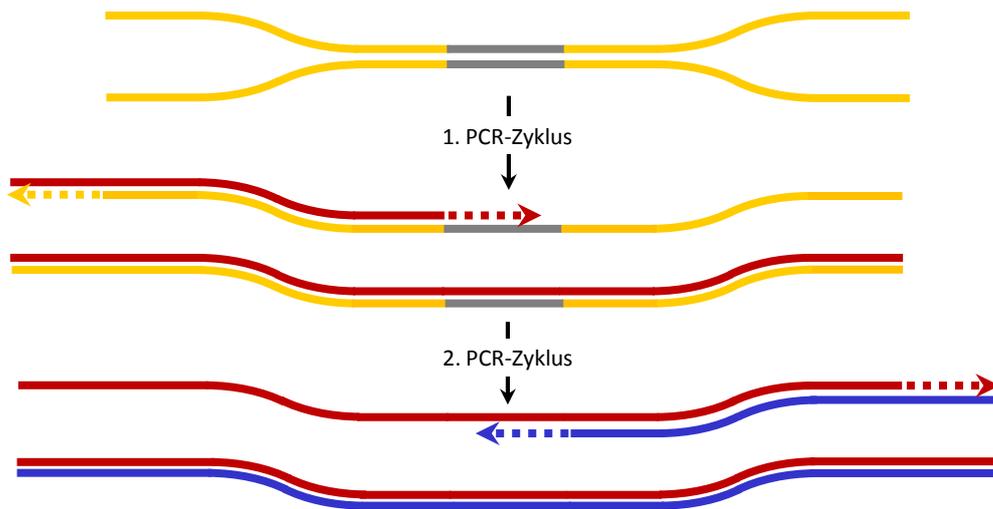


Abbildung 21 Schematische Darstellung der LM-PCR. Die Primerbindungsstellen liegen in den gegabelten Adaptern (gelb). Der erste PCR-Zyklus (roter Primer) generiert die vollständige Primerbindungsstelle (roter Strang) des zweiten Primers (blau). Die überhängende 5'-Enden beider Primer (rot und blau) werden durch die PCR aufgefüllt.

Durch die überhängenden 5'-Enden der PE-PCR Primer hat nach der Amplifikation die Größe der NC-DNA-Bibliothek um die erwarteten ca. 50 bp zugenommen (Abbildung 22)

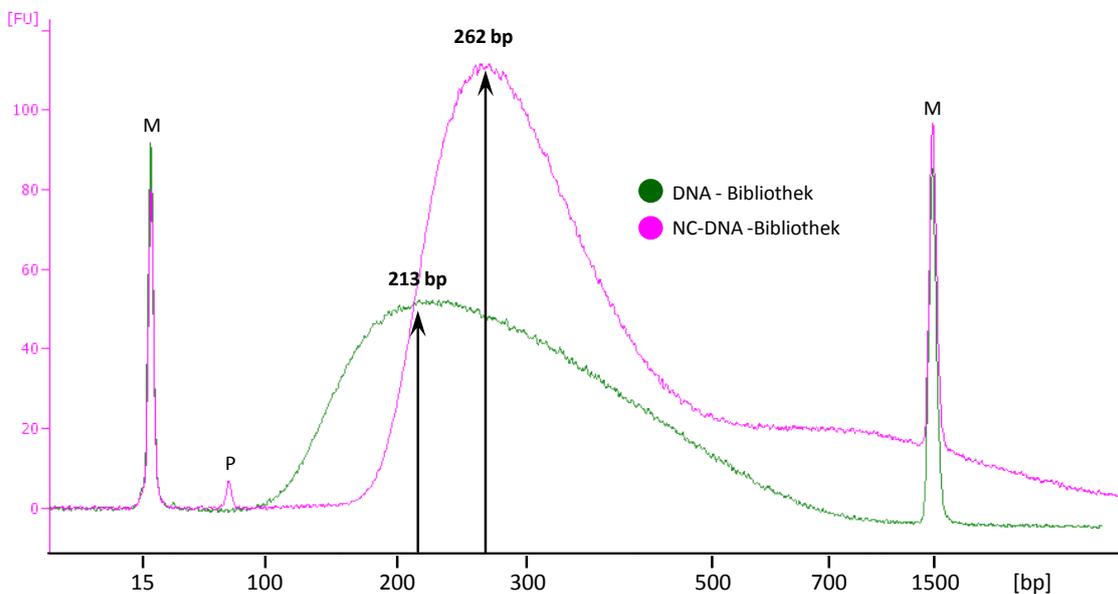


Abbildung 22 Größenvergleich der DNA-Bibliothek und der NC-DNA-Bibliothek. Die Größenverschiebung der nicht-angereicherten NC-DNA-Bibliothek (rosa) ist durch die Amplifikation der DNA-Bibliothek (grün) mit überhängenden Primern verursacht. Durch die Amplifikation werden den DNA-Fragmenten rund 50 bp angehängt. M= Marker-Peaks bei 15 bp und 1500 bp, P= Primer-Peak.

Dieses Protokoll ermöglicht die reproduzierbare Generierung von DNA-Bibliotheken (Anhang 6.1).

3.1.2 Bisulfit-Anreicherung zur subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse

Eine Vielfalt von Methoden zur DNA-Methylierungsanalyse ist heutzutage verfügbar. Beim *Typing* werden in einer größeren Anzahl von Proben einzelne Loci untersucht. Das *Profiling* gibt einen Überblick über den Methylierungsstatus des Genoms. Zu den Profiling-Methoden zählen auch die NGS-basierten Techniken, mit denen jedes einzelne CpG analysiert werden kann (vgl. Kapitel 1.2.2). Zur Reduktion von Kosten und Aufwand wurde die Bisulfit-Anreicherung entwickelt, so dass die Vorteile von *Typing* und *Profiling* ausgenutzt werden können. Die Bisulfit-Anreicherung stellt gewissermaßen einen Kompromiss aus beiden Verfahren dar und vereinigt die Vorteile beider Methoden. In einem größeren Bereich (bis 5 Mb) kann punktgenau der CpG-Methylierungsstatus untersucht werden.

Für die Bisulfit-Anreicherung wurde die DNA-Bibliothek wie im vorherigen Kapitel 3.1.1 beschrieben generiert und den Qualitätskontrollen unterzogen. Dann erfolgte die Anreicherung der Zielregionen durch Array-Hybridisierung.

Für die Bisulfit-Anreicherung wird die DNA-Bibliothek auf den 385K CustomArray hybridisiert. Der Array wird gewaschen, die hybridisierte DNA eluiert.

Dann erfolgt eine Bisulfitbehandlung und Amplifikation der eluierten DNA, gefolgt von der Sequenzierung (Abbildung 23).

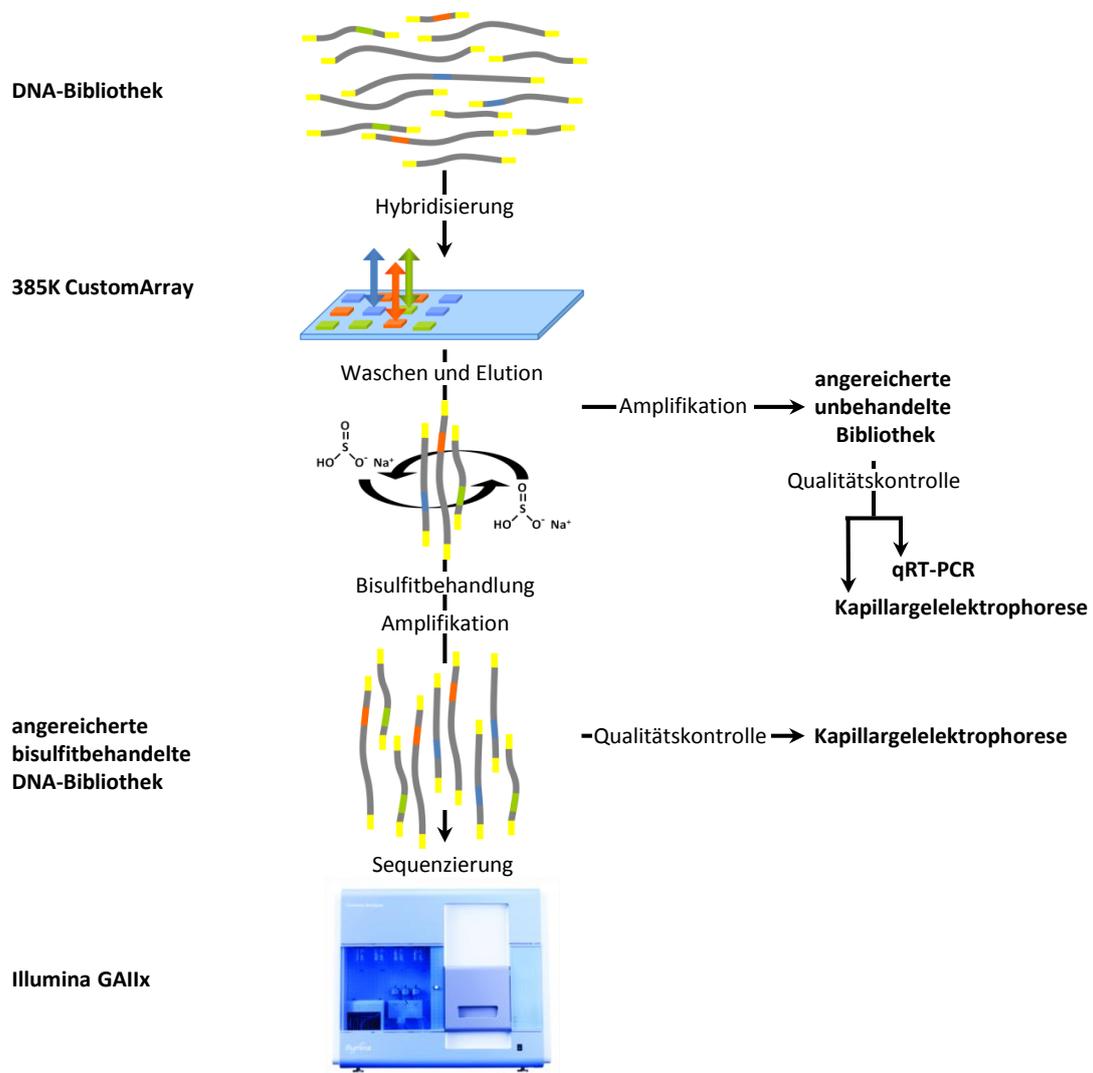


Abbildung 23 Schematische Darstellung des Ablaufs der Bisulfit-Anreicherung.

Modifikationen bei der Bibliotheken-Herstellung für die Bisulfit-Anreicherung

Bei der DNA-Methylierungsanalyse wird die angereicherte DNA einer Bisulfitbehandlung unterzogen. Deshalb werden bei der Herstellung dieser DNA-Bibliotheken Adapter verwendet, bei denen alle Cytosine durch 5-Methylcytosin ersetzt sind.

Herstellung der DNA-Bibliothek

Die Schritte der Fragmentierung, FillIn, Adenylierung, Adapterligation und Aufreinigung wurden wie unter Kapitel 3.1.1 beschrieben durchgeführt.

Hybridisierung

Essentiell für die Effizienz der Anreicherung ist die Wahl der Hybridisierungsbedingungen wie Puffer, Temperatur und Dauer. Diese Bedingungen sind so mild wie nötig zu wählen, so dass eine große Menge von Fragmenten hybridisieren kann, die die Zielregionen enthalten. Gleichzeitig sind diese Bedingungen so stringent wie möglich zu halten, um Hybridisierungen von Fragmenten zu vermeiden, die keine Zielregion enthalten.

Die gegabelte Form der Adapter spielt auch hierbei eine wichtige Rolle sie verhindert, dass Fragmente über komplementäre Adapterbereiche hybridisieren.

Die Bedingungen für die Hybridisierung wurden vollständig aus dem *NimbleGen Arrays User's Guide: Sequence Capture Array Delivery* von Roche NimbleGen übernommen.

Protokoll

5 µg DNA-Bibliothek und 100 µl (1 mg/ml) humane Cot-1 DNA wurden bei 60 °C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und danach mit 5 µl (70 °C) H₂O bei 70 °C für 10 min im Thermomixer rehydriert. Danach erfolgte die Zugabe von 8 µl (2 x) SC Hybridization Buffer und 3,2 µl Component A. Die Mischung wurde 10 min bei 95 °C denaturiert und dann bei 42 °C kurzzeitig gelagert und schnellstens weiterverarbeitet.

Der 385K CustomArray wurde mittels "Precision Mixer Alignment Tool" (PMAT) mit einem X1 Mixer beklebt und 15 µl der Hybridisierungsmischung luftblasenfrei in das so entstandene Reservoir pipettiert (MICROMAN®). Fill- und Ventport wurden luftdicht abgeklebt. Die Hybridisierung erfolgte für 64 h – 72 h bei 42 °C.

Waschen und Elution

Beim Waschen des Arrays werden nicht-hybridisierte Fragmente oder Fragmente, die aufgrund von Sequenzähnlichkeit teilweise hybridisieren konnten, entfernt. Hier gilt das gleiche Prinzip wie für die Hybridisierung: Stringent genug zur Entfernung der Fragmente, die keine Zielregion enthalten; aber mild genug, so dass Zielregion-Fragmente nicht gewaschen werden. Auch in diesem Schritt wurden die Bedingungen des *NimbleGen Arrays User's Guide: Sequence Capture Array Delivery* von Roche NimbleGen übernommen. Die einzige Ausnahme stellte die Temperatur des ersten Waschröhrchens mit Wash Buffer II dar.

Protokoll

Zwei Wasserbäder mit 42 °C bzw. 47,5 °C wurden mindestens zwei Stunden vorgewärmt. 10 x Wash Buffer I, II und III sowie der 2 x Stringend Wash Buffer wurden mit ddH₂O auf 1 x verdünnt. 32 ml Waschröhrchen wurden vorbereitet: 2 Röhrchen 1 x Stringend Wash Buffer (47,5 °C), 1 Röhrchen 1 x Wash Buffer I (RT), 2 Röhrchen Wash Buffer II (RT), 1 Röhrchen Wash Buffer III (RT). Desweiteren wurden zusätzlich 100 ml Wash Buffer II auf 42 °C vorgewärmt. Für die Elution wurde in einem Behälter mit den 100 ml Wash Buffer II der Mixer vom Array entfernt. Anschließend wurde der Array in den vorbereiteten Röhrchen einem mehrstufigen Waschprozess unterzogen, um Fragmente, die keine Zielregionen enthalten und daher nicht hybridisiert sind, abzutrennen: In Wash Buffer II 10 mal invertieren, in Stringend Wash Buffer (47,5 °C), 10 mal invertieren, 5 min bei 47,5 °C inkubieren. 10 mal invertieren, erneut in Stringend Wash Buffer (47,5 °C), 10 mal invertieren, 5 min bei 47,5 °C inkubieren, 10 mal invertieren. In Wash Buffer I 2 min invertieren. In Wash Buffer II 1 min invertieren. In Wash Buffer III 10 mal invertieren. Dann wurde der Array in die Elutionsstation gelegt und mit der Elutionskammer verschlossen. Die Elution erfolgte mit 450 µl (125 mM) NaOH, die in die Elutionskammer pipettiert wurden. Nach fünf-minütiger Inkubation wurde die Lösung abpipettiert. Das Eluat wurde zum Entsalzen über ein MinElute Säule des MinElute PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt. Dazu wurden 500 µl des PBI-Puffers mit 16 µl (20 %) Essigsäure versetzt, das Eluat zugegeben und die weitere Aufreinigung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 50 µl EB-Puffer. Anschließend wurde das Eluat mit EB-Puffer auf das benötigte Volumen von 60 µl eingestellt.

Amplifikation der angereicherten, unbehandelten (C) DNA-Bibliothek

Für die Qualitätskontrolle wird ein Teil der angereicherten DNA-Bibliothek zur Amplifikation ohne Bisulfidbehandlung verwendet. Diese C-DNA-Bibliotheken zeigten ein unerwartetes Trennungsverhalten bei der Analyse mittels Kapillargelelektrophorese. Statt eines einzelnen Peaks zwischen 200 bp - 300 bp waren zwei Peaks vorhanden. Der erste Peak bei ca. 200 bp - 300 bp, der zweite zwischen 500 bp und 700 bp.

Das Template bei der LM-PCR ist eine Mischung von sehr vielen unterschiedlichen Fragmenten, die aber alle die gleichen Adapter besitzen. Gegen Ende der PCR mit 30 Zyklen sind Primer, Nukleotide und DNA-Polymerase eventuell schon ausgeschöpft, so dass nicht mehr in jedem Zyklus mit einer Amplifikation der Fragmente zu rechnen ist. Sinkt die Temperatur zum Primerannealing könnten sich auch zwei Fragmente aneinander lagern, die entweder nur über die Adapter komplementär oder sequenzbedingt teilweise komplementär sind. Unvollständige Doppelstränge wären die Folge. Bei der Kapillarelektrophorese könnten solche Fragmente das Trennungsverhalten größerer Fragmente aufzeigen. Durch die Zugabe von einem Volumen neuen MasterMixes (Puffer, Primer, Nukleotide, Polymerase) gefolgt von der Durchführung eines weiteren PCR-Zyklus konnte dieses Problem behoben werden. Es zeigte sich dann ein normales Trennungsverhalten der C-DNA-Bibliothek mit einem einzelnen Peak bei 300 bp (Abbildung 24).

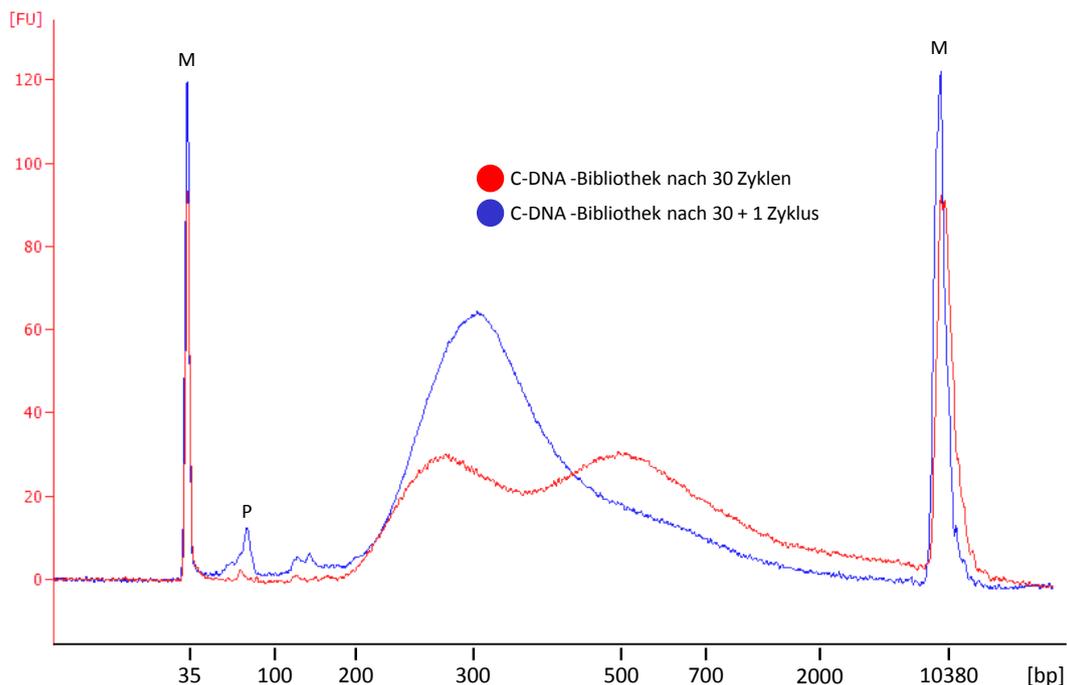


Abbildung 24 Vergleich der angereicherten C-DNA-Bibliothek nach Amplifikation. Nach 30 PCR-Zyklen zeigt sich abnormes Trennungsverhalten, durch nicht komplementäre Basen (rot). Ein zusätzlicher PCR-Zyklus mit frischem MasterMix schafft vollständige Doppelstränge mit normalem Trennungsverhalten (blau). M= Marker-Peaks bei 15 bp und 1500 bp, P= Primer-Peak.

Protokoll

Für die Amplifikation wurde das FastStart High Fidelity PCR System von Roche Applied Science verwendet. Ein PCR-Reaktionsansatz bestand aus: 26,25 µl H₂O, 5 µl (10 x) PCR Buffer 2, 1,25 µl (40 µM) PE-PCR-Mix, 0,5 µl (100 mM) dNTPs, 1 µl (5 U/µl) FastStart Taq DNA Polymerase und 15 µl DNA. PCR-Protokoll: 2 min bei 95 °C, 30 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 20 s bei 65 °C, 30 s bei 72 °C ; 72 °C für 7 min, 4 °C. Nach Ende der PCR wurden dem Reaktionsansatz 41,25 µl H₂O, 5 µl (10 x) PCR Buffer, 1,25 µl (40 µM) PE-PCR Primer Mix, 0,5 µl (100 mM) dNTPs, 1 µl (5 U/µl) Fast Start High Fidelity DNA Polymerase zugefügt. Die Inkubation im Thermocycler erfolgte für 2 min bei 95 °C, 20 s bei 65 °C, 7 min bei 72 °C; 4 °C. Die Aufreinigung wurde mit dem MinElute PCR Purification Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 15 µl EB-Puffer.

Zur Überprüfung der Größenverteilung wurde ein Aliquot der C-DNA-Bibliothek mit einem 1000 DNA-Chip oder High Sensitivity DNA-Chip (je nach Konzentration) auf dem Bioanalyzer 2100 analysiert.

Die C-DNA-Bibliothek wurde später zur Überprüfung der Anreicherungs-effizienz eingesetzt. (siehe Qualitätskontrolle durch qRT-PCR).

Bisulfitbehandlung

Für die Bisulfit-Anreicherung wird die C-DNA-Bibliothek einer Bisulfitbehandlung unterzogen. Das gesamte Eluat der Array-Hybridisierung enthält nur ca. 10 - 100 pg C-DNA-Bibliothek. Durch die Bisulfitbehandlung ist mit Verlusten, durch gebrochene und damit nicht mehr amplifizierbare DNA-Fragmente, zu rechnen. Eine Säulen-Aufreinigung des Reaktionsansatzes ist notwendig. Dabei ist von weiteren Produktverlusten durch Adsorption an das Säulenmaterial auszugehen. Die Zugabe eines RNA Carriers soll Adsorptionsverluste minimieren.

Protokoll

Die Bisulfitbehandlung der C-DNA-Bibliothek wurde nach der Elution und Aufreinigung durchgeführt. Hierzu wurde die DNA-Lösung auf 59 µl mit EB-Puffer aufgefüllt. 15 µl wurden für die Amplifikation ohne Bisulfitbehandlung eingesetzt, um die Anreicherungs-effizienz zu überprüfen (s.u.).

44 µl der C-DNA-Bibliothek wurden mit 1 µl (1 µg/µl) Carrier RNA versetzt. Für die Bisulfitbehandlung wurde das EZ DNA Methylation Kit von Zymo Research verwendet. Die 45 µl DNA-RNA-Lösung wurden nach Protokoll mit 5 µl M-Dilution Buffer versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 µl CT Conversion Reagent hinzugefügt und für 16 Zyklen mit 95 °C für 15 s und 50 °C für 60 min inkubiert, nach diesen Zyklen wurde der Reaktionsansatz, bis zur Aufreinigung, bei 4 °C gehalten. Die Aufreinigung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgte mit 25 µl EB-Puffer.

Amplifikation der angereicherter, bisulfitbehandelter (BC) DNA-Bibliothek

Die PCR zur Amplifikation der BC-DNA-Bibliothek wurde dahingehend optimiert mit möglichst wenig Zyklen genügend BC-DNA-Bibliothek zur Durchführung der Qualitätskontrolle und Sequenzierung zu erzeugen.

Eine große Anzahl PCR-Zyklen erhöhen die Gefahr von PCR-Artefakten (z.B. Einbau falscher Basen oder Duplikate). Da für die Sequenzierung die DNA nochmals amplifiziert werden muss, ist es unerlässlich die Zyklenzahl so gering wie möglich zu halten. Aus diesem Grund wurde nach 25 PCR-Zyklen dem PCR-Reaktionsansatz 1 µl entnommen und mittels High Sensitivity DNA-Chip analysiert. Zeigte sich hier bereits genügend Produkt, wurde der PCR-Ansatz dem zusätzlichen PCR-Zyklus mit neuem Mastermix unterzogen und aufgereinigt. War noch nicht genügend Produkt vorhanden wurden weitere 2 bis 5 Zyklen durchgeführt, gefolgt vom zusätzlichen PCR-Zyklus mit neuem MasterMix. Dann erfolgte die Aufreinigung.

Protokoll

Für die Amplifikation wurde das Fast Start High Fidelity Kit von Roche Applied Science verwendet. Ein PCR-Reaktionsansatz bestand aus: 16,25 µl H₂O, 5 µl (10 x) PCR Buffer, 1,25 µl (40 µM) PE-PCR Primer Mix, 0,5 µl (100 mM) dNTPs, 1 µl (5 U/µl) HotStarTaq DNA Polymerase und 25 µl BC-DNA-Bibliothek. PCR-Protokoll: 2 min bei 95 °C, 25 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 20 s bei 65 °C, 30 s bei 72 °C; 72 °C für 7 min, 4 °C. Nach diesen 25 PCR Zyklen wurden dem Reaktionsansatz 1 µl entnommen und auf dem Bioanalyzer von Agilent überprüft, ob schon genug PCR-Produkt gebildet wurde. War dies nicht der Fall, so wurde die PCR-Reaktion um 2-5 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 20 s bei 65 °C, 30 s bei 72 °C; 72 °C für 7 min, 4 °C verlängert. Nach Ende der PCR wurden dem Reaktionsansatz 41,25 µl H₂O, 5 µl (10 x) PCR Buffer, 1,25 µl (40 µM) PE-PCR Primer Mix, 0,5 µl (100 mM) dNTPs, 1 µl (5 U/µl) Fast Start High Fidelity DNA Polymerase zugefügt. Die Inkubation im Thermocycler erfolgte für 2 min bei 95 °C, 20 s bei 65 °C, 7 min bei 72 °C; 4 °C. Die Aufreinigung wurde mit dem MinElute PCR Purification Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 12 µl EB-Puffer.

Qualitätskontrolle: Kapillargelelektrophorese

Zur Überprüfung der Größenverteilung wurde ein Aliquot der BC-DNA-Bibliothek mittels High Sensitivity DNA-Chip auf dem Bioanalyzer 2100 analysiert. Die Fragmente der BC-DNA-Bibliothek waren im Durchschnitt zwischen 220 bp und 280 bp groß. Abbildung 25 zeigt den direkten Vergleich der BC-DNA-Bibliothek mit der C-DNA-Bibliothek. Durch die Bisulfitbehandlung kommt es zu keiner Verschiebung oder Verzerrung der Größenverteilung (die unterschiedlichen Skalen und Marker-Peaks sind durch die Analyse mit unterschiedlichen DNA-Chips bedingt).

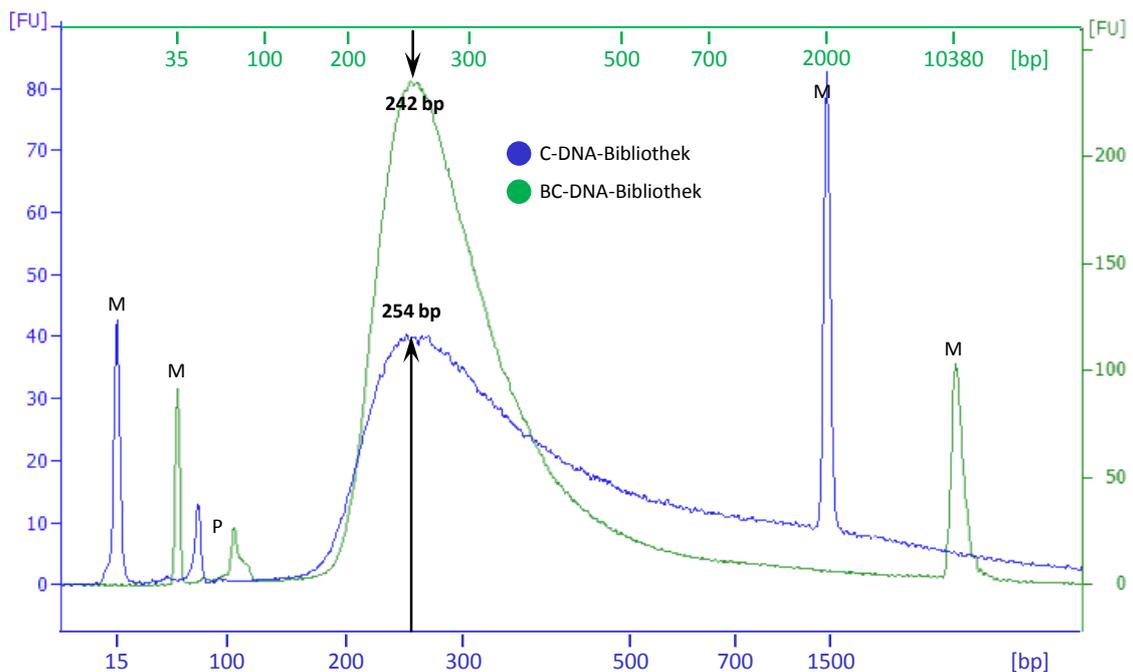


Abbildung 25 Vergleich der C-DNA-Bibliothek (blau) und der BC-DNA-Bibliothek (grün). Die Größenverteilung beider Bibliotheken ist identisch. Die verschiedenen Skalen und Marker-Peaks ergeben sich aus der Analyse mit unterschiedlichen DNA-Chips (High Sensitivity: grün, 1000 DNA: blau). M= Marker-Peaks bei 15 bp und 1500 bp (blau) bzw. bei 35 bp und 10380 bp (grün), P= Primer-Peak.

Als eine Negativkontrolle (für die zweite Negativkontrolle wurde dem Mastermix kein Template und keine Carrier-RNA zugesetzt) wurde Carrier-RNA in einem LM-PCR Ansatz eingesetzt. Die Analyse mittels Kapillargelelektrophorese (Abbildung 26) zeigt, dass kein PCR-Produkt entstanden ist, das zu Artefakten in der Sequenzierung führen würde.

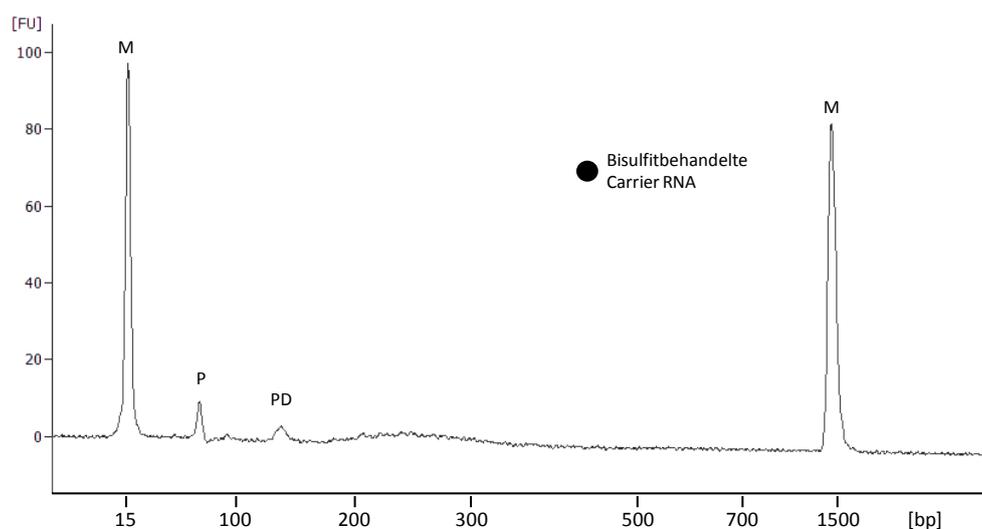


Abbildung 26 Elektropherogramm der Carrier RNA nach Amplifikation mit PE-Primern. M= Marker-Peaks bei 15 bp und 1500 bp, P= Primer-Peak, PD= Primer-Dimer-Peak.

Qualitätskontrolle: Überprüfung der Anreicherung mittels qRT-PCR

Die Bestimmung der Anreicherung erfolgte mittels qRT-PCR. Im Idealfall sollten nach der Anreicherung nur noch Fragmente vorhanden sein, die Zielregionen enthalten. Im *NimbleGen Arrays User's Guide: Sequence Capture Array Delivery* sind zur Kontrolle der Anreicherung qRT-PCR-Assays mittels SYBR Green vorgeschlagen. Die Detektion ist dabei nicht PCR-Produkt spezifisch, sondern es wird jede Art dsDNA detektiert. Um eine größere Spezifität bei der Kontrolle der Anreicherung zu erzielen, wurden qRT-PCR Assays basierend auf dem Roche UPL-System etabliert. Die Detektion erfolgt hierbei mit einer sequenzabhängigen *Probe*. Es wurden UPL-Assays für die Zielregionen, für Nicht-Zielregionen und für die Kontrollregionen etabliert. Design-unabhängig sind auf jedem 385K CustomArray drei Kontrollregionen repräsentiert NSC247, NSC268 und NSC272. Dies ermöglicht eine Experiment-übergreifende Qualitätskontrolle.

Protokoll

Es wurde mit dem Universal ProbeLibrary System von Roche Applied Science gearbeitet. Ein qRT-PCR Reaktionsansatz bestand aus: 5 μl (2 x) Probes Master, je 1 μl (5 pmol) Vorwärts- und Rückwärts-Primer, 0,1 μl Probe, 1 μl H₂O und 2 μl (5 ng/ μl) DNA-Bibliothek. qRT-PCR-Protokoll: 95 °C für 5 min (Ramp Rate [°C/s] 4,8; 40 Zyklen mit 95 °C für 10 s (Ramp Rate [°C/s] 4,8), 58 °C für 20 s (Ramp Rate [°C/s] 2,5), 72 °C für 1 s (Ramp Rate [°C/s] 4,8); 40 °C für 1 min (Ramp Rate [°C/s] 2,5).

Um die Anreicherung zu bestimmen, wurden C-DNA-Bibliothek und nicht-angereicherte NC-DNA-Bibliothek analysiert. Die für jedes Primerpaar empirische bestimmte PCR-Effizienz wurde hierfür mit der Differenz der C_t -Werte⁶ (NC-C) potenziert, um Anreicherungs-werte zu erhalten (Abbildung 27). Zur Berechnung der PCR-Effizienz wurde für jedes Primerpaar eine Standardkurve mit Verdünnungen (500 ng/ μl , 50 ng/ μl , 5 ng/ μl , 0,5 ng/ μl , 0,05 ng/ μl) fragmentierter humaner genomischer DNA erstellt.

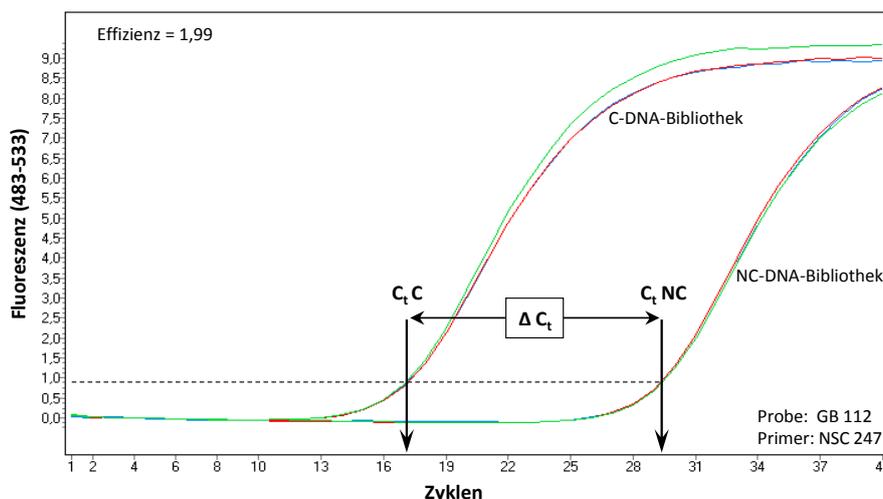


Abbildung 27 Amplifikationskurven der angereicherten (C) und nicht-angereicherten (NC) DNA-Bibliothek. Die Anreicherung errechnet sich durch Potenzieren der PCR-Effizienz (1,99) mit der Differenz der C_t -Werte.

⁶ C_t = Threshold Cycle; diejenige Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz den Schwellenwert erreicht hat.

Für die DNA-Methylierungsanalyse lagen die Assays für die Zielregionen in den Promotorbereichen der Gene *METTL10*, *MGMT* und *WNT8B* (Chromosom 10). Die Assays der Nicht-Zielregionen lagen in den Exons der Gene *MCM5* und *KCNE1* (Chromosom 22 und Chromosom 21). Im *NimbleGen Arrays User's Guide: Sequence Capture Array Delivery* ist ein unterer Grenzwert der Anreicherung der Kontrollregionen (NSC 247, NSC 268, NSC 272) von 200-fach festgelegt. Erst dann ist die Effizienz des Anreicherungsprozess groß genug, so dass bei der Sequenzierung ausreichend viele Reads in der Zielregion liegen. Zur Kontrolle der Abreicherung der Nicht-Zielregionen wurden Assays etabliert, bei denen das detektierte PCR-Produkt außerhalb der Zielregion liegt. Es sollte daher keine Anreicherung gemessen werden können.

Abbildung 28 zeigt die Übersicht der Anreicherung der Probe NB Pool 0. In allen Zielregionen und Kontrollregionen konnte eine Anreicherung gemessen werden. Die durchschnittliche Anreicherung der Zielregionen liegt bei ca. 2000-fach. Die Anreicherung der Kontrollregionen bei ca. 1600-fach. Der Gesamtdurchschnitt der Anreicherung der Zielregionen und Kontrollregionen liegt bei ca. 1800-fach. Die vom *NimbleGen Arrays User's Guide: Sequence Capture Array Delivery* geforderte Mindestanreicherung liegt bei 200-fach und wurde somit erreicht bzw. weit überschritten. Die Nicht-Zielregionen *MCM5* und *KCNE1* sind nicht angereichert.

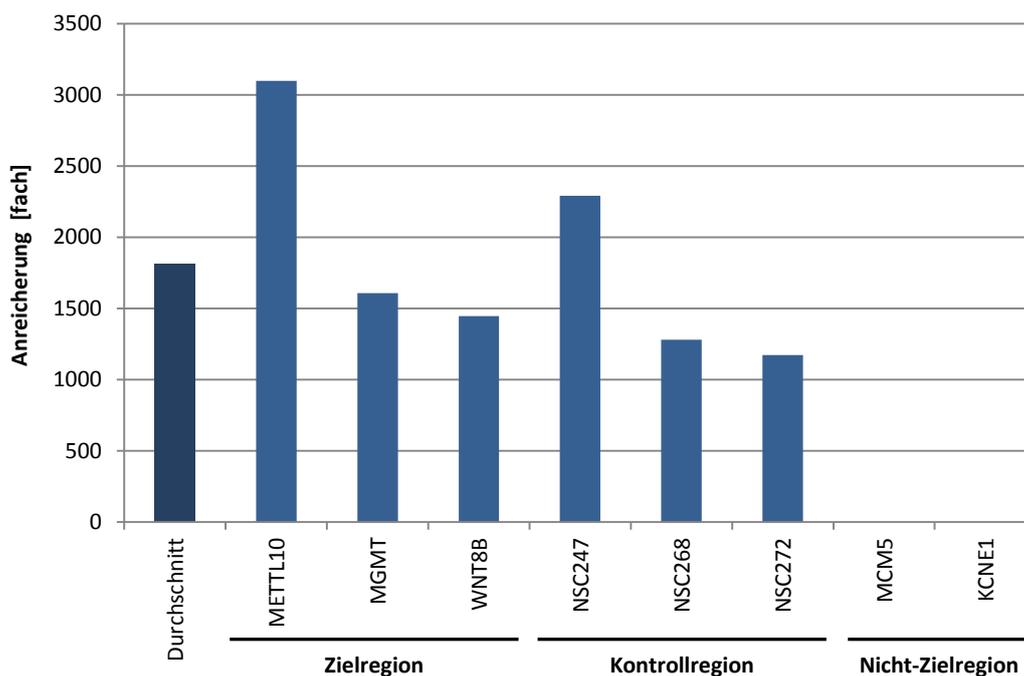


Abbildung 28 Übersicht über die Anreicherung der einzelnen Regionen. Sowohl die Zielregionen als auch die Kontrollregionen weisen eine starke Anreicherung von durchschnittlich ca. 1800-fach auf. Die Nicht-Zielregionen sind nicht angereichert. (Daten der Probe NB Pool 0).

Sequenzierung einer BC-DNA-Bibliothek aus Plazenta-DNA

Zur Überprüfung des *Proof-of Principle* wurde aus Plazenta-DNA eine DNA-Bibliothek hergestellt, angereichert, bisulfitbehandelt und sequenziert. In dem 75 bp Single-Read Lauf wurden rund 10 Mio. Reads erzielt; dies entspricht ca. 720 Mb. Von den rund 10 Mio. Reads war das eindeutige Mapping⁷ von rund 70 % im Genom möglich (Mapped Reads). Mit einer Duplikat⁸-Rate von 33 %, handelte es sich bei 67 % der 10 Mio. Reads um Unique Reads⁹, die in der Zielregion lagen. Knapp 99 % der Zielregionen konnten angereichert werden. Die durchschnittliche Abdeckung der Zielregionen betrug rund 165-fach. Die aus den Sequenzdaten berechnete Anreicherung liegt bei ca. 750-fach (Tabelle 2).

Tabelle 2 Sequenzierung einer angereicherten, bisulfitbehandelten Plazenta-DNA-Bibliothek

| | |
|---|-------------|
| Reads | 9.477.649 |
| Readlänge | 75 bp |
| Anzahl der sequenzierten Basen | 720.301.324 |
| Mapped Reads (von Reads) | 70,2 % |
| Unique Reads in Zielregion (von Mapped Reads) | 67,0 % |
| Anzahl der angereicherte Zielregionen | 98,7 % |
| Abdeckung | 165 |
| Anreicherung = | 747 |

$$\text{Anreicherung} = \frac{\frac{\text{Anzahl der gemappten Basen in Zielregion}}{\text{Anzahl der gemappten Basen der Sequenzierung}}}{\frac{\text{Anzahl der Basen in der Zielregion}}{\text{Anzahl der Basen des Genoms}}}$$

3.1.3 MID-Anreicherung¹⁰

Heutige Sequenzierer generieren riesige Datenmengen. Die Abdeckung, die dadurch erreicht werden kann, ist mehr als ausreichend für eine signifikante Datenanalyse. Die Folge daraus ist, dass zur Kostenersparnis in einem Sequenzier-Lauf mehrere Proben simultan sequenziert werden können. Zur Unterscheidung werden die Proben bei der Bibliotheken-Herstellung mit einem *Multiple Identifier* (MID) - eine Art Barcode - versehen. Solch ein Multiplexverfahren kann auch für die Anreicherung eingesetzt werden.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten Protokoll zur MID-Anreicherung können bis zu 12 Bibliotheken kostensparend über einen Array angereichert werden. Die Sequenzierung der Bibliotheken erfolgte dann anschließend ebenfalls als Pool. Die Zuordnung der Daten zu den einzelnen Proben geschieht über die 6 bp lange MID-Sequenz, die in den Adapter integriert ist (Abbildung 29).

⁷ Mapping= Zuordnung der Sequenzen zu Chromosomenpositionen

⁸ Duplikate= identische Reads. Verursacht durch die Amplifikation

⁹ Unique Reads= Reads, nach der Entfernung der Duplikate

¹⁰ Für die MID-Anreicherung wurde keine Bisulfitbehandlung etabliert



Abbildung 29 MID-Adapter ligiertes DNA-Fragments

Erweiterungsschritte bei der Herstellung der DNA- Bibliotheken

Abbildung 30 gibt einen Überblick über den Herstellungsprozess der MID-Bibliotheken mit zusätzlich eingeführten Schritten der Gelaufreinigung und der Pre-PCR. Danach folgt die Hybridisierung mit weiterführenden Schritten (Abbildung 33).

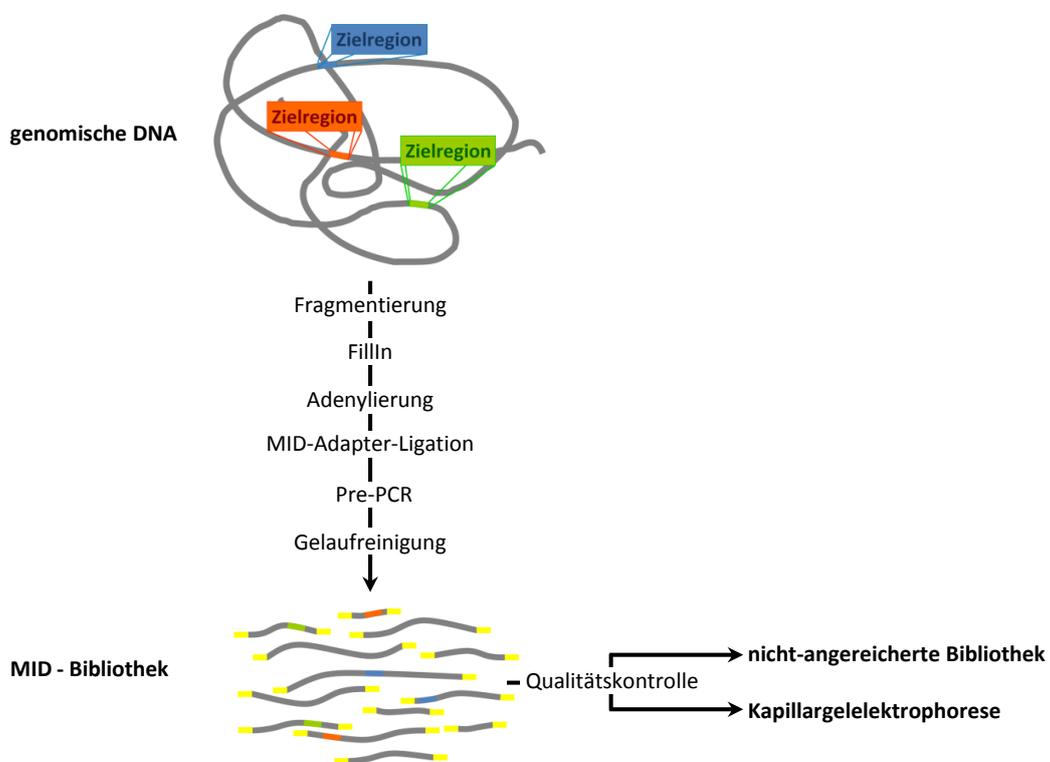


Abbildung 30 Generierung von MID-Bibliotheken. Vor der Anreicherung eine Pre-PCR und eine Gelextraktion der 300 bp Bande durchgeführt.

Modifikationen bei der Bibliotheken-Herstellung für die MID-Anreicherung

Für die MID-Anreicherung werden Adapter verwendet, die zusätzlich eine MID-Sequenz besitzen. Die Verwendung der MID-Adapter hat keine Konsequenzen für die Generierung der DNA-MID-Bibliotheken. Die LM-PCR zur Überprüfung der Amplifizierbarkeit der MID-Bibliothek wird erst später im Protokoll durchgeführt.

Adapter-Annealing

Protokoll

Äquimolare Mengen der Oligonukleotide MID.FOR (4000 μ M) und MID.REV (4000 μ M) wurden in einer Lösung mit 50 mM NaCl und 10 mM TRIS/HCl gemischt und in einem Thermomixer auf 95 °C erhitzt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde der Thermomixer ausgeschaltet und die Adapter solange im Gerät belassen, bis die Lösung RT angenommen hatte. Danach wurden die Adapter mit EB-Puffer auf eine Konzentration von 500 μ M verdünnt und 20 μ l Aliquots bei -20 °C gelagert.

Herstellung der MID-Bibliothek

Die Schritte der Fragmentierung, FillIn, Adenylierung, Adapterligation und Aufreinigung wurden wie unter Kapitel 3.1.1 beschrieben durchgeführt.

Gelaufreinigung

Bei der Hochdurchsatz-Sequenzierung auf dem Illumina GAIIx werden die besten Resultate mit DNA-Bibliotheken einer durchschnittlichen Größe von ca. 300 bp erzielt. Um diese Fragmente der MID-Bibliothek zu selektieren, wird ein Gelextraktionsschritt eingeführt.

Protokoll

Für die Gelextraktion wurden 1,5 μ g der MID-Bibliothek mit (10 x) OrangeG Ladepuffer versetzt und in die Tasche eines 1,5 % TAE Agarosegels pipettiert. Das Gel wurde 1 h bei 120 V gefahren, anschließend gefärbt (Abbildung 31) und ein Größenbereich von 200-400 bp ausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem MinElute Gel Extraction Kit. Die Elution erfolgte mit 15 μ l EB-Puffer. Das Eluat wurde mit H₂O auf 125 μ l aufgefüllt.

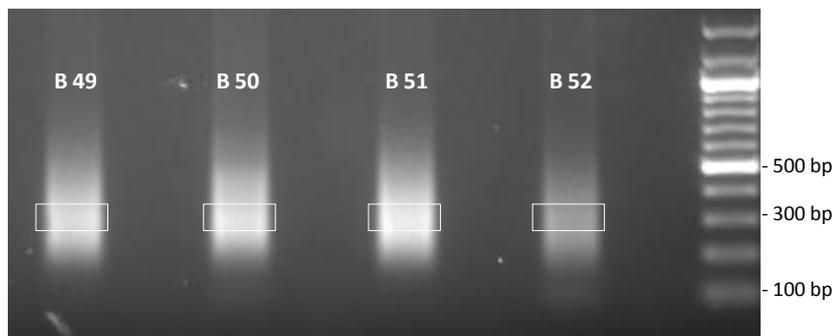


Abbildung 31 MID-Bibliotheken vor der Gelextraktion. Die Größe der MID-Bibliotheken (B49-B52) liegt zwischen 150 bp und 700 bp. Bei der Gelextraktion werden Fragmente zwischen 200 bp und 400 bp ausgeschnitten.

Pre-PCR

Da der Prozess der Bibliotheken-Herstellung nicht stets gleich effizient ist, schwankt die Menge an Adapter-ligierten DNA-Fragmenten zwischen den einzelnen MID-Bibliotheken. Für die gemeinsame Anreicherung mehrerer MID-Bibliotheken über einen Array ist es aber essentiell äquimolare Mengen Adapter-ligierter MID-Bibliothek einzusetzen, um eine gleichmäßige Verteilung der Daten auf die einzelnen Proben zu erzielen. Hierfür wird die Pre-PCR (eine LM-PCR) eingeführt. Nach dieser Pre-PCR liegen als MID-Bibliothek nur noch Fragmente vor, die beidseits Adapter tragen und nach der Anreicherung auch amplifiziert werden können.

Die Pre-PCR dient außerdem dazu, die MID-Bibliothek nach der Gelaufreinigung zu amplifizieren, so dass genügend MID-Bibliothek zur Hybridisierung vorliegt.

Mit der Durchführung der Pre-PCR kann auch die Anzahl der Zyklen bei der Amplifikation nach der Hybridisierung abgesenkt werden, da alle eluierten Fragmente amplifizierbar sein sollten.

Protokoll

Für die Pre-PCR wurde das Fast Start High Fidelity Kit von Roche Applied Science verwendet. Es wurden pro DNA-Bibliothek fünf PCR-Reaktionen angesetzt. Ein Reaktionsansatz bestand aus: 17,25 µl H₂O, 5 µl (10 x) Puffer 2, 0,5 µl (100 mM) dNTPs, 1,25 µl (40 µM) PE-PCR Primer Mix, 1 µl (5 U/µl) Fast Start High Fidelity Polymerase und 25 µl geextrahierte MID-Bibliothek. PCR-Protokoll: 95 °C für 2 min; 12 Zyklen mit 95 °C für 30 s, 65 °C für 20 s, 72 °C für 30s; 7 min bei 72 °C, 4 °C. Der PCR-Ansatz wurde mittels MinElute PCR Purification Kit aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit 15 µl H₂O.

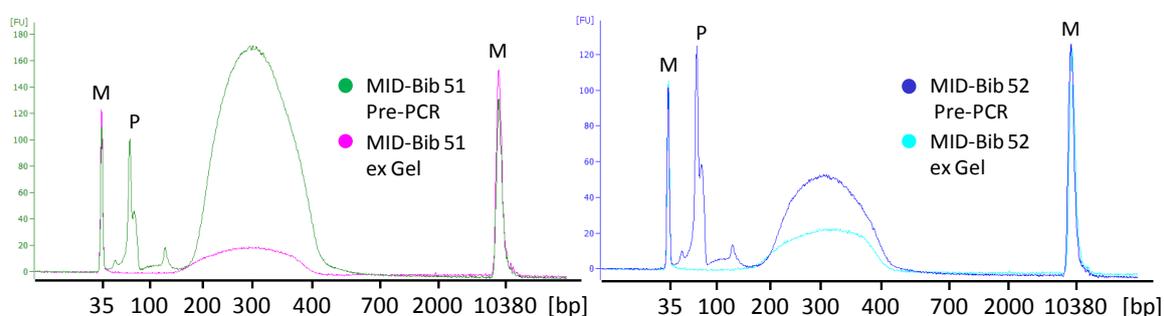


Abbildung 32 Vergleich zweier MID-Bibliotheken nach Gelextraktion und Pre-PCR. Nach der Gelextraktion der MID-Bibliotheken 51 (rosa) und MID-Bibliothek 52 (hellblau) werden diese in der Pre-PCR amplifiziert (grün bzw. dunkelblau). Eine gleichmäßige Größenverteilung der Fragmente konnte dadurch erzielt werden. M= Marker Peaks bei 35 bp und 10380 bp, P= Primer-Peak

Anreicherung der MID-Bibliotheken

Abbildung 33 zeigt einen Überblick über den Hybridisierungsprozess der MID-Bibliotheken mit Wasch- und Elutionsschritten gefolgt von der Amplifikation, Qualitätskontrolle und anschließender Sequenzierung.

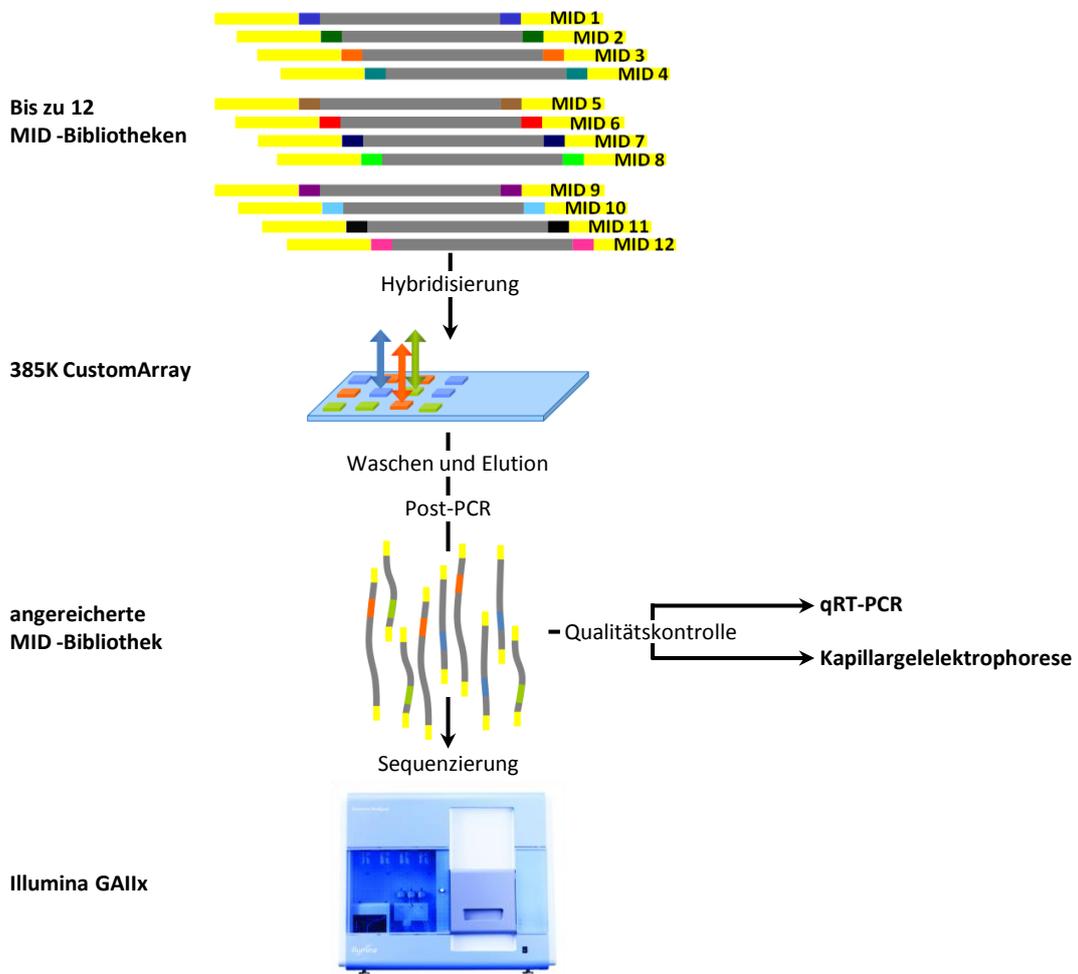


Abbildung 33 Schematische Darstellung des Ablaufs bei der Anreicherung eines MID-Pools aus bis zu 12 MID-Bibliotheken.

Hybridisierung

Nach der Pre-PCR besitzen die MID-Bibliotheken keine gegabelten Adapter mehr, sondern vollständig komplementäre Enden. Hierdurch ist es möglich, dass Fragmente unspezifisch über die Adapter hybridisieren (Abbildung 34) und damit der Anteil der On-Target Reads¹¹ abnimmt.

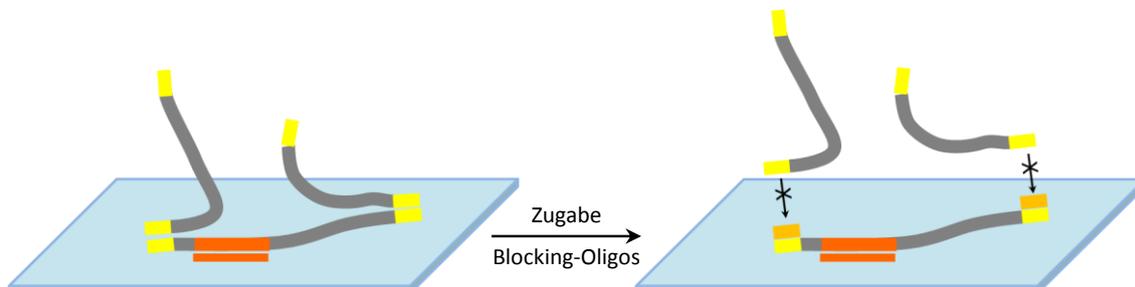


Abbildung 34 Unspezifische Co-Hybridisierungen. Nach der Pre-PCR können Fragmente über die dann komplementären Adapter (gelb) hybridisieren. Durch Co-Hybridisierung kommt es zur Anreicherung von Fragmenten der Nicht-Zielregion. Die Zugabe von Blocking-Oligos reduziert die Co-Hybridisierung über die Adaptersequenzen. Der Anteil an On-Target Reads erhöht sich.

