(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
13. Juni 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/46452 A2

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: C12Q 1/68

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/04617

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. Dezember 2001 (05.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 61 348.9 6. Dezember 2000 (06.12.2000) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **EPIGENOMICS AG** [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **OLEK, Alexander** [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **SCHUBERT, Klemens**; Neue Promenade 5, 10178 Berlin-Mitte (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**
— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts*
— *mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

WO 02/46452 A2

(54) **Title:** METHOD FOR QUANTIFYING CYTOSINE METHYLATIONS IN GENOMIC DNA THAT IS AMPLIFIED IN A COMPLEX MANNER

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR QUANTIFIZIERUNG VON CYTOSIN-METHYLIERUNGEN IN KOMPLEX AMPLIFIZIERTER GENOMISCHER DNA

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for providing demethylated DNA as a reference material for analyzing cytosine methylations in genomic DNA samples while using complex amplifications.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Verfahren zur Bereitstellung von demethylierter DNA als Referenzmaterial für die Analyse von Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben unter Verwendung komplexer Amplifikation.

# Verfahren zur Quantifizierung von Cytosin-Methylierungen in komplex amplifizierter genomischer DNA

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Quantifizierung von Cytosin-Methylierungen einer genomischen DNA-Probe mit unbekanntem Metylierungsstatus durch den Vergleich mit einer demethylierten Referenz-DNA.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der Transkription, genomischem Imprinting und in der Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüberhinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

Die Amplifikation von DNA mittels PCR ist Stand der Technik.

Es sind mehrere Verfahren bekannt, die diese Probleme lösen. Meist wird eine chemische Reaktion oder enzymatische Behandlung der genomischen DNA durchgeführt, infolge derer sich die Cytosin von den Methylcytosin Basen unterscheiden lassen. Eine gängige Methode ist die Umsetzung von genomischer DNA mit Bisulfit, die nach alkalischer Hydrolyse in zwei Schritten zu einer Umwandlung der Cytosin Basen in Uracil führt (Shapiro, R., Cohen, B., Servis, R. Nature 227, 1047 (1970). 5-Methylcytosin bleibt unter diesen Bedingungen unverändert. Die Umwandlung von C in U führt zu einer Veränderung der Basensequenz, aus

der sich durch Sequenzierung nun die ursprünglichen 5-Methylcytosine ermitteln lassen.

Die Modifikation der genomischen Base Cytosin zu 5-Methylcytosin stellt bis heute den wichtigsten und best-untersuchten epigenetischen Parameter dar. Trotzdem gibt es bis heute zwar Methoden, umfassende Genotypen von Zellen und Individuen zu ermitteln, aber noch keine vergleichbaren Ansätze auch in großem Maße epigenotypische Information zu generieren und auszuwerten.

Demethylierte DNA wird im Stand der Technik bei zahlreichen Verfahren zur Quantifizierung von DNA-Methylierung eingesetzt. Stellvertretend seien genannt: „Rapid quantitation of methylation differences at specific sites using methylation-sensitive single nucleotide primer extension" (Gonzalgo, M.L., Jones P.A. Nucleic Acids Res. 25, 2529 (1997)) und „Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA" (Warnecke, P.M., Stirzaker, C., Melki, J.R., Douglas, S.M., Paul, C.L., Clark, S.J. 25, 4422 (1997)). Diese demethylierte DNA wird z.B. aus Zellen gewonnen, die in der Zielsequenz demethyliert sind oder aus Zellen, denen das Enzym DNA Methyltransferase fehlt.

Andererseits ist es leicht möglich, demethylierte DNA-Fragmente mittels PCR herzustellen, da während der Amplifikation die Methylierungsinformation verloren geht, d.h. es wird anstelle von Methylcytosin immer Cytosin eingebaut, wenn wie üblich in der Polymerasereaktion dCTP eingesetzt wird.

Möchte man jedoch Cytosin-Methylierung wie oben erwähnt mittels der Bisulfit-Methode untersuchen, bei der alle nicht methylierten Cytosinbasen in Uracil und letztlich in Thymin umgewandelt werden, so muss für die Quantifi-

zierung eine Referenz-DNA hergestellt werden, welche anstelle aller methylierten und nicht methylierten Cytosine Thymin enthält. Diese DNA dient dann als Referenzmaterial für einen Methylierungsstatus von 0%. Am einfachsten kann man diese DNA für die Analyse einzelner Fragmente erhalten, indem man zunächst in einer ersten Amplifikation eine PCR der genomischen DNA-Probe durchführt und dabei das gewünschte Fragment erzeugt, welches dann im wesentlichen keine Methylierung mehr aufweist. Nachfolgend wird die Bisulfit-Behandlung durchgeführt und das betreffende Fragment, nun mit entsprechend anderen Primern, zum zweiten Mal amplifiziert.

