



Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie

Biotechnologie



Glioblastomen onder de loep: MGMT-promotor hypermethylering

Lene Salimans

Promotoren:

Prof. Dr. E.J. Speel

Ing. G.M.J.M Roemen

Dr. ir. I. Smets.

academisch ziekenhuis Maastricht

academisch ziekenhuis Maastricht

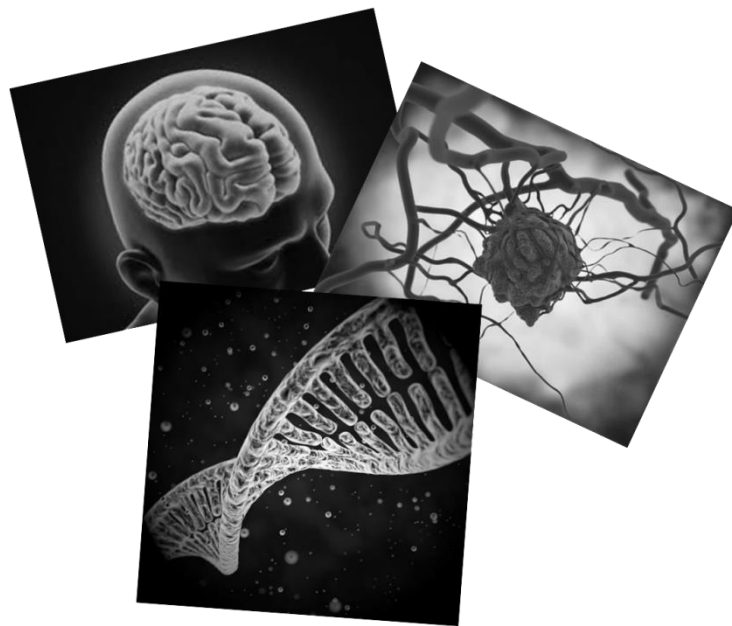
Hogeschool PXL





Professionele Bachelor Agro- en Biotechnologie

Biotechnologie



Glioblastomen onder de loep: MGMT-promotor hypermethylering

Lene Salimans

Promotoren:

Prof. Dr. E.J. Speel

Ing. G.M.J.M Roemen

Dr. ir. I. Smets.

academisch ziekenhuis Maastricht

academisch ziekenhuis Maastricht

Hogeschool PXL



VOORWOORD

Mijn opleiding Agro- en biotechnologie eindigt met een bachelorproef. Bij deze opdracht liep ik, Lene Salimans, een half jaar stage op de afdeling pathologie in het academisch ziekenhuis Maastricht (azM). Hierbij voer ik zelfstandig een project uit.

Tijdens deze bachelorproef wordt de mutL, E. coli, homolog of, 1'(MLH1)-analyse met betrekking tot promotor hypermethylering verder geoptimaliseerd. Met deze analyse kan een beter onderscheid gemaakt worden tussen sporadische en erfelijke colontumoren. Daarnaast wordt getracht om promotor hypermethylering van het O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)-gen aan te tonen. Zo kan met behulp van MGMT-promotor hypermethylering een betere prognose gesteld worden bij de behandeling van hersentumoren met chemotherapie.

Graag zou ik mijn promotoren Prof. Dr. Speel en Ing. Roemen willen bedanken voor de kans die zij mij hebben gegeven om mee te werken aan dit project. Door dit project heb ik zeer veel bijgeleerd, zowel praktisch als theoretisch. Ook wil ik hen bedanken voor de begeleiding en steun doorheen dit project. Verder wil ik Dr. Ir. Smets van hogeschool PXL bedanken voor de goede begeleiding en het vele geduld doorheen deze bachelorproef. Daarnaast wil ik mijn begeleidster in het labo, Mevrouw Pirens, en de andere analisten bedanken. Ze stonden altijd klaar om mijn vragen te beantwoorden, maar ook voor een babbeltje te maken.

SAMENVATTING

Het onderzoek naar kanker en de behandeling ervan is de laatste jaren in opmars. Met nieuwe technologieën en inzichten wordt de opsporing van kanker gemakkelijker en doeltreffender. Hierdoor kan een behandeling sneller en efficiënter gestart worden.

Hersentumoren zijn over het algemeen zeer moeilijk te behandelen. De tumoren zijn vaak vrij resistent waardoor de patiënten meestal overlijden binnen het jaar. *Glioblastoma multiforme* is de meest voorkomende agressieve vorm binnen de hersentumoren. Om de overlevingskansen te vergroten, is het nodig dat de juiste behandeling gekozen wordt. Dit kan door aantonen van MGMT-promotor hypermethylering.

In dit project wordt getracht om promotor hypermethylering van het MGMT-gen aan te tonen. Promotor hypermethylering is een veelvoorkomend verschijnsel in tumorcellen. Hierbij wordt de promotor-regio van het gen gehypermethyleerd, waardoor het gen zijn functie niet meer naar behoren kan uitvoeren.

Vooreerst wordt de bisulfietbehandeling gevalideerd omwille van een nieuwe kit. Met deze behandeling wordt een onderscheid gemaakt tussen gemethyleerd en ongemethyleerd DNA. Zo kan de methylatiestatus van het DNA bepaald worden.

Verder wordt de MLH1-analyse opnieuw geoptimaliseerd omwille van de nieuwe bisulfietbehandeling. Met deze analyse wordt de methylatiestatus van het MLH1-gen, een *mismatch repair* gen, onderzocht. Een verhoogde methylatie van de promotor van het MLH1-gen kan het gen inactiveren. Hierdoor worden microsatellieten instabiel. Een hoge instabiliteit van microsatellieten kan in verband gebracht worden met het Lynch syndroom, een erfelijke vorm van darmkanker. Zo kan met deze analyse een betere prognose voor het Lynch syndroom gesteld worden.

De optimalisatie van de MLH1-analyse dient echter als basis voor het aantonen van MGMT-promotor hypermethylering. Het MGMT-gen is betrokken bij DNA-herstel. Bij methylatie van de promotor van dit gen, zal geen DNA-herstel optreden. Dit is positief voor de behandeling van hersentumoren met behulp van temozolomide.

De validatie van de bisulfietbehandeling gebeurt op patiëntstalen waar reeds de oude bisulfietbehandeling op uitgevoerd werd.

Na de validatie van de bisulfietbehandeling wordt overgegaan naar de optimalisatie van de MLH1-analyse. Hierbij wordt getracht om de methylatiestatus van het MLH1-gen aan te tonen met *methylation specific* PCR en *pyrosequencing*. Als PCR-methode wordt geopteerd voor een qPCR. Verder wordt getracht een cut-off voor deze analyses te stellen aan de hand van de resultaten van patiëntstalen en een verdunningsreeks.

Na de optimalisatie van de MLH1-analyse wordt getracht om promotor hypermethylering van het MGMT-gen aan te tonen. Hierbij wordt eveneens de methylatiestatus van het gen aangetoond met *methylation specific* PCR en *pyrosequencing*. Voor deze analyses wordt ook een cut-off gesteld.

Uit de validatie van de bisulfietbehandeling blijkt dat de nieuwe behandeling efficiënter is.

Bij de optimalisatie van de MLH1-analyse is de methylatiestatus van het gen zowel met qPCR als *pyrosequencing* bepaald. Verder is getracht een cut-off op te stellen voor deze analyses.

Ook voor het MGMT-gen is de methylatiestatus bepaald met zowel qPCR als *pyrosequencing*. Voor deze analyses moeten nog verdere testen uitgevoerd worden. Zo moet voor de cut-off bepaling een grotere reeks patiëntstalen worden geanalyseerd.

Inhoudsopgave

Voorwoord	4
Samenvatting.....	5
Lijst met afkortingen	9
1. Inleiding	10
2. Literatuurstudie.....	12
2.1. Epigenetica	12
2.1.1. Epigenetische mechanismen.....	12
2.2. Kanker.....	13
2.2.1. Genen die betrekking hebben op het veroorzaken van kanker.....	14
2.2.2. Methylering en kanker	15
2.3. Colonkanker.....	16
2.3.1. Erfelijke en sporadische colonkanker.....	17
2.3.2. Erfelijk colonkanker: Het Lynch syndroom.....	17
2.4. Hersentumoren	21
2.4.1. Soorten en types van hersentumoren.....	22
2.4.2. Graden bepaald door <i>World Health organization</i> (WHO-graden).....	22
2.4.3. Genen die betrekking hebben op het veroorzaken van hersentumoren.....	23
2.5. Methoden die toegepast worden in kankeronderzoek	28
2.5.1. Isolatie van het DNA.....	28
2.5.2. <i>Specimen control size</i> (SCS)-ladder.....	28
2.5.3. Bisulfietbehandeling.....	29
2.5.4. <i>Methylation specific</i> PCR	30
2.5.5. <i>Pyrosequencing</i>	34
2.6. Plan van aanpak.....	38
2.6.1. Optimalisatie van MLH1-analyse.....	38
2.6.2. Aantonen promotor hypermethylering MGMT-gen	39

3.	Materiaal en methoden	40
3.1.	Stalen.....	40
3.1.1.	Algemeen.....	40
3.1.2.	Aantonen van promotor hypermethylering op MLH1- en MGMT-gen.....	42
3.2.	Methoden.....	46
3.2.1.	Aantonen van promotor hypermethylering op MLH1- en MGMT-gen.....	46
4.	Resultaten met bijhorende discussie	68
4.1.	MLH1-analyse.....	68
4.1.1.	Validatie nieuwe bisulfietbehandeling, EpiTect <i>bisulfite</i> kit.....	69
4.1.2.	qPCR als methode om promotor hypermethylering van het MLH1-gen te analyseren	72
4.1.3.	<i>Pyrosequencing</i> als methode om promotor hypermethylering van het MLH1-gen te analyseren	94
4.2.	MGMT-analyse	103
4.2.1.	qPCR als methode om promotor hypermethylering van het MGMT-gen te analyseren	103
4.2.2.	<i>Pyrosequencing</i> als methode om promotor hypermethylering van het MGMT-gen te analyseren	130
5.	Algemene discussie	142
5.1.	MLH1-analyse.....	142
5.1.1.	Validatie van de nieuwe bisulfietbehandeling, EpiTect <i>Bisulfite</i> kit	142
5.1.2.	qPCR als methode om promotor hypermethylering van het Mlh1-gen te analyseren	142
5.1.3.	<i>Pyrosequencing</i> als methode om promotor hypermethylering van het MLH1-gen te analyseren	144
5.2.	Aantonen van promotor hypermethylering van MGMT-gen.....	144
5.2.1.	qPCR als methode om promotor hypermethylering van het MGMT-gen te analyseren	145
5.2.2.	<i>Pyrosequencing</i> als methode om promotor hypermethylering van het MGMT-gen te analyseren	146
6.	Besluit.....	148
.	Literatuurlijst	150

Figurenlijst	158
Tabellenlijst	162
Bijlagen	165
Bijlage 1: Sequentie MLH1-gen	165
Bijlage 2: Sequentie MGMT-gen.....	168
Bijlage 3: Primers <i>nested</i> -PCR aangeduid op MLH1-sequentie.....	170
Bijlage 4: Primers qPCR aangeduid op MLH1-sequentie.....	171
Bijlage 5: Primers <i>pyrosequencing</i> aangeduid op MLH1-sequentie.....	172
Bijlage 6: Vergelijking van gedetecteerde CpG-gebieden door MSP en <i>pyrosequencing</i> op MLH1-sequentie.....	173
Bijlage 7: Primers <i>nested</i> PCR aangeduid op MGMT-sequentie	174
Bijlage 8: Primers qPCR aangeduid op MGMT-sequentie	175
Bijlage 9: Primers <i>pyrosequencing</i> aangeduid op MGMT-sequentie	176
Bijlage 10: Primers <i>methylation specific</i> PCR aangeduid op MGMT-sequentie van analyse in Radboudumc te Nijmegen.....	177
Bijlage 11: Vergelijking van gedetecteerde CpG-gebieden door MSP en <i>pyrosequencing</i> op MGMT-sequentie.....	178
Bijlage 12: Patiëntenstalen MLH1-analyse voor bisulfietbehandeling.....	179
Bijlage 13: Beperkte reeks patiëntenstalen voor MLH1-analyse	181
Bijlage 14: Patiëntenstalen voor validatie van MLH1-analyse	182
Bijlage 15: Patiëntenstalen MGMT-analyse voor bisulfietbehandeling.....	184
Bijlage 16: Patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse	185
Bijlage 17: Patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse	186

LIJST MET AFKORTINGEN

APC	adenomateuze polyposis coli
APS	adenosine 5' fosfosulfaat
ATP	adenosine trifosfaat
azM	academisch ziekenhuis Maastricht
BMI	<i>body mass index</i> (index die verhouding tussen lengte en gewicht weergeeft)
CCD	<i>charge-coupled device</i> (ladinggekoppelde component)
CpG	cytosinefosfaatguanine
Ct	<i>threshold cycle</i> (drempelwaarde voor qPCR)
DHS	<i>DNA hydration solution</i> (DNA hydratatie buffer, gebruikt voor DNA-isolatie)
dNTP's	desoxynucleotide trifosfaat
FAP	<i>familiar</i> adenomateuze polyposis
FFPE	<i>formalin-fixed paraffin-embedded</i> (in formaline gefixeerd en in paraffine ingebed weefsel)
GBM	<i>glioblastoma multiforme</i> (hersentumor van graad IV)
hMLH1	<i>human mutL, E. coli</i> , homolog of, 1'
HNPCC	<i>hereditair 'non-polyposis'</i> -colorectaal carcinoom
HSO ₃	bisulfiet
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> (humane navelstrengcellen)
IDH1-gen	isocitraat dehydrogenase 1-gen
IDH2-gen	isocitraat dehydrogenase 2-gen
IGF2	<i>insulin-like growth factor 2</i> -gen (groeifactor gen gelinked aan insuline)
IHC	immunohistochemisch
IvD	<i>in vitro methylated</i> DNA (in vitro gemethyleerd DNA)
KRAS	V-KI-RAS2 <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
M	<i>methylated</i> (gemethyleerd)
MGMT	O ⁶ -methylguanine-DNA methyltransferase
MLH1	mutL, E. coli, homolog of, 1'
MMR	<i>mismatch repair</i> (hestelmechanisme)
MSH2	<i>mutS homolog 2</i> (naam van eiwit)
MSH6	<i>mutS homolog 6</i> (naam van eiwit)
MSI	microsatelliet instabiliteit
MSP	<i>methylation specific polymerase chain reaction</i>
MTIC	5-(3-methyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide
MutS	Mutator S
NAD ⁺	nicotinamideadeninedinucleotide
NADPH ⁺	nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat
P53	tumor <i>protein 53</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (polymerasekettingreactie)
PMS2	<i>post-meiotic segregation increased 2</i> (naam van eiwit)
PPi	pyrofosfaat
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> (kwantitatieve polymerasekettingreactie)
SCS	Specimen control size
ss-beads	streptavidine gecoate sepharose <i>beads</i>
SSR	<i>Simple sequence repeats</i> (microsatellieten)
U	<i>Unmethylated</i> (ongemethyleerd)

1. INLEIDING

Wereldwijd bedroeg het aantal nieuwe kankergevallen in 2012 voor mannen en vrouwen respectievelijk, 7.427.000 en 6.663.000 gevallen. Dit maakt een totaal van 14.1 miljoen nieuwe gevallen [1]. Het onderzoek naar kanker is nog steeds in opmars. Met de nieuwe technologieën en inzichten wordt de opsporing ervan gemakkelijker en doeltreffender zodat de behandeling sneller en efficiënter kan gestart worden.

Op de afdeling pathologie in het azM worden hieromtrent analyses uitgevoerd zodat de juiste diagnose gesteld kan worden. Hierdoor kan een correcte behandeling worden opgestart. Verder wordt er ook onderzoek verricht naar kanker en de opsporing ervan.

In dit project worden glioblastomen onder de loep genomen, meer bepaald de *glioblastoma multiforme* (GBM). Dit is de meest voorkomende agressieve vorm van hersentumoren. De behandeling van *glioblastoma multiforme* is moeilijk. Deze tumoren zijn vaak vrij resistent, waardoor de patiënten meestal overlijden binnen het jaar. Het aantonen van MGMT-promotor hypermethylering kan ervoor zorgen dat de juiste behandeling uitgekozen wordt, waardoor de patiënt een grotere overlevingskans krijgt [2].

Het project binnen deze bachelorproef bestaat uit twee doelstellingen: de optimalisering van de MLH1-analyse met betrekking tot promotor hypermethylering en het aantonen van promotor hypermethylering van het MGMT-gen.

De eerste doelstelling van het project is de optimalisering van de MLH1-analyse met betrekking tot promotor hypermethylering. Deze analyse wordt uitgevoerd om een betere prognose te kunnen stellen voor het Lynch syndroom. Het Lynch syndroom, ook wel hereditair 'non-polyposis'-colorectaal carcinoom (HNPCC), is een erfelijke vorm van darmkanker. Bij deze analyse wordt de methylatiestatus van het MLH1-gen onderzocht. Het MLH1-gen behoort tot de *mismatch repair* (MMR)-genen. Het eiwit dat door het MLH1-gen gesynthetiseerd kan worden, speelt een rol bij DNA-herstel. Een verhoogde methylatiestatus van de promotor van het MLH1-gen kan het gen inactiveren. Hierdoor worden microsatellieten instabiel, langer of korter. Microsatellieten, ook wel bekend onder de naam *simple sequence repeats* (SSR), zijn korte DNA-sequenties met een repeterend stuk die in het gehele genoom kunnen voorkomen. Een hoge instabiliteit van microsatellieten kan in verband gebracht worden met het Lynch syndroom [3].

De MLH1-analyse wordt reeds uitgevoerd in de diagnostiek voor bepaalde tumoren, zoals colontumoren. Deze analyse blijkt echter te gevoelig te zijn, waardoor de methode verder geoptimaliseerd moet worden. De optimalisatie gebeurt door een nieuwe bisulfietbehandeling, nl. de Epiect *bisulfite* kit, en een semi-kwantitatieve *polymerase chain reaction* (PCR)-methode.

Zo is de nieuwe bisulfietbehandeling flexibeler en makkelijker. Bij de oude bisulfietbehandeling was een overnachtstap noodzakelijk, terwijl bij de nieuwe methode hiervoor geopteerd kan worden. Verder bestaat de nieuwe bisulfietbehandeling uit minder handelingen. Dit maakt ze makkelijker om uit te voeren.

De detectie van de methylatiestatus wordt momenteel uitgevoerd met behulp van een *methylation specific* PCR. Als PCR-methode wordt gebruik gemaakt van de *nested* PCR. Hierbij wordt het resultaat op het einde zichtbaar gemaakt via gelelektroforese. Deze methode moet omgezet worden in een kwantitatieve methode. Hiervoor wordt geopteerd voor de qPCR.

Naast de MSP wordt ook *pyrosequencing* uitgevoerd om de methylatiestatus van het MLH1-gen te detecteren. De techniek die het beste scoort op gebied van sensitiviteit en specificiteit wordt verder gevalideerd.

Als tweede doelstelling wordt MGMT-promotor hypermethylering in glioblastomen aangetoond. Promotor hypermethylering van het MGMT-gen speelt een belangrijke rol bij tumorgenese en tumorprogressie van glioblastomen. Het MGMT-gen codeert voor een enzym, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, dat betrokken is bij DNA-herstel. Wanneer de promotor van het MGMT-gen gemethyleerd is, zal geen eiwit gevormd worden. Hierdoor zal ook geen DNA-herstel optreden [4]. Dat er geen DNA-herstel optreedt bij promotor hypermethylering is positief voor de behandeling van hersentumoren met behulp van temozolomide. Dat is een stof die de groei van hersentumoren remt. Zonder methylatie van de promotor zal het methyltransferase de werking van temozolomide tenietdoen. Wanneer de promotor gemethyleerd is, zal geen DNA-herstel optreden, waardoor de behandeling succesvoller is [5]. Via MGMT-promotor hypermethylering kan dus een betere prognose gesteld worden bij de behandeling van hersentumoren met chemotherapie.

Deze analyse wordt nog niet uitgevoerd in de diagnostiek van het azM. Als basis voor deze analyse wordt de optimalisatie van de MLH1-analyse gebruikt. Bij MGMT-analyse wordt de nieuwe bisulfietbehandeling toegepast. Verder wordt de methylatiestatus van het MGMT-gen bepaald door middel van MSP en *pyrosequencing*. Ook hier wordt de techniek die het beste scoort zowel voor sensitiviteit als specificiteit verder gevalideerd.

2. LITERATUURSTUDIE

2.1. EPIGENETICA

Genetica is de wetenschap die zich bezighoudt met erfelijkheidsleer. Hierbij worden genen en overdracht van genen tussen generaties bestudeerd. De studie verdiept zich vooral in de overdracht van veranderingen die zich voordoen in DNA-sequentie.

De epigenetica daarentegen is de studie van veranderingen in genen die niet terug te vinden zijn in DNA-sequenties, maar wel kunnen worden overgeërfd. Hierbij kunnen omgevingsfactoren een invloed hebben op mensen, maar ook op foetussen en zelfs al op blastocysten [6].

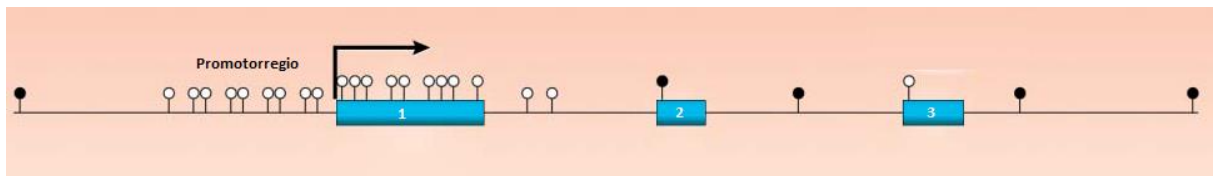
Deze verworven epigenetische info kan worden doorgegeven, hiervan is de hongerwinter die op het einde van de Tweede Wereldoorlog ontstond een voorbeeld. De meeste Nederlanders waren toen ondervoed. Wanneer vrouwen in deze periode zwanger werden, had dit voedseltekort een impact op de foetussen. Bij deze kinderen werd op latere leeftijd een hogere *body mass index* (BMI) geconstateerd. Daarnaast hadden deze mensen meer risico op cardiovasculaire aandoeningen en zelfs psychische ziekten op latere leeftijd. Deze 'afwijkingen' zijn te wijten aan het feit dat het DNA van deze mensen veranderingen heeft ondergaan tijdens het begin van de zwangerschap. De moeder liet een imprint na op de foetus. Het geheugen van de cel is pas later tot uiting gekomen.

Dit fenomeen werd nader onderzocht op DNA-niveau. Zo werd een vergelijking uitgevoerd naar de methylatiestatus van het *insulin-like growth factor 2* (IGF2)-gen, een gen dat belangrijk is in de ontwikkeling en de groei. Uit dit onderzoek kon worden opgemerkt dat het gen van kinderen verwekt tijdens de hongerwinter minder gemethyleerd was dan kinderen verwekt voor of na de hongerwinter. Hierdoor zal een hogere productie (upregulatie) van het IGF2-gen plaatsvinden. Naast het IGF2-gen volgden heel wat andere genen hetzelfde patroon [7].

2.1.1. EPIGENETISCHE MECHANISMEN

Onder epigenetische mechanismen of modificaties kan DNA-methylering worden geplaatst. Hiernaast wordt ook histonmodificatie gezien als een epigenetisch verschijnsel. Deze twee modificaties worden verder uitgelegd.

Bij DNA-methylering wordt aan de base cytosine een methylgroep (-CH₃) toegevoegd, waardoor een methylcytosine ontstaat. De methylering van een cytosine kan enkel gebeuren wanneer deze gevolgd wordt door de base guanine. Dit verschijnsel, waarbij een cytosine gevolgd wordt door een guanine, wordt ook wel cytosinefosfaatguanine(CpG)-sequentie genoemd. Hierbij staat de p, in de afkorting CpG, voor het fosfaat dat deze twee basen met elkaar verbindt. CpG-sequenties zijn doorheen heel het genoom terug te vinden. Daarnaast kunnen CpG-sequenties zich gaan groeperen. Dit worden CpG-eilanden genoemd, het zijn gebieden rijk aan CpG-sequenties. Deze CpG-eilanden komen meestal voor in de promotorregio van genen. In normale cellen zijn de meeste CpG-sequenties gemethyleerd buiten de CpG-eilanden en dus buiten de promotor. Deze gemethyleerde toestand buiten de CpG-eilanden zorgt dat ongewenste transcriptie onderdrukt wordt. In de promotor daarentegen zijn de meeste CpG-eilanden ongemethyleerd waardoor transcriptie kan plaatsvinden (figuur 1) [5] [8] [9].



Figuur 1 Methylering van CpG-eilanden in normale cellen. Op de figuur is een gen bestaande uit drie exonen simpel weergegeven. De exonen worden voorgesteld door blauwe rechthoeken, de intronen door zwarte lijnen tussen de exonen. De promotor bevindt zich voor exon één en wordt gekenmerkt door een verhoogd aantal CpG-gebieden, ook wel een CpG-eiland genoemd. In normale cellen zijn de meeste CpG-sequenties buiten het CpG-eiland, in de *genbody*, gemethyleerd (voorgesteld door een zwarte cirkel). Terwijl de CpG-eilanden in de promotor ongemethyleerd zijn (voorgesteld door een witte cirkel). De gemethyleerde status in de *genbody* zorgt voor een extra bescherming tegen ongewenste transcriptie. De ongemethyleerde status van de CpG-eilanden in de promotor daarentegen zorgt voor actieve genexpressie [9].

De structuur van het chromatine wordt naast methylatie ook bepaald door posttranslationale covalente modificaties, met andere woorden histonmodificaties. Histonen kunnen verschillende modificaties ondergaan, zoals acetylering, methylering en fosforylering. Deze chemische veranderingen creëren bindingsplaatsen voor chromatine eiwitten waardoor het DNA toegankelijk wordt voor transcriptiefactoren. Hiernaast worden eiwitinteracties geactiveerd die mee zorgen voor de uiteindelijke structuur van het chromatine.

Een modificatie die de laatste jaren goed bestudeerd is, is de lysine-acetylatie en -methylatie. De lysine-acetylatie maakt het chromatine toegankelijk voor transcriptionele activiteit. Terwijl lysine-methylatie verschillende effecten kan hebben. Deze effecten zijn afhankelijk van het residu dat gemodificeerd wordt. Zo kan de modificatie van het residu zowel voor transcriptionele activatie als repressie zorgen [8].

2.2. KANKER

Er bestaan verschillende soorten kanker, met een verschillende diagnose en behandeling. Toch hebben al deze soorten één ding gemeen, nl. celveranderingen met ongecontroleerde groei en deling van lichaamscellen tot gevolg. Hierdoor ontstaan tumoren [10].

Carcinogenese is het ontstaan, de ontwikkeling en eventuele uitzaaiing van tumoren. Het proces is op te delen in drie stappen: initiatie, promotie en progressie.

Bij initiatie gaat een welbepaald gen wijzigen waarbij geen herstel optreedt. Bijvoorbeeld een proto-oncogen muteert en verandert in een oncogen. Na de initiatie fase wordt er gesproken van promotie. In deze fase ontstaan nieuwe mutaties waardoor de cellen overvloedig gaan delen. Daarna volgt de progressie. Hierbij wordt de schade verhoogd en gaan de kankercellen evolueren tot een kwaadaardig gezwel. Afhankelijk van het soort kanker zullen de kankercellen vroeg of laat gaan migreren en uitzaaiingen of metastases vormen [11].

2.2.1. GENEN DIE BETREKKING HEBBEN OP HET VEROORZAKEN VAN KANKER

Bepaalde genen worden in verband gebracht met kanker. Deze genen kunnen worden opgedeeld in twee groepen: proto-oncogenen/oncogenen en tumorsuppressorgen [8] [12].

2.2.1.1. PROTO-ONCOGENEN/ONCOGENEN

Proto-oncogenen produceren eiwitten die betrekking hebben op celdeling. De eiwitten hebben een celdelingsbevorderende werking en kunnen onderverdeeld worden in: groeifactoren, receptoren voor groeifactoren, signaaltransductie-eiwitten, fosforylerende kinasen en nucleaire transcriptiefactoren. Al deze eiwitten zijn proto-oncogenen.

In normale cellen wordt de transcriptie van genen en de activiteit van de eiwitten goed gereguleerd. Verschillende mechanismen kunnen deze genen en eiwitten zodanig beïnvloeden of veranderen waardoor de normale regulatie verstoord wordt en *gain-of-function* optreedt. Zo kunnen genamplificaties, puntmutaties en chromosomale translocaties zorgen voor deze verstoring.

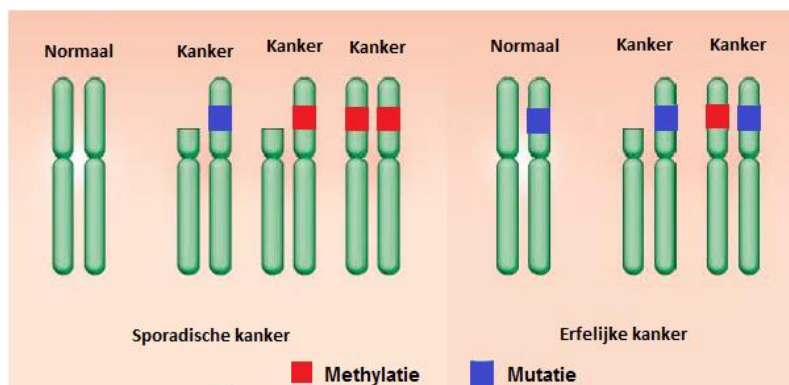
Deze modificaties kunnen leiden tot transformatie van een proto-oncogen naar een oncogen. Een oncogen is een gen dat betrokken is bij het ontstaan van tumoren. Oncogenen hebben een dominant karakter, zo is één gemuteerd allel voldoende om voor ongecontroleerde celdeling te zorgen. Bij deze genen wordt de functie van het eiwit niet geremd, maar geactiveerd [12] [13].

2.2.1.2. TUMORSUPPRESSORGENEN

Een tumorsuppressorgen codeert voor een eiwit dat ongecontroleerde celdeling voorkomt of dat celdood kan veroorzaken. Bij het optreden van een mutatie in een tumorsuppressorgen verliest het eiwit zijn werking. Hierdoor blijft de cel delen waardoor ongecontroleerde celdeling optreedt [12].

Voor ongecontroleerde deling van de cel door een gemuteerd tumorsuppressorgen moeten de DNA-sequenties van het gen op beide allelen zijn gemuteerd. Het tumorsuppressorgen heeft met andere woorden een recessief karakter [9].

Zowel genetische als epigenetische veranderingen kunnen leiden tot inactivatie van het tumorsuppressorgen. Hierop is de 'two-hit' hypothese van Knudson gebaseerd (figuur 2). Deze hypothese stelt dat twee mutaties of *hits* nodig zijn vooralleer *loss-of-function* van een tumorsuppressorgen optreedt. Een eerste *hit* kan veroorzaakt worden door een mutatie. In erfelijke gevallen heeft de persoon vanaf zijn geboorte één mutatie overgeërfd van het allel van moederszijde of vaderszijde. Deze mutatie wordt ook wel kiembaanmutatie genoemd. Hiernaast is nog maar één *hit* nodig voordat kanker zich kan ontwikkelen. Terwijl bij de sporadische vorm al twee *hits* doorheen het leven moeten optreden vooralleer de persoon in kwestie kanker gaat ontwikkelen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat personen met een kiembaanmutatie op een tumorsuppressorgen een verhoogde kans hebben op een vorm van erfelijke kanker [9] [14].