Durch Zugabe der PE-PCR Primer als Blocking-Oligos, die vollständig komplementär zu den amplifizierten Adaptern sind, sollten diese bei der Hybridisierung abgesättigt werden, so dass keine unspezifischen Co-Hybridisierungen vorkommen können.

Die Menge der MID-Bibliothek konnte durch die Durchführung der Pre-PCR reduziert werden, da von 100 % amplifizierbaren Fragmenten ausgegangen werden kann. Die Hybridisierungsbedingungen wurden dem *NimbleGen Arrays User's Guide: Sequence Capture Array Delivery* von Roche NimbleGen entnommen.

Protokoll

Je 600 ng (Anreicherung als 5 er-Pool) bzw. 400 ng (Anreicherung als 12 er-Pool) MID-Bibliothek wurden zu einem MID-Pool gemischt und mit 100 µl (1 mg/ml) humaner Cot-1 DNA bei 60 °C in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Danach wurde mit 4,5 µl (70 °C) H₂O bei 70 °C für 10 min im Thermomixer rehydriert. Dann erfolgte die Zugabe von 1,3 µl (1 mM) PE-PCR-Mix, 8 µl (2 x) SC Hybridization Buffer und 3,2 µl Component A. Die Mischung wurde 10 min bei 95 °C denaturiert und dann bei 42 °C kurzzeitig gelagert.

Der 385K CustomArray wurde mittels *Precision Mixer Alignment Tool* (PMAT) mit einem X1 Mixer beklebt und 15 µl der Hybridisierungsmischung luftblasenfrei in das so entstandene Reservoir pipettiert (MICROMAN®). Fill- und Ventport wurden luftdicht abgeklebt. Die Hybridisierung erfolgte für 64 h - 72 h bei 42 °C.

¹¹ On-Target Reads= Reads, die mit der Zielregion überlappen

Waschen und Elution

Das Waschen des Arrays und die Elution der DNA-MID-Bibliothek wurde, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, durchgeführt. Die Elution der MinElute Säule erfolgte mit 50 µl EB-Puffer.

Post-PCR des angereicherten (C) MID-Pools

Die Zyklenzahl der Post-PCR zur Amplifikation des angereicherten MID-Pools konnte durch die Einführung der Pre-PCR auf 19 Zyklen abgesenkt werden.

Protokoll

Für die Amplifikation wurde das FastStart High Fidelity PCR System von Roche Applied Science verwendet. Es wurden je 2 PCR-Reaktionen angesetzt. Ein PCR-Reaktionsansatz bestand aus: 17,25 µl H₂O, 5 µl (10 x) PCR Buffer 2, 1,25 µl (40 µM) PE-PCR-Mix, 0,5 µl (100 mM) dNTPs, 1 µl (5 U/µl) FastStart Taq DNA Polymerase und 25 µl DNA. PCR-Protokoll: 2 min bei 95 °C, 19 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 20 s bei 65 °C, 30 s bei 72 °C; 72 °C für 7 min, 4 °C. Die Aufreinigung wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 30 µl EB-Puffer.

Post-PCR des nicht-angereicherten (NC) MID-Pools

Zur Überprüfung der Anreicherung mittels qRT-PCR werden C-MID-Pool und NC-MID-Pool miteinander verglichen. Beide Proben sollten zur optimalen Vergleichbarkeit die gleiche Menge an PCR-Zyklen durchlaufen haben. Daher wurden 5 ng MID-Pool vor der Hybridisierung abgenommen und in eine Post-PCR Reaktion eingesetzt.

Protokoll

Für die Amplifikation wurde das FastStart High Fidelity PCR System von Roche Applied Science verwendet. Der PCR-Reaktionsansatz bestand aus: 50 µl H₂O, 5 µl (10 x) PCR Buffer 2, 1,25 µl (40 µM) PE-PCR-Mix, 0,5 µl (100 mM) dNTPs, 1 µl (5 U/µl) FastStart Taq DNA Polymerase und 5 ng MID-Bibliotheken Pool. PCR-Protokoll: 2 min bei 95 °C, 19 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 20 s bei 65 °C, 30 s bei 72 °C; 72 °C für 7 min, 4 °C. Die Aufreinigung wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit durchgeführt. Die Elution erfolgte mit 15 µl EB-Puffer.

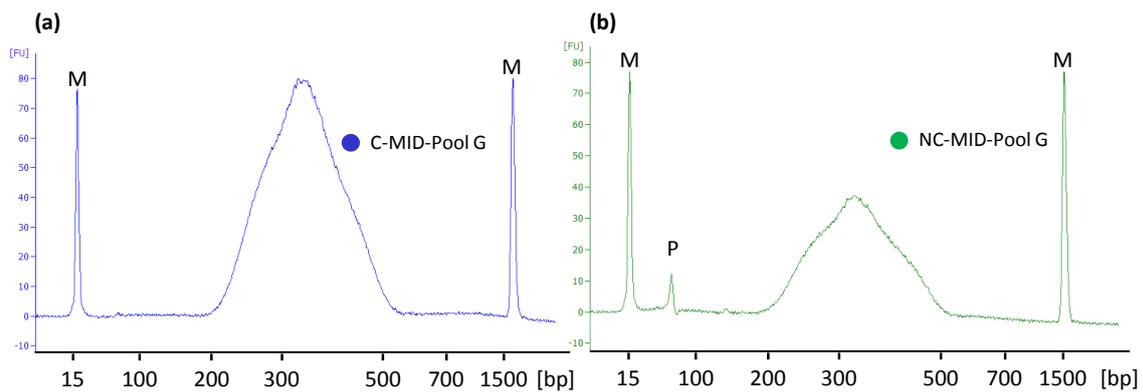


Abbildung 35 MID-Pools nach Post-PCR. Der (a) NC-MID-Pool G und der (b) C-MID-Pool G zeigen die gleiche Größenverteilung. M= Marker-Peaks bei 15 bp und 1500 bp, P= Primer-Peak.

Die Post-PCR des NC-MID-Pools und C-MID-Pools wurden jeweils auf dem Bioanalyzer 2100 analysiert (Abbildung 35). Der MID-Pool G zeigt vor (a) und nach (b) der Anreicherung die gleiche Größenverteilung.

Sequenzierung eines 12 MID-Pools

Zur Überprüfung der MID-Verteilung eines MID-Pools wurden aus Plazenta-DNA 12 MID-Bibliotheken hergestellt, als MID-Pool über einen Array angereichert und sequenziert. Knapp 11 Mio. Reads konnten im 36 bp Single-Read Lauf erzielt werden. Rund 3 % der 11 Mio. Reads konnten keiner der 12 MIDs zugeordnet werden. Der Anteil der einzelnen MIDs lag zwischen 3,4 % und 13,6 %. Der theoretisch zu erwartende Anteil einer MID liegt bei 8,3 %.

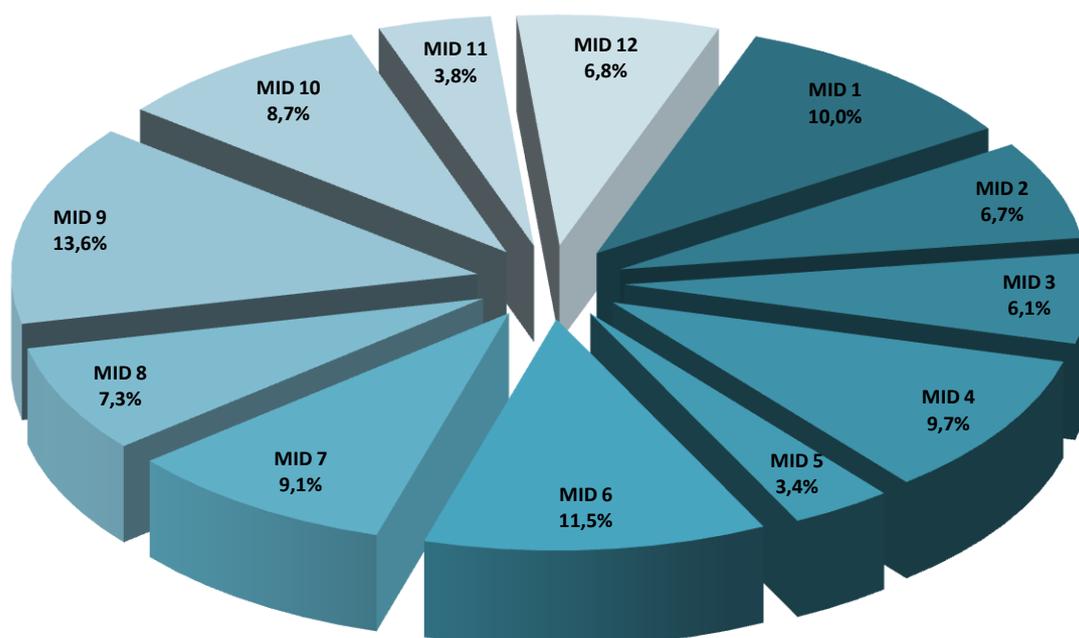


Abbildung 36 Prozentuale Verteilung der einzelnen MID-Sequenzen in einem 36 bp Single-Read Lauf.

3.2 Anreicherung und Sequenzierung von 20 MID-Pools

Diese in diesem Kapitel gezeigten Daten wurden im Rahmen eines Kooperationsprojekts mit Dr. Anna Dolnik vom Universitätsklinikum Ulm generiert. Ziel der Ulmer Arbeitsgruppe unter Leitung von Dr. Lars Bullinger war eine Sequenzanalyse von 1000 Genen, die im Zusammenhang mit der Entstehung und Prognose von akuter myeloischer Leukämie (AML) beschrieben wurden.

Hierzu wurde die DNA von 50 AML-Patienten (Ersterkrankung und Rezidive) als Pools angereichert und sequenziert. Die Größe des subgenomischen Bereichs lag bei 2,7 Mb, verteilt auf 10.969 Zielregionen. Zur Demonstration des *Proof-of-Principle* der in dieser Arbeit etablierten und optimierten MID-Anreicherung werden hier die Statistik-Daten der Anreicherung und Sequenzierung gezeigt. Die vollständigen Ergebnisse des o.g. Projekts (Dolnik, Engelmann et al., Blood, 2012) sind zur Publikation eingereicht und akzeptiert.

3.2.1 MID-Anreicherung von 100 MID-Bibliotheken

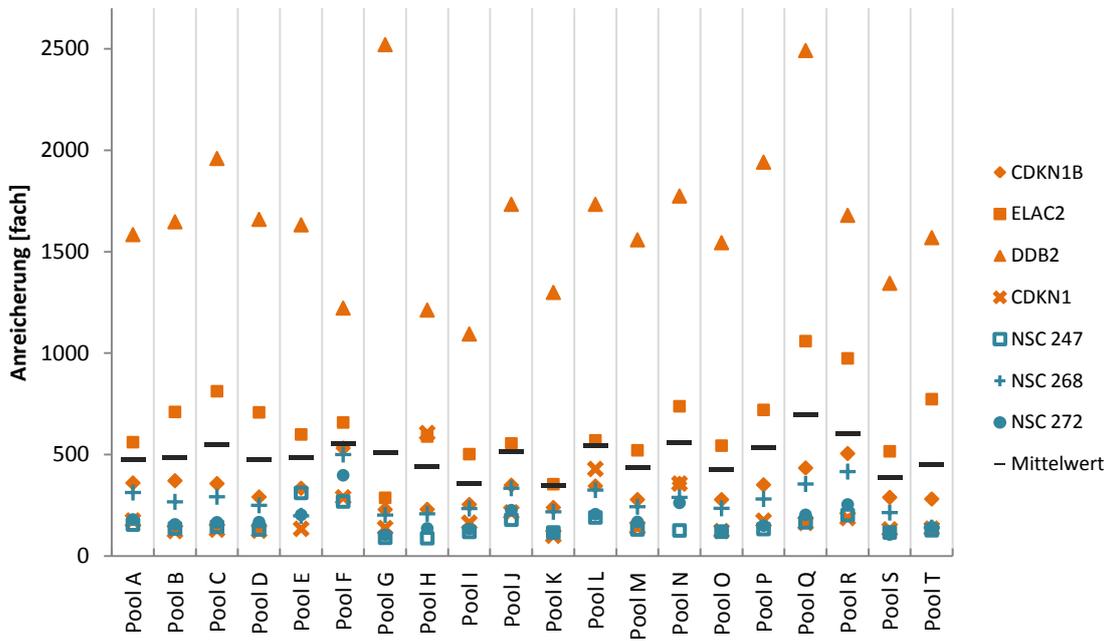
Nach den in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.3 beschriebenen Methoden wurden 100 MID-Bibliotheken hergestellt, in 20 Pools von jeweils 5 MID-Bibliotheken (MID-Pools A - T) angereichert und anschließend sequenziert.

Zur Überprüfung der Anreicherung wurden qRT-PCR Assays der Zielregionen CDKN1B, ELAC2, DDB2 und CDKN1 sowie Assays der Nicht-Zielregionen KCNE1 und MCM5 durchgeführt. Die Kontrollregionen NSC 247, NSC 268 und NSC 272 wurden ebenfalls mittels qRT-PCR analysiert.

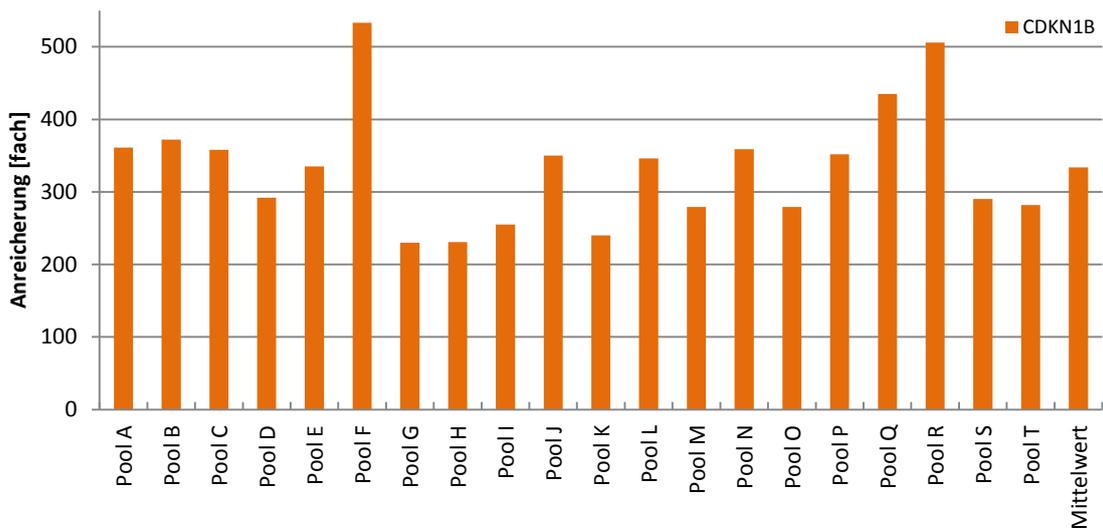
Abbildung 37 a gibt einen Überblick über die Anreicherungswerte¹² der Ziel- und Kontrollregionen der MID-Pools. Die durchschnittliche Gesamtanreicherung aller MID-Pools lag bei 500-fach. Dies errechnete sich aus der durchschnittlichen 700-fachen Anreicherung der Zielregionen und der 200-fachen Anreicherung der Kontrollregionen. Die Nicht-Zielregionen waren nicht angereichert. Beim Vergleich der Anreicherungswerte der MID-Pools der CDKN1B-Zielregion (Abbildung 37 b) ist nur eine geringe Schwankung der Einzelwerte um den Mittelwert von 350 erkennbar. Die einzigen überdurchschnittlich hohe Anreicherungswerte von 550-fach und 500-fach stellten Pool F bzw. Pool R dar. Schwankungen um den Mittelwert lagen in solchen Ausreißer-Fällen bei einem Faktor von maximal 2 um den Mittelwert der entsprechenden Region. Dieser Sachverhalt setzt sich auch in den übrigen Ziel- und Kontrollregionen fort (Abbildung 37 a, Anhang 6.2, 6.3 und 6.4). Der Vergleich der Anreicherungswerte der einzelnen Regionen eines MID-Pools (Abbildung 37 c) zeigt deutliche Schwankungen. Vor allem die Zielregion DDB2 war in allen MID-Pools überdurchschnittlich hoch angereichert (1700-fach). Dieser Sachverhalt war zwischen den einzelnen MID-Pools ebenfalls konsistent (Abbildung 37 a, Anhang 6.2 und 6.4).

¹² Die Anreicherungswerte sind gerundet. Die genauen Anreicherungswerte sind im Anhang 6.2 zu finden

(a)



(b)



(c)

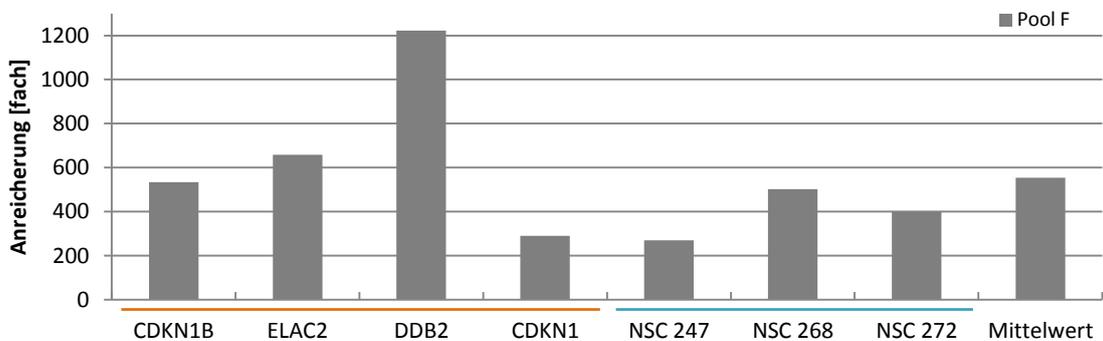


Abbildung 37 Anreicherung der MID-Pools. (a) Anreicherung der Ziel- und Kontrollregionen aller MID-Pools. (b) Anreicherung der Zielregion *CDKN1B* aller MID-Pools. (c) Anreicherung aller Regionen von Pool F. Die Zielregionen sind orange, die Kontrollregionen türkis markiert

3.2.2 Statistik der Sequenzierungen

Die Sequenzierung der MID-Pools wurde als 100 bp Paired-End Lauf (GAIIx, Illumina) durchgeführt. Beide Seiten eines Fragments wurden somit sequenziert. Die Reads konnten durch die MIDs den einzelnen Patienten zugeordnet werden. Pro 100 bp Read erhielt man 94 bp zur Datenanalyse. Das Mapping der Reads erfolgte getrennt nach Patienten. Reads aus PCR-Duplikaten wurden entfernt. Die Anzahl der Basen, die in die Zielregion mappen, wurden gezählt, daraus errechnete sich die Reads On-Target Rate und die Abdeckung der Basen in der Zielregion.

Durchschnittlich konnten pro Patient ca. 9,5 Mio. Reads erzielt werden. Nach Abzug der Duplikate ergaben sich dann rund 7,5 Mio. Unique Reads pro Patient, dies entsprach einer durchschnittlichen Duplikat-Rate von ca. 20 %. Mittels Burrows-Wheeler Aligner (Li and Durbin 2009) konnten dann 88 % der Unique Reads auf das humane Genom gemapped werden. Dies entspricht einer On-Target Rate von rund 33 %, dadurch ergibt sich eine durchschnittlich 57-fache Basenabdeckung in der Zielregion. Im Mittel konnten 98,9 % der 10.969 Zielregionen angereichert werden (Tabelle 3, Anhang 6.5).

Betrachtet man die MID-Pools E und F im Vergleich zu den restlichen MID-Pools (Tabelle 3) so fällt auf, dass diese Proben eine im Vergleich geringe On-Target Rate aufweisen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei diesen MID-Pools noch keine Blocking-Oligos zugegeben wurde. Bei den restlichen MID-Pools erfolgte die Zugaben der Blocking-Oligos; eine Steigerung der On-Target Rate von ca. 23 % auf rund 33 % konnte hierdurch erreicht werden.

Tabelle 3 Statistik der MID-Sequenzierungen der ersten sechs MID-Pool A-F

| Pool | Name | MID | Reads | Unique Reads | Mapped Reads (von UR) | On Target (von MR) | Abdeckung [-fach] |
|--------|-----------|--------|------------|--------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Pool A | Lib 10 | MID 12 | 13.259.138 | 82,2 % | 83,6 % | 37,9 % | 92,8 |
| | Lib 11 | MID 1 | 14.836.086 | 83,3 % | 80,5 % | 40,9 % | 110,2 |
| | Lib 7 | MID 8 | 6.932.564 | 80,3 % | 82,5 % | 31,4 % | 38,4 |
| | LibRem 10 | MID 2 | 12.095.624 | 77,7 % | 94,3 % | 40,9 % | 101,4 |
| | LibRem 11 | MID 3 | 8.209.668 | 77,8 % | 95,4 % | 46,7 % | 74,7 |
| Pool B | Lib 21 | MID 1 | 16.405.180 | 87,4 % | 84,3 % | 40,8 % | 132,8 |
| | Lib 23 | MID 3 | 16.591.510 | 84,2 % | 87,0 % | 43,0 % | 139,8 |
| | Lib 24 | MID 4 | 12.445.814 | 87,7 % | 91,1 % | 35,7 % | 94,4 |
| | LibRem 21 | MID 2 | 7.725.550 | 82,1 % | 94,7 % | 40,5 % | 63,8 |
| | LibRem 24 | MID 6 | 1.479.650 | 88,8 % | 92,2 % | 38,4 % | 12,4 |
| Pool C | Lib 30 | MID 12 | 9.898.230 | 89,5 % | 89,3 % | 40,4 % | 85,8 |
| | Lib 32 | MID 2 | 10.319.286 | 83,1 % | 84,9 % | 43,7 % | 85,3 |
| | Lib 38 | MID 9 | 10.943.452 | 87,1 % | 80,5 % | 37,4 % | 76,9 |
| | LibRem 30 | MID 10 | 7.236.040 | 81,4 % | 92,2 % | 38,6 % | 55,8 |
| | LibRem 38 | MID 1 | 14.778.680 | 86,33 % | 92,9 % | 36,3 % | 114,25 |

Fortsetzung Tabelle 3

| Pool | Name | MID | Reads | Unique Reads | Mapped Reads (von UR) | On Target (von MR) | Abdeckung [-fach] |
|--------------|------------|--------|------------|--------------|-----------------------|--------------------|-------------------|
| Pool D | Lib 28 | MID 9 | 15.883.374 | 85,3 % | 87,4 % | 38,0 % | 122,1 |
| | Lib 40 | MID 12 | 15.523.928 | 81,7 % | 80,5 % | 35,7 % | 98,9 |
| | LibRem 40 | MID 3 | 8.889.130 | 75,5 % | 93,2 % | 42,0 % | 75,6 |
| | LibRem 43 | MID 5 | 1.629.226 | 73,4 % | 88,3 % | 45,2 % | 12,0 |
| | LibRem 48 | MID 10 | 5.940.720 | 75,7 % | 92,5 % | 38,8 % | 43,2 |
| Pool E | Lib 1 | MID 1 | 6.561.826 | 77,8 % | 75,2 % | 26,1 % | 23,6 |
| | Lib 4 | MID 4 | 5.067.352 | 78,1 % | 77,5 % | 21,0 % | 15,6 |
| | Lib 5 | MID 6 | 5.550.510 | 80,9 % | 75,0 % | 20,7 % | 16,5 |
| | Lib 8 | MID 9 | 9.442.324 | 77,8 % | 71,4 % | 23,2 % | 29,2 |
| | Lib 9 | MID 10 | 12.317.838 | 79,8 % | 76,0 % | 23,7 % | 42,7 |
| Pool F | DRK-KSch | MID 5 | 13.619.778 | 28,2 % | 80,6 % | 14,9 % | 45,7 |
| | Lib Rem 15 | MID 7 | 10.928.912 | 61,8 % | 87,1 % | 22,5 % | 34,6 |
| | Lib Rem 16 | MID 8 | 7.055.902 | 70,4 % | 85,1 % | 23,2 % | 26,0 |
| | Lib Rem 18 | MID 10 | 9.280.022 | 61,9 % | 84,1 % | 25,0 % | 31,8 |
| | Lib Rem 19 | MID 11 | 7.256.540 | 63,0 % | 82,0 % | 26,7 % | 26,5 |
| ∅ alle Pools | | | 9.412.609 | 7,510.946 | 6.612.572 | 2.154.992 | 57 |
| | | | | 79,8 % | 88,0 % | 32,6 % | |

Vor der Anreicherung (2,7 Mb verteilt auf 10.969 Zielregionen) repräsentierte die Zielregion ca. 0,09 % des Genoms (~3 Gb). Nach der Anreicherung und Sequenzierung konnten rund 33 % aller Reads in die Zielregion gemapped werden. (Abbildung 38 a und b). Daraus lässt sich eine rund 400-fache Anreicherung errechnen ([Anzahl der gemappten Basen in Zielregion/Anzahl der gemappten Basen der Sequenzierung] / [Größe der Zielregion in bp/Größe des Genoms in bp]).

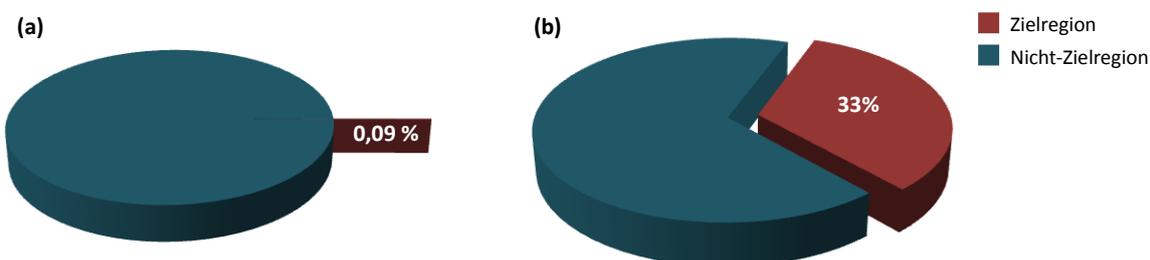


Abbildung 38 Effizienz der subgenomischen Anreicherung. Vor der Anreicherung (a) repräsentiert die Zielregion 0,09 % des Genoms, nach Anreicherung und Sequenzierung (b) liegen rund 33 % der Reads in der Zielregion.

Entscheidend für den Erfolg der MID-Anreicherung ist die gleichmäßige Verteilung der MIDs (der Patientenproben) in einem Sequenzier-Lauf. Nur dadurch kann eine ausreichende Basenabdeckung der Zielregion für alle Patientenproben erreicht werden und nur dann lassen sich die Vorteile des Multiplexverfahrens optimal ausnutzen.

Zur signifikanten Detektion von SNPs sollte die Basenabdeckung mindestens 30-fach sein. Legt man die Größe der Zielregion zugrunde (2,7 Mb), ergibt dies eine Anzahl von rund $6,7 \cdot 10^7$ sequenzierten Basen, die in der Zielregion liegen müssen. Dies entspricht $8,1 \cdot 10^5$ Reads (Readlänge 100 bp), die in der Zielregion liegen müssten. Bei einer On-Target Rate von rund 33 % müssen auf jede MID-Bibliothek 2,4 Mio. Reads für eine 30-fache Basenabdeckung entfallen. 2,4 Mio Reads sind ca. 8 % der durchschnittlich 30 Mio. Unique Mapped Reads, die bei der Sequenzierung pro MID-Pool erzielt werden konnten (Anhang 6.5). D.h. erst ab einem MID-Anteil von 8 % kann mit einer hinreichenden Datenmenge für die entsprechende Probe gerechnet werden.

Bei den MID-Pools A - F (Abbildung 39) ist bis auf zwei Ausreißer (MID-Pool B, MID 6 und MID-Pool D, MID 5) der Grenzwert von 8 % pro MID erreicht. Dieser Sachverhalt setzt sich auch in den restlichen MID-Pools G - T fort. Bis auf wenige Ausreißer haben alle MID-Bibliotheken den erforderlichen Anteil an den Unique Mapped Reads. Auffallend ist, dass die Ausreißer vor allem bei der MID 5 und der MID 6 zu finden sind. Bei der MID 6 haben rund 67 % der MID 6-Bibliotheken einen zu geringen Read-Anteil (6 von 9 MID 6-Bibliotheken), bei der MID 5 ist dies sogar bei 83 % der MID 5- Bibliotheken der Fall (5 von 6 MID 5-Bibliotheken).

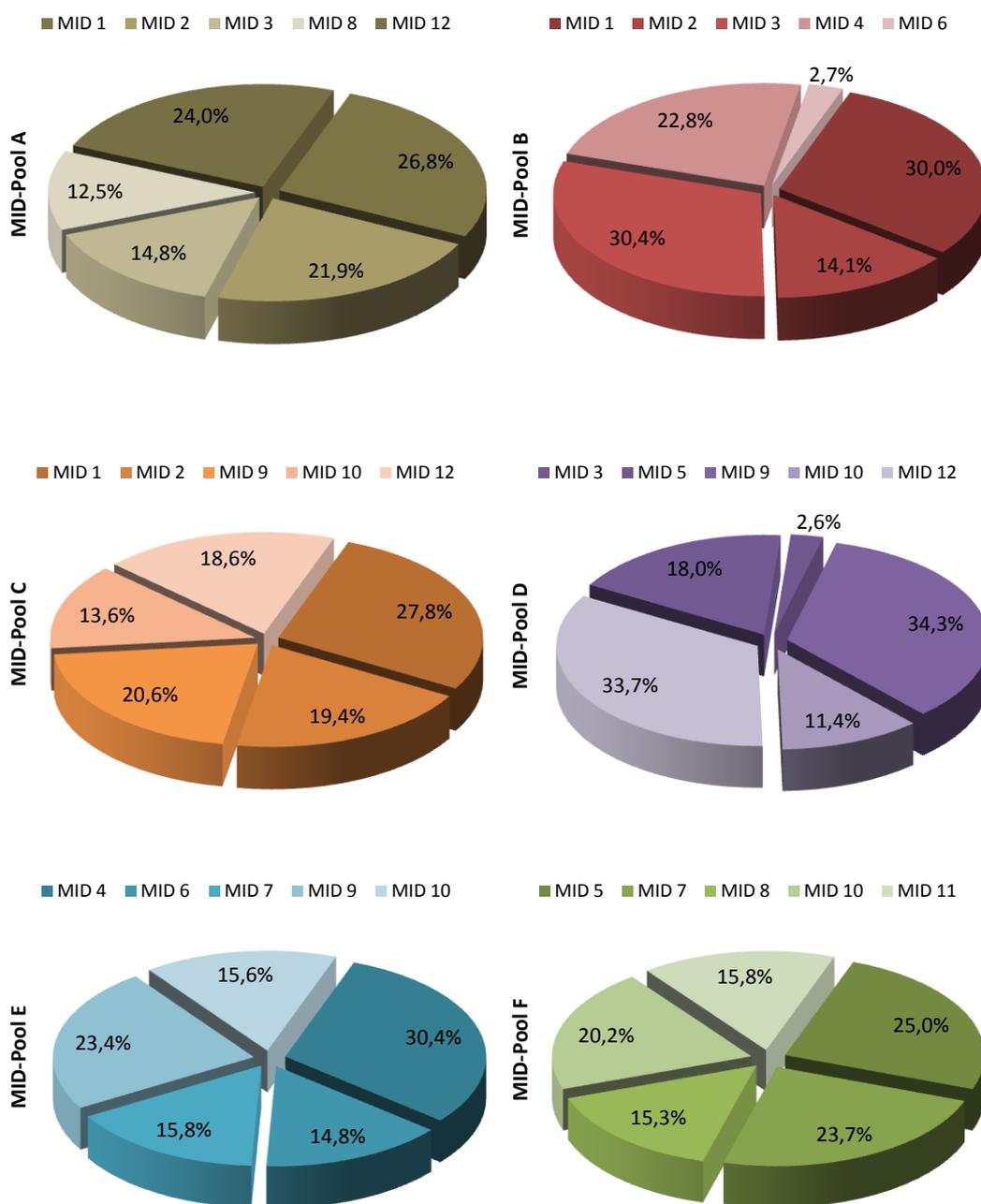


Abbildung 39 MID Verteilung der MID-Pool A - F. Eine 30-fache Basenabdeckung wird theoretisch erst ab einem MID-Anteil von 8 % erreicht. Nur in wenigen MID-Pools liegen einzelne MID-Bibliotheken unter den 8 % (z.B. MID-Pool B, MID 6; MID-Pool D, MID 5). Betroffen sind nahezu ausschließlich die MID 5-Bibliotheken und die MID 6-Bibliotheken.

3.3 Subgenomische DNA-Methylierungsanalyse im Glioblastom

LOH von Chromosom 10q ist eine weitverbreitete genetische Aberration in pGBIV wie auch in sGBIV (Ohgaki and Kleihues 2009). Zur Identifikation potentieller TSG in diesem Bereich (Assem, Sibenaller et al. 2012), die durch Promotormethylierung (Jones and Baylin 2002) inaktiviert sind, wurde eine subgenomische DNA-Methylierungsanalyse ,durch Bisulfit-Anreicherung (vgl. Kapitel 3.1.2), der Promotorregionen aller codierenden Genen des Chromosoms 10q durchgeführt. Die Promotorbereiche (definiert als - 1500/+300 bp der TSS) werden durch 2852 einzelne Zielregionen repräsentiert (Anhang 6.10), in denen 83.516 CpGs liegen.

3.3.1 Anreicherung von Patienten- und Kontrollproben

Nach der in den Kapiteln 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Methode wurden insgesamt 27 DNA-Bibliotheken hergestellt und für 10q Promotorbereiche angereichert. Sechs der Bibliotheken wurden aus Normalhirn- DNA (Pools aus jeweils 5 Spendern) hergestellt; zehn aus GBIV ohne *IDH1* Mutation (pGBIV-*IDH1*^{wt}) und elf aus GBIV ohne *IDH1* Mutation (sGBIV-*IDH1*^{mut}).

Zur Überprüfung der Anreicherung wurden qRT-PCR Assays der Zielregionen METTL10, MGMT und WNT8B sowie Assay der Nicht-Zielregionen KCNE1 und MCM5 und der Kontrollregionen NSC 247, NSC 268 und NSC 272 durchgeführt.

Abbildung 40 a gibt einen Überblick über die Anreicherungswerte¹³ der Ziel- und Kontrollregionen aller Proben. Die Gesamtanreicherung aller Proben lag bei 2100-fach. Dies errechnete sich aus der durchschnittlichen Anreicherung der Zielregionen mit 2000-fach und die der Kontrollregionen mit 2200-fach. Die Nicht-Zielregionen waren nicht angereichert.

Beim Vergleich der Anreicherungswerte der einzelnen Proben der MGMT-Zielregion (Abbildung 40 b) sind starke Schwankungen der Einzelwerte nach oben und nach unten um den Mittelwert (1700) erkennbar. Dieser Sachverhalt setzt sich auch in den übrigen Ziel- und Kontrollregionen fort (Abbildung 40 a, Anhang 6.6, 6.7 und 6.8).

Der Vergleich der Anreicherungswerte der einzelnen Regionen der Probe NB Pool 0 (Abbildung 40 c) zeigt deutliche, wenn auch weniger starke Schwankungen (Faktor ~1,5 um den Mittelwert). Die Zielregion METTL10 zeigt die stärksten Anreicherungswerte (3100-fach). Der kleinste Anreicherungswert wurde in der Kontrollregion NSC272 (1200-fach) gemessen. Dieser Sachverhalt war zwischen den einzelnen Probengruppen ebenfalls konsistent (Abbildung 40 a, Anhang 6.6, 6.7 und 6.8).

¹³ die Anreicherungswerte sind gerundet. Die genauen Anreicherungswerte sind in Anhang 6.6 zu finden

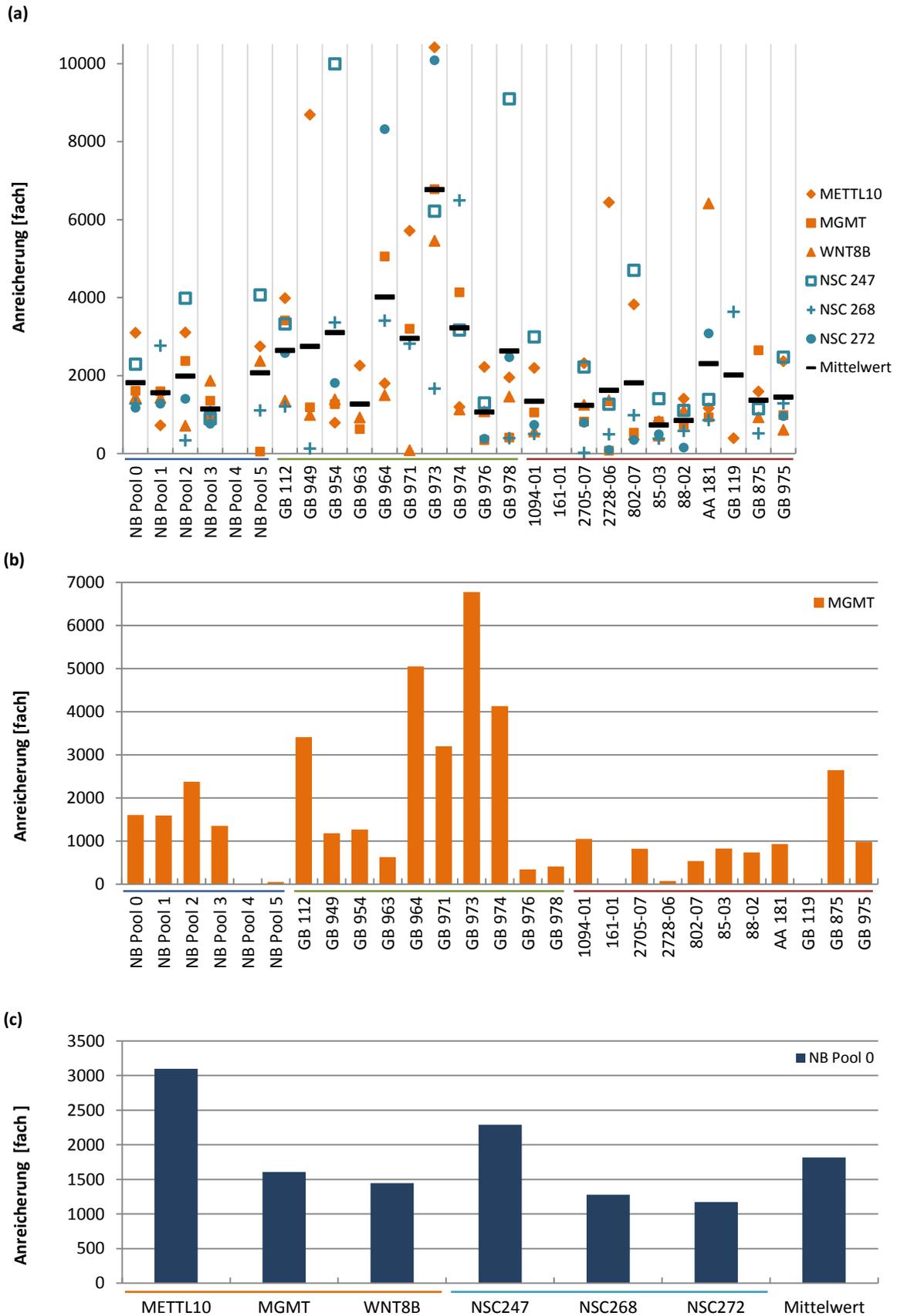


Abbildung 40 Anreicherung der Glioblastom-Proben. (a) Anreicherung der Ziel- und Kontrollregionen aller Proben. Normalhirn-Kontrollen (blau), IDH1-wt (grün), IDH1-mut (rot) (b) Anreicherung der Zielregion *MGMT* aller Proben. (c) Anreicherung aller Regionen von NB Pool 0, Zielregion (orange), Kontrollregion (türkis).

Die Proben GB 119, NB Pool 4 und 161-01 zeigten entweder nur eine Anreicherung von sehr wenigen Regionen bzw. es konnte keine Anreicherung bestimmt werden, deshalb wurden diese Proben nicht sequenziert.

3.3.2 Statistik der Sequenzierungen

Die bioinformatische Auswertung der Mate-Pair Sequenzierungen wurde von Volker Hovestadt, Abteilung Molekular Genetik, DKFZ durchgeführt.

Die Sequenzierung der Bisulfit-angereicherten Proben wurde als 100 bp Single-Read Läufe durchgeführt. Im Durchschnitt konnten pro Probe knapp 22 Mio. Reads erzielt werden. Davon konnten im Schnitt 59,5 % eindeutig im Genom gemapped werden. Rund 99,7 % der 2852 Zielregionen konnten angereichert werden (Tabelle 4, Abbildung 41).

Tabelle 4 Sequenzierung der Bisulfit-Anreicherungen

| Name | Reads | Mapped Reads | Unique Reads (von MR) | On-Target | Abdeckung Zielregion [fach] | Abdeckung CpGs in Zielregion [-fach] |
|-------------------|-------------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| NB Pool 0 | 22.238.728 | 55,7 % | 1,7 % | 58,4 % | 11,5 | 7,6 |
| NB Pool 1 | 23.589.259 | 57,9 % | 1,3 % | 63,7 % | 9,9 | 6,4 |
| NB Pool 2 | 25.568.014 | 60,7 % | 0,8 % | 60,7 % | 6,3 | 4,6 |
| NB Pool 3 | 20.270.058 | 57,3 % | 1,6 % | 64,7 % | 10,5 | 6,2 |
| NB Pool 5 | 22.411.231 | 44,0 % | 0,2 % | 67,1 % | 1,3 | 0,6 |
| GB 112 | 18.220.930 | 69,9 % | 4,3 % | 59,2 % | 23,4 | 18,5 |
| GB 949 | 29.753.364 | 53,5 % | 0,2 % | 54,9 % | 1,4 | 1,1 |
| GB 954 | 17.337.951 | 62,1 % | 2,9 % | 39,1 % | 9,9 | 6,9 |
| GB 963 | 26.416.313 | 58,0 % | 0,2 % | 39,6 % | 1,1 | 0,7 |
| GB 964 | 22.274.844 | 60,6 % | 0,6 % | 58,8 % | 4,3 | 2,9 |
| GB 971 | 21.454.537 | 45,2 % | 0,3 % | 50,4 % | 1,6 | 0,9 |
| GB 973 | 20.963.200 | 66,9 % | 0,9 % | 61,2 % | 5,5 | 3,5 |
| GB 974 | 20.706.142 | 64,8 % | 0,5 % | 54,7 % | 3,0 | 1,7 |
| GB 976 | 20.787.505 | 56,1 % | 0,8 % | 36,2 % | 3,1 | 2,0 |
| GB 978 | 13.792.772 | 60,1 % | 1,8 % | 46,1 % | 5,8 | 4,6 |
| 1094-01 | 23.471.130 | 50,2 % | 0,8 % | 53,2 % | 5,0 | 3,2 |
| 2705-07 | 22.940.711 | 65,0 % | 1,2 % | 55,8 % | 8,1 | 5,0 |
| 2728-06 | 27.291.176 | 65,5 % | 2,2 % | 50,9 % | 15,3 | 9,8 |
| 802-07 | 23.481.686 | 60,1 % | 2,2 % | 46,0 % | 12,2 | 7,6 |
| 85-03 | 25.651.341 | 57,4 % | 1,8 % | 45,6 % | 10,9 | 7,1 |
| 88-02 | 22.625.171 | 60,9 % | 2,4 % | 45,9 % | 12,7 | 7,6 |
| AA 181 | 15.165.251 | 69,8 % | 3,6 % | 67,8 % | 18,8 | 10,6 |
| GB 875 | 19.492.175 | 58,9 % | 0,7 % | 65,7 % | 4,3 | 2,7 |
| GB 975 | 15.467.313 | 71,2 % | 3,7 % | 59,2 % | 17,1 | 9,6 |
| Mittelwert | 21.936.617 | 59,5 % | 1,5 % | 54,5 % | 8,6 | 5,6 |

Bei der Auswertung der Sequenzdaten zeigte sich, dass es sich bei dem Großteil der Reads um PCR-Duplikate handelte. Die Duplikat-Rate lag bei bis zu 99 %. Diese Reads, die an die gleiche 5'-Position mappen können nicht in der Auswertung berücksichtigt werden. Der Duplikat-Anteil steht im Gegensatz zur angereichert und bisulfitbehandelten Plazenta-DNA, die eine Duplikat-Rate von rund 33 % aufwies (vgl. Kapitel 3.1.2). Nach Abzug der Duplikate konnten 54,5 % der durchschnittlich 311.786 Unique Reads den Zielregionen zugeordnet werden (Abbildung 41). Daraus errechnete sich eine Abdeckung aller Basen der Zielregion von 8,6-fach, die Abdeckung der 83.516 CpG in der Zielregion lag bei 5,6-fach (Tabelle 4).

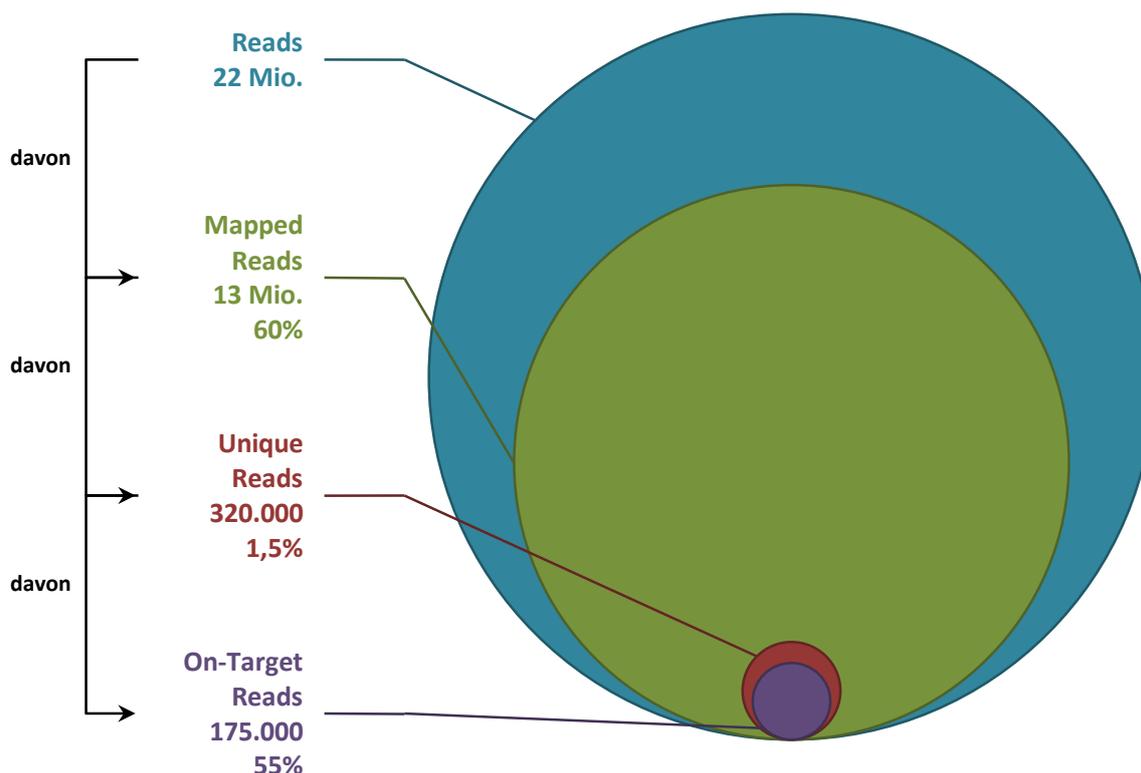


Abbildung 41 Schematische Darstellung der Reads.

Read Map

Mit dem Integrative Genomics Viewer (IGV) können die Reads bzw. die Abdeckung der Basen durch die Erstellung einer ReadMap visualisiert werden. Abbildung 42 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Sequenzierung. Die Zielregionen (rot) der Bisulfit-Anreicherung sind die Promotorregionen der Gene auf Chromosom 10q. Sowohl Chromosom 10p, als auch die intergenischen Bereiche, Introns und Exons von Chromosom 10q sind die Nicht-Zielregion. Der größte Teil der Reads (grün) sind auf Chromosom 10q zu finden. Die Höhe der Balken ist ein Maß für die Abdeckung (Abbildung 42 a). Nur wenige Reads liegen außerhalb der Zielregionen. Dies wird deutlich, wenn man einen 100 kb-Ausschnitt von Chromosom 10q betrachtet (Abbildung 42 b). Für den Großteil der Zielregionen sind Sequenzinformationen vorhanden. Außerhalb der Zielregionen sind keine Reads zu finden.

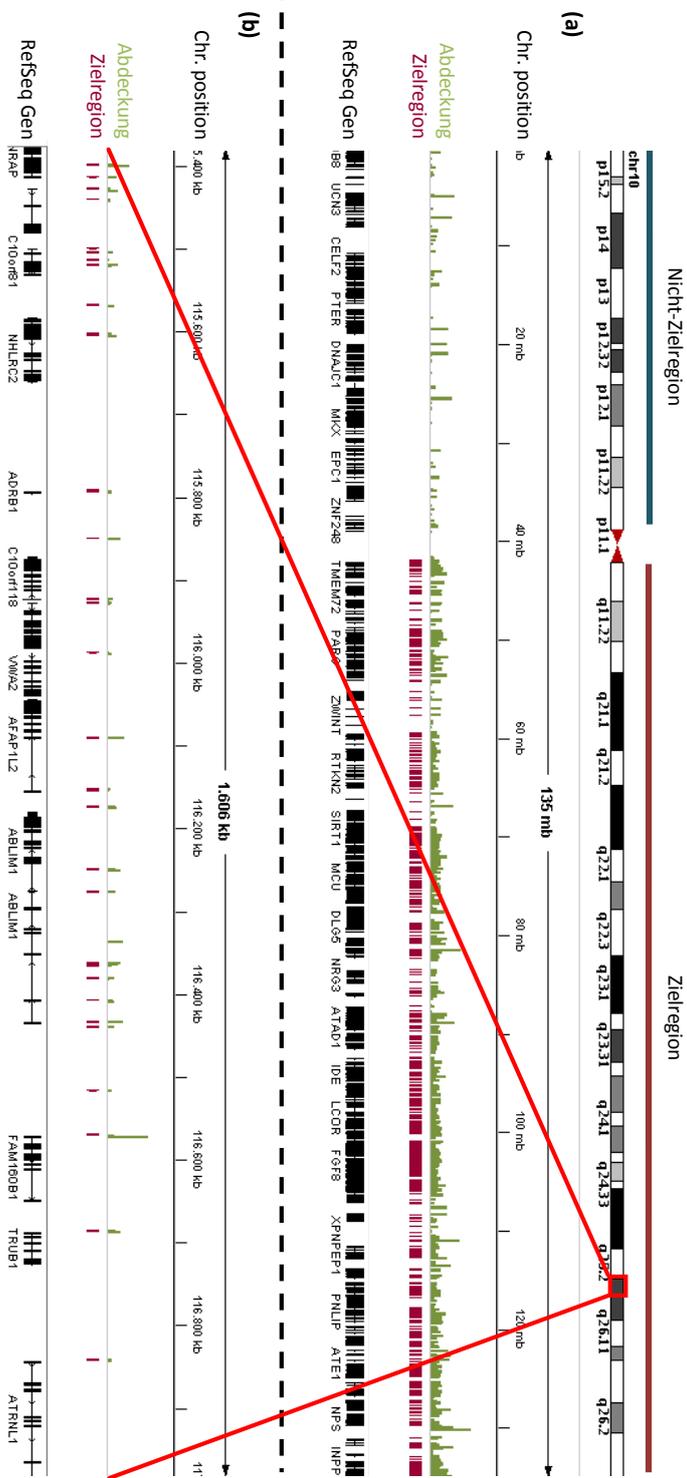


Abbildung 42 Read Map von Chromosom 10. Die gemappten Unique Reads können mittels Integrative Genomics Viewer dargestellt werden. Die 2852 Zielregionen (rot) liegen auf Chromosom 10 q. Die meisten (54,5 %) der Unique Reads (grün) liegen in der Zielregion, nur wenige Reads mit geringer Abdeckung liegen in der Nicht-Zielregion Chromosom 10 p (a). Die Vergrößerung eines Ausschnitts von Chromosom 10 q (b) zeigt deutlich, dass nahezu alle Zielregionen angereichert werden konnten; keine Reads sind hier außerhalb der Zielregionen zu finden.

Vergleich der Werte der Anreicherung und der Abdeckung

Für die Auswertung der Sequenzdaten ist die Abdeckung der Basen bzw. CpGs und nicht die Anreicherungswerte entscheidend. Abbildung 43 zeigt den Vergleich der durchschnittlichen normalisierten Abdeckung mit der durchschnittlichen normalisierten Anreicherung der einzelnen Regionen. Für die Normalisierung der Anreicherung wurden die Anreicherungswerte (Durchschnitt aller Proben) der Regionen durch Mittelwert (Durchschnitt aller Proben) der Anreicherung dividiert. Analog dazu wurde die Normalisierung der Abdeckung berechnet. Dabei handelte es sich um die Basenabdeckung der qRT-PCR Amplikons (MGMT usw.)

Die normalisierte Abdeckung und die normalisierte Anreicherung bewegen sich innerhalb der einzelnen Regionen in der gleichen Größenordnung. Ist eine Region stark angereichert liegt eine hohe Abdeckung der Region vor.

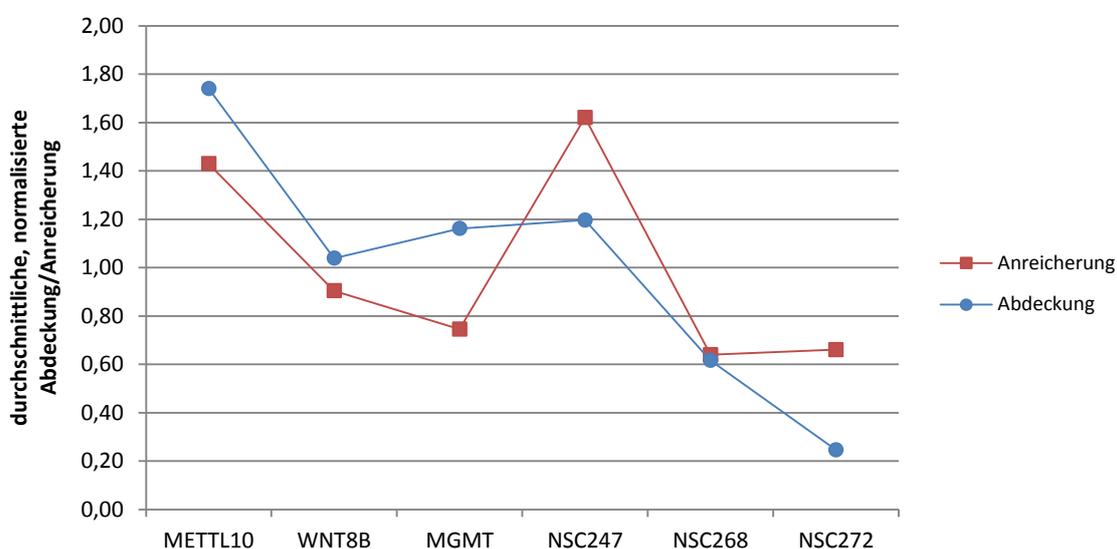


Abbildung 43 Vergleich der normalisierten Abdeckung und der Anreicherung aller Proben. Eine hohe Anreicherung korreliert mit einer hohen Abdeckung.

3.3.3 Methylierungsmuster

Trotz der geringen Abdeckung der CpGs in den Zielregionen konnten 14.243 CpGs mit einer mindestens 10-fachen Abdeckung in zehn GBIV Proben und vier Normalhirn-Kontrollen analysiert werden (Tabelle 5).

Tabelle 5 Ausgewertete Proben der subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse

| Normalhirn-Kontrollen | pGBIV- <i>IDH1</i> ^{wt} | sGBIV- <i>IDH1</i> ^{mut} |
|-----------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| NB Pool 0 | GB 112 | 2705-07 |
| NB Pool 1 | GB 954 | 2728-06 |
| NB Pool 2 | GB 978 | 802-06 |
| NB Pool 3 | | 85-03 |
| | | 88-02 |
| | | AA 181 |
| | | GB975 |

Beim Ward-Clustering (Abbildung 44) wurde nach der euklidischen Distanz gruppiert. Es zeigt sich, eine Auftrennung der Proben in drei Gruppen. Dies entspricht weitestgehend den Gruppen der Normalhirn-Kontrollen, den pGBIV-*IDH1*^{wt} und den sGBIV-*IDH1*^{mut}. Die sGBIV-*IDH1*^{mut} wiesen eine im Vergleich zu den Normalhirn-Kontrollen und pGBIV-*IDH1*^{wt} stärkere Methylierung auf. Eine Ausnahme bildet jedoch die Probe 85-03, die der Methylierung nach zwischen den Normalhirn-Kontrollen und den pGBIV-*IDH1*^{wt} gruppiert, aber eine Probe der sGBIV-*IDH1*^{mut} Gruppe ist.

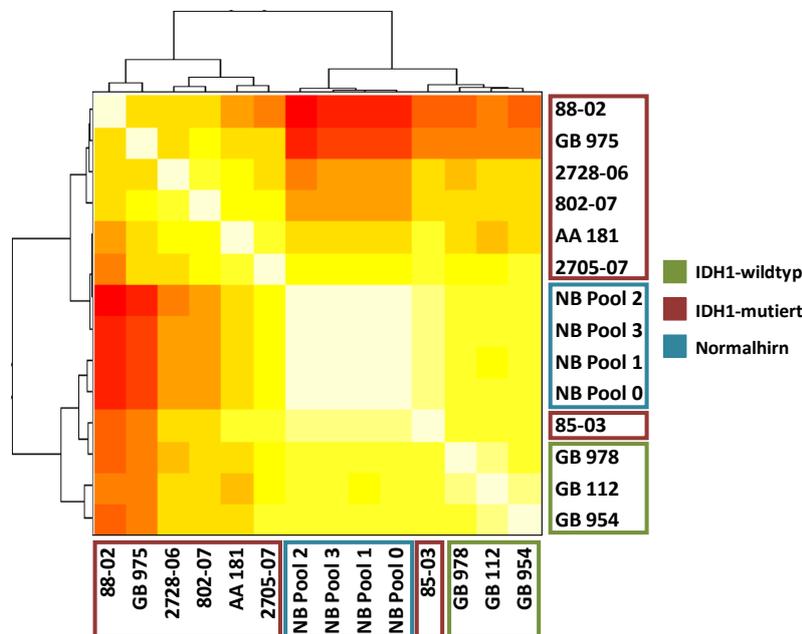


Abbildung 44 Ward-Clustering nach der euklidischen Distanz. Die Proben clustern in drei Gruppen, die mit Ausnahme von 85-03 den Kategorien Normalhirn (blau), sGBIV-*IDH1*^{mut} (rot) und pGBIV-*IDH1*^{wt} (grün) entsprechen. [Abbildung wurde von Volker Hovestadt erstellt]

3.3.4 Identifizierung differentiell methylierter und exprimierter Gene

Zur Detektion differentiell methylierter Gene wurden die verschiedenen Proben Gruppen miteinander verglichen. Vier verschiedene Vergleiche wurden angestellt (Abbildung 45): Normalhirn gegen GBIV (1), Normalhirn gegen pGBIV-*IDH1*^{wt} (2), Normalhirn gegen sGBIV-*IDH1*^{mut} (3) und pGBIV-*IDH1*^{wt} gegen sGBIV-*IDH1*^{mut} (4).