Dieses Verfahren eignet sich jedoch nicht zur Durchführung komplexer Amplifikationen, die viele Fragmente gleichzeitig für die Methylierungsdetektion bereitstellen sollen. Hier stellt sich das Problem, dass nur schwer sichergestellt werden kann, dass die erste Amplifikation auch wesentlich die Fragmente bereitstellt, die in der zweiten PCR nach der Bisulfit Reaktion amplifiziert werden sollen. Dies ist aber essentiell, da die zu untersuchende Probe, für deren Methylierungsanalyse die Vergleichs-DNA hergestellt wird, üblicherweise ausschliesslich nach der Bisulfitbehandlung amplifiziert wird. Damit ist bei einer komplexen PCR-Reaktion eine Vergleichbarkeit von Referenz und Probe nicht mehr gegeben, da sie potentiell unterschiedliche Fragmente enthalten.

## Aufgabenstellung

Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben bereit, wozu als Referenzmaterial DNA mit einem Methylierungsgrad von 0% hergestellt wird. Damit ist es erstmals

möglich, für komplexe Amplifikationen eine im wesentlichen unmethylierte Referenz-DNA bereitzustellen.

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren zur Bereitstellung von demethylierter DNA als Referenzmaterial für die Analyse von Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben unter Verwendung komplexer Amplifikationen. Dazu werden im Einzelnen die folgenden Verfahrensschritte durchgeführt:

a) Eine genomische DNA-Probe wird mit Primern amplifiziert, die entweder sehr kurze oder degenerierte Oligonukleotide oder zu Adaptoren komplementäre Oligonukleotide sind. Für den zweiten Fall wird vor der Amplifikation mit einem Restriktionsenzym geschnitten und die Adaptoren, unter denen man kurze Nukleotidfragmente bekannter Sequenz versteht, an die Enden der entstandenen DNA Fragmente ligiert.

Die Amplifikate werden chemisch derart behandelt, dass an der 5-Position unmethylierte Cytosinbasen in Uracil, Thymin oder in eine andere im Hybridisierungsverhalten dem Cytosin unähnliche Base umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen im wesentlichen unverändert bleiben. Dies wird im folgenden unter chemischer Vorbehandlung verstanden.

Die chemisch vorbehandelten Amplifikate werden wiederum amplifiziert. Als Primer werden dazu entweder mehrere spezifisch hybridisierende Oligonukleotide oder aber zu den Adaptoren komplementäre Oligonukleotide verwendet. Für den letzteren Fall wird ebenfalls die chemische Vorbehandlung durchgeführt.

b) Eine zu untersuchende genomische DNA-Probe wird mittels eines Restriktionsenzyms geschnitten. An die Enden der DNA-Fragmente werden Adaptoren ligiert und die Probe nachfolgend geteilt. Der erste Teil der Probe wird mit Primeroligonukleotiden amplifiziert, die zu den Adaptoren komplementär sind. Der zweite Teil der Probe wird hingegen nicht amplifiziert.

Die beiden Teile der Probe werden chemisch separat vorbehandelt und amplifiziert, wobei zu den Adaptoren komplementäre Primeroligonukleotide verwendet werden. Die beiden Teile der Probe werden anschließend analysiert. Dabei liefert der erste Teil der Probe den Referenzwert für einen Methylierungsgrad von 0%. Der zweite Teil der Probe hingegen liefert den Messwert, der dem Methylierungsgrad in der ursprünglichen genomischen DNA-Probe im wesentlichen entspricht.

Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust, Leber, Haut oder Knochenmark, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

Bevorzugt wird dazu die oben beschriebene Behandlung genomischer DNA mit Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) und anschließender alkalischer Hydrolyse verwendet, die zu einer Umwandlung nicht methylierter Cytosin-Nukleobasen in Uracil führt.

In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens wird für die Amplifikation die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Für die Polymerasekettenreaktion wird

vorzugsweise eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet. Die Amplifikation von mehreren gleichen oder mehreren unterschiedlichen DNA-Abschnitten wird bevorzugt in einem Reaktionsgefäß durchgeführt.

Als Restriktionsendonukleasen werden vorzugsweise verwendet: RsaI, DpnI, DpnII, MseI, Sau3AI, AluI, NIaIII, HaeI-II, BfaI, Tsp509I, BstUI oder MboI.

Die Amplifikate werden nach der chemischen Behandlung durch Bindung an eine Festphase oder an ein Gel und Waschschritte von den Reagenzien und anderen Bestandteilen des Reakionsgemisches abgetrennt.

Die Reagenzien und die anderen Bestandteile des Reakionsgemisches werden bevorzugt derart verdünnt, dass sie in der nachfolgenden Amplifikation nicht mehr hinderlich sind, jedoch die Konzentration des behandelten Amplifikates nach wie vor für die zweite Amplifikation ausreicht.

Besonders bevorzugt wird die hergestellte demethylierte Referenz-DNA auf die gleiche Weise analysiert wie eine zu untersuchende Proben-DNA. Diese Referenz-DNA liefert in der Analyse den Vergleichswert für einen Methylierungsgrad von 0%. Vorzugsweise wird zusätzlich eine enzymatisch aufmethylierte DNA, die im folgenden gleichermaßen wie die Proben-DNA behandelt wurde, als Referenz für einen Methylierungsgrad von 100% dient.

