

# **Entwicklung von Realtime-PCR-Methoden zur Analyse von DNA-Methylierung**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften

eingereicht an der  
Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von  
**Dipl.-Ing. Reimo Tetzner**

Saarbrücken 2006



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Stand der Forschung</b> .....	1
<b>1.1 DNA-Methylierung</b> .....	1
1.1.1 Die Rolle der DNA-Methylierung in der Epigenetik.....	1
1.1.2 Genomisches Imprinting und DNA-Methylierung.....	3
1.1.3 DNA-Methylierung in Krebsgewebe.....	4
1.1.4 Diagnostische Anwendung der DNA-Methylierungsanalyse.....	5
1.1.4.1 Eignung der DNA-Methylierung als Biomarker.....	5
1.1.4.2 Molekulare Klassifizierung von Tumorproben.....	6
1.1.4.3 Krebsfrüherkennung.....	6
1.1.4.4 DNA-Methylierung des GSTp1-Gens in Prostatatumoren.....	7
<b>1.2 Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung</b> .....	8
1.2.1 Bestimmung des Anteils von Methylcytosin im Genom.....	8
1.2.2 Methylierungsspezifische Restriktionsenzyme.....	8
1.2.3 Identifizierung von Methylierungsmarkern.....	9
1.2.4 Wandlung der Methylierungsinformation in einen Sequenzunterschied mit Hilfe der Bisulfit-Reaktion.....	10
1.2.4 PCR-basierte Analysen der DNA-Methylierung.....	11
<b>1.3 Realtime-PCR-Verfahren zur Methylierungsanalyse</b> .....	12
1.3.1 Grundlagen der DNA-Quantifizierung mittels Realtime-PCR.....	12
1.3.2 Detektionssysteme in der Realtime-PCR.....	14
1.3.3 Methylierungsspezifische Amplifikation im Realtime-PCR-Verfahren.....	15
1.3.4 Realtime-PCR zur quantitativen Methylierungsanalyse .....	17
<b>1.4 Die Begriffe Spezifität und Sensitivität</b> .....	17
1.4.1 Analytische Spezifität.....	18
1.4.2 Analytisches Detektionslimit.....	18
1.4.3 Relatives Detektionslimit.....	18
1.4.1 Klinische Spezifität und Sensitivität.....	19
<b>2 Aufgabenstellung</b> .....	20
<b>3 Methoden</b> .....	21
<b>3.1 Präparation von Vorläuferkeimzellen</b> .....	21
<b>3.2 DNA-Extraktion und Aufreinigung</b> .....	21
<b>3.3 Isothermale genomweite Amplifikation von DNA</b> .....	21
<b>3.4 Herstellung universell methylierter DNA</b> .....	21
<b>3.5 Herstellung von Bisulfit-DNA</b> .....	22
<b>3.6 Herstellung von SafeBis-DNA</b> .....	22
<b>3.7 Gelelektrophorese</b> .....	22
<b>3.8 Berechnung von Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden</b> .....	23
<b>3.9 Konzentrationsbestimmung von DNA</b> .....	23

<b>3.10 Herstellung der Standard-DNA zur Quantifizierung</b> .....	23
<b>3.11 DNA-Mischungen aus methylierter und nicht methylierter DNA</b> .....	23
<b>3.12 Berechnung des Anteils methylierter DNA</b> .....	24
<b>3.13 Statistische Methoden</b> .....	24
3.13.1 Darstellung klinischer Daten im Box-Whisker-Plot.....	24
3.13.2 Bewertung der diskriminierenden Eigenschaften eines Assays mit dem Fisher-Score.....	24
3.13.3 Ermittlung des analytischen und relativen Detektionslimits mit der Probit-Regression.....	25
<b>3.14 Realtime-PCR-Protokolle und DNA-Sequenzen</b> .....	25
3.14.1 GSTp1-HeavyMethyl-Assay I.....	26
3.14.2 GSTp1-HeavyMethyl-Assay II .....	26
3.14.3 GSTp1-HeavyMethyl-Assay III .....	26
3.14.4 Duplex-Reaktion aus GSTp1-HM-Assay und Referenz-Assay.....	27
3.14.5 Duplex-Reaktion aus GSTp1-HM-Assay und PTGER4-HM-Assay.....	27
3.14.6 GSTp1-Referenz-Assay.....	28
3.14.7 Allelspezifischer QM-Assay für IGF2/DMR2, Mus Musculus.....	28
3.14.8 Allelspezifischer QM-Assay für H19, Mus Musculus.....	29
3.14.9 TMEFF2-QM-Assay .....	29
3.14.10 TMEFF2-HQM-Assay.....	30
3.14.11 TMEFF2-HM-Assay.....	30
3.14.12 Duplex-Voramplifikation von H19 und IGF2/DMR2, Mus Musculus.....	31
<b>3.15 PCR-Kontaminationsvermeidung durch UNG</b> .....	31
<b>4 Ergebnisse</b> .....	32
<b>4.1 Übertragung der HeavyMethyl-Technologie in das Realtime-PCR-Format</b> .....	32
4.1.1 Optimierung der Komponenten des GSTp1-HeavyMethyl-Assays.....	32
4.1.1.1 Einfluß des Temperatur-Zeit-Profiles.....	32
4.1.1.2 Entwurf der Primer.....	32
4.1.1.3 Entwurf des Blockers.....	33
4.1.1.4 Einführung der Blocker-Kennzahl.....	35
4.1.1.4 Verbesserung der Linearität der PCR.....	36
4.1.1.5 Entwurf der Hybridisierungssonden.....	37
4.1.1.6 Validierung des GSTp1-HM-Assays II.....	37
4.1.2 Simulation von heterogenen Methylierungsmustern .....	40
4.1.3 Maskierung von CpG-Positionen im Blockerbereich.....	42
4.1.4 Untersuchung der Spezifität der Hybridisierungssonden.....	43
4.1.5 Kriterien für die Entwicklung von HM-Assays .....	44
4.1.6 Entwicklung einer Referenz-PCR .....	46
4.1.9 Methylierungsanalyse des GSTp1-Gens in Prostatagewebe.....	46
<b>4.2 Entwicklung von Duplexreaktionen zur Methylierungsanalyse</b> .....	47
4.2.1 Entwicklung einer Duplexreaktion aus HM-Assay und Referenz-Assay.....	47
4.2.2 Entwicklung einer Duplexreaktion aus zwei HM-Assays.....	48

4.2.3 Analyse von Patientenproben mit der Duplexreaktion aus zwei HM-Assays.....	50
4.2.3.1 Analyse von Prostata-Gewebeproben.....	50
4.2.3.2 Analyse von Serum-DNA.....	51
<b>4.3 Entwicklung einer allelspezifischen quantitativen Methylierungsanalyse .....</b>	<b>52</b>
4.3.1 Funktionsprinzip eines allelspezifischen QuantitativeMethylation-Assays.....	52
4.3.2 Identifikation von SNPs in der SD7-Maus.....	53
4.3.3 Kalibrierung der allelspezifischen QM-Assays für IGF2/DMR2.....	54
4.3.4 Methylierung in IGF2/DMR2 in unterschiedlichem Gewebe.....	58
4.3.5 Erhöhung der Sensitivität der QM-Assays durch Duplex-Voramplifikation.....	59
4.3.5 Anwendung der allelspezifischen QM-Assays zur Analyse primordialer Keimzellen..	60
<b>4.4 Der HQM-Assay - eine neue PCR-Technologie zur Methylierungsanalyse.....</b>	<b>61</b>
4.4.1 Funktionsprinzip des HeavyQuantitativeMethylation-Assays.....	61
4.4.2 Entwicklung eines HQM-Assays für das TMEFF2-Gen.....	63
4.4.3 Eigenschaften des TMEFF2-HQM-Assays.....	65
<b>4.5 Entwicklung von Verfahren zur Kontaminationsvermeidung.....</b>	<b>66</b>
4.5.1 Notwendigkeit der Kontaminationsvermeidung.....	66
4.5.2 PCR-Kontaminationsvermeidung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen.....	67
4.5.2.1 Verfahren mit Restriktionsendonukleasen für vorhandene Schnittstellen.....	67
4.5.2.2 Verfahren mit Restriktionsendonukleasen für erzeugte Schnittstellen.....	67
4.5.3 PCR-Kontaminationsvermeidung mit UNG .....	68
4.5.4 Methylierungsanalyse von Darmkrebsproben mit dem TMEFF2-HM-Assay unter Anwendung von UNG.....	72
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>73</b>
<b>5.1 HM-Assay-Technologie.....</b>	<b>73</b>
5.1.1 Hochsensitiver Nachweis methylierter DNA mit Realtime-HM-Assays.....	73
5.1.2 Die Blockerkennzahl - Kennzeichen der Leistungsfähigkeit des Blockers.....	74
5.1.3 Sonden zur Sicherung der methylierungsspezifischen Detektion von DNA.....	74
5.1.4 Optimierung eines HM-Assays für heterogene DNA-Methylierung.....	74
5.1.5 Der GSTp1-Referenz-Assay zur Bestimmung der Gesamt-DNA.....	75
5.1.6 Duplex-Reaktionen aus zwei HM-Assays.....	76
5.1.7 Validierung der HM-Technologie mit klinischen Proben.....	77
<b>5.2 QM-Assay-Technologie.....</b>	<b>79</b>
5.2.1 Weiterentwicklung und Validierung der QM-Technologie .....	79
5.2.2 Validierung der allelspezifischen QM-Assays mit embryonalen Zellen der Maus.....	80
<b>5.3 HQM-Assay-Technologie.....</b>	<b>83</b>
5.2.3 Erhöhung der Sensitivität einer quantitativen Analyse.....	83
5.2.4 Das Zwei-Strang-Prinzip.....	84
<b>5.3 Vor- und Nachteile der entwickelten Verfahren .....</b>	<b>85</b>
<b>5.4 Verfahren zur Kontaminationsvermeidung.....</b>	<b>88</b>
5.4.1 Kontaminationsvermeidung durch Verwendung von Endonukleasen.....	88
5.4.2 Kontaminationsvermeidung durch Verwendung des UNG-Systems.....	89
<b>5.5 Ausblick zur Methylierungsanalyse mit Realtime-PCR.....</b>	<b>90</b>

<b>6 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>102</b>
<b>7.1 Geräte.....</b>	<b>102</b>
<b>7.2 Chemikalien.....</b>	<b>102</b>
<b>7.3 Puffer und Lösungen.....</b>	<b>103</b>
<b>7.4 Enzyme und molekularbiologische Reagenzien.....</b>	<b>103</b>
<b>7.5 Gene mit genetischem Imprinting.....</b>	<b>104</b>
<b>7.6 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
<b>7.7 Lebenslauf.....</b>	<b>109</b>
<b>7.8 Veröffentlichungen.....</b>	<b>110</b>

## Zusammenfassung

DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei einer Reihe biologischer Prozesse wie Imprinting, X-chromosomaler Inaktivierung und Genexpression. DNA-Hypermethylierung ist häufig assoziiert mit einer verminderten Transkription, während Hypomethylierung oft mit einer Aktivierung der Transkription einhergehen kann. Veränderte DNA-Methylierungsmuster sind sowohl bei der Tumorgenese als auch bei einigen genetischen Krankheiten beschrieben. Die Analyse der DNA-Methylierung eignet sich daher zur Klassifizierung von Krebs und anderen Krankheiten. Die schnelle und einfache Detektion von Tumor-DNA in Körperflüssigkeiten anhand ihrer veränderten DNA-Methylierung ist ein innovatives und vielversprechendes Verfahren zur Früherkennung von Krebs. Für diagnostische Zwecke ist die Realtime-PCR besonders geeignet, da sie sich durch Genauigkeit, Schnelligkeit und Automatisierbarkeit auszeichnet. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand daher die Entwicklung von drei Messverfahren zur Methylierungsanalyse im Realtime-PCR-Format sowie die Etablierung einer Methode zur PCR-Kontaminationsvermeidung.

*HeavyMethyl-Assay (HM-Assay):* Die Anreicherung methylierter DNA kann mit Hilfe von Oligonukleotiden erreicht werden, die die Amplifikation nicht methylierter DNA blockieren (HeavyMethyl-Assay, HM-Assay). Ziel dieser Arbeit war es, eine robuste hochsensitive Methode zur Detektion von DNA-Methylierung basierend auf der HM-Technologie zu entwickeln. Dazu wurde zunächst der HM-Assay erfolgreich in das Realtime-PCR-Format übertragen und dann ein generelles Konzept zur Etablierung von HM-Assays erarbeitet. Die Leistungsfähigkeit des Detektionsverfahrens wurde am Beispiel der Entwicklung und Validierung des GSTp1-HM-Assays demonstriert. Das Detektionslimit dieser PCR lag bei 15 pg methylierter DNA. Das entspricht etwa 4 - 5 methylierten Genkopien. Dieser Nachweis gelang auch in einem hohen Hintergrund nicht methylierter DNA, dabei lag das relative Detektionslimit bei mindestens 1:4000. Mit dem GSTp1-HM-Assay wurden anschließend Gewebeproben aus Prostata-tumoren analysiert. Die klinische Sensitivität betrug hier 79% bei einer Spezifität von 95%. Die Kombination des GSTp1-HM-Assays mit einer GSTp1-Referenz-PCR in einer Duplex-Reaktion erlaubte die gleichzeitige Analyse von methylierter und Gesamt-DNA und erhöhte die Effizienz der Methode. Für eine Früherkennung von Krebs ist eine Detektion von Tumor-DNA in Körperflüssigkeiten notwendig. Analysen von Blutplasma und Serum sind jedoch nur begrenzt möglich, da dort sehr geringe Mengen Tumor-DNA vorkommen. Mit der entwickelten Duplex-Reaktion aus GSTp1- und PTGER4-HM-Assay ist es nun möglich, auch mehr als einen Methylierungsmarker in diesem limitierten Analyten zu untersuchen. Die Realtime-HM-Technologie ist inzwischen als Standardmethode zur Detektion von Tumor-DNA in Körperflüssigkeiten etabliert und wird bereits in mehr als 20 weiteren Realtime-PCRs zur Detektion von methylierter DNA erfolgreich angewendet.

*QuantitativeMethylation-Assay (QM-Assay):* Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Weiterentwicklung des QM-Assays, einem Realtime-PCR-Verfahren, das die genaue Bestimmung des Anteils methylierter DNA in Gewebeproben ermöglicht. Durch die neuartige Kombination von SNP-spezifischen und methylierungsspezifischen Sonden konnte erstmals eine allelspezifische, quantitative Analyse von DNA-Methylierung mit einem Realtime-Verfahren realisiert werden. Durch die Entwicklung eines Auswertungsverfahrens mittels Fluoreszenzintensitäten konnte die Kalibrierung des QM-Assays vereinfacht werden. Eine weitere Verbesserung wurde dadurch erreicht, dass eine Voramplifikation des Templates auch geringste DNA-Mengen einer Methylierungsanalyse zugänglich machten. Mit allelspezifischen QM-Assays wurden primordiale Keimzellen aus Mausembryonen untersucht. Für die H19-Region wurde zwischen den Tagen 9,5 und 10,5 nach der Befruchtung eine signifikante Abnahme der

parentalen Methylierung gemessen. In der IGF2/DMR2-Region wurde am Tag 9,5 keine Methylierung detektiert, während am Tag 10,5 sowohl maternales als auch paternales Allel geringe Methylierung aufwiesen.

*HeavyQuantitativeMethylation-Assay (HQM-Assay):* Aus der Kombination von HM-Assay und QM-Assay wurde ein neuartiges Verfahren der Methylierungsanalyse, der HQM-Assay, entwickelt. Dieses Realtime-PCR-Verfahren vereint die Vorteile beider Technologien, die hohe relative Sensitivität des HM-Assays mit den guten quantitativen Eigenschaften des QM-Assays. Es handelt sich dabei um eine Duplexreaktion aus zwei HM-Assays, deren Signale nach dem Prinzip eines QM-Assays ausgewertet werden. Dabei werden methylierte und nicht methylierte DNA des gleichen Locus parallel amplifiziert und analysiert. Mit dem TMEFF2-HQM-Assay konnten DNA-Mischungen mit einem Anteil von 0,1 % und 0,5 % methylierter DNA exakt quantifiziert und damit im Vergleich zu einem QM-Assay eine 10 mal niedrigere Grenze für die quantitative Detektion methylierter DNA erreicht werden.

*Verfahren zur Vermeidung von PCR-Kontaminationen:* Für die Methylierungsanalyse, basierend auf Bisulfit-DNA, standen bisher keine Verfahren zur Vermeidung von PCR Kontaminationen zur Verfügung. In der Arbeit wurde ein Protokoll für die Bisulfit-Konversion entwickelt, das auf der Herstellung sulfonierter DNA (SafeBis-DNA) basiert. Dieses Protokoll ermöglicht die Anwendung von Uracil-DNA-Glycosylase zum Abbau kontaminierender PCR-Produkte. Die Analyse von Tumorproben ergab die gleichen Ergebnisse unter Verwendung von SafeBis-DNA mit UNG im Vergleich zur Analyse von Standard-Bisulfit-DNA ohne UNG. In dieser Arbeit wurde also erstmalig eine Methylierungsanalyse mit einer effizienten Kontaminationskontrolle durchgeführt. Damit wurde eine weitere Voraussetzung geschaffen, Methylierungsanalysen als diagnostische Tests in der klinischen Routine einzusetzen.

## Summary

DNA-Methylation plays a role in a number of biological processes, such as imprinting, X chromosomal inactivation and gene expression. DNA hypermethylation is closely associated with transcriptional silencing, while DNA hypomethylation is associated with transcriptional activation. The tumor genesis is associated with changes in DNA methylation patterns of the genome, and also characteristic of some genetic diseases. DNA methylation is therefore a suitable tool for the diagnosis and classification of cancer and other diseases. Fast and simple detection and quantification of methylated tumor DNA in body fluids and tissue is an innovative and promising method for the early recognition of cancer. The focus of this work was the development of novel detection procedures for DNA methylation based on the real-time PCR format.

*HeavyMethyl Assay (HM-Assay):* The enrichment of methylated DNA can be realized by blocked oligonucleotides in a PCR, the so-called HeavyMethyl Assay (HM-Assay). A goal of this work was to develop a robust, high sensitive method for the detection of DNA methylation based on the HM-technology. The HM-Assay was transferred into a real-time PCR format and a concept for the establishment of HM-Assays was compiled. The efficiency of the detection procedure was demonstrated by the development and validation of the GSTp1-HM-Assays. The 90 %-detection limit of this PCR was 15 pg, the relative detection limit was determined with at least 1:4000. That corresponds to 4 - 5 molecules of methylated DNA. Afterwards, samples from prostate tumors were analyzed with the GSTp1-HM-Assay. The clinical sensitivity amounted to 79 %, with a specificity of 95 %. The combination of the GSTp1-HM-Assays with a GSTp1-Referenz-PCR in a duplex reaction allows the parallel analysis of methylated and total DNA. Only very small DNA quantities can be isolated from blood plasma or serum, and thus

only a limited number of methylation markers can be analyzed. The multiplexing of GSTp1 and PTGER4-HM-Assay demonstrates one solution to this problem. The duplex real-time PCR was successfully validated on the basis of serum samples. Since then, real time HeavyMethyl technology has been established as the standard method for the detection of tumor DNA in body fluids. It is used in more than 20 additional real time PCR's for the detection of methylated DNA.

*QuantitativeMethylation Assay (QM-Assay):* A second goal of the work was the advancement of the QuantitativeMethylation Assay, a real-time PCR procedure, which allows for the exact determination of the proportional portion of methylated DNA from tissue samples. This is the first time an allele-specific quantitative analysis could be established by the combination of SNP specific and methylation specific probes in a real-time PCR. Calculating the real-time PCR results by fluorescence intensities, simplified the calibration of QM-Assays. The quantitative measurement was also expanded by a preamplification allowing for the analysis of small sample quantities. Allele-specific QM-Assays were then used to investigate the allelic methylation of primordial germ cells from mouse embryos. For the H19-region, a significant decrease in the parentale methylation was measured between days 9.5 and 10.5 after fertilization. No methylation was found on IGF2/DMR2 on day 9.5, while low levels were detected on day 10.5 for the maternale and paternale alleles.

*HeavyQuantitativeMethylation Assay (HQM Assay):* In the third part of the work the technological combination of HM-Assay and QM-Assay, which is called HQM Assay, was developed. This new real-time PCR procedure combines the advantages of both technologies: the high, relative sensitivity of the HM-Assays, with the good quantitative characteristics of the QM-Assays. The principle is based on a duplex reaction of two HM-Assays, whose signals are evaluated similarly to QM-Assays. In doing so, methylated and non-methylated DNA from the same region can be amplified and analyzed in parallel. DNA mixtures consisting of 0.1% and 0.5% methylated DNA could be precisely quantified with the TMEFF2-HQM Assay, allowing for the detection of methylated DNA with a limit 10 times lower than that of a QM-Assay.

*Procedure for PCR contamination prevention:* Avoiding reaction contamination from former PCR products is essential for diagnostic tests. For the methylation analysis, no such procedures are currently available. For this study, a modified protocol for bisulfite conversion was developed, which is based on the generation of sulfonated DNA (SafeBis DNA). It allows for the application of uracil DNA glycosylase to inactivate contaminating PCR products. The method was used successfully in a methylation analysis of tumor samples. The use of SafeBis DNA had no negative influence on the sensitivity and quality of the analysis. This is the first time an efficient carry over prevention system was applied to a bisulfite DNA based methylation analysis.



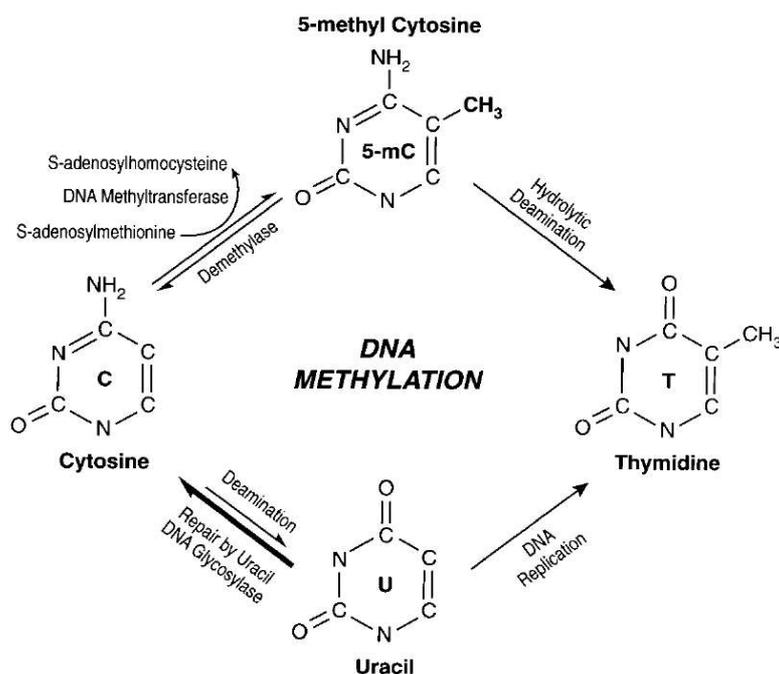
## 1 Stand der Forschung

### 1.1 DNA-Methylierung

#### 1.1.1 Die Rolle der DNA-Methylierung in der Epigenetik

Im Unterschied zur klassischen Genetik, die alle Fragen der Vererbung und Veränderung des DNA-Codes als Informationsträger behandelt, werden in der Epigenetik die Mechanismen zur Ausprägung von Merkmalen untersucht, die nicht durch einen veränderten DNA-Code bewirkt werden (Jablonka und Lamb 2002). Die wichtigsten Mechanismen zur Regulation epigenetischer Modifikationen sind die Alkylierung von Histonen und die Methylierung des Cytosins der DNA (Jenuwein und Allis 2001).

Die DNA-Methylierung ist eine chemische Modifikation des Cytosins, gekennzeichnet durch eine Methylgruppe an der 5-Position der Base. So entsteht die seltene natürliche Base 5-Methylcytosin, die sowohl in Prokaryonten als auch Eukaryonten gefunden wird. Die Übertragung der Methylgruppe wird von DNA-Methyltransferasen katalysiert (Abb.1, Jeltsch 2002). Methylcytosin kommt im eukaryotischen Genom vorrangig in 5'-CG-3'-Dinukleotiden, sogenannten CpGs, vor. Im Genom von Säugern sind CpGs unterrepräsentiert und ungleichmäßig verteilt. Es werden nur 5-10 % der statistisch zu erwartenden Häufigkeit des CG-Dinukleotids gefunden, wenn eine Gleichverteilung aller vier Basen angenommen wird. Das in den CpGs enthaltene Cytosin liegt zu etwa 70% methyliert vor (Antequera und Bird 1993). Insgesamt liegen etwa 2 – 4 % aller Cytosine als Methylcytosin vor. In Pflanzen hingegen kann der Anteil an methyliertem Cytosin bis zu 40% betragen. Der größte Teil Methylcytosin wird in sogenannten CpG-Inseln gefunden, Regionen in denen eine hohe CpG-Dichte vorliegt. Etwa die Hälfte aller in Maus und Mensch gefundenen Gene enthält CpG-Inseln in ihrer Promotorregion (Antequera und Bird 1993).



**Abbildung 1:** Biochemische Umwandlung des Cytosins in Methylcytosin, Uracil und Thymin (Singal und Ginder 1999).

DNA-Methylierung ist typisch für DNA-Regionen mit Heterochromatinstruktur. Sie beeinflusst die Anlagerung verschiedener Proteine, die an der Verpackung der DNA in die Heterochromatinstruktur beteiligt sind. Die Dichte dieser DNA-Konformation verhindert dabei die Transkription der betroffenen Regionen. So können zum Beispiel methylierungsspezifische DNA-Bindungsproteine die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren verhindern (Boyes und Bird 1992, Jones und Laird 1999). Die Hypermethylierung unterdrückt in der Regel die Transkription „downstream“ gelegener Gene durch die Anbindung Methyl-CpG-bindender Proteine, wie MeCP2 (Kudo 1998) oder MBD (Lopez-Serra et al. 2006). Auch die Histondeacetylase ist mit einem methylierungsspezifischen DNA-Bindungskomplex assoziiert und reprimiert die Transkription (Nan et al. 1998). Dies verdeutlicht den Einfluss der DNA-Methylierung auf die Expression von Genen. Letztendlich erhöht die Methylierung des Cytosins also den Informationsgehalt der DNA, denn sie gibt Hinweise auf die Genaktivität. 5-Methylcytosin wird deshalb häufig auch als fünfte Base der DNA bezeichnet.

In somatischen Zellen wird die Weitergabe des Methylierungsmusters an die Tochterzellen durch die DNMT1-Methyltransferase, die sogenannte Erhaltungsmethylase, gewährleistet (Pradhan et al. 1999). Hingegen sind für die „De novo“-Methylierung die Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B verantwortlich (Okano et al. 1999). Eine passive Demethylierung ergibt sich bei der Replikation der DNA, wenn die Methylierungsmuster in den Tochtersträngen nicht wieder hergestellt werden. Für den aktiven Prozess der Demethylierung kommen zwei Mechanismen in Frage: Demethylasen und DNA-Glykosylasen (Wolffe et al. 1999). Einerseits wurden Demethylasen beschrieben, wobei hemi- und vollmethylierte DNA das Substrat sein kann (Bhattacharya et al. 1999). Andererseits ist eine meC-DNA-Glycosylase bekannt, die Methylcytosin entfernt, wenn auf beiden DNA-Strängen die CpG-Position methyliert vorliegt. In einem zweiten Schritt ersetzen Reparaturenzyme die Position durch Cytosin (Vairapandi et al. 2000). Neuere Veröffentlichungen bekräftigen die Annahme einer aktiven Demethylierung durch DNA-Glykosylasen (Kapoor et al. 2005, Agius et al. 2006).

Beispiele für epigenetische Effekte sind die Regulation der Expression, die X-chromosomale Inaktivierung, Imprinting und die gewebespezifische Differenzierung. Beschrieben ist auch der Zusammenhang zwischen Methylierung und Zelldifferenzierung sowie die damit verbundene Neuprogrammierung der epigenetischen Informationen in den Keimbahnzellen während der Embryogenese (Reik et al. 2001). Es wird angenommen, dass durch Methylierung repetitiver DNA-Elemente auch die Beweglichkeit von Transposons sowie homologe Rekombinationsereignisse unterdrückt werden können (Florl et al. 1999). Damit trägt die DNA-Methylierung auch zur Stabilisierung von Chromosomen bei, indem sie Chromosomenaberrationen verhindert (Gaudet et al. 2003). Hypomethylierung von repetitiven Elementen, wie Satelliten-DNA, wird mit chromosomaler Instabilität in Verbindung gebracht und wurde in Tumorgewebe gefunden (Tsuda et al. 2002, Nakagawa et al. 2005).

Eine erste Theorie, dass DNA-Methylierung direkt bei der Karzinogenese mitwirkt, stammt bereits aus dem Jahre 1979 (Holliday 1979). Vier Jahre später wurde berichtet, dass in Krebszellen weniger 5-Methylcytosin vorliegt als in gesundem Gewebe (Gama-Sosa et al. 1983). Weitere Beweise wurden erbracht, dass Veränderungen in der DNA-Methylierung im Zusammenhang mit der Entwicklung von Krebszellen stehen (Feinberg und Vogelstein 1983, Bedford und van Helden 1987). Hypomethylierung, also die Erniedrigung des Anteils methylierter DNA, findet sich vor allem in repetitiven oder parasitären DNA-Elementen, die in gesunden Zellen normalerweise hypermethyliert vorliegen (Weisenberger et al.

2005). Hier spiegelt sich auch die allgemeine Situation großer genetischer Instabilität in Krebszellen wider, die u.a. aus der Aktivierung von transponierbaren Elementen resultiert (Suter et al. 2004). Die chromosomale Instabilität in Tumorzellen korreliert mit einer genomweiten Abnahme der Methylierung (Rodriguez et al. 2006). Gleichzeitig wird in Tumorzellen auch eine lokale Zunahme der Methylierung gefunden. Diese sogenannte Hypermethylierung ist für den Promotorbereich zahlreicher Gene beschrieben (siehe Kap. 1.1.3). Die Bedeutung der DNA-Methylierung für die Entstehung von Krankheiten ist heute unumstritten und eröffnet neben neuen Diagnose- auch neue Therapiemöglichkeiten (Verma und Srivastava 2002, Momparler 2003). Nach der vollständigen Sequenzierung des humanen Genoms tritt deshalb nun die Erforschung der Regulation der Gene, die epigenetische Charakterisierung des menschlichen Genoms und die Erfassung epigenetischer Signale verschiedenster Krankheiten in den Vordergrund (Huang et al. 1999, Lewin et al. 2004, Schumacher et al. 2006).

### 1.1.2 Genomisches Imprinting und DNA-Methylierung

Als genomisches Imprinting, oder auch allelische Prägung, wird die reversible Veränderung von DNA durch Inaktivierung eines der beiden elterlichen Allele bezeichnet, die zur unterschiedlichen Ausprägung von mütterlich (maternal) oder väterlich (paternal) vererbten Genen führt. Das heißt, es ist möglich, dass sich ein maternal vererbtes Gen funktionell vom paternal vererbten Gen unterscheidet, obwohl es mit diesem in seiner DNA-Sequenz identisch ist. Diese allelspezifische Inaktivierung korreliert mit einer erhöhten DNA-Methylierung und der Ausprägung einer Heterochromatinstruktur dieses DNA-Bereichs. Die hohe Verpackungsdichte solcher Regionen führt dazu, dass ihre Erbinformationen

**Tabelle 1:** Tumorarten, in denen ein abweichender Imprintingstatus gefunden wurde.\*)

Tumor type	Gene
<i>Childhood Tumors</i>	
Wilms' tumor	<i>IGF2,H19,p57<sup>KIP2</sup>,M6P/IGF2R</i>
Rhabdomyosarcoma	<i>IGF2</i>
Ewing's sarcoma	<i>IGF2</i>
Hepatoblastoma	<i>IGF2</i>
<i>Adult Tumors</i>	
Bladder	<i>IGF2,H19,IPW</i>
Breast	<i>IGF2</i>
Cervical	<i>IGF2,H19</i>
Choriocarcinoma	<i>IGF2,H19</i>
Colorectal	<i>IGF2</i>
Esophageal	<i>H19</i>
Gastric adenocarcinoma	<i>IGF2</i>
Glioma	<i>IGF2</i>
Hepatocellular	<i>IGF2,H19</i>
Leukemia-acute myeloid	<i>IGF2</i>
Leukemia-chronic myelogenous	<i>IGF2</i>
Lung	<i>IGF2,H19,p73</i>
Medulloblastoma	<i>IGF2,H19</i>
Mesothelioma	<i>IGF2</i>
Ovarian	<i>IGF2</i>
Prostate	<i>IGF2</i>
Renal cell carcinoma	<i>IGF2,p73</i>
Testicular germ cell	<i>IGF2,H19</i>
Uterine	<i>IGF2</i>

\*) aus Falls 1999

nicht abgelesen und nicht exprimiert werden können. Normalerweise ist immer nur eines der beiden Allele betroffen und Imprinting damit geschlechtsspezifisch. Das heißt, nur eines der beiden elterlichen Allele wird im Phänotyp ausgeprägt. Ein mutiertes Allel, das z.B. maternalem Imprinting unterliegt, scheint rezessiv vererbt zu werden, wenn es von der Mutter weitergegeben wird, und dominant, wenn es vom väterlichen Elternteil stammt. Genomisches Imprinting ergänzt also die Mendelsche Vererbungslehre und erklärt Phänomene, die anhand der klassischen chromosomalen Verteilung der Gene nicht erklärt werden können. Die Modifikation der DNA erfolgt während der Keimzellentwicklung (Spermatogenese und Oogenese). Die DNA-Methylierung wird beim Durchgang durch die Keimbahn (Meiose) zuerst gelöscht, später jedoch geschlechtsspezifisch entweder nur maternal oder nur paternally wieder reprogrammiert (Reik 2001).

Es sind eine Reihe von Genen bekannt, die genomischem Imprinting unterliegen, und einige Krankheiten beim Menschen, die mit diesen Genen in Zusammenhang gebracht werden (Nicholls 2000, Walter und Paulsen 2003). Dazu gehören Störungen in der Wachstumsentwicklung wie das Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) sowie neuronale Erkrankungen wie das Angelman-Syndrom (AS) und das Prader-Willi-Syndrom (PWS). Auch die Entstehung des Wilms-Tumors, eines kindlichen Nierentumors, geht mit dem Verlust des Imprintingmusters im IGF2-Gen einher (LOI, engl.: loss of imprinting). Die Fehlregulierung des genomischen Imprinting wird auch für viele andere Krebsarten beschrieben (Tab. 1, Falls et al. 1999). Ein von Morison und Mitarbeitern angelegter Katalog von Genen, die genetischem Imprinting unterliegen, wird ständig erweitert (Morison und Reeve 1998). Eine zum Zeitpunkt der Arbeit aktuelle Liste ist im Anhang zu finden (Tab. 17).

### **1.1.3 DNA-Methylierung in Krebsgewebe**

Zusätzlich zur globalen Hypomethylierung weisen Krebszellen regionale Hypermethylierungen gerade im Bereich von Promotoren auf. Von der Hypermethylierung im Promotorbereich sind vor allem Gene betroffen, die in die DNA-Reparatur, Detoxifizierung, Zellzyklusregulation und die Apoptose involviert sind (Tab. 2, Herman 1999, Esteller 2000, Costello und Plass 2001). Die Untersuchung der Hypermethylierung im Promotorbereich von 12 Genen ergab, dass für jeden Tumortyp andere Profile der Hypermethylierung existieren (Esteller et al. 2001). Eine Datenbank von Genen, die veränderte Methylierung im Promotor aufweisen, wird am M.D. Anderson Cancer Center aufgebaut und veröffentlicht (<http://www.mdanderson.org/departments/methylation/>). In zahlreichen Veröffentlichungen sind die gefundenen epigenetischen Veränderungen zusammengefasst (Jones und Baylin 2002, Plass 2002, Herman und Baylin 2003, Baylin 2005).

Die in Tumorzellen durch hypermethylierte Promotoren inaktivierten Gene können als Tumorsuppressorgene klassifiziert werden (Esteller 2002). Knudsons Two-Hit-Hypothese geht davon aus, dass für die Entstehung eines Tumors beide Allele eines Tumorsuppressorgens inaktiviert werden müssen (Knudson 2000). Durch die Kombination von Mutationen, dem Verlust eines Allels (LOH) oder durch DNA-Methylierung werden beide Allele eines Gens inaktiviert (Grady et al. 2000).

Im Gegensatz dazu werden Onkogene normalerweise nicht exprimiert, können aber durch Demethylierung aktiviert werden (Feinberg und Vogelstein 1983). Die epigenetischen Änderungen der TumordNA sind aus klinischer Sicht bedeutend, da sie im Gegensatz zu den genetischen Änderungen (Muta-

tionen, Deletionen) potentiell reversibel sind und damit ein Ziel für Therapeutika darstellen (Karpf und Jones 2002).

### 1.1.4 Diagnostische Anwendung der DNA-Methylierungsanalyse

#### 1.1.4.1 Eignung der DNA-Methylierung als Biomarker

Genspezifische Methylierung besitzt ein hohes diagnostisches Potenzial. Die Veränderung der DNA-Methylierung tritt schon früh bei der Entstehung des Tumors auf und ist oft tumorspezifisch (Yano et al. 2004). Gegenüber anderen Biomarkern hat die Untersuchung der DNA-Methylierung viele Vorteile. Sie basiert auf einer kovalenten Bindung und ist damit sehr stabil. Dies ermöglicht eine Analyse von Gewebe nach histopathologischen Routinebehandlungen, wie nach der Fixierung in Formalin.

Die veränderten Methylierungsmuster sind spezifisch für Tumorzellen, da sie in gesunden Zellen nicht gefunden werden. Dies ermöglicht den qualitativen Nachweis von Tumor-DNA aus Körperflüssigkeiten.

**Tabelle 2:** Gene in denen Hypermethylierung in Tumoren gefunden wurde und ihre Funktion.\*)

<i>Function</i>	<i>Genes</i>
Apoptosis	Death associated protein kinase ( <i>DAP kinase</i> , 9q34), Caspase 8 ( <i>CASP8</i> , 2q33-34), Target of methylation induced silencing ( <i>TMSI</i> , 16p11.2-12.1)
Angiogenesis	Thrombospondin-1 ( <i>THBS1</i> , 15q15)
Cell cycle	Retinoblastoma ( <i>RB</i> , 13q14) p14ARF (9p21) Cyclin dependent kinase 2A ( <i>CDKN2A</i> , 9p21) Cyclin dependent kinase 2B ( <i>CDKN2B</i> , 9p21), p27/ <i>KIP1</i> (12p13), p73 ( <i>TP73</i> , 1p36) 14-3-3 $\sigma$ (stratifin, <i>SFN</i> , 1p)
Differentiation	Myogenic differentiation antigen-1 ( <i>MYOD</i> , 11p15.4) Paired box gene 6 ( <i>PAX6</i> , 11p13) Retinoic acid receptor ( <i>RAR<math>\beta</math>2</i> , 3p24) Wilms tumour 1 ( <i>WT1</i> , 11p13)
DNA repair	<i>hMLH1</i> (3p23-p21.3)
Metastasis/invasion	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase ( <i>MGMT</i> , 10q26) E-cadherin ( <i>CDH1</i> , 16q22.1) Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 ( <i>TIMP-3</i> ) Maspin (protease inhibitor 5, <i>PIS</i> , 18q21.3)
Drug resistance/ detoxification	Glutathione S-transferase $\pi$ ( <i>GSTP1</i> , 11q13) Multi-drug resistance 1 ( <i>MDR1</i> , 7q21.1)
Signal transduction	Adenomatous polyposis of the colon ( <i>APC</i> , 5q21-22) <i>PTEN</i> (10q23.3) Androgen receptor ( <i>AR</i> , Xq11-12) Oestrogen receptor 1 ( <i>ESR1</i> , 6q25.1) Ras association domain family member 1 ( <i>RASSF1A</i> , 3p21.3) Serine/threonine protein kinase 11 ( <i>STK11</i> or <i>LKB1</i> , 19p13.3)
Transcription/ transcription factors	Von Hippel-Lindau syndrome ( <i>VHL</i> , 3p26-p25) Hypermethylated in cancer ( <i>HIC-1</i> , 17p13.3) Breast cancer, type 1 ( <i>BRCA1</i> , 17q21)
Other	CD44 antigen ( <i>CD44</i> , 11pter-p13) Cyclo-oxygenase 2 ( <i>COX2</i> , 1q25.2-25.3) Calcium channel, voltage dependent, T type, alpha-1G subunit ( <i>CACNA1G</i> , 17q22) Calcitonin ( <i>CALCA</i> , 11p15.2-15.1) Fragile histidine triad gene ( <i>FHIT</i> , 3p14.2) Telomerase reverse transcriptase ( <i>TERT</i> , 5p15.33) Transmembrane protein containing epidermal growth factor and follistatin domains ( <i>TPEF</i> , 2q33) Chondroitin sulphate proteoglycan 2 ( <i>CSPG2</i> , 5q12-14)

\*) aus Costello 2001

Methylierungssignale können aber auch quantitativ bestimmt werden und erlauben so eine Klassifizierung anhand gradueller Messwerte. Ein Vorteil gegenüber anderen Biomarkern, wie z.B. Proteinen, ist das methylierte DNA amplifiziert werden kann. Im Gegensatz zu Punktmutationen ändert sich die DNA-Methylierung in mehreren CpGs gleichzeitig, man spricht von Co-Methylierung (Millar et al. 1999). Daher können mehrere benachbarte CpG-Positionen zur Anreicherung methylierter DNA genutzt werden.

Die Analyse der DNA-Methylierung eignet sich für zwei große Bereiche der Tumordiagnostik, die Krebsfrüherkennung und die Prognose der Tumorentwicklung. Die Kombination von Diagnostik und Therapie, basierend auf den epigenetischen Informationen sowie auf einer robusten und schnellen Technologie, wird die Behandlung von Patienten in Zukunft entscheidend verbessern.

#### **1.1.4.2 Molekulare Klassifizierung von Tumorproben**

Die Methylierungsanalyse bietet die Möglichkeit, Tumore zu klassifizieren. So kann Prostatakrebs anhand der Methylierung des GSTp1-Gens eindeutig identifiziert werden (Lee et al. 1997). Die Klassifizierung erlaubt häufig zusätzlich eine Krankheitsprognose und die Wahl einer geeigneten Therapie (Wei et al. 2002). Der Verlauf einer Erkrankung hängt von vielen Faktoren ab, z.B. der genetischen Prädisposition und dem allgemeinen Gesundheitszustand des Patienten (Liotta und Petricoin 2000). Mit Hilfe von molekularen Markern versucht man, die Progression der Krankheit vorherzusagen. Man unterscheidet Marker, die den Verlauf einer Krankheit unabhängig von der Therapie prognostizieren, so genannte prognostische Marker, von solchen, die den Erfolg einer bestimmten Therapie vorherzusagen, den prädiktiven Markern. Beispielsweise reagiert ein Patient, der eine bestimmte Mutation im Thymidylatsynthase-Gen besitzt, gut auf die Behandlung mit 5-Fluoruracil, da seine Thymidylatsynthase weniger aktiv ist, leidet aber möglicherweise stärker unter den Nebenwirkungen der Substanz (Pullarkat et al. 2001). Beide Arten von Markern sind für den behandelnden Arzt hilfreiche Parameter. Mehrere Studien demonstrieren, dass die tumorspezifische Methylierung als prognostischer Marker verwendet werden kann (Widschwendter und Jones 2002, Muller et al. 2003, Widschwendter et al. 2004).

Ein neuer Klassifikationstest basiert auf der Methylierungsanalyse in PITX2 und dient der Vorhersage der Rückfallwahrscheinlichkeit bei Brustkrebs-Patientinnen (Martens et al. 2005). Auch für Prostatakrebs konnte PITX2 als prognostischer Marker bestätigt werden (Cottrell et al. 2006).

#### **1.1.4.3 Krebsfrüherkennung**

Die Krebsfrüherkennung unterstützt die rechtzeitige Behandlung von Tumoren und führt zu einer verbesserten Prognose der Patienten. Bereits vor 25 Jahren wurde gezeigt, dass Krebspatienten eine erhöhte Konzentration von DNA im Blut haben (Leon et al. 1977). Später wurde bestätigt, dass die DNA von nekrotisierten Tumorzellen im Plasma detektierbar ist (Vasioukhin et al. 1994). Weist ein Tumor ein verändertes Methylierungsmuster in bestimmten DNA-Sequenzen auf, können diese im Blut nachgewiesen werden. Krebs kann daher mit Hilfe tumor-spezifischer Methylierungsmarker in Körperflüssigkeiten frühzeitig diagnostiziert werden. Die Menge freier DNA, die in Plasma gefunden wird

unterliegt sowohl bei Probanden ohne, als auch bei Patienten mit Tumor sehr großen Schwankungen (Jahr et al. 2001). Der Anteil der Tumor-DNA an der Gesamt-DNA kann also sehr gering sein. Die Herausforderung bei der Detektion besteht deshalb darin, ein charakteristisches Methylierungsmuster des Tumors vor einem Hintergrund nicht methylierter Sequenzen nachzuweisen. Gelingt der Nachweis einiger vom Tumor stammender DNA-Moleküle in großen Mengen "gesunder" DNA, eröffnet sich die Chance eines einfachen Tests zur Krebsfrüherkennung. So könnten zum Beispiel in der Krebsvorsorge in einem sehr frühen Stadium Diagnosen gestellt und therapeutische Maßnahmen ergriffen werden (Hoque et al. 2006a). Das Potential der Krebsfrüherkennung mittels Methylierungsanalyse wurde bereits in mehreren Studien belegt. So konnte methylierte DNA von Patienten mit Lungenkrebs in Serum nachgewiesen werden (Esteller et al. 1999). In anderen Studien gelang die Detektion von Tumoren des Kopf- und Nackenbereiches in Serum (Sanchez-Cespedes et al. 2000), die Erkennung von Prostatakrebs in Blut, Urin oder Ejakulat (Goessl et al. 2001) oder der Nachweis von Brustkrebs mit Hilfe von Plasma (Hoque et al. 2006b). Für Darmkrebs, die häufigste Krebsart in der westlichen Welt, konnte ein Test basierend auf Plasma (Lofton-Day et al. 2006) entwickelt werden. Andere Studien belegen nicht nur die Möglichkeit der Früherkennung aus Körperflüssigkeiten, sondern auch das Potential zur gleichzeitigen Prognose der Tumorentwicklung. Der Krankheitsverlauf von Magenkrebspatienten konnte durch die Methylierungsanalyse von Serum-DNA vorhergesagt werden (Ikoma et al. 2006).

#### **1.1.4.4 DNA-Methylierung des GSTp1-Gens in Prostata Tumoren**

Prostatakrebs ist der am häufigsten diagnostizierte Krebs bei Männern in den westlichen Ländern und in den USA die Tumorart, die am zweithäufigsten zum Tode führt (Greenlee et al. 2001, Jemal et al. 2002). Die Behandlung von Tumoren im fortgeschrittenen Stadium hat nur begrenzten Erfolg. Deshalb ist die Entwicklung von zuverlässigen, nichtinvasiven Methoden zur Früherkennung dieses Tumors von besonderer Bedeutung, um die Heilungschancen zu verbessern. Die Prostata-Tumor-Diagnose nutzt gegenwärtig die Rectal-Untersuchung sowie die Messung von prostata-spezifischen Antigenen (PSA) im Serum. Liegt ein Verdacht vor, erfolgt eine Prostata-Nadel-Biopsie und die histologische Untersuchung des entnommenen Gewebes. Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methoden sind jedoch begrenzt. Einerseits können die PSA-Niveaus auch unter den Bedingungen von gutartiger Prostatavergrößerung erhöht sein. Andererseits besteht die Gefahr, den Tumor nicht zu identifizieren, weil er durch die Nadel-Biopsie nicht erreicht wird (Harden et al. 2003). Neue zusätzliche diagnostische Verfahren sind deshalb erforderlich, um eine sichere Diagnose zu stellen.

Verschiedene spezifische genetische Veränderungen sind für Prostata-Tumor beschrieben worden, wie Aktivierung und Inaktivierung der Tumor-Suppressor-Gene p53, CDKN2a und PTEN (Isaacs et al. 1994). Hypermethylierung der CpG-Inseln im Promotor der Glutathione-S-Transferase pi (GSTp1) kommt in Prostata-Tumoren mit einer Häufigkeit von 90 % und in Prostata intraepithelialer Prostata-neoplasie (PIN) mit einer Häufigkeit von 70 % vor (Lee et al. 1997, Millar et al. 1999). Obwohl die Hypermethylierung des GSTp1 in Tumoren sehr frühzeitig vorliegt, wird in gutartiger Prostatavergrößerung (Benign) sehr selten Methylierung gefunden. Diese epigenetische Veränderung ist deshalb möglicherweise ein sehr wirksamer Biomarker zur Detektion von Prostata-Tumor-Zellen in einem frühen Stadium der Erkrankung. Methylierung in GSTp1 wurde auch in mehr als 80 % von Leber-Tumoren,

30 % von Brust-Tumoren und bis zu 10 % bei anderen Tumoren bei Menschen gefunden (Esteller et al. 1998, Tchou et al. 2000). Die Detektion der methylierten DNA in Körperflüssigkeiten, wie Urin, Ejakulat, Serum und Plasma, erfolgte dabei mit PCR-basierten Techniken (Goessl et al. 2000, Cairns et al. 2001).

GSTp1 ist in der q13-Region des Chromosoms 11 lokalisiert und gehört zur Supergen-Familie der GST-Enzyme. GSTs wirken bei der Entgiftung einer großen Zahl potentiell toxischer und karziogener elektrophiler Substanzen mit, indem sie diese mit dem nukleophilen Glutathion konjugieren. Neben ihrer enzymatischen Aktivität agieren die GSTs als intrazelluläre Transportproteine für diverse hydrophobe Moleküle, wie Billirubin, Häm, Steroidhormone und Drogen (Listowsky et al. 1988, Zucker et al. 1995). Diese Stoffe können wichtige Einflussfaktoren bei der Entwicklung von Prostata-Krebs sein (Gsur et al. 2001). Das GSTp1-Gen ist ungefähr 4 kb lang und überspannt 7 Exons (Abb. 13). GSTp1 enthält eine CpG-Insel, die sich von ca. 400 Basenpaare aufwärts bis 800 Basenpaare abwärts des Transkriptionsstartpunktes erstreckt (Millar et al. 2000). In dieser Arbeit war von besonderem Interesse, neue Tests zu entwickeln, die auf der Methylierung des Exon1 beruhen. Der Test sollte auf der HM-Technologie basieren und eine Kontrollreaktion beinhalten, die die Gesamt-DNA der Patientenprobe unabhängig vom Methylierungsstatus des GSTp1-Gens quantifiziert.

## 1.2 Methoden zur Analyse der DNA-Methylierung

### 1.2.1 Bestimmung des Anteils von Methylcytosin im Genom

Untersuchungen der DNA-Methylierung können sowohl sequenzunspezifisch als auch sequenzspezifisch erfolgen. Die sequenzunspezifische Untersuchung ermöglicht keine Aussagen über den genauen Ort der modifizierten Basen. Sie gibt Auskunft über den Gesamtanteil von Methylcytosin im Genom des untersuchten Gewebes. Zu den sequenzunspezifischen Untersuchungsmethoden zählen immunochemische Analysen (Oakeley et al. 1997), chromatographische Verfahren, wie Dünnschichtchromatographie (Schmitt et al. 1997) und HPLC (Kuo et al. 1980), (Fraga et al. 2002) sowie Kapillarelektrophorese (Stach et al. 2003).

Der sequenzspezifische Nachweis des Methylcytosins kann durch die chemische Sequenzierung genomischer DNA nach Maxam-Gilbert erfolgen (Church und Gilbert 1984). Sie wird jedoch heute kaum noch angewendet, da die 1992 von Frommer eingeführte Bisulfit-Reaktion die Detektion von Methylcytosin durch Sequenzierung nach Sanger ermöglicht (Frommer et al. 1992, Sanger et al. 1977, siehe Kap. 1.2.4).

### 1.2.2 Methylierungsspezifische Restriktionsenzyme

Eine weitere Möglichkeit zum sequenzspezifischen Nachweis von Methylcytosin ist die Verwendung methylierungssensitiver Restriktionsendonukleasen. Eine Reihe von Restriktionsenzymen wird durch das Vorhandensein eines Methylcytosins in der Erkennungssequenz in ihrer Aktivität gehemmt. Dadurch wird die DNA methylierungsspezifisch hydrolysiert (z.B. durch *Bst*UI). Erfolgt anschließend eine PCR mit Primern, deren Bindungsstellen die Schnittstelle des Enzyms einschließen, wird nur ungeschnittene, also methylierte DNA, amplifiziert. Damit kann sowohl die Sequenzumgebung als auch der

Methylierungsstatus eines einzelnen Methylcytosins ermittelt werden. Dieses Verfahren wurde erstmalig 1990 zur Untersuchung der Methylierung im P<sub>gk</sub>-1-Gen angewendet. Durch die sequenzspezifische Analyse wurde erstmalig gezeigt, dass die X-Chromosom-Inaktivierung ortsspezifisch und zeitversetzt erfolgt (Singer-Sam et al. 1990). Der umgekehrte Ansatz, spezifisch methylierte DNA enzymatisch zu spalten, kann erst seit der Entdeckung dieser Enzyme angewendet werden. Mit Hilfe von *McrBC* konnten neue differenziell methylierte Gene in Brustkrebs-Zelllinien identifiziert werden (Tryndyak et al. 2006). Die Enzyme *GlaI* und *BisI* erkennen ebenfalls spezifisch methylierte DNA (5'-GmeCGC und 5'-GmeCNGC) und haben so das Potential, zur Methylierungsanalyse eingesetzt zu werden (Chernukhin et al. 2005, Chmuzh et al. 2005).

### 1.2.3 Identifizierung von Methylierungsmarkern

Die Identifikation differentiell methylierter DNA-Sequenzen erfolgt meist mit Hilfe methylierungssensitiver Restriktionsendonukleasen. Durch die methylierungsspezifische Hydrolyse bleiben nur vollständig methylierte Bereiche des Genoms intakt. Die Identifikation dieser Sequenzen kann mit verschiedenen Methoden erfolgen. Mit einem Set von Primern aus kurzen Oligonukleotiden (40 Hexamere), in denen CG-Dinukleotide besonders häufig vorkommen, wird eine zufällige genomweite Amplifikation erreicht, die bevorzugt CpG-reiche Regionen amplifiziert (methylation-sensitive arbitrarily primed PCR, MS-AP-PCR). Die Gelanalyse des Bandenmusters der Amplifikationsprodukte mit und ohne methylierungsspezifische Hydrolyse zeigt differentiell methylierte Regionen, die dann durch Sequenzierung identifiziert werden können (Gonzalzo et al. 1997). Kombiniert man die Fragmentierung der DNA mit einer Linkerligation, können die methylierten Bereiche des Genoms mit linker-spezifischen Primern genomweit amplifiziert werden. Die Amplifikationsprodukte können mit Hilfe einer 2D-Gelelektrophorese untersucht werden (restriction landmark genomic screening, RLGS). Die identifizierten Spots müssen dann kloniert und sequenziert werden (Smiraglia et al. 1999). Die linker-spezifische genomweite Amplifikation methylierter DNA-Regionen kann auch mit Hilfe von Microarrays analysiert werden (differential methylation hybridization, DMH). Die PCR-Produkte werden dazu fluoreszenz-markiert und auf einem Microarray hybridisiert. Je nach Dichte des Arrays kann mit ihm das Genom teilweise oder vollständig abgedeckt werden (Huang et al. 1999). Weitere Verfahren zur Identifikation differentiell methylierter Sequenzen basieren auf Southernblotanalyse (Bird und Southern 1978) oder subtraktiver Hybridisierung (MCA-RDA, methylated CpG island amplification-representational difference analysis, Toyota et al. 1999).

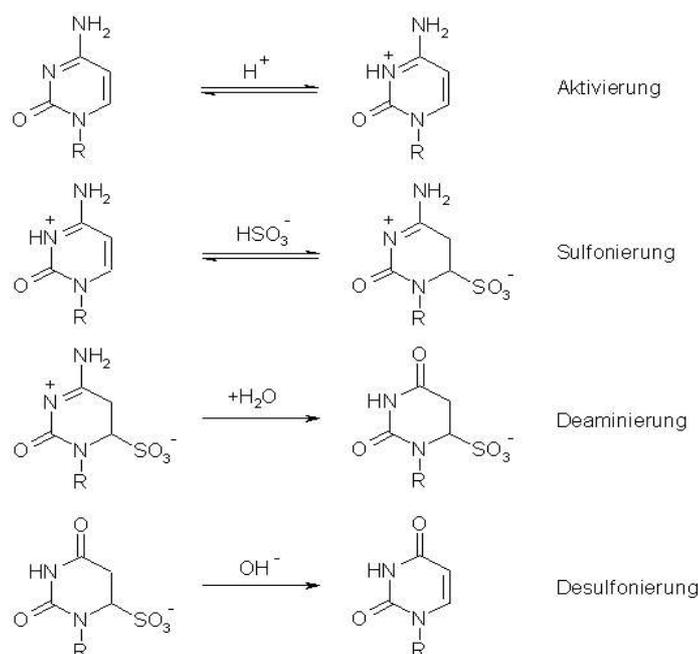
Verfahren basieren auf Methylcytosin-bindenden Proteinen (MBD oder MeCP2). Diese sind entweder an einer Säule immobilisiert oder in Lösung mit methylierter DNA komplexiert. Nach einer Aufreinigung können die methylierten Sequenzen mittels cDNA-Bibliotheken oder auf Microarrays identifiziert werden (Cross et al. 1994). Eine kommerzielle Variante dieser Technologie ist erhältlich bei Panomics, USA (TranSignal™ Promoter Methylation Array).

Als ein neuer Zweig hat sich die software-gestützte Voraussage von Methylierungseigenschaften entwickelt. Anhand der Sequenzeigenschaften ist man in der Lage, generelle Eigenschaften der Sequenz bezüglich der DNA-Methylierung vorherzusagen (Feltus et al. 2003, Fang et al. 2006, Das et al. 2006, Bock et al. 2006).

### 1.2.4 Wandlung der Methylierungsinformation in einen Sequenzunterschied mit Hilfe der Bisulfit-Reaktion

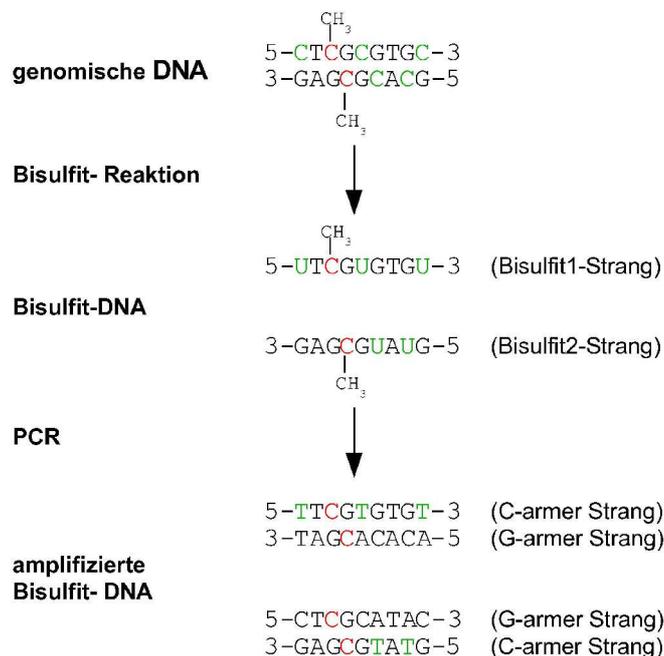
Die meisten sequenzspezifischen Methoden zur Methylierungsanalyse basieren auf der von Frommer entwickelten Bisulfit-Reaktion (Frommer et al. 1992). Diese chemische Behandlung genomischer DNA wandelt nicht methyliertes Cytosin in Uracil um, wogegen methyliertes Cytosin unverändert bleibt. Im ersten Schritt wird Cytosin mittels Natriumbisulfit an der C5-Position oxidativ deaminiert. Dabei wird eine Sulfon-Gruppe an die C6-Position angelagert. Im nächsten Schritt erfolgt eine alkalische Desulfonierung zu Uracil (Abb. 2). Die Methylgruppe an der C5-Position schützt das 5-Methylcytosin vor der Deaminierung und unterliegt daher keiner chemischen Umwandlung. Eine Umwandlung des Cytosin erfolgt nur in Einzelstrang-DNA, d.h. der DNA-Doppelstrang muss vor der Bisulfit-Behandlung vollständig denaturiert werden. Durch die selektive Umwandlung der nicht methylierten Cytosine in Uracil, wird die Methylierungsinformation in eine Sequenzinformation transformiert. Gleichzeitig entstehen zwei nicht komplementäre DNA-Stränge, der Bisulfit1- und der Bisulfit2-Strang. Beide tragen die Information der DNA-Methylierung in Form eines Sequenzunterschiedes: 5'-CG-Dinukleotide sind nur entstanden, wenn Methylierung vorlag. Nicht methylierte Dinukleotide liegen als 5'-UG vor. Beide Bisulfit-Stränge sind nach der Umwandlung arm an Cytosin, man spricht vom C-armen Strang. In der anschließenden PCR verhält sich Uracil wie Thymin (Abb. 3). Der entstehende komplementäre Strang ist folglich G-arm. Die Bisulfit-Reaktion revolutionierte die Erforschung der DNA-Methylierung, denn sie erlaubt die Anwendung der meisten molekularbiologischen Methoden zur Analyse von DNA-Sequenzunterschieden. Das Human-Epigenome-Projekt (HEP) hat sich zum Ziel gesetzt die Methylierungsmuster verschiedener Gewebe mit Hilfe der Sequenzierung genomweit zu analysieren (Bradbury 2003).

Neben der chemischen Umwandlung der Methylierungsinformation in einen Sequenzunterschied ist auch eine enzymatische Umwandlung beschrieben worden. Die Cytosin-Methyltransferase wandelt dabei 5-Methylcytosin in Thymin um (Yebrá und Bhagwat 1995). Das Verfahren könnte ebenso wie die



**Abbildung 2:** Chemische Umwandlung von 5-Methylcytosin in Uracil durch die Behandlung mit Natriumbisulfit und anschließende alkalische Desulfonierung.

Bisulfit-Konversion zur DNA-Methylierungsanalyse herangezogen werden, fand jedoch bisher in keiner weiteren Arbeit Anwendung.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Bisulfit-Konversion. Cytosine der genomischen DNA werden durch die Bisulfit-Reaktion in Uracil umgewandelt (grüne Basen). Cytosine können in CpG-Dinukleotiden als 5-Methyl-Cytosin, methyliert vorliegen und werden in der Bisulfit-Reaktion nicht umgewandelt (rote Basen).

#### 1.2.4 PCR-basierte Analysen der DNA-Methylierung

Die durch die Bisulfit-Konversion als Sequenzpolymorphismus (C/U) zugänglich gemachte Methylierungsinformation kann mit verschiedenen PCR-basierten Verfahren analysiert werden. Die wichtigsten Verfahren sind:

1. COBRA. Bisulfit-konvertierte DNA wird mit methylierungsunspezifischen Primern amplifiziert. Die PCR-Produkte werden anschließend mit einem Restriktionsenzym hydrolysiert. Die Erkennungssequenz enthält dabei CpG-Positionen, die je nach Methylierungsstatus als TG oder CG im PCR-Produkt vorliegen. Die geschnittenen PCR-Produkte werden mit Agarosegel analysiert. Eine densitometrische Auswertung der Bandenstärke erlaubt eine semiquantitative Aussage zum Methylierungsstatus der untersuchten CpG-Positionen (Xiong und Laird 1997).
2. SEQUENZIERUNG. Die Sequenzierung von PCR-Produkten aus bisulfit-konvertierter DNA kann auf zwei Arten erfolgen. Die direkte Sequenzierung resultiert in einem Summensignal für das untersuchte CpG. Methylierte Cytosine werden dabei als Cytosin, nicht methylierte Cytosine als Thymin erkannt (Clark et al. 1994, Grunau et al. 2001). Eine software-basierte Interpretation des C/T-Polymorphismus erlaubt eine quantitative Auswertung der Methylierungsanalyse (Lewin et al. 2004).
3. KLONSEQUENZIERUNG. Sequenziert man eine große Anzahl klonierter Produkte einer PCR aus bisulfit-konvertierter DNA, so kann man durch Auszählen der gefundenen Cytosine einer CpG-Position auf den Grad der Methylierung schließen.

4. METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE PCR (MSP). Die gerichtete Amplifikation von methylierter DNA kann mittels selektierender PCR-Primer erfolgen (Herman et al. 1996). Die Primer liegen dabei auf mindestens einer CpG-Position. Ähnlich zu einer allelspezifischen PCR werden nur methylierte Sequenzen angereichert. Die Primer können auch so entworfen werden, dass ausschließlich nicht methylierte DNA amplifiziert wird. Die PCR-Produkte werden mit dem Agarosegel analysiert oder im Realtime-PCR-Verfahren detektiert (Lo et al. 1999).
5. METHYLIGHT. Dieses Assayformat erlaubt den quantitativen Nachweis co-methylierter CpGs in einer Realtime-PCR. Die Amplifikation erfolgt mit methylierungsunspezifischen Primern, die Detektion der methylierten DNA mit Hilfe von methylierungsspezifischen Sonden. In einer speziellen Ausführungsform werden methylierungsspezifische Primer verwendet, so dass es sich um eine Realtime MSP handelt (Lo et al. 1999, Eads et al. 2000).
6. PYROSEQUENZIERUNG. Diese Technik basiert auf die Detektion von Licht, das nach der Zugabe eines Nukleotides durch eine Enzymkaskade freigesetzt wird (Colella et al. 2003). Sie erlaubt die Analyse von DNA-Sequenzen aus PCR-Amplifikationen von bis zu 25 bp Länge.
7. MS-SNuPE. Das Methylierungsniveau nur eines CpGs kann mit einer methylierungsspezifischen Primerextension untersucht werden (MS-SNuPE, Gonzalgo et al. 1997). Die Detektion erfolgt dabei wahlweise über Radioaktivität (SNuPE IP), HPLC (RP HPLC, El-Maarri et al. 2002), Kapillarelektrophorese (SNaPmeth, Uhlmann et al. 2002) oder MALDI-TOF (GOOD, Tost et al. 2003).
8. MICROARRAY: Die parallele Analyse der Methylierungsniveaus an verschiedenen Positionen der DNA ist durch die Microarrayanalyse von fluoreszenz-markierten Amplifikaten möglich (Adorjan et al. 2002, Schumacher et al. 2006).
9. RNase1-T1-MALDI-TOF: Bei dieser Methode werden klonierte PCR-Amplikate mit Hilfe einer guanosinspezifischen Fragmentierung analysiert. Dazu wird die Klonsequenz in RNA transkribiert, durch T1-RNase fragmentiert und massenspektroskopisch analysiert (Schatz et al. 2004).

Eine umfangreiche Übersicht aller Methoden zur Analyse von Methylcytosin geben Oakeley E.J., Fraga M.F. und Esteller M., Laird P.W. sowie Schumacher A. und Petronis A. (Oakeley 1999, Fraga und Esteller 2002, Laird 2003, Schumacher und Petronis 2006).

## 1.3 Realtime-PCR-Verfahren zur Methylierungsanalyse

### 1.3.1 Grundlagen der DNA-Quantifizierung mittels Realtime-PCR

In einer Realtime-PCR wird, im Gegensatz zur konventionellen PCR, die Anzahl der entstandenen Kopien nach jedem Zyklus gemessen. Die Messung kann mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe, wie z.B. SYBR-Green, erfolgen. SYBR-Green bindet nur an doppelsträngige DNA und ändert dabei sein Emissionsmaximum. Bei der Wellenlänge von 530 nm kann die Zunahme von doppelsträngiger DNA verfolgt werden. Mit fluoreszenz-markierten DNA-Sonden werden dagegen Signale erzeugt, die auf der sequenzspezifischen Bindung an die Ziel-DNA beruhen. In beiden Detektionsverfahren wird eine Mindestmenge DNA benötigt, bevor ein Signal vor dem Hintergrundsignal detektiert werden kann. Das detektierbare Signal wird mit etwa  $10^{10}$  -  $10^{11}$  Kopien erreicht. Sobald diese Anzahl DNA-Moleküle überschritten wird, kann entsprechend der PCR-Kinetik ein exponentieller Anstieg des Signals beob-

achtet werden (exponentielle Phase). Nach einer Übergangsphase nähert sich die Fluoreszenz einem Maximum an. Als Signalgrenzwert (engl.: threshold) wird ein Fluoreszenz-Wert definiert, der etwa der 10fachen Standardabweichung des Hintergrundsignals entspricht. Der Moment des Überschreitens des Signalgrenzwertes wird als Durchbruchzyklus CT (engl.: cycle threshold) oder auch CP (engl.: crossing point) bezeichnet. Der Signalgrenzwert kann software-gestützt oder auch manuell festgelegt werden. Von entscheidender Bedeutung ist, dass die Aufnahme des CT in der exponentiellen Phase der Signalkurve stattfindet, denn nur dort entspricht die Kinetik der angeführten Formel (1). Die Kinetik entspricht einer exponentiellen Funktion der Zyklenzahl, deren Basis die PCR-Effizienz E ist. Sie kann maximal 2 betragen, wenn in der PCR 100 % des Templates kopiert werden.

$$(1) \quad N = N_0 + N_0 \cdot E^{CT} \quad (N_0 = \text{Anzahl der Startmoleküle, } N = \text{Anzahl der Moleküle nach jedem Zyklus, } E = \text{Effizienz der PCR, } CT = \text{Durchbruchzyklus})$$

Die Formel kann durch Logarithmieren in eine lineare Form (2) gebracht werden.

$$(2) \quad \log K = \log N_0 + CT \cdot \log E \quad \text{mit: } K = N_0 \cdot E^{CT}$$

Nach Umformung ergibt sich die lineare Abhängigkeit des CT von der log-Zahl der Startermoleküle der Reaktion

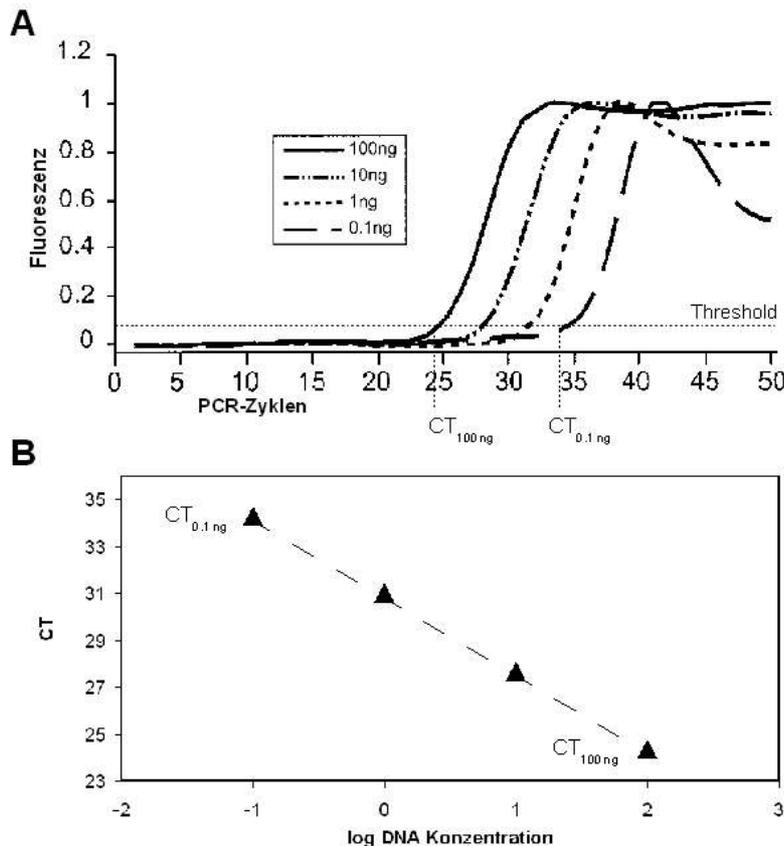
$$(3) \quad CT = -(1/\log E) \cdot \log N_0 + (\log K / \log E).$$

Diese lineare Abhängigkeit spiegelt sich in der DNA-Standardkurve wider, wie sie in Abbildung 4 B zu sehen ist. Sie entsteht durch die Auftragung der CTs über der logarithmischen Menge der eingesetzten DNA. Mit Hilfe der Standardverdünnungsreihe aus einer DNA mit bekannter Konzentration kann die DNA-Menge einer Probe aus den erhaltenen CTs ermittelt werden. Die Linearität der PCR ist Voraussetzung für die Quantifizierung und beschränkt den Messbereich des Verfahrens. Abweichungen von der Linearität ergeben sich bei sehr hohen DNA-Konzentrationen durch Substrat-Inhibierung oder durch Änderungen des Hintergrundsignals. Abweichungen treten auch bei sehr geringen DNA-Konzentrationen auf. Ist die Anzahl der Startermoleküle sehr niedrig, treten stochastische Effekte, also Schwankungen aufgrund der zufälligen Verteilung der Moleküle, auf.

Die PCR-Effizienz wird nach der Formel (4) aus den CTs einer DNA-Verdünnungsreihe bestimmt, indem die Steigung aus der Kalibrierkurve (Abb.4 B) ermittelt wird.

$$(4) \quad \text{Eff} = 10^{(-1/\text{Steigung})} \quad \text{mit Steigung} = (1/\log E).$$

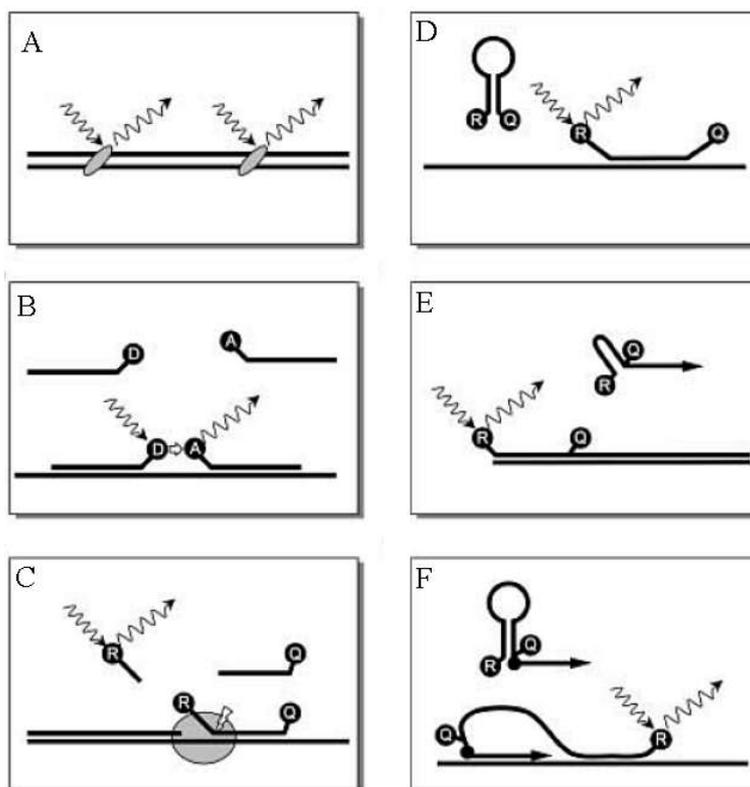
Die Steigung  $1/\log E$  darf den Wert -3,33 nicht unterschreiten, da die Effizienz E nicht größer als 2 sein kann.



**Abbildung 4:** Amplifikationskurven einer DNA-Verdünnungsreihe (A). Die CTs werden zum Zeitpunkt des Überschreitens des Hintergrundsignals abgelesen (cycle threshold). Für unterschiedliche Mengen DNA ergeben sich unterschiedliche CTs. Werden die CTs in ein halblogarithmisches Diagramm über der DNA-Menge aufgetragen, ergibt sich eine lineare Trendlinie, die DNA-Standardkurve (B).

### 1.3.2 Detektionssysteme in der Realtime-PCR

Alle Realtime-PCR-Systeme beruhen auf der kontinuierlichen Messung eines Fluoreszenz-Signals, welches proportional zum entstehenden Amplifikat ansteigt. Dabei muss in zwei Gruppen unterschieden werden, sequenzunspezifische Signale und sequenzspezifische Signale. Zur ersten Gruppe zählen unspezifische Fluoreszenz-Farbstoffe, die ihre Emissionseigenschaften durch die Interkalation in den DNA-Doppelstrang ändern. Wichtigster Vertreter ist SYBR-Green, welches praktisch auf allen Realtime-Plattformen angewendet werden kann. Vorteil dieser Technik sind die niedrigen Kosten sowie die hohe Empfindlichkeit. Ein Nachteil ist, dass jedes doppelsträngige PCR-Produkt Signale generiert. Dies führt dazu, dass auch unspezifisches Amplifikat detektiert und die Analyse ungenau wird. Die sequenzspezifische Detektion erfolgt mit Sonden, die innerhalb des Amplifikates binden. Dazu gehören TaqMan-Sonden (Holland et al. 1991, Livak et al. 1995), LightCycler-Hybridisierungssonden (Lay und Wittwer 1997), Molecular Beacon (Abravaya et al. 2003), Scorpion-Sonden (Whitcombe et al. 1999). Eine Ausnahme bilden die Sunrise-Primer (Nuovo et al. 1999), deren Signal auf Grund der Streckung nach der Verlängerung des Rückwärtsprimer entsteht. Die Signale von Sunrise-Primern sind also nicht notwendigerweise fragmentspezifisch, sondern können auch durch Primerdimere entstehen (Abb. 5). Bei der Verwendung von TaqMan-Sonden muss beachtet werden, dass die in der PCR verwendete Polymerase eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besitzt, die für die hydrolytische Spaltung der Sonde not-



**Abbildung 5:** Die wichtigsten Detektionssysteme für die Realtime-PCR: SYBR-Green (A), FRET-Hybridisierungssonden (B), TaqMan-Sonde (C), Molecular Beacon (D), Sunrise-Primer (E), Scorpion-Primer (F).

wendig ist. Eine Sonderstellung nehmen auch die LightCycler-Hybridisierungssonden ein. Dieses Detektionssystem besteht aus zwei Sonden, die benachbart an das Templat binden müssen, um einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zu erzeugen. Die Signalerzeugung durch FRET beruht darauf, dass der Farbstoff der Donor-Sonde Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, welches den benachbarten zweiten Farbstoff anregt. Dieser emittiert dann Licht einer höheren Wellenlänge als die Donor-Sonde.

### 1.3.3 Methylierungsspezifische Amplifikation im Realtime-PCR-Verfahren

Die größte Herausforderung bei der Messung methylierter DNA in Körperflüssigkeiten besteht in der sensitiven Detektion weniger methylierter Kopien in Mischungen mit großem Überschuss nicht methylierter DNA dar. Die erste hochsensitive Realtime-PCR zum Nachweis von DNA-Methylierung wurde 1999 für den Nachweis methylierter Sequenzen des p16-Promotors beschrieben (Lo et al. 1999). Dabei wurden methylierungsspezifische Primer (MSP) verwendet und mit einer methylierungsspezifischen Sonde kombiniert. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens lag bei 10 Kopien. Dabei wurde der Methylierungsindex als Ergebnis der quantitativen Methylierungsmessung eingeführt:  $MI = 100 \cdot M / (M + U)$ , wobei M die Anzahl methylierter und U die Anzahl nicht methylierter DNA-Kopien ist. Seit der Veröffentlichung der methylierungsspezifischen PCR ist eine Vielzahl von Untersuchungen mit methylierungsspezifischen Primern durchgeführt worden. Sowohl konventionelle als auch Realtime-PCR-Verfahren erlauben einen hochsensitiven Nachweis der DNA-Methylierung. Letztere werden in der Literatur oft auch als MethyLight oder Q-MSP bezeichnet. Durch die Kombination methylierungsspezi-

fischer Primer mit methylierungsspezifischen Sonden kann ein sehr hohes relatives Detektionslimit von bis zu 1 in 10000 erreicht werden (Eads et al. 2000). Durchschnittlich wird mit einem MSP-Assay ein relatives Detektionslimit von  $1:10^3$  -  $1:10^4$  erzielt (Wong und Lo 2002).

Eine weitere Methode zur gezielten Anreicherung methylierter DNA ist der sogenannte Headloop-Assay (Rand et al. 2005). Diese Technik basiert auf einer zusätzlichen reversen komplementären Sequenz am 5'-Ende des Primers. Diese ist so gestaltet, dass sie auf die vom Primer selbst verlängerte Sequenz rückfalten kann, wenn diese unmethyliert vorliegt. Die zurückgefaltete Sequenz (Headloop) wird dann verlängert. Die Anlagerung des Rückwärtsprimers wird dadurch unterbunden, weil die sich selbst komplementäre Sequenz den Primer verdrängt. Unmethylierte DNA wird somit der exponentiellen PCR-Amplifikation entzogen, und die methylierte DNA wird angereichert. Obwohl mit dieser Technologie eine sehr gute relative Sensitivität von bis zu 1:4000 erzielt wurde, sind keine weiteren Studien zu dieser Technologie veröffentlicht worden.

So ist die Amplifikation mit Hilfe methylierungsspezifischer Primer heute die meist genutzte Methode zum sensitiven Nachweis von DNA-Methylierung. Dennoch hat die Methode einige Nachteile. Eine unspezifische Anbindung der Primer kann nicht immer verhindert werden, so dass Fragmente gebildet werden, die in den Primerbindungsstellen die vom Primer selbst „mitgebrachten“ CpGs besitzen. Innerhalb des Fragments liegt dagegen keine methylierte Sequenz vor. Im weiteren Verlauf der Amplifikation können diese Fragmente nicht mehr diskriminiert werden und werden als Hintergrund amplifiziert. Dies kann die Spezifität und Sensitivität des Assays negativ beeinflussen (Shaw et al. 2006). Desweiteren ist eine Methylierung aller von Primern und Sonde überspannten CpGs notwendig, um eine positive Reaktion zu erzielen. Das Assayformat erfordert also eine Co-Methylierung von mindestens 8 - 10 CpGs, die in der Regel auf einer Länge von über 100 Basenpaaren vorliegen müssen. Kritisch ist auch das Primerdesign bezüglich der Spezifität für Bisulfit-DNA, denn die Primer enthalten CpGs, so dass der Anteil der umgewandelter Cytosine in der Sequenz reduziert ist. Bei der Verwendung von MSPs besteht daher ein erhöhtes Risiko der unspezifischen Amplifikation nicht vollständig umgewandelter DNA. Dies kann zu einer Überschätzung der DNA-Methylierung führen. Falsch-positive Ergebnisse können durch den Einsatz einer zusätzlichen Sonde zur Kontrolle der Bisulfit-Konversion vermieden werden (Rand et al. 2002). Zur Erhöhung der Sensitivität von MSPs wurde die Verwendung einer „nested PCR“ vorgeschlagen (An et al. 2002). Eine andere interessante Weiterentwicklung ist die Kombination aus einer multiplexierten Voramplifikation und anschließender Analyse der Amplikate mittels MSP (Fackler et al. 2004). Eine Realtime-PCR mit zwei Farbstoffen erlaubt die gleichzeitige Methylierungsanalyse von zwei Genen oder die Quantifizierung von methylierter und nicht methylierter DNA in einer Reaktion (Swift-Scanlan et al. 2006).

Die methylierungsspezifische Amplifikation von Bisulfit-DNA mit Primern, deren Basen die Diskriminierung methylierter von nicht methylierter DNA erlauben, ist patentrechtlich geschützt. Ein diagnostischer Test auf Basis eines MSP bedarf daher einer Lizenzierung. Eine Motivation dieser Arbeit war es, die HM-Technologie als alternative Methode zur Detektion methylierter DNA zu etablieren, um die Kosten für eine klinische Anwendung zu verringern.

### 1.3.4 Realtime-PCR zur quantitativen Methylierungsanalyse

Die quantitative Methylierungsmessung, im Folgenden QM-Assay genannt, basiert auf der gleichzeitigen Amplifikation methylierter und nicht methylierter bisulfit-konvertierter DNA in einer Realtime-PCR (Zeschnick et al. 2004). Die Primer binden außerhalb von CpG-Positionen, so dass keine methylierungsspezifische Anreicherung der DNA stattfindet. Die Detektion erfolgt mit zwei methylierungsspezifischen Sonden, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind. Die Signale für methylierte und unmethylierte DNA werden bei verschiedenen Wellenlängen detektiert und können nach zwei Algorithmen ausgewertet werden. In beiden Verfahren wird der Methylierungsindex MI ermittelt, der proportional zum Anteil methylierter DNA des Templates ist. Die Berechnung mittels CT erfolgt nach der Formel:

$$MI_{CT} = 100 / (1 + 2^{(CT_{\text{methyl.}} - CT_{\text{nicht methyl.}})}) \quad (\text{Kluth et al. 2006}).$$

Die Auswertung der Fluoreszenz-Intensitäten (FI) führt nach folgender Formel zum Methylierungsindex:

$$MI_{FI} = 100 * FI_{(\text{methyl.})} / (FI_{(\text{methyl.})} + FI_{(\text{nicht methyl.})}) \quad (\text{Kluth et al. 2006}).$$

Die quantitative Auswertung der Fluoreszenz-Signale erfolgt am Ende der Amplifikation. Diese FI-Methode eignet sich besonders bei der Verwendung von TaqMan-Sonden, deren Signal sich mit den PCR-Zyklen akkumuliert. Bei der Verwendung von LightCycler-Sonden ist häufig eine Verringerung des Signals am Ende der PCR zu beobachten (Hook-Effekt). Eine Endpunktbestimmung der Signale ist in diesem Fall nicht sinnvoll. Stattdessen ist dann eine Verarbeitung der Fluoreszenz-Daten aus früheren PCR-Zyklen notwendig.

Anhand des Methylierungsindex, der aus definierten DNA-Mischungen von methylierter und nicht methylierter DNA bestimmt wird, kann eine Kalibrierkurve erstellt werden. Anhand dieser Kalibrierung wird der Methylierungsgrad einer Probe berechnet. Die CT- oder FI-Werte einer Probe sollten aus dem Mittelwert von mindestens zwei Wiederholungen bestimmt werden. Die QM-Technologie kann weitgehend automatisiert werden und wurde in umfangreichen Studien zur Methylierungsanalyse eingesetzt (Martens et al. 2005). Sie erlaubt die schnelle Bestimmung des Methylierungsgrades mit einer Abweichung von max. 10 % des Messwertes. Das Detektionslimit ist von der Sensitivität der Sonden abhängig und liegt durchschnittlich bei 3 % (pers. Kom. A. Kluth).

## 1.4 Die Begriffe Spezifität und Sensitivität

Die technische Leistungsfähigkeit eines diagnostischen Tests muss unabhängig von der klinischen Anwendung evaluiert werden. Dazu gehören vor allem die Bestimmung der analytischen Spezifität und Sensitivität. Die technischen Eigenschaften eines Assays müssen von seinen klinischen Ergebnissen unterschieden werden. Um die Begriffe voneinander abzugrenzen, werden in dieser Arbeit die Formulierungen „analytische Spezifität“, „analytisches Detektionslimit“ und „relatives Detektionslimit“ zur Beschreibung der technischen Eigenschaften verwendet. Klinische Spezifität und Sensitivität beziehen sich dagegen immer auf die Analyse von Patientenproben und sind ein Ergebnis der Summe aus biologisch-medizinischen Eigenschaften und technischer Leistungsfähigkeit des Tests.

#### 1.4.1 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität eines Assay ist ein Maß dafür, ob ein Signal tatsächlich auf den zu untersuchenden Analyten zurückzuführen ist oder ob die Entstehung des Signales unspezifisch erfolgt. Zum Beispiel könnte ein Signal auf die Detektion des Hintergrundrauschens zurückzuführen sein. Um vom echten Signal abzugrenzen muss der Test in einem geeigneten Modellsystem auf Spezifität geprüft werden. In dieser Arbeit wurde die Spezifität einer methylierungsspezifischen Realtime-PCR anhand universell methylierter DNA sowie nicht methylierter DNA ermittelt. Universell methylierte DNA ist mit Sssl-Methyltransferase behandelte DNA, in der alle Cytosine in CpG-Dinukleotiden methyliert vorliegen und diente als Modell für Tumor-DNA. Phi29-DNA diente dagegen als Modell für gesunde DNA. Methylierungsspezifische Sonden beispielsweise sind nur spezifisch, wenn sie ein Signal mit universell methylierter DNA erzeugen, nicht jedoch mit phi29-DNA.

#### 1.4.2 Analytisches Detektionslimit

Die Nachweisgrenze des Tests bezüglich des Analyten wird als analytisches Detektionslimit bezeichnet. Dazu wird der LOD90-Wert eingeführt, diejenige Menge DNA, die in der PCR mit einer 90 %igen Wahrscheinlichkeit detektiert wird. Mit Hilfe einer Probit-Regressionsanalyse wird diese Wahrscheinlichkeit berechnet. Das Konfidenzintervall einer Probit-Regression ist im Bereich der 50%igen Wahrscheinlichkeit am engsten und eignet sich daher am besten zum Vergleich von Assays. Dazu wird der LOD50-Wert berechnet, der die Menge methylierter DNA angibt, die mit 50 %iger Wahrscheinlichkeit detektiert wird. Überlappen die Konfidenzintervalle des LOD50 zweier Assays, so kann kein signifikanter Unterschied im Detektionslimit festgestellt werden und somit von einer vergleichbaren Leistungsfähigkeit ausgegangen werden. Gibt es keinen Überlapp zwischen den Konfidenzintervallen, so muss davon ausgegangen werden, dass die Tests unterschiedliche Detektionslimits haben.

#### 1.4.3 Relatives Detektionslimit

Die Leistungsfähigkeit eines Assays wird auch durch sein relatives Detektionslimit bestimmt. Es gibt an, in welchem maximalen Verhältnis die methylierte DNA zu nicht methylierter DNA vorliegen darf, damit eine Detektion noch möglich ist. Es beschreibt die Fähigkeit des Assays zur Anreicherung methylierter DNA. Diese Eigenschaft ist von besonderer Bedeutung, da die Detektion methylierter DNA aus Körperflüssigkeiten immer in Anwesenheit großer Mengen nicht methylierter DNA erfolgt. Das relative Detektionslimit wird aus Mischungen von methylierter DNA mit nicht methylierter DNA in unterschiedlichen Verhältnissen bestimmt. Dabei kann entweder die Menge methylierter DNA konstant und die Menge nicht methylierter DNA erhöht werden oder umgekehrt. In dieser Arbeit kamen beide Möglichkeiten zur Anwendung.

#### 1.4.1 Klinische Spezifität und Sensitivität

Die klinische Spezifität eines medizinischen Tests gibt den Anteil der richtig als negativ (richtig-negativ) erkannten Proben an. Werden zum Beispiel mit einem diagnostischen Test 10% einer untersuchten Population fälschlicherweise als positiv detektiert, obwohl sie keine Krankheit aufweisen, so besitzt der diagnostische Test eine Spezifität von 90 %.

Dagegen beschreibt die klinische Sensitivität die Wahrscheinlichkeit, ein positives Ergebnis in einem medizinischen Test auch als solches zu erkennen (richtig-positiv). So gibt die Sensitivität bei einer medizinischen Untersuchungsmethode zur Erkennung einer Krankheit den Anteil der Kranken an, bei denen die Krankheit richtig erkannt wurde.

Die Spezifität kann über die Festlegung eines Grenzwertes eingestellt werden, das heißt, erst das Überschreiten dieses Grenzwertes führt zu einem positiven Testergebnis. Dies beeinflusst gleichzeitig die Sensitivität des Tests. In der Diagnostik erfolgt diese Art der Grenzwertfestlegung oft mit Hilfe von ROC-Kurven.

Klinische Spezifität und Sensitivität sind ein Ergebnis sowohl der medizinischen Eigenschaften des verwendeten Biomarkers als auch der technischen Leistungsfähigkeit des verwendeten Tests.

## 2 Aufgabenstellung

Eine Methode zum sensitiven Nachweis von DNA-Methylierung basiert auf der Anreicherung methylierter DNA mit Hilfe von Blockeroligonukleotiden. Blocker können dazu benutzt werden, eine gerichtete Amplifikation methylierter Bisulfit-DNA zu erzeugen. Zu Beginn dieser Arbeit war dieses Prinzip als PCR-Format mit einer Gel-Analyse etabliert. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, diese Art der methylierungsspezifischen PCR als diagnostischen Assay nutzbar zu machen. Diese als HeavyMethyl-Assay (HM-Assay) bezeichnete hochsensitive Detektion methylierter DNA musste dazu als Realtime-PCR etabliert werden. Anhand des GSTp1-Gens sollte das Assayformat umfassend charakterisiert und mit klinischen Daten validiert werden. Weiterhin sollten Realtime-Duplexreaktionen mit dem HM-Assay umgesetzt und charakterisiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte der QuantitativeMethylation-Assays (QM-Assay) zur genauen Quantifizierung des Anteils methylierter DNA weiterentwickelt werden. Die technologische Verbesserung des QM-Assays sollte die diagnostischen Anwendungsmöglichkeiten auch auf geringe DNA-Mengen erweitern. Als Modell diente die Untersuchung des Methylierungsstatus der Gene H19 und IGF2 in embryonalen Mauszellen. Die Methylierungsmuster dieser allelspezifisch inaktivierten Gene (genetisches Imprinting) werden während der Embryonalentwicklung reprogrammiert. In der Arbeit sollte der zeitliche Ablauf der Reprogrammierung in frühen Stadien der Embryonalentwicklung untersucht werden. Als besondere Herausforderung war dafür die allelspezifische Methylierungsanalyse mit Hilfe von QM-Assays zu entwickeln.

Jede PCR-basierte Technologie ist anfällig für Kontamination mit PCR-Produkten, die aus vorherigen Experimenten stammen. Durch den Einsatz von dUTP in der PCR und die Inkubation des Reaktionsansatzes mit Uracil-DNA-Glykosylase können PCR-Kontaminationen vermieden werden. Dieses System ist jedoch bei Verwendung von Bisulfit-DNA nicht anwendbar, da diese Uracil enthält. Für die Methylierungsanalyse, basierend auf Bisulfit-DNA, standen bisher keine Verfahren zur Vermeidung von PCR Kontaminationen zur Verfügung. Ein weiteres Ziel der Arbeit war deshalb, eine mit Bisulfit-DNA durchführbare Methode zur Kontaminationsvermeidung zu entwickeln.

### **3 Methoden**

#### **3.1 Präparation von Vorläuferkeimzellen**

Von der Universität Saarbrücken wurden primordiale Keimzellen (PGCs) aus Mäuseembryonen zu Verfügung gestellt. Dort waren Embryonen aus Kreuzungen der Laborstämme BL6 und SD7 nach 9,5, 10,5 und 11,5 Tagen gewonnen und daraus die PGCs präpariert worden. An jedem der drei Tage wurden drei Proben gewonnen. Dazu wurden jeweils mehrere Präparationen gepoolt, wobei die Anzahl der gesammelten Zellen zwischen 30 und 75 betrug. Die Zellen wurden lysiert und die DNA mit der Agarosebead-Methode bisulfit-konvertiert (Olek et al. 1996).

#### **3.2 DNA-Extraktion und Aufreinigung**

DNA aus Gewebe wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit extrahiert und aufgereinigt. Die Konzentration der gelösten DNA wurde mittels UV bei 260 nm bestimmt. DNA aus Serum wurde nach den Angaben des Herstellers automatisiert mit dem MagNA Pure LC Instrument (Roche Diagnostics) extrahiert. 4 x 1 ml Serum wurden parallel extrahiert und die DNA gepoolt. Nach der Bisulfit-Konversion wurde die DNA in 50 µl Elutionspuffer aufgenommen und 10 µl pro PCR eingesetzt, dies entspricht 0,8 ml Serum-Äquivalent.

#### **3.3 Isothermale genomweite Amplifikation von DNA**

Chromosomale DNA wurde mit dem GenomiPhi Kit (Amersham Biosciences) unter Verwendung der phi29 DNA-Polymerase genomweit amplifiziert. Dabei erfolgte eine 500- bis 1000-fache Vervielfachung der Ausgangs-DNA. Die in der Reaktion entstehende DNA enthält keine Methylcytosin und kann als Standard für nicht methylierte DNA verwendet werden. Gemäß der Anweisung des Herstellers wurden 1-10 ng chromosomale DNA in 10 µl Proben-Puffer gelöst, 3 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gestellt. 1 µl phi29 DNA-Polymerase wurde mit 9 µl Enzym-Puffer gelöst und anschließend mit der Probe gemischt. Die Reaktion erfolgte 18 Stunden über Nacht bei 37°C und wurde anschließend 10 Minuten bei 65°C deaktiviert.

#### **3.4 Herstellung universell methylierter DNA**

Vollständig methylierte humane, sowie murine DNA von BL6 und SD7-Mäusen wurde durch eine genomweite Methylierung von CpGs mittels Sssl-DNA-Methyltransferase (New England Biolabs) hergestellt. 5 µg chromosomale oder phi29-DNA wurden in 20µl Reaktionsansatz mit 5U Sssl und 160 mM S-Adenosyl-Methionin (SAM) bei 37°C inkubiert. Nach 3 Stunden wurden nochmals 5U Enzym sowie die gleiche Menge SAM nachdosiert und der Ansatz für weitere 14 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 65°C für 10 min. Alternativ wurde humane universell methylierte DNA von der Firma Chemicon International bezogen (CpGenome™ Universal Methylated DNA).

### 3.5 Herstellung von Bisulfit-DNA

Die Umwandlung genomischer DNA in die bisulfit-konvertierte DNA-Sequenz basiert auf der erstmals von Frommer beschriebenen Methode (Frommer et al. 1992). Die Behandlung weniger, aus Mausembryonen gewonnener Zellen erfolgte nach der Agarosemethode, einem nach Frommer adaptierten Protokoll von Olek und seinen Mitarbeitern (Olek et al. 1996).

Die Verwendung bisulfit-konvertierter DNA in Realtime-PCRs erfordert eine Bisulfit-Behandlung nach einem von der Epigenomics AG patentierten Verfahren, das ebenfalls auf der Methode von Frommer basiert (Berlin et al. 2005). Dabei werden max. 2 µg DNA in 100 µl Wasser vorgelegt und mit 354 µl Bisulfit-Lösung (5,89 mol/l) sowie 146 µl Dioxan (enthält Radikalfänger 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchromane-2-Carboxyl-Säure, 98,6 mg / 2,5 ml) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde sorgfältig gemischt und für 3 min bei 99 °C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Stunden bei 50 °C inkubiert, wobei nach 30 min, 1,5 h und 3 h jeweils für 3 min bei 99 °C eine weitere Denaturierung erfolgte. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl Wasser verdünnt und in zwei Schritten über einen Membranfilter (Millipore, Microcon YM30) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Zur Desulfonierung der DNA wurden 100 µl einer 0,2 M NaOH-Lösung auf die Filtermembran gegeben und für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit 400 µl Wasser wurde die DNA in 50 µl Wasser (50 °C) nach den Angaben des Herstellers eluiert. Die Vorteile dieser Methode sind die hohe Umwandlungsrate, die gute Reproduzierbarkeit sowie hohe Ausbeuten. Im Gegensatz zum agarose-basierten Verfahren kann diese DNA mittels UV genau quantifiziert und pipettiert werden. Auch ermöglicht dieses Verfahren die Verwendung hoher Volumina in der Realtime-PCR, ohne inhibierende Komponenten einzutragen.

### 3.6 Herstellung von SafeBis-DNA

Um bisulfit-konvertierte DNA in PCR-Systemen mit UNG-Kontaminationskontrolle verwenden zu können, wurde ein Protokoll zur Herstellung sulfonierter DNA (SafeBis-DNA) entwickelt. Wesentlicher Unterschied zur Herstellung von Bisulfit-DNA ist, dass die DNA nach der Bisulfit-Behandlung nicht desulfoniert wird. Dazu wurden 0,5 µg gereinigte DNA in 100 µl Wasser gelöst und 354 µl Bisulfit-Lösung (5,89 mol/l) sowie 146 µl Dioxan (enthält Radikalfänger 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchromane-2-Carboxyl-Säure, 98,6 mg / 2,5 ml) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde sorgfältig gemischt und für 3 min bei 99 °C denaturiert. Anschließend wurde der Ansatz für 5 Stunden bei 50 °C inkubiert, wobei nach 30 min, 1,5 h und 3 h jeweils für 3 min bei 99 °C eine weitere Denaturierung erfolgte. Anschließend wurde der Ansatz mit 200 µl Wasser verdünnt und in zwei Schritten über einen Membranfilter (Microcon YM30) nach den Angaben des Herstellers gereinigt. Nach weiterem zweimaligen Waschen mit 400 µl Wasser wurde die DNA in 50 µl Wasser (50 °C) nach den Angaben des Herstellers eluiert.

### 3.7 Gelelektrophorese

Für die Gelelektrophorese wurden 2,5 %ige Agarosegele mit 1x TBE-Puffer und 0,07 µg/ml Ethidiumbromid hergestellt. Vom PCR-Produkt wurden 8 µl unter Zusatz von 2 µl Ladepuffer aufgetragen und

mit einer Spannung zwischen 80 und 130 V aufgetrennt (Sambrook et al. 1989). Zur Identifizierung der Fragmentgrößen wurde eine 100 bp-Leiter eingesetzt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

### **3.8 Berechnung von Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden**

Die Berechnung der theoretischen Schmelztemperaturen basiert auf der Nearest-Neighbour-Methode (Breslauer et al. 1986, Sugimoto et al. 1996). Dazu wurde die Analyse-Software OligoCalc benutzt, die frei im Internet zugänglich ist (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). Die Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden mit Basenfehlpaarungen wurden mit der Software MeltCalc<sup>®</sup> berechnet (Schütz und von Ahsen 1999).

### **3.9 Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Bestimmung der Konzentrationen von chromosomaler DNA, Bisulfit-DNA, SafeBis-DNA sowie Oligonukleotiden erfolgte mittels UV-Absorption bei 260 nm. Mit Hilfe des Spektrophotometers Naondrop ND-1000 wurden jeweils 2 µl des unverdünnten Analyten vermessen. Für einzelsträngige DNA wurde eine optische Dichte von 1 OD<sub>260</sub> = 33 µg/ml sowie für doppelsträngige DNA 1 OD<sub>260</sub> = 50 µg/ml angewendet. Die Berechnung der Konzentration von Oligonukleotiden erfolgte aus der Absorption bei 260 nm und dem spezifischem molaren Extinktionskoeffizienten nach der Formel  $c = E / (d \cdot \epsilon)$ , mit E = Absorption bei 260 nm, d = Schichtdicke (cm),  $\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient ( $l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Der molare Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe der Software OligoAnalyzer 3.0 ermittelt ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)).

### **3.10 Herstellung der Standard-DNA zur Quantifizierung**

Die DNA-Quantifizierung mittels Realtime-PCR erfolgte unter Verwendung einer externen Standard-DNA aus bisulfit-konvertierter universell methylierter DNA (Kap. 3.4, 3.5). Die Konzentration der Standard-DNA wurde mittels Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe erfolgte durch die Erhöhung des Gesamtvolumens, nicht durch serielle Verdünnung. Dies ist sinnvoll, um die Fortpflanzung systematischer Fehler, beispielsweise von Pipettenungenauigkeiten, zu vermeiden. Zur Verdünnung der Standard-DNA wurde Poly-A (5 ng/µl, Roche Diagnostics) als Trägersubstanz verwendet, um Verluste durch Adhäsion der DNA an den Gefäßoberflächen zu vermeiden. Unverdünnte Standard-DNA wurde bei -20 °C gelagert und nicht öfter als 3 mal aufgetaut.

### **3.11 DNA-Mischungen aus methylierter und nicht methylierter DNA**

Zur Kalibrierung quantitativer Realtime-PCRs (QM-Assays) wurden Mischungen mit definiertem Anteil aus methylierter und nicht methylierter DNA hergestellt. Für humane PCRs wurde bisulfit-behandelte universell methylierte humane DNA (Kap. 3.4) mit bisulfit-behandelter humaner PBL-DNA (Roche Diagnostics) gemischt. Pro PCR wurden 10 ng Gesamt-DNA mit 0, 0,5, 1, 5, 25, 50, 75, und 100% Anteil

methylierter DNA. Die Messung von Anteilen mit 0,1 % und weniger erfolgte im gleichen Volumen mit 50 ng Gesamt-DNA.

Um Standard-DNA für die Gene H19 und IGF2 der Mausstämmen BL6 und SD7 zu erhalten, wurden zunächst 10 ng chromosomale DNA in eine isothermale genomweite Amplifikation eingesetzt. Anschließend wurde ein Teil der phi29-DNA mit SssI-DNA-Methyltransferase (New England Biolabs) methyliert während der zweite Teil nicht mit Enzym behandelt wurde (Mock-DNA). Anschließend wurde die methylierte und nicht methylierte phi29-DNA quantifiziert und daraus Mischungsreihen mit 0, 5, 10, 25, 50, 75, 90 und 100 % Anteil methylierter DNA hergestellt.

### **3.12 Berechnung des Anteils methylierter DNA**

Der Grad der Methylierung einer DNA-Sequenz wird als PMR-Wert (engl. percent methylated reference) angegeben. Die Bestimmung des PMR-Wertes erfolgt durch die Berechnung des Verhältnisses aus methylierter DNA einer untersuchten Region zur Gesamt-DNA der Probe. Zur Messung der Gesamt-DNA wird eine methylierungsunspezifische PCR, basierend auf einem Referenz-Gen, verwendet, während in der zweiten PCR genspezifisch methylierte DNA quantifiziert wird. Setzt man die gefundenen DNA-Mengen ins Verhältnis, erhält man den PMR-Wert (Eads et al. 2001).

### **3.13 Statistische Methoden**

#### **3.13.1 Darstellung klinischer Daten im Box-Whisker-Plot**

Die Darstellung der klinischen Daten erfolgte mit dem Box-Whisker-Plot. Lage- und Streuungsmaße verschiedener Stichproben werden durch ein Rechteck (Box) und die sogenannten Whiskers (Schnurrhaare) dargestellt. In der Arbeit folgen die Darstellungen folgenden Regeln: Die Box umfasst 50 % der Daten und wird durch das untere und obere Quartil begrenzt. Innerhalb der Whisker liegen 90 % der Daten. Der Median ist als waagerechte Linie, der Mean als Quadrat innerhalb der Box dargestellt. Die Box-Whisker-Plots in dieser Arbeit wurden mit Hilfe der Software OriginPro 7.5 erzeugt.

#### **3.13.2 Bewertung der diskriminierenden Eigenschaften eines Assays mit dem Fisher-Score**

Der Fisher Score gibt an, mit welcher Sicherheit zwei Messwerte unterschiedlichen Klassen angehören (Fisher 1936). Im Falle des Methylierungsindex wird ermittelt, ob der mit einem Assay gemessene Unterschied zwischen zwei Proben mit unterschiedlicher Methylierungsrate auch signifikant ist. Dazu wird die Differenz der Messwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen ins Verhältnis gesetzt. Der Fisher Score berechnet sich aus den Medianen zweier Messwertgruppen  $M_1$  und  $M_2$  und den dazugehörigen Standardabweichungen  $SD_1$  und  $SD_2$  wie folgt:  $F_s = (M_1 - M_2)^2 / (SD_1^2 + SD_2^2)$ . Je größer der Fisher Score ist, desto sicherer werden zwei Proben voneinander unterschieden, d.h., desto besser sind die diskriminierenden Eigenschaften des Assays im getesteten Messbereich.

### 3.13.3 Ermittlung des analytischen und relativen Detektionslimits mit der Probit-Regression

Die Probit-Regression basiert auf der kumulierten Standard-Normalverteilungsfunktion und bildet iterativ eine Regressionskurve durch die gegebenen Datenpunkte (Finney 1977). Die Methode kann zur Ermittlung der Sensitivität einer Messmethode herangezogen werden. Dafür werden die positiven Ergebnisse des Tests als Antwortsignal auf einen Analyten gemessen. Der Analyt wird dazu in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt und die Messung in großer Anzahl wiederholt. In der Arbeit wurde das Detektionslimit von Realtime-HM-Assays durch die häufig wiederholte Messung geringer DNA-Mengen bestimmt. Als Ergebnis der Probit-Regression erhält man das Detektionslimit einer PCR als diejenige Menge DNA, welche mit 90 % Wahrscheinlichkeit detektiert wird (LOD90). Analog können auch andere Wahrscheinlichkeiten ermittelt werden, wie z.B. die LOD50; das ist die DNA-Menge, die mit 50 % Wahrscheinlichkeit detektiert wird. Innerhalb des angegebenen Konfidenzintervalls ist das Ergebnis mit 95 % Wahrscheinlichkeit richtig. Das Konfidenzintervall wird umso enger, je höher die Anzahl der Wiederholungen ist. Um genaue Ergebnisse zu erzielen, sollten die getesteten DNA-Konzentrationen in der Nähe des zu erwarteten Detektionslimits liegen und eine große Anzahl von Wiederholungen umfassen.

Wenn nicht anders beschrieben, wurde das analytische Detektionslimit aus je 16 Messungen folgender Mengen methylierter DNA ermittelt: 0 pg, 6,25 pg, 12,5 pg, 25 pg, 50 pg. Um Verluste durch Adhäsion an der Gefäßoberfläche zu vermeiden, erfolgte die Verdünnung in Poly-A (5 ng/µl) als Trägersubstanz. Als positiv wurden alle PCR gewertet, die ein Amplifikationssignal generierten, unabhängig vom CT. Zur Bestimmung des relativen Detektionslimits wurden die gleichen Konzentrationen methylierter DNA unter Zugabe von 50 ng nicht methylierter DNA gemessen. Die in der Arbeit getesteten HM-Assays zeigten keine Methylierung in DNA aus peripherem Blut gesunder Probanden, so dass humane PBL-DNA (Roche Diagnostics) als nicht methylierte DNA verwendet werden konnte. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm SPSS 13.0<sup>®</sup> für Windows. Die Ergebnisse wurden anschließend in MS Excel<sup>®</sup> exportiert und visualisiert.

### 3.14 Realtime-PCR-Protokolle und DNA-Sequenzen

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biotech GmbH (Ebersberg, Deutschland) oder TIB Molbiol GmbH (Berlin, Deutschland) bezogen. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Realtime-PCRs in einem Volumen von 20 µl im LightCycler 1.2 (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der LightCycler Software 3.5. Sofern im Text nicht anders beschrieben, wurden die Reaktionen mit Hybridisierungssonden im Kanal F2 (640 nm) bzw. F3 (705 nm) detektiert und gegen den Kanal F1 (530 nm) normalisiert, Reaktionen mit SYBR Green (Molecular Probes) im Kanal F1 (530 nm) analysiert. Die Abkürzungen bedeuten: FL-Fluoreszein, LCred640=LightCycler-Farbstoff Red640, LCred705=LightCycler-Farbstoff Red705). Die CT wurden im automatischen Modus nach der Methode der 2. Ableitung (second derivate method) ermittelt.

## 3.14.1 GSTp1-HeavyMethyl-Assay I

Nr.	Name	DNA-Sequenz	Funktion	Hersteller
1	GSTP1.4F6	GGGAAAGAGGGAAAGGTTTTTTT	Primer	MWG
2	GSTP1.4R3	CTCCRCCCCAATACTAAATCAC	Primer	MWG
3	GSTP1.4fluo3	CGGTCGACGTTCCGG-FL	Sonde	TIB Molbiol
4	GSTP1.4red3	LCred640-TAGCGGTGTCGGG-PH	Sonde	TIB Molbiol
5	GSTP1.4B10	CCCCAATACTAAATCACAACACCAACCA-PH	Blocker	MWG

**Mastermix:** 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (Qiagen), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 Unit HotStart Taq (Qiagen), 200 nM dNTP (Fermentas), 0,25 mg/ml BSA (Sigma Aldrich), je 0,3 µM Primer, je 0,25 µM Sonde, 4 µM Blocker.

**PCR-Programm:** Die Reaktion wurde im LightCycler 1.2 durchgeführt. Nach 15 min Denaturierung folgten 55 Zyklen mit 10s 95 °C / 20s 48 °C / 10s 72 °C (Heizrate 20 °C/s). Die Detektion erfolgte bei 640 nm bei 48 °C.

Im Anschluß an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 10s 95 °C, 10s 40 °C, 10s 75 °C ( 0,1 °C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 640 nm.

## 3.14.2 GSTp1-HeavyMethyl-Assay II

Nr.	Name	DNA-Sequenz	Funktion	Hersteller
6	GSTP1.10F1	GGGATTATTTTTATAAGGTT	Primer	MWG
7	GSTP1.10R5	TACTAAAACTCTAAACCCCATC	Primer	MWG
8	GSTP1.10B107	CCCATCCCCAAAAACACAAACCACACAT-PH	Blocker	MWG
9	GSTP1.10fluo1	TTCGTCGTCGTAGTTTTTCGTT-FL	Sonde	TIB Molbiol
10	GSTP1.10red1	LCred640-TAGTGAGTACGCGGGT-PH	Sonde	TIB Molbiol

**Mastermix:** 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µM Primer GSTP1.10F1, 0,3 µM Primer GSTP1.10R5, je 0,15 µM Sonde, 4 µM Blocker.

**PCR-Programm:** Die Reaktion wurde im LightCycler 1.2 durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 55 Zyklen mit 10s 95 °C / 30s 56 °C / 10s 72 °C (Heizrate 20 °C/s). Die Detektion erfolgte bei 640 nm bei 56 °C.

Im Anschluß an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 10s 95 °C, 10s 40 °C, 10s 75 °C ( 0,1°C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 640 nm.

## 3.14.3 GSTp1-HeavyMethyl-Assay III

Nr.	Name	DNA-Sequenz	Funktion	Hersteller
6	GSTP1.10F1	GGGATTATTTTTATAAGGTT	Primer	MWG
11	GSTP1.10R8	CCCATACTAAAACTCTAAAC	Primer	MWG
12	GSTP1.10B201	CTAAACCCCATCCCCAAAAACACAAACCACACA-PH	Blocker	MWG
13	GSTP1.10fluo2	AGTTTCGTCGTCGTAGTTTTTCGTT-FL	Sonde	TIB Molbiol
14	GSTP1.10red2	LCred640-TAGTGAGTACGCGGGTTCG-PH	Sonde	TIB Molbiol

**Mastermix:** 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,3 µM Primers, je 0,15 µM Sonde, 4 µM Blocker.

**PCR-Programm:** Die Reaktion wurde im LightCycler 1.2 durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 55 Zyklen mit 10s 95 °C / 30s 56 °C / 10s 72 °C (Heizrate 20 °C/s). Die Detektion erfolgte bei 640 nm bei 56 °C.

Im Anschluß an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 10s 95 °C, 10s 40 °C, 10s 75 °C ( 0,1°C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 640 nm.

### 3.14.4 Duplex-Reaktion aus GSTp1-HM-Assay und Referenz-Assay

Nr.	Name	DNA-Sequenz	Funktion	Hersteller
6	GSTP1.10F1	GGGATTATTTTTATAAGGTT	Primer	MWG
7	GSTP1.10R5	TACTAAAAACTCTAAACCCCATC	Primer	MWG
8	GSTP1.10B107	CCCATCCCCAAAAACACAAACCACACAT-PH	Blocker	MWG
9	GSTP1.10fluo1	TTCGTCGTCGTAGTTTTCGTT-FL	Sonde	TIB Molbiol
10	GSTP1.10red1	LCred640-TAGTGAGTACGCGCGGTT-PH	Sonde	TIB Molbiol
15	GSTP1.C3F	GGAGTGGAGGAAATTGAGAT	Primer	MWG
16	GSTP1.C3R	CCACACAACAAACTCAAAAC	Primer	MWG
17	GSTP1.C3flou	GTTTAAGGTTAAGTTTGGGTGTTTGTA-FL	Sonde	TIB Molbiol
18	GSTP1.C3red	LCred705-TTTTGTTTTGTGTTAGGTTGTTTTTAGG-PH	Sonde	TIB Molbiol

**Mastermix:** 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,0 µM Primer GSTP1.10F1, 0,3 µM Primer GSTP1.10R5, 4 µM Blocker GSTP1.10B107, 0,1 µM Primer GSTP1.C3F und GSTP1.10C3R, je 0,15 µM Sonde.

**PCR-Programm:** Die Reaktion wurde im LightCycler 1.2 durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 55 Zyklen mit 10s 95 °C / 30s 56 °C / 10s 72 °C (Heizrate 20 °C/s). Die Detektion erfolgte bei 640 nm (methylierte DNA) und 705 nm (Gesamt DNA) bei 56 °C.

Im Anschluß an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 10s 95 °C, 10s 40 °C, 10s 75 °C ( 0,1°C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 640 nm.

### 3.14.5 Duplex-Reaktion aus GSTp1-HM-Assay und PTGER4-HM-Assay

Nr.	Name	DNA-Sequenz	Funktion	Hersteller
6	GSTP1.10F1	GGGATTATTTTTATAAGGTT	Primer	MWG
11	GSTP1.10R8	CCCATACTAAAAACTCTAAAC	Primer	MWG
12	GSTP1.10B201	CTAAACCCCATCCCCAAAAACACAAACCACACA-PH	Blocker	MWG
13	GSTP1.10fluo2	AGTTTCGTCGTCGTAGTTTTCGTT-FL	Sonde	TIB Molbiol
14	GSTP1.10red2	LCred640-TAGTGAGTACGCGCGGTTTCG-PH	Sonde	TIB Molbiol
19	PTGER4.10F	TGGTTATTAATTATGTTTATTTTTATAG	Primer	MWG
20	PTGER4.10R	ACCAAATATCTAAATACTACAACC	Primer	MWG
21	PTGER4.10B2	TACAACCACAAACTACCAAACCCATATTAACAACACAC-PH	Blocker	MWG
22	PTGER4.10fluo	TGGCGGGTTTTACGTTTTTTGTAGT-FL	Sonde	TIB Molbiol
23	PTGER4.10red	LCred640-TATGCGTTTAACGTGTTTTTTGCG-PH	Sonde	TIB Molbiol

**Mastermix:** 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,15 µM Primer, 2 µM Blocker GSTP1.10B107, 1,5 µM Blocker PTGER4.10B2, je 0,15 µM Sonde.

**PCR-Programm:** Die Reaktion wurde im LightCycler 1.2 durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 55 Zyklen mit 10s 95 °C / 30s 56 °C / 10s 72 °C (Heizrate 20 °C/s). Die Detektion erfolgte bei 640 nm (methylierte DNA in GSTp1) und 705 nm (methylierte DNA in PTGER4) bei 56 °C.

Im Anschluß an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 10s 95 °C, 10s 40 °C, 10s 75 °C ( 0,1°C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 640 nm.

### 3.14.6 GSTp1-Referenz-Assay

Nr.	Name	DNA-Sequenz	Funktion	Hersteller
15	GSTP1.C3F	GGAGTGGAGGAAATTGAGAT	Primer	MWG
16	GSTP1.C3R	CCACACAACAAATACTCAAAAC	Primer	MWG
17	GSTP1.C3flu	GTTTAAGGTTAAGTTTGGGTGTTTGTA-FL	Sonde	TIB Molbiol
18	GSTP1.C3red	LCred705-TTTTGTGTTTGTGTTAGGTTGTTTTTAGG-PH	Sonde	TIB Molbiol
<b>Mastermix:</b> 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3,5 mM MgCl <sub>2</sub> , je 0,3 µM Primer, je 0,15 µM Sonde.				
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im LightCycler 1.2 durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 55 Zyklen mit 10s 95 °C / 30s 56 °C / 10s 72 °C (Heizrate 20 °C/s). Die Detektion erfolgte bei 705 nm bei 56 °C.				

### 3.14.7 Allelspezifischer QM-Assay für IGF2/DMR2, Mus Musculus

Zwei allelspezifische Varianten dieses Assays wurden verwendet. Sie unterscheiden sich in der für den BL6- bzw. SD7-Stamm verwendeten spezifischen Donor-Sonde. Die Tabelle zeigt den BL6-spezifischen QM-Assay für IGF2/DMR2. Die Allelspezifität des BL6-Assays wird durch die Polymorphismen (grau unterlegt) an den Positionen 8 (T/A) und 15 (G/T) der Sonde 26 erreicht. Der SD7-Assay entspricht dem BL6-Assay, mit Ausnahme der der Sonde Nr. 26. Sie wird ersetzt durch die Sequenz TGGTTTTATTGAAITTTTGAGTTTTTG-FL (IGF2-SD7-Fluo, Nr. 29). Die SD7-Sonde Nr. 29 enthält Position 15 ein Inosin, da durch den G/T-Polymorphismus an dieser Stelle ein zusätzliches CpG entsteht.

Nr.	Name	Sequenz	Funktion	Hersteller
24	IGF2-F	TTATTGATGGTTGTTGGATATTTT	Primer	MWG
25	IGF2-R	AAAACCTACCTACCCTCCTA	Primer	MWG
26	IGF2-BL6-Fluo	TGGTTTTTTGAATTTTGGAGTTTTTTG-FL	allelspezifische Sonde	TIB Molbiol
27	IGF2-Red640	LCred640-TAAGTATGCGATTTTCGGCGG-PH	methylierungs-spezifische Sonde	TIB Molbiol
28	IGF2-Red705	LCred705-TAAGTATGTGATTTTGGTGGGTAT-PH	methylierungs-spezifische Sonde	TIB Molbiol
<b>Mastermix:</b> 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3 mM MgCl <sub>2</sub> , je 0,6 µM Primer, je 0,15 µM Sonde.				
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im Lightcycler 1.2 durchgeführt mit 10 min Denaturierung, 50 Zyklen mit 10s 95 °C / 30s 56 °C / 0s 58 °C / 10s 72 °C (Heizrate 20 °C/s). Die Detektion erfolgte bei 640 nm und 705 nm bei 58 °C.				

### 3.14.8 Allelspezifischer QM-Assay für H19, Mus Musculus

Verwendet wurden zwei allelspezifische QM-Assays für H19. Die Amplifikation erfolgte mit identischen Primern für beide Mausstämmen. Für BL6 erfolgte die Detektion mit den in der Tabelle angegebenen Sonden, für SD7 wurden folgende Sonden verwendet: FL-TCCCCTATTACACATAACAAC-PH (H19-SD7-Fluo, Nr. 35), ACCGCGCGATAACATCCG-LCred640 (H19-SD7-640, Nr. 36) und ACCACCACACAATAACATCA-LCred705 (H19-SD7-705, Nr. 37). Die Allelspezifität der Assays wird durch die Polymorphismen (grau unterlegt) an den Position 17 (A/G) der Sonde Nr.32, bzw. 35 erreicht.

Nr.	Name	Sequenz	Funktion	Hersteller
30	H19-F	TTAAAAATTAGTTAGTGTGGTTT	Primer	MWG
31	H19-R	CCCAAATTAACAACATTTAAA	Primer	MWG
32	H19-BL6-Fluo	GTTGTTATGTGTAATAAGGGA-FL	allelspezifische Sonde	TipMolBiol
33	H19-BL6-640	LCred640-CGGATGTTATCGCGCGGT-PH	methylierungs-spezifische Sonde	TipMolBiol
35	H19-BL6-705	LCred705-TGGATGTTATTGTGTGGTGG-PH	methylierungs-spezifische Sonde	TipMolBiol

**Mastermix:** 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,6 µM Primer, je 0,3 µM LightCycler-Sonde.

**PCR-Programm:** Die Reaktion wurde im Lightcycler 1.2 durchgeführt mit 10 min Denaturierung, 50 Zyklen mit 10s 95 °C / 30s 54 °C / 0s 56 °C / 10s 72 °C (Heizrate 20 °C/s). Die Detektion erfolgte bei 640 nm und 705 nm bei 56 °C.

### 3.14.9 TMEFF2-QM-Assay

Nr.	Name	Sequenz	Funktion	Hersteller
38	TMEFF2-F1	AAAAAAAAAAAACTCCTCTACATAC	Primer	MWG
39	TMEFF2-R1	GGTTATTGTTTGGGTTAATAAATG	Primer	MWG
40	TMEFF2-Taq1	HEX-TCAACCAAACAACAACATCCAA-BHQ1	Sonde	TibMolBiol
41	TMEFF2-Taq2	FAM-TTCGGACGTCGTTGTTCCGG-BHQ1	Sonde	TibMolBiol

**Mastermix:** 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,6 µM Primer, je 0,2 µM Sonde.

**PCR-Programm:** Die Reaktion wurde im ABI 7900 (96 Platte, ohne ROX) durchgeführt mit 10 min Denaturierung, 45 Zyklen mit 15s 95 °C / 30s 56 °C / 30s 72 °C (Heizrate 100 %). Die Detektion erfolgte bei 72 °C mit den Detektoren für Vic- und Fam-Farbstoff.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der SDS Software 2.2. Die Abkürzungen bedeuten: FAM=6-Carboxyfluorescein, HEX=6-Hexachlorofluorescein, BHQ1=BlackHoleQuenche1. Die CT wurden nach manueller Festlegung des Threshold ermittelt.

## 3.14.10 TMEFF2-HQM-Assay

Nr.	Name	Sequenz	Funktion	Hersteller
38	TMEFF2-F1	AAAAAAAAAAAACTCCTCTACATAC	Primer	MWG
39	TMEFF2-R1	GGTTATTGTTTGGGTTAATAAATG	Primer	MWG
40	TMEFF2-B1	ACATACACCACAAATAAATTACCAAAAACATCAACCAA-pho	Blocker	MWG
42	TMEFF2-Taq2	FAM-TTCGGACGTCGTTGTTCCGG-BHQ1	Sonde	TibMolBiol
43	TMEFF2-F2	GAAAGAGAAAGGTTTTTTTGTATAC	Primer	MWG
44	TMEFF2-R2	AATCACTACCTAAACCAACAAATA	Primer	MWG
45	TMEFF2-B2	TGTATACGTCGCGGGTGGGTTGTCGG-PH	Blocker	MWG
46	TMEFF2-Taq3	HEX-CTTCCCAAACACCACTACCCAA-BHQ1	Sonde	TibMolBiol

**Mastermix:** 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,3 µM Primer, je 0,2 µM Sonde sowie je 4 µM Blocker.

**PCR-Programm:** Die Reaktion wurde im ABI 7900 (96 Platte, ohne ROX) durchgeführt mit 10 min Denaturierung, 45 Zyklen mit 15s 95 °C / 30s 56 °C / 30s 72 °C (Heizrate 100 %). Die Detektion erfolgte bei 72 °C mit den Detektoren für Vic- und Fam-Farbstoff.

Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der SDS Software 2.2. Die Abkürzungen bedeuten: FAM=6-Carboxyfluoreszein, HEX=6-Hexachlorofluoreszein, BHQ1=BlackHoleQuenche1. Die CT wurden nach manueller Festlegung des Threshold ermittelt.

## 3.14.11 TMEFF2-HM-Assay

Nr.	Name	DNA-Sequenz	Funktion	Hersteller
38	TMEFF2-F1	AAAAAAAAAAAACTCCTCTACATAC	Primer	MWG
39	TMEFF2-R1	GGTTATTGTTTGGGTTAATAAATG	Primer	MWG
40	TMEFF2-B1	ACATACACCACAAATAAATTACCAAAAACATCAACCAA-PH	Blocker	MWG
47	TMEFF2-fluo	TTTTTTTTTTCGGACGTCGTT-FL	Sonde	TibMolBiol
48	TMEFF2-red	LCred640-TCGGTCGATGTTTTTCGGTAA-PH	Sonde	TibMolBiol

**Mastermix:** 20 µl enthielten 1x PCR-Puffer (FastStart HybProbe Master, Roche Diagnostics), 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 0,3 µM Primer, je 0,15 µM Sonde, 4 µM Blocker.

**PCR-Programm:** Die Reaktion wurde im LightCycler 1.2 durchgeführt. Nach 10 min Denaturierung folgten 55 Zyklen mit 10s 95 °C / 30s 56 °C / 10s 72 °C (Heizrate 20 °C/s). Die Detektion erfolgte bei 640 nm bei 56 °C.

Im Anschluß an die PCR folgte eine Schmelzkurvenanalyse mit 10s 95 °C, 10s 40 °C, 10s 75 °C (0,1°C/s) und kontinuierlicher Detektion bei 640 nm.

### 3.14.12 Duplex-Voramplifikation von H19 und IGF2/DMR2, Mus Musculus

Die Voramplifikation von DNA erfolgte mit einer konventionellen PCR auf einem Eppendorf-Mastercycler. Die Duplex-Voramplifikation aus H19 und IGF2-Primern diente der Anreicherung der genspezifischen Sequenzen aus primordialen Keimzellen.

Nr.	Name	Sequenz	Funktion	Hersteller
24	IGF2-F	TTATTGATGGTTGTTGGATATTTT	Primer	MWG
25	IGF2-R	AAAACCTACCTACCCTCCTA	Primer	MWG
30	H19-F	TTAAAAATTAGTTAGTGTGGTTT	Primer	MWG
31	H19-R	CCCAAATTAACAACATTTAAA	Primer	MWG
<b>Mastermix:</b> 25 µl enthielten 1x PCR-Puffer (Qiagen), 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 Unit HotStart Taq (Qiagen), 200 nM dNTP (Fermentas), je 0,3 µM Primer.				
<b>PCR-Programm:</b> Die Reaktion wurde im Mastercycler (Eppendorf) durchgeführt mit 15 min Aktivierung bei 95 °C und anschließend 40 Zyklen mit 20s 95 °C / 40s 52 °C / 20s 72 °C.				

### 3.15 PCR-Kontaminationsvermeidung durch UNG

Die Verwendung von SafeBis-DNA zur Methylierungsanalyse erlaubt die PCR-Kontaminationsvermeidung mit Hilfe von Uracil-DNA-Glycosylase (UNG). Dabei werden Änderungen im Ablauf der Methylierungsanalyse notwendig. Die zu analysierende DNA darf nicht desulfoniert werden. In die PCR muss nicht desulfonierte Bisulfit-konvertierte eingesetzt werden, sogenannte SafeBis-DNA. Pro 20 µl PCR-Mastermix werden 0,2 U UNG (Roche Diagnostics) zugegeben. Der verschlossene Reaktionsansatz wird für 10 min bei 37 °C inkubiert. Dabei werden potentiell kontaminierende PCR-Produkte zerstört. Anschließend erfolgt die Desulfonierung der SafeBis-DNA im PCR-Puffer durch 30 min Inkubation bei 95 °C. Während dieser initialen Denaturierungsphase wird gleichzeitig die Hotstart-Taq-Polymerase aktiviert und die UNG deaktiviert. Das Temperatur-Zeit-Profil der PCR bleibt danach unverändert. PCR-Kontaminationen können nur dann neutralisiert werden, wenn die PCR-Produkte Uracil enthalten. Deshalb ist es erforderlich, in allen PCRs dUTP anstelle von dTTP einzusetzen. In dieser Arbeit wurden alle HM-Assays unter Verwendung des FastStart LightCycler Kit für Hybridisierungssonden durchgeführt, der 600 nM dUTP enthält.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Übertragung der HeavyMethyl-Technologie in das Realtime-PCR-Format

#### 4.1.1 Optimierung der Komponenten des GSTp1-HeavyMethyl-Assays

##### 4.1.1.1 Einfluß des Temperatur-Zeit-Profiles

Die Etablierung eines HM-Assays in das Realtime-PCR erforderte im ersten Schritt die Optimierung des Temperatur-Zeit-Profiles der Amplifikation. Dazu wurden in verschiedene PCR-Programme mit dem GSTp1-HeavyMethyl-Assays I getestet (Kap. 3.14). Ausgangspunkt war das Programm Nr.1 in Tabelle 3. Die Dauer von Denaturierung, Annealing und Extension wurde einzeln variiert, alle anderen Parameter blieben unverändert. Die CT-Werte von 200 pg methylierter DNA und 200 pg methylierter DNA gemischt in 400 ng nicht methylierter DNA (1:2000) wurden in zwei Wiederholungen aufgenommen.

Niedrigere CT-Werte ergaben eine Verbesserung der PCR-Effizienz im Vergleich zu der des Ausgangsprogramms Nr. 1. Den größten Einfluss hatte die Änderung der Annealingzeit. Durch deren Verlängerung auf 30 Sekunden konnten Signale zwei Zyklen früher gemessen werden. Dagegen wurden bei Verkürzung der Annealingzeit CTs vier Zyklen später gemessen. Als optimales Temperatur-Zeit-Profil wurde deshalb das Programm Nr. 5 ausgewählt und für alle weiteren PCRs dieser Arbeit verwendet.

**Tabelle 3:** Einfluß des PCR-Programms auf die CT des GSTp1-HM-Assays I.

Programm Nr.	Temperatur - Zeit - Profil			$\Delta CT^{1)}$ 200 pg	$\Delta CT^{2)}$ 1:2000
	Denaturierung [s]	Annealing [s]	Extension [s]		
1 <sup>3)</sup>	10	20	10	/	/
2	5	20	10	-0,6	1,1
3	15	20	10	-0,2	0,6
4	10	10	10	3,9	4,8
5	10	30	10	-2,3	-2,8
6	10	20	20	-1,0	-0,7

<sup>1)</sup> Die Differenz der CTs im Vergleich zu Programm Nr. 1 ergibt sich aus dem Mittelwert von 2 Wiederholungen mit 200 pg methylierter DNA.

<sup>2)</sup> Differenz der CTs aus den Mittelwerten von 2 Wiederholungen mit 200 pg methylierter DNA in 400 ng nicht methylierter DNA.

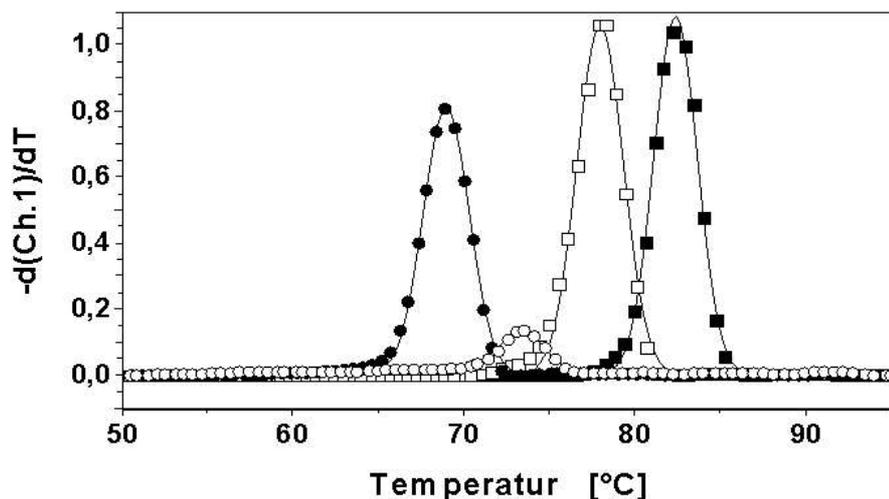
<sup>3)</sup> Programm Nr. 1 war Ausgangspunkt der Analyse und diente als Bezugspunkt.

##### 4.1.1.2 Entwurf der Primer

Der GSTp1-HeavyMethyl-Assay I ist im Promotorbereich des Gens lokalisiert. Aufgabe dieser Arbeit war es, einen neuen HM-Assay im Bereich des Exon 1 zu etablieren. Die neuen Sequenzen des HeavyMethyl-Assays wurden entsprechend der bisulfit-konvertierten Sequenz des humanen GSTp1-Gens (GenBank Accession Number X08058) entworfen. Es wurden 3 Vorwärts- und 6 Rückwärtsprimer getestet, die das Exon1 des GSTp1-Gens flankieren. Die Primer enthielten keine CG-Dinukleotide, ihre theoretischen Schmelztemperaturen lagen zwischen 46 °C und 52 °C. Die Funktion der Primer wurde

mittels einer SYBR-Green basierten Realtime-PCR im LightCycler überprüft. Jede Primerkombination wurde mit 100 pg humaner bisulfit-konvertierter DNA sowie 100 pg universell methylierter bisulfit-konvertierter DNA getestet. Als Kontrolle dienten 10 ng nicht konvertierter humaner DNA sowie Reaktionen ohne Templat.

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer Schmelzkurve analysiert. PCR-Produkte von methylierter DNA zeigten einen Schmelzpunkt von  $T_m=83\text{ }^\circ\text{C}$ , die von nicht methylierter DNA einen Schmelzpunkt von  $T_m=78\text{ }^\circ\text{C}$  (Abb. 6). Die Auswertung der CTs erfolgte nur für die Reaktionen, in denen spezifische PCR-Produkte entstanden waren, das heißt, deren Schmelzkurven einen Einzelpeak aufwiesen. Weiterhin wurden nur solche Primerkombinationen berücksichtigt, in denen die Amplifikation von 10ng nicht konvertierter DNA nicht oder mindestens 10 Zyklen später als die von 100 pg methylierter DNA detektiert wurde. Das Paar aus dem Vorwärtsprimer F1 und dem Rückwärtsprimer R5 erfüllte diese Kriterien und wies die niedrigsten CT-Werte für methylierte und nicht methylierte DNA auf. Sowohl 100 pg methylierter DNA als auch 100 pg nicht methylierte DNA wurden mit einem CT von 34,8 gemessen.



**Abbildung 6:** Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte der Primer F1 und R5 für GSTp1. Dargestellt ist die erste Ableitung der Fluoreszenz-Signale von SYBR-Green in Abhängigkeit von der Temperatur. Amplifiziert wurden 100 pg humaner bisulfit-konvertierter DNA (weiße Quadrate) und 100 pg universell methylierter bisulfit-konvertierter DNA (schwarze Quadrate), 10ng nicht konvertierter humaner DNA (schwarze Kreise) sowie Reaktionen ohne Templat (weiße Kreise).

#### 4.1.1.3 Entwurf des Blockers

Um eine methylierungsspezifische Amplifikation erzeugen zu können, wurden 3'-Phosphat-modifizierte Oligonukleotide, sogenannte Blocker, entworfen. Die Lage der Blocker wurde so gewählt, dass sie die CpGs des Exon 1 überspannen und Teile der Sequenz des Rückwärtsprimers R5 enthalten. Die Schmelztemperatur der Blocker wurde 15 – 20 °C über der der Primer gewählt. Die Wirkungsweise von 5 verschiedenen Blockern wurde in einer Realtime-PCR basierend auf SYBR-Green untersucht. Der Test der Blocker erfolgte in Reaktionsansätzen mit 100 ng nicht methylierter DNA und 100 pg methylierter DNA. Als nicht methylierte DNA wurde PBL-DNA verwendet. Die Unterdrückung der Amplifikation nicht methylierter DNA wurde als Erhöhung der CTs nach Zugabe von 4  $\mu\text{M}$  Blocker gemessen.

**Tabelle 4:** Bestimmung der Effizienz verschiedener Blocker für den GSTp1-HM-Assay.

Name	Sequenz <sup>1)</sup>	T <sub>m</sub> [°C]	Länge des Überlapp <sup>2)</sup>	CT 100ng nicht methylierter DNA	CT 100 pg methylierter DNA
ohne Blocker		-	-	23,8	34,8
B18	<u>CATCCC</u> CaAAAACaCaAACCaCaCaT	71,2	6	27,5	36,1
B19	<u>CCATCCC</u> CaAAAACaCaAACCaCaC	71,7	7	29,9	36,0
B20	<u>CCCATCCC</u> CaAAAACaCaAACCaCa	72,9	8	31,1	36,0
B22	<u>CCCATCCC</u> CaAAAACaCaAACCaC	71,6	8	30,4	35,4
B107	<u>CCCATCCC</u> CaAAAACaCaAACCaCaCaT	74,4	8	31,0	35,3

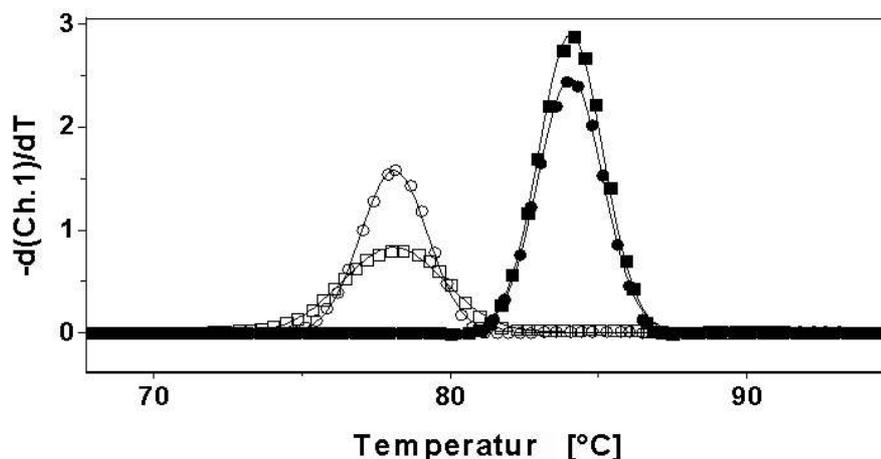
<sup>1)</sup> Die vom Blocker überspannten CpG-Positionen sind rot, der Überlapp mit dem Primer unterstrichen dargestellt.

<sup>2)</sup> Länge des Überlapp in bp mit der Bindungsstelle für den Rückwärtsprimer.

Die diskriminierenden Eigenschaften des Blockers wurden durch anhand der Inhibierung von 100 pg methylierter DNA eingeschätzt (Tab. 4).

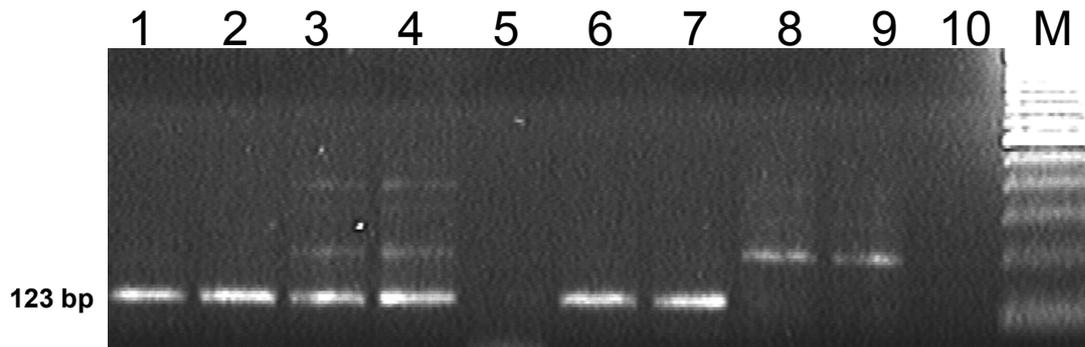
Die beste Blockereffizienz wird erreicht, wenn die Unterdrückung unmethylierter DNA besonders stark, die Inhibition methylierter DNA jedoch möglichst gering ist. Die höchsten Effizienzen wurden für den Blocker B107 gemessen. Er erzeugte auf 100 ng unmethylierter DNA eine Verschiebung des CTs um 7,2 Zyklen, während 100 pg methylierter DNA nur 0,5 Zyklen später als in der Reaktion ohne Blocker detektiert wurden (Tab. 4).

Um den Einfluss des Blockers B107 auf die PCR genauer zu untersuchen, wurden die PCR-Produkte mittels Schmelzkurve analysiert. Die Abbildung 7 zeigt, dass in den Reaktionen mit Blocker B107 die Peakhöhe für unmethylierte PCR-Produkte (T<sub>m</sub> = 78 °C) gegenüber den Reaktionen mit Blocker deutlich reduziert ist. Methylierte DNA (T<sub>m</sub> = 81 °C) zeigt in den Reaktionen mit und ohne Blocker ein unverändertes Schmelzprofil. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit Agarosegel analysiert. PCR-Produkte mit der erwarteten Länge von 123 bp entstanden in allen Reaktionen ohne Blocker. In den Reaktionen mit Blocker B107 entstanden die spezifischen PCR-Produkte nur aus methylierter DNA,



**Abbildung 7:** Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte des GSTp1-HM-Assays. Die PCR-Produkte wurden mit den GSTp1-Primern GSTP1.10F1 und GSTP1.10R5 und mit Blocker GSTP1.10B107 (quadratische Symbole) sowie ohne Blocker (Kreise) generiert. Amplifiziert wurden 100 pg methylierter DNA (schwarz) und 100 ng nicht methylierter DNA (weiß).

während die nicht methylierte DNA auch unspezifische PCR-Produkte aufwies (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Analyse der PCR-Produkte des neu entwickelten GSTp1-HM-Assays II mit den Primern GSTP1.10F1 und GSTP1.10R5 in der Gelelektrophorese. Die Spuren 1–5 zeigen die Reaktionen ohne Blocker, die Spuren 6–10 die mit Blocker GSTP1.10B107. Als Templat wurde eingesetzt: Spuren 1,2,6,7: 100 pg methylierter DNA; Spuren 3,4,8,9: 100 ng nicht methylierter DNA. M: 100bp Leiter.

#### 4.1.1.4 Einführung der Blocker-Kennzahl

Der Entwurf des Blockers ist die wichtigste Komponente der HM-Assay-Entwicklung. Er bestimmt die Leistungsfähigkeit des Assays zur gezielten Anreicherung methylierter DNA. Um seinen Einfluß auf die Amplifikation noch besser einordnen zu können wurde der Blockerfaktor eingeführt. Er kann aus den CT-Werten mit und ohne Blocker ermittelt werden. Aus der PCR-Kinetik ergibt sich

$$(1) N = N_0 + N_0 \cdot E^{\text{Cycle}} \quad (N_0 = \text{Anzahl der Startmoleküle; } N = \text{Anzahl der Moleküle; } E = \text{Effizienz der PCR})$$

$$(2) N_{\text{CT/ -Blocker}} = N_{\text{CT/ +Blocker}} \quad (\text{Die Anzahl der Moleküle ist in jeder PCR zum Zeitpunkt des Durchbruchzyklus, also des CT, gleich.})$$

$$(3) E_{\text{Blocker}} = X \cdot E_{\text{Blocker}} \quad (X \text{ ist die gesuchte Variable, die den Effekt des Blockers beschreibt.})$$

Für zwei PCRs mit und ohne Blocker ergibt sich durch Einsetzen von (1) in (2):

$$(E_{\text{-B}})^{\text{CT-B}} = (E_{\text{+B}})^{\text{CT+B}} \quad \text{Daraus folgt nach Einsetzen von (3):}$$

$$(E_{\text{-B}})^{\text{CT-B}} = (X \cdot E_{\text{+B}})^{\text{CT+B}} \quad \text{Durch Potenzieren mit } 1/\text{CT}_{\text{+B}} \text{ ergibt sich}$$

$$(E_{\text{-B}})^{\text{CT-B}/\text{CT+B}} = X \cdot E_{\text{+B}} \quad \text{und durch Umstellung:}$$

$$\underline{X = E_{\text{+B}}^{(\text{CT-B}/\text{CT+B}) - 1}}$$

Man kann annehmen, dass die PCR-Effizienz ohne Blocker annähernd 2 ist, so dass die Werte für X berechnet werden können. X beschreibt die Auswirkung des Blockers auf die PCR, deshalb wird für X die Bezeichnung Blockerfaktor eingeführt. Es ergeben sich unterschiedliche Blockerfaktoren für methylierte und nicht methylierte DNA. Für den Blockertest des GSTp1-HM-Assays II mit dem Blocker B107 ergeben sich folgende Werte:

$$\text{mit 100 ng PBL-DNA} \quad X_{\text{PBL}} = 2^{((22,8/31,0)-1)} = 0,851$$

$$\text{mit 100 pg methylierter DNA} \quad X_{\text{meth}} = 2^{((34,8/35,3)-1)} = 0,990.$$

Dies bedeutet, dass die PCR-Effizienz mit PBL-DNA durch Zugabe des Blockers um den Faktor 0,85 reduziert wurde, während die Effizienz mit methylierter DNA nur um den Faktor 0,99 niedriger liegt, also annähernd gleich geblieben ist. Aus den in Tabelle 4 zusammengestellten Ergebnissen können die Blockerfaktoren für methylierte und nicht methylierte DNA berechnet werden (Tab. 5). Bei der Blockeroptimierung besteht die Herausforderung darin, das Optimum zwischen der Unterdrückung nicht methylierter DNA und ungewollter Inhibition methylierter DNA zu finden. Der Blockerfaktor für methylierte DNA muss möglichst groß, der für nicht methylierte DNA möglichst klein sein. Um dies charakterisieren zu können, wurde die Blockerkennzahl eingeführt. Sie ergibt sich aus der Differenz der Blockerfaktoren für methylierte und für nicht methylierte DNA und gibt an, in welchem Maße methylierte DNA bevorzugt amplifiziert wird. Für den GSTp1-HM-Assay II erreicht der Blocker B107 die beste Blockerkennzahl (Tab. 5).

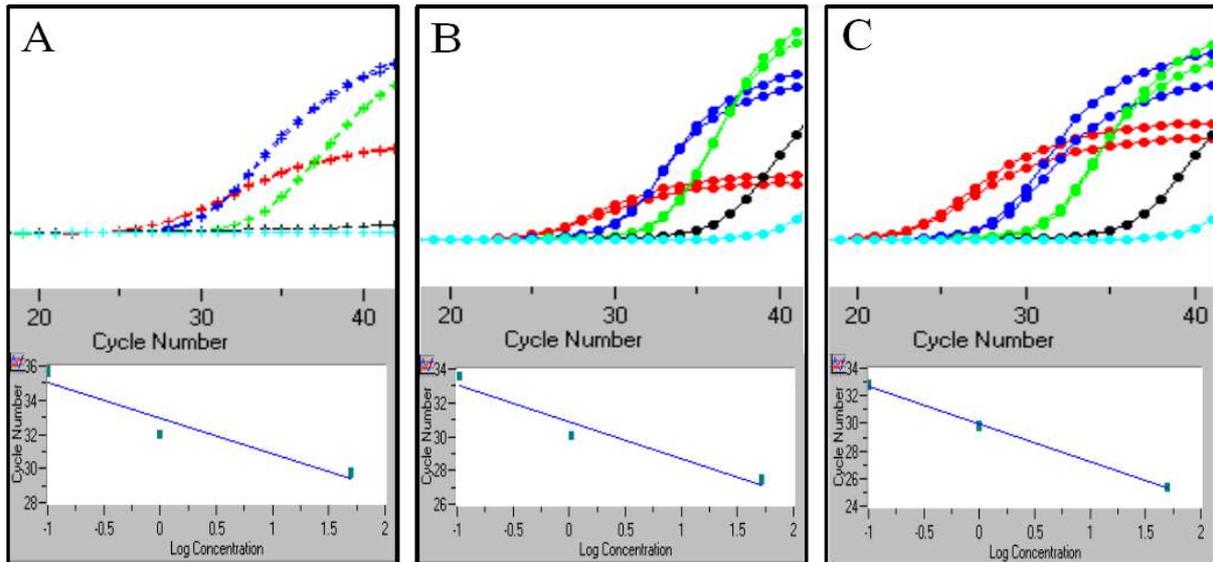
**Tabelle 5:** PCR-Faktoren und Blockerkennzahl unterschiedlicher Blocker des GSTp1-HM-Assays II.

Blocker	CT 100 ng nicht methylierter DNA	$X_{\text{PBL}}$	CT 100 pg methylierter DNA	$X_{\text{meth}}$	Blocker-Kennzahl ( $X_{\text{PBL}} - X_{\text{meth}}$ )
ohne	23,8	-	34,8	-	-
B18	27,5	0,911	36,1	0,975	0,064
B19	29,9	0,868	36,0	0,977	0,109
B20	31,1	0,850	36,0	0,977	0,127
B22	30,4	0,860	35,4	0,988	0,128
B107	31,0	0,851	35,3	0,990	0,139

#### 4.1.1.4 Verbesserung der Linearität der PCR

Als Linearität bezeichnet man die lineare Regression der Abhängigkeit der CTs einer Realtime-PCR von der Konzentration der Ausgangs-DNA im halblogarithmischen Diagramm. Die Linearität ist Grundlage jeder Quantifizierung mittels Realtime-PCR. Folgen die gemessenen CTs keiner linearen Regression, kann keine Quantifizierung erfolgen, da die PCR im beobachteten Messbereich keine konstante Kinetik aufweist.

Die Linearität des GSTp1-HM-Assays wurde mit Hilfe einer DNA-Verdünnungsreihe überprüft. Die Amplifikation von 50 ng, 1 ng sowie 0,1 ng methylierter DNA wurde mit SYBR-Green detektiert. In Teil A der Abbildung 9 ist die Standardkurve unter Verwendung einer äquimolaren Primerkonzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  zu sehen. Sie verläuft nicht linear, deshalb wurde eine asymmetrische Erhöhung der Konzentration des Vorwärts-Primers getestet. Die Konzentration des Rückwärts-Primers wurde dabei unverändert gelassen, um die Effizienz des ihn überlappenden Blockers nicht zu beeinflussen. Mit 1,0  $\mu\text{M}$  Vorwärtsprimer konnte eine Linearität der PCR zwischen 50 ng und 0,1 ng erreicht werden (Abb. 9 C). Die asymmetrische Erhöhung der Primerkonzentration führte auch zu niedrigeren CTs. 0,3, 0,6 bzw. 1,0  $\mu\text{M}$  Vorwärtsprimer GSTP1.10F1 ergaben mit 100pg methylierter DNA jeweils CTs bei Zyklus 35,6, 33,7, bzw. 32,8.



**Abbildung 9:** Linearität der Realtime-PCR durch Erhöhung der Konzentration des Vorwärtsprimers F1. Die Detektion erfolgte mittels SYBR-Green. Die Konzentration des Vorwärtsprimers GSTP1.10F1 betrug: 0,3  $\mu\text{M}$  (A); 0,6  $\mu\text{M}$  (B) und 1,0  $\mu\text{M}$  (C). Der Rückwärtsprimer GSTP1.10R5 wurde mit 0,3  $\mu\text{M}$  konstant gehalten. Getestet wurden 50ng DNA (rot), 1ng (blau) und 0,1 ng (grün) bisulfit-konvertierter DNA. 10 ng nicht konvertierter DNA (schwarz) und Wasser (cyan) dienten als Kontrollen. Die CTs sind über der der DNA Konzentration (log DNA) aufgetragen. Bei Verwendung von 1,0  $\mu\text{M}$  Vorwärtsprimer liegen alle Messwerte auf der linearen DNA-Standardkurve.

#### 4.1.1.5 Entwurf der Hybridisierungssonden

Durch die Verwendung von Hybridisierungssonden wird eine sequenz- und methylierungsspezifische Detektion des PCR-Produktes erreicht. Die LightCycler-Sonden GSTP1.10fluo1 und GSTP1.10red1 wurden so entworfen, dass sie 7 CpGs überspannen (Abb. 13). Die theoretischen Schmelztemperaturen liegen bei 58 °C bzw. 60°C. Die Sonden wurden in einer Endkonzentration von 0,15  $\mu\text{M}$  eingesetzt und ihre Spezifität für methylierte bisulfit-konvertierte DNA durch Reaktionen ohne Blocker überprüft. 10 ng nicht methylierter DNA wurden dabei nicht detektiert, für 100 pg methylierter DNA wurde ein CT von 35,0 gemessen.

#### 4.1.1.6 Validierung des GSTp1-HM-Assays II

Der neu entwickelte HeavyMethyl-Assay zur Detektion methylierter DNA des Exon1 des GSTp1-Gens, im Folgenden als GSTp1-HM-Assay II bezeichnet, wurde abschließend umfassend charakterisiert. Die Linearität des Assays wurde mit DNA-Mischungen von methylierter und nicht methylierter DNA bestimmt. In 50 ng Gesamt-DNA wurden 8 ng bis 50 pg methylierter Bisulfit-DNA in zwei Wiederholungen gemessen. Abbildung 11 zeigt die Standardkurve mit einem linearen Verlauf über den gesamten Bereich der eingesetzten DNA-Konzentrationen. Die Effizienz der PCR wurde mit 2,0 ermittelt.

Zur Bestimmung des analytischen Detektionslimits des GSTp1-HM-Assays II wurden zwei unabhängige Messungen einer Verdünnungsreihe methylierter DNA mit je vier Wiederholungen pro Konzentration durchgeführt. Die DNA wurde in poly-A als Trägermaterial (carrier) verdünnt. Anhand der in Tabelle 6 zusammengefassten Daten wurde eine Probit-Regressionsanalyse durchgeführt (Abb. 10). Der Assay besitzt demnach eine Nachweisgrenze von LOD90 = 14,9pg, das heißt, diese Menge me-

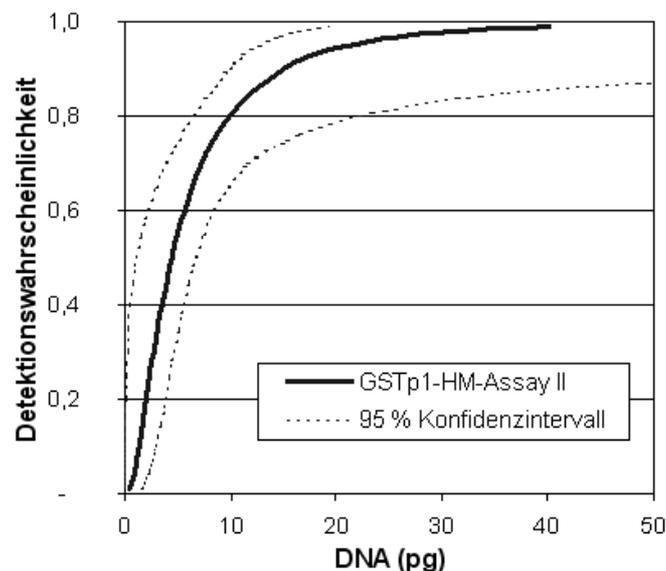
thylierter DNA wird mit einer Wahrscheinlichkeit von 90% detektiert. Mit 50 % Wahrscheinlichkeit werden 4,5 pg nachgewiesen (LOD50).

Das Potenzial des Assays, methylierte DNA im Hintergrund von nicht methylierter DNA zu detektieren, wurde gesondert untersucht. Dazu wurden DNA-Mischungen aus methylierter und nicht methylierter Bisulfit-DNA unterschiedlicher Konzentration hergestellt und in vier Wiederholungen vermessen. Dabei wurde die Menge methylierter DNA mit 100 pg pro Reaktion konstant gehalten. Als nicht methylierte DNA wurde PBL-DNA in den Mengen 25, 50, 100, 200 und 400 ng zugegeben. In allen Reaktionen konnte methylierte DNA detektiert werden. 400 ng PBL-DNA allein gaben kein Signal.

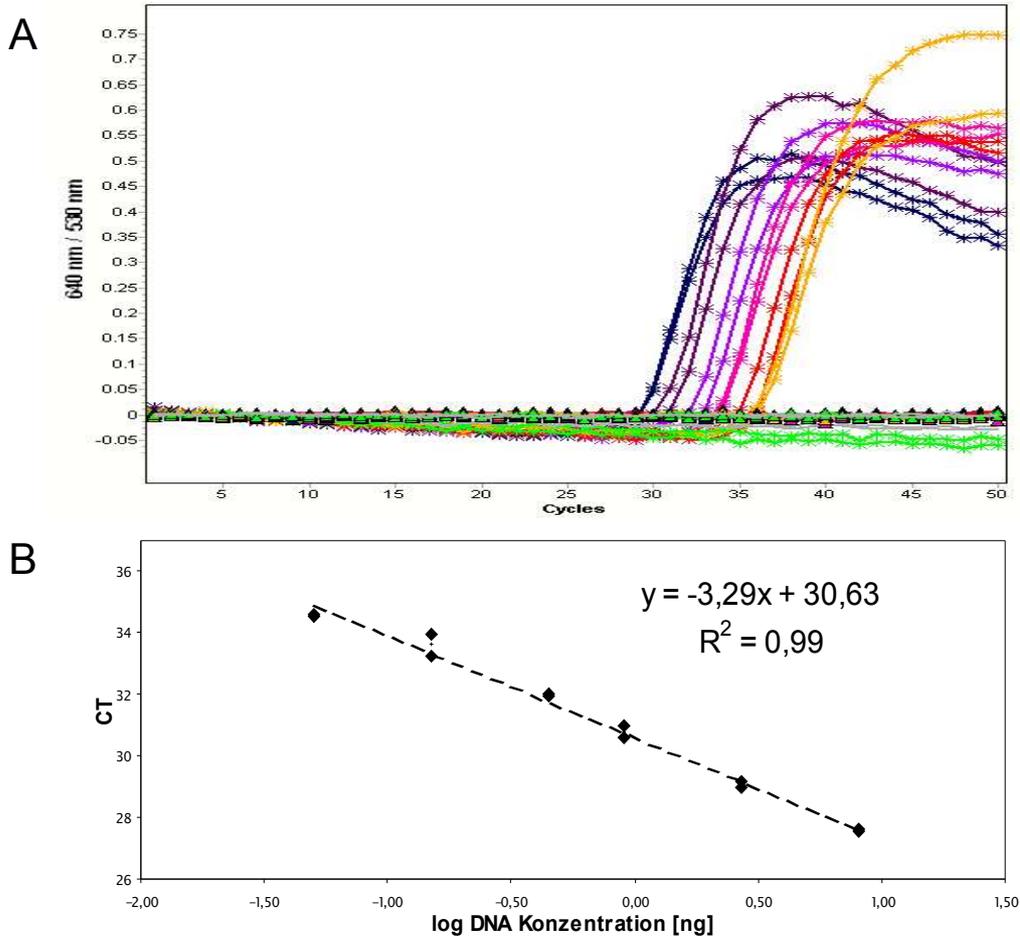
Der entwickelte GSTp1-HM-Assay II erreichte also eine relative Sensitivität von mindestens 1:4000 (Abb. 12). Für die folgenden Untersuchungen wurde in der Regel der GSTp1-HM-Assay II angewendet. Ausnahmen sind gekennzeichnet. Die Lage des Assays in der Gen-Region sind in Abbildung 13 dargestellt. Die optimalen Reaktionsbedingungen sowie die Sequenzen des GSTp1-HM-Assays II sind in Kapitel 3.14.2 zusammengefasst.

**Tabelle 6:** Anzahl positiv detektierter Reaktionen des GSTp1-HM-Assays II unter Verwendung methylierter bisulfit-konvertierter DNA.

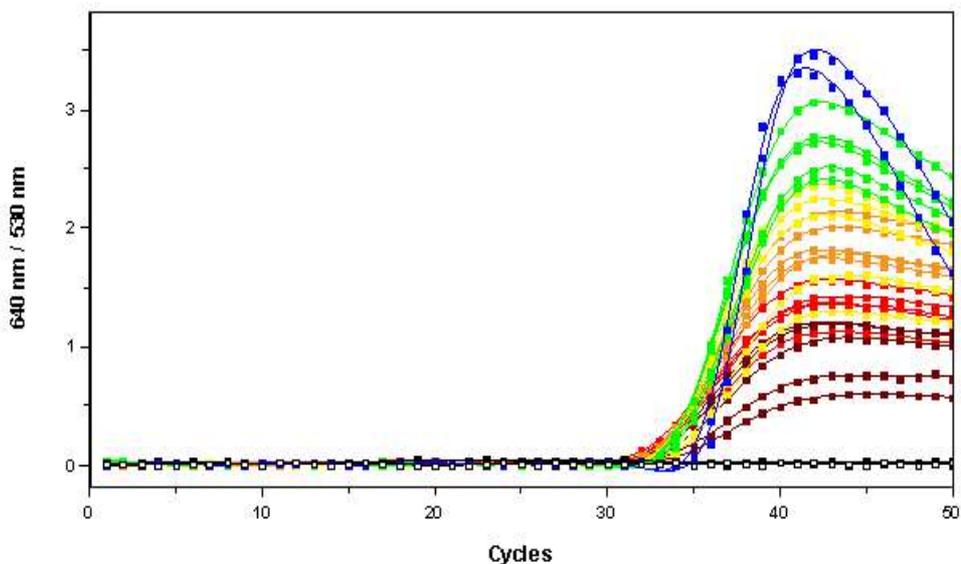
Methylierte DNA pro PCR [pg]	50	25	18	10	8	6	4	0
Detektion in 8 Wiederholungen	8/8	8/8	7/8	7/8	5/8	5/8	4/8	0/8



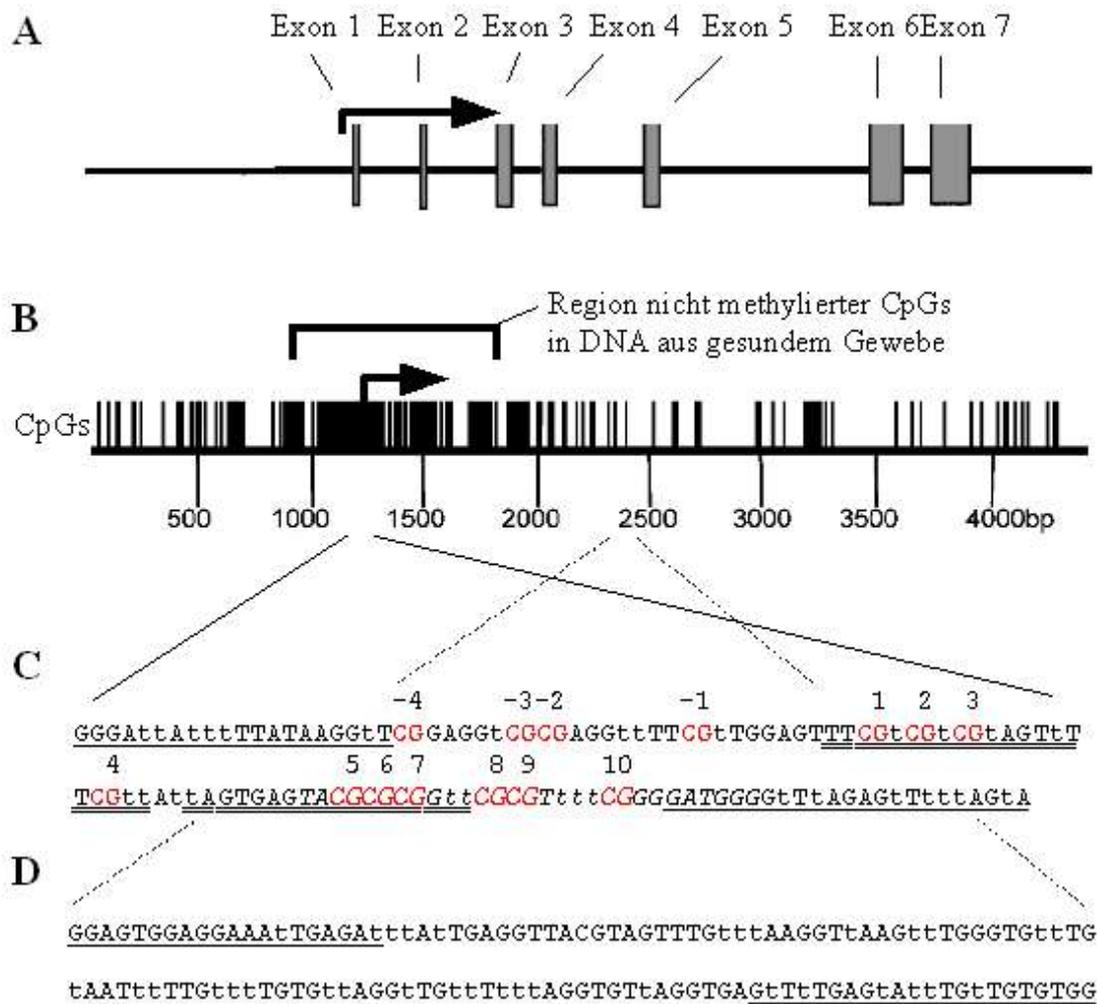
**Abbildung 10:** Bestimmung des Detektionslimits des GSTp1-HM-Assays II. 50, 25, 18, 10, 8, 6, 4 und 0 pg methylierter DNA wurde mit je 8 Wiederholungen gemessen und die Detektionsrate bestimmt. Die daraus ermittelte Regressionskurve ist mit dem 95%-Konfidenzintervall dargestellt.



**Abbildung 11:** Amplifikation einer DNA-Standardreihe (A) und die daraus resultierende Standardkurve des entwickelten GSTp1-HM-Assays II (B). Eingesetzt wurden DNA-Mischungen aus nicht methylierter und methylierter Bisulfit-DNA. 50 ng Gesamt-DNA enthielten 8 - 0,05 ng methylierter DNA.



**Abbildung 12:** Ermittlung der relativen Sensitivität des GSTp1-HM-Assays II. Amplifiziert wurden 100 pg universell methylierter DNA (Chemicon) in Mischungen mit nicht methylierter DNA (PBL, Roche Diagnostics). Dargestellt sind jeweils vier Wiederholungen von Reaktionen mit 400 ng (braun), 200 ng (rot), 100 ng (orange), 50 ng (gelb) und 25 ng (grün) PBL-DNA. 100 pg methylierter DNA allein (blau) diente als Positivkontrolle. 400 ng PBL-DNA (schwarz) sowie Negativ-Kontrollen (weiß) wurden nicht detektiert.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des GSTp1-Gens und der Lage des GSTp1-HM-Assays II. Teil A zeigt die Positionen der Exons 1 - 7 sowie den Transkriptionsstart. Teil B zeigt die CpG-Dichte. Die bisulfit-konvertierte Sequenz des GSTp1-HM-Assays (1183 – 1304 bp, GenBank X08058) ist in Teil C, das Amplikon des Referenzassays (2273 – 2402 bp, GenBank X08058) in Teil D dargestellt. Die Zählung der CpGs (rot) beginnt mit dem ersten CpG des Exon 1. Die Bindungsstellen der Primer sind einfach, die der Sonden doppelt unterstrichen, die Blockerbindungsstelle ist kursiv dargestellt.

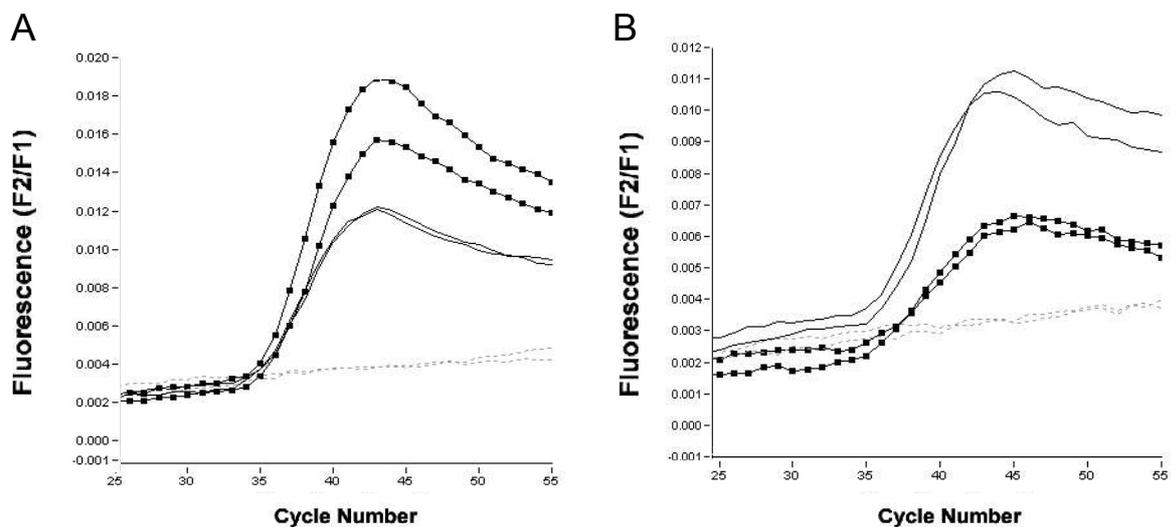
#### 4.1.2 Simulation von heterogenen Methylierungsmustern

Die methylierungsspezifische Anreicherung von DNA mit einem HM-Assays ist von der Effizienz des Blockers abhängig. Sein Bindungsverhalten wird durch seine Länge und die Anzahl der überspannten CpGs bestimmt. Die tatsächliche Schmelztemperatur mit methylierter DNA sowie sein Bindungsverhalten unter Bildung von Mismatches können nur schwer vorhergesagt werden. Diese Eigenschaften werden daher mit Modell-DNAs ermittelt, die aus Mischungen universell methylierter oder vollständig unmethylierter DNA hergestellt werden. Unklar war jedoch, wie sich ein Blocker verhält, wenn die DNA nicht diesem idealisierten Modell entspricht. Dies ist z.B. der Fall, wenn einzelne CpGs des vom Blocker überspannten Bereichs in der Hintergrund-DNA methyliert vorliegen. Um die Effizienz des Blockers und damit des Assays auf solch einer partiell methylierter DNA zu untersuchen, wurden de-

		$\Delta G$ [kcal/mole]
<b>A</b>		
nicht methyl. DNA	3'-TtGGGGTAGGGGt <sup>†</sup> ttttTgtGtttGgtGtGtATGAG-5'	-42.7
Hpa II-DNA	3'-TtGGGGTAGGGGc <sup>†</sup> ttttTgtGtttGgtGtGtATGAG-5'	-45.0
Blocker B26	5'-CCCATCCCc <sup>†</sup> aaaACaCa <sup>†</sup> aaC <sup>†</sup> CaC-PH	
<b>B</b>		
nicht methyl. DNA	3'-TtGGGGTAGGGGt <sup>†</sup> ttttTgtGtttGgtGtGtATGAG-5'	-43.4
Hpa II-DNA	3'-TtGGGGTAGGGGc <sup>†</sup> ttttTgtGtttGgtGtGtATGAG-5'	-39.9
Blocker B22	5'-CCCATCCCc <sup>†</sup> aaaACaCa <sup>†</sup> aaC <sup>†</sup> CaC-PH	

**Abbildung 14:** Templat und Blocker-Sequenzen zur Simulation von heterogenen Methylierungsmustern. Dargestellt ist die Bindung der Blocker B22 und B26 an unterschiedliche DNA. A: Bindung des Blockers B26 an vollständig unmethyliertes Templat, B: Bindung des Blockers B22 an partiell methylierte DNA (CpG 10 wurde mit *M.Hpa II* methyliert). Die Freie Enthalpie ( $\Delta G$ ) für die Match- und Mismatch-Bindung der Blocker wurde mit MeltCalc berechnet.

finierte Basenfehlpaarungen für einzelne CpG-Positionen im Bereich des Blockers eingeführt (Neumann 2004). Das Muster der partiellen Methylierung wurde einmal in der Templat-DNA erzeugt und zum anderen durch den Blocker B26 selbst simuliert und die Ergebnisse miteinander verglichen (Abb. 14). Partiiell methylierte DNA wurde mit *M.HpaII*-Methylase erzeugt, bisulfit-konvertiert und als Hintergrund-DNA eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte dann mit dem GSTp1-HM-Assay II mit einer Mischung aus 50 pg methylierter und 50 ng *M.HpaII*-DNA sowie 50 pg methylierter gemischt in 50 ng unmethylierter DNA. Mit Blocker B22 wurden signifikant niedrigere Signale in DNA-Mischungen mit *M.HpaII*-DNA im Vergleich zur Kontrollreaktion mit DNA-Mischungen aus unmethylierter DNA gemessen (Abb.15 B). Der gegenteilige Effekt wurde mit dem modifizierten Blocker B26, der an der *HpaII*-Positi-



**Abbildung 15:** Auswirkung heterogener Methylierung in der Blockerregion eines HM-Assay. A: GSTp1-HM-Assay II mit Blocker B26, in dem eine der vier CpG-Positionen komplementär zu methylierter DNA ist. B: GSTp1-HM-Assay II mit Blocker B22, der vollständig komplementär zu nicht methylierter DNA ist. Als Templat wurden 50 pg methylierte DNA mit 50 ng Hintergrund-DNA eingesetzt (1:1000). Die gepunkteten Linien zeigen Amplifikationen mit partiell methylierter DNA Hintergrund-DNA (*M.HpaII*-DNA), die einfachen Linien Amplifikationen mit unmethylierter Hintergrund-DNA. Negativ-Kontrollen ohne Templat sind als gestrichelte Linien dargestellt. Amplifikationen in denen der Blocker eine Basenfehlpaarung mit der Hintergrund-DNA ausbildet zeigen jeweils flachere Amplifikationskurven, unabhängig davon ob die Basenfehlpaarung durch die Blockersequenz oder die Templat-DNA erzeugt wird.

on die Base G anstelle der Base A aufweist, beobachtet. Er zeigte unter Verwendung der *M.HpaII*-DNA als Hintergrund-DNA die stärkeren Signale (Abb.15 A). Daraus lässt sich schließen, dass durch Einführung von Basenfehlpaarungen in CpG-Positionen des Blockers ein Muster partieller Methylierung simuliert werden kann. Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Blocker unter Ausbildung einer Basenfehlpaarung an partiell methylierte DNA (*M.HpaII*-DNA) binden und deren Amplifikation verhindern kann. So wurde eine relative Sensitivität von 1:1000 erreicht, auch wenn eine der vier vom Blocker überspannten CpG-Positionen methyliert vorliegt.

#### 4.1.3 Maskierung von CpG-Positionen im Blockerbereich

In der Mehrzahl der auf Methylierung untersuchten Regionen liegen benachbarte CpGs einheitlich methyliert vor, man spricht von Co-Methylierung. In einigen Genen können jedoch einzelne CpG-Positionen lokalisiert werden, deren Methylierungsstatus nicht dem der benachbarten CpG-Positionen entspricht. Um die Leistungsfähigkeit des diagnostischen Tests zu optimieren, sollten solche Positionen von der Analyse ausgeschlossen werden. Dazu wurde die Möglichkeit untersucht, mit der HM-Technologie einzelne CpGs zu „maskieren“. Dazu wurden gezielt Basenfehlpaarungen an zwei CpG-Positionen der Blockersequenz B107 erzeugt. Durch die Verwendung eines „T“ anstelle des „A“ im zu maskierenden CpG des Blockers wird erreicht, dass er an dieser Position sowohl auf unmethylierter als auch auf methylierter DNA einen Mismatch ausbildet. Die diskriminierenden Eigenschaften des Blockers werden nun ausschließlich durch die verbleibenden CpG-Positionen erzeugt. Im Experiment wurden auf diese Art jeweils 2 CpG-Positionen „maskiert“, wobei verschiedene Kombinationen getestet wurden (Abb. 16). Die Basenfehlpaarung erniedrigt die Schmelztemperatur, weshalb die Blocker am 3'- oder 5'-Ende verlängert wurden und ihre ursprüngliche Schmelztemperatur annähernd wieder eingestellt wurde. Danach wurde der Blocker B107 mit den modifizierten Blockern verglichen. Für alle Blocker wurden CT-Werte zwischen 35,7 und 36,7 für 100 pg methylierter DNA gemessen (Tab. 7). Alle vier modifizierten Blocker mit zwei Mismatch-Positionen erreichten eine relative Sensitivität von 1:1000 und zeigten eine vergleichbare Effizienz zu B107. Die Ergebnisse demonstrieren die Möglichkeit, einzelne CpG-Positionen zu „maskieren“. Die Amplifikation ist dann nicht mehr vom Methylierungsstatus der maskierten CpGs abhängig.

		Tm [°C] mit +CH <sub>3</sub> DNA	Tm [°C] mit -CH <sub>3</sub> DNA
-CH <sub>3</sub> DNA	3'-tTtGGGGTAGGGGttttTgtGtttGGtGtGtATGAGT-5'		
+CH <sub>3</sub> DNA	3'-tTtGGGGTAGGGGcTTTtGCGcTTtGGCGCGCATGAGT-5'		
B107	CCCATCCCCa <sup>10</sup> aaaACaCa <sup>8</sup> aaCCaCaCaT-PH	30.0	74.4
B117	CCCATCCCCt <sup>10</sup> aaaACaC <sup>8</sup> aaCCaCaCaTACTCA-PH	52.6	72.8
B118	CCCATCCCCt <sup>10</sup> aaaACaCa <sup>8</sup> aaCCtCaCaTACTCA-PH	52.5	72.2
B119	aAaCCCCATCCCCt <sup>10</sup> aaaACaC <sup>8</sup> aaCCaCaCaT-PH	46.5	70.2
B120	aAaCCCCATCCCCt <sup>10</sup> aaaACaCa <sup>8</sup> aaCCtCaCaT-PH	45.9	70.2

**Abbildung 16:** Sequenzen der Blocker B117, B118, B119 und B120 und ihre Schmelzpunkte. Die Tm für methylierte und nicht methylierte DNA wurden mit MeltCalc (Schütz und von Ahsen 1999) berechnet. Die ermittelte Schmelztemperatur berücksichtigt die erzeugten Mismatch-Paarungen. An den CpG-Positionen 10, 8, und 7 (grau unterlegt) wurde jeweils ein Basenaustausch zu „T“ vorgenommen, so dass an diesen Positionen keine methylierungsunspezifische Diskriminierung erfolgt.

**Tabelle 7:** Ergebnisse mit Blockern, die unterschiedliche CpG-Positionen maskieren.

Blocker	CT $\pm$ SD <sup>1)</sup> 100 pg methylierter DNA in 100 ng unmethylierter DNA
B107	36,4 $\pm$ 0,1
B117	35,7 $\pm$ 0,2
B118	36,0 $\pm$ 0,0
B119	36,3 $\pm$ 0,3
B120	36,7 $\pm$ 0,3
ohne	kein Signal

<sup>1)</sup> Mittelwert der CTs und Standardabweichung von drei Wiederholungen mit Mischungen aus 100 pg methylierter DNA und 100 ng nicht methylierter DNA.

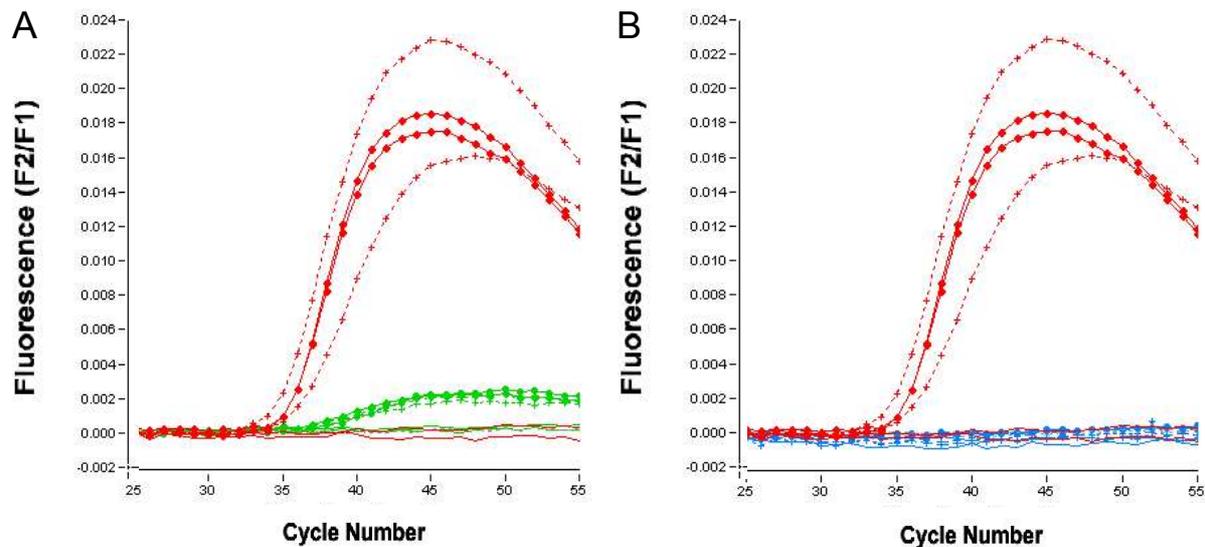
#### 4.1.4 Untersuchung der Spezifität der Hybridisierungssonden

Das Modell zur Simulation von heterogenen Methylierungsmustern wurde auch zur Untersuchungen der Spezifität der Hybridisierungs-Sonden angewendet. Verschiedene Methylierungszustände der Templat-DNA wurden dabei durch die Donor-Sonde GSTP1.10-fluo1 mit unterschiedlichen Sequenzen repräsentiert. Die Sonde wurde so verändert, dass entweder eine (in GSTP1.10-fluo10) oder zwei CpG-Positionen (in GSTP1.10-fluo11) ein CA-Dinukleotid enthielten. Die entstehenden Basenfehlpaarungen und die dazu berechneten Schmelztemperaturen sind in Abbildung 17 dargestellt. Die drei Varianten wurden mit dem GSTp1-HM-Assay II in Kombination mit der Akzeptor-Sonde GSTP1.10-red1 mit 100 pg methylierter, 100 ng unmethylierter sowie einer Mischung aus 100 pg methylierter und 100 ng unmethylierter DNA getestet.

Mit der Sonde GSTP1.10-fluo10, die eine unmethylierte Position enthielt, wurde die methylierte DNA zwar detektiert, das Signal erreichte jedoch nur noch 15 % der Signalstärke im Vergleich zur Sonde GSTP1.10-fluo1 (Abb. 18 A). Mit der Donor-Sonde GSTP1.10-fluo11, die zwei unmethylierte Positionen enthielt, wurde weder methylierte noch unmethylierte DNA detektiert (Abb. 18 B). Unmethylierte DNA wurde mit keinem der drei Sonden-Paare detektiert. Der Versuch demonstriert die hohe Empfindlichkeit der LightCycler-Sonden bezüglich Basenfehlpaarungen. Ihr Einsatz führt zur einer sehr hohen Spezifität der Detektion methylierter DNA. Bei der Detektion methylierter DNA mit dem GSTp1-HM-Assay kann daher von einer Co-Methylierung im Bereich der Sonden ausgegangen werden.

Templat		T <sub>m</sub> [°C]
	3'-AAGCaGCaGCaTCAaAAGCaa-5'	
GSTP1.10-fluo1	5'-TTCGtCGtCGtAGTtTTCGtt-FL	67.2
GSTP1.10-fluo10	5'-TTCGtCGtCaTAgTtTTCGtt-FL	59.9
GSTP1.10-fluo11	5'-TTCGtCaTCaTAgTtTTCGtt-FL	49.8

**Abbildung 17:** Sequenzen der untersuchten Donor-Sonden. Standard-Sonde GSTP1.10-fluo1, wie sie im GSTp1- HM-Assay II verwendet wird. GSTP1.10-fluo10 simuliert ein unmethyliertes CpG in der Sonden-Region. GSTP1.10-fluo11 simuliert zwei unmethylierte CpG-Positionen in der Sonden-Region. Die Positionen der Basenfehlpaarung sind grau unterlegt. Die theoretischen Schmelzpunkte der Sonden wurden mit MeltCalc ermittelt.



**Abbildung 18:** Simulation von heterogenen Methylierungszuständen mit den Sonden des GSTp1-HM-Assay II. Eingesetzt wurden 100 pg methylierter DNA (gepunktete Linien), 100 ng unmethylierter DNA (einfache Linien) sowie 100 pg methylierter DNA in Mischung mit 100 ng unmethylierter DNA (gekreuzte Linien). Teil A: Die Donor-Sonde GSTP1.10-fluo10 (grün) hybridisiert unter Bildung einer Basenfehlpaarung und erreicht nur etwa 15 % der Signalstärke wie die Standard-Sonde GSTP1.10-fluo1 (rot). Teil B: Unter Verwendung der Donor-Sonde GSTP1.10-fluo11 (blau), die zwei Basenfehlpaarungen ausbildet, wurden keine Signale gemessen.

#### 4.1.5 Kriterien für die Entwicklung von HM-Assays

Basierend auf den in Kapitel 4.1.1 bis 4.1.4 beschriebenen Ergebnissen wurden weitere HM-Assays entwickelt (Tab. 8). Dazu wurden allgemeine Anforderungen an das Design von HM-PCRs aufgestellt. Alle Assays wurden mit dem gleichen PCR-Puffer und dem selben Temperatur-Zeit-Profil etabliert, wie der GSTp1-HM-Assay II. Die zusammengestellten Parameter beziehen sich auf HM-PCRs im LightCycler unter Verwendung von Hybridisierungssonden:

Ein HM-Assay

- sollte die Fragmentlänge von 150 bp nicht überschreiten,
- darf keine Repeats und Polymorphismen enthalten.

Die Primer

- sollten in direkter Nachbarschaft zu den zu analysierenden CpG-Positionen liegen sowie
- eine Länge von 18 - 25 bp und eine Schmelztemperatur von ca. 50 - 55 °C erreichen.

Der Blocker

- muss mindestens vier CpG-Positionen überspannen,
- sollte für die C-reiche Sequenz entworfen werden,
- und muss mit dem Primer einen Überlapp von mindestens 3 Basen aufweisen,
- kann eine Länge von 25 - 40 bp haben und
- sollte eine Schmelztemperatur von etwa 70 °C erreichen.

## Die LightCycler-Sonden

- sollten als G-reiche Sequenzen entwickelt werden,
- müssen mindestens zwei CpG-Positionen überspannen und
- sollten einen Schmelzpunkt von etwa 60 °C aufweisen.

Vorzugsweise wird ein HM-Assay so entwickelt, dass der C-reiche Primer einen Überlapp zum Blocker bildet, der durchschnittlich 8 bp beträgt. Der Blocker müssen eine Modifikation des freien 3'-OH aufweisen, damit sie in der PCR nicht verlängert werden können. In der Arbeit wurden ausschließlich 3'-Phosphat-Modifikationen benutzt, andere Modifikationen sind jedoch auch möglich. Die Analyse der PCR-Produkte mittels Schmelzkurven muss eindeutige Einzelpeaks für vollständig methylierte und nicht methylierte DNA mit unterschiedlicher Temperatur ergeben (vergl. Abb. 6). Primer-Dimere sollten sie nicht vor dem 40. Zyklus entstehen. Bevorzugt sind Amplifikationen ohne Primer-Dimere. Zur Detektion der methylierten DNA können auch Sonden-Paare entwickelt werden, in denen nur eine der beiden LightCycler-Sonden CpG-Positionen überspannt. Die Analyse der Spezifität der LightCycler-Sonden mittels Schmelzkurven muss zeigen, dass mit unmethylierter DNA kein Signal erzeugt wird.

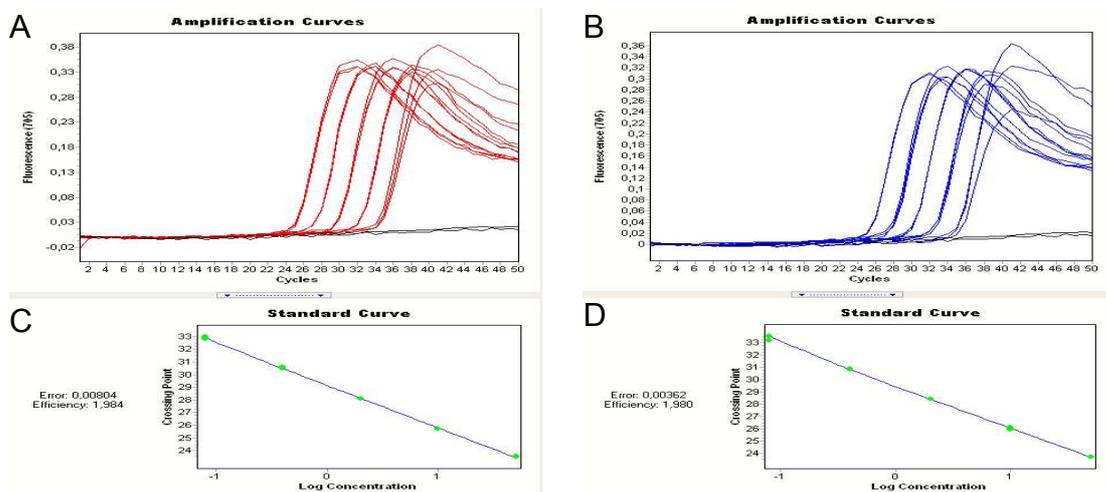
**Tabelle 8:** Eigenschaften von Oligonukleotiden in 20 Realtime-HM-Assays.<sup>\*)</sup>

HM-Assay Nr.	Amplikon Länge [bp]	Tm Vorwärts-primer [°C]	Tm Rückwärts-primer [°C]	Tm Blocker [°C]	Überlapp Primer / Blocker [bp]	Tm Sonde1 [°C]	Tm Sonde 2 [°C]
2044-4	109	50,9	53,3	72,1	7	58,4	59,4
2111-10	123	48,2	57,5	68,7	6	57,4	56,1
2111-11	127	48,2	53,5	72,7	6	61,8	62,5
2188-7	109	49,3	50,2	73,4	4	62,5	66,3
4084-2	95	54,3	50,2	71,1	7	57,2	58,4
4336-1	131	60	57,3	68	10	57,3	58,4
6211-4	158	59,8	59,1	69,4	20	61,3	58,4
6480-1	194	53,3	51,6	64,7	4	62,5	62,5
15660-2	186	57,4	56,9	67,3	12	64,7	54,8
15667-6	113	56,7	55,9	69,2	6	53,5	56,4
15712-5	166	57,7	50,9	65,8	6	59,4	62,1
15714-3	86	56,4	55	68,3	5	58,4	55,8
15747-5	138	55,7	58,4	72,8	3	60,3	62,5
15789-7	168	58,4	59,9	70,3	12	62,5	67,6
15798-1	157	53,9	51,6	68,4	8	61,6	64,6
15872-2	141	55,7	52,4	70,4	7	58,4	61,3
16184-10	153	55,5	56,7	72,8	9	62,5	60,9
16217-1	114	51	47,5	72,7	11	66,4	60,7
17378-7	91	55,2	50	69,9	8	57,6	57,2
17406-2	110	47,5	48,2	69,4	5	62,1	58,4
<b>Mittelwert</b>	<b>133</b>	<b>54,3</b>	<b>53,8</b>	<b>69,9</b>	<b>8</b>	<b>60,3</b>	<b>60,2</b>

<sup>\*)</sup> Die Berechnung der Schmelztemperaturen erfolgte nach der Nearest-Neighbour-Methode mit der Software OligoCalc (salt corrected).

#### 4.1.6 Entwicklung einer Referenz-PCR

Zur Quantifizierung der Gesamt-DNA ist eine Referenz-PCR notwendig, die unabhängig vom Methylierungsstatus die gesamte Bisulfit-DNA amplifiziert und detektiert. Dazu wurde außerhalb der CpG-Insel des GSTp1-Gens eine PCR entworfen, die methylierungsunspezifisch ist. Für die Primerkombination GSTP1.CF3/GSTP1.CR3 wurden 100 pg methylierter DNA mit einem CT von 31 gemessen. Für dieses DNA-Fragment wurden LightCycler-Sonden entwickelt, die keine CpGs überspannen und damit nicht sensitiv für Methylierung sind. Die Reaktionsparameter waren die gleichen wie die des GSTp1-HM-Assays II. Mittels Standard-Verdünnungsreihe wurden die Effizienzen für methylierte und nicht methylierte DNA mit  $E=1,98$  ermittelt (Abb. 19). In den Kontrollen mit nicht bisulfit-konvertierter DNA wurden keine Signale gemessen. Die Sequenzen sowie die optimalen PCR-Bedingungen der Referenz-PCR sind in Kapitel 3.14.6 detailliert beschrieben. Die Abbildung 13 zeigt die Lokalisation des HM- und des Referenz-Assays im GSTp1-Gen.



**Abbildung 19:** Standardkurven des Referenz-Assays auf methylierter und unmethylierter DNA. A: Amplifikationskurven von universell methylierter humaner DNA (Chemicon) in den Konzentrationen 50, 10, 2, 0,4 und 0,08 ng. B: Amplifikationskurven von nicht methylierter humaner DNA (Roche Diagnostics) in den gleichen Verdünnungsstufen. C und D: Standardkurven und Effizienzen aus den CTs der Amplifikationen aus A und B.

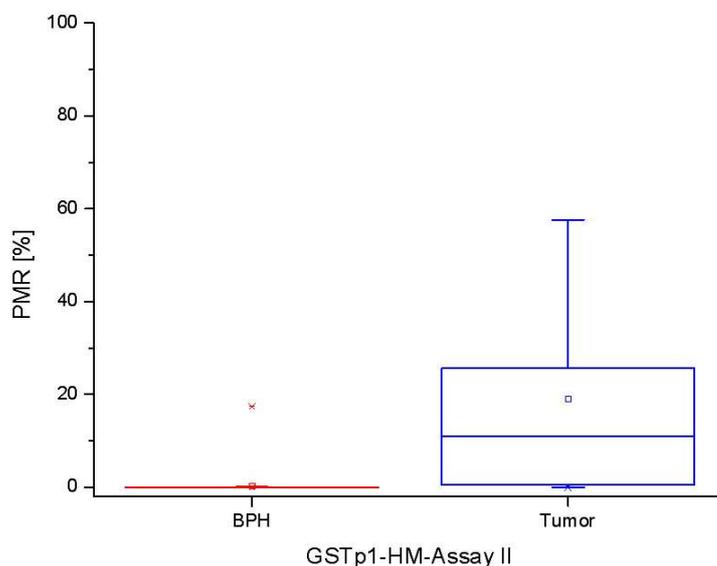
#### 4.1.9 Methylierungsanalyse des GSTp1-Gens in Prostatagewebe

Der in der vorliegenden Arbeit entwickelte GSTp1-HM- und der Referenz-Assay wurden zur Validierung für die Analyse von Prostatagewebe angewandt und die klinische Spezifität und Sensitivität des GSTp1-HM-Assays ermittelt. Die Gewebeproben wurden durch einen Kooperationspartner der Epigenomics AG zur Verfügung gestellt. Insgesamt wurde Gewebe aus 145 Prostataktomien von Männern verschiedenen Alters untersucht. Die DNA jeder Probe wurde bisulfit-konvertiert und mittels GSTp1-Referenz-Assay quantifiziert. 133 Proben mit mehr als 2 ng pro PCR wurden als informativ angesehen und analysiert. Davon waren 75 Tumore, während 58 Gewebeproben als „Benign Prostatic Hyperplasia“ (BPH), also einer gutartigen Vergrößerung der Prostata, diagnostiziert waren.

In 61 der 75 Tumورproben (81 %) wurde mit dem GSTp1-HM-Assay II methylierte DNA amplifiziert und detektiert. Dagegen wurde in nur 6 der 58 BPH-Proben (10 %) ein positives Signal festgestellt. Der Me-

thylierungsgrad der untersuchten DNA wurde aus dem prozentualen Verhältnis beider DNA-Quantifizierungen bestimmt und wird als PMR angegeben.

Die Bestimmung der PMR-Werte ermöglicht eine noch genauere Korrelation der Testergebnisse mit der Krebsdiagnose (Abb. 20). Wird ein Grenzwert von 0,2 % Methylierung festgesetzt, ergibt sich ein positiver Test für nur 3 der 58 BPH-Proben (95 % Spezifität) und 59 der Tumore (79 % Sensitivität).



**Abbildung 20:** Box-Whisker-Plot der PMR-Werte für GSTp1-Exon1 in Prostata-Tumorgewebe und BPH. 58 BPH- und 75 Tumor-Gewebebeobachtungen wurden mit dem GSTp1-HM-Assay II und dem Referenz-Assay analysiert.

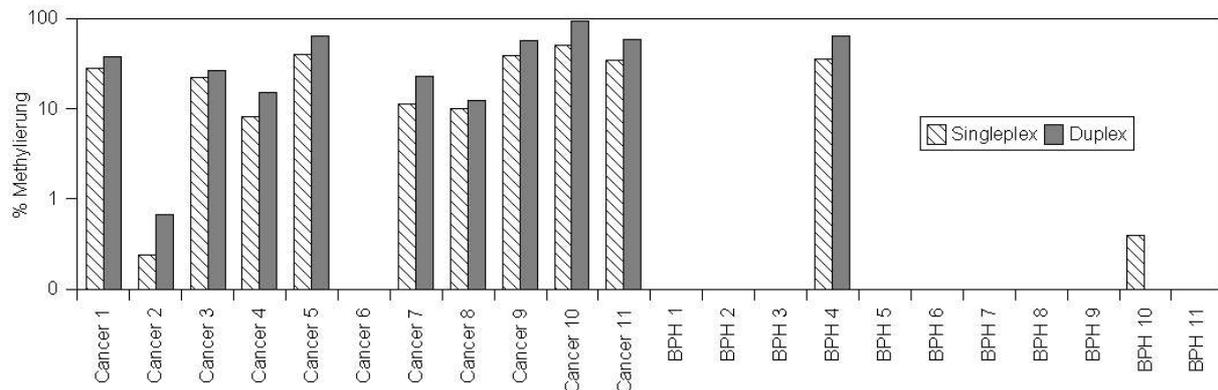
## 4.2 Entwicklung von Duplexreaktionen zur Methylierungsanalyse

### 4.2.1 Entwicklung einer Duplexreaktion aus HM-Assay und Referenz-Assay

Durch Kombination des GSTp1-HM-Assays II mit dem Referenz-Assay in einer Duplexreaktion sollte die HM-Technologie weiterentwickelt werden. Ziel war dabei, den Meßaufwand zu verringern, die Genauigkeit der Analyse zu erhöhen und Probenmaterial zu sparen. Die gleichzeitige Amplifikation beider Assays in einem Reaktionsgefäß erforderte eine Anpassung und Optimierung der Reaktionsbedingungen.

Der Verbrauch von PCR-Komponenten wie Nukleotiden und Polymerase ist bei multiplexierten Reaktionen von entscheidender Bedeutung, insbesondere bei Reaktionen mit unterschiedlichen Templatekonzentrationen für die parallelen Reaktionen. Da es sich bei der entwickelten Duplexreaktion aus GSTp1-HM-Assay II und Referenz-Assay um eine solche multiplexierte Reaktion handelt, muss gewährleistet sein, dass niedrige Konzentrationen methylierter DNA detektiert werden, auch wenn hohe Konzentrationen Gesamt-DNA vorliegen. Um dies zu erreichen, wurde die Primerkonzentration der Referenz-PCR in mehreren Stufen reduziert und getestet. Eine Quantifizierung der Gesamt-DNA mittels Referenz-Assay war auch nach Reduktion der Primerkonzentration von 0,3 auf 0,1  $\mu\text{M}$  gewährleistet. Durch die Limitierung der Referenz-PCR konnte die Effizienz der methylierungsspezifischen PCR auch bei hohem Anteil unmethylierter DNA konstant gehalten werden. Die Hybridisierungssonden beider Assays wurden mit verschiedenen LightCycler-Farbstoffen ausgestattet, um die unabhängige

Detektion der methylierten DNA bei 640 nm und der Gesamt-DNA bei 705 nm zu ermöglichen. Die Spezifität und Sensitivität der Duplex-Reaktion wurde auf DNA-Mischungen nachgewiesen. Der GSTp1-HM-Assay II erreichte dabei eine zur Einzel-PCR vergleichbare relative Sensitivität von 1:4000. Die entwickelte Duplex-Realtime-PCR aus GSTp1-HM-Assay II und GSTp1-Referenz-Assay wurde anschließend auf klinische Proben angewendet. Dazu wurden 22 Patientenproben von Prostatagewebe untersucht, die bereits mittels Einzelreaktionen aus HM- und Referenz-Assay analysiert worden waren (Kap. 4.1.9). Dabei wurden, mit Ausnahme einer BPH, in der Duplexreaktion die gleichen Proben positiv detektiert (Abb. 21). Die Korrelation der PMR-Werte aus beiden Untersuchungen betrug  $R^2 = 0,98$ .

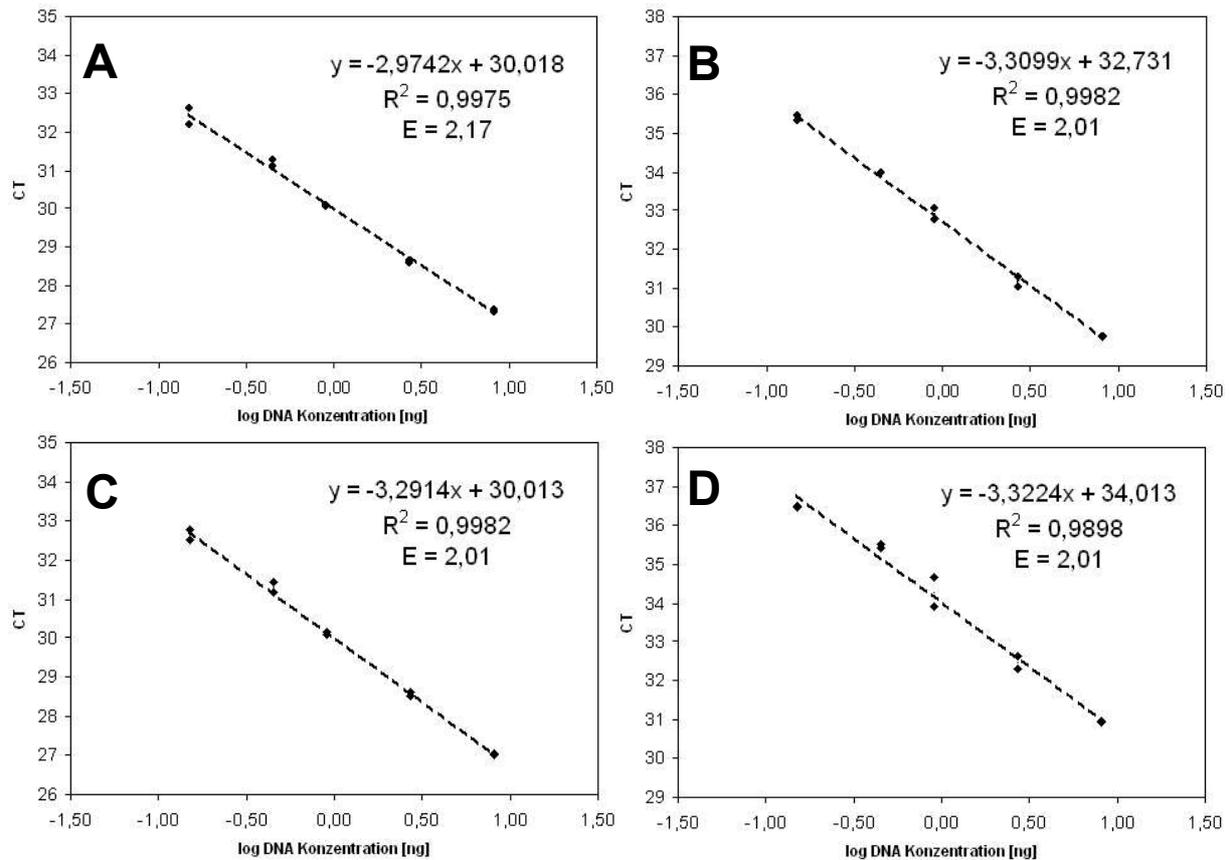


**Abbildung 21:** Methylierung in Prostata-Gewebe, ermittelt durch eine Duplex-Realtime-PCR. Dargestellt sind Methylierungswerte der Duplex-PCR (dunkle Säulen) im Vergleich zu den Ergebnissen aus den Einzelreaktionen (schraffierte Säulen). Untersucht wurden 22 Proben aus der in (Kap. 4.1.9) beschriebenen Studie.

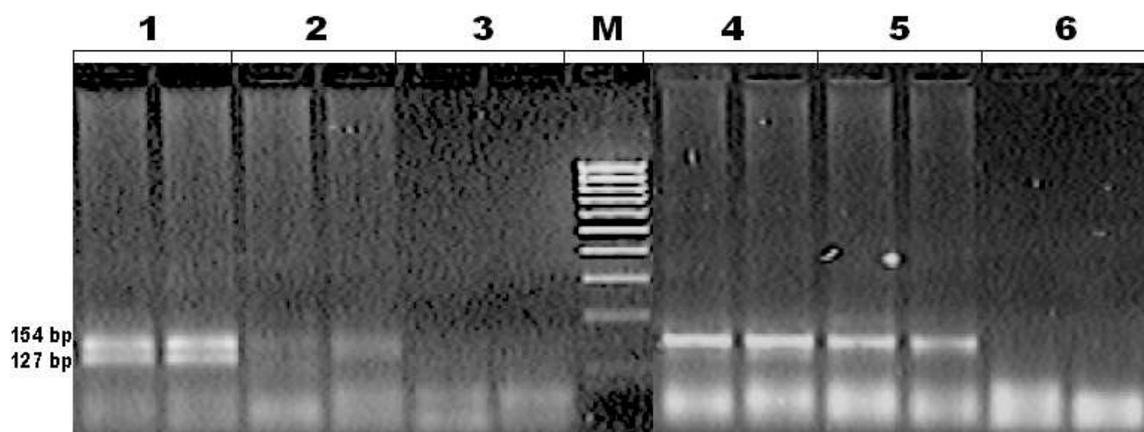
#### 4.2.2 Entwicklung einer Duplexreaktion aus zwei HM-Assays

Die hohe Zuverlässigkeit, die ein kommerzieller diagnostischer Test erfordert, kann möglicherweise nur durch die gleichzeitige Untersuchung mehrerer biologischer Marker gewährleistet werden. Dies führt zu einem erhöhten Bedarf an Untersuchungs- und Verbrauchsmaterial. Daher wurde die Idee entwickelt, verschiedene Methylierungsmarker in einer Reaktion parallel zu messen. Hierbei war zu prüfen, ob die parallele Durchführung von zwei HeavyMethyl-Assays möglich ist. Dafür wurde der GSTp1-HM-Assay III (Kap. 3.14.3) ausgewählt und mit dem PTGER4-HM-Assay kombiniert. PTGER4 wurde von der Epigenomics AG als Methylierungsmarker identifiziert und kann in Prostata-Tumoren methyliert vorliegen.

In einem Vorexperiment wurde deutlich, dass die Duplexreaktion mit den in den Einzelreaktionen optimierten Konzentrationen für Primer, Blocker und Sonden zu einer niedrigeren Sensitivität des GSTp1-HM-Assays III führt. Die Analyse der Reaktionsprodukte mittels Gelelektrophorese (Spuren 4-6 in Abb.23) zeigte eine bevorzugte Amplifikation durch den PTGER4-HM-Assay (154 bp). Aus den Reaktionen mit 50 pg methylierter und 50 ng unmethylierter DNA konnte keine spezifische Bande des GSTp1-HM-Assays III (123 bp) nachgewiesen werden. Deshalb wurde die Konzentration der Primer für beide Assays stufenweise reduziert und aneinander angepasst. Die Blockerkonzentration wurde dabei im gleichen Verhältnis reduziert. Für die Duplexreaktion wurden 0,15  $\mu\text{M}$  als optimale Primerkonzentration für beide HM-Assays gefunden. Die Abbildung 22 zeigt einen Vergleich der PCR-Effizienzen der Einzel- und Duplexreaktionen. Die Standardverdünnungen von methylierter DNA erfolgten in Mi-

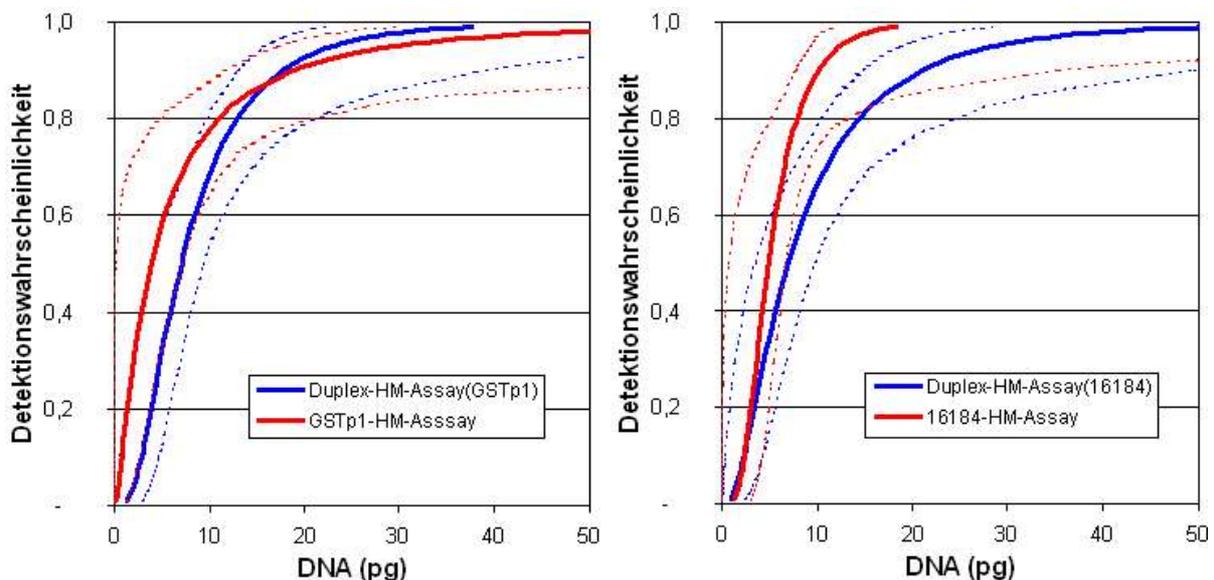


**Abbildung 22:** PCR-Effizienzen von GSTp1- und PTGER4-HM-Assay in Einzelreaktionen und in der Duplexreaktion. Detektiert wurde methylierte DNA in Mischungen mit 50 ng Gesamt-DNA. A: GSTp1-HM-Assay III Einzelreaktion, B: GSTp1-HM-Assay III in der Duplexreaktion, C: PTGER4-HM-Assay Einzelreaktion, D: PTGER4-HM-Assay in der Duplexreaktion.



**Abbildung 23:** PCR-Produkte der optimierten (1-3) und nicht optimierten (4-6) HM-Duplexreaktion aus GSTp1-HM-Assays III und PTGER4-HM-Assays in der Gelelektrophorese. Die Spuren 1 bis 3 zeigen Produkte von Reaktionen mit 0,15 µM Primern für beide Assays, die Spuren 4 bis 6 die Reaktionen mit 0,3 µM Primern für GSTp1 und 0,6 µM Primern für PTGER4. Die DNA-Konzentrationen waren 50 pg methylierte in 50 ng PBL-DNA (1 und 4) sowie 50 ng PBL-DNA (2 und 5). 3 und 6 sind Negativkontrollen ohne Templat-DNA.

schungen mit 50 ng unmethylierter DNA. Unter Verwendung der reduzierten Primerkonzentration konnten die Amplikons beider Assays im Agarosegel mit ihrer spezifischen Länge nachgewiesen werden (Spuren 1-3 in Abb.23). Die optimierte Duplexreaktion zeigte dabei auch eine geringere Neigung zur Bildung von Primerdimeren. Die Leistungsfähigkeit der Duplex-Reaktion aus zwei HM-Assays wurde anschließend mit Hilfe einer Probit-Regression ermittelt. Das Detektionslimit, angegeben als 90 %-Detektionswahrscheinlichkeit (LOD90), lag demnach bei 19,0 pg für die Einzelreaktion des GSTp1-HM-Assays III und bei 17,8 pg für die Duplexreaktion (CI: 11,8 - 95,1 und 13,0 - 38,9). Für den PTGER4-HM-Assay wurde für die Einzelreaktion das LOD90 mit 10,2 pg (CI: 7,7 - 35,3) und in der Duplexreaktion mit 21,0 pg (CI: 14,8 - 49,4) bestimmt. Da auch die Konfidenzintervalle im Bereich von LOD50 vollständig überlappen, ist die Leistungsfähigkeit beider Assays in Duplex- und Einzelreaktion nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 24).

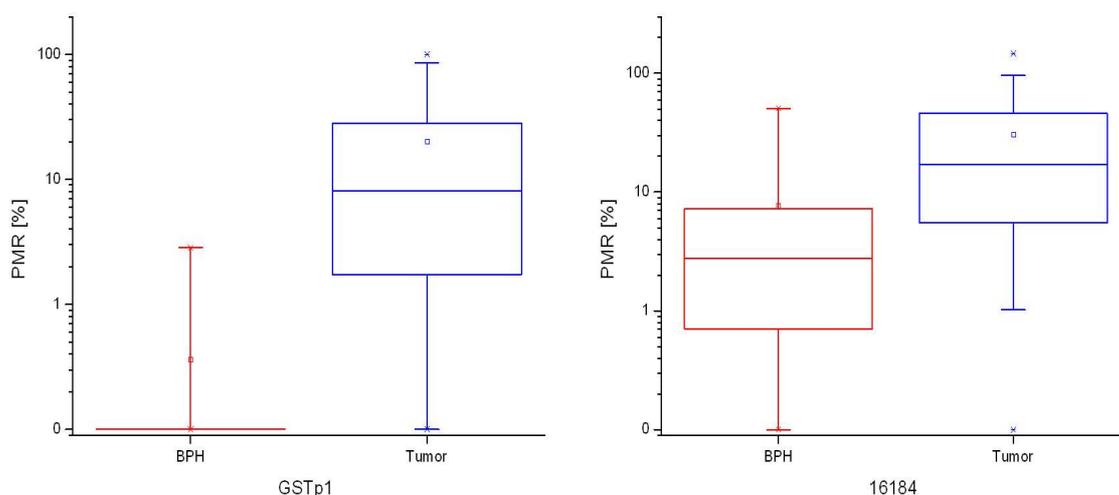


**Abbildung 24:** Probit-Regressionen zur Bestimmung des Detektionslimits (LOD). Die Detektionswahrscheinlichkeit des GSTp1-HM-Assays III (links) und des PTGER4-HM-Assays (rechts) ist für die Einzelreaktionen (rot) und in der Duplexreaktion (blau) aus beiden Assays dargestellt. Das 95 % Konfidenzintervall ist jeweils als gestrichelte Linie dargestellt.

#### 4.2.3 Analyse von Patientenproben mit der Duplexreaktion aus zwei HM-Assays

##### 4.2.3.1 Analyse von Prostata-Gewebeproben

Die Duplexreaktion aus GSTp1-HM-Assay III und PTGER4-HM-Assay wurde zur Untersuchung von 38 Proben aus Prostatagewebe herangezogen, davon stammten 12 aus BPH und 26 aus Tumoren. Die extrahierte DNA wurde bisulfit-konvertiert und die Konzentration mittels Referenz-Assay bestimmt. 2 µl der Bisulfit-Präparation wurde in die Duplexreaktion eingesetzt und die PMR-Werte bestimmt. Die Methylierung lag danach in Tumoren bei durchschnittlich 20 % für GSTp1 und bei 30 % für PTGER4. In der Abbildung 25 sind die Ergebnisse als Box-Whisker-Plot dargestellt. PTGER4 wies jedoch eine höhere Methylierung in BPH von durchschnittlich 8 % auf, während in GSTp1 durchschnittlich 0,2 % gemessen wurden.



**Abbildung 25:** PMR-Werte für GSTp1-HM-Assay III (links) und PTGER4-HM-Assay (rechts) in BPH und Prostata-Tumorgewebe. 12 BPH und 26 Tumorgewebeprobe wurden mit einer Duplexreaktion aus GSTp1-HM-Assay III und PTGER4-HM-Assay vermessen. Der Median der Methylierung lag für GSTp1 bei 0 % (BPH, rot) und 9 % (Tumor, blau) sowie für PTGER4 bei 4 % (BPH, rot) und 18 % (Tumor, blau).

#### 4.2.3.2 Analyse von Serum-DNA

Das Aufgabe eines diagnostischen Tests zur Krebsvorsorge ist die Detektion von Tumor-DNA in Blut-Proben. Um die Leistungsfähigkeit des Duplex-HM-Assays für diesen Zweck zu überprüfen, wurde eine Untersuchung von 46 Serumproben durchgeführt. 26 Seren stammten von Patienten, bei denen ein Prostatatumor diagnostiziert worden war. Die Kontrollgruppe setzte sich aus 10 gesunden Probanden sowie 10 Patienten mit BPH zusammen. Aus Blut wurden 4 ml Serum gewonnen und mit Hilfe einer automatisierten DNA-Extraktion aufgearbeitet. Danach wurde die DNA bisulfit-konvertiert und 10 µl DNA mit dem Duplex-HM-Assay analysiert. Dies entspricht der DNA aus 0,8 ml Serum pro Reaktion.

In der DNA von gesunden Probanden wurde keine methylierte DNA von GSTp1 oder PTGER4 nachgewiesen. Eine Serumprobe der BPH-Gruppe gab mit beiden Assays ein positives Signal. Insgesamt wurden 11 der 26 Serumproben von Patienten mit Prostatakrebs positiv diagnostiziert. Dabei wurden 10 Proben mit dem GSTp1-HM-Assay und 6 mit dem PTGER4-HM-Assay detektiert (Tab. 9). Die Sensitivität der Analyse von Serumproben lag also bei 42 %, wobei eine Spezifität von 95 % erreicht wurde.

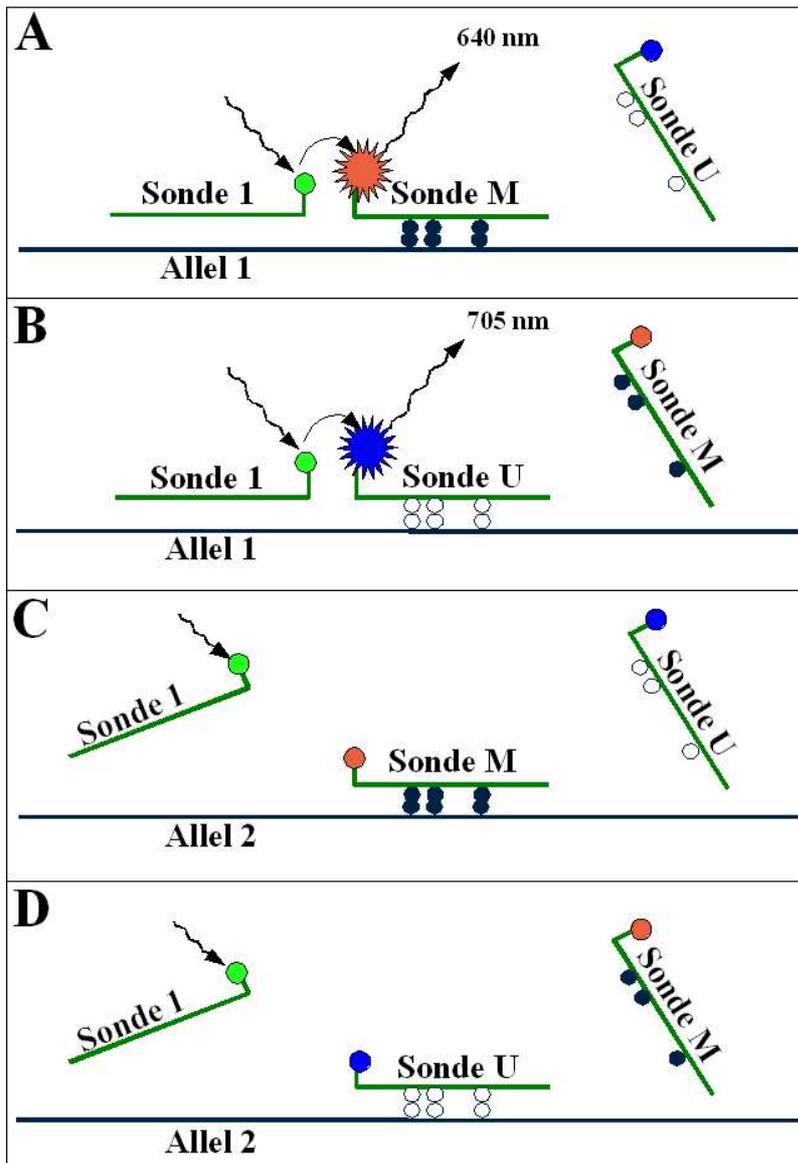
**Tabelle 9:** Detektion methylierter DNA in Serum mit dem Duplex-HM-Assay für das GSTp1- und das PTGER4-Gen.

Diagnose	GSTp1-HM-Assay	PTGER4-HM-Assay	Detektion mit mind. einem HM-Assay
gesund (10)	0/10	0/10	0/10
BPH (10)	1/10	1/10	1/10
Prostatakrebs (26)	10/26	6/26	11/26

### 4.3 Entwicklung einer allelspezifischen quantitativen Methylierungsanalyse

#### 4.3.1 Funktionsprinzip eines allelspezifischen QuantitativeMethylation-Assays

Um genetisches Imprinting während der Embryogenese analysieren zu können, sollte auf der Basis des QuantitativeMethylation-Assays (QM-Assay) eine Technologie entwickelt werden, die es ermöglicht, eine allelspezifische Methylierungsanalyse durchzuführen. Ziel war es, die zeitliche Abfolge der Reprogrammierung des Methylierungsmusters in der Region des H19- und des IGF2-Gens zu verfolgen und dabei dem elterlichem Allel zuzuordnen. Dabei sollte gleichzeitig eine genaue Quantifizierung als auch eine allelspezifische Zuordnung des Methylierungssignals erfolgen. Dazu wurde die Idee umgesetzt, QM-Assays um allelspezifische Sonden zu erweitern. Möglich wird dies durch die Verwendung von zwei LightCycler-Hybridisierungs sonden, in denen eine Sonde methylierungsspezifisch und die andere SNP-spezifisch reagiert. So kann nur dann ein Signal erzeugt werden, wenn beide Sonden benachbart zueinander an das Amplifikat binden. Das Prinzip kann nur dann umgesetzt werden, wenn sich maternales und paternales Allel in ihrer Sequenz unterscheiden. Deshalb wurden Nachkommen aus genetisch unterschiedlichen Mäusen analysiert. Liegt ein Polymorphismus in der zu



**Abbildung 26:** Funktionsprinzip eines allelspezifischen QM-Assays. In einer Realtime-PCR bindet Sonde 1, wenn das Amplifikat Allel 1 enthält (Teil A und B). Sonde M bindet benachbart zu Sonde 1, wenn die Sequenz des Allels 1 methylierte CpG-Positionen enthält (Teil A). Mittels FRET wird bei 640 nm ein Signal erzeugt. Liegt Allel 1 unmethyliert vor, bindet Sonde U und das Signal wird bei 705 nm erzeugt (Teil B). Enthält die Ausgangs-DNA nur das Allel 2, wird kein Signal erzeugt, unabhängig davon, ob Methylierung vorliegt (Teil C und D). Zur Analyse des Allels 2 werden die Sonden M und U mit einer allelspezifischen Sonde 2 kombiniert.

analysierenden Region vor, können also allelspezifische Donor-Sonden entworfen werden, die spezifisch an das maternale oder paternale Allel binden. Ist das untersuchte Allel methyliert, so bindet die methylierungsspezifische Akzeptor-Sonde benachbart zur allelspezifischen Donor-Sonde. Das durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) erzeugte Signal ist somit proportional zum Anteil methylierter DNA des untersuchten Allels (Abb. 26A und B). Der Methylierungszustand des zweiten, nicht untersuchten, Allels hat keinen Einfluß auf das Signal (Abb. 26C und D).

### 4.3.2 Identifikation von SNPs in der SD7-Maus

Zunächst wurden Bereiche im H19-Gen sowie in Regionen von IGF2 identifiziert, die eine Methylierungsanalyse mittels Realtime-PCR erlauben, d.h. in denen potentielle Primer- und Sondenbindungsstellen liegen. Anschließend wurden in den definierten Regionen Polymorphismen identifiziert,

H19-BL6	TGTGGCTAACTATAGGNAAGGCATAGNAAGNCTGTTATGTGCAACAAGGGGAA <b>CG</b> GATGCT
H19-SD7	TGTGGCTAACTATAGGTAAGGCATAGAAAGTCTGTTATGTGCAACAGGGGAA <b>CG</b> GATGCT *****
H19-BL6	AC <b>CGCGCG</b> GTGGCAGCATACTCCTATATAT <b>CG</b> TGGCCCAAATGCTGCCAACTTGGGGGGA
H19-SD7	AC <b>CGCGCG</b> GTGGCAGCATACTCCTATATAT <b>CG</b> TGACCCAAATGCTGCCAACTTGGGGGGA *****
H19-BL6	<b>CG</b> GATTCATTCCCAGCAATATCCAANNN
H19-SD7	<b>CG</b> GATTCATTCCCAGCAATATCCAANNN *****
DMR0-BL6	CCCCTGCTTTGGAGGGGGCTGCTAATATTGACCCAGCCAG <b>CG</b> GATCAT <b>CG</b> TCCGGGCAAT
DMR0-SD7	CCCCTGCTTTGGAGGGGGCTGCTAATATTGACCCAGCCAG <b>CG</b> GATCAT <b>CG</b> TCCGGGCAAT *****
DMR0-BL6	TT <b>CG</b> GAAGAGAATCTTGGGCACCAGTGACTCCC <b>CG</b> GTCCCTCTTTATCCAC <b>CG</b> TCCGGGAA
DMR0-SD7	TT <b>CG</b> GAAGAGAATCTTGGGCACCAGTGACTCCC <b>CG</b> GTCCCTCTTTATCCAC <b>CG</b> TCCGGGAA *****
DMR0-BL6	CTTCAGGAACTA <b>CG</b> AAG <b>CG</b> ACTAGAGTACAGGTAACCTAATTGATTTCCCCTTGTTTCATGC
DMR0-SD7	CTTCAGGNNCTA <b>CG</b> AAG <b>CG</b> ACTAGAGTACAGGTAACCTAATTGATTTCCCCTTGTTTCATGC *****
DMR0-BL6	CTTTTTGTGTAANNN
DMR0-SD7	CTTTT-GTGTAANNN *****
DMR2-BL6	GAC <b>CG</b> CCTG <b>CG</b> CAGAGGCCTGCCTGCCCTCCTG <b>CG</b> TGCC <b>CG</b> CGGGGT <b>CG</b> CATGCTTGCCA
DMR2-SD7	GAC <b>CG</b> CCTG <b>CG</b> CAGAGGCCTGCCTGCCCTCCTG <b>CG</b> TGCC <b>CG</b> CGGGGT <b>CG</b> CATGCTTGCCA *****
DMR2-BL6	AAGAGCTCAAAGAGTTCAGAGAGGCCAAA <b>CG</b> TCAT <b>CG</b> TCCCCTGAT <b>CG</b> TGTTACCACCCA
DMR2-SD7	AAGAGCTCAAAG <b>CG</b> TTCAGTGAGGCCAAA <b>CG</b> TCAT <b>CG</b> TCCCCTGAT <b>CG</b> TGTTACCACCCA *****
DMR2-BL6	AAGACCC <b>CG</b> CCCA <b>CG</b> GGGGAGCCTCTT <b>CG</b> GAGATGTCCAGCAACCATCAGTGAATCAAAT
DMR2-SD7	AAGACCC <b>CG</b> CCCA <b>CG</b> GGGGAGCCTCTT <b>CG</b> GAGATGTCCAGCAACCATCAGTGAATCAAAT *****
DMR2-BL6	TATGTGGTAA
DMR2-SD7	TAC <b>CG</b> TGGTAA ** *****

**Abbildung 27:** Polymorphismen des Mausstammes SD7. Ausgewählte Regionen von H19 und IGF2/DMR0 wurden durch Sequenzierung analysiert. Die für BL6 gefundenen Sequenzen entsprechen dem Wildtyp (Accession AY849916, AY849920). Der SD7-Stamm zeigt Polymorphismen in H19, jedoch nicht in IGF2/DMR0. Für IGF2/DMR2 waren die Polymorphismen bekannt und sind hier ebenfalls im Vergleich zur BL6-Sequenz (Accession AY849922) dargestellt. CpG-Positionen sind rot markiert, Polymorphismen grau unterlegt.

die eine allelspezifische Detektion mittels LightCycler-Sonden ermöglichen. Dazu wurden die Regionen H19, IGF2/DMR0 und IGF2/DMR2 der Maus-Stämme BL6 und SD7 sequenziert und die Sequenzen miteinander verglichen. Analysiert wurden 10 ng genomische DNA aus peripherem Blut, die von der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt wurde.

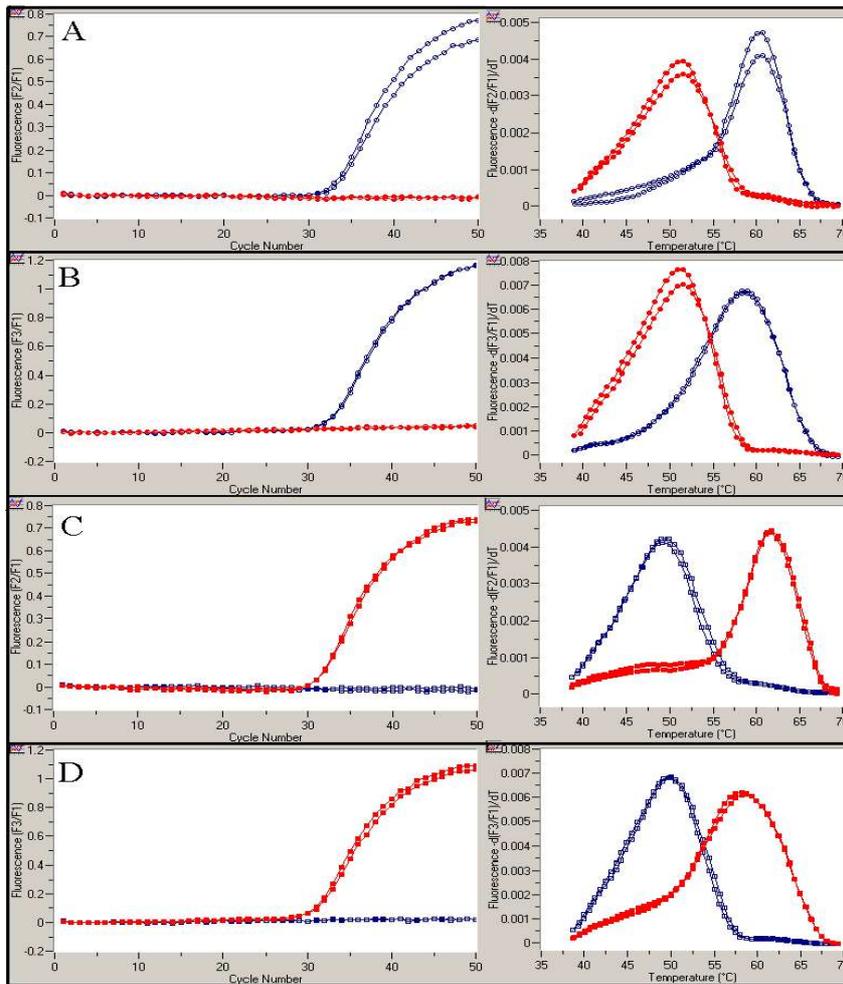
In der H19-Region der SD7-Maus konnte ein A/G-Polymorphismus gefunden werden, der direkt neben vier CpGs lokalisiert war. Dieser Polymorphismus ist für eine allelspezifische Methylierungsanalyse geeignet. Für die DMR0-Region des IGF2-Gens wurde kein geeigneter Polymorphismus gefunden. In der DMR2-Region konnten 3 SNPs identifiziert werden, wobei 2 für die Analyse geeignet waren. Diese Regionen war bereits an der Universität des Saarlandes sequenziert worden (M. Paulsen, pers. Komm.).

#### **4.3.3 Kalibrierung der allelspezifischen QM-Assays für IGF2/DMR2**

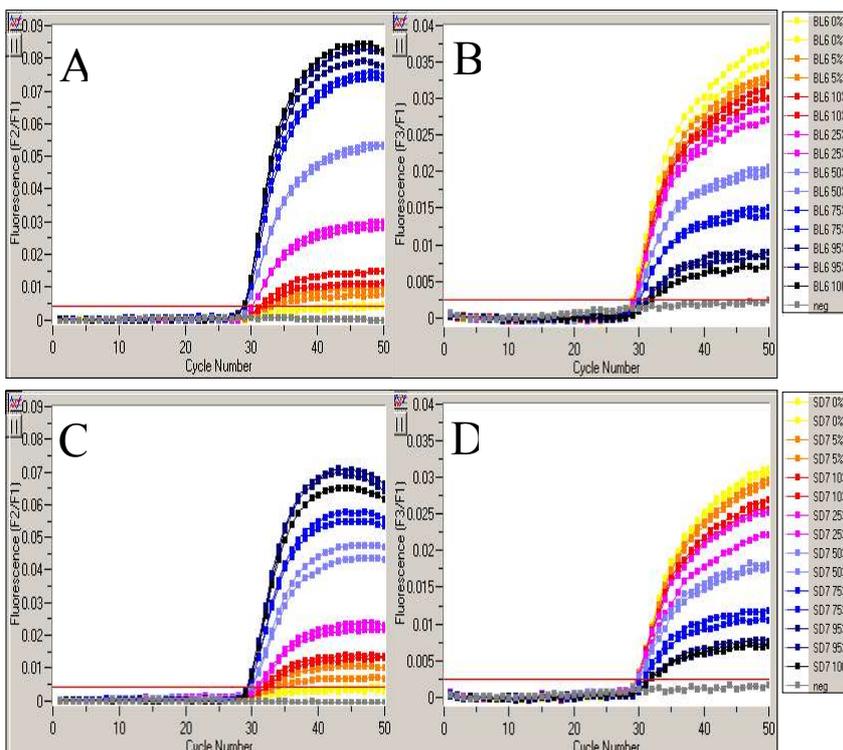
Die in der Region des IGF2/DMR2 gefundenen Polymorphismen wurden genutzt, um einen allelspezifischen QM-Assay zu entwickeln. Die methylierungsspezifischen Sonden wurden so gestaltet, dass sie in Nachbarschaft zu den in Kapitel 4.3.2 gefundenen Polymorphismen liegen. Die Sonde für methylierte DNA wurde mit dem Farbstoff LCred640 für den Kanal F2 und die Sonde für nicht methylierte Sequenzen mit LCred705 für den Kanal F3 ausgestattet. Anschließend wurden die für BL6 bzw. SD7 spezifischen Donor-Sonden entworfen (IGF2-BL6-Fluo und IGF2-SD7-Fluo). Dabei musste beachtet werden, dass durch einen der beiden SD7-Polymorphismen ein zusätzliches CpG entsteht. Um die allelspezifische Sonde unabhängig vom Methylierungsstatus dieses CpG zu machen, wurde eine Inosin-Base an dieser Position eingesetzt. Die Allel-Spezifität der Sonden wurde mittels homozygoter DNA der Stämme BL6 und SD7 aus adulten Mäusen nachgewiesen. Der BL6-QM-Assay erzeugte nur auf BL6-DNA Signale, während mit dem SD7-QM-Assay hier keine Signale erzeugt wurden. Der SD7-QM-Assay hingegen detektierte nur SD7-DNA, auf BL6-DNA wurden keine Signale gemessen. Die Allelspezifität beider Assays war somit gewährleistet (Abb. 28).

Der SD7-spezifische QM-Assay wurde mit Kalibriermischungen aus SD7-DNA, der BL6-spezifische QM-Assay mit Kalibriermischungen aus BL6-DNA kalibriert. Als 0%-Kontrolle diente MDA-DNA beider Mausstämme. 100 % methylierte DNA wurde mit Hilfe von Sssl-Methyltransferase aus MDA-DNA und danach Mischungen mit 5, 10, 25, 50, 75 bzw. 95% Methylierung hergestellt. 10 ng jeder Mischung wurden in zwei Wiederholungen gemessen. Mit den methylierungsspezifischen Sonden wurden spezifische Signale in Abhängigkeit vom Anteil methylierter DNA in den Kanälen F2 und F3 erzeugt (Abb. 29). Zur Simulation von heterozygoter DNA wurden je 10 ng nicht methylierter DNA des anderen Mausstammes zugegeben. Eine Kalibrierung ohne Hintergrund-DNA ergab die gleichen Resultate. Die entwickelten allelspezifischen QM-Assays erwiesen sich als unabhängig von der Hintergrund-DNA.

Aus den CTs der Reaktionen wurde der Methylierungsindex berechnet und über dem Anteil methylierter DNA aufgetragen. Für beide Assays ergibt sich ein sigmoider Verlauf der Kalibrierkurve (Abb. 30 A u. B).



**Abbildung 28:** Spezifitätstest der allelspezifischen QM-Assays für IGF2/DMR2. Links sind die Amplifikationen von 10 ng bisulfit-konvertierter DNA adulter Mäuse der Stämme BL6 (blau, offene Symbole) und SD7 (rot, geschlossene Symbole) dargestellt. Der BL6-spezifische Assay detektiert keine SD7-DNA (A und B). Der SD7-Assay gibt keine Signale mit BL6-DNA (C und D). Methylierte DNA wird im Kanal F2/F1 detektiert (A und C), nicht methylierte DNA im Kanal F3/F1 (B und D). Die Peaks der Schmelzkurvenanalyse (rechte Seite) zeigen, dass die allelspezifischen Sonden bei etwa 58 °C nur noch an das erwünschte Templat binden.



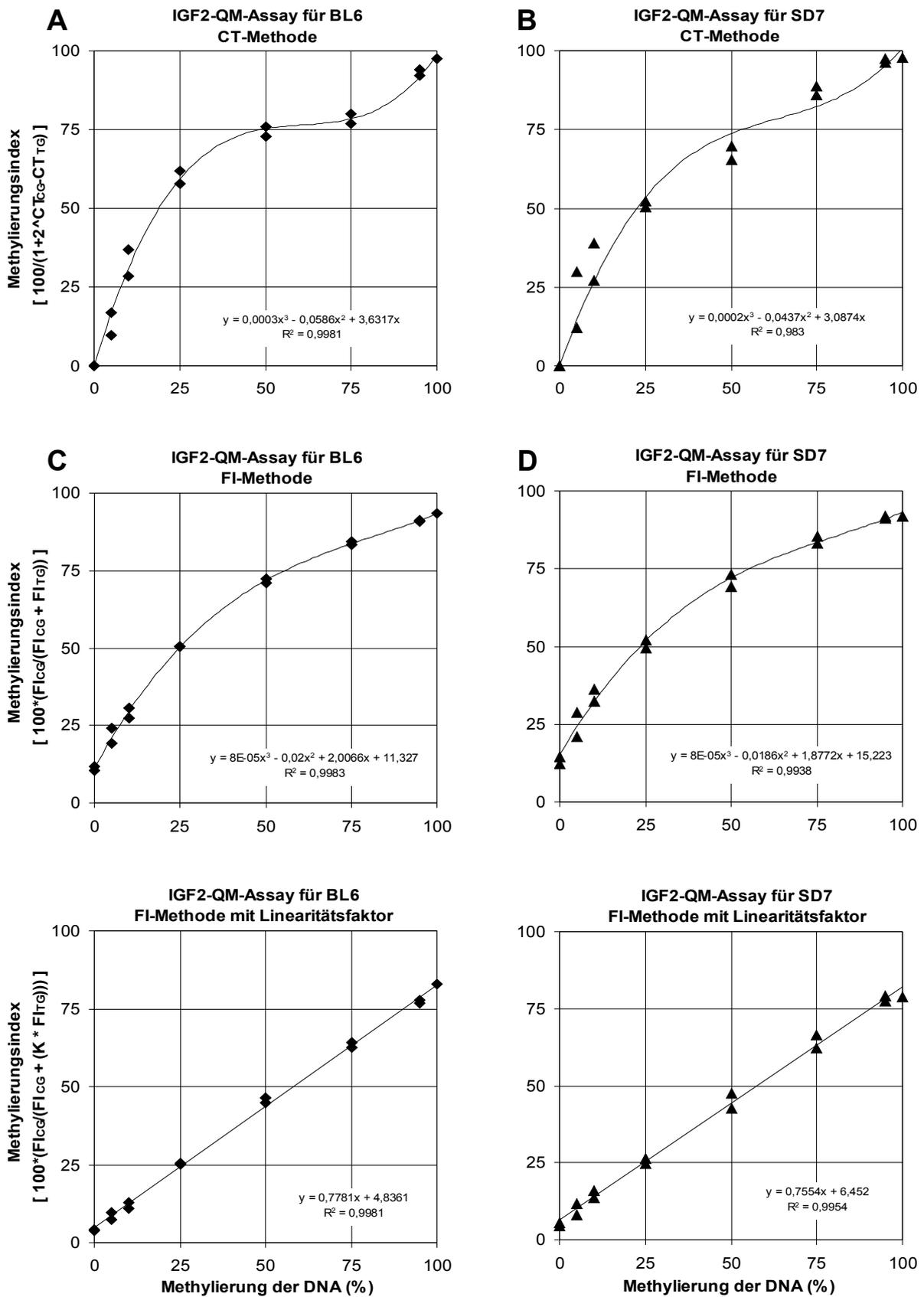
**Abbildung 29:** Amplifikationskurven der Kalibrierung der allelspezifischen QM-Assays für IGF2/DMR2. Amplifiziert wurden 10 ng bisulfit-konvertierter DNA der BL6-Maus mit 0, 5, 10, 25, 50, 75, 95 und 100 % Anteil methylierter DNA (A und B) sowie der SD7-Maus (C und D). Die Signale der methylierten DNA wurden im Kanal F2/F1 detektiert (A und C), die der nicht methylierten DNA im Kanal F3/F1 (B und D).

Anschließend erfolgte die Berechnung des Methylierungsindex mittels Fluoreszenz-Intensitäten (FI) der Realtime-PCR. Der Index wurde dabei aus dem Verhältnis der Signale von methylierter zur Summe der Signale aus methylierter und nicht methylierter DNA ermittelt:

$$MI_{FI} = 100 * FI_{(methyl.)} / FI_{(methyl.)} + FI_{(nicht\ methyl.)}$$

Die FI-Werte können dabei am Ende der PCR bestimmt werden. Die Verarbeitung der Rohdaten des Realtime-PCR erlaubt jedoch auch eine Bestimmung der FI-Werte aus der exponentiellen Phase der PCR. Die Berechnung des Methylierungsindex aus diesen FI-Werten führt zu einem monotonen Anstieg der Kalibrierungskurve (Abb. 30 C u. D). In einem nächsten Schritt wurden die FI-Werte für un-methylierte DNA (Kanal F3/F1) mit einem Linearitätsfaktor K multipliziert. Dieser wurde aus dem Verhältnis der FI-Werte für die 50 %-Mischung ermittelt. Der neu berechnete Methylierungsindex ist nun direkt linear abhängig von der eingesetzten DNA-Methylierung (Abb. 30 E u. F).

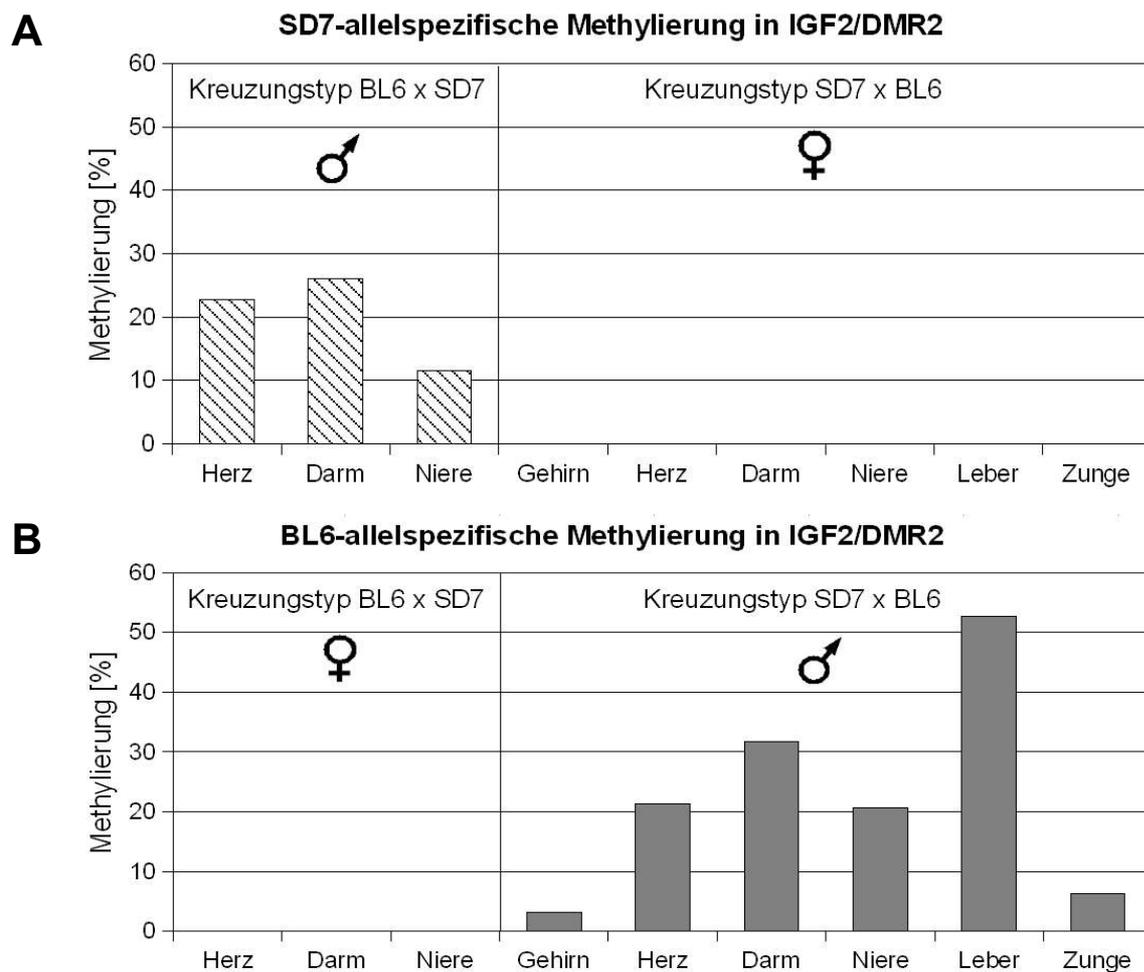
Die lineare Regression ermöglicht eine einfache Berechnung der Methylierung aus Anstieg und Achsenabschnitt der Kalibriergeraden. Für die H19-Region wurden zwei weitere allelspezifische QM-Assays für die Mausstämme BL6 und SD7 entwickelt, ihre Allelspezifität geprüft und auf DNA-Mischungen kalibriert.



**Abbildung 30:** Kalibrierung des BL6-spezifischen (A, C und E) und des SD7-spezifischen (B, D und F) QM-Assays für IGF2/DMR2. Die Auswertung erfolgte mit der CT-Methode (A und B) bzw. der FI-Methode (C und D). Durch die Anwendung des Linearitätsfaktors K konnte mit der FI-Methode eine lineare Regression der Kalibrierungskurve erreicht werden (E und F).

#### 4.3.4 Methylierung in IGF2/DMR2 in unterschiedlichem Gewebe

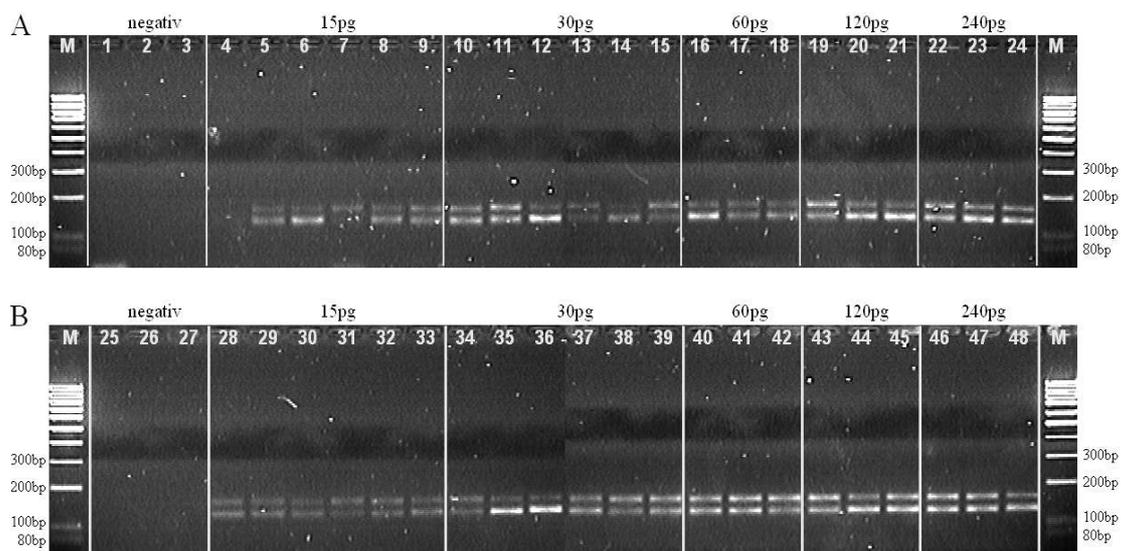
Durch die Kreuzung des Wildstammes BL6 mit dem Laborstamm SD7 entstehen heterozygote Nachkommen. Die elterliche Herkunft der Chromosomen kann anhand der beschriebenen Polymorphismen unterschieden und damit dem Geschlecht zugeordnet werden. Aus Mäusen des Kreuzungstyps **BL6**×SD7 sowie **SD7**×BL6 (der fettgedruckte Stamm ist jeweils weiblich) wurde DNA aus unterschiedlichen Gewebetypen (Herz, Darm, Niere, Gehirn, Leber und Zunge) gewonnen. Je 10 ng bisulfit-konvertierter DNA wurden in zwei Wiederholungen mit dem BL6-IGF2-QM-Assay und dem SD7-IGF2-QM-Assay vermessen. Aus den FI-Werten wurden mit Hilfe der Kalibrierung die Methylierungsraten für das jeweilige Allel ermittelt. Für das maternale Chromosom wurde in keinem der untersuchten Gewebetypen Methylierung gefunden. Hingegen konnte in allen Geweben Methylierung im parental vererbten Chromosom gemessen werden. Für Herz-, Darm- und Nieren-Gewebe wurden aus beiden Kreuzungstypen Daten gewonnen, die gute Übereinstimmung aufwiesen: Herz 23% und 21%, Darm 26% und 32%, Niere 11% und 21%. Für einige Gewebe stand nur der Kreuzungstyp **SD7**×BL6 zu Verfügung. Die gemessenen Methylierungsraten betragen hier für Gehirn 3% und für Leber 53% und für Zunge 6% (Abb. 31).



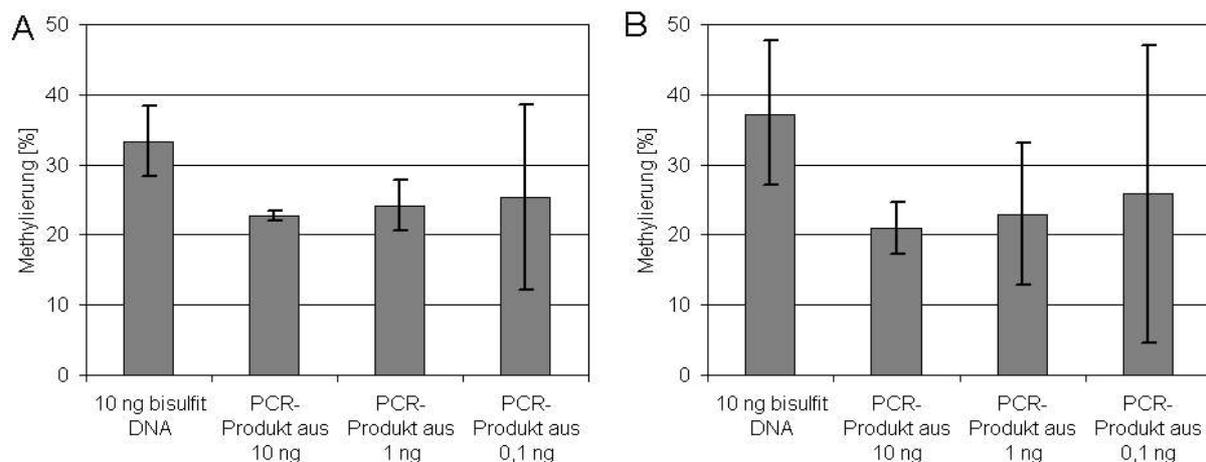
**Abbildung 31:** Methylierung von IGF2/DMR2 in verschiedenen Geweben. A: Ergebnisse des BL6-spezifischen QM-Assays, B: Ergebnisse des SD7-spezifischen QM-Assays. Es wurden 10 ng bisulfit-konvertierter DNA aus den Kreuzungsvarianten BL6×SD7 (Balken 1-3) sowie SD7×BL6 (Balken 4-8) untersucht. In dem maternalen Allel wurde keine Methylierung detektiert. Hingegen wurden im paternalen Allel unterschiedliche gewebespezifische Methylierungsraten gemessen. Die Werte stellen den Mittelwert von zwei Wiederholungen dar.

#### 4.3.5 Erhöhung der Sensitivität der QM-Assays durch Duplex-Voramplifikation

Die direkte Messung von bisulfit-konvertierter DNA mittels QM-Assay erfordert etwa 5-10 ng DNA pro Assay. Um auch geringere DNA-Mengen sicher zu quantifizieren sowie mehrere Gene untersuchen zu können, wurde eine Voramplifikation für die Genregionen H19 und IGF2/DMR2 durchgeführt. Die PCR erfolgte als Duplexreaktion im Thermocycler mit den gleichen Primern, wie sie für die QM-Assays verwendet wurden, und wurde im Agarosegel analysiert (Abb. 32). Die Sensitivität dieser Voramplifikation wurde mit bisulfit-konvertierter DNA aus adulten Mäusen der Stämme BL6 und SD7 validiert. Unter Verwendung von 30 pg Templat-DNA konnten in allen 6 Wiederholungen spezifische PCR-Produkte beider Gene amplifiziert werden. Die PCR-Produkte wurden 1:1000 in Wasser verdünnt und anschließend mit den QM-Assays vermessen. Zur Validierung der Methode wurde die Methylierung für IGF2/DMR0 in peripherem Blut homozygoten adulter Mäuse (BL6 und SD7) bestimmt (Abb. 33). Die direkte Messung von 10 ng bisulfit-konvertierter DNA ergab 33 % (für BL6) und 37 % (für SD7) Methylierung des IGF2/DMR0. Unter Verwendung von PCR-Produkten aus der Duplex-Voramplifikation wurden 21 % - 26 % Methylierung ermittelt. Die Werte wurden aus vier unabhängigen Messungen bzw. Voramplifikationen und anschließenden Messungen im QM-Assay ermittelt. Alle Messungen wurden mit Hilfe einer Mischungsreihe aus 0 % und 100 % methylierter DNA kalibriert.



**Abbildung 32:** Duplex-Voramplifikation von H19 (128 bp) und IGF2/DMR2 (161 bp). A: Amplifikation bisulfit-konvertierter DNA aus adulten Mäusen des BL6-Stammes, B: Amplifikation von Bisulfit-DNA aus SD7-Mäusen.



**Abbildung 33:** Vergleich der Ergebnisse des allelspezifischen QM-Assays für IGF2/DMR0 mit und ohne Duplex-Voramplifikation. Analysiert wurde DNA aus peripherem Blut homozygoter Mäuse der Stämme BL6 (A) und SD7 (B). Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus vier unabhängigen Realtime-Messungen. Die PCR-Produkte wurden in vier unabhängigen Duplex-Voramplifikation hergestellt und anschließend je einmal in der Realtime-PCR vermessen.

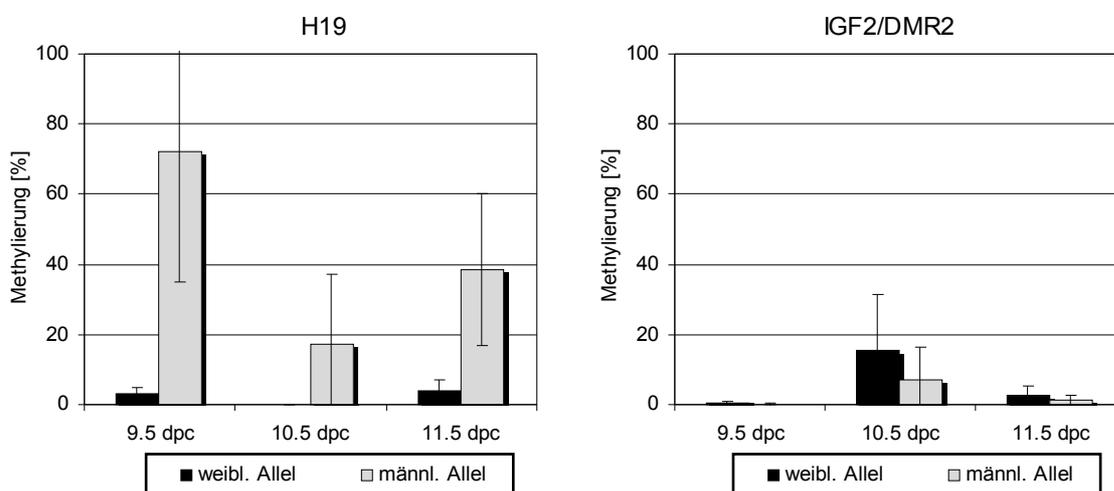
#### 4.3.5 Anwendung der allelspezifischen QM-Assays zur Analyse primordialer Keimzellen

Mit Hilfe der allelspezifischen QM-Assays wurde die Methylierung der Gene H19 und IGF2/DMR2 in den frühen Embryonalstadien untersucht. Das Ziel der Untersuchung war, den genauen zeitlichen Verlauf der Reprogrammierung der Methylierung zu beobachten. Dazu wurden Kreuzungen der Mausstämmen BL6 und SD7 erzeugt und aus den Embryos die primordialen Keimzellen gewonnen. Die Zellen wurden an der Universität des Saarlandes gewonnen und zur Verfügung gestellt. Die Präparation erfolgte an den Tagen 9,5, 10,5 und 11,5 nach der Befruchtung. Zu jedem der drei Zeitpunkte wurden Keimzellen aus drei Embryonen, also insgesamt 9 Proben, präpariert. Die Anzahl der gewonnenen Zellen betrug zwischen 30 und 75. Deren DNA wurde extrahiert und bisulfit-konvertiert. Die gesamte bisulfit-konvertierte DNA wurde in die Duplex-Voramplifikation eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden 1:1000 verdünnt und in zwei Wiederholungen mit den vier allelspezifischen QM-Assays vermessen (H19-BL6-, H19-SD7-, IGF2-BL6- und IGF2-SD7-QM-Assay).

Diese allelspezifischen Assays erlaubten die Zuordnung der Methylierung zum elterlichen Allel. Wurden Proben des Kreuzungstyps SD7×BL6 untersucht, so detektierten die BL6-spezifischen QM-Assays nur das paternale Allel. Entsprechend wurde mit den SD7-spezifischen QM-Assays nur das maternale Allel quantifiziert. Außerdem wurden reziproke Kreuzungstypen BL6×SD7 analysiert, hier waren die Werte des SD7-Assays dem paternalen und die Werte des BL6-Assays dem maternalen Allel zuzuordnen (Abb. 34).

Die Methylierung des weiblichen Allels beträgt in H19 zu allen drei Zeitpunkten annähernd 0 % bei einer Standardabweichung SD von maximal 3. Für das männliche Allel des H19-Gens wurden am Tag 9,5 72 % Methylierung (SD=37) gemessen. Am Tag 10,5 betrug die Methylierung 17 %, am Tag 11,5 38 % (SD=20 und 22). In IGF2/DMR2 wurden für das männliche Allel an den Tagen 9,5, 10,5 und 11,5 Methylierungswerte von 0 %, 7 % und 1 % gemessen (SD=0, 10 und 1). Das weibliche Allel zeigte 0 %, 15 % und 3 % Methylierung (SD=1, 16 und 3). Die erhaltenen Methylierungswerte und dazuge-

hörigen Standardabweichungen resultieren jeweils aus den Mittelwerten der drei unabhängigen Präparationen (Tab.15 und 16). Trotz der hohen Standardabweichungen, wurde ein eindeutiger Trend der Abnahme der Methylierung in H19 zwischen den Tagen 9,5 und 10,5 beobachtet. Der Verlauf der Methylierung in IGF2/DMR2 zeigt dagegen keine eindeutige Tendenz.



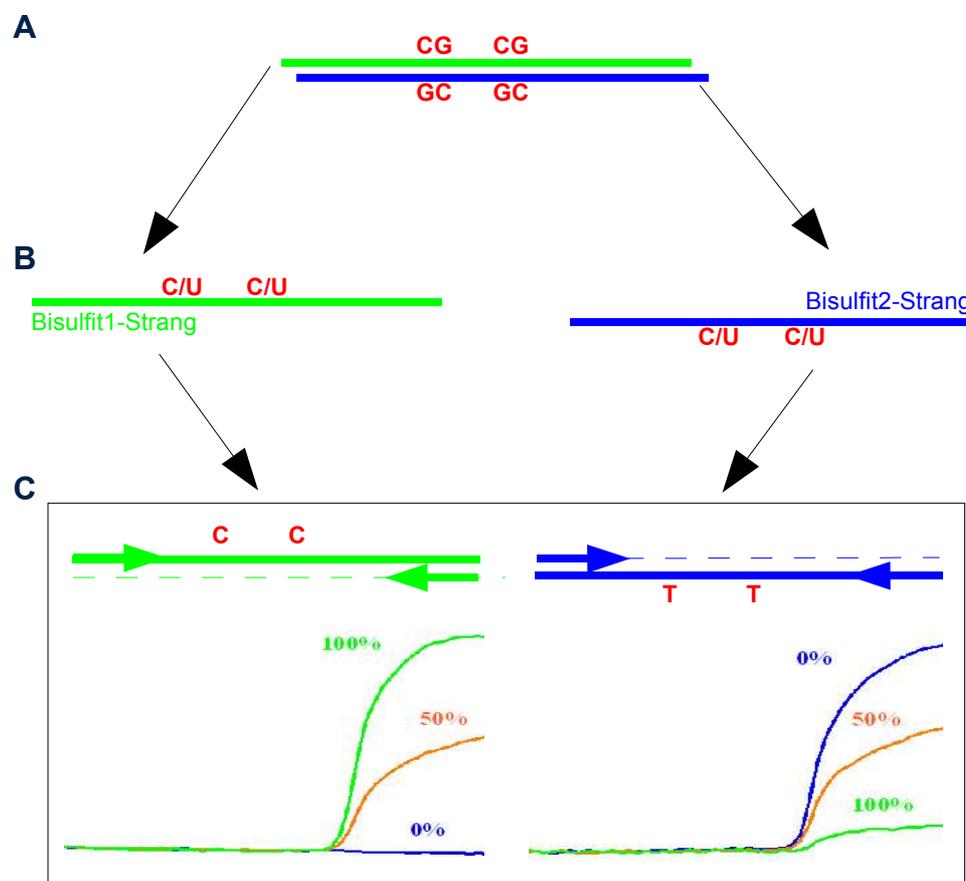
**Abbildung 34:** Methylierungsraten der Regionen H19 und IGF2/DMR2 in primordialen Keimzellen. Nach 9,5, 10,5 und 11,5 Tagen wurden die primordialen Keimzellen aus Kreuzungen der Mausstämme BL6 und SD7 präpariert, DNA extrahiert und bisulfit-konvertiert. In einer Duplex-Voramplifikation wurden die Regionen H19 und IGF2/DMR2 angereichert und anschließend mit allelspezifischen QM-Assays analysiert. Die gefundenen Methylierungswerte wurden dem weiblichen bzw. männlichen Allel zugeordnet.

## 4.4 Der HQM-Assay - eine neue PCR-Technologie zur Methylierungsanalyse

### 4.4.1 Funktionsprinzip des HeavyQuantitativeMethylation-Assays

Der Vorteil der HeavyMethyl-Technologie ist, dass sie auf der selektiven Amplifikation methylierter DNA basiert und eine hohe relative Sensitivität erreicht. Anteile von weniger als 0,025 % Methylierung können mit HM-Assays noch detektiert werden. Der QuantitativeMethylation-Assay stellt dagegen eine Methode dar, mit der eine genaue quantitative Methylierungsanalyse möglich ist. Er erreicht diese Genauigkeit durch die parallele Detektion von methylierter und nicht methylierter DNA in einer PCR und die Bestimmung des relativen Signals beider DNA-Arten. Der Nachteil des QM-Assays besteht jedoch darin, dass keine selektive Anreicherung der methylierten bzw. nicht methylierten DNA erfolgt und so das Detektionslimit bei nur etwa 3 % Methylierung liegt. Die Weiterentwicklung der Realtime-PCR-basierten Methylierungsanalyse führt zur Verknüpfung der beiden Formate in einem HeavyQuantitativeMethylation-Assay, dem HQM-Assay. Im Folgenden wird gezeigt, dass es möglich ist, eine Methylierungsanalyse sowohl sensitiv als auch quantitativ zu betreiben und die Vorteile eines HM-Assays mit denen eines QM-Assays zu verknüpfen. Das Funktionsprinzip eines HQM-Assays beruht darauf, dass nicht nur einer, sondern die beiden vor der Bisulfit-Konversion zueinander komplementären DNA-Stränge zur Methylierungsanalyse herangezogen werden (Abb. 35). Alle bisherigen Verfahren, die auf einer PCR mit bisulfit-konvertierten DNA beruhen, benutzen PCR-Primer für nur einen der beiden DNA-Stränge, entweder für den Bisulfit1- oder den Bisulfit2-Strang. Da die DNA-Stränge nach der Bisulfit-Konversion nicht mehr zueinander komplementär sind, können für die gleiche Region zwei von-

einander unabhängige PCR-Reaktionen entwickelt werden. Sowohl Bisulfit1-, als auch Bisulfit2-Strang enthalten die gleiche Methylierungsinformation und können zur Analyse der identischen CpG-Positionen herangezogen werden. In einem HQM-Assay wird nun die parallele Amplifikation methylierter und nicht methylierter DNA der gleichen Region in einer Duplex-PCR realisiert. Der HQM-Assay besteht also aus einem HM-Assay in dem methylierte DNA amplifiziert wird und einem zweiten HM-Assay in dem nicht methylierte DNA angereichert wird. So wird eine hohe relative Sensitivität für beide Arten von DNA erreicht. Methylierte und für nicht methylierte DNA werden spezifischen Sonden bei unterschiedlichen Wellenlängen detektiert und wie in einem QM-Assay ins Verhältnis gesetzt. In diesem neuartigen Assayformat wird das Methylierungssignal also nicht nur durch spezifische Hybridisierung der Sonden, sondern zusätzlich durch spezifische Amplifikation erzeugt und damit eine höhere Sensitivität als bei einem QM-Assay erreicht.



**Abbildung 35:** Funktionsprinzip des HQM-Assays. Das PCR-Design beruht auf zwei nicht komplementären Sequenzen, wie sie nach einer Behandlung mit Natriumbisulfit entstehen (B). Diese waren ursprünglich zueinander komplementär und enthalten daher die gleiche Methylierungsinformation (A). In einer Duplex-Reaktion werden gleichzeitig methylierte DNA vom Bisulfit1-Strang und nicht methylierte DNA vom Bisulfit2-Strang amplifiziert (C). Die Detektion der Duplex-Reaktion erfolgt methylierungsspezifischen Sonden bei unterschiedlichen Wellenlängen.

#### 4.4.2 Entwicklung eines HQM-Assays für das TMEFF2-Gen

Im Folgenden soll gezeigt werden, dass das HQM-Assayformat tatsächlich Vorteile gegenüber einem QM-Assay, der auf den gleichen Primern basiert, bietet. Dazu wurden zwei Realtime-PCRs für das TMEFF2-Gen entwickelt, die ein 113 bp langes Fragment in der Promotorregion des Gens amplifizieren (Accession AF242221 nt 1102 - nt 1214, Abb. 36). Für den QM-Assay wurde ein Primerpaar für den Bisulfid2-Strang etabliert. Anschließend wurden zwei methylierungsspezifische TaqMan-Sonden entworfen, die die gleichen CpG-Positionen überspannen. Die Sonden trugen die Fluoreszenz-Farbstoffen FAM und HEX sowie BHQ1 als Quencher. Anschließend wurde, basierend auf den Primern des QM-Assays, ein TMEFF2-HQM-Assay entwickelt. Diese Duplex-Realtime-PCR besteht aus zwei HM-PCRs. PCR1 dient der spezifischen Amplifikation und Detektion methylierter DNA, PCR2 der Amplifikation und Detektion nicht methylierter DNA. Für die PCR1 wurden die gleichen Primer und die gleiche Sonde verwendet wie im beschriebenen TMEFF2-QM-Assay. Zusätzlich wurde der Blocker TMEFF2-B1 entwickelt, der an die nicht methylierte DNA bindet und deren Amplifikation verhindert. Damit wird selektiv methylierte DNA angereichert. Anschließend wurde ein zweites Primerpaar entwickelt, das den gleichen DNA-Abschnitt des TMEFF2-Gens, jedoch den Bisulfid1-Strang, amplifiziert. Ein zweiter Blocker diente hier der selektiven Anreicherung nicht methylierter DNA, die mit der methylierungsspezifischen TaqMan-Sonde TMEFF2-Taq3 detektiert wurde. PCR1 und PCR2 wurden erst einzeln, dann als Duplex-Reaktion auf Spezifität und Sensitivität getestet. Die Eigenschaften des QM- und des HQM-Assays wurden experimentell bestimmt. Dazu wurden DNA-Mischungen mit 0,5 - 100 % Methylierung aus universell methylierter DNA und PBL-DNA hergestellt und 10 ng in vier Wiederholungen gemessen. Für 0,1 % Methylierung wurden 50 ng Gesamt-DNA eingesetzt. Die Abbildung 37 zeigt repräsentative Amplifikationskurven beider Assays im FAM-Kanal auf den unter-

**A: QM-Assay**

5'-HEX-TCaaCCaaaCaaCaaCaTCCaa-BHQ1 (Sonde TMEFF2-Taq1)

5'-aAAAAaAAAAaCTCCTCTaCATACGCCGCGGaaTaaaTTaCCGaaAaCATCGaCCGaaCAaCGaCGTCCGaaAAAAaAaAaCGaaCTCCATTaTTaaCCCAaaCAaTaACC  
 3'-tTTTtTtTTTtGAGGAGAtGTATCGCGCGCtAtttAAAtGGCttTtGTAGCtGGCttGtGtGCtGCAGGCtTtTtttTtTtGCtGAGGTAAAtAAAtGGGTtGTtAtTGG

3'-BHQ1-GGCttGTtGCtGCAGGCt-FAM (Sonde TMEFF2-Taq2)

**B: HQM-Assay**

**PCR1, HM-Assay für methylierte DNA**

5'-aCATACaCCaCaaaTaaaTTaCCaaaAaCATCaCCaa-PH (Blocker TMEFF2-B1)

5'-aAAAAaAAAAaCTCCTCTaCATACGCCGCGGaaTaaaTTaCCGaaAaCATCGaCCGaaCAaCGaCGTCCGaaAAAAaAaAaCGaaCTCCATTaTTaaCCCAaaCAaTaACC  
 3'-tTTTtTtTTTtGAGGAGAtGTATCGCGCGCtAtttAAAtGGCttTtGTAGCtGGCttGtGtGCtGCAGGCtTtTtttTtTtGCtGAGGTAAAtAAAtGGGTtGTtAtTGG

3'-BHQ1-GGCttGTtGCtGCAGGCt-FAM (Sonde TMEFF2-Taq2)

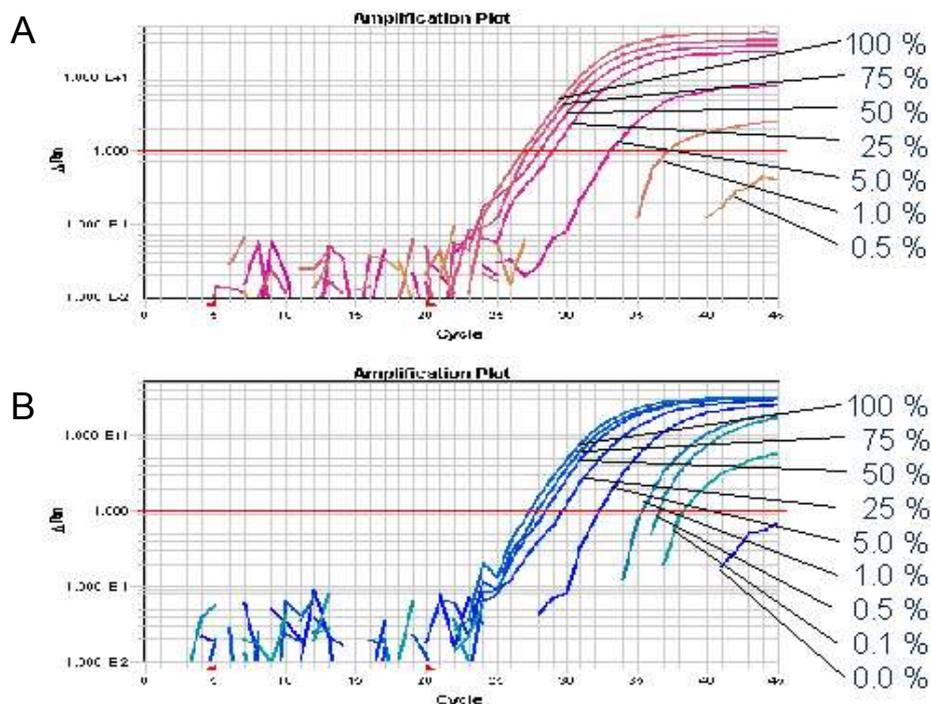
**PCR2, HM-Assay für unmethylierte DNA**

5'-HEX-ttGGtAGtGGtGtTtGGGAAG-BHQ1 (Sonde TMEFF2-Taq3)

5'-GtATACGtCGCGGGTGGTTGtCG-PH (Blocker TMEFF2-B2)

5'-GAAAGAGAAAGGtTttTtTGtATAGtGtGtGGTGGTGGtGGAGAtTtGGtGGtAGtGGtGtTtGGAAAGGGAGAGtGGGtTttATTCTTGGtttAGGtAGTGAtt  
 3'-CTTCTCTTCCaAAAAaCaTATaCaCaCCaCCCAaCaCCCTCaTaaCCaaCCaTcaCaCaAaCCCTTCCCCTCTCaCCCAaAaTAAaCAaCCaaaTCCaTcaCTaa

**Abbildung 36:** Design des QM-Assay und HQM-Assay für TMEFF2. Der TMEFF2-QM-Assay basiert auf der Sequenz des Bisulfid2-Stranges (A). Dargestellt sind das Amplikon (113 bp) als Doppelstrang, die Primer (unterstrichene Sequenzen) sowie die methylierungsspezifischen Sonden TMEFF2-Taq1 und TMEFF2-Taq2, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind. Der HQM-Assay für das TMEFF2-Gen basiert auf der Duplexreaktion aus 2 HM-Assays (B). Der Blocker TMEFF2-B1 bindet an die Sequenz der PCR1, wenn diese unmethyliert vorliegt. Mit TMEFF2-Taq2 wird angereicherte methylierte DNA detektiert. Nicht methylierte DNA wird in der PCR2 amplifiziert und detektiert.



**Abbildung 37:** Amplifikationskurven des TMEFF2-QM-Assays (A) und des TMEFF2-HQM-Assays (B). Dargestellt sind die Signale der methylierten DNA im FAM-Kanal. Amplifiziert wurden 10 ng DNA mit unterschiedlichem Gehalt methylierter DNA. Die Probe mit 0,1% Anteil methylierter DNA wurde in einer Mischung aus 50 ng PBL-DNA und 50 pg methylierter DNA hergestellt. 0,5% und 0,1% Methylierung konnte nur mit dem HQM-Assay detektiert werden.

schiedlichen DNA-Mischungen. Es ist zu sehen, dass die Intensität der Fluoreszenzsignale des QM-Assays direkt vom Gehalt methylierter DNA abhängig ist. Dies führt dazu, dass DNA-Mischungen mit weniger als 1 % Methylierung nicht mehr detektiert werden. Hingegen ist die Signalstärke im HQM-Assay bei niedrigem Anteil methylierter DNA deutlich höher als im QM-Assay (Abb. 37 B). Dies resultiert aus der spezifischen Anreicherung methylierter DNA in einer unabhängigen Amplifikation. Ein Vergleich der CTs zeigt die höhere Sensitivität des HQM-Assays. Die DNA-Mischungen mit 0,5 % und 0,1 % Methylierung wurden mit dem HQM-Assay detektiert, während mit dem QM-Assay keine Signale gemessen wurden (Tab. 10).

**Tabelle 10:** Vergleich von QM- und HQM-Assay auf verschiedenen DNA-Mischungen.<sup>1)</sup>

Methyl. DNA [ng/PCR]	Nicht methyl. DNA [ng/PCR]	Anteil methyl. DNA [%]	QM-Assay				HQM-Assay			
			CT (FAM)	SD	CT (HEX)	SD	CT (FAM)	SD	CT (HEX)	SD
0,00	10,00	0,0	-	-	27,50	0,28	42,75	1,52	27,60	0,08
0,05	50,00	0,1	-	-	25,13	0,24	38,06	0,48	25,15	0,27
0,05	9,95	0,5	-	-	27,24	0,45	37,38	0,96	27,55	0,31
0,10	9,90	1,0	41,83	3,31	27,16	0,33	35,21	0,38	27,40	0,13
0,50	9,50	5,0	33,49	0,43	27,61	0,18	32,73	0,28	27,86	0,30
2,50	7,50	25,0	29,67	0,48	27,89	0,37	30,07	0,33	28,21	0,37
5,00	5,00	50,0	28,46	0,29	28,51	0,24	28,66	0,18	28,53	0,20
7,50	2,50	75,0	27,76	0,23	29,86	0,26	28,12	0,17	30,05	0,24
10,00	0,00	100,0	27,32	0,27	-	-	27,60	0,18	-	-
0,00	0,00	neg.Kontr.	-	-	-	-	-	-	-	-

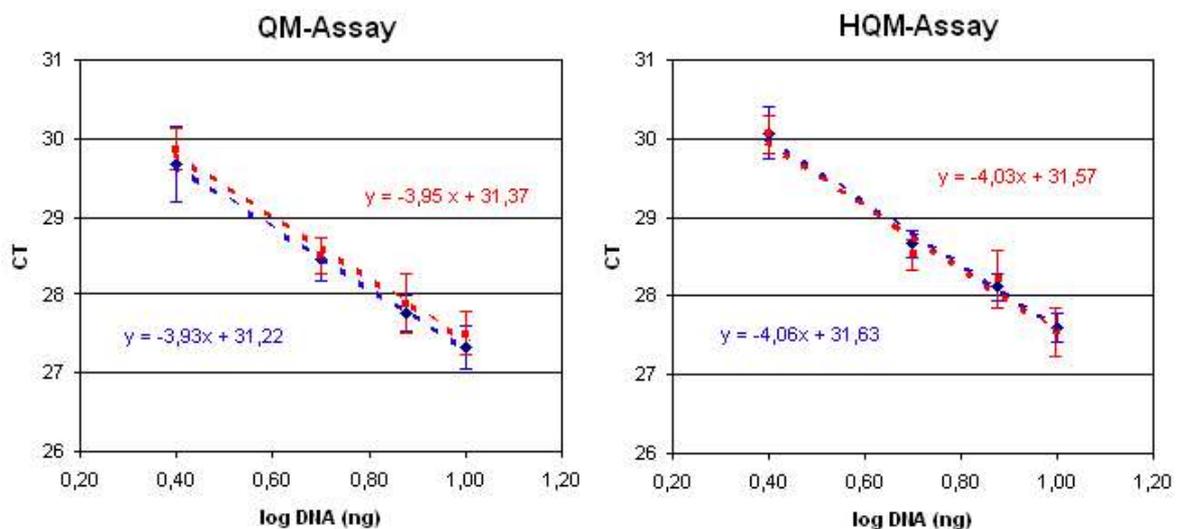
<sup>1)</sup> Mittelwerte und Standardabweichung aus vier Wiederholungen.

#### 4.4.3 Eigenschaften des TMEFF2-HQM-Assays

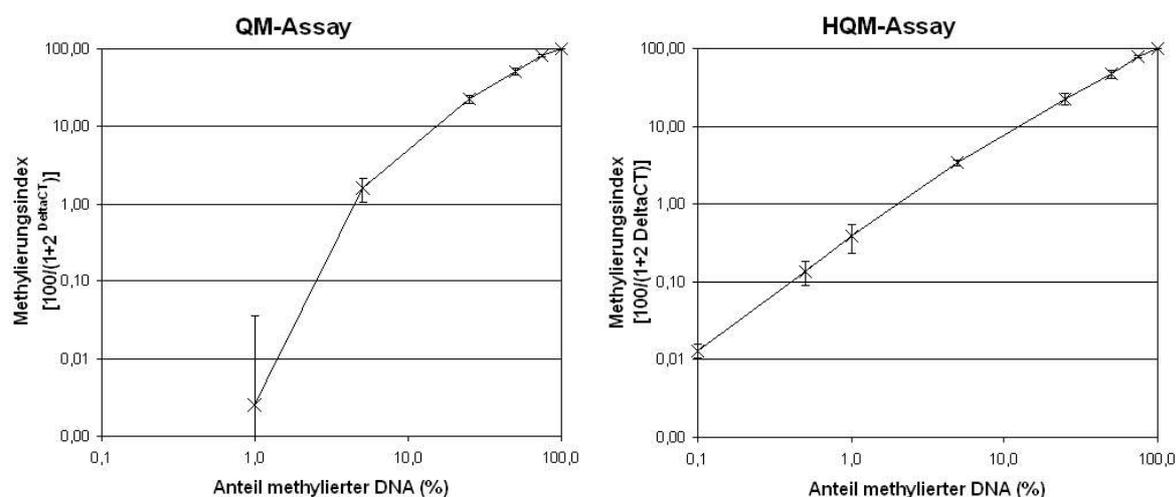
Aus den erhaltenen CTs für die DNA-Mischungen mit 0, 25, 50, 75 und 100 % Anteil methylierter DNA wurden die PCR-Effizienzen beider Assays ermittelt. Die Mittelwerte der CTs für methylierte und nicht methylierte DNA wurden getrennt aufgetragen und nach der Formel  $E=10^{(1/\text{Steigung})}$  die Effizienzen berechnet (Abb. 38). Für den QM-Assay wurden Effizienzen von 1,8 (Steigung -3,93) mit methylierter DNA und 1,79 (Steigung -3,95) mit nicht methylierter DNA ermittelt. Für den HQM-Assay ergaben sich Effizienzen von 1,77 (Steigung -4,03) und 1,76 (Steigung -4,06).

Die quantitativen Eigenschaften beider Assays wurden anschließend mit Hilfe des Methylierungsindex verglichen. Der Methylierungsindex ergibt sich aus der Differenz des CT im FAM-Kanal und des CT im HEX-Kanal und wird nach der Formel  $M = 100 / (1 + E^{(CT_{\text{methyliert}} - CT_{\text{nicht methyliert}})})$  errechnet (Abb. 39). Dabei wurde für E der Mittelwert aus methylierter und nicht methylierter DNA eingesetzt.

Als Maß für die Diskriminierungseigenschaften der Assays wurde außerdem der Fisher Score (FS) herangezogen (Tab. 11). Je größer der Fisher Score, desto sicherer werden zwei Proben voneinander unterschieden. Danach ermöglicht sowohl der QM-Assay als auch der HQM-Assay eine gute Diskriminierung zwischen 1 und 5 %, 5 und 25 %, 25 und 50 %, 50 und 75 % sowie 75 und 100 % methylierter DNA. Beide Assays weisen hier für den Fisher Scores Werte größer 8 auf. Der QM-Assay bietet nicht die Möglichkeit, 1 % methylierter DNA oder weniger zu quantifizieren. Mit dem HQM-Assay hingegen konnten auch 1 % von 0,5 %, 0,5 % von 0,1 % (FS=7) sowie 0,1 % von 0 % (FS=6) unterschieden werden. Der Verlauf der Kalibrierkurven mit den dazugehörigen Standardabweichungen verdeutlicht die höhere Sensitivität des HQM-Assays (Abb. 39). Die relative Sensitivität des HQM-Assays beträgt mindestens 1:1000, wobei 50 pg methylierter DNA in 50 ng Gesamt-DNA (0,1%) von der Hintergrund-DNA (0 %) unterschieden werden konnten.



**Abbildung 38:** PCR-Effizienzen des TMEFF2-QM- und HQM-Assays. Aufgetragen wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der CTs aus vier Messungen von 10 ng bisulfit-konvertierter DNA mit einem Anteil von 0, 25, 50, 75 und 100 % methylierter DNA. Die Ergebnisse des FAM-Kanals (methylierte DNA) sind blau, die Ergebnisse des HEX-Kanals (nicht methylierte DNA) rot dargestellt. Aus der Steigung errechnen sich die PCR-Effizienzen von 1,80 (Steigung -3,93), 1,79 (Steigung -3,95), 1,77 (Steigung -4,03) und 1,76 (Steigung -4,06).



**Abbildung 39:** Kalibrierkurven des TMEFF2-QM-Assays und TMEFF2-HQM-Assays. Aufgetragen wurde der Methylierungsindex gegen den Anteil methylierter DNA im Templat. Der Methylierungsindex ergibt sich aus den CTs des FAM- und des HEX-Kanals.

**Tabelle 11:** Methylierungsindex und Fisher Score für QM- und HQM-Assay

Anteil methyl. DNA <sup>a)</sup> %	QM-Assay			HQM-Assay		
	Methylierungs- Index	SD	Fisher Score	Methylierungs- Index <sup>b)</sup>	SD	Fisher Score
0,0	0,00	0,00	-	0,00	0,00	6
0,1	0,00	0,00	-	0,01	0,00	7
0,5	0,00	0,00	-	0,14	0,05	2
1,0	0,00	0,03	8,4	0,39	0,16	98
5,0	1,59	0,55	57,9	3,40	0,26	24
25,0	22,40	2,70	22,6	22,36	3,82	13
50,0	51,70	5,50	21,9	47,05	5,68	28
75,0	81,90	3,30	30,1	79,87	2,50	65
100,0	100,00	0,00		100,00	0,00	

<sup>a)</sup> Mischungen hergestellt aus PBL-DNA und universell methylierter DNA

## 4.5 Entwicklung von Verfahren zur Kontaminationsvermeidung

### 4.5.1 Notwendigkeit der Kontaminationsvermeidung

Eine Herausforderung aller PCR-basierten Methoden ist die Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse. Sie können durch den Eintrag und die Reamplifikation unerwünschter PCR-Produkte aus vorherigen DNA-Analysen verursacht werden („carry over contamination“). Die hohe Stabilität von DNA und die extrem hohe Anzahl an Amplifikaten, die in einer PCR entstehen, können leicht zu einer Verunreinigung neuer PCR-Reaktionen führen und die ergebnisse verfälschen. Neben sorgfältiger experimenteller Praxis stellen vor allem Systeme zur „carry over prevention“ eine fehlerfreie Analyse sicher.

Ein bewährtes System zur Vermeidung von Kontaminationen durch Amplifikate ist die Verwendung von Uracil-DNA-Glykosylase (UNG). UNG spaltet die Base Uracil sowohl in doppel- als auch in einzelsträngiger DNA ab. Es entstehen sogenannte abasische Positionen, welche dazu führen, dass die betroffene DNA nicht amplifiziert werden kann. Eine routinemäßige Verwendung von dUTP anstelle von dTTP in allen PCR-Reaktionen eines Labors ermöglicht die Anwendung von UNG. PCR-Produkte aus vorherigen Experimenten werden im neuen Reaktionsansatz mit Hilfe von UNG zerstört, während die Templat-DNA erhalten bleibt, da sie kein Uracil enthält. Dieses Verfahren kann bei bisulfit-konvertierter DNA jedoch nicht angewendet werden, da sie Uracil enthält. Eine Behandlung des Reaktionsansatzes mit UNG führt zu abasischen Positionen in der Bisulfit-DNA, so dass diese nicht mehr amplifiziert werden kann. Für Experimente mit Bisulfit-DNA musste daher ein neues Verfahren entwickelt werden.

#### **4.5.2 PCR-Kontaminationsvermeidung mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen**

##### **4.5.2.1 Verfahren mit Restriktionsendonukleasen für vorhandene Schnittstellen**

Als erste Möglichkeit der Kontaminationsvermeidung wurde die Neutralisation von PCR-Produkten mit Hilfe von Restriktionsenzymen an vorhandenen Schnittstellen getestet. Dabei wurde deren Spezifität für doppelsträngige DNA ausgenutzt. Doppelsträngige PCR-Produkte, nicht jedoch einzelsträngige Bisulfit-DNA, können mit ihnen hydrolysiert werden. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass ihre Erkennungssequenz mindestens einmal innerhalb des Amplikons vorkommt. Dem PCR-Ansatz wurden einzelne oder auch Kombinationen aus mehreren Restriktionsenzymen zugegeben. Anschließend wurden dem Ansatz PCR-Produkte zugesetzt, um eine Kontamination zu simulieren. Für die Aktivität der Restriktionsenzyme wurde der geschlossene PCR-Reaktionsansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert. In der anschließenden 10minütigen Denaturierungsphase wurden die Endonukleasen thermisch inaktiviert. Mit dem Enzym-Mix aus drei Endonukleasen (*MseI*, *Bsh1236I*, *SsiI*) konnten 97,8 % des zugesetzten „kontaminierenden“ PCR-Produktes inaktiviert werden. Die CTs für die Amplifikation methylierter Bisulfit-DNA wurden dabei nicht beeinflusst. Durch die Anwendung des Enzym-Mixes konnte die Effizienz gegenüber der Anwendung einzelner Enzyme wesentlich erhöht werden (Tab.12).

##### **4.5.2.2 Verfahren mit Restriktionsendonukleasen für erzeugte Schnittstellen**

Entwickelt wurde ein weiteres Verfahren zur PCR-Kontaminationsvermeidung, das auf der Erzeugung von Restriktionsschnittstellen im PCR-Produkt basiert, die in der zu amplifizierenden DNA-Region normalerweise nicht vorkommen. Dies wurde durch einen gezielten Basenaustausch oder das Hinzufügen von einer oder maximal zwei Basen in der Primersequenz erreicht. Trotz Basenfehlpaarung mit der Templat-DNA wurden spezifische PCR-Produkte erzeugt, die eine neue Restriktionsschnittstelle aufwiesen. Die Templat-DNA hingegen besaß keine Erkennungstelle und blieb nach der Behandlung mit der sequenzspezifischen Endonuklease intakt.

Mit dieser Methode wurden gute Neutralisationseffekte erzielt (Tab. 12). Hervorzuheben ist die Verwendung von *GsuI*, einem Restriktionsenzym vom Typ IIS. Es schneidet außerhalb der Erkennungssequenz zwischen den Basen 16/14 des Doppelstranges in 3'-Richtung. Dies ermöglicht die

Erzeugung der Schnittstelle durch Anhängen der Erkennungssequenz 5'-CTGGAG an das 5'-Ende der Primer, ohne dabei ihre genspezifische Sequenz zu verändern. Als besonders effizient erwies sich diese Verlängerung als Tandemrepeat der *GsuI*-Erkennungssequenz. Dies steigerte die Effizienz der Methode so wesentlich, dass etwa 99,9 % des PCR-Produktes inaktiviert werden konnten (Tab. 12).

**Tabelle 12:** Effizienzen der Neutralisation von PCR-Produkten im Reaktionsansatz mit Hilfe von Restriktions-Endonukleasen.

Endonuklease	Anzahl u. Position der Restriktions-Schnittstellen	Zugabe	CT 1ng Bisul- fit- DNA	CT 10000 Kopi- en PCR- Prod.	Neutralisa- tion [%]
<i>MseI</i>	1x im Amplikon <sup>1)</sup>	-	30,9	24,3	88,3
		1 Unit	29,7	26,2	
<i>Bsh1236I</i>	1x im Amplikon <sup>1)</sup>	-	30,9	24,4	88,3
		1 Unit	29,7	26,3	
<i>SsiI</i>	1x im Amplikon <sup>1)</sup>	-	30,8	24,4	87,5
		1 Unit	30,9	27,5	
<i>MseI</i> + <i>Bsh1236I</i> + <i>SsiI</i>	1x im Amplikon <sup>1)</sup>	-	31,2	24,8	97,8
		je 1 Unit	31,3	30,4	
<i>HaeIII</i> + <i>HpyCH4V</i>	1x im Primer <sup>2)</sup>	-	33,2	28,4	99,4
		je 1 Unit	35,7	38,4	
<i>HpyCH4V</i>	2x im Primer <sup>2)</sup>	-	33,2	28,3	59,4
		1 Unit	36,6	33,0	
<i>AluI</i>	2x im Primer <sup>2)</sup>	-	32,6	27,7	59,4
		1 Unit	33,6	30,0	
<i>GsuI</i>	2x im Primer <sup>3)</sup>	-	30,3	27,1	75,0
		1 Unit	31,9	30,7	
<i>GsuI</i>	4x im Primer <sup>4)</sup>	-	32,3	29,3	99,9
		1 Unit	33,1	39,9	

1) Die Schnittstellen waren durch die Sequenz des PCR-Fragments gegeben.

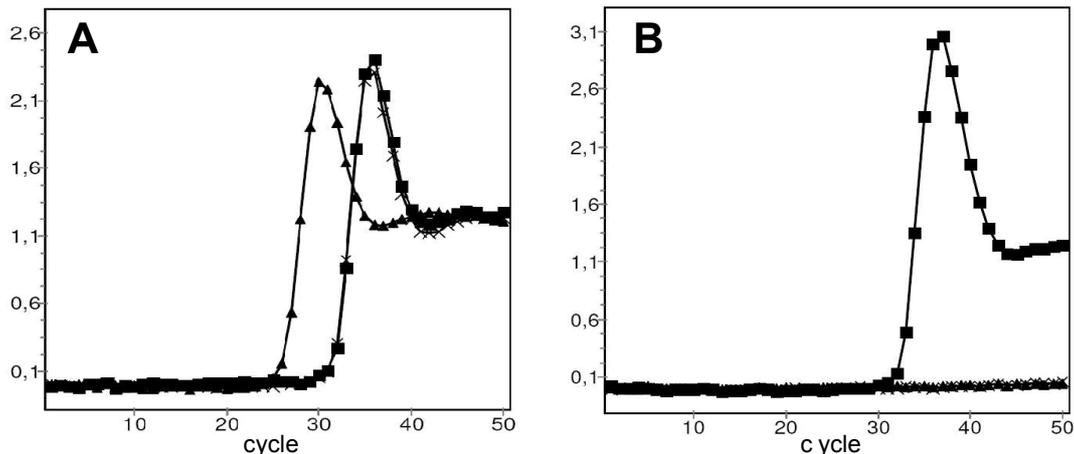
2) Die Schnittstellen wurden durch Basenaustausch im Vorwärts- und Rückwärtsprimer erzeugt.

3) Die Erkennungstelle wurde am 5'-Ende beider Primer angehängt.

4) Die Erkennungstelle wurde als Tandemrepeat am 5'-Ende beider Primer angehängt.

#### 4.5.3 PCR-Kontaminationsvermeidung mit UNG

Im Folgenden wird gezeigt, wie eine veränderte Bisulfit-Reaktion die Anwendung von Uracil-DNA-Glycosylase dennoch ermöglicht. Die Methode basiert darauf, bisulfit-konvertierte DNA zu erzeugen, die kein Uracil enthält. Dies wird erreicht, indem die standardmäßige Desulfonierung der DNA ausgesetzt und erst kurz vor der Amplifikation im PCR-Puffer durchgeführt wird. Als stabile Zwischenstufe entsteht eine DNA, die 6-Sulfonyluracil enthält (siehe Abb. 2). Auf diese Art enthält die Bisulfit-DNA kein Uracil und kann nicht von UNG zerstört werden. Da DNA-Polymerasen sulfonierte DNA nicht als Templat akzeptieren, muss vor der Amplifikation eine Desulfonierung erfolgen. Die Desulfonierung ist ein im alkalischen Milieu stattfindender exothermer Prozess und kann durch Temperaturerhöhung beschleunigt

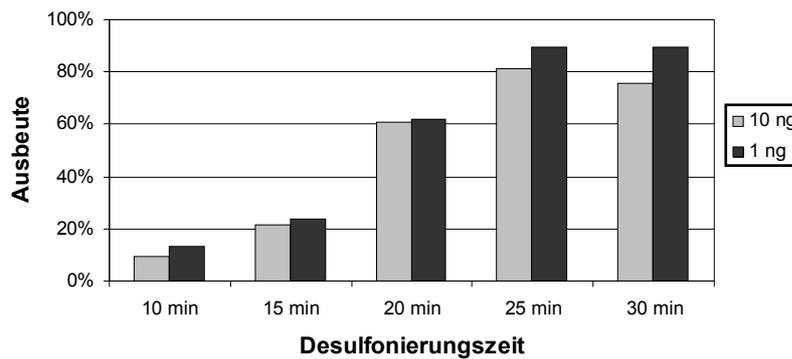


**Abbildung 40:** Sensitivität von Bisulfit-DNA und SafeBis-DNA gegenüber einer Behandlung mit Uracil-DNA-Glycosylase. Die Detektion erfolgte mit dem GSTp1-HM-Assay II. 1 ng Bisulfit-DNA (Kreuze), 1 ng SafeBis-DNA (Quadrate) sowie 10000 Kopien des TMEFF2-PCR-Produktes (Dreiecke) wurden als Templat in die PCR eingesetzt. Teil A zeigt die PCR ohne UNG-Behandlung, in der alle drei Sorten Templat amplifiziert werden. In Teil B enthielt der PCR-Mastermix 0,2 Unit UNG und wurde vor der Amplifikation für 10 min bei 37°C inkubiert. Sowohl Bisulfit-DNA als auch PCR-Produkte wurden durch die UNG vollständig deaktiviert und gaben kein Signal. SafeBis-DNA hingegen konnte mit und ohne UNG-Behandlung amplifiziert werden.

werden. Damit ergibt sich die Möglichkeit, die Desulfonierung im PCR-Puffer bei 95 °C durchzuführen. Dieses neuartige Konzept zur “carry over prevention” wurde mit dem GSTp1-HM-Assays II getestet. Während desulfonierte Bisulfit-DNA durch eine Vorbehandlung mit 0,2 Unit UNG vollständig inaktiviert wird, kann sulfonierte DNA detektiert werden. Sie ist gegen die Aktivität der UNG geschützt und wird amplifiziert. Im Folgenden wird bisulfit-konvertierte, jedoch nicht desulfonierte, DNA deshalb SafeBis-DNA genannt. Die enzymatische Aktivität der UNG wurde durch die Zugabe von PCR-Produkten überprüft. Sie wurden mit dUTP hergestellt, gereinigt, verdünnt und in einer Menge von etwa 10000 Kopien in die PCR eingesetzt. Im Reaktionsansatz ohne UNG wurden diese PCR-Produkte mit einem CT von 27 gemessen, während im Reaktionsansatz mit 0,2 Unit UNG keine Signale detektiert wurden (Abb. 40).

Die zur vollständigen Desulfonierung notwendige Inkubationszeit wurde experimentell bestimmt. SafeBis-DNA wurde für 0, 5, 10, 15 bzw. 20 min bei 95 °C in TE-Puffer bei pH 8 desulfoniert und auf Eis gestellt. Anschließend wurden alle DNA-Proben mit dem GSTp1-HM-Assay II ohne Zugabe von UNG gegen eine Standardreihe aus Bisulfit-DNA quantifiziert. Zusammen mit der 10minütigen Aktivierung der Hot-Start-Taq-Polymerase ergaben sich 10, 15, 20, 25 und 30 min Gesamtzeit für die Desulfonierung. Bis 25 min Desulfonierung zeigte sich eine deutliche Zunahme der Ausbeute. Sie betrug mit 10 ng SafeBis-DNA etwa 80 % und für 1 ng etwa 90 % (Abb. 41). Nach 30 min konnte keine weitere Zunahme der Desulfonierung festgestellt werden. Für alle weiteren Experimente mit SafeBis-DNA wurden immer PCR-Aktivierungszeiten von 30 min gewählt.

Die universelle Anwendung der entwickelten Methode auch für andere PCRs konnte mit verschiedenen HM-Assays gezeigt werden. Es wurden die gleichen PCR-Effizienzen für den 15667-HM-Assay, den GSTp1-HM-Assay II sowie den Referenz-Assay mit Bisulfit-DNA und SafeBis-DNA ermittelt. Desweiteren wurde die Effizienz der Neutralisation von PCR-Produkten mittels UNG ermittelt. Für jeden HM-Assay wurde die höchstmögliche Zahl von Kopien des PCR-Produkts, die durch UNG inaktiviert



**Abbildung 41:** Zeitabhängigkeit der Desulfonierung von 6-Sulfonyluracil der SafeBis-DNA im PCR-Puffer. Dargestellt ist die Ausbeute gegenüber einer Amplifikation vollständig desulfonierter Bisulfit-DNA. Die SafeBis-DNA wurde nach der Bisulfit-Konversion für 0, 5, 10, 15 und 20 min in TE-Puffer bei 95 °C desulfoniert. 10 min Aktivierung in der Realtime-PCR führen zu den angegebenen Gesamtzeiten für die Desulfonierung. Amplifiziert wurden 10, 1 und 0,2 ng methylierter DNA mit dem GSTp1-HM-Assay II im Roche FastStart-Mastermix. Nach 25 - 30 min werden etwa 80 % Ausbeute erzielt.

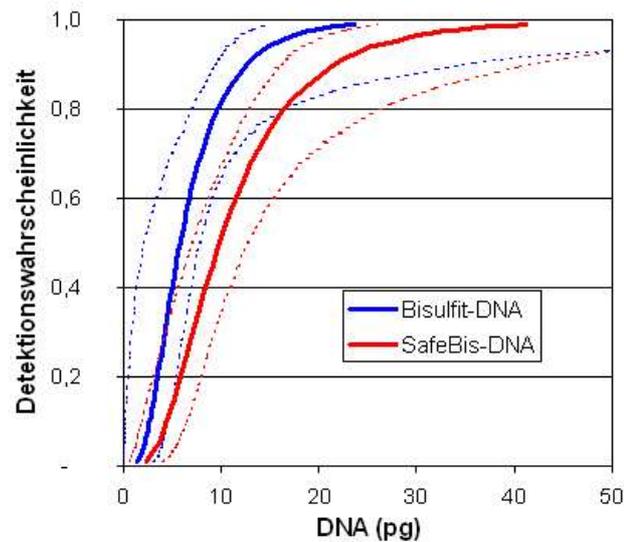
werden kann, bestimmt (Tab. 13). Es zeigte sich, dass die Kopienzahl neutralisierbarer PCR-Produkte spezifisch für jedes Amplikon ist, dass jedoch immer mindestens 3000 Kopien vollständig inaktiviert werden können. Dies entspricht einer Neutralisationsrate von mindestens 99,97 %.

Um die Sensitivität der Methylierungsanalyse unter Verwendung von SafeBis-DNA zu untersuchen, wurde das Detektionslimit mit dem GSTp1-HM-Assay unter Verwendung von SafeBis-DNA ermittelt. Im direkten Vergleich mit Standard-Bisulfit-DNA konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität gegenüber einem Experiment ohne "carry over prevention" nicht signifikant verringert ist. Im Experiment wurden 50, 25, 12,5 und 6,25 pg methylierter Bisulfit-DNA sowie die gleichen Mengen SafeBis-DNA in 16 Wiederholungen mit dem GSTp1-HM-Assay amplifiziert. Während die Analyse der Bisulfit-DNA ohne UNG erfolgte, wurden die Reaktionen mit SafeBis-DNA für 10 min bei 37°C mit 0,2 Units UNG inkubiert und anschließend für 30 min bei 95 °C aktiviert. Aus den erhaltenen Detektionsraten wurde mittels Probit-Analyse das Detektionslimit ermittelt (Abb. 42). Mit SafeBis-DNA wurde das Detektionslimit bei 21,6 pg mit einem 95%-Konfidenzintervall von 16,0 - 41,4 pg, bestimmt. Mit Standard-Bisulfit-DNA wurde ein LOD90 von 12,6 pg (9,4 - 34,6 pg) ermittelt.

**Tabelle13:** Inaktivierung und Reamplifikation von uracil-haltigen PCR-Produkten mit UNG.

	UNG <sup>1)</sup>	PCR-Produkte pro Reaktion (Kopienzahl)				
		100000	30000	10000	3000	1000
<b>TMEFF2-HM-Assay</b>	-	20,0	21,8	23,5	25,4	26,8
	+	31,1	38	-	-	-
<b>15714-HM-Assay</b>	-	20,2	21,9	24,0	25,6	26,9
	+	-	-	-	-	-
<b>17378-HM-Assay</b>	-	20,3	22,1	24	25,8	27,2
	+	35,3	36,2	36,6	-	-
<b>GSTp1-HM-Assay II</b>	-	22,9	n.d.	n.d.	27,3	n.d.
	+	35,7	n.d.	n.d.	-	n.d.

<sup>1)</sup> + : Reaktionsansätze wurden mit 0,2 U UNG versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert  
 - : keine Zugabe von UNG



**Abbildung 42:** Detektionslimit des GSTp1-HM-Assays II mit Standard Bisulfit-DNA und SafeBis-DNA. Mit 90% Wahrscheinlichkeit werden unter Verwendung von SafeBis-DNA 21,6 pg methylierte DNA nachgewiesen. Mit Standard-Bisulfit-DNA wurde ein LOD90 von 12,6 pg ermittelt. In der Abbildung ist die Probit-Regressionskurve für SafeBis-DNA in Rot, die der Bisulfit-DNA in Blau dargestellt. Die gestrichelten Linien zeigen das 95 % Konfidenzintervall an.

Voraussetzung für eine praktische Anwendung von SafeBis-DNA bei der Kontaminationsvermeidung ihre Stabilität und Lagerfähigkeit. Eine ungewollte, spontane Desulfonierung während der Lagerung würde zu ihrer Degradation durch die UNG führen. Um den Prozess der spontanen Desulfonierung der SafeBis-DNA zu überprüfen, wurde sie unter verschiedenen Bedingungen gelagert. Anschließend wurden 10 ng der gelagerten SafeBis-DNA mit dem GSTp1-HM-Assay II amplifiziert. Der Anteil desulfonierter DNA wurde vor der PCR durch eine UNG-Behandlung inaktiviert. Erhöhte CT-Werte gegenüber dem Standard sind somit auf einen erhöhten Anteil desulfonierter DNA zurückzuführen. Es zeigte sich, dass die Lagerung bei 40 °C den Prozess der Desulfonierung einleitet, besonders bei Pufferbedingungen mit pH 8 und pH 9 (Tab. 14). Der Anteil desulfonierter DNA blieb bei einer Lagertemperatur von 4° C gering. Die Lagerung von SafeBis-DNA sollte daher immer unter neutralen Bedingungen bei möglichst geringen Temperaturen erfolgen.

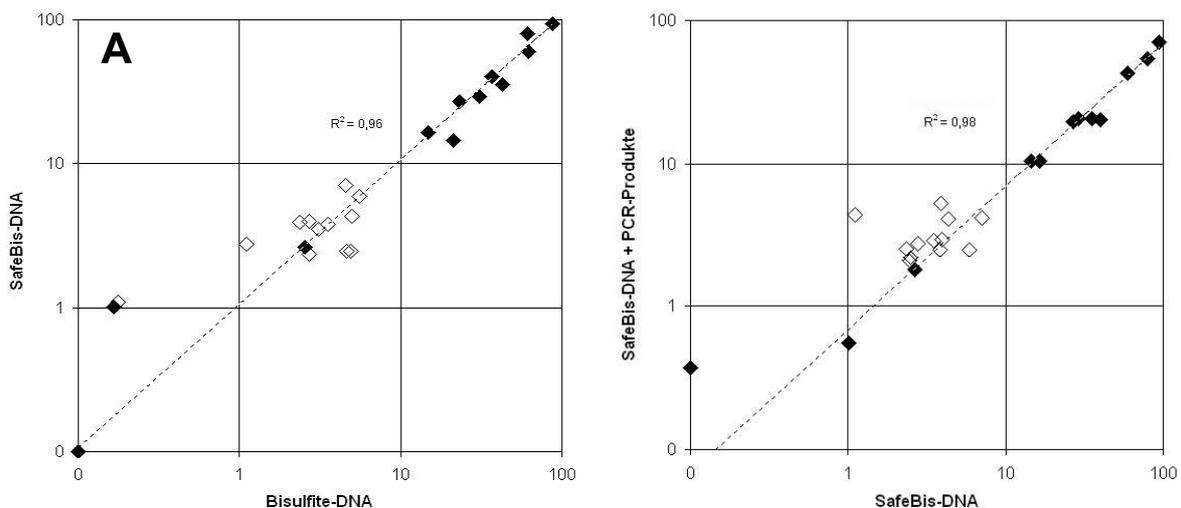
**Tabelle 14:** CT-Werte des GSTp1-HM-Assays für 10 ng bisulfit-konvertierter DNA mit und ohne Desulfonierung nach unterschiedlichen Lagerbedingungen.

	Lagerung UNG	12 h, 4°C -	12 h, 4°C +	122 h, 4°C +	22 h, 40°C +
<b>Standard Bisulfit-DNA</b> bei pH 8		28,5	-	-	-
<b>SafeBis-DNA</b> in Wasser		29,3	29,9	29,5	30,5
<b>SafeBis-DNA</b> bei pH 8		28,9	30,1	29,3	32,8
<b>SafeBis-DNA</b> bei pH 9		28,7	30	30,3	35,9

#### 4.5.4 Methylierungsanalyse von Darmkrebsproben mit dem TMEFF2-HM-Assay unter Anwendung von UNG

In einer Methylierungsanalyse klinischer Proben sollte getestet werden, ob die Verwendung von SafeBis-DNA und der Einsatz von UNG die gleichen diagnostischen Ergebnisse liefert wie die Verwendung von Bisulfit-DNA ohne "carry over prevention". Gleichzeitig sollte durch die Zugabe von PCR-Produkten die Kontamination von DNA-Proben simuliert und geprüft werden, ob die entwickelte Methode Kontaminationen effizient neutralisiert, ohne die Ergebnisse der PCR zu beeinflussen. Dazu wurden 24 Darmgewebeproben auf DNA-Methylierung in der Promotorregion des TMEFF2-Gens analysiert. Dabei handelte sich um 12 Tumorproben und 12 Proben aus dem benachbarten Normalgewebe. Nach der DNA-Extraktion wurden gleiche Teile der DNA nach der Standardmethode (Kap. 3.5) und nach der vorgestellten Methode ohne Desulfonierung (Kap. 3.6) bisulfit-konvertiert. Die DNA-Proben wurden anschließend mit dem GSTp1-Referenz-Assay und dem TMEFF2-HM-Assay quantifiziert. Die Messung der SafeBis-DNA erfolgte mit einer Standard-DNA, die ebenfalls nicht desulfonyert wurde. Die Analyse der SafeBis-DNA wurde unter Zugabe von 0,2 U UNG durchgeführt. Die Quantifizierung der Standard-Bisulfit-DNA erfolgte ohne UNG. Die PMR-Werte der DNA-Proben wurden getrennt für Bisulfit-DNA und SafeBis-DNA ermittelt. Die Ergebnisse beider Analysen korrelieren mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,96$  (Abb. 43 A).

Anschließend wurde die SafeBis-DNA ein zweites Mal mit dem TMEFF2-HM-Assay analysiert. Diesmal erfolgte eine bewusste Kontamination der PCR-Ansätze. Dazu wurden jeder Reaktion 10.000 Kopien des TMEFF2-PCR-Produktes zugesetzt. Trotz Zugabe der PCR-Produkte aus methylierter DNA wurden die gleichen PMR-Werte ermittelt. Die Korrelation zwischen SafeBis-DNA und SafeBis-DNA mit Kontamination betrug  $R^2=0,98$  (Abb. 43 B). Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Anwendung von UNG die Kontamination durch PCR-Produkte zuverlässig vermeidet, und dass die Verwendung von SafeBis-DNA unter Zugabe von UNG die gleichen Ergebnisse wie die Standard-Methylierungsanalyse ohne Kontaminationsvermeidung liefert.

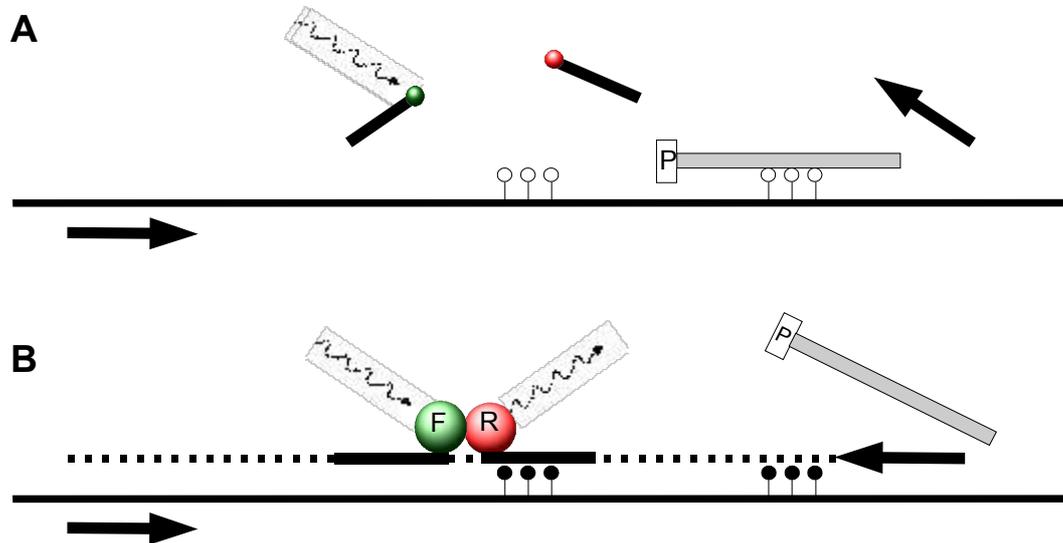


**Abbildung 43:** Methylierungsanalyse von 24 Darmgewebeproben unter Einsatz von Uracil-DNA-Glykosylase (UNG) zur Kontaminationsvermeidung. 12 Tumorproben (schwarz) und 12 Proben aus benachbartem Normalgewebe (weiß) wurden mit dem TMEFF2-HM-Assay analysiert und die PMR-Werte ermittelt. A: Die Korrelation der PMR-Werte mit Bisulfit-DNA und der PMR-Werte mit SafeBis-DNA und UNG betrug  $R^2=0,96$ . B: Die PMR-Werte unter Zugabe von 10.000 Kopien PCR-Produkt korrelieren mit der Analyse von SafeBis-DNA ohne Kontamination mit  $R^2=0,98$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 HM-Assay-Technologie

#### 5.1.1 Hochsensitiver Nachweis methylierter DNA mit Realtime-HM-Assays



**Abbildung 44:** Funktionsprinzip einer HeavyMethyl-Realtime-PCR. A: Enthält die Ziel-DNA nicht methylierte CpGs, so ist sie nach der Bisulfit-Konversion komplementär zum Blockeroligonukleotid (grau). Dieses bindet bevorzugt an das unmethylierte Template und verdrängt den mit ihm überlappenden Primer. Es entsteht kein PCR-Produkt. Durch eine Modifikation des 3'-OH des Blockers (P) wird dieser nicht verlängert. B: Methylierte DNA wird von den Primern amplifiziert, da der Blocker an diese nicht bindet. Die Detektion des Amplifikats erfolgt mittels Fluoreszenz-Sonden. Dargestellt ist das LightCycler-Sondensystem, in dem eine Fluoreszein-Sonde (F) die LCred-Sonde (R) durch FRET anregt. Mindestens eine der Sonden überspannt CpG-Positionen.

In dieser Arbeit konnte der Einsatz von Blockeroligonukleotiden zur Anreicherung methylierter Bisulfit-DNA im Realtime-PCR-Format erfolgreich umgesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit der Verwendung nur eines Blockers die hochsensitive Detektion und Quantifizierung methylierter DNA auch in einem hohen Hintergrund nicht methylierter DNA möglich ist. Damit wurde das ursprüngliche Konzept, in dem zwei Blocker vorgesehen sind, vereinfacht (Abb. 44).

In der Arbeit wurde das analytische Detektionslimit mittels Probit-Analyse bestimmt (Abb. 10). Diese Art der Assay-Charakterisierung dient der Bestimmung der Leistungsfähigkeit der entwickelten HM-Assays. Das gefundene Detektionslimit des neu entwickelten GSTp1-HM-Assays von 14,9 pg bedeutet, dass dieser mit 90 %iger Wahrscheinlichkeit die DNA aus 2 -3 Tumorzellen detektieren kann. Der Assay besitzt dabei eine relative Sensivität von 1:4000. Das heißt, dass die Detektion der Tumorzellen auch dann gelingt, wenn eine 4000fache Menge gesunder Zellen als Hintergrund vorliegt. Aus 1 ml Serum werden bis zu 200 ng DNA extrahiert (Holdenrieder et al. 2005). Obwohl aus Plasma in der Regel weniger DNA gewonnen wird (1-5 ng/ml Plasma), werden in einzelnen Proben auch sehr hohe DNA-Mengen bis zu 100 ng/ml gefunden (Jahr et al. 2001). Die relative Sensivität ist also eine notwendige Eigenschaft des Assays, die eine Detektion von Tumorzellen in Körperflüssigkeiten wie Serum oder Plasma ermöglicht.

### 5.1.2 Die Blockerkennzahl - Kennzeichen der Leistungsfähigkeit des Blockers

Im Gegensatz zur methylierungsspezifischen PCR (Herman et al. 1996), in der die Primer zwischen methylierter und nicht methylierter DNA selektieren, wird im HM-Assay die Selektion über den Blocker erzielt (Cottrell et al. 2004). Wesentlicher Bestandteil der Entwicklung eines HM-Assays ist daher die Prüfung der Effektivität des Blockers. Mit Hilfe der Blockerkennzahl kann die Leistungsfähigkeit unterschiedlicher Blocker ohne großen Aufwand eingestuft werden. Dabei kann deren Berechnung auch auf der Basis unterschiedlicher DNA-Mengen erfolgen, was in Zukunft die Blockeretablierung vereinfachen und den Vergleich von Blockereffizienzen unterschiedlicher HM-Assays ermöglichen wird. Diese Größe kann als Orientierung schon während der Entwicklung von leistungsfähigen HM-Assays dienen. Der in der Arbeit entwickelte GSTp1-HM-Assay II weist eine Blockerkennzahl von 0,139 auf. Für in denen eine möglichst hohe relative Sensitivität erforderlich ist, sind Blockerkennzahlen größer 0,13 anzustreben.

Anhand der Blockerkennzahl könnte auch die optimale Konzentration des Blockers eingestellt werden. Niedrigere Blockerkonzentrationen führen zu einer weniger starken Unterdrückung der unmethylierten DNA. Gleichzeitig verringert sich die Inhibition der methylierten DNA, so dass eine höhere analytische Sensitivität erreicht werden kann. Je nach diagnostischer Fragestellung könnten so auch Assays entwickelt werden, die eine niedrigere relative Sensitivität aufweisen.

### 5.1.3 Sonden zur Sicherung der methylierungsspezifischen Detektion von DNA

Da beim Blockerdesign ein optimaler Mittelweg zwischen maximaler Unterdrückung nicht methylierter DNA und minimaler Inhibition methylierter DNA gefunden werden muss, ist es schwierig, die Amplifikation nicht methylierter DNA vollständig zu verhindern. Je nach ihrem Mengen-Verhältnis wird neben der methylierten auch nicht methylierte DNA amplifiziert. Dies führt zu einem niedrigeren Amplifikations-signal in Mischungen mit einem hohen Anteil nicht methylierter DNA. So zeigt die Abbildung 13 deutlich flachere Signalkurven für die Amplifikation bei Mischungen von 1:1000 bis 1:4000 als für Amplifikationen mit methylierter DNA. Diese Befunde machen deutlich, dass die Verwendung methylierungsspezifischer Sonden zwingend notwendig ist, um eindeutige und spezifische Signale methylierter DNA zu erhalten. Desweiteren wird mit der Verwendung von Sonden die Sequenzidentität des Amplifikats überprüft, denn es besteht auch die Möglichkeit, dass unspezifische PCR-Produkte entstehen (Abb. 8). Sonden sichern also sowohl die sequenz- als auch die methylierungsspezifische Detektion methylierter DNA - eine notwendige Voraussetzung für die Anwendung in einem diagnostischen Assay.

### 5.1.4 Optimierung eines HM-Assays für heterogene DNA-Methylierung

Die Methylierung von DNA ist in doppelter Hinsicht heterogen. Einerseits unterscheiden sich die DNA-Stränge in einer Probe untereinander. Andererseits können innerhalb eines DNA-Stranges benachbarte CpGs ungleiche Methylierung aufweisen. Obwohl für die meisten bisher gefundenen Methylierungsmarker eine starke Co-Methylierung über größere Bereiche gefunden wurde, ist es möglich, dass einzelne CpGs nicht dieser Co-Methylierung unterliegen. So ist der Untersuchung von Millar und Mitarbeitern zu entnehmen, dass die Promotorregion des GSTp1-Gens in Prostatatumoren weitgehend Hypermethylierung aufweist, jedoch einzelne CpGs deutlich niedrigere Methylierungsraten aufweisen

(Millar et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass mit der HM-Technologie einzelne CpGs maskiert werden können, so dass die Detektion hypermethylierter DNA vom Methylierungsstatus des entsprechenden maskierten CpGs unabhängig wird (Kap. 4.1.4). Dies könnte die Sensitivität des diagnostischen Test in Regionen mit heterogener Methylierung verbessern. Weiterhin erlaubt die Maskierung von einzelnen Basen die Anwendung des HM-Assays auch auf Regionen, in denen Polymorphismen vorliegen. Gerade CG-reiche Regionen der DNA unterliegen häufig C-T-Transitionen (Holliday und Grigg 1993). Befindet sich in der zu analysierenden Region ein Polymorphismus, können die Blocker oder Sonden für diese Position maskiert werden. Ein HM-Assay kann also so gestaltet werden, dass die Detektion methylierter DNA unabhängig vom Allel eine korrekte Diagnose gewährleistet. Die Ergebnisse der Arbeit verdeutlichen die hohe Flexibilität des Assayformats, in dem biologische Besonderheiten der zu analysierenden Sequenz berücksichtigt werden können.

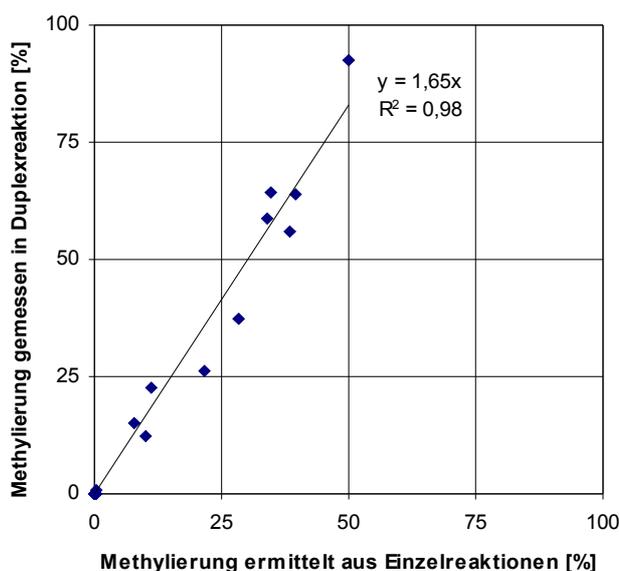
Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Bindungsverhalten methylierungsspezifischer Hybridisierungssonden demonstrieren die hohe Empfindlichkeit des Systems gegenüber nicht homogen methylierter DNA (Kap. 4.1.5). Ein unmethyliertes CpG im Bindungsbereich der Hybridisierungs-Sonden führte zum fast vollständigen Signalverlust. Dies war nicht überraschend, da das LightCycler-Sondensystem für die Detektion einzelner SNPs entwickelt wurde (Lay und Wittwer 1997). Gerade diese hohe Empfindlichkeit des Sondensystems bildet die Grundlage der hohen klinischen Spezifität des GSTp1-HM-Assays II. Die Amplifikation der DNA allein führt noch nicht zu einem positiven Signal. Erst die methylierungsspezifische Hybridisierung der Realtime-PCR-Sonden resultiert in einem Signal und damit in einem positiven Testergebnis.

### **5.1.5 Der GSTp1-Referenz-Assay zur Bestimmung der Gesamt-DNA**

Eine Möglichkeit, differentielle Methylierung verschiedener Proben darzustellen, ist die Angabe des PMR-Wertes. Für diesen Zweck wird die Menge methylierter DNA einer bestimmten Region auf die Gesamt-DNA-Menge bezogen, die mit Hilfe eines Referenz-Assays bestimmt wird. In der Regel wird dafür eine PCR in der Region eines „house keeping gene“ verwendet, wie z.B. Beta-Actin (Eads et al. 2000). Die Messung der Gesamt-DNA muss also nur einmal erfolgen und kann dann zur Berechnung der PMR-Werte mehrerer Gene herangezogen werden. Der PMR-Wert kann allerdings fehlerhaft sein, wenn das Referenz-Gen von Deletionen oder Duplikationen betroffen ist. So können in Prostata-Krebszelllinien die Chromosomen-Arme 1q, 7, 8q, 16p and 17q amplifiziert sein und 2q, 4p/q, 6q, 8p, 13q, 16q, 17p and 18q deletiert vorliegen (Saramaki et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methylierungsrate des GSTp1-Gens mit Hilfe eines Referenz-Assays bestimmt, der nur 1000 bp entfernt vom GSTp1-HM-Assay lag. Methylierungs- und Referenzsignal wurden in der selben DNA-Region erzeugt und dadurch ein Einfluss durch Chromosomenaberrationen minimiert. Die Entwicklung eines genspezifischen Referenz-Assays bedeutet einen erheblichen Entwicklungsaufwand und lohnt sich vor allem für diagnostische Applikationen, in denen ein einziger Biomarker gemessen werden soll.

Eine besonders interessante Form des diagnostischen Tests stellt die parallele Analyse von methylierter und Gesamt-DNA in einer Duplex-PCR dar. Sie konnte im nächsten Schritt erfolgreich umgesetzt werden. Damit vereinfacht sich der diagnostische Test, da nur noch eine Reaktion durchgeführt



**Abbildung 45:** Korrelation von Messwerten aus Einzelreaktionen und Duplexreaktion. Dargestellt sind PMR-Werte in Prostatagewebe, ermittelt mit einer Duplex-Realtime-PCR, über den PMR-Werten aus Einzelreaktionen von GSTp1-HM-Assay und Referenz-Assay

werden muss und so weniger Arbeitsschritte anfallen. Gleichzeitig wird für die Analyse weniger Probenmaterial benötigt. Die besondere Herausforderung bei der Entwicklung solcher multiplexierter Reaktionen ist, dass sich infolge des Verbrauchs der PCR-Komponenten die Reaktionen gegenseitig beeinflussen. In Abhängigkeit vom Verhältnis zwischen Gesamt-DNA und methylierter DNA erreicht der Referenz-Assay seine exponentielle Phase zu einem früheren Zeitpunkt als der HM-Assay. Dies kann dazu führen, dass dem HM-Assay nicht mehr ausreichend Ressourcen zur Verfügung stehen und das Detektionslimit einer Einzelreaktion nicht erreicht wird. Um dies auszuschließen, muss die Referenz-PCR durch eine niedrige Primerkonzentration limitiert werden. Für den GSTp1-Referenz-Assay wurde die niedrigste, noch effiziente Primerkonzentration mit 0,1 pmol/µl bestimmt und für die Duplex-Reaktion gewählt. In der Validierung der Duplex-Reaktion mit 22 DNA-Proben aus Prostata-Gewebe zeigte sich jedoch, dass die Ergebnisse aus Einzelreaktion und Duplexreaktion voneinander abwichen (Kap. 4.2.1). Mit der Duplex-PCR wurden durchschnittlich höhere PMR-Werte gemessen. Dennoch korrelierten die PMR-Werte mit einem hohen Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,98$  (Abb. 45). Als Ursache für diese systematische Abweichung kommen folgende Ursachen in Betracht: Erstens kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Referenz-Assay einen Einfluss auf das Signal des GSTp1-HM-Assays in der Duplex-Reaktion hat. Zweitens wurden die Methylierungsanalysen mit Einzelreaktionen und Duplexreaktion unabhängig voneinander durchgeführt. Dabei wurden die Standard-DNA neu hergestellt. So sind abweichende Quantifizierungen aufgrund unterschiedlicher Standards möglich. Ob die unterschiedlichen Messergebnisse durch die Limitierung der Primer des Referenz-Assays hervorgerufen wurden, konnte deshalb nicht endgültig beurteilt werden.

### 5.1.6 Duplex-Reaktionen aus zwei HM-Assays

Die Hauptmotivation zur Entwicklung einer Duplex-PCR aus zwei HM-Assays war die Einsparung von Templat-DNA. Aus 1 ml Plasma werden im Durchschnitt 1 - 5 ng DNA gewonnen, wobei der Anteil an Tumor-DNA wenige pg betragen kann (pers. Komm. C. Lofton-Day). Zur sicheren Detektion von Tumor-DNA sollte also ein möglichst großes Volumen-Äquivalent pro PCR eingesetzt werden. Die Messung mehrerer Genregionen kann deshalb nur dann erfolgen, wenn die Analyse mit einer Multiplex-PCR durchgeführt wird. Die Möglichkeit einer multiplexierten sensitiven Detektion methylierter DNA sollte mit der Duplex-Reaktion aus GSTp1-HM- und PTGER4-HM-Assay demonstriert werden. Die ermittelten Detektionslimits für Einzel- und Duplexreaktionen zeigen, dass das Konzept erfolgreich umgesetzt werden konnte (Kap. 4.2.2).

Bei der Entwicklung dieser Duplexreaktion bestanden die gleichen Herausforderungen wie bei der Entwicklung der Reaktion aus HM- und Referenz-Assay. Es zeigte sich eine Dominanz des PTGER4-HM-Assays aufgrund seiner höheren Primerkonzentration. Erst die Anpassung der Primerkonzentrationen führte zur gleichzeitigen Amplifikation beider Fragmente mit identischer PCR-Effizienz (Abb. 22). Obwohl sich die Detektionslimits der Assays in der Duplexreaktion nicht statistisch signifikant von denen der Einzelreaktionen unterschieden, konnte doch eine Tendenz zu höherer Sensitivität für die Einzelreaktionen beobachtet werden. Als Ursache dafür kann die niedrigere Primerkonzentration in der Duplexreaktion angenommen werden. Durch die höhere Anzahl von Oligonukleotiden in einer Reaktion steigt außerdem die Tendenz zur Bildung von Primer-Dimeren, was einen negativen Einfluß auf die Stabilität und Sensitivität der Analyse haben kann (Lind et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Etablierung von Realtime-Duplex-PCRs einen hohen experimentellen Aufwand erfordert und technisch anspruchsvoll ist. Die Primerkonzentrationen müssen dabei so angepasst werden, dass sich die Reaktionen nicht gegenseitig beeinflussen. Außerdem müssen die Detektionslimits von Einzel- und Duplexreaktionen ermittelt und miteinander verglichen werden, um sicherzustellen, dass kein Verlust an Sensitivität auftritt. Für einen möglichen Verlust an Sensitivität kann die Limitierung der Reaktionskomponenten sowie die Entstehung zusätzlicher unspezifischer Produkte verantwortlich sein.

### 5.1.7 Validierung der HM-Technologie mit klinischen Proben

Die in dieser Arbeit entwickelten HM-Assays konnten in verschiedenen Studien mit klinischen Proben validiert werden. Die Analyse von 133 DNA-Proben aus Prostatagewebe bestätigte die hohe Leistungsfähigkeit der Technologie zur Methylierungsanalyse. Unter Anwendung eines Grenzwertes von 0,2 % Methylierung erreichte der GSTp1-HM-Assay II eine Sensitivität von 79 % (59/75) bei einer Spezifität von 95 % (55/58). In vergleichbaren Studien, sind ähnliche Sensitivitäten gemessen worden. Von Jeronimo wurden 95 % (112/118) Tumorproben unter Anwendung eines MSP-Assays detektiert, wobei keine der 30 BPHs detektiert wurde (Jeronimo et al. 2004). 74 % (31/42) Sensitivität wurde in einer anderen Studie unter Verwendung von Prostatabiopsien erreicht, wobei 2 von 102 der gesunden Proben positiv waren (Bernardini et al. 2004).

Durchschnittlich wurden in den untersuchten Prostatatumoren etwa 20 % Methylierung für GSTp1 gemessen. Auch dieser Befund deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Daten (Jeronimo et al.

2004). Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem untersuchten Material um heterogenes Gewebe handelte. Dies bedeutet, dass die Proben zum Teil auch benachbartes gesundes Gewebe enthalten und die gemessenen Methylierungswerte niedriger liegen als in reinem Tumorgewebe. Für die in dieser Arbeit untersuchten Proben lagen keine Angaben über den Tumorgehalt vor. Die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Studien hinsichtlich klinischer Sensitivität und Spezifität sind zum Teil auf die unterschiedlichen Qualität und Tumorgehalt der Proben zurückzuführen. So lassen sich die außergewöhnlich guten Ergebnisse der Studie von Yegnasubramanian und Mitarbeitern als Resultat der sorgfältigen Auswahl und Kontrolle der Proben interpretieren (Yegnasubramanian et al. 2004). Dort wurden nur Proben mit einem Tumorgehalt von mindestens 70 % analysiert. Anschließend konnte in 94 % der Prostatatumore Methylierung in GSTp1 nachgewiesen werden, wobei die Spezifität in gesundem Gewebe bei 100 % lag.

Die Bestimmung der Methylierung in Tumorgeweben könnte zukünftig durch die gezielte Isolation von Tumorzellen genauer werden. Die histologische Klassifizierung und Bewertung des Tumorteils kann mikroskopisch an Gewebeschnitten erfolgen. Desweiteren könnte durch Mikrodissektion spezifisch Tumorgewebe isoliert werden, wenn paraffin-eingebettete Proben analysiert werden.

In der Arbeit wurde Prostatagewebe auch mit einer Duplex-Realtime-PCR aus PTGER4- und GSTp1-HM-Assay analysiert (Kap. 4.2.3.1). Dabei wurden für GSTp1 die gleiche durchschnittliche Methylierungsrate von 20 % gefunden, wie in der Einzelreaktion. Der Duplex-HM-Assay wurde desweiteren zur Analyse von 46 Serum-Proben herangezogen (Kap. 4.2.3.2). Insgesamt konnten 11 der 26 Seren von Patienten mit Prostatatumor positiv diagnostiziert werden. Eine Probe wurde nur mit dem PTGER4-HM-Assay detektiert. Durch das Konzept der gleichzeitigen Messung von zwei Methylierungsmarkern konnte die Sensitivität des Tests geringfügig erhöht werden. In beiden Assays waren 10 von 11 Proben gesunder Probanden negativ. Die Spezifität wurde durch die additive Auswertung beider Marker nicht negativ beeinflusst.

Für einen diagnostischen Test zur Krebsfrüherkennung ist eine Sensitivität von 42 %, wie sie in der Analyse von Serumproben ermittelt wurde, nicht zufriedenstellend. Auch in anderen Arbeiten, in denen methylierte DNA von GSTp1 in Körperflüssigkeiten nachgewiesen wurde, konnten zum Teil nur niedrige Werte für die Sensitivität ermittelt werden. Beispiele dafür sind die Studien von Jeronimo et al. mit 32 % (22/69 in Plasma) und Gonzalگو et al. mit 39 % (7/18) in Urine (Jeronimo et al. 2002, Gonzalگو et al. 2003). Die besten Resultate wurden bisher von Goessl et al. mit 72 % (23/32) Sensitivität in Plasma oder Serum erzielt (Goessl et al. 2001).

Mit Gewebe wurde eine höhere klinische Sensitivität als mit Serumproben erreicht. Dies ist leicht erklärbar, durch den niedrigeren Anteil an Tumor-DNA im Blut. Um die im Blutkreislauf zirkulierende Tumor-DNA sicher detektieren zu können, sollte daher ein möglichst hohes Serum-Volumen analysiert werden. Dies stellt wiederum hohe Anforderungen an die relative Sensitivität der Assays, denn aus einem ml Serum können bis zu 100 ng DNA isoliert werden. Ein anderer Lösungsansatz besteht in der genomweiten Voramplifikation methylierter Sequenzen zur Anreicherung der Tumor-DNA aus Körperflüssigkeiten, wie z. B. von Di Vinci mit der Meth-DOP-PCR vorgeschlagen (Di Vinci et al. 2006). Außerdem könnten zur Detektion von Prostatakrebs auch andere Körperflüssigkeiten, wie Ejakulat oder Urin-Sediment herangezogen werden (Goessl et al. 2001).

## 5.2 QM-Assay-Technologie

### 5.1.8 Weiterentwicklung und Validierung der QM-Technologie

QM-Assays basieren auf der gleichzeitigen Amplifikation methylierter und nicht methylierter DNA sowie ihrer Detektion mit Hilfe zweier unterschiedlich markierter Sonden (Zeschnigk et al. 2004, Kluth et al. 2006). Das Signal für methylierte DNA wird zum Signal für nicht methylierte DNA ins Verhältnis gesetzt. Deshalb ist es notwendig, die methylierungsspezifischen Sonden auf ihre selektierenden Eigenschaften zu überprüfen. Dies geschieht mit Hilfe von Mischungen aus methylierter und nicht methylierter DNA (Abb. 29). Eine verbesserte Kalibrierkurve wurde durch die Verwendung der Fluoreszenzsignale (FI) anstelle der CTs erreicht. Auch erfolgte die Bestimmung der Fluoreszenzsignale nicht wie üblich am Ende der PCR, sondern in deren exponentieller Phase. Dies war notwendig, da die Signale mit LightCycler-Sonden häufig nach Erreichen eines Maximums wieder abnehmen. Deshalb wurden die Rohdaten der Realtime-PCR in eine MS-Excel-Tabelle exportiert und ausgewertet. Desweiteren konnte durch die Einführung eines Linearitätsfaktors eine lineare Regression der Kalibrierkurve für den gesamten Bereich der Methylierung von 0 % -100 % erzielt werden. Dies ermöglichte eine einfache Berechnung der Methylierungsrate aus dem Verhältnis der gemessenen Signale. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Methylierungsanalyse mittels QM-Assay sowohl durch die Verwendung der FI-Werte als auch durch die Einführung des Linearitätsfaktors vereinfacht wurde.

Eine Weiterentwicklung stellt auch die Duplex-Voramplifikation dar, die in dieser Arbeit erstmals für die QM-Technologie verwendet wurde. Ihr besonderer Wert liegt darin, dass auch DNA-Proben mit sehr geringer DNA-Konzentration analysiert werden können. Die PCR-Produkte einer Voramplifikation wurden in allelspezifische QM-Assays eingesetzt und analysiert (Kap. 4.3.5). Für PCR-Produkte aus 100 pg Bisulfit-DNA aus peripherem Blut homozygoter adulter Mäuse wurden Werte von 21 - 37 % Methylierung in IGF2/DMR2 gemessen. Gegenüber der direkten Messung von 10 ng Bisulfit-DNA werden etwa 10 % niedrigere Methylierung gefunden. Als Ursache für diese Unterschätzung des Methylierungswertes kommen in erster Linie unterschiedliche PCR-Effizienzen für methylierte und unmethylierte DNA in Betracht (PCR-Bias). Da die PCR-Produkte zum Zeitpunkt der Analyse einer größeren Zahl PCR-Zyklen unterliegen als die direkt gemessene Bisulfit-DNA, könnte bereits durch einen minimalen PCR-Bias eine Abweichung erzeugt werden. Die Standardabweichungen der Messung von 10 ng bisulfit-konvertierter DNA liegen zwischen 5-10 %, dagegen wurde bei der Messung von PCR-Produkten, die aus 10 ng DNA hergestellt wurden, eine Standardabweichung von 1-3 % festgestellt. Die Analyse der PCR-Produkte in der Realtime-PCR führt offensichtlich zu stabileren Meßwerten. Die Standardabweichung erhöht sich jedoch wieder bei sehr geringeren DNA-Mengen. So ergab die Analyse von PCR-Produkten aus 100 pg DNA Standardabweichungen zwischen 10 - 20%. Dies ist erklärbar durch die geringe Anzahl von DNA-Kopien, die für die Messung zur Verfügung standen. 100 pg Maus-DNA entsprechen ca. 30 DNA-Kopien. Bei einer Methylierungsrate von 25 % werden also noch 7-8 Kopien methylierte DNA amplifiziert. In diesem Bereich sind bereits stochastische Effekte, also Abweichungen durch eine zufällige Verteilung der Kopien, zu erwarten.

Für experimentelle Schwankungen können weitere Ursachen in Betracht gezogen werden: Minimale Konzentrationsänderungen der Fluoreszenzsonden können zu unterschiedlichen Intensitäten führen. Desweiteren kann die Kalibrierung mittels Mischungsreihe von Experiment zu Experiment

Schwankungen unterliegen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Verwendung sehr geringer DNA-Mengen die Möglichkeiten der Analyse von PCR-Produkten mittels QM-Assay limitiert sind. Auch in zukünftigen Analysen mit Voramplifikation muss ihr Einfluß auf das Ergebnis sehr genau untersucht werden. Möglicherweise könnte eine Kalibrierung anhand von PCR-Produkten mit definiertem Anteil methylierter Sequenzen vorgenommen werden. Die Standard-DNA und die untersuchte Probe würden dann der gleichen Anzahl PCR-Zyklen unterliegen, so dass Abweichungen durch den PCR-Bias normalisiert werden könnten.

Das Anwendungsspektrum der QM-Technologie wurde durch die Duplex-Voramplifikation wesentlich erweitert. Während üblicherweise 10 - 20 ng Bisulfit-DNA für die Analyse nur einer Genregion benötigt werden, wurde in dieser Arbeit eine Analyse in zwei Genregionen mit nur ca. 0,3 ng durchgeführt. Das Prinzip der Messung von PCR-Produkten in einem QM-Assay könnte zukünftig auch auf mehr als zwei DNA-Regionen angewendet werden. Eine multiplexierte Voramplifikation könnte die Analyse von mehreren Methylierungsmarkern mittels QM-Assay ermöglichen. Dabei würde letztlich weniger DNA benötigt als für die standardmäßige Messung eines Markers.

Die Voramplifikation ermöglichte auch die Verwendung von in Agarose eingebetteter Bisulfit-DNA, wie sie mit der Agarosebead-Methode gewonnen wird. Diese Methode ist besonders gut für die Bisulfit-Umwandlung weniger Zellen geeignet. Die agarosegebundene DNA kann normalerweise nicht in Realtime-PCRs eingesetzt werden, da sie vorher aufgeschmolzen werden muss und möglicherweise inhibierenden Einfluss auf die PCR hat. Setzt man die agarosegebundene Bisulfit-DNA jedoch in die Voramplifikation ein, können die PCR-Produkte analysiert und inhibierende Effekte umgangen werden.

Die Methylierungsanalyse nach einer Duplex-Voramplifikation konnte für die Genregionen H19 und IGF2/DMR2 der Maus erfolgreich realisiert werden. Diese Weiterentwicklung der QM-Technologie ermöglichte die quantitative Analyse primordialer Keimzellen in der Realtime-PCR. Mit Probenmaterial aus lediglich 30 - 75 Zellen gelang eine Methylierungsanalyse in vier QM-Assays.

#### **5.1.9 Validierung der allelspezifischen QM-Assays mit embryonalen Zellen der Maus**

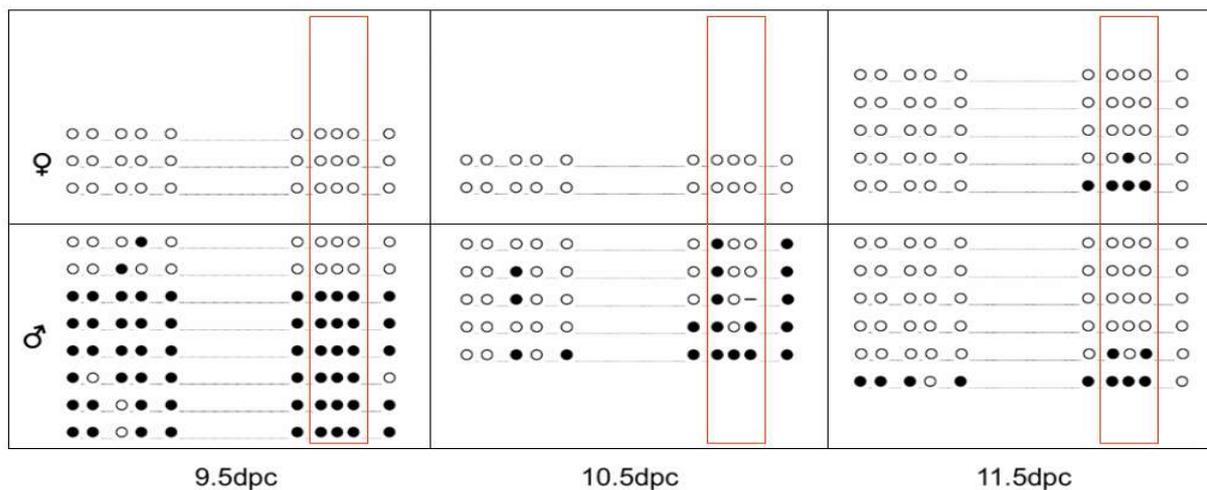
Die Vererbung der epigenetischen Information in Säugetieren erfolgt durch die Weitergabe der Methylierungsmuster an die Embryos über die Keimzellen. Dies geschieht in zwei Phasen. Die erste Phase ist durch eine rasche Abnahme der genomweiten Methylierung gekennzeichnet. Sie findet während der Ausbildung von Samen- und Eizellen in den Keimbahnvorläuferzellen statt, in der auch die Methylierung der imprinteten Gene gelöscht wird. In den reifen Keimzellen ist die Methylierung wieder hergestellt, man spricht von „reprogrammiert“. Die zweite Phase folgt direkt nach der Befruchtung der Eizelle, wobei das paternale Allel deutlich schneller demethyliert vorliegt als das maternal vererbte (Reik et al. 2001, Hajkova et al. 2002). Diese zweite Phase der Reprogrammierung in den primordialen Keimzellen des frühen Embryos war ein Gegenstand der Untersuchung in dieser Arbeit.

Das imprintete Gen IGF2 (insulin-like growth factor 2) ist Gegenstand zahlreicher Veröffentlichungen, wobei die differentiell methylierte Region DMR2 des Gens die am besten untersuchte ist. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der embryonalen Entwicklung. Die Überexprimierung des Gens führt zu vergrößerten Föten, während der Verlust der Expression zu deren verzögertem Wachstum führt (Sun et al. 1997, Eggenschwiler et al. 1997, DeChiara et al. 1991). Die imprintete Region des H19-Gens liegt 90

Kilobasen downstream von IGF2-Gen. Die Funktion dieses maternal exprimierten Transkripts ist bisher nicht bekannt. Der Imprinting-Status beider Gene ist stark miteinander verknüpft (Murrell et al. 2004). Die Anbindung eines Zinkfinger-Bindeproteins an die CTCF-Bindungsstelle in der H19-Region reguliert dabei die allelspezifische Methylierung der IGF2-H19-Region (Kurukuti et al. 2006).

Die Präparation von primordialen Keimzellen (PGCs) aus sehr frühen Stadien der Embryonalentwicklung ist schwierig und aufwendig. Deshalb gibt es bisher nur sehr wenige Veröffentlichungen, in denen die Reprogrammierung einzelner Gene für den Tag 11,5 nach der Befruchtung und früher beschrieben ist. Hajkova et al. gelang die Analyse von IGF2/DMR2 für die Tage 10,5 und 11,5, jedoch ohne allelische Zuordnung der Methylierung (Hajkova et al. 2002). Auch für die Region H19 liegen die Daten nur für die Tage 10,5 und 11,5 vor. Hier gelang die allelspezifische Analyse für den Tag 11,5. Die veröffentlichten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Demethylierung ein aktiver Prozess ist, wobei paternal imprintete Gene ihre Methylierung zu einem früheren Zeitpunkt als maternal imprintete Gene verlieren. Die maternal imprinteten Gene Snrpn/DMR1, Peg3 und Lit1 wurden zwischen den Tagen 11,5 und 12,5 demethyliert, während für das paternal methylierte Gen H19 schon am Tag 11,5 keine Methylierung mehr gefunden wurde. Für den Methylierungszustand der Gene am Tag 9,5 liegen bisher keine Daten vor. Gerade für diesen Zeitraum wurde aber die größte Dynamik für den Demethylierungsprozess der paternal methylierten Gene vermutet.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte diese Lücke geschlossen werden. Es wurde erstmalig die Veränderung der Methylierung in PGCs mit Hilfe einer Realtime-PCR gemessen. Allelspezifische QM-Assays für die Regionen H19 und IGF2/DMR2 dienten der spezifischen Detektion der Methylierung entweder nur des paternalen oder nur des maternalen Allels. Die Reprogrammierung der elterlichen Chromosomen konnte so unabhängig voneinander beobachtet werden. Zwischen den Tagen 9,5 und 10,5 wurde eine signifikante Abnahme der Methylierung des paternalen Allels von 72 % auf 17 % gemessen. Für die Region IGF2/DMR2 konnte keine signifikante Veränderung festgestellt werden. Der Arbeit von Hajkova kann entnommen werden, dass die von der QM-Sonde überspannten CpGs generell ein niedrigeres Methylierungsniveau erreichen als die distal benachbarten CpGs. Dies erklärt



**Abbildung 46:** Methylierung der H19-Region in primordialen Keimzellen 9,5, 10,5 und 11,5 Tage nach der Befruchtung. Die Ergebnisse von Klonsequenzierung sind in Reihen, gleiche CpG-Positionen (methylierte schwarz, nicht methylierte weiß) in Spalten dargestellt. Die Ergebnisse wurden unabhängig von dieser Arbeit ermittelt. Die 3 markierten CpGs entsprechen den in dieser Arbeit analysierten Positionen. Die analysierte DNA entstammt der gleichen DNA-Präparation wie die in dieser Arbeit analysierten Proben (mit freundlicher Genehmigung von S. Reither, Universität des Saarlandes 2006).

einerseits die niedrige Methylierungsrate, die mit dem QM-Assay für diese Region gefunden wurde. Andererseits bleibt bemerkenswert, dass für den Tag 9,5 gar keine Methylierung gefunden werden konnte.

Die Ergebnisse für die H19-Region konnten durch Daten der Arbeitsgruppe Reither (Universität des Saarlandes) bestätigt werden. In ihrer Analyse wurde die gleiche DNA mittels Klonsequenzierung untersucht (Abb.46). Für den Vergleich von Ergebnissen aus Klonsequenzierung und QM-Assay muss jedoch beachtet werden, dass die methylierungsspezifische Sonde drei CpG-Positionen gleichzeitig überspannt (Markierung in Abb.46). Mit dem QM-Assay werden daher nur die co-methylierten CpG-Positionen detektiert. Auch in der Klonsequenzierung wurde für das maternale Allel von H19 an allen Tagen keine oder nur sehr geringe Methylierung in H19 gefunden. Dies stimmt mit den Ergebnissen des allelspezifischen QM-Assays dieser Arbeit überein. Das paternale Allel zeigt dagegen eine hohe Methylierungsrate am Tag 9,5 (6 von 8 Sequenzen methyliert) und eine deutlich reduzierte Methylierungsrate am Tag 10,5 (1 von 5 Sequenzen methyliert). Auch wenn diese Ergebnisse der Klonsequenzierung keine hohe statistische Sicherheit bieten, da zum Teil nur 2 Klone pro Zeitpunkt analysiert wurden, so zeigen die Ergebnisse eine gute Übereinstimmung den Daten dieser Arbeit und stehen nicht im Widerspruch zu diesen. Der Zeitpunkt der Reprogrammierung des paternalen Allels in H19 konnte somit für den Zeitraum zwischen Tag 9,5 und 10,5 ermittelt werden. Der fast vollständige Verlust der Methylierung in dieser Genregion innerhalb eines Tages bekräftigt die Annahme, dass während der Embryogenese ein aktiver Prozeß zur Demethylierung dieser imprinteten Region beiträgt. Die Abnahme der Methylierung konnte nur für H19, nicht jedoch in IGF2/DMR2 beobachtet werden. IGF2/DMR2 lag zu allen drei beobachteten Zeitpunkten sowohl auf dem maternalen als auch paternalen Chromosom weitgehend unmethyliert vor. Dies kann darauf hindeuten, dass IGF2/DMR2 zu einem noch früheren Zeitpunkt als 9,5 Tage nach der Befruchtung demethyliert wird.

**Tabelle 15:** Methylierungsanalyse von H19 in maternalem und paternalem Allel von primordialen Keimzellen (Einzelwerte der 3 Proben in Prozent).

Maternales Allel			Paternales Allel		
9.5 dpc	10.5dpc	11.5 dpc	9.5 dpc	10.5dpc	11.5 dpc
3	0	0	114	4	67
5	0	5	77	45	15
1	0	8	25	2	33

**Tabelle 16:** Methylierungsanalyse von IGF2/DMR2 in maternalem und paternalem Allel von primordialen Keimzellen (Einzelwerte der 3 Proben in Prozent).

Maternales Allel			Paternales Allel		
9.5 dpc	10.5dpc	11.5 dpc	9.5 dpc	10.5dpc	11.5 dpc
0	9	0	1	21	3
0	0	6	0	0	1
1	37	2	0	0	0

Die Bestimmung der Methylierung in primordialen Keimzellen erfolgte aus drei unabhängigen Präparationen für jeden Zeitpunkt. Die aus diesen Messungen erhaltenen Standardabweichungen sind in einigen Fällen sehr hoch. So wurde die Methylierung des paternalen Allels in H19 am Tag 9,5 mit 114 %, 77 % und 25 % gemessen (Tab.15). Auch in der technischen Validierung der allelspezifischen QM-Assays wurden zum Teil hohe Standardabweichungen registriert (Kap. 4.3.5).

Bei der Untersuchung promordialer Keimzellen wurden nur zwischen 200 - 400 pg DNA eingesetzt (30 - 75 Zellen). Bei einer Methylierung von 25 %, ergibt sich eine Anzahl von 30 - 60 Kopien methylierter Sequenzen. Berücksichtigt man weiter eine Ausbeute von 50 % nach Extraktion und Bisulfit-Konversion, so sind im Falle der Untersuchung von 30 Zellen nur noch etwa 15 Kopien methylierter DNA detektierbar. Hinzu kommt, dass die statistische Wahrscheinlichkeit einer Amplifikation aller vorhandenen Kopien bzw. die Amplifikation einer repräsentativen Auswahl der vorhandenen Kopien stochastischen Schwankungen unterliegt. Bei einer derart geringen Anzahl von 15 - 30 Molekülen kann sich diese zufällige Verteilungsschwankung sehr ungünstig auswirken. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache, kann also eine Genauigkeit der durchgeführten Methylierungsanalyse auf primordialen Keimzellen mit maximal 20 % Methylierung angenommen werden. Dies spiegelt sich auch in der gefundenen Standardabweichung wider.

Diese Fehlerbetrachtung gilt für jede Art der PCR-Amplifikation von DNA aus wenigen Zellen. Die Genauigkeit der Methylierungsanalyse weniger DNA-Kopien ist deshalb auch in anderen PCR-basierten Methoden limitiert und abhängig von der Anzahl der amplifizierbaren Genkopien. Eine Auswertung mittels Klonsequenzierung basiert letztlich ebenfalls auf den Ergebnissen nur einer PCR und unterliegt daher den gleichen Einschränkungen. Einzige Möglichkeit die Genauigkeit einer Analyse von Proben mit geringer Kopienzahl zu verbessern, ist die Anzahl der untersuchten Proben zu erhöhen.

Neben der statistischen und technischen Limitierung kann die Varianz der Methylierungsanalyse weitere Ursachen haben. Abweichungen in der Bestimmung des Zeitpunktes der Fertilisation bzw. Präparation können nicht ausgeschlossen werden. Desweiteren ist denkbar, dass neben den PGCs auch Zellen anderen Typs isoliert wurden. Die Verifizierung der hier gewonnenen Daten ist deshalb weiteren Versuchen mit einer größeren Anzahl Präparationen vorbehalten.

## **5.3 HQM-Assay-Technologie**

### **5.1.10 Erhöhung der Sensitivität einer quantitativen Analyse**

In dieser Arbeit wurde eine neue hochsensitive und quantitative Methode zur Methylierungsanalyse entwickelt - der HQM-Assay. Die vorgestellten Ergebnisse belegen die hervorragenden quantitativen Eigenschaften des Assays bei gleichzeitig hoher Sensitivität. Dies bedeutet eine neue Qualität der Methylierungsanalyse mittels Realtime-PCR. Die HQM-Technologie ist gekennzeichnet durch die gleichzeitige Anreicherung methylierter und nicht methylierter DNA und ihre Detektion mit zwei unterschiedlich markierten Sonden. Dies ähnelt in Art und Weise einem QM-Assay. Der wesentliche Unterschied besteht jedoch darin, dass beide DNA-Fraktionen in einer Duplexreaktion selektiv angereichert werden, während beim QM-Assay die vorliegende Misch-Population mit einem Primerpaar gleichmäßig amplifiziert wird. Die selektive Anreicherung wird durch die Verwendung beider Bisulfit-DNA-Stränge

möglich, die nach der Konversion nicht mehr komplementär sind und deshalb unabhängig voneinander amplifiziert werden können. Der TMEFF2-HQM-Assay ist die erste praktische Umsetzung dieser Idee. Der Assay besitzt eine wesentlich höhere Sensitivität als der vergleichbare QM-Assay. Die größte gemessene relative Sensitivität betrug 1:1000, wobei 50 pg in 50 ng PBL-DNA nachgewiesen wurden. Möglicherweise können noch höhere Sensitivitäten erzielt werden. Die quantitativen Eigenschaften des Assays waren dabei besser als die des QM-Assays, der nur bis 5 % Methylierung eine gute Diskriminierung ermöglichte.

Es ist bekannt, dass TMEFF2 in PBL-DNA keine oder nur eine sehr niedrige Hintergrundmethylierung aufweist. Mit dem HQM-Assay konnte der Anteil methylierter Sequenzen in PBL-DNA einfach bestimmt werden. Der gemessene Methylierungsindex für 50 ng PBL-DNA betrug 0,004 (Tab. 11). Nach Zugabe von 50 pg methylierter DNA wurde ein Methylierungsindex von 0,013 gemessen. Daraus ergibt sich unter Annahme einer linearen Regression ein Gehalt von etwa 22 pg methylierter DNA in 50 ng PBL. Die Hintergrundmethylierung in PBL-DNA für das TMEFF2-Gen beträgt demnach etwa 0,04 %. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit keine Möglichkeit bestand, den entwickelten HQM-Assay mit klinischen Proben zu validieren, zeigt die Bestimmung der Hintergrundmethylierung in PBL-DNA die Leistungsfähigkeit dieser Technologie. Das Assayformat schließt die Lücke zwischen QM-Assays und HM-Assay und vereint die Vorteile beider Methoden.

Zum sensitiven Nachweis methylierter DNA in Körperflüssigkeiten werden bisher meist MSP- und HM-Assays eingesetzt. Mit beiden Technologien wird nur der Anteil methylierter DNA bestimmt. Soll die Methylierungsrate berechnet werden, wird ein Referenz-Assay benötigt. Dies hat drei wesentliche Nachteile. Erstens ist eine zusätzliche Realtime-PCR notwendig, dadurch vergrößert sich die experimentelle Schwankung. Zweitens wird mit einem Referenz-Assay eine andere Sequenz als im Methylierungsassay quantifiziert. Das kann bei chromosomal instabilen Zellen zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Drittens wird im Referenz-Assay die Gesamt-DNA quantifiziert. Im Gegensatz dazu wird im HQM-Assay die unmethylierte DNA angereichert und als Referenz benutzt. Im TMEFF2-HQM-Assay wurde dazu ein Blocker verwendet, der gegen die methylierte DNA gerichtet ist. Die sensitive Anreicherung methylierter und nicht methylierter DNA führt dazu, dass der HQM-Assay nicht nur nahe 0 % Methylierung gute quantitative Eigenschaften besitzt, sondern auch sensitiv im Bereich 100 %iger Methylierung ist. In weiterführenden Experimenten hat sich diese Eigenschaft bestätigt. Dabei gelang die Unterscheidung von 99 % und 100 % Methylierung mittels Methylierungsindex (Daten nicht gezeigt). Diese Eigenschaft eröffnet die Möglichkeit, Methylierungsmarker zu untersuchen, die in normalen Zellen hypermethyliert vorliegen und in Tumorzellen eine niedrigere Methylierung aufweisen. Für diagnostische Zwecke müssten wenige nicht methylierte Kopien vor dem hohen Hintergrund methylierter Kopien detektiert und quantifiziert werden. Die HQM-Technologie kann dies leisten und könnte so die Analyse einer Reihe neuer Methylierungsmarker ermöglichen, die bisher für diagnostische Zwecke nicht herangezogen wurden.

### **5.1.11 Das Zwei-Strang-Prinzip**

Die Idee, beide Stränge der Bisulfit-DNA gleichzeitig zur Methylierungsanalyse heranzuziehen, kann auch für andere Zwecke eingesetzt werden (Lewin und Tetzner, EP06090132.9). Die Wahrscheinlich-

keit der Detektion von Tumor-DNA in Plasma erhöht sich, wenn in einer Duplex-Reaktion beide DNA-Stränge als Templat dienen. So könnte sich die Sensitivität eines diagnostischen Assays erhöhen, wenn der gleiche Marker, also die identischen CpGs, auf beiden DNA-Strängen gemessen wird.

Das Prinzip ist grundsätzlich natürlich auch mit anderen PCR-Formaten umsetzbar. So könnte zum Beispiel ein MSP, entworfen auf dem Bisulfit1-Strang, methylierte DNA detektieren, während ein MSP, auf dem Bisulfit2-Strang liegend, nicht methylierte DNA anreichert. Die Analyse der Signale kann dann wie im HQM-Assay erfolgen. Es ist anzunehmen, dass dieses Assay-Format eine ähnliche Leistungsfähigkeit wie der HQM-Assay besitzt. Das Zwei-Strang-Prinzip kann auch zur Entwicklung eines Referenz-Assays genutzt werden. Die PCR auf dem ersten Bisulfit-Strang dient dann der Messung der methylierten DNA, der zweite Bisulfit-Strang wird zur Quantifizierung der Gesamt-DNA benutzt. Abweichungen des Methylierungswertes aufgrund von Chromosomenaberrationen im Bereich der Referenz-PCR werden so vermieden, weil der identische DNA-Abschnitt analysiert wird.

## 5.2 Vor- und Nachteile der entwickelten Verfahren

Das erarbeitete Konzept zur Entwicklung und Validierung von HM-Assays diente als Grundlage für die Etablierung von mehr als 20 HM-Assays. Die HM-Technologie hat sich dabei als Standard-Methode zum sensitiven Nachweis methylierter DNA bewährt. Die besondere Stärke besteht in ihrer hohen relativen Sensitivität. Sie wird durch die Eigenschaft des Blockers bestimmt, selektiv an unmethylierte DNA-Sequenzen zu binden und damit die gezielte Amplifikation methylierter DNA zu bewirken. Die Möglichkeit zur Anpassung der Blockersequenz an biologische Besonderheiten, wie SNPs oder partielle Methylierung, sowie die Einstellung der relativen Sensitivität mittels Blockerkonzentration stellt einen Vorteil gegenüber der MSP-Technologie dar. Eine weitere Stärke der HM-Technologie liegt darin, dass Co-Methylierung nur für wenige benachbarte CpGs erforderlich ist. Eine hochsensitive methylierungsspezifische PCR wird durch die Verwendung nur eines Blocker erzielt. Die Sonden können so entworfen werden, dass sie die gleichen CpGs wie der Blocker detektieren. Auf diese Art werden nur 4-5 methylierte CpGs zur Detektion benötigt. Dagegen werden im MSP zwei methylierungsspezifische Primer sowie eine Sonde zwischen den Primern verwendet, so dass mindestens 8-10 CpGs analysiert werden. Ein MSP benötigt daher ausgedehntere Bereiche mit Co-Methylierung gegenüber einem HM-Assay (Abb. 47). Die Entwicklung eines HM-Assays ist jedoch in Regionen schwierig, in denen eine besonders hohe CpG-Dichte vorliegt, da die Primer keine CpG-Positionen überspannen dürfen. Hier bietet der MSP Vorteile. Im Gegensatz dazu erfordert der Entwurf des Blockers mindestens vier CpGs auf einer Sequenzlänge von 25-35 Basenpaaren. Das wiederum macht einen HM-Assay in Regionen mit besonders niedriger CpG-Dichte unmöglich.

HM-Assays beruhen, genau wie MSP-Assays, auf der Amplifikation bisulfit-konvertierter DNA. Bisulfit-DNA bildet die Basis der hohen Sensitivität und Spezifität der Assays und damit auch die Grundlage zu ihrer Anwendung in diagnostischen Tests. Die Verwendung von Bisulfit-DNA hat jedoch den Nachteil, dass Kosten und Zeitaufwand eines diagnostischen Tests negativ beeinflusst werden. Eine Alternative zu MSP und HM-PCR stellt die Verwendung von Restriktionsenzymen mit anschließender PCR dar. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine Bisulfit-Konversion der DNA notwendig ist. Dabei können jedoch nur DNA-Sequenzen untersucht werden, die eine Schnittstelle eines methylierungs-

sensitiven Enzyms, wie *Bst*II, *Hpa*II oder *Hin*P1I, aufweisen. Positive PCR-Signale werden nur dann erzeugt, wenn die zu amplifizierende Sequenz durch Methylierung geschützt war. Das Templat kann aber auch intakt bleiben, wenn das Templat nicht vollständig vom Restriktionsenzym geschnitten wurde. Dies kann der Fall sein, wenn die DNA teilweise einzelsträngig vorliegt. Weitere Ursachen dafür können die Enzymaktivität selbst, Proben-Verunreinigungen oder mit der DNA assoziierte Proteine sein. Detektionssysteme basierend Restriktionsenzymen sind daher anfällig für falsch-positive Ergebnisse und nicht für die Krebsfrüherkennung geeignet.

Die Stärke der HM-Technologie liegt in der hohen Spezifität sowie hohen relativen Sensitivität. Sie ist daher, genau wie die MSP-Technologie, vor allem zur qualitativen Detektion von Tumor-DNA in Körperflüssigkeiten geeignet. Wird der Anteil methylierter DNA einer Region bestimmt, muss die Gesamt-DNA in einer zweiten Realtime-PCR quantifiziert werden. Da sich die Varianzen beider Einzelmessung addieren, muss mit einem relativen Fehler von bis zu 50 % gerechnet werden (Abb. 47).

Für diagnostische Anwendungen in denen eine genaue Quantifizierung erforderlich ist, bietet die QM-Technologie Vorteile. Durch die gleichzeitige Detektion methylierter und nicht methylierter Sequenzen wird eine interne Normalisierung erreicht. Die Messung benötigt keine Referenz-PCR, da die Analyse unabhängig von der Menge eingesetzter DNA ist. Mit der QM-Technologie können je nach Meßbereich Methylierungsunterschiede von 3 - 10 % aufgelöst werden. In dieser Arbeit konnte diese Genauigkeit auch für allelspezifische QM-Assays in Kalibrierungsexperimenten erreicht werden. Durch die allelspezifische Trennung der Signale, konnte die Methylierungsanalyse für nur ein Chromosomen erfolgen. Die Messung von PCR-Produkten einer Voramplifikation bietet außerdem die Möglichkeit, mehrere Regionen mit geringen DNA-Mengen zu untersuchen. Der Nachteil von QM-Assays besteht jedoch darin, dass während der Amplifikation keine methylierungsspezifische Anreicherung erfolgt. Mit QM-Assays können daher DNA-Proben mit weniger als 3 % Methylierung in der Regel nicht detektiert werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellte HQM-Technologie vereinigt die Vorteile beider Systeme. Dies wird durch die gleichzeitige Detektion methylierter und nicht methylierter CpGs in einer Reaktion möglich. Die interne Normalisierung erlaubt, wie bei einem QM-Assay, die genaue Bestimmung des Anteils methylierter DNA ohne Referenz-PCR. Gleichzeitig wird durch den Einsatz von Blockern eine spezifische Anreicherung methylierter und nicht methylierter DNA erzeugt, so dass eine hohe relative Sensitivität, ähnlich dem HM-Assay, erreicht wird. Der Entwicklungsaufwand für einen HQM-Assay ist jedoch größer als für einen HM-Assay oder QM-Assay, da hier eine Duplex-Reaktion realisiert werden muss. Der Aufwand lohnt sich deshalb nur, wenn ein Biomarker analysiert werden soll, bei dem Methylierungsunterschiede genau quantifiziert werden müssen und der Anteil der methylierten DNA unter 10% liegt. Beispielweise könnte der entwickelte TMEFF2-HQM-Assay zur Detektion von Darmkrebs mit Hilfe von Körperflüssigkeiten herangezogen werden. Dieser Biomarker weist eine erhöhte Methylierung in Darmkrebsgewebe auf und wird im Blut von Tumorpatienten gefunden. Bei gesunden Patienten können jedoch ebenfalls methylierte TMEFF2-Sequenzen im Blut nachgewiesen werden. Das Niveau der Methylierung liegt hier bei weniger als 0,1 %. Für einen diagnostischen Assay muss also die tumorspezifische Erhöhung des Anteils methylierter DNA von der vorhandenen Hintergrundmethylierung unterschieden werden. Ein HM-Assay ist für diese Art der quantitativen Analyse nicht geeignet. Mit einem HQM-Assay kann diese diagnostische Fragestellung beantwortet werden.

Assayformat	Assay-Schema <sup>4)</sup>	Anzahl untersuchter CpGs	Relative Sensitivität	Messgenauigkeit	Analysematerial	Klinische Fragestellung
<b>MSP</b>		7 - 10	0,01 %	± 50 % <sup>1)</sup>	Gewebe und Körperflüssigkeiten	Krebsfrüherkennung (qualitative Detektion)
<b>HIM</b>		4 - 7	0,01 %	± 50 % <sup>1)</sup>	Gewebe und Körperflüssigkeiten	Krebsfrüherkennung (qualitative Detektion)
<b>QM</b>		3 - 4	~ 3 %	± 10 % <sup>2)</sup>	Gewebe	Tumor-Charakterisierung (quantitative Bestimmung)
<b>HQM</b>		4 - 6	mind. 0,1 %	± 10 % <sup>2)</sup>	Gewebe und Körperflüssigkeiten	hochsensitive quantitative Bestimmung
<b>Klonsequenzierung von mind. 25 Klonen</b>		variabel		± 20 % <sup>3)</sup>	Gewebe	Spezifikation und Validierung von Methylierungsmarkern
<b>Direktsequenzierung eines PCR-Produktes</b>		variabel		± 25 % <sup>3)</sup>	Gewebe	Identifizierung von Methylierungsmarkern

**Abbildung 47:** Assayformate zur Methylierungsanalyse und ihre Eigenschaften. Gegenübergestellt sind vier verschiedene Realtime-PCR-Formate und zwei Sequenzier-Methoden, die auf der Amplifikation von bisulfit-konvertierter DNA beruhen.

- 1) Maximale Abweichung aus zwei Realtime-Einzelreaktionen, wenn die Gesamt-DNA in einer zweiten Reaktion (Referenz-PCR) bestimmt wird.
- 2) Maximale Abweichung einer Einzelreaktion, in der methylierte und nicht methylierte DNA gleichzeitig detektiert werden.
- 3) Die Genauigkeit der Analyse ist abhängig von der Anzahl der sequenzierten Klone.
- 4) Die Symbole bedeuten: ● methyliertes CpG, ○ unmethyliertes CpG, ● Detektion unabhängig vom CpG, ● Primer, ● Blocker, ● Sonde

## 5.3 Verfahren zur Kontaminationsvermeidung

### 5.3.1 Kontaminationsvermeidung durch Verwendung von Endonukleasen

In dieser Arbeit werden verschiedene Methoden zur Vermeidung von PCR-Kontaminationen durch PCR-Produkte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen beschrieben. Die in Kapitel 4.5.2 zusammengefassten Ergebnisse zeigen, dass so bis zu 99,9 % PCR-Produkt neutralisiert werden können. Die Anwendungsmöglichkeit dieser Methode ist jedoch eindeutig begrenzt, denn die erreichten Effizienzen sind sehr unterschiedlich. Wesentlicher Nachteil gegenüber der Kontaminationsvermeidung mit Uracil-DNA-Glykosylase (UNG) ist, dass die verwendeten Restriktionsenzyme vorrangig doppelsträngige PCR-Produkte zerstören. Auch kann mit Endonukleasen meist nur eine vorhandene Erkennungstelle pro PCR-Produkt geschnitten werden, während UNG alle enthaltenen Uracil-Basen entfernen kann. Dabei wird die Amplifikation schon durch das Fehlen einer Base verhindert. Die Effizienzen des Abbaus von PCR-Produkten durch Restriktionsenzyme ist so verfahrensbedingt niedriger als mit UNG (vgl. Kap.4.5.3). Die Effizienz ist dabei in erster Linie vom gewählten Enzym abhängig. Mit einigen für diese Anwendung getesteten Endonukleasen wurden Effizienzen von weniger als 50 % gefunden. Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass die Pufferbedingungen nicht an die Enzyme angepasst werden können, denn die PCR-Bedingungen müssen unverändert bleiben. Die Anzahl der enthaltenen Schnittstellen bestimmt auch die Neutralisationsrate, denn mit 3 Schnittstellen konnte eine Neutralisationsrate von 97,8 % erreicht werden, während bei Anwendung einer Schnittstelle nur 88 % der PCR-Produkt neutralisiert wurden (vgl. Tab. 12).

Die Verwendung von Endonukleasen zur Vermeidung von PCR-Kontaminationen wurde auch für die reverse Transkription vorgeschlagen (Ashkenas et al. 2005). Die Autoren beschreiben die Verwendung eines Enzymmixes, um die Anzahl der Schnittstellen zu erhöhen. Die Zahl der Schnittstellen wird sich auch mit der Länge des PCR-Produktes erhöhen. Eine Anwendung für die Realtime-PCR ist somit nur eingeschränkt möglich, da hier möglichst kurze Fragmente angestrebt werden. Die Einführung von Schnittstellen mit der Primersequenz löst diesen Widerspruch. Mit dem gezielten Basenaustausch in dieser Region konnten künstlich neue Schnittstellen erzeugt werden. Überraschend war dabei, dass Primer entworfen werden konnten, die unter Bildung einer Basenfehlpaarung an die Templat-DNA hybridisierten und dennoch gute Eigenschaften in der Realtime-PCR zeigten.

Die flexibelste Art der Kontaminationsvermeidung mit Restriktionsenzymen ist mit Typ IIS- Endonukleasen realisierbar. Das Prinzip beruht darauf, eine Bindungsstelle am 5'-Ende des Primers mittels generischer Domäne zu erzeugen, während die Schnittstelle des Enzyms innerhalb des Primers liegt. *GsuI* bietet den Vorteil, zwischen der 16. und 14. Base nach der Erkennungssequenz zu schneiden, wogegen *HgaI*, wie von Ashkenas und Mitarbeitern vorgestellt, nur zwischen der 5. und 10. Base schneidet (Ashkenas et al. 2005, supplement). Die Primerbindungsstelle wird durch die Enzymbehandlung entfernt, obwohl die Erkennungsstelle des Enzyms am Rand des PCR-Produktes liegt. Die Effizienz der Methode konnte wesentlich gesteigert werden, wenn die Erkennungssequenz, im Unterschied zu Ashkenas und Mitarbeitern, als Tandemrepeat an das 5'-Ende des Primers gekoppelt wurde. Auf diese Art waren vier anstelle von zwei Schnittstellen pro PCR-Produkt enthalten, so dass eine Neutralisationsrate von 99,9 % erreicht werden konnte (Tab. 12). Der Vorteil der Methode liegt neben der guten Effizienz auch in ihrer einfachen Umsetzung. Durch Anfügen der Erkennungsstelle können

etablierte PCR-Systeme nachträglich für die Kontaminationsvermeidung mit *Gsul* „umgerüstet“ werden, ohne die Primerbindungsstelle zu verändern. Jedes PCR-Produkt kann mit dieser Methode gezielt neutralisiert werden, denn es sind keine weiteren Sequenzvoraussetzungen nötig. Inwieweit das Verfahren auf eine größere Anzahl von PCR-Reaktionen anwendbar ist, muss noch gezeigt werden. Die Verlängerung der Primer am 5'-Ende wirkte sich im Falle der getesteten PCR nicht negativ aus. In multiplexierten PCR-Systemen könnte jedoch die generische Domäne einen negativen Einfluss haben, wenn jeder Primer die gleiche Domäne trägt.

### 5.3.2 Kontaminationsvermeidung durch Verwendung des UNG-Systems

Einige Anwendungsformen der Kontaminationsvermeidung mit Restriktionsenzymen waren effizient, jedoch konnte mit keinem der getesteten Systeme die Neutralisationsrate von UNG erreicht werden. Das weit verbreitete und hocheffiziente UNG-Verfahren konnte bislang jedoch mit Bisulfit-DNA nicht benutzt werden, da die uracilhaltige Bisulfit-DNA genauso wie uracilhaltige PCR-Produkte von UNG neutralisiert wird. Es war daher ein alternatives Verfahren zur Kontaminationsvermeidung erforderlich, das für die Amplifikation von Bisulfit-DNA geeignet ist. Die Idee, das in der Bisulfit-Umwandlung entstehende stabile Zwischenprodukt, die 6-Sulfonyl-Uracil-DNA, ohne Desulfonierung in die PCR einzusetzen, sollte die Anwendung von UNG möglich machen. Folgende vier Voraussetzungen sollten erfüllt sein, damit die Kontaminationsvermeidung mit Hilfe von UNG ohne Verlust an Sensitivität durchgeführt werden konnte:

1. 6-Sulfonyl-Uracil-haltige DNA ist kein Substrat der UNG.
2. 6-Sulfonyl-Uracil-haltige DNA kann im PCR-Puffer desulfoniert werden.
3. UNG wird im initialen Aktivierungsschritt der PCR vollständig inaktiviert.
4. Die Stabilität von sulfonyluracil-haltiger DNA ist gewährleistet, so dass keine "spontane" Desulfonierung auftritt.

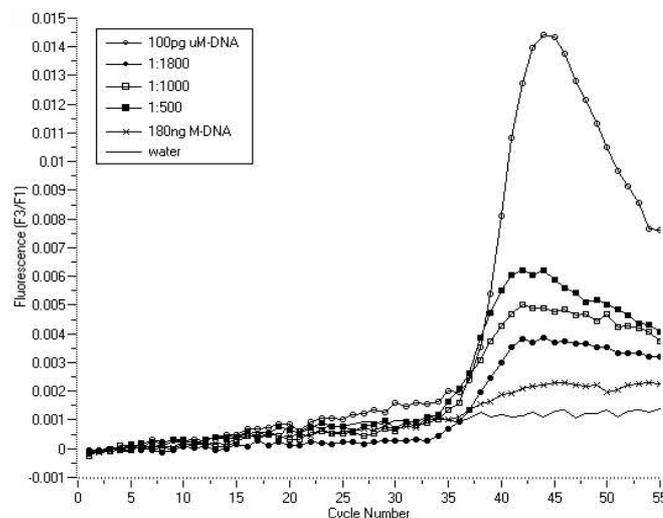
Alle vier Voraussetzungen, um eine effiziente Kontaminationsvermeidung mit UNG zu betreiben, konnten im Experiment erfüllt werden. Die Sulfon-Gruppe an Position 6 des Uracils schützt die Base vor ihrer Abspaltung durch UNG (Abb. 40). Desweiteren wurde gezeigt, dass die Desulfonierung bei alkalischem pH durch Temperaturerhöhung beschleunigt wird. So wurde es möglich die SafeBis-DNA während der initialen Detarurierungsphase der PCR zu desulfonieren, wobei gleichzeitig die Polymerase aktiviert und die UNG inaktiviert wurde. Bei der Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Desulfonierung im PCR-Puffer bei 95 °C ergab sich eine maximale theoretische Ausbeute von etwa 85 %. Da die Halbwertszeit von Taq-DNA-Polymerase bei 95 °C mit 40 - 60 min angegeben wird, sollte die Aktivierungsphase 30 min nicht überschreiten. Das Optimum zwischen der Desulfonierung einerseits und der Inaktivierung der Polymerase andererseits wurde zwischen 25 und 30 min erreicht (Abb. 41). In weiterführenden Experimenten wurde ermittelt, dass die Effizienz der Desulfonierung nicht in allen PCR-Puffern gleich gut ist. Mit dem FastStart Kit (Roche Diagnostics) und dem QuantiTect Kit (Qiagen) wurden sehr gute Ergebnisse erzielt. Die PCR-Effizienzen mit SafeBis-DNA und Bisulfit-DNA waren in diesen PCR-Puffern etwa gleich. Dagegen zeigte die SafeBis-DNA mit dem qPCR Core Kit (Eurogentec) 4 Zyklen spätere CTs. Offensichtlich konnte die SafeBis-DNA im Puffer des qPCR Core Kit nicht effizient desulfoniert werden. Die Ursache liegt im pH-Wert, der mit 7,8 deutlich niedriger

ist als in den PCR-Puffern der anderen Hersteller (pH 8,3 FastStartKit und pH 8,5 QuantiTect Kit). Das Ergebnis deckt sich mit dem im Lagerungsexperiment gefundenen Ausmaß spontaner Desulfonierung. Dort wurde festgestellt, dass bereits bei einem pH-Wert von 8 große Teile der SafeBis-DNA desulfoniert werden, wenn sie bei 40 °C gelagert werden, dagegen bleibt die SafeBis-DNA bei pH 7 sulfoniert (Tab. 14). Die Anwendung der SafeBis-DNA und UNG erfordert daher streng kontrollierte Lagerbedingungen bei einem neutralen pH-Wert und Kühlung bei mindestens 4 °C. Werden diese Bedingungen nicht eingehalten, kann sich die Sensitivität der PCR reduzieren. Die Verwendung von richtig gelagerter SafeBis-DNA führt dagegen zu keinem signifikanten Verlust der Sensitivität der PCR. Der große Vorteil dieser Methode der Kontaminationsvermeidung liegt in der einfachen Umsetzung für jede Art von Methylierungsanalyse, die auf der PCR bisulfit-umgewandelter DNA basiert. Jedes auf Frommer basierende Protokoll der Bisulfit-Reaktion ist leicht anzupassen, indem der Inkubationsschritt zur Desulfonierung der DNA mit NaOH weggelassen wird (Frommer et al. 1992). Der Einsatz von UNG ist ein Standard-Verfahren zur Kontaminationsvermeidung und gewährleistet eine effiziente Neutralisation von PCR-Produkten (Pruvost et al. 2005). Auch in dieser Arbeit konnten bis zu  $10^5$  PCR-Produkte, mindestens jedoch 3000 Kopien PCR-Produkt, vollständig neutralisiert werden (Tab. 13). Die Anwendung der UNG in der PCR bietet erstmalig die Sicherheit, Methylierungsanalysen ohne die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse durchzuführen. Dies ist besonders wertvoll für Methoden, in denen offen mit PCR-Produkten gearbeitet werden muss, und damit die Gefahr einer Kontamination besonders hoch ist. Das trifft auf alle Sequenzierverfahren, COBAS, MSP, MS-SNuPE sowie alle Hybridisierungsverfahren, in denen PCR-Produkte analysiert werden, zu. In einer Realtime-PCR werden die Reaktionsgefäße zwar in der Regel nicht geöffnet, dennoch besteht auch hier die Gefahr einer versehentlichen Verbreitung von PCR-Produkten. Die hohe Empfindlichkeit der Realtime-PCR machen sie besonders anfällig für Kontaminationen. Diagnostische Assays, die auf Realtime-PCR beruhen, müssen deshalb unbedingt mit einem System zur Kontaminationsvermeidung ausgestattet sein. Das betrifft insbesondere Anwendungen, in denen nur eine qualitative Aussage zur Diagnose herangezogen wird, denn bereits eine einzige Kopie kontaminierendes PCR-Produkt würde zu einer falschen Diagnose führen. Die Nutzung von SafeBis-DNA in Kombination mit dem UNG-System schafft eine Voraussetzung, dass ein Realtime-PCR-Verfahren basierend auf bisulfit-konvertierter DNA als diagnostischer Test akzeptiert wird.

#### **5.4 Ausblick zur Methylierungsanalyse mit Realtime-PCR**

Die meisten in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden im LightCycler-Gerät mit spezifischen FRET-Hybridisierungs sonden erzielt. Dieses System hat sich als besonders vorteilhaft erwiesen, um mit HM-Assays eine hohe Spezifität und Sensitivität für methylierte DNA zu erzielen. Die spezifische Detektion methylierter DNA ist jedoch nicht auf dieses Sondenformat beschränkt. TaqMan-Sonden, ein weit verbreitetes Detektionssystem in der Realtime-PCR, wurden bereits mehrfach für die HM-Technologie angewendet (pers. Kom. J. Distler). Auch der in dieser Arbeit vorgestellte HQM-Assay, bestehend aus 2 HM-PCRs, demonstriert die Anwendbarkeit dieses Sondentyps (Kap. 4.4.2). Zur Detektion methylierter DNA können weiterhin Molecular Beacon benutzt werden (pers. Kom. I. Schwöpe). Eine Sonderstellung nimmt die Verwendung von Scorpionprimern zur Methylierungsanalyse ein (Tetzner und

Distler 2005). Dieses Detektionssystem vereint die Funktion von Primer und Sonde in sich. Dabei wird das Signal durch eine intramolekulare Rückfaltung des Sonden-Teils auf die am 3'-Ende verlängerte Sequenz des Primer-Teils erzeugt (siehe auch Kap. 1.3.2). Die Sonde muss dabei nicht, wie in anderen Systemen, durch Diffusionsprozesse an die Ziel-Sequenz herangeführt werden, um daran hybridisieren zu können, sondern sie befindet sich immer in direkter Nähe zur Ziel-Sequenz. Die intramolekulare Rückfaltung bedingt auch wesentlich niedrigere Schmelztemperaturen des hybridisierenden Teils der Sonde. Dies ermöglicht die Detektion besonders kurzer Amplifikate. Besonders für die Detektion nicht methylierter DNA, in denen die Ziel-Sequenz aufgrund des niedrigen CG-Gehaltes eine niedrige Schmelztemperatur besitzt, kann dieses Sondenformat vorteilhaft eingesetzt werden. Die HM-Technologie kann auch ohne Realtime-PCR umgesetzt werden. Die Analyse der PCR-Produkte kann zum Beispiel auch auf einem Mikroarray erfolgen. Dafür muss die Anreicherung der methylierten oder unmethylierten DNA mittels Blocker in einer konventionellen PCR erfolgen. Die DNA wird anschließend mit einer geeigneten Methode markiert, z.B. mit einem Fluoreszenz-Farbstoff. Die Hybridisierung und Detektion auf dem Mikroarray kann methylierungsspezifisch erfolgen, so dass das Verfahren die gleiche Sensitivität wie im Realtime-Format erreichen kann. Die Analyse entspricht jedoch einer Endpunkt-Bestimmung, so dass nur qualitative und keine quantitativen Aussagen getroffen werden können. Die HM-Technologie wurde vorrangig entwickelt, um eine spezifische Anreicherung der methylierten DNA zu erzielen. Umgekehrt ist auch die Anreicherung unmethylierter Sequenzen aus Mischungen mit großem Anteil methylierter DNA sinnvoll. DNA-Regionen, die in gesundem Gewebe vollständig methyliert vorliegen, können in Tumoren einen Verlust an Methylierung aufweisen. Dies wird vor allem für Onkogene gefunden, deren erhöhte Expression durch den Verlust der Methylierung in der Promotorregion gekennzeichnet ist (Dunn 2003). Zur Detektion dieser hypomethylierten Regionen ist also ein sensibler Nachweis unmethylierter Sequenzen notwendig. Dafür kann die HM-Technologie ebenfalls genutzt werden, wie am Beispiel der PCR2 des TMEFF2-HQM-Assays in dieser Arbeit gezeigt wurde (Kap. 4.4.2). Dort wurde ein Blocker eingesetzt, der spezifisch an methylierte DNA bindet und deren Amplifikation unterbindet. Auch für das GSTp1-Gen wurde ein sogenannter reverser HM-Assay entwickelt. Dabei konnte eine relative Sensitivität von mindestens 1:1800 nachgewiesen werden (Abb. 48).



**Abbildung 48:** Spezifische Detektion unmethylierter DNA mit einem reversen HM-Assay für GSTp1. Die Primer des GSTp1-HM-Assay II wurden kombiniert mit einem Blocker, der an methylierte DNA bindet. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Hybridisierungssonden für unmethylierte DNA. Amplifiziert wurden 100 pg nicht methylierte DNA (PBL) in Mischungen mit unterschiedlichen Mengen universell methylierter DNA (Chemicon).

Die hochsensitive Detektion von methylierter DNA hat der Medizin die Möglichkeit eröffnet, TumordNA in Körperflüssigkeiten nachzuweisen. Dieser viel versprechende Ansatz bietet die Chance, die Diagnostik in der Krebsfrüherkennung und Therapie wesentlich zu verbessern. In einer Reihe von Untersuchungen mit Körperflüssigkeiten wurde das Potenzial der DNA-Methylierungsanalyse aufgezeigt. Die HeavyMethyl-Realtime-PCR erwies sich als eine robuste und flexible Technologie, die die Anforderungen der modernen Diagnostik erfüllt. Der Septin9-HM-Assays, zur Detektion von Darmkrebszellen in Plasma, konnte mit Hilfe der Erfahrungen dieser Arbeit entwickelt und verbessert werden. Er kam in einer der umfangreichsten Studien zur Detektion von Darmkrebs mit Hilfe von Plasma-Proben zur Anwendung (Lofton-Day et al. 2006, Model et al. 2006). Die klinische Sensitivität des Tests lag zwischen 50 und 57 % bei einer Spezifität von 94 % in der Gruppe gesunder Probenaden. Dabei wurden frühe Formen des Krebses genauso gut detektiert wie Krebs im fortgeschrittenem Stadium. Der Test ist nicht invasive, denn es wird lediglich eine Blutabnahme erforderlich. Der Septin9-HM-Assay könnte also die Basis eines komfortablen und sicheren Tests in der Vorsorge gegen Darmkrebs bilden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abravaya K, Huff J, Marshall R, Merchant B, Mullen C, Schneider G und Robinson J (2003) Molecular beacons as diagnostic tools: technology and applications. *Clin Chem Lab Med*, 41 (4), 468-74.
- Adorjan P, Distler J, Lipscher E, Model F, Muller J, Pelet C, Braun A, Florl AR, Gutig D, Grabs G, Howe A, Kursar M, Lesche R, Leu E, Lewin A, Maier S, Muller V (2002) Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 30 (5), e21.
- Agius F, Kapoor A und Zhu J (2006) Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (31), 11796-801.
- An Q, Liu Y, Gao Y, Huang J, Fong X, Li L, Zhang D und Cheng S (2002) Detection of p16 hypermethylation in circulating plasma DNA of non-small cell lung cancer patients. *Cancer Lett*, 188 (1-2), 109-14.
- Antequera F und Bird A (1993) Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (24), 11995-9.
- Ashkenas J, Dennis JW und Ho CY (2005) Simple enzymatic means to neutralize DNA contamination in nucleic acid amplification. *Biotechniques*, 39 (1), 69-73.
- Baylin SB (2005) DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 2 Suppl 1 S4-11.
- Bedford MT und van Helden PD (1987) Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate. *Cancer Res*, 47 (20), 5274-6.
- Berlin K, Ballhause M und Cardon K (2005) Improved Bisulfite Conversion of DNA. *Patentanmeldung veröffentlicht*, WO2005038051.
- Bernardini S, Miano R, Iori R, Finazzi-Agro E, Palmieri G, Ballerini S, Angeloni C, Orlandi A, Bellincampi L, Cortese C und Federici G (2004) Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region of the GSTP1 gene in prostate cancer: a useful diagnostic and prognostic marker? *Clin Chim Acta*, 350 (1-2), 181-8.
- Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N und Szyf M (1999) A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature*, 397 (6720), 579-83.
- Bird AP und Southern EM (1978) Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA methylation: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. *J Mol Biol*, 118 (1), 27-47.
- Bock C, Paulsen M, Tierling S, Mikeska T, Lengauer T und Walter J (2006) CpG island methylation in human lymphocytes is highly correlated with DNA sequence, repeats, and predicted DNA structure. *PLoS Genet*, 2 (3), e26.
- Boyes J und Bird A (1992) Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *EMBO J*, 11 (1), 327-33.
- Bradbury J (2003) Human epigenome project - up and running. *PLoS Biol*, 1 (3), E82.
- Breslauer KJ, Frank R, Blocker H und Marky LA (1986) Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83 (11), 3746-50.
- Cairns P, Esteller M, Herman JG, Schoenberg M, Jeronimo C, Sanchez-Cespedes M, Chow NH, Grasso M, Wu L, Westra WB und Sidransky D (2001) Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res*, 7 (9), 2727-30.
- Chernukhin VA, Najakshina TN, Abdurashitov MA, Tomilova JE, Mezentzeva NV, Dedkov VS, Mikhnenkova NA, Gonchar DA und Degtyarev SK (2005) A novel restriction endonuclease Glal recognizes methylated sequence 5'-G(m5C)^GC-3'. *Biotechnologia (russ.)*, 4, 31-35.
- Chmuzh EV, Kashirina JG, Tomilova JE, Mezentzeva NV, Dedkov VS, Gonchar DA, Abdurashitov MA und Degtyarev SK (2005) Restriction endonuclease Bis I from *Bacillus subtilis* T30 recognizes methylated sequence 5'-G(m5C)?NGC-3'. *Biotechnologia (russ.)*, 3, 22-26.
- Chu D, Chuang C, Fu J, Huang H, Tseng C und Sun C (2002) The use of real-time quantitative polymerase chain reaction to detect hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking the GSTP1 gene to diagnose prostate carcinoma. *J Urol*, 167 (4), 1854-8.
- Church GM und Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (7), 1991-5.

- Clark SJ, Harrison J, Paul CL und Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res*, 22 (15), 2990-7.
- Colella S, Shen L, Baggerly KA, Issa JP und Krahe R (2003) Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques*, 35 (1), 146-50.
- Costello JF und Plass C (2001) Methylation matters. *J Med Genet*, 38 (5), 285-303.
- Cottrell S, Weiss G, Stamey T, Nolley R, Wheeler T, Ittmann M, Corman J, Odom E, Dahl K, Haefliger C und Sledziewski A (2006) Validation of methylation markers for prostate cancer prognosis in a cohort of 605 radical prostatectomy patients. *Poster auf der AACR-Konferenz*, (download unter [www.epigenomics.com](http://www.epigenomics.com)).
- Cottrell SE, Distler J, Goodman NS, Mooney SH, Kluth A, Olek A, Schwoppe I, Tetzner R, Ziebarth H und Berlin K (2004) A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res*, 32 (1), e10.
- Cross SH, Charlton JA, Nan X und Bird AP (1994) Purification of CpG islands using a methylated DNA binding column. *Nat Genet*, 6 (3), 236-44.
- Das R, Dimitrova N, Xuan Z, Rollins RA, Haghghi F, Edwards JR, Ju J, Bestor TH und Zhang MQ (2006) Computational prediction of methylation status in human genomic sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (28), 10713-6.
- DeChiara TM, Robertson EJ und Efstratiadis A (1991) Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64 (4), 849-59.
- Di Vinci A, Gelvi I, Banelli B, Casciano I, Allemanni G und Romani M (2006) Meth-DOP-PCR: an assay for the methylation profiling of trace amounts of DNA extracted from bodily fluids. *Lab Invest*, 86 (3), 297-303.
- Dunn BK, (2003) Hypomethylation: one side of a larger picture. *Ann N Y Acad Sci*. 983, 28-42.
- Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV und Laird PW (2000) MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res*, 28 (8), E32.
- Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, Long TI, Kurumboor SK, Bernstein L, Peters JH, DeMeester SR, DeMeester TR, Skinner KA und Laird PW (2001) Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Res*, 61 (8), 3410-8.
- Eggenchwiler J, Ludwig T, Fisher P, Leighton PA, Tilghman SM und Efstratiadis A (1997) Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith-Wiedemann and Simpson-Golabi-Behmel syndromes. *Genes Dev*, 11 (23), 3128-42.
- El-Maarri O, Herbiniaux U, Walter J und Oldenburg J (2002) A rapid, quantitative, non-radioactive bisulfite-SNUPe-IP RP HPLC assay for methylation analysis at specific CpG sites. *Nucleic Acids Res*, 30 (6), e25.
- Esteller M (2000) Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. *Eur J Cancer*, 36 (18), 2294-300.
- Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21 (35), 5427-40.
- Esteller M, Corn PG, Baylin SB und Herman JG (2001) A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, 61 (8), 3225-9.
- Esteller M, Corn PG, Urena JM, Gabrielson E, Baylin SB und Herman JG (1998) Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. *Cancer Res*, 58 (20), 4515-8.
- Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB und Herman JG (1999) Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res*, 59 (1), 67-70.
- Fackler MJ, McVeigh M, Mehrotra J, Blum MA, Lange J, Lapidus A, Garrett E, Argani P und Sukumar S (2004) Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res*, 64 (13), 4442-52.
- Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA und Jirtle RL (1999) Genomic imprinting: implications for human disease. *Am J Pathol*, 154 (3), 635-47.

- Fang F, Fan S, Zhang X und Zhang MQ (2006) Predicting methylation status of CpG islands in the human brain. *Bioinformatics*, 22 (18), 2204-9.
- Feinberg AP und Vogelstein B (1983) Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 301 (5895), 89-92.
- Feltus FA, Lee EK, Costello JF, Plass C und Vertino PM (2003) Predicting aberrant CpG island methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (21), 12253-8.
- Finney DJ (1977). *Probit analysis*. Cambridge [u.a.]: Cambridge Univ. Press.
- Fisher R (1936) The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems. *Annals of Eugenics*, 7 179-188.
- Flori AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ und Schulz WA (1999) DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *Br J Cancer*, 80 (9), 1312-21.
- Fraga M und Esteller M (2002) DNA methylation: a profile of methods and applications. *Biotechniques* JT - *Biotechniques*, 33 (3), 632, 634, 636-49.
- Fraga MF, Uriol E, Borja Diego L, Berdasco M, Esteller M, Canal MJ und Rodriguez R (2002) High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis*, 23 (11), 1677-81.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL und Paul CL (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (5), 1827-31.
- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW und Ehrlich M (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Res*, 11 (19), 6883-94.
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H und Jaenisch R (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 300 (5618), 489-92.
- Goessl C, Krause H, Muller M, Heicappell R, Schrader M, Sachsinger J und Miller K (2000) Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res*, 60 (21), 5941-5.
- Goessl C, Muller M, Heicappell R, Krause H und Miller K (2001) DNA-based detection of prostate cancer in blood, urine, and ejaculates. *Ann N Y Acad Sci*, 945 51-8.
- Gonzalzo ML, Liang G, Spruck CH, Zingg JM, Rideout WM und Jones PA (1997) Identification and characterization of differentially methylated regions of genomic DNA by methylation-sensitive arbitrarily primed PCR. *Cancer Res*, 57 (4), 594-9.
- Gonzalzo ML, Pavlovich CP, Lee SM und Nelson WG (2003) Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clin Cancer Res*, 9 (7), 2673-7.
- Grady WM, Willis J, Guilford PJ, Dunbier AK, Toro TT, Lynch H, Wiesner G, Ferguson K, Eng C, Park JG, Kim SJ und Markowitz S (2000) Methylation of the CDH1 promoter as the second genetic hit in hereditary diffuse gastric cancer. *Nat Genet*, 26 (1), 16-7.
- Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T und Thun M (2001) Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin*, 51 (1), 15-36.
- Grunau C, Clark SJ und Rosenthal A (2001) Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters. *Nucleic Acids Res*, 29 (13), E65-5.
- Gsur A, Haidinger G, Hinteregger S, Bernhofer G, Schatzl G, Madersbacher S, Marberger M, Vutuc C und Micksche M (2001) Polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTP1, GSTM1 and GSTT1) and prostate-cancer risk. *Int J Cancer*, 95 (3), 152-5.
- Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J und Surani MA (2002) Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*, 117 (1-2), 15-23.
- Harden SV, Guo Z, Epstein JI und Sidransky D (2003) Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol*, 169 (3), 1138-42.
- Herman JG (1999) Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer. *Semin Cancer Biol*, 9 (5), 359-67.

- Herman JG und Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349 (21), 2042-54.
- Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD und Baylin SB (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93 (18), 9821-6.
- Holdenrieder S, Stieber P, Chan LYS, Geiger S, Kremer A, Nagel D und Lo YMD (2005) Cell-free DNA in serum and plasma: comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem*, 51 (8), 1544-6.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R und Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (16), 7276-80.
- Holliday R (1979) A new theory of carcinogenesis. *Br J Cancer*, 40 (4), 513-22.
- Holliday R und Grigg GW (1993) DNA methylation and mutation. *Mutat Res*, 285 (1), 61-7.
- Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Chatterjee A, Rosenbaum E, Van Criekinge W, Westra WH, Schoenberg M, Zahurak M, Goodman SN und Sidransky D (2006a) Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J Natl Cancer Inst*, 98 (14), 996-1004.
- Hoque MO, Feng Q, Toure P, Dem A, Critchlow CW, Hawes SE, Wood T, Jeronimo C, Rosenbaum E, Stern J, Yu M, Trink B, Kiviat NB und Sidransky D (2006b) Detection of aberrant methylation of four genes in plasma DNA for the detection of breast cancer. *J Clin Oncol*, 24 (26), 4262-9.
- Huang TH, Perry MR und Laux DE (1999) Methylation profiling of CpG islands in human breast cancer cells. *Hum Mol Genet*, 8 (3), 459-70.
- Ikoma H, Ichikawa D, Koike H, Ikoma D, Tani N, Okamoto K, Ochiai T, Ueda Y, Otsuji E und Yamagishi H (2006) Correlation between serum DNA methylation and prognosis in gastric cancer patients. *Anticancer Res*, 26 (3B), 2313-6.
- Isaacs WB, Bova GS, Morton RA, Bussemakers MJ, Brooks JD und Ewing CM (1994) Genetic alterations in prostate cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 59 653-9.
- Jablonka E und Lamb MJ (2002) The changing concept of epigenetics. *Ann N Y Acad Sci*, 981 82-96.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD und Knippers R (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 61 (4), 1659-65.
- Jeltsch A (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBiochem*, 3 (4), 274-93.
- Jemal A, Kulldorff M, Devesa SS, Hayes RB und Fraumeni JFJ (2002) A geographic analysis of prostate cancer mortality in the United States, 1970-89. *Int J Cancer*, 101 (2), 168-74.
- Jenuwein T und Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science*, 293 (5532), 1074-80.
- Jeronimo C, Henrique R, Hoque MO, Mambo E, Ribeiro FR, Varzim G, Oliveira J, Teixeira MR, Lopes C und Sidransky D (2004) A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 10 (24), 8472-8.
- Jeronimo C, Usadel H, Henrique R, Silva C, Oliveira J, Lopes C und Sidransky D (2002) Quantitative GSTP1 hypermethylation in bodily fluids of patients with prostate cancer. *Urology*, 60 (6), 1131-5.
- Jones P und Laird P (1999) Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* *JT - Nature genetics*, 21 (2), 163-7.
- Jones PA und Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 3 (6), 415-28.
- Kapoor A, Agius F und Zhu J (2005) Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett*, 579 (26), 5889-98.
- Karpf AR und Jones DA (2002) Reactivating the expression of methylation silenced genes in human cancer. *Oncogene*, 21 (35), 5496-503.
- Kluth A, Schuster M, Schmitt A, Habighorst D und Guetig D (2006) Method of quantifying methylated DNA. *Patentanmeldung veröffentlicht*, EP1655377.

- Knudson AG (2000) Chasing the cancer demon. *Annu Rev Genet*, 34 1-19.
- Kudo S (1998) Methyl-CpG-binding protein MeCP2 represses Sp1-activated transcription of the human leuko-sialin gene when the promoter is methylated. *Mol Cell Biol*, 18 (9), 5492-9.
- Kuo KC, McCune RA, Gehrke CW, Midgett R und Ehrlich M (1980) Quantitative reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of major and modified deoxyribonucleosides in DNA. *Nucleic Acids Res*, 8 (20), 4763-76.
- Kurukuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenkov V, Reik W und Ohlsson R (2006) CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (28), 10684-9.
- Laird P (2003 Apr) The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* - *Nature reviews. Cancer*, 3 (4), 253-66.
- Lay MJ und Wittwer CT (1997) Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem*, 43 (12), 2262-7.
- Lee WH, Isaacs WB, Bova GS und Nelson WG (1997) CG island methylation changes near the GSTP1 gene in prostatic carcinoma cells detected using the polymerase chain reaction: a new prostate cancer biomarker. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 6 (6), 443-50.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM und Yaros MJ (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, 37 (3), 646-50.
- Lewin J, Schmitt AO, Adorjan P, Hildmann T und Piepenbrock C (2004) Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics*, 20 (17), 3005-12.
- Lewin J., Tetzner R., A method for methylation analysis of nucleic acid. *Patentanmeldung*. Voraussichtliche Veröffentlichung August 2007, EP 06 090 132.9.
- Lind K, Stahlberg A, Zoric N und Kubista M (2006) Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *Biotechniques*, 40 (3), 315-9.
- Liotta L und Petricoin E (2000) Molecular profiling of human cancer. *Nat Rev Genet*, 1 (1), 48-56.
- Listowsky I, Abramovitz M, Homma H und Niitsu Y (1988) Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases. *Drug Metab Rev*, 19 (3-4), 305-18.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W und Deetz K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl*, 4 (6), 357-62.
- Lo YM, Wong IH, Zhang J, Tein MS, Ng MH und Hjelm NM (1999) Quantitative analysis of aberrant p16 methylation using real-time quantitative methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 59 (16), 3899-903.
- Lofton-Day C, Model F, Tetzner R, DeVos T, Schuster M, Lesche R, Sledziewski A und Day R (2006) A Real-Time PCR Test for Septin 9 Gene Methylation Identifies Early Stage Colorectal Cancer in Plasma. *Poster auf der AACR-Konferenz*, (download unter [www.epigenomics.com](http://www.epigenomics.com)).
- Lopez-Serra L, Ballestar E, Fraga MF, Alaminos M, Setien F und Esteller M (2006) A Profile of Methyl-CpG Binding Domain Protein Occupancy of Hypermethylated Promoter CpG Islands of Tumor Suppressor Genes in Human Cancer. *Cancer Res*, 66 (17), 8342-6.
- Martens J, Maier S, Schwöpe I, Koenig T, Hartmann O, Kluth A, Look M, Harbeck N, Model F, Bolt-de Vries J, Sieuwerts A, Portengen H, Meijer-Van Gelder M, Klijn J, Schmitt M, Foekeler J und Nimmrich I (2005) DNA-hypermethylation of PITX2 and risk of cancer recurrence in lymph node-negative hormone receptor-positive breast cancer patients. *Poster auf der AACR-Konferenz*, (download möglich unter [www.epigenomics.com](http://www.epigenomics.com)).
- Mayer W, Niveleau A, Walter J, Fundele R und Haaf T (2000) Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature*, 403 (6769), 501-2.
- Millar DS, Ow KK, Paul CL, Russell PJ, Molloy PL und Clark SJ (1999) Detailed methylation analysis of the glutathione S-transferase pi (GSTP1) gene in prostate cancer. *Oncogene*, 18 (6), 1313-24.

- Millar DS, Paul CL, Molloy PL und Clark SJ (2000) A distinct sequence (ATAAA)<sub>n</sub> separates methylated and unmethylated domains at the 5'-end of the GSTP1 CpG island. *J Biol Chem*, 275 (32), 24893-9.
- Model F, Ebert M, deVos T, Tetzner R, Schuster M, Lesche R, Sledziewski A, Day RW und Lofton-Day C (2006) Detection of Methylated DNA in Plasma from Colorectal Cancer Patients and Controls by Real-Time PCR Analysis of Septin 9. Posterpräsentation auf der AACR-Konferenz, (download unter [www.epigenomics.com](http://www.epigenomics.com)).
- Momparler RL (2003) Cancer epigenetics. *Oncogene*, 22 (42), 6479-83.
- Morison IM und Reeve AE (1998) A catalogue of imprinted genes and parent-of-origin effects in humans and animals. *Hum Mol Genet*, 7 (10), 1599-609.
- Muller HM, Widschwendter A, Fiegl H, Ivarsson L, Goebel G, Perkmann E, Marth C und Widschwendter M (2003) DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker. *Cancer Res*, 63 (22), 7641-5.
- Murrell A, Heeson S und Reik W (2004) Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. *Nat Genet*, 36 (8), 889-93.
- Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T und Hirohashi S (2005) DNA hypomethylation on pericentromeric satellite regions significantly correlates with loss of heterozygosity on chromosome 9 in urothelial carcinomas. *J Urol*, 173 (1), 243-6.
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN und Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393 (6683), 386-9.
- Neumann M (2004). *Optimization of a real-time PCR assay for the sensitive detection of DNA methylation in the human genome*. Diplomarbeit an der Fachhochschule Mannheim, Deutschland.
- Nicholls RD (2000) The impact of genomic imprinting for neurobehavioral and developmental disorders. *J Clin Invest*, 105 (4), 413-8.
- Nuovo GJ, Hohman RJ, Nardone GA und Nazarenko IA (1999) In situ amplification using universal energy transfer-labeled primers. *J Histochem Cytochem*, 47 (3), 273-80.
- Oakeley E (1999 Dec) DNA methylation analysis: a review of current methodologies. *Pharmacol TherJT - Pharmacology & therapeutics*, 84 (3), 389-400.
- Oakeley EJ, Podesta A und Jost JP (1997) Developmental changes in DNA methylation of the two tobacco pollen nuclei during maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (21), 11721-5.
- Okano M, Bell DW, Haber DA und Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99 (3), 247-57.
- Olek A, Oswald J und Walter J (1996) A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res*, 24 (24), 5064-6.
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W und Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol*, 10 (8), 475-8.
- Plass C (2002) Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet*, 11 (20), 2479-88.
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD und Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*, 274 (46), 33002-10.
- Pruvost M, Grange T und Geigl E (2005) Minimizing DNA contamination by using UNG-coupled quantitative real-time PCR on degraded DNA samples: application to ancient DNA studies. *Biotechniques*, 38 (4), 569-75.
- Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, Ingles SA, Sherrod A, Warren R, Tsao-Wei D, Groshen S und Lenz HJ (2001) Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J*, 1 (1), 65-70.
- Rand K, Qu W, Ho T, Clark SJ und Molloy P (2002) Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives. *Methods*, 27 (2), 114-20.
- Rand KN, Ho T, Qu W, Mitchell SM, White R, Clark SJ und Molloy PL (2005) Headloop suppression PCR and its application to selective amplification of methylated DNA sequences. *Nucleic Acids Res*, 33 (14), e127.

- Reik W, Dean W und Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, 293 (5532), 1089-93.
- Rodriguez J, Frigola J, Vendrell E, Risques R, Fraga MF, Morales C, Moreno V, Esteller M, Capella G, Ribas M und Peinado MA (2006) Chromosomal Instability Correlates with Genome-wide DNA Demethylation in Human Primary Colorectal Cancers. *Cancer Res*, 66 (17), 8462-9468.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, Nawroz-Danish H, Yoo GH, Koch WM, Jen J, Herman JG und Sidransky D (2000) Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. *Cancer Res*, 60 (4), 892-5.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74 (12), 5463-7.
- Saramaki OR, Porkka KP, Vessella RL und Visakorpi T (2006) Genetic aberrations in prostate cancer by microarray analysis. *Int J Cancer*, 119 (6), 1322-9.
- Schatz P, Dietrich D und Schuster M (2004) Rapid analysis of CpG methylation patterns using RNase T1 cleavage and MALDI-TOF. *Nucleic Acids Res*, 32 (21), e167.
- Schmitt F, Oakeley EJ und Jost JP (1997) Antibiotics induce genome-wide hypermethylation in cultured *Nicotiana tabacum* plants. *J Biol Chem*, 272 (3), 1534-40.
- Schumacher A und Petronis A (2006) Epigenetics of complex diseases: from general theory to laboratory experiments. *Curr Top Microbiol Immunol*, 310 81-115.
- Schumacher A, Kapranov P, Kaminsky Z, Flanagan J, Assadzadeh A, Yau P, Virtanen C, Winegarten N, Cheng J, Gingeras T und Petronis A (2006) Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. *Nucleic Acids Res*, 34 (2), 528-42.
- Schütz E und von Ahsen N (1999) Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *Biotechniques*, 27 (6), 1218-1124.
- Shaw RJ, Akufo-Tetteh EK, Risk JM, Field JK und Liloglou T (2006) Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing. *Nucleic Acids Res*, 34 (11), e78.
- Singal R und Ginder GD (1999) DNA methylation. *Blood*, 93 (12), 4059-70.
- Singer-Sam J, LeBon JM, Tanguay RL und Riggs AD (1990) A quantitative HpaII-PCR assay to measure methylation of DNA from a small number of cells. *Nucleic Acids Res*, 18 (3), 687.
- Smiraglia DJ, Fruhwald MC, Costello JF, McCormick SP, Dai Z, Peltomaki P, O'Dorisio MS, Cavenee WK und Plass C (1999) A new tool for the rapid cloning of amplified and hypermethylated human DNA sequences from restriction landmark genome scanning gels. *Genomics*, 58 (3), 254-62.
- Stach D, Schmitz OJ, Stilgenbauer S, Benner A, Dohner H, Wiessler M und Lyko F (2003) Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Res*, 31 (2), E2.
- Sugimoto N, Nakano S, Yoneyama M und Honda K (1996) Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Res*, 24 (22), 4501-5.
- Sun FL, Dean WL, Kelsey G, Allen ND und Reik W (1997) Transactivation of Igf2 in a mouse model of Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature*, 389 (6653), 809-15.
- Suter CM, Martin DI und Ward RL (2004) Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. *Int J Colorectal Dis*, 19 (2), 95-101.
- Swift-Scanlan T, Blackford A, Argani P, Sukumar S und Fackler MJ (2006) Two-color quantitative multiplex methylation-specific PCR. *Biotechniques*, 40 (2), 210-9.
- Tchou JC, Lin X, Freije D, Isaacs WB, Brooks JD, Rashid A, De Marzo AM, Kanai Y, Hirohashi S und Nelson WG (2000) GSTP1 CpG island DNA hypermethylation in hepatocellular carcinomas. *Int J Oncol*, 16 (4), 663-76.
- Tetzner R und Distler J (2005) Method for detection of cytosine methylations in DNA. *Patentanmeldung veröffentlicht*, WO2005024056.

- Tost J, Schatz P, Schuster M, Berlin K und Gut IG (2003) Analysis and accurate quantification of CpG methylation by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*, 31 (9), e50.
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB und Issa JP (1999) Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res*, 59 (10), 2307-12.
- Tryndyak V, Kovalchuk O und Pogribny IP (2006) Identification of differentially methylated sites within unmethylated DNA domains in normal and cancer cells. *Anal Biochem*, 356 (2), 202-7.
- Tsuda H, Takarabe T, Kanai Y, Fukutomi T und Hirohashi S (2002) Correlation of DNA hypomethylation at pericentromeric heterochromatin regions of chromosomes 16 and 1 with histological features and chromosomal abnormalities of human breast carcinomas. *Am J Pathol*, 161 (3), 859-66.
- Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H und Nurnberg P (2002) Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis*, 23 (24), 4072-9.
- Vairapandi M, Liebermann DA, Hoffman B und Duker NJ (2000) Human DNA-demethylating activity: a glycosylase associated with RNA and PCNA. *J Cell Biochem*, 79 (2), 249-60.
- Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C und Stroun M (1994) Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*, 86 (4), 774-9.
- Verma M und Srivastava S (2002) Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol*, 3 (12), 755-63.
- Walter J und Paulsen M (2003) Imprinting and disease. *Semin Cell Dev Biol*, 14 (1), 101-10.
- Wei SH, Chen C, Strathdee G, Harnsomburana J, Shyu C, Rahmatpanah F, Shi H, Ng S, Yan PS, Nephew KP, Brown R und Huang TH (2002) Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. *Clin Cancer Res*, 8 (7), 2246-52.
- Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C, Fiala E, Ehrlich M und Laird PW (2005) Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res*, 33 (21), 6823-36.
- Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T und Little S (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nat Biotechnol*, 17 (8), 804-7.
- Widschwendter A, Muller HM, Fiegl H, Ivarsson L, Wiedemair A, Muller-Holzner E, Goebel G, Marth C und Widschwendter M (2004) DNA methylation in serum and tumors of cervical cancer patients. *Clin Cancer Res*, 10 (2), 565-71.
- Widschwendter M und Jones PA (2002) The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. Commentary re: J. Kwong et al., Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 8: 131-137, 2002, and H-Z. Zou et al., *Clin Cancer Res*, 8 (1), 17-21.
- Wolffe AP, Jones PL und Wade PA (1999) DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96 (11), 5894-6.
- Wong IHN und Lo YMD (2002) New markers for cancer detection. *Curr Oncol Rep*, 4 (6), 471-7.
- Xiong Z und Laird PW (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*, 25 (12), 2532-4.
- Yano T, Ito F, Kobayashi K, Yonezawa Y, Suzuki K, Asano R, Hagiwara K, Nakazawa H, Toma H und Yamasaki H (2004) Hypermethylation of the CpG island of connexin 32, a candidate tumor suppressor gene in renal cell carcinomas from hemodialysis patients. *Cancer Lett*, 208 (2), 137-42.
- Yebra MJ und Bhagwat AS (1995) A cytosine methyltransferase converts 5-methylcytosine in DNA to thymine. *Biochemistry*, 34 (45), 14752-7.
- Yegnasubramanian S, Kowalski J, Gonzalgo ML, Zahurak M, Piantadosi S, Walsh PC, Bova GS, De Marzo AM, Isaacs WB und Nelson WG (2004) Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer. *Cancer Res*, 64 (6), 1975-86.

- Zeschnigk M, Bohringer S, Price EA, Onadim Z, Masshofer L und Lohmann DR (2004) A novel real-time PCR assay for quantitative analysis of methylated alleles (QAMA): analysis of the retinoblastoma locus. *Nucleic Acids Res*, 32 (16), e125.
- Zucker SD, Goessling W, Ransil BJ und Gollan JL (1995) Influence of glutathione S-transferase B (ligandin) on the intermembrane transfer of bilirubin. Implications for the intracellular transport of nonsubstrate ligands in hepatocytes. *J Clin Invest*, 96 (4), 1927-35.

## 7 Anhang

### 7.1 Geräte

Analysen Waage, Explorer	OHAUS Corporation, New Jersey, USA
ABI 7900 Real Time PCR Instrument	Applied Biosystems, Foster City, USA
CCD Gel Cam S/W	PHASE GmbH, Lübeck, Deutschland
Centrifuge MiniSpin	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Köln, Deutschland
Centrifuge 5810 R und 5417 R	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Köln, Deutschland
Gelelektrophorese-Kammern	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland
LightCycler instrument 1.2	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
LightCycler instrument 2.0	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Magnetrührer RH basic	IKA, Wilmington, USA
Minishaker MS2	IKA, Wilmington, USA
pH-Meter	
Photometer UV Mini 1240	SHIMADZU Corporation, Kyoto, Japan
Referenz-Pipetten	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Köln, Deutschland
Spannungsgeber (Gelelektrophorese)	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf, Deutschland
Spektrophotometer Naondrop ND-1000	Nanodrop Technologies, Wilmington, USA
Thermomixer 5355 Comfort	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Köln, Deutschland
Thermocycler Mastercycler® gradient	Eppendorf-Nethler-Hinz GmbH, Köln, Deutschland
Waage BL 600	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waterbath 1002	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland

### 7.2 Chemikalien

Agarose	Eurogentec, Köln, Deutschland
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Dioxan	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Hydrochinon	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethyl- chroman-2-Carboxyl-Säure	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumsulfit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumbisulfit	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SYBR-Green I	Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA (now part of Invitrogen Corp. Carlsbad CA, USA)
Tris, Trishydroxymethylaminomethane	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Wasser, steril, gefiltert 0,2 µm, behandelt	DEPC Fluka GmbH, Buchs, Deutschland
Wasser, steril, nicht DEPC behandelt	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland

### 7.3 Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland bezogen.

TBE-Puffer (pH 8,0-8,3)	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA
TE-Puffer (pH 8,0-8,3)	10 mM Tris, 1 mM EDTA
modifizierter TE-Puffer (pH 8,0 - 8,3)	10 mM Tris, 0,1 mM EDTA
Ladepuffer	3 mM Bromphenolblau, 23 % Glycerin
Bisulfit-Lösung	5,89 mol/l, pH 5,5
Dioxan mit Radikalfänger	98,6 mg 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxyl-Säure wurden in 2,5 ml Dioxan gelöst.

### 7.4 Enzyme und molekularbiologische Reagenzien

<i>A</i> lul, Type II restriction enzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Basenleiter, 100bp DNA ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
<i>Bsh</i> 1236I, Type II restriction enzyme	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
DNA, genomische DNA aus Mäusen (whole blood, Wildtyp=BL6)	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
DNA, humane genomische DNA aus peripherem Blut	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
GenomiPhi - Whole Genome Amplification Kit	Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA
<i>G</i> sul, Type II restriction enzyme	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
<i>Hea</i> III, Type II restriction enzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<i>Hpy</i> CH4V, Type II restriction enzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
HotStarTaq DNA Polymerase	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
<i>Hpa</i> II, Type II restriction enzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
LightCycler ® FastStart DNA Master HybProbe	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
MagNA Pure Compact Nucleic Acid Kit	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
methyated DNA, CpGenome Universal Methylated DNA (human)	Chemicon International Inc, Temecula, USA (now part of Millipore)
Microcon Centrifugal Filter Units YM30	Millipore Corp., Billerica, USA
<i>Mse</i> I, Type II restriction enzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<i>Mss</i> 1, Restriktionsenzym	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
<i>M.Hpa</i> II, Type II methyltransferase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
poly-A, Polyadenylic acid potassium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
SAM, S-Adenosyl-Methionin	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
<i>Ssi</i> I, Type II restriction enzyme	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
<i>Sssl</i> (CpG) Methylase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
SYBR Green I, Nucleic Acid Stain	Molecular Probes, Eugene, USA
UNG, Uracil-N-DNA-Glycosylase	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland

## 7.5 Gene mit genetischem Imprinting

**Tabelle 17:** Liste der Gene mit bekanntem Imprinting-Status in Mensch und Maus.\*

Mensch				Maus			
Lokation	Genname	Imprint-status	Expri-miertes Allel	Lokation	Genname	Imprint-status	Expri-miertes Allel
1p36	TP73	I	M	4E2	Trp73	NR	
1p31	DIRAS3	I	P	4E2		NO	P
2p15	COMMD1	NI	M	11A3	Commd1	I	M
2p15		NO	P	11A3	U2af1-rs1	I	P
4q13		NO	P	5E1	Mkrn1-ps1	I	P
4q22	NAP1L5	NR		6C1	Nap1l5	I	P
6q24	HYMAI	I	P	10A1	Hymai	NR	
6q24	PLAGL1	I	P	10A1	Plagl1	I	P
6q25	IGF2R	NI	M	17A1	Igf2r	I	M
6q25		NO	P	17A1	Air	I	P
6q25	SLC22A2	NR		17A1	Slc22a2	I	M
6q25	SLC22A3	NR		17A1	Slc22a3	I	M
7p12	GRB10	I	P/M c	11A1	Grb10	I	P/M c
7q21	CALCR	PD	M	6A1	Calcr	I	M
7q21	SGCE	I	P	6A1	Sgce	I	P
7q21	PEG10	I	P	6A1	Peg10	I	P
7q21	PPP1R9A	I	M	6A1	Ppp1r9a	I	M
7q21	PON1	PD	P	6A1	Pon1	NI	P
7q21	PON3	NR		6A1	Pon3	PD	M
7q21	PON2	NR		6A1	Pon2	PD	M
7q21	ASB4	NR		6A1	Asb4	I	M
7q21	DLX5	I	M	6A1	Dlx5	I	M
7q32	CPA4	I	M	6A3	Cpa4	NR	
7q32	MEST	I	P	6A3	Mest	I	P
7q32	MESTIT1	I	P	6A3		NO	P
7q32	COPG2IT1	I	P	6A3	Copgas2	I	P
7q32	COPG2	CD	P d	6A3	Copg2	I	M d
8q24		NO	P	15D3	Peg13	I	P
10q22	STOX1	PD	M	10B4		NR	
10q22	CTNNA3	PD	M	10B4	Catna3	NR	
10q25		NO	P	19D2	Ins1	CD	P
10q26	INPP5F	NR		7F3	Inpp5f/V2 isoform	I	P
11p15	H19	I	M	7F5	H19	I	M
11p15	IGF2	I	P	7F5	Igf2	I	P
11p15	IGF2AS	I	P	7F5	Igf2as	I	P
11p15	INS	I	P	7F5	Ins2	I	P
11p15	ASCL2	CD	M	7F5	Ascl2	I	M
11p15	PHEMX	NI	M	7F5	Phemx	I	M
11p15	CD81	NI	M	7F5	Cd81	I	M
11p15	TSSC4	NI	M	7F5	Tssc4	I	M
11p15	TRPM5	PD	P	7F5	Trpm5	NI	P
11p15	KCNQ1	I	M	7F5	Kcnq1	I	M
11p15	KCNQ1OT1	I	P	7F5	Kcnq1ot1	I	P
11p15	KCNQ1DN	I	M	7F5		NO	M
11p15	CDKN1C	I	M	7F5	Cdkn1c	I	M
11p15	SLC22A1LS	PD	M	7F5		NO	M

Mensch				Maus			
Lokation	Genname	Imprint-status	Expri-miertes Allel	Lokation	Genname	Imprint-status	Expri-miertes Allel
11p15		NO	M	7F5	Msuit1	I	M
11p15	SLC22A18	I	M	7F5	Slc22a18	I	M
11p15	PHLDA2	I	M	7F5	Phlda2	I	M
11p15	NAP1L4	NR		7F5	Nap1l4	I	M
11p15		NO	M	7F5	Tnfrsf23	I	M
11p15	OSBPL5	I	M	7F5	Osbp15	I	M
11p15	ZNF215	PD	M	7F5		NO	M
11p13	WT1	I	P	2E	Wt1	NR	
11p13	WT1AS	I	P	2E	Wt1as	NR	
11q23	SDHD	CD	P	9A5	Sdhd	NR	
12q13	SLC38A4	NR		15F1	Slc38a4	I	P
12q21	DCN	NR		10C3	Dcn	I	M
13q14	HTR2A	CD	M	14D2	Htr2a	I	M
14q32	DLK1	I	P	12F1	Dlk1	I	P
14q32	MEG3	I	M	12F1	Gtl2	I	M
14q32	miR-337	NR		12F1		I	M
14q32	LOC388015	NR		12F1	Rtl1	I	P
14q32	Anti-PEG11	NR		12F1	anti-Rtl1	I	M
14q32		NR		12F1	miR-431	I	M
14q32		NR		12F1	miR-433	PD	M
14q32		NR		12F1	miR-127	I	M
14q32		NR		12F1	miR-434	PD	M
14q32		NR		12F1	miR-432	PD	M
14q32		NR		12F1	miR-136	I	M
14q32	MEG8	NR		12F1	Rian	I	M
14q32		NR		12F1	miR-370	I	M
14q32		NO		12F1	MBII-78	I	M
14q32		NO		12F1	MBII-19	I	M
14q32		NR		12F1	MBII-48	I	M
14q32		NO		12F1	MBII-49	I	M
14q32		NO		12F1	MBII-426	I	M
14q32		NR		12F1	MBII-343	I	M
14q32		NR		12F1	Mirg	I	M
14q32		NR		12F1	miR-411	I	M
14q32		NR		12F1	miR-380	I	M
14q32		NR		12F1	miR-376b	I	M
14q32		NR		12F1	miR-376	I	M
14q32		NR		12F1	miR-134	I	M
14q32		NR		12F1	miR-154	I	M
14q32		NR		12F1	miR-410	I	M
14q32	DIO3	NR		12F1	Dio3	I	P
15q11-12		NO		7B5	Peg12	I	P
15q11-12	MKRN3	I	P	7B5	Mkrm3	I	P
15q11-12	ZNF127AS	NR		7B5	Zfp127as	I	P
15q11-12	MAGEL2	I	P	7B5	Magel2	I	P
15q11-12	NDN	I	P	7B5	Ndn	I	P
15q11-12		NR		7B5	AK014392	PD	P
15q11-12		NR		7B5	Pec2	I	P
15q11-12		NR		7B5	Pec3	I	P

Mensch				Maus			
Lokation	Genname	Imprint-status	Expri-miertes Allel	Lokation	Genname	Imprint-status	Expri-miertes Allel
15q11-12		NR		7B5	Nccr	I	P
15q11-12	SNURF	I	P	7B5	Snurf	I	P
15q11-12	SNRPN	I	P	7B5	Snrpn	I	P
15q11-12	HBII-436	I	P	7B5	HBII-436	I	P
15q11-12	HBII-13	I	P	7B5	HBII-13	I	P
15q11-12	HBII-437	I	P	7B5		NO	P
15q11-12	HBII-438A	I	P	7B5		NO	P
15q11-12	PWCR1	I	P	7B5	Pwcr1	I	P
15q11-12	HBII-52	I	P	7B5	HBII-52	I	P
15q11-12	HBII-438B	I	P	7B5		NO	P
15q11-12	UBE3A-AS	I	P	7B5		I	P
15q11-12	UBE3A	I	M	7B5	Ube3a	I	M
15q11-12	ATP10A	I	M	7B5	Atp10a	CD	M
15q11-12	GABRB3	CD	P	7B5	Gabrb3	NI	P
15q11-12	GABRA5	CD	P	7B5	Gabra5	NI	P
15q11-12	GABRG3	CD	P	7B5	Gabrg3	NI	P
15q21	GATM	NR		2E5	Gatm	I	M
15q24		NO	P	9E3	4930524O08Rik	I	P
15q24	RASGRF1	NR		9E3	Rasgrf1	I	P
18q11	IMPACT	NI	P	18A2-B2	Impact	I	P
18q21	TCEB3C	I	M	18A2-B2		NO	M
19q13	IMP01/ITUP1	I	P	7A2-B1		NR	
19q13	PEG3	I	P	7A2-B1	Peg3	I	P
19q13		NO	M	7A2-B1	Zim1	I	M
19q13	ZIM2	I	P d	7A2-B1	Zim2	I	M d
19q13	USP29	NR		7A2-B1	Usp29	I	P
19q13	ZIM3	NR		7A2-B1	Zim3	I	M
19q13	ZNF264	NR		7A2-B1	Zfp264	I	P
20q11	NNAT	I	P	2H1	Nnat	I	P
20q13	L3MBTL	I	P	2H3	L3mbtl	NI	P
20q13	GNAS/NESP55	I	M	2E1-H3	Gnas/Nesp	I	M
20q13	GNASXL	I	P	2E1-H3	GnasXL	I	P
20q13	Exon-1A	I	P	2E1-H3	Exon-1a	I	P
20q13	GS-alpha	I	M	2E1-H3	GS-alpha	I	M
20q13	SANG	I	P	2E1-H3	Nespas	I	P
(XA7)		NO	M	2E1-H3	Xlr3b	I	M
(XA7)		NO	M	2E1-H3	Xlr4b	I	M
(XA7)		NO	M	2E1-H3	Xlr4c	I	M
Xq13	XIST	NI	P	XD	Xist	I	P
Xq13	TSIX	NI	M	XD	Tsix	I	M

\*) nach Morison 2005

Erläuterungen:

AS: Antisense Transkript; miRNA: microRNA; misc RNA: RNA mit unbekannter Funktion; CD: widersprüchliche Daten; I: imprinted Gen; NI: Gen ist nicht imprinted; NO: keine orthologe Sequenz; NR: unbekannter Imprinting-Status; M: Imprint des weiblichen Allels; P: Imprint des männlichen Allels; PD: vorläufige Daten; <sup>b)</sup> betrifft nur nicht codierende RNAs; <sup>c)</sup> Imprinting-Status ist isoform-abhängig; <sup>d)</sup> ZIM2 and COPG2 wurden veröffentlicht als Gene mit gegensätzlichem Imprinting-Status in Mensch und Maus.

## 7.6 Abkürzungsverzeichnis

AUC	Area under the ROC-curve
Bisulfit-DNA	mit Natriumbisulfit behandelte und desulfonierte DNA
BL6	Wildtyp-Mausstamm, auch C57/BL6
BPH	Benign prostatic hyperplasia
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
CpG	5'-CG-Dinukleotid; möglicher Ort des Auftretens von Methylcytosin
CT	Cycle treshold, auch crossing point (CP)
CI	confidence interval, 95 % Konfidenzintervall
DMH	Differential methylation hybridization
DMR	Differential methylated region; in Regionen mit mehreren DMR werden diese numeriert.
DNA	Desoxyribonucleic Acid
Dnmt3	Human DNA (cytosine-5) Methyltransferase 3
dpc	days post coitum; Maßeinheit für den Zeitraum ab Zeugung des Embryos in Tagen
FAM	Fluoreszenz-Farbstoff für die Realtime-PCR mit Extinktionsmaximum bei 520 nm
FI	Fluoreszenz-Intensität
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GSTp1	Glutathione S-transferase p1
HEX	Fluoreszenz-Farbstoff für die Realtime-PCR mit Extinktionsmaximum bei 556 nm
HM-Assay	HeavyMethyl-Assay
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HQM-Assay	HeavyQuantitativeMethylation-Assay
LCred640	5'-LightCycler® Red 640 Fluoreszenz-Farbstoff mit Extinktionsmaximum bei 640 nm
LCred705	5'-LightCycler® Red 705 Fluoreszenz-Farbstoff mit Extinktionsmaximum bei 705 nm
LCfluor	3'-Fluorescein Fluoreszenz-Farbstoff mit Extinktionsmaximum bei 520 nm
LOD50	Limit of Detection 50, Menge DNA, die mit der Wahrscheinlichkeit von 50 % detektiert wird
LOD90	Limit of Detection 90, Menge DNA, die mit der Wahrscheinlichkeit von 90 % detektiert wird
MDA	Multiple displacement amplification; genomweite Amplifikation von DNA mit Hilfe der phi29 DNA Polymerase
MDA-DNA	siehe phi29-DNA
MeltCalc	Programm zur Berechnung der Schmelztemperaturen von Oligonukleotiden
MSP	Methylation specific PCR
PBL-DNA	Peripheral blood lymphocytes DNA
PCR	Polymerase chain reaction
PGC	Primordial germ cell; primordiale Keimzelle oder auch Urkeimzelle.
phi29-DNA	DNA, hergestellt durch genomweite Amplifikation mit Hilfe der phi29-DNA-Polymerase
PMR	Percentage methylatio ratio
PTGER4	Prostaglandin E Rezeptor 4
P16	Tumor suppressor gene p16 (CDKN2A)
P53	Tumor suppressor gene p53
QM-Assay	QuantitativeMethylation-Assay
ROC-Kurve	Receiver Operating Characteristic curve
SafeBis DNA	bisulfit-konvertierte, nicht desulfonierte DNA zur Anwendung der PCR-Kontaminationskontrolle mit UNG

---

SD7	Labor-Mausstamm, der gegenüber dem Wildtyp DNA-Polymorphismen aufweist
SNP	Single nucleotide polymorphism
TMEFF2	Transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2 (alias: TPEF)

## 7.7 Lebenslauf

Reimo Tetzner	geb. 24.07.1972 in Karl-Marx-Stadt (heute Chemnitz)
Kontakt	postalisch: Kuglerstr. 33, 10439 Berlin email: reimo.tetzner@epigenomics.com
Berufstätigkeit	seit September 2002 Promotion bei der Epigenomics AG zum Thema "RealTime PCR Methoden zur hochsensitiven Methylierungsanalyse" seit April 2002 Angestellter der Epigenomics AG November 1992 - 1994 Zivildienst im Mikrobiologischen Labor des Krankenhauses am Friedrichshain Berlin
Hochschulstudium	Oktober 1994 - Mai 2002 Studium an der TU Berlin, Abschluß: Diplom-Ingenieur für Biotechnologie Juli 2001 - März 2002 Diplomarbeit bei der Epigenomics AG zum Thema: „Entwicklung einer Technologie für die Herstellung eines gewebespezifischen Genchips“ Dezember 1999 Studienarbeit am Institut für Bioverfahrenstechnik der TU Berlin zum Thema: „Vergleichende Untersuchungen zur autotrophen und mixotrophen Kultivierung“
Schulbildung	1991 Abitur am IVA Halle 1989 Schulabschluß an der 26. POS Berlin
Praktische Tätigkeiten	Juli 2000 – Februar 2001 Studentischer Mitarbeiter am Institut für Bioverfahrenstechnik der TU Berlin Juni - Dezember 1998 Studentischer Mitarbeiter am Institut für Bioverfahrenstechnik der TU Berlin Oktober- März 1991 Praktikum am Institut für Pflanzenphysiologie und Zellbiologie der HU Berlin Mai/Juni 1990 Schülerpraktikum in der Arbeitsstelle für technische Mikrobiologie in Berlin-Buch

## 7.8 Veröffentlichungen

### Wissenschaftliche Publikationen:

Cottrell SE, Distler J, Goodman NS, Mooney SH, Kluth A, Olek A, Schwöpe I, Tetzner R, Ziebarth H, Berlin K. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res.* 2004 Jan 13;32(1):e10.

Tetzner R., Dietrich D., Distler J., Control of carry-over contamination for PCR-based DNA methylation quantification using bisulfite treated DNA. *Nucleic Acids Res.* 2006 Nov 28; doi:10.1093.

### Erteilte Patente:

Tetzner R., Distler J., Improved HeavyMethyl assay for the methylation analysis of the GSTPI gen. veröffentlicht 29.12.2004, WO2004113567.

### Veröffentlichte Patentanmeldungen:

Tetzner R., Distler J., Method for detection of cytosine methylations in DNA. Veröffentlicht 17.03.2005, DE10338308/WO2005024056, voraussichtliche Erteilung 2006.

Berlin K., Tetzner R., Distler J., Verfahren zur Untersuchung von Cytosin-Methylierungen in DNA mit Hilfe von DNA-Reparaturenzymen. Veröffentlicht 28.07.2005, WO2005068648.

Tetzner R., Dietrich D., A method for the carry-over protection in DNA amplification systems targeting methylation analysis achieved by a modified pre-treatment of nucleic acid. Veröffentlicht 20.04.2006, voraussichtliche Erteilung 2006, WO2006040187.

Berlin K., Distler D., Tetzner R., Compositions of methods for preventing carry-over contamination in nucleic acid amplification reactions. Veröffentlicht 26.01.2006, WO2006009870.

Lesche R., Lofton-Day C., Schuster M., Distler J., Tetzner R., Hildmann T., Methods and nucleic acids for the analyses of cellular proliferative disorders. US 11/405,322, Veröffentlicht als EP 1721992 am 15.11.2006

Ballhause M., Berlin K., de Voss T., Dietrich D., Liebenberg V., Lofton-Day C., Lograsso J., Maas J., Model F., Schuster M., Sledziewski A., Tetzner R., Method for providing DNA fragments derived from a remote sample. Veröffentlicht 26.10.2006, WO2006113770.

### Eingereichte Patentanmeldungen:

Tetzner R., Verfahren zur Quantifizierung methylierter DNA. Voraussichtliche Veröffentlichung Juli 2007, EP2006007288.

Dietrich D., Tetzner R., Carry-over protection in enzyme-based DNA amplification systems targeting methylation analysis. Voraussichtliche Veröffentlichung Juli 2007, EP 06 090 102.2.

Berlin K., Distler J., Tetzner R., Verfahren zum Nachweis eines Methylierungsmusters. Voraussichtliche Veröffentlichung Juli 2007, EP 10 2006 035 600.4.

Lewin J., Tetzner R., A method for methylation analysis of nucleic acid. Voraussichtliche Veröffentlichung August 2007, EP 06 090 132.9.

### Posterpräsentationen:

Lofton-Day C., Model F, Tetzner R, DeVos T, Schuster M, Lesche R, Sledziewski A, Day R, A Real-Time PCR Test for Septin 9 Gene Methylation Identifies Early Stage Colorectal Cancer in Plasma. Poster-Präsentation auf dem AACR Annual Meeting, Washington, DC April 2006.

Model F, Ebert M, DeVos T, Tetzner R, Schuster M, Lesche R, Sledziewski A, Day RW, and Catherine Lofton-Day, Detection of Methylated DNA in Plasma from Colorectal Cancer Patients and Controls by Real-Time PCR Analysis of Septin 9. Poster-Präsentation auf dem World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, Juli 2006.

Song X, Joern Lewin J, Model F, Tetzner R, DeVos T, Schuster M, Sledziewski A, Lofton-Day C. Methylation analysis of the promoter region of Septin 9 – a novel biomarker for early detection of colorectal cancer. Poster-Präsentation auf der AACR Special Conference in Cancer Therapeutic Development, Chicago September 2006.

## Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Jörn Walter für die Betreuung dieser Arbeit und die Initiierung des Doktorandenseminars danken. Herzlich danken möchte ich Dr. Jürgen Distler, der diese Arbeit bei der Epigenomics AG betreut hat und mich mit großer Hilfsbereitschaft und Engagement unterstützt hat. Ein besonderer Dank gilt Monika Neumann, die für das Gelingen dieser Arbeit auch praktische Unterstützung geleistet hat. Ihre Diplomarbeit zu betreuen hat viel Spaß gemacht. Bei Sabine Reither und Dr. Konstantin Lepikhov möchte ich mich herzlich für die wissenschaftliche Unterstützung und Präparation der PGCs bedanken. Ohne die Meister der Mäuse wären große Teile der Arbeit nicht möglich gewesen. Bei Dr. Kurt Berlin und Dr. Matthias Schuster möchte ich mich für die anregenden Diskussionen bedanken, aus denen immer neue Ideen erwachsen sind. Auch dem Team der Patentabteilung von Epigenomics danke ich für die fruchtbare Zusammenarbeit. Ein ganz großer Dank gilt den beiden leidenschaftlichsten Lesern dieser Arbeit. Das waren Dr. Jürgen Distler und Dr. Gudrun Lämmel ohne deren Hilfe die Fertigstellung der Arbeit unendlich viel länger gedauert hätte. Besonderer Dank gilt auch den Epigenomics Doktoranden, auf deren wissenschaftliche und soziale Unterstützung ich mich immer verlassen konnte. Ein dickes Dankeschön gilt vor allem meinen Bürokollegen Dimo Dietrich und Manuel Krispin sowie Philipp Schatz, die mich mit viel Geduld ertragen und in den Kurvenstar begleitet haben, wenn es notwendig war. All meinen Kollegen aus der dritten Etage möchte ich für das angenehme Umfeld danken und die vielen guten Tipps, die sie mir gegeben haben. An dieser Stelle möchte ich auch meinen Eltern danken, die mein Studium finanziert haben und auch danach immer für mich da waren. Für die Unterstützung und Ablenkungen außerhalb der Arbeit möchte ich auch all meinen Freunden danken. Der größte Dank gilt jedoch meiner lieben Freundin Heide, die immer für mich da war, auch in Zeiten in denen kein Ende in Sicht war. Sie hat mir den größten Schatz geschenkt: Helene !