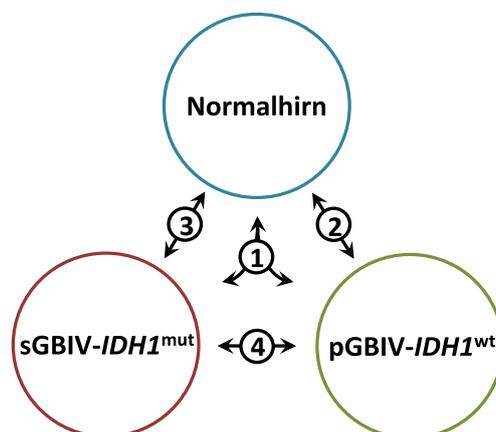


Abbildung 45 Gruppenvergleiche zur Identifizierung differentiell methylierter Gene.

Von diesen Vergleichen wurden jeweils die Gene ausgewählt, deren adj.p Wert $\leq 0,05$ war und die relative Methylierungsdifferenz mindestens 10 % betrug.

In Tabelle 6 sind die Kandidatengene der unterschiedlichen Gruppenvergleiche verzeichnet. Der Vergleich Normalhirn-gegen-pGBIV-*IDH1*^{wt} (2) ergab keine signifikanten Treffer. Für den Vergleich der Normalhirn-Proben-gegen-GBIV (1) ergaben sich 64 Gene mit differentiellem Methylierungsmuster, davon waren im Tumor 20 Gene hypomethyliert und 46 Gene hypermethyliert. Zwei hypomethylierte Gene und 47 hypermethylierte Gene ergaben sich in der Vergleichsgruppe Normalhirn-gegen-sGBIV-*IDH1*^{mut} (3). Für den Vergleich der pGBIV-*IDH1*^{wt}-gegen-sGBIV-*IDH1*^{mut} zeigten sich 11 Gene in sGBIV-*IDH1*^{mut} als hypermethyliert; ein Gen war hypomethyliert. Sieben Gene waren rekurrent in allen 3 Gruppen (*CHAT*, *C10orf58*, *DKK1*, *NODAL*, *PPYR1*, *RHOBTB1* und *SEC31B*). 33 Gene waren als differentiell methyliert in zwei Gruppen wiederzufinden.

Ergebnisse

Tabelle 6 Gene mit differentieller Methylierung der unterschiedlichen Vergleichsgruppen

| Normalhirn gegen GBIV | Normalhirn gegen pGBIV-IDH1 ^{wt} | Normalhirn gegen sGBIV-IDH1 ^{mut} | pGBIV-IDH1 ^{wt} gegen sGBIV-IDH1 ^{mut} | Normalhirn gegen GBIV | Normalhirn gegen pGBIV-IDH1 ^{wt} | Normalhirn gegen sGBIV-IDH1 ^{mut} | pGBIV-IDH1 ^{wt} gegen sGBIV-IDH1 ^{mut} |
|-----------------------------|---|--|--|-----------------------------|---|--|--|
| ABLIM1 | | ABLIM1 | | LDB3 | | | |
| ACSL5 | | | | LRRC18 | | | |
| ADRA2A | | ADRA2A | | | | LZTS2 | |
| ALOX5 | | ALOX5 | | MIR346 | | MIR346 | |
| ANK3 | | | | MIR609 | | | |
| ANXA11 | | | ANXA11 | MSMB | | | |
| C10orf122 | | | | NCRNA00245 | | NCRNA00245 | |
| C10orf27 | | | | NKX2-3 | | NKX2-3 | |
| C10orf58 | | C10orf58 | C10orf58 | NODAL | | NODAL | NODAL |
| C10orf81 | | | | NPFPR1 | | | |
| C10orf91 | | | | NPM3 | | | NPM3 |
| C10orf92 | | | | OGDHL | | OGDHL | |
| CDH23 | | | | PPP2R2D | | PPP2R2D | |
| CHAT | | CHAT | CHAT | PPYR1 | | PPYR1 | PPYR1 |
| CTBP2 | | CTBP2 | | PRLHR | | PRLHR | |
| CUZD1 | | | | PSD | | PSD | |
| CXCL12 | | CXCL12 | | PYROXD2 | | PYROXD2 | |
| DKK1 | | DKK1 | DKK1 | | | RASGEF1A | RASGEF1A |
| DNMBP | | DNMBP | | RASSF4 | | RASSF4 | |
| | | EMX2 | | RBP3 | | | |
| | | EMX2OS | | RET | | RET | |
| FAM13C | | FAM13C | | | | | RGR |
| FGFR2 | | FGFR2 | | RGS10 | | | |
| FLJ41350 | | | | RHOBTB1 | | RHOBTB1 | RHOBTB1 |
| FRAT2 | | FRAT2 | | SEC31B | | SEC31B | SEC31B |
| GDF2 | | | | | | SH2D4B | SH2D4B |
| | | GPR123 | | SLC16A9 | | SLC16A9 | |
| GSTO2 | | GSTO2 | | SLC18A3 | | | |
| HHEX | | HHEX | | SORCS1 | | | |
| HMX2 | | | | | | SYT15 | SYT15 |
| | | HPS1 | | TLX1NB | | | |
| HPSE2 | | HPSE2 | | | | TMEM26 | |
| HTR7 | | | | UNC5B | | UNC5B | |
| INPP5A | | INPP5A | | VAX1 | | VAX1 | |
| | | KCNIP2 | | | | VCL | |
| KCNMA1 | | KCNMA1 | | WDFY4 | | | |
| KNDC1 | | | | | | ZMIZ1 | |
| LBX1 | | LBX1 | | ZNF365 | | ZNF365 | |
| | | LCOR | | | | | |

rot= hypermethyliert, grün= hypomethyliert

Die meisten (56) der differentiell methylierten Gene waren hypermethyliert, was zu einer reduzierten Expression der assoziierten Gene führen kann (vgl. Kapitel 1.2.1.3). Eine Demethylierung von Promotoren (Tabelle 6, grün markiert) kann im Umkehrschluss zur Aktivierung von Onkogenen führen (Feinberg 2004). Im nächsten Schritt wurden daher

diejenigen Gene (aus Tabelle 6) identifiziert, die sowohl eine differentielle Methylierung als auch eine umgekehrt proportionale differentielle Expression aufwiesen. Hierzu wurden Datenbankabgleiche mit R2 (R2: microarray analysis and visualization platform, <http://r2.amc.nl>, Zugriff Juni 2011), Rembrandt (National Cancer Institute. 2005, <http://rembrandt.nci.nih.gov>, REMBRANDT homepage, Zugriff Juni 2011), Supplemental Data der Publikation von Noushmer et al. (Noushmer, Weisenberger et al. 2010), sowie den unpublizierten „Whole human genome 4x44k“ Microarray Expression Profiling-Daten von Dr. Martje Tönjes, Abteilung Molekulare Genetik, DKFZ durchgeführt

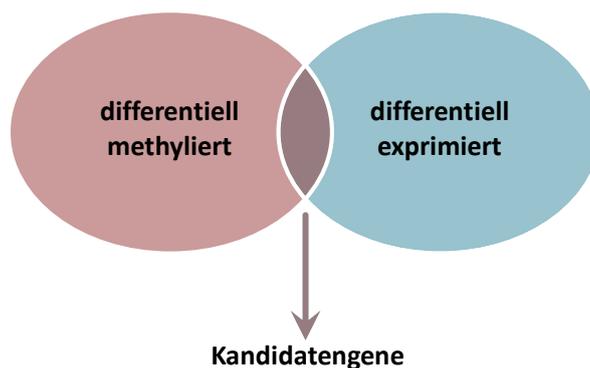


Abbildung 46 Identifizierung sowohl differentiell methylierter als auch differentiell exprimierter Kandidatengene.

Durch den Abgleich der Liste der hypermethylierten Gene mit den Genen, die eine verminderte Expression aufwiesen, ergaben sich acht Kandidatengene (Tabelle 7). Unter den Genen mit Hypomethylierung konnte keines mit gesteigerter Expression identifiziert werden.

Tabelle 7 Hypermethylierte Gene mit verringerter Expression.

| Symbol | Name |
|----------|--|
| DKK1 | dickkopf 1 homolog (Xenopus laevis) |
| GSTO2 | glutathione S-transferase omega 2 |
| KCNMA1 | potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, alpha member 1 |
| OGDHL | oxoglutarate dehydrogenase-like |
| HHEX | hematopoietically expressed homeobox |
| ZMIZ1 | zinc finger, MIZ-type containing 1 |
| SEC31B | SEC31 homolog B (S. cerevisiae) |
| RASGEF1A | RasGEF domain family, member 1A |

3.3.5 Validierung der Methylierungsmuster der Kandidatengene

Das gefundene differentielle Methylierungsmuster der Kandidatengene wurde mittels MassARRAY® validiert. Hierfür wurden Regionen einer Größe von bis zu 500 bp aus den Promotorregionen der Kandidatengene ausgewählt und Bisulfit-Primer für diese Regionen gewählt (Tabelle 8). Die DNA der Normalhirn-Kontrollen und der Tumorproben wurde bisulfitbehandelt und amplifiziert.

Die in-vitro Transkription, die Massenspektrometrie, sowie die statistische Auswertung wurden von der Abteilung Epigenomik und Krebsrisikofaktoren des DKFZ durchgeführt.

Tabelle 8 Regionen und Amplikons für MassARRAY®

| Gen Symbol | Gewählte Regionen | | Amplikons | | | |
|------------|----------------------------|------------|-----------|------|------------|------|
| | Position | Länge [bp] | Start | Ende | Länge [bp] | CpGs |
| DKK1 | Chr10: 54072921-54074827 | 1906 | 90 | 539 | 474 | 20 |
| GSTO2 | Chr10: 106027719-106029158 | 1918 | 940 | 1373 | 448 | 24 |
| RASGEF1A | Chr10: 43697754-43698226 | 472 | 85 | 400 | 336 | 36 |
| RASGEF1A | Chr10: 43724991-43725412 | 422 | 2 | 104 | 127 | 9 |
| KCNMA1 | Chr10: 79396097-79397228 | 1131 | 313 | 714 | 426 | 26 |
| KCNMA1 | Chr10: 79396097-79397228 | 1131 | 713 | 1020 | 332 | 34 |
| OGDHL | Chr10: 50969660-50971324 | 1663 | 529 | 995 | 494 | 52 |
| HHEX | Chr10: 94451331-94451737 | 1369 | 281 | 705 | 445 | 42 |
| ZMIZ1 | Chr10: 81001947-81002296 | 655 | 43 | 227 | 259 | 30 |
| SEC31B | Chr10: 102279053-102279585 | 1860 | 233 | 708 | 500 | 52 |

Bei der Analyse der MassARRAY® Daten wird der Methylierungsstatus von CpG-Einheiten bestimmt, die von den Spaltstellen der Endonucleasen abhängig sind. Daher sind in solchen CpG-Einheiten manchmal mehrere CpGs zu finden. (vgl. Kapitel 2.2.9.).

Das Unsupervised Clustering nach der euklidischen Distanz, zeigt eine auch hier eine Trennung der pGBIV-*IDH1*^{wt} und der sGBIV-*IDH1*^{mut}. Die zweifelhafte Probe 85-03 gruppiert hier genau zwischen pGBIV-*IDH1*^{wt} und sGBIV-*IDH1*^{mut}. Je dunkler die einzelnen Felder dargestellt sind, desto höher ist der Methylierungsgrad der einzelnen CpG-Einheiten. Vor allem im unteren Bereich sind die Methylierungsunterschiede der pGBIV-*IDH1*^{wt} und der sGBIV-*IDH1*^{mut} erkennbar. Dabei zeigen die sGBIV-*IDH1*^{mut} eine, im Vergleich zu den pGBIV-*IDH1*^{wt} stärkere Methylierung. Die CpG-Einheiten, die ein signifikantes (Wilcoxon-Rangsummen-Test) Methylierungsmuster (Hypermethylierung) aufwiesen, gehörten zu den Genen *DKK1*, *RASGEF1A*, *KCNMA1* und *SEC31B* (Anhang 6.9.)

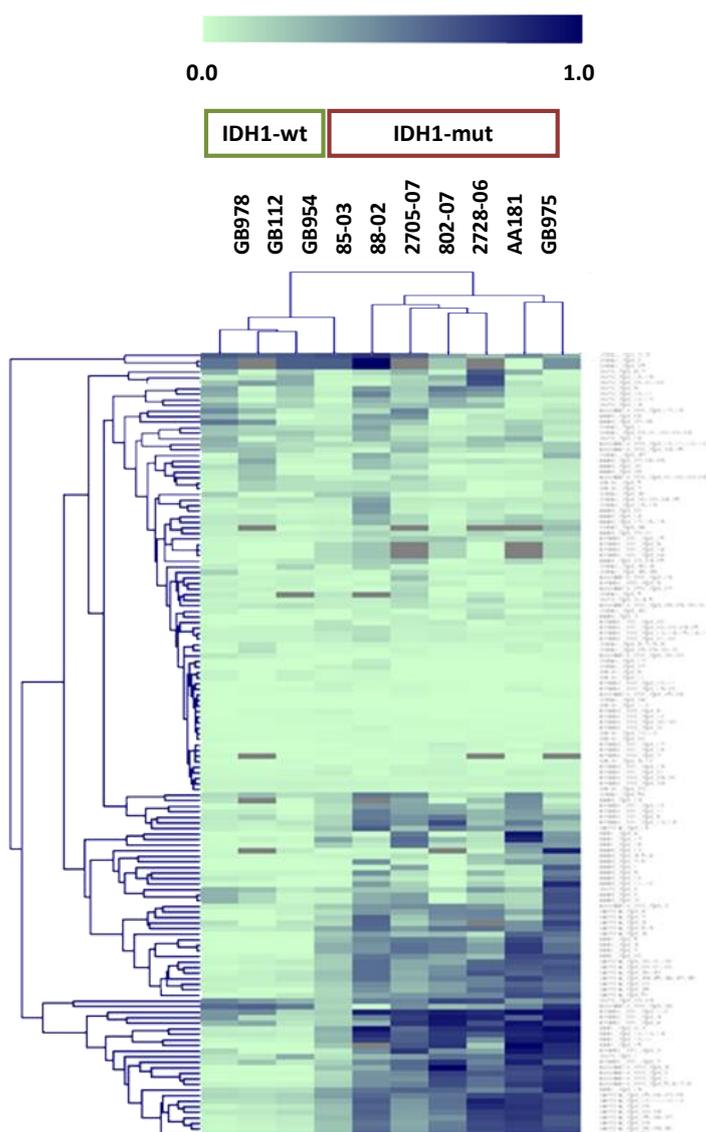


Abbildung 47 Unsupervised Clustering der pGBIV-*IDH1*^{wt} (grün) und der sGBIV-*IDH1*^{mut} (rot) Proben. Je dunkler die einzelnen Felder, desto höher ist der Methylierungsgrad der einzelnen CpG-Einheiten.
[Abbildung wurde von Dr. Rainer Claus erstellt]

Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich zwischen Normalhirn und Tumorproben.

Die Methylierungsanalyse mittels MassARRAY bestätigt die Ergebnisse der subgenomischen Methylierungsanalyse. *DKK1*, *RASGEF1A* und *SEC31B* wurden als differentiell methyliert zwischen den pGBIV-*IDH1*^{wt} und den sGBIV-*IDH1*^{mut} identifiziert.

SEC31B und *RASGEF1A* konnten bei der subgenomischen Methylierungsanalyse auch in den Vergleichen Normalhirn-gegen-GBIV und Normalhirn-gegen-sGBIV-*IDH1*^{mut} als differentiell methyliert identifiziert werden. Eine differentielle Methylierung von *RASGEF1A* wurde bei der subgenomischen Methylierungsanalyse zusätzlich noch beim Normalhirn-gegen-sGBIV-*IDH1*^{mut} Vergleich gefunden. *KCNMA1* wurde in der subgenomischen Methylierungsanalyse in den Vergleichen Normalhirn-gegen-GBIV und Normalhirn-gegen-sGBIV-*IDH1*^{mut} als hypermethyliert identifiziert.

3.3.6 Der Einfluss von *DKK1*, *RASGEF1A*, *KCNMA1* und *SEC31B* auf die Überlebensrate

Molekulare Marker zur Einschätzung der Prognose von GBIV-Patienten sind rar. Mit der Erstellung von Kaplan-Meier-Plots wurde überprüft, ob sich anhand des Methylierungsstatus der Gene bzw. die damit einhergehende verminderte Genexpression eine Aussage über die Prognose der Patienten treffen lässt.

Die Kaplan-Meier-Plots wurden mit R2 und Rembrandt erstellt. Grundlage der Kaplan-Meier-Plots sind die Daten von TCGA (The Cancer Genome Atlas; <http://cancergenome.nih.gov/abouttcga>) (The Cancer Genome Atlas 2008). Diese Daten unterscheiden nicht zwischen sGBIV und pGBIV. Kaplan-Meier-Plots konnten daher nur für GBIV-Patienten generell erstellt werden.

Für den Zusammenhang der *KCNMA1*- und *DKK1*-Expression und dem Gesamtüberleben der Patienten ergibt sich ein signifikanter Zusammenhang, so ist eine niedrige Expression mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Abbildung 48).

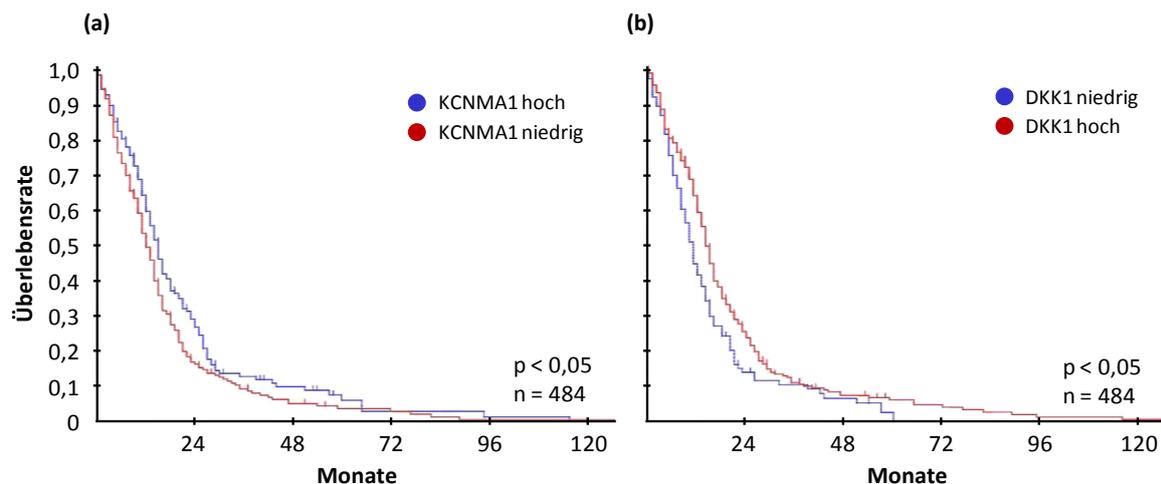


Abbildung 48 Kaplan-Meier-Plot von GBIV-Patienten. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der Expression von (a) *KCNMA1* und (b) *DKK1* mit dem Gesamtüberleben. ($p < 0,05$). [Erstellt mit R2]

Für *RASGEF1A* waren in o.g. Datenbanken keine Expressionsdaten hinterlegt. Bei *RasGEF1A* handelt es sich um einen GTP-Austauschfaktor mit Spezifität für Rap2A. *RasGEF1A* wirkt dabei aktivierend auf Rap2A (Yaman, Gasper et al. 2009). Ist die Expression von *RASGEF1A* vermindert, sollte auch von einer reduzierten Aktivität von Rap2A ausgegangen werden können. Eine Hypermethylierung und die reduzierte Expression von *RASGEF1A* könnte sich daher direkt auf die Aktivität von Rap2A auswirken. Dies lässt sich näherungsweise mit einer verminderten Expression von *RAP2A* beschreiben. Expressionsdaten zu *RAP2A* waren in der o.g. Datenbank verfügbar. Hier zeigt sich eine signifikante ($p < 5 \cdot 10^{-4}$) Korrelation zwischen *RAP2A*-Genexpression und dem Gesamtüberleben von GBIV-Patienten. Eine verminderte *RAP2A* Expression ist mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

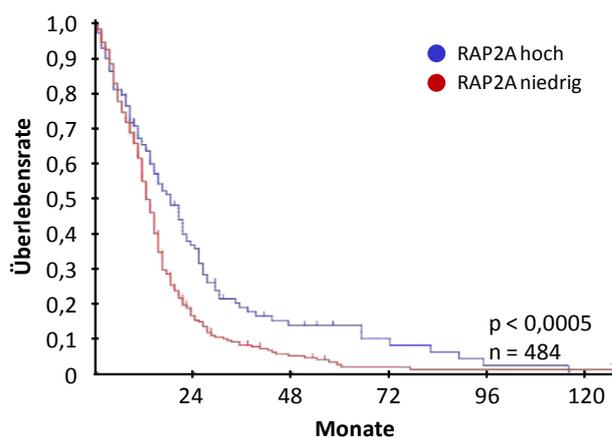


Abbildung 49 Kaplan-Meier-Plot von GBIV-Patienten. Es zeigt sich eine signifikante Korrelation der *RAP2A*-Expression mit dem Gesamtüberleben. ($p < 5 \cdot 10^{-4}$). Hohe *RAP2A*-Expression - einem Effektorprotein von *RASGEF1A*- geht mit einer besseren Prognose einher. [Erstellt mit R2]

Für *SEC31B* (Abbildung 50) war es möglich sowohl für (a) GBIV-Patienten als auch für (b) Astrocytoma (AII/AAIII)-Patienten Kaplan-Meier-Plots zu erstellen. Eine signifikant bessere Prognose lässt sich in beiden Fällen für Patienten mit hoher *SEC31B*-Expression feststellen ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$).

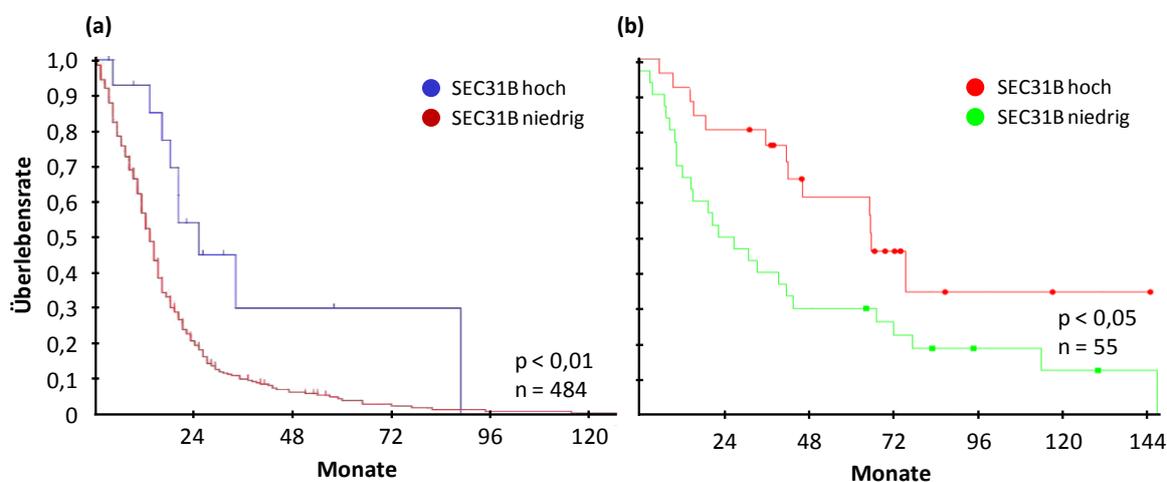


Abbildung 50 Kaplan-Meier Plots für Glioma-Patienten. Hohe *SEC31B*-Expression geht in (a) GBIV-Patienten als auch in (b) Astrozytomen (A II/A AIII)-Patienten mit einem signifikant besseren Gesamtüberleben einher ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$). [(a) erstellt mit R2; (b) erstellt mit Rembrandt]

3.4 Identifizierung von Strukturvariationen im Glioblastom

Strukturelle Variationen (SV) sind im menschlichen Genom weitverbreitet (Korbel, Urban et al. 2007). In vielen Tumoren findet man verstärkt genomische Veränderungen, die auch mit dem Verlust der genomischen Integrität einhergehen. Dabei sind diese Stellen nicht nur willkürlich im Genom verteilt, sondern treffen Bereiche, die Gene enthalten deren Veränderungen klar mit Tumorprogression im Zusammenhang stehen (Korkola and Gray 2010). Zur Detektion von vor allem kleinerer Amplifikationen und Deletionen wurde mit der Methode der Mate-Pair Sequenzierung gearbeitet.

3.4.1 Statistik der Mate-Pair Sequenzierung

Die bioinformatische Auswertung der Mate-Pair Sequenzierungen wurde von Dr. Marc Zapatka, Abteilung Molekulare Genetik, DKFZ durchgeführt.

Von 18 Patienten wurden aus gepaarten Tumor/Normal-DNA Paired-End Bibliotheken hergestellt und in 36 bp PE-Läufen sequenziert. Die Proben GB 112, GB 875 und GS 72 wurden aufgrund der unzureichenden Abdeckung nachsequenziert werden. Im Durchschnitt ergaben sich bei der Sequenzierung rund 40 Mio. Reads pro Proben. Davon konnten durchschnittlich rund 87 % gemapped werden.

Die Duplikate-Rate lag im Mittel bei 27,6 % allerdings schwankten hier die einzelnen Proben beträchtlich zwischen 8,1 % Duplikate und bis zu 81,1 % Duplikate. Durchschnittlich 14 % der Reads konnten als Properly-Paired¹⁴ klassifiziert werden. Singletons¹⁵ hatten einen Anteil von 10,3 %. Die Insertgröße¹⁶ sollte bei ca. 2500 bp-3500 bp liegen (dies war die initiale Fragmentgröße bei der Herstellung der Bibliotheken). Nur bei ca. 45 % der Bibliotheken liegt die tatsächliche Insertgröße bei den erwartenden 2500-3500 bp. Die restlichen Bibliotheken wiesen eine Insertgröße von 250-450 bp auf.

Tabelle 9 Statistik der Mate-Pair Sequenzierung

| Name | Gewebe | Reads | Mapped Reads | Unique Reads | Properly Paired | Singletons | Insertgröße [bp] | Mates auf 2 Chr |
|---------------------|--------|------------|--------------|--------------|-----------------|------------|------------------|-----------------|
| Mittelwert IDH1-wt | | 32.743.633 | 87,6 % | 73,6 % | 15,6 % | 9,9 % | | 10,8 % |
| Mittelwert IDH1-mut | | 49.701.066 | 86,3 % | 70,9 % | 12,2 % | 10,8 % | | 10,4 % |
| Mittelwert alle | | 40.515.790 | 87,0 % | 72,4 % | 14,0 % | 10,3 % | | 10,6 % |

¹⁴Properly-Paired= Reads, bei denen beide Enden korrekt dem Genom zugeordnet werden könnten.

¹⁵ Singletons= Reads, bei dem der zugehörige Mate nicht identifiziert werden konnte.

¹⁶ Die Insertgröße wird anhand des Abstands der Mappingpositionen (im Genom) der Mates berechnet.

Fortsetzung Tabelle 9

| Name | Gewebe | Reads | Mapped Reads | Unique Reads | Properly Paired | Singletons | Insertgröße [bp] | Mates auf 2 Chr |
|---------|-----------|------------|--------------|--------------|-----------------|------------|------------------|-----------------|
| GS 72 | tumor | 8.430.152 | 86,3 % | 79,8 % | 7,2 % | 10,9 % | 3209 | 9,4 % |
| GS 72 | tumor | 24.087.000 | 90,1 % | 56,9 % | 7,5 % | 8,3 % | 3208 | 10,0 % |
| GS 72 | tumor | 27.872.150 | 87,2 % | 54,5 % | 7,0 % | 10,8 % | 3223 | 13,0 % |
| GS 72 | somatisch | 8.768.108 | 86,4 % | 70,9 % | 11,2 % | 10,9 % | 392 | 13,7 % |
| GS 72 | somatisch | 28.236.438 | 90,0 % | 42,4 % | 11,3 % | 8,4 % | 425 | 16,0 % |
| GS 72 | somatisch | 31.017.592 | 82,4 % | 42,2 % | 9,2 % | 14,6 % | 482 | 16,2 % |
| GB 112 | tumor | 18.912.206 | 85,6 % | 66,1 % | 7,1 % | 12,0 % | 481 | 11,6 % |
| GB 112 | tumor | 20.520.114 | 90,0 % | 65,7 % | 9,2 % | 8,5 % | 2469 | 15,1 % |
| GB 112 | tumor | 26.294.418 | 88,0 % | 61,5 % | 8,6 % | 10,2 % | 2478 | 16,3 % |
| GB 112 | somatisch | 24.485.742 | 90,1 % | 65,6 % | 9,3 % | 8,5 % | 431 | 16,6 % |
| GB 112 | somatisch | 29.269.624 | 88,2 % | 63,0 % | 8,8 % | 10,1 % | 434 | 13,1 % |
| GB 112 | somatisch | 27.148.642 | 85,3 % | 62,4 % | 7,5 % | 12,2 % | 386 | 15,8 % |
| GB 954 | tumor | 26.011.246 | 88,0 % | 91,7 % | 4,8 % | 10,4 % | 2161 | 9,0 % |
| GB 954 | somatisch | 21.199.234 | 88,3 % | 92,3 % | 5,5 % | 10,3 % | 1837 | 9,2 % |
| GB 949 | tumor | 45.860.774 | 94,8 % | 18,9 % | 83,9 % | 2,9 % | 202 | 2,8 % |
| GB 949 | somatisch | 52.838.056 | 94,9 % | 90,1 % | 84,3 % | 3,2 % | 193 | 8,1 % |
| GB 963 | tumor | 61.992.372 | 87,8 % | 71,4 % | 12,1 % | 10,2 % | 287 | 8,5 % |
| GB 963 | somatisch | 72.397.130 | 85,4 % | 85,0 % | 9,1 % | 11,7 % | 256 | 9,9 % |
| GB 964 | tumor | 65.086.516 | 85,9 % | 83,0 % | 14,7 % | 11,6 % | 255 | 5,8 % |
| GB 964 | somatisch | 70.895.416 | 84,9 % | 90,7 % | 27,1 % | 10,2 % | 180 | 8,1 % |
| GB 973 | tumor | 18.773.542 | 87,8 % | 95,8 % | 8,1 % | 10,4 % | 2439 | 8,9 % |
| GB 973 | somatisch | 19.582.138 | 88,6 % | 93,2 % | 7,6 % | 9,6 % | 2487 | 9,6 % |
| GB 974 | tumor | 42.219.192 | 86,6 % | 87,6 % | 15,8 % | 11,0 % | 276 | 7,1 % |
| GB 974 | somatisch | 47.710.208 | 79,3 % | 93,6 % | 12,3 % | 12,0 % | 223 | 7,1 % |
| GB 976 | tumor | 14.680.210 | 88,5 % | 96,1 % | 7,7 % | 9,6 % | 2345 | 9,4 % |
| GB 976 | somatisch | 17.046.250 | 88,2 % | 93,8 % | 7,7 % | 10,0 % | 2492 | 9,2 % |
| 1094-01 | tumor | 65.164.704 | 86,9 % | 74,5 % | 12,5 % | 10,8 % | 248 | 10,8 % |
| 1094-01 | somatisch | 69.785.544 | 92,0 % | 64,0 % | 55,1 % | 5,8 % | 217 | 9,0 % |
| 2705-07 | tumor | 69.137.666 | 81,7 % | 83,5 % | 35,9 % | 9,9 % | 237 | 5,5 % |
| 2705-07 | somatisch | 62.964.046 | 83,7 % | 83,4 % | 4,2 % | 12,3 % | 2465 | 10,0 % |
| 2728-06 | tumor | 76.571.166 | 86,5 % | 68,5 % | 9,4 % | 11,3 % | 289 | 9,9 % |
| 2728-06 | somatisch | 76.498.734 | 84,5 % | 68,9 % | 4,2 % | 12,7 % | 2330 | 9,2 % |
| 802-07 | tumor | 72.409.698 | 85,8 % | 77,5 % | 10,9 % | 11,5 % | 313 | 9,0 % |
| 802-07 | somatisch | 61.532.196 | 86,1 % | 74,4 % | 6,6 % | 11,3 % | 2565 | 9,3 % |
| 88-02 | tumor | 48.234.487 | 85,9 % | 84,2 % | 4,8 % | 11,6 % | 2105 | 10,0 % |
| 88-02 | somatisch | 57.270.860 | 81,4 % | 74,8 % | 6,4 % | 13,5 % | 350 | 8,7 % |
| AA 181 | tumor | 50.331.277 | 86,2 % | 79,0 % | 25,7 % | 10,5 % | 250 | 7,9 % |
| AA 181 | somatisch | 56.098.767 | 82,9 % | 86,1 % | 11,0 % | 12,8 % | 234 | 7,8 % |
| GB 119 | somatisch | 69.117.632 | 85,5 % | 82,0 % | 12,5 % | 11,8 % | 230 | 8,4 % |
| GB 119 | tumor | 70.702.216 | 86,4 % | 81,4 % | 7,5 % | 11,3 % | 847 | 8,5 % |
| GB 875 | tumor | 8.839.604 | 86,8 % | 71,2 % | 7,4 % | 10,5 % | 3152 | 10,4 % |
| GB 875 | tumor | 25.276.020 | 90,3 % | 45,5 % | 7,5 % | 8,2 % | 3148 | 15,0 % |
| GB 875 | tumor | 31.381.782 | 86,9 % | 41,7 % | 6,9 % | 11,0 % | 3171 | 16,1 % |
| GB 875 | somatisch | 24.145.058 | 86,0 % | 42,5 % | 8,2 % | 11,3 % | 485 | 11,0 % |
| GB 875 | somatisch | 27.907.138 | 87,6 % | 41,7 % | 9,6 % | 10,3 % | 2514 | 17,6 % |
| GB 875 | somatisch | 21.294.168 | 90,6 % | 46,6 % | 10,5 % | 7,8 % | 2443 | 16,9 % |
| GB 975 | tumor | 30.642.800 | 87,5 % | 93,8 % | 5,6 % | 10,9 % | 2230 | 8,9 % |
| GB 975 | somatisch | 18.117.878 | 88,2 % | 94,3 % | 7,0 % | 10,3 % | 2168 | 8,7 % |

3.4.2 Amplifikationen und Deletionen

Insgesamt zeigten sich eine ganze Reihe von Aberrationen, sowohl in der Gruppe der pGBIV-*IDH1*^{wt} als auch in bei den sGBIV-*IDH1*^{mut}. Abbildung 51 gibt einen Überblick über Amplifikationen (rot) und Deletionen (blau) der Patientengenome. Amplifikation(en) von Chromosom 7 konnten größtenteils in den pGBIV-*IDH1*^{wt} identifiziert werden. Die Amplifikation konzentriert sich v.a. auf den Bereich des Gens *EGFR*. In sieben pGBIV-*IDH1*^{wt} ließ sich diese Amplifikation identifizieren (Tabelle 10). Weitere Amplifikationen konnten in den Banden 1q32.1 4q12 10p11.23-13, sowie 12p13.31-13.32 identifiziert, in denen teilweise krebsrelevante Gene liegen. Die Amplifikation einer Teilregion der Bande 20q11.21 wurde vor allem sGBIV-*IDH1*^{mut} beobachtet (4 sGBIV-*IDH1*^{mut}/1 pGBIV-*IDH1*^{wt}) Dieser Bereich enthält die Gene *COX4I2*, *BCL2L1* und *TPX2*. Deletionen könnten vor allem in sGBIV-*IDH1*^{mut} identifiziert werden. Größere Deletion fand sich in den Banden 22q11.21 und. Bei dem deletierten Bereich der Banden 1p36.32-36.33 war bei den sGBIV-*IDH1*^{mut} (n=6) ausschließlich der Bereich des Gens *TTC34* betroffen. Eine weitere Deletion im Bereich der Banden 19p13.2-13.3 konnte identifiziert werden (Tabelle 10).

Tabelle 10 CNA von 18 Gliom-Patienten

| Chr | CNA | Bande(n) | Position | | ~Größe [bp] | (Pot.) Onkogen | Anzahl <i>IDH1</i> wt | Anzahl <i>IDH1</i> mut |
|-----|---------------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|--------------------------|---------------------------|
| | | | Start | Stop | | | | |
| 1 | Deletion | 1p36.32-36.33 | 672.875 | 4.672.773 | 3.999.898 | | | 4 |
| 1 | Deletion | 1p36.32 | 2.581.442 | 2.701.616 | 120.174 | | 1 | 6 |
| 1 | Amplifikation | 1q32.1 | 203.300.776 | 204.752.264 | 1.451.488 | * | 3 | |
| 4 | Amplifikation | 4q12 | 52.926.400 | 57.591.107 | 4.664.707 | <i>PDGFRA</i> | 1 | 3 |
| 7 | Amplifikation | 7p11.2 | 54.827.107 | 55.445.458 | 618.351 | <i>EGFR</i> | 7 | |
| 10 | Amplifikation | 10p11.23-13 | 17.211.931 | 29.589.049 | 12.377.118 | | | 4 |
| 12 | Amplifikation | 12p13.31-13.32 | 3.473.588 | 7.020.236 | 3.546.648 | <i>CCND2</i> | | 4 |
| 19 | Deletion | 19p13.2-13.3 | 390.727 | 7.047.425 | 6.656.698 | | | 2 |
| 20 | Amplifikation | 20q11.21 | 29.657.312 | 29.837.695 | 180.383 | | 1 | 4 |
| 22 | Deletion | 22q11.21 | 16.546.302 | 16.881.688 | 335.386 | | 2 | 3 |

**MDM4* liegt in dieser Bande ist aber nicht von der Amplifikation betroffen. Chr= Chromosom, CNA= Copy Number Aberration, Pot.= Potentielles

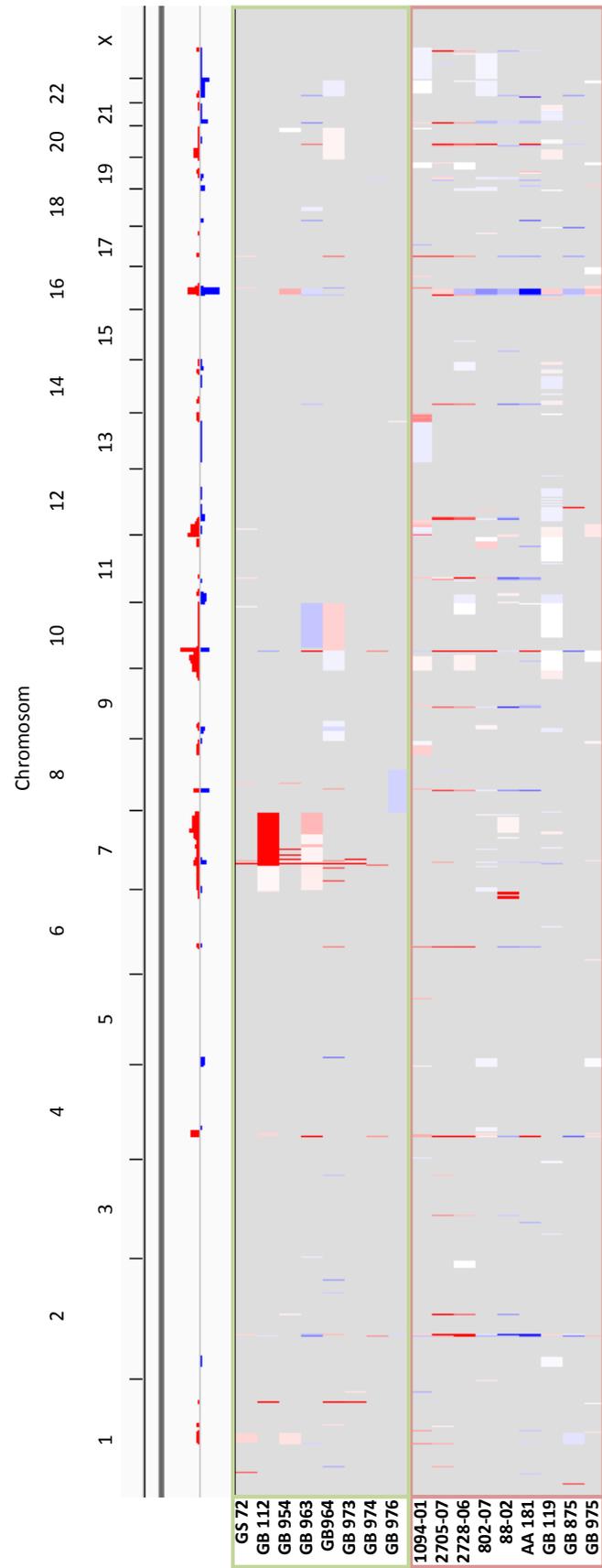


Abbildung 51 Übersicht der CNA. Amplifikationen (rot) und Deletionen (blau) sind im ganzen Genom verteilt. Die meisten CNAs sind in Bereichen von bekannten Polymorphismen zu finden. pGBIV-IDH1^{wt} sind grün markiert, sGBIV-IDH1^{mut} sind rot markiert

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es mittels **Next Generation Sequencing-basierten Technologien** neue epigenetische und genetische Aberrationen in primären und sekundären Glioblastomen zu identifizieren.

Hierzu wurde eine Methode zur Anreicherung subgenomischer Bereiche etabliert, die durch die **MID-Anreicherung** als Multiplexverfahren Verwendung findet und im besonderen die subgenomische DNA-Methylierungsanalyse durch **Bisulfit-Anreicherung** ermöglicht. Mit der Bisulfit-Anreicherung wurde dann eine DNA-Methylierungsanalyse im Glioblastom durchgeführt und hypermethylierte Gene identifiziert.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden mittels **Mate-Pair Sequenzierung** von 18 gepaarten GBIV-Patientenproben Strukturvariationen im GBIV-Genom identifiziert.

4.1 Subgenomische Anreicherung

Trotz immer weiterer Verbesserungen und Optimierungen der Next Generation Sequencing Plattformen bis hin zum Third Generation Sequencing, ist die Sequenzierung ganzer (Epi-) Genome immer noch zeit- und kostenintensiv. Durch die subgenomische Anreicherung wird eine kosten- und zeitsparende Analyse eines spezifischen interessierenden Bereichs des Genoms ermöglicht (Pareek, Smoczynski et al. 2011).

Basierend auf der Grundlage des *NimbleGen Arrays User's Guide: Sequence Capture Array Delivery* von Roche NimbleGen und des Protokolls des *Paired-End Sample Prep Kit* von Illumina wurde ein Protokoll zur Generierung und Anreicherung von DNA-(MID)-Bibliotheken entwickelt. Die durchgeführten Änderungen der Protokolle, und die Gründe warum Änderungen und Erweiterungen durchgeführt wurden sind in Kapitel 3.1 ausführlich beschrieben.

4.1.1 Effizienz der subgenomischen Anreicherung

Sowohl bei der MID-Anreicherung als auch bei der Bisulfit-Anreicherung zeigten sich Schwankungen der Anreicherungswerte sowohl zwischen den einzelnen Regionen als auch zwischen den einzelnen Proben (Abbildung 37, Abbildung 40). Die Schwankungen in den Anreicherungswerten waren bei der MID-Anreicherung jedoch weniger stark ausgeprägt. Eine durchschnittliche Anreicherung von 2200-fach wurde bei der Bisulfit-Anreicherung (Kapitel 3.3) erzielt. Die MID-Anreicherung von 20 MID-Pools ergab eine durchschnittliche Anreicherung von 500-fach. Entscheidend in der subgenomischen Anreicherung ist jedoch nicht allein die Anreicherung, sondern vor allem die Abdeckung, also der Anteil der Reads, der in den Zielregionen liegt. Der Anreicherungsgrad kann aber als Maß dafür dienen, ob mit einer ausreichenden Abdeckung der Zielregionen zu rechnen ist. Der Vergleich der normalisierten Anreicherung mit der normalisierten Abdeckung zeigte, dass im Durchschnitt aller Proben, bei einer höheren Anreicherung auch mit einer höheren Abdeckung zu rechnen ist (Abbildung 43).

Bei der Sequenzierung der angereicherten Proben zeigte sich, dass 99,5 % (MID-Anreicherung) bzw. 99,7 % (Bisulfit-Anreicherung) der Zielregionen angereichert werden konnten, Andere publizierte Studien zeigten ähnliche hohe Anteile (Tabelle 11). Der Anteil der Mapped Reads lag bei 90 % (MID-Anreicherung) bzw. bei 60 % (Bisulfit-Anreicherung) und zeigte sich im Vergleich als überdurchschnittlich hoch (Albert, Molla et al. 2007; Hodges, Xuan et al. 2007; Bau, Schracke et al. 2009; Hodges, Smith et al. 2009; Summerer, Schracke et al. 2010).

Tabelle 11 Vergleich der MID/Bisulfit-Anreicherung mit vorherig publizierten Methoden zur subgenomischen Anreicherung

| Studie | On-Target Rate | Angereicherte Zielregionen | Größe der Zielregion | Mapped Reads | Unique Reads |
|----------------------------------|----------------|----------------------------|----------------------|--------------|--------------|
| (Albert, Molla et al. 2007) | 36-72 % | 98,2 % | 5 Mb | 91 % | N/A |
| (Hodges, Xuan et al. 2007) | 36-55 % | 99,4 % | 6 Mb | N/A | N/A |
| (Bau, Schracke et al. 2009) | 4,5-7 % | 66 % | 185/ 277 Kb | N/A | 92 % |
| (Summerer, Schracke et al. 2010) | N/A | 97,2 % | 1,5 Mb | 51 % | 98 % |
| MID-Anreicherung | 16-47 % | 99,5 % | 2,7 Mb | 90 % | 80 % |
| Bisulfit-Anreicherung* | 36-68 % | 99,7 % | 2,5 Mb | 60 % | 1,5 % |
| (Hodges, Smith et al. 2009)* | 6,5-12 % | 93,9 % | 0,26 Mb | 28 % | N/A |

N/A= keine Abgabe, bzw. lässt sich aus den veröffentlichten Daten nicht ableiten.* Anreicherung in Kombination mit einer Bisulfitbehandlung.

Sowohl bei der MID-Anreicherung als auch bei der Bisulfit-Anreicherung zeigt sich dann aber, dass es sich bei zwischen 20 % (MID-Anreicherung) und 99 % (Bisulfit-Anreicherung) der Reads um Duplikate handelte. Bei Duplikaten handelt es sich um Reads, die ihren Ursprung mit hoher Wahrscheinlichkeit im selben Bibliothek-Fragment haben. Hohe Anteile von Duplikaten entstehen wenn es während der Konstruktion der Sequenzier-Bibliothek zu einer starken Reduktion der DNA-Menge und damit der Vielfalt (Komplexität) der DNA-Fragmente kommt, wie es zum beispiel nach einer chip-basierten Anreicherung der Zielfragmente. Dieser Effekt wird durch die nach der Anreicherung notwendige PCR-Amplifikation noch weiter verstärkt. In der vorliegenden Arbeit wurden Reads als Duplikate gewertet, wenn ihre 5'-Mapping-Positionen identisch waren, auch wenn im Read einzelne Basensubstitutionen (durch Sequenzierungsfehler) vorhanden waren. Die Wahrscheinlichkeit, dass solche Reads von gleichen Ursprungsfragment stammen, ist als höher einzustufen, als die Wahrscheinlichkeit, dass bei der Fragmentierung der gDNA zwei identische Fragmente mit gleichem 5' Ende entstehen, angereichert und sequenziert werden. Reads aus Duplikaten können für die Datenauswertung nicht berücksichtigt werden.

Duplikate dürften nicht nur in dieser Arbeit von Bedeutung sein, sondern in allen Methoden, die mit sehr geringen DNA-Mengen und PCR-Reaktionen arbeiten. Dieses Phänomen ist daher auch bei der reinen Hochdurchsatz-Sequenzierung beobachtet worden. Quail et al. berichteten über eine Duplikat-Rate von bis zu 60 % (Quail, Kozarewa et al. 2008). Vor allem aber sollte bei Methoden zur subgenomischen Anreicherung die Duplikat-Rate nicht außer acht gelassen werden, da hier besonders geringen Mengen DNA amplifiziert werden müssen. In publizierten Studien wird allerdings kaum über Duplikate berichtet (Tabelle 11). In den meisten Publikationen wird zwar über die Anzahl der eindeutig Mapped Reads (*uniquely mapped reads*) berichtet, hierbei ist aber im Kontext von der eindeutigen Mapping-Position im Genom auszugehen; eine klare Definition unterbleibt. Einzig eine Gruppe berichtet explizit, dass es sich bei über 90 % um

Unique Reads handelt. Eine genaue Definition von „unique“ unterbleibt allerdings auch in diesen Fällen (Bau, Schracke et al. 2009; Summerer, Schracke et al. 2010). Die Definition ist insofern von Bedeutung, da Mapping Algorithmen eine bestimmte Anzahl von *Mismatches* pro Read erlauben. Obwohl zwei Reads vom gleichen PCR-Fragment stammen, können sich diese durch Sequenzierfehler in einigen Basen unterscheiden und dann als Unique Reads definiert werden. Hierdurch würde sich auch bei der Bisulfit-Anreicherung der Anteil Unique Reads erhöhen.

Bei der MID-Anreicherung wurde durch Pre-PCR und Post-PCR (Kapitel 3.1.3) eine Duplikat-Rate von nur 20 % erzielt.

Bei Anreicherungen mit NimbleGen Arrays enthält das Eluat nur 10 - 100 pg DNA. Die Bisulfitbehandlung erfolgt bei der Bisulfit-Anreicherung erst nach der Anreicherung. Eine Pre-PCR ist daher nicht möglich. Zusätzlich ist die Bisulfitbehandlung für die DNA sehr strapazios; es kommt zu Strangbrüchen: Der Anteil an amplifizierbarer DNA-Bibliothek wird dadurch noch weiter verringert. Diese Kombination führte aller Wahrscheinlichkeit nach bei der Bisulfit-Anreicherung zur hohen Duplikat-Rate. Hodges et al. führten die Bisulfitbehandlung (gefolgt von einer Amplifikation) vor der Anreicherung durch. Die dadurch hervorgerufene Sequenzänderung in den Zielregionen wurde beim Design des Arrays berücksichtigt. Die Oligos des Anreicherungsarray waren komplementär zur den Bisulfit-konvertierten Sequenzen der Zielregionen, bei denen 100 % Methylierung und 0 % Methylierung angenommen wurde. Hiermit konnte zwar rund 94 % der Zielregionen abgedeckt werden; die On-Target-Rate lag allerdings nur bei 6 - 12 % (Hodges, Smith et al. 2009). Bei der Bisulfit-Anreicherung konnten rund 55 % (36 - 68 %) der Unique Reads in die Zielregion gemapped werden (Tabelle 11).

Aufgrund der hohen Duplikat-Rate ergab sich bei der „DNA-Methylierungsanalyse subgenomischer Bereiche im Glioblastom“ eine rund 9-fache Basenabdeckung bzw. eine rund 6-fache CpG-Abdeckung in den Zielregionen. Dies steht im Gegensatz zur vorangegangenen Anreicherung und Sequenzierung einer Plazenta-DNA-Bibliothek mit einer Duplikat-Rate von 33 % und einer durchschnittlichen Basenabdeckung der Zielregion von 165-fach (Tabelle 2).

Obwohl in Publikationen eine Abdeckung von >5-fach (Smith, Gu et al. 2009) oder >10-fach (Meissner, Mikkelsen et al. 2008) für ausreichend erachtet wird, so liegen heutige Publikationen bei einer >25-fachen Abdeckung (Gu, Bock et al. 2010).

Bei der MID-Anreicherung wurde durch die Zugabe der Blocking-Oligos (Abbildung 34) in 25-fachem Überschuss eine Steigerung der On-Target-Rate von 20 % auf 30 - 45 % erreicht (Tabelle 3). Daraus ergab sich eine durchschnittliche 57-fache Basenabdeckung (Anhang 6.7).

4.1.2 Besonderheiten bei der MID-Anreicherung

Für die MID-Anreicherung ist es essentiell, dass äquimolare Mengen der einzelner DNA-Bibliothek zum Bibliotheken-Pool gemischt werden, nur dann kann eine gleichmäßige Verteilung der Reads auf die einzelnen Patientenproben gewährleistet werden (Abbildung 39). Eine optimale MID-Readverteilung konnte allerdings nicht in allen der 20 MID-Pools verzeichnet werden. Einzelne MIDs waren in den Pools unterrepräsentiert. Dies betraf v.a. die MIDs 5 und 6. Als wahrscheinliche Ursache kommt hier entweder eine schlechte Qualität der Adapter durch

ineffiziente Synthese der Oligos oder ein unzureichendes Annealing zu einsatzbarem Adapter in Betracht. Für den weiteren Gebrauch dieser MIDs sollten diese MID-Adapter neu synthetisiert und validiert werden. Eine MID-sequenzbedingte ineffiziente Amplifikation während Post- oder Pre-PCR wäre ebenfalls denkbar. Für zukünftige Einsätze der der MID-Anreicherung muss in diesem Fall auf MID 5 und MID 6 verzichtet werden.

4.2 DNA-Methylierungsanalyse subgenomischer Bereiche im Glioblastom

4.2.1 Das Methylierungsmuster im Glioblastom

Mittels der in dieser Arbeit etablierten subgenomischer DNA-Methylierungsanalyse wurde das Methylierungsmuster der Promotorregionen des Chromosoms 10q in GBIV untersucht. Ziel war die Identifizierung von Genen, die durch ihre differentielle Methylierung bei der Pathogenese oder Prognose von pGBIV und sGBIV eine Rolle spielen. pGBIV und sGBIV unterscheiden sich insbesondere durch die für sGBIV charakteristische Mutation des *IDH1* Gens. Die Mutation wurde daher als Marker für die Einteilung in pGBIV und sGBIV verwendet (pGBIV-*IDH1*^{wt} bzw. sGBIV-*IDH1*^{mut}).

Aus der DNA von 20 GBIV-Patienten (10 pGBIV-*IDH1*^{wt} / 10 sGBIV-*IDH1*^{mut}) und sechs Normalhirnkontrollen wurden DNA-Bibliotheken erstellt und für die interessierenden Regionen angereichert. Im Mittel konnte eine Anreicherung von 2200-fach der Ziel- und Kontrollregionen der insgesamt 26 Proben erreicht werden. In der Sequenzierung zeigte sich eine hohe Anzahl von Duplikaten. Trotz der hohen Duplikat-Rate konnten dennoch 14.243 CpGs von 14 Proben mit einer mindestens 10-fachen Abdeckung analysiert werden.

Das Unsupervised Clustering nach dem Methylierungsgrad (Abbildung 44) zeigte eine Trennung der einzelnen Gruppen in Normalhirn-Kontrolle, pGBIV-*IDH1*^{wt}, sGBIV-*IDH1*^{mut}. Wobei die sGBIV-*IDH1*^{mut} eine höhere Methylierung im Vergleich zu den pGBIV-*IDH1*^{wt} und Normalhirnkontrollen aufwies. Eine solche Auftrennung von Glioblastomen in verschiedene Untergruppen anhand des Methylierungsmusters bestimmter Gene (*hypermethylator phenotype*, G-CIMP) wurde von Noushmer et al beschrieben; in den meisten Fällen zeigte sich ein G-CIMP in GBIV mit *IDH1* Mutation (Noushmer, Weisenberger et al. 2010). Dabei sind *IDH1*-Status und G-CIMP nicht nur assoziiert, vielmehr ist die *IDH1* Mutation für den Umbau des Methyloms im GBIV verantwortlich (Turcan, Rohle et al. 2012).

Zur Identifizierung differentiell methylierter Gene wurde der Methylierungsstatus der Gene der einzelnen Gruppen miteinander verglichen (Abbildung 45). Dadurch sollten differentiell methylierte Gene im GBIV, in pGBIV-*IDH1*^{wt} und sGBIV-*IDH1*^{mut} identifiziert werden können. Als signifikant ($p < 0,05$) differentiell methyliert wurde dann ein Gen gewertet, wenn der Methylierungsgrad der Vergleichsgruppen eine Mindstdifferenz von 10 % aufwies.

56 Gene konnten als hypermethyliert identifiziert werden; 21 Gene als hypomethyliert. Dabei waren sieben Gene rekurrent in drei der vier Vergleichsgruppen, 33 Gene waren in zwei der Vergleichsgruppen wiederzufinden. Die restlichen 37 Gene waren nur in einem Gruppenvergleich

als differentiell methyliert identifiziert worden (Tabelle 6). In der Vergleichsgruppe „Normalhirn-gegen-IDH1-wt“ wurden keine signifikant differentiell methylierten Gene identifiziert. Eine mögliche Ursache könnte in dem ähnlichen Methylierungsmuster dieser beiden Gruppen liegen (Abbildung 44). Unter die signifikant differentiell methylierten Gene der restlichen Vergleichsgruppen fallen Gene, wie beispielsweise *FGFR2* oder *RASSF4*, die bereits im Neuroblastom bzw. im Neuroblastom und Nasopharynxkarzinom als hypermethyliert identifiziert wurden (Chow, Lo et al. 2004; Lazcoz, Munoz et al. 2007; Djos, Martinsson et al. 2012). Ebenso wurde die Hypermethylierung von *EMX2* im Bronchialkarzinom bereits beschrieben (Okamoto, Hirata et al. 2010). *MGMT*, das man als differentiell methyliert erwartet hätte, wurde nicht gefunden. Als mögliche Ursache ist vor allem die, aufgrund der hohen Duplikat-Rate, nur geringe Anzahl analysierter CpGs anzuführen.

Änderungen im Methylierungsmuster der Promotorregionen von Genen können zur einer Änderung der Expression dieser Gene führen (Jones and Baylin 2002). Die Änderung der Genexpression der als differentiell methyliert gefundenen Gene wurde daher als direkt messbare Größe zur Identifizierung von Kandidatengenen eingesetzt. Zur Identifizierung differentiell methylierter und exprimierter Gene konnte auf das große Patientenkollektiv der Datenbanken R2 und Rembrandt (Tabelle 2.1.11), den umfangreichen Daten von Noushmer et al. (Noushmer, Weisenberger et al. 2010) sowie den unpublizierten Microarray Expression Profiling-Daten von Dr. Martje Tönjes zurückgegriffen werden.