Die nachfolgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

Beispiel 1a: Herstellung einer demethylierten Referenz-DNA mittels Multiplex-PCR

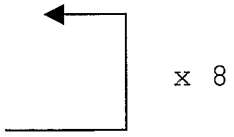
Das folgende Beispiel bezieht sich auf die Herstellung einer runtermethylierten DNA- Probe, die als Referenz im Vergleich zu einer unbekannt methylierten DNA dient. Man

setzt eine genomische DNA-Probe ein, die in diesem Fall mit dem Restriktionsenzym, Mss1, verdaut wurde. Dann werden (1-40 ng) der geschnittenen DNA durch eine Voramplifikation vervielfältigt, indem eine DOP-PCR (degenerate oligonucleotide primed polymerase chain reaction) nach der Methode von Nelson (V. G. Cheung, S. F. Nelson, PNAS 93, 1476-1479, 1996) mit dem genomischen Primeroligonukleotid 5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTG G-3' durchgeführt wird. Die Methode dient vor allem dazu, sehr kleine Mengen an genomischer DNA vorzuamplifizieren, um dann aus 2-15 µg (200-1000 bp) eine vielfache genetische Analyse zu erlauben. Bei der Amplifikation werden sämtliche Methylcytosine als Cytosinbasen behandelt.

Reaktionsansatz (50 µl):
1 µl (1-40 ng) DNA
2 µl (2 µM) DOP Primer (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTG G-3')
5 µl (200 µM) dNTP's (Fermentas)
5 µl PCR Puffer (10 x, 15 mM MgCl2) (Qiagen)
0,5 µl (2,5 U ) Taq Polymerase (HotstarTaq, Qiagen)
36,5 µl Wasser (für die Molekularbiologie, Fluka)

Die PCR-Reaktion wird im Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit folgendem Programm durchgeführt.

15 min 96 °C
60 s 93°C
60 s 30 °C
180 s 72 °C
Halt bei 4 °C




Die PCR Probe wird mit Wasser verdünnt (1:10-1:100) und 1 µl der Verdünnung werden mit Hydrogensulfit (= Bisulfit, Disulfit) chemisch umgewandelt. Die DNA wird zuerst thermisch denaturiert und anschließend mit Hydrogensulfit

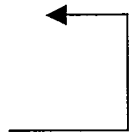
(=Bisulfit, Difulfit), einem Radikalfänger und einem denaturierenden Reagenz versetzt und längere Zeit bei erhöhter Temperatur inkubiert. Die Bisulfit Reaktion führt zur Umwandlung aller Cytosinbasen in Uracil. Zur Reinigung der bisulfitierten DNA wird diese auf eine Reversed Phase C18 Festphase gebunden und durch Waschen mit einer geeigneten Pufferlösung von Chemikalien befreit. Anschließend wird die DNA mit einem polaren Lösungsmittel wie z. B. Acetonitril oder Wasser eluiert und auf ein kleineres Volumen konzentriert. Die alkalische Hydrolyse der mit Hydrogensulfit (= Bisulfit, Disulfit) behandelten Fragmente erfolgt für 20 min bei 96 °C unter basischen Bedingungen unmittelbar vor der spezifischen Amplifikation. In dieser werden vorzugsweise zwischen 1-500 verschiedene Primeroligonukleotide, die keine Wobble-Basenpaarungen enthalten, eingesetzt. In diesem Beispiel wird die spezifische Amplifikation mit 128 Primeroligonukleotiden durchgeführt, wobei mindestens 64 Primeroligonukleotide mit Cy5 (Amersham Pharmacia) markiert sind. Dabei handelt es sich um je ein Primeroligonukleotid eines Primerpaares.

Reaktionsansatz Multiplex PCR (25 µl)

| | |
|---|---|
| 1 µl | Hydrogensulfit behandelte DNA |
| 2,5 µl | PCR buffer (10x, Qiagen) |
| 0,6 µl | Primeroligonukleotidmischung (128 Primeroligonukleotide, 64 davon sind Cy5 markiert, 0,78 pmol/ul von jedem) |
| 0,8 µl | dNTPs (25 mM pro dNTP, Gibco-BRL) |
| 3 µl | MgCl2 (15 mM ) |
| 4,5 µl | Wasser (für die Molekularbiologie, Fluka) |
| 12,5 µl | Tris-HCl (pH 9,5; 100 mM) |
| 0,2 µl | Polymerase (1 unit) (HotstarTaq, Qiagen) |

Die PCR-Reaktion wird im Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit folgendem Programm durchgeführt.

15 min 95 °C
60 s 95 °C
45 s 55 °C
120 s 65 °C
10 min 65 °C
Halt bei 4 °C



x 39

Die erzeugten PCR-Amplifikate wurden durch Agarosegel-Elektrophorese (1,5 % Agarose in 0,5xTBE-Puffer, Sambrook et al.) analysiert. Hierfür werden 4 µl des PCR-Ansatzes der Gelelektrophorese unterzogen. Unter den angegeben Bedingungen werden 64 Gene gleichzeitig erfolgreich amplifiziert.