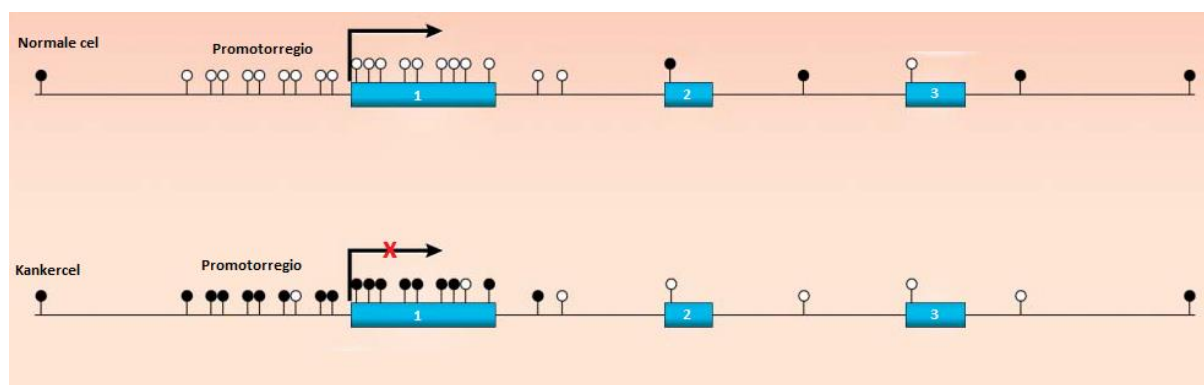
Figuur 2 'Two-hit'-hypothese van Knudson. Een tumorsuppressorgen wordt pas geïnactiveerd wanneer beide allelen gemuteerd zijn. Hiervoor zijn dus twee *hits* nodig. Bij de erfelijke vorm van kanker heeft de patiënt reeds één *hit* overgeërfd van één van de ouders, nl. een kiembaanmutatie. De kans dat deze persoon doorheen zijn leven een tweede *hit* ontwikkelt, is reëel. Bij de sporadische vorm van kanker moeten doorheen het leven twee *hits* ontwikkeld worden voor het gen zijn functie verliest [9].

Voorbeelden van tumorsuppressorgen zijn het adenomateuze polyposis coli (APC)-gen, MLH1-gen en tumor *protein 53* (p53).

Onder tumorsuppressorgen kunnen ook DNA-*repair* genen geplaatst worden. DNA-*repair* genen spelen een rol bij DNA-herstelmechanismen. Deze genen produceren eiwitten die fouten, gemaakt tijdens de DNA-replicatie, gaan herstellen. Wanneer een DNA-*repair* gen gemuteerd is, wordt geen eiwit gevormd. Hierdoor kunnen de fouten niet hersteld worden. Dit kan leiden tot tumorvorming [12].

2.2.2. METHYLERING EN KANKER

Het ontwikkelen van tumoren en DNA-methylering zijn met elkaar in verband gebracht (figuur 3). Zo vertonen alle vormen van kanker verlies van methylering in CpG-sequenties in de *genbody* en neemt de methylatiestatus toe in de CpG-eilanden van de promotor [9].



Figuur 3 Vergelijking van DNA-methylering bij normale cel en kankercel. Op de figuur wordt een vereenvoudigde weergave van een gen getoond. De exonen worden voorgesteld door de blauwe rechthoeken en de intronen door de lijnen tussen deze rechthoeken. In kankercellen zijn de gemethyleerde gebieden verplaatst. Zo worden vele CpG-gebieden in de *genbody* die normaal gemethyleerd zijn ongemethyleerd. Daarnaast vertonen de CpG-eilanden in de promotor methylering terwijl deze in normale cellen ongemethyleerd zijn. Door deze veranderingen kan geen transcriptie plaatsvinden, waardoor het gen *gesilenced* wordt [9].

De toename van methylering in tumoren is zeer groot. Hierbij vindt niet enkel methylering plaats in de tumor zelf, maar meestal ook in het gebied rondom de tumor. Bij tumorontwikkeling kunnen drie soorten methyleringspatronen onderscheiden worden: promotorhypermethylering, algemene hypomethylering en *loss of imprinting* [5].

2.2.2.1. PROMOTOR HYPERMETHYLERING

Tumorontwikkeling kan veroorzaakt worden door hypermethylering van de promotor van een gen. Hierbij wordt de promotor of een gedeelte van de promotor, zoals een CpG-eiland, gemethyleerd. Daardoor komt dit gen niet tot expressie, het wordt geïnactiveerd. Bij inactivatie van een gen zal geen transcriptie plaatsvinden waardoor geen eiwit geproduceerd wordt. Hierdoor kan de celdeling ontaarden en kan een tumor ontstaan [5].

2.2.2.2. ALGEMENE HYPOMETHYLERING

Bij hypomethylering gaan gebieden die van nature gemethyleerd zijn methylgroepen verliezen. Bij hypomethylering kunnen genen terug geactiveerd worden. Dit kan nadelige gevolgen hebben en leiden tot tumorontwikkeling [5]. Hiernaast kan algemene hypomethylering leiden tot chromosoom instabiliteit [15].

2.2.2.3. LOSS OF IMPRINTING

Bij *loss of imprinting* wordt de door hyper- of hypomethylering regulatie van genomische *imprinting* verstoord. Genomische *imprinting* heeft betrekking op het tot expressie brengen van ofwel het gen afkomstig van de vader ofwel het gen afkomstig van de moeder. Hierbij komt maar één allel van een chromosoom tot expressie. Het andere allel is onderdrukt. Methylering speelt een rol bij *loss of imprinting*. Zo kunnen genen door methylering selectief aan- en uitgeschakeld worden.

Een voorbeeld hiervan is het IGF2-gen. Normaal vindt expressie van IGF2 plaats vanaf het vaderlijke chromosoom. Wanneer *loss of imprinting* optreedt, zal ook het IGF2-gen van het moederlijke chromosoom tot expressie komen, waardoor overexpressie plaatsvindt. Dit kan leiden tot de ontwikkeling van kanker [5].

2.3. COLONKANKER

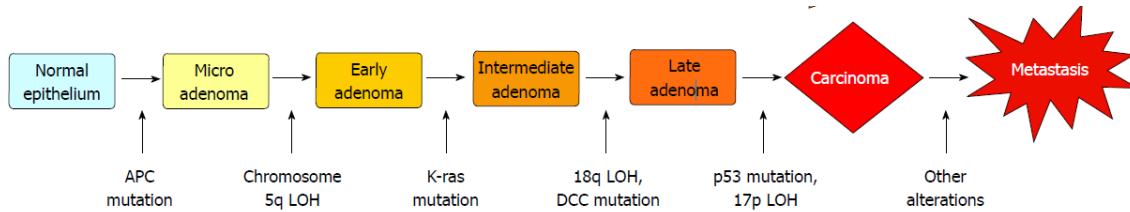
Colonkanker, ook wel dikke darmkanker genoemd, is één van de meest voorkomende vormen van kanker. Dikke darmkanker ontstaat vrijwel altijd uit goedaardige poliepen. Dit zijn cellen die blijven groeien en delen waardoor een ophoping of gezwel ontstaat. Deze goedaardige poliepen kunnen wel evolueren naar kwaadaardige gezwellen [14].

Colonkanker kan zich op twee manieren ontwikkelen. In 80-85% van colonkanker worden tumoren ontwikkeld volgens het Fearon-Vogelstein model (figuur 4). Dit model beschrijft de verschillende mutaties die een normale darmcel ondergaat in de ontwikkeling naar een kankercel.

Colonkanker ontstaat meestal door een mutatie in het APC-gen. Dit gen is een tumorsupressorgen en zorgt voor het remmen en reguleren van de celdeling. Bij een mutatie in het APC-gen, wordt dit gen geïnactiveerd waardoor de celdeling niet geremd wordt. De cel gaat bijgevolg blijven delen en er ontstaan poliepen aan de wand van de darm.

De ongeremde celdeling kan leiden tot andere mutaties. Bij colonkanker is meestal het V-KI-RAS2 *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS)-gen dat na het APC-gen gemuteerd wordt. Het KRAS-gen is een proto-oncogen. Bij een mutatie in het proto-oncogen verandert dit gen in een oncogen. De mutatie gaat zorgen voor een stimulans op de werking waardoor de celdeling verhoogd wordt.

Daarna vindt een opeenvolging van mutaties plaats. Door deze mutaties gaat de sneldelende cel veranderen in een adenoom. Een adenoom is een goedaardig gezwell dat ontstaat uit epitheliaal klierweefsel en een verhoogde kans heeft op ontwikkeling naar een kwaadaardig gezwell. Als laatste volgt de mutatie van het p53-gen. Dit gen is eveneens een tumorsuppressorgen [16] [17].



Figuur 4 Fearon-Vogelstein model. Dit model beschrijft de ontwikkeling van sporadische colonkanker [17].

In de andere 15-20% wordt colonkanker veroorzaakt door microsatelliet instabiliteit. Deze tumoren vertonen een groot aantal mutaties in microsatellietsequenties. Microsatellieten zijn korte sequenties met een repeterend stuk die in het gehele genoom kunnen voorkomen. De microsatelliet instabiliteit wordt veroorzaakt door een defect in de MMR-genen [17].

2.3.1. ERFELIJKE EN SPORADISCHE COLONKANKER

Colonkanker kan een sporadische oorsprong hebben, maar ook een erfelijke. De meeste colorectale kankers zijn sporadisch. Dit wil zeggen dat de patiënt geen andere familieleden heeft met darmkanker. Sporadische vormen komen voor na de leeftijd van 65, 70 jaar. Deze vorm van darmkanker kent een traag verloop. Hiermee wordt bedoeld dat tussen de tumorvorming en het optreden van symptomen enkele jaren kunnen verlopen.

De erfelijke vorm van colonkanker wordt veroorzaakt door het doorgeven van mutaties in genen. Bij deze vorm wordt dikke darmkanker opgemerkt bij andere familieleden, dit aan moeder- of vaderzijde van de familie. Hiernaast zijn binnen de familie vaak enkele leden gestorven aan deze vorm van kanker.

Bij erfelijke colonkanker ontstaan meestal weinig adenomen, maar de adenomen ontwikkelen zich veel sneller tot een carcinoom in tegenstelling tot de sporadische vorm. De meest voorkomende vormen van erfelijke colonkanker zijn het Lynch syndroom en familiere adenomateuze polyposis (FAP). Hierbij is vroegtijdige opsporing van belang, zodat de behandeling snel kan worden opgestart [18] [19].

2.3.2. ERFELIJK COLONKANKER: HET LYNCH SYNDROOM

Het Lynch syndroom is de meest voorkomende erfelijke vorm van dikke darmkanker. Door veranderingen in de genetische achtergrond ontstaat een verhoogde kans op dikke darmkanker maar ook op andere vormen van kanker, zoals endeldarmkanker en baarmoederkanker. Bij dit syndroom ontstaat dikke darmkanker meestal voor het 50^{ste} levensjaar [19] [20].

Het Lynch syndroom wordt ook vaak *hereditair non polyposis colorectaal carcinoom* genoemd. Bij HNPCC ontstaan de meeste tumoren direct na de overgang van de dunne naar de dikke darm. Dit syndroom erft autosomaal dominant over. Dit wil zeggen dat één ziek gen, afkomstig van vader of moeder, voldoende is om het syndroom te krijgen. Autosomaal wijst op het feit dat het gen dat voor deze ziekte verantwoordelijk is niet op de geslachtschromosomen gelegen is [21].

2.3.2.1. OORZAAK VAN HET LYNCH SYNDROOM

Het syndroom van Lynch wordt veroorzaakt door kiembaanmutaties in *mismatch repair* genen. MMR-genen coderen voor eiwitten die betrokken zijn bij het herstel van DNA-fouten. Deze DNA-fouten treden op tijdens de celdeling, meer bepaald DNA-replicatie.

De MMR-genen die verantwoordelijk zijn voor het Lynch syndroom zijn de volgende vier: *mutS homolog 2* (MSH2), *MLH1*, *mutS homolog 6* (MSH6) en *post-meiotic segregation increased 2* (PMS2). Door de detectie van mutaties in deze genen kan een gerichte behandeling worden opgesteld [19].

PATHWAY VAN MUTS- EN MUTL-GENEN

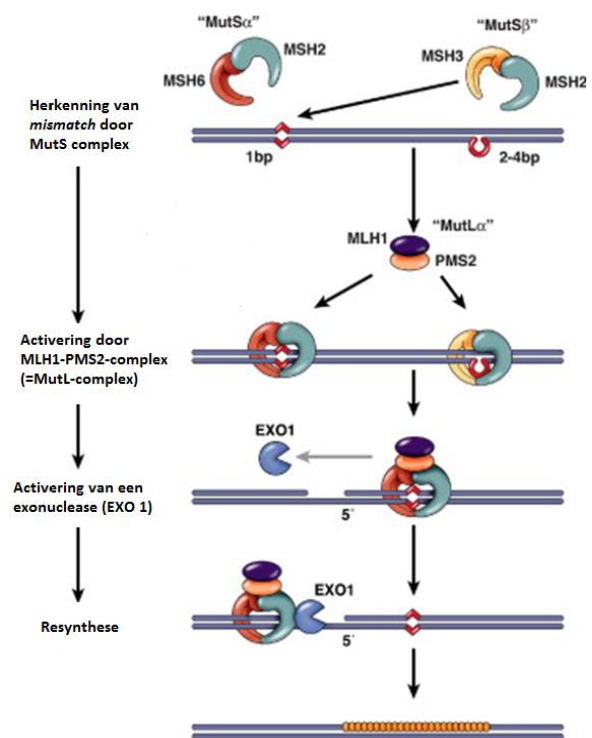
Tijdens de DNA-replicatie kunnen er fouten gemaakt worden, zoals het inbouwen van niet-complementaire basen. Deze fouten kunnen worden opgespoord en hersteld. Dit gebeurt door DNA-herstelmechanismen of DNA *mismatch repair*.

Het *MLH1*-gen behoort tot de *mismatch repair* genen. Het gen is in staat om een *MLH1*-eiwit te synthetiseren dat een rol gaat spelen in DNA-herstel. Het eiwit kan fouten, die gemaakt worden tijdens de DNA-replicatie, herstellen. Hiervoor gaat het *MLH1*-eiwit samenwerken met andere eiwitten [22].

DNA mismatch repair systeem in functie van colonkanker

Het herstelsysteem begint met de detectie van fouten. Hierbij gaat een eiwitcomplex Mutator S (MutS) over de DNA-sequentie heen bewegen. Van het MutS-complex bestaan twee vormen, nl. MutS α en MutS β . Deze vormen bestaan uit andere eiwitten en gaan andere fouten detecteren. MutS α bestaat uit het MSH2-MSH6-eiwitcomplex. Dit complex kan drie fouten detecteren: een verkeerd ingebouwd nucleotide, een insertie van een nucleotide of een deletie van een nucleotide. MutS β daarentegen bestaat uit het MSH2-MSH3-eiwitcomplex. Dit complex kan twee soorten fouten detecteren, nl. inserties en deleties van ongeveer 2 tot 4 basenparen.

Bij het detecteren van een fout gaat een MutL-complex aan het MutS-complex binden. In dit geval wordt het eiwitcomplex *MLH1*-*PMS2*, ook wel MutL α genoemd, aan MutS gebonden. Na binding van MutL aan MutS wordt het eiwitcomplex geactiveerd. De activatie van dit complex zorgt ervoor dat een exonuclease een

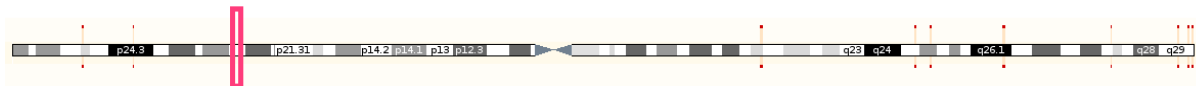


Figuur 5 Schematische weergave van de pathway van MutS-MutL. [84]

stuk DNA-streng met inbegrip van de fout gaat afbreken. Hierna worden terug complementaire basen aan de streng toegevoegd door een DNA-polymerase. Als laatste gaat een ligase de complementaire basen aan de streng binden (figuur 5) [23].

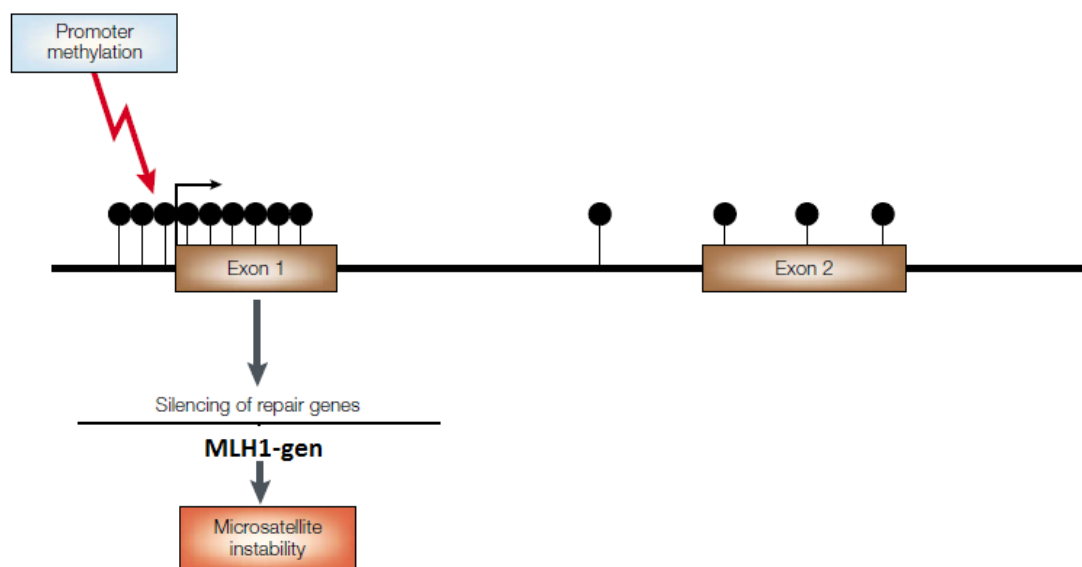
HET MLH1-GEN

Het hMLH1-gen of MLH1-gen is gelegen op de korte arm van chromosoom 3, meer bepaald 3p22,2. Het bestaat uit 19 exonen. Op onderstaande figuur (figuur 6) wordt het volledige chromosoom weergegeven. De korte arm wordt voorgesteld door het symbool p en de lange arm door het symbool q. Op de figuur is 3p22.2 aangegeven met een roze balk. De sequentie en de gemethyleerde sequentie van het MLH1-gen zijn terug te vinden in bijlage 1.



Figuur 6 De plaats van het MLH1-gen aangeduid op chromosoom 3 [24].

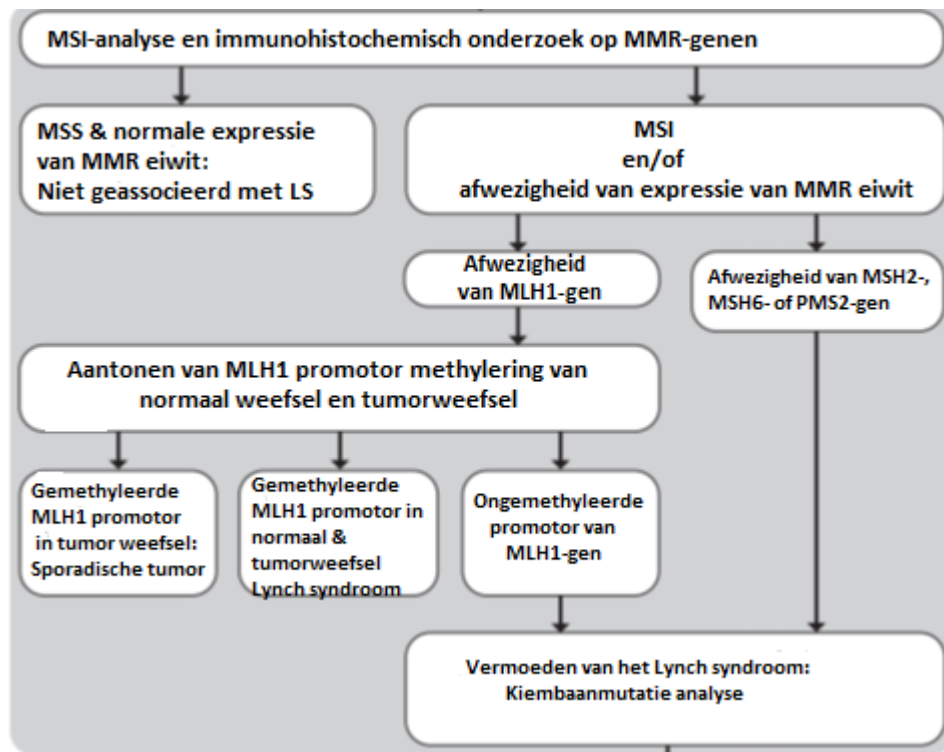
Hypermethylering van CpG-eilanden in de promotor van een DNA *repair* gen kan leiden tot inactivatie van het gen. Zo leidt hypermethylering van de promotor van het MLH1-gen tot microsatelliet instabiliteit (MSI) (figuur 7). Door een foutieve replicatie wordt het verkeerde aantal *repeats* getranscribeerd waardoor deze langer of korter worden. Dit heeft invloed op de ontwikkeling van tumoren in colonkanker.



Figuur 7 Hypermethylering van de promotor van het MLH1-gen kan leiden tot inactivatie van het gen [25].

2.3.2.2. ANALYSE VOOR HET LYNCH SYNDROOM

Bij het stellen van de diagnose voor Lynch syndroom worden verschillende analyses uitgevoerd (figuur 8). Zo wordt eerst een voorscreening gedaan door middel van MSI en immunohistochemisch (IHC) onderzoek. Daarnaast kan een derde analyse uitgevoerd worden om het resultaat van de MSI en IHC te bevestigen, nl. promotor hypermethylering van het MLH1-gen. Als uit deze drie analyses geen definitief resultaat kan worden geanalyseerd, kan een mutatieanalyse worden uitgevoerd [26].



Figuur 8 Overzicht van verschillende analyses voor het Lynch syndroom. Voor de analyse van het Lynch syndroom wordt eerst een MSI-analyse samen met een immunohistochemisch onderzoek op MMR-genen uitgevoerd. Wanneer uit deze analyses een microsatelliet stabiel resultaat en een normale expressie van de MMR-eiwitten worden geanalyseerd, wordt deze tumor niet geassocieerd met het syndroom van Lynch. Bij microsatelliet instabiliteit of afwezigheid van expressie van één van de MMR-genen is verder onderzoek vereist. Zo wordt bij afwezigheid van het MLH1-gen getracht om promotorhypermethylering aan te tonen in zowel tumor als normaal weefsel. Bij een gemethyleerde MLH1- promotor in het tumorweefsel is de tumor van sporadische oorsprong. Bij een gemethyleerde promotor in zowel normaal als tumorweefsel is deze tumor te wijten aan het Lynch syndroom. Bij een ongemethyleerde promotor van het MLH1-gen is er een vermoeden van het Lynch syndroom. Dit vermoeden moet verder bevestigd worden met een kiembaanmutatieanalyse. Bij afwezigheid van expressie van de andere MMR-genen is eveneens een vermoeden van het Lynch syndroom en moet ook dit verder bevestigd worden met een kiembaanmutatie analyse [26].

MICROSATELLIET INSTABILITEITSANALYSE

De microsatelliet instabiliteitsanalyse wordt uitgevoerd bij een vermoeden van het Lynch syndroom. In 15% van colonkanker wordt MSI gedetecteerd, hiervan wordt 3% geassocieerd met het Lynch syndroom. De overige 12% wordt veroorzaakt door sporadische colonkanker. Wanneer uit de analyse voortkomt dat de microsatellieten geen instabiliteit vertonen, is het een sporadische vorm van colonkanker [16].

Microsatellieten, ook wel bekend onder de naam *simple sequence repeats*, zijn korte DNA-sequenties met een repeterend stuk die in het gehele genoom kunnen voorkomen. Door het repeterende stuk worden hierin tijdens de DNA-replicatie vaak fouten gemaakt. Normaal worden deze fouten hersteld door DNA-*repair* genen zoals de MMR-genen. Bij gemuteerde DNA-*repair* genen wordt de functie van dit eiwit niet naar behoren uitgevoerd en worden de fouten bijgevolg niet hersteld [14].

IMMUNOHISTOCHEMISCH ONDERZOEK

Bij patiënten met het Lynch syndroom ontstaan tumoren als gevolg van verlies van MMR-eiwitten in de tumor. Dit kan aangetoond worden met immunochemisch onderzoek op de MMR-genen, nl. MLH1, PMS2, MSH2 en MSH6. Hierbij wordt een kleuring met antilichamen uitgevoerd tegen de *mismatch repair* genen. Aan de hand van het expressiepatroon van deze genen kan worden bepaald in welk gen de kiembaanmutatie zit. Zo zal bij een mutatie in het gen geen eiwit meer gesynthetiseerd worden. Hierdoor zal de kleuring van dit gen negatief uitvallen. Waardoor een vermoeden ontstaat op de aanwezigheid van mutaties in het desbetreffende gen [27]. Bij mutatie in het MLH1-gen kan verder geopteerd worden om promotor hypermethylering uit te voeren. Bij een mutatie in de andere drie MMR-genen is er een vermoeden van het Lynch syndroom. Dit vermoeden wordt al dan niet bevestigd bij het uitvoeren van mutatieanalyse op MMR-genen [19].

PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN MLH1-GEN

Met behulp van de methylatiestatus van de promotor van het MLH1-gen kan een beter onderscheid gemaakt worden tussen sporadische en erfelijke vormen van colontumoren. Zo wordt meestal de sporadische vorm van colonkanker veroorzaakt door hypermethylering van de promotor van het MLH1-gen. Terwijl de erfelijke vormen veroorzaakt worden door kiembaanmutaties in MMR-genen [28].

Deze analyse wordt na MSI-analyse uitgevoerd. Zo kan bij tumoren met een verhoogde microsatelliet instabiliteit en afwezigheid van hypermethylering van het MLH1-gen een betere prognose gemaakt worden voor het Lynch syndroom [29].

MUTATIE-ONDERZOEK MMR-GENEN

Identificatie van een kiembaanmutatie in één van de vier MMR-genen zal de diagnose van de vooraf uitgevoerde analyses (MSI, immunohistochemie en promotor hypermethylering van MLH1-gen) bevestigen [26].

2.4. HERSENTUMOREN

Hersentumoren zijn complexe en moeilijk te behandelen tumoren. Deze tumoren groeien tussen gezond hersenweefsel en hun zenuwcellen in. Hierbij moet worden opgepast dat het gezonde weefsel niet beschadigd wordt [30].

2.4.1. SOORTEN EN TYPES VAN HERSENTUMOREN

Er bestaan zeer veel types hersentumoren die opgedeeld kunnen worden in twee soorten, nl. de primaire hersentumoren en secundaire hersentumoren. De primaire hersentumoren ontstaan uit het hersenweefsel zelf. Secundaire hersentumoren daarentegen worden in andere delen van het lichaam gevormd en zaaien uit naar de hersenen, beter bekend onder metastasen. Secundaire hersentumoren zijn bijna altijd kwaadaardig, aangezien deze uit andere tumoren afkomstig zijn [31].

De types worden ingedeeld naar de cellen waaruit de tumoren ontstaan. Zo ontstaan de meest voorkomende kwaadaardige hersentumoren uit gliacellen. Dit zijn de steuncellen van het hersenweefsel. Deze tumoren worden gliomen of glioma genoemd. De meest voorkomende goedaardige hersentumor ontstaat daarentegen uit hersenvliezen en wordt meningeoom genoemd [30].

Van gliacellen kunnen vier celtypes onderscheiden worden, nl. astrocyten, oligodendrocyten, ependymcellen en microglia. De meeste gliomen ontstaan uit astrocyten, kleine stervormige gliacellen die als steuncel fungeren bij zenuwcellen. Gliomen die ontstaan uit astrocyten worden astrocytomen genoemd. Hiernaast kunnen gliomen ontstaan uit oligodendrocyten. Dit zijn de cellen die de myelineschede rond zenuwceluitlopers synthetiseren. Deze tumoren worden oligodendrogliomen genoemd. Hersentumoren kunnen ook ontstaan uit een combinatie van astrocyten en oligodendrocyten. Deze tumoren worden meng-glioom of ook wel oligo-astrocytoom genoemd. Verder zijn ependymomen hersentumoren die ontstaan uit ependymcellen. Deze cellen bekleden de wand van de hersenkamer. Als laatste kunnen hersentumoren ook uit microglia ontstaan. Microglia zijn kleine gliacellen die instaan voor het verwijderen van schadelijk materiaal [32].

2.4.2. GRADEN BEPAALD DOOR *WORLD HEALTH ORGANIZATION* (WHO-GRADEN)

Bij hersentumoren wordt de mate van agressiviteit uitgedrukt in graden. Deze indeling wordt gemaakt aan de hand van bepaalde criteria, zoals aantal delende cellen, aantal bloedvaten in tumor, aantal afgestorven cellen... Er wordt onderscheid gemaakt tussen vier graden, waarbinnen ook de goedaardige tumoren worden onderverdeeld (tabel 1).

Graad I en graad II stellen de laaggradige tumoren voor en graad III en graad IV de hooggradige tumoren. Hierbij staat laag- en hooggradig niet gelijk aan goed- of kwaadaardig. De hersentumoren van graad I zijn goedaardig. Verder stellen graad II en graad III de min of meer kwaadaardige hersentumoren voor. Graad IV zijn zeer kwaadaardige hersentumoren [33].

Tabel 1 Overzicht van indeling van hersentumoren in WHO-graden [32].

WHO-graad	Hersentumor
Graad I	Pilocytair astrocytoom Pilomyxoid astrocytoom
Graad II	Diffuus laaggradige astrocytoom Diffuus laaggradige oligodendroglioom Diffuus laaggradige oligo-astrocytoom
Graad III	Anaplastisch astrocytoom Anaplastische oligodendroglioom Anaplastische oligo-astrocytoom Gliomatosis cerebri
Graad IV	<i>Glioblastoma multiforme</i>

De laaggradige hersentumoren groeien traag en zijn min of meer goedaardig. Bij hersentumoren wordt niet echt van goedaardige tumoren gesproken aangezien het verwijderen van tumorweefsel moeizaam is. Hierdoor kunnen kleine delen van de tumor in de hersenen aanwezig blijven, waardoor deze na een tijd weer kunnen aangroeien. Zo'n tumor wordt ook wel tumorrecidief genoemd. Hiernaast bestaat het feit dat een laaggradige hersentumor na verloop van tijd in een hooggradige hersentumor kan evolueren [32] [34].

