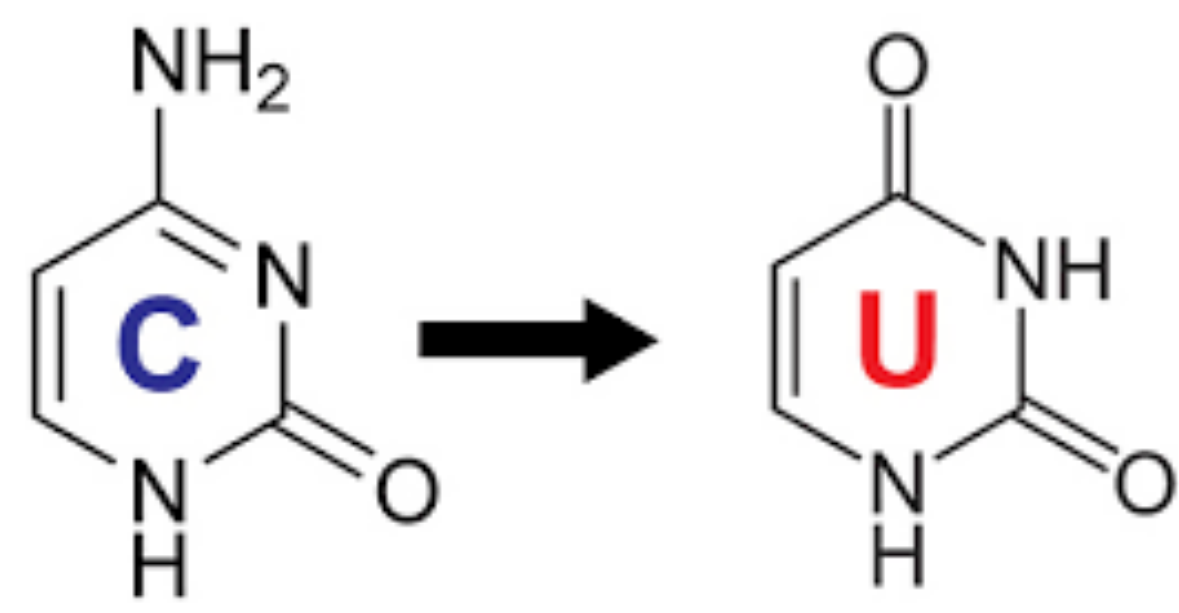


Bisulfit-Konvertierung – Methodenvergleich des Kits von Zymo Research mit dem Kit von Qiagen



Enya Petrolo, BMA 20-23

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Diagnostische Molekularpathologie, Universitätsspital Zürich

1. Zusammenfassung

Am Universitätsspital Zürich wird zur Untersuchung der DNA-Methylierung der Methylation Array angeboten. Vor der Analyse muss die DNA mit einer Bisulfitlösung konvertiert werden. Diese Arbeit beschreibt den Vergleich der herkömmlichen Qiagen-Methode mit dem Kit von Zymo Research bezüglich Qualitätswerte in der Datenauswertung des Methylation Arrays. Ziel der Arbeit war, zu überprüfen, ob sich der Wechsel zum Kit von Zymo Research lohnt. Die Stichprobe bestand aus 3 DNA-Proben aus Formalin-fixiertem Paraffin-eingebettetem (FFPE) Gewebe und 3 DNA-Proben aus Frischgewebe. Anhand des Methodenvergleichs wurde ersichtlich, dass mit dem Kit von Zymo Research der Klassifizierungsscore bei DNA-Proben aus FFPE-Gewebe um mehr als 20 Prozent verbessert werden kann.

2. Einleitung

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um einen epigenetischen Mechanismus, bei welchem eine Methylgruppe an die C5 Position des Cytosins gelagert wird [1]. Findet die DNA-Methylierung in einer Promotorregion statt, wird das entsprechende Gen vermindert exprimiert und transkribiert. Dieser Prozess tritt physiologisch in menschlichen Zellen auf und spielt eine wichtige Rolle bei der Zelldifferenzierung und Entwicklung [2]. Eine aberrante DNA-Methylierung wird aufgrund der Auswirkung auf die Genexpression häufig mit verschiedenen Krankheitsprozessen in Verbindung gebracht, z.B. wenn Gene stillgelegt werden, die für DNA-Reparaturproteine codieren [3].

Um herauszufinden, welche Abschnitte der DNA methyliert sind und welche nicht, wird im Labor vor der Analyse eine Bisulfit-Konvertierung durchgeführt. Dabei werden unmethylierte Cytosinbasen zu Uracil umgewandelt, methylierte Cytosinbasen bleiben hingegen resistent [4].