Beispiel 1b: Herstellung einer unbekannt methylierten DNA Probe mittels Multiplex-PCR

Das folgende Beispiel 1b bezieht sich auf die Herstellung einer unbekannt methylierten DNA- Probe, die mit der runtermethylierten Referenz DNA aus Beispiel 1a verglichen wird. Man setzt eine genomische DNA-Probe ein, die in diesem Fall mit dem Restriktionsenzym MssI gespalten wurde. Die Probe wird anschließend mit Hydrogensulfit (≙ Bisulfit, Disulfit) umgesetzt. Dabei kann man nach 2 verschiedenen Methoden vorgehen. Die erste Methode (Olek et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066) ist eine Umsetzung mit Hydrogensulfit und einem Radikalfänger, wobei die DNA in Agarose eingebettet ist. Die Desulfonierung der DNA erfolgt ebenfalls in Agarose. Die DNA wird in diesem Fall ohne weitere Reinigungsoperationen in eine Preamplifikation (PEP = primer extension preamplification) eingesetzt. Alternativ wird die DNA ohne Agarosematrix ebenfalls mit Hydrogensulfit (= Bisulfit, Disulfit) und einem Radikalfänger bei erhöhter Temperatur chemisch umgewandelt. Ein organisches Reagenz, welches die Denaturierung unterstützt, wird zugesetzt und der Ansatz bei erhöhter Temperatur inkubiert. Durch die Behandlung

mit Hydrogensulfit werden in beiden Methoden alle Cytosin-Basen zu Uracil umgesetzt wobei Methylcytosine erhalten bleiben. Zur Reinigung der ohne Agarosematrix bisulfitierten DNA wird diese auf eine Reversed Phase C18 Festphase gebunden und durch Waschen mit einer geeigneten Pufferlösung von Chemikalien befreit. Anschließend wird die DNA mit einem polaren Lösungsmittel wie z. B. Acetonitril und Wasser eluiert und auf ein kleineres Volumen konzentriert. Die Preamplifikation der mit Hydrogensulfit behandelten DNA wird mit degenerierten Primeroligonukleotiden (5'-TTATAATGTTTT und 5'-TAATATACTAAT) durchgeführt.

Reaktionsansatz (20 ul):

| | | |
|---|---|---|
| 1 µl | Bisulphit-DNA (0.2-1 ng) | |
| 2 µl | Reaktions-Puffer (10x, Qiagen) | |
| 2 µl | dNTP's (10mM pro dNTP, Fermentas) | |
| 1 µl | Primer (TTATAATGTTTT) | 25 pmol |
| 1 µl | Primer (TAATATACTAAT) | 25 pmol |
| 0,2 µl | Polymerase (1 unit) (HotstarTaq, Qiagen) | |
| 12,8 µl | Wasser (für die Molekularbiologie, Fluka) | |

Die nachfolgende Amplifikation mit Cy5-gelabelten Bisulfit-spezifischen Primeroligonukleotiden erfolgt mit den im Beispiel 1a beschriebenen 128 Primeroligonukleotiden, wobei das gleiche Primeroligonukleotid Cy5-gelabelt ist. Die Amplifikate werden zur Analyse ebenfalls einer Agarosegel-Elektrophorese unterzogen.

Beispiel 1c: Vergleich der unbekannt methylierten DNA Probe mit der runtermethylierten Referenz-DNA

Der Vergleich der unbekannt methylierten DNA Probe mit der runtermethylierten Referenz DNA erfolgt vorzugsweise durch Hybridisierung auf ein Oligonukleotidarray. Entsprechend der Position auf dem Array ist sind fluoreszierende Punkte sichtbar. Es fällt auf, dass bestimmte Punkte auf dem Array relativ zu den anderen und zur Referenz-

DNA eine deutlich erhöhte oder verminderte Fluoreszenz zeigen, sofern die Amplifikate in den einzelnen zu untersuchenden Proben in vergleichbarer Konzentration vorliegen. Es werden die Intensitäten des Fluorszenzfarbstoffes Cy5 (635 nm) in den einzelnen Amplifikaten gemessen. Die Art und Weise der Auswertung von Fluoreszenzmessungen sind dem Fachmann bekannt.

Beispiel 2: Herstellung demethylierter Referenz-DNA

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz durch Zugabe eines Restriktionsenzyms, hier NlaIII (Fermentas), welches die Sequenz CATG erkennt, nach Herstellerangaben enzymatisch gespalten. Dabei werden Fragmente von durchschnittlich 400 bp Größe erzeugt. Die gespaltenen Fragmente weisen 3' überhängende CATG-Enden auf und werden mit dem Oligomer mit der genomischen Sequenz TGTCATCCTGTTGTCATG unter Zugabe von T4-DNA Ligase gemäß Standardbedingungen (Fermentas) an die Sequenzabschnitte ligiert und nicht ligierte Adaptoren nach Standardbedingungen mit einem Reinigungskit (Qiaquick PCR Purification Kit, Qiagen) entfernt. Anschließend werden mit Klenow Enzym (DNA Polymerase I, Roche Molecular Biochemicals) und dNTP's die einzelsträngigen Enden zum Doppelstrang ergänzt (Fig 1a).