De hooggradige hersentumoren kennen een snelle en ongeremde groei. Daarnaast dringen deze tumoren diep door in het gezond weefsel. Hooggradige hersentumoren kunnen meestal niet volledig verwijderd worden, waardoor deze weer aangroeien [32].

Glioblastoma multiforme is de meest kwaadaardige hersentumor. Daarnaast is het de meest voorkomende hersentumor. De meeste patiënten met *glioblastoma multiforme* sterven binnen het jaar [35].

2.4.3. GENEN DIE BETREKKING HEBBEN OP HET VEROORZAKEN VAN HERSENTUMOREN

De moleculaire kenmerken van een hersentumor zeggen veel over de prognose voor de patiënt. Onder moleculaire kenmerken worden de eigenschappen en het erfelijk materiaal van het tumorweefsel verstaan. Zo zijn de 1p/19q-codeletie, MGMT-methylatie en isocitraat dehydrogenase 1 (IDH1)- & isocitraat dehydrogenase 2 (IDH2)-genen belangrijke moleculaire kenmerken voor gliomen [32].

2.4.3.1. 1P/19Q-CODELETIE

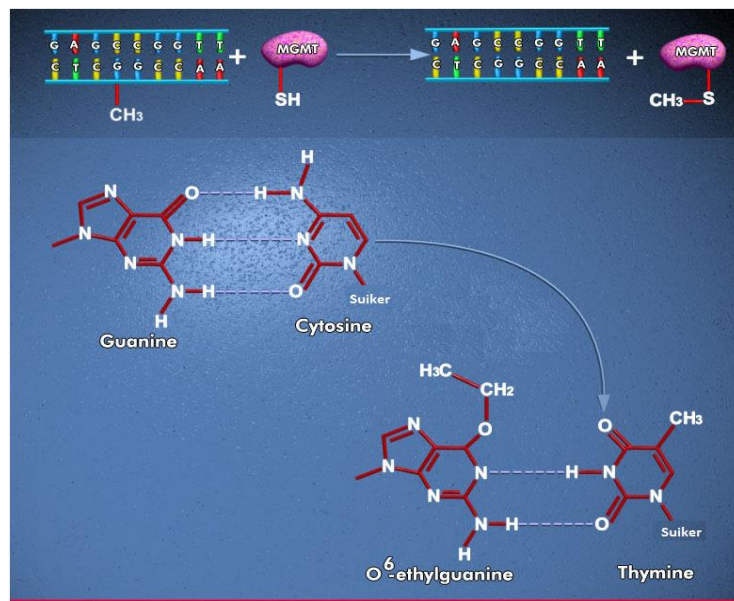
De 1p/19q-codeletie heeft betrekking op hersentumoren van graad II en graad III, de oligodendrogliomen en oligo-astrocytomen. Wanneer bij chromosomaal onderzoek op hersentumoren een verlies optreedt bij zowel de korte arm (p) van chromosoom 1 en de lange arm (q) van chromosoom 19 zal voor de patiënt een gunstigere prognose bestaan. Deze patiënten zijn vaak gevoeliger voor behandelingen dan patiënten zonder deze codeletie [32].

2.4.3.2. MGMT-METHYLATIE

Met behulp van MGMT-methylatie kan een betere prognose voor hersentumoren gesteld worden. Bij een gemethyleerde promotor van het MGMT-gen wordt de gevoeligheid voor de chemotherapie verhoogd [32].

PATHWAY

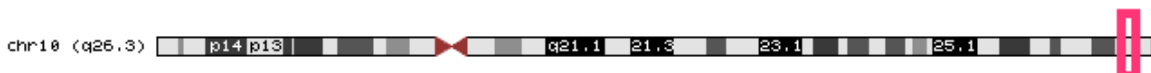
Het MGMT-gen speelt een rol bij het verwijderen van methylgroepen. Dit gen codeert voor een belangrijk DNA-*repair* eiwit, het MGMT-eiwit. Het MGMT-eiwit gaat methylgroepen van de O⁶-positie van guanine verwijderen door deze zelf op te nemen. Hierbij gaat het enzym afbreken. De DNA-streng blijft echter ongewijzigd, waardoor geen apoptose optreedt. Bij een gealkyleerd O⁶-guanine zal de DNA-dubbelstreng gaan breken of kan base *mismatching* optreden. Hierdoor wordt apoptose of geprogrammeerde celdood geïnduceerd. Het MGMT-gen beschermt normale cellen tegen carcinogenese door de methylgroepen af te breken en base *mismatching* te voorkomen (figuur 9) [36] [37].



Figuur 9 Pathway van het MGMT-gen [85]. Het MGMT-eiwit gaat methylgroepen (CH₃) verwijderen van de O⁶-positie van het guanine.

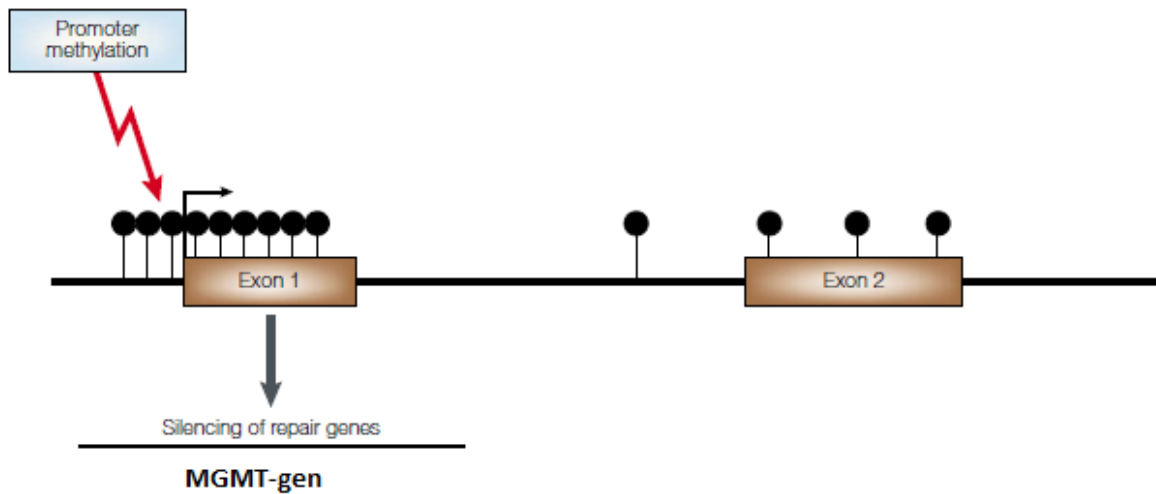
MGMT-GEN

Het MGMT-gen is gelegen op de lange arm van chromosoom 10, meer bepaald op 10q26.3. Het bestaat uit vijf exonen. Op onderstaande figuur (figuur 10) wordt het volledige chromosoom weergegeven. De roze balk duidt de plaats van het MGMT-gen op de lange arm aan, nl. 10q26.3 [4]. De sequentie van het MGMT-gen zowel ongemethyleerd als gemethyleerd wordt weergegeven in bijlage 2.



Figuur 10 De plaats van het MGMT-gen aangeduid op chromosoom 10 [4].

Hypermethylatie van CpG-gebieden in de promotor kan leiden tot inactivatie van het gen (figuur 11).



Figuur 11 Hypermethylering van de promotor van het MGMT-gen kan leiden tot inactivatie van het gen [25].

HYPERMETHYLERING VAN PROMOTOR VAN HET MGMT-GEN EN RELEVANTIE BIJ KANKERONDERZOEK

Bij methylering van de promotor van het MGMT-gen wordt de gevoeligheid voor chemotherapie groter. Dit is gunstig voor de behandeling van *glioblastoma multiforme* [32].

Chemotherapie met temozolomide

Temozolomide is een kankerremmende stof. Deze stof breekt DNA af door alkylgroepen op verschillende plaatsen in de DNA-streng te plaatsen. Als temozolomide in een fysiologische pH terecht komt, zoals de pH in een cel, valt de stof uiteen in zijn reactief tussenproduct 5-(3-methyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide (MTIC). Deze stof gaat de O⁶ en N⁷ positie van guanine en N³ positie van adenine methyleren [38].

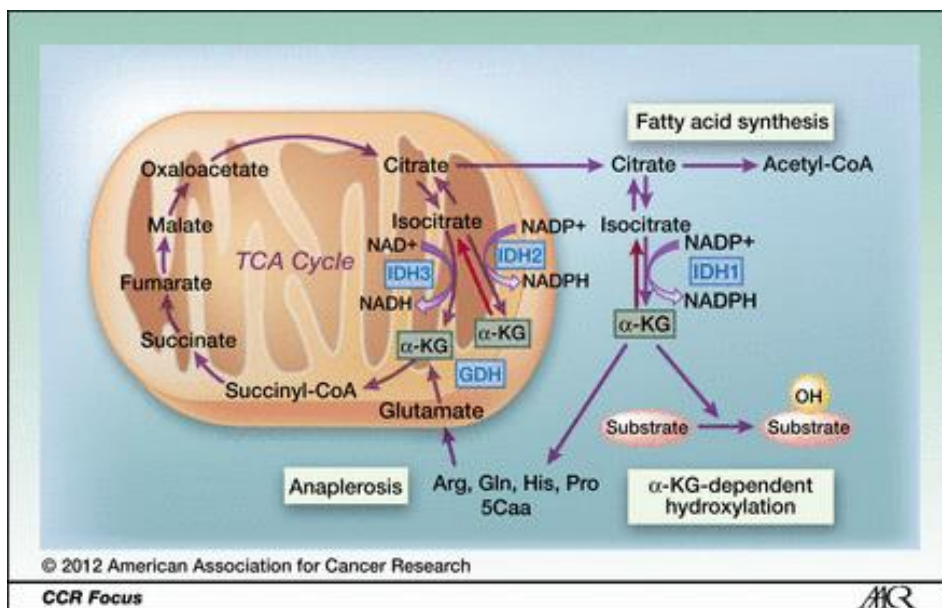
Normale cellen bezitten *DNA-repair mechanismen*, zoals het MGMT-eiwit. Dit eiwit gaat de alkylgroepen afbreken, waardoor de functie van temozolomide tenietgedaan wordt. Maar wanneer de promotor van het MGMT-eiwit gemethyleerd is, kan het MGMT-eiwit niet gevormd worden. Hierdoor zullen de alkylgroepen van het O⁶-guanine niet verwijderd worden, waardoor de werking van temozolomide niet verhinderd wordt. Door temozolomide is de kans op een tumorrecidief lager. Tevens verhoogt deze chemotherapie de overlevingskans [39] [40].

2.4.3.3. MUTATIEANALYSE OP IDH1- EN IDH2-GENEN

Onderzoek naar IDH1- en IDH2-genen geeft meer informatie over de prognose van de verschillende graden van hersentumoren. Zo reageren tumoren met een gemuteerd IDH1- of IDH2-gen beter op de therapie [41].

PATHWAY

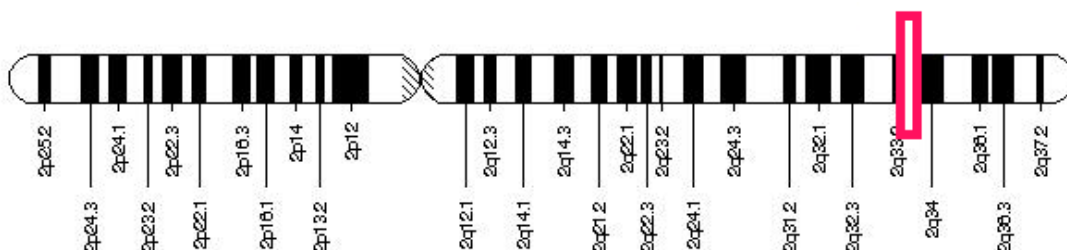
Eukaryote cellen brengen drie verschillende vormen van IDH tot expressie. Deze IDH-eiwitten spelen een rol in de citroenzuurcyclus van de cel. Het IDH1- en IDH2-eiwit zijn nicotinamide adenine dinucleotide fosfaat(NADPH⁺)-afhankelijke enzymen die de oxidatieve decarboxylatie van isocitraat katalyseren om α -ketoglutaaraat, ook wel oxoglutaaraat genoemd, te vormen (figuur 12). De IDH-genen zorgen voor dezelfde reactie maar op een andere plaats in de cel. Zo speelt IDH1 een rol in het cytoplasma en de peroxisomen van de cel. Terwijl IDH2 een rol speelt in de energieproducerende organellen van de cel, nl. de mitochondriën. Het IDH3-eiwit daarentegen is een nicotinamideadeninedinucleotide(NAD⁺)-afhankelijk enzym die eveneens zorgt voor de omzetting van isocitraat naar α -ketoglutaaraat. De omzettingen die gebeuren door IDH1- en IDH2-eiwitten kunnen ongedaan gemaakt worden, terwijl de omzetting door het IDH3-eiwit onomkeerbaar is [41] [42].



Figuur 12 Pathway van IDH-genen [41].

IDH1-GEN

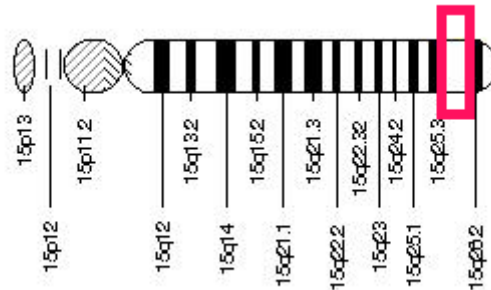
Het IDH1-gen is gelokaliseerd op de lange arm van chromosoom 2, meer bepaald 2q33.3. Het gen bestaat uit 12 exonen. Op onderstaande figuur (figuur 13) wordt het volledige chromosoom weergegeven. Op de figuur is 2q33.3 aangeduid met een roze balk [43].



Figuur 13 Schematische weergave van chromosoom 2, met aanduiding van locatie van IDH1-gen [43].

IDH2-GEN

Het IDH2-gen is gelokaliseerd op de lange arm van chromosoom 15, meer bepaald op 15q26.1. Het gen bestaat uit 11 exonen. Op onderstaande figuur (figuur 14) wordt het volledige chromosoom weergegeven. Op de figuur is 15q26.1 aangeduid met een roze balk [44].

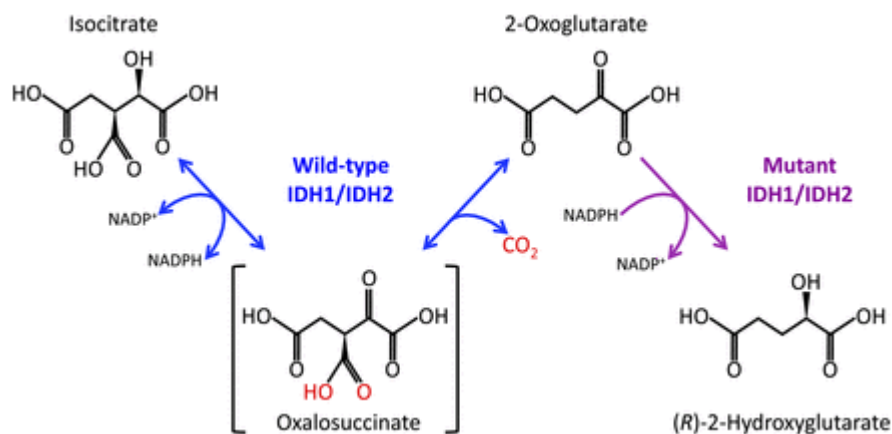


Figuur 14 Schematische weergave van chromosoom 15. De roze balk geeft de plaats van het IDH2-gen weer, nl. 15q26.1 [44].

MUTATIES IN IDH1- EN IDH2-GENEN EN RELEVANTIE BIJ KANKERONDERZOEK

Het detecteren van mutaties in IDH-genen heeft betrekking op de prognose voor hersentumoren. Zo verliezen gemuteerde IDH1- en IDH2-genen hun katalytische activiteit en wordt de productie van 2-hydroxyglutaraat verhoogd.

Bij een gemuteerd IDH1- of IDH2-gen verliezen deze genen hun activiteit. Hierbij wordt NADP^+ afhankelijk oxidatieve decarboxylatie van isocitraat niet omgezet in α -ketoglutaraat en NADPH . Het IDH1- of IDH2-eiwit is niet in staat om isocitraat om te zetten in α -ketoglutaraat. Daarnaast wordt een andere functie geactiveerd. Hierbij wordt α -ketoglutaraat omgezet in 2-hydroxyglutaraat (figuur 15) [41] [42].



Figuur 15 Eenvoudige weergave van de reactie van wildtype en gemuteerd IDH1- en IDH2-gen [42]

2.5. METHODEN DIE TOEGEPAST WORDEN IN KANKERONDERZOEK

2.5.1. ISOLATIE VAN HET DNA

Elke DNA-analyse begint met het isoleren van DNA. Hierbij wordt het DNA uit de cellen gehaald zodat het voor verdere analyses gebruikt kan worden. Om het DNA uit de cellen te krijgen, worden de cellen opengeboren. Deze stap wordt ook wel de cellysis genoemd. Cellysis kan op verschillende manieren veroorzaakt worden, nl. mechanisch, chemisch of enzymatisch.

Bij mechanische cellyse kan geopteerd worden voor sonicatie, malen, pletten... Deze methode is niet geschikt om het DNA intact te houden.

Bij chemische cellyse wordt gebruik gemaakt van een detergent. Deze stof gaat de membraanfosfolipiden openbreken, waardoor het celmembraan kapot gaat.

De enzymatische cellyse wordt dikwijls als additionele stap toegevoegd om celwanden van bijvoorbeeld planten af te breken.

Hierna moeten celresten, membranen, eiwitten en RNA verwijderd worden.

Bij het verwijderen van eiwitten wordt gebruik gemaakt van de verschillen in eigenschappen tussen DNA en eiwitten. Het RNA wordt verwijderd door enzymen toe te voegen die het RNA gaan afbreken. Deze enzymen worden RNases genoemd [45].

2.5.2. SPECIMEN CONTROL SIZE (SCS)-LADDER

De kwaliteit van het DNA is zeer belangrijk bij het uitvoeren van analyses. Zo hangt het geven van een juiste interpretatie samen met deze kwaliteit. Bij DNA-stalen geïsoleerd uit weefsel dat gefixeerd is in paraffine is de kwaliteit van het DNA vaak minder goed. Hierbij speelt vooral de mate van fragmentatie een rol. Zo zijn bij PCR-producten afkomstig van gefragmenteerd DNA meer artefacten aanwezig waardoor een foute interpretatie kan worden gemaakt.

De SCS-ladder is een PCR waarbij meerdere primerparen gebruikt worden tegen standaard genen. Hierbij worden PCR-producten gevormd van precies 100 bp., 200 bp., 300 bp., 400 bp. en 600 bp. groot. Aan de hand van deze ladder kan meer gezegd worden over de kwaliteit van het DNA [46].

2.5.2.1. VISUALISATIE VAN BEKOMEN AMPLICONS NA SCS-LADDER

Het resultaat van de SCS-ladder wordt zichtbaar gemaakt met behulp van gelelektroforese. Elektroforese is een scheidingstechniek waarbij geladen deeltjes zoals DNA-moleculen of RNA-moleculen, onder invloed van een elektrisch veld door een medium, meestal gel, bewegen. Op deze manier kunnen de componenten worden gescheiden op basis van grootte.

Het medium moet voor een goede voortbeweging van de moleculen zorgen zodat een goede scheiding plaatsvindt. Elk molecuul beweegt met een andere snelheid doorheen de gel. Meestal wordt voor het medium agarose gebruikt. Agarose is een polysaccharide dat oorspronkelijk uit rode zeewieren werd gewonnen. Tegenwoordig wordt het synthetisch geproduceerd.

DNA en RNA zijn negatief geladen moleculen door de fosfaatgroepen in hun ketens. In een elektrisch veld gaan de negatief geladen moleculen zich bewegen naar de positief geladen pool. De snelheid waarmee de moleculen zich gaan voortbewegen, hangt af van de sterkte van de lading van

de deeltjes en de sterkte van het veld. Daarnaast hangt de snelheid af van de dikte en het soort medium. Moleculen zullen zich trager voortbewegen in een dikkere gel, aangezien zo'n medium een grotere weerstand biedt voor de moleculen. Daarnaast kunnen kleinere DNA-fragmenten zich sneller voortbewegen aangezien deze minder weerstand ondervinden dan grotere fragmenten.

Aan de stalen wordt vooraf een *tracking dye* toegevoegd. Die *dye* kan enerzijds toegevoegd worden vooraf aan de PCR bij de mastermix. Anderzijds kan deze na de PCR worden toegevoegd, voordat de stalen op de gel geladen worden. Voorbeeld van dergelijke *tracking dye* zijn *orange G* of *coralload*. Deze stof gaat mee migreren met het kleinste fragment, zodat de gelelektroforese tijdig kan stopgezet worden. Hierdoor zullen de kleinste fragmenten niet uit de gel migreren, waardoor deze niet verloren gaan.

Het resultaat van de gelelektroforese wordt zichtbaar gemaakt door middel van een UV-transilluminator. Bij het maken van de gel wordt een DNA-bindende fluorofoor, zoals *SYBR® safe* of *gelred™* toegevoegd. Deze stof gaat intercaleren met het DNA. Wanneer de gel wordt blootgesteld aan UV-licht gaat het fluorofoor gebonden aan het DNA oplichten [47].

2.5.3. BISULFIETBEHANDELING

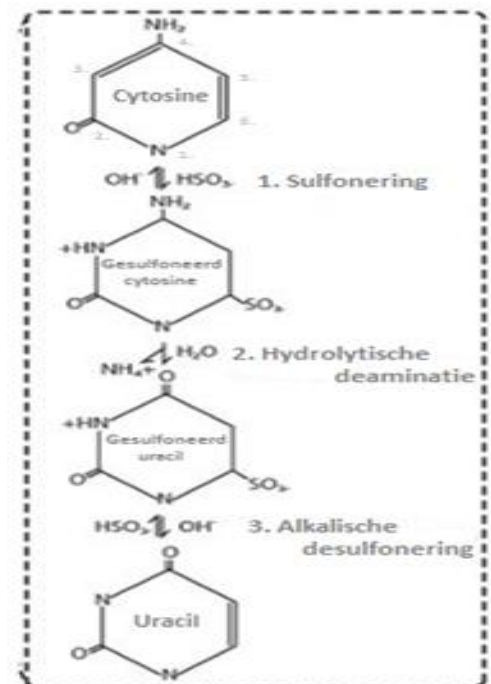
Met behulp van een bisulfietbehandeling ontstaat een onderscheid tussen ongemethyleerde en gemethyleerde DNA-sequenties. Hierbij worden ongemethyleerde cytosine basen omgezet naar uracil basen, terwijl gemethyleerde cytosine basen ongewijzigd blijven. Door middel van deze behandeling kan de methylatiestatus van het DNA gedetecteerd worden. Met methylatiestatus wordt bedoeld of de DNA-sequentie al dan niet gemethyleerd is [48].

2.5.3.1. PRINCIPE

Bij deze methode wordt het DNA behandeld met bisulfiet (HSO_3). Deze techniek is gebaseerd op het verschil in gevoeligheid van cytosine en methylcytosine voor deaminatie door bisulfiet onder zure omstandigheden. Methylcytosines kunnen ook door bisulfiet worden omgezet, maar deze reactie verloopt trager dan die van ongemethyleerde cytosines. Dit komt door de methylgroepen.

De bisulfietbehandeling bestaat uit drie stappen, nl. aromatische sulfonering, hydrolytische deaminering en alkalische desulfonering (figuur 16).

Het bisulfiet (HSO_3) wordt toegevoegd en gaat zich opsplitsen in een waterstofion (H^+) en sulfiet (SO_3^{2-}). Het waterstofatoom op de 5-6 dubbele binding van het cytosine wordt vervangen door een sulfaatgroep. Daarnaast wordt het waterstofion, afkomstig van het bisulfiet, op de 3-4 dubbele binding van het N-atoom gehangen ten koste van de dubbele binding.



Figuur 16 Reactievergelijking van de omzetting van een cytosine naar een uracil met behulp van bisulfiet [48]

Hierna volgt de hydrolytische deaminering. Bij deze stap worden overtollige aminozuurgroepen (NH₂) van het cytosine afgebroken. Hierbij gebeurt de omzetting van cytosine-bisulfiet derivaat naar uracil-bisulfiet derivaat. Het uracil-bisulfiet derivaat is stabiel in neutrale condities, maar kan makkelijk omgezet worden naar uracil in een alkalisch milieu.

In de laatste stap wordt de sulfaatgroep verwijderd door een alkalische behandeling. Zo wordt terug een dubbele binding gevormd bij C5 en C6 om uiteindelijk een uracil te bekomen [49] [50].

2.5.3.2. BISULFIET CONVERSIE VAN DNA

De bisulfietbehandeling bestaat uit twee stappen, nl. de eigenlijke conversie en de opzuivering. Bij de eigenlijke conversie wordt het DNA enkelstrengig gemaakt en gaat de reactie van de cytosines met het bisulfiet plaatsvinden.

De denaturatie van het DNA gebeurt meestal met een temperatuursverhoging. Wanneer al het DNA enkelstrengig is geworden, kan hierop het bisulfiet reageren. Een kritische stap bij de bisulfiet conversie is dat een volledige omzetting plaatsvindt van de ongemethyleerde cytosines. Hiervoor wordt het DNA geïncubeerd met het bisulfiet. Dit gebeurt bij hoge temperatuur en een lage pH-waarde voor een optimale omzetting. Het DNA is gevoelig voor deze condities waardoor fragmentatie kan optreden.

Na de conversie moet het DNA worden opgezuiverd. Dit is noodzakelijk om de bisulfietzouten en chemicaliën te verwijderen. Tijdens de opzuivering wordt het overtollige bisulfiet verwijderd door middel van ontzouting. Daarnaast worden de sulfaatresten verwijderd. Verder moeten ook de resten van de alkalische sulfonering verwijderd worden [51].

2.5.4. METHYLATION SPECIFIC PCR

Het resultaat van de bisulfietbehandeling kan zichtbaar gemaakt worden door een PCR-reactie. Zo een PCR-reactie wordt ook wel *methylation specific* PCR genoemd. Bij deze PCR wordt gebruik gemaakt van twee specifieke primerparen. Hiervan is één paar gericht tegen de gemethyleerde sequentie en het andere paar is gericht tegen de ongemethyleerde sequentie.

De MSP wordt met behulp van een PCR-reactie uitgevoerd, zoals een *nested* PCR of een *real time* PCR. Hieronder wordt eerst de theoretische achtergrond van een PCR-reactie uitgelegd. Daarna wordt dieper ingegaan op het principe van *nested* PCR en *real time* PCR [52].

2.5.4.1. BASISPRINCIPE VAN PCR

Bij deze reactie wordt een specifiek stuk uit een DNA-sequentie afgebakend. Hierna wordt het gewenste stuk DNA geamplificeerd, met andere woorden er worden miljarden kopieën gemaakt.

Het specifiek stuk DNA wordt afgebakend door primers. Dit zijn korte DNA-sequenties van ongeveer 20 tot 30 nucleotiden. De primers worden in een reactiemix gemengd. In deze reactiemix worden naast de primers ook DNA-polymerase, desoxynucleotide trifosfaat (dNTP's) en een buffer toegevoegd. Het DNA-polymerase is een enzym dat complementaire basenparen aan de DNA-sequentie kan plakken. Hierbij gebruikt het enzym de DNA-sequentie waaraan de primer gebonden is als startplaats. De nucleotiden die door het DNA-polymerase aan de sequentie geplakt worden, worden toegevoegd in de mastermix onder de vorm dNTP's. De buffer creëert een ideale omgeving waarin de reactie kan plaatsvinden.

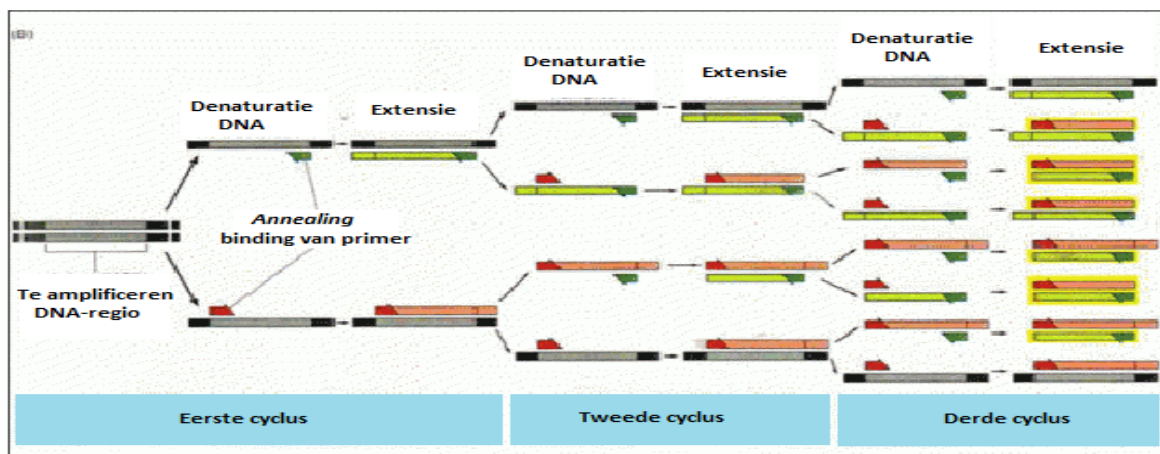
De PCR bestaat uit drie fasen, nl. denaturatie, hybridisatie en elongatie (figuur 17).

Bij de eerste fase vindt een temperatuursverhoging van 90°C-95°C plaats. Door deze verhoging gaan de waterstofbruggen breken, waardoor de DNA-strengen van elkaar loskomen. Dit wil zeggen dat het DNA denatureert, waardoor twee enkelstrengen ontstaan.

Hierna volgt de hybridisatie, ook wel *annealing* genoemd. Tijdens deze stap wordt de temperatuur verlaagd, zodat nieuwe waterstofbruggen kunnen worden aangemaakt tussen de primers en de DNA-sequentie. De temperatuur waarop de hybridisatie plaatsvindt is afhankelijk van de gebruikte primers en ligt meestal tussen 45°C en 65°C.

Als laatste stap gaat het DNA-polymerase in werking treden. Hierbij wordt de temperatuur terug verhoogd tot ongeveer 72°C. Deze fase, waarin de sequentie terug dubbelstrengs wordt, wordt de elongatie of extensie genoemd.

Deze drie fasen worden meerdere malen herhaald, waardoor het gewenste stuk DNA vermenigvuldigd wordt en een amplicon ontstaat [53] [54].



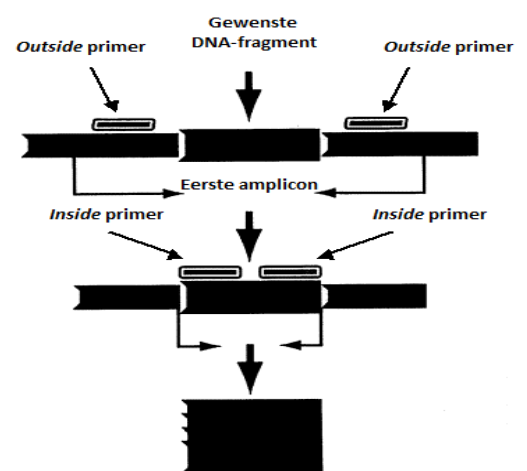
Figuur 17 Schematische weergave van principe van PCR [88].