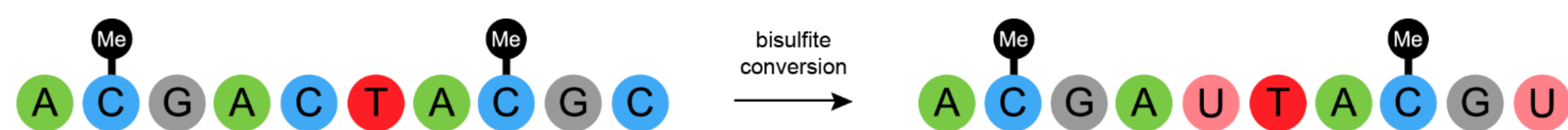


Abb. 1 Funktionsprinzip der Bisulfit-Konvertierung (Wolff et al., 2023)

Nach der Konvertierung muss die DNA noch amplifiziert werden. Im Labor wurde dafür der Methylation Array eingesetzt. Die Analyse ermöglicht die Quantifizierung der DNA-Methylierung auf genomweiter Ebene [5].

Mit der künstlichen Intelligenz «Heidelberg Brain Tumor Classifier», welche vom Hopp-Kindertumorzentrum zusammen mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum und dem Universitätsklinikum Heidelberg entwickelt wurde, kann anhand des DNA-Methylierungsmuster der Hirntumor klassifiziert werden [6].

3. Ziel und Fragestellungen

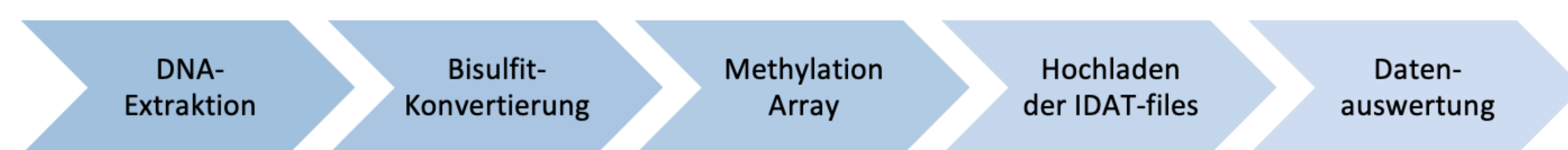
Ziel: Überprüfung der Einführung des Kits von Zymo Research anhand eines Methodenvergleichs.

Fragestellung 1: Kann mit dem Kit von Zymo Research bei DNA-Proben aus FFPE-Gewebe ein höherer Klassifizierungsscore in der Datenauswertung des Methylation Arrays erreicht werden als mit dem bisherigen Kit von Qiagen?

Fragestellung 2: Bleibt der Klassifizierungsscore in der Datenauswertung des Methylation Arrays bei DNA-Proben aus Frischgewebe, welche mit dem Kit von Zymo Research konvertiert wurden, so hoch wie mit dem bisherigen Kit von Qiagen?

4. Material und Methodik

Für den Methodenvergleich wurden je drei FFPE- und Frischgewebe-Proben aus Patientinnen und Patienten mit Hirntumoren verwendet. Aus den zu testenden Gewebeproben wurde vorgängig die DNA extrahiert und deren Konzentration gemessen. Alle DNA-Proben wurden mit beiden Kits konvertiert und anschliessend mit dem Methylation Array analysiert. Die generierten IDAT-files wurden zur methylierungsbasierten Klassifizierung von neuropathologischen Tumoren auf molecularneuropathology.org hochgeladen und bezüglich Klassifizierungsscore ausgewertet.



5. Ergebnisse

In Abbildung 2 sind für jede Probe die erreichten Scores für die Klassifizierung des Hirntumors bei der Analyse mit dem Methylation Array aufgeführt. Bei den Proben MV23.7, MV23.9 und MV23.48 handelt es sich um FFPE-Gewebeproben. MV23.12, MV23.13 und MV23.49 sind Proben aus Frischgewebe.