Soll eine Referenz DNA hergestellt werden, so ist wie folgt zu verfahren: Es werden in dem nun folgenden Schritt die ligierten Sequenzabschnitte in einer PCR-Reaktion unter Zugabe von Primeroligonukleotiden mit der Sequenz TGTCATCCTGTTGTCATG und mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase amplifiziert. Die PCR-Reaktion wird im Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit folgenden Parametern durchgeführt: Denaturierung: 15 Minuten (min) bei 96 °C, die folgenden Zyklen werden 45 mal wiederholt: 60 Sekunden (sec) bei 96 °C, 45 sec bei 51 °C, 60 sec bei 72 °C und anschliessende Inkubation für 10 Minuten bei 72 °C.

Im nächsten Schritt wird die DNA unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfit, Disulfit) derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion 1.7 M Bisulfitlösung verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im letzten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen Lösung. Bevorzugt wird anschliessend eine Desulfonierung der DNA (20 min, 96 °C) bei pH 9 durchgeführt. Im letzten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe mit den nun zu der Bisulfit behandelten DNA komplementären Primern wiederum in einer Polymeraseketтenreaktion. Die PCR-Reaktion wird im Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit folgenden Parametern durchgeführt: Denaturierung: 15 Minuten (min) bei 96 °C, die folgenden Zyklen werden 45 mal wiederholt: 60 Sekunden (sec) bei 96 °C, 45 sec bei 42 °C, 60 sec bei 72 °C und anschliessende Inkubation für 10 Minuten bei 72 °C (Fig. 1b).

Soll eine DNA mit unbekanntem Methylierungsstatus untersucht werden (Fig 2), so ist die geschnittene und mit Adaptoren ligierte DNA (Fig 1a) mit Bisulfit zu behandeln. Nach der Bisulfitbehandlung erfolgt eine PCR, wobei die Primeroligonukleotide mit den Sequenzen TGTTATTTTGTTGTTTAG und TATCATCCTATTATGATA verwendet werden. Die PCR-Reaktion wird im Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg) mit folgenden Parametern durchgeführt: Denaturierung: 15 Minuten (min) bei 96 °C, die folgenden Zyklen

werden 45 mal wiederholt: 60 Sekunden (sec) bei 96 °C, 45 sec bei 42 °C, 60 sec bei 72 °C und anschliessende Inkubation für 10 Minuten bei 72 °C.

Sowohl im Fall der runtermethylierten Referenz DNA als auch im Fall einer DNA mit unbekanntem Methylierungsstatus beruht der Nachweis des Hybridisierungsprodukts auf Cy5 fluoreszenzmarkierten Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt.

Legenden zu den folgenden Figuren:

Figur 1a

a. Restriktionsenzym, NlaIII
b. Adaptor 1 5'-TGTCATCCTGTTGT, Ligase z.B. T4-DNA
c. Klenow Enzym (DNA Polymerase I), dNTP's, Puffer
d. Reinigung (Qiaquick Reinigungskit)

Figur 1b

e. PCR, Primer 5'-TGTCATCCTGTTGTCATG, dNTP's, Puffer, TAQ
f. Reaktion mit Hydrogensulfit
g. PCR, Primer 1 5'-TGTTATTTTGTTGTTATG, Primer 2 5'-TATCATCCTATTATCATA

Figur 2

a. Reaktion mit Hydrogensulfit
b. PCR, Primer 1 5'-TGTTATTTTGTTGTTATG, Primer 2 5'-TATCATCCTATTATCATA

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bereitstellung von demethylierter DNA als Referenzmaterial für die Analyse von Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben unter Verwendung komplexer Amplifikationen, dadurch gekennzeichnet, dass die folgenden Verfahrensschritte ausgeführt werden:

a) eine genomische DNA-Probe wird amplifiziert, wobei entweder sehr kurze oder degenerierte Oligonukleotide oder zu Adaptoren komplementäre Oligonukleotide jeweils als Primer verwendet werden, in letzterem Fall wird die genomische DNA vor der Amplifikation mit einem Restriktionsenzym geschnitten und die Adaptoren an die Enden der entstandenen DNA Fragmente ligiert;

b) die Amplifikate werden chemisch derart behandelt, dass nicht methylierte Cytosinbasen in Uracil oder in eine andere im Hybridisierungsverhalten dem Cytosin unähnliche Base umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen im wesentlichen unverändert bleiben;

c) die chemisch vorbehandelten Amplifikate werden wiederum amplifiziert, wobei entweder mehrere spezifisch hybridisierende Oligonukleotide oder aber zu den Adaptoren komplementäre Oligonukleotide jeweils als Primer verwendet werden, im letzteren Fall werden die Adaptoren gemäß den Regeln des Schrittes 1b ebenfalls umgewandelt.

