

DNS-metiláció – microarray-ek értékelése

Sztupinszki Zsófia

A DNS-metiláció során a citozin pirimidin gyűrűjének 5-ös szénatomjához a DNS-metiltransferáz enzimek által metil csoport kapcsolódik. Ez a metiláció a CpG dinukleotidok (azaz amikor egy citozin és guanin nukleotid szomszédos) esetében figyelhető meg. A CpG dinukleotidok nem véletlenszerűen, egyenletes fordulnak elő a genomban. Azokat a 0.5-5 kilobázis hosszúságú DNS szakaszokat, melyekben a CpG dinukleotidok aránya legalább 60%, CpG szigeteknek nevezzük. Ezek a régiók gyakran a gének 5' promóter régióiban helyezkednek el, ezáltal befolyásolják a transzkripció faktorok bekötődését, így szabályozzák a gének átíródását, expresszióját. A metil csoport jelenléte akadályozza a transzkripció faktorok bekötődése, metil-CpG-kötő domainnel rendelkező fehérjék bekapcsolódása, és a kromatinszerkezet megváltozása révén csökkenti a szabályozása alatt álló gén átírását. Bár a genomban a CpG szigetek „alap-állapotban” nem metiláltak bizonyos gének promótere adott szövetre jellemzően metilált. Így a metiláltság szövetspecifikus mintázatot alkot. Amennyiben egy szövetspecifikusan metilált CpG sziget elveszti a metiláltságát, a szabályozott gén átíródása felszabadul a metilációs gátlás alól. Ha ez a demetilizáció egy protoonkogén promoterében történik, az a sejtek malignus transzformációját fokozhatja. Más gének (például tumorszupresszorok) esetében a promóter hipermetilációja járul hozzá a daganat kialakulásához, progressziójához.

DNS-metiláció meghatározás legelterjedtebb módszerei:

Na-biszulfát kezelésen alapuló

1. Metiláció specifikus PCR (MSP)

Az MSP reakció során a Na-biszulfát hatására a CpG szigetek nem metilált citozinja uracilra cserélődik. Ez a nukleotid eltérés PCR-rel mutatható ki.

2. Teljes genom biszulfát-szekvenálás (BS-Seq)

A Na-biszulfáttal történő kezelés után a vizsgált DNS szakaszok nukleotidjait szekvenálással határozzák meg.

3. Piroszekvenálás

A minta Na-biszulfáttal történő kezelés után következik a piroszekvenálás.

Egy nukleotid beépülését követően felszabadul egy pirofoszfát molekula, mely jelenlétét a luciferáz enzim segítségével fényfelvillanás jelzi. Ha metilált a vizsgált nukleotid, akkor elmarad a felvillanás: Ez a módszer napjainkban az egyik legelterjedtebb, előnye, hogy a DNS-metiláltság mértéke kvantitatívan meghatározható.

4. High Resolution Melt Analysis (HRM, HRMA)

A Na-biszulfát kezelést követően, a termékek PCR-rel történő amplifikációja következik. Az minták eltérő metiláltsága tömegspektrométerrel detektálható olvadáspont különbséget eredményez.

5. Illumina microarray-ek [1]

Enzim alapú:

1. HELP Assay (HpaII tiny fragment Enrichment by Ligation-mediated PCR)

A DNS HpaII és az MspI restriktív enzimekkel történő emésztése után PCR-rel kimutathatóak az eltérő termékek. (A HpaII enzim csak az olyan 5'-CCGG-3' DNS szakaszokat bontja, ahol a CpG nukleotid nem metilált, a MspI kontroll szerepét tölti be)

Antitest alapú:

1. Metilált-DNS immunprecipitáció (MeDIP, mDIP)

5-metil-citozin ellenes antitestek segítségével izolálják a metilált DNS szakaszokat, melyeket a következő lépésben vagy microarray-el (MeDIP-chip) vagy szekvenálással (MeDIP-seq) azonosítanak.