Aus dem Vergleich der differentiell methylierten Gene mit den Expressionsdaten ergaben sich die hypermethylierten und herunterregulierten Kandidatengene *DKK1*, *GSTO2*, *KCNMA1*, *OGDHL*, *HHEX*, *ZMIZ1*, *SEC31B*, *RASGEF1A*. Die Validierung der Methylierung der Kandidatengene mittels MassARRAY® konnte eine differentielle Methylierung der Gene *DKK1*, *KCNMA1*, *RASGEF1A* und *SEC31B* für den Vergleich der Gruppen pGBIV-IDH1^{wt} und sGBIV-IDH1^{mut} bestätigen. Das Kandidatengen *KCNMA1* wurde allerdings bei der subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse nicht in diesem Gruppenvergleich als differentiell methyliert identifiziert.

Bestätigt werden konnte ebenso die Aufteilung der Proben in pGBIV-IDH1^{wt} und sGBIV-IDH1^{mut} anhand des Methylierungsmusters (Abbildung 47).

Trotz der geringen Abdeckung der analysierten CpGs war es möglich mit der Bisulfit-Anreicherung differentiell methylierte Gene zu identifizieren und das aberrante Methylierungsmuster mit einer unabhängigen Methode zu validieren.

4.2.1.1 Genexpression und Promotormethylierung zur Identifizierung von Kandidatengenen

Zu den Veränderungen der DNA-Methylierung in Krebs zählen Hypomethylierung sowie Hypermethylierung, durch die es zu veränderter Genexpression von Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen kommen kann (Jones and Baylin 2002). Die meisten Studien zur DNA-Methylierung, wie auch diese Arbeit, konzentrierten sich dabei auf die Untersuchung von Promotorregionen und den Zusammenhang zwischen aberranter Methylierung und Genexpression. Neuere Publikationen zeigen jedoch, dass krebsspezifische Veränderungen der DNA-Methylierung nicht nur in Promotorregionen oder CGI, sondern v.a. auch in den Regionen

der „CpG island-shores“, oder auch in intragenischen Bereichen („gene body“) beobachtet wird; Veränderungen der DNA-Methylierung dieser Regionen regulierend die Genexpression (Irizarry, Ladd-Acosta et al. 2009; Maunakea, Nagarajan et al. 2010).

4.2.2 Die validierten Kandidatengene und ihr Einfluss auf das Gesamtüberleben

Derzeit sind nur wenige Biomarker für die Prognose oder Therapie-Response von primären oder sekundäre Glioblastomen im Einsatz (Riemenschneider, Jeuken et al. 2010). Zur Überprüfung, ob die differentiell methylierten Gene als prognostischer Marker Verwendung finden können, wurden Überlebenszeitanalysen in Form von Kaplan-Meier-Plots erstellt. Hierfür wurde die Expression der Kandidatengene *DKK1*, *SEC31B*, *KCNMA1* und *RASGEF1A* mit der Gesamtüberlebensdauer korreliert.

Die Kaplan-Meier-Plots wurden mit den Datenbanken R2 und Rembrandt erstellt. Hier sind die u.a. die Daten des „The Cancer Genome Atlas“-Konsortiums (TCGA) hinterlegt (The Cancer Genome Atlas 2008; Verhaak, Hoadley et al. 2010). R2, unterscheidet allerdings nicht zwischen pGBIV und sGBIV, noch ist der *IDH1*-Status der Patienten hinterlegt. Kaplan-Meier-Plots konnten daher nur für GBIV-Patienten generell erstellt werden. In rund 90 % der GBIV -Fälle handelt es sich um pGBIV; in den Datenbanken sollten daher pGBIV ohne *IDH1* Mutation (pGBIV-*IDH1*^{wt}) stark überrepräsentiert sein und es kann angenommen werden, dass die angegebenen Gesamtüberlebenszeiten die der pGBIV-*IDH1*^{wt} Patienten gut widerspiegeln.

4.2.2.1 *DKK1*

DKK1 wurde in der subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse als signifikant hypermethyliert identifiziert (Tabelle 6). Die Hypermethylierung von sGBIV-*IDH1*^{mut} konnte durch den MassARRAY® validiert werden (Abbildung 47, Anhang 6.11) und eine umgekehrt proportionale Verminderung der Expression war mit hypermethyliertem *DKK1* assoziiert. GBIV-Patienten, mit geringer *DKK1*-Expression wiesen eine signifikant ($p < 0,05$) verkürzte Überlebensdauer auf (Abbildung 48).

Die Dickkopf (DKK)-Familie mit den Mitgliedern *DKK1*, *DKK2*, *DKK3* und *DKK4* (Krupnik, Sharp et al. 1999) sind Antagonisten des Wnt-Signalweges (Shou, Ali-Osman et al. 2002; Niida, Hiroko et al. 2004). Dkk bindet an den LRP-Rezeptor, vermittelt so die Interanlisierung in die Zelle und verhindert damit ein Andocken von Wnt (Logan and Nusse 2004; Niehrs 2006). Der Wnt-Signalweg ist in vielen Krebsentitäten von entscheidender Bedeutung (Morin, Sparks et al. 1997; Aguilera, Fraga et al. 2006; Polakis 2007; Qian, Xie et al. 2007; Klaus and Birchmeier 2008). Auch in der Pathogenese des Glioblastoms nimmt der Wnt-Signalweg eine bedeutende Rolle ein (Palos, Zheng et al. 1999) und wurde im Zusammenhang mit Proliferation (Pulvirenti, Van Der Heijden et al. 2011), Differenzierung (Sato and Kuroda 2000) und Invasion (Roth, Wild-Bode et al. 2000) beschrieben. Die Expression von Wnt1 ist in GBIV erhöht und stellt für GBIV-Patienten ein prognostischer Faktor dar (Liu, Tu et al. 2011). Ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhter Wnt-Expression, einer Zunahme von Proliferation und erhöhten Aggressivität der Tumore wurde beschrieben (Yu, Jun et al. 2007; Pu, Zhang et al. 2009). Eine Inaktivierung des Wnt-Antagonisten

DKK1 könnte demnach ein zusätzlicher Mechanismus sein, Wnt-vermittelte Proliferation, Differenzierung und Invasion in GBIV zu gewährleisten. Als Mechanismus zur Inaktivierung wurde die Promotorhypermethylierung vermutet, aber nicht gezeigt. Eine epigenetische Regulierung des TSG *DKK1* wurde bereits im kolorektalen Karzinom, sowie im Medulloblastom beschrieben (Aguilera, Fraga et al. 2006; Vibhakar, Foltz et al. 2007).

Eine Hypermethylierung von *DKK1* in sGBIV im Vergleich zu pGBIV wurde ebenfalls von Gotze et al gezeigt. Jedoch konnte in dieser Studie kein Einfluss der Methylierung auf den Expression von *DKK1* nachgewiesen werden. (Gotze, Wolter et al. 2010). Die verminderte Expression von *DKK1* scheint auf die Hypermethylierung der Promotorregion zurückzuführen zu sein.

4.2.2.2 *SEC31B*

Mittels subgenomischer DNA-Methylierungsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Promotorregion von *SEC31B* im Vergleich Normalhirn-gegen-Tumor, Normalhirn-gegen-sGBIV-*IDH1*^{mut} und pGBIV-*IDH1*^{wt}-gegen-sGBIV-*IDH1*^{mut} hypermethyliert ist (Tabelle 6). Eine Bestätigung der statistisch signifikanten Hypermethylierung zeigte sich beim MassARRAY® zwischen pGBIV-*IDH1*^{wt} und sGBIV-*IDH1*^{mut} (Abbildung 47, Anhang 6.11). Die verminderte Expression von *SEC31B* korreliert signifikant mit einer besseren Prognose von GBIV-Patienten und von AII/AIII-Patienten ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$).

Über *SEC31B* ist derzeit nur wenig bekannt, es handelt sich um orthologes Gen von *Sec31p* aus *S.cerevisiae*. *Sec31p* ist Teil des COPII-Vesikels (coat protein complex II), das am retrograden Transport von Golgi zu ER verantwortlich sind. Unterschiedliche Isoformen des Proteins Sec31 sind an der Auswahl der zu transportierenden Proteine beteiligt (Tang, Zhang et al. 2000; Stankewich, Stabach et al. 2006). Inwiefern die Hypermethylierung und die damit einhergehende verminderte Expression dieses Proteins bei der Pathogenese und Prognose bei GBIV eine Rolle spielt könnte aufgrund der begrenzten Informationen zur Funktion von *SEC31B* nur spekuliert werden.

4.2.2.3 *KCNMA1*

KCNMA1 wurde bei der subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse als differentiell methyliert in GBIV und insbesondere in sGBIV-*IDH1*^{mut} im Vergleich zur Normalhirnkontrolle identifiziert (Tabelle 6). Im MassARRAY® konnte eine Hypermethylierung von *KCNMA1* im Vergleich pGBIV-*IDH1*^{wt} bestätigt werden (Abbildung 47, Anhang 6.11). Eine Hypermethylierung von *KCNMA1* ist mit einer verminderten Expression des Gens assoziiert und korreliert signifikant ($p < 0,05$) mit einer schlechteren Prognose von GBIV-Patienten (Abbildung 48).

KCNMA1 codiert für die α -Untereinheit der Calcium-aktivierten Kaliumkanäle (BK_{Ca} Kanal). BK_{Ca} Kanäle besitzen sechs konservierte Transmembrandomänen (S1-S6) und eine siebte Transmembrandomäne (S0). Die Aktivierung der BK_{Ca} Kanäle geschieht durch den cytosolischen Ca₂₊-Anstieg oder durch Membrandepolarisation. BK_{Ca} Kanäle werden in nicht erregbaren Zellen u.a. auch in Gliomazellen exprimiert; Gliomazellen weisen eine exklusive Isoform - gBK - auf.

BK_{Ca} Kanäle sind in Prozesse, wie die Regulation der Osmose, Zellproliferation und Zellmigration, involviert (Debska-Vielhaber, Godlewski et al. 2009). Einige Studien zeigten eine Überexpression von *KCNMA1* in GBIV und AIII, die proportional zum Malignitätsgrad ist. BK_{Ca} Kanäle könnten daher einen Beitrag zum aggressiven Verhalten (Proliferation und Migration) von Gliomazellen beitragen (Ransom and Sontheimer 2001; Weaver, Bomben et al. 2006). Andere Untersuchungen hingegen konnten antitumorigene Eigenschaften der BK_{Ca} Kanäle nachweisen (Cambien, Rezzonico et al. 2008; Han, Xi et al. 2008). Die Inaktivierung von *KCNMA1* könnte demnach zu einer verstärkten Proliferation und Migration von Gliomazellen beitragen.

4.2.2.4 *RASGEF1A*

RASGEF1A konnte bei der subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse als hypermethyliert in sGBIV-*IDH1*^{mut} im Vergleich zu Normalhirn und pGBIV-*IDH1*^{wt} identifiziert werden (Tabelle 6) und wurde beim MassARRAY® als hypermethyliert bestätigt (Abbildung 47, Anhang 6.8). Die Hypermethylierung ist mit einer verminderten Expression von *RASGEF1A* assoziiert.

RASGEF1A codiert für einen GTP-Austauschfaktor (Guanine nucleotide exchange factor, GEF) der kleinen GTPasen (Ras-Superfamilie). Solche GEFs katalysieren den Austausch von GDP zu GTP der GTPasen und wirken aktivierend auf die GTPase.

In den Datenbanken R2 und Rembrandt waren für *RASGEF1A* keine Überlebensraten von GBIV-Patienten hinterlegt. Damit konnte für *RASGEF1A* auch keine Überlebenszeitanalyse durchgeführt werden. RasGEF1A katalysiert jedoch exklusiv den GDP-Austausch von Rap2A (Yaman, Gasper et al. 2009). Rap2A ist eine GTPase der Ras-Familie (Wennerberg, Rossman et al. 2005). Für andere prominente Mitglieder der Ras-Familie, wie H-Ras, R-Ras oder RalB konnte keine GEF-Aktivität von RasGEF1A nachgewiesen werden (Yaman, Gasper et al. 2009).

Durch die verminderte Expression von *RASGEF1A*, sollte es, aufgrund der verringerten GEF-Aktivität, zu einer reduzierten Aktivität von Rap2A kommen. Daher wurde angenommen, dass die verringerte Rap2A-Aktivität mit einer verminderten Expression von *RAP2A* näherungsweise gleichzusetzen ist. Eine verminderte Expression von *RAP2A* korreliert signifikant mit einem schlechteren Gesamtüberleben von GBIV-Patienten.

Der Ras-Signalweg spielt - nicht nur im GBIV - eine kritische Rolle in der Onkogenese. Ras-Proteine dienen als Knotenpunkte in der Signaltransduktion. Aktivierte Ras-Proteine interagieren mit zahlreichen katalytisch unterschiedlichen Effektormolekülen und kontrollieren Genexpression, Proliferation und Differenzierung (Colicelli 2004). Andere Proteine der Ras-Familie, u.a. R-Ras, Ral und auch Rap sind ebenfalls an der Regulation der Signaltransduktion beteiligt. Obwohl sie eine hohe biochemische Ähnlichkeit zu den Ras-Proteinen besitzen, fungieren einige von ihnen als Tumorsuppressorgene und nicht als Onkogene (Colicelli 2004). (Wennerberg, Rossman et al. 2005) Rap2A bindet viele der Ras-Effektormoleküle und wirkt inhibierend auf die durch Ras induzierte Raf-Aktivierung (Nancy, Wolthuis et al. 1999; Ohba, Mochizuki et al. 2000)

Der Ras-Signalweg über EGFR, ERBB2, PDGFR und MET (Abbildung 10) ist in GBIV nachhaltig aktiviert; es kommt zu andauernder Proliferation und Zellwachstum. Durch die Inaktivierung von *RASGEF1A* durch Promotorhypermethylierung, gefolgt von einer verringerten Rap2A-Aktivität

könnte die Tumorzelle einen Selektionsvorteil erlangen („clonal evolution“ (Nowell 1976), vgl. Kapitel 1.1).

4.3 Detektion von Strukturvariationen

Die Detektion von Amplifikationen und Deletionen erfolgte mittels Mate-Pair (MP) Sequenzierung. 36 MP-Bibliotheken aus DNA von 18 Patienten wurden generiert und sequenziert. Rekurrente SV wurden sowohl in primären GBIV als auch in sekundären GBIV identifiziert (Tabelle 10).

Eine ganze Reihe von Amplifikationen und Deletionen (Tabelle 12) ist bereits in Glioblastomen beschrieben worden (Holland 2001; Zhu and Parada 2002; Hill, Hunter et al. 2003; Soni, King et al. 2005; Ernst, Hofmann et al. 2009; Rao, Edwards et al. 2010).

Tabelle 12 Bekannte amplifizierte und deletierte Bereich mit GBIV-assoziierten Genen (Rao, Edwards et al. 2010; Verhaak, Hoadley et al. 2010)

| Amplifikationen | | | Deletionen | | | |
|-----------------|---------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Bande | Gen | Häufigkeit | Bande | Gen | Häufigkeit | |
| | | pGBIV- <i>IDH1</i> ^{wt} | sGBIV- <i>IDH1</i> ^{mut} | | pGBIV- <i>IDH1</i> ^{wt} | sGBIV- <i>IDH1</i> ^{mut} |
| 7q11.2-12.1 | <i>EGFR</i> | 36 % | 9p11.1-24.3 | <i>CDKN2A/B</i> | 46 % | |
| 12q13-14.1 | <i>CDK4</i> | 13 % | 10q11.2-q26.3 | <i>PTEN</i> | 85 % | |
| 12q14.2-24 | <i>MDM2</i> | 9 % | 13q.2-33.1 | <i>RB1</i> | 6 % | |
| 1q21-q44 | <i>MDM4</i> | 8 % | 17p11.2-13.2 | <i>TP53</i> | 2 % | |
| 4q11-35.2 | <i>PDGFR</i> | 8 % | | | | |
| 1q21-q44 | <i>PI(3)K</i> | 8 % | | | | |
| 7q11.2-36.3 | <i>MET</i> | 4 % | | | | |
| 7q21.1-22 | <i>CDK6</i> | 2 % | | | | |
| 8q24.21 | <i>MYC</i> | 2 % | | | | |

Von den in Tabelle 12 dargestellten Amplifikationen konnten bei der Mate-Pair Sequenzierung nur *EGFR* und *PDGFRA* identifiziert werden. Von den beschriebenen Deletionen konnte keine identifiziert werden. Bei einer kleinen Probenanzahl (n=17: pGBIV-*IDH1*^{wt} = 8, sGBIV-*IDH1*^{mut} = 9) können aus statistischen Gründen die selten vorkommenden SV nicht detektiert werden. Verstärkt wird dieser Sachverhalt, dass einige der o.g. SV nicht in sGBIV identifiziert werden können oder seltener auftreten, so ist beispielsweise eine *EGFR*-Amplifikationen in nur knapp 10 % der sGBIV beschrieben worden (Ohgaki and Kleihues 2007; Parsons, Jones et al. 2008).

Die Amplifikation in der Bande 20q11.21, identifiziert in 4 sGBIV-*IDH1*^{mut} und 1 pGBIV-*IDH1*^{wt}, umfasst die Gene *COX4I2*, *BCL2L1* sowie *TPX2*. *BCL2L1* gehört zur Bcl-2 Protein-Familie. Diese Proteine fungieren als apoptische Regulatoren. *BCL2L1* kommt in zwei Splicevarianten vor von denen die kürzere als Apoptose-Aktivator, die längere als Apoptose-Inhibitor fungiert (Kim 2005; Terrano, Upreti et al. 2010; Wang, Beauchemin et al. 2011). Alle drei Gene *COX4I2*, *BCL2L1*, *TPX2* wurden im Bronchialkarzinom als potentielle Onkogene und als amplifiziert beschrieben (Tonon, Wong et al. 2005). Die Deletion in den Banden 1p36.32-36.33 betraf exklusiv der Bereich des

Gen *TTC34* und wurde ausschließlich in sGBIV-*IDH1*^{mut} identifiziert. Zu diesem Gen sind keine Annotationen vorhanden.

Trotz der Detektion einiger SV bleibt die Anzahl an identifizierten SV hinter den Erwartungen zurück. Die Detektion von Strukturvariationen erfolgt über die Mapping-Position der Paired-End Reads (Vgl. Kapitel 2.2.11). Entscheidend bei der Datenanalyse ist nicht die Abdeckung der einzelnen sequenzierten Basen, sondern die *Spanning-Coverage* (Abbildung 52).

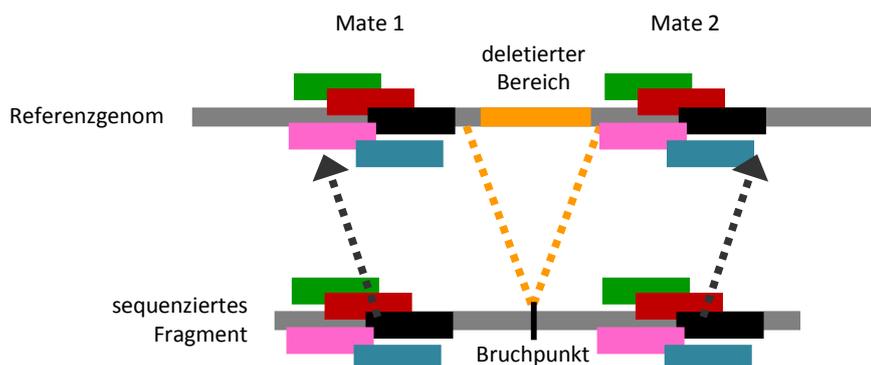


Abbildung 52 Spanning Coverage. Die zwei Mates eines Paired-End Reads überspannen den Bruchpunkt der Deletion. Das Gleiche gilt auch für Amplifikationen.

In vielen Proben konnte keine ausreichende Spanning-Coverage für detektierte SV erzielt werden. Als Gründe hierfür sind anzuführen: (1) Rund 40 Mio. Reads wurde pro sequenzierter Lane erzielt. Auch hier handelte es bei knapp 30 % der Reads um Duplikate. (2) Die Auswertung der Sequenzdaten zeigte eine hohe Anzahl (4 Mio. Reads) von PE-Reads, bei denen die Mates auf zwei unterschiedlichen Chromosomen liegen. Bei solchen Reads handelt es sich entweder um intrachromosomale Translokationen oder um sogenannte Chimären. Intrachromosomale Translokationen sind ein seltenes Ereignis im menschlichen Genom (Ou, Stankiewicz et al. 2011). Bei den 4 Mio. Reads deren Mates auf unterschiedlichen Chromosomen liegen handelt es sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit um Chimären. Chimären entstehen, wenn bei der Zirkularisierung zwei Fragmente von unterschiedlichen Chromosomen ein zirkuläres Fragment bilden. Reads, die auf Chimärenbildung zurückzuführen sind können bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden, da es sich um präparative Artefakte handelt. (3) Bei rund 10 % aller Reads handelt es sich um Singletons, d.h. ein Mapping des zweiten Mates war nicht möglich (Sequenzierfehler, keine eindeutige Mappingposition) oder er war nicht vorhanden.

(4) Als Insertgröße der MP-Bibliotheken wurde ein Bereich von rund 3 kb gewählt. Die tatsächliche Insertgröße der MP-Bibliothek lässt sich anhand der Mappingpositionen der Mates berechnen. 45 % der MP-Bibliotheken wiesen eine Insertgröße der erwartenden ca. 3 kb auf. Hierbei handelt es sich um sog. „Outies“ (Abbildung 53). In rund 55 % der MP-Bibliotheken lag die Insertgröße bei ca. 400 bp (Tabelle 9). Diese sog. „Innies“ entstehen durch unzureichende Trennung von Fragmenten mit und ohne Biotin-Markierung. „Innies“ liefern keine Information über Strukturvariationen und müssen daher verworfen werden.

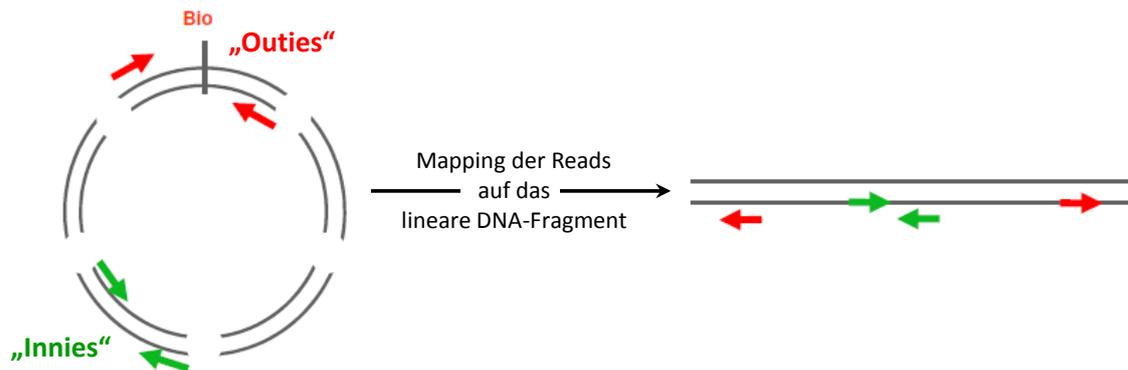


Abbildung 53 Entstehung der „Innies“ und „Outies“. Innie-Reads (grün) mappen im Genom mit einer zugewandten Orientierung und einer Abstand von rund 300-500 bp. Outie-Reads (rot) mappen im Genom mit einer entgegengesetzten Orientierung und einem Abstand von rund 3000 bp.

5 Schlussbemerkung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden mittels *Next Generation Sequencing* Technologien das Glioblastom auf epigenetische und strukturelle Veränderung hin untersucht. Neue und bereits beschriebene strukturelle Veränderungen konnten identifiziert werden. Zur Klärung inwieweit die amplifizierten Gene *COX4I2*, *BCL2L1* und *TPX2*, sowie das deletierte Gen *TTC34* bei der Pathogenese des GBIV (v.a. in sGBIV-*IDH1*^{mut}) eine Rolle spielen müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Zur Untersuchung des Methylierungsmusters der Promotorregionen von Chromosom 10q wurde die subgenomische Bisulfit-Anreicherung entwickelt. Diese Methode erlaubt die punktgenaue Analyse des Methylierungsstatus einzelner CpGs von (nicht-zusammenhängenden) Zielregionen. Die Gene *DKK1*, *SEC31B*, *KCNMA1* und *RASGEF1A* als hypermethyliert identifiziert und mit einer unabhängigen Methode validiert werden. Eine verringerte Expression dieser Gene steht im Zusammenhang mit einer schlechteren Prognose von GBIV-Patienten. Weiterführende Studien könnten die Frage klären, ob die verminderte Expression durch die Hypermethylierung der Gene verursacht ist. In diesem Zusammenhang sollten auch grundlegende Überlegungen über die bei Methylierungsanalysen zu untersuchenden Regionen angestellt werden.

Eine funktionelle Charakterisierung, v.a. der wenig beschriebenen Gene *SEC31B* und *RASGEF1A*, sowie das genaue Zusammenspiel von *RASGEF1A* und Rap2A könnte zur Aufklärung deren Rolle bei der Pathogenese des GBIV beitragen.

6 Anhang

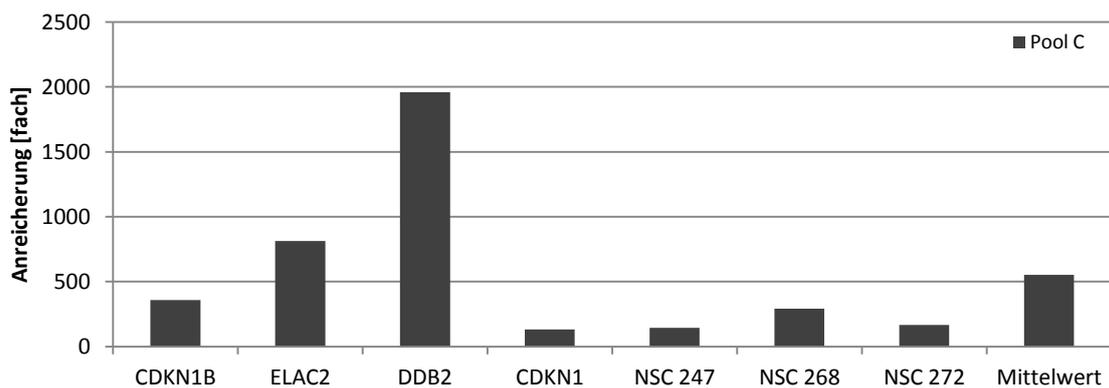
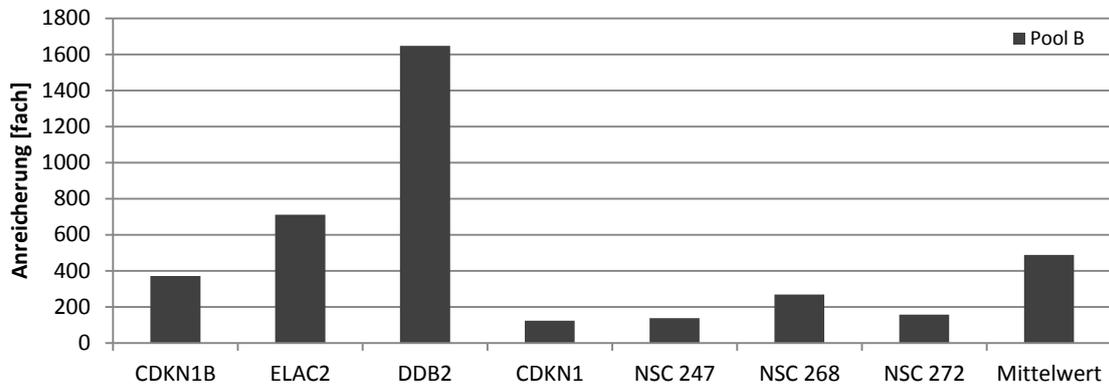
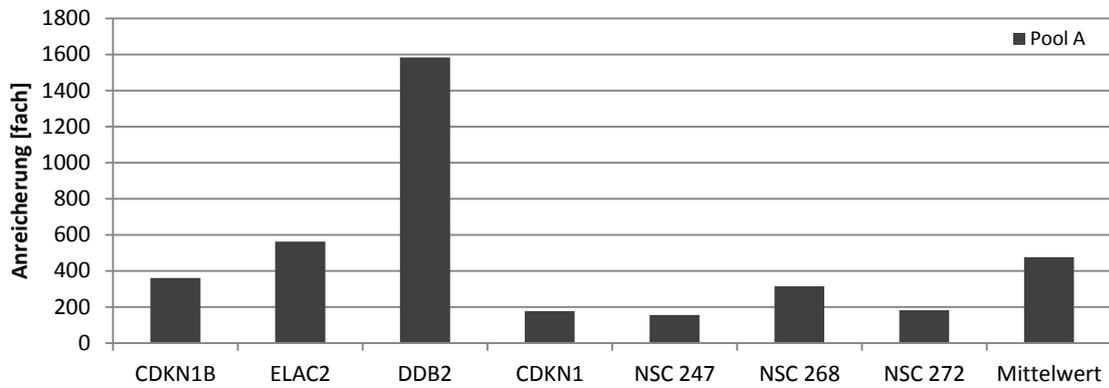
6.1 DNA-Bibliotheken der subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse

| Name | DNA-Bibliothek [ng/ μ l] | NC [ng/ μ l] | C [ng/ μ l] | C BIS [ng/ μ l] | PCR-Zyklen |
|-----------|---------------------------------|---------------------|--------------------|------------------------|------------|
| NB Pool 0 | 131 | 201 | 305 | 67 | 30 |
| GB 112 | 134 | 246 | 129 | 32 | 25 |
| GB 949 | 151 | 189 | 153 | 37 | 30 |
| GB 963 | 183 | 143 | 157 | 30 | 30 |
| GB 964 | 151 | 193 | 196 | 82 | 30 |
| GB 971 | 233 | 140 | 124 | 84 | 30 |
| GB 973 | 173 | 125 | 181 | 93 | 30 |
| GB 974 | 174 | 187 | 70 | 8 | 30 |
| GB 976 | 215 | 140 | 128 | 19 | 27 |
| GB 978 | 200 | 166 | 143 | 30 | 27 |
| GB 954 | 144 | 182 | 156 | 44 | 27 |
| GB 875 | 135 | 173 | 108 | 51 | 28 |
| GB 975 | 179 | 228 | 194 | 30 | 25 |
| AA 181 | 154 | 225 | 197 | 39 | 25 |
| 2705-07 | 157 | 217 | 153 | 70 | 27 |
| 802-07 | 151 | 204 | 170 | 76 | 27 |
| 2728-06 | 148 | 219 | 205 | 89 | 27 |
| 85-03 | 119 | 232 | 209 | 90 | 27 |
| 88-02 | 153 | 281 | 167 | 78 | 27 |
| 161-01 | 132 | 190 | 26 | 28 | 30 |
| 1094-01 | 161 | 200 | 159 | 59 | 30 |
| GB 119 | 166 | 122 | 35 | 34 | 30 |
| NB Pool 1 | 116 | 235 | 146 | 80 | 27 |
| NB Pool 2 | 108 | 186 | 126 | 57 | 27 |
| NB Pool 3 | 147 | 181 | 134 | 61 | 27 |
| NB Pool 4 | 124 | 315 | 19 | 12 | 30 |
| NB Pool 5 | 141 | 144 | 41 | 27 | 30 |

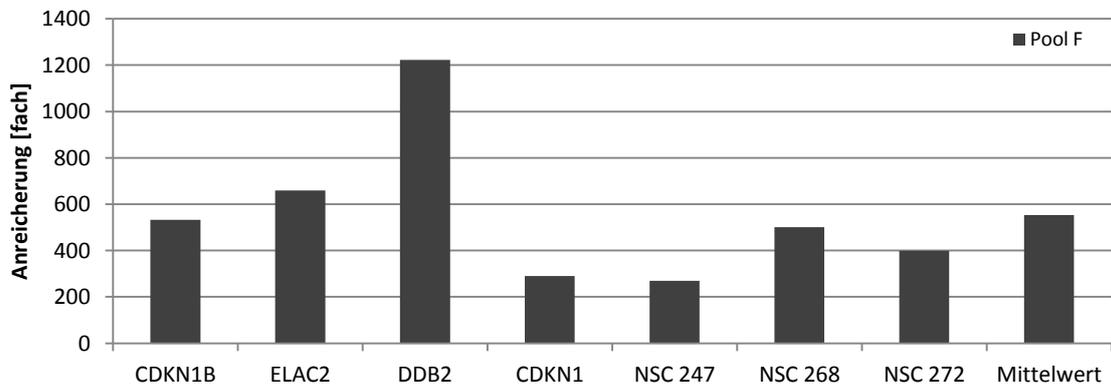
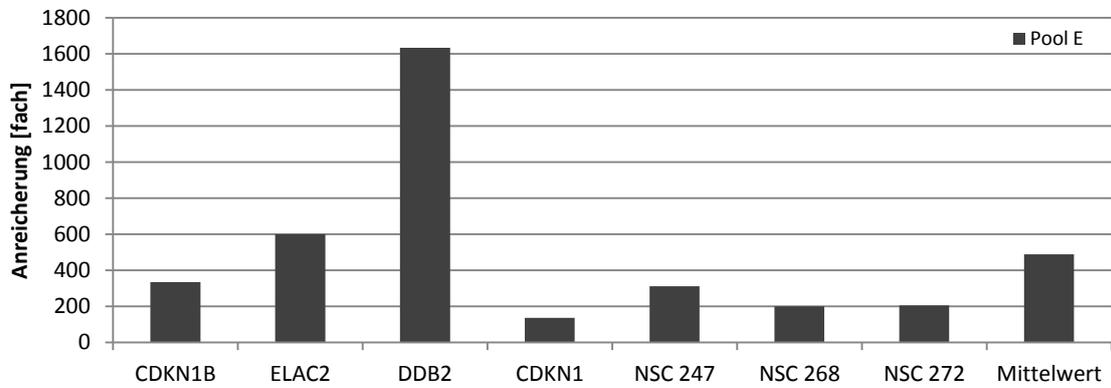
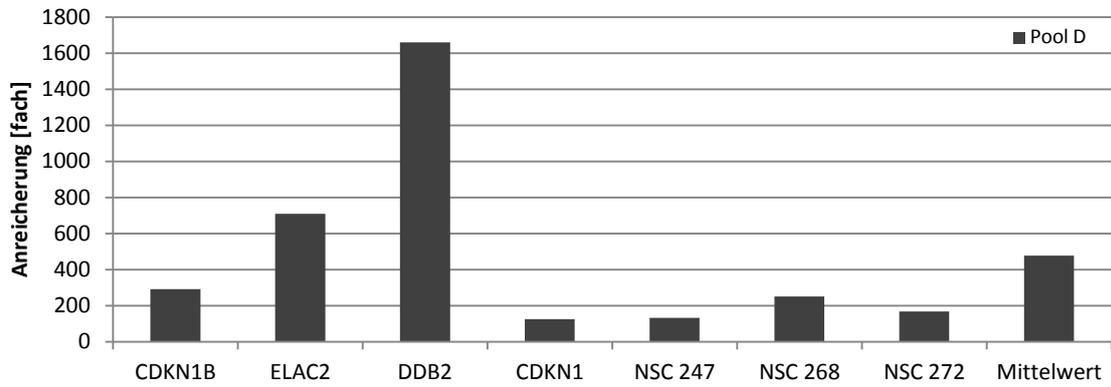
6.2 Übersicht über die Anreicherungswerte der einzelnen Regionen der MID-Pools A-T

| Name | Zielregion | | | | | Kontrollregion | | | | Nicht-Zielregion | | |
|---------------|------------|-------|------|-------|------------|----------------|---------|---------|------------|------------------|------|------------|
| | CDKN1B | ELAC2 | DDB2 | CDKN1 | Mittelwert | NSC 247 | NSC 268 | NSC 272 | Mittelwert | KCNE1 | MCM5 | Gesamt |
| Pool A | 361 | 562 | 1585 | 176 | 671 | 156 | 314 | 181 | 217 | 0 | 0 | 476 |
| Pool B | 372 | 711 | 1648 | 124 | 714 | 137 | 268 | 157 | 188 | 0 | 0 | 488 |
| Pool C | 358 | 813 | 1960 | 131 | 816 | 145 | 293 | 167 | 202 | 0 | 0 | 552 |
| Pool D | 292 | 709 | 1660 | 126 | 697 | 132 | 251 | 168 | 184 | 0 | 0 | 477 |
| Pool E | 335 | 600 | 1633 | 135 | 651 | 312 | 199 | 204 | 225 | 0 | 0 | 488 |
| Pool F | 533 | 659 | 1223 | 290 | 1068 | 270 | 501 | 399 | 390 | 0 | 0 | 554 |
| Pool G | 230 | 288 | 2521 | 139 | 388 | 91 | 203 | 105 | 133 | 0 | 0 | 511 |
| Pool H | 231 | 590 | 1213 | 607 | 642 | 89 | 209 | 137 | 145 | 0 | 0 | 439 |
| Pool I | 255 | 503 | 1095 | 165 | 504 | 120 | 235 | 134 | 163 | 0 | 0 | 358 |
| Pool J | 350 | 556 | 1734 | 216 | 722 | 180 | 335 | 227 | 248 | 0 | 0 | 514 |
| Pool K | 240 | 355 | 1300 | 101 | 468 | 117 | 219 | 117 | 151 | 0 | 0 | 350 |
| Pool L | 346 | 571 | 1734 | 430 | 770 | 191 | 326 | 207 | 242 | 0 | 0 | 544 |
| Pool M | 279 | 522 | 1559 | 141 | 600 | 132 | 244 | 169 | 182 | 0 | 0 | 435 |
| Pool N | 359 | 739 | 1775 | 358 | 808 | 127 | 290 | 263 | 226 | 0 | 0 | 559 |
| Pool O | 279 | 545 | 1545 | 124 | 623 | 121 | 236 | 125 | 160 | 0 | 0 | 425 |
| Pool P | 352 | 721 | 1942 | 175 | 797 | 134 | 282 | 151 | 189 | 0 | 0 | 537 |
| Pool Q | 435 | 1060 | 2492 | 164 | 1038 | 167 | 356 | 204 | 242 | 0 | 0 | 697 |
| Pool R | 506 | 975 | 1680 | 188 | 1143 | 203 | 417 | 255 | 292 | 0 | 0 | 603 |
| Pool S | 290 | 517 | 1345 | 132 | 546 | 117 | 215 | 107 | 146 | 0 | 0 | 389 |
| Pool T | 282 | 774 | 1570 | 136 | 665 | 128 | 141 | 143 | 137 | 0 | 0 | 453 |
| Mittelwert | 334 | 638 | 1660 | 202 | 716 | 153 | 276 | 181 | 203 | 0 | 0 | |
| Gesamt | | | | | | | | | | | | 485 |

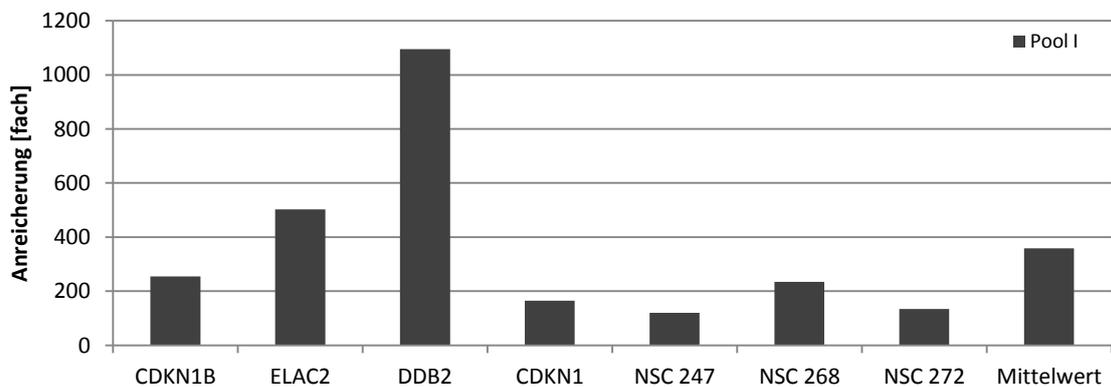
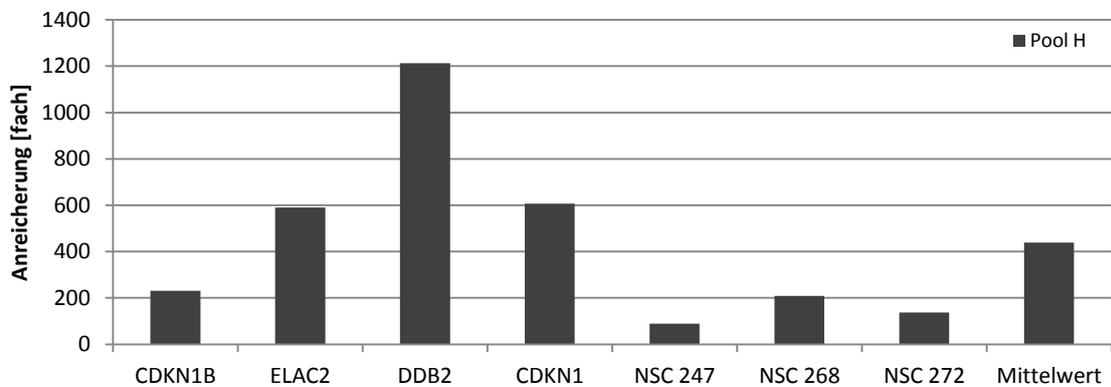
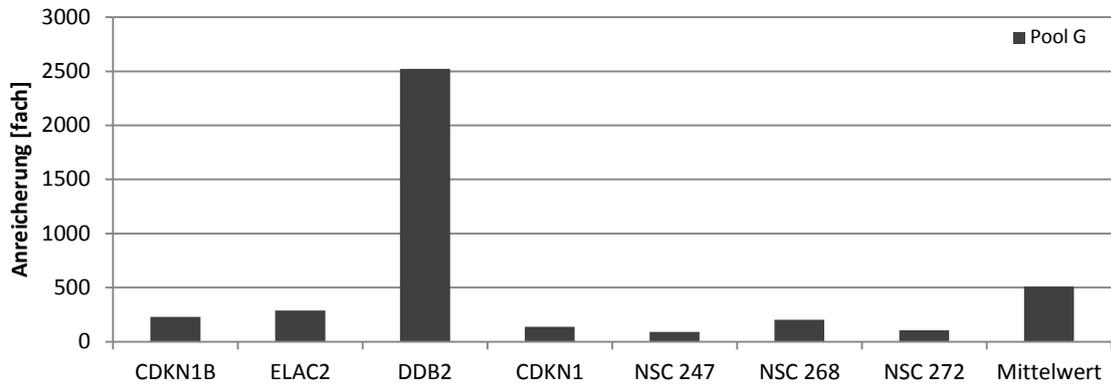
6.3 Darstellung der Anreicherungswerte der MID-Pools nach Regionen



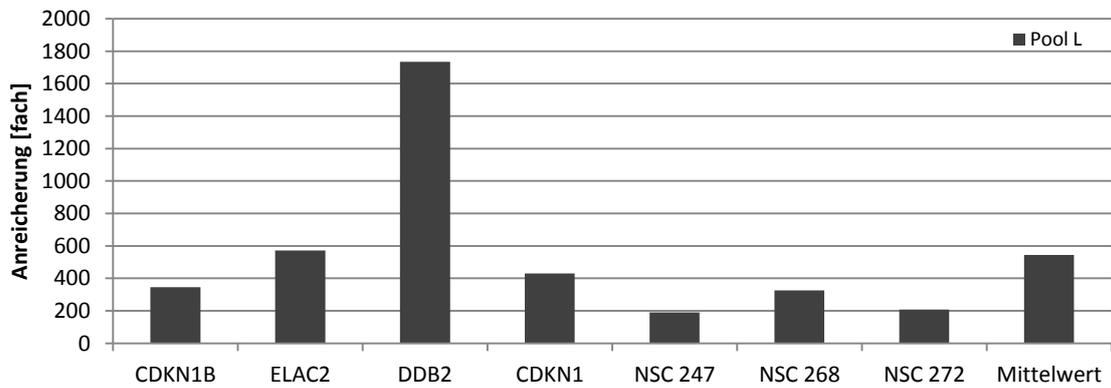
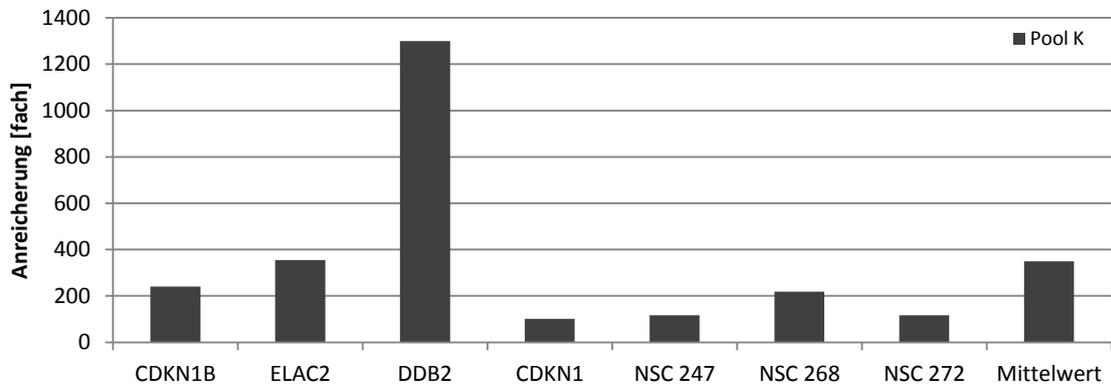
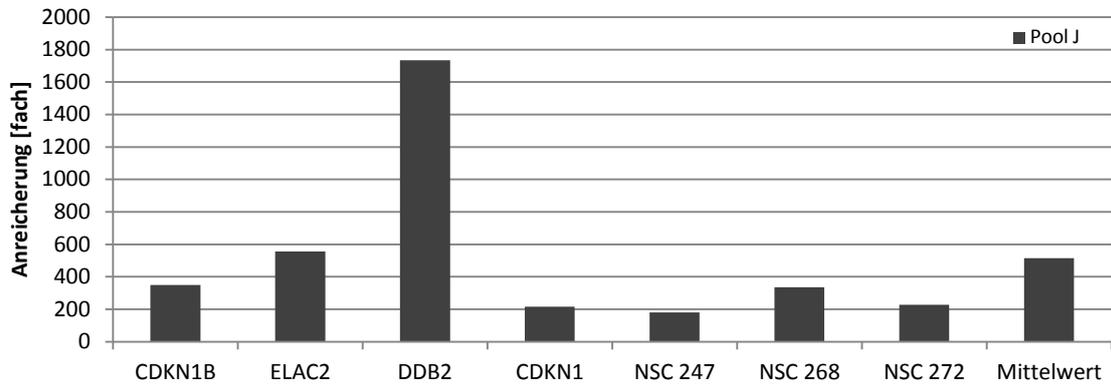
Fortsetzung Anhang 6.3



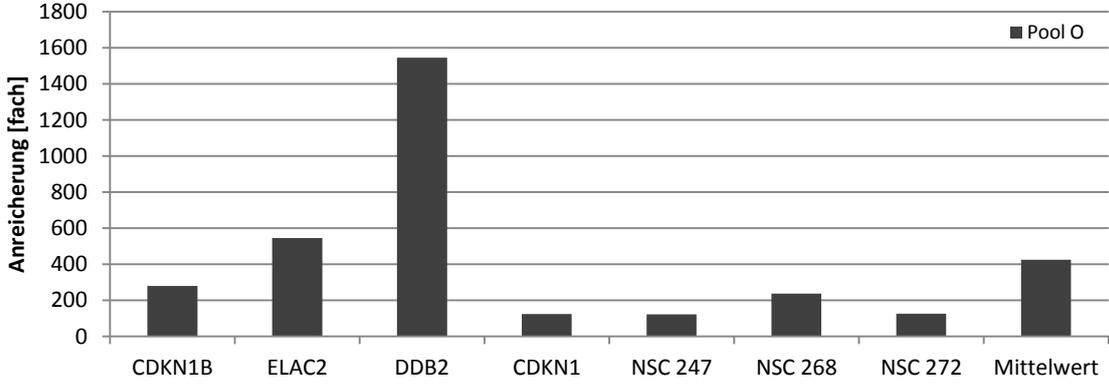
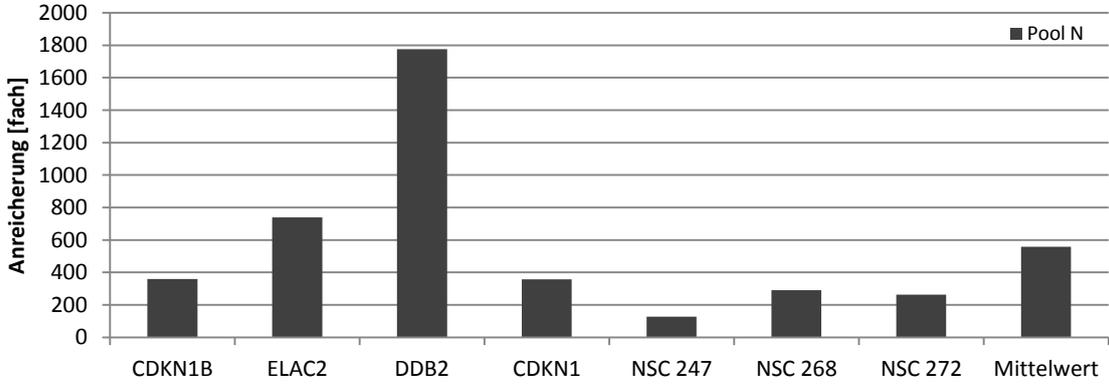
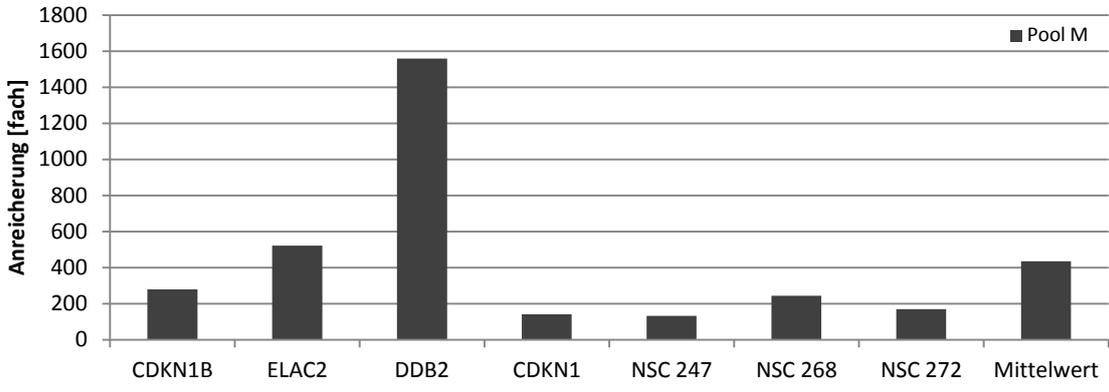
Fortsetzung Anhang 6.3



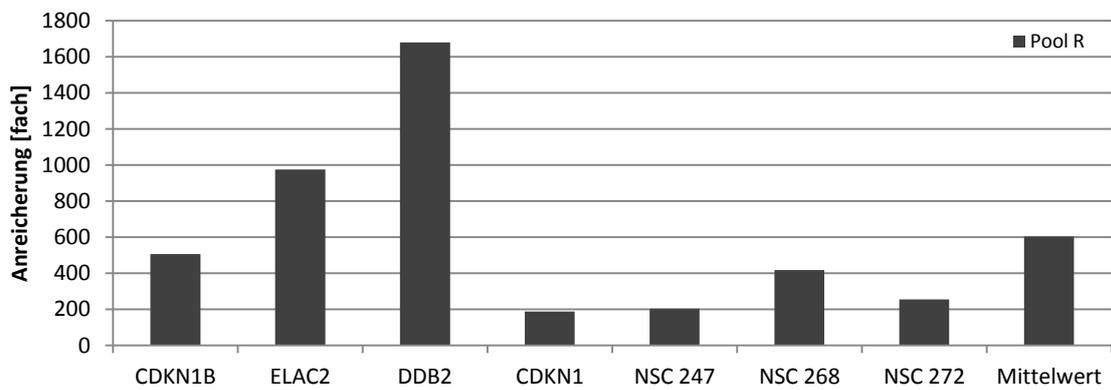
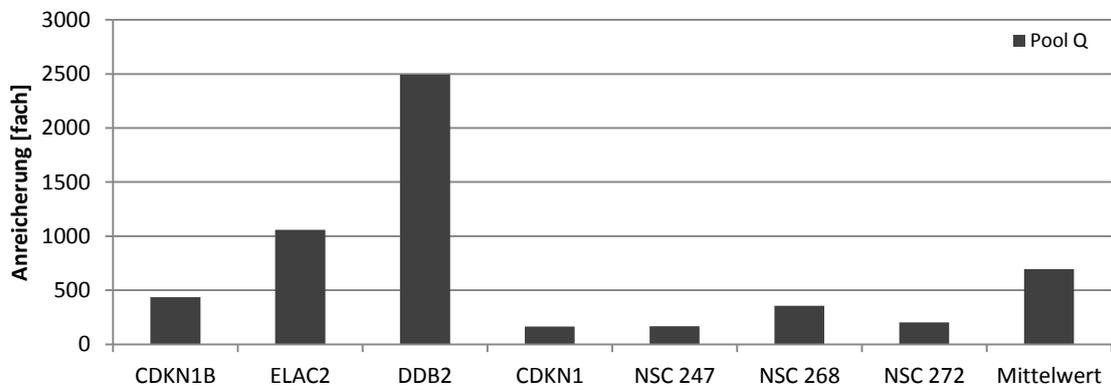
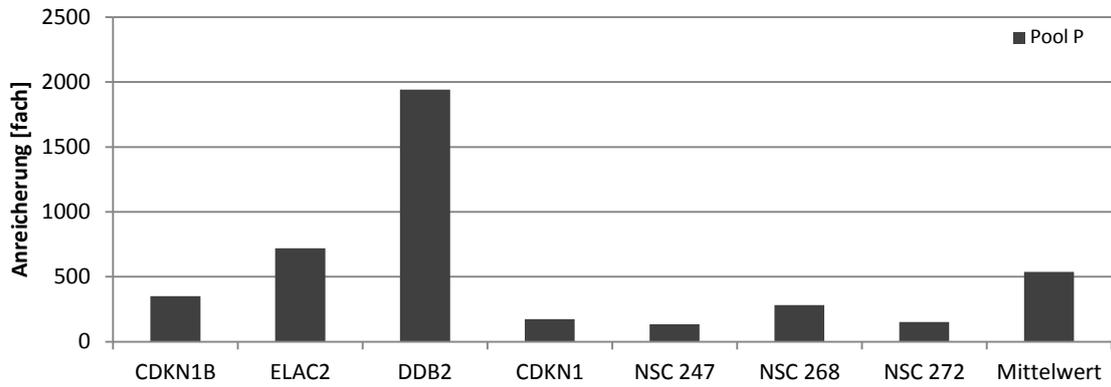
Fortsetzung Anhang 6.3



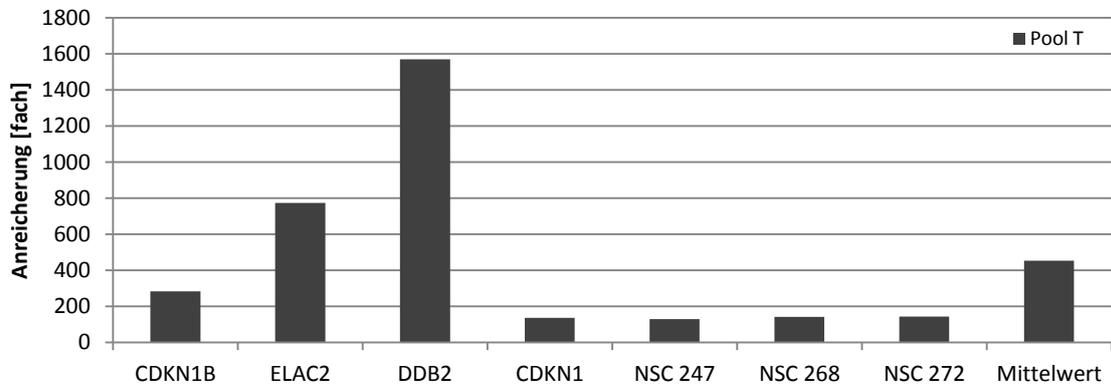
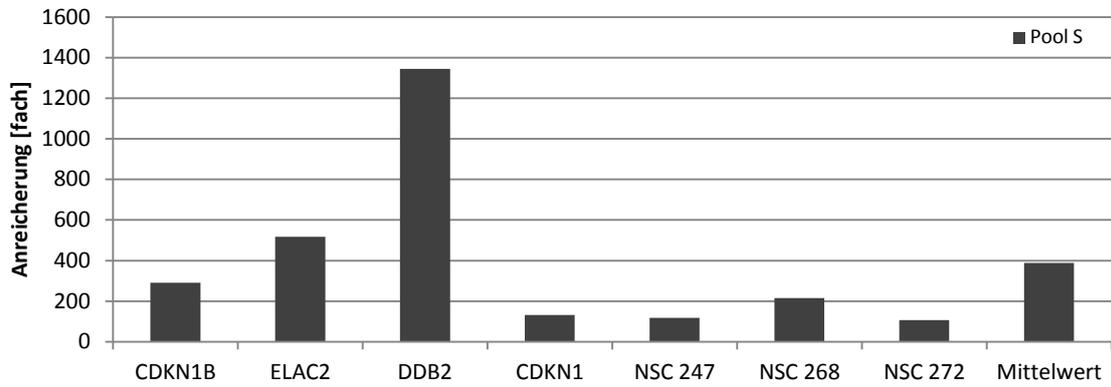
Fortsetzung Anhang 6.3



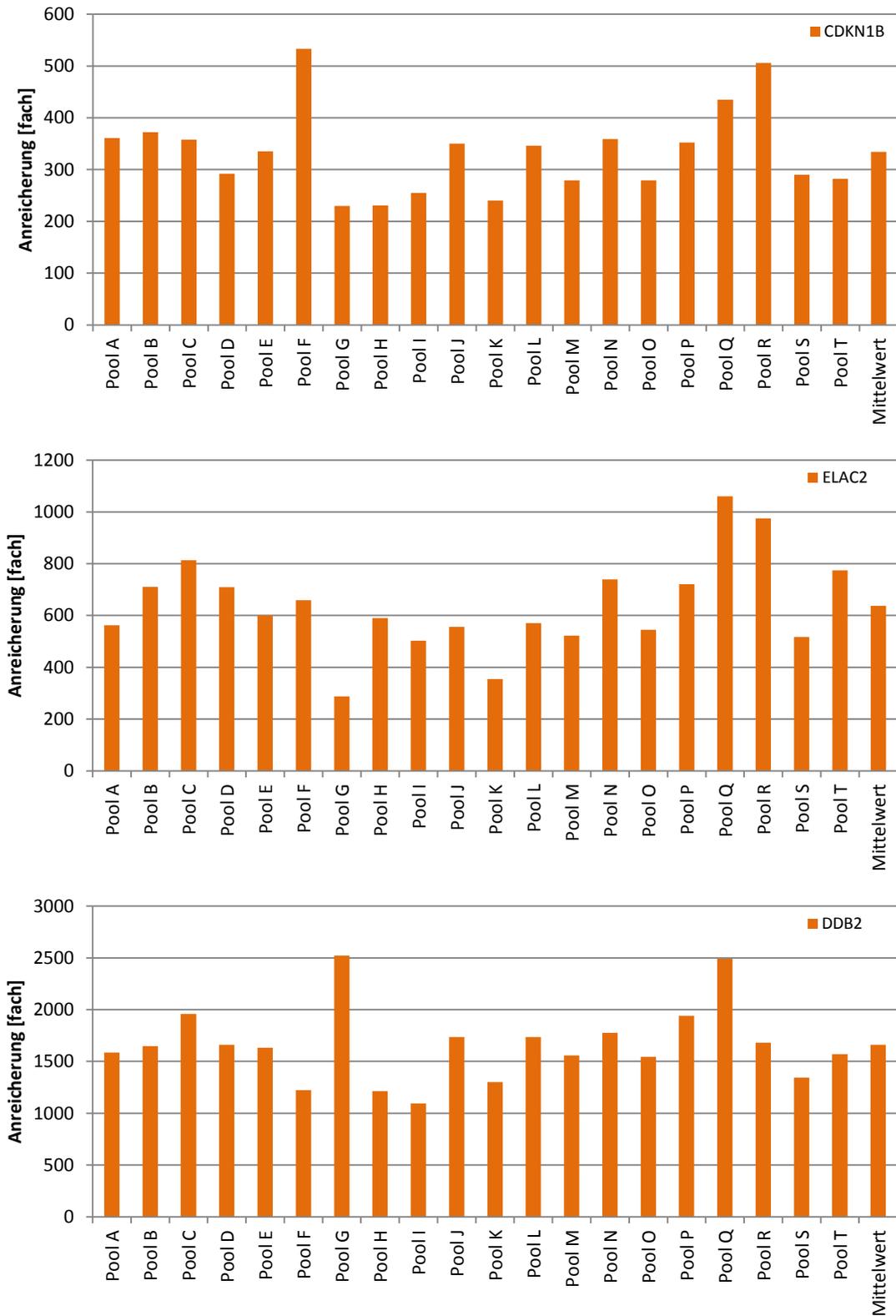
Fortsetzung Anhang 6.3



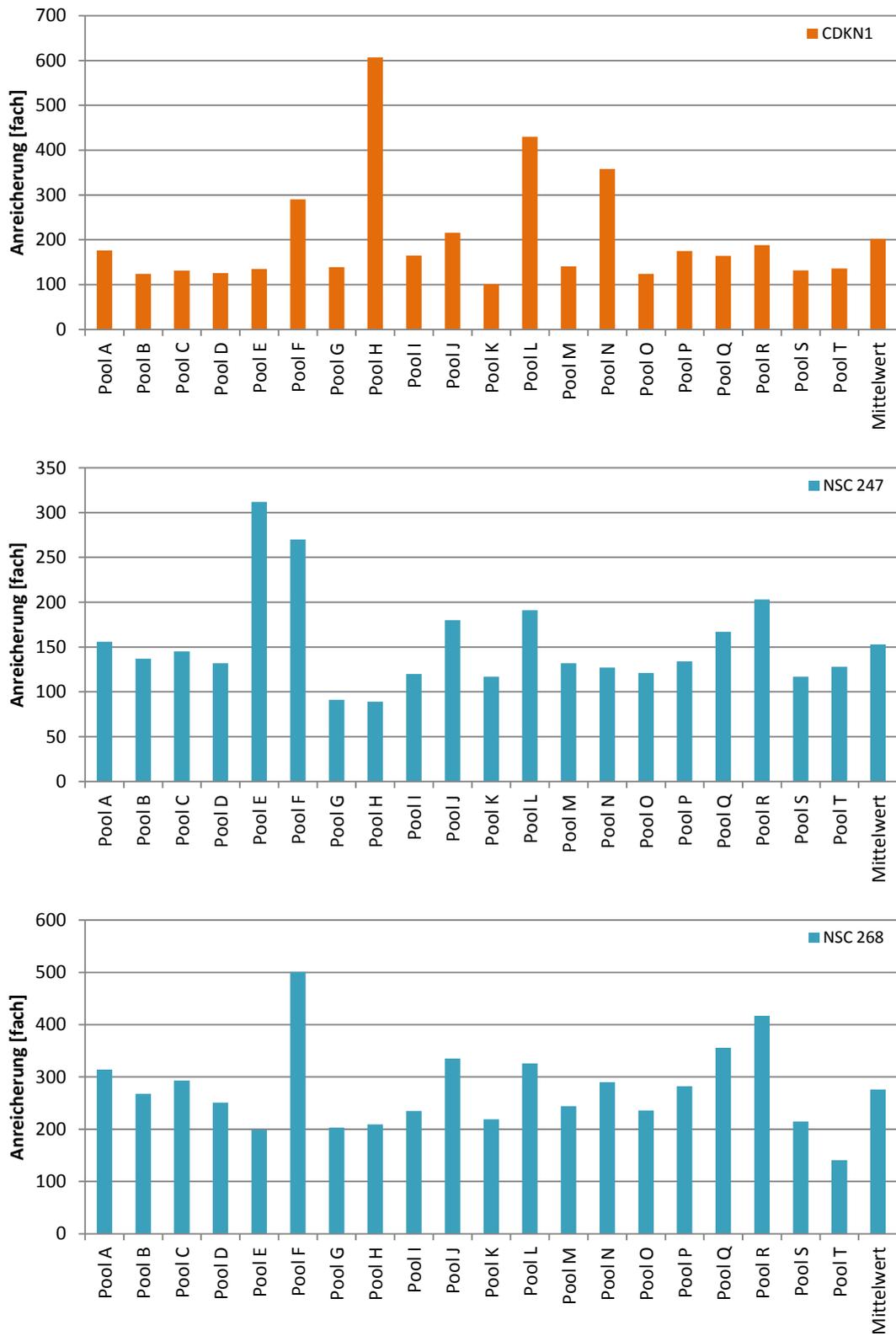
Fortsetzung Anhang 6.3



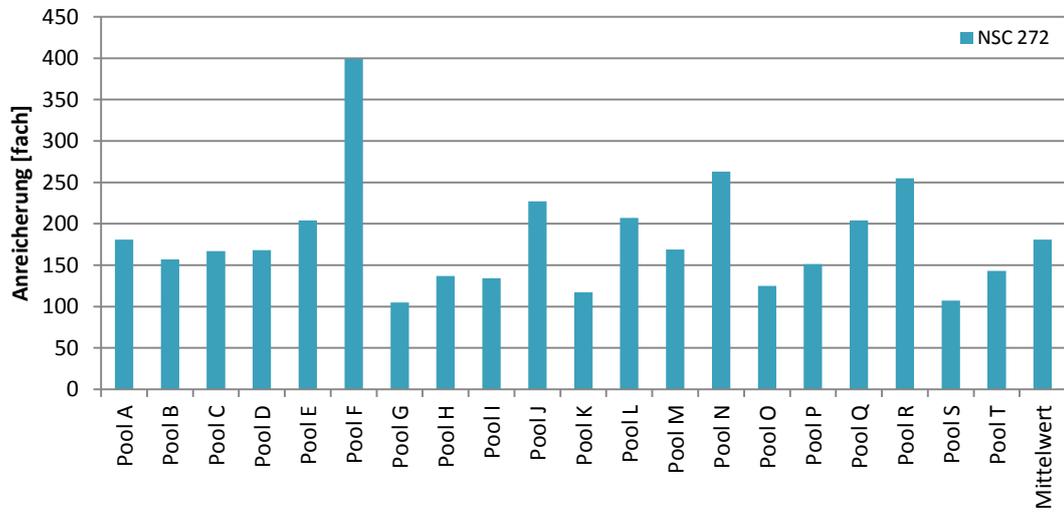
6.4 Darstellung der Anreicherungsweite der einzelnen Regionen der MID-Pools



Fortsetzung Anhang 6.4



Fortsetzung Anhang 6.4



6.5 Statistik der MID-Sequenzierung der 100 MID-Bibliotheken

| Name | Reads | Unique Reads | Mapped Reads | Reads On-Target | Targets Covered | Abdeckung [-fach] |
|-------|------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Lib1 | 6.561.826 | 5.110.371 | 3.841.175 | 1.002.390 | 96,6 % | 24 |
| Lib10 | 13.259.138 | 10.907.748 | 9.114.997 | 3.458.015 | 99,3 % | 93 |
| Lib11 | 14.836.086 | 12.370.555 | 9.961.180 | 4.073.853 | 99,3 % | 110 |
| Lib12 | 11.517.946 | 8.389.267 | 6.989.100 | 1.827.442 | 98,7 % | 49 |
| Lib13 | 16.220.980 | 14.574.639 | 13.527.944 | 3.657.464 | 99,0 % | 98 |
| Lib14 | 14.793.712 | 12.490.414 | 11.590.167 | 4.302.542 | 99,4 % | 116 |
| Lib15 | 7.734.900 | 6.622.259 | 6.159.848 | 2.067.746 | 99,0 % | 56 |
| Lib16 | 7.937.544 | 6.047.907 | 5.690.135 | 1.940.256 | 99,0 % | 52 |
| Lib17 | 6.420.526 | 5.834.091 | 5.336.600 | 984.781 | 97,7 % | 26 |
| Lib18 | 12.722.038 | 10.473.936 | 9.666.511 | 3.600.575 | 99,4 % | 97 |
| Lib19 | 8.388.862 | 6.419.179 | 5.873.757 | 2.142.440 | 99,3 % | 58 |
| Lib2 | 17.481.082 | 13.803.381 | 10.864.821 | 3.305.583 | 99,5 % | 87 |
| Lib20 | 24.788.034 | 16.499.505 | 15.106.714 | 4.858.536 | 99,1 % | 131 |
| Lib21 | 16.405.180 | 14.343.793 | 12.097.796 | 4.935.465 | 99,3 % | 133 |
| Lib22 | 16.527.410 | 12.742.618 | 11.220.831 | 4.589.369 | 99,2 % | 123 |
| Lib23 | 16.591.510 | 13.974.020 | 12.156.925 | 5.230.154 | 99,3 % | 140 |
| Lib24 | 12.445.814 | 10.914.938 | 9.941.907 | 3.551.888 | 98,9 % | 94 |
| Lib25 | 7.699.638 | 6.900.415 | 6.306.307 | 1.957.083 | 98,5 % | 53 |
| Lib26 | 14.129.322 | 10.029.425 | 8.792.147 | 3.035.105 | 99,0 % | 81 |
| Lib27 | 10.690.090 | 7.748.567 | 6.581.297 | 1.768.439 | 98,7 % | 47 |
| Lib28 | 15.883.374 | 13.557.662 | 11.852.563 | 4.507.646 | 99,4 % | 122 |
| Lib29 | 18.723.116 | 14.184.142 | 11.906.273 | 4.619.321 | 99,4 % | 124 |
| Lib3 | 17.823.598 | 15.470.102 | 12.865.071 | 5.939.611 | 99,4 % | 160 |
| Lib30 | 9.898.230 | 8.864.807 | 7.913.404 | 3.197.477 | 99,2 % | 86 |
| Lib31 | 19.676.022 | 15.254.381 | 12.705.957 | 5.293.166 | 99,4 % | 142 |
| Lib32 | 10.319.286 | 8.576.862 | 7.281.491 | 3.184.457 | 99,2 % | 85 |
| Lib33 | 17.008.574 | 15.619.063 | 13.788.636 | 3.487.822 | 99,3 % | 94 |
| Lib34 | 12.464.042 | 11.399.794 | 10.004.461 | 2.247.948 | 99,1 % | 61 |
| Lib35 | 4.654.360 | 4.436.389 | 3.890.148 | 895.224 | 97,9 % | 24 |
| Lib36 | 7.120.234 | 6.277.710 | 5.280.742 | 1.237.686 | 98,4 % | 33 |
| Lib37 | 9.432.380 | 8.760.120 | 7.700.431 | 1.437.198 | 98,5 % | 38 |
| Lib38 | 10.943.452 | 9.537.610 | 7.675.208 | 2.866.691 | 99,2 % | 77 |
| Lib39 | 11.826.872 | 9.430.607 | 7.218.374 | 2.294.259 | 99,4 % | 63 |
| Lib4 | 5.067.352 | 3.961.743 | 3.069.113 | 643.894 | 95,3 % | 16 |
| Lib40 | 15.523.928 | 12.694.042 | 10.212.053 | 3.644.246 | 99,5 % | 99 |
| Lib41 | 17.146.460 | 13.757.152 | 10.605.443 | 3.329.056 | 99,5 % | 91 |
| Lib42 | 4.345.777 | 4.345.777 | 3.908.488 | 1.239.946 | 97,8 % | 34 |
| Lib43 | 3.791.743 | 3.791.743 | 3.236.340 | 1.289.167 | 97,7 % | 36 |
| Lib44 | 3.291.075 | 3.291.075 | 2.783.495 | 828.250 | 95,6 % | 23 |
| Lib45 | 1.816.848 | 1.816.848 | 1.536.116 | 400.083 | 91,4 % | 11 |
| Lib46 | 2.367.151 | 2.367.151 | 2.044.527 | 679.107 | 94,3 % | 19 |
| Lib47 | 7.742.532 | 6.300.745 | 5.519.036 | 1.042.330 | 98,3 % | 27 |
| Lib48 | 14.127.078 | 13.556.801 | 12.499.668 | 2.025.799 | 99,0 % | 54 |
| Lib49 | 12.473.212 | 11.832.920 | 11.044.389 | 1.786.311 | 99,0 % | 48 |
| Lib5 | 5.550.510 | 4.494.791 | 3.370.907 | 699.364 | 95,2 % | 17 |
| Lib50 | 12.819.258 | 12.202.096 | 11.428.983 | 1.847.549 | 98,9 % | 49 |
| Lib51 | 10.125.592 | 9.547.699 | 8.067.525 | 1.527.535 | 99,1 % | 41 |
| Lib52 | 3.094.366 | 2.876.764 | 2.541.281 | 504.640 | 97,1 % | 14 |
| Lib6 | 14.716.570 | 11.543.514 | 9.625.437 | 3.299.376 | 99,3 % | 89 |
| Lib7 | 6.932.564 | 5.568.706 | 4.596.686 | 1.442.657 | 98,7 % | 38 |
| Lib8 | 9.442.324 | 7.354.919 | 5.252.791 | 1.220.434 | 96,1 % | 29 |
| Lib9 | 12.317.838 | 9.835.813 | 7.476.280 | 1.768.725 | 97,8 % | 43 |

Fortsetzung Anhang 6.5

| Name | Reads | Unique Reads | Mapped Reads | Reads On-Target | Targets Covered | Abdeckung [-fach] |
|------------|------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| LibRem1 | 13.258.612 | 11.306.212 | 10.780.217 | 3.484.943 | 99,3 % | 92 |
| LibRem10 | 12.095.624 | 9.404.197 | 8.869.427 | 3.854.150 | 99,2 % | 101 |
| LibRem11 | 8.209.668 | 6.386.987 | 6.092.196 | 2.845.553 | 99,0 % | 75 |
| LibRem12 | 8.202.800 | 6.347.275 | 5.816.463 | 1.801.759 | 98,9 % | 48 |
| LibRem13 | 7.357.928 | 6.390.478 | 5.982.200 | 1.519.441 | 99,0 % | 41 |
| LibRem14 | 2.131.742 | 1.880.433 | 1.669.496 | 582.857 | 97,9 % | 16 |
| LibRem15 | 10.928.912 | 6.762.521 | 5.889.482 | 1.325.615 | 99,0 % | 35 |
| LibRem16 | 7.055.902 | 4.973.718 | 4.233.912 | 984.159 | 98,6 % | 26 |
| LibRem17 | 2.397.198 | 2.172.445 | 2.051.605 | 547.838 | 97,0 % | 15 |
| LibRem18 | 9.280.022 | 5.752.741 | 4.838.112 | 1.210.628 | 98,9 % | 32 |
| LibRem19 | 7.256.540 | 4.575.388 | 3.751.685 | 1.001.902 | 98,1 % | 27 |
| LibRem20A | 17.539.936 | 13.463.016 | 11.697.218 | 2.870.605 | 99,2 % | 74 |
| LibRem21 | 7.725.550 | 6.349.637 | 6.015.716 | 2.437.771 | 98,8 % | 64 |
| LibRem22 | 2.554.558 | 1.736.016 | 1.545.714 | 667.079 | 97,9 % | 18 |
| LibRem23 | 15.739.584 | 11.707.354 | 11.026.066 | 3.891.574 | 99,1 % | 102 |
| LibRem24 | 1.479.650 | 1.315.152 | 1.212.765 | 465.281 | 96,8 % | 12 |
| LibRem25 | 9.704.236 | 7.216.842 | 6.791.091 | 1.994.979 | 98,5 % | 52 |
| LibRem26 | 10.106.086 | 7.707.837 | 7.158.073 | 2.297.227 | 98,6 % | 61 |
| LibRem27 | 4.174.872 | 2.970.658 | 2.703.190 | 913.423 | 98,3 % | 24 |
| LibRem28 | 21.949.644 | 12.460.995 | 11.346.482 | 3.924.830 | 99,4 % | 105 |
| LibRem29 | 4.016.008 | 2.683.004 | 2.263.100 | 956.423 | 98,6 % | 26 |
| LibRem2 | 1.477.026 | 997.700 | 837.124 | 210.818 | 88,8 % | 6 |
| LibRem3 | 8.589.766 | 6.663.484 | 6.275.084 | 2.596.890 | 99,2 % | 68 |
| LibRem30 | 7.236.040 | 5.890.108 | 5.428.728 | 2.095.679 | 98,9 % | 56 |
| LibRem31 | 3.735.588 | 2.288.471 | 1.929.377 | 812.742 | 98,3 % | 22 |
| LibRem32 | 1.796.312 | 1.361.045 | 1.194.812 | 455.314 | 95,3 % | 12 |
| LibRem33 | 15.209.128 | 12.816.307 | 12.327.684 | 4.643.376 | 99,3 % | 121 |
| LibRem34 | 10.380.616 | 8.090.565 | 7.800.565 | 2.907.399 | 99,2 % | 76 |
| LibRem35 | 13.521.400 | 10.331.024 | 9.919.545 | 3.802.286 | 99,3 % | 99 |
| LibRem36 | 5.048.338 | 3.914.423 | 3.764.543 | 1.285.943 | 98,9 % | 34 |
| LibRem37 | 1.402.420 | 1.162.673 | 1.009.418 | 380.511 | 96,1 % | 10 |
| LibRem38 | 14.778.680 | 12.758.928 | 11.854.755 | 4.300.903 | 99,3 % | 114 |
| LibRem39 | 6.156.144 | 4.682.004 | 4.231.132 | 1.490.508 | 99,1 % | 40 |
| LibRem4 | 12.538.162 | 9.942.539 | 8.794.709 | 3.179.783 | 99,5 % | 85 |
| LibRem40 | 8.889.130 | 6.715.295 | 6.255.505 | 2.826.361 | 99,3 % | 76 |
| LibRem41 | 704.968 | 533.115 | 453.739 | 188.475 | 86,5 % | 5 |
| LibRem42 | 10.824.168 | 9.431.909 | 8.915.253 | 2.059.801 | 98,9 % | 55 |
| LibRem43 | 1.629.226 | 1.195.863 | 1.056.368 | 445.186 | 96,4 % | 12 |
| LibRem44 | 6.961.770 | 3.986.594 | 3.411.733 | 1.187.706 | 97,9 % | 32 |
| LibRem45 | 2.289.194 | 1.053.674 | 826.090 | 300.851 | 90,6 % | 8 |
| LibRem46 | 11.007.758 | 6.402.353 | 5.798.054 | 1.492.561 | 98,8 % | 40 |
| LibRem47 | 7.226.634 | 5.515.708 | 4.828.957 | 1.393.492 | 98,8 % | 36 |
| LibRem48 | 5.940.720 | 4.501.198 | 4.163.266 | 1.613.597 | 99,1 % | 43 |
| LibRem49 | 963.832 | 673.538 | 610.551 | 212.163 | 94,2 % | 6 |
| LibRem5 | 12.194.438 | 9.710.603 | 8.705.383 | 2.542.968 | 99,4 % | 67 |
| LibRem50 | 4.371.184 | 2.699.664 | 2.426.373 | 958.500 | 98,6 % | 26 |
| LibRem51 | 2.550.008 | 1.466.534 | 1.222.058 | 419.454 | 95,3 % | 11 |
| LibRem52 | 1.406.334 | 685.272 | 487.297 | 216.425 | 81,9 % | 6 |
| LibRem6 | 1.459.592 | 1.147.490 | 1.011.311 | 479.375 | 95,1 % | 13 |
| LibRem7 | 12.265.950 | 10.307.554 | 9.848.151 | 3.861.035 | 99,0 % | 102 |
| LibRem8 | 14.182.276 | 9.119.503 | 8.301.941 | 2.555.450 | 99,1 % | 67 |
| LibRem9 | 3.392.056 | 2.823.804 | 2.562.258 | 909.512 | 98,7 % | 24 |
| Mittelwert | 9.412.609 | 7.510.946 | 6.612.572 | 2.154.992 | 97,9 % | 57 |

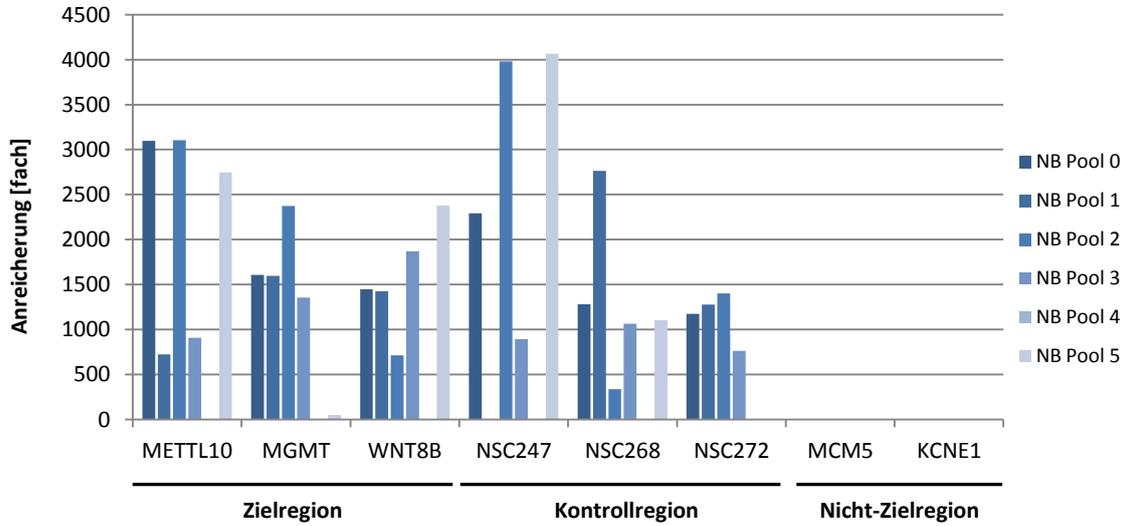
6.6 Anreicherungswerte der einzelnen Regionen der Glioblastom-Proben

| Name | Zielregion | | | | Kontrollregion | | | Nicht-Zielregion | | | Gesamt |
|---------------|------------|------|-------|------------|----------------|--------|--------|------------------|------|-------|-------------|
| | METTL10 | MGMT | WNT8B | Mittelwert | NSC247 | NSC268 | NSC272 | Mittelwert | MCM5 | KCNE1 | |
| NB Pool 0 | 3097 | 1607 | 1446 | 2050 | 2291 | 1280 | 1173 | 1581 | 0 | 0 | 1816 |
| NB Pool 1 | 724 | 1596 | 1427 | 1249 | N/A | 2766 | 1277 | 2021 | 0 | 0 | 1558 |
| NB Pool 2 | 3104 | 2374 | 713 | 2064 | 3983 | 338 | 1403 | 1908 | 0 | 0 | 1986 |
| NB Pool 3 | 909 | 1354 | 1868 | 1377 | 893 | 1063 | 764 | 906 | 0 | 0 | 1142 |
| NB Pool 4 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| NB Pool 5 | 2747 | 51 | 2376 | 1724 | 4066 | 1105 | N/A | 2585 | 0 | 0 | 2069 |
| Mittelwert | 2116 | 1396 | 1566 | 1693 | 2808 | 1310 | 1154 | 1800 | 0 | 0 | 1725 |
| GB 112 | 3984 | 3413 | 1358 | 2918 | 3323 | 1206 | 2576 | 2368 | 0 | 0 | 2643 |
| GB 949 | 8689 | 1184 | 989 | 3621 | N/A | 128 | N/A | 128 | 0 | 0 | 2748 |
| GB 954 | 790 | 1267 | 1389 | 1148 | 9992 | 3361 | 1809 | 5054 | 0 | 0 | 3101 |
| GB 963 | 2255 | 627 | 923 | 1268 | N/A | N/A | N/A | N/A | 0 | 0 | 1268 |
| GB 964 | 1798 | 5054 | 1496 | 2783 | N/A | 3408 | 8317 | 5862 | 0 | 0 | 4015 |
| GB 971 | 5712 | 3199 | 86 | 2999 | N/A | 2817 | N/A | 2817 | 0 | 0 | 2954 |
| GB 976 | 2220 | 343 | 1082 | 1215 | 1297 | N/A | 379 | 838 | 0 | 0 | 1064 |
| GB 978 | 1951 | 410 | 1459 | 1273 | 9095 | 394 | 2469 | 3986 | 0 | 0 | 2630 |
| GB 973 | 10416 | 6778 | 5455 | 7550 | 6215 | 1666 | 10084 | 5988 | 0 | 0 | 6769 |
| GB 974 | 1195 | 4134 | 1129 | 2153 | 3166 | 6492 | N/A | 4829 | 0 | 0 | 3223 |
| Mittelwert | 3901 | 2641 | 1537 | 2693 | 5515 | 2434 | 4272 | 3541 | 0 | 0 | 3383 |
| 1094-01 | 2195 | 1053 | 565 | 1271 | 2990 | 503 | 735 | 1409 | 0 | 0 | 1340 |
| 161-01 | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A | N/A |
| 2705-07 | 2317 | 820 | 1250 | 1462 | 2219 | 18 | 790 | 1009 | 0 | 0 | 1236 |
| 2728-06 | 6442 | 72 | 1364 | 2626 | 1265 | 493 | 92 | 617 | 0 | 0 | 1621 |
| 802-07 | 3824 | 535 | 483 | 1614 | 4698 | 983 | 347 | 2009 | 0 | 0 | 1812 |
| 85-03 | 828 | 826 | 458 | 704 | 1406 | 382 | 494 | 761 | 0 | 0 | 732 |
| 88-02 | 1407 | 736 | 1109 | 1084 | 1105 | 581 | 153 | 613 | 0 | 0 | 849 |
| AA 181 | 1163 | 931 | 6413 | 2836 | 1387 | 857 | 3080 | 1775 | 0 | 0 | 2305 |
| GB 119 | 393 | N/A | N/A | 393 | N/A | 3634 | N/A | 1818 | N/A | N/A | 2014 |
| GB 875 | 1591 | 2647 | 929 | 1722 | 1146 | 517 | N/A | 832 | 0 | 0 | 1366 |
| GB 975 | 2365 | 985 | 608 | 1319 | 2472 | 1285 | 961 | 1573 | 0 | 0 | 1446 |
| Mittelwert | 2253 | 956 | 1464 | 1503 | 2076 | 925 | 832 | 1242 | | | 1372 |
| Mittelwert | 2757 | 1664 | 1522 | 1963 | 3466 | 1557 | 2086 | 2194 | | | |
| Gesamt | | | | | | | | | | | 2079 |

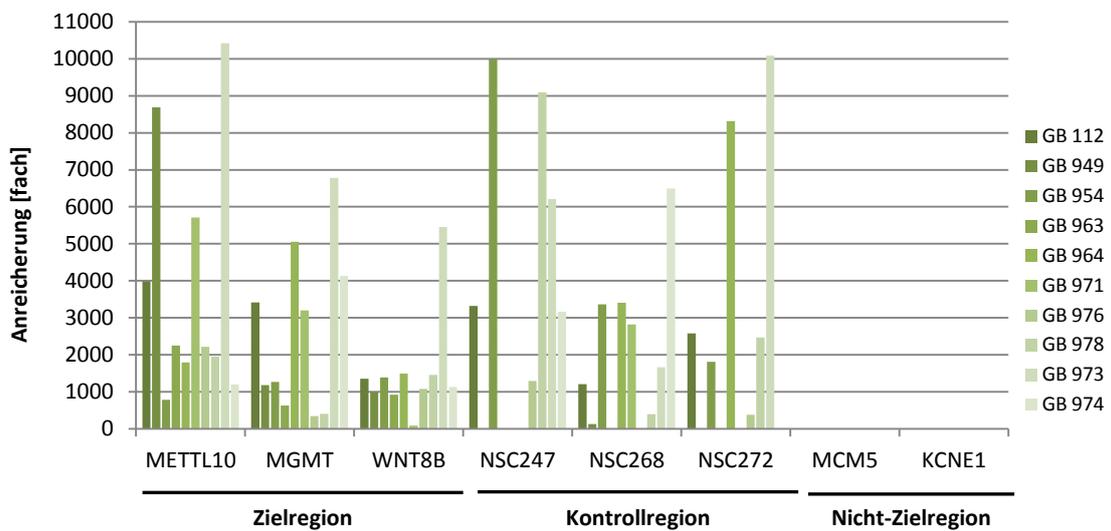
N/A= keine Berechnung möglich.

6.7 Darstellung der Anreicherungswerte der Regionen nach Gruppen

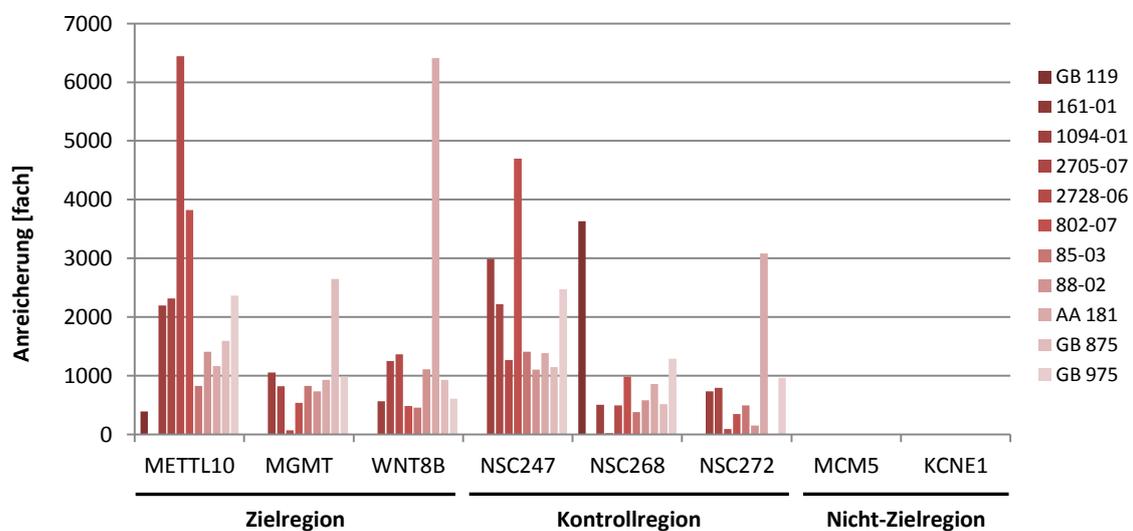
Normalhirn-Kontrollen



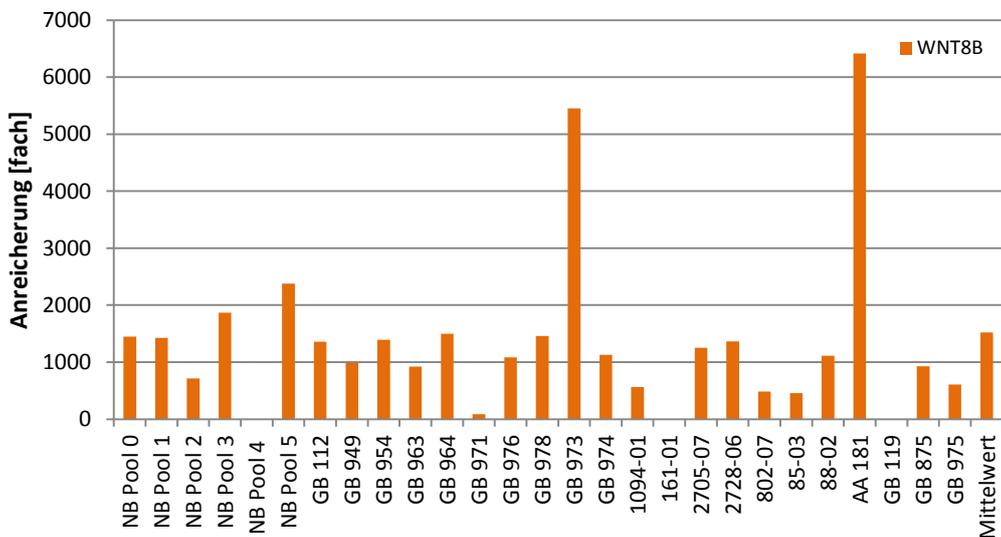
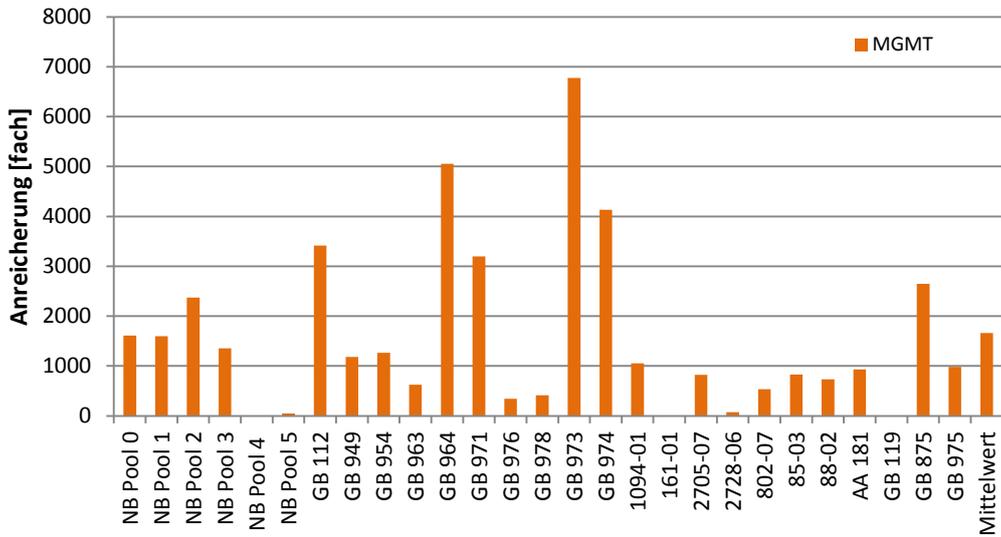
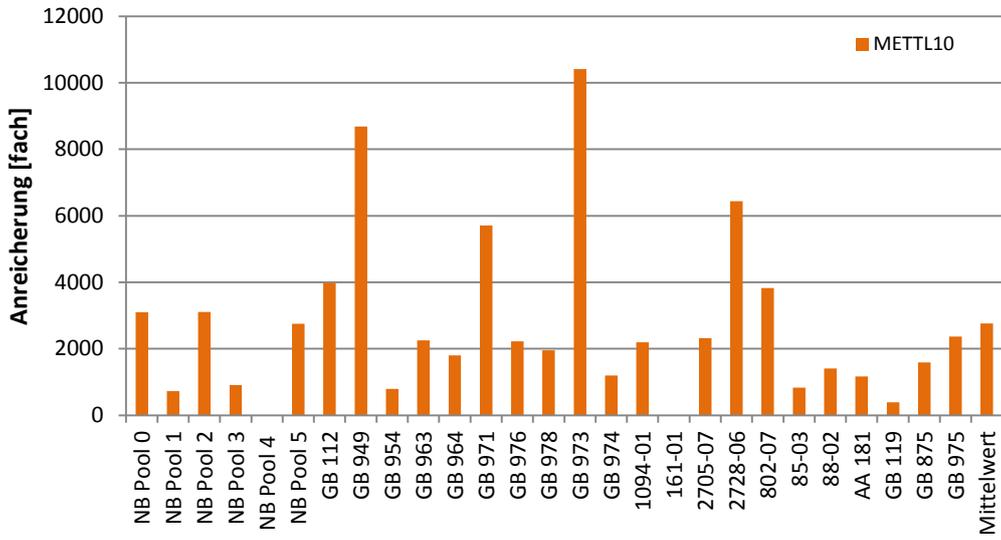
pGBIV-IDH1^{wt}



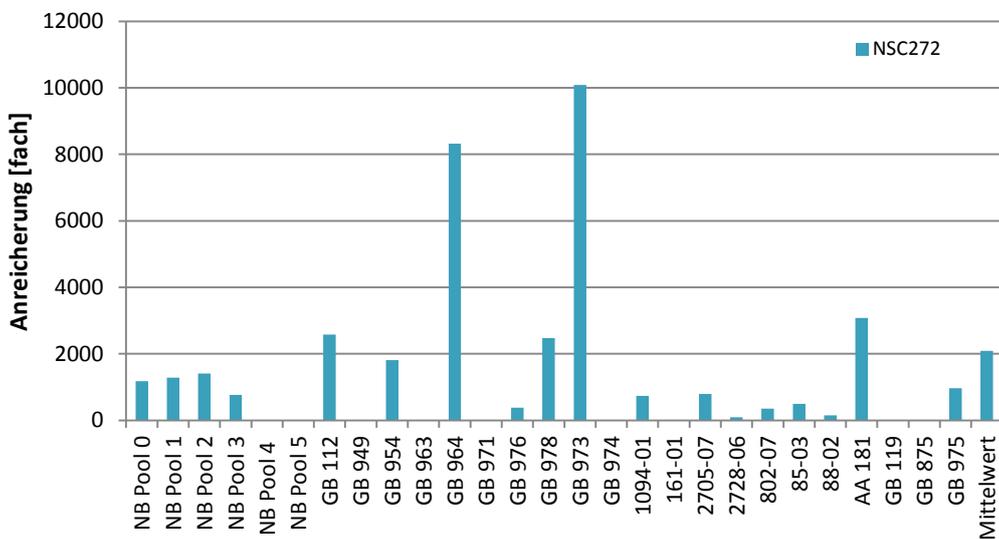
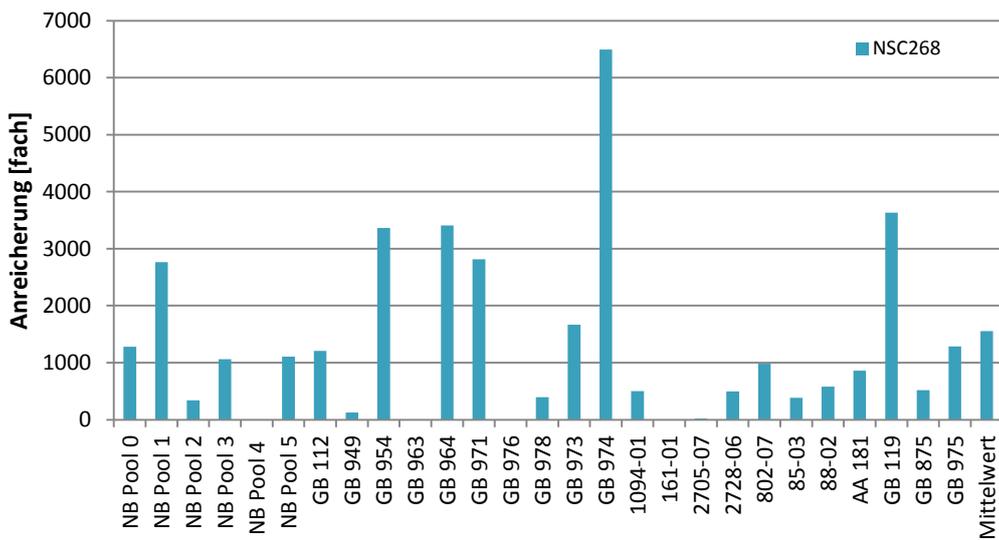
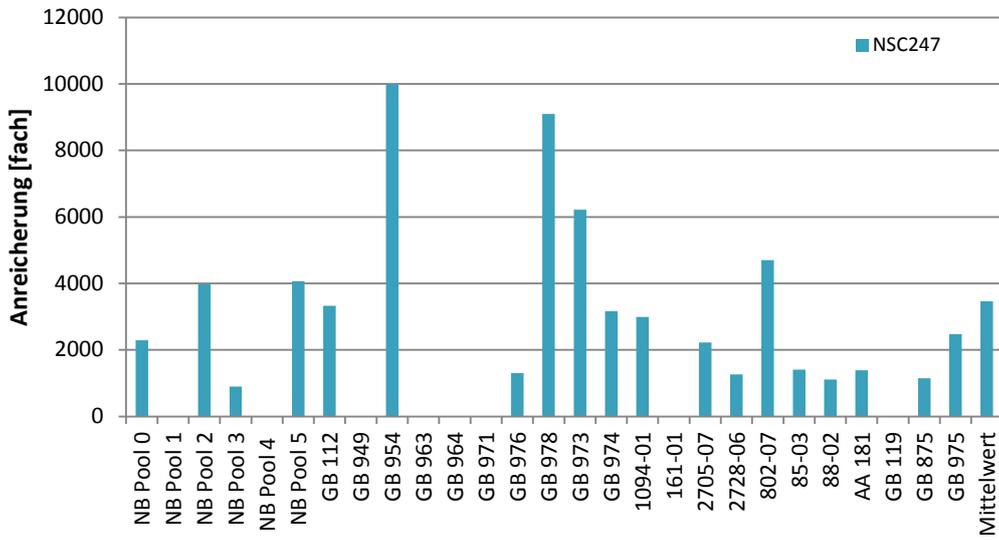
pGBIV-IDH1^{mut}



6.8 Darstellung der Anreicherungs-werte der Regionen und Proben



Fortsetzung Anhang 6.8



6.9 MassARRAY-Statistik

| CpG-Einheit | Gen | adj. p-Wert | CpG-Einheit | Gen | adj. p-Wert |
|---------------------------|----------|-------------|--------------------------|----------|-------------|
| RASGEF1A_003_CpG_1 | RASGEF1A | 0,038 | HHEX_CpG_1 | HHEX | 0,066 |
| DKK1_CpG_7 | DKK1 | 0,038 | DKK1_CpG_15 | DKK1 | 0,071 |
| DKK1_CpG_4 | DKK1 | 0,038 | HHEX_CpG_20.21 | HHEX | 0,084 |
| RASGEF1A_003_CpG_4 | RASGEF1A | 0,038 | HHEX_CpG_7.8 | HHEX | 0,1 |
| KCNMA1_001_CpG_15 | KCNMA1 | 0,038 | ZMIZ1_CpG_23 | ZMIZ1 | 0,101 |
| DKK1_CpG_5 | DKK1 | 0,038 | HHEX_CpG_9 | HHEX | 0,135 |
| DKK1_CpG_20 | DKK1 | 0,038 | DKK1_CpG_18 | DKK1 | 0,137 |
| KCNMA1_001_CpG_10 | KCNMA1 | 0,038 | GSTO_CpG_23.24 | GSTO | 0,137 |
| KCNMA1_001_CpG_8 | KCNMA1 | 0,038 | DKK1_CpG_17 | DKK1 | 0,137 |
| SEC31B_CpG_8.9 | SEC31B | 0,038 | KCNMA1_001_CpG_18 | KCNMA1 | 0,156 |
| SEC31B_CpG_49 | SEC31B | 0,038 | HHEX_CpG_4.5.6 | HHEX | 0,156 |
| SEC31B_CpG_6 | SEC31B | 0,038 | KCNMA1_002_CpG_8 | KCNMA1 | 0,156 |
| RASGEF1A_003_CpG_5.6.7.8 | RASGEF1A | 0,038 | HHEX_CpG_11.12 | HHEX | 0,156 |
| SEC31B_CpG_44.45.46.47.48 | SEC31B | 0,038 | ZMIZ1_CpG_8 | ZMIZ1 | 0,161 |
| SEC31B_CpG_23 | SEC31B | 0,038 | ZMIZ1_CpG_11 | ZMIZ1 | 0,161 |
| SEC31B_CpG_33.34 | SEC31B | 0,038 | OGDHL_CpG_46 | OGDHL | 0,169 |
| RASGEF1A_003_CpG_2 | RASGEF1A | 0,038 | HHEX_CpG_17.18.19 | HHEX | 0,189 |
| KCNMA1_001_CpG_1.2 | KCNMA1 | 0,038 | HHEX_CpG_22 | HHEX | 0,223 |
| KCNMA1_001_CpG_11 | KCNMA1 | 0,038 | OGDHL_CpG_18.19 | OGDHL | 0,227 |
| DKK1_CpG_12.13.14 | DKK1 | 0,038 | KCNMA1_001_CpG_19 | KCNMA1 | 0,248 |
| DKK1_CpG_10.11 | DKK1 | 0,038 | ZMIZ1_CpG_9.10 | ZMIZ1 | 0,248 |
| KCNMA1_001_CpG_4 | KCNMA1 | 0,038 | OGDHL_CpG_3.4 | OGDHL | 0,269 |
| KCNMA1_001_CpG_3 | KCNMA1 | 0,038 | KCNMA1_001_CpG_9 | KCNMA1 | 0,269 |
| SEC31B_CpG_10.11.12.13 | SEC31B | 0,038 | KCNMA1_001_CpG_26 | KCNMA1 | 0,269 |
| SEC31B_CpG_25.26.27.28 | SEC31B | 0,038 | KCNMA1_001_CpG_16 | KCNMA1 | 0,269 |
| SEC31B_CpG_51 | SEC31B | 0,038 | HHEX_CpG_10 | HHEX | 0,303 |
| KCNMA1_001_CpG_7 | KCNMA1 | 0,038 | DKK1_CpG_6 | DKK1 | 0,324 |
| SEC31B_CpG_20.21.22 | SEC31B | 0,038 | RASGEF1A_002_CpG_32.33 | RASGEF1A | 0,349 |
| SEC31B_CpG_24 | SEC31B | 0,038 | HHEX_CpG_27.28.29 | HHEX | 0,352 |
| KCNMA1_001_CpG_13.14 | KCNMA1 | 0,038 | GSTO_CpG_10.11 | GSTO | 0,353 |
| SEC31B_CpG_35.36.37 | SEC31B | 0,038 | GSTO_CpG_9 | GSTO | 0,353 |
| SEC31B_CpG_42.43 | SEC31B | 0,038 | OGDHL_CpG_20.21.22.23.24 | OGDHL | 0,353 |
| DKK1_CpG_2.3 | DKK1 | 0,038 | KCNMA1_002_CpG_31 | KCNMA1 | 0,384 |
| SEC31B_CpG_38.39.40 | SEC31B | 0,038 | OGDHL_CpG_17 | OGDHL | 0,384 |
| DKK1_CpG_19 | DKK1 | 0,038 | HHEX_CpG_13 | HHEX | 0,386 |
| SEC31B_CpG_29 | SEC31B | 0,038 | RASGEF1A_002_CpG_27 | RASGEF1A | 0,394 |
| SEC31B_CpG_30.31.32 | SEC31B | 0,038 | KCNMA1_002_CpG_12 | KCNMA1 | 0,409 |
| SEC31B_CpG_52 | SEC31B | 0,038 | OGDHL_CpG_2 | OGDHL | 0,447 |
| SEC31B_CpG_4 | SEC31B | 0,051 | OGDHL_CpG_25 | OGDHL | 0,447 |
| SEC31B_CpG_7 | SEC31B | 0,059 | HHEX_CpG_16 | HHEX | 0,447 |
| RASGEF1A_003_CpG_3 | RASGEF1A | 0,059 | HHEX_CpG_2 | HHEX | 0,447 |
| SEC31B_CpG_41 | SEC31B | 0,059 | HHEX_CpG_31 | HHEX | 0,447 |
| SEC31B_CpG_18 | SEC31B | 0,059 | KCNMA1_001_CpG_20 | KCNMA1 | 0,498 |
| GSTO_CpG_1 | GSTO | 0,059 | RASGEF1A_002_CpG_19 | RASGEF1A | 0,501 |
| KCNMA1_001_CpG_6 | KCNMA1 | 0,059 | GSTO_CpG_12.13 | GSTO | 0,501 |
| KCNMA1_001_CpG_17 | KCNMA1 | 0,066 | ZMIZ1_CpG_5 | ZMIZ1 | 0,564 |
| HHEX_CpG_3 | HHEX | 0,066 | ZMIZ1_CpG_7 | ZMIZ1 | 0,564 |

Fortsetzung Anhang 6.9

| CpG-Einheit | Gen | adj. p-Wert | CpG-Einheit | Gen | adj. p-Wert |
|-------------------------------|----------|-------------|------------------------------|----------|-------------|
| OGDHL_CpG_1 | OGDHL | 0,564 | RASGEF1A_002_CpG_28.29.30.31 | RASGEF1A | 0,853 |
| GSTO_CpG_2 | GSTO | 0,564 | KCNMA1_001_CpG_21 | KCNMA1 | 0,853 |
| RASGEF1A_002_CpG_36 | RASGEF1A | 0,564 | OGDHL_CpG_40.41 | OGDHL | 0,853 |
| KCNMA1_002_CpG_29.30 | KCNMA1 | 0,588 | GSTO_CpG_6.7 | GSTO | 0,853 |
| GSTO_CpG_20.21.22 | GSTO | 0,628 | ZMIZ1_CpG_12.13 | ZMIZ1 | 0,892 |
| HHEX_CpG_23.24.25 | HHEX | 0,628 | OGDHL_CpG_6.7.8.9 | OGDHL | 0,909 |
| HHEX_CpG_14 | HHEX | 0,628 | KCNMA1_001_CpG_22.23.24.25 | KCNMA1 | 0,909 |
| KCNMA1_002_CpG_10.11 | KCNMA1 | 0,666 | RASGEF1A_002_CpG_10.11.12.13 | RASGEF1A | 0,909 |
| OGDHL_CpG_32.33.34.35 | OGDHL | 0,672 | GSTO_CpG_14 | GSTO | 0,909 |
| KCNMA1_002_CpG_34 | KCNMA1 | 0,672 | KCNMA1_002_CpG_7 | KCNMA1 | 0,926 |
| OGDHL_CpG_43 | OGDHL | 0,672 | OGDHL_CpG_27 | OGDHL | 0,942 |
| RASGEF1A_002_CpG_17.18 | RASGEF1A | 0,672 | OGDHL_CpG_5 | OGDHL | 0,942 |
| GSTO_CpG_16 | GSTO | 0,672 | OGDHL_CpG_28.29.30.31 | OGDHL | 0,942 |
| RASGEF1A_002_CpG_34.35 | RASGEF1A | 0,672 | KCNMA1_002_CpG_19.20 | KCNMA1 | 0,942 |
| KCNMA1_002_CpG_13.14.15.16.17 | KCNMA1 | 0,699 | OGDHL_CpG_48.49 | OGDHL | 0,942 |
| GSTO_CpG_3.4.5 | GSTO | 0,736 | HHEX_CpG_30 | HHEX | 0,942 |
| HHEX_CpG_26 | HHEX | 0,736 | HHEX_CpG_39 | HHEX | 0,942 |
| OGDHL_CpG_52 | OGDHL | 0,736 | GSTO_CpG_18.19 | GSTO | 1 |
| ZMIZ1_CpG_22 | ZMIZ1 | 0,752 | OGDHL_CpG_42 | OGDHL | 1 |
| KCNMA1_002_CpG_32.33 | KCNMA1 | 0,752 | RASGEF1A_002_CpG_25.26 | RASGEF1A | 1 |
| RASGEF1A_002_CpG_21.22.23.24 | RASGEF1A | 0,789 | KCNMA1_002_CpG_21.22 | KCNMA1 | 1 |
| KCNMA1_002_CpG_9 | KCNMA1 | 0,789 | OGDHL_CpG_36 | OGDHL | NaN |
| OGDHL_CpG_47 | OGDHL | 0,789 | ZMIZ1_CpG_1.2 | ZMIZ1 | NaN |
| HHEX_CpG_37.38 | HHEX | 0,789 | | | |