2. Verfahren zur Analyse von Cytosin-Methylierungen in genomischen DNA-Proben unter Verwendung komplexer Amplifikationen mittels Adaptoren, dadurch gekenn-

zeichnet, dass die folgenden Verfahrensschritte ausgeführt werden:

a) eine zu untersuchende genomische DNA-Probe wird mittels eines Restriktionsenzyms geschnitten;

b) an die Enden der DNA-Fragmente werden Adaptoren ligiert und die Probe nachfolgend geteilt, der erste Teil der Probe wird mittels zu den Adaptoren komplementären Oligonukleotiden als Primer amplifiziert, wohingegen der zweite Teil der Probe nicht amplifiziert wird;

c) die beiden Teile der Probe werden chemisch separat derart behandelt, dass nicht methylierte Cytosinbasen in Uracil oder in eine andere im Hybridisierungsverhalten dem Cytosin unähnliche Base umgewandelt werden, während die 5-Methylcytosinbasen im wesentlichen unverändert bleiben;

d) die chemisch behandelten beiden Teile der Probe werden amplifiziert, wobei zu den Adaptoren nach der chemischen Behandlung komplementäre Oligonukleotide als Primer verwendet werden;

e) beide Teile der Probe werden analysiert, wobei der erste Teil der Probe den Referenzwert für einen Metylierungsgrad von 0% liefert und der zweite Teil der Probe den Messwert, der dem Methylierungsgrad in der ursprünglichen genomischen DNA-Probe im wesentlichen entspricht.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass für die Amplifikation eine PCR (Polymerasekettenreaktion) eingesetzt wird.

4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Polymerasekettenreaktion eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet wird.

5 Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die chemische Behandlung mit Natriumbisulfit (=Hydrogensulfit, Disulfit) durchgeführt wird.

7. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikate nach der chemischen Behandlung durch Bindung an eine Festphase oder ein Gel und Waschschritte von den Reagenzien und anderen Bestandteilen des Reaktionsgemisches abgetrennt werden.

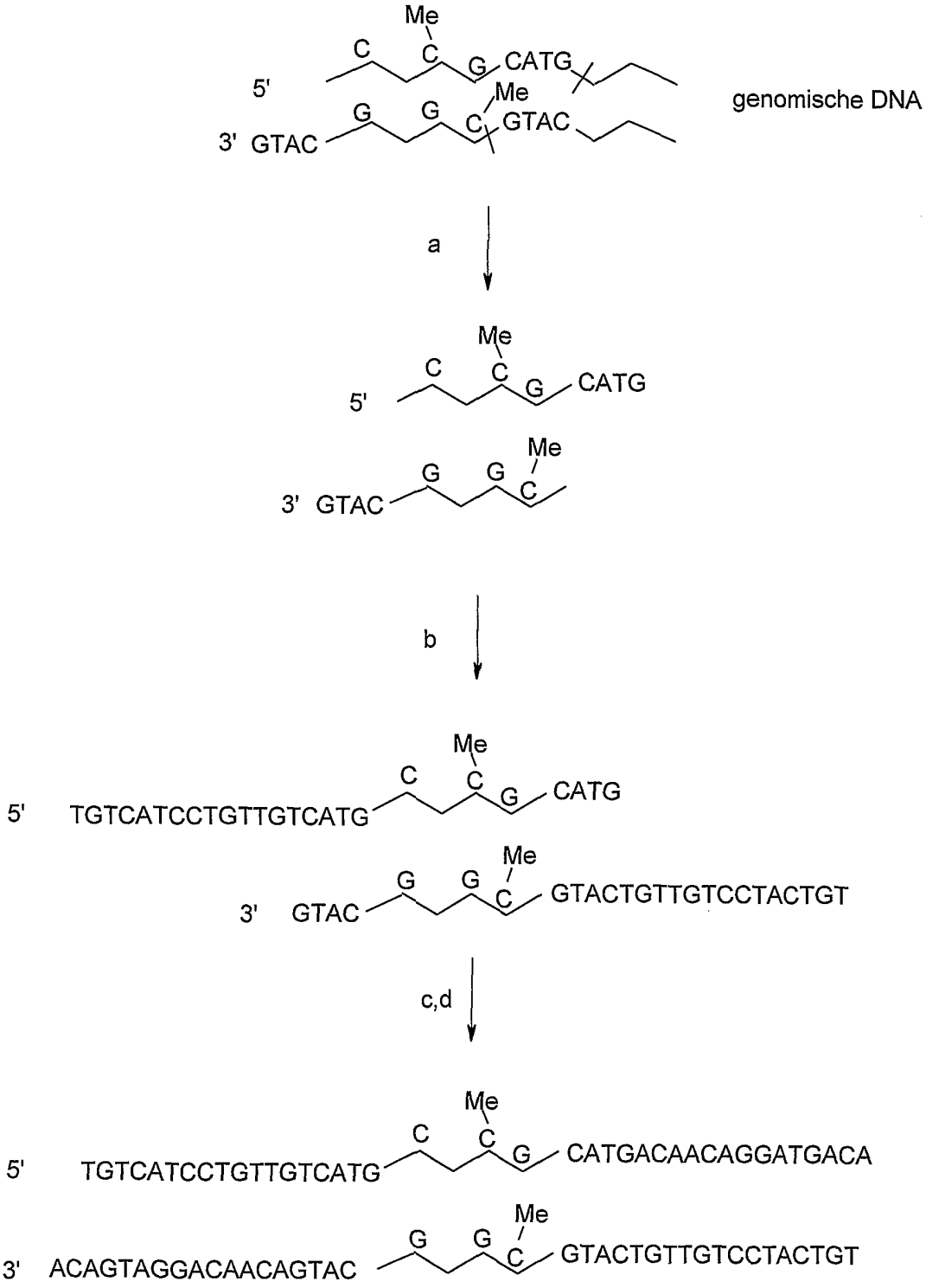
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass nach der chemischen Behandlung die Reagenzien und die anderen Bestandteile des Reakionsgemisches derart verdünnt werden, dass sie in der nachfolgenden Amplifikation nicht mehr hinderlich sind, jedoch die Konzentration des behandelten Amplifikates nach wie vor für die zweite Amplifikation ausreicht.

9. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass eine der folgenden Restriktionsendonukleasen verwendet wird: RsaI, DpnI, DpnII, MseI, Sau3AI, AluI, NlaIII, HaeIII, BfaI, Tsp509I, BstU1 oder MboI.

10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die hergestellte demethylierte Referenz-DNA auf die gleiche Weise analysiert wird wie eine zu untersuchende Proben-DNA und in der Analyse den Vergleichswert für einen Methylierungsgrad von 0% liefert.

11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich eine enzymatisch aufmethylierte DNA, die im folgenden gleichermaßen wie die Proben-DNA behandelt wurde, als Referenz für einen Methylierungsgrad von 100% verwendet wird.

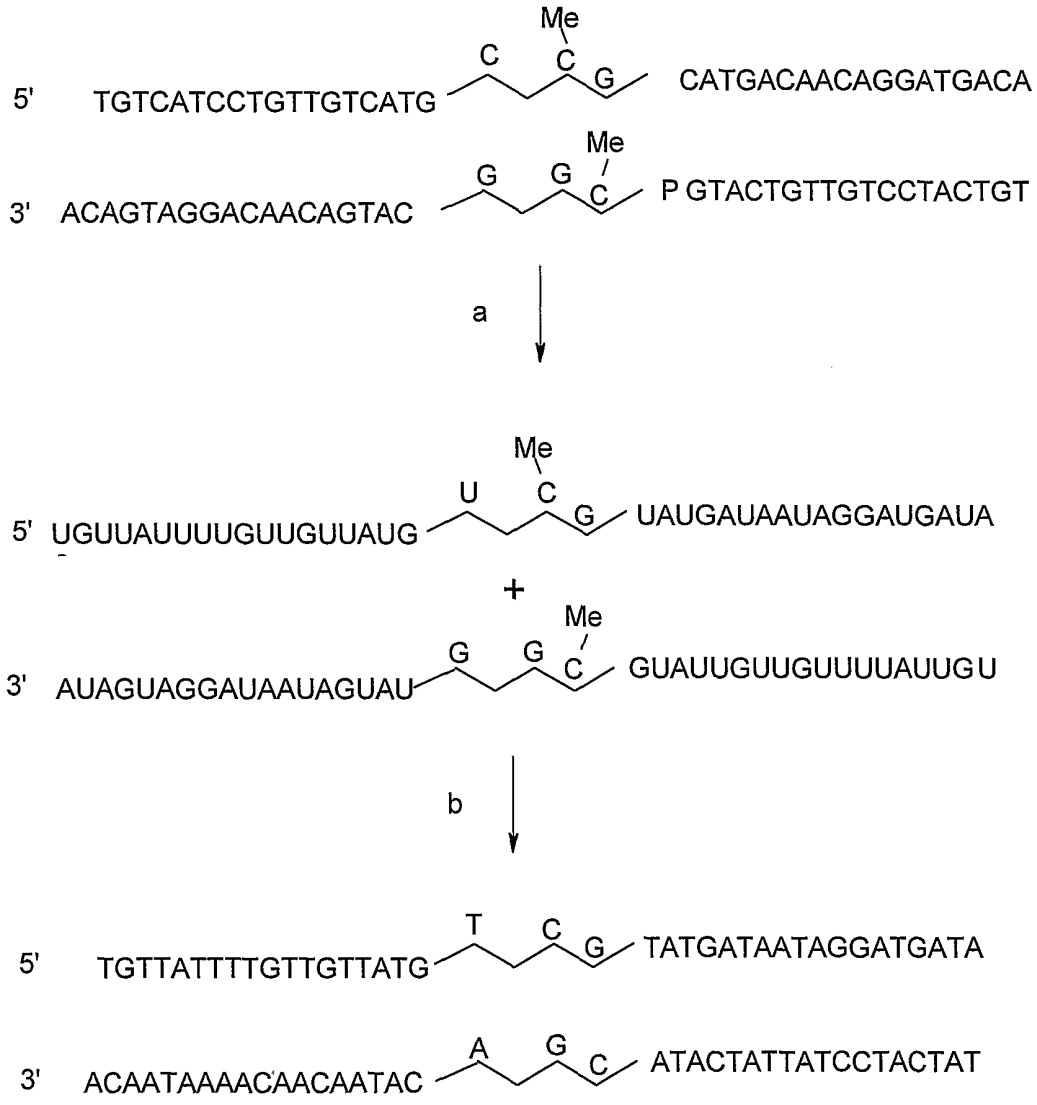
*Figur 1a*


Me
C
C
G
CATG
5'
Me
G
G
C
GTAC
3' GTAC
genomische DNA
a
Me
C
C
G
CATG
5'
Me
G
G
C
3' GTAC
b
Me
C
C
G
CATG
5' TGTCATCCTGTTGTCATG
Me
G
G
C
3' GTAC
GTACTGTTGTCCTACTGT
c,d
Me
C
C
G
CATGACAACAGGATGACA
5' TGTCATCCTGTTGTCATG
Me
G
G
C
3' ACAGTAGGACAACAGTAC
GTACTGTTGTCCTACTGT

*Figur 1b* (Referenz-DNA)



*Figur 2*


Me
C C G
5' TGTCATCCTGTTGTCATG CATGACAACAGGATGACA
Me
G G C
3' ACAGTAGGACAACAGTAC P GTACTGTTGTCCTACTGT
a
Me
U C G
5' UGUUAUUUUGUUGUUAUG UAUGAUAAUAGGAUGAUA
+
Me
G G C
3' AUAGUAGGAUAAUAGUAU GUAUUGUUGUUUUAUUGU
b
T C G
5' TGTTATTTTGTTGTTATG TATGATAATAGGATGATA
A G C
3' ACAATAAAACAACAATAC ATACTATTATCCTACTAT

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Epigenomics AG

<120> Verfahren zur Quantifizierung von Cytosin-Methylierungen in komplex amplifizierter genomischer DNA

<130> EO1-1251-WO

<160> 28

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: künstliche Sequenz

<400> 1
ttataatgtt tt 12

<210> 2
<211> 12
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 2
taatatacta at 12

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
tgtcatcctg ttgtcatg 18

<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 4
tgttattttg ttgtttag 18

<210> 5

<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 5
tatcatccta ttatgata 18

<210> 6
<211> 14
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 6
tgtcatcctg ttgt 14

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 7
tgttattttg ttgttatg 18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 8
tatcatccta ttatcata 18

<210> 9
<211> 12
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Base 4: d steht für Methylcytosin

<400> 9
dcddgcatgd dd 12

<210> 10

<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Base 8: d steht für Methylcytosin

<400> 10
dddcatgdgd gcatg 15

<210> 11
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Base 21: d steht für Methylcytosin

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 11
tgtcatcctg ttgtcatgcd dgcatg 26