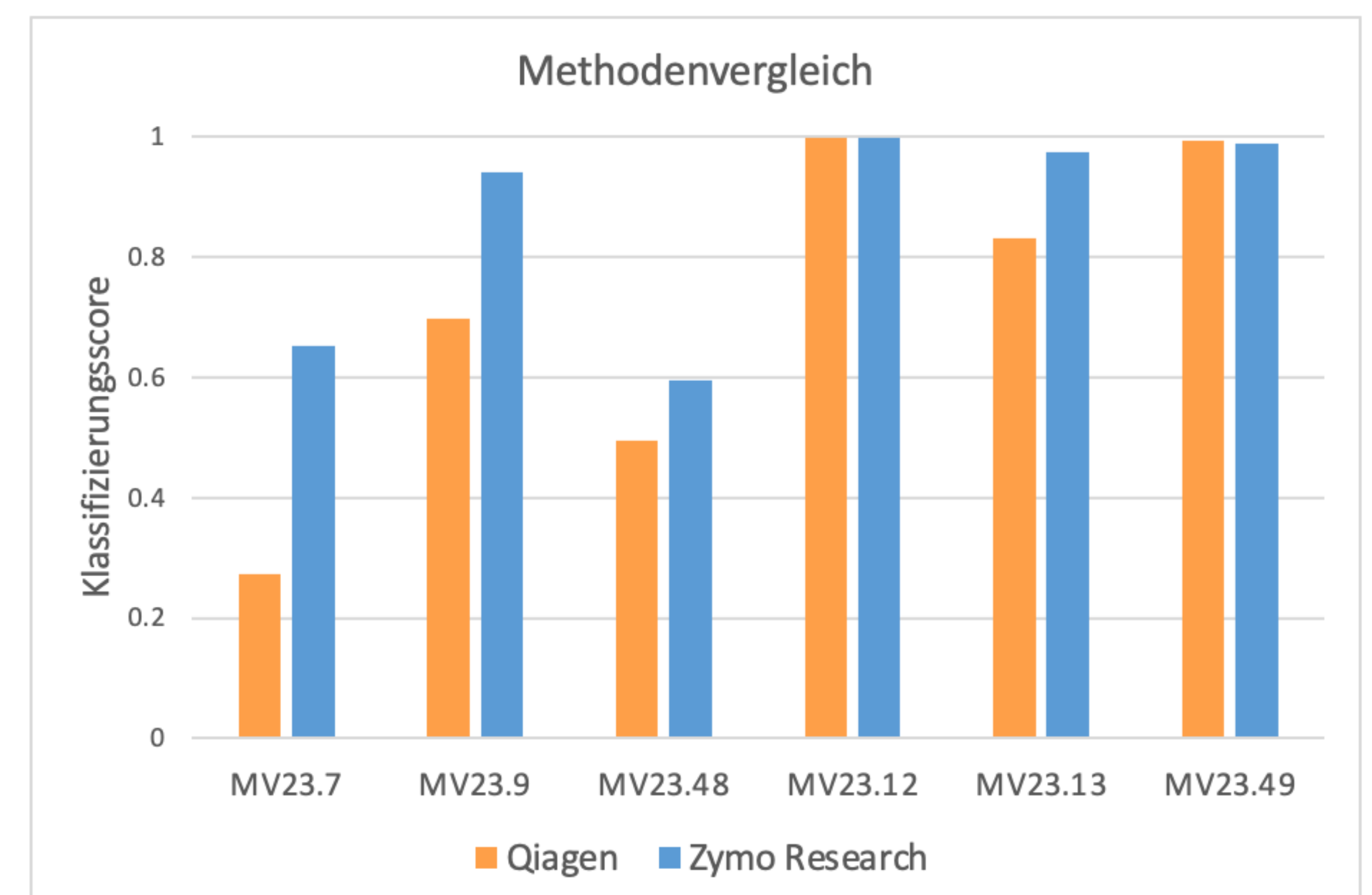


Abb. 2 Ergebnisse der Klassifizierungsscores (Petrolo, 2023)

6. Diskussion

In Abbildung 2 ist ersichtlich, dass mit dem Kit von Zymo Research bei allen Proben aus FFPE-Gewebe ein höherer Klassifizierungsscore erzielt werden konnte. Bei den Proben aus Frischgewebe konnten die hohen Werte erhalten bleiben.

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs zeigen auf, dass sich das Kit von Zymo Research bezüglich der Qualitätswerte in der Datenauswertung des Methylation Arrays dazu eignet, in der Diagnostik eingesetzt zu werden.

Für eine bessere Aussagekraft sollten weitere Proben analysiert und interpretiert werden.

Referenzen

- [1] Moore et al. (2013). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- [2] LABO. (2013). *DNA-Methylierungsanalyse auf dem Vormarsch*. LABO.
- [3] Portela, A., & Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology*, 28(10), 1057-1068. <https://doi.org/10.1038/nbt.1685>
- [4] Ammerpohl et al. (2013). Der Über-Code der DNA: Epigenetische Mechanismen und deren Bedeutung für die Entstehung von Krankheiten. *LaboratoriumsMedizin*, 37(6), 317-328. <https://doi.org/10.1515/labmed-2013-0048>
- [5] Illumina. (2023). *Infinium MethylationEPIC v2.0 Kit*. Illumina.
- [6] Universitätsklinikum Heidelberg. (2023). *KI-gestützte Krebsdiagnose für Kinder und Jugendliche*. Universitätsklinikum Heidelberg.

Abbildungen

- Titelbild: Zymo Research. (2015). A comprehensive guide to bisulfite-converted DNA amplification.
 Abb. 1 Wolff, J., & Le Bras, Y. (2023). *Introduction to DNA Methylation data analysis*. Galaxy Training.
 Abb. 2 Petrolo, E. (2023). *Ergebnisse der Klassifizierungsscores*. medi.