

Aus dem Charité Centrum 17
Frauen-, Kinder- und Jugendmedizin mit
Perinatalzentrum und Humangenetik
Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik
Direktor: Prof.Dr.med.Stefan Mundlos

**Translationale molekulare Medizin: Die Entschlüsselung der
Genetik und Epigenetik von monogenetischen sowie komplexen
Erkrankungen durch moderne Hochdurchsatz-
Sequenziertechnologien**

Habilitationsschrift
Zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach
Experimentelle Medizin

Vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Dr.med.Dr.rer.nat. Michal-Ruth Schweiger
Berlin

Eingereicht: März 2012

Dekanin: Frau Prof.Dr. Annette Grüters-Kieslich

1.Gutachter: Herr Prof.Dr. Edgar Dahl, Aachen

2.Gutachter: Herr Prof.Dr. Roman Thomas, Köln

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	4
1.1	Hochdurchsatz- Sequenziertechnologien	4
1.2	Monogene und komplexe Erkrankungen	6
1.2.1	Monogene Erkrankungen: Hyperphosphatasie und mentales Retardierungs-Syndrom	6
1.2.2	Komplexe Erkrankungen: Tumore	7
1.2.2.1	Tumore des Dickdarms	8
1.2.2.2	Prostata-Tumore	10
1.3	Genetik und Epigenetik von Erkrankungen	12
1.3.1	Mutationsdetektion	12
1.3.2	DNA-Methylierung	13
1.3.2.1	DNA Methylierungen und Tumore	14
1.3.2.2	Technologien für die Analyse des Epigenoms	15
1.4	Individualisierte Diagnostik und Therapie	17
2.	Ergebnisse	18
2.1	Detektion von Mutationen bei monogen bedingten Erkrankungen	18
2.2	Anwendung der Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien an klinischen Proben	20
2.3	Das Mutationsspektrum unterscheidet sich bei MSI und MSS Darmtumoren	22
2.4	Epigenetische Veränderungen in Fusionsgen negativen Tumoren	23
3.	Diskussion	25
4.	Zusammenfassung	30
5.	Literatur	32
6.	Danksagung	45
7.	Erklärung	47

Abkürzungen:

APC	„Adenomatous Polyposis Coli“
BS	Bisulfit
CIMP	CpG Insel Methylierungsphänotyp
CIN	Chromosomeninstabilität
dbSNP	Datenbank für „Single Nucleotid Polymorphismen“
DNMT	DNA-Methyltransferase
EGFR	„Epidermal growth factor receptor“
EZH2	„Enhancer of zeste homolog 2“
FFPE	Formalin fixiert, Paraffin eingebettet
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
GSTP1	Glutathion S-Transferase pi 1
HPMR	Hyperphosphatasie und mentale Retardierung
HST	Hochdurchsatz-Sequenzieretechnologie
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog“
KRK	Kolorektale Karzinome
MeDIP-Seq	Methylierte DNA Immunopräzipitation und Sequenzierung
MMR	„Mismatch Repair“
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
MSS	Mikrosatelliten-Stabilität
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PT	Prostata-Tumore
ROI	„Region of interest“
SNV	„single nucleotide variation“

1. Einleitung

Die Entwicklung neuester Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien (HST) stellt einen der bedeutendsten Durchbrüche moderner Wissenschaften dar. Mit diesen Technologien ist es möglich, gesamte menschliche Genome in kürzester Zeit zu analysieren und in systematischen Ansätzen die molekular-genetischen Grundlagen von Krankheiten zu identifizieren. Dies ist sowohl für Erkrankungen, die durch Veränderung einer einzigen Position in der DNA verursacht werden (monogene Erkrankungen), als auch für genetisch komplexe Erkrankungen durchführbar (Krawitz et al., 2010; Schweiger et al., 2011).

1.1 Hochdurchsatz- Sequenziertechnologien

Die Entwicklung moderner Sequenziertechnologien geht auf erste manuelle Methoden zurück, die von Frederic Sanger (1975) sowie von Allan Maxam und Walter Gilbert (1977) parallel entwickelt worden sind (Maxam and Gilbert, 1977; Sanger et al., 1977). Basierend auf diesen Methoden wurde 1990 das Humane Genom Projekt initiiert, das sich zum Ziel gesetzt hatte, das gesamte menschliche Genom zu entziffern. In einem internationalen Projekt unter Beteiligung von über 1000 Wissenschaftlern konnte schließlich 2001 die Fertigstellung der Sequenzierung bekanntgegeben werden (2004; Lander et al., 2001). Dennoch, das Interesse und die Notwendigkeit weitere Genome zu sequenzieren, hörten nicht auf und führten zu der Entwicklung von Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien (HST) auch ‚next generation sequencing‘ (NGS) Technologien genannt (Mardis, 2008; Metzker, 2010; Shendure and Ji, 2008). Diese Technologien ermöglichen es, komplette Genome innerhalb von wenigen Tagen zu sequenzieren und eröffnen damit die Möglichkeit, systematisch Einblick in eine Vielzahl von Organismen zu gewinnen.

Dieser technische Fortschritt berechtigt zu großen Erwartungen. Es formieren sich bereits internationale Konsortien wie z.B. das 1000-Genome Projekt, in dem über 1000 gesunde Individuen sequenziert werden sollen, um genetische Varianten der DNA Sequenz in einzelnen Individuen zu erkennen, oder das ICGC („International Cancer Genome Consortium“) und das TCGA Projekt („The Cancer Genome Atlas“), die sich zum Ziel gesetzt haben, durch Sequenzierung einer großen Anzahl von Tumoren spezifische Veränderungen zu detektieren, die maßgeblich zur Tumorentstehung beigetragen haben könnten.

Der eigentliche Durchbruch in der Entwicklung der HST kam durch die Einführung paralleler Sequenzierungen. Dadurch wurde die gleichzeitige Sequenzierung von Millionen von DNA-Fragmenten ermöglicht mit Leselängen zwischen 40 und 1000bp, je nach verwendeter Sequenziertechnologie. Im Augenblick befinden sich fünf Technologien

auf dem Markt. Am weitesten verbreitet sind die 454 Sequenzierung von Roche, die Illumina-Technologie und die SOLiD Sequenzierung von Applied Biosystems (Bentley et al., 2008; Margulies et al., 2005; Ronaghi, 2001; Rothberg and Leamon, 2008; Shendure et al., 2005). Weniger verbreitet sind die HeliScope (Helicos) und die Polonator (Danaher) Technologie. Die unterschiedlichen Technologien basieren alle auf ähnlichen Grundgedanken. So kann das im Verlauf der Sequenzierung emittierte Lichtsignal direkt in Sequenzinformationen umgesetzt werden und durch bioinformatische Analysealgorithmen prozessiert werden. Dieses digitale Signal stellt die Basis für Sequenzierungen dar, kann aber auch verwendet werden, um Genexpressionen und Anreicherungen bei Chromatin-Immünpräzipitationen (ChIP-Seq) zu quantifizieren. Diese parallele Sequenzierung eignet sich auch besonders gut für heterogenes Gewebe. Heterogenes Gewebe liegt insbesondere bei Tumorproben vor, da hier meist nicht nur Tumorzellen vorliegen, sondern diese von normalen Zellen umgeben sind. Somatische Mutationen können damit durch DNA-Sequenzen der Normalzellen maskiert werden. Da durch die parallelen Sequenzierungen jedoch bereits geringe Sequenzabweichungen detektiert werden können, sind diese Technologien besonders bei Tumorproben von nutzen und somatische Mutationen können sensitiver als mit herkömmlichen Technologien erkannt werden (Margulies et al., 2005; Thomas et al., 2006). Unterschiede in den Methoden ergeben sich daraus, wie die Fluoreszenz-Marker in die DNA eingebaut werden. Dabei basiert z.B. die SOLiD-Technologie auf Ligationen von kleinen markierten Primern an die DNA, die Illumina-Technologie auf einer Inkorporation von markierten Nukleotiden während der Sequenzierung, und die 454 Technologie auf einem Luziferase-Signal, das an den Einbau der Nukleotide gekoppelt ist.

Zwar unterscheiden sich die Technologien in der genauen Durchführung der Sequenzierungen, sie können aber alle durchwegs für eine Vielzahl von unterschiedlichen Fragestellungen eingesetzt werden. So umfassen Standardanwendungen die Sequenzierung von gesamten oder Teilen von Genomen, DNA-Methylierungs-Studien, Identifikation von strukturellen genomischen Veränderungen, Chromatin-Immünpräzipitations-Experimente sowie Transkriptom- und miRNA-Sequenzierungen. Weitere Anwendungsmöglichkeiten werden laufend neu entwickelt und vergrößern damit das Anwendungsspektrum maßgeblich.

1.2 Monogene und komplexe Erkrankungen

1.2.1 Monogene Erkrankungen: Hyperphosphatasie und mentales Retardierungs-Syndrom

Bisher werden monogene Ursachen bei über 5000 unterschiedlichen Erkrankungen vermutet (Gilissen et al., 2012). Die Dunkelziffer liegt noch deutlich höher, da bei vielen Erkrankungen entweder die Familien nicht groß genug oder nicht genügend Betroffene in den Familien vorhanden sind, sodass von vorneherein eine genetische Ursache nicht vermutet wird. Selbst Subgruppen von Erkrankungen, die insgesamt als komplexe Erkrankungen eingestuft worden sind, wie geistige Retardierung, Schizophrenie, Autismus oder bestimmte Formen von Alzheimer, scheinen in die Klasse der monogenen Erkrankungen zu gehören. Damit wird die Anzahl der Krankheitsbilder immer größer, und es wird immer dringlicher, die zugrunde liegenden Mutationen zu identifizieren, und die Erkrankungen besser zu klassifizieren. Bisherige Strategien basierten auf der Sequenzierung von Kandidatengen, die sich durch einen ähnlichen Phänotyp bei einer anderen Erkrankung, eine funktionelle, für den Phänotypen relevante Funktion, oder durch eine bekannte Genregion („positional mapping“) auszeichneten. Derartige Informationen sind aber nur bei einem kleinen Teil der monogenen Erkrankungen vorhanden und können deshalb für den Großteil nicht herangezogen werden.

Das Ziel einer besseren Klassifizierung ist durch die Entwicklung der HST in greifbare Nähe gerückt. Mit der Sequenzierung aller Exone (dem Exom) der Patienten ist es nun möglich, so gut wie alle Mutationen in Kandidatengen zu identifizieren. Die Anzahl möglicher Kandidaten ist allerdings bei einer Beschränkung der Sequenzierung auf nur einen Betroffenen mit ca. 20 – 50.000 Varianten sehr hoch. Nach Durchführung einiger Filterprozesse, wie z.B. Festsetzung einer Mindest-Sequenziertiefe („coverage“), genügend hoher Qualitätswerte der Sequenzierungen („quality values“) und relativen Anzahl der Fragmente mit Mutationen, bleiben im Schnitt 3.000 bis 5.000 Varianten übrig. Weitere Maßnahmen zur Einschränkung potentieller Mutationen sind notwendig und umfassen unter anderem die Sequenzierung von mehreren Betroffenen einer Familie oder anderer Individuen mit dem gleichen Krankheitsbild. Eine deutliche Reduktion erfolgt durch eine Einschränkung auf Mutationen, die bisher noch nicht als Normvarianten beschrieben worden sind, d.h., die noch nicht in der dbSNP-Datenbank oder bei Großprojekten, wie dem 1000Genome Projekt, beschrieben worden sind. Nach diesem Filterungsschritt bleiben noch immer Mutationen im zweistelligen Bereich übrig, und weitere Strategien zur Reduktion der Anzahl von Kandidaten sind notwendig. Hierbei können z.B. mit Hilfe der Sequenzierung von betroffenen und nicht-betroffenen verwandten Personen die Zahl der krankheitsrelevanten Mutationen weiter eingeschränkt werden. Bei drei betroffenen

Geschwistern würde dies eine Reduktion auf 10 bis 20 Mutationen bedeuten. Bei konsanguinen Stammbäumen kann über eine Kartierung von homozygoten Regionen ebenfalls die Zahl der Kandidaten deutlich reduziert werden, teilweise sogar bei nur einem Betroffenen auf ca. drei mögliche Mutationen (Becker et al., 2011). Wie erwähnt gibt es auch die Möglichkeit, mehrere Betroffene, das gleiche Krankheitsbild ausprägende Individuen aus unterschiedlichen Familien, zu sequenzieren. Hierbei wird anschließend nach den, bei allen Betroffenen mutierten Genen gesucht. Konkrete Anwendungen zeigen, dass schon drei erkrankte Personen genügen können, um das Krankheitsgen zu identifizieren (Hoischen et al., 2010). Treffen keine der bisherigen Grundvoraussetzungen zu, also existieren weder Verwandte, die ebenfalls betroffen sind, noch besteht Konsanguinität, und es ist außerdem wahrscheinlich, dass der Phänotyp durch Mutationen in unterschiedlichen Genen verursacht sein könnte (Heterogenie), dann liegt vermutlich eine *de novo* Mutation vor. Eine Möglichkeit der Absicherung besteht dann darin, die Eltern des Betroffenen ebenfalls zu sequenzieren und dadurch jene Mutationen zu identifizieren, die ausschließlich in dem Erkrankten vorliegen (Vissers et al., 2010). Dies kann aber mit technischen Schwierigkeiten verbunden sein, denn selbst Fehler der Sequenzierungen oder eine unterschiedliche Sequenziertiefe („coverage“) bei den einzelnen Individuen, kann das Ergebnis beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass Exom-Sequenzierungen mit der SOLiD-Technologie genutzt werden können, um ursächliche Mutationen bei monogenen Erkrankungen – hier am Beispiel des HPMR (Hyperphosphatasie mit mentaler Retardierung) - Syndroms gezeigt – zu identifizieren.