Glioblasztóma multiforme és DNS metiláltság

A metilációs vizsgálatok az onkológiában a klinikumban való megjelenése legkorábban a glioblasztóma multiforme-ban szenvedő betegek terápiájának megválasztása során várható. 2003 óta több klinikai vizsgálat igazolta, hogy az MGMT (O-methylguanine-DNA-methyltransferase) gén promóterének hipermetilációja jó prognózissal jár, fokozza az érzékenységet alkiláló ágensekkel (pl: temozolomid) szemben. [2-5]

Illumina 450k Methylation Array-ek értékelése:

A DNS-metiláció mérése microarray technológiával alapulhat az immunprecipitáció elvén (Agilent chip-ek) vagy Na-biszulfát kezelést követő PCR reakciókon (Illumina).

Az Illumina 450k Methylation microarray-el 477 ezer CpG sziget metiláltsága mérheti oligonukleotid próbák segítségével Na-biszulfát kezelést követően. Ez a chip Infinium I, és II típusú elrendezést is tartalmaz. Az Infinium I-es elrendezés esetében egy CpG-hez egy próbapár (metilálthoz és nem metilálthoz illeszkedő) tartozik, ezek a próbák egyszínűek. Az Infinium II-es esetében egy CpG-hez egy próba tartozik, mely viszont két színben kerül leolvasásra.

Egy próba metiláltságát béta és M-értékkal szokták jellemezni.

A béta-érték a metilált és az összes (nem metilált plusz metilált) próbák intenzitásának az aránya egy próba esetében. A béta értéke így 0 és 1 közötti ahol a 0 azt jelenti, hogy a CpG sziget összes példánya, másolata a mintában metilálatlan volt.

Az M-értéke egy próbának a metilált és a nem metilált próbák arányának a kettes alapú logaritmus. A 0 közeli M-érték azt jelenti, hogy a metilált és metilálatlan molekulák száma azonos, pozitív érték esetén a metilált DNS szakasz volt túlsúlyban.

Az Illumina a béta-érték használatát ajánlja, azonban a béta-értékek eloszlása a megkötések szigorúan véve nem teszi lehetővé normál eloszláson alapuló tesztek (pl t-teszt) elvégzését. A metiláltsági állapot megállapításánál a vizsgálat kérdését figyelembe véve kell döntenie a béta- és az M-érték használata között. [6]

Az értékelés során hasznos R csomagok: lumi [7], wateRmelon[8], methylumi, minfi, IMA[9].

A kutatás a TÁMOP 4.2.4.A/1-11-1-2012-0001 azonosító számú „Nemzeti Kiválóság Program – Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése országos program” című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.

Irodalom:

1. Bibikova, M., et al., High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res*, 2006. 16(3): p. 383-93.
2. Hegi, M.E., et al., Clinical trial substantiates the predictive value of O-6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide. *Clin Cancer Res*, 2004. 10(6): p. 1871-4.
3. Hegi, M.E., et al., Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J Clin Oncol*, 2008. 26(25): p. 4189-99.

4. Everhard, S., et al., MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Ann Neurol*, 2006. 60(6): p. 740-3.
5. Weller, M., et al., MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol*, 2010. 6(1): p. 39-51.
6. Du, P., et al., Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis. *BMC Bioinformatics*, 2010. 11: p. 587.
7. Du, P., W.A. Kibbe, and S.M. Lin, lumi: a pipeline for processing Illumina microarray. *Bioinformatics*, 2008. 24(13): p. 1547-8.
8. Pidsley, R., et al., A data-driven approach to preprocessing Illumina 450K methylation array data. *BMC Genomics*, 2013. 14: p. 293.
9. Wang, D., et al., IMA: an R package for high-throughput analysis of Illumina's 450K Infinium methylation data. *Bioinformatics*, 2012. 28(5): p. 729-30