

Charakterisierung von DNA-Methylierungsmustern

mit Hilfe von Oligonukleotid-Microarrays

Epigenetische Studien beschäftigen sich mit erblichen Veränderungen in der Genexpression, die nicht auf Modifikationen der DNA-Sequenz, etwa durch Mutation oder Deletion, beruhen. Zu den epigenetischen Phänomenen gehört neben Histon-Modifikationen vor allem auch die Methylierung von genomischer DNA. Diese Modifikation betrifft fast ausschließlich die Base Cytosin, die im humanen Genom in der Dinukleotid-Folge CpG zu 5'-Methylcytosin methyliert wird. Die Methylierung wird noch während der Replikation durch DNA-Methyl-Transferasen eingeführt.

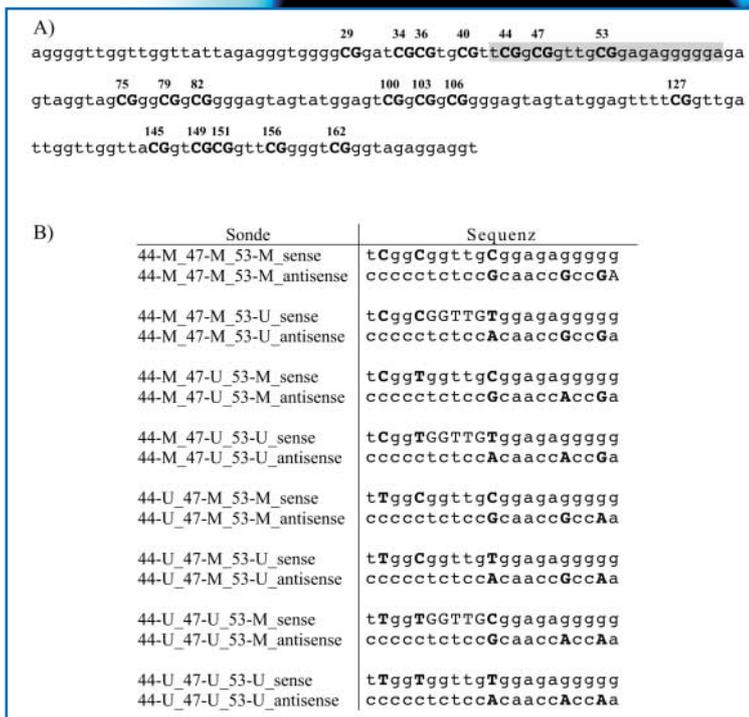
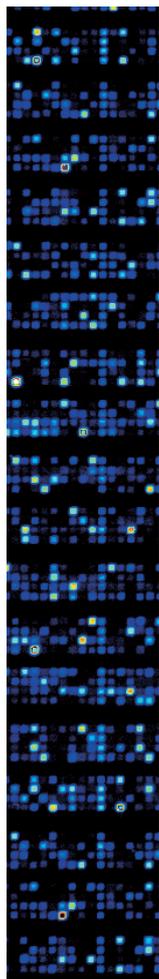


Abb. 1: A) Die Sequenz zeigt eine CpG-Insel mit einer Länge von 176 Nucleotiden aus dem Tumorsuppressorgen p16. Die CpG-Dinukleotide, gezeigt in fettgedruckten Großbuchstaben, sind anhand ihrer Position in der Sequenz durchnummeriert. Grau unterlegt ist als Beispiel für eine Oligonukleotidsonde ein die CpGs Nr. 44, Nr. 47 und Nr. 53 umspannendes 21mer, wobei das CpG Nr. 53 die zentrale Position belegt. B) Aus der Anzahl der CpGs innerhalb der Sonde errechnet sich die Zahl der möglichen Kombinationen von methyliertem CpG (M) und unmethyliertem CpG (U). Aus drei CpG-Dinukleotiden ergeben sich im vorliegenden Fall $2^3 =$ acht verschiedene Sonden für den sense-Strang sowie weitere acht revers komplementäre Sonden für den antisense-Strang.

Im menschlichen Genom sind ca. 4% aller Cytosine methyliert. Die CpG-Dinukleotide sind im menschlichen Genom nicht gleichmäßig verteilt und stark unterrepräsentiert. Während die Mehrzahl der CpG-Dinukleotide methyliert sind, gibt es 1-2 kb lange Abschnitte, die sogenannten CpG-Inseln, die eine relativ hohe Dichte an unmethylierten CpG-Dinukleotiden aufweisen. Bei mehr als 60% aller bekannten Gene finden sich CpG-Inseln in Promotor-Regionen und den ersten Exons [1].

Methylierungsmuster als Tumormarker

Veränderungen in den Methylierungsmustern der CpG-Inseln gehören mit zu den frühesten und häufigsten Merkmalen bei der Tumorgenese [2]. Die Hypermethylierung von CpG-Inseln ist assoziiert mit der auf Transkriptionsebene stattfindenden Inaktivierung von Tumor-

suppressor-Genen (z.B. p16 oder BRCA1) und Genen für DNA-Reparatur, Apoptose und Zellzyklus-Regulation [3]. Dabei spielt nicht nur der absolute Methylierungsstatus jedes einzelnen CpG-Dinukleotids eine Rolle, sondern vor allem der Methylierungsgrad, d.h. zu welchem Anteil das jeweilige CpG in der zu untersuchenden Probe methyliert ist.

Genomweite Analyse durch Microarrays

Die Untersuchung von gen-spezifischen DNA-Methylierungsmustern mithilfe von Oligonukleotid-Microarrays beruht auf der Behandlung von genomischer DNA mit Natriumbisulfit, wodurch unmethylierte Cytosine zu Uracil deaminiert werden, während alle methylierten Cytosine unmodifiziert bleiben. Wird anschließend eine PCR durchgeführt, erhält man insgesamt eine Konversion von unmethyliertem Cytosin in Thymin. Dieser Basenaustausch kann durch verschiedene Methoden detektiert werden, wie zum Beispiel die Bisulfit-Sequenzierung [4] oder methylierungs-spezifische PCR (MSP) [5]. Beide Methoden sind sowohl arbeits- als auch zeitintensiv und erfassen jeweils nur eine sehr beschränkte Anzahl von CpG-Dinukleotiden von einzelnen Genen. Durch eine hybridisierungsbasierende Untersuchung unter Verwendung von Oligonukleotid-Microarrays wird die parallele Analyse einer großen Anzahl von Genen und CpG-Dinukleotiden möglich [6,7]. Ein Oligonukleotid-Microarray enthält Tausende von kurzen (17-25mer) Oligonukleotid-Sonden. Für unsere Studien verwenden wir in-situ synthetisierte Oligonukleotid-Microarrays, die mittels der Geniom-Technologie der febit AG, Mannheim, hergestellt werden [8; www.febit.de]. Für jedes CpG-Dinukleotid gibt es zwei Sequenz-Variationen der Sonden: für den methylierten Status enthalten die Sonden die Sequenz CG, für den unmethylierten Status dagegen die Sequenz TG. Enthält eine Sonde mehr als ein CpG-Dinukleotid, gibt es für jede Kombination von methyliertem oder unmethyliertem Status der benachbarten CpG-Dinukleotide eine Sonde, bei n CpGs also 2^n Sonden (Abb. 1). Damit der Methylierungsstatus jedes einzelnen CpG-Dinukleotids erfasst werden kann, sind die Sonden so angeordnet, dass jedes abzufragende Cytosin einmal in der zentralen Position der zugehörigen Oligonukleotidsonden steht, da so die Diskriminierung aufgrund der verschiedenen Hybridisierungseffizienzen von methylierter und unmethylierter Probe am größten ist. Zusätzlich wird zu jeder Sonde eine zweite Sonde mit revers

komplementärer Sequenz erzeugt, mit der in der Hybridisierung auch der Gegenstrang der doppelsträngigen Probe analysiert werden kann. Für die Hybridisierung wird genomische DNA aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert und mit Natriumbisulfit behandelt. Anschließend werden die Gene bzw. Regionen von Interesse mittels PCR amplifiziert und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Cy3) markiert. Als Positivkontrolle für vollständig methylierte DNA wird genomische DNA verwendet, die zunächst mit SssI-Methylase behandelt wurde, wodurch alle Cytosine in CpG-Dinukleotiden methyliert werden, so dass sie bei der nachfolgenden Natriumbisulfitbehandlung unmodifiziert bleiben. Als Negativkontrolle wird eine vollständig unmethylierte DNA generiert, indem die Bereiche von Interesse mittels PCR amplifiziert werden, wodurch die Methylierung verloren geht. Behandelt man diese PCR-Produkte anschließend mit Natriumbisulfit, erhält man eine vollständige Konversion aller CG-Sequenzen zu TG. Durch die Hybridisierung von definierten Gemischen aus Positiv- und Negativkontrolle, die einen Methylierungsgrad von 0%, 25%, 50% 75% und 100% repräsentieren, kann die Linearität des Systems bestimmt werden. Als Referenz kann die Positiv- oder Negativkontrolle, markiert mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Cy5), mit der zu untersuchenden Probe gemeinsam hybridisiert werden.

Für die Untersuchung mehrerer Gene gleichzeitig gibt es entweder die Möglichkeit, jedes PCR-Produkt einzeln zu amplifizieren, und die verschiedenen PCR-Produkte vor der Markierungsreaktion zu gleichen Anteilen zu mischen. Zeit- und kostengünstiger ist es jedoch, eine sogenannte Multiplex-PCR durchzuführen, in der verschiedene Gene gleichzeitig in einer einzelnen PCR amplifiziert werden. Die Sequenzen der Primer für die PCR-Amplifikation werden so gewählt, dass sie keine CpG-Dinukleotide beinhalten. Dadurch wird gewährleistet, dass die Amplifikation unabhängig vom Methylierungsstatus des zu amplifizierenden DNA-Fragments erfolgt. Nach der Hybridisierung der markierten Probe werden die resultierenden Fluoreszenzsignalintensitäten ermittelt (Abb. 2). Für die Ermittlung des Methylierungsstatus jedes CpG-Dinukleotids werden die Signalintensitäten der zugehörigen Sonden analysiert.

Ausblick

Durch die Charakterisierung genomweiter und genspezifischer DNA-Methylierungsmuster werden grundlegende Er-

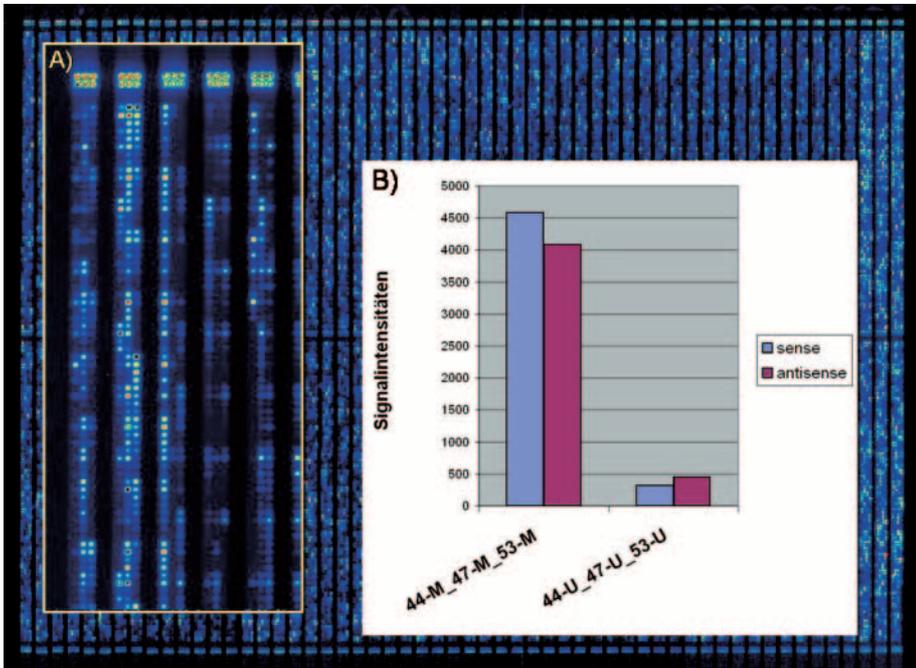


Abb. 2: Die Oligonucleotid-Microarrays werden mit Hilfe der Geniom-Technologie von febit, Mannheim, *in-situ* synthetisiert. Sowohl die Hybridisierung mit anschließenden Wasch-Schritten als auch die Detektion der Signalintensitäten unter Verwendung des internen CCD-Kamera-Systems finden ebenfalls im selben Gerät statt.

A) Gezeigt ist der Ausschnitt eines Oligonucleotid-Microarrays, der mit einem vollständig methylierten, mit Cy3-Farbstoff markierten PCR-Produkt von p16 hybridisiert wurde.
 B) Im Diagramm sind die Signalintensitäten für die Sonden aufgetragen, die die CpG-Dinucleotide Nr. 44, Nr. 47 und Nr. 53 (in der zentralen Position) abfragen (Abb. 1). Deutlich erkennbar sind die hohen Signalintensitäten der vollständig methylierten Sonde 44-M_47-M_53-M, die um etwa den Faktor 11 höher sind als die Signalintensitäten für die vollständig unmethylierte Sonde 44-U_47-U_53-U.

kenntnisse über die Tumorentstehung gewonnen, insbesondere durch einen Vergleich der gewonnenen epigenetischen Daten mit verfügbaren klinischen Daten und Ergebnissen aus Genexpressionsstudien. Durch die Etablierung eines Systems, das sowohl der Diagnostik als auch der Prognose dient, wird der Grundstein für eine epigenetische Tumorklassifikation gelegt. Zur Verbesserung der Analyseeffizienz arbeiten wir auch an Nachweisverfahren, die sich beispielsweise eine Polymeraseverlängerungsreaktion auf dem Chip zunutze machen oder durch die Verwendung vollständig synthetischer Sondenmoleküle (Peptide Nucleic Acids, PNAs) eine Analyse ohne jegliche (PCR-) Amplifikation und Markierung erlauben [9].

- [8] Baum M. *et al.*: Nucleic Acids Res. 31, e151 (2003)
- [9] Brandt O. *et al.*: Nucleic Acids Res. 31, e119 (2003)

Referenzen

- [1] Bird A.: Genes Dev 16, 6–21 (2002)
- [2] Jones P. A. und Baylin S. B.: Cancer Cell 3, 415–428 (2002)
- [3] Esteller M. *et al.*: Cancer Res 61, 3225–3229 (2001)
- [4] Frommer M. *et al.*: Proc. Natl Acad. Sci. 89, 1827–1831 (1992)
- [5] Herman J.G. *et al.*: Proc. Natl Acad. Sci. 93, 9821–9826 (1996)
- [6] Adorján P. *et al.*: Nucl Acids Res. 30(5), e21 (2002)
- [7] Gitan R. S. *et al.*: Genome Res 12, 158–164 (2001)



Verena Beier



Jörg Hoheisel

Dr. Verena Beier
 seit 2002 Wissenschaftlerin am DKFZ, Heidelberg

Dr. Jörg Hoheisel
 seit 1998 Abteilungsleiter am DKFZ, Heidelberg

Funktionelle Genomanalyse
 Deutsches Krebsforschungszentrum
 Im Neuenheimer Feld 580
 69120 Heidelberg
 v.beier@dkfz.de