1.2.2 Komplexe Erkrankungen: Tumore

Zu den komplexen Krankheiten gehören Erkrankungen wie z.B. die Alzheimer'sche Erkrankung, der Diabetes mellitus, aber auch Tumorerkrankungen. Insbesondere wurden bisher für die Entstehung von Tumorerkrankungen nur einzelne Gene oder kleine Gengruppen verantwortlich gemacht, die, im Gegensatz zu Keimbahnmutationen, die in allen Körperzellen vorliegen, ausschließlich in Tumorzellen zu finden sind (somatische Mutationen). Unter Verwendung der Hochdurchsatz-Sequenzierungen hat sich in den letzten Jahren jedoch gezeigt, dass eine Vielzahl von somatischen Veränderungen in der Tumor-DNA vorliegen. Der Identifikation dieser Veränderungen sowie der Integration unterschiedlicher großer Datensätze, wie Mutationen, Genexpressionen und genomweite DNA-Methylierungsmuster gilt das Hauptinteresse meiner Arbeit. Ich erhoffe dadurch einerseits grundlegende Einblicke in die Pathogenese von Tumoren zu erlangen, andererseits aber auch robuste Biomarker zu identifizieren, die für die Diagnose, Therapie und Prognose der Erkrankungen verwendet werden können.

1.2.2.1 Tumore des Dickdarms

Kolorektale Karzinome (KRK) sind mit 1 Million Tumorpatienten die dritthäufigste Tumorentität weltweit (WHO). In Deutschland ist es das zweithäufigste Karzinom (bei Männern nach dem Bronchialkarzinom, bei Frauen nach dem Brustkarzinom)(Herold, 2006). In frühen Stadien kann der Patient durch eine Operation oder eine Chemotherapie (sowohl adjuvant als auch neoadjuvant) geheilt werden. Bei 20% der Patienten liegen bereits zum Diagnosezeitpunkt Lebermetastasen vor. Diese fortgeschrittenen Stadien (TNM-Stadium IV) mit Metastasierung sind nicht mehr heilbar (Markowitz et al., 2002). Fünf-Jahres-Überlebensraten liegen stadienabhängig zwischen 95% und 5%. Bei ca. 1-5% aller KRK-Patienten liegt eine Keimbahnmutation vor, die autosomal dominant vererbt wird. Zu diesem Formenkreis gehören das Lynch-Syndrom sowie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP).

Auf genomischer Ebene können KRK unterschiedlichen Gruppen zugeteilt werden (Worthley and Leggett, 2010). Dabei unterscheidet man die Tumore aufgrund ihrer i) chromosomalen Instabilität (CIN positiv und negativ), ii) ihres CpG-Insel Methylierungsphänotyps (CIMP) und ihrer iii) Mikrosatelliten Stabilität bzw. Instabilität (MSS versus MSI) (Issa, 2008).

i) Eine Chromosomeninstabilität (CIN) ist die häufigste genetische Veränderung. Sie tritt in 85% aller Tumore auf (Lengauer et al., 1998). Resultierende Kopienzahl-Veränderungen in der DNA können zu dem Verlust eines Tumorsuppressorgens führen, so ist z.B. eine Deletion des langen Arms von Chromosom 18 begleitet von einem Verlust von SMAD2 und SMAD4 („SMAD family member 2 and 4“), beides Gene, die im Signalweg des TGF- β („transforming growth factor“) eine Rolle spielen (Okamoto et al., 1988; Vogelstein et al., 1988). CIN positive Tumore sind mit einer schlechten Prognose verbunden, der Grund dafür ist allerdings noch unbekannt(Pritchard and Grady, 2011).

ii) Ein CpG-Insel Methylierungsphänotyp (CIMP) liegt bei ca. 15% aller KRK vor(Toyota et al., 1999). Hierbei wird eine Vielzahl von Genen methyliert. Die DNA Methylierung erfolgt an der 5' Position des Cytosins, zumeist in der Dinukleotid-Sequenz CG. Eine Methylierung der CG Sequenz führt zu einer veränderten Bindungsaffinität von Transkriptionsfaktoren und in der Folge zu einer Veränderung der Genexpression (Kondo and Issa, 2004). Zu den in Tumoren methylierten Genen gehören HIC1 („hyperMethylated in cancer 1“), SFRPs („secreted Frizzled-related“ Proteine), die den Wnt- Signalweg antagonisieren, sowie MLH1, ein „mismatch repair“ (MMR) Gen(Roehr, 2012). Die Methylierung des MLH1-Gens kann dabei zu einer Mikrosatelliten-Instabilität bei sporadischen Tumoren führen (Weisenberger et al., 2006).

iii) Die Mikrosatelliten-Instabilität wird durch Mutationen in Genen des Reparatursystems verursacht (Kinzler and Vogelstein, 1996a; Kolodner, 1996). Diese Mutationen, die nicht

repariert oder stabilisiert werden können, führen zu einer Instabilität der Mikrosatelliten-Regionen. Ursächliche Mutationen können in zahlreichen Genen des MMR Systems auftreten, darunter MLH1, MLH3, MSH2, MSH3, MSH6, PMS1 und PMS2 (Vilar and Gruber, 2010). Liegen Mutationen bereits in der Keimbahn vor, so liegt, wie oben erwähnt, eine erbliche Form der KRK vor, die auch als ‚Lynch-Syndrom‘ oder HNPCC (‚Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer‘) bezeichnet wird (Lynch and de la Chapelle, 2003). Der Mikrosatelliten-Status hat einen Einfluß auf die Therapie und Prognose des KRK (Fallik et al., 2003).

Neben den globalen genomischen Veränderungen können auch spezifische Mutationen in einzelnen Genen vorliegen, die ebenfalls entscheidend zu der Tumorentstehung beitragen. Hierbei können diese Mutationen sowohl in der Keimbahn als auch als somatische Mutationen auftreten. Eine Keimbahnmutation des APC (‚adenomatous polyposis coli‘) Gens liegt der familiären adenomatösen Polyposis zugrunde, die mit einem 80%igen Risiko für KRK verknüpft ist und bei 0.5% der KRK vorliegt. Als somatische Variante treten in ca. 70% aller Tumore eine APC Mutation auf (Jaiswal et al., 2005; Kinzler and Vogelstein, 1996a; Segditsas and Tomlinson, 2006). Andere Tumore aktivieren den Wnt-Signalweg durch aktivierende Mutationen in CTNNB1, die dann in der Folge zu einer Aktivierung von c-myc, cyclin D1 und c-jun führen (Goss and Groden, 2000).

Mutationen bzw. Verlust des DCC –Gens (‚deleted in colorectal cancer‘) treten in ca. 70% der KRK auf (Konstantinova et al., 1991). DCC spielt als Tumorsuppressorgen eine Rolle in der Zelladhäsion, der Zelldifferenzierung und der Apoptose (Fearon and Vogelstein, 1990; Keino-Masu et al., 1996).

Des Weiteren finden sich bei KRK in mehr als 50% der Fälle Mutationen in TP53. Die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens führt zu einer Hemmung der Apoptose, einem gesteigerten Zellwachstum und zu Invasivität der Tumore (Markowitz et al., 2002).

Mutationen in KRAS, HRAS und NRAS liegen bei ca 50% aller KRK vor (Bos et al., 1987; Fearon and Gruber, 2001). Die Proteine der Ras-Familie führen über eine Aktivierung von GTPasen zu einer gestörten Signal-Weiterleitung in der Zelle und führen damit zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen (Kinzler and Vogelstein, 1996a, b). KRAS-Mutationen werden, ähnlich wie APC-Mutationen, zu frühen Ereignissen des KRK gezählt. Als Bestandteil des EGF-Rezeptor (EGFR) Signalwegs führen Mutationen zu einer erhöhten Proliferation. Neben KRAS-Mutationen kann der EGFR auch direkt mutiert sein, ein Zustand, der mit einer veränderten Chemotherapie-Sensitivität einhergehen kann (Barber et al., 2004; Moroni et al., 2005; Pritchard and Grady, 2011).

1.2.2.2 Prostata-Tumore

Mehr als 900.000 Menschen pro Jahr (2008) erkrankten weltweit an Prostata-Tumoren (PT) und mehr als 250.000 Patienten versterben daran. Damit liegen PT auf Platz 2 der häufigsten Tumore (Jemal et al., 2011). Die Erkrankung tritt vorwiegend in fortgeschrittenem Alter auf, da mehr als ein Drittel der Betroffenen älter als 65 Jahre alt ist. Die Inzidenz von PT ist regional unterschiedlich, vermutlich bedingt durch Polymorphismen in den Steroidhormon-Signalwegen (Boerno, 2012; Parkin et al., 2005; Shibata and Whittemore, 1997). Diese Polymorphismen können z.B. unterschiedliche Aktivitäten des Androgenrezeptors verursachen und damit auch ein variables PT Risiko herbeiführen. Darüber hinaus wird das Risiko an PT zu erkranken durch exogene Noxen moduliert. So scheinen Sport, geringe Fettaufnahme, Sojabohnen, Tomaten, Selen und Vitamin E das Risiko zu erniedrigen (Damber and Aus, 2008). Der ursächliche Zusammenhang ist nicht bekannt, könnte allerdings durch epigenetische Faktoren bedingt sein.

Bei der Entwicklung von PT kommt es am Anfang zu einer PIN („prostatic intraepithelial neoplasia“) Läsion, die von vermehrt invasiven Tumoren gefolgt wird. Häufig entsteht eine PIN auf dem Boden einer chronischen Entzündung (Andreou and Cheng, 2010; Bostwick and Cheng, 2012; Cazares et al., 2011; Hanahan and Weinberg, 2011). Fortgeschrittene PIN Läsionen zeigen chromosomal ein ähnliches Muster wie PT, wie z.B. eine Chromosom 8q-Amplifikation, eine Verkürzung der Telomere und eine HyperMethylierung von GSTP1 (Qian et al., 1995). Meist entwickeln sich aus den PIN Läsionen Prostata-Tumore innerhalb von 5 bis 10 Jahren, diese können jedoch mit Hilfe einer Androgen-Entzugstherapie verhindert werden (Bostwick and Cheng, 2012).

Die Aktivität des Androgens wird über eine spezifische Signalkaskade vermittelt, die auch den intrazellulären Androgenrezeptor (AR) einschließt. Zunächst wird Androgen durch die Steroid-5 α -Reduktase (SRD5A) zu Dihydrotestosteron (DHT) konvertiert. DHT bindet dann an den AR, der dimerisiert und an die Androgen Elemente (ARE) der Zielgene bindet (Boerno, 2012; Trapman and Cleutjens, 1997). Die erhöhte Androgen-Wirkung in den Tumorzellen bewirkt eine erhöhte Zellproliferation und inhibiert die Apoptose, beides Faktoren, die die tumorigenen Eigenschaften aufrecht erhalten. In frühen Stadien sprechen Tumore auf einen Androgenentzug mit einer Wachstumshemmung an, späte Tumorstadien sind jedoch meist resistent gegenüber einem Entzug, und diese Tumorpatienten profitieren daher nicht von einer Orchiektomie oder Anti-Androgentherapie. Eine Resistenz gegenüber Androgen kann auch dadurch begründet sein, dass der AR besonders sensitiv auf kleine Mengen von Androgen reagiert. Diese Sensitivität kann durch Punktmutationen in der Liganden-Bindungsdomäne, eine

Amplifikation dieser Domäne oder eine erhöhte Aktivität der 5 α -Reduktase bedingt sein. Überdies kann der AR so modifiziert sein, dass ihn auch andere Steroide aktivieren können, oder er wird durch Onkogene umgangen. Genomweite Sequenzierstudien können hier Einblick in die genomischen Veränderungen geben und hilfreich für die Therapie sein.

Die meisten PT (60-90%) liegen multifokal vor (Andreou et al., 2010; Kerick et al., 2011; Sakr et al., 1994), wobei die Unterscheidung, ob diese einzelnen Foci durch unabhängige Tumorentwicklungen oder durch eine bestimmte, histopathologische Schnittweise entstehen, sehr schwierig ist und noch nicht abschließend geklärt ist. Metastasen können vermutlich jedoch jederzeit, auch von sehr kleinen Ausgangstumoren entstehen (Schmidt et al., 2006). Die meisten PT sind wenig aggressiv und werden meist nicht diagnostiziert. Bei einer breit angelegten Autopsie-Studie konnte 1994 nachgewiesen werden, dass mehr als 60% der Patienten, die älter als 60 Jahre waren, einen kleinen Tumor aufwiesen, der aber klinisch unauffällig war (Soos et al., 2005). Dies stellt auch eine der Schwierigkeiten bei der Diagnose von PT dar. Würden alle diese Tumore identifiziert werden, würde eine Vielzahl von Patienten ohne Notwendigkeit therapiert werden.

Zur Diagnose von PT hat sich in den vergangenen Jahren eine Routineuntersuchung des PSA im Serum bei Männern durchgesetzt. PSA ist ein Produkt des Kallikrein-3 Gens (KLK3) und ist verantwortlich dafür, das Prostata-Sekret zu verflüssigen (Christensson et al., 1990; Shariat et al., 2011). PSA-Werte können verwendet werden, um Verlaufskontrollen durchzuführen, sowohl bei Männern, bei denen kein PT vorliegt, als auch bei jenen, die einer PT-Therapie unterzogen worden sind, insbesondere, wenn die Serumkonzentration unter 1ng/ml liegt (Catalona et al., 1991; Damber and Aus, 2008; Stamey et al., 1987). Leider gehen die PSA-Werte mit einer hohen Rate an falsch positiven Ergebnissen einher, und sie können auch nicht zwischen aggressiven und wenig aggressiven Tumoren unterscheiden. So kann der PSA-Wert durch eine Entzündung, eine benigne Prostatahyperplasie oder einen zuvor durchgeführten transrektalen Ultraschall erhöht sein (Shariat et al., 2011). Aber auch die Rate an falsch negativen Diagnosen ist relativ hoch, da bei ca. 6.6% der Patienten mit einem PSA Wert unter 0.5ng/ml ein Prostata-Tumor detektiert werden konnte (Thompson et al., 2004; Tosoian and Loeb, 2010). Um die Aussagekraft des PSA-Werts zu erhöhen, wird zwischen freiem und an Serumproteine gebundenem PSA unterschieden. Eine niedrige Rate an freiem zu gesamt-PSA deutet auf eine höhere Wahrscheinlichkeit für einen PT hin (Shariat et al., 2011).

Um die Rate an richtig positiven Patienten zu erhöhen, wird an die PSA-Bestimmung eine digitale Untersuchung angeschlossen. Diese Untersuchung ist von der Erfahrung des Urologen abhängig und birgt damit das Risiko, Patienten nicht zu erkennen. Die digitale Untersuchung kann durch einen transrektalen Ultraschall (TRUS) ergänzt werden.

Besteht nach der rektalen Untersuchung weiterhin der Verdacht auf einen PT, so werden 10-14 Biopsien entnommen. Die Biopsien werden anschließend histopathologisch untersucht und ein Gleason ‚Score‘ wird ihnen zugeordnet (Delahunt et al., 2012; Gleason, 1992). Für die Diagnose wird der geringste sowie der höchste Gleason Wert verwendet und als Addition angegeben, so z.B. kann ein Gleason Score von 7 die Werte (4+3) mit einer insgesamt schlechteren Prognose oder (3+4) mit einer insgesamt etwas besseren Prognose zeigen. Die Reproduzierbarkeit der Gleason Scores unter unterschiedlichen Pathologen beträgt ‚nur‘ 70%.

Diese Ausführungen zeigen, welche Schwierigkeiten sich in der Diagnostik und Therapie dieser sehr häufigen Tumorart ergeben. Die Entwicklung von HST und aussagekräftigen Biomarkern sollten einen Durchbruch zum Wohle der Patienten erwarten lassen.

1.3 Genetik und Epigenetik von Erkrankungen

1.3.1 Mutationsdetektion

Erste Sequenzier-Studien wurden noch durch Sanger-Sequenzierungen mit einem enormen Aufwand an Arbeitskraft und Kosten durchgeführt. So amplifizierten und sequenzierten Wood und Kollegen 125.624 Exons von mehr als 18.000 Transkripten bei 11 Brust – und 11 Darmtumoren (Wood et al., 2007). Erst durch die Entwicklung von HST ist es möglich, komplette menschliche Genome innerhalb von wenigen Tagen mit einem deutlich geringeren Arbeitsaufwand zu sequenzieren und auf Mutationen, strukturelle Veränderungen und Änderungen der Kopienzahl hin zu untersuchen. Interessanterweise zeigten alle Studien, dass nicht einzelne spezifische Mutationen in allen Tumoren vorliegen, sondern dass eher eine Störung von Signalwegen entsteht, die dann zu einer De-Regulation führt (2008; Bardelli et al., 2003; Greenman et al., 2007; Jones et al., 2008; Parsons et al., 2008; Sjoblom et al., 2006; Wang et al., 2004; Wood et al., 2007). Mutationen können dabei an unterschiedlichen Stellen in dem Signalweg auftreten, führen aber im Endergebnis zu einem ähnlichen Funktionsverlust oder – gewinn des Signalwegs.

Insbesondere bei der Detektion von Mutationen beschränkt man sich häufig auf die Analyse von nicht-synonymen Mutationen, d.h., man konzentriert sich auf kodierende Exonbereiche. Damit werden ca. 99% der genomischen DNA sequenziert, ohne dass sie für die Mutationsanalyse herangezogen werden. Um diesen Aufwand an Arbeit und Material zu umgehen, wurden in den letzten Jahren einige Technologien entwickelt, um spezifische kodierende Bereiche anzureichern und nur diese zu sequenzieren. Möglichkeiten, um bestimmte DNA – Bereiche selektiv zu sequenzieren bestehen darin, die Regionen von Interesse (ROI) mit Hilfe einer PCR oder mit molekularen

Inversionsproben in einem ‚rolling circle‘-Verfahren durch Amplifikation signifikant zu vermehren, sodass nur diese Areale sequenziert werden, und nicht betroffene Bereiche als Hintergrundrauschen verloren gehen (Porreca et al., 2007). Eine hoch parallelisierte PCR-basierte Technologie besteht darin, die PCR in winzigen Mikrotropfen stattfinden zu lassen (Raindance^R Technologie). Damit beeinflussen sich die einzelnen Reaktionen nicht gegenseitig, was bei einer ‚multiplex‘ PCR ansonsten sehr problematisch sein kann. Hierbei können ca. 70% der Fragmente eindeutig lokalisiert werden, und eine homogene horizontale Abdeckung von ca. 90% ist damit erreichbar (Hu et al., 2009).

Neben den Technologien, die auf einer Vermehrung der DNA beruhen, existieren auch Methoden, die durch eine Hybridisierung spezifisch die ROI ‚herausziehen‘. Die Hybridisierungen können entweder auf einer festen Oberfläche, also ‚array‘ basiert, oder in einer Lösung durchgeführt werden. In beiden Fällen werden Oligonukleotide verwendet, die komplementär zu den ROI sind und damit diese Regionen binden können (Albert et al., 2007; Choi et al., 2009; Gnirke et al., 2009; Hodges et al., 2007; Porreca et al., 2007). Die Durchführung der Anreicherung in einer Lösung birgt den Vorteil, dass dieses Verfahren sehr einfach durchzuführen ist, und eine Vielzahl an Proben parallel prozessiert werden können. Als Sonden werden biotinylierte RNA Sequenzen benutzt, die komplementär zu den ROI sind. Die Verwendung von RNA anstelle von DNA ermöglicht eine vollständige Entfernung des Sondenmaterials durch eine RNase nach erfolgreicher Durchführung. Für die Hybridisierung wird die Ausgangs-DNA verwendet, die bereits mit Adaptoren für die Sequenzierung versehen ist, sodass direkt nach der Elution die DNA Fragmente für eine HST eingesetzt werden können (Gnirke et al., 2009).

1.3.2 DNA-Methylierung

Die Nukleinsäuresequenz bestimmt den genetischen Code der DNA, der aus den vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin besteht. In den letzten Jahren hat es sich herausgestellt, dass zusätzlich zu dem genetischen Code epigenetische Veränderungen der DNA existieren, die entscheidenden Einfluß auf die Funktion der DNA haben. Bei den epigenetischen Veränderungen handelt es sich zum einen um spezifische Modifikationen der Basen. Hierbei werden insbesondere Cytosin-Reste durch Methylierung kovalent verändert, mit entscheidenden Auswirkungen auf die Informationsverarbeitung der DNA (Bird, 1986). Zum anderen werden Histone posttranslational modifiziert, mit Auswirkungen auf die Verpackungsdichte der DNA (Jenuwein and Allis, 2001). Diese Abwandlungen führen zu einer veränderten Chromatin-Kondensation und haben damit einen Einfluß auf die Transkription. Das bedeutet, die Epigenetik umfaßt Mechanismen, die zu vererbaren Veränderungen im zellulären Phänotyp führen, die aber nicht durch Veränderungen in der DNA-Sequenz bedingt sind.

Die DNA-Methylierung erfolgt zumeist in CpG-Dinukleotiden an dem 5' Kohlenstoffatom des Cytosins. In embryonalen Stammzellen werden auch Cytosine außerhalb einer CpG-Sequenz methyliert (Lister et al., 2009). Die Methylierung geschieht durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Dabei sind DNMT3A und DNMT3B dafür verantwortlich, ein elterliches Methylierungsmuster, das zuvor entfernt worden ist, nach der Implantation des befruchteten Eis neu aufzubauen (Jaenisch and Bird, 2003; Okano et al., 1999). DNMT1 hingegen wird für die Wiedereinführung des Methylierungsmusters nach der DNA-Replikation verantwortlich gemacht. D.h., die DNA liegt nach der Replikation hemimethyliert vor, und die vollständige Methylierung wird durch DNMT1 ergänzt (Song et al., 2012). Der Mechanismus der DNA-Methylierung besteht darin, dass bei der DNA-Methylierung in einem nucleophilen Angriff die Methylgruppe von S-Adenosyl-Methionin auf die C5-Gruppe von Cytosin übertragen wird. Als Zwischenprodukt entsteht Dihydro-Methylcytosin und S-Adenosyl-Homocystein (Smith et al., 1992).

Methylierte CpG-Regionen können durch Methyl-CpG-Bindungsproteine erkannt werden, die ihrerseits Histon-Deacetylasen rekrutieren. Dies führt zu einer Kondensation des Chromatins und zu einer Repression der Transkription. Bei Mutationen in den CpG-Bindeproteinen kann es zu Erkrankungen kommen, so z.B. zum Rett-Syndrom bei einer Mutation in MECP2 („methyl CpG binding protein“) (Amir et al., 1999).

Die DNA-Methylierung hat eine entscheidende Funktion in dem Entwicklungsprozess, und Mäuse mit DNMT „knock outs“ sind nicht überlebensfähig (Li et al., 1992). Das Genom ist grossflächig methyliert. So sind in etwa 80% des methylierbaren Genoms, d.h. der CpG-Stellen, methyliert, mit Ausnahme der Bird's Inseln (auch CpG-Inseln genannt). Dabei enthält das menschliche Genom in etwa 28 Millionen (1%) CpG-Stellen, die potentiell methyliert sein können (Beck and Rakyen, 2008). Bird's Inseln sind ca. 200bp lange Bereiche mit einem hohen GC-Anteil von mehr als 50%, die nicht methyliert sind (Gardiner-Garden and Frommer, 1987). Eine Methylierung dieser Regionen geht mit einem pathologischen Phänotypen einher, so sind z.B. diese Regionen häufig bei Tumoren methyliert, aber auch systemische Autoimmunerkrankungen, psychiatrische Erkrankungen und eine Vielzahl von monogenen Erkrankungen sind mit einem fehlgeleiteten DNA-Methylierungsmuster vergesellschaftet.

1.3.2.1 DNA Methylierungen und Tumore

Global zeichnen sich Tumore durch eine genomweite Hypomethylierung aus. Hypermethylierungen finden sich hingegen spezifisch an CpG-reichen Promotoren, die dann durch eine Verdrängung von Transkriptionsfaktoren zu einer Repression der Transkription führen können. Dies ist insbesondere bei Tumorsuppressor-Genen von Bedeutung, da sie bei einer Hypermethylierung des Promoters vermindert exprimiert

werden und damit die Tumorprogression gefördert wird (Egger et al., 2004; Ehrlich, 2009; Ehrlich et al., 1982; Feinberg et al., 2006; Feinberg and Vogelstein, 1983; Jones and Baylin, 2002). Hypermethylierungen der Promotoren von Tumorsuppressor-Genen ist ein generelles Phänomen und kann bei vielen Tumorentitäten gefunden werden: APC und MLH1 bei kolorektalen Tumoren (Hiltunen et al., 1997), Apoptose-Gene wie z.B. *BCL2* und *PYCARD* bei Prostata-Tumoren (Carvalho et al., 2010) und *BRCA1* bei Brusttumoren (Dobrovic and Simpfendorfer, 1997).

Im Gegensatz zu DNA Hypermethylierungen ist die DNA Hypomethylierung hauptsächlich für Satelliten-DNA in Centromer-Bereichen, Alu- und LINE-1 Elementen beschrieben (Ehrlich, 2009). Promotoren sind weniger von DNA Hypomethylierungen betroffen, zu ihnen gehören *RRAS*, *MASPIN*, *S100*, *MAGE* und *IGF2* (Boerno, 2012). Es wird angenommen, dass die verminderte Methylierung dieser Elemente zu chromosomaler Instabilität führt (Howard et al., 2008; Rodriguez et al., 2006; Walsh et al., 1998). Zusätzlich kommt hinzu, dass viele Entwicklungsgene von der differentiellen Methylierung betroffen sind, sodass Prozesse der Entwicklung wie Wachstum und Differenzierung reaktiviert werden.

Aufgrund der eindeutigen Zuordbarkeit von bestimmten Modifikationen zu pathologischen oder normalen Situationen werden diese Regionen mehr und mehr als Biomarker gehandelt (Banerjee and Verma, 2009).

1.3.2.2 Technologien für die Analyse des Epigenoms

Für die Analyse von DNA-Methylierungen sind in den vergangenen Jahren Technologien entwickelt worden, die genomweite Untersuchungen ermöglichen (Boerno et al., 2010). Dazu gehören indirekte Methoden, die auf einer Immunpräzipitation beruhen und damit Regionen kennzeichnen, die, im Vergleich zu ihrer Umgebung, vermehrt methyliert sind, sowie direkte Methoden, die über eine Bisulfit-Konversion der DNA direkt Information zu den einzelnen methylierten Cytosin-Resten liefern (Beck and Rakan, 2008; Lister and Ecker, 2009; Pomraning et al., 2009). Indirekte Methoden umfassen ChIP-Seqs, MeDIP-Seq und MBP-Seq, zu den direkten Methoden zählen PCR-basierte, RRBS (reduced representation BS), BS-Seq, Methyl-C-Seq und Methyl-Seq, bei denen teilweise gesamte Genome, teilweise aber auch nur Subbereiche analysiert werden.

Die Verwendung von indirekten Methoden liefert zwar keine Basen-spezifische Informationen, aber man kann methylierte Regionen zwischen 100 und 200bp detektieren. Bei der MeDIP-Seq werden Antikörper gegen 5-Methyl-Cytosin verwendet; bei der MBP-Seq benutzt man Methyl-Binde-Proteine (MBP), die methylierte DNA-Fragmente präzipitieren, die anschließend durch HST identifiziert werden (Cross et al.,

1994; Keshet et al., 2006; Weber et al., 2005). Die MeDIP-Seq Ansätze benötigen eine Mindest-Methylierung von 2 bis 3 methylierten CpGs, das bedeutet, dass Regionen mit einem hohen CpG-Gehalt, und damit viel Methylierung, einfacher identifiziert werden können als jene mit geringem CpG-Gehalt. Für die Sequenzierung werden 30 bis 40 Millionen sequenzierte Fragmente benötigt, eine Größenordnung, die mit den HST gut zu erzielen ist (Beck and Rakan, 2008; Down et al., 2008).

Bei den direkten Methoden werden entweder Methylierungs-spezifische Restriktionsenzyme eingesetzt, oder die DNA mit Bisulfit konvertiert. Hierbei werden Cytosinreste deaminiert und zu Uracil konvertiert, methylierte Cytosine bleiben jedoch unbeeinträchtigt (Frommer et al., 1992). In den darauffolgenden Amplifikations-Reaktionen wird Uracil zu Thymin konvertiert, das dann durch SNV-Detektionen identifiziert werden kann. Schwierigkeiten bei diesen Technologien ergeben sich daraus, dass DNA teilweise nicht komplett konvertiert wird, die DNA durch die starken Reaktionen degradiert werden kann und Methylierungen auch in Pseudogenen vorliegen können, die dann zu fehlerhaften Analysen führen können (Esteller, 2002).

Analysen gesamter Genome wurden bisher nur beschränkt durchgeführt, da dieses Prozedere immer noch einen relativ großen zeitlichen und technischen Aufwand bedeutet. Als erstes wurden kleine Genome, wie das Genom von *Arabidopsis thaliana* sequenziert, das menschliche Genom folgte wenig später (Cokus et al., 2008; Lister et al., 2009).

Neben der Methylierung von Cytosin-Resten spielt auch die 5-Hydroxymethylierung von Cytosinen (5OHm-C) in der Regulation der Transkription eine Rolle. Es wird diskutiert, dass 5OHm-C als Zwischenprodukt beim Abbau von 5m-C entsteht (Pastor et al., 2011; Tahiliani et al., 2009). Es wird interessant sein, diese und andere Modifikationen der Nukleotide mit der Transkription in Verbindung zu bringen.

1.4 Individualisierte Diagnostik und Therapie

Das zentrale Thema dieser Arbeit ist der Einsatz von Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien bei der Diagnostik von monogenen Erkrankungen sowie ihrer Anwendungen in der Tumor-Diagnostik. Nicht dargestellt habe ich in diesem Rahmen meine Arbeiten in Bezug auf die Vorhersage von Therapie-Resistenzen bei Tumoren; dies wird in der Zukunft von entscheidender Bedeutung für eine optimale, Personen-bezogene Therapie sein. Eine Zusammenfassung der Anwendungen in der Onkologie finden sich in dem folgenden Review.

The power of NGS technologies to delineate the genome organization in cancer: from mutations to structural variations and epigenetic alterations.

Schweiger MR, Kerick M, Timmermann B, Isau M.
Cancer Metastasis Rev. 2011 Jun;30(2):199-210.

2. Ergebnisse

2.1 Detektion von Mutationen bei monogen bedingten Erkrankungen

Die Identifikation von Ursachen bei monogenen Erkrankungen war bis vor kurzem ein meistens sehr langwieriges Unterfangen, das oft auch ergebnislos blieb. Viele Versuche, die ursächliche Mutation zu identifizieren, ähnelten der Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen. Erst durch die Entwicklungen auf dem Gebiet der Hochdurchsatz-Sequenzier-Technologien sind die Analysen heutzutage deutlich schneller und teilweise auch einfacher geworden. Allerdings waren die Etablierung und die Durchführung bis vor kurzem immer noch mit einigem Aufwand und technischem Geschick verbunden. Es ist mir, zusammen mit Herrn Dr. Peter Krawitz, gelungen, die SOLiD Technologie – eine der verbreitetsten Sequenzier-Technologien – für die Identifikation des, dem HPMR-Syndrom (Hyperphosphatasie verbunden mit mentaler Retardierung) zugrunde liegenden, mutierten Gens zu verwenden. Das HPMR-Syndrom, auch Mabry-Syndrom genannt, ist eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, bei der die betroffenen Kinder unter einer starken geistigen Einschränkung, einer sehr stark erhöhten alkalischen Phosphatase, verbunden mit spezifischen Gesichts-Merkmalen, Krampfanfällen und muskulärer Hypotonie leiden. Für die Identifikation des Kandidatengens haben wir die gesamten kodierenden Bereiche bei drei betroffenen Geschwistern sequenziert. Ein Vergleich der Sequenzen dieser drei Kinder ergab 1.928 nichtsynonyme und Spleißstellen- Mutationen. Durch einen Abgleich mit allen bisher bekannten Sequenzveränderungen (dbSNP) war es möglich, die Anzahl auf 14 mögliche Kandidatenmutationen zu reduzieren. Unter Verwendung eines Hidden Markov Modells war es weiterhin möglich, Regionen, die abstammungsgleich von den Eltern vererbt worden sind („identical by descent“), zu identifizieren und damit die Anzahl möglicher Kandidatengene weiter zu reduzieren. Unter Verwendung dieses Ansatzes reduzierte sich die Anzahl an möglichen Kandidatenmutationen weiter bis auf zwei. Eine dieser beiden Mutationen, lokalisiert im Gen Mannosyltransferase (PIGV), die für die Biosynthese des Glykosylphosphatidylinositols (GPI) notwendig ist, konnte für die Erkrankung als funktionell ursächlich identifiziert werden. Mutationen in diesem Gen konnten in drei weiteren, unabhängigen Familien nachgewiesen werden und führen dort zu einer deutlichen Verringerung der Proteinmenge. Durch die fehlerhafte Synthese der GPI-Anker auf den Zelloberflächen kann es zu einer verstärkten Freisetzung der alkalischen Phosphatase kommen, die ansonsten an die Zelloberfläche gebunden wäre (Murakami et al., 2012). Es konnte somit erstmalig durch die Anwendung von Hochdurchsatz-Sequenzier-Technologien die pathogene Mutation des HPMR-Syndroms identifiziert werden.

Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome.

Krawitz PM*, **Schweiger MR***, Rödelsperger C, Marcelis C, Kölsch U, Meisel C, Stephani F, Kinoshita T, Murakami Y, Bauer S, Isau M, Fischer A, Dahl A, Kerick M, Hecht J, Köhler S, Jäger M, Grünhagen J, de Condor BJ, Doelken S, Brunner HG, Meinecke P, Passarge E, Thompson MD, Cole DE, Horn D, Roscioli T, Mundlos S, Robinson PN.

* **equally contributed**

Nat Genet. 2010 Oct;42(10):827-9.

2.2 Anwendung der Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien an klinischen Proben

Bisherige Untersuchungen, auch solche im Rahmen großer Sequenzierprojekte, basieren auf frischen bzw. schockgefrorenen Gewebeproben. Diese Vorgehensweise stellt einen entscheidenden Engpass dar: Einerseits haben Chirurgen bei der Tumorentnahme nicht immer die Zeit und die Gelegenheit, Gewebeproben sofort einzufrieren, andererseits wurden von vielen interessanten Proben in der Vergangenheit keine Gefrierproben gesammelt. Andererseits werden bereits seit Jahrzehnten in den pathologischen Abteilungen aller Krankenhäuser Gewebeproben routinemäßig zunächst in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin (FFPE) eingebettet. Diese Form der Konservierung, die eine einfache und platzsparende Lagerung ermöglicht, ist auch eine gängige Methode, wenn es darum geht, große Gewebebanken anzulegen, in denen Proben über viele Jahre hinweg gesammelt werden.

Der Nachteil dieser Vorgangsweise besteht darin, dass viele molekularbiologische Techniken an derartigen Proben nicht durchgeführt werden können, da die Verwendung von Formaldehyd zu einer Quervernetzung von DNA mit an sie gebundenen Proteinen führt, und damit die DNA für viele modifizierende Enzyme nicht mehr zugänglich ist. Darüber hinaus liegt DNA aus FFPE-Materialien oft fragmentiert vor, so dass Techniken, wie z.B. Polymerase Kettenreaktionen (PCRs), nicht durchgeführt werden können. Insgesamt ist die Qualität wie auch die Quantität derartiger DNA stark beeinträchtigt. Im Hinblick auf die zukünftigen Bedürfnisse der Tumorgenetik erhob sich daher die wichtige Frage, ob DNA aus FFPE-Geweben für Sequenzierungen mit Techniken der zweiten Generation verwendet werden kann.

Um diese Frage beantworten zu können, haben wir systematische Untersuchungen durchgeführt. Sowohl unterschiedliche Konservierungsbedingungen als auch verschiedene DNA-Extraktions-Methoden wurden eingesetzt, um die Tauglichkeit der DNA für ihre Verwendung in den modernen Sequenziertechnologien zu prüfen. Unter anderem haben wir in unseren Versuchen Ischämiezeiten (Zeit nach Probenentnahme, in der das Gewebe nicht mehr durchblutet werden kann) von 20 bis über 360 Minuten, Fixationszeiten bis zu 72 Stunden sowie Lagerungszeiten bis zu 18 Jahren vorgegeben.

Für die Experimente haben wir Gewebeproben verwendet, von denen ein Teil in Stickstoff eingefroren, der andere parallel als FFPE-Material präpariert worden war. Der Gehalt an Tumorgewebe wurde unter dem Mikroskop bestimmt und umfaßte mindestens 70%. Nach der Präparation der Sequenzierbibliotheken wurden die Proben mittels Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien sequenziert und jeweils auf Veränderungen der Kopienzahl und der Nukleotidaustausche (Polymorphismen und Mutationen) hin untersucht. Dabei konnten wir eindeutig zeigen, dass FFPE-Material für die

Sequenzanalyse verwendet werden kann. Zwar sollte, wenn möglich, dem Gefriergewebe der Vorzug gegeben werden, doch belegen unsere Studien, dass für besondere Fragestellungen auf große Gewebebanken und deren FFPE-Proben zurückgegriffen werden kann. Somit wird ihre Anwendung für verschiedene klinische Studien möglich, die entweder sehr großer Probenmengen oder sehr spezifischer Krankheitsentitäten bedürfen. Darüberhinaus konnten wir durch weitere Untersuchungen die Menge an benötigtem Material signifikant reduzieren und zeigen, dass die Heterogenität des Tumors für die Mutationsdetektion eine untergeordnete Rolle spielt, dass sie aber die Analyse von Kopienzahlveränderungen der DNA signifikant beeinflusst.

Genome-wide massively parallel sequencing of formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues for copy-number- and mutation-analysis.

Schweiger MR, Kerick M, Timmermann B, Albrecht MW, Borodina T, Parkhomchuk D, Zatloukal K, Lehrach H.

PLoS One. 2009;4(5):e5548.

Targeted high throughput sequencing in clinical cancer settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity.

Kerick M, Isau M, Timmermann B, Sültmann H, Herwig R, Krobitch S, Schaefer G, Verdorfer I, Bartsch G, Klocker H, Lehrach H, **Schweiger MR**.

BMC Med Genomics. 2011 Sep 29;4:68.

2.3 Das Mutationsspektrum unterscheidet sich bei MSI und MSS Darmtumoren

Nicht nur auf dem Gebiet der Technologie-Entwicklung war es uns möglich, die Tumordiagnostik entscheidend voranzutreiben: In einem konkreten Projekt haben wir HST Technologien bei Dickdarntumoren eingesetzt. Dazu haben wir alle kodierenden Bereiche der DNA (also jenes eine Prozent der DNA, das für die Zelle von besonderer Bedeutung ist) sowohl in normalem als auch in pathologischem Darmgewebe von Tumorpatienten untersucht. Die Datensätze beider Gewebeproben haben wir miteinander verglichen und speziell jene Informationen identifiziert, die vermutlich für die Tumorentstehung eine funktionelle Rolle spielen. Dabei war es auffällig, dass ein Teil der Tumoren ungefähr 50 Veränderungen, ein anderer hingegen ungefähr 300 spezielle Veränderungen beinhaltet. Diese Zahlen korrelieren mit der Einteilung der Tumoren in sogenannte Mikrosatelliten-stabile (MSS) bzw. -instabile (MSI) Tumore. Diese Charakteristika spielen für weitere Untersuchungen auf der Suche nach einer familiär bedingten Ursache eine Rolle und scheinen zudem für das therapeutische Prozedere entscheidend zu sein. Wir konnten mit unseren Untersuchungen weiterhin zeigen, dass die Anzahl an Mutationen generell deutlich höher liegt als bisher vermutet. Gleichzeitig erlaubt die Technologie eine Vereinfachung der Diagnostik von Darmtumoren: Mit dem Einsatz von HST Technologien ist es nun möglich, eine Unterteilung der Tumortypen in MSS und MSI mit der Identifikation der zugrunde liegenden Mutation zu koppeln, so dass keine weitergehenden molekularbiologischen Methoden mehr von Nöten sind. Das vereinfacht nicht nur die Diagnostik, sondern erweitert auch das Spektrum der möglichen Ursachenidentifikation.

Somatic mutation profiles of MSI and MSS colorectal cancer identified by whole exome next generation sequencing and bioinformatics analysis.

Timmermann B, Kerick M, Roehr C, Fischer A, Isau M, Boerno ST, Wunderlich A, Barmeyer C, Seemann P, Koenig J, Lappe M, Kuss AW, Garshasbi M, Bertram L, Trappe K, Werber M, Herrmann BG, Zatloukal K, Lehrach H, **Schweiger MR.**

PLoS One. 2010 Dec 22;5(12):e15661.

2.4 Epigenetische Veränderungen in Fusionsgen negativen Tumoren

Eine fehlgeleitete DNA-Methylierung ist eine der ersten Veränderungen, die bei Prostata-Tumoren festgestellt werden konnte (Feinberg and Vogelstein, 1983; Gama-Sosa et al., 1983; Schulz and Hoffmann, 2009; Yegnasubramanian et al., 2008). Dazu gehört auch die Hypermethylierung der Promotorregion und des Exons 1 von GSTP1 (Glutathion S-Transferase pi 1), die bei nahezu allen Tumoren gefunden werden kann, und die als Biomarker-Kandidat gehandelt wird (Kollermann et al., 2006; Lee et al., 1994; Nakayama et al., 2003).

Um eventuelle genomweite, epigenetische Veränderungen bei Tumoren zu identifizieren, haben wir spezifisch methylierte Regionen durch eine Immunpräzipitation mit einem gegen 5-Methyl-Cytosin gerichteten Antikörper angereichert und anschließend mit HST identifiziert. Diese Technologie haben wir in über 100 Prostata-Gewebeproben (Tumor- und Normalgewebe) eingesetzt und Analysen durchgeführt (Börno et al., *Cancer Discovery* in Revision). Unter Verwendung von uns entwickelter bioinformatischer Ansätze konnten wir an die 150.000 Regionen identifizieren, die wiederholt in Tumoren ein, im Vergleich zu Normalproben, unterschiedliches Muster zeigen. Diese Regionen haben wir weiter eingeeengt und konnten schließlich ein kleines Markerset an Regionen identifizieren, die eine eindeutige Unterscheidung der Gewebe in maligne (bösartig) und benigne (gutartig) ermöglichen; und dies mit einer größeren Genauigkeit, als es mit bisher verwendeten Markern möglich gewesen ist. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass Tumore, ohne die in etwa der Hälfte der Prostata-Patienten nachweisbaren TMPRSS2:ERG Fusionen, eine deutlich stärker veränderte Methylierung aufzeigen als jene, bei denen eine Fusion existiert. Dies ist möglicherweise das bisher fehlende Verbindungsglied das erklärt, warum auch hier Tumore entstehen können, ohne dass onkogene Translokationen vorliegen. Weitere Analysen unter Einbeziehung von Gen- und miRNA-Expressionsdaten, sowie den ‚copy number alterations (CNAs)‘ haben es ermöglicht, den vermutlich für die unterschiedliche Methylierung verantwortlichen Pathomechanismus zu identifizieren: In den Fusionsgen negativen Tumoren ist EZH2 („enhancer of zeste homolog 2“) signifikant höher exprimiert als in Fusionsgen positiven Tumoren. EZH2-bedingte Hypermethylierungen sind bereits mit der Progression von PT in Verbindung gebracht worden (Karanikolas et al., 2010; Yu et al., 2007a; Yu et al., 2010), und eine Überexpression von EZH2 ist mit einer gesteigerten Invasivität und hohen Malignität verschiedener Tumore (auch PT) verbunden (Alajez et al., 2010; Banerjee et al., 2011; Hoffmann et al., 2007; Karanikolas et al., 2010; Lu et al., 2011; Schlesinger et al., 2007; Varambally et al., 2002; Vire et al., 2006; Yang et al., 2009; Yu et al., 2007a; Yu et al., 2010; Yu et al., 2007b). Wir konnten darüber hinaus zeigen, dass der Anstieg von EZH2 vermutlich durch eine verminderte Expression von miRNA-26a bedingt ist, die ihrerseits durch eine Hypermethylierung der eigenen Region verursacht wird.

Genome-wide DNA methylation events in TMPRSS2-ERG fusion-negative prostate cancers implicate an EZH2-dependent mechanism with miR-26a hypermethylation.

Börno ST, Fischer A, Kerick M, Fälth M, Laible M, Brase JC, Kuner R, Dahl A, Grimm C, Sayanjali B, Isau M, Röhr C, Wunderlich A, Timmermann B, Claus R, Plass C, Graefen M, Simon R, Demichelis F, Rubin MA, Sauter G, Schlomm T, Sültmann H, Lehrach H, **Schweiger MR.**

Cancer Discov. 2012 Nov;2(11):1024-35.

3. Diskussion

Die Entwicklungen auf dem Gebiet der Genetik haben in den letzten Jahren zu großer Euphorie geführt, da man nun endlich in der Lage ist, dringende Fragen zu beantworten. Viele sprechen in diesem Sinne von einer großen Revolution in der Medizin. Durch die Weiterentwicklung von Hochdurchsatztechnologien wurde es möglich, ein Spektrum an unterschiedlichen Fragestellungen zu bearbeiten, die bis dahin entweder mit jahrelanger Arbeit verbunden oder rein technisch nicht durchführbar waren.

In der vorliegenden Arbeit wurden modernste Hochdurchsatz-Sequenziertechnologien (HST) für unterschiedliche klinische Fragestellungen in der Genetik verwendet. Dabei wurden einerseits Mutationsanalysen bei einer monogenen Erkrankung, andererseits bei einem Modell der komplex genetischen Erkrankung, den Dickdarmtumoren, durchgeführt. Auch wurden diese Technologien verwendet um genomweite Methylierungsmuster bei Prostata-Tumoren zu analysieren.

Durch die Verwendung der HST war es möglich, die für das HPMR-Syndrom ursächliche Mutation zu identifizieren. Es wird nicht mehr lange dauern, und die Sequenzierung der Exome von Patienten mit monogenen Erkrankungen wird als Routine-Verfahren Einzug in die klinische Diagnostik halten. Einige Probleme, wie z.B. die Sicherstellung einer genügend hohen Abdeckung aller kodierenden Nukleotide und die bioinformatische Analyse, werden bereits bearbeitet und Lösungen werden hoffentlich demnächst für die tägliche Anwendung zur Verfügung stehen. Damit wäre ein großer Schritt in der klinischen Genetik getan und vielen Patienten geholfen, die entweder selbst unter einer Erkrankung leiden, deren Ursache nicht bekannt ist, oder die nach der Wahrscheinlichkeit der Vererbung auf folgende Generationen fragen.

Im Gegensatz zu der Pathogenese monogener Erkrankungen, bei denen eine einzige zugrunde liegende Mutation identifiziert werden kann, konnten wir bei Dickdarmtumoren eine Vielzahl an Mutationen aufdecken, die durch eine Weiterentwicklung der bioinformatischen Analysetechniken in funktionell relevante Mutationen klassifiziert werden konnten.

Da die beschriebenen, neuesten Hochdurchsatz-Technologien erst seit wenigen Jahren zur Verfügung stehen, sind erst seit diesem Zeitpunkt systematische Einblicke in Genome und Epigenome möglich. Daraus resultiert, dass viele grundlegende Fragen noch nicht geklärt waren, unter anderem die Frage nach der Anwendbarkeit der Technologie im Hinblick auf klinisch relevantes Material: So liegen die meisten Gewebeproben in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet (FFPE) vor, und sind in nur sehr kleinen Mengen verfügbar. Dies und die Frage, ob die Lokalisation der Biopsieentnahmen für das Ergebnis von Relevanz ist, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass FFPE Material für Sequenzierungen verwendet werden kann,

dass die notwendigen Mengen an Gewebe durchaus durch Biopsieentnahmen abgedeckt werden können, und dass bei der Biopsieentnahme die Lokalisation der Biopsien eine Rolle spielen, zumindest, wenn es um die Bestimmung von Kopienzahlveränderungen geht. Für diesen Fall sind jedoch weiterführende Studien notwendig, die die Heterogenität von Tumoren im Detail untersuchen.

Neben genetischen Veränderungen spielen bei Tumoren epigenetische Veränderungen eine entscheidende Rolle. Insbesondere Abwandlungen des DNA-Methylierungsmusters finden sich hier und scheinen ein frühes Ereignis in der Tumorphogenese zu sein. Eine in dieser Arbeit dargestellte Analyse der Methylome von mehr als 50 Prostatatumoren und entsprechend vielen Normalproben zeigt, dass mehr als 150,000 unterschiedliche Methylierungen bei Tumoren vorliegen können. DNA-Methylierungen sind kovalente Veränderungen der DNA, die insofern einen Schleier über den Informationsgehalt der DNA legen, als dass sie, wenn sie in Promotoren lokalisiert sind, die Bindung von Transkriptionsfaktoren verändern und damit Einfluß auf die Transkription des entsprechenden Gens ausüben. Die genauen Zusammenhänge der Dosisanpassung nach Methylierungen sind allerdings bei weitem noch nicht geklärt. So können Methylierungen einerseits zur Inhibierung der Transkription, andererseits aber auch zu deren Aktivierung führen. Dies scheint von der Lokalisation der Methylierung abhängig zu sein. Ein eindeutiger Zusammenhang mit der zugrunde liegenden DNA-Sequenz konnte jedenfalls noch nicht gezeigt werden.

Neben Bemühungen zur Aufklärung der Pathomechanismen der Tumorentstehung zieht sich der Versuch der Identifikation von Biomarkern und das Bestreben zur Weiterentwicklung von möglichen Ansatzpunkten für Therapien durch die Arbeit. Allgemein hängt die Prognose für Tumorkrankheiten entscheidend von einer frühen Diagnose ab. Je früher der Tumor entdeckt werden kann, desto kleiner ist er, desto unwahrscheinlicher ist es, dass er bereits metastasiert hat, und die Möglichkeiten einer kompletten Resektion sind größer. Dafür ist es notwendig, Biomarker zu identifizieren, die sensitiv genug sind, um ein Tumorstadium zu erkennen, andererseits aber auch nicht so sensitiv sind, dass nicht betroffene Patienten als erkrankt eingestuft werden (möglichst kleine falsch-positiv Rate). Als ein weiterer Einsatzbereich von Biomarkern bietet sich die Klassifikation von Patienten an. Mit Hilfe von Markern besteht die Hoffnung, Patienten besser der für sie optimalen Therapie zuführen zu können. Ein Beispiel hierfür ist die Selektion von Patienten, für die eine Cetuximab-Therapie erfolgreich sein kann: Sie sollen keine KRAS-Mutation besitzen, da ansonsten Cetuximab, ein EGFR-Inhibitor, keine Wirkung zeigt. Als Biomarker werden Gen- und miRNA-Expressionen, Proteine, Mutationen, Kopienzahlveränderungen, der Mikrosatelliten-Status, Veränderungen in der mitochondrialen DNA sowie epigenetische Veränderungen diskutiert. Bisher werden jedoch nur relativ wenige der potentiellen Biomarker tatsächlich in der Klinik eingesetzt.

Biomarker bei Darmtumoren:

Bei Darmtumoren gilt Blut im Stuhl als Indikation, Kolonoskopien durchzuführen. Der Nachweis von Blut ist jedoch wenig sensitiv und kann nur ca. 10% der Adenome und 40 – 85% der Karzinome identifizieren. Trotzdem wird damit die Tumormortalität bereits um ca. 30% reduziert (Hardcastle et al., 1996; Mandel et al., 1993). Zahlreiche weitere Kandidaten werden bei Darmtumoren als Biomarker propagiert, so wie KRAS, APC, TP53 und die Mikrosatelliten-Stabilität. Allerdings müssen erst gute Tests entwickelt werden, um Genmutationen als ‚Screening‘-Methode verwenden zu können. Immerhin werden Mikrosatellitenanalysen in der Klinik bereits durchgeführt. Mikrosatelliten sind unterschiedlich lange Wiederholungen von kurzen Nukleotid-Frequenzen von 1-5bp, die über das gesamte Genom verteilt vorliegen. Die Länge der Wiederholungen ist bei Mikrosatelliten-instabilen Tumoren unterschiedlich. Des Weiteren kann die DNA-Integrität Hinweise auf einen Tumor geben. Normalerweise durchlaufen Kolonozyten eine Apoptose, wobei ihre DNA fragmentiert wird. Dieser Prozess ist in Tumoren reduziert, sodass lange DNA-Fragmente im Stuhl identifiziert werden können. Die Sensitivität beträgt ca. 57% und die Spezifität etwa 94% (Boynton et al., 2003; Roehr, 2012).

Als Marker im Blut werden ‚Carcinoembryonic antigen‘ (CEA) and ‚Carbohydrate antigen‘ 19-9 (CA 19-9) verwendet. Beide Marker werden für die Diagnose von Kolontumoren benutzt, aber nur CEA ist als Marker für eine Tumorprognose geeignet (Duffy, 2001). Weitere Blutmarker sind in Entwicklung, so wurden in letzter Zeit einige Marker entwickelt, die den Methylierungsgrad der DNA messen. Als einer der am weitesten entwickelten Marker bei KRK gilt die Methylierung von Septin-9 (Kim et al., 2010). Andere Regionen, die durch eine Methylierung reguliert werden, umfassen *LRRC3B*, *BAGE*, *MLH1*, *EYA2*, *APC*. Insbesondere eine Hypomethylierung der LINE1 Regionen wurde mit der Prognose bei KRK in Verbindung gebracht (Banerjee and Verma, 2009).

Potentiell werden auch miRNAs als Biomarker diskutiert, so z.B. miRNAs des miRNA17-92 Clusters oder miRNA-29a (Ng et al., 2009).

Biomarker bei Prostata-Tumoren:

Bei Prostata-Tumoren wird vor allem PSA (prostate-spezifisches Antigen) im Serum als Marker herangezogen. PSA kann als ‚screening‘-Methode bei Prostata-Tumoren verwendet werden, ist aber nicht sensitiv genug, um zwischen hoch aggressiven und milden Formen des Prostata-Karzinoms zu unterscheiden (Catalona et al., 1991; Eckersberger et al., 2009; Kilpelainen et al.; Shariat et al., 2011; Stamey et al., 1987). Auf genomischer Ebene sind zwar einige Mutationen im Zusammenhang mit einem erhöhten Prostata-Risiko beschrieben worden, aber die Frequenz der Mutationen ist recht niedrig, sodass sich ein allgemeines ‚screening‘ bisher nicht anbietet. Um somatische Mutationen steht es ähnlich. Mit ca. 0,33 Mutationen pro Mb ist die Mutationsrate deutlich geringer als bei anderen Tumoren (ca. 1 – 4 /Mb) und damit zu niedrig, um sie für großflächige

Diagnose-Verfahren zu verwenden. Auch liegen die Mutationen in unterschiedlichen Genen und sind damit zu komplex für Routine-Untersuchungen (Berger et al., 2011; Kan et al., 2010). Auch bei Prostata-Tumoren spielt die DNA Methylierung eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung – und Progression. Einzelne Regionen werden und wurden als Marker getestet, darunter am breitesten untersucht die Methylierung von *GSTP1*. Weitere potentielle Biomarker-Regionen umfassen Hypermethylierungen der *CDH1*, *MDR1* und *RASF1A* – Gene (Banerjee and Verma, 2009; Kollermann et al., 2006; Suh et al., 2000). Dem gegenüber stehen Chromosomopathien: Amplifikationen, Deletionen und Translokationen sind häufig zu finden. Insbesondere die TMPRSS2:ERG Translokation liegt bei nahezu 50% aller Tumore vor und entsteht vermutlich bereits in frühen Stadien der Tumorgenese (Braun et al., 2011; Mehra et al., 2007; Perner et al., 2006; Rubin et al., 2011; Tomlins et al., 2005). Ein Urin-basierter Test für diese Translokation muss jedoch erst noch entwickelt werden.

Das Spektrum an möglichen Biomarkern könnte durch den Einsatz von modernsten Technologien entscheidend verbessert werden. Dazu müssen diese Technologien auf ihre Verwendbarkeit für klinisches Material getestet und dann eingesetzt werden. Die Grundlagen dafür finden sich in dieser Arbeit. Auch wurde von uns eine Anzahl epigenetischer Biomarker identifiziert, die eine Auftrennung von malignem und benignem Gewebe ermöglichen, und die auch erfolgreich eine Unterscheidung zwischen PT mit und ohne Translokation ermöglichen. Bisher sind Biomarker-Analysen auf eine einzige Ebene der genetischen Information – DNA, RNA oder Epigenom – beschränkt. Im Augenblick arbeite ich an einem integrativen Ansatz, bei dem durch die Kombination mit weiteren Datensätzen, erhoben an den gleichen Proben, wie z.B. den Genexpressionsdaten, miRNAs, Mutationen und Kopienzahlveränderungen, die Sensitivität und Spezifität der Biomarker in Zukunft noch deutlich erhöht werden könnte.

Selbstverständlich ist es in diesem Zusammenhang wichtig, auch das systemweite Muster der Veränderungen bei Erkrankungen zu betrachten und alle Informationen zusammenzutragen, die ein besseres Bild von den Ursachen und Konsequenzen der vielen genetischen und epigenetischen Veränderungen bei pathologischen Entgleisungen ermöglichen (Schweiger et al., 2011). Insbesondere die Integration auf genetischer (Mutationen, Veränderungen der Kopienzahlen, der Struktur der DNA sowie der Expressionsmengen auf RNA-Ebene) und epigenetischer Ebene wird es ermöglichen, eine Vielzahl an Fehlentwicklungen bei komplexen Erkrankungen zu verstehen. Wichtige Aspekte sind hierbei: Welche der Veränderungen spielen eine entscheidende Rolle bei der Krankheitsentstehung? Ultimativ müssen hierfür jedoch funktionelle Experimente durchgeführt werden, die sich an die Hochdurchsatz-Verfahren unbedingt anschließen müssen. Allerdings könnte man auch davon ausgehen, dass Veränderungen auf

Transkriptomenebene, die ihr Korrelat in der DNA besitzen - sei es durch Kopienzahlveränderungen der DNA, Mutationen in Promotoren oder miRNA-Bindestellen oder durch epigenetische Modifikationen - primäre Veränderungen darstellen und damit maßgeblich an der Entstehung des pathogenen Prozesses beteiligt sind; dies im Gegensatz zu sekundären Veränderungen, wie Erhöhungen oder Verminderungen von Transkriptionsfaktoren, die im weiteren dann zu einer De-Regulation ihrer Zielgene führen.

Man kann diese Frage auch etwas anders formulieren und danach fragen, welche Veränderungen den Beginn der Entwicklung darstellen und damit als erste mit therapeutischen Mitteln angegangen werden sollten? Eine Beantwortung dieser Frage ist hauptsächlich durch Tiermodelle möglich, bei denen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Krankheitsentstehung Analysen durchgeführt werden. Hiermit wäre es z.B. möglich, die zeitliche Abfolge der Modifikationen festzustellen, indem man sehen könnte, ob DNA-Methylierungen in der Tat als erstes Ereignis auftreten, die dann chromosomale Instabilitäten und Mutationen nach sich ziehen.

Eine der wichtigsten Anwendungsgebiete im Augenblick scheint die Frage zu sein, wodurch sich die Krankheitsverläufe bei einzelnen Patienten unterscheiden, und wie man die Therapie darauf abstimmen kann. Durch die Möglichkeit, einzelne Individuen komplett zu sequenzieren und damit Karten ihrer ‚privaten‘ Mutationen und (epi)genetischen Muster zu erstellen, wird es immer selbstverständlicher, individuelle Eigenschaften der Tumore zu erkennen und auf sie die Chemotherapie abzustimmen. Allerdings ist es aufgrund der großen Anzahl der Veränderungen schwierig, genau abzuschätzen, welche der existierenden Medikamente günstiger oder weniger günstig sind. Auch liegt hier einer der entscheidenden, limitierenden Faktoren: die Anzahl der zur Verfügung stehenden Medikamente. Erst seit wenigen Jahren wird eine ‚targeted therapy‘ Strategie verfolgt, bei der Substanzen gegen ein spezifisches Zielprotein gerichtet sind. Bis dahin wurden Chemotherapien verwendet, die ungerichtet v.a. proliferierende Zellen in ihrem Wachstum blockieren. Bei diesem Vorgehen ist es dann besonders schwierig, die optimale Therapie auf den einzelnen Patienten abzustimmen. Auf alle Fälle werden die Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Diagnostik auch die Entwicklungen auf Seite der Medikamente weiter vorantreiben. Dies wird zu einer Medizin führen, die die Unterschiedlichkeit der Tumore von Patient zu Patient in Betracht zieht und, unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse, versucht, für jeden Patienten ein Personen-bezogenes therapeutisches Schema zu erstellen. Wie in dieser Arbeit dargelegt, stehen die dafür notwendigen Technologien bereit und müssen ‚nur‘ noch zur Lösung der entsprechenden Fragestellungen angewandt werden.

4. Zusammenfassung

Genetische Erkrankungen stellen eines der größten Probleme unserer Zeit dar. Zu ihnen zählen sowohl monogene als auch genetisch komplex Erkrankungen wie z.B. Tumore, Diabetes Mellitus oder die Alzheimer'sche Erkrankung. Bisherige Technologien haben Einblick in kleine Teilbereiche des Genoms ermöglicht, die aber trotz jahrelanger Puzzlearbeiten Zusammenhänge nur teilweise erkennen lassen. Die Entwicklung von modernen Technologien und Analyseverfahren hat nun eine wahre Revolution mit sich gebracht: Erstmals ist es möglich geworden, ganze Genome innerhalb von wenigen Tagen zu sequenzieren und diese auch systematisch zu analysieren und zu interpretieren. Nicht nur zur Entschlüsselung der genomischen Sequenz können diese Techniken eingesetzt werden, sondern auch für die Analyse von Gen – und miRNA – Expressionen, Chromosomopathien und Veränderungen des Epigenoms. Angesichts dieser Möglichkeiten ist es gerechtfertigt, bereits heute von einer großen Revolution in der Humangenetik zu sprechen. Dennoch, ein Defizit gibt es noch, das es gilt, langsam aus dem Weg zu räumen: Der Transfer der Erkenntnisse zum Nutzen von Patienten, ein Punkt, der zentral in dieser Arbeit behandelt wird.

Kurz nach der Einführung der neuen Technologien in Forschungslaboratorien gelang es mir, in Zusammenarbeit mit der Abteilung für medizinische Genetik der Charite, als eine der ersten Gruppen weltweit, diese Technologien für die Identifikation der, einer monogen autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung zugrunde liegenden Mutation, zu nutzen. Dies ist ein klassisches Anwendungsgebiet der Humangenetik: Die Suche nach der Stecknadel im Heuhaufen – der krankheitsauslösenden Mutation unter ca 30 Millionen Nukleotiden. Durch die Anwendung der Hochdurchsatz-Sequenzieretechnologie (HST) ist es uns gelungen, diesen Prozess, der mit anderen Technologien mehrere Jahre gedauert hätte, innerhalb weniger Woche abzuschließen. Die Identifikation der Mutation im PIGV-Gen bei HPMR-Patienten führte dazu, dass wir Einblick in den Pathomechanismus der mentalen Retardierung und der drastischen Erhöhung der alkalischen Phosphatase bei diesen Patienten gewonnen haben, und nunmehr in der Lage sind, Wiederholungsrisiken für weitere Generationen zu bestimmen, und darüber hinaus mögliche therapeutische Richtlinien zu entwickeln.

Eine etwas komplexere Analyse ist mir bei kolorektalen Tumoren gelungen, bei denen wir zeigen konnten, dass Mikrosatelliten instabile (MSI) Tumore deutlich mehr kodierende, funktional relevante Mutationen aufweisen als die Gruppe der Mikrosatelliten stabilen (MSS). Diese Arbeit war die erste systematische Sequenzierung des Exoms eines soliden Tumors. Zuvor waren ausschließlich Leukämien untersucht worden, die aufgrund ihrer homogenen Zellpopulation eine einfachere Datenanalyse ermöglichen. Durch die Vermischung von Tumorzellen mit Bindegewebszellen bei den Darmtumoren mußte

zunächst das Problem der Heterogenität gelöst werden, das ein ‚einfaches‘ Bestimmen der Mutationen durch gängige Algorithmen unmöglich gemacht hatte. Diese Arbeit an klinischem Material führte bereits zum nächsten Problem: Die Gewinnung von idealen Gewebeproben für die HST. Wir konnten zeigen, dass Gewebe, das, gängigen pathologischen Asservierungstechnologien entsprechend, als FFPE (Formalin Fixierung, Paraffin Einbettung)- Material über viele Jahre hinweg gelagert worden ist, gut für die HST verwendet werden kann. Außerdem konnten wir die für die Sequenzierung notwendige DNA – Menge deutlich reduzieren, was bei wertvollem Patientenmaterial sehr wichtig ist. Schließlich konnten wir zeigen, dass die Lokalisation der Gewebeentnahme bei Tumoren für die Bestimmung der Kopienzahl („copy number alterations, CNAs“) – und vermutlich auch die Detektion von Mutationen – einen Einfluß auf die Ergebnisse hat. Dies ist auf dem Hintergrund der Heterogenität von Tumoren auch erklärbar.

Neben genetischen Ursachen für die Tumor-Entstehung und -Progression ist bekannt, dass differentielle Methylierungen eine der ersten Veränderungen bei der Entwicklung von Tumoren darstellen. Prostata-Tumore sind eine der häufigsten Tumorentitäten und können in zwei große Gruppen eingeteilt werden: Solche, in denen eine TMPRSS2:ERG Genfusion vorliegt und jene ohne Fusionsgen. Da die pathomechanistischen Gründe für die Entstehung von Fusionsgen-negativen Prostata-Tumoren nicht bekannt sind, haben wir die Epigenome dieser Tumore analysiert. Dazu haben wir eine Technologie, die MeDIP-Seq (Sequenzierung von mit einem Antikörper gegen 5-MethylCytosin immunopräzipitierter DNA), verwendet, um so genomweite Muster der DNA-Methylierungen von Prostata-Tumoren und Normalgewebe zu erhalten. Bei der Analyse der Ergebnisse zeigte sich, dass sich Fusionsgen-negative Tumore sowohl lokalisations-spezifisch als auch global in ihrem Methylierungsmuster deutlich von Fusionsgen-positiven Tumoren unterscheiden. Weitere mechanistische Untersuchungen haben ergeben, dass dies durch eine erhöhte EZH2-Expression ihrerseits, bedingt durch eine verminderte miRNA26-Menge, verursacht wird. Die Verminderung der miRNA26 konnten wir auf eine Hypermethylierung ihrer genomischen Region zurückführen. Diese Erkenntnisse haben nicht nur eine Bedeutung für den Pathomechanismus von ca. 50% aller Prostata-Tumore an sich, sondern haben auch weitreichende Konsequenzen für die Therapiewahl. Weitere Experimente und Analysen werden zeigen, worauf die verstärkte Methylierung der miRNA26a Region beruht. Durch eine Integration unterschiedlicher Datensätze erhoffe ich mir des Weiteren Einblicke in die Tumorgenese zu erhalten, die dann eine Patienten-orientierte Diagnostik und Therapie ermöglichen.

5. Literatur

(2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.

(2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061-1068.

Alajez, N.M., Shi, W., Hui, A.B., Bruce, J., Lenarduzzi, M., Ito, E., Yue, S., O'Sullivan, B., and Liu, F.F. (2010). Enhancer of Zeste homolog 2 (EZH2) is overexpressed in recurrent nasopharyngeal carcinoma and is regulated by miR-26a, miR-101, and miR-98. *Cell Death Dis* 1, e85.

Albert, T.J., Molla, M.N., Muzny, D.M., Nazareth, L., Wheeler, D., Song, X., Richmond, T.A., Middle, C.M., Rodesch, M.J., Packard, C.J., *et al.* (2007). Direct selection of human genomic loci by microarray hybridization. *Nature methods* 4, 903-905.

Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., and Zoghbi, H.Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185-188.

Andreoiu, M., and Cheng, L. (2010). Multifocal prostate cancer: biologic, prognostic, and therapeutic implications. *Human pathology* 41, 781-793.

Banerjee, H.N., and Verma, M. (2009). Epigenetic mechanisms in cancer. *Biomark Med* 3, 397-410.

Banerjee, R., Mani, R.S., Russo, N., Scanlon, C.S., Tsodikov, A., Jing, X., Cao, Q., Palanisamy, N., Metwally, T., Inglehart, R.C., *et al.* (2011). The tumor suppressor gene rap1GAP is silenced by miR-101-mediated EZH2 overexpression in invasive squamous cell carcinoma. *Oncogene*.

Barber, T.D., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., and Velculescu, V.E. (2004). Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *The New England journal of medicine* 351, 2883.

Bardelli, A., Parsons, D.W., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Saha, S., Markowitz, S., Willson, J.K., Parmigiani, G., Kinzler, K.W., *et al.* (2003). Mutational analysis of the tyrosine kinome in colorectal cancers. *Science* 300, 949.

Beck, S., and Rakan, V.K. (2008). The methylome: approaches for global DNA methylation profiling. *Trends Genet* 24, 231-237.

Becker, J., Semler, O., Gilissen, C., Li, Y., Bolz, H.J., Giunta, C., Bergmann, C., Rohrbach, M., Koerber, F., Zimmermann, K., *et al.* (2011). Exome sequencing identifies truncating mutations in human SERPINF1 in autosomal-recessive osteogenesis imperfecta. *American journal of human genetics* 88, 362-371.

Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., *et al.* (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53-59.

Berger, M.F., Lawrence, M.S., Demichelis, F., Drier, Y., Cibulskis, K., Sivachenko, A.Y., Sboner, A., Esgueva, R., Pflueger, D., Sougnez, C., *et al.* (2011). The genomic complexity of primary human prostate cancer. *Nature* 470, 214-220.

Bird, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.

Boerno, S.T. (2012). Dissertation.

Boerno, S.T., Grimm, C., Lehrach, H., and Schweiger, M.R. (2010). Next-generation sequencing technologies for DNA methylation analyses in cancer genomics. *Epigenomics* 2, 199-207.

Bos, J.L., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Verlaan-de Vries, M., van Boom, J.H., van der Eb, A.J., and Vogelstein, B. (1987). Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327, 293-297.

Bostwick, D.G., and Cheng, L. (2012). Precursors of prostate cancer. *Histopathology* 60, 4-27.

Boynton, K.A., Summerhayes, I.C., Ahlquist, D.A., and Shuber, A.P. (2003). DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Clinical chemistry* 49, 1058-1065.

Braun, M., Scheble, V.J., Menon, R., Scharf, G., Wilbertz, T., Petersen, K., Beschorner, C., Reischl, M., Kuefer, R., Schilling, D., *et al.* (2011). Relevance of cohort design for studying the frequency of the ERG rearrangement in prostate cancer. *Histopathology* 58, 1028-1036.

Carvalho, J.R., Filipe, L., Costa, V.L., Ribeiro, F.R., Martins, A.T., Teixeira, M.R., Jeronimo, C., and Henrique, R. (2010). Detailed analysis of expression and promoter methylation status of apoptosis-related genes in prostate cancer. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15, 956-965.

Catalona, W.J., Smith, D.S., Ratliff, T.L., Dodds, K.M., Coplen, D.E., Yuan, J.J., Petros, J.A., and Andriole, G.L. (1991). Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med* 324, 1156-1161.

Cazares, L.H., Drake, R.R., Esquela-Kirscher, A., Lance, R.S., Semmes, O.J., and Troyer, D.A. (2011). Molecular pathology of prostate cancer. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers* 9, 441-459.

Choi, M., Scholl, U.I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I.R., Zumbo, P., Nayir, A., Bakkaloglu, A., Ozen, S., Sanjad, S., *et al.* (2009). Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19096-19101.

Christensson, A., Laurell, C.B., and Lilja, H. (1990). Enzymatic activity of prostate-specific antigen and its reactions with extracellular serine proteinase inhibitors. *European journal of biochemistry / FEBS* 194, 755-763.

Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452, 215-219.

Cross, S.H., Charlton, J.A., Nan, X., and Bird, A.P. (1994). Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nat Genet* 6, 236-244.

Damber, J.E., and Aus, G. (2008). Prostate cancer. *Lancet* 371, 1710-1721.

Delahunt, B., Miller, R.J., Srigley, J.R., Evans, A.J., and Samaratunga, H. (2012). Gleason grading: past, present and future. *Histopathology* 60, 75-86.

Dobrovic, A., and Simpfendorfer, D. (1997). Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 57, 3347-3350.

Down, T.A., Rakyan, V.K., Turner, D.J., Flicek, P., Li, H., Kulesha, E., Graf, S., Johnson, N., Herrero, J., Tomazou, E.M., *et al.* (2008). A Bayesian deconvolution strategy for immunoprecipitation-based DNA methylome analysis. *Nature biotechnology* 26, 779-785.

Duffy, M.J. (2001). Carcinoembryonic antigen as a marker for colorectal cancer: is it clinically useful? *Clinical chemistry* 47, 624-630.

Eckersberger, E., Finkelstein, J., Sadri, H., Margreiter, M., Taneja, S.S., Lopor, H., and Djavan, B. (2009). Screening for Prostate Cancer: A Review of the ERSPC and PLCO Trials. *Rev Urol* 11, 127-133.

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.

Ehrlich, M. (2009). DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 1, 239-259.

Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., and Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10, 2709-2721.

Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21, 5427-5440.

Fallik, D., Borrini, F., Boige, V., Viguier, J., Jacob, S., Miquel, C., Sabourin, J.C., Ducreux, M., and Praz, F. (2003). Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 63, 5738-5744.

Fearon, E., and Gruber, S. (2001). Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In *The Molecular Basis of Cancer*, J. Mendelsohn, P. Howley, M. Israel, and L. Liotta, eds. (Philadelphia: W.B.Saunders), pp. 289-312.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.

Feinberg, A.P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7, 21-33.

Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.

Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and Paul, C.L. (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 1827-1831.

Gama-Sosa, M.A., Slagel, V.A., Trewyn, R.W., Oxenhandler, R., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., and Ehrlich, M. (1983). The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res* 11, 6883-6894.

Gardiner-Garden, M., and Frommer, M. (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196, 261-282.

Gilissen, C., Hoischen, A., Brunner, H.G., and Veltman, J.A. (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet*. May 20(5):490-7

Gleason, D.F. (1992). Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Human pathology* 23, 273-279.

Gnirke, A., Melnikov, A., Maguire, J., Rogov, P., LeProust, E.M., Brockman, W., Fennell, T., Giannoukos, G., Fisher, S., Russ, C., *et al.* (2009). Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nature biotechnology* 27, 182-189.

Goss, K.H., and Groden, J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 18, 1967-1979.

Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G.L., Hunter, C., Bignell, G., Davies, H., Teague, J., Butler, A., Stevens, C., *et al.* (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153-158.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

Hardcastle, J.D., Chamberlain, J.O., Robinson, M.H., Moss, S.M., Amar, S.S., Balfour, T.W., James, P.D., and Mangham, C.M. (1996). Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 348, 1472-1477.

Herold, G. (2006). Herold - Innere Medizin.

Hiltunen, M.O., Alhonen, L., Koistinaho, J., Myohanen, S., Paakkonen, M., Marin, S., Kosma, V.M., and Janne, J. (1997). Hypermethylation of the APC (adenomatous polyposis coli) gene promoter region in human colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 70, 644-648.

Hodges, E., Xuan, Z., Balija, V., Kramer, M., Molla, M.N., Smith, S.W., Middle, C.M., Rodesch, M.J., Albert, T.J., Hannon, G.J., *et al.* (2007). Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nat Genet* 39, 1522-1527.

Hoffmann, M.J., Engers, R., Florl, A.R., Otte, A.P., Muller, M., and Schulz, W.A. (2007). Expression changes in EZH2, but not in BMI-1, SIRT1, DNMT1 or DNMT3B are associated with DNA methylation changes in prostate cancer. *Cancer Biol Ther* 6, 1403-1412.

Hoischen, A., van Bon, B.W., Gilissen, C., Arts, P., van Lier, B., Steehouwer, M., de Vries, P., de Reuver, R., Wieskamp, N., Mortier, G., *et al.* (2010). De novo mutations of SETBP1 cause Schinzel-Giedion syndrome. *Nat Genet* 42, 483-485.

Howard, G., Eiges, R., Gaudet, F., Jaenisch, R., and Eden, A. (2008). Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 27, 404-408.

Hu, H., Wrogemann, K., Kalscheuer, V., Tzschach, A., Richard, H., Haas, S.A., Menzel, C., Bienek, M., Froyen, G., Raynaud, M., *et al.* (2009). Mutation screening in 86 known X-linked mental retardation genes by droplet-based multiplex PCR and massive parallel sequencing. *The HUGO journal* 3, 41-49.

Issa, J.P. (2008). Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin Cancer Res* 14, 5939-5940.

Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 245-254.

Jaiswal, A.S., Balusu, R., and Narayan, S. (2005). Involvement of adenomatous polyposis coli in colorectal tumorigenesis. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 10, 1118-1134.

Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61, 69-90.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.

Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., *et al.* (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science* 321, 1801-1806.

Kan, Z., Jaiswal, B.S., Stinson, J., Janakiraman, V., Bhatt, D., Stern, H.M., Yue, P., Haverty, P.M., Bourgon, R., Zheng, J., *et al.* (2010). Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* 466, 869-873.

Karanikolas, B.D., Figueiredo, M.L., and Wu, L. (2010). Comprehensive evaluation of the role of EZH2 in the growth, invasion, and aggression of a panel of prostate cancer cell lines. *Prostate* 70, 675-688.

Keino-Masu, K., Masu, M., Hinck, L., Leonardo, E.D., Chan, S.S., Culotti, J.G., and Tessier-Lavigne, M. (1996). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor. *Cell* 87, 175-185.

Kerick, M., Isau, M., Timmermann, B., Sultmann, H., Herwig, R., Krobitch, S., Schaefer, G., Verdorfer, I., Bartsch, G., Klocker, H., *et al.* (2011). Targeted high throughput sequencing in clinical cancer settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. *BMC medical genomics* 4, 68.

Keshet, I., Schlesinger, Y., Farkash, S., Rand, E., Hecht, M., Segal, E., Pikarski, E., Young, R.A., Niveleau, A., Cedar, H., *et al.* (2006). Evidence for an instructive mechanism of de novo methylation in cancer cells. *Nat Genet* 38, 149-153.

Kilpelainen, T.P., Tammela, T.L., Maattanen, L., Kujala, P., Stenman, U.H., Ala-Opas, M., Murtola, T.J., and Auvinen, A. False-positive screening results in the Finnish prostate cancer screening trial. *Br J Cancer* 102, 469-474.

Kim, M.S., Lee, J., and Sidransky, D. (2010). DNA methylation markers in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 29, 181-206.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996a). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159-170.

Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1996b). Life (and death) in a malignant tumour. *Nature* 379, 19-20.

Kollermann, J., Kempkensteffen, C., Helpap, B., Schrader, M., Krause, H., Muller, M., Miller, K., and Schostak, M. (2006). Impact of hormonal therapy on the detection of promoter hypermethylation of the detoxifying glutathione-S-transferase P1 gene (GSTP1) in prostate cancer. *BMC urology* 6, 15.

Kolodner, R. (1996). Biochemistry and genetics of eukaryotic mismatch repair. *Genes & development* 10, 1433-1442.

Kondo, Y., and Issa, J.P. (2004). Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23, 29-39.

Konstantinova, L.N., Fleischman, E.W., Knisch, V.I., Perevozchikov, A.G., and Kopnin, B.P. (1991). Karyotype peculiarities of human colorectal adenocarcinomas. *Human genetics* 86, 491-496.

Krawitz, P.M., Schweiger, M.R., Rodelsperger, C., Marcelis, C., Kolsch, U., Meisel, C., Stephani, F., Kinoshita, T., Murakami, Y., Bauer, S., *et al.* (2010). Identity-by-descent filtering of exome sequence data identifies PIGV mutations in hyperphosphatasia mental retardation syndrome. *Nat Genet* 42, 827-829.

Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., *et al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409, 860-921.

Lee, W.H., Morton, R.A., Epstein, J.I., Brooks, J.D., Campbell, P.A., Bova, G.S., Hsieh, W.S., Isaacs, W.B., and Nelson, W.G. (1994). Cytidine methylation of regulatory sequences near the pi-class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 11733-11737.

Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.

Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.

Lister, R., and Ecker, J.R. (2009). Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res* 19, 959-966.

Lister, R., Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., *et al.* (2009). Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462, 315-322.

Lu, J., He, M.L., Wang, L., Chen, Y., Liu, X., Dong, Q., Chen, Y.C., Peng, Y., Yao, K.T., Kung, H.F., *et al.* (2011). MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. *Cancer Res* 71, 225-233.

Lynch, H.T., and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *The New England journal of medicine* 348, 919-932.

Mandel, J.S., Bond, J.H., Church, T.R., Snover, D.C., Bradley, G.M., Schuman, L.M., and Ederer, F. (1993). Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *The New England journal of medicine* 328, 1365-1371.

Mardis, E.R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics* 9, 387-402.

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bembem, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y.J., Chen, Z., *et al.* (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376-380.

Markowitz, S.D., Dawson, D.M., Willis, J., and Willson, J.K. (2002). Focus on colon cancer. *Cancer Cell* 1, 233-236.

Maxam, A.M., and Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 560-564.

Mehra, R., Tomlins, S.A., Shen, R., Nadeem, O., Wang, L., Wei, J.T., Pienta, K.J., Ghosh, D., Rubin, M.A., Chinnaiyan, A.M., *et al.* (2007). Comprehensive assessment of TMPRSS2 and ETS family gene aberrations in clinically localized prostate cancer. *Mod Pathol* 20, 538-544.

Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11, 31-46.

Moroni, M., Sartore-Bianchi, A., Benvenuti, S., Artale, S., Bardelli, A., and Siena, S. (2005). Somatic mutation of EGFR catalytic domain and treatment with gefitinib in colorectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 16, 1848-1849.

Murakami, Y., Kanzawa, N., Saito, K., Krawitz, P.M., Mundlos, S., Robinson, P.N., Karadimitris, A., Maeda, Y., and Kinoshita, T. (2012). Mechanism for release of alkaline phosphatase caused by glycosylphosphatidylinositol deficiency in patients with hyperphosphatasia-mental retardation syndrome. *J Biol Chem*.

Nakayama, M., Bennett, C.J., Hicks, J.L., Epstein, J.I., Platz, E.A., Nelson, W.G., and De Marzo, A.M. (2003). Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed study using laser-capture microdissection. *The American journal of pathology* 163, 923-933.

Ng, E.K., Chong, W.W., Jin, H., Lam, E.K., Shin, V.Y., Yu, J., Poon, T.C., Ng, S.S., and Sung, J.J. (2009). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 58, 1375-1381.

Okamoto, M., Sasaki, M., Sugio, K., Sato, C., Iwama, T., Ikeuchi, T., Tonomura, A., Sasazuki, T., and Miyaki, M. (1988). Loss of constitutional heterozygosity in colon carcinoma from patients with familial polyposis coli. *Nature* 331, 273-277.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.

- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55, 74-108.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., *et al.* (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807-1812.
- Pastor, W.A., Pape, U.J., Huang, Y., Henderson, H.R., Lister, R., Ko, M., McLoughlin, E.M., Brudno, Y., Mahapatra, S., Kapranov, P., *et al.* (2011). Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature* 473, 394-397.
- Perner, S., Demichelis, F., Beroukhi, R., Schmidt, F.H., Mosquera, J.M., Setlur, S., Tchinda, J., Tomlins, S.A., Hofer, M.D., Pienta, K.G., *et al.* (2006). TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer. *Cancer Res* 66, 8337-8341.
- Pomraning, K.R., Smith, K.M., and Freitag, M. (2009). Genome-wide high throughput analysis of DNA methylation in eukaryotes. *Methods* 47, 142-150.
- Porreca, G.J., Zhang, K., Li, J.B., Xie, B., Austin, D., Vassallo, S.L., LeProust, E.M., Peck, B.J., Emig, C.J., Dahl, F., *et al.* (2007). Multiplex amplification of large sets of human exons. *Nature methods* 4, 931-936.
- Pritchard, C.C., and Grady, W.M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut* 60, 116-129.
- Qian, J., Jenkins, R.B., and Bostwick, D.G. (1995). Chromosomal anomalies in atypical adenomatous hyperplasia and carcinoma of the prostate using fluorescence in situ hybridization. *Urology* 46, 837-842.
- Rodriguez, J., Frigola, J., Vendrell, E., Risques, R.A., Fraga, M.F., Morales, C., Moreno, V., Esteller, M., Capella, G., Ribas, M., *et al.* (2006). Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res* 66, 8462-9468.
- Roehr, C. (2012). Dissertation
- Ronaghi, M. (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 11, 3-11.
- Rothberg, J.M., and Leamon, J.H. (2008). The development and impact of 454 sequencing. *Nature biotechnology* 26, 1117-1124.
- Rubin, M.A., Maher, C.A., and Chinnaiyan, A.M. (2011). Common gene rearrangements in prostate cancer. *J Clin Oncol* 29, 3659-3668.

Sakr, W.A., Macoska, J.A., Benson, P., Grignon, D.J., Wolman, S.R., Pontes, J.E., and Crissman, J.D. (1994). Allelic loss in locally metastatic, multisampled prostate cancer. *Cancer Res* 54, 3273-3277.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.

Schlesinger, Y., Straussman, R., Keshet, I., Farkash, S., Hecht, M., Zimmerman, J., Eden, E., Yakhini, Z., Ben-Shushan, E., Reubinoff, B.E., *et al.* (2007). Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 39, 232-236.

Schmidt, H., DeAngelis, G., Eltze, E., Gockel, I., Semjonow, A., and Brandt, B. (2006). Asynchronous growth of prostate cancer is reflected by circulating tumor cells delivered from distinct, even small foci, harboring loss of heterozygosity of the PTEN gene. *Cancer Res* 66, 8959-8965.

Schulz, W.A., and Hoffmann, M.J. (2009). Epigenetic mechanisms in the biology of prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 19, 172-180.

Schweiger, M.R., Kerick, M., Timmermann, B., and Isau, M. (2011). The power of NGS technologies to delineate the genome organization in cancer: from mutations to structural variations and epigenetic alterations. *Cancer Metastasis Rev.*

Segditsas, S., and Tomlinson, I. (2006). Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene* 25, 7531-7537.

Shariat, S.F., Scherr, D.S., Gupta, A., Bianco, F.J., Jr., Karakiewicz, P.I., Zeltser, I.S., Samadi, D.B., and Akhavan, A. (2011). Emerging biomarkers for prostate cancer diagnosis, staging, and prognosis. *Archivos espanoles de urologia* 64, 681-694.

Shendure, J., and Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology* 26, 1135-1145.

Shendure, J., Porreca, G.J., Reppas, N.B., Lin, X., McCutcheon, J.P., Rosenbaum, A.M., Wang, M.D., Zhang, K., Mitra, R.D., and Church, G.M. (2005). Accurate multiplex polony sequencing of an evolved bacterial genome. *Science* 309, 1728-1732.

Shibata, A., and Whittemore, A.S. (1997). Genetic predisposition to prostate cancer: possible explanations for ethnic differences in risk. *Prostate* 32, 65-72.

Sjoblom, T., Jones, S., Wood, L.D., Parsons, D.W., Lin, J., Barber, T.D., Mandelker, D., Leary, R.J., Ptak, J., Silliman, N., *et al.* (2006). The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314, 268-274.

Smith, S.S., Kaplan, B.E., Sowers, L.C., and Newman, E.M. (1992). Mechanism of human methyl-directed DNA methyltransferase and the fidelity of cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4744-4748.

- Song, J., Teplova, M., Ishibe-Murakami, S., and Patel, D.J. (2012). Structure-based mechanistic insights into DNMT1-mediated maintenance DNA methylation. *Science* 335, 709-712.
- Soos, G., Tsakiris, I., Szanto, J., Turzo, C., Haas, P.G., and Dezso, B. (2005). The prevalence of prostate carcinoma and its precursor in Hungary: an autopsy study. *Eur Urol* 48, 739-744.
- Stamey, T.A., Yang, N., Hay, A.R., McNeal, J.E., Freiha, F.S., and Redwine, E. (1987). Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 317, 909-916.
- Suh, C.I., Shanafelt, T., May, D.J., Shroyer, K.R., Bobak, J.B., Crawford, E.D., Miller, G.J., Markham, N., and Glode, L.M. (2000). Comparison of telomerase activity and GSTP1 promoter methylation in ejaculate as potential screening tests for prostate cancer. *Molecular and cellular probes* 14, 211-217.
- Tahiliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., *et al.* (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.
- Thomas, R.K., Nickerson, E., Simons, J.F., Janne, P.A., Tengs, T., Yuza, Y., Garraway, L.A., LaFramboise, T., Lee, J.C., Shah, K., *et al.* (2006). Sensitive mutation detection in heterogeneous cancer specimens by massively parallel picoliter reactor sequencing. *Nature medicine* 12, 852-855.
- Thompson, I.M., Pauler, D.K., Goodman, P.J., Tangen, C.M., Lucia, M.S., Parnes, H.L., Minasian, L.M., Ford, L.G., Lippman, S.M., Crawford, E.D., *et al.* (2004). Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med* 350, 2239-2246.
- Tomlins, S.A., Rhodes, D.R., Perner, S., Dhanasekaran, S.M., Mehra, R., Sun, X.W., Varambally, S., Cao, X., Tchinda, J., Kuefer, R., *et al.* (2005). Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644-648.
- Tosoian, J., and Loeb, S. (2010). PSA and beyond: the past, present, and future of investigative biomarkers for prostate cancer. *TheScientificWorldJournal* 10, 1919-1931.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J.G., Baylin, S.B., and Issa, J.P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8681-8686.
- Trapman, J., and Cleutjens, K.B. (1997). Androgen-regulated gene expression in prostate cancer. *Seminars in cancer biology* 8, 29-36.

- Varambally, S., Dhanasekaran, S.M., Zhou, M., Barrette, T.R., Kumar-Sinha, C., Sanda, M.G., Ghosh, D., Pienta, K.J., Sewalt, R.G., Otte, A.P., *et al.* (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* *419*, 624-629.
- Vilar, E., and Gruber, S.B. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence. *Nature reviews Clinical oncology* *7*, 153-162.
- Vire, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.M., *et al.*(2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* *439*, 871-874.
- Vissers, L.E., de Ligt, J., Gilissen, C., Janssen, I., Steehouwer, M., de Vries, P., van Lier, B., Arts, P., Wieskamp, N., del Rosario, M., *et al.*(2010). A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet* *42*, 1109-1112.
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, S.E., Preisinger, A.C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A.M., and Bos, J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *The New England journal of medicine* *319*, 525-532.
- Walsh, C.P., Chaillet, J.R., and Bestor, T.H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* *20*, 116-117.
- Wang, Z., Shen, D., Parsons, D.W., Bardelli, A., Sager, J., Szabo, S., Ptak, J., Silliman, N., Peters, B.A., van der Heijden, M.S., *et al.*(2004). Mutational analysis of the tyrosine phosphatome in colorectal cancers. *Science* *304*, 1164-1166.
- Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haase, M., Lam, W.L., and Schubeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet* *37*, 853-862.
- Weisenberger, D.J., Siegmund, K.D., Campan, M., Young, J., Long, T.I., Faasse, M.A., Kang, G.H., Widschwendter, M., Weener, D., Buchanan, D., *et al.*(2006). CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* *38*, 787-793.
- Wood, L.D., Parsons, D.W., Jones, S., Lin, J., Sjoblom, T., Leary, R.J., Shen, D., Boca, S.M., Barber, T., Ptak, J., *et al.* (2007). The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science* *318*, 1108-1113.
- Worthley, D.L., and Leggett, B.A. (2010). Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists* *31*, 31-38.
- Yang, X., Karuturi, R.K., Sun, F., Aau, M., Yu, K., Shao, R., Miller, L.D., Tan, P.B., and Yu, Q. (2009). CDKN1C (p57) is a direct target of EZH2 and suppressed by multiple epigenetic mechanisms in breast cancer cells. *PLoS One* *4*, e5011.

Yegnasubramanian, S., Haffner, M.C., Zhang, Y., Gurel, B., Cornish, T.C., Wu, Z., Irizarry, R.A., Morgan, J., Hicks, J., DeWeese, T.L., *et al.* (2008). DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity. *Cancer Res* 68, 8954-8967.

Yu, J., Cao, Q., Mehra, R., Laxman, B., Tomlins, S.A., Creighton, C.J., Dhanasekaran, S.M., Shen, R., Chen, G., Morris, D.S., *et al.* (2007a). Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer. *Cancer Cell* 12, 419-431.

Yu, J., Mani, R.S., Cao, Q., Brenner, C.J., Cao, X., Wang, X., Wu, L., Li, J., Hu, M., Gong, Y., *et al.* (2010). An integrated network of androgen receptor, polycomb, and TMPRSS2-ERG gene fusions in prostate cancer progression. *Cancer Cell* 17, 443-454.

Yu, J., Rhodes, D.R., Tomlins, S.A., Cao, X., Chen, G., Mehra, R., Wang, X., Ghosh, D., Shah, R.B., Varambally, S., *et al.* (2007b). A polycomb repression signature in metastatic prostate cancer predicts cancer outcome. *Cancer Res* 67, 10657-10663.

6. Danksagung

Das Große kommt nicht allein durch Impuls zustande, sondern ist eine Aneinanderkettung kleiner Dinge, die zu einem Ganzen vereint worden sind.

Vincent van Gogh

In diesem Sinne ist die vorgelegte Arbeit wie ein Puzzle: Aus vielen kleinen Einzelteilen entsteht langsam ein großes Ganzes. Das Zusammenfügen in den letzten Jahren hat mir sehr viel Freude bereitet. Dafür ein großes Dankeschön an Stefan Börno, Dr. Andreas Dahl, Axel Fischer, Michelle Hussong, Melanie Isau, Dr. Martin Kerick, Anna Kosiura, Nada Kumer, Florian Mertes, Christina Röhr, Uta Marchfelder und Andrea Wunderlich.

Herrn Prof. Dr. Stefan Mundlos danke ich besonders herzlich für sein Interesse an meiner Arbeit, sowie für seine ständige Unterstützung und Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Ausbildung.

Dr. Peter Krawitz, PD Dr. Sylvia Krobitch, PD Dr. Peter Robinson und Dr. Bernd Timmermann danke ich für die anregende und freundschaftliche Zusammenarbeit während der gesamten Zeit meiner wissenschaftlichen Tätigkeit in Berlin. Auf klinischer Seite möchte ich mich an dieser Stelle ausdrücklich bei PD Dr. Denise Horn, Dr. Luitgard Graul-Neumann, Dr. Pablo Villavicenciorini und Dr. Sandra Dölken bedanken, die immer wieder persönlichen Sinn in meine Arbeiten gebracht haben.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Fundamente, die ich in der Gruppe von Prof. Peter Howley an der Harvard Medical School in Boston legen konnte. Dort habe ich gelernt, Zusammenhänge zu erkennen und sie mit experimenteller Arbeit zu belegen. Prof. Volker Erdmann und Prof. Friedrich Körber haben mich auf meinem gesamten beruflichen Weg begleitet und sind mir wichtige Ratgeber.

Durch meinen Wechsel nach Berlin habe ich auch meinen wissenschaftlichen Horizont erweitern können und habe Einblick in die Systembiologie und Hochdurchsatz-Technologien bekommen. Dafür möchte ich Herrn Prof. Hans Lehrach ganz besonders danken.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei einer Vielzahl an Kollaborationspartnern, die mir immer wieder das Interesse an wissenschaftlicher Arbeit vermitteln und die ich sehr schätze. Zu ihnen zählen insbesondere Prof. Dr. Francesca Demichelis, Prof. Dr. Helmut Klocker, Prof. Dr. Mark Rubin und Prof. Dr. Holger Sültmann.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Habilitationskommission (Frau Prof. Lehmkuhl, Frau Prof. Martiny, Herr Prof. Mundlos, Herr Prof. Sperling, Herr Prof. Schmitt, Herr Prof. Schäfer, Herr Prof. Hummel, Frau Prof. Rickert-Sperling und Herrn Herzig) für sehr interessante Diskussionen. Danken möchte ich auch vielen weiteren hier nicht namentlich genannten Kolleginnen und Kollegen des Max Planck Instituts für Molekulare Genetik, ohne deren tatkräftige Hilfe viele Experimente bzw. klinische Studien nicht vorangekommen wären.

Meiner Familie – insbesondere meinen Eltern – gebührt mein tiefster Dank. Ohne sie wäre ich wohl nicht zu dem geworden, was ich bin.

Schließlich danke ich von Herzen meinem Ehemann Dr.Christian Barmeyer und meiner kleinen Tochter Rahel Sophie für ihre Unterstützung und dass sie mir immer wieder unermüdlich zeigen, wie groß der Spass des Lebens ist.

7. Erklärung

Nach § 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité erkläre ich hiermit, dass

- ich weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet habe,
- ich die vorliegende Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben habe und
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, März 2012

(Dr. med.Dr. rer. nat.Michal-Ruth Schweiger)