6.10 Design des 385K CustomArray für die subgenomischen DNA-Methylierungsanalyse

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|----|----------|----------|------------|----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|
| 0 | 41964893 | 41965299 | 407 | 48 | 42569494 | 42570015 | 522 | 96 | 43232654 | 43232937 | 284 |
| 1 | 41965372 | 41966430 | 1059 | 49 | 42570016 | 42570942 | 927 | 97 | 43233354 | 43233894 | 541 |
| 2 | 41992521 | 41992922 | 402 | 50 | 42596715 | 42596791 | 77 | 98 | 43234174 | 43234271 | 98 |
| 3 | 41993151 | 41993296 | 146 | 51 | 42596864 | 42596965 | 102 | 99 | 43235872 | 43236150 | 279 |
| 4 | 41993381 | 41993472 | 92 | 52 | 42596968 | 42597199 | 232 | 100 | 43236382 | 43236637 | 256 |
| 5 | 42057274 | 42057358 | 85 | 53 | 42597284 | 42597466 | 183 | 101 | 43250990 | 43251101 | 112 |
| 6 | 42057526 | 42057741 | 216 | 54 | 42597772 | 42598308 | 537 | 102 | 43251705 | 43252613 | 909 |
| 7 | 42057795 | 42057959 | 165 | 55 | 42598385 | 42598552 | 168 | 103 | 43252680 | 43252913 | 234 |
| 8 | 42057978 | 42058062 | 85 | 56 | 42598610 | 42598789 | 180 | 104 | 43270743 | 43271459 | 717 |
| 9 | 42058378 | 42058568 | 191 | 57 | 42652383 | 42652486 | 104 | 105 | 43383363 | 43384246 | 884 |
| 10 | 42058712 | 42058804 | 93 | 58 | 42652629 | 42652759 | 131 | 106 | 43384472 | 43385413 | 942 |
| 11 | 42058849 | 42058925 | 77 | 59 | 42681614 | 42681861 | 248 | 107 | 43389317 | 43391608 | 2292 |
| 12 | 42058993 | 42059096 | 104 | 60 | 42681979 | 42682085 | 107 | 108 | 43420561 | 43420638 | 78 |
| 13 | 42153568 | 42153647 | 80 | 61 | 42682144 | 42682242 | 99 | 109 | 43420659 | 43420744 | 86 |
| 14 | 42154278 | 42154407 | 130 | 62 | 42682318 | 42682393 | 76 | 110 | 43420906 | 43421110 | 205 |
| 15 | 42155059 | 42155150 | 92 | 63 | 42713434 | 42714455 | 1022 | 111 | 43421165 | 43421308 | 144 |
| 16 | 42155151 | 42155225 | 75 | 64 | 42748143 | 42748505 | 363 | 112 | 43421341 | 43421522 | 182 |
| 17 | 42182856 | 42183303 | 448 | 65 | 42748522 | 42748779 | 258 | 113 | 43421560 | 43422415 | 856 |
| 18 | 42183378 | 42183975 | 598 | 66 | 42748785 | 42749490 | 706 | 114 | 43463609 | 43464878 | 1270 |
| 19 | 42184010 | 42185030 | 1021 | 67 | 42766835 | 42767029 | 195 | 115 | 43465063 | 43465860 | 798 |
| 20 | 42287306 | 42287393 | 88 | 68 | 42767087 | 42767422 | 336 | 116 | 43482821 | 43483563 | 743 |
| 21 | 42287485 | 42287564 | 80 | 69 | 42890975 | 42893476 | 2502 | 117 | 43504759 | 43506175 | 1417 |
| 22 | 42287656 | 42287733 | 78 | 70 | 42920107 | 42921198 | 1092 | 118 | 43659214 | 43660175 | 962 |
| 23 | 42287810 | 42288106 | 297 | 71 | 42952393 | 42952621 | 229 | 119 | 43660178 | 43660395 | 218 |
| 24 | 42288151 | 42288566 | 416 | 72 | 42952905 | 42954473 | 1569 | 120 | 43660405 | 43660538 | 134 |
| 25 | 42288587 | 42288694 | 108 | 73 | 43017738 | 43018251 | 514 | 121 | 43660539 | 43661288 | 750 |
| 26 | 42288719 | 42288828 | 110 | 74 | 43024091 | 43025666 | 1576 | 122 | 44126103 | 44126793 | 691 |
| 27 | 42288968 | 42289080 | 113 | 75 | 43025898 | 43026109 | 212 | 123 | 44199683 | 44201172 | 1490 |
| 28 | 42289125 | 42289229 | 105 | 76 | 43044486 | 43046724 | 2239 | 124 | 44201176 | 44201975 | 800 |
| 29 | 42289467 | 42290566 | 1100 | 77 | 43081827 | 43082728 | 902 | 125 | 44202006 | 44202410 | 405 |
| 30 | 42290572 | 42290893 | 322 | 78 | 43083006 | 43083816 | 811 | 126 | 44725490 | 44725743 | 254 |
| 31 | 42290917 | 42291873 | 957 | 79 | 43138035 | 43138631 | 597 | 127 | 44725749 | 44727345 | 1597 |
| 32 | 42367545 | 42367624 | 80 | 80 | 43155690 | 43156539 | 850 | 128 | 44773676 | 44775764 | 2089 |
| 33 | 42367658 | 42368343 | 686 | 81 | 43156555 | 43156744 | 190 | 129 | 44785346 | 44786115 | 770 |
| 34 | 42368353 | 42368508 | 156 | 82 | 43157015 | 43157368 | 354 | 130 | 44786202 | 44786293 | 92 |
| 35 | 42447841 | 42447929 | 89 | 83 | 43177448 | 43178246 | 799 | 131 | 44786505 | 44787422 | 918 |
| 36 | 42447935 | 42448010 | 76 | 84 | 43185631 | 43185760 | 130 | 132 | 44793782 | 44795868 | 2087 |
| 37 | 42448036 | 42448346 | 311 | 85 | 43186031 | 43186627 | 597 | 133 | 44814383 | 44817817 | 3435 |
| 38 | 42448354 | 42448447 | 94 | 86 | 43186936 | 43187434 | 499 | 134 | 45003823 | 45003952 | 130 |
| 39 | 42448538 | 42448737 | 200 | 87 | 43187531 | 43187629 | 99 | 135 | 45004482 | 45004569 | 88 |
| 40 | 42448796 | 42449007 | 212 | 88 | 43211286 | 43212357 | 1072 | 136 | 45004668 | 45004872 | 205 |
| 41 | 42449054 | 42449142 | 89 | 89 | 43212366 | 43212958 | 593 | 137 | 45004954 | 45005054 | 101 |
| 42 | 42449459 | 42449542 | 84 | 90 | 43222541 | 43223403 | 863 | 138 | 45005130 | 45005244 | 115 |
| 43 | 42453448 | 42454596 | 1149 | 91 | 43223611 | 43224824 | 1214 | 139 | 45005325 | 45005413 | 89 |
| 44 | 42454638 | 42454788 | 151 | 92 | 43224847 | 43225012 | 166 | 140 | 45005530 | 45005609 | 80 |
| 45 | 42454821 | 42454897 | 77 | 93 | 43225467 | 43225697 | 231 | 141 | 45005684 | 45005766 | 83 |
| 46 | 42454912 | 42455066 | 155 | 94 | 43225701 | 43225873 | 173 | 142 | 45039674 | 45040222 | 549 |
| 47 | 42568480 | 42569469 | 990 | 95 | 43226057 | 43226198 | 142 | 143 | 45119290 | 45120447 | 1158 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|
| 144 | 45120831 | 45121337 | 507 | 192 | 48058673 | 48060686 | 2014 | 240 | 50055907 | 50057987 | 2081 |
| 145 | 45122732 | 45124808 | 2077 | 193 | 48145848 | 48145996 | 149 | 241 | 50065862 | 50067959 | 2098 |
| 146 | 45188086 | 45190193 | 2108 | 194 | 48145998 | 48146082 | 85 | 242 | 50175645 | 50177760 | 2116 |
| 147 | 45234348 | 45235078 | 731 | 195 | 48146113 | 48146602 | 490 | 243 | 50199049 | 50199489 | 441 |
| 148 | 45242791 | 45243414 | 624 | 196 | 48146637 | 48146762 | 126 | 244 | 50199502 | 50199679 | 178 |
| 149 | 45258597 | 45259702 | 1106 | 197 | 48146958 | 48147119 | 162 | 245 | 50199902 | 50199972 | 71 |
| 150 | 45278798 | 45280872 | 2075 | 198 | 48572411 | 48572482 | 72 | 246 | 50200006 | 50202776 | 2771 |
| 151 | 45350280 | 45351778 | 1499 | 199 | 49054450 | 49054536 | 87 | 247 | 50204243 | 50204739 | 497 |
| 152 | 45351780 | 45351941 | 162 | 200 | 49129257 | 49130007 | 751 | 248 | 50272948 | 50274319 | 1372 |
| 153 | 45352050 | 45352212 | 163 | 201 | 49130016 | 49130905 | 890 | 249 | 50274346 | 50276798 | 2453 |
| 154 | 45409662 | 45410071 | 410 | 202 | 49130946 | 49131332 | 387 | 250 | 50365707 | 50366700 | 994 |
| 155 | 45410076 | 45410928 | 853 | 203 | 49152173 | 49153436 | 1264 | 251 | 50366707 | 50366844 | 138 |
| 156 | 45411201 | 45411882 | 682 | 204 | 49153703 | 49154257 | 555 | 252 | 50367117 | 50367781 | 665 |
| 157 | 45464687 | 45465559 | 873 | 205 | 49183194 | 49183551 | 358 | 253 | 50401729 | 50403586 | 1858 |
| 158 | 45465988 | 45466769 | 782 | 206 | 49183554 | 49183666 | 113 | 254 | 50403619 | 50403816 | 198 |
| 159 | 45487287 | 45487462 | 176 | 207 | 49183668 | 49184942 | 1275 | 255 | 50416509 | 50418082 | 1574 |
| 160 | 45487484 | 45487698 | 215 | 208 | 49184950 | 49185411 | 462 | 256 | 50418408 | 50418624 | 217 |
| 161 | 45487787 | 45489786 | 2000 | 209 | 49278099 | 49279466 | 1368 | 257 | 50485602 | 50486278 | 677 |
| 162 | 45541128 | 45541279 | 152 | 210 | 49279468 | 49280014 | 547 | 258 | 50486312 | 50487561 | 1250 |
| 163 | 45541373 | 45541465 | 93 | 211 | 49280078 | 49280244 | 167 | 259 | 50487562 | 50491937 | 4376 |
| 164 | 45542438 | 45542526 | 89 | 212 | 49328186 | 49329230 | 1045 | 260 | 50491942 | 50494638 | 2697 |
| 165 | 45542683 | 45542832 | 150 | 213 | 49344204 | 49344970 | 767 | 261 | 50556144 | 50558242 | 2099 |
| 166 | 46388111 | 46388894 | 784 | 214 | 49401405 | 49403350 | 1946 | 262 | 50639615 | 50641464 | 1850 |
| 167 | 46388942 | 46391592 | 2651 | 215 | 49403630 | 49403825 | 196 | 263 | 50641465 | 50641905 | 441 |
| 168 | 46391599 | 46392344 | 746 | 216 | 49434181 | 49436272 | 2092 | 264 | 50646304 | 50647167 | 864 |
| 169 | 46412002 | 46414384 | 2383 | 217 | 49474147 | 49476234 | 2088 | 265 | 50757735 | 50757817 | 83 |
| 170 | 46501994 | 46503053 | 1060 | 218 | 49482633 | 49484718 | 2086 | 266 | 51157511 | 51157785 | 275 |
| 171 | 46503061 | 46503137 | 77 | 219 | 49533579 | 49534590 | 1012 | 267 | 51158924 | 51159067 | 144 |
| 172 | 46503235 | 46504061 | 827 | 220 | 49561387 | 49561917 | 531 | 268 | 51159174 | 51159269 | 96 |
| 173 | 46504125 | 46505042 | 918 | 221 | 49561976 | 49563448 | 1473 | 269 | 51159360 | 51159513 | 154 |
| 174 | 46505239 | 46506193 | 955 | 222 | 49586238 | 49587039 | 802 | 270 | 51159525 | 51159638 | 114 |
| 175 | 47123868 | 47124016 | 149 | 223 | 49587047 | 49587188 | 142 | 271 | 51218011 | 51220094 | 2084 |
| 176 | 47124036 | 47124190 | 155 | 224 | 49587479 | 49588313 | 835 | 272 | 51233696 | 51234237 | 542 |
| 177 | 47124268 | 47124375 | 108 | 225 | 49665093 | 49665825 | 733 | 273 | 51234828 | 51235770 | 943 |
| 178 | 47125637 | 47126419 | 783 | 226 | 49666368 | 49667087 | 720 | 274 | 51240826 | 51241547 | 722 |
| 179 | 47126705 | 47126812 | 108 | 227 | 49697599 | 49699681 | 2083 | 275 | 51241551 | 51243071 | 1521 |
| 180 | 47126875 | 47127427 | 553 | 228 | 49791734 | 49792257 | 524 | 276 | 51243353 | 51243834 | 482 |
| 181 | 47127440 | 47127551 | 112 | 229 | 49792266 | 49793816 | 1551 | 277 | 51496355 | 51496465 | 111 |
| 182 | 47127890 | 47127965 | 76 | 230 | 49812695 | 49814224 | 1530 | 278 | 51497435 | 51497531 | 97 |
| 183 | 47128022 | 47128101 | 80 | 231 | 49814251 | 49814496 | 246 | 279 | 51497685 | 51497828 | 144 |
| 184 | 47128199 | 47128547 | 349 | 232 | 49993014 | 49993764 | 751 | 280 | 51677829 | 51679911 | 2083 |
| 185 | 47128550 | 47128782 | 233 | 233 | 49993779 | 49994218 | 440 | 281 | 51847682 | 51848223 | 542 |
| 186 | 47973886 | 47975621 | 1736 | 234 | 49994224 | 49995088 | 865 | 282 | 52052431 | 52055272 | 2842 |
| 187 | 48010447 | 48011463 | 1017 | 235 | 50011512 | 50012405 | 894 | 283 | 52089440 | 52089523 | 84 |
| 188 | 48011507 | 48012531 | 1025 | 236 | 50012479 | 50013604 | 1126 | 284 | 52089771 | 52089865 | 95 |
| 189 | 48036314 | 48038391 | 2078 | 237 | 50045758 | 50046064 | 307 | 285 | 52089867 | 52089959 | 93 |
| 190 | 48048638 | 48049501 | 864 | 238 | 50046081 | 50046717 | 637 | 286 | 52167949 | 52168035 | 87 |
| 191 | 48058373 | 48058661 | 289 | 239 | 50046791 | 50047844 | 1054 | 287 | 52168269 | 52168355 | 87 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|
| 288 | 52169259 | 52169384 | 126 | 335 | 57026554 | 57026627 | 74 | 382 | 61140187 | 61141097 | 911 |
| 289 | 52169474 | 52169636 | 163 | 336 | 57026655 | 57026735 | 81 | 383 | 61165218 | 61166260 | 1043 |
| 290 | 52169679 | 52169788 | 110 | 337 | 57026787 | 57027219 | 433 | 384 | 61166461 | 61166535 | 75 |
| 291 | 52169816 | 52169946 | 131 | 338 | 57027282 | 57027565 | 284 | 385 | 61166563 | 61167304 | 742 |
| 292 | 52169964 | 52170174 | 211 | 339 | 57027604 | 57027908 | 305 | 386 | 61335618 | 61337583 | 1966 |
| 293 | 52279923 | 52282090 | 2168 | 340 | 57027927 | 57028098 | 172 | 387 | 61337608 | 61338350 | 743 |
| 294 | 52289205 | 52289915 | 711 | 341 | 57057161 | 57057298 | 138 | 388 | 61485099 | 61485963 | 865 |
| 295 | 52289929 | 52290407 | 479 | 342 | 57057403 | 57057586 | 184 | 389 | 61486239 | 61486543 | 305 |
| 296 | 52290426 | 52291259 | 834 | 343 | 57057746 | 57057824 | 79 | 390 | 61486769 | 61487183 | 415 |
| 297 | 52314894 | 52316972 | 2079 | 344 | 57057883 | 57057979 | 97 | 391 | 61509955 | 61510880 | 926 |
| 298 | 52419579 | 52419697 | 119 | 345 | 57058027 | 57058212 | 186 | 392 | 61511150 | 61513691 | 2542 |
| 299 | 52419729 | 52420388 | 660 | 346 | 57058283 | 57058369 | 87 | 393 | 61513695 | 61513901 | 207 |
| 300 | 52420399 | 52420530 | 132 | 347 | 57058475 | 57058577 | 103 | 394 | 61568614 | 61571328 | 2715 |
| 301 | 52420534 | 52421091 | 558 | 348 | 57058823 | 57059175 | 353 | 395 | 61571344 | 61572273 | 930 |
| 302 | 52421109 | 52421798 | 690 | 349 | 57060304 | 57061256 | 953 | 396 | 61583502 | 61584290 | 789 |
| 303 | 52502811 | 52504892 | 2082 | 350 | 57788975 | 57791395 | 2421 | 397 | 61584560 | 61585351 | 792 |
| 304 | 52727790 | 52728987 | 1198 | 351 | 57791400 | 57791776 | 377 | 398 | 61708858 | 61709856 | 999 |
| 305 | 52729254 | 52729874 | 621 | 352 | 57792075 | 57792412 | 338 | 399 | 61710095 | 61710943 | 849 |
| 306 | 53069238 | 53069536 | 299 | 353 | 57792420 | 57792571 | 152 | 400 | 61818968 | 61820496 | 1529 |
| 307 | 53069543 | 53070152 | 610 | 354 | 59536344 | 59536834 | 491 | 401 | 61820564 | 61821019 | 456 |
| 308 | 53070153 | 53071126 | 974 | 355 | 59673266 | 59673360 | 95 | 402 | 62112500 | 62112603 | 104 |
| 309 | 53128807 | 53130796 | 1990 | 356 | 59696969 | 59697257 | 289 | 403 | 62112685 | 62114268 | 1584 |
| 310 | 53232801 | 53234876 | 2076 | 357 | 59697269 | 59697451 | 183 | 404 | 62114416 | 62114603 | 188 |
| 311 | 53474996 | 53477166 | 2171 | 358 | 59697474 | 59697661 | 188 | 405 | 62114619 | 62114733 | 115 |
| 312 | 53742500 | 53742763 | 264 | 359 | 59697713 | 59698508 | 796 | 406 | 62162745 | 62163411 | 667 |
| 313 | 53742772 | 53744864 | 2093 | 360 | 59698509 | 59699437 | 929 | 407 | 62206572 | 62207120 | 549 |
| 314 | 54200917 | 54202258 | 1342 | 361 | 59763239 | 59763800 | 562 | 408 | 62207282 | 62207450 | 169 |
| 315 | 54202260 | 54202991 | 732 | 362 | 59763824 | 59763989 | 166 | 409 | 62207657 | 62208868 | 1212 |
| 316 | 54280843 | 54280978 | 136 | 363 | 59764053 | 59765320 | 1268 | 410 | 62208871 | 62209138 | 268 |
| 317 | 54281028 | 54281173 | 146 | 364 | 59789132 | 59790203 | 1072 | 411 | 62209142 | 62210433 | 1292 |
| 318 | 54281193 | 54281363 | 171 | 365 | 59790216 | 59790416 | 201 | 412 | 62342285 | 62342640 | 356 |
| 319 | 54281368 | 54281510 | 143 | 366 | 59790697 | 59791217 | 521 | 413 | 62342661 | 62343613 | 953 |
| 320 | 54281705 | 54282570 | 866 | 367 | 59813634 | 59814593 | 960 | 414 | 62343650 | 62344209 | 560 |
| 321 | 54282577 | 54282900 | 324 | 368 | 59814622 | 59815734 | 1113 | 415 | 62373269 | 62375526 | 2258 |
| 322 | 55334431 | 55335104 | 674 | 369 | 59941364 | 59941862 | 499 | 416 | 62430190 | 62430782 | 593 |
| 323 | 55335391 | 55335766 | 376 | 370 | 59941865 | 59942480 | 616 | 417 | 62430850 | 62432683 | 1834 |
| 324 | 55335771 | 55336502 | 732 | 371 | 59942485 | 59943472 | 988 | 418 | 62860547 | 62860825 | 279 |
| 325 | 56037178 | 56037702 | 525 | 372 | 60221836 | 60222356 | 521 | 419 | 62860827 | 62861486 | 660 |
| 326 | 56037713 | 56037963 | 251 | 373 | 60222605 | 60223558 | 954 | 420 | 62861596 | 62861697 | 102 |
| 327 | 56038080 | 56038172 | 93 | 374 | 60223575 | 60223834 | 260 | 421 | 62861879 | 62862631 | 753 |
| 328 | 56038383 | 56038587 | 205 | 375 | 60604808 | 60606517 | 1710 | 422 | 62882455 | 62883928 | 1474 |
| 329 | 56038603 | 56039251 | 649 | 376 | 60606533 | 60607120 | 588 | 423 | 62883932 | 62884738 | 807 |
| 330 | 56230407 | 56231471 | 1065 | 377 | 60607123 | 60607552 | 430 | 424 | 63091176 | 63093131 | 1956 |
| 331 | 56231479 | 56232592 | 1114 | 378 | 60791808 | 60792803 | 996 | 425 | 63093145 | 63093279 | 135 |
| 332 | 57026027 | 57026179 | 153 | 379 | 60792808 | 60793881 | 1074 | 426 | 63101094 | 63102951 | 1858 |
| 333 | 57026180 | 57026266 | 87 | 380 | 61113558 | 61115622 | 2065 | 427 | 63329901 | 63331742 | 1842 |
| 334 | 57026329 | 57026539 | 211 | 381 | 61138571 | 61140160 | 1590 | 428 | 63331748 | 63331967 | 220 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|
| 429 | 63332848 | 63333316 | 469 | 476 | 64562236 | 64563201 | 966 | 523 | 69237036 | 69237218 | 183 |
| 430 | 63355151 | 63355957 | 807 | 477 | 64563231 | 64563591 | 361 | 524 | 69237301 | 69238373 | 1073 |
| 431 | 63355981 | 63356348 | 368 | 478 | 64644249 | 64644726 | 478 | 525 | 69238384 | 69238796 | 413 |
| 432 | 63356746 | 63357226 | 481 | 479 | 64644744 | 64644967 | 224 | 526 | 69254819 | 69255061 | 243 |
| 433 | 63477431 | 63478636 | 1206 | 480 | 64645013 | 64645466 | 454 | 527 | 69255188 | 69255301 | 114 |
| 434 | 63478646 | 63479511 | 866 | 481 | 64645494 | 64646205 | 712 | 528 | 69255329 | 69255539 | 211 |
| 435 | 63544435 | 63544518 | 84 | 482 | 64698448 | 64699384 | 937 | 529 | 69255699 | 69255903 | 205 |
| 436 | 63545135 | 63546036 | 902 | 483 | 64699408 | 64699972 | 565 | 530 | 69256588 | 69256682 | 95 |
| 437 | 63546045 | 63546169 | 125 | 484 | 64700307 | 64700394 | 88 | 531 | 69256739 | 69256873 | 135 |
| 438 | 63665562 | 63666143 | 582 | 485 | 64802266 | 64804348 | 2083 | 532 | 69267329 | 69268160 | 832 |
| 439 | 63666233 | 63666413 | 181 | 486 | 64855547 | 64855877 | 331 | 533 | 69268164 | 69268254 | 91 |
| 440 | 63666456 | 63666675 | 220 | 487 | 64856128 | 64856201 | 74 | 534 | 69268544 | 69268644 | 101 |
| 441 | 63666679 | 63666767 | 89 | 488 | 64856428 | 64857085 | 658 | 535 | 69268844 | 69269129 | 286 |
| 442 | 63666778 | 63666896 | 119 | 489 | 64857097 | 64857187 | 91 | 536 | 69269209 | 69269425 | 217 |
| 443 | 63666903 | 63667016 | 114 | 490 | 64857208 | 64857330 | 123 | 537 | 69313003 | 69315218 | 2216 |
| 444 | 63667018 | 63667563 | 546 | 491 | 64857353 | 64857461 | 109 | 538 | 69320106 | 69320245 | 140 |
| 445 | 63697922 | 63699295 | 1374 | 492 | 64894827 | 64896783 | 1957 | 539 | 69320818 | 69321773 | 956 |
| 446 | 63699305 | 63699998 | 694 | 493 | 64896792 | 64896998 | 207 | 540 | 69334638 | 69336124 | 1487 |
| 447 | 63778228 | 63778736 | 509 | 494 | 64949632 | 64950228 | 597 | 541 | 69336153 | 69336343 | 191 |
| 448 | 63779049 | 63779810 | 762 | 495 | 64950279 | 64952050 | 1772 | 542 | 69399582 | 69400084 | 503 |
| 449 | 63779832 | 63779979 | 148 | 496 | 64990788 | 64991517 | 730 | 543 | 69400382 | 69400693 | 312 |
| 450 | 63780054 | 63780310 | 257 | 497 | 64991531 | 64992027 | 497 | 544 | 69400700 | 69401150 | 451 |
| 451 | 63802437 | 63803088 | 652 | 498 | 64992303 | 64992841 | 539 | 545 | 69401152 | 69401316 | 165 |
| 452 | 63803097 | 63803329 | 233 | 499 | 65051626 | 65052476 | 851 | 546 | 69401317 | 69401637 | 321 |
| 453 | 63803352 | 63804198 | 847 | 500 | 65052759 | 65053521 | 763 | 547 | 69437250 | 69437470 | 221 |
| 454 | 63804202 | 63805606 | 1405 | 501 | 65053559 | 65053707 | 149 | 548 | 69437845 | 69438184 | 340 |
| 455 | 63805643 | 63806491 | 849 | 502 | 65059832 | 65060856 | 1025 | 549 | 69438255 | 69438373 | 119 |
| 456 | 63948667 | 63950047 | 1381 | 503 | 65241458 | 65241527 | 70 | 550 | 69438655 | 69438728 | 74 |
| 457 | 63950092 | 63950310 | 219 | 504 | 65626550 | 65626664 | 115 | 551 | 69438993 | 69439055 | 63 |
| 458 | 63950422 | 63950490 | 69 | 505 | 65626675 | 65626751 | 77 | 552 | 69469191 | 69470380 | 1190 |
| 459 | 63950508 | 63950603 | 96 | 506 | 65626795 | 65626871 | 77 | 553 | 69470730 | 69471260 | 531 |
| 460 | 64071999 | 64072417 | 419 | 507 | 65626915 | 65626989 | 75 | 554 | 69504370 | 69505862 | 1493 |
| 461 | 64072424 | 64073273 | 850 | 508 | 66483650 | 66483722 | 73 | 555 | 69506145 | 69506292 | 148 |
| 462 | 64073299 | 64074222 | 924 | 509 | 66483725 | 66483807 | 83 | 556 | 69506305 | 69506503 | 199 |
| 463 | 64232986 | 64233570 | 585 | 510 | 66483826 | 66483916 | 91 | 557 | 69506546 | 69506616 | 71 |
| 464 | 64233575 | 64235305 | 1731 | 511 | 66484029 | 66484103 | 75 | 558 | 69534370 | 69534554 | 185 |
| 465 | 64235313 | 64235854 | 542 | 512 | 67508317 | 67508426 | 110 | 559 | 69534833 | 69534987 | 155 |
| 466 | 64244618 | 64247067 | 2450 | 513 | 67508427 | 67510039 | 1613 | 560 | 69535023 | 69536012 | 990 |
| 467 | 64247072 | 64247533 | 462 | 514 | 67510047 | 67510120 | 74 | 561 | 69536068 | 69536993 | 926 |
| 468 | 64247540 | 64248266 | 727 | 515 | 67510137 | 67510396 | 260 | 562 | 69537455 | 69538473 | 1019 |
| 469 | 64248272 | 64248814 | 543 | 516 | 68354251 | 68356338 | 2088 | 563 | 69538775 | 69539780 | 1006 |
| 470 | 64538506 | 64538599 | 94 | 517 | 69094894 | 69096332 | 1439 | 564 | 69586297 | 69587334 | 1038 |
| 471 | 64538630 | 64538903 | 274 | 518 | 69096339 | 69096981 | 643 | 565 | 69587671 | 69588375 | 705 |
| 472 | 64539160 | 64539451 | 292 | 519 | 69125386 | 69126479 | 1094 | 566 | 69660853 | 69663395 | 2543 |
| 473 | 64539964 | 64540125 | 162 | 520 | 69126483 | 69127466 | 984 | 567 | 69708745 | 69708867 | 123 |
| 474 | 64561508 | 64562111 | 604 | 521 | 69193802 | 69194304 | 503 | 568 | 69708890 | 69708967 | 78 |
| 475 | 64562121 | 64562211 | 91 | 522 | 69194305 | 69194375 | 71 | 569 | 69726350 | 69726496 | 147 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|
| 570 | 69726632 | 69727599 | 968 | 618 | 70256790 | 70257424 | 635 | 666 | 70839698 | 70840008 | 311 |
| 571 | 69728227 | 69728422 | 196 | 619 | 70258030 | 70258246 | 217 | 667 | 70840288 | 70840526 | 239 |
| 572 | 69736095 | 69736811 | 717 | 620 | 70275785 | 70275888 | 104 | 668 | 70846130 | 70848216 | 2087 |
| 573 | 69737082 | 69737259 | 178 | 621 | 70276192 | 70277102 | 911 | 669 | 70879684 | 70880027 | 344 |
| 574 | 69737552 | 69738177 | 626 | 622 | 70329492 | 70331566 | 2075 | 670 | 70880607 | 70882026 | 1420 |
| 575 | 69760550 | 69760664 | 115 | 623 | 70340971 | 70341474 | 504 | 671 | 70998620 | 70999188 | 569 |
| 576 | 69760900 | 69762883 | 1984 | 624 | 70341485 | 70341968 | 484 | 672 | 71001888 | 71004065 | 2178 |
| 577 | 69762890 | 69764196 | 1307 | 625 | 70342261 | 70342959 | 699 | 673 | 71004312 | 71004658 | 347 |
| 578 | 69806979 | 69807275 | 297 | 626 | 70342976 | 70343050 | 75 | 674 | 71007547 | 71008694 | 1148 |
| 579 | 69807289 | 69807912 | 624 | 627 | 70384353 | 70384476 | 124 | 675 | 71058463 | 71059780 | 1318 |
| 580 | 69807922 | 69808520 | 599 | 628 | 70385052 | 70385117 | 66 | 676 | 71059799 | 71060930 | 1132 |
| 581 | 69808524 | 69809059 | 536 | 629 | 70385168 | 70385243 | 76 | 677 | 71230105 | 71231602 | 1498 |
| 582 | 69836164 | 69837504 | 1341 | 630 | 70385332 | 70386529 | 1198 | 678 | 71231625 | 71232896 | 1272 |
| 583 | 69837772 | 69837940 | 169 | 631 | 70416954 | 70417737 | 784 | 679 | 71480814 | 71482577 | 1764 |
| 584 | 69838248 | 69838388 | 141 | 632 | 70417824 | 70417901 | 78 | 680 | 71482583 | 71483814 | 1232 |
| 585 | 69890460 | 69890541 | 82 | 633 | 70418048 | 70418128 | 81 | 681 | 71553319 | 71554720 | 1402 |
| 586 | 69890560 | 69890641 | 82 | 634 | 70418139 | 70419362 | 1224 | 682 | 71554941 | 71555057 | 117 |
| 587 | 69890680 | 69891257 | 578 | 635 | 70516592 | 70517022 | 431 | 683 | 71562027 | 71562867 | 841 |
| 588 | 69901128 | 69901931 | 804 | 636 | 70517328 | 70518371 | 1044 | 684 | 71562924 | 71563278 | 355 |
| 589 | 69902007 | 69902240 | 234 | 637 | 70551739 | 70552244 | 506 | 685 | 71563584 | 71563838 | 255 |
| 590 | 69902485 | 69902908 | 424 | 638 | 70552519 | 70552625 | 107 | 686 | 71564108 | 71564178 | 71 |
| 591 | 69903173 | 69903421 | 249 | 639 | 70552809 | 70554435 | 1627 | 687 | 71575177 | 71575939 | 763 |
| 592 | 69931367 | 69931441 | 75 | 640 | 70608449 | 70609000 | 552 | 688 | 71575947 | 71577643 | 1697 |
| 593 | 69931510 | 69931688 | 179 | 641 | 70609264 | 70610534 | 1271 | 689 | 71577922 | 71578029 | 108 |
| 594 | 69931980 | 69932294 | 315 | 642 | 70648515 | 70648596 | 82 | 690 | 71591130 | 71591413 | 284 |
| 595 | 69932755 | 69933442 | 688 | 643 | 70648870 | 70649112 | 243 | 691 | 71591417 | 71591646 | 230 |
| 596 | 69956920 | 69957501 | 582 | 644 | 70649385 | 70650597 | 1213 | 692 | 71591672 | 71591820 | 149 |
| 597 | 69958092 | 69958188 | 97 | 645 | 70698296 | 70698460 | 165 | 693 | 71591887 | 71591991 | 105 |
| 598 | 69958812 | 69959003 | 192 | 646 | 70698742 | 70698918 | 177 | 694 | 71592267 | 71592592 | 326 |
| 599 | 69959017 | 69959107 | 91 | 647 | 70699192 | 70699915 | 724 | 695 | 71592622 | 71592921 | 300 |
| 600 | 69988577 | 69988786 | 210 | 648 | 70716991 | 70717063 | 73 | 696 | 71593182 | 71593290 | 109 |
| 601 | 69989068 | 69989955 | 888 | 649 | 70717226 | 70717348 | 123 | 697 | 71593314 | 71593481 | 168 |
| 602 | 69989978 | 69990856 | 879 | 650 | 70717351 | 70717452 | 102 | 698 | 71593503 | 71593577 | 75 |
| 603 | 70149622 | 70149743 | 122 | 651 | 70717461 | 70717535 | 75 | 699 | 71593876 | 71594116 | 241 |
| 604 | 70150624 | 70151632 | 1009 | 652 | 70717536 | 70717640 | 105 | 700 | 71594126 | 71594323 | 198 |
| 605 | 70165441 | 70165630 | 190 | 653 | 70717881 | 70718126 | 246 | 701 | 71599690 | 71600687 | 998 |
| 606 | 70165894 | 70166360 | 467 | 654 | 70718235 | 70718551 | 317 | 702 | 71600975 | 71601460 | 486 |
| 607 | 70166369 | 70166440 | 72 | 655 | 70718815 | 70719043 | 229 | 703 | 71601470 | 71601818 | 349 |
| 608 | 70166521 | 70166996 | 476 | 656 | 70729852 | 70729926 | 75 | 704 | 71662371 | 71663052 | 682 |
| 609 | 70183396 | 70184293 | 898 | 657 | 70729932 | 70730147 | 216 | 705 | 71663070 | 71664202 | 1133 |
| 610 | 70184325 | 70185455 | 1131 | 658 | 70730466 | 70730734 | 269 | 706 | 71664206 | 71664550 | 345 |
| 611 | 70187536 | 70187650 | 115 | 659 | 70744066 | 70744355 | 290 | 707 | 71684737 | 71685741 | 1005 |
| 612 | 70188120 | 70188192 | 73 | 660 | 70744800 | 70746135 | 1336 | 708 | 71695613 | 71697685 | 2073 |
| 613 | 70188706 | 70188910 | 205 | 661 | 70747078 | 70749408 | 2331 | 709 | 71713408 | 71713920 | 513 |
| 614 | 70189396 | 70189483 | 88 | 662 | 70792855 | 70793167 | 313 | 710 | 71810870 | 71812172 | 1303 |
| 615 | 70189511 | 70189577 | 67 | 663 | 70793428 | 70794929 | 1502 | 711 | 71812180 | 71812899 | 720 |
| 616 | 70255894 | 70256252 | 359 | 664 | 70838348 | 70839448 | 1101 | 712 | 71813160 | 71813576 | 417 |
| 617 | 70256545 | 70256683 | 139 | 665 | 70839477 | 70839621 | 145 | 713 | 71813644 | 71813904 | 261 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|
| 714 | 71817663 | 71817752 | 90 | 762 | 73281889 | 73282656 | 768 | 810 | 74084315 | 74085029 | 715 |
| 715 | 71817753 | 71817856 | 104 | 763 | 73318452 | 73318984 | 533 | 811 | 74085275 | 74085522 | 248 |
| 716 | 71818483 | 71818570 | 88 | 764 | 73392630 | 73392711 | 82 | 812 | 74120380 | 74120855 | 476 |
| 717 | 71818657 | 71818732 | 76 | 765 | 73392896 | 73393964 | 1069 | 813 | 74121135 | 74122631 | 1497 |
| 718 | 71819093 | 71819164 | 72 | 766 | 73393976 | 73394104 | 129 | 814 | 74321799 | 74321918 | 120 |
| 719 | 71819313 | 71819382 | 70 | 767 | 73394113 | 73394811 | 699 | 815 | 74321930 | 74322419 | 490 |
| 720 | 71819461 | 71819570 | 110 | 768 | 73437114 | 73438416 | 1303 | 816 | 74322685 | 74323296 | 612 |
| 721 | 71819602 | 71819676 | 75 | 769 | 73516763 | 73517517 | 755 | 817 | 74323301 | 74323873 | 573 |
| 722 | 71832383 | 71833023 | 641 | 770 | 73517518 | 73518393 | 876 | 818 | 74383992 | 74385416 | 1425 |
| 723 | 71833093 | 71833977 | 885 | 771 | 73518398 | 73519352 | 955 | 819 | 74385692 | 74386078 | 387 |
| 724 | 71833988 | 71834609 | 622 | 772 | 73519358 | 73519935 | 578 | 820 | 74511978 | 74512644 | 667 |
| 725 | 71870025 | 71870713 | 689 | 773 | 73519943 | 73520299 | 357 | 821 | 74512804 | 74513544 | 741 |
| 726 | 71870721 | 71872573 | 1853 | 774 | 73609087 | 73609772 | 686 | 822 | 74513559 | 74513893 | 335 |
| 727 | 71872872 | 71872966 | 95 | 775 | 73610062 | 73610129 | 68 | 823 | 74525820 | 74527997 | 2178 |
| 728 | 71888003 | 71888516 | 514 | 776 | 73610392 | 73610570 | 179 | 824 | 74530796 | 74530870 | 75 |
| 729 | 71907025 | 71909093 | 2069 | 777 | 73610572 | 73610743 | 172 | 825 | 74531806 | 74532012 | 207 |
| 730 | 72031971 | 72034067 | 2097 | 778 | 73611017 | 73611150 | 134 | 826 | 74532391 | 74532584 | 194 |
| 731 | 72101125 | 72103033 | 1909 | 779 | 73643250 | 73643372 | 123 | 827 | 74538871 | 74538967 | 97 |
| 732 | 72201556 | 72203414 | 1859 | 780 | 73643970 | 73644138 | 169 | 828 | 74539709 | 74540607 | 899 |
| 733 | 72203421 | 72203636 | 216 | 781 | 73644430 | 73644896 | 467 | 829 | 74540611 | 74540749 | 139 |
| 734 | 72214638 | 72216691 | 2054 | 782 | 73645170 | 73645365 | 196 | 830 | 74555726 | 74555929 | 204 |
| 735 | 72244186 | 72244994 | 809 | 783 | 73645370 | 73646967 | 1598 | 831 | 74555941 | 74556741 | 801 |
| 736 | 72245117 | 72245752 | 636 | 784 | 73647245 | 73647584 | 340 | 832 | 74557156 | 74557273 | 118 |
| 737 | 72245757 | 72246334 | 578 | 785 | 73648970 | 73649237 | 268 | 833 | 74557375 | 74557502 | 128 |
| 738 | 72317608 | 72318604 | 997 | 786 | 73649511 | 73649788 | 278 | 834 | 74596384 | 74596470 | 87 |
| 739 | 72318623 | 72320081 | 1459 | 787 | 73650400 | 73650483 | 84 | 835 | 74596590 | 74596662 | 73 |
| 740 | 72640752 | 72641617 | 866 | 788 | 73650486 | 73650560 | 75 | 836 | 74597095 | 74597936 | 842 |
| 741 | 72641622 | 72643443 | 1822 | 789 | 73650621 | 73650705 | 85 | 837 | 74597940 | 74598083 | 144 |
| 742 | 72643517 | 72643914 | 398 | 790 | 73650956 | 73651030 | 75 | 838 | 74598110 | 74598809 | 700 |
| 743 | 72644016 | 72645549 | 1534 | 791 | 73702138 | 73704734 | 2597 | 839 | 74599110 | 74599231 | 122 |
| 744 | 72645597 | 72645892 | 296 | 792 | 73727370 | 73728082 | 713 | 840 | 74602929 | 74603115 | 187 |
| 745 | 72645893 | 72646030 | 138 | 793 | 73749298 | 73749893 | 596 | 841 | 74603120 | 74603428 | 309 |
| 746 | 72647083 | 72647456 | 374 | 794 | 73783777 | 73784942 | 1166 | 842 | 74603439 | 74603514 | 76 |
| 747 | 72647460 | 72647797 | 338 | 795 | 73784976 | 73785506 | 531 | 843 | 74603650 | 74603755 | 106 |
| 748 | 72747493 | 72748145 | 653 | 796 | 73785792 | 73786359 | 568 | 844 | 74603795 | 74603879 | 85 |
| 749 | 72748438 | 72749564 | 1127 | 797 | 73820181 | 73820900 | 720 | 845 | 74603880 | 74604816 | 937 |
| 750 | 72825152 | 72825455 | 304 | 798 | 73821223 | 73821623 | 401 | 846 | 74604833 | 74604902 | 70 |
| 751 | 72825457 | 72827987 | 2531 | 799 | 73821627 | 73821773 | 147 | 847 | 74621584 | 74621674 | 91 |
| 752 | 73105956 | 73106132 | 177 | 800 | 73821848 | 73822055 | 208 | 848 | 74621999 | 74622387 | 389 |
| 753 | 73106382 | 73107532 | 1151 | 801 | 74011022 | 74011120 | 99 | 849 | 74622428 | 74623275 | 848 |
| 754 | 73107677 | 73107791 | 115 | 802 | 74011377 | 74011692 | 316 | 850 | 74623323 | 74623600 | 278 |
| 755 | 73167039 | 73169120 | 2082 | 803 | 74011982 | 74012243 | 262 | 851 | 74676655 | 74676818 | 164 |
| 756 | 73202797 | 73203813 | 1017 | 804 | 74012632 | 74012864 | 233 | 852 | 74676860 | 74677219 | 360 |
| 757 | 73203842 | 73204880 | 1039 | 805 | 74012897 | 74013051 | 155 | 853 | 74678078 | 74678712 | 635 |
| 758 | 73240860 | 73242217 | 1358 | 806 | 74055298 | 74056452 | 1155 | 854 | 74678961 | 74679037 | 77 |
| 759 | 73242223 | 73242586 | 364 | 807 | 74056742 | 74056887 | 146 | 855 | 74679047 | 74679134 | 88 |
| 760 | 73280464 | 73281346 | 883 | 808 | 74057191 | 74057437 | 247 | 856 | 74679136 | 74679457 | 322 |
| 761 | 73281444 | 73281580 | 137 | 809 | 74083500 | 74084034 | 535 | 857 | 74679505 | 74679578 | 74 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|-----|----------|----------|------------|
| 858 | 74681907 | 74683418 | 1512 | 905 | 75210376 | 75210916 | 541 | 952 | 76640649 | 76640919 | 271 |
| 859 | 74683437 | 74683988 | 552 | 906 | 75211146 | 75212343 | 1198 | 953 | 76640939 | 76641880 | 942 |
| 860 | 74707481 | 74708473 | 993 | 907 | 75213879 | 75214137 | 259 | 954 | 76663853 | 76665261 | 1409 |
| 861 | 74708756 | 74709018 | 263 | 908 | 75214410 | 75216088 | 1679 | 955 | 76665309 | 76666587 | 1279 |
| 862 | 74775150 | 74775251 | 102 | 909 | 75237946 | 75238594 | 649 | 956 | 76667154 | 76667303 | 150 |
| 863 | 74775565 | 74775667 | 103 | 910 | 75238615 | 75239523 | 909 | 957 | 76724461 | 76725122 | 662 |
| 864 | 74776020 | 74776150 | 131 | 911 | 75239753 | 75239959 | 207 | 958 | 76825090 | 76827782 | 2693 |
| 865 | 74776410 | 74776729 | 320 | 912 | 75240653 | 75241848 | 1196 | 959 | 76827800 | 76828244 | 445 |
| 866 | 74776740 | 74777218 | 479 | 913 | 75242132 | 75243047 | 916 | 960 | 76828257 | 76831645 | 3389 |
| 867 | 74787994 | 74789674 | 1681 | 914 | 75303398 | 75304386 | 989 | 961 | 76831655 | 76831800 | 146 |
| 868 | 74789682 | 74790116 | 435 | 915 | 75304388 | 75305279 | 892 | 962 | 76831807 | 76835552 | 3746 |
| 869 | 74790167 | 74790359 | 193 | 916 | 75305448 | 75305673 | 226 | 963 | 76835555 | 76838683 | 3129 |
| 870 | 74790367 | 74790773 | 407 | 917 | 75305788 | 75305883 | 96 | 964 | 76838710 | 76839637 | 928 |
| 871 | 74843268 | 74843806 | 539 | 918 | 75339351 | 75339658 | 308 | 965 | 76859667 | 76861748 | 2082 |
| 872 | 74843808 | 74845315 | 1508 | 919 | 75339666 | 75341854 | 2189 | 966 | 76980675 | 76980931 | 257 |
| 873 | 74857504 | 74858263 | 760 | 920 | 75351996 | 75352207 | 212 | 967 | 76980932 | 76981008 | 77 |
| 874 | 74858538 | 74858611 | 74 | 921 | 75352506 | 75352905 | 400 | 968 | 76981842 | 76982419 | 578 |
| 875 | 74858625 | 74858698 | 74 | 922 | 75353021 | 75353099 | 79 | 969 | 76982437 | 76982688 | 252 |
| 876 | 74858976 | 74859586 | 611 | 923 | 75353391 | 75354076 | 686 | 970 | 77210976 | 77212060 | 1085 |
| 877 | 74862776 | 74864280 | 1505 | 924 | 75426332 | 75426545 | 214 | 971 | 77212065 | 77212196 | 132 |
| 878 | 74864290 | 74864494 | 205 | 925 | 75426828 | 75428610 | 1783 | 972 | 77212243 | 77213058 | 816 |
| 879 | 74864499 | 74864858 | 360 | 926 | 75579436 | 75582364 | 2929 | 973 | 77253212 | 77253292 | 81 |
| 880 | 74924993 | 74927281 | 2289 | 927 | 75605145 | 75605237 | 93 | 974 | 77253707 | 77255075 | 1369 |
| 881 | 74958606 | 74958690 | 85 | 928 | 75605250 | 75605448 | 199 | 975 | 77556530 | 77557046 | 517 |
| 882 | 74958721 | 74958891 | 171 | 929 | 75605545 | 75607033 | 1489 | 976 | 77557066 | 77557452 | 387 |
| 883 | 74959211 | 74960461 | 1251 | 930 | 75799357 | 75800463 | 1107 | 977 | 77557460 | 77558614 | 1155 |
| 884 | 75004974 | 75006260 | 1287 | 931 | 75800624 | 75801331 | 708 | 978 | 77671527 | 77671786 | 260 |
| 885 | 75006286 | 75006676 | 391 | 932 | 75801346 | 75801426 | 81 | 979 | 77672037 | 77672130 | 94 |
| 886 | 75006689 | 75006958 | 270 | 933 | 75979609 | 75979842 | 234 | 980 | 77672132 | 77672453 | 322 |
| 887 | 75054866 | 75055624 | 759 | 934 | 75980106 | 75980641 | 536 | 981 | 77672482 | 77673604 | 1123 |
| 888 | 75055639 | 75056558 | 920 | 935 | 75980726 | 75981187 | 462 | 982 | 77690117 | 77690250 | 134 |
| 889 | 75070975 | 75071933 | 959 | 936 | 75981220 | 75981662 | 443 | 983 | 77690263 | 77690826 | 564 |
| 890 | 75072260 | 75072393 | 134 | 937 | 76253800 | 76256925 | 3126 | 984 | 77691117 | 77691749 | 633 |
| 891 | 75072661 | 75072950 | 290 | 938 | 76266916 | 76267325 | 410 | 985 | 77691962 | 77692195 | 234 |
| 892 | 75080244 | 75081577 | 1334 | 939 | 76267329 | 76267617 | 289 | 986 | 78833252 | 78833341 | 90 |
| 893 | 75085291 | 75086253 | 963 | 940 | 76267624 | 76267839 | 216 | 987 | 78833344 | 78834046 | 703 |
| 894 | 75086721 | 75087002 | 282 | 941 | 76267859 | 76268125 | 267 | 988 | 78834329 | 78835285 | 957 |
| 895 | 75127275 | 75127360 | 86 | 942 | 76268129 | 76268647 | 519 | 989 | 79015267 | 79017350 | 2084 |
| 896 | 75127660 | 75127750 | 91 | 943 | 76268924 | 76268999 | 76 | 990 | 79066067 | 79067248 | 1182 |
| 897 | 75160074 | 75160306 | 233 | 944 | 76473319 | 76473890 | 572 | 991 | 79067280 | 79067358 | 79 |
| 898 | 75162460 | 75163367 | 908 | 945 | 76487742 | 76489651 | 1910 | 992 | 79067382 | 79069650 | 2269 |
| 899 | 75163384 | 75163460 | 77 | 946 | 76528714 | 76530764 | 2051 | 993 | 79140924 | 79141457 | 534 |
| 900 | 75172589 | 75172671 | 83 | 947 | 76538399 | 76539584 | 1186 | 994 | 79206318 | 79206774 | 457 |
| 901 | 75173158 | 75173222 | 65 | 948 | 76539854 | 76540599 | 746 | 995 | 79206785 | 79206860 | 76 |
| 902 | 75173268 | 75174184 | 917 | 949 | 76540854 | 76541997 | 1144 | 996 | 79207104 | 79208286 | 1183 |
| 903 | 75174190 | 75174673 | 484 | 950 | 76639020 | 76639186 | 167 | 997 | 79295093 | 79297167 | 2075 |
| 904 | 75200528 | 75202857 | 2330 | 951 | 76639464 | 76640592 | 1129 | 998 | 79355676 | 79356533 | 858 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|----------|----------|------------|------|----------|----------|------------|------|----------|----------|------------|
| 999 | 79356546 | 79357902 | 1357 | 1046 | 81782263 | 81782345 | 83 | 1093 | 82285435 | 82288377 | 2943 |
| 1000 | 79458715 | 79460222 | 1508 | 1047 | 81782378 | 81782453 | 76 | 1094 | 82391225 | 82391853 | 629 |
| 1001 | 79460555 | 79460706 | 152 | 1048 | 81782457 | 81782557 | 101 | 1095 | 82391980 | 82392176 | 197 |
| 1002 | 79462245 | 79462409 | 165 | 1049 | 81783028 | 81783105 | 78 | 1096 | 82392185 | 82392971 | 787 |
| 1003 | 79463039 | 79464163 | 1125 | 1050 | 81783553 | 81783629 | 77 | 1097 | 82392990 | 82393282 | 293 |
| 1004 | 79732737 | 79733632 | 896 | 1051 | 81826856 | 81826943 | 88 | 1098 | 83623241 | 83625741 | 2501 |
| 1005 | 79795723 | 79797501 | 1779 | 1052 | 81827211 | 81827760 | 550 | 1099 | 83626159 | 83627437 | 1279 |
| 1006 | 79797520 | 79797792 | 273 | 1053 | 81828141 | 81828421 | 281 | 1100 | 83627439 | 83628222 | 784 |
| 1007 | 80178819 | 80179106 | 288 | 1054 | 81828423 | 81829298 | 876 | 1101 | 83798798 | 83800012 | 1215 |
| 1008 | 80179445 | 80180393 | 949 | 1055 | 81829915 | 81830403 | 489 | 1102 | 83800060 | 83800532 | 473 |
| 1009 | 80180440 | 80180900 | 461 | 1056 | 81831005 | 81831074 | 70 | 1103 | 84089387 | 84090611 | 1225 |
| 1010 | 80403258 | 80404051 | 794 | 1057 | 81831415 | 81831518 | 104 | 1104 | 84090877 | 84091038 | 162 |
| 1011 | 80496725 | 80498496 | 1772 | 1058 | 81831528 | 81831991 | 464 | 1105 | 84817458 | 84817534 | 77 |
| 1012 | 80498504 | 80500612 | 2109 | 1059 | 81880156 | 81880593 | 438 | 1106 | 84817678 | 84817937 | 260 |
| 1013 | 80590326 | 80591479 | 1154 | 1060 | 81880981 | 81881330 | 350 | 1107 | 84818218 | 84818610 | 393 |
| 1014 | 80591496 | 80592408 | 913 | 1061 | 81881391 | 81881744 | 354 | 1108 | 84818617 | 84819269 | 653 |
| 1015 | 80671886 | 80672309 | 424 | 1062 | 81881802 | 81881963 | 162 | 1109 | 85468980 | 85470256 | 1277 |
| 1016 | 80672317 | 80673969 | 1653 | 1063 | 81881991 | 81882687 | 697 | 1110 | 85470310 | 85470512 | 203 |
| 1017 | 80775679 | 80776251 | 573 | 1064 | 81954615 | 81956089 | 1475 | 1111 | 85470519 | 85470689 | 171 |
| 1018 | 80776271 | 80776977 | 707 | 1065 | 81956217 | 81956581 | 365 | 1112 | 85470860 | 85470956 | 97 |
| 1019 | 80776993 | 80777429 | 437 | 1066 | 81956862 | 81957528 | 667 | 1113 | 85512546 | 85512644 | 99 |
| 1020 | 80777434 | 80777967 | 534 | 1067 | 81998072 | 81998154 | 83 | 1114 | 85512671 | 85513010 | 340 |
| 1021 | 80873380 | 80875969 | 2590 | 1068 | 81998621 | 81998702 | 82 | 1115 | 85513024 | 85513204 | 181 |
| 1022 | 80875978 | 80876924 | 947 | 1069 | 82001172 | 82001272 | 101 | 1116 | 85513367 | 85514635 | 1269 |
| 1023 | 81576813 | 81576888 | 76 | 1070 | 82038865 | 82039237 | 373 | 1117 | 85751519 | 85751994 | 476 |
| 1024 | 81653459 | 81653575 | 117 | 1071 | 82039239 | 82040027 | 789 | 1118 | 85752178 | 85753594 | 1417 |
| 1025 | 81654334 | 81654422 | 89 | 1072 | 82040044 | 82040948 | 905 | 1119 | 85887617 | 85888180 | 564 |
| 1026 | 81654431 | 81654608 | 178 | 1073 | 82092934 | 82093252 | 319 | 1120 | 85888475 | 85889809 | 1335 |
| 1027 | 81654609 | 81654826 | 218 | 1074 | 82093366 | 82093596 | 231 | 1121 | 85922169 | 85924072 | 1904 |
| 1028 | 81668801 | 81668895 | 95 | 1075 | 82093901 | 82094283 | 383 | 1122 | 85942840 | 85942984 | 145 |
| 1029 | 81669455 | 81670371 | 917 | 1076 | 82094616 | 82095030 | 415 | 1123 | 85942985 | 85945318 | 2334 |
| 1030 | 81670383 | 81670600 | 218 | 1077 | 82104989 | 82105726 | 738 | 1124 | 85974714 | 85976199 | 1486 |
| 1031 | 81696329 | 81697170 | 842 | 1078 | 82105733 | 82106654 | 922 | 1125 | 85976304 | 85976803 | 500 |
| 1032 | 81697426 | 81698268 | 843 | 1079 | 82106723 | 82107826 | 1104 | 1126 | 85990651 | 85992337 | 1687 |
| 1033 | 81698287 | 81699597 | 1311 | 1080 | 82156015 | 82156436 | 422 | 1127 | 85992587 | 85992734 | 148 |
| 1034 | 81699925 | 81700165 | 241 | 1081 | 82156520 | 82157009 | 490 | 1128 | 85993499 | 85995346 | 1848 |
| 1035 | 81700256 | 81700335 | 80 | 1082 | 82157275 | 82157364 | 90 | 1129 | 86076991 | 86077546 | 556 |
| 1036 | 81731160 | 81732304 | 1145 | 1083 | 82157625 | 82157913 | 289 | 1130 | 86077657 | 86077769 | 113 |
| 1037 | 81733062 | 81733420 | 359 | 1084 | 82157915 | 82158912 | 998 | 1131 | 86077852 | 86078926 | 1075 |
| 1038 | 81733430 | 81733563 | 134 | 1085 | 82168189 | 82168723 | 535 | 1132 | 86185739 | 86185810 | 72 |
| 1039 | 81774376 | 81774479 | 104 | 1086 | 82169329 | 82170730 | 1402 | 1133 | 86290335 | 86290929 | 595 |
| 1040 | 81774860 | 81774988 | 129 | 1087 | 82202456 | 82202625 | 170 | 1134 | 87285566 | 87286915 | 1350 |
| 1041 | 81775038 | 81775109 | 72 | 1088 | 82202876 | 82203133 | 258 | 1135 | 87286935 | 87287240 | 306 |
| 1042 | 81775226 | 81775323 | 98 | 1089 | 82203136 | 82203844 | 709 | 1136 | 87287256 | 87287631 | 376 |
| 1043 | 81775803 | 81776104 | 302 | 1090 | 82203861 | 82204771 | 911 | 1137 | 87362337 | 87362478 | 142 |
| 1044 | 81781609 | 81781683 | 75 | 1091 | 82207491 | 82208705 | 1215 | 1138 | 87362480 | 87364410 | 1931 |
| 1045 | 81782124 | 81782214 | 91 | 1092 | 82208748 | 82209562 | 815 | 1139 | 87800640 | 87800711 | 72 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|----------|----------|------------|------|----------|----------|------------|------|----------|----------|------------|
| 1140 | 87800840 | 87801048 | 209 | 1187 | 88720500 | 88721637 | 1138 | 1234 | 90550918 | 90551030 | 113 |
| 1141 | 87801055 | 87801572 | 518 | 1188 | 88769469 | 88769551 | 83 | 1235 | 90551887 | 90553141 | 1255 |
| 1142 | 87801575 | 87802719 | 1145 | 1189 | 88769689 | 88769768 | 80 | 1236 | 90601162 | 90602517 | 1356 |
| 1143 | 88012591 | 88013295 | 705 | 1190 | 88770173 | 88770271 | 99 | 1237 | 90602529 | 90603244 | 716 |
| 1144 | 88013980 | 88015126 | 1147 | 1191 | 88790558 | 88790653 | 96 | 1238 | 90628450 | 90628962 | 513 |
| 1145 | 88015180 | 88016057 | 878 | 1192 | 88791033 | 88791114 | 82 | 1239 | 90628965 | 90629346 | 382 |
| 1146 | 88112868 | 88117664 | 4797 | 1193 | 88791377 | 88791645 | 269 | 1240 | 90629350 | 90630622 | 1273 |
| 1147 | 88126585 | 88127302 | 718 | 1194 | 88792338 | 88792420 | 83 | 1241 | 90649521 | 90650378 | 858 |
| 1148 | 88139200 | 88139755 | 556 | 1195 | 88843448 | 88844096 | 649 | 1242 | 90650381 | 90651331 | 951 |
| 1149 | 88149546 | 88150115 | 570 | 1196 | 88844208 | 88844290 | 83 | 1243 | 90660545 | 90660632 | 88 |
| 1150 | 88150118 | 88151628 | 1511 | 1197 | 88844363 | 88845539 | 1177 | 1244 | 90660638 | 90662613 | 1976 |
| 1151 | 88216745 | 88217262 | 518 | 1198 | 88845648 | 88845781 | 134 | 1245 | 90680881 | 90681562 | 682 |
| 1152 | 88217265 | 88217417 | 153 | 1199 | 88973669 | 88973755 | 87 | 1246 | 90681581 | 90681783 | 203 |
| 1153 | 88217745 | 88217908 | 164 | 1200 | 89253081 | 89255381 | 2301 | 1247 | 90682035 | 90682956 | 922 |
| 1154 | 88218223 | 88218429 | 207 | 1201 | 89312377 | 89312545 | 169 | 1248 | 90701960 | 90703372 | 1413 |
| 1155 | 88236698 | 88237357 | 660 | 1202 | 89312551 | 89312937 | 387 | 1249 | 90703381 | 90703454 | 74 |
| 1156 | 88237643 | 88238223 | 581 | 1203 | 89313038 | 89313274 | 237 | 1250 | 90703708 | 90703985 | 278 |
| 1157 | 88238228 | 88238700 | 473 | 1204 | 89313278 | 89313427 | 150 | 1251 | 90737691 | 90738164 | 474 |
| 1158 | 88270580 | 88271041 | 462 | 1205 | 89313463 | 89314456 | 994 | 1252 | 90738180 | 90739070 | 891 |
| 1159 | 88271046 | 88272212 | 1167 | 1206 | 89407911 | 89409632 | 1722 | 1253 | 90739105 | 90741152 | 2048 |
| 1160 | 88272215 | 88273077 | 863 | 1207 | 89409661 | 89410041 | 381 | 1254 | 90956501 | 90958581 | 2081 |
| 1161 | 88285136 | 88285723 | 588 | 1208 | 89451945 | 89453020 | 1076 | 1255 | 91001094 | 91002229 | 1136 |
| 1162 | 88286016 | 88286635 | 620 | 1209 | 89453045 | 89453947 | 903 | 1256 | 91002550 | 91002966 | 417 |
| 1163 | 88381678 | 88382244 | 567 | 1210 | 89564074 | 89566151 | 2078 | 1257 | 91003070 | 91003150 | 81 |
| 1164 | 88402744 | 88402946 | 203 | 1211 | 89567347 | 89568901 | 1555 | 1258 | 91050143 | 91050452 | 310 |
| 1165 | 88403229 | 88403611 | 383 | 1212 | 89569177 | 89569427 | 251 | 1259 | 91050684 | 91051336 | 653 |
| 1166 | 88403794 | 88403871 | 78 | 1213 | 89611625 | 89613402 | 1778 | 1260 | 91051452 | 91051549 | 98 |
| 1167 | 88403904 | 88403999 | 96 | 1214 | 89613419 | 89613578 | 160 | 1261 | 91051565 | 91051646 | 82 |
| 1168 | 88404134 | 88404829 | 696 | 1215 | 89613985 | 89614121 | 137 | 1262 | 91051652 | 91052159 | 508 |
| 1169 | 88416804 | 88418780 | 1977 | 1216 | 89743887 | 89744641 | 755 | 1263 | 91054149 | 91054346 | 198 |
| 1170 | 88418785 | 88418932 | 148 | 1217 | 89744932 | 89745963 | 1032 | 1264 | 91054349 | 91054498 | 150 |
| 1171 | 88460836 | 88461932 | 1097 | 1218 | 90332381 | 90334304 | 1924 | 1265 | 91054549 | 91054732 | 184 |
| 1172 | 88504838 | 88505611 | 774 | 1219 | 90334920 | 90335367 | 448 | 1266 | 91054739 | 91055267 | 529 |
| 1173 | 88505666 | 88506429 | 764 | 1220 | 90335369 | 90336988 | 1620 | 1267 | 91055269 | 91056227 | 959 |
| 1174 | 88506541 | 88506619 | 79 | 1221 | 90339413 | 90340878 | 1466 | 1268 | 91076461 | 91076578 | 118 |
| 1175 | 88506621 | 88507218 | 598 | 1222 | 90340885 | 90341492 | 608 | 1269 | 91076700 | 91076798 | 99 |
| 1176 | 88637758 | 88637890 | 133 | 1223 | 90404437 | 90404936 | 500 | 1270 | 91076821 | 91076936 | 116 |
| 1177 | 88638194 | 88638295 | 102 | 1224 | 90404977 | 90406042 | 1066 | 1271 | 91077306 | 91078349 | 1044 |
| 1178 | 88638585 | 88639350 | 766 | 1225 | 90406052 | 90406420 | 369 | 1272 | 91080699 | 91080901 | 203 |
| 1179 | 88639403 | 88639493 | 91 | 1226 | 90406427 | 90406506 | 80 | 1273 | 91081236 | 91081325 | 90 |
| 1180 | 88639503 | 88639829 | 327 | 1227 | 90413343 | 90413514 | 172 | 1274 | 91081611 | 91081696 | 86 |
| 1181 | 88689223 | 88689415 | 193 | 1228 | 90413614 | 90414724 | 1111 | 1275 | 91081889 | 91082778 | 890 |
| 1182 | 88692251 | 88693335 | 1085 | 1229 | 90472911 | 90474697 | 1787 | 1276 | 91091906 | 91092862 | 957 |
| 1183 | 88706801 | 88708239 | 1439 | 1230 | 90474701 | 90474811 | 111 | 1277 | 91092957 | 91093982 | 1026 |
| 1184 | 88708241 | 88708903 | 663 | 1231 | 90509589 | 90510762 | 1174 | 1278 | 91126247 | 91128322 | 2076 |
| 1185 | 88716619 | 88716896 | 278 | 1232 | 90510780 | 90511464 | 685 | 1279 | 91140752 | 91140976 | 225 |
| 1186 | 88716937 | 88718763 | 1827 | 1233 | 90511527 | 90511675 | 149 | 1280 | 91141601 | 91142843 | 1243 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|----------|----------|------------|------|----------|----------|------------|------|----------|----------|------------|
| 1281 | 91162233 | 91162327 | 95 | 1328 | 93546656 | 93546735 | 80 | 1375 | 94460695 | 94460952 | 258 |
| 1282 | 91162632 | 91162736 | 105 | 1329 | 93546748 | 93547669 | 922 | 1376 | 94461255 | 94461419 | 165 |
| 1283 | 91162886 | 91163190 | 305 | 1330 | 93547704 | 93547910 | 207 | 1377 | 94582904 | 94583433 | 530 |
| 1284 | 91163235 | 91163311 | 77 | 1331 | 93547924 | 93548712 | 789 | 1378 | 94583440 | 94584398 | 959 |
| 1285 | 91163513 | 91164011 | 499 | 1332 | 93557001 | 93557072 | 72 | 1379 | 94584404 | 94584984 | 581 |
| 1286 | 91164103 | 91165645 | 1543 | 1333 | 93557235 | 93557463 | 229 | 1380 | 94596766 | 94597580 | 815 |
| 1287 | 91284743 | 91286582 | 1840 | 1334 | 93557748 | 93558758 | 1011 | 1381 | 94597587 | 94599047 | 1461 |
| 1288 | 91342037 | 91343756 | 1720 | 1335 | 93657937 | 93658660 | 724 | 1382 | 94809006 | 94809358 | 353 |
| 1289 | 91343781 | 91344103 | 323 | 1336 | 93658668 | 93659244 | 577 | 1383 | 94809378 | 94813277 | 3900 |
| 1290 | 91363205 | 91364264 | 1060 | 1337 | 93659333 | 93659469 | 137 | 1384 | 94815487 | 94816343 | 857 |
| 1291 | 91364540 | 91364671 | 132 | 1338 | 93659513 | 93659883 | 371 | 1385 | 94818047 | 94819056 | 1010 |
| 1292 | 91364685 | 91365277 | 593 | 1339 | 93660032 | 93660135 | 104 | 1386 | 94821458 | 94822662 | 1205 |
| 1293 | 91393080 | 91396727 | 3648 | 1340 | 93660482 | 93660558 | 77 | 1387 | 94822672 | 94825278 | 2607 |
| 1294 | 91447230 | 91448720 | 1491 | 1341 | 93672166 | 93672385 | 220 | 1388 | 95051387 | 95052636 | 1250 |
| 1295 | 91448723 | 91449193 | 471 | 1342 | 93672386 | 93672602 | 217 | 1389 | 95052912 | 95053297 | 386 |
| 1296 | 91449817 | 91450407 | 591 | 1343 | 93672876 | 93674249 | 1374 | 1390 | 95231396 | 95232596 | 1201 |
| 1297 | 91450412 | 91451829 | 1418 | 1344 | 93953497 | 93954415 | 919 | 1391 | 95232641 | 95232943 | 303 |
| 1298 | 91586910 | 91587795 | 886 | 1345 | 93954418 | 93954578 | 161 | 1392 | 95233201 | 95233597 | 397 |
| 1299 | 91913357 | 91914474 | 1118 | 1346 | 93954882 | 93955173 | 292 | 1393 | 95244834 | 95245029 | 196 |
| 1300 | 91914605 | 91914719 | 115 | 1347 | 93955503 | 93955576 | 74 | 1394 | 95245094 | 95245617 | 524 |
| 1301 | 91914807 | 91914877 | 71 | 1348 | 93989063 | 93990034 | 972 | 1395 | 95245644 | 95245712 | 69 |
| 1302 | 91915005 | 91915195 | 191 | 1349 | 94021448 | 94022932 | 1485 | 1396 | 95245879 | 95246904 | 1026 |
| 1303 | 92446033 | 92446111 | 79 | 1350 | 94022933 | 94023525 | 593 | 1397 | 95248252 | 95249270 | 1019 |
| 1304 | 92446116 | 92448076 | 1961 | 1351 | 94039585 | 94042342 | 2758 | 1398 | 95249549 | 95250330 | 782 |
| 1305 | 92606756 | 92607079 | 324 | 1352 | 94082970 | 94083663 | 694 | 1399 | 95259879 | 95260688 | 810 |
| 1306 | 92607101 | 92607779 | 679 | 1353 | 94083915 | 94084257 | 343 | 1400 | 95260972 | 95261345 | 374 |
| 1307 | 92607811 | 92608328 | 518 | 1354 | 94084260 | 94084728 | 469 | 1401 | 95314863 | 95314932 | 70 |
| 1308 | 92608335 | 92609158 | 824 | 1355 | 94170251 | 94170748 | 498 | 1402 | 95315212 | 95317100 | 1889 |
| 1309 | 92620140 | 92620653 | 514 | 1356 | 94191166 | 94191276 | 111 | 1403 | 95350330 | 95352874 | 2545 |
| 1310 | 92620662 | 92622238 | 1577 | 1357 | 94191852 | 94192222 | 371 | 1404 | 95352880 | 95353019 | 140 |
| 1311 | 92629367 | 92630149 | 783 | 1358 | 94192491 | 94192574 | 84 | 1405 | 95356818 | 95356925 | 108 |
| 1312 | 92630461 | 92631438 | 978 | 1359 | 94290550 | 94291919 | 1370 | 1406 | 95357018 | 95357884 | 867 |
| 1313 | 92670463 | 92671587 | 1125 | 1360 | 94292303 | 94292622 | 320 | 1407 | 95358198 | 95358364 | 167 |
| 1314 | 92671707 | 92672396 | 690 | 1361 | 94322844 | 94325291 | 2448 | 1408 | 95358368 | 95358864 | 497 |
| 1315 | 92672497 | 92674110 | 1614 | 1362 | 94341289 | 94341814 | 526 | 1409 | 95360785 | 95360861 | 77 |
| 1316 | 92801250 | 92802876 | 1627 | 1363 | 94341885 | 94341980 | 96 | 1410 | 95361105 | 95362871 | 1767 |
| 1317 | 92802927 | 92803118 | 192 | 1364 | 94342397 | 94343505 | 1109 | 1411 | 95451784 | 95452010 | 227 |
| 1318 | 92803165 | 92803232 | 68 | 1365 | 94419454 | 94419603 | 150 | 1412 | 95452024 | 95452277 | 254 |
| 1319 | 92911207 | 92912622 | 1416 | 1366 | 94419610 | 94419683 | 74 | 1413 | 95452284 | 95452943 | 660 |
| 1320 | 92912631 | 92913907 | 1277 | 1367 | 94419965 | 94420152 | 188 | 1414 | 95452944 | 95453149 | 206 |
| 1321 | 92968800 | 92969828 | 1029 | 1368 | 94420470 | 94420628 | 159 | 1415 | 95453152 | 95453800 | 649 |
| 1322 | 92969836 | 92970971 | 1136 | 1369 | 94420630 | 94420756 | 127 | 1416 | 95506082 | 95508204 | 2123 |
| 1323 | 93158532 | 93160776 | 2245 | 1370 | 94438111 | 94440483 | 2373 | 1417 | 95642175 | 95642254 | 80 |
| 1324 | 93232296 | 93232404 | 109 | 1371 | 94441264 | 94441746 | 483 | 1418 | 95642365 | 95643260 | 896 |
| 1325 | 93232405 | 93233618 | 1214 | 1372 | 94459860 | 94460028 | 169 | 1419 | 95643294 | 95644258 | 965 |
| 1326 | 93233664 | 93234380 | 717 | 1373 | 94460035 | 94460142 | 108 | 1420 | 95711106 | 95711213 | 108 |
| 1327 | 93382290 | 93384377 | 2088 | 1374 | 94460520 | 94460594 | 75 | 1421 | 95711284 | 95711389 | 106 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|----------|----------|------------|------|----------|----------|------------|------|----------|----------|------------|
| 1422 | 95711567 | 95711895 | 329 | 1469 | 96820193 | 96820744 | 552 | 1516 | 97749542 | 97749618 | 77 |
| 1423 | 95711907 | 95712082 | 176 | 1470 | 96933136 | 96933742 | 607 | 1517 | 97749809 | 97749891 | 83 |
| 1424 | 95712622 | 95712821 | 200 | 1471 | 96942399 | 96942572 | 174 | 1518 | 97749929 | 97750079 | 151 |
| 1425 | 95742190 | 95743812 | 1623 | 1472 | 96942577 | 96942881 | 305 | 1519 | 97791591 | 97794286 | 2696 |
| 1426 | 95743825 | 95744273 | 449 | 1473 | 96942892 | 96943577 | 686 | 1520 | 97839509 | 97840109 | 601 |
| 1427 | 95779009 | 95780118 | 1110 | 1474 | 96943591 | 96944753 | 1163 | 1521 | 97860951 | 97861396 | 446 |
| 1428 | 95780119 | 95780287 | 169 | 1475 | 96955488 | 96956119 | 632 | 1522 | 97861441 | 97862556 | 1116 |
| 1429 | 95780294 | 95781092 | 799 | 1476 | 96956122 | 96957135 | 1014 | 1523 | 97862567 | 97862641 | 75 |
| 1430 | 95837477 | 95839371 | 1895 | 1477 | 96957136 | 96957533 | 398 | 1524 | 97862858 | 97863028 | 171 |
| 1431 | 95905129 | 95905329 | 201 | 1478 | 97040140 | 97041261 | 1122 | 1525 | 97878126 | 97878923 | 798 |
| 1432 | 95905459 | 95905531 | 73 | 1479 | 97041265 | 97041904 | 640 | 1526 | 97878931 | 97880431 | 1501 |
| 1433 | 95905722 | 95906190 | 469 | 1480 | 97042181 | 97042285 | 105 | 1527 | 97903545 | 97903892 | 348 |
| 1434 | 95906214 | 95906656 | 443 | 1481 | 97106446 | 97107015 | 570 | 1528 | 97904220 | 97904810 | 591 |
| 1435 | 95906672 | 95907022 | 351 | 1482 | 97107023 | 97107113 | 91 | 1529 | 97904815 | 97905616 | 802 |
| 1436 | 96111154 | 96113245 | 2092 | 1483 | 97107138 | 97108423 | 1286 | 1530 | 98020766 | 98022581 | 1816 |
| 1437 | 96113586 | 96113677 | 92 | 1484 | 97190332 | 97190751 | 420 | 1531 | 98022631 | 98022844 | 214 |
| 1438 | 96113951 | 96114198 | 248 | 1485 | 97190772 | 97192121 | 1350 | 1532 | 98052535 | 98052753 | 219 |
| 1439 | 96150628 | 96150806 | 179 | 1486 | 97192177 | 97192330 | 154 | 1533 | 98053030 | 98053194 | 165 |
| 1440 | 96151086 | 96151448 | 363 | 1487 | 97310365 | 97312696 | 2332 | 1534 | 98053200 | 98054607 | 1408 |
| 1441 | 96151711 | 96153500 | 1790 | 1488 | 97405802 | 97407145 | 1344 | 1535 | 98105686 | 98107758 | 2073 |
| 1442 | 96294629 | 96296092 | 1464 | 1489 | 97407250 | 97407488 | 239 | 1536 | 98108535 | 98110608 | 2074 |
| 1443 | 96338911 | 96339433 | 523 | 1490 | 97407511 | 97407711 | 201 | 1537 | 98262151 | 98263128 | 978 |
| 1444 | 96339721 | 96340752 | 1032 | 1491 | 97407766 | 97407987 | 222 | 1538 | 98263152 | 98265186 | 2035 |
| 1445 | 96340866 | 96340978 | 113 | 1492 | 97443101 | 97444173 | 1073 | 1539 | 98335990 | 98337488 | 1499 |
| 1446 | 96431818 | 96432062 | 245 | 1493 | 97444176 | 97444646 | 471 | 1540 | 98337490 | 98338331 | 842 |
| 1447 | 96432187 | 96432288 | 102 | 1494 | 97444956 | 97445418 | 463 | 1541 | 98367578 | 98367967 | 390 |
| 1448 | 96432344 | 96432426 | 83 | 1495 | 97460156 | 97460467 | 312 | 1542 | 98368038 | 98368190 | 153 |
| 1449 | 96432488 | 96432624 | 137 | 1496 | 97460471 | 97461245 | 775 | 1543 | 98368353 | 98368835 | 483 |
| 1450 | 96432843 | 96433063 | 221 | 1497 | 97461371 | 97461449 | 79 | 1544 | 98368838 | 98369651 | 814 |
| 1451 | 96433308 | 96433550 | 243 | 1498 | 97461484 | 97462053 | 570 | 1545 | 98382260 | 98383315 | 1056 |
| 1452 | 96433618 | 96433712 | 95 | 1499 | 97504066 | 97505626 | 1561 | 1546 | 98383330 | 98384339 | 1010 |
| 1453 | 96433714 | 96433831 | 118 | 1500 | 97505676 | 97506045 | 370 | 1547 | 98418883 | 98419267 | 385 |
| 1454 | 96510825 | 96511171 | 347 | 1501 | 97656375 | 97658191 | 1817 | 1548 | 98419527 | 98419663 | 137 |
| 1455 | 96511175 | 96511689 | 515 | 1502 | 97670272 | 97670648 | 377 | 1549 | 98419928 | 98420893 | 966 |
| 1456 | 96511946 | 96512285 | 340 | 1503 | 97670653 | 97670734 | 82 | 1550 | 98469680 | 98470597 | 918 |
| 1457 | 96512541 | 96512637 | 97 | 1504 | 97670753 | 97670851 | 99 | 1551 | 98470612 | 98471328 | 717 |
| 1458 | 96512676 | 96512754 | 79 | 1505 | 97670867 | 97670946 | 80 | 1552 | 98471331 | 98471618 | 288 |
| 1459 | 96512756 | 96512904 | 149 | 1506 | 97670962 | 97671183 | 222 | 1553 | 98491704 | 98491796 | 93 |
| 1460 | 96686859 | 96687201 | 343 | 1507 | 97671278 | 97671558 | 281 | 1554 | 98492119 | 98492471 | 353 |
| 1461 | 96687205 | 96687616 | 412 | 1508 | 97671698 | 97672267 | 570 | 1555 | 98492474 | 98492954 | 481 |
| 1462 | 96687910 | 96688263 | 354 | 1509 | 97722349 | 97722650 | 302 | 1556 | 98578211 | 98578455 | 245 |
| 1463 | 96688519 | 96688614 | 96 | 1510 | 97722656 | 97723329 | 674 | 1557 | 98578516 | 98578659 | 144 |
| 1464 | 96688655 | 96688731 | 77 | 1511 | 97723621 | 97724298 | 678 | 1558 | 98578666 | 98579464 | 799 |
| 1465 | 96688732 | 96688934 | 203 | 1512 | 97748321 | 97748440 | 120 | 1559 | 98579756 | 98580046 | 291 |
| 1466 | 96818814 | 96819752 | 939 | 1513 | 97748513 | 97748587 | 75 | 1560 | 98580484 | 98581400 | 917 |
| 1467 | 96819778 | 96819953 | 176 | 1514 | 97748958 | 97749201 | 244 | 1561 | 98581404 | 98583300 | 1897 |
| 1468 | 96820019 | 96820187 | 169 | 1515 | 97749337 | 97749470 | 134 | 1562 | 98668899 | 98669043 | 145 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|----------|----------|------------|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|
| 1563 | 98669074 | 98669246 | 173 | 1610 | 99320642 | 99322761 | 2120 | 1657 | 100197826 | 100198137 | 312 |
| 1564 | 98669259 | 98669924 | 666 | 1611 | 99332524 | 99334637 | 2114 | 1658 | 100981997 | 100982700 | 704 |
| 1565 | 98669929 | 98670131 | 203 | 1612 | 99338244 | 99340006 | 1763 | 1659 | 100985004 | 100985681 | 678 |
| 1566 | 98670864 | 98670943 | 80 | 1613 | 99342819 | 99342959 | 141 | 1660 | 100985769 | 100987134 | 1366 |
| 1567 | 98729482 | 98729631 | 150 | 1614 | 99343244 | 99343626 | 383 | 1661 | 101077300 | 101077756 | 457 |
| 1568 | 98729911 | 98730332 | 422 | 1615 | 99344525 | 99344905 | 381 | 1662 | 101078386 | 101080661 | 2276 |
| 1569 | 98730441 | 98731567 | 1127 | 1616 | 99382688 | 99383761 | 1074 | 1663 | 101179791 | 101181652 | 1862 |
| 1570 | 98934975 | 98935754 | 780 | 1617 | 99384104 | 99384204 | 101 | 1664 | 101181666 | 101181754 | 89 |
| 1571 | 98935755 | 98936019 | 265 | 1618 | 99384223 | 99384323 | 101 | 1665 | 101269882 | 101270389 | 508 |
| 1572 | 98936055 | 98937206 | 1152 | 1619 | 99384331 | 99384409 | 79 | 1666 | 101271124 | 101272137 | 1014 |
| 1573 | 99015324 | 99016338 | 1015 | 1620 | 99384433 | 99384518 | 86 | 1667 | 101277108 | 101277929 | 822 |
| 1574 | 99019861 | 99020803 | 943 | 1621 | 99384798 | 99384896 | 99 | 1668 | 101280589 | 101283209 | 2621 |
| 1575 | 99020820 | 99021074 | 255 | 1622 | 99384898 | 99385237 | 340 | 1669 | 101284394 | 101285204 | 811 |
| 1576 | 99021110 | 99021434 | 325 | 1623 | 99385238 | 99385374 | 137 | 1670 | 101285274 | 101287393 | 2120 |
| 1577 | 99021546 | 99021881 | 336 | 1624 | 99388884 | 99388988 | 105 | 1671 | 101287394 | 101287722 | 329 |
| 1578 | 99041855 | 99042802 | 948 | 1625 | 99389493 | 99389794 | 302 | 1672 | 101289943 | 101290869 | 927 |
| 1579 | 99043008 | 99043216 | 209 | 1626 | 99389893 | 99390980 | 1088 | 1673 | 101369609 | 101369847 | 239 |
| 1580 | 99043233 | 99043317 | 85 | 1627 | 99429173 | 99431056 | 1884 | 1674 | 101369848 | 101371678 | 1831 |
| 1581 | 99043348 | 99043941 | 594 | 1628 | 99436463 | 99438548 | 2086 | 1675 | 101407923 | 101409787 | 1865 |
| 1582 | 99067633 | 99067790 | 158 | 1629 | 99461924 | 99462226 | 303 | 1676 | 101480878 | 101481475 | 598 |
| 1583 | 99068398 | 99068991 | 594 | 1630 | 99462436 | 99462522 | 87 | 1677 | 101481483 | 101482809 | 1327 |
| 1584 | 99069011 | 99069230 | 220 | 1631 | 99462531 | 99464689 | 2159 | 1678 | 101483080 | 101483326 | 247 |
| 1585 | 99069253 | 99069330 | 78 | 1632 | 99485325 | 99487464 | 2140 | 1679 | 101531083 | 101531536 | 454 |
| 1586 | 99069357 | 99069439 | 83 | 1633 | 99520967 | 99521684 | 718 | 1680 | 101531822 | 101533046 | 1225 |
| 1587 | 99069448 | 99071069 | 1622 | 1634 | 99521686 | 99523263 | 1578 | 1681 | 101663274 | 101664082 | 809 |
| 1588 | 99083348 | 99084068 | 721 | 1635 | 99598836 | 99599720 | 885 | 1682 | 101664083 | 101664557 | 475 |
| 1589 | 99084077 | 99084164 | 88 | 1636 | 99599721 | 99600515 | 795 | 1683 | 101664972 | 101665157 | 186 |
| 1590 | 99084187 | 99084269 | 83 | 1637 | 99685410 | 99685761 | 352 | 1684 | 101759113 | 101760564 | 1452 |
| 1591 | 99084292 | 99084487 | 196 | 1638 | 99685770 | 99686580 | 811 | 1685 | 101760818 | 101760921 | 104 |
| 1592 | 99084496 | 99084961 | 466 | 1639 | 99686585 | 99687483 | 899 | 1686 | 101761078 | 101761194 | 117 |
| 1593 | 99085217 | 99085401 | 185 | 1640 | 99724603 | 99725122 | 520 | 1687 | 101831086 | 101832000 | 915 |
| 1594 | 99085727 | 99085990 | 264 | 1641 | 99760539 | 99761530 | 992 | 1688 | 101832407 | 101832478 | 72 |
| 1595 | 99150539 | 99151309 | 771 | 1642 | 99761539 | 99762616 | 1078 | 1689 | 101832859 | 101832953 | 95 |
| 1596 | 99151622 | 99151735 | 114 | 1643 | 99779555 | 99781498 | 1944 | 1690 | 101833030 | 101833167 | 138 |
| 1597 | 99152007 | 99152208 | 202 | 1644 | 99781499 | 99781964 | 466 | 1691 | 101929716 | 101930143 | 428 |
| 1598 | 99152500 | 99152615 | 116 | 1645 | 99782012 | 99782105 | 94 | 1692 | 101930145 | 101931269 | 1125 |
| 1599 | 99170809 | 99170935 | 127 | 1646 | 99882974 | 99883079 | 106 | 1693 | 101931543 | 101931775 | 233 |
| 1600 | 99171017 | 99171345 | 329 | 1647 | 99883262 | 99883432 | 171 | 1694 | 101935243 | 101936675 | 1433 |
| 1601 | 99171644 | 99171963 | 320 | 1648 | 99883698 | 99884953 | 1256 | 1695 | 101936831 | 101937336 | 506 |
| 1602 | 99175116 | 99175681 | 566 | 1649 | 99911488 | 99912411 | 924 | 1696 | 101937536 | 101938144 | 609 |
| 1603 | 99175726 | 99176035 | 310 | 1650 | 99912749 | 99913572 | 824 | 1697 | 101938301 | 101939572 | 1272 |
| 1604 | 99176157 | 99176507 | 351 | 1651 | 100017452 | 100018884 | 1433 | 1698 | 101978784 | 101979631 | 848 |
| 1605 | 99194375 | 99194831 | 457 | 1652 | 100018887 | 100019531 | 645 | 1699 | 101979894 | 101980870 | 977 |
| 1606 | 99194840 | 99196479 | 1640 | 1653 | 100144517 | 100146580 | 2064 | 1700 | 101986544 | 101987353 | 810 |
| 1607 | 99196735 | 99197291 | 557 | 1654 | 100164386 | 100166469 | 2084 | 1701 | 101987679 | 101988410 | 732 |
| 1608 | 99247208 | 99247769 | 562 | 1655 | 100196107 | 100197621 | 1515 | 1702 | 101996109 | 101997378 | 1270 |
| 1609 | 99247778 | 99250036 | 2259 | 1656 | 100197652 | 100197720 | 69 | 1703 | 101997698 | 101997980 | 283 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|
| 1704 | 101997993 | 101998072 | 80 | 1751 | 102487097 | 102487698 | 602 | 1798 | 102974897 | 102976314 | 1418 |
| 1705 | 101998097 | 101998193 | 97 | 1752 | 102488682 | 102488770 | 89 | 1799 | 102976321 | 102976694 | 374 |
| 1706 | 102006770 | 102007039 | 270 | 1753 | 102488788 | 102489660 | 873 | 1800 | 102976702 | 102979118 | 2417 |
| 1707 | 102007333 | 102007725 | 393 | 1754 | 102491641 | 102492231 | 591 | 1801 | 102979165 | 102980237 | 1073 |
| 1708 | 102007993 | 102008656 | 664 | 1755 | 102493854 | 102496155 | 2302 | 1802 | 102985975 | 102986653 | 679 |
| 1709 | 102016907 | 102017796 | 890 | 1756 | 102497425 | 102499675 | 2251 | 1803 | 103033778 | 103034507 | 730 |
| 1710 | 102018022 | 102018162 | 141 | 1757 | 102554815 | 102556827 | 2013 | 1804 | 103041071 | 103042451 | 1381 |
| 1711 | 102018417 | 102018881 | 465 | 1758 | 102576068 | 102577221 | 1154 | 1805 | 103055726 | 103056518 | 793 |
| 1712 | 102035556 | 102037457 | 1902 | 1759 | 102577225 | 102579634 | 2410 | 1806 | 103056530 | 103056930 | 401 |
| 1713 | 102037717 | 102037965 | 249 | 1760 | 102656482 | 102656606 | 125 | 1807 | 103056931 | 103057816 | 886 |
| 1714 | 102079683 | 102081311 | 1629 | 1761 | 102656961 | 102658269 | 1309 | 1808 | 103102269 | 103102472 | 204 |
| 1715 | 102081623 | 102081699 | 77 | 1762 | 102660766 | 102661359 | 594 | 1809 | 103102920 | 103104438 | 1519 |
| 1716 | 102095297 | 102096327 | 1031 | 1763 | 102661474 | 102663259 | 1786 | 1810 | 103114235 | 103114570 | 336 |
| 1717 | 102096332 | 102096896 | 565 | 1764 | 102718959 | 102719728 | 770 | 1811 | 103115507 | 103116310 | 804 |
| 1718 | 102096907 | 102097035 | 129 | 1765 | 102720728 | 102720875 | 148 | 1812 | 103163349 | 103163760 | 412 |
| 1719 | 102097047 | 102097127 | 81 | 1766 | 102720876 | 102721833 | 958 | 1813 | 103163761 | 103163837 | 77 |
| 1720 | 102097242 | 102097745 | 504 | 1767 | 102721850 | 102722819 | 970 | 1814 | 103163838 | 103163929 | 92 |
| 1721 | 102122967 | 102123325 | 359 | 1768 | 102723184 | 102723530 | 347 | 1815 | 103163933 | 103164044 | 112 |
| 1722 | 102123327 | 102123578 | 252 | 1769 | 102723792 | 102723943 | 152 | 1816 | 103164049 | 103164217 | 169 |
| 1723 | 102148003 | 102148211 | 209 | 1770 | 102724212 | 102724587 | 376 | 1817 | 103164223 | 103164291 | 69 |
| 1724 | 102148983 | 102149154 | 172 | 1771 | 102724707 | 102725264 | 558 | 1818 | 103164336 | 103164536 | 201 |
| 1725 | 102149447 | 102149635 | 189 | 1772 | 102735755 | 102737044 | 1290 | 1819 | 103164541 | 103164614 | 74 |
| 1726 | 102211254 | 102211475 | 222 | 1773 | 102737046 | 102738783 | 1738 | 1820 | 103164656 | 103164889 | 234 |
| 1727 | 102211697 | 102212424 | 728 | 1774 | 102745406 | 102745877 | 472 | 1821 | 103316119 | 103316716 | 598 |
| 1728 | 102212456 | 102213328 | 873 | 1775 | 102746135 | 102746980 | 846 | 1822 | 103319797 | 103320325 | 529 |
| 1729 | 102231921 | 102232578 | 658 | 1776 | 102746990 | 102749811 | 2822 | 1823 | 103332395 | 103333694 | 1300 |
| 1730 | 102269040 | 102269587 | 548 | 1777 | 102751712 | 102753411 | 1700 | 1824 | 103333700 | 103333969 | 270 |
| 1731 | 102269600 | 102270219 | 620 | 1778 | 102753422 | 102753784 | 363 | 1825 | 103334097 | 103334455 | 359 |
| 1732 | 102270495 | 102270959 | 465 | 1779 | 102779435 | 102782668 | 3234 | 1826 | 103336532 | 103339218 | 2687 |
| 1733 | 102279072 | 102280488 | 1417 | 1780 | 102797720 | 102798292 | 573 | 1827 | 103371251 | 103371465 | 215 |
| 1734 | 102280593 | 102280792 | 200 | 1781 | 102810040 | 102812878 | 2839 | 1828 | 103371466 | 103371906 | 441 |
| 1735 | 102281148 | 102281276 | 129 | 1782 | 102815871 | 102816894 | 1024 | 1829 | 103371927 | 103372203 | 277 |
| 1736 | 102284231 | 102285638 | 1408 | 1783 | 102816900 | 102817717 | 818 | 1830 | 103372546 | 103372911 | 366 |
| 1737 | 102285641 | 102286221 | 581 | 1784 | 102872919 | 102873566 | 648 | 1831 | 103443925 | 103444355 | 431 |
| 1738 | 102311774 | 102312769 | 996 | 1785 | 102879142 | 102880940 | 1799 | 1832 | 103444365 | 103444648 | 284 |
| 1739 | 102371137 | 102371685 | 549 | 1786 | 102880942 | 102885080 | 4139 | 1833 | 103444749 | 103445808 | 1060 |
| 1740 | 102403744 | 102404148 | 405 | 1787 | 102889768 | 102890287 | 520 | 1834 | 103445825 | 103446531 | 707 |
| 1741 | 102404188 | 102405130 | 943 | 1788 | 102895656 | 102896707 | 1052 | 1835 | 103525295 | 103526611 | 1317 |
| 1742 | 102405870 | 102406725 | 856 | 1789 | 102914407 | 102914830 | 424 | 1836 | 103526637 | 103527351 | 715 |
| 1743 | 102409098 | 102409683 | 586 | 1790 | 102914911 | 102914995 | 85 | 1837 | 103528446 | 103528750 | 305 |
| 1744 | 102420642 | 102421140 | 499 | 1791 | 102915089 | 102915153 | 65 | 1838 | 103528751 | 103529975 | 1225 |
| 1745 | 102430526 | 102431028 | 503 | 1792 | 102915174 | 102915244 | 71 | 1839 | 103532602 | 103534674 | 2073 |
| 1746 | 102459748 | 102460361 | 614 | 1793 | 102915926 | 102916038 | 113 | 1840 | 103567337 | 103569392 | 2056 |
| 1747 | 102463148 | 102464049 | 902 | 1794 | 102916046 | 102916487 | 442 | 1841 | 103579636 | 103580434 | 799 |
| 1748 | 102473673 | 102474478 | 806 | 1795 | 102965921 | 102968099 | 2179 | 1842 | 103580450 | 103581397 | 948 |
| 1749 | 102479289 | 102481021 | 1733 | 1796 | 102972246 | 102973992 | 1747 | 1843 | 103581400 | 103581720 | 321 |
| 1750 | 102485062 | 102485637 | 576 | 1797 | 102974003 | 102974856 | 854 | 1844 | 103589055 | 103590850 | 1796 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|
| 1845 | 103590851 | 103591253 | 403 | 1892 | 104209614 | 104209793 | 180 | 1939 | 104942183 | 104942534 | 352 |
| 1846 | 103592966 | 103595201 | 2236 | 1893 | 104210070 | 104211697 | 1628 | 1940 | 104942583 | 104942654 | 72 |
| 1847 | 103701903 | 103702291 | 389 | 1894 | 104219187 | 104219302 | 116 | 1941 | 104942717 | 104944394 | 1678 |
| 1848 | 103702301 | 103702492 | 192 | 1895 | 104219552 | 104221233 | 1682 | 1942 | 104994209 | 104994956 | 748 |
| 1849 | 103702527 | 103702676 | 150 | 1896 | 104251917 | 104254328 | 2412 | 1943 | 104995234 | 104995346 | 113 |
| 1850 | 103702681 | 103702793 | 113 | 1897 | 104274356 | 104274849 | 494 | 1944 | 104995679 | 104995765 | 87 |
| 1851 | 103702816 | 103702916 | 101 | 1898 | 104275133 | 104275244 | 112 | 1945 | 104995774 | 104995900 | 127 |
| 1852 | 103702996 | 103703069 | 74 | 1899 | 104275543 | 104275741 | 199 | 1946 | 105025365 | 105026069 | 705 |
| 1853 | 103703451 | 103703661 | 211 | 1900 | 104275853 | 104275931 | 79 | 1947 | 105026072 | 105028102 | 2031 |
| 1854 | 103751272 | 103752436 | 1165 | 1901 | 104339745 | 104339895 | 151 | 1948 | 105062145 | 105062432 | 288 |
| 1855 | 103752741 | 103752922 | 182 | 1902 | 104340311 | 104340800 | 490 | 1949 | 105062735 | 105062967 | 233 |
| 1856 | 103753196 | 103753340 | 145 | 1903 | 104340806 | 104340990 | 185 | 1950 | 105062980 | 105063054 | 75 |
| 1857 | 103805372 | 103806374 | 1003 | 1904 | 104341376 | 104341807 | 432 | 1951 | 105063440 | 105063846 | 407 |
| 1858 | 103806842 | 103806934 | 93 | 1905 | 104391762 | 104392744 | 983 | 1952 | 105099847 | 105099961 | 115 |
| 1859 | 103807235 | 103807306 | 72 | 1906 | 104392746 | 104393035 | 290 | 1953 | 105100170 | 105100491 | 322 |
| 1860 | 103807406 | 103807472 | 67 | 1907 | 104393102 | 104393340 | 239 | 1954 | 105100532 | 105100611 | 80 |
| 1861 | 103813797 | 103814533 | 737 | 1908 | 104393342 | 104394947 | 1606 | 1955 | 105100732 | 105101395 | 664 |
| 1862 | 103814697 | 103815798 | 1102 | 1909 | 104406521 | 104407170 | 650 | 1956 | 105101651 | 105101811 | 161 |
| 1863 | 103864145 | 103864835 | 691 | 1910 | 104462838 | 104464044 | 1207 | 1957 | 105102107 | 105102251 | 145 |
| 1864 | 103864837 | 103865671 | 835 | 1911 | 104464056 | 104464834 | 779 | 1958 | 105116273 | 105116408 | 136 |
| 1865 | 103865682 | 103865959 | 278 | 1912 | 104465083 | 104465418 | 336 | 1959 | 105117020 | 105117088 | 69 |
| 1866 | 103869578 | 103869935 | 358 | 1913 | 104524332 | 104524609 | 278 | 1960 | 105117089 | 105117318 | 230 |
| 1867 | 103869939 | 103870637 | 699 | 1914 | 104524883 | 104526407 | 1525 | 1961 | 105117434 | 105118483 | 1050 |
| 1868 | 103881229 | 103881420 | 192 | 1915 | 104533780 | 104534175 | 396 | 1962 | 105143601 | 105145070 | 1470 |
| 1869 | 103881672 | 103883610 | 1939 | 1916 | 104535225 | 104535860 | 636 | 1963 | 105145333 | 105146944 | 1612 |
| 1870 | 103889690 | 103891175 | 1486 | 1917 | 104580953 | 104581824 | 872 | 1964 | 105146968 | 105147202 | 235 |
| 1871 | 103891189 | 103891770 | 582 | 1918 | 104582109 | 104583036 | 928 | 1965 | 105147458 | 105147742 | 285 |
| 1872 | 103900378 | 103900554 | 177 | 1919 | 104586744 | 104587560 | 817 | 1966 | 105201515 | 105202076 | 562 |
| 1873 | 103901158 | 103902572 | 1415 | 1920 | 104587590 | 104587887 | 298 | 1967 | 105202080 | 105203114 | 1035 |
| 1874 | 103974698 | 103976666 | 1969 | 1921 | 104588571 | 104588657 | 87 | 1968 | 105203285 | 105204183 | 899 |
| 1875 | 103980167 | 103981844 | 1678 | 1922 | 104602435 | 104602554 | 120 | 1969 | 105204993 | 105205487 | 495 |
| 1876 | 103990197 | 103992405 | 2209 | 1923 | 104602585 | 104602794 | 210 | 1970 | 105208086 | 105208814 | 729 |
| 1877 | 103993914 | 103995833 | 1920 | 1924 | 104603465 | 104603639 | 175 | 1971 | 105208830 | 105210174 | 1345 |
| 1878 | 104142779 | 104142986 | 208 | 1925 | 104603738 | 104604410 | 673 | 1972 | 105228442 | 105229890 | 1449 |
| 1879 | 104143529 | 104144577 | 1049 | 1926 | 104616733 | 104616854 | 122 | 1973 | 105230166 | 105230512 | 347 |
| 1880 | 104144584 | 104144860 | 277 | 1927 | 104616858 | 104617055 | 198 | 1974 | 105242489 | 105243672 | 1184 |
| 1881 | 104144863 | 104145976 | 1114 | 1928 | 104617343 | 104617911 | 569 | 1975 | 105243683 | 105244560 | 878 |
| 1882 | 104149042 | 104149608 | 567 | 1929 | 104617963 | 104618045 | 83 | 1976 | 105303579 | 105304214 | 636 |
| 1883 | 104158500 | 104159176 | 677 | 1930 | 104618058 | 104618276 | 219 | 1977 | 105304217 | 105304563 | 347 |
| 1884 | 104160113 | 104160901 | 789 | 1931 | 104618543 | 104618985 | 443 | 1978 | 105304578 | 105305660 | 1083 |
| 1885 | 104168040 | 104172056 | 4017 | 1932 | 104618989 | 104619276 | 288 | 1979 | 105334119 | 105335048 | 930 |
| 1886 | 104181797 | 104182613 | 817 | 1933 | 104619321 | 104619768 | 448 | 1980 | 105351726 | 105352215 | 490 |
| 1887 | 104183248 | 104183833 | 586 | 1934 | 104666555 | 104666630 | 76 | 1981 | 105410626 | 105411342 | 717 |
| 1888 | 104184709 | 104185248 | 540 | 1935 | 104666894 | 104669321 | 2428 | 1982 | 105421361 | 105421773 | 413 |
| 1889 | 104185254 | 104186734 | 1481 | 1936 | 104924344 | 104925895 | 1552 | 1983 | 105422036 | 105423014 | 979 |
| 1890 | 104200037 | 104201799 | 1763 | 1937 | 104925914 | 104926137 | 224 | 1984 | 105423331 | 105423442 | 112 |
| 1891 | 104202376 | 104202819 | 444 | 1938 | 104926189 | 104926262 | 74 | 1985 | 105442284 | 105444906 | 2623 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|
| 1986 | 105604454 | 105606645 | 2192 | 2033 | 107284212 | 107284441 | 230 | 2080 | 111976677 | 111977953 | 1277 |
| 1987 | 105666869 | 105667015 | 147 | 2034 | 108448558 | 108450198 | 1641 | 2081 | 112053900 | 112055075 | 1176 |
| 1988 | 105667022 | 105667141 | 120 | 2035 | 108450200 | 108450631 | 432 | 2082 | 112055144 | 112055510 | 367 |
| 1989 | 105667160 | 105669160 | 2001 | 2036 | 108718224 | 108718505 | 282 | 2083 | 112055530 | 112055674 | 145 |
| 1990 | 105715437 | 105715894 | 458 | 2037 | 108718508 | 108719800 | 1293 | 2084 | 112055925 | 112056019 | 95 |
| 1991 | 105716188 | 105717512 | 1325 | 2038 | 108719821 | 108720094 | 274 | 2085 | 112056020 | 112056213 | 194 |
| 1992 | 105797405 | 105798582 | 1178 | 2039 | 108913721 | 108915045 | 1325 | 2086 | 112182809 | 112182954 | 146 |
| 1993 | 105798709 | 105799464 | 756 | 2040 | 108915061 | 108915799 | 739 | 2087 | 112183039 | 112183176 | 138 |
| 1994 | 105834976 | 105837136 | 2161 | 2041 | 109171028 | 109171542 | 515 | 2088 | 112183308 | 112183968 | 661 |
| 1995 | 105870260 | 105872449 | 2190 | 2042 | 109171563 | 109172016 | 454 | 2089 | 112184009 | 112184112 | 104 |
| 1996 | 105968206 | 105968313 | 108 | 2043 | 109172036 | 109172316 | 281 | 2090 | 112184114 | 112184524 | 411 |
| 1997 | 105968414 | 105969739 | 1326 | 2044 | 109172338 | 109173107 | 770 | 2091 | 112246068 | 112248709 | 2642 |
| 1998 | 105969789 | 105970158 | 370 | 2045 | 109209758 | 109211832 | 2075 | 2092 | 112316379 | 112318210 | 1832 |
| 1999 | 105981516 | 105982279 | 764 | 2046 | 109664152 | 109664979 | 828 | 2093 | 112391985 | 112392422 | 438 |
| 2000 | 105982348 | 105982447 | 100 | 2047 | 110215869 | 110216485 | 617 | 2094 | 112392423 | 112392555 | 133 |
| 2001 | 105982698 | 105982871 | 174 | 2048 | 110661670 | 110662348 | 679 | 2095 | 112392568 | 112392693 | 126 |
| 2002 | 105983163 | 105983635 | 473 | 2049 | 110690513 | 110691120 | 608 | 2096 | 112392702 | 112393335 | 634 |
| 2003 | 106003184 | 106003588 | 405 | 2050 | 110691248 | 110691325 | 78 | 2097 | 112393343 | 112394330 | 988 |
| 2004 | 106003681 | 106005170 | 1490 | 2051 | 110691368 | 110692596 | 1229 | 2098 | 112394333 | 112394724 | 392 |
| 2005 | 106017074 | 106017441 | 368 | 2052 | 110987840 | 110988429 | 590 | 2099 | 112421781 | 112422397 | 617 |
| 2006 | 106017701 | 106019152 | 1452 | 2053 | 110988432 | 110989499 | 1068 | 2100 | 112509343 | 112510183 | 841 |
| 2007 | 106023119 | 106025441 | 2323 | 2054 | 110989547 | 110989922 | 376 | 2101 | 112510875 | 112511427 | 553 |
| 2008 | 106064907 | 106065389 | 483 | 2055 | 111206545 | 111207107 | 563 | 2102 | 112529748 | 112530375 | 628 |
| 2009 | 106078124 | 106078797 | 674 | 2056 | 111618059 | 111619639 | 1581 | 2103 | 112530377 | 112531822 | 1446 |
| 2010 | 106078827 | 106080199 | 1373 | 2057 | 111619647 | 111620130 | 484 | 2104 | 112545707 | 112546277 | 571 |
| 2011 | 106083105 | 106085179 | 2075 | 2058 | 111624866 | 111625775 | 910 | 2105 | 112546461 | 112546902 | 442 |
| 2012 | 106087555 | 106087862 | 308 | 2059 | 111625810 | 111626940 | 1131 | 2106 | 112547051 | 112547792 | 742 |
| 2013 | 106087871 | 106088661 | 791 | 2060 | 111672643 | 111674783 | 2141 | 2107 | 112620386 | 112620634 | 249 |
| 2014 | 106088921 | 106089674 | 754 | 2061 | 111703148 | 111704460 | 1313 | 2108 | 112620641 | 112622496 | 1856 |
| 2015 | 106101967 | 106104050 | 2084 | 2062 | 111704467 | 111704629 | 163 | 2109 | 112629411 | 112631327 | 1917 |
| 2016 | 106106462 | 106107479 | 1018 | 2063 | 111704859 | 111705010 | 152 | 2110 | 112667809 | 112669354 | 1546 |
| 2017 | 106107882 | 106108535 | 654 | 2064 | 111705043 | 111705172 | 130 | 2111 | 112669362 | 112670277 | 916 |
| 2018 | 106125053 | 106125192 | 140 | 2065 | 111754336 | 111754508 | 173 | 2112 | 112670292 | 112670429 | 138 |
| 2019 | 106125318 | 106125394 | 77 | 2066 | 111754511 | 111754815 | 305 | 2113 | 112737125 | 112738039 | 915 |
| 2020 | 106125481 | 106125574 | 94 | 2067 | 111755095 | 111755355 | 261 | 2114 | 112738044 | 112738736 | 693 |
| 2021 | 106125598 | 106125670 | 73 | 2068 | 111755356 | 111755751 | 396 | 2115 | 112738744 | 112739210 | 467 |
| 2022 | 106125869 | 106125939 | 71 | 2069 | 111755770 | 111758358 | 2589 | 2116 | 112825364 | 112827323 | 1960 |
| 2023 | 106126268 | 106127110 | 843 | 2070 | 111956008 | 111957004 | 997 | 2117 | 112827361 | 112828027 | 667 |
| 2024 | 106389511 | 106392834 | 3324 | 2071 | 111957048 | 111958170 | 1123 | 2118 | 112828053 | 112828153 | 101 |
| 2025 | 106907131 | 106907512 | 382 | 2072 | 111958176 | 111958316 | 141 | 2119 | 112828156 | 112829328 | 1173 |
| 2026 | 106907536 | 106907922 | 387 | 2073 | 111958372 | 111959077 | 706 | 2120 | 113932911 | 113935040 | 2130 |
| 2027 | 106907961 | 106908068 | 108 | 2074 | 111959098 | 111959791 | 694 | 2121 | 114031870 | 114033938 | 2069 |
| 2028 | 106908071 | 106909204 | 1134 | 2075 | 111959798 | 111960744 | 947 | 2122 | 114099482 | 114099859 | 378 |
| 2029 | 107282862 | 107283214 | 353 | 2076 | 111974207 | 111974392 | 186 | 2123 | 114122401 | 114122716 | 316 |
| 2030 | 107283809 | 107283911 | 103 | 2077 | 111974682 | 111974918 | 237 | 2124 | 114123226 | 114125945 | 2720 |
| 2031 | 107283916 | 107284015 | 100 | 2078 | 111974922 | 111976304 | 1383 | 2125 | 114125956 | 114126469 | 514 |
| 2032 | 107284047 | 107284172 | 126 | 2079 | 111976336 | 111976675 | 340 | 2126 | 114195198 | 114197504 | 2307 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|
| 2127 | 114197518 | 114197707 | 190 | 2174 | 115850625 | 115851108 | 484 | 2221 | 118020520 | 118022048 | 1529 |
| 2128 | 114197797 | 114198192 | 396 | 2175 | 115923325 | 115925870 | 2546 | 2222 | 118022075 | 118022804 | 730 |
| 2129 | 114602822 | 114604852 | 2031 | 2176 | 115927472 | 115927573 | 102 | 2223 | 118022805 | 118023133 | 329 |
| 2130 | 114698661 | 114699139 | 479 | 2177 | 115927950 | 115929856 | 1907 | 2224 | 118023220 | 118024484 | 1265 |
| 2131 | 114699152 | 114700206 | 1055 | 2178 | 115987713 | 115988668 | 956 | 2225 | 118072384 | 118072681 | 298 |
| 2132 | 114700237 | 114700325 | 89 | 2179 | 115988673 | 115989627 | 955 | 2226 | 118072685 | 118072953 | 269 |
| 2133 | 114700326 | 114701475 | 1150 | 2180 | 116090047 | 116091099 | 1053 | 2227 | 118072980 | 118074447 | 1468 |
| 2134 | 114701476 | 114702564 | 1089 | 2181 | 116091382 | 116091619 | 238 | 2228 | 118175823 | 118177738 | 1916 |
| 2135 | 114892124 | 114893834 | 1711 | 2182 | 116091630 | 116091860 | 231 | 2229 | 118177749 | 118177898 | 150 |
| 2136 | 114893887 | 114894179 | 293 | 2183 | 116091949 | 116092118 | 170 | 2230 | 118286320 | 118287159 | 840 |
| 2137 | 114899287 | 114900057 | 771 | 2184 | 116153334 | 116155516 | 2183 | 2231 | 118287487 | 118287712 | 226 |
| 2138 | 114900072 | 114901360 | 1289 | 2185 | 116155798 | 116155902 | 105 | 2232 | 118287723 | 118288030 | 308 |
| 2139 | 115301570 | 115303309 | 1740 | 2186 | 116173270 | 116173508 | 239 | 2233 | 118288035 | 118288181 | 147 |
| 2140 | 115399325 | 115401079 | 1755 | 2187 | 116173557 | 116173749 | 193 | 2234 | 118293873 | 118295610 | 1738 |
| 2141 | 115413371 | 115415408 | 2038 | 2188 | 116174115 | 116174481 | 367 | 2235 | 118295626 | 118295923 | 298 |
| 2142 | 115427375 | 115427566 | 192 | 2189 | 116174555 | 116174694 | 140 | 2236 | 118338940 | 118340018 | 1079 |
| 2143 | 115427860 | 115428361 | 502 | 2190 | 116174795 | 116174990 | 196 | 2237 | 118340039 | 118341014 | 976 |
| 2144 | 115428384 | 115428478 | 95 | 2191 | 116175230 | 116175352 | 123 | 2238 | 118358524 | 118359510 | 987 |
| 2145 | 115428795 | 115430225 | 1431 | 2192 | 116249640 | 116250199 | 560 | 2239 | 118359800 | 118360042 | 243 |
| 2146 | 115440284 | 115440424 | 141 | 2193 | 116250530 | 116250965 | 436 | 2240 | 118369354 | 118369618 | 265 |
| 2147 | 115440451 | 115440592 | 142 | 2194 | 116250970 | 116251416 | 447 | 2241 | 118369895 | 118370994 | 1100 |
| 2148 | 115440611 | 115441298 | 688 | 2195 | 116251440 | 116251623 | 184 | 2242 | 118376961 | 118377489 | 529 |
| 2149 | 115441381 | 115441526 | 146 | 2196 | 116276034 | 116277414 | 1381 | 2243 | 118418924 | 118419433 | 510 |
| 2150 | 115441536 | 115442229 | 694 | 2197 | 116277995 | 116278211 | 217 | 2244 | 118419466 | 118421010 | 1545 |
| 2151 | 115499658 | 115499974 | 317 | 2198 | 116362905 | 116363914 | 1010 | 2245 | 118490814 | 118493609 | 2796 |
| 2152 | 115500033 | 115500180 | 148 | 2199 | 116364139 | 116364526 | 388 | 2246 | 118498386 | 118498925 | 540 |
| 2153 | 115500228 | 115500308 | 81 | 2200 | 116364823 | 116365568 | 746 | 2247 | 118498926 | 118499418 | 493 |
| 2154 | 115500313 | 115500583 | 271 | 2201 | 116365569 | 116365780 | 212 | 2248 | 118499442 | 118499682 | 241 |
| 2155 | 115500613 | 115501736 | 1124 | 2202 | 116365969 | 116366676 | 708 | 2249 | 118499765 | 118499942 | 178 |
| 2156 | 115503847 | 115504251 | 405 | 2203 | 116366684 | 116366863 | 180 | 2250 | 118499946 | 118500085 | 140 |
| 2157 | 115504522 | 115505164 | 643 | 2204 | 116381185 | 116383257 | 2073 | 2251 | 118597464 | 118599548 | 2085 |
| 2158 | 115505432 | 115505563 | 132 | 2205 | 116407399 | 116409000 | 1602 | 2252 | 118606988 | 118607151 | 164 |
| 2159 | 115513028 | 115513857 | 830 | 2206 | 116433857 | 116435525 | 1669 | 2253 | 118607430 | 118609067 | 1638 |
| 2160 | 115514133 | 115514643 | 511 | 2207 | 116435544 | 116435928 | 385 | 2254 | 118754138 | 118755742 | 1605 |
| 2161 | 115514648 | 115515091 | 444 | 2208 | 116440225 | 116440441 | 217 | 2255 | 118756081 | 118756387 | 307 |
| 2162 | 115519452 | 115521159 | 1708 | 2209 | 116440706 | 116441922 | 1217 | 2256 | 118875506 | 118875984 | 479 |
| 2163 | 115521437 | 115522316 | 880 | 2210 | 116517470 | 116518461 | 992 | 2257 | 118882107 | 118882660 | 554 |
| 2164 | 115568660 | 115568829 | 170 | 2211 | 116569945 | 116570132 | 188 | 2258 | 118883473 | 118884451 | 979 |
| 2165 | 115569093 | 115569212 | 120 | 2212 | 116570563 | 116570962 | 400 | 2259 | 118885904 | 118887575 | 1672 |
| 2166 | 115569218 | 115570681 | 1464 | 2213 | 116570973 | 116572448 | 1476 | 2260 | 118887634 | 118888703 | 1070 |
| 2167 | 115602860 | 115604192 | 1333 | 2214 | 116686397 | 116687011 | 615 | 2261 | 118888709 | 118889950 | 1242 |
| 2168 | 115604195 | 115605226 | 1032 | 2215 | 116687017 | 116688474 | 1458 | 2262 | 118912292 | 118913545 | 1254 |
| 2169 | 115605535 | 115605665 | 131 | 2216 | 116841565 | 116841866 | 302 | 2263 | 118916967 | 118918608 | 1642 |
| 2170 | 115792266 | 115793203 | 938 | 2217 | 116841874 | 116844169 | 2296 | 2264 | 118923053 | 118923253 | 201 |
| 2171 | 115793216 | 115793678 | 463 | 2218 | 117864457 | 117864984 | 528 | 2265 | 118923524 | 118925210 | 1687 |
| 2172 | 115793681 | 115794904 | 1224 | 2219 | 117864997 | 117865593 | 597 | 2266 | 118945444 | 118945899 | 456 |
| 2173 | 115794911 | 115795477 | 567 | 2220 | 117865732 | 117866535 | 804 | 2267 | 118945920 | 118947510 | 1591 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|
| 2268 | 118965991 | 118966723 | 733 | 2315 | 120852956 | 120853652 | 697 | 2362 | 121640663 | 121641046 | 384 |
| 2269 | 118989171 | 118991554 | 2384 | 2316 | 120853666 | 120854420 | 755 | 2363 | 121641698 | 121642749 | 1052 |
| 2270 | 119106311 | 119106623 | 313 | 2317 | 120907101 | 120907854 | 754 | 2364 | 121760922 | 121761448 | 527 |
| 2271 | 119106892 | 119106992 | 101 | 2318 | 120908136 | 120908216 | 81 | 2365 | 121873458 | 121873662 | 205 |
| 2272 | 119107317 | 119107904 | 588 | 2319 | 120908791 | 120909178 | 388 | 2366 | 121873698 | 121874646 | 949 |
| 2273 | 119107926 | 119108102 | 177 | 2320 | 120914619 | 120915732 | 1114 | 2367 | 122204911 | 122205113 | 203 |
| 2274 | 119108107 | 119108373 | 267 | 2321 | 120915735 | 120916728 | 994 | 2368 | 122205186 | 122206493 | 1308 |
| 2275 | 119123747 | 119126244 | 2498 | 2322 | 120927790 | 120928947 | 1158 | 2369 | 122206496 | 122207388 | 893 |
| 2276 | 119283873 | 119287672 | 3800 | 2323 | 120929265 | 120929385 | 121 | 2370 | 122251536 | 122251865 | 330 |
| 2277 | 119290400 | 119291112 | 713 | 2324 | 120929675 | 120929863 | 189 | 2371 | 122251881 | 122253613 | 1733 |
| 2278 | 119291131 | 119291854 | 724 | 2325 | 120955546 | 120957215 | 1670 | 2372 | 122346166 | 122346733 | 568 |
| 2279 | 119291911 | 119292340 | 430 | 2326 | 120957226 | 120957725 | 500 | 2373 | 122346967 | 122348244 | 1278 |
| 2280 | 119292341 | 119292425 | 85 | 2327 | 120960814 | 120962389 | 1576 | 2374 | 122600040 | 122601392 | 1353 |
| 2281 | 119292456 | 119292573 | 118 | 2328 | 120962419 | 120962615 | 197 | 2375 | 122698471 | 122699336 | 866 |
| 2282 | 119292641 | 119293874 | 1234 | 2329 | 120962658 | 120962739 | 82 | 2376 | 122728859 | 122729408 | 550 |
| 2283 | 119293896 | 119294175 | 280 | 2330 | 121276430 | 121277543 | 1114 | 2377 | 123158922 | 123159018 | 97 |
| 2284 | 119294194 | 119295388 | 1195 | 2331 | 121277819 | 121278089 | 271 | 2378 | 123159040 | 123159612 | 573 |
| 2285 | 119301150 | 119302121 | 972 | 2332 | 121278368 | 121278516 | 149 | 2379 | 123159880 | 123160601 | 722 |
| 2286 | 119302709 | 119303574 | 866 | 2333 | 121285488 | 121286624 | 1137 | 2380 | 123160620 | 123160950 | 331 |
| 2287 | 119484438 | 119485001 | 564 | 2334 | 121286900 | 121286998 | 99 | 2381 | 123342783 | 123344876 | 2094 |
| 2288 | 119794957 | 119797634 | 2678 | 2335 | 121287005 | 121287567 | 563 | 2382 | 123346557 | 123347970 | 1414 |
| 2289 | 120091258 | 120091950 | 693 | 2336 | 121291419 | 121292203 | 785 | 2383 | 123347977 | 123349492 | 1516 |
| 2290 | 120091953 | 120092178 | 226 | 2337 | 121292232 | 121293746 | 1515 | 2384 | 123358121 | 123358756 | 636 |
| 2291 | 120092193 | 120092592 | 400 | 2338 | 121329734 | 121330226 | 493 | 2385 | 123594555 | 123595638 | 1084 |
| 2292 | 120092638 | 120093359 | 722 | 2339 | 121330229 | 121330464 | 236 | 2386 | 123595640 | 123595822 | 183 |
| 2293 | 120343633 | 120346682 | 3050 | 2340 | 121330473 | 121331294 | 822 | 2387 | 123595835 | 123596162 | 328 |
| 2294 | 120391719 | 120393515 | 1797 | 2341 | 121331314 | 121331820 | 507 | 2388 | 123596240 | 123596640 | 401 |
| 2295 | 120393684 | 120393778 | 95 | 2342 | 121337163 | 121337837 | 675 | 2389 | 123676914 | 123678603 | 1690 |
| 2296 | 120503892 | 120505227 | 1336 | 2343 | 121338136 | 121338719 | 584 | 2390 | 123679178 | 123679455 | 278 |
| 2297 | 120505795 | 120506273 | 479 | 2344 | 121338997 | 121339196 | 200 | 2391 | 123723873 | 123725436 | 1564 |
| 2298 | 120509717 | 120509801 | 85 | 2345 | 121345759 | 121348006 | 2248 | 2392 | 123725444 | 123725625 | 182 |
| 2299 | 120509905 | 120510032 | 128 | 2346 | 121399324 | 121399566 | 243 | 2393 | 123725635 | 123725782 | 148 |
| 2300 | 120753742 | 120753942 | 201 | 2347 | 121399842 | 121399976 | 135 | 2394 | 123725897 | 123726247 | 351 |
| 2301 | 120754347 | 120754484 | 138 | 2348 | 121399977 | 121400092 | 116 | 2395 | 123737306 | 123737556 | 251 |
| 2302 | 120754777 | 120755296 | 520 | 2349 | 121400117 | 121401851 | 1735 | 2396 | 123737559 | 123737786 | 228 |
| 2303 | 120755357 | 120755805 | 449 | 2350 | 121474040 | 121474412 | 373 | 2397 | 123738039 | 123738341 | 303 |
| 2304 | 120778172 | 120779810 | 1639 | 2351 | 121474417 | 121476148 | 1732 | 2398 | 123738524 | 123738814 | 291 |
| 2305 | 120779812 | 120780403 | 592 | 2352 | 121516199 | 121516334 | 136 | 2399 | 123738844 | 123739233 | 390 |
| 2306 | 120791604 | 120791707 | 104 | 2353 | 121516629 | 121517753 | 1125 | 2400 | 123742672 | 123743122 | 451 |
| 2307 | 120791797 | 120792251 | 455 | 2354 | 121517818 | 121517948 | 131 | 2401 | 123743447 | 123744665 | 1219 |
| 2308 | 120809094 | 120810413 | 1320 | 2355 | 121518059 | 121518279 | 221 | 2402 | 123769905 | 123770465 | 561 |
| 2309 | 120810446 | 120811705 | 1260 | 2356 | 121529609 | 121529805 | 197 | 2403 | 123770731 | 123771759 | 1029 |
| 2310 | 120811710 | 120812149 | 440 | 2357 | 121530084 | 121530360 | 277 | 2404 | 123861264 | 123863485 | 2222 |
| 2311 | 120829544 | 120831169 | 1626 | 2358 | 121530419 | 121531662 | 1244 | 2405 | 123874989 | 123875286 | 298 |
| 2312 | 120831438 | 120831560 | 123 | 2359 | 121567440 | 121568730 | 1291 | 2406 | 123875569 | 123875831 | 263 |
| 2313 | 120852054 | 120852129 | 76 | 2360 | 121568741 | 121569512 | 772 | 2407 | 123875844 | 123876180 | 337 |
| 2314 | 120852351 | 120852663 | 313 | 2361 | 121621596 | 121623908 | 2313 | 2408 | 123876204 | 123876414 | 211 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|-----------|-----------|---------------|------|-----------|-----------|---------------|------|-----------|-----------|---------------|
| 2409 | 123876494 | 123876621 | 128 | 2456 | 124756869 | 124759837 | 2969 | 2503 | 126096759 | 126098420 | 1662 |
| 2410 | 123876639 | 123876750 | 112 | 2457 | 124775587 | 124775819 | 233 | 2504 | 126098694 | 126098976 | 283 |
| 2411 | 123911549 | 123913618 | 2070 | 2458 | 124775826 | 124776236 | 411 | 2505 | 126125753 | 126126165 | 413 |
| 2412 | 123957998 | 123959206 | 1209 | 2459 | 124776247 | 124776370 | 124 | 2506 | 126126185 | 126128915 | 2731 |
| 2413 | 123959477 | 123960082 | 606 | 2460 | 124776377 | 124776846 | 470 | 2507 | 126138828 | 126139692 | 865 |
| 2414 | 124019263 | 124019978 | 716 | 2461 | 124776897 | 124776969 | 73 | 2508 | 126140112 | 126140876 | 765 |
| 2415 | 124020286 | 124021341 | 1056 | 2462 | 124777162 | 124777559 | 398 | 2509 | 126293740 | 126293857 | 118 |
| 2416 | 124093647 | 124093811 | 165 | 2463 | 124882212 | 124883364 | 1153 | 2510 | 126293863 | 126293944 | 82 |
| 2417 | 124093815 | 124094159 | 345 | 2464 | 124884011 | 124885542 | 1532 | 2511 | 126294043 | 126294121 | 79 |
| 2418 | 124094215 | 124095049 | 835 | 2465 | 124885549 | 124885748 | 200 | 2512 | 126294165 | 126294237 | 73 |
| 2419 | 124095203 | 124095314 | 112 | 2466 | 124885776 | 124886877 | 1102 | 2513 | 126421257 | 126424444 | 3188 |
| 2420 | 124095371 | 124095666 | 296 | 2467 | 124886897 | 124886993 | 97 | 2514 | 126443209 | 126443471 | 263 |
| 2421 | 124122665 | 124124964 | 2300 | 2468 | 124887004 | 124887479 | 476 | 2515 | 126443664 | 126444543 | 880 |
| 2422 | 124124969 | 124125077 | 109 | 2469 | 124891849 | 124892637 | 789 | 2516 | 126444635 | 126445284 | 650 |
| 2423 | 124134567 | 124134817 | 251 | 2470 | 124895580 | 124900142 | 4563 | 2517 | 126469884 | 126471073 | 1190 |
| 2424 | 124135110 | 124135346 | 237 | 2471 | 124900165 | 124901060 | 896 | 2518 | 126471679 | 126471965 | 287 |
| 2425 | 124135399 | 124135668 | 270 | 2472 | 124902325 | 124903103 | 779 | 2519 | 126480084 | 126480921 | 838 |
| 2426 | 124135685 | 124136647 | 963 | 2473 | 124903104 | 124904741 | 1638 | 2520 | 126493535 | 126493761 | 227 |
| 2427 | 124209502 | 124212264 | 2763 | 2474 | 125414315 | 125416655 | 2341 | 2521 | 126494041 | 126494458 | 418 |
| 2428 | 124308621 | 124310704 | 2084 | 2475 | 125483812 | 125483880 | 69 | 2522 | 126494741 | 126495141 | 401 |
| 2429 | 124323556 | 124325632 | 2077 | 2476 | 125484022 | 125484145 | 124 | 2523 | 126595062 | 126595752 | 691 |
| 2430 | 124424699 | 124425128 | 430 | 2477 | 125484207 | 125484311 | 105 | 2524 | 126595769 | 126596227 | 459 |
| 2431 | 124425129 | 124426786 | 1658 | 2478 | 125484556 | 125484679 | 124 | 2525 | 126619157 | 126619257 | 101 |
| 2432 | 124448783 | 124450863 | 2081 | 2479 | 125484689 | 125484760 | 72 | 2526 | 126619581 | 126619766 | 186 |
| 2433 | 124571639 | 124573713 | 2075 | 2480 | 125484837 | 125484956 | 120 | 2527 | 126619767 | 126619944 | 178 |
| 2434 | 124585872 | 124586641 | 770 | 2481 | 125485012 | 125485169 | 158 | 2528 | 126620181 | 126621213 | 1033 |
| 2435 | 124586652 | 124587808 | 1157 | 2482 | 125485192 | 125485291 | 100 | 2529 | 126683819 | 126685897 | 2079 |
| 2436 | 124587822 | 124589136 | 1315 | 2483 | 125485567 | 125485899 | 333 | 2530 | 126705773 | 126706357 | 585 |
| 2437 | 124595132 | 124596458 | 1327 | 2484 | 125640761 | 125643019 | 2259 | 2531 | 126706358 | 126707791 | 1434 |
| 2438 | 124596496 | 124597204 | 709 | 2485 | 125660527 | 125660625 | 99 | 2532 | 126829732 | 126831050 | 1319 |
| 2439 | 124599754 | 124601542 | 1789 | 2486 | 125660647 | 125660994 | 348 | 2533 | 126837175 | 126838474 | 1300 |
| 2440 | 124601564 | 124601827 | 264 | 2487 | 125661012 | 125661386 | 375 | 2534 | 126838525 | 126838758 | 234 |
| 2441 | 124628563 | 124630250 | 1688 | 2488 | 125661457 | 125661666 | 210 | 2535 | 126838764 | 126838910 | 147 |
| 2442 | 124630336 | 124630668 | 333 | 2489 | 125661799 | 125662587 | 789 | 2536 | 126838950 | 126839085 | 136 |
| 2443 | 124642416 | 124642552 | 137 | 2490 | 125722127 | 125722873 | 747 | 2537 | 126839109 | 126839503 | 395 |
| 2444 | 124642826 | 124643008 | 183 | 2491 | 125741083 | 125741254 | 172 | 2538 | 126839510 | 126839678 | 169 |
| 2445 | 124643291 | 124643553 | 263 | 2492 | 125741358 | 125741666 | 309 | 2539 | 126839706 | 126841349 | 1644 |
| 2446 | 124643554 | 124644453 | 900 | 2493 | 125741682 | 125741972 | 291 | 2540 | 126843916 | 126844031 | 116 |
| 2447 | 124658669 | 124659854 | 1186 | 2494 | 125841092 | 125841619 | 528 | 2541 | 126844061 | 126844525 | 465 |
| 2448 | 124659866 | 124660738 | 873 | 2495 | 125841625 | 125843352 | 1728 | 2542 | 126844626 | 126845499 | 874 |
| 2449 | 124703192 | 124705265 | 2074 | 2496 | 125843657 | 125843915 | 259 | 2543 | 126845514 | 126845659 | 146 |
| 2450 | 124728016 | 124728109 | 94 | 2497 | 126067351 | 126068100 | 750 | 2544 | 126845660 | 126845769 | 110 |
| 2451 | 124728186 | 124728280 | 95 | 2498 | 126090394 | 126090622 | 229 | 2545 | 126905262 | 126905792 | 531 |
| 2452 | 124728391 | 124728706 | 316 | 2499 | 126090732 | 126090815 | 84 | 2546 | 126905802 | 126906431 | 630 |
| 2453 | 124728971 | 124729064 | 94 | 2500 | 126091315 | 126091581 | 267 | 2547 | 126906454 | 126906541 | 88 |
| 2454 | 124729326 | 124730243 | 918 | 2501 | 126091649 | 126091817 | 169 | 2548 | 127361120 | 127362505 | 1386 |
| 2455 | 124730246 | 124730451 | 206 | 2502 | 126091864 | 126091984 | 121 | 2549 | 127362515 | 127363198 | 684 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|
| 2550 | 127396534 | 127396890 | 357 | 2597 | 128202834 | 128204585 | 1752 | 2644 | 132191815 | 132192316 | 502 |
| 2551 | 127397174 | 127398659 | 1486 | 2598 | 128204612 | 128204809 | 198 | 2645 | 132192340 | 132192551 | 212 |
| 2552 | 127412901 | 127414985 | 2085 | 2599 | 128235086 | 128235531 | 446 | 2646 | 132192565 | 132193805 | 1241 |
| 2553 | 127426307 | 127427129 | 823 | 2600 | 128235608 | 128235769 | 162 | 2647 | 132193815 | 132193892 | 78 |
| 2554 | 127427131 | 127427273 | 143 | 2601 | 128236048 | 128237153 | 1106 | 2648 | 132999138 | 132999579 | 442 |
| 2555 | 127427389 | 127427556 | 168 | 2602 | 128457783 | 128459190 | 1408 | 2649 | 132999594 | 132999785 | 192 |
| 2556 | 127427830 | 127428379 | 550 | 2603 | 128459528 | 128459862 | 335 | 2650 | 132999834 | 133001495 | 1662 |
| 2557 | 127433792 | 127434440 | 649 | 2604 | 128582463 | 128585073 | 2611 | 2651 | 133299393 | 133299722 | 330 |
| 2558 | 127434447 | 127435358 | 912 | 2605 | 128597821 | 128598782 | 962 | 2652 | 133307404 | 133308019 | 616 |
| 2559 | 127435662 | 127435873 | 212 | 2606 | 128598831 | 128599478 | 648 | 2653 | 133471652 | 133471729 | 78 |
| 2560 | 127452171 | 127453013 | 843 | 2607 | 128599771 | 128599871 | 101 | 2654 | 133471823 | 133473207 | 1385 |
| 2561 | 127453834 | 127454618 | 785 | 2608 | 128863536 | 128864084 | 549 | 2655 | 133473258 | 133473391 | 134 |
| 2562 | 127454625 | 127455404 | 780 | 2609 | 128883451 | 128884976 | 1526 | 2656 | 133473393 | 133473562 | 170 |
| 2563 | 127494641 | 127495786 | 1146 | 2610 | 128884981 | 128885926 | 946 | 2657 | 133473563 | 133473724 | 162 |
| 2564 | 127495916 | 127496713 | 798 | 2611 | 129236063 | 129236860 | 798 | 2658 | 133596405 | 133597151 | 747 |
| 2565 | 127500558 | 127500888 | 331 | 2612 | 129237163 | 129238126 | 964 | 2659 | 133597200 | 133598487 | 1288 |
| 2566 | 127501290 | 127503324 | 2035 | 2613 | 129423958 | 129425978 | 2021 | 2660 | 133644843 | 133645287 | 445 |
| 2567 | 127519958 | 127521524 | 1567 | 2614 | 129426004 | 129427392 | 1389 | 2661 | 133645342 | 133646717 | 1376 |
| 2568 | 127521578 | 127521935 | 358 | 2615 | 129580651 | 129582185 | 1535 | 2662 | 133699538 | 133700847 | 1310 |
| 2569 | 127532878 | 127533514 | 637 | 2616 | 129582211 | 129582736 | 526 | 2663 | 133766754 | 133767336 | 583 |
| 2570 | 127533792 | 127534017 | 226 | 2617 | 129593766 | 129596264 | 2499 | 2664 | 133767338 | 133768834 | 1497 |
| 2571 | 127534298 | 127534944 | 647 | 2618 | 129734277 | 129736346 | 2070 | 2665 | 133780540 | 133781109 | 570 |
| 2572 | 127559324 | 127559642 | 319 | 2619 | 129803713 | 129804887 | 1175 | 2666 | 133781121 | 133781223 | 103 |
| 2573 | 127559651 | 127559719 | 69 | 2620 | 129805174 | 129805779 | 606 | 2667 | 133787640 | 133788315 | 676 |
| 2574 | 127559724 | 127560213 | 490 | 2621 | 129813386 | 129815060 | 1675 | 2668 | 133803791 | 133804094 | 304 |
| 2575 | 127560489 | 127560801 | 313 | 2622 | 129815336 | 129816139 | 804 | 2669 | 133804150 | 133804309 | 160 |
| 2576 | 127560804 | 127561406 | 603 | 2623 | 129837669 | 129839125 | 1457 | 2670 | 133832389 | 133833492 | 1104 |
| 2577 | 127568697 | 127569366 | 670 | 2624 | 129898509 | 129899633 | 1125 | 2671 | 133848845 | 133849825 | 981 |
| 2578 | 127569500 | 127569912 | 413 | 2625 | 131153962 | 131156045 | 2084 | 2672 | 133849834 | 133851522 | 1689 |
| 2579 | 127569917 | 127570032 | 116 | 2626 | 131646636 | 131648358 | 1723 | 2673 | 133855569 | 133856785 | 1217 |
| 2580 | 127570152 | 127570770 | 619 | 2627 | 131648376 | 131648797 | 422 | 2674 | 133912064 | 133913796 | 1733 |
| 2581 | 127573563 | 127575630 | 2068 | 2628 | 131651113 | 131652651 | 1539 | 2675 | 133914061 | 133914137 | 77 |
| 2582 | 127650524 | 127650603 | 80 | 2629 | 131652665 | 131653758 | 1094 | 2676 | 133970158 | 133972855 | 2698 |
| 2583 | 127650609 | 127651463 | 855 | 2630 | 131653765 | 131655247 | 1483 | 2677 | 133972858 | 133972988 | 131 |
| 2584 | 127651481 | 127653335 | 1855 | 2631 | 131655254 | 131659484 | 4231 | 2678 | 133994283 | 133994425 | 143 |
| 2585 | 127653339 | 127653414 | 76 | 2632 | 131659489 | 131661719 | 2231 | 2679 | 133994713 | 133996794 | 2082 |
| 2586 | 127653429 | 127653706 | 278 | 2633 | 131733469 | 131734700 | 1232 | 2680 | 133997057 | 133997907 | 851 |
| 2587 | 127656848 | 127657251 | 404 | 2634 | 131792724 | 131793193 | 470 | 2681 | 133998022 | 133998785 | 764 |
| 2588 | 127657349 | 127657762 | 414 | 2635 | 131793473 | 131793722 | 250 | 2682 | 133999102 | 133999296 | 195 |
| 2589 | 127657764 | 127658926 | 1163 | 2636 | 131794008 | 131794347 | 340 | 2683 | 133999386 | 133999471 | 86 |
| 2590 | 127823594 | 127825114 | 1521 | 2637 | 131794348 | 131794493 | 146 | 2684 | 133999537 | 134000831 | 1295 |
| 2591 | 127825246 | 127825674 | 429 | 2638 | 131794576 | 131794649 | 74 | 2685 | 134051551 | 134051688 | 138 |
| 2592 | 128066100 | 128068587 | 2488 | 2639 | 131798432 | 131799906 | 1475 | 2686 | 134052332 | 134052432 | 101 |
| 2593 | 128102964 | 128104615 | 1652 | 2640 | 131823104 | 131825346 | 2243 | 2687 | 134059117 | 134060253 | 1137 |
| 2594 | 128104629 | 128105024 | 396 | 2641 | 131877199 | 131877394 | 196 | 2688 | 134060287 | 134060665 | 379 |
| 2595 | 128198870 | 128200554 | 1685 | 2642 | 131878163 | 131879350 | 1188 | 2689 | 134060677 | 134061228 | 552 |
| 2596 | 128200843 | 128201523 | 681 | 2643 | 132048350 | 132048433 | 84 | 2690 | 134068214 | 134069635 | 1422 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] | ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|------|-----------|-----------|------------|
| 2691 | 134088627 | 134088751 | 125 | 2738 | 134726566 | 134726670 | 105 | 2785 | 134924943 | 134925503 | 561 |
| 2692 | 134088754 | 134089065 | 312 | 2739 | 134728230 | 134728311 | 82 | 2786 | 134925586 | 134925805 | 220 |
| 2693 | 134089186 | 134089292 | 107 | 2740 | 134732873 | 134733110 | 238 | 2787 | 134939815 | 134941897 | 2083 |
| 2694 | 134093637 | 134093969 | 333 | 2741 | 134733243 | 134733320 | 78 | 2788 | 134948484 | 134949249 | 766 |
| 2695 | 134094035 | 134094974 | 940 | 2742 | 134733326 | 134733657 | 332 | 2789 | 134951348 | 134951837 | 490 |
| 2696 | 134094986 | 134095680 | 695 | 2743 | 134733750 | 134733838 | 89 | 2790 | 134954007 | 134954743 | 737 |
| 2697 | 134107155 | 134107749 | 595 | 2744 | 134733887 | 134734820 | 934 | 2791 | 134955500 | 134955567 | 68 |
| 2698 | 134107755 | 134108260 | 506 | 2745 | 134734989 | 134737028 | 2040 | 2792 | 134955963 | 134956065 | 103 |
| 2699 | 134108335 | 134109219 | 885 | 2746 | 134740951 | 134741029 | 79 | 2793 | 134965945 | 134966650 | 706 |
| 2700 | 134128961 | 134129455 | 495 | 2747 | 134743310 | 134743424 | 115 | 2794 | 134966660 | 134966769 | 110 |
| 2701 | 134150705 | 134151217 | 513 | 2748 | 134746633 | 134747173 | 541 | 2795 | 134966805 | 134967575 | 771 |
| 2702 | 134199794 | 134201557 | 1764 | 2749 | 134749854 | 134750566 | 713 | 2796 | 134967800 | 134968004 | 205 |
| 2703 | 134201558 | 134201864 | 307 | 2750 | 134750633 | 134752636 | 2004 | 2797 | 134970866 | 134971053 | 188 |
| 2704 | 134270077 | 134270593 | 517 | 2751 | 134761918 | 134762482 | 565 | 2798 | 134971243 | 134971440 | 198 |
| 2705 | 134354361 | 134355311 | 951 | 2752 | 134763485 | 134764063 | 579 | 2799 | 134971583 | 134971997 | 415 |
| 2706 | 134355400 | 134355612 | 213 | 2753 | 134764192 | 134765648 | 1457 | 2800 | 134971998 | 134973675 | 1678 |
| 2707 | 134412512 | 134413225 | 714 | 2754 | 134765660 | 134765736 | 77 | 2801 | 134973691 | 134974142 | 452 |
| 2708 | 134416383 | 134416940 | 558 | 2755 | 134765743 | 134766279 | 537 | 2802 | 134981958 | 134982454 | 497 |
| 2709 | 134445236 | 134445711 | 476 | 2756 | 134775758 | 134775877 | 120 | 2803 | 134987689 | 134987992 | 304 |
| 2710 | 134447303 | 134452676 | 5374 | 2757 | 134775966 | 134776043 | 78 | 2804 | 134988129 | 134988264 | 136 |
| 2711 | 134456249 | 134456408 | 160 | 2758 | 134776059 | 134776145 | 87 | 2805 | 134988269 | 134989777 | 1509 |
| 2712 | 134457364 | 134457906 | 543 | 2759 | 134776241 | 134776373 | 133 | 2806 | 134993263 | 134993732 | 470 |
| 2713 | 134461493 | 134461724 | 232 | 2760 | 134776694 | 134776905 | 212 | 2807 | 134998141 | 135000832 | 2692 |
| 2714 | 134461963 | 134462776 | 814 | 2761 | 134787912 | 134788496 | 585 | 2808 | 135000877 | 135001335 | 459 |
| 2715 | 134500783 | 134500967 | 185 | 2762 | 134790276 | 134790877 | 602 | 2809 | 135001337 | 135001540 | 204 |
| 2716 | 134501357 | 134501530 | 174 | 2763 | 134791870 | 134793011 | 1142 | 2810 | 135001557 | 135001950 | 394 |
| 2717 | 134520677 | 134521834 | 1158 | 2764 | 134795277 | 134795492 | 216 | 2811 | 135009450 | 135009654 | 205 |
| 2718 | 134521903 | 134522762 | 860 | 2765 | 134795531 | 134795614 | 84 | 2812 | 135009931 | 135010300 | 370 |
| 2719 | 134542491 | 134543604 | 1114 | 2766 | 134795752 | 134795847 | 96 | 2813 | 135010600 | 135011432 | 833 |
| 2720 | 134543621 | 134544161 | 541 | 2767 | 134822431 | 134824492 | 2062 | 2814 | 135020586 | 135021589 | 1004 |
| 2721 | 134544196 | 134544572 | 377 | 2768 | 134829130 | 134830029 | 900 | 2815 | 135021609 | 135022826 | 1218 |
| 2722 | 134581858 | 134582029 | 172 | 2769 | 134830063 | 134831210 | 1148 | 2816 | 135036286 | 135036457 | 172 |
| 2723 | 134582547 | 134583780 | 1234 | 2770 | 134846260 | 134846454 | 195 | 2817 | 135036566 | 135037584 | 1019 |
| 2724 | 134587735 | 134589773 | 2039 | 2771 | 134846464 | 134847020 | 557 | 2818 | 135037603 | 135037670 | 68 |
| 2725 | 134605492 | 134606411 | 920 | 2772 | 134864644 | 134865420 | 777 | 2819 | 135037942 | 135038074 | 133 |
| 2726 | 134606450 | 134607024 | 575 | 2773 | 134866323 | 134866552 | 230 | 2820 | 135038133 | 135038409 | 277 |
| 2727 | 134607232 | 134607608 | 377 | 2774 | 134866769 | 134867440 | 672 | 2821 | 135041139 | 135042566 | 1428 |
| 2728 | 134627478 | 134628657 | 1180 | 2775 | 134868622 | 134869094 | 473 | 2822 | 135042705 | 135044083 | 1379 |
| 2729 | 134629034 | 134629568 | 535 | 2776 | 134883273 | 134883640 | 368 | 2823 | 135056062 | 135056475 | 414 |
| 2730 | 134646847 | 134647768 | 922 | 2777 | 134884291 | 134884373 | 83 | 2824 | 135056736 | 135056967 | 232 |
| 2731 | 134676073 | 134676859 | 787 | 2778 | 134888027 | 134888525 | 499 | 2825 | 135057241 | 135058146 | 906 |
| 2732 | 134680465 | 134680625 | 161 | 2779 | 134892219 | 134892292 | 74 | 2826 | 135066335 | 135066507 | 173 |
| 2733 | 134680687 | 134681045 | 359 | 2780 | 134892588 | 134895003 | 2416 | 2827 | 135078682 | 135078749 | 68 |
| 2734 | 134681997 | 134682225 | 229 | 2781 | 134898748 | 134901484 | 2737 | 2828 | 135086638 | 135087190 | 553 |
| 2735 | 134684617 | 134685919 | 1303 | 2782 | 134901513 | 134901588 | 76 | 2829 | 135096424 | 135096501 | 78 |
| 2736 | 134694386 | 134694948 | 563 | 2783 | 134901595 | 134902093 | 499 | 2830 | 135109370 | 135110217 | 848 |
| 2737 | 134726285 | 134726521 | 237 | 2784 | 134910565 | 134912548 | 1984 | 2831 | 135115874 | 135116405 | 532 |

Fortsetzung Anhang 6.10

| ID | Start | Stop | Länge [bp] |
|------|-----------|-----------|---------------|
| 2832 | 135116677 | 135117952 | 1276 |
| 2833 | 135120225 | 135122273 | 2049 |
| 2834 | 135122941 | 135123693 | 753 |
| 2835 | 135127845 | 135129836 | 1992 |
| 2836 | 135189307 | 135192592 | 3286 |
| 2837 | 135193525 | 135195598 | 2074 |
| 2838 | 135228548 | 135230315 | 1768 |
| 2839 | 135230387 | 135230608 | 222 |
| 2840 | 135231237 | 135231311 | 75 |
| 2841 | 135231380 | 135231467 | 88 |
| 2842 | 135231505 | 135231977 | 473 |
| 2843 | 135286031 | 135286104 | 74 |
| 2844 | 135327878 | 135327955 | 78 |
| 2845 | 135348962 | 135349074 | 113 |
| 2846 | 135373335 | 135373421 | 87 |
| 2847 | 135373711 | 135373789 | 79 |
| 2848 | 135374015 | 135374160 | 146 |

Literaturverzeichnis

- Aguilera, O., M. F. Fraga, et al. (2006). "Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer." *Oncogene* **25**(29): 4116-4121.
- Alaminos, M., V. Davalos, et al. (2005). "EMP3, a myelin-related gene located in the critical 19q13.3 region, is epigenetically silenced and exhibits features of a candidate tumor suppressor in glioma and neuroblastoma." *Cancer Res* **65**(7): 2565-2571.
- Albert, T. J., M. N. Molla, et al. (2007). "Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization." *Nat Methods* **4**(11): 903-905.
- Assem, M., Z. Sibenaller, et al. (2012). "Enhancing diagnosis, prognosis, and therapeutic outcome prediction of gliomas using genomics." *OMICS* **16**(3): 113-122.
- Axelrod, R., D. E. Axelrod, et al. (2006). "Evolution of cooperation among tumor cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(36): 13474-13479.
- Bachman, K. E., B. H. Park, et al. (2003). "Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene." *Cancer Cell* **3**(1): 89-95.
- Bast, R. C. J., D. W. Kufe, et al., Eds. (2000). *Holland-Frei Cancer Medicine*. 5th edition, Hamilton (ON): BC Decker.
- Batchelor, T. T., R. A. Betensky, et al. (2004). "Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma." *Clin Cancer Res* **10**(1 Pt 1): 228-233.
- Bau, S., N. Schracke, et al. (2009). "Targeted next-generation sequencing by specific capture of multiple genomic loci using low-volume microfluidic DNA arrays." *Anal Bioanal Chem* **393**(1): 171-175.
- Baylin, S. B. and P. A. Jones (2011). "A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications." *Nat Rev Cancer* **11**(10): 726-734.
- Baylin, S. B. and J. E. Ohm (2006). "Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction?" *Nat Rev Cancer* **6**(2): 107-116.
- Bentley, D. R., S. Balasubramanian, et al. (2008). "Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry." *Nature* **456**(7218): 53-59.
- Berger, A. H., A. G. Knudson, et al. (2011). "A continuum model for tumour suppression." *Nature* **476**(7359): 163-169.
- Berger, S. L., T. Kouzarides, et al. (2009). "An operational definition of epigenetics." *Genes Dev* **23**(7): 781-783.
- Bestor, T. H. (2000). "The DNA methyltransferases of mammals." *Hum Mol Genet* **9**(16): 2395-2402.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." *Genes Dev* **16**(1): 6-21.
- Blelloch, R., Z. Wang, et al. (2006). "Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus." *Stem Cells* **24**(9): 2007-2013.
- Bock, C., E. Kiskinis, et al. (2011). "Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines." *Cell* **144**(3): 439-452.
- Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." *Cancer Res* **49**(17): 4682-4689.
- Brennan, C. (2011). "Genomic profiles of glioma." *Curr Neurol Neurosci Rep* **11**(3): 291-297.
- Burbano, H. A., E. Hodges, et al. (2010). "Targeted investigation of the Neandertal genome by array-based sequence capture." *Science* **328**(5979): 723-725.
- Cadieux, B., T. T. Ching, et al. (2006). "Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation." *Cancer Res* **66**(17): 8469-8476.
- Cambien, B., R. Rezzonico, et al. (2008). "Silencing of hSlo potassium channels in human osteosarcoma cells promotes tumorigenesis." *Int J Cancer* **123**(2): 365-371.
- Chang, H., D. G. Jackson, et al. (2011). "Exome sequencing reveals comprehensive genomic alterations across eight cancer cell lines." *PLoS One* **6**(6): e21097.

- Chedin, F. (2011). "The DNMT3 family of mammalian de novo DNA methyltransferases." Prog Mol Biol Transl Sci **101**: 255-285.
- Chen, K., J. W. Wallis, et al. (2009). "BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation." Nat Methods **6**(9): 677-681.
- Chen, T. and E. Li (2004). "Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases." Curr Top Dev Biol **60**: 55-89.
- Chow, L. S., K. W. Lo, et al. (2004). "Aberrant methylation of RASSF4/AD037 in nasopharyngeal carcinoma." Oncol Rep **12**(4): 781-787.
- Cokus, S. J., S. Feng, et al. (2008). "Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning." Nature **452**(7184): 215-219.
- Colicelli, J. (2004). "Human RAS superfamily proteins and related GTPases." Sci STKE **2004**(250): RE13.
- Costello, J. F., M. C. Fruhwald, et al. (2000). "Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns." Nat Genet **24**(2): 132-138.
- Cruz-Correa, M., H. Cui, et al. (2004). "Loss of imprinting of insulin growth factor II gene: a potential heritable biomarker for colon neoplasia predisposition." Gastroenterology **126**(4): 964-970.
- D'Ascenzo, M., C. Meacham, et al. (2009). "Mutation discovery in the mouse using genetically guided array capture and resequencing." Mamm Genome **20**(7): 424-436.
- Deatherage, D. E., D. Potter, et al. (2009). "Methylation analysis by microarray." Methods Mol Biol **556**: 117-139.
- Debska-Vielhaber, G., M. M. Godlewski, et al. (2009). "Large-conductance K⁺ channel openers induce death of human glioma cells." J Physiol Pharmacol **60**(4): 27-36.
- Djos, A., T. Martinsson, et al. (2012). "The RASSF gene family members RASSF5, RASSF6 and RASSF7 show frequent DNA methylation in neuroblastoma." Mol Cancer **11**(1): 40.
- Dohm, J. C., C. Lottaz, et al. (2008). "Substantial biases in ultra-short read data sets from high-throughput DNA sequencing." Nucleic Acids Res **36**(16): e105.
- Down, T. A., V. K. Rakyant, et al. (2008). "A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis." Nat Biotechnol **26**(7): 779-785.
- Dressman, D., H. Yan, et al. (2003). "Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(15): 8817-8822.
- Ducray, F., S. El Hallani, et al. (2009). "Diagnostic and prognostic markers in gliomas." Curr Opin Oncol **21**(6): 537-542.
- Duesberg, P. H. and P. K. Vogt (1970). "Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses." Proc Natl Acad Sci U S A **67**(4): 1673-1680.
- Eads, C. A., K. D. Danenberg, et al. (2000). "MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation." Nucleic Acids Res **28**(8): E32.
- Ehrich, M., M. R. Nelson, et al. (2005). "Quantitative high-throughput analysis of DNA methylation patterns by base-specific cleavage and mass spectrometry." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(44): 15785-15790.
- Ernst, A., S. Hofmann, et al. (2009). "Genomic and expression profiling of glioblastoma stem cell-like spheroid cultures identifies novel tumor-relevant genes associated with survival." Clin Cancer Res **15**(21): 6541-6550.
- Esteller, M. (2002). "CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future." Oncogene **21**(35): 5427-5440.
- Esteller, M. (2007). "Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps." Nat Rev Genet **8**(4): 286-298.
- Esteller, M. (2007). "Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome." Hum Mol Genet **16 Spec No 1**: R50-59.
- Esteller, M. (2008). "Epigenetics in cancer." N Engl J Med **358**(11): 1148-1159.

- Esteller, M., S. R. Hamilton, et al. (1999). "Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia." *Cancer Res* **59**(4): 793-797.
- Fazzari, M. J. and J. M. Grealley (2004). "Epigenomics: beyond CpG islands." *Nat Rev Genet* **5**(6): 446-455.
- Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* **61**(5): 759-767.
- Fedurco, M., A. Romieu, et al. (2006). "BTA, a novel reagent for DNA attachment on glass and efficient generation of solid-phase amplified DNA colonies." *Nucleic Acids Res* **34**(3): e22.
- Feinberg, A. P. (2004). "The epigenetics of cancer etiology." *Semin Cancer Biol* **14**(6): 427-432.
- Feinberg, A. P. and B. Tycko (2004). "The history of cancer epigenetics." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 143-153.
- Feinberg, A. P. and B. Vogelstein (1983). "Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts." *Nature* **301**(5895): 89-92.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, et al. (2005). "Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30): 10604-10609.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, et al. (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." *Nat Genet* **37**(4): 391-400.
- Frigola, J., M. Ribas, et al. (2002). "Methylome profiling of cancer cells by amplification of inter-methylated sites (AIMS)." *Nucleic Acids Res* **30**(7): e28.
- Frommer, M., L. E. McDonald, et al. (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1827-1831.
- Furnari, F. B., T. Fenton, et al. (2007). "Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment." *Genes Dev* **21**(21): 2683-2710.
- Gardiner-Garden, M. and M. Frommer (1987). "CpG islands in vertebrate genomes." *J Mol Biol* **196**(2): 261-282.
- Gnirke, A., A. Melnikov, et al. (2009). "Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing." *Nat Biotechnol* **27**(2): 182-189.
- Goll, M. G., F. Kirpekar, et al. (2006). "Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2." *Science* **311**(5759): 395-398.
- Gotze, S., M. Wolter, et al. (2010). "Frequent promoter hypermethylation of Wnt pathway inhibitor genes in malignant astrocytic gliomas." *Int J Cancer* **126**(11): 2584-2593.
- Greger, V., E. Passarge, et al. (1989). "Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma." *Hum Genet* **83**(2): 155-158.
- Groth, A., W. Rocha, et al. (2007). "Chromatin challenges during DNA replication and repair." *Cell* **128**(4): 721-733.
- Gu, H., C. Bock, et al. (2010). "Genome-scale DNA methylation mapping of clinical samples at single-nucleotide resolution." *Nat Methods* **7**(2): 133-136.
- Han, X., L. Xi, et al. (2008). "The potassium ion channel opener NS1619 inhibits proliferation and induces apoptosis in A2780 ovarian cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* **375**(2): 205-209.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- Hecht, J. L. and J. C. Aster (2000). "Molecular biology of Burkitt's lymphoma." *J Clin Oncol* **18**(21): 3707-3721.
- Herman, J. G. and S. B. Baylin (2003). "Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation." *N Engl J Med* **349**(21): 2042-2054.
- Herman, J. G., J. R. Graff, et al. (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(18): 9821-9826.

- Heyn, H., E. Vidal, et al. (2012). "Whole-genome bisulfite DNA sequencing of a DNMT3B mutant patient." *Epigenetics* **7**(6).
- Hill, C., S. B. Hunter, et al. (2003). "Genetic markers in glioblastoma: prognostic significance and future therapeutic implications." *Adv Anat Pathol* **10**(4): 212-217.
- Hodges, E., M. Rooks, et al. (2009). "Hybrid selection of discrete genomic intervals on custom-designed microarrays for massively parallel sequencing." *Nat Protoc* **4**(6): 960-974.
- Hodges, E., A. D. Smith, et al. (2009). "High definition profiling of mammalian DNA methylation by array capture and single molecule bisulfite sequencing." *Genome Res* **19**(9): 1593-1605.
- Hodges, E., Z. Xuan, et al. (2007). "Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing." *Nat Genet* **39**(12): 1522-1527.
- Holland, E. C. (2001). "Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models." *Nat Rev Genet* **2**(2): 120-129.
- Holliday, R. and J. E. Pugh (1975). "DNA modification mechanisms and gene activity during development." *Science* **187**(4173): 226-232.
- Holst, C. R., G. J. Nuovo, et al. (2003). "Methylation of p16(INK4a) promoters occurs in vivo in histologically normal human mammary epithelia." *Cancer Res* **63**(7): 1596-1601.
- Huang, P. H., A. M. Xu, et al. (2009). "Oncogenic EGFR signaling networks in glioma." *Sci Signal* **2**(87): re6.
- Huang, T. H., M. R. Perry, et al. (1999). "Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells." *Hum Mol Genet* **8**(3): 459-470.
- Huang, Y. W., T. H. Huang, et al. (2010). "Profiling DNA methylomes from microarray to genome-scale sequencing." *Technol Cancer Res Treat* **9**(2): 139-147.
- Human Epigenome Project (2008). "Moving AHEAD with an international human epigenome project." *Nature* **454**(7205): 711-715.
- Hupe, P., N. Stransky, et al. (2004). "Analysis of array CGH data: from signal ratio to gain and loss of DNA regions." *Bioinformatics* **20**(18): 3413-3422.
- Igartua, C., E. H. Turner, et al. (2010). "Targeted enrichment of specific regions in the human genome by array hybridization." *Curr Protoc Hum Genet* **Chapter 18**: Unit 18 13.
- International Cancer Genome Consortium (2010). "International network of cancer genome projects." *Nature* **464**(7291): 993-998.
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." *Nature* **431**(7011): 931-945.
- Irizarry, R. A., C. Ladd-Acosta, et al. (2009). "The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores." *Nat Genet* **41**(2): 178-186.
- Ito, Y., T. Koessler, et al. (2008). "Somatically acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer." *Hum Mol Genet* **17**(17): 2633-2643.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nat Rev Genet* **3**(6): 415-428.
- Jones, P. A. and P. W. Laird (1999). "Cancer epigenetics comes of age." *Nat Genet* **21**(2): 163-167.
- Kanu, O. O., A. Mehta, et al. (2009). "Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets." *Expert Opin Ther Targets* **13**(6): 701-718.
- Keller, A., C. Harz, et al. (2011). "Identification of novel SNPs in glioblastoma using targeted resequencing." *PLoS One* **6**(6): e18158.
- Kim, R. (2005). "Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death." *Biochem Biophys Res Commun* **333**(2): 336-343.
- Kinzler, K. W. and B. Vogelstein (1997). "Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers." *Nature* **386**(6627): 761, 763.
- Klaus, A. and W. Birchmeier (2008). "Wnt signalling and its impact on development and cancer." *Nat Rev Cancer* **8**(5): 387-398.

- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.
- Korbel, J. O., A. E. Urban, et al. (2007). "Paired-end mapping reveals extensive structural variation in the human genome." Science **318**(5849): 420-426.
- Korkola, J. and J. W. Gray (2010). "Breast cancer genomes--form and function." Curr Opin Genet Dev **20**(1): 4-14.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Kriegstein, A. and A. Alvarez-Buylla (2009). "The glial nature of embryonic and adult neural stem cells." Annu Rev Neurosci **32**: 149-184.
- Krupnik, V. E., J. D. Sharp, et al. (1999). "Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family." Gene **238**(2): 301-313.
- Laird, P. W. (2010). "Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis." Nat Rev Genet **11**(3): 191-203.
- Landegren, U., E. Schallmeiner, et al. (2004). "Molecular tools for a molecular medicine: analyzing genes, transcripts and proteins using padlock and proximity probes." J Mol Recognit **17**(3): 194-197.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Langmead, B., C. Trapnell, et al. (2009). "Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome." Genome Biol **10**(3): R25.
- Lazcoz, P., J. Munoz, et al. (2007). "Loss of heterozygosity and microsatellite instability on chromosome arm 10q in neuroblastoma." Cancer Genet Cytogenet **174**(1): 1-8.
- Lee, H., B. D. O'Connor, et al. (2009). "Improving the efficiency of genomic loci capture using oligonucleotide arrays for high throughput resequencing." BMC Genomics **10**: 646.
- Li, B., M. Carey, et al. (2007). "The role of chromatin during transcription." Cell **128**(4): 707-719.
- Li, H. and R. Durbin (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform." Bioinformatics **25**(14): 1754-1760.
- Lister, R., R. C. O'Malley, et al. (2008). "Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis." Cell **133**(3): 523-536.
- Liu, C., Y. Tu, et al. (2011). "Wnt/beta-Catenin pathway in human glioma: expression pattern and clinical/prognostic correlations." Clin Exp Med **11**(2): 105-112.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol **20**: 781-810.
- Louis, D. N., H. Ohgaki, et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system." Acta Neuropathol **114**(2): 97-109.
- Luco, R. F., Q. Pan, et al. (2010). "Regulation of alternative splicing by histone modifications." Science **327**(5968): 996-1000.
- Lujambio, A., S. Ropero, et al. (2007). "Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells." Cancer Res **67**(4): 1424-1429.
- Lyon, M. F. (1961). "Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.)." Nature **190**: 372-373.
- MacKenzie, D. J. (1926). "A Classification of the Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis With a Correlated Study of Prognosis." Canadian Medical Association journal **16**(7): 872-872.
- Mamanova, L., A. J. Coffey, et al. (2010). "Target-enrichment strategies for next-generation sequencing." Nat Methods **7**(2): 111-118.
- Mardis, E. R. (2008). "Next-generation DNA sequencing methods." Annu Rev Genomics Hum Genet **9**: 387-402.
- Margulies, M., M. Egholm, et al. (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." Nature **437**(7057): 376-380.

- Martin, G. S. (1970). "Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state." *Nature* **227**(5262): 1021-1023.
- Maunakea, A. K., R. P. Nagarajan, et al. (2010). "Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters." *Nature* **466**(7303): 253-257.
- Meder, B., J. Haas, et al. (2011). "Targeted next-generation sequencing for the molecular genetic diagnostics of cardiomyopathies." *Circ Cardiovasc Genet* **4**(2): 110-122.
- Meissner, A. (2010). "Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells." *Nat Biotechnol* **28**(10): 1079-1088.
- Meissner, A., A. Gnirke, et al. (2005). "Reduced representation bisulfite sequencing for comparative high-resolution DNA methylation analysis." *Nucleic Acids Res* **33**(18): 5868-5877.
- Meissner, A., T. S. Mikkelsen, et al. (2008). "Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells." *Nature* **454**(7205): 766-770.
- Metzker, M. L. (2010). "Sequencing technologies - the next generation." *Nat Rev Genet* **11**(1): 31-46.
- Moore, S. D., S. R. Herrick, et al. (2004). "Uterine leiomyomata with t(10;17) disrupt the histone acetyltransferase MORF." *Cancer Res* **64**(16): 5570-5577.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, et al. (1997). "Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC." *Science* **275**(5307): 1787-1790.
- Nakamura, M., T. Watanabe, et al. (2001). "Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene." *Carcinogenesis* **22**(10): 1715-1719.
- Nancy, V., R. M. Wolthuis, et al. (1999). "Identification and characterization of potential effector molecules of the Ras-related GTPase Rap2." *J Biol Chem* **274**(13): 8737-8745.
- Ng, S. B., E. H. Turner, et al. (2009). "Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes." *Nature* **461**(7261): 272-276.
- Niehrs, C. (2006). "Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators." *Oncogene* **25**(57): 7469-7481.
- Niida, A., T. Hiroko, et al. (2004). "DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway." *Oncogene* **23**(52): 8520-8526.
- Nikopoulos, K., C. Gilissen, et al. (2010). "Next-generation sequencing of a 40 Mb linkage interval reveals TSPAN12 mutations in patients with familial exudative vitreoretinopathy." *Am J Hum Genet* **86**(2): 240-247.
- Nilsson, M., H. Malmgren, et al. (1994). "Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection." *Science* **265**(5181): 2085-2088.
- Nordling, C. O. (1953). "A new theory on cancer-inducing mechanism." *Br J Cancer* **7**(1): 68-72.
- Noushmehr, H., D. J. Weisenberger, et al. (2010). "Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma." *Cancer Cell* **17**(5): 510-522.
- Nowell, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations." *Science* **194**(4260): 23-28.
- Nowell, P. C. and D. A. Hungerford (1960). "Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes." *J Natl Cancer Inst* **25**: 85-109.
- Ohba, Y., N. Mochizuki, et al. (2000). "Rap2 as a slowly responding molecular switch in the Rap1 signaling cascade." *Mol Cell Biol* **20**(16): 6074-6083.
- Ohgaki, H., P. Dessen, et al. (2004). "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." *Cancer Res* **64**(19): 6892-6899.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma." *Am J Pathol* **170**(5): 1445-1453.
- Ohgaki, H. and P. Kleihues (2009). "Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas." *Cancer Sci* **100**(12): 2235-2241.
- Okamoto, J., T. Hirata, et al. (2010). "EMX2 is epigenetically silenced and suppresses growth in human lung cancer." *Oncogene* **29**(44): 5969-5975.

- Okano, M., D. W. Bell, et al. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." *Cell* **99**(3): 247-257.
- Okou, D. T., K. M. Steinberg, et al. (2007). "Microarray-based genomic selection for high-throughput resequencing." *Nat Methods* **4**(11): 907-909.
- Osborne, R. J. and M. G. Hamshere (2000). "A genome-wide map showing common regions of loss of heterozygosity/allelic imbalance in breast cancer." *Cancer Res* **60**(14): 3706-3712.
- Ou, Z., P. Stankiewicz, et al. (2011). "Observation and prediction of recurrent human translocations mediated by NAHR between nonhomologous chromosomes." *Genome Res* **21**(1): 33-46.
- Palos, T. P., S. Zheng, et al. (1999). "Wnt signaling induces GLT-1 expression in rat C6 glioma cells." *J Neurochem* **73**(3): 1012-1023.
- Pareek, C. S., R. Smoczynski, et al. (2011). "Sequencing technologies and genome sequencing." *J Appl Genet* **52**(4): 413-435.
- Parpura, V., M. T. Heneka, et al. (2012). "Glial cells in (patho)physiology." *J Neurochem* **121**(1): 4-27.
- Parsons, D. W., S. Jones, et al. (2008). "An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme." *Science* **321**(5897): 1807-1812.
- Penterman, J., D. Zilberman, et al. (2007). "DNA demethylation in the Arabidopsis genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(16): 6752-6757.
- Phillips, H. S., S. Kharbada, et al. (2006). "Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis." *Cancer Cell* **9**(3): 157-173.
- Polakis, P. (2007). "The many ways of Wnt in cancer." *Curr Opin Genet Dev* **17**(1): 45-51.
- Pu, P., Z. Zhang, et al. (2009). "Downregulation of Wnt2 and beta-catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth." *Cancer Gene Ther* **16**(4): 351-361.
- Pulvirenti, T., M. Van Der Heijden, et al. (2011). "Dishevelled 2 signaling promotes self-renewal and tumorigenicity in human gliomas." *Cancer Res* **71**(23): 7280-7290.
- Qian, J., J. Xie, et al. (2007). "Dickkopf-1 (DKK1) is a widely expressed and potent tumor-associated antigen in multiple myeloma." *Blood* **110**(5): 1587-1594.
- Quail, M. A., I. Kozarewa, et al. (2008). "A large genome center's improvements to the Illumina sequencing system." *Nat Methods* **5**(12): 1005-1010.
- Ransom, C. B. and H. Sontheimer (2001). "BK channels in human glioma cells." *J Neurophysiol* **85**(2): 790-803.
- Rao, S. K., J. Edwards, et al. (2010). "A survey of glioblastoma genomic amplifications and deletions." *J Neurooncol* **96**(2): 169-179.
- Riemenschneider, M. J., J. W. Jeuken, et al. (2010). "Molecular diagnostics of gliomas: state of the art." *Acta Neuropathol* **120**(5): 567-584.
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2012). *Krebs in Deutschland 2007/2008 8. Auflage*. Berlin.
- Robertson, K. D. (2002). "DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web." *Oncogene* **21**(35): 5361-5379.
- Ronaghi, M., M. Uhlen, et al. (1998). "A sequencing method based on real-time pyrophosphate." *Science* **281**(5375): 363, 365.
- Ropero, S., M. F. Fraga, et al. (2006). "A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition." *Nat Genet* **38**(5): 566-569.
- Roth, W., C. Wild-Bode, et al. (2000). "Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells." *Oncogene* **19**(37): 4210-4220.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-491.
- Sanger, F. and A. R. Coulson (1975). "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase." *J Mol Biol* **94**(3): 441-448.

- Satoh, J. and Y. Kuroda (2000). "Beta-catenin expression in human neural cell lines following exposure to cytokines and growth factors." *Neuropathology* **20**(2): 113-123.
- Schwartzbaum, J. A., J. L. Fisher, et al. (2006). "Epidemiology and molecular pathology of glioma." *Nat Clin Pract Neurol* **2**(9): 494-503; quiz 491 p following 516.
- Shields, J. M., K. Pruitt, et al. (2000). "Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'." *Trends Cell Biol* **10**(4): 147-154.
- Shou, J., F. Ali-Osman, et al. (2002). "Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA." *Oncogene* **21**(6): 878-889.
- Smith, Z. D., H. Gu, et al. (2009). "High-throughput bisulfite sequencing in mammalian genomes." *Methods* **48**(3): 226-232.
- Soni, D., J. A. King, et al. (2005). "Genetics of glioblastoma multiforme: mitogenic signaling and cell cycle pathways converge." *J Clin Neurosci* **12**(1): 1-5.
- Stankewich, M. C., P. R. Stabach, et al. (2006). "Human Sec31B: a family of new mammalian orthologues of yeast Sec31p that associate with the COPII coat." *J Cell Sci* **119**(Pt 5): 958-969.
- Steenman, M. J., S. Rainier, et al. (1994). "Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour." *Nat Genet* **7**(3): 433-439.
- Stehelin, D., H. E. Varmus, et al. (1976). "DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA." *Nature* **260**(5547): 170-173.
- Summerer, D., N. Schracke, et al. (2010). "Targeted high throughput sequencing of a cancer-related exome subset by specific sequence capture with a fully automated microarray platform." *Genomics* **95**(4): 241-246.
- Surani, M. A., S. C. Barton, et al. (1984). "Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis." *Nature* **308**(5959): 548-550.
- Suzuki, H., D. N. Watkins, et al. (2004). "Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer." *Nat Genet* **36**(4): 417-422.
- Tabin, C. J., S. M. Bradley, et al. (1982). "Mechanism of activation of a human oncogene." *Nature* **300**(5888): 143-149.
- Takai, D. and P. A. Jones (2002). "Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(6): 3740-3745.
- Tang, B. L., T. Zhang, et al. (2000). "Mammalian homologues of yeast sec31p. An ubiquitously expressed form is localized to endoplasmic reticulum (ER) exit sites and is essential for ER-Golgi transport." *J Biol Chem* **275**(18): 13597-13604.
- Terrano, D. T., M. Upreti, et al. (2010). "Cyclin-dependent kinase 1-mediated Bcl-xL/Bcl-2 phosphorylation acts as a functional link coupling mitotic arrest and apoptosis." *Mol Cell Biol* **30**(3): 640-656.
- Tews, B., P. Roerig, et al. (2007). "Hypermethylation and transcriptional downregulation of the CITED4 gene at 1p34.2 in oligodendroglial tumours with allelic losses on 1p and 19q." *Oncogene* **26**(34): 5010-5016.
- The 1000 Genomes Project (2010). "A map of human genome variation from population-scale sequencing." *Nature* **467**(7319): 1061-1073.
- The Cancer Genome Atlas (2008). "Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways." *Nature* **455**(7216): 1061-1068.
- Todd, R. and D. T. Wong (1999). "Oncogenes." *Anticancer Res* **19**(6A): 4729-4746.
- Tonon, G., K. K. Wong, et al. (2005). "High-resolution genomic profiles of human lung cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(27): 9625-9630.
- Turcan, S., D. Rohle, et al. (2012). "IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype." *Nature* **483**(7390): 479-483.

- Turek-Plewa, J. and P. P. Jagodzinski (2005). "The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression." *Cell Mol Biol Lett* **10**(4): 631-647.
- Vaquero, A., A. Loyola, et al. (2003). "The constantly changing face of chromatin." *Sci Aging Knowledge Environ* **2003**(14): RE4.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." *Science* **291**(5507): 1304-1351.
- Verhaak, R. G., K. A. Hoadley, et al. (2010). "Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1." *Cancer Cell* **17**(1): 98-110.
- Vibhakar, R., G. Foltz, et al. (2007). "Dickkopf-1 is an epigenetically silenced candidate tumor suppressor gene in medulloblastoma." *Neuro Oncol* **9**(2): 135-144.
- Vogelstein, B., D. Lane, et al. (2000). "Surfing the p53 network." *Nature* **408**(6810): 307-310.
- Volpe, T. A., C. Kidner, et al. (2002). "Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi." *Science* **297**(5588): 1833-1837.
- Waddington, C. H. (1939). "Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **25**(7): 299-307.
- Wales, M. M., M. A. Biel, et al. (1995). "p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3." *Nat Med* **1**(6): 570-577.
- Walsh, C. P., J. R. Chaillet, et al. (1998). "Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation." *Nat Genet* **20**(2): 116-117.
- Wang, J., M. Beauchemin, et al. (2011). "Bcl-xL phosphorylation at Ser49 by polo kinase 3 during cell cycle progression and checkpoints." *Cell Signal* **23**(12): 2030-2038.
- Wang, R. Y., C. W. Gehrke, et al. (1980). "Comparison of bisulfite modification of 5-methyldeoxycytidine and deoxycytidine residues." *Nucleic Acids Res* **8**(20): 4777-4790.
- Wang, Z., M. Gerstein, et al. (2009). "RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics." *Nat Rev Genet* **10**(1): 57-63.
- Watt, F. and P. L. Molloy (1988). "Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter." *Genes Dev* **2**(9): 1136-1143.
- Weaver, A. K., V. C. Bomben, et al. (2006). "Expression and function of calcium-activated potassium channels in human glioma cells." *Glia* **54**(3): 223-233.
- Weber, M., J. J. Davies, et al. (2005). "Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells." *Nat Genet* **37**(8): 853-862.
- Weinberg, R. A., Ed. (2007). *The Biology of Cancer*. New York, Garland Science.
- Weller, M., J. Felsberg, et al. (2009). "Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network." *J Clin Oncol* **27**(34): 5743-5750.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman, et al. (2005). "The Ras superfamily at a glance." *J Cell Sci* **118**(Pt 5): 843-846.
- Wijnhoven, S. W., H. J. Kool, et al. (2001). "Loss of heterozygosity in somatic cells of the mouse. An important step in cancer initiation?" *Mutat Res* **473**(1): 23-36.
- Wu, H., Y. Chen, et al. (2005). "Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis." *Nature* **438**(7070): 981-987.
- Xiong, Z. and P. W. Laird (1997). "COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay." *Nucleic Acids Res* **25**(12): 2532-2534.
- Yaman, E., R. Gasper, et al. (2009). "RasGEF1A and RasGEF1B are guanine nucleotide exchange factors that discriminate between Rap GTP-binding proteins and mediate Rap2-specific nucleotide exchange." *FEBS J* **276**(16): 4607-4616.
- Yan, H., D. W. Parsons, et al. (2009). "IDH1 and IDH2 mutations in gliomas." *N Engl J Med* **360**(8): 765-773.

- Yoder, J. A., C. P. Walsh, et al. (1997). "Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites." Trends Genet **13**(8): 335-340.
- Yu, J. M., E. S. Jun, et al. (2007). "Role of Wnt5a in the proliferation of human glioblastoma cells." Cancer Lett **257**(2): 172-181.
- Zhang, M. Q. (1998). "Statistical features of human exons and their flanking regions." Hum Mol Genet **7**(5): 919-932.
- Zhang, X., J. Yazaki, et al. (2006). "Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis." Cell **126**(6): 1189-1201.
- Zhu, P., E. Martin, et al. (2004). "Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis." Cancer Cell **5**(5): 455-463.
- Zhu, Y. and L. F. Parada (2002). "The molecular and genetic basis of neurological tumours." Nat Rev Cancer **2**(8): 616-626.

Publikation

Commonly altered genomic regions in acute myeloid leukemia are enriched for somatic mutations involved in chromatin-remodeling and splicing

Anna Dolnik*, Julia C. Engelmann*, Maren Scharfenberger-Schmeer, **Sabine Kelkenberg-Schade**, Berit Haldemann, Tamara Fries, Jan Krönke, Michael W. M. Kühn, Peter Paschka, Sabine Kayser, Stephan Wolf, Verena I. Gaidzik, Richard F. Schlenk, Frank G. Rücker, Hartmut Döhner, Claudio Lottaz, Konstanze Döhner, Lars Bullinger

Blood (akzeptiert)

*geteilte Erstautorenschaft

Danksagung

Bei dieser Arbeit handelte es sich um eine Kooperation zwischen der Abteilung Genomics and Proteomics Core Facilities und der Abteilung Molekulare Genetik. Daher gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. Bernhard Korn und Herrn Prof. Dr. Peter Lichter für die Möglichkeit diese Doktorarbeit durchführen zu können. Ebenso danke ich für die Betreuung und Unterstützung, wenn es schwierig wurde und für die Erfahrungen, die ich in dieser Zeit gesammelt habe.

Ein besonderer Dank gilt auch meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Stefan Wiemann, der nach dem Weggang von Herrn Dr. Bernhard Korn zusätzlich noch die Betreuung dieser Doktorarbeit übernommen hat.

Für die wissenschaftliche Betreuung dieser Doktorarbeit geht ein sehr großes Dankeschön an Prof. Dr. Maren Scharfenberger-Schmeer, die auch nach ihrem Weggang vom DKFZ immer ein offenes Ohr bei allen Fragen und Probleme hatte.

Herrn Dr. Bernhard Radlwimmer danke ich für die ebenfalls wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit, die fachlichen Diskussionen und hilfreichen Anregungen.

Weiterhin möchte ich mich bei allem Kooperationspartnern bedanken: Prof. Dr. Guido Reifenberger vom Institut für Neuropathologie in Düsseldorf für die Bereitstellung der Glioblastom-Proben; Dr. Jan Korbel und Dr. Adrian Stütz, sowie Dr. Vladimir Benes und der Genomics Core Facility vom EMBL in Heidelberg; Dr. Anna Dolnik und Dr. Lars Bullinger vom Universitätsklinikum Ulm.

Ein besonderer Dank gilt Berit Haldemann, Volker Hovestadt und Dr. Marc Zapatka, die die bioinformatischen Auswertungen durchgeführt haben.

Dr. Stephan Wolf danke ich für alles rund um die Sequenzierung, sowie für seine hilfreichen Tipps und Anregungen. Ein Dankeschön geht an André Leischwitz für die Durchführung der Sequenzierungen.

Dankeschön an Dr. Martje Tönjes, die ihre Expressionsdaten zur Verfügung gestellt hat.

Ein großer Dank geht an die Abteilung Epigenomik und Krebsrisikofaktoren insbesondere an Dr. Rainer Claus für die Unterstützung und Durchführung des MassARRAY.

Ein Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der Abteilung Genomics and Proteomics Core Facilities für das tolle Arbeitsklima und die wissenschaftliche Hilfsbereitschaft. Insbesondere möchte ich Matthias Schick für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft danken. Vielen Dank an Tamara Fries und Naja Wermke für die Unterstützung im Labor.

Danksagung

Ein besonderer Dank geht an die Labormädels Kerstin Mohr, Nadja Wermke, Sonja Blasche, Gabriella Siszler und Dr. Sabine Asser-Kaiser, die mit mir Freud und Leid des Laboralltags geteilt haben und ohne die die Arbeit nicht nur annähernd so viel Spass gemacht hätte.

Ein ganz besonders herzlicher Dank geht an meinen Mann Stephan Schade für seine Hilfe und stete Unterstützung. Danke für alles!

Meinen Freunden und meiner Familie, besonders meinen Eltern danke ich dafür, dass sie immer für mich da sind, für ihre Unterstützung und ihren steten Rückhalt.

Last but not least möchte ich ganz besonders allen Babysittern danken, die sich liebevoll um Cornelius gekümmert haben. Danke!