<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Base 19: d steht für Methylcytosin

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 12
tgtcatcctg ttgtcatgdg dgcatg 26

<210> 13
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Base 21: n steht für Methylcytosin

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 13
tgtcatcctg ttgtcatgcd dgcatgacaa caggatgaca 40

<210> 14
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Base 19: d steht für Methylcytosin

<220>

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 14
tgtcatcctg ttgtcatgdg dgcatgacaa caggatgaca 40

<210> 15
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Base 21: d steht für Methylcytosin

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 15
tgtcatcctg ttgtcatgcd dgcatgacaa caggatgaca 40

<210> 16
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Base 19: n steht für Methylcytosin

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 16
tgtcatcctg ttgtcatgdg dgcatgacaa caggatgaca 40

<210> 17
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 17
tgtcatcctg ttgtcatgcd cgcatgacaa caggatgaca 40

<210> 18
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 18
tgtcatcctg ttgtcatgcg dgcatgacaa caggatgaca 40

<210> 19
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination: DNA, künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 19
uguuauuuug uuguuaugun uguaugauaa uaggaugaua 40

<210> 20
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:DNA, künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 20
uguuauuuug uuguuaugug nguaugauaa uaggaugaua 40

<210> 21
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 21
tgttattttg ttgttatgtd tgtatgataa taggatgata 40

<210> 22
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 22

tatcatccta ttatcataca dacataacaa caaaataaca 40

<210> 23
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 23
tgtcatcctg ttgtcatgcd dgcatgacaa caggatgaca 40

<210> 24
<211> 41
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 24
tgtcatcctg ttgtcatgnd gdgcatgaca acaggatgac a 41

<210> 25
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:DNA, künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 25
uguuauuuug uuguuaugud dguaugauaa uaggaugaua 40

<210> 26
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung des Moleküls der DNA/RNA-Kombination:DNA, künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 26
uguuauuuug uuguuaugdg dguaugauaa uaggaugaua 40

<210> 27

<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 27
tgttattttg ttgttatgtd cgtatgataa taggatgata 40

<210> 28
<211> 40
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:künstliche Sequenz

<400> 28
tatcatccta ttatcatacg dacataacaa caaaataaca 40