2.5.4.2. NESTED PCR

De *nested* PCR (figuur 18) volgt hetzelfde principe als de gewone PCR-reactie. Het verschil is dat deze PCR bestaat uit twee PCR-reacties na elkaar, waarbij de keuze van primers van groot belang is.

De eerste PCR-reactie wordt uitgevoerd met *outside* primers. Deze primers worden zo gekozen dat de gewenste sequentie binnen het afgebakend gebied ligt. De *outside* primers bakenen een groter gebied af dan het eigenlijk gewenste DNA-fragment.

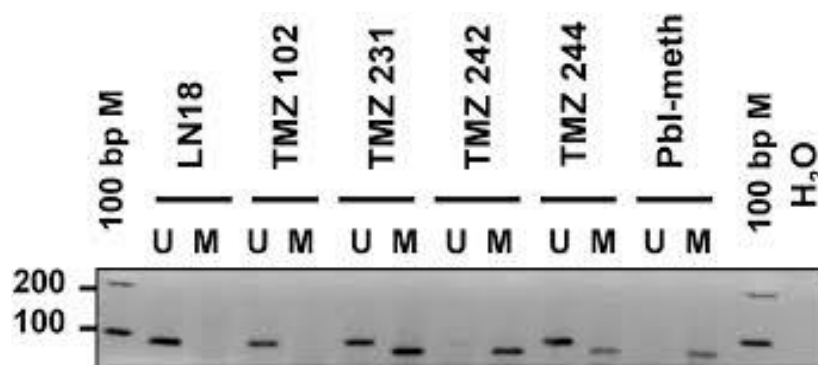
Na deze reactie volgt een tweede PCR-reactie met andere primers, nl. *inside* primers. Deze primers binden op de DNA-sequentie die tussen de *outside* primers ligt. Deze primers kunnen enkel binden wanneer de eerste PCR-reactie, met *outside* primers, een PCR-product heeft opgeleverd. Hierdoor ligt de specificiteit van de PCR-reactie hoger dan bij een gewone PCR-reactie [55] [56].



Figuur 18 Schematische weergave van principe van *nested* PCR [87].

VISUALISATIE VAN BEKOMEN AMPLICONS NA PCR-REACTIE

Het resultaat van de *nested* PCR wordt zichtbaar gemaakt door gelelektroforese. Er vormt zich een bandenpatroon waaruit kan worden geanalyseerd of de DNA-sequentie al dan niet gemethyleerd is [57]. In figuur 19 wordt een voorbeeld van zo een bandenpatroon weergegeven. Op de figuur zijn de verschillende resultaten voor MSP zichtbaar. Wanneer bij de tumor een band zichtbaar wordt bij *unmethylated* (U), wil dit zeggen dat de primers, gekozen voor de ongemethyleerde DNA-sequentie hebben kunnen binden. De DNA-sequentie wordt beschouwd als ongemethyleerd. Wanneer een band zichtbaar wordt bij *methylated* (M), wil dit zeggen dat primers, gekozen voor de gemethyleerde DNA-sequentie hebben kunnen binden. De DNA-sequentie wordt beschouwd als gemethyleerd. Hiernaast kan het ook zijn dat zowel een band bij U als bij M zichtbaar wordt. In deze gevallen wordt de DNA-sequentie ook beschouwd als gemethyleerd, aangezien de primers, voor de gemethyleerde DNA-sequentie, hebben kunnen binden [58].



Figuur 19 Resultaat na MSP. Op de figuur zijn de verschillende resultaten voor MSP zichtbaar. U staat voor ongemethyleerd DNA en M voor gemethyleerd DNA. De 100 basenparenladder die voor deze analyse gebruikt wordt is 100 bp M. Hiermee kan de grootte van de stalen geanalyseerd worden. H₂O is de negatieve controle die gebruikt wordt [58].

2.5.4.3. REAL TIME PCR

Deze PCR-methode verschilt van de klassieke PCR-reactie in de detectie van het PCR-product. Bij de klassieke PCR-methode wordt het PCR-product op het einde van de analyse via gelelektroforese gedetecteerd. Terwijl bij *real time* PCR het product gedurende het PCR-proces gebeurt, met andere woorden in '*real time*'.

PRINCIPE

De *real time* PCR bestaat net zoals de klassieke PCR uit drie stappen, nl. denaturatie, *annealing* en extensie. Deze drie stappen worden meerdere malen herhaald. Elke herhaling wordt een cyclus genoemd. Het PCR-product wordt na elke cyclus gemeten via een fluorescent signaal. Hiervoor moet een fluorescente *dye* worden toegevoegd die intercaleert met het DNA, zoals *Sybr® Green*.

Real time PCR kan zowel kwalitatief als kwantitatief uitgevoerd worden. Bij kwalitatieve *real time* PCR wordt de aan- of afwezigheid van een sequentie aangetoond. Bij kwantitatieve *real time* PCR wordt het aantal kopieën van het DNA gedetecteerd. Deze methode wordt ook wel qPCR genoemd [59] [60].

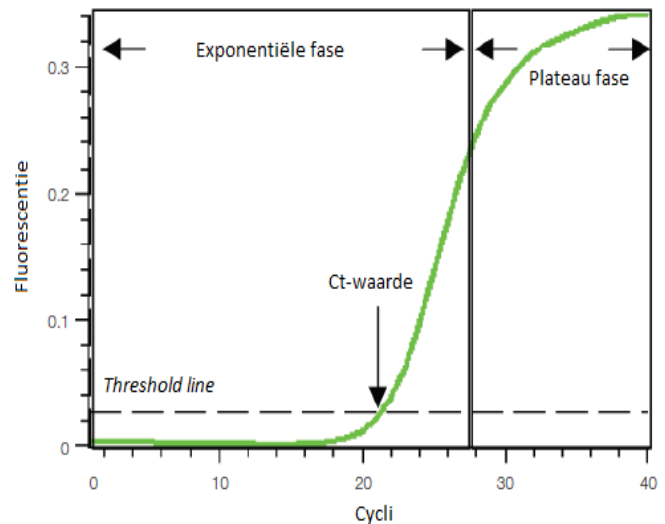
VISUALISATIE VAN HET VERLOOP VAN EEN *REAL TIME* PCR

Het resultaat van *real time* PCR wordt zichtbaar gemaakt aan de hand van grafieken. Er zijn twee soorten grafieken van belang bij de *methylation specific* PCR, nl. de amplificatieplot en de smeltcurve.

Amplificatiecurve

De amplificatiecurve (figuur 20) wordt weergegeven in een grafiek. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven en op de Y-as de fluorescentie van de amplificatie reactie. De curve bestaat uit twee fases: de exponentiële fase en de plateau fase. De grafiek begint met de exponentiële fase. In deze fase wordt het PCR-product na elke cyclus verdubbeld. Naarmate de reactie vordert raken reactiecomponenten op, waardoor de reactie vertraagt. De grafiek gaat over in een plateau fase.

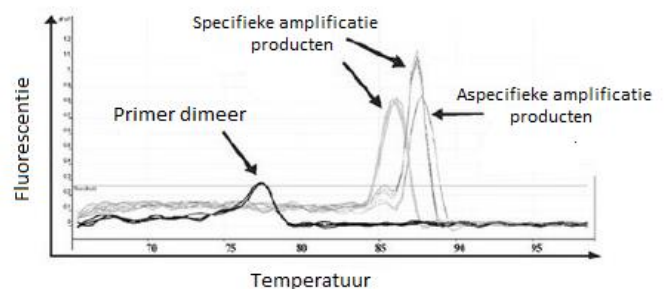
Op figuur 20 is te zien hoe bij cycli 1-18 de fluorescentie als achtergrond of ruis wordt waargenomen. De toename van de fluorescentie is niet detecteerbaar, terwijl het product toch exponentieel vermenigvuldigd wordt. De *threshold cyle* (Ct) of Ct-waarde is de cyclus waarbij het product voldoende geamplificeerd is en een detecteerbaar fluorescent signaal verkregen wordt [59].



Figuur 20 De amplificatiecurve [59]. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven en op de Y-as de fluorescentie van de amplificatie reactie

Smeltcurve

Een smeltcurve (figuur 21) geeft de verandering in fluorescentie weer bij denaturatie van het dubbelstrengig DNA naar enkelstrengig DNA. De denaturatie wordt veroorzaakt door middel van temperatuursverhoging. De smeltemperatuur van nucleïneuren wordt onder andere beïnvloed door de lengte van de sequentie en het GC-gehalte. Door deze verschillende smelteigenschappen kunnen de PCR-producten vaak onderscheiden worden op smeltemperatuur.



Figuur 21 Resultaat na qPCR, de smeltcurve [89]. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven. Op de Y-as wordt de fluorescentie

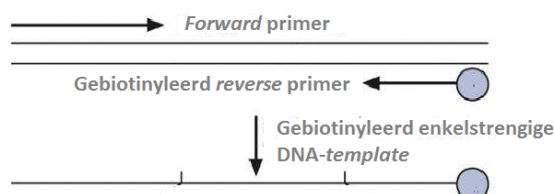
Met behulp van de smeltcurve kan de *real time* reactie gecontroleerd worden op primerdimeren. Hiernaast is de dissociatiecurve een controle op de reactiespecificiteit [59].

2.5.5. PYROSEQUENCING

Pyrosequencing is een techniek waarbij de volgorde van basenparen in een bepaalde DNA-sequentie kenbaar gemaakt wordt. Met deze techniek kan naast aantonen van de methylatiestatus van de DNA-sequentie ook opsporing naar mutaties gedaan worden.

2.5.5.1. PCR-REACTIE ALS VOORBEREIDING OP PYROSEQUENCING

Voorafgaand aan de *pyrosequencing* wordt een PCR uitgevoerd om het gewenste stuk DNA te amplificeren. Deze PCR wordt uitgevoerd met specifieke primers, waarbij de *forward* primer of de *reverse* primer aan het 5'-uiteinde een biotinelabel draagt. Met dit biotinelabel kan het PCR-product aan streptavidine gecoatete sepharose *beads* (ss-*beads*) worden gebonden (figuur 22).



Figuur 22 Principe van pyroPCR [61]

De controle van de PCR gebeurt met behulp van gelelektroforese. Hierbij wordt naast de stalen een ladder geladen om de grootte van de fragmenten te vergelijken en de dikte van de banden. Als ladder kan bijvoorbeeld een *smartladder* gebruikt worden. Zo kan worden besloten of het standaardvolume van het input DNA moet worden aangepast. Wanneer de banden licht van intensiteit zijn, betekent dit dat er weinig PCR-product gevormd is. Indien dit het geval is, zal het standaardvolume verhoogd worden [61].

2.5.5.2. VOORBEREIDING OP PYROSEQUENCING

Tijdens de voorbereiding wordt het PCR-product door middel van een biotinelabel aan ss-*beads* gebonden.

Hierna wordt het DNA gedeneureerd. Dit gebeurt door middel van verandering in pH-waarde. Het DNA wordt blootgesteld aan hoge pH-waarden, bijvoorbeeld aan een basische stof zoals natriumhydroxide (NaOH). Hierbij gaan de basen protonen verliezen, waardoor ze negatief geladen worden. Er zal afstoting optreden waardoor de twee strengen van elkaar loskomen.

Vervolgens volgt een wasstap om de resten van NaOH te verwijderen. Daarnaast worden ook de DNA-enkelstrengen die niet gekoppeld zijn aan het biotinelabel verwijderd.

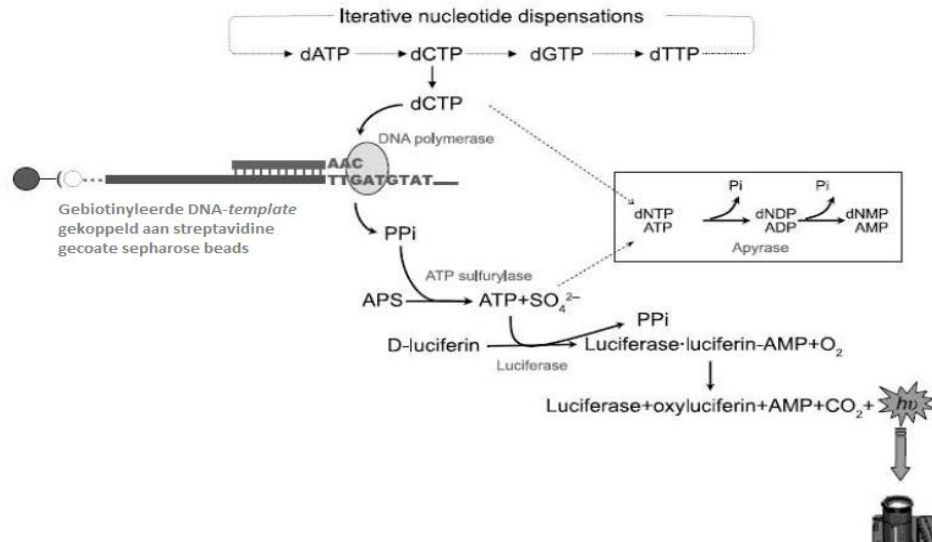
Na de opzuivering wordt het enkelstrengig product aan de *sequencing* primer gevoegd. Aan deze primer worden tijdens de *pyrosequencing* nucleotiden ingebouwd door middel van DNA-polymerase [61].

2.5.5.3. PRINCIPE VAN EIGENLIJKE PYROSEQUENCING

De methode is gebaseerd op de detectie van vrijgegeven pyrofosfaat (PPi). Het pyrofosfaat wordt tijdens de *sequencing* door een enzymreactie omgezet in een lichtsignaal.

Tijdens de *pyrosequencing* worden in elke cyclus vier dNTP's toegevoegd. Wanneer een nucleotide complementair is aan de base in de DNA-*template*, wordt het door DNA-polymerase ingebouwd in de DNA-streng. Hierbij komt een bepaalde hoeveelheid PPi vrij. Deze hoeveelheid is evenredig met het aantal nucleotiden dat wordt ingebouwd.

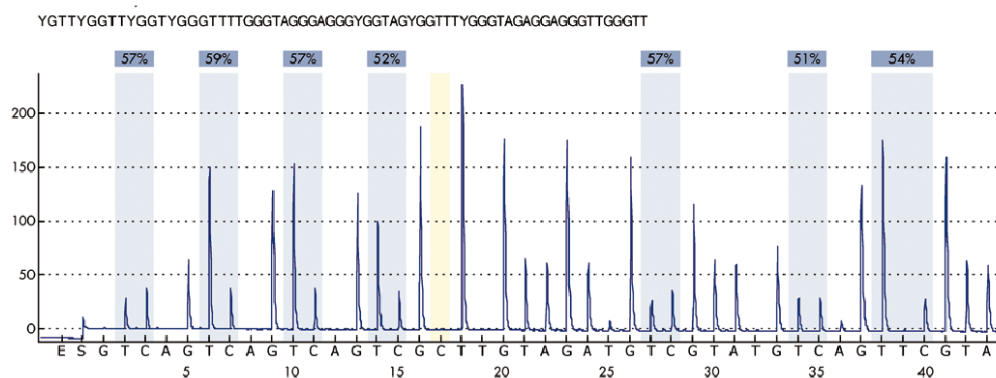
Het adenosine trifosfaat (ATP) sulfurylase zet P_i in, in de aanwezigheid van adenosine 5' fosfosulfaat (APS), om in ATP. Het bekomen ATP werkt als katalysator voor de luciferase-gemedieerde omzetting van luciferine naar oxyluciferine. Bij de omzetting van luciferine naar oxyluciferine wordt licht gegenereerd (figuur 23) [61].



Figuur 23 Principe van *pyrosequencing* [61].

De eventuele niet opgenomen dNTP's worden afgebroken door het enzym apyrase. Dit enzym breekt continu niet ingebouwde nucleotiden en ATP af. Wanneer de afbraak van de overmaat aan nucleotiden is afgerond, worden de volgende nucleotiden toegevoegd.

Het vrijgekomen licht wordt gedetecteerd met behulp van een *charge-coupled device* (CCD) camera. Deze vangt het signaal op en zet dit om naar een piekendiagram, ook wel pyrogram genoemd (figuur 24). De hoogte van elke piek is evenredig met het aantal opgenomen nucleotiden [61].



Figuur 24 Resultaat van *pyrosequencing*, een pyrogram [61].

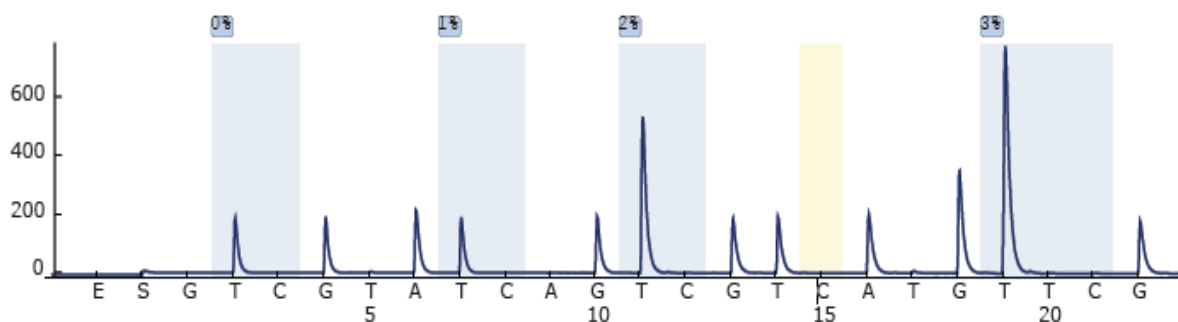
2.5.5.4. INTERPRETATIE VAN EEN PYROGRAM

Aan de hand van een piekendiagram kan de methylatiestatus worden afgeleid. Verder kan bij mutatieanalyse uit het pyrogram geanalyseerd worden of er zich al dan niet mutaties hebben voorgedaan. Hieronder worden twee voorbeelden besproken, nl. een pyrogram waarbij de methylatiestatus geanalyseerd wordt en een pyrogram waarbij een mutatieanalyse wordt uitgevoerd.

Pyrogram van bepaling methylatiestatus

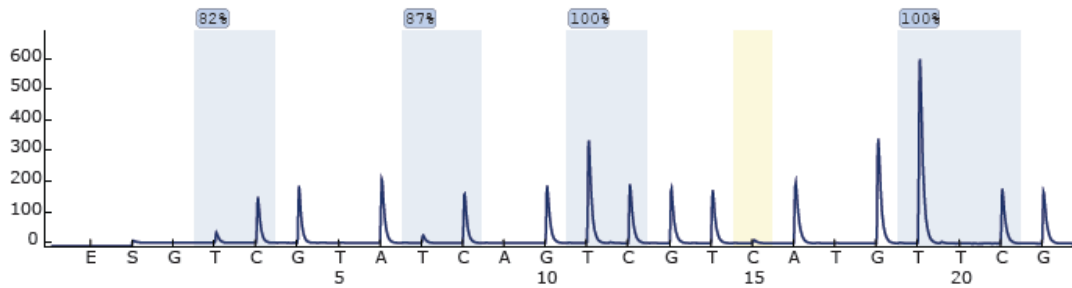
Om de methylatiestatus van een promotor of een gen te kunnen bepalen, wordt eerst een bisulfietbehandeling uitgevoerd. Bij deze behandeling worden de ongemethyleerde cytosines omgezet in thymines. De gemethyleerde cytosines blijven echter ongewijzigd.

Als de methylatiestatus van het DNA bepaald wordt, wordt er naar de CpG gebieden gekeken, vooral de C in het CpG gebied. Aan de hand van de cytosine voorafgaand aan een guanine kan bepaald worden of methylering heeft opgetreden. Zo zal bij een ongemethyleerd staal (figuur 25) de cytosine die gevolgd wordt door een guanine wijzigen in een thymine. Op het pyrogram zal een piek terug te vinden zijn bij de thymines en niet bij de cytosines. Bovenaan de grafiek wordt een percentage van methylatie weergegeven. Zo betekent 1% methylatie, dat het gen voor 1% gemethyleerd is of beter gezegd ongemethyleerd is.



Figuur 25 Voorbeeld van pyrogram waarbij methylatiestatus bepaald wordt van een ongemethyleerd staal. Op de X-as wordt de sequentie van het geanalyseerde gen weergegeven. Op de Y-as wordt het ontvangen lichtsignaal uitgedrukt. De CpG-gebieden worden in het blauw gemarkeerd. Boven het gemarkeerde gebied staat een percentage. Dit percentage stelt de graad van methylatie voor. Verder wordt op het pyrogram een geel gearceerd gebied weergegeven. Dit gebied wordt aangeduid voor de bisulfietcontrole [62].

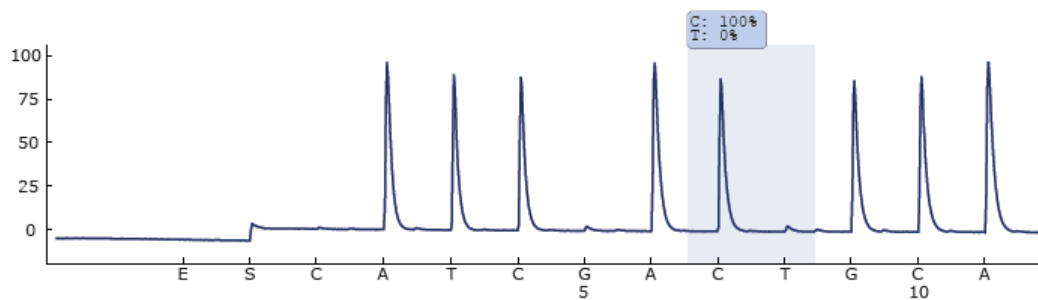
In figuur 26 wordt het pyrogram van een gemethyleerd staal weergegeven. Hierbij kan duidelijk waargenomen worden dat de cytosines van het CpG-gebied ongewijzigd zijn gebleven na de bisulfietbehandeling. Vandaar de 100% methylatie boven gebied drie en vier. Echter zijn niet al de cytosines ongewijzigd gebleven, zoals in het gemarkeerde gebied één en twee te zien is. Hierbij is niet het volledige CpG gebied gemethyleerd. Zo is voor het eerste gemarkeerde gebied 82% van het geanalyseerde DNA gemethyleerd. Dit betekent dat 8% van het geanalyseerde DNA niet gemethyleerd is. Voor het tweede gemarkeerde gebied is 87% van het geanalyseerde DNA gemethyleerd. Als eindconclusie kan gesteld worden dat dit staal gemethyleerd is.



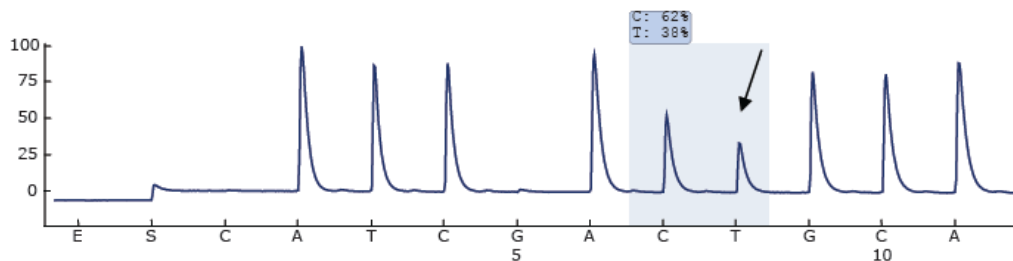
Figuur 26 Voorbeeld van een pyrogram waarbij methylatiestatus bepaald wordt van een gemethyleerd staal. Op de X-as staat de sequentie van het geanalyseerde gen weergegeven. Op de Y-as wordt het ontvangen lichtsignaal uitgedrukt. De CpG-gebieden worden in het blauw gemarkeerd. Boven elk gemarkeerde gebied staat het percentage. Dit percentage stelt de graad van methylatie voor. Verder wordt op het pyrogram een geel gearceerd gebied weergegeven. Dit gebied wordt aangeduid voor de bisulfietcontrole [62].

Pyrogram van een mutatieanalyse

Bij een mutatieanalyse wordt het pyrogram van het geanalyseerde staal vergeleken met het pyrogram van een wildtype sequentie. In de wildtype sequenties komen geen mutaties voor (figuur 27). Bij deze sequentie kan de C in ACG gemuteerd worden naar een T. Dit is zichtbaar in figuur 28.



Figuur 27 Pyrogram van wildtype sequentie [63].



Figuur 28 Pyrogram van een sequentie met een mutatie nl. ACG is gemuteerd naar ATG [63].

2.6. PLAN VAN AANPAK

Het onderwerp van dit project, MGMT-promotor hypermethylering, kadert zich binnen het kankeronderzoek, meer bepaald het onderzoek op glioblastomen, ook wel hersentumoren genoemd. Het project bestaat uit twee doelstellingen.

De eerste doelstelling van het project is het optimaliseren van de MLH1-analyse met betrekking tot promotor hypermethylering. Bij deze analyse wordt de methylatiestatus van het MLH1-gen onderzocht. Een verhoogde methylatiestatus van de promotor van het MLH1-gen kan voor instabiliteit van microsatellieten zorgen. Een hoge instabiliteit van microsatellieten kan in verband gebracht worden met een erfelijke vorm van kanker, het zogenaamde Lynch syndroom.

In een tweede doelstelling wordt getracht om MGMT-promotor hypermethylering aan te tonen in glioblastomen. Promotor hypermethylering van het MGMT-gen speelt een belangrijke rol bij tumorgenese en tumorprogressie van glioblastomen. Deze analyse vormt de tweede doelstelling.

2.6.1. OPTIMALISATIE VAN MLH1-ANALYSE

Om een beter onderscheid tussen sporadische en erfelijke colontumoren te maken, kan promotor methylering van het MLH1-gen aangetoond worden. Bij tumoren met een verhoogde microsatelliet instabiliteit en afwezigheid van hypermethylering van het MLH1-gen kan een betere prognose gemaakt worden voor het Lynch syndroom.

De MLH1-analyse dient opnieuw geoptimaliseerd te worden aangezien de analyse die reeds in het labo wordt uitgevoerd te gevoelig blijkt te zijn. Deze optimalisatie gebeurt aan de hand van een nieuwe bisulfietbehandeling, nl. Epiect *bisulfite* kit en een kwantitatieve PCR-methode.

De nieuwe bisulfietbehandeling is flexibeler en makkelijker. Zo is bij de oude bisulfietbehandeling een overnachtstap nodig aangezien de conversie van DNA naar gebisulfiet DNA 12 tot 16 uur in beslag neemt. Terwijl bij de nieuwe bisulfietbehandeling de conversie maar enkele uren duurt. Hierdoor kan geopteerd worden voor de bisulfietbehandeling op te delen in de conversie en de opzuivering, maar kan de analyse ook op één dag worden uitgevoerd. Dit maakt de analyse makkelijker. Daarnaast bestaat de nieuwe bisulfietbehandeling uit minder handelingen.

De methylatiestatus wordt momenteel gedetecteerd door een *methylation specific* PCR. Als PCR-methode wordt gebruik gemaakt van de *nested* PCR. Hierbij wordt het resultaat op het einde van de analyse zichtbaar gemaakt door middel van gelelektroforese. Deze methode dient omgezet te worden in een kwantitatieve methode. Hiervoor wordt geopteerd voor de qPCR.

Naast een MSP kan de methylatiestatus ook gedetecteerd worden door *pyrosequencing*. De techniek die het beste scoort op het gebied van sensitiviteit en specificiteit wordt verder gevalideerd.

Voor de MSP wordt zowel een *nested* PCR als een qPCR uitgevoerd. In bijlage 3 en 4 worden primers voor *nested* PCR en qPCR weergegeven en aangeduid op zowel de gemethyleerde als ongemethyleerde sequentie van het MLH1-gen. Beide technieken, *nested* PCR en qPCR, detecteren dezelfde CpG-gebieden.

Bij *pyrosequencing* worden andere primers gebruikt dan bij MSP. In bijlage 5 worden de gebruikte primers weergegeven en aangeduid op zowel de gemethyleerde als ongemethyleerde sequentie van het MLH1-gen. De *pyrosequencing* analyseert andere CpG-gebieden dan de MSP.

Het is van belang de CpG-gebieden te analyseren die zorgen voor inactivatie van het MLH1-gen.

2.6.2. AANTONEN PROMOTOR HYPERMETHYLERING MGMT-GEN

Hiernaast wordt getracht om MGMT-promotor hypermethylering aan te tonen. Hypermethylatie van de promotor van het MGMT-gen speelt een rol bij hersentumoren. Hersentumoren zijn moeilijk te behandelen tumoren aangezien ze een vrij resistent karakter vertonen. Wanneer de promotor van het MGMT-gen gemethyleerd is, wordt de gevoeligheid van de tumor voor chemotherapie verhoogd. Hierbij kan voor de patiënt een gunstigere prognose gesteld worden.

Voor het aantonen van hypermethylering van de promotor van het MGMT-gen kan de MLH1-analyse als basis gebruikt worden. Hierbij wordt eveneens beroep gedaan op twee technieken, nl. de *methylation specific PCR* en *pyrosequencing*.

Voor zowel de MSP en *pyrosequencing* zijn standaardmethodes terug te vinden in de literatuur. De standaardmethode van MSP wordt beschreven in Esteller et al. [64]. Om de methylatiestatus van het MGMT-gen via *pyrosequencing* te analyseren is een kit beschikbaar via Qiagen, nl. *therascreen MGMT pyro kit*. In het artikel van Quillien et al. [65] worden andere cruciale CpG-gebieden gedetecteerd.

Aangezien het belangrijk is dat de juiste CpG-gebieden worden gedetecteerd, worden de primers van MSP en *pyrosequencing* aangeduid op de sequentie van het MGMT-gen. In bijlage 7 en 8 worden de gebruikte primers voor *nested PCR* en qPCR weergegeven en aangeduid op zowel de gemethyleerde als ongemethyleerde sequentie van het MGMT-gen. Beide technieken, *nested PCR* en qPCR, detecteren dezelfde CpG-gebieden. Verder worden in bijlage 9 de primers voor *pyrosequencing* aangeduid, voor respectievelijk de Qiagen kit en het artikel van Quillin, aangeduid op de MGMT-sequentie, zowel op de gemethyleerde als ongemethyleerde sequentie.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat de *pyrosequencing* met primers uit Quillien et al. [65]. Zes cruciale CpG-gebieden detecteert.

3. MATERIAAL EN METHODEN

3.1. STALEN

Hieronder wordt algemene informatie gegeven over de gebruikte stalen. De analyses werden eerst geoptimaliseerd op controlestalen en daarna uitgevoerd op patiëntenstalen. Verder wordt uitleg gegeven over de specifieke stalen die gebruikt zijn bij de verschillende methodes. Hierbij wordt een onderscheid gemaakt tussen de stalen die gebruikt worden voor de analyses op het MLH1-gen en het MGMT-gen.

3.1.1. ALGEMEEN

Hieronder wordt een algemene informatie gegeven over de soorten stalen die gebruikt worden. Daarnaast wordt uitleg gegeven over hoe sommige stalen, zoals *in vitro methylated* DNA (IvD) en *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) verkregen worden.

3.1.1.1. CONTROLESTALEN

Er worden zowel controlestalen van het labo ter beschikking gesteld als controlestalen verkrijgbaar via Qiagen. De controlestalen van het labo zijn IVD en HUVEC. Daarnaast wordt een controlekit van Qiagen aangekocht, nl. Qiagen PCR *control* DNA. Deze kit werd aangekocht bij de firma Qiagen (Nederland). Het productienummer van deze kit is 59695. De controlestalen kunnen echter ook apart aangekocht worden.

Positieve controle IVD

IVD wordt als positieve controle voor gemethyleerd DNA gebruikt. Dit wil zeggen dat deze controle normaal alleen gemethyleerd DNA bevat. Deze controle wordt in het labo zelf gemaakt. Dit gebeurt door een cellijn DNA te behandelen met een DNA-methyltransferase of CpG-methyltransferase (M.SssI). Dit enzym gaat alle cytosines in de dubbelstrengige DNA-sequentie methyleren.

Negatieve controle HUVEC

Als negatieve controle voor detectie van methylatiestatus worden endotheelcellen afkomstig uit bloedvaten van de navelstreng gebruikt. Deze controle bevat enkel ongemethyleerd DNA.

Qiagen PCR *control* DNA

Deze kit bevat *unmethylated* DNA (U-controle) en *methylated* DNA (M-controle). Deze twee controles hebben al een bisulfietbehandeling ondergaan. Hiernaast wordt ook een ongemethyleerde controle meegeleverd die geen bisulfietbehandeling heeft ondergaan (UM-controle).

3.1.1.2. PATIËNSTALEN

Naast de controlestalen worden de analyses uitgevoerd op DNA-stalen die afkomstig zijn van patiënten zie bijlage 12, 13, 14, 15, 16 en 17. Eerst wordt de analyse op een beperkt aantal stalen uitgevoerd zie bijlage 13 voor de MLH1-analyse en zie bijlage 16 MGMT-analyse. Aan de hand van de resultaten wordt de procedure, indien nodig bijgeschaafd. Daarna wordt de techniek toegepast op een ander aantal stalen zie bijlage 14 voor de MLH1-analyse en bijlage 15 voor de MGMT-analyse.

3.1.1.3. CELLIJNEN

Voor de analyse van het MGMT-gen worden naast patiëntenstalen ook cellijnen geanalyseerd. Er worden vijf cellijnen geanalyseerd op basis van promotor hypermethylering van het MGMT-gen, nl. MDA231, SW480, SW48, HT29 en LS174T. Het DNA van deze cellijnen is van goede kwaliteit. Verder is het resultaat van methylatie voor het MGMT-gen algemeen bekend.

MDA231

MDA231 is een cellijn afkomstig van epitheelcellen van een metastase borstkanker [66]. Deze cellijn wordt in onderzoeksanalyses gebruikt als gemethyleerde controle bij het bepalen van de methylatiestatus van het MGMT-gen [67].

SW480

SW480 is een cellijn afkomstig van colonweefsel [68]. Deze cellijn wordt gebruikt als gemethyleerde controle bij analyses voor het bepalen van de methylatiestatus van het MGMT-gen [69].

SW48

SW48 is, net zoals SW480, een cellijn afkomstig van colonweefsel [70]. Deze cellijn wordt in analyses gebruikt als een gemethyleerde controle voor het bepalen van het MGMT-gen [69].

HT29

HT29 is een cellijn afkomstig van colonweefsel [71]. Deze cellijn wordt gebruikt als een ongemethyleerde controle bij analyses voor het bepalen van de methylatiestatus van het MGMT-gen [72].

LS174T

LS174T is een cellijn afkomstig van colonweefsel [73]. Over deze cellijn werd niets gevonden in de literatuur over de methylatiestatus van het MGMT-gen. Dit staal wordt meegenomen aangezien de kwaliteit van het DNA goed is.

In onderstaande tabel (tabel 2) wordt een overzicht gegeven van de resultaten van de cellijnen.

Tabel 2 Overzicht van methylatiestatus van het MGMT-gen voor de verschillende cellijnen.

Cellijn	MDA231	SW480	SW48	HT29	LS174T
Methylatiestatus voor MGMT-gen	Gemethyleerd	Gemethyleerd	Gemethyleerd	Ongemethyleerd	/

3.1.2. AANTONEN VAN PROMOTOR HYPERMETHYLERING OP MLH1- EN MGMT-GEN

3.1.2.1. BISULFIETBEHANDELING

De bisulfietbehandeling wordt uitgevoerd op zowel controle- als patiëntenstalen. Alle stalen die voor het bepalen van de methylatiestatus worden gebruikt, zowel voor MLH1-analyse als MGMT-analyse, worden behandeld met de nieuwe bisulfietbehandeling, nl. Epiect *bisulfite* kit. Deze kit wordt aangekocht bij de firma Qiagen (Nederland). De catalogusnummer van deze kit is 59104.

Hierbij is van belang in welke concentratie het DNA is opgelost. Aan de hand van de DNA-concentratie wordt bepaald hoeveel DNA wordt toegevoegd aan de bisulfietreactie. De concentratie van de DNA-stalen is afhankelijk van de methode van isolatie. Zo worden patiëntenstalen waarbij het DNA geïsoleerd is met behulp van de TE-buffer en *DNA hydration solution* (DHS) naar een concentratie van 200 ng/μl verdund. Daarnaast wordt stalen, geïsoleerd met behulp van de Maxwell, herleid naar een concentratie van 20 ng/μl. Wanneer de stalen een te lage concentratie hebben waardoor ze niet meer verdund kunnen worden, blijft de huidige concentratie behouden. Ook de kwaliteit van het DNA is belangrijk. Deze kwaliteit wordt bepaald met behulp van de SCS-ladder.

In bijlage 12 worden stalen weergegeven die de bisulfietbehandeling ondergaan voor analyses van het MLH1-gen. Naast het staalnummer wordt de concentratie, de wijze van DNA-isolatie en de verdunning weergegeven. Verder wordt het resultaat van de SCS-ladder weergegeven. Als laatste wordt ook de zuiverheid van het DNA weergegeven.

In bijlage 15 worden de stalen weergegeven die de bisulfietbehandeling ondergaan voor analyses van het MGMT-gen. Hierbij wordt ook de concentratie, wijze van DNA-isolatie en verdunning weergegeven. Verder wordt ook het resultaat van de SCS-ladder en de zuiverheid van het DNA weergegeven.

3.1.2.2. NESTED PCR

De *nested* PCR wordt in het labo reeds uitgevoerd op het MLH1-gen. Voorafgaand aan deze methode ondergaan de DNA-stalen een bisulfietbehandeling.

MLH1-GEN

Voor de analyses van het MLH1-gen worden patiëntenstalen uit voorgaande jaren gebruikt. De MSP-analyse met de *nested* PCR is reeds uitgevoerd op de patiëntenstalen van het MLH1-gen. Hierbij werd een andere bisulfietmethode toegepast. De bisulfietmethode die nu gebruikt wordt, Epiect *bisulfite* kit, zou een hogere gevoeligheid vertonen. Dit kan aangetoond worden met deze analyse. Deze analyse wordt uitgevoerd op patiëntenstalen van 2010 zie bijlage 13.

3.1.2.3. QPCR

De qPCR wordt, zowel voor het MLH1-gen als het MGMT-gen, geoptimaliseerd op controlestalen. Daarna volgt een analyse op een beperkt aantal patiëntenstalen (bijlage 13 en 16). Hierna kunnen indien nodig nog aanpassingen gedaan worden aan de procedure. Als laatste wordt de analyse gevalideerd aan de hand van een groter aantal patiëntenstalen (bijlage 14 en 17).

OPTIMALISATIE QPCR ALS ANALYSE VOOR HET MLH1-GEN

De optimalisatie van de qPCR wordt uitgevoerd op controlestalen. Hierbij worden zowel de controles van het labo als van Qiagen PCR *control* kit gebruikt.

QPCR OP BEPERKT AANTAL STALEN VOOR DE MLH1-ANALYSE

Na de optimalisatie van de qPCR wordt deze analyse uitgevoerd op een beperkt aantal patiëntenstalen (bijlage 13). De stalen zijn allemaal afkomstig uit het jaar 2010. Op deze stalen is in 2010 de bisulfietbehandeling met de oude kit uitgevoerd. Tijdens dit project worden de stalen behandeld met de nieuwe bisulfietbehandeling. Na de bisulfietbehandeling wordt op de patiëntenstalen de qPCR uitgevoerd.

VALIDATIE VAN QPCR VOOR DE ANALYSE VAN HET MLH1-GEN

De validatie van de qPCR voor de analyse van het MLH1-gen wordt uitgevoerd op een groot aantal stalen. Het DNA van deze stalen is in 2008, 2009, 2010, 2011 of 2012 geïsoleerd. In bijlage 14 is meer informatie over deze stalen te vinden.

OPTIMALISATIE QPCR ALS ANALYSE VOOR HET MGMT-GEN

De optimalisatie gebeurt net zoals bij het MLH1-gen op controlestalen. Hierbij worden eveneens beide controles gebruikt, zowel de controlestalen van het labo als van de Qiagen PCR *control* kit.

QPCR OP EERSTE REEKS PATIËNTENSTALEN VOOR DE MGMT-ANALYSE

Na de optimalisatie van de qPCR wordt deze analyse uitgevoerd op een beperkt aantal patiëntenstalen (bijlage 16). De stalen zijn allemaal afkomstig uit het jaar 2014. Op deze stalen is reeds MSP uitgevoerd in een ander labo in het azM (*research*).

QPCR OP TWEEDE REEKS PATIËNTENSTALEN VOOR DE ANALYSE VAN HET MGMT-GEN

De qPCR wordt ook uitgevoerd op een tweede reeks patiëntenstalen (bijlage 17). Het DNA van deze stalen wordt geïsoleerd uit weefsel dat gefixeerd is in paraffine, ook wel *formalin-fixed paraffin-embedded* (FFPE) genoemd.

3.1.2.4. PYROSEQUENCING

De *pyrosequencing* wordt voor zowel het MLH1-gen als MGMT-gen eerst uitgevoerd op controlestalen. Zo wordt eerst de pyroPCR geoptimaliseerd. Dit gebeurt aan de hand van controlestalen. Als deze PCR geoptimaliseerd is, kan de pyroPCR op de patiëntenstalen worden uitgevoerd. Dit zowel voor het MLH1-gen (bijlage 13 en 14) als het MGMT-gen (bijlage 16 en 17). Verder dient het programma voor de *pyrosequencing* geoptimaliseerd te worden. Dit gebeurt met behulp van controlestalen. Als controlestalen worden zowel voor de analyses van het MLH1-gen als voor MGMT-gen gebruik gemaakt van ongemethyleerde en gemethyleerde controlestalen, nl. gebisulfierte HUVEC of UM en IVD. Nadat het programma goedgekeurd is, kan de *pyrosequencing* uitgevoerd worden op een beperkt aantal patiëntenstalen, bijlage 13 voor het MLH1-gen en bijlage 16 voor het MGMT-gen. Nadat deze resultaten voldoen aan de verwachtingen, kan overgegaan worden op het analyseren van een groter aantal patiëntenstalen voor zowel het MLH1-gen (bijlage 14) als het MGMT-gen (bijlage 17).

MLH1-GEN

Bij de *pyrosequencing* wordt gebruik gemaakt van gebisulfierte stalen. Vooraf aan de *pyrosequencing* wordt een pyroPCR uitgevoerd. Zowel de pyroPCR als de *pyrosequencing* worden geoptimaliseerd op controlestalen. Nadat de controlestalen een goede amplificatie vertonen dient het programma van de *pyrosequencing* geoptimaliseerd te worden. Voor het MLH1-gen wordt gekeken welke programma het beste resultaat weergeeft. Na de controlestalen wordt de *pyrosequencing* uitgevoerd op het beperkt aantal patiëntenstalen van 2010 (zie bijlage 13). Als laatste wordt de analyse gevalideerd aan de hand van een groter aantal patiëntenstalen (bijlage 14).

OPTIMALISATIE VAN PYROPCR EN PYROSEQUENCING

De optimalisatie van de pyroPCR gebeurt aan de hand van controlestalen. Hiervoor worden HUVEC of UM en IVD gebruikt. Deze dienen echter een bisulfiertbehandeling te ondergaan vooraf aan de pyroPCR. Als de pyroPCR goede resultaten geeft, kunnen deze stalen gebruikt worden bij de optimalisatie van de *pyrosequencing*. Voor deze analyse dient een programma opgesteld te worden. Dit programma wordt met behulp van de controlestalen uitgetest. Bij goede resultaten kan overgegaan worden op het testen van een beperkt aantal patiëntenstalen.

PYROPCR EN PYROSEQUENCING OP BEPERKT AANTAL STALEN VOOR DE MLH1-ANALYSE

Na de optimalisatie van de pyroPCR wordt de analyse uitgevoerd op een beperkt aantal patiëntenstalen (bijlage 13). Deze stalen zijn afkomstig uit het jaar 2010. Voor deze analyse ondergaan de patiëntenstalen opnieuw een bisulfiertbehandeling. Na die bisulfiertbehandeling wordt op de stalen de geoptimaliseerde pyroPCR uitgevoerd. Afhankelijk van het resultaat van de pyroPCR wordt een *pyrosequencing* uitgevoerd op de stalen.

VALIDATIE VAN PYROPCR EN PYROSEQUENCING VOOR HET MLH1-GEN

De validatie van de pyroPCR en *pyrosequencing* wordt uitgevoerd op een groot aantal patiëntenstalen (bijlage 14). Het DNA van deze stalen is in 2008, 2009, 2010, 2011 of 2012 geïsoleerd. In bijlage 14 is meer informatie over deze stalen terug te vinden.

MGMT-GEN

Ook bij de *pyrosequencing* voor de MGMT-analyse wordt gebruik gemaakt van gebisulfiet stalen. Voor deze analyse wordt net zoals bij het MLH1-gen de pyroPCR geoptimaliseerd met behulp van controlestalen. Nadat de pyroPCR geoptimaliseerd is, kan het programma van de *pyrosequencing* geoptimaliseerd worden. Dit gebeurt aan de hand van de controlestalen waarop de geoptimaliseerde pyroPCR is uitgevoerd. Voor deze methode dienen alsook de programma's van *pyrosequencing* geoptimaliseerd te worden. Wanneer de programma's zijn goedgekeurd kan overgegaan worden naar de analyse van de patiëntenstalen (bijlage 16 en 17).

OPTIMALISATIE VAN PYROPCR EN PYROSEQUENCING

De optimalisatie gebeurt aan de hand van controlestalen. Hiervoor worden UM en IvD gebruikt. Deze dienen echter vooraf aan de pyroPCR een bisulfietbehandeling te ondergaan. Als de pyroPCR goede resultaten oplevert, kunnen deze stalen gebruikt worden bij de optimalisatie van de *pyrosequencing*. Voor deze analyse worden drie programma's uitgetest. Zo worden twee programma's zelf aangemaakt aangezien er twee verschillende gebieden van het gen geanalyseerd worden. Verder wordt een derde programma uitgetest. Dit programma werd al door Qiagen geoptimaliseerd. Toch wordt dit voor de zekerheid op de controlestalen uitgetest. Nadat de programma's goede resultaten op de controlestalen opleveren, kan overgegaan worden naar een beperkte reeks patiëntenstalen (bijlage 16 en 17).

PYROPCR EN PYROSEQUENCING OP BEPERKT AANTAL STALEN VOOR DE MGMT-ANALYSE

Na de optimalisatie van de pyroPCR wordt de analyse uitgevoerd op een beperkte reeks patiëntenstalen (bijlage 16). Deze stalen zijn afkomstig uit het jaar 2014. Het DNA van deze stalen is reeds geïsoleerd. Voor deze analyse ondergaan de DNA-stalen opnieuw een bisulfietbehandeling. Na de bisulfietbehandeling wordt op de stalen de geoptimaliseerde pyroPCR uitgevoerd. Afhankelijk van het resultaat van de pyroPCR wordt een *pyrosequencing* uitgevoerd op de stalen.

VALIDATIE VAN PYROPCR EN PYROSEQUENCING VOOR HET MGMT-GEN

Naast de patiëntenstalen reeks 1 van MGMT-analyse wordt de pyroPCR en *pyrosequencing* uitgevoerd op een andere reeks patiëntenstalen bijlage 17. Het DNA van deze stalen wordt geïsoleerd uit weefsel dat gefixeerd is in paraffine.

3.2. METHODEN

Hieronder wordt uitleg gegeven over de uitgevoerde methoden in het labo. Daarnaast zijn de protocollen die worden uitgevoerd hier terug te vinden.

3.2.1. AANTONEN VAN PROMOTOR HYPERMETHYLERING OP MLH1- EN MGMT-GEN

De gebruikte procedures voor het aantonen van promotor hypermethylering worden verder omschreven. Hierbij wordt in het protocol omschreven hoe dit voor het MLH1-gen en voor het MGMT-gen gebeurt.

3.2.1.1. DNA-ISOLATIE MET BEHULP VAN DE MAXWELL 16MDX

Elke DNA-analyse begint met het isoleren van DNA. De DNA-isolatie gebeurt met behulp van de Maxwell 16 MDx. Met dit toestel wordt de DNA-isolatie automatisch uitgevoerd met behulp van cellysis en binding aan paramagnetische silicapartikels. Het toestel voert volgende stappen automatisch uit:

- Lyseren van het monster in aanwezigheid van een chaotrope stof en reinigingsmiddel.
- Binding van nucleïnezuren aan paramagnetische silicadeeltjes.
- Uitwassen/scheiden van de gebonden deeltjes van de overige cellulaire bestanddelen.
- Elutie van de nucleïnezuren.

Voor de patiëntenstalen van de MLH1-analyse en de patiëntenstalen reeks 1 van de MGMT-analyse is het DNA reeds geïsoleerd. Voor de patiëntenstalen reeks 2 van de MGMT-analyse moet het DNA nog geïsoleerd worden. Het DNA van deze stalen wordt geïsoleerd uit FFPE. Voor dit weefsel wordt een kit gebruikt voor de DNA-isolatie met de Maxwell, nl. Maxwell® 16 FFPE Plus LEV DNA Purification Kit. Deze kit wordt aangekocht bij de firma Promega (Duitsland). Het catalogusnummer van deze kit is AS1135.

Naast de patiëntenstalen wordt bij elke run een blanco meegenomen. Hiermee kan gecontroleerd worden of tijdens de procedure alles goed verlopen is.

MATERIALENLIJST

Toestellen en materialen

- ✓ Maxwell 16 MDx
- ✓ Maxwell® 16 LEV RNA Cartridge
- ✓ LEV plungers
- ✓ Elutietubes
- ✓ Pipetten (20µl, 200µl en 1000 µl)
- ✓ Filtertips
- ✓ Vortex
- ✓ Eppendorfcentrifuge
- ✓ Thermomixer
- ✓ Eppen (1,5 ml)

Producten

- ✓ Nuclease vrij water
- ✓ Lysisbuffer
- ✓ Incubatiebuffer
- ✓ Proteïnase K

PROTOCOL

Vorbewerking

1. Voeg 180 µl incubatiebuffer toe aan het staal.
2. Voeg 20 µl proteïnase K toe aan het staal.
 - Vortex enkele sec.
3. Incubeer het staal in een thermomixer bij 70°C en 800 rpm. Dit gedurende min. 3 uur tot overnacht.
 - Het weefsel moet volledig opgelost zijn, vloeistof helder zonder weefselfragmenten.
4. Voeg 400 µl lysisbuffer toe.
 - Vortex gedurende enkele sec.

Vorbereiding van de Maxwell-run

1. Plaats een cartridge (label naar achter gericht) en verwijder de *seal*.
2. Pipetter het volledige *sample* in welletje 1.
3. Plaats een Plunger in welletje 8.
4. Plaats een elutie-epje met 60µl Maxwell TE buffer in de Maxwell.
 - Laat het epje open staan.
 - Let erop dat het elutievolume op de bodem van het epje zit.
 - Indien er minder dan 16 *samples* gerund worden, verspreid dan het aantal cartridges gelijkelijk over het rek.

Maxwell-run starten

1. Het hoofdscherm moet LEV aangeven.
 - Zo niet moet de hardware gewisseld worden (APP/MXL-001).
2. Selecteer "DNA".
3. Selecteer "FFPE/Cells".
4. Druk op de "Run/Stop" knop. Open de deur en plaats het platform.
5. Sluit de deur.
6. De run start automatisch.

Einde van de Maxwell-run

1. Open de deur en let erop dat de plungers van de magnetische staaf af zijn en in welletje 8 zitten.
 - Let erop dat er geen *beads* in welletje 2 aanwezig zijn.
2. Druk op de "Run/Stop" knop.
3. De cartridges mogen weggegooid worden.
4. Sluit de deur en laat de UV-lamp van de Maxwell 10 minuten branden.

Afwerken van DNA-isolatie

1. Zet de elutie-epjes in het magnetische elutierek en pipetteer het elutievolume over in opslagepjes.

3.2.1.2. DNA-CONCENTRATIE- EN ZUIVERHEIDSBEPALING MET BEHULP VAN NANODROP

Na de DNA-isolatie dient echter de concentratie en zuiverheid van het DNA te worden gemeten. Afhankelijk van de concentratie wordt het DNA verdund. Het DNA dat met de Maxwell 16MDx geïsoleerd is, wordt verdund naar 20 ng/ µl.

Ook deze bepaling is voor de meeste stalen reeds uitgevoerd. Enkel op het DNA, van de patiëntenstalen reeks 2 van de MGMT-analyse (bijlage 17), dat nog geïsoleerd moet worden, wordt de DNA-concentratie- en zuiverheidsbepaling uitgevoerd met behulp van de NanoDrop. De NanoDrop is een spectrofotometer die de absorptie van oplossingen meet bij 230, 260 en 280 nm. Bij 230 nm is er een minimale absorptie door nucleïnezuren. Wel worden bij deze golflengte organische verontreinigingen, zoals fenol en Trizol, gemeten. Bij golflengte 260 nm worden nucleïnezuren gemeten en bij golflengte 280 nm worden eiwitten gemeten. De achtergrond absorptie wordt gemeten bij 340 nm. De A340 wordt afgetrokken van de A230, A260 en A280 om te corrigeren voor de achtergrond. De resultaten bij A230, A260 of A280 kunnen gebruikt worden voor het berekenen van DNA- of RNA-concentratie. De ratio's tussen de verschillende absorpties geven informatie over de kwaliteit van het monster (zie tabel 3).

Tabel 3 In deze tabel worden de ratio's weergegeven die van belang zijn voor de kwaliteit van DNA of RNA. De ratio A260/A280 geeft informatie over de verontreiniging door eiwitten. De ratio A260/A230 geeft informatie over de organische verontreiniging

Ratio	A260/A280	A260/A230
Zuiver DNA	1,8	1,8-2,2
Zuiver RNA	2,0	1,8-2,2

Naast de DNA-stalen worden voor deze analyse MilliQ water en de blanco van de DNA-isolatie meegenomen. Met het MilliQ water wordt het apparaat geïntialiseerd. Het toestel wordt op nul gezet door de blanco.

MATERIALELIJST

Toestellen en materialen

- ✓ NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer
- ✓ Pipet (10 µl)
- ✓ Filtertips

Producten

- ✓ MilliQ water
- ✓ Blanco

PROTOCOL

1. Start het *software* programma van de NanoDrop 1000 3.7.1 op de computer.
2. Kies een *user* en vul het bijhorende wachtwoord in.
3. Kies voor de optie "*Nucleic Acid*".
4. Click op "OK".
5. Open de *sampling* arm.
6. Pipetteer 1 µl MilliQ water op de onderste pedestal.
7. Sluit voorzichtig de *sampling* arm.
8. Druk op "OK".
9. Stel het *sample* type in op "DNA-50".
10. Open de *sampling* arm, veeg de druppel MilliQ water weg met een zachte tissue.

11. Pipetteer 1 µl blanco op de onderste pedestal.
12. Klik vervolgens op “*blank*”.
13. Breng de naam van het te meten *sample* (in het vak *sample ID*).
14. Open de *sampling* arm, veeg de druppel van het blanco monster weg met een zachte tissue.
15. Pipetteer 1 µl DNA van een staal op de onderste pedestal.
 - Denk hierbij om het DNA-staal op te mengen door op en neer te pipetteren.
16. Klik vervolgens op “*measure*”.
17. Noteer de DNA-concentratie en de ratio A260/A280 en A260/A230.
18. Herhaal stap 13 tot 17 voor de andere DNA-stalen.
 - Dit enkel wanneer de DNA-stalen opgelost zijn in dezelfde oplossing als de blanco. In andere gevallen moet de blanco opnieuw ingesteld worden (stap 11-14).

3.2.1.3. DNA-CONCENTRATIEBEPALING MET BEHULP VAN QUANTUS

De Quantus Fluorometer is een fluorometer voor kwantificering van DNA, RNA en eiwitten. Met deze fluorometer kunnen zowel nucleïnezuren (DNA en RNA) als eiwitten gekwantificeerd worden. De Quantus heeft een zeer gevoelige fluorescentiedetectie. De concentratiebepaling door dit toestel gebeurt met behulp van een *dye*. Deze is afhankelijk van het soort materiaal. Deze *dyes* zijn commercieel beschikbaar bij de firma Promega (Duitsland). Voor dubbelstrengig DNA wordt de QuantiFluor® dsDNA *sample* kit gebruikt. Het catalogusnummer is E2671. Voor elke kit met een nieuw lotnummer dient de fluorometer gekalibreerd te worden.

MATERIALENLIJST

Toestellen en materialen

- ✓ Quantus™ fluorometer
- ✓ USB *power supply*
- ✓ USB *cord*
- ✓ *Outlet adapter* kit
- ✓ *Quick reference guide*
- ✓ *Operating manual*
- ✓ *Product registration card*
- ✓ PCR-tubes (0,5 ml)
- ✓ Pipetten (10 µl, 200 µl)
- ✓ Vortex
- ✓ Centrifuge

Producten

- ✓ *Dye*
- ✓ DNA *standard*
- ✓ TE-buffer

PROTOCOL

Kalibratie en controle voor meting van dsDNA

1. Bereid de standaard voor.
 - 1 µl standaard toevoegen aan 199 µl QuantiFluor ONE dsDNA *dye*.
2. Bereid de blanco voor.
 - 1 µl TE-buffer toevoegen aan 199 µl QuantiFluor ONE dsDNA *dye* in een 0,5 ml epje.
 - Hier wordt TE-buffer gebruikt aangezien hier het DNA in is opgelost.

3. Vortex 10 sec.
4. Draai het epje kort af.
5. Laat 5-10 min. incuberen in het donker bij kamertemperatuur.
6. Selecteer de gewenste QuantiFluor *dye assay*.
7. Kies in het basismenu de optie “*calibrate*”.
8. Plaats het blanco *sample* in de *sample* kamer en sluit het toestel.
9. Selecteer “*read blanc*”. Het resultaat verschijnt op het scherm.
10. Plaats het standaard *sample* in de *sample* kamer en sluit het toestel.
11. Selecteer “*read std*”. Het resultaat verschijnt op het scherm.
12. De blanco/standaard ratio wordt nu automatisch berekend.
 - Als deze ratio goed is, wordt de status op het scherm “VALID”.
 - Als deze ratio niet goed is, verschijnt “INVALID”. De kalibratie dient opnieuw uitgevoerd te worden.
13. Kies “*safe*” om de kalibratie op te slaan.

Metten van DNA-concentratie van stalen met behulp van Quantifluor ONE dsDNA

1. Bereid de *samples* voor door 1 µl DNA aan 199 µl Quantifluor ONE dsDNA *dye* toe te voegen in een 0,5 ml epje.
2. Vortex 10 sec. en draai het *sample* af.
 - Vermijd luchtbelletjes in het *sample*. Deze kunnen de meting beïnvloeden.
3. Incubeer 5 tot 10 minuten bij kamertemperatuur.
 - Bij voorkeur in het donker. De *dye* is lichtgevoelig.
4. Plug het USB uitend van de Quantus in de computer. Het basismenu wordt geladen.
5. Druk op een willekeurige knop om de Quantus op te starten.
6. Navigeer naar de rechterzijde van het scherm en selecteer “*protocol*”.
7. Selecteer het gewenste protocol.
8. Selecteer de volume/Units knop en breng het volume van het *sample* in dat is toegevoegd (1µl).
9. Selecteer de gewenste concentratieweergave en druk op enter.
10. Open de Quantus Fluorometer *software*.
11. Plaats het onbekende *sample* in de *sample* kamer en sluit het toestel.
 - Het toestel gaat automatisch de fluorescentie meten zodra het deksel dicht is. De berekende nucleïnezuurconcentratie zal vervolgens op zowel de Quantus als de computer getoond worden.
12. Open het toestel en wissel van *sample* als er nog meerdere metingen verricht moeten worden.
13. De *samples* kunnen met behulp van de *software* hernoemd worden.
14. Druk in de *software* op “*save as*” om de resultaten op te slaan
15. Druk op “*clear data*” om de resultaten uit de *software* te verwijderen en sluit vervolgens de *software* af.

3.2.1.4. SCS-LADDER

Naast de concentratiebepaling worden de DNA-stalen ook op kwaliteit en amplificeerbaarheid gecontroleerd. Dit gebeurt met behulp van een PCR-reactie, nl. de SCS-ladder. Met deze analyse kan bepaald worden of DNA voldoende kwaliteit heeft om geamplificeerd te worden. Verder kan ook de mate van fragmentatie worden vastgesteld.

Deze kwaliteitsbepaling is noodzakelijk vermits de kwaliteit van DNA geïsoleerd uit FFPE-weefsel vaak slecht is. Hierbij speelt vooral de mate van fragmentatie een grote rol. Zo kunnen bij grote PCR-producten waarvan het DNA sterk gefragmenteerd is, veel artefacten ontstaan. Hierdoor kunnen foute interpretaties volgen.

De SCS-ladder is een PCR gebaseerd op meerdere primerssets die gericht zijn tegen standaard genen. De verwachte grootte van de PCR-producten zijn exact 100, 200, 300, 400 en 600 basenparen. Het grootste PCR-product dat met de SCS-ladder geamplificeerd kan worden, geeft een indicatie voor de betrouwbaarheid van de verdere DNA-analyses.

Naast de patiëntenstalen wordt voor deze analyse een positieve controle en een blanco meegenomen. Met de positieve controle kan worden gekeken of de PCR-reactie gelukt is. De blanco dient om te kijken of contaminatie heeft plaatsgevonden.

MATERIALENLIJST

Toestellen en materialen

- ✓ Pipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 200 µl en 100 µl)
- ✓ UV-kast
- ✓ Thermocycler
- ✓ PCR-epjes
- ✓ Epjes (1,5 ml)
- ✓ Filtertips
- ✓ Vortex
- ✓ Centrifuge

Producten

- ✓ dNTP's (25 mM)
- ✓ Primermix
- ✓ Steriel H₂O

PROTOCOL

1. Bereid de mastermix voor volgens onderstaand pipetteerschema (tabel 4).

Tabel 4 Pipetteerschema voor de mastermix van SCS-ladder.

Oplossing	Volume per reactie (µl)	Volume voor ... reacties (µl)
PCR-mix	3,5	
JumpStart RedTaq (1 Unit/µl)	1,0	
Steriel H ₂ O	14,5	
Totaal volume	19	
Sample DNA	1	

2. Vul de mastermix uit in PCR-epjes.
3. Voeg het DNA toe.

4. Stel het PCR-programma in (tabel 5).

Tabel 5 PCR-programma van SCS-ladder.

Stap	Aanta cycli	Temperatuur	Tijd
Enzymactivatie	1	95°C	7 min.
Denaturatie	35	95°C	45 sec.
<i>Annealing</i>		60°C	45 sec.
Extensie		72°C	90 sec.
	1	72°C	10 min.
Hold		15°C	∞

5. Zet de PCR-epjes in de thermocycler.
6. Start het PCR-programma.

GELELEKTROFORESE

De PCR-producten worden gecontroleerd door middel van gelelektroforese. Hierbij wordt 10 µl PCR-product op een 2% agarose-gel geladen.

MATERIALELIJST

Toestellen

- ✓ *Power supply*
- ✓ Elektroforese systeem
- ✓ Transilluminatie systeem
- ✓ Pipetten (10 µl of 20 µl)
- ✓ Filtertips
- ✓ Balans
- ✓ Magnetron
- ✓ Maatcilinder
- ✓ Erlenmeyer
- ✓ Parafilm

Producten

- ✓ Agarose
- ✓ 0,5x TBE-buffer
- ✓ *Syber safe DNA gel stain*
- ✓ Smartladder
- ✓ *Coraload*

PROTOCOL

Bereiding EDTA (0,5 M en pH 8,0)

1. 186 g EDTA Afwegen.
2. Aanlengen tot 500 ml met MilliQ.
3. Met 4 M NaOH de pH stellen op 8.
4. Aanlengen tot 1 liter met MilliQ.
5. De oplossing autoclaveren.

Bereiding 10X TBE

1. 108 g TRIS afwegen.
2. 55 g boorzuur afwegen.
3. 40 ml EDTA (pH 8).
4. Aanlengen tot 1 liter met MilliQ.
5. Oplossing autoclaveren.

Bereiding TBE-buffer

1. 100 ml TBE-buffer (10x) afmeten in maatcilinder.
2. Aanlengen met MilliQ tot 2 liter.

Bereiding van gel

1. Bepaal welke *tray* en kam gebruikt moet worden.
(Afhankelijk van het aantal en de verwachte grootte van *samples*)
2. Plaats de *tray* in de *gelcaster* en zet hem vast.
3. Bepaal aan de hand van de verwachte grootte van de DNA-fragmenten het percentage agarose gel.
4. Weeg de juiste hoeveelheid agarose af in een erlenmeyer (tabel 6).
5. Meet de juiste hoeveelheid TBE-buffer af in een maatcilinder (tabel 6).

Tabel 6 Schema met hoeveelheden agarose en TBE buffer voor het aanmaken van een gel.

	Kleine gel van 70 ml TBE-buffer	Grote gel van 120 ml TBE-buffer
Agarose 1%	0,7 g	1,2 g
Agarose 2%	1,4 g	2,4 g
Agarose 3%	2,1 g	3,6 g

6. Voeg de TBE-buffer bij de agarose en zwenk enkele keren.
7. Kook de oplossing in de magnetron tot de oplossing helder is en de kleine luchtballen verdwenen zijn.
 - Pas op voor overkoken. Tussendoor regelmatig zwenken.
8. Koel de gel af tot ongeveer 50°C onder lauw water, hierbij voortdurend zwenken.
9. Voeg de juiste hoeveelheid *Sybrsafe* toe (tabel 7), meng goed.

Tabel 7 Schema met toe te voegen hoeveelheden *sybrsafe* voor 70 ml gel en voor 120 ml gel.

	Kleine gel van 70 ml	Grote gel van 120 ml
<i>Sybrsafe</i>	1,75 µl	3 µl

10. Giet de afgekoelde agarose met *Sybrsafe* in de *tray*.
 - Verwijder eventuele luchtballen.
 - Plaats de kam.
 - Minimaal 20 min. laten polymeriseren.
 - Verwijder de kam voorzichtig uit de gel.

Laden van stalen

1. Laad in het eerste slot 5 µl smartladder.
2. Laad in de rest van de sloten de stalen. Hiervan kan 5 of 10 µl worden geladen, dit is afhankelijk van welk soort staal.
3. Haal de gel uit de *gelcaster* en plaats hem in de elektroforese buffertank.
 - Plaats de sloten aan de negatieve pool van de elektroforesebuffer.
 - Zorg dat alle sloten bedekt zijn met buffer.
4. Plaats de deksel op de elektroforese-bak.
 - Stel het voltage op 120 V.

5. Laat runnen tot Orange G/jumpstart Red Taq DNA-polymerase onderaan de gel is.
 - Meestal wordt voor de tijd 20 min. aangenomen.

Resultaat zichtbaar maken

1. Verwijder de gel met *tray* voorzichtig uit de elektroforese bak en plaats hem in een plastic bakje.
 - Met handschoenen aan.
2. Trek zuivere handschoenen aan om het transilluminatie systeem te bedienen.
3. De gel zonder *tray* onder het UV-licht bekijken m.b.v. het transilluminatie systeem.
4. Foto maken van de gel.

3.2.1.5. BISULFIETBEHANDELING

De bisulfietbehandeling wordt uitgevoerd om de methylatiestatus van MLH1- en MGMT-gen te bepalen. De stalen die voor deze analyse worden gebruikt, ondergaan één voor één een bisulfietbehandeling.

Bij elke procedure wordt een blanco meegenomen. Deze ondergaat net dezelfde stappen als de stalen, maar bevat geen DNA. In plaats van DNA wordt 20 µl RNase vrij water toegevoegd. Deze blanco dient om te controleren of de bisulfietbehandeling succesvol verlopen is. Met behulp van deze controle kan achterhaald worden of de gebruikte mixen en buffers eventueel gecontamineerd zijn.

De bisulfietbehandeling wordt uitgevoerd met behulp van een kit, nl. Epiect *bisulfite* kit. Deze kit is commercieel verkrijgbaar bij Qiagen (Nederland). Het catalogusnummer van de kit is 59104.

MATERIALELIJST

Toestellen en materialen

- ✓ Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- ✓ Filtertips (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- ✓ Microcentrifugeertubes (1,5 ml)
- ✓ PCR-tubes
- ✓ Minishaker of vortex
- ✓ Centrifuge (14 000 rpm.)
- ✓ *Spin columns*
- ✓ *Collection tubes* (2ml)
- ✓ *Deepwell* thermocycler
- ✓ Thermomixer of hitteblock
- ✓ 10 ml centrifuge tubes

Producten

- ✓ Bisulfiet mix
Bevat natriumbisulfiet; Irriterend.
Vermijd inademing, contact met ogen.
- ✓ DNA *protect* buffer
Bevat tetrahydrofurufyl alcohol:
Irriterend.
Vermijd contact met ogen en huid.
- ✓ RNase-vrij water
- ✓ Buffer elutiebuffer (EB)
- ✓ Buffer wasbuffer (WB)
- ✓ Buffer desulfoneringbuffer (BD)
Bevat natriumhydroxide:
Corrosief, irriterend
Vermijd contact met ogen en huid.
- ✓ Buffer *loading*buffer (BL)
Bevat guanidine thiocyanaat:
Schadelijk.
Vermijd contact met ogen.
- ✓ Ethanol (96-100%)

PROTOCOL

Opmerkingen

- ✓ De bisulfiet mix kan 4 weken bewaard worden op -20°C.
- ✓ DNA *protect* buffer moet van groen naar blauw veranderen wanneer de DNA bisulfiet mix wordt toegevoegd. Na toevoeging goed mengen.
- ✓ Alle centrifuge stappen worden op kamertemperatuur (15°C-25°C) uitgevoerd.
- ✓ Pipetteer het *sample* voorzichtig in de *spin columns* zonder de rand van de tube en het membraan van de kolom aan te raken.
- ✓ Open de *spin columns* stap per stap en vermijd aerosolen.
- ✓ *Collection* tubes kunnen meerdere keren gebruikt worden gedurende de opzuivering.

Vorbereiding

Draag gedurende de hele procedure een labojas en handschoenen.

→ Wanneer een stof gemorst is op handschoenen, nieuwe handschoenen aandoen.

1. Voeg 30 ml ethanol (96%-100%) toe aan buffer BW, bewaar op kamertemperatuur.
 - Meng voor het gebruik een aantal keer, door zwenken.
2. Voeg 27 ml ethanol (96%-100%) toe aan buffer BD . Bewaar tussen 2°C en 8 °C.
 - Meng voor het gebruik een aantal keer, door zwenken.
 - Sluit het flesje onmiddellijk na gebruik.
 - Mix het flesje goed op voor gebruik.
 - Er kunnen zich witte substanties vormen. Deze hebben geen effect op de werking of het verdere verloop. Vermijd wel het overbrengen van deze substanties.

Conversie naar bisulfiet DNA

1. Ontdooi de *samples* die voor deze bisulfietreacties wordt gebruikt.
Los de vereiste hoeveelheid bisulfiet mix hoeveelheid op door 800 µl RNase-vrij water toe te voegen bij elk *aliquot*.
 - Vortex tot de bisulfietmix volledig is opgelost (kan 5 min. duren).
 - De bisulfiet mix-RNase-vrij water kan verwarmd worden tot 60°C, hierna opnieuw vortexen.
 - Plaats de bisulfietmix niet op ijs.
2. Bereid de bisulfietreacties voor in 200 µl PCR-tubes.
 - Maak een mastermix (DNA nog niet toevoegen) (zie tabel 8).

Tabel 8 Schema voor het maken van de mastermix van de bisulfietbehandeling.

Component	Volume per reactie (µl)	Volume voor reacties
DNA-oplossing (1 ng-2 µg) *	20**	
RNA-vrij water *	0	
Bisulfiet mix	85	
DNA <i>protect</i> buffer	35	
Totaal volume	140	
* Het totaal volume RNA-vrij water en DNA-oplossing moet samen 20 µl zijn		
** Hier wordt van 400-1000 ng geïsoleerd DNA uitgegaan		

- Benoem de 200 µl PCR-tubes.
 - Verdeel de mastermix uit en voeg de hoeveelheid DNA toe.
3. Sluit de PCR-tubes en meng de stoffen door snel heen en weer te schudden. Bewaar de tubes op kamertemperatuur (15°C-25°C).
- Meng de reactie goed zodat de kleur van geelgroen naar blauw verandert.
4. Voer de conversie uit in een thermocycler.
- Gebruik een *deepwell* thermocycler.
 - Stel het PCR-programma in (zie tabel 9).
 - Wanneer bij het PCR-toestel geen *sample* hoeveelheid van 140 µl kan worden ingesteld, wordt de grootst mogelijke hoeveelheid aangenomen.

Tabel 9 PCR-programma voor de bisulfietbehandeling.

Stap	Tijd	Temperatuur
Denaturatie	5 min	95°C
Incubatie	25 min	60°C
Denaturatie	5 min	95°C
Incubatie	85 min	60°C
Denaturatie	5 min	95°C
Incubatie	175 min	60°C
Hold		20°C

* Geconverteerd DNA kan in de thermocycler overnacht blijven staan

5. Plaats de PCR-tubes in de thermocycler.

Opzuivering van het geconverteerd DNA

6. Na afloop van PCR-programma. Centrifugeer de PCR-tubes kort af. Pipetteer de hoeveelheid van de bisulfiet reactie over in 1,5 ml eppen.
- De overdracht van neergeslagen deeltjes heeft geen invloed op het resultaat van de handeling.
7. Voeg 310 µl (vers bereide) buffer BL toe aan elk *sample*.
- Vortex de oplossing en centrifugeer kort af.
8. Voeg 250 µl ethanol (96 % -100 %) toe aan elk *sample*.
- Vortex de oplossing voor 15 sec. en centrifugeer kort af om de druppels naar onder te krijgen.
9. Plaats het benodigde aantal EpiTect spin kolommen en *collection* tubes in een geschikte rek.
- Schrijf de tubes (*samples*).
 - Breng het gehele mengsel (700 µl) van stap 7 en 8 over in de overeenkomstige EpiTect spin kolommen.
10. Centrifugeer de spin kolommen af op max. snelheid gedurende 1 min.
- Verwijder de doorgelopen vloeistof.
 - Plaats de spin kolommen terug in de *collection* tubes.
11. Voeg 500 µl buffer BW toe aan elke spin kolom.
- Centrifugeer de kolommen op max. snelheid af gedurende 1 min.
 - Verwijder de doorgelopen vloeistof uit de *collection* tubes.
12. Voeg 500 µl buffer BD toe aan de spin kolommen.
- Incubeer voor 15 min. op kamertemperatuur (15 °C – 25 °C).
 - Als er zich neergeslagen deeltjes bevinden in de buffer, vermijd deze over te brengen in de spin kolommen.

- Sluit de fles met buffer BD onmiddellijk na gebruik.
13. Zet het hitteblok aan op 56°C.
 14. Centrifugeer de spin kolommen op max. snelheid gedurende 1 min.
 - Verwijder de doorgelopen vloeistof uit de *collection tubes*.
 - Plaats de spin kolommen terug in de *collection tubes*.
 15. Voeg 500 µl buffer BW toe aan elke spin kolom.
 - Centrifugeer de spin kolommen af op max. snelheid gedurende 1 min.
 - Verwijder de doorgelopen vloeistof uit de *collection tubes*.
 - Plaats de spin kolommen terug in de *collection tubes*.
 16. Herhaal stap 14.
 17. Plaats de spin kolommen in nieuwe 2 ml *collection tubes*.
 - Centrifugeer de spin kolommen af op max. snelheid voor 1 min. om het restvolume te verwijderen.
 18. Plaats de spin kolommen met open deksels in schone 1,5 ml eppen.
 - Incubeer de kolommen gedurende 5 min. op 56°C in een verwarmingsblok.
 - Hierdoor gaat de restvloeistof verdampen.
 19. Plaats de spin kolommen in zuivere 1,5 ml eppen.
 - Verdeel 20 µl buffer EB in het midden van het membraan.
 - Elueer het gezuiverde DNA door centrifugatie gedurende 1 min. bij ongeveer 15.000g (12.000 rpm.)
 20. Om de opbrengst van het DNA te verhogen.
 - Breng een extra keer 20 µl buffer EB in het midden van het membraan aan.
 - Centrifugeer hierna 1 min. op max. snelheid.
 21. Opslag van het gezuiverde DNA.
 - Voor maximaal 24 uur: best opgeslagen bij 2 °C- 8 °C.
 - Voor langere opslag dan 24 uur: bij -20 °C.

3.2.1.6. NESTED PCR

Na de bisulfietbehandeling wordt een *methylation specific* PCR uitgevoerd. De MSP kan zowel door een *nested* PCR uitgevoerd worden als door *real time* PCR. Hieronder wordt het protocol van de *nested* PCR omschreven. De *nested* PCR bestaat uit twee PCR-reacties, nl. *outside* PCR en *inside* PCR. Het PCR-product van de *outside* PCR wordt 1000x verdund. Daarna volgt de *inside* PCR. Na de *inside* PCR-reactie wordt het resultaat zichtbaar gemaakt met behulp van gelelektroforese.

Voor de analyse van het MLH1-gen worden andere primers gebruikt als de MGMT-analyse. Verder verloopt de *nested* PCR voor het MGMT-gen gelijkaardig aan het MLH1-gen.

Bij de *methylation specific* PCR wordt een positieve controle en een negatieve controle meegenomen. Daarnaast wordt ook de blanco van de bisulfietbehandeling meegenomen. Verder wordt voor deze PCR-reactie een nieuwe blanco meegenomen om de PCR-reactie te controleren. Zo kan gecontroleerd worden of contaminaties hebben plaatsgevonden.

Het protocol van de *nested* PCR wordt opgedeeld in *outside* PCR, verdunning maken, *inside* PCR en gelelektroforese.

OUTSIDE PCR

MATERIALELIJST

Toestellen

- ✓ Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- ✓ Filtertips
- ✓ Eppen (1,5 ml)
- ✓ PCR-eppen
- ✓ Reverse pipet
- ✓ Thermocycler
- ✓ Bak met ijs
- ✓ Centrifuge
- ✓ Minishaker of vortex

Producten

- ✓ Buffer (Sigma)
- ✓ Primer *forward* (*outside* primer, 20 µM)
- ✓ Primer *reverse* (*outside* primer, 20 µM)
- ✓ dNTP's (6,25 mM)
- ✓ Red Taq (Sigma)
- ✓ RNase/DNase vrij water

PROTOCOL

1. Ontdooi de componenten voor de bereiding van de mastermix.
2. Schrijf de PCR-eppen, de *samples* worden in duplo ingezet, behalve de controles.
3. Bereid de mastermix.
Voeg alle componenten (behalve *template* DNA) (tabel 10) samen op kamertemperatuur.

Tabel 10 Pipetteerchema voor het maken van de mastermix voor de *outside* PCR van *nested* PCR.

Component (Beginconcentratie)	Volume per reactie	Volume voor ... reacties	Eindconcentratie
Buffer (Sigma)	2,5 µl		1x
Primer <i>forward outside</i> (20 µM)	0,25 µl		0,1-0,5 µM
Primers <i>reverse outside</i> (20 µM)	0,25 µl		0,1-0,5 µM
dNTP's (6,25 mM)	1,25 µl		
Red Taq (Sigma)	0,5 µl		0,05 U/µl
RNase/DNase-vrij water	16,25 µl		
Totaal volume	21 µl		
<i>Template</i> DNA	2 µl (controle nor.) 4 µl (staal) (voor staal 20 ng/µl en voor controle 10 ng/ µl)		
Totaal volume	23 µl (controle) 25 µl (staal)		

Vortex de mastermix.

Centrifugeer de tube kort af, zodat alle componenten zich vanonder in de tube bevinden.

4. Verdeel de mastermix uit in de PCR-eppen.
Verdeel de mastermix uit met de *reverse* pipet.
Sluit de PCR-eppen.
5. Haal de stalen uit de diepvries en houd deze op ijs. Voeg het DNA toe aan de mastermix.
4 µl voor staal en 2 µl voor controle.

6. Stel het PCR-programma (tabel 11) in.

Tabel 11 PCR-programma dat gebruikt wordt voor de *outside* PCR van de *nested* PCR.

Stap	# cyclussen	Temperatuur	Tijd
Enzym activatie	1	95°C	3 min.
Denaturatie	35	95°C	30 sec.
<i>Annealing</i>		56°C	30 sec.
Extensie		72°C	30 sec
		72°C	4 min.
Hold	1	15°C	∞

VERDUNNING VAN PCR-PRODUCT

Het PCR-product van de *outside* PCR wordt 1000x verdund met TE-buffer. Met andere woorden wordt er 1 µl PCR-product opgelost in 999 µl TE-buffer.

INSIDE PCR

MATERIALENLIJST

Toestellen

- ✓ Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- ✓ Filtertips
- ✓ Eppen (1,5 ml)
- ✓ PCR-eppen
- ✓ *Reverse* pipet
- ✓ *Thermocycler*
- ✓ Minishaker of vortex
- ✓ Centrifuge

Producten

- ✓ Buffer (Sigma)
- ✓ Primer *forward*
(*inside* primer U en M (20µM))
- ✓ Primer *reverse*
(*inside* primer U en M (20 µM))
- ✓ dNTP's (6,25 mM)
- ✓ Red Taq (Sigma)
- ✓ RNase/DNase vrij water

PROTOCOL

1. Haal de componenten van de mastermix uit de diepvries.
2. Schrijf de PCR-eppen.
Maak twee reeksen: voor U- en M-primer.
3. Bereid de mastermix (2 mastermixen: M-primers en U-primers).
Voeg alle componenten (behalve *template* DNA) (tabel 12) samen op kamertemperatuur.

Tabel 12 Schema voor het maken van de mastermix voor de *inside* PCR van de *nested* PCR.

Component (Beginconcentratie)	Volume per reactie	Volume voor ... reacties	Eindconcentratie
Buffer (Sigma)	2,5 µl		1x
Primer <i>forward inside</i> (U en M) (20 µM)	0,5 µl		0,1-0,5 µM
Primers <i>reverse inside</i> (U en M) (20 µM)	0,5 µl		0,1-0,5 µM
dNTP's (6,25 mM)	1,25 µl		
Red Taq. (Sigma)	0,5 µl		0,05 U/µl
RNase/DNase-vrij water	15,75 µl		
Totaal volume	21 µl		

Template DNA	1µl (controle 40µl) 2 µl (controle nor.) 4 µl (staal) (voor staal 20 ng/µl en voor controle 10 ng/ µl)		
--------------	--	--	--

Vortex de mastermix .

Centrifugeer de tube kort af, zodat alle componenten zich vanonder in de tube bevinden.

4. Verdeel de mastermix uit in PCR-eppen.

Schrijf de eppen (datum, proef, *samples*, initialen).

Verdeel de mastermix uit met de *reverse* pipet en voeg het DNA toe.

5. Stel het PCR-programma (tabel 13) in.

Tabel 13 PCR-programma van de *inside* PCR voor de *nested* PCR.

Stap	# cyclussen	Temperatuur	Tijd
Enzym activatie	1	94°C	3 min.
Denaturatie	34	94°C	30 sec.
<i>Annealing</i>		*	30 sec.
Extensie		72°C	10 sec.
	1	72°C	4 min.
Hold	1	15°C	∞

* De *annealing*temperatuur is afhankelijk van de gebruikte primers voor de analyse. Zo wordt voor de analyse van het MLH1-gen 60°C als *annealing*temperatuur gebruikt en voor de analyse van het MGMT-gen wordt 64°C als *annealing*temperatuur gebruikt.

GELELEKTROFORESE

Om het resultaat van de *nested* PCR zichtbaar te maken, wordt gelelektroforese toegepast. Hierbij wordt 10 µl PCR-product geladen op een 2% agarose gel. Voor het protocol zie 3.2.1.4 SCS-ladder.

3.2.1.7. QPCR VOOR HET BEPALEN VAN PROMOTOR HYPERMETHYLERING

In plaats van de *nested* PCR kan ook een *real time* PCR, ook wel qPCR genoemd uitgevoerd worden. Hieronder wordt het protocol van de qPCR omschreven. Bij de qPCR wordt het PCR-product doorheen de procedure gemeten.

De optimalisatie van de qPCR gebeurde met behulp van twee mastermixen, nl. MyTaq™ HS mix en SensiFast™ HRM mix. Beide mixen zijn commercieel verkrijgbaar bij Biorline. Het catalogusnummer voor de MyTaq™ HS mix is BIO-25045 en voor SensiFast™ HRM is BIO-32002. Het verschil tussen deze mixen is dat de SensiFast een *ready-to-use* mix is. Hierbij moet enkel nog primers en steriel H₂O aan worden toegevoegd.

Bij de qPCR wordt een positieve en negatieve controle meegenomen. Hiermee kan de PCR-reactie gecontroleerd worden. Daarnaast wordt een blanco meegenomen om de PCR-reactie te kijken of er contaminaties hebben plaatsgevonden bij het maken of uitverdelen van de mastermix. Daarnaast wordt ook de blanco van de bisulfietbehandeling meegenomen als controle of de reactie goed verlopen is.

MATERIALELIJST

Toestellen

- ✓ Seal
- ✓ Kam
- ✓ Thermocycler met verwarmd deksel
- ✓ 96-well plaat
- ✓ Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl)
- ✓ Pipettips (10 µl, 20 µl, 200 µl)

Producten

- ✓ MyTaq™ HS mix of SensiFast™ HRM mix
- ✓ Forward primer (*inside primer U en M*, 20 µM)
- ✓ Reverse primer (*inside primer U en M*, 20 µM)
- ✓ Pipettips
- ✓ RNase/DNase-vrij water

PROTOCOL

1. Bereid de mastermix.

Voeg alle componenten (behalve *template* DNA) samen op kamertemperatuur. Voor de MyTaq™ HS mix staat het pipetteerschema weergegeven in tabel 14. Voor de SensiFast™ HRM mix staat het pipetteerschema weergegeven in tabel 15.

Tabel 14 Pipetteerschema voor het bereiden van een mastermix met MyTaq™ HS mix voor qPCR.

Component (Beginconcentratie)	Volume per reactie	Volume voor ... reacties	Eindconcentratie
MyTaq™ HS mix	12,5 µl		1x
Forward primer (20 µM)	0,5 µl		300-500 nM
Reverse primer (20 µM)	0,5 µl		300-500 nM
RNase/DNase-vrij water	3 µl		-
LC green	2,5 µl		
Totaal volume	19 µl		
Template DNA	1 µl (controle 40 µl) 2 µl (controle nor.) 4 µl (staal) (voor staal 20 ng/µl en voor controle 10 ng/ µl)		

Tabel 15 Schema voor het bereiden van een mastermix met SensiFast™ HRM mix voor qPCR.

Component (Beginconcentratie)	Volume per reactie	Volume voor ... reacties	Eindconcentratie
SensiFast™ HRM mix	12,5 µl		1x
Forward primer (20 µM)	0,25 µl		300-500 nM
Reverse primer (20 µM)	0,25 µl		300-500 nM
RNase/DNase-vrij water	11 µl		-
Totaal volume	21 µl		
Template DNA	1 µl (controle 40 µl) 2 µl (controle nor.) 4 µl (staal) (voor staal 20 ng/µl en voor controle 10 ng/ µl)		

Vortex de mastermix.

Centrifugeer de tube kort af, zodat alle componenten zich vanonder in de tube bevinden.

2. Verdeel de mastermix uit in 96 well plaat.

Schrijf de eppen (datum, proef, *samples*, initialen).

Verdeel de mastermix uit met de *reverse* pipet.

Voeg het DNA toe.

3. Stel het PCR-programma in. In tabel 16 is het PCR-programma weergegeven voor de qPCR voor de MLH1-analyse. In tabel 17 is het PCR-programma weergegeven voor de qPCR voor de MGMT-analyse.

Tabel 16 PCR-programma voor qPCR voor MLH1-analyse.

Stap	# cyclussen	Temperatuur	Tijd
Enzym activatie	1	95°C	3 min.
Denaturatie	45	95°C	5 sec.
<i>Annealing</i>		60°C	30 sec.
Extensie		72°C	10 sec.
Smelt curve	1	95°C	20 sec.
		65-95°C (in 0,5°C inc.)	2 sec./stap

Tabel 17 PCR-programma voor qPCR voor MGMT-analyse.

Stap	# cyclussen	Temperatuur	Tijd
Enzym activatie	1	95°C	3 min.
Denaturatie	41	95°C	5 sec.
<i>Annealing</i>		64°C	30 sec.
Extensie		72°C	10 sec.
Smelt curve	1	95°C	20 sec.
		65-95°C (in 0,5°C inc.)	2 sec./stap

3.2.1.8. PYROSEQUENCING

Naast de MSP kan ook *pyrosequencing* gebruikt worden om de methylatiestatus te bepalen. Voor de *pyrosequencing* moet vooraf een programma aangemaakt worden, zodat de Pyromark Q24 MDx weet in welke volgorde de nucleotiden moeten worden toegevoegd.

Vooraf aan de *pyrosequencing* wordt een PCR-reactie uitgevoerd, ook wel pyroPCR genoemd. Bij deze reactie wordt een *reverse* en een *forward* primer gebruikt. Eén van de twee primers draagt een biotinelabel. In dit geval is het voor zowel de analyse op het MLH1-gen als het MGMT-gen de *reverse* primer die het biotinelabel draagt. Voor de pyroPCR wordt gebruik gemaakt van een kit, nl. PyroMark PCR kit. Deze is verkrijgbaar bij Qiagen (Nederland). Het catalogusnummer is 978703.

Na de pyroPCR wordt een gelelektroforese uitgevoerd. Op basis van dit resultaat kan besloten worden of de producten kunnen dienen voor de *pyrosequencing*. Zo kan met behulp van de pyroPCR achterhaald worden of al dan niet amplificatie heeft plaatsgevonden. Verder kan aan de hand van de intensiteit van de banden het volume van het PCR-product worden aangepast. Wanneer een lichte band zichtbaar is, kan besloten worden om het volume van het gebiotinyld PCR-product van 10 µl te verhogen naar 15 µl. Als er geen band zichtbaar is, wordt meestal besloten om dit product niet mee te nemen.

Hierna volgt een opzuivering. Vooraf wordt het PCR-product geïmmobiliseerd aan *ss-beads*, zodat het product kan worden opgezuiverd. Tijdens de opzuivering wordt het DNA enkelstrengig gemaakt door middel van de denaturatiebuffer die NaOH bevat. Na de opzuivering wordt het product gebonden aan de *sequencing* primer. Hierna kan de *pyrosequencing* gestart worden.

Voor de MGMT-analyse werd een commerciële kit van Qiagen (Nederland) aangekocht, nl. *therascreen* MGMT Pyro kit. Het catalogusnummer is 971061.

Hieronder wordt de procedure voor *pyrosequencing* beschreven. Bij verschillen tussen de *therascreen* MGMT Pyro kit en de PyroMark PCR kit wordt dit aangegeven in het protocol.

MATERIALELIJST

Toestellen

- ✓ PCR-eppen
- ✓ Microcentrifugeertubes (1,5 ml)
- ✓ Pipetten (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- ✓ Filtertips (10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)
- ✓ Vortex of minishaker
- ✓ Centrifuge
- ✓ Thermocycler
- ✓ Pyromark Q24 *software*
- ✓ Bak met ijs
- ✓ Hitteblok van 80°C
- ✓ 24 well plaat
- ✓ *Seal*
- ✓ Microtiterplaatschudder
- ✓ Pyromark Q24 well plaat
- ✓ Pyromark Q24 vacuümstation
- ✓ Vacuümpomp
- ✓ Pipetboy met pipet van (5 ml of 10 ml)
- ✓ *Cartridge*

Producten

- ✓ Pyromark PCR mastermix
- ✓ *Coraload concentrate*
- ✓ Primer *forward* (gebiotynleerd, afhankelijk van primer *reverse*)
- ✓ Primer *reverse* (gebiotynleerd afhankelijk van primer *forward*)
- ✓ Steriel water
- ✓ *ss-beads*
- ✓ Pyromark binding buffer
- ✓ *Sequence primer*
- ✓ Pyromark *annealing* buffer
- ✓ Wasbuffer
- ✓ Pyromark denaturatie buffer
- ✓ 70% ethanol
- ✓ MilliQ water
- ✓ Pyrogold Q24 reagentia
- ✓ USB-stick

PROTOCOL

Amplificatie (pyroPCR)

1. Verdun indien mogelijk de te analyseren stalen naar een concentratie tussen 10 en 250 ng/µl (10 ng/µl is optimaal).
2. Schrijf de PCR-eppen.
3. Bereid de mastermix voor. In tabel 18 staat het pipetteerschema voor de mastermix weergegeven voor de PyroMark PCR kit. In tabel 19 staat het pipetteerschema voor de mastermix weergegeven voor de *therascreen* MGMT pyro kit.

Tabel 18 Pipetteerschema voor bereiding van de mastermix van de PyroMark PCR kit voor de pyroPCR.

Component (Beginconcentratie)	Volume per reactie (µl)	Volume voor ... reacties	Eindconcentratie
Pyromark PCR mastermix (2x)	12,5		1x
<i>Coraload concentrate</i> (10x)	2,5		1x
Primer <i>forward</i> (20 pmol/µl)	0,25		5 pmol
Primer <i>reverse</i> (20 pmol/µl)	0,25		5 pmol
Steriel water	8,5		
Totaal volume	24		
<i>Template</i> DNA	1 (10-500 ng: voorkeur 10-20 ng)		

Tabel 19 Pipetteerschema voor bereiding van de mastermix van de *therascreen* MGMT Pyro kit voor de pyroPCR.

Component (Beginconcentratie)	Volume per reactie (μ l)	Volume voor ... reacties
Pyromark PCR mastermix (2x)	12,5	
Coraload <i>concentrate</i> (10x)	2,5	
PCR primer mix MGMT	1,0	
Steriel water	4,0	
Totaal volume	20	
<i>Template</i> DNA	5 (10-50 ng)	

Vortex en afdraaien.

- Verdeel de mastermix uit in PCR-eppen.
- Voeg de juiste hoeveelheid DNA toe.
- Draai de PCR-eppen af en zet ze in de thermocycler met volgende PCR-programma. In tabel 20 wordt het PCR-programma weergegeven voor de pyroPCR van de PyroMark PCR kit. In tabel 21 wordt het PCR-programma weergegeven voor de pyroPCR van de *therascreen* MGMT Pyro kit.

Tabel 20 PCR-programma voor de pyroPCR van PyroMark PCR kit voor de MLH1-analyse als MGMT-analyse

Stap	# cycli	Temperatuur	Tijd
Enzymactivatie	1	95°C	15 min.
Denaturatie	42	94°C	20 sec.
<i>Annealing</i>		56°C	30 sec.
Extensie		72°C	20 sec.
Finale extensie	1	72°C	5 min.
Hold		4°C	∞

Tabel 21 PCR-programma voor de pyroPCR van de *therascreen* MGMT Pyro kit.

Stap	# cycli	Temperatuur	Tijd
Enzymactivatie	1	95°C	15 min.
Denaturatie	42	94°C	20 sec.
<i>Annealing</i>		56°C	30 sec.
Extensie		72°C	20 sec.
Finale extensie	1	72°C	5 min.
Hold		4°C	∞

- Controleer de PCR-producten door 5 μ l PCR-product op 2% agarose gel te laden (protocol zie 3.2.1.4 SCS-ladder, gelelektroforese).

Aanmaken programma *pyrosequencing*

- Open Pyromark Q24 *Software*.
- Ga naar file en kies nieuw assay.
- Hier wordt gekozen voor CpG assay, omdat het over de methylatiestatus van de DNA-sequentie gaat.
- Bij *sequence to analyse* wordt de sequentie die geanalyseerd moet worden ingevuld.
 - Voor MLH1-gen: YGG ATA GYG ATT TTT AAY GYG
 - Voor MGMT-gen
 - CpG 74-83: YGTTTTGYGTTTYGAYGTTYGTAGGTTTTYGYGGTGYGTATYGTGTTTGYG
 - CpG 84-89: GGTGTTTTYGTGTTTTYGGAAAGAGTGYGGAGTTTTTTTTYGGGAYGGTGG
 - CpG76-79 (*therascreen* MGMT kit): YGAYGTTYGTAGGTTTTYGT

5. Bij *dispensation order* wordt door de *software* ingevuld.
 - Voor MLH1-gen: GTC GAT CAT GTC GAT TGA TCA GTC
 - Voor MGMT-gen:
 - CpG 74-83: GTCGCTTAGTCAGTTCGTATCAGTCGTATGTTTCAGTCGTAGTCGTGATCGTAGTC
 - CpG 84-89: GTCGCTTCGTTTCGAGAGTAGTCGATGTTTCGTATCGT
 - CpG76-79 (*therascreen* MGMT kit): GTCGATCAGTCGTCATGTTCCG
6. Bij *sequence before bisulfite* wordt de sequentie zoals deze is voor de bisulfietbehandeling ingevuld.
 - Voor MLH1-gen: CGG ACA GCG ATT TTT AAC GCG
 - Voor MGMT-gen:
 - CpG 74-83: CGCTTTGCGTCCCGACGCCCGCAGGTCCTCGCGGTGCGCACCGTTTGCG
 - CpG 84-89: CGCCTCGTCCCGGAAGAGTGCGGAGCTCTCCCTCGGGACG
 - CpG76-79 (*therascreen* MGMT kit): /

Run setup voor Pyromark

1. Open Pyromark Q24 *Software*.
2. Kies in de toolbar voor een nieuwe run.
3. Vul de runparameters in.
 - Run name*: naam van runfile.
 - Instrument method*: staat vermeld op de cartridge die voor de run wordt gebruikt.
 - Plate ID*: ID van de Pyromark Q24 plaat (meestal datum met naam van analyse).
 - Bar code*: (optioneel) m.b.v scanner kan de barcode van de plaat gescand worden.
 - Reagent ID*: lotnummer van de in gebruikte PyroGold Q24 reagents.
 - Run note*: (optioneel) vul eventuele opmerkingen betreffende de run in.
4. Deel de plaat in door uit te voeren assays in te voegen in combinatie met de te analyseren *samples* volgens onderstaande figuur (figuur 29). De in te voeren assay is target afhankelijk.



Figuur 29 Voorbeeld van invullen van plaat setup voor *pyrosequencing*.

5. Print de werklijst waarin plaatopzet en de voor de run benodigde hoeveelheden (substraatmix, enzymmix, nucleotiden) staan vermeld.
6. Sluit de runfile af en kopieer deze naar een USB-stick.

Immobilisatie van PCR-producten aan *SS beads*

1. Laat de reagentia en de oplossingen op kamertemperatuur komen.
2. Schakel hitteblock aan zodat deze kan opwarmen tot 80°C.

3. Resuspendeer de *ss-beads* tot homogene oplossing.
4. Maak onderstaande mastermix (tabel 22) voor DNA immobilisatie. Houd rekening met extra dood volume.

Tabel 22 Pipetteerschema voor bereiding van mastermix voor de immobilisatie van de PCR-producten aan *ss-beads* zowel voor de PyroMark PCR kit als de *therascreen* MGMT kit.

Component	Volume per reactie (µl)	Volume voor ... reacties
<i>ss-beads</i>	1	
Pyromark binding buffer	40	
Water	29	
Totaal volume	70	

5. Voeg 70 µl mastermix per well toe aan een 24 wells plaat zoals aangegeven in de plaatindeling van de geprinte werklIJst.
6. Voeg 10 µl gebiotinylerd PCR-product toe volgens gedefinieerde plaatindeling op de werklIJst van de gemaakte runfile.
7. *Seal* de PCR-plaat en laat deze minimum 5 min. schudden op de microtiterplaatschudder bij 1200-1400 rpm.

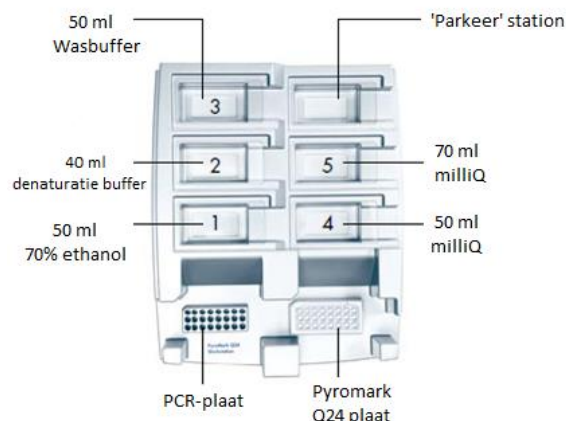
Sample voorbereiding voorafgaande aan de *pyrosequencing* run op de Pyromark Q24

1. Voor de stalen behandeld met de PyroMark PCR kit verdun de benodigde *sequencing* primer naar 0,3 µM in Pyromark *annealing* buffer.
Voor de stalen behandeld met de *therascreen* MGMT kit verdun de *sequencing* primer zoals in tabel 23.

Tabel 23 Pipetteerschema voor het verdunnen van de *sequencing* primer voor de stalen behandeld met de *therascreen* MGMT kit.

Component	Volume per reactie (µl)	Volume voor ... reacties (µl)
Seq Primer MGMT	0,8	
PyroMark <i>Annealing</i> buffer	24,2	
Totaal volume	25	

2. Voeg 25 µl verdunde *sequencing* primer toe aan elke well van de Pyromark Q24 plaat volgens de gedefinieerde plaatindeling op de werklIJst van de gemaakte runfile.
3. Bereid het Pyromark Q24 werkstation voor door de diverse gevulde bufferbakjes te plaatsen (figuur 30).



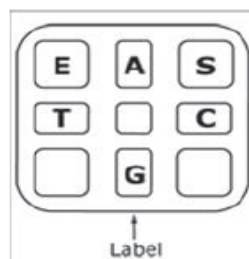
Figuur 30 Weergave van opstelling van het vacuümstation.

4. Zet de vacuümpomp aan en schakel Vacuüm Prep tool in.
5. Spoel de VP tool met milli Q in bakje 5 en controleer of deze goed vacuüm zuigt.

6. Vul bakje 5 opnieuw met milli Q. schakel de vacuüm op de VP tool uit en plaats deze in het parkeerstation.
7. Plaats de 24 wells plaat met geïmmobiliseerd PCR-product links vooraan in het werkstation en de Pyromark Q24 plaats rechts vooraan. Controleer of beide 24 wells dezelfde oriëntatie hebben.
8. Schakel de vacuüm pomp op de VP tool aan en laat deze langzaam in de wells van de PCR-plaat zakken en laat de VP tool 15 sec. in de wells staan om de *beads* met het PCR-product te vangen.
9. Spoel de VP tool met vacuüm aan met 70% ethanol.
10. Spoel de VP tool met vacuüm aan met denaturatie oplossing.
11. Spoel de VP tool met vacuüm aan met wasbuffer.
12. Breng de VP tool iets verder dan 90°C omhoog om de resterende vloeistof weg te zuigen.
13. Oriënteer de VP tool boven de Pyromark Q24 plaat, schakel het vacuüm uit en ontkoppel de vacuümslang.
14. Laat de VP tool langzaam in de Q24 plat zakken en ga langzaam op en neer met de VP tool om de *beads* in oplossing te brengen.
15. Plaats de VP tool in milli Q met vacuüm uit.
16. Koppel de vacuümslang terug en schakel het vacuüm terug in. Spoel de VP tool door het milli Q.
17. Breng de VP tool iets meer dan 90°C omhoog om de resterende vloeistof weg te zuigen. Schakel het vacuüm vervolgens uit en plaats de VP tool in het parkeer station.
18. Plaats de Pyromark Q24 plaat op de voorverwarmde Q24 plaathouder en verwarm het geheel op een hitteblock bij 80°C.
19. Haal de Pyromark Q24 plaat van de verwarmde plaathouder af en plaats deze op de niet verwarmde plaathouder bij Tk.
20. De Q24 plaat is nu klaar om geanalyseerd te worden in de Pyromark Q24.

Runnen van Pyromark Q24

21. Neem de pyrogold Q24 reagentia, bereid deze indien nodig voor zoals beschreven.
22. Plaats de Pyromark Q24 cartridge op de tafel met label naar u toegericht.
23. Pipetteer de juiste hoeveelheden nucleotiden, enzymmix en substraatmix in de cartridge (figuur 31).
24. Laad en start de Pyromark Q24 zoals beschreven in apparaat voorvoorschrift.



Figuur 31 Weergave van de cartridge voor het pipetteren van de nucleotiden (A,C,G en T), enzymmix (E) en substraatmix (S).

25. Breng de resultaat file na afloop van de run met USB-stick over naar de computer voor verdere analyses m.b.v. Q24 *software*. Voer het onderhoud na een run.

4. RESULTATEN MET BIJHORENDE DISCUSSIE

In dit hoofdstuk volgt de bespreking van de resultaten. De resultaten worden gegroepeerd per techniek. Verder worden de resultaten per analyse besproken.

Zo wordt voor de optimalisatie van de MLH1-analyse met betrekking tot promotor hypermethylering eerst de validatie van de bisulfietbehandeling besproken. Aan de hand van de nieuwe bisulfietbehandeling dient de MSP geoptimaliseerd te worden. Dit gebeurt met behulp van qPCR. Na de optimalisatie van de qPCR wordt de techniek uitgetest op een beperkt aantal patiëntenstalen (bijlage 13). Vervolgens wordt de qPCR gevalideerd aan de hand van een uitgebreid aantal patiëntenstalen (bijlage 14). Als laatste dient voor deze techniek een cut-off bepaald te worden.

Voor de MLH1-analyse wordt getracht om niet enkel promotor hypermethylering aan te tonen via qPCR maar ook met behulp van *pyrosequencing*. Ook deze techniek dient net zoals de qPCR eerst geoptimaliseerd te worden. Hierna kan de geoptimaliseerde techniek worden uitgetest op een beperkt aantal patiëntenstalen (bijlage 13). Na de optimalisatie kan deze techniek gevalideerd worden aan de hand van een uitgebreid aantal patiëntenstalen. Net zoals bij de qPCR dient voor deze techniek een cut-off bepaald te worden.

Voor de MGMT-analyse worden de resultaten gelijkaardig aan de resultaten van de MLH1-analyse besproken. Hiervoor wordt eerst de optimalisatie van de qPCR besproken. Na de optimalisatie dient de qPCR gevalideerd te worden. Dit gebeurt aan de hand van patiëntenstalen (bijlage 15 en 16). Verder wordt ook voor deze techniek een cut-off bepaald.

Naast de qPCR wordt, net zoals bij de MLH1-analyse, ook hier getracht om promotor hypermethylering van het MGMT-gen aan te tonen met behulp van *pyrosequencing*. Deze techniek dient ook voor de MGMT-analyse geoptimaliseerd te worden. Na de optimalisatie kan de techniek uitgetest worden op een reeks patiëntenstalen (bijlage 15 en 16). Verder dient de techniek gevalideerd te worden. Als laatste wordt getracht om een cut-off te bepalen.

4.1. MLH1-ANALYSE

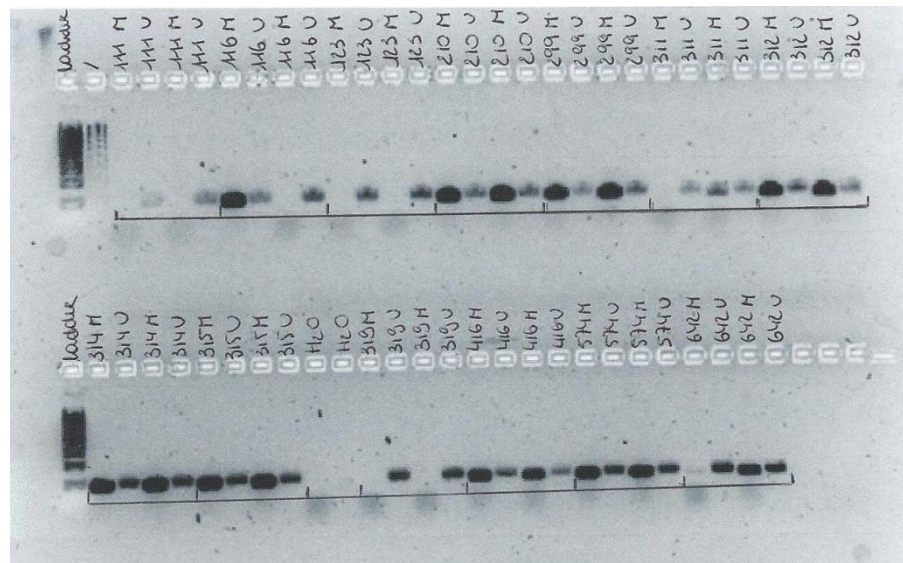
Om een beter onderscheid tussen sporadische en erfelijke colontumoren te maken, kan promotor hypermethylering van het MLH1-gen worden aangetoond. Verder kan bij tumoren met een verhoogde microsatelliet instabiliteit en de afwezigheid van hypermethylering van het MLH1-gen een betere prognose gemaakt worden voor het Lynch syndroom.

De MLH1-analyse dient opnieuw geoptimaliseerd te worden aangezien de analyse die reeds in het labo uitgevoerd wordt te gevoelig blijkt te zijn. De optimalisatie van deze analyse gebeurt door een nieuwe bisulfietbehandeling. Hierbij dient de PCR-methode opnieuw geoptimaliseerd te worden. Verder wordt getracht om promotor hypermethylering van het MLH1-gen te bepalen met behulp van *pyrosequencing*. Voor beide technieken, qPCR en *pyrosequencing*, dient echter ook een cut-off bepaald te worden. Deze cut-off wordt aan de hand van twee zaken bepaald. Zo wordt langs de ene kant een vergelijking van de resultaten van de patiëntenstalen met de resultaten van de oude methode (*nested PCR*) uitgevoerd. Langs de andere kant wordt een verdunningsreeks gemaakt van een gemethyleerde controle (IvD) en een ongemethyleerde controle (HUVEC) om te bepalen tot welk minimaal methyleringspercentage de techniek kan detecteren.

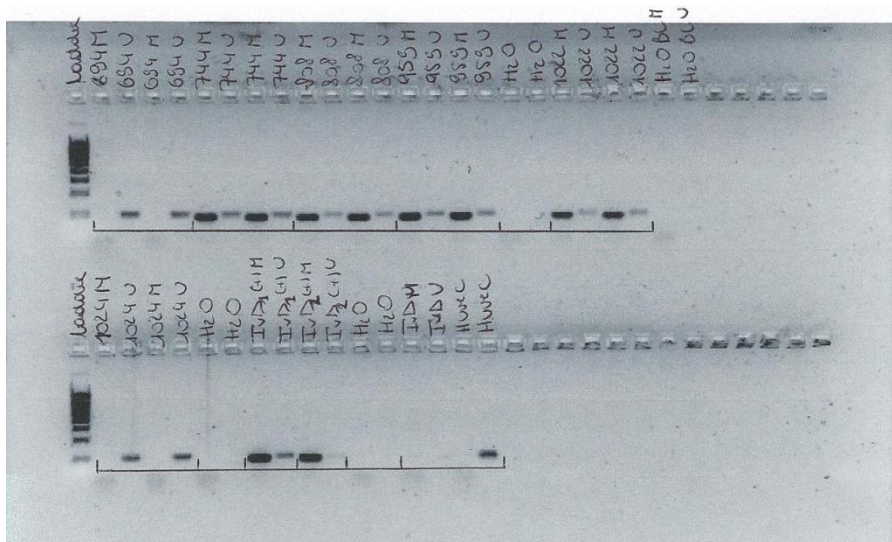
4.1.1. VALIDATIE NIEUWE BISULFIETBEHANDELING, EPITECT *BISULFITE* KIT

Het bepalen van promotor hypermethylering van het MLH1-gen wordt in het azM reeds uitgevoerd met behulp van *methylation specific* PCR, meer bepaald een *nested* PCR, gevolgd door gelelektroforese. Voorafgaand aan die PCR-reactie wordt een bisulfietbehandeling uitgevoerd. Voor deze analyse wordt geopteerd voor een nieuwe bisulfietbehandeling, nl. een behandeling met de Epitect *bisulfite* kit (Cat.no. 59104). Deze behandeling is flexibeler en makkelijker uit te voeren. Zo kan bij deze behandeling geopteerd worden voor een overnachtstap. Bij de oude bisulfietbehandeling was deze overnachtstap echter noodzakelijk aangezien de conversie 12 tot 16 uur duurde. Verder bestaat de nieuwe bisulfietbehandeling uit minder handelingen waardoor deze makkelijker is uit te voeren.

De nieuwe bisulfietbehandeling dient opnieuw gevalideerd te worden om te kijken of de kwaliteit van deze behandeling gelijkaardig is aan de oude bisulfietbehandeling. De validatie gebeurt door de resultaten van de oude bisulfietbehandeling te vergelijken met de resultaten van de nieuwe bisulfietbehandeling. Deze validatie wordt uitgevoerd op een beperkt aantal patiëntenstalen (bijlage 13). Op deze patiëntenstalen is reeds een MLH1-analyse uitgevoerd met de oude bisulfietbehandeling. Deze stalen ondergaan nogmaals de MLH1-analyse, maar dan met de nieuwe bisulfietbehandeling, nl. Epitect *bisulfite* kit. De stalen worden in duplo meegenomen om discrepanties uit te sluiten. Het resultaat wordt zichtbaar gemaakt aan de hand van een gelelektroforese (figuur 32, 33 en 34).



Figuur 32 Resultaat na gelelektroforese van MLH1-analyse met de nieuwe bisulfietbehandeling. In de eerste laan werd een 100 basenparenladder toegevoegd. Hiermee kan de lengte van het PCR-product worden afgeleid. Bovenaan de gel worden enkel de nummers van de stalen weergegeven. Hierbij wordt MBT14, de code van de afdeling en het jaartal van isolatie '14 weggelaten om de figuur overzichtelijk te houden. Hiernaast wordt een M of een U vermeld. Dit wijst erop of bij het staal primers voor gemethyleerde of ongemethyleerde sequenties zijn toegevoegd. Bij elke bisulfietbehandeling wordt een blanco meegenomen, H₂O. Verder werd ook een blanco meegenomen voor de PCR-reactie. Dit zowel voor de U-primer als M-primer (H₂O BL M en H₂O BL U). Als laatste werd nog een gemethyleerde en een ongemethyleerde controle meegenomen, respectievelijk IvD en HUVEC. IvD is cellijn DNA dat in vitro gemethyleerd is. HUVEC is DNA afkomstig van navelstrengcellen.



Figuur 33 Resultaat na gelelektroforese van MLH1-analyse met de nieuwe bisulfitbehandeling. In de eerste laan werd een 100 basenparenladder toegevoegd. Hiermee kan de lengte van de PCR-producten worden afgeleid. Bovenaan de gel worden enkel de nummers van de stalen weergegeven. Hierbij wordt MBT14, de code van de afdeling, en het jaartal van isolatie '14 weggelaten om de figuur overzichtelijk te houden. Hiernaast wordt een M of een U vermeld. Dit wijst erop of bij het staal primers voor een gemethyleerde of ongemethyleerde sequenties zijn toegevoegd. Bij elke bisulfitbehandeling wordt een blanco meegenomen, H₂O. Verder werd ook een blanco meegenomen voor de PCR-reactie. Dit zowel voor de U-primer als M-primer, nl. H₂O BL M en H₂O BL U. Als laatste werd nog een gemethyleerde controle en ongemethyleerde controle meegenomen, respectievelijk IVD en HUVEC. IVD is cellijn DNA dat in vitro gemethyleerd is. HUVEC is DNA afkomstig van navelstrengcellen.

Op figuur 32 en 33 zijn de resultaten van de MLH1-analyse met de nieuwe bisulfitbehandeling na gelelektroforese zichtbaar. Bij zowel de blanco van de bisulfitbehandeling als de blanco van de PCR-reactie zijn geen banden waar te nemen. De gevormde PCR-producten liggen, voor zowel ongemethyleerde als gemethyleerde producten, rond 100 basenparen. De PCR-producten afkomstig van het gemethyleerde primerpaar (M-primers) liggen ietwat lager dan de PCR-producten afkomstig van het ongemethyleerde primerpaar (U-primers). Dit komt overeen met de verwachte waarden, nl. 98 en 87 basenparen respectievelijk voor PCR-producten van ongemethyleerd DNA en gemethyleerd DNA. De PCR-reactie is dus gelukt.

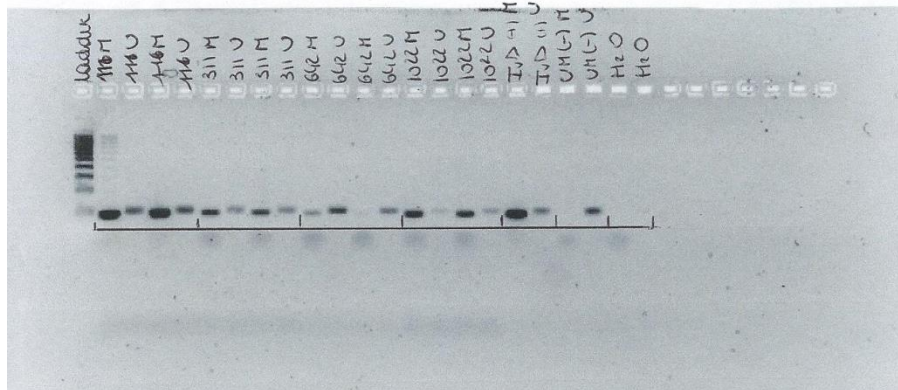
Bij een ongemethyleerd staal kunnen alleen de ongemethyleerde primers binden. Hierbij verschijnt enkel een band bij het staal waarbij de U-primers zijn toegevoegd, zoals MBT14-111. Bij een gemethyleerd staal kunnen in principe enkel de gemethyleerde primers binden. Doch is op de gel bij de meeste stalen zowel een band waar te nemen bij de stalen waar een gemethyleerd primerpaar als een ongemethyleerd primerpaar werd toegevoegd, bv. MBT14-210.

Naast de stalen en blanco's werd een gemethyleerde en ongemethyleerde controle meegenomen, respectievelijk IVD en HUVEC. De gemethyleerde controle, IVD, moest nog een bisulfitbehandeling ondergaan. Hierbij werden twee gemethyleerde controles behandeld, zodat deze voor volgende methyleringanalyses al getest zijn. Bij de eerste gemethyleerde controle (IVD1) is zowel een band zichtbaar bij de U- als bij de M-primer. Bij de tweede gemethyleerde controle (IVD2) is enkel een band bij de M-primer aanwezig. Ook hierbij werd een blanco voor de bisulfitbehandeling meegenomen. Deze blanco vertoont geen band. De ongemethyleerde controle, UM, was nog aanwezig in het labo. Deze werd reeds in de vorige analyses getest. Bij de UM is enkel een band zichtbaar bij de U-primer.

Bij de eerste gemethyleerde controle (lvD1) is zowel een band zichtbaar bij de U- als de M-primer. Dit kan wijzen op het feit dat deze controle niet volledig positief is. Deze controle werd in het labo zelf bereid door een cellijn te behandelen met DNA-methyltransferase (zie 3. Materiaal en methoden; 3.1 stalen; 3.1.1 controlestalen: lvD). Aangezien de controle niet volledig positief is, kan het zijn dat het enzym niet alle cytosines in het dubbelstrengig DNA heeft gemethyleerd. Voor verdere analyses moet hier rekening mee gehouden worden. Deze controle kan wel gebruikt worden als gemethyleerde controle.

Bij de meeste stalen is een band zichtbaar bij zowel U-primers als M-primers, bv. MBT14-210. Dit wijst erop dat beide primerparen, primers gericht tegen gemethyleerd DNA en ongemethyleerd DNA, hebben kunnen binden. Deze stalen bevatten zowel gemethyleerd als ongemethyleerd DNA. Voor verdere analyses worden deze stalen behandeld als gemethyleerd.

De duplo geeft meestal een eenduidig resultaat. Enkel de duplo van de stalen MBT14-116, MBT14-311, MBT14-642 geven een discrepantie. De analyse werd daarom herhaald op deze stalen. Ook wordt de analyse herhaald op het staal MBT14-1022. Aangezien deze een discrepantie vertoont met de oude bisulfitbehandeling.



Figuur 34 Resultaat na gelelektroforese van MLH1-analyse met de nieuwe bisulfitbehandeling op de stalen die een discrepantie vertonen. In de eerste baan werd een 100 basenparenladder toegevoegd. Hiermee kan de lengte van de PCR-producten worden afgeleid. Bovenaan de gel worden enkel de nummers van de stalen weergegeven, zonder MBT14. Hierbij wordt MBT14, de code van de afdeling en het jaartal van isolatie '14 weggelaten om de figuur overzichtelijk te houden. Verder wordt bij het staal een M of een U vermeld. Dit wijst erop of bij het staal primers voor gemethyleerd of ongemethyleerd sequenties zijn toegevoegd. Voor deze analyse werd ook een blanco meegenomen voor de PCR-reactie, H₂O. Als laatste werd nog een gemethyleerde controle en ongemethyleerde controle meegenomen, respectievelijk lvD en UM. lvD is cellijn DNA dat in vitro gemethyleerd is. HUVEC is DNA afkomstig van menselijke navelstrengcellen.

Op bovenstaande figuur (figuur 34) is het resultaat zichtbaar van de gelelektroforese na de MSP van de vier stalen die een discrepantie vertonen, nl. MBT 14-111, MBT 14-316, MBT14-642 en MBT14-1022. Bij de blanco van de PCR-reactie is geen band zichtbaar. Dit wil zeggen dat geen contaminatie heeft plaatsgevonden en bijgevolg de PCR-reactie gelukt is.

De stalen op bovenstaande gel geven zowel een band bij de U-primers als bij de M-primers, behalve de duplo van MBT14-642. Hiervan geeft één staal enkel een band bij de M-primers.

Naast de stalen werd ook een gemethyleerde controle, ongemethyleerde controle en blanco voor de PCR-reactie meegenomen. Een blanco voor de bisulfitbehandeling is hierbij niet nodig aangezien deze stalen niet opnieuw gebisulfit moesten worden. Daarbij werd de blanco reeds in de vorige analyse getest. Deze was negatief. De gemethyleerde controle geeft een band weer bij zowel de U-primers als M-primers. Bij de ongemethyleerde controle is enkel een band zichtbaar bij de U-primers.

Bij het staal MBT14-642 geeft één duplo enkel een band weer bij de M-primer. De andere duplo geeft echter een band weer bij zowel de U- als M-primer. Voor dit staal is dus een discrepantie waar te nemen, maar deze heeft geen effect op het resultaat van dit staal. Zowel een band bij de U-primers als M-primers als een band enkel bij de M-primers wijzen op methylering.

De ongemethyleerde controle geeft enkel een band bij de U-primers. Dit wil zeggen dat de ongemethyleerde controle goed gelukt is en enkel de U-primers hebben kunnen binden.

Samengevat

De resultaten van de MLH1-analyse, met zowel de oude als de nieuwe bisulfietbehandeling, worden samengevat in onderstaande tabel (tabel 24). Uit de tabel kan worden opgemerkt dat bij drie stalen een discrepantie is waar te nemen, nl. MBT14-311, MBT14-642 en MBT14-1022. Bij deze stalen is het MLH1-gen ongemethyleerd bij de MLH1-analyse met de oude bisulfietbehandeling. Terwijl met de nieuwe bisulfietbehandeling het MLH1-gen voor deze stalen gemethyleerd is. Dit wijst op het feit dat de nieuwe bisulfietbehandeling efficiënter is.

Tabel 24 Overzichtstabel van resultaten na MSP met nieuwe en oude bisulfietbehandeling op beperkte reeks patiëntenstalen (bijlage 13). In onderstaande tabel worden de resultaten van zowel de oude als de nieuwe bisulfietbehandeling samengevat. De discrepanties die voorkomen tussen deze twee bisulfietbehandelingen worden aangeduid in het grijs.

Staal	MBT14-111	MBT14-116	Mbt14-123	MBT14-210	MBT14-299	MBT14-311	MBT14-312	MBT14-314	MBT14-315	MBT14-319	MBT14-416	Mbt14-574	Mbt14-642	MBT14-694	MBT14-744	MBT14-808	MBT14-959	MBT14-1022	MBT14-1024
Resultaat oude bisulfiet-behandeling	U	M	U	M	M	U	M	M	M	U	M	M	U	U	M	M	M	U	U
Resultaat nieuwe bisulfiet-behandeling	U	M	U	M	M	M	M	M	M	U	M	M	M	U	M	M	M	M	U

De validatie van de bisulfietbehandeling is gelukt. Met behulp van deze behandeling kan een onderscheid worden gemaakt tussen gemethyleerd DNA en ongemethyleerd DNA. Aangezien drie stalen een discrepantie vertonen en met de nieuwe bisulfietbehandeling als gemethyleerd worden beschouwd, kan worden besloten dat de nieuwe bisulfietbehandeling efficiënter is.

4.1.2. QPCR ALS METHODE OM PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN HET MLH1-GEN TE ANALYSEREN

Aangezien de nieuwe bisulfietbehandeling gevalideerd is, moet de MLH1-analyse terug op punt gesteld worden. Er wordt getracht om een betere cut-off te stellen voor de huidige analyse voor het aantonen van promotor hypermethylering van het MLH1-gen. Hierbij wordt geopteerd voor de qPCR.

Om de qPCR te gebruiken als analysemethode voor het detecteren van de methylatiestatus van het MLH1-gen dient deze methode hiervoor geoptimaliseerd te worden. De optimalisatie gebeurt eerst aan de hand van controlestalen. Daarna wordt de geoptimaliseerde qPCR uitgetest op een beperkt aantal patiëntenstalen (zie bijlage 13).

Verder wordt deze analyse gevalideerd aan de hand van een grootte reeks patiëntenstalen (zie bijlage 14) met de geoptimaliseerde qPCR.

Als laatste dient een cut-off bepaald te worden, ook wel drempelwaarde genoemd. Dit gebeurt op basis van de resultaten van patiëntenstalen, waarop reeds de oude analyse (*nested* PCR) werd uitgevoerd, te vergelijken met de bekomen resultaten van de qPCR. Verder wordt deze cut-off bepaald door een verdunningsreeks te maken van IvD en UM. Op basis van de aflopende concentraties gemethyleerd DNA kan de detectiegrens van de methode bepaald worden. Verder kan op basis van deze verdunningsreeks een cut-off gesteld worden.

4.1.2.1. OPTIMALISATIE VAN QPCR OP CONTROLESTALEN

De optimalisatie van de qPCR gebeurde op twee soorten controlestalen. Zo werden IvD en UM gebruikt. Deze controlestalen werden zelf bereid in het labo (zie 3. Materiaal en methoden; 3.1 stalen; 3.1.1 controlestalen: IvD en HUVEC). IvD is de controle voor gemethyleerd DNA. Dit is een DNA cellijn die in vitro gemethyleerd werd. HUVEC is de controle voor ongemethyleerd DNA. Dit DNA is afkomstig van endotheelcellen uit bloedvaten van de navelstreng. Daarnaast werd ook een kit met controlestalen aangekocht bij Qiagen (Nederland), nl. Qiagen PCR control DNA (Cat.no. 59695).

Verder werden twee soorten buffers met bijhorende mastermix uitgetest, nl. MyTaq™ HS mix (Cat.no.BIO-25045) en SensiFast™ HRM mix (Cat.no.BIO-32002). Deze werden aangekocht bij Bioline. Het verschil tussen deze mixen is dat de SensiFast een *ready-to-use* mix is. Aan deze mix moeten enkel primers en steriel H₂O worden toegevoegd.

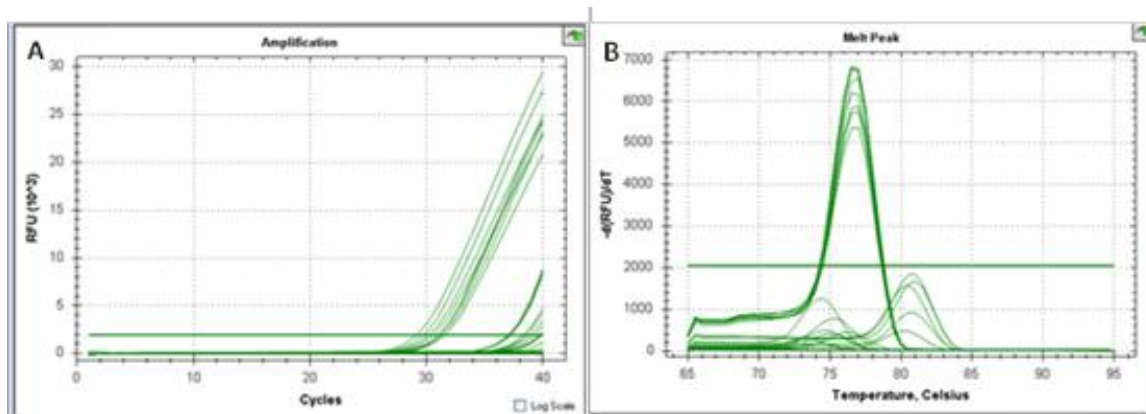
Ook het PCR-programma werd op punt gesteld. Dit gebeurde met behulp van een temperatuursgradiënt.

QPCR MYTAQ™ HS MIX

De optimalisatie van de qPCR gebeurde aan de hand van de MyTaq™ HS mix. Deze mix is ontworpen voor *hot-start* PCR. De mix bevat een buffer, dNTP's, MgCl₂, *enhancer* en stabilisatoren die nodig zijn voor een PCR-reactie. Verder wordt bij deze mix, naast de primers, *LC green* toegevoegd als fluorescente *dye*.

De qPCR werd op controlestalen ingezet met de MyTaq™ HS mix. Als primers werden de *inside* primers gebruikt. Bij deze qPCR werd voor de *annealing*temperatuur een gradiënt ingevoerd met als temperaturen: 58°C, 60°C, 62°C en 64°C.

De amplificatiecurve (figuur 35A) komt vrij laat op bij de controlestalen, maar er is wel een duidelijk verschil te onderscheiden tussen gemethyleerde en ongemethyleerde stalen. Ook bij de smeltcurve is een mooi resultaat zichtbaar. Hierbij liggen de temperaturen van de ongemethyleerde stalen bij elkaar. De temperaturen van de gemethyleerde stalen liggen ook rond dezelfde waarde. Dit echter wel onder de Ct-waarde aangezien de amplificatiecurve maar voor een klein deel zichtbaar is (figuur 35B).

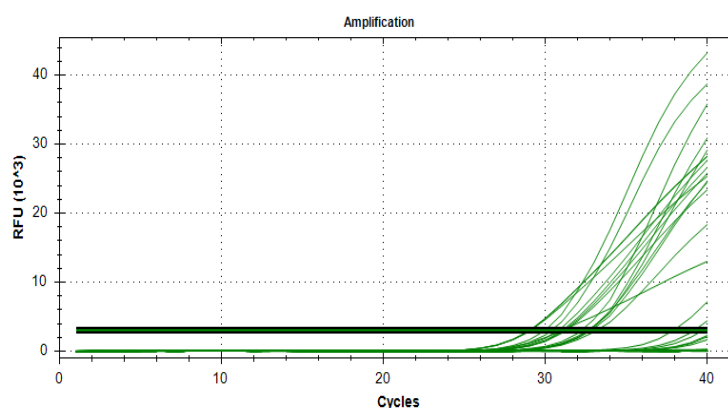


Figuur 35 Resultaat van qPCR met MyTaq™ HS mix op controlestalen (MLH1-analyse).

A. Amplificatiecurve van de controlestalen met gemethyleerde primers en ongemethyleerde primers bij verschillende *annealing*temperaturen. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven.
 B. Bijhorende smeltcurves van de controlestalen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven.

Aangezien de amplificatiecurve vrij laat opkwam, werd de qPCR herhaald maar in plaats van 1 µl DNA wordt 2 µl DNA toegevoegd aan de mastermix.

De amplificatiecurve (figuur 36) komt nog steeds vrij laat op. Het amplificatiesignaal is wel hoger bij deze reactie, maar het onderscheid tussen gemethyleerd DNA en ongemethyleerd DNA kan minder goed worden waargenomen. Om de amplificatiecurve volledig zichtbaar te maken kan het aantal cycli verhoogd worden. Voor deze qPCR optimalisatie wordt verder een vergelijking gemaakt tussen de MyTaq™ HS mix en de SensiFast™ HRM mix.

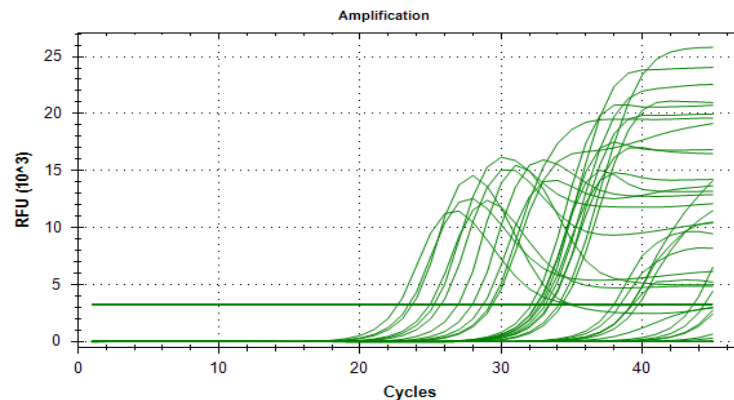


Figuur 36 Resultaat van qPCR met MyTaq™ HS mix op controlestalen met 2 µl DNA (MLH1-analyse). Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven.

VERGELIJKING TUSSEN MYTAQ™ HS MIX EN SENSIFAST™ HRM MIX

Voor de vergelijking van deze mastermixen werden twee aparte mastermixen gemaakt, één met MyTaq™ HS mix en één met SensiFast™ HRM mix. Voor het PCR-programma werd getracht om de twee optimale PCR-programma's, van MyTaq™ HS en SensiFast™ HRM, te herleiden tot één programma. Zo konden deze twee mastermixen in één qPCR vergeleken worden onder hetzelfde PCR-programma. Dit PCR-programma werd gemaakt door de PCR-programma's van MyTaq™ HS mix en SensiFast™ HRM mix te vergelijken en samen te vatten in één PCR-programma. Aangezien

de temperaturen en tijden voor enzymactivatie, denaturatie en extensie voor beide programma's gelijkaardig waren, kon één PCR-programma worden opgesteld. Bij de *annealing*temperatuur werd een gradiënt geplaatst met als temperaturen 52°C, 54°C, 56°C, 58°C en 60°C. Verder werden bij deze qPCR voor elke mix opnieuw twee mastermixen bereid. De eerste mastermix bevatte de ongemethyleerde primers. Aan deze mastermix werden de controlestalen met ongemethyleerd DNA toegevoegd. De tweede mastermix bevatte gemethyleerde primers. Aan deze mastermix werden enkel controlestalen met gemethyleerd DNA toegevoegd.

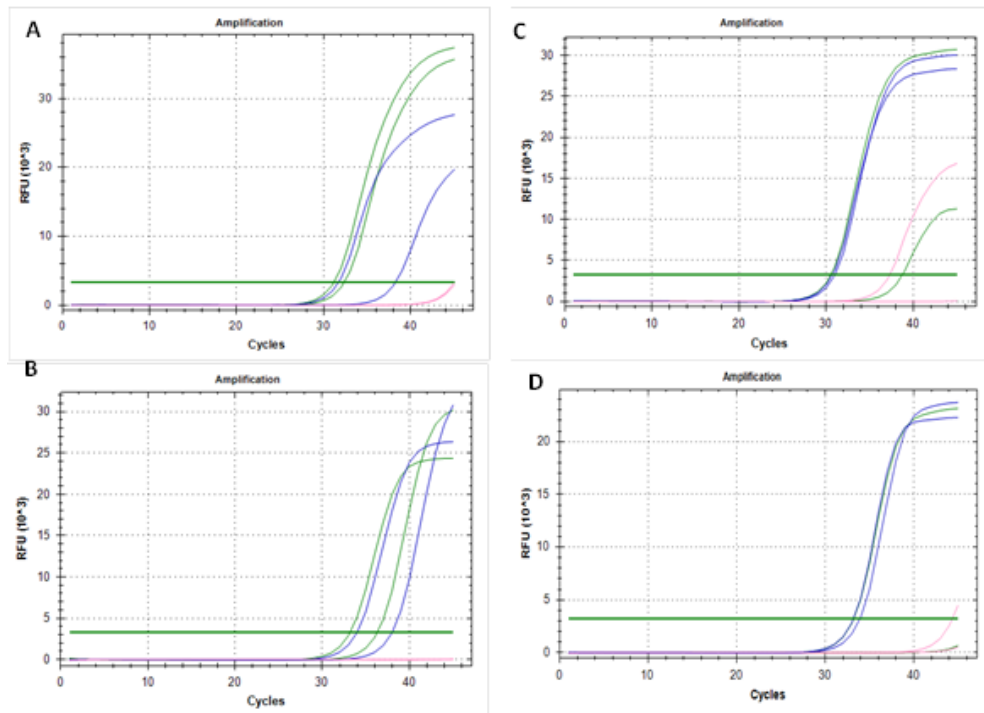


Figuur 37 Resultaat van qPCR vergelijking tussen MyTaq™ HS mix en SensiFast™ HRM HM mix bij lage temperaturen voor *annealing*temperatuur (52°C, 54°C en 56°C) (MLH1-analyse). Voor deze analyse werden enkel gemethyleerde controle met gemethyleerde primers ingezet en ongemethyleerde controles met ongemethyleerde primers.

De temperaturen onder 58°C gaven geen mooie amplificatiecurves weer (figuur 37). Deze temperaturen liggen te laag voor de *annealing*temperatuur. De binding van de primers aan de sequentie gebeurt niet optimaal bij deze temperaturen.

Bij temperatuur 60°C en 58°C werden de beste amplificatiecurves (figuur 38) gevormd. Op figuur 38A en 38B zijn de blanco's mooi negatief. De amplificatiecurves van de controlestalen zijn goed gelukt. Het amplificatiesignaal is bij de ongemethyleerde primers bij 60°C hoger dan bij 58°C. Dit wijst op het feit dat 60°C een betere *annealing*temperatuur is dan 58°C.

Op figuur 38C geeft de blanco een licht amplificatiesignaal. Verder is op de curve waar te nemen dat ongemethyleerde controle (UK) maar een licht amplificatiesignaal geeft. Dit kan te wijten zijn aan pipetteerfouten. Op figuur 38D blijft de blanco echter mooi negatief. De controlestalen geven een mooie amplificatie weer. Het gemethyleerde controlestaal (ML) blijft negatief bij de gemethyleerde primer bij 60°C. Dit kan te wijten zijn aan het vergeten toe te voegen van het staal.



Figuur 38 Resultaat van qPCR vergelijking tussen MyTaq™ HS mix en SensiFast™ HRM mix bij 58°C en 60°C (MLH1-analyse).

A. Amplificatiecurve van MyTaq™ HS mix met ongemethyleerde primers op controlestalen. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. In het blauw zijn de stalen aangeduid waarop een *annealing*temperatuur van 58°C is uitgetest. In het groen zijn de stalen aangeduid waarop een *annealing*temperatuur van 60°C is uitgetest. In het roze is de blanco aangeduid.

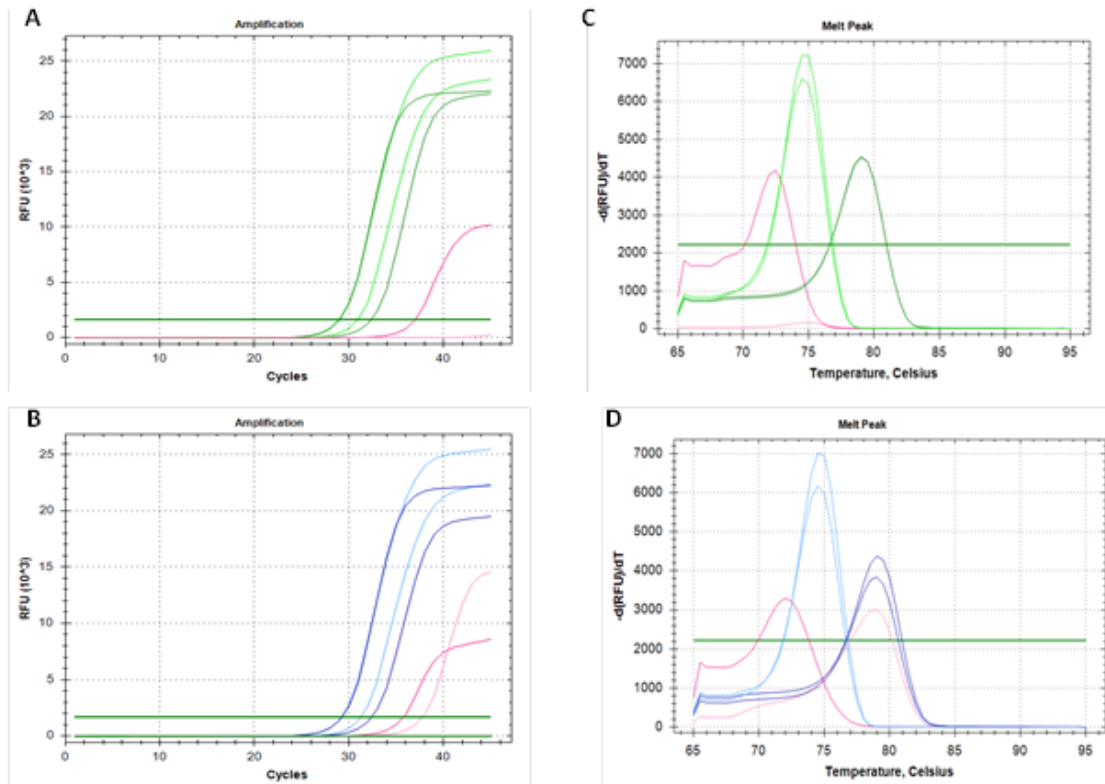
B. Amplificatiecurve van MyTaq™ HS mix met gemethyleerde primers op controlestalen. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Zelfde kleurcode als bij A.

C. Amplificatiecurve van SensiFast™ HRM met ongemethyleerde primers op controlestalen. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Zelfde kleurcode als bij A.

D. Amplificatiecurve van SensiFast™ HRM met gemethyleerde primers op controlestalen. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Zelfde kleurcode als bij A.

QPCR SENSIFAST™ HRM MIX

De qPCR werd opnieuw herhaald met de SensiFast™ HRM Mix op controlestalen. Vermits bij sommige stalen een onbetrouwbaar resultaat was waar te nemen. Zo werd bij een blanco amplificatie waargenomen, bij gemethyleerde controle (MK) werd geen amplificatie waargenomen en bij ongemethyleerde controle (UK) maar een lichte amplificatie. Hierbij werden enkel de *annealing*temperaturen 58°C en 60°C uitgetest vermits bij deze temperaturen de amplificatiecurve het beste was.



Figuur 39 Resultaat van qPCR met SensiFast™ HRM mix op controlestalen (MLH1-analyse).

A. Amplificatiecurve bij 60°C op controlestalen met zowel ongemethyleerde als gemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. In het lichtgroen zijn de ongemethyleerde controlestalen weergegeven met ongemethyleerde primers. In het donkergroen de gemethyleerde controlestalen met gemethyleerde primers. In het lichtroze is de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers weergegeven. In het donkerroze is de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers weergegeven.

B. Amplificatiecurve bij 58°C op controlestalen met zowel ongemethyleerde als gemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. In het lichtblauw zijn de ongemethyleerde controlestalen met ongemethyleerde primers weergegeven. In het donkerblauw zijn de gemethyleerde stalen met gemethyleerde primers weergegeven. In het lichtroze is de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers weergegeven. In het donkerroze is de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers weergegeven.

C. Smeltcurve bij 60°C van controlestalen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Zelfde kleurcode als bij A.

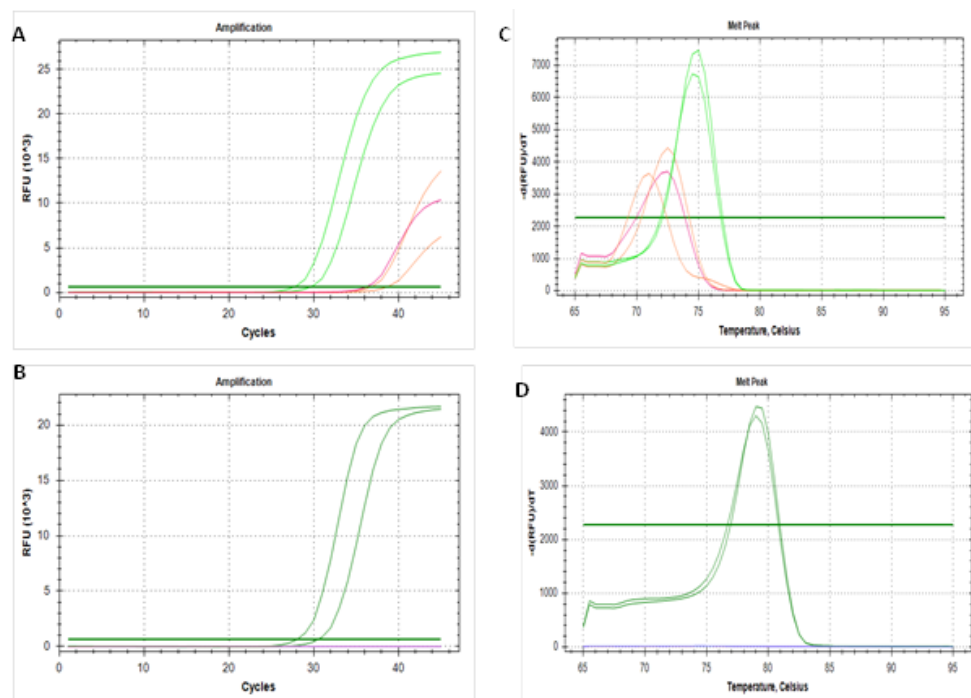
D. Smeltcurve bij 58°C van controlestalen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Zelfde kleurcode als bij B.

Op figuur 39A is de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers (lichtroze) mooi negatief. De blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers (donkerroze) vertoont zowel bij 58°C als 60°C amplificatie. Aangezien dit bij beide temperaturen voorkomt, lijken pipetteerfouten onwaarschijnlijk. Hiernaast kan dit ook aan binding van de primers liggen. Als deze ongemethyleerde controles op de smeltcurve wordt bekeken (figuur 39C en 39D) kan worden opgemerkt dat deze een lagere smelttemperatuur hebben dan de gemethyleerde en ongemethyleerde stalen. Enkel de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers heeft dezelfde smelttemperatuur als de gemethyleerde stalen (figuur 39C). Hierbij heeft waarschijnlijk een pipetteerfout plaatsgevonden. De controlestalen geven een mooi beeld bij zowel 60°C (figuur 39A) als 58°C (figuur 39B). De amplificatiecurve bij 60°C geeft een strakkere curve weer dan 58°C. Daarom wordt geadviseerd voor 60°C als *annealing*temperatuur. Op figuur 39C is maar één smeltcurve van de gemethyleerde stalen waar te nemen. Dit komt aangezien de smeltcurves samenvallen.

Bij het opzoeken van de primers naar de kans op primerdimeren, blijkt de kans op primerdimeren bij de ongemethyleerde primer vrij hoog te zijn. Zo kunnen zowel zelfdimeren als crossdimeren gevormd worden.

De geoptimaliseerde qPCR werd nogmaals op de controlestalen uitgevoerd met SensiFast™ HRM mix. Deze keer werden echter zowel de ongemethyleerde als de gemethyleerde stalen onderworpen aan de ongemethyleerde en gemethyleerde primers. Dit met het geoptimaliseerde PCR-programma met een *annealing*stemperatuur van 60°C.

De resultaten van de geoptimaliseerde qPCR zijn zeer goed (figuur 40). Beide amplificatiecurves, zowel van de mastermix met ongemethyleerde primers (figuur 40A) als gemethyleerde primers (figuur 40B) zien er gunstig uit. Enkel bij de ongemethyleerde primers zijn primerdimeren terug te vinden. Dit is te zien aan de lichte amplificatie die waar te nemen is bij zowel de blanco als de gemethyleerde controlestalen (figuur 40A). Als naar de bijhorende smeltcurve (figuur 40C) wordt gekeken, kan worden bevestigd dat de blanco en gemethyleerde controlestalen een andere smeltemperatuur hebben dan de ongemethyleerde stalen. Toch is op figuur 40C een verschillende smeltemperatuur waar te nemen tussen de twee stalen. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat het verschillende stalen zijn, maar kan ook te wijten zijn aan pipetteerfouten. De smeltcurve van de mastermix met gemethyleerde primers (figuur 40D) ziet er zeer goed uit.



Figuur 40 Resultaat geoptimaliseerde qPCR op controlestalen (MLH1-analyse).

A. De amplificatiecurves van controlestalen met ongemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. In het lichtgroen de ongemethyleerde controlestalen aangeduid. In het oranje de gemethyleerde controlestalen aangeduid. In het roze de blanco aangeduid.

B. De amplificatiecurve van de controlestalen met gemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. In het donkergroen de gemethyleerde controlestalen aangeduid. In het paars de ongemethyleerde controlestalen aangeduid. In het roze de blanco aangeduid. Hierbij is de kleurcode hetzelfde als bij de amplificatiecurve A.

C. De smeltcurve van de controlestalen met ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven.

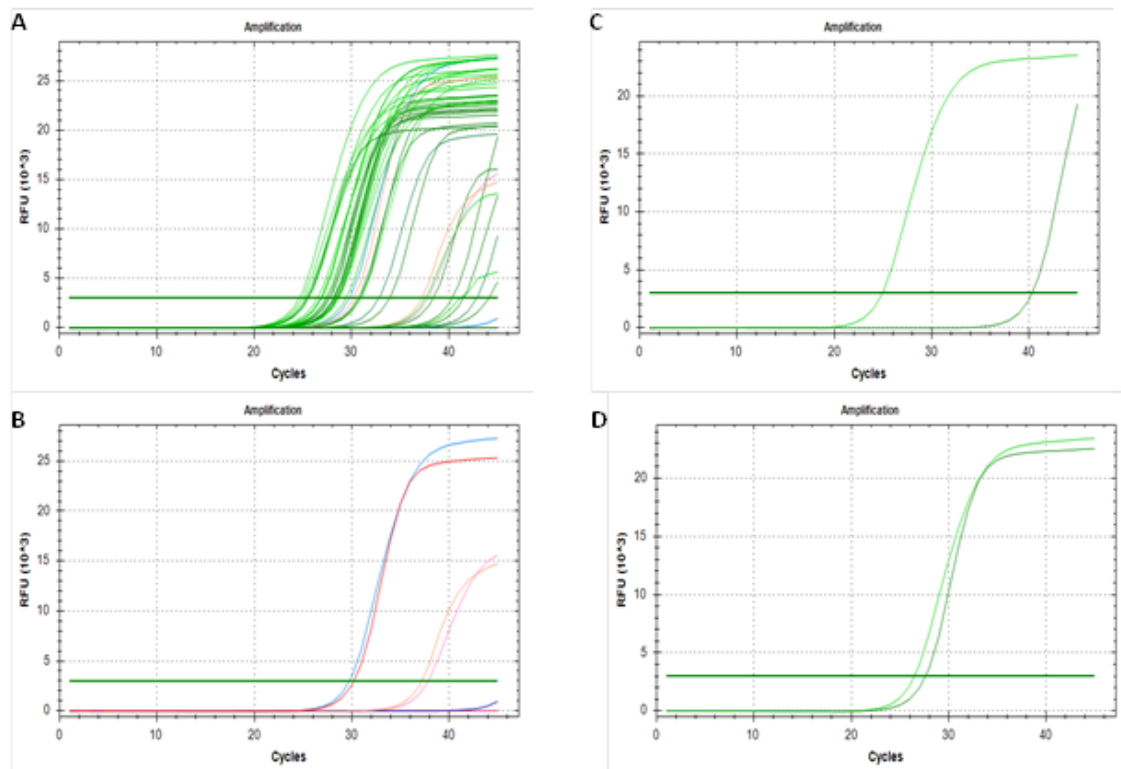
D. De smeltcurve van de controlestalen met gemethyleerde primers. Hierbij is ook de kleurcode hetzelfde als bij de amplificatiecurve. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven.

4.1.2.2. VALIDATIE VAN QPCR

Na de optimalisatie van de qPCR op de controlestalen kan een beperkte reeks patiëntenstalen getest worden (Bijlage 13). Wanneer deze reeks goede resultaten geeft, kan overgegaan worden naar de validatie van de analyse op een grotere reeks patiëntenstalen (Bijlage 14).

QPCR OP BEPERKT AANTAL PATIËNSTALEN

Voor het controlelabo werd de mastermix gebruikt met als buffer SensiFast™ HRM. Verder werd het geoptimaliseerde PCR-programma toegepast met als *annealing*temperatuur 60°C.



Figuur 41 Resultaat van qPCR op beperkt aantal stalen voor MLH1-analyse.

- A. Amplificatiecurves van de verschillende patiëntenstalen en controlestalen. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurves van de patiëntenstalen met ongemethyleerde primers worden weergegeven in het lichtgroen. De amplificatiecurves van de patiëntenstalen met gemethyleerde primers worden weergegeven in het donkergroen. In het donkeroranje wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers. In het lichtroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers. De ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtblauw. De ongemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkerblauw. De gemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkeroranje. De gemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtoranje.
- B. Amplificatiecurves van de controlestalen. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. In het donkeroranje wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers. In het lichtroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers. De ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtblauw. De ongemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkerblauw. De gemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkeroranje. De gemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtoranje.
- C. Amplificatiecurves van een ongemethyleerd staal, MBT10-111, weer. Hierbij is de amplificatiecurve van het staal met de mastermix met ongemethyleerde primers weergegeven in het lichtgroen. Het staal met de mastermix met gemethyleerde primers is weergegeven met een donkergroene grafiek.
- D. Amplificatiecurve van een gemethyleerd staal weer, nl. MBT10-116. Hierbij is opnieuw de curve van het staal met de mastermix met ongemethyleerde primers weergegeven in het lichtgroen. Het staal met de mastermix met gemethyleerde primers is weergegeven in het donkergroen.

Op figuur 41A wordt een overzicht gegeven van de amplificatiecurves van de geanalyseerde stalen. Figuur 41B geeft de amplificatiecurves van de blanco, gemethyleerde controle en ongemethyleerde controle weer. Voor elk staal zijn twee amplificatiecurves zichtbaar. Zo wordt voor deze analyse het staal zowel aan een mastermix met gemethyleerde primers (donkergroene curves) als een mastermix met ongemethyleerde primers (lichtgroene curves) toegevoegd.

De gemethyleerde controle (lichtoranje) en de blanco (roze) komen licht op bij de ongemethyleerde primers (figuur 41B). Dit is te wijten aan primerdimeren. De ongemethyleerde controle (donkerblauw) en de blanco (donkerroze) blijven mooi negatief bij de gemethyleerde primers. De qPCR is gelukt. De meeste stalen zijn goed te analyseren aan de hand van de amplificatiecurve. Zo is op figuur 41C het staal MBT10-111 zichtbaar. Dit staal is duidelijk ongemethyleerd aangezien de amplificatie van het staal met de mastermix met gemethyleerde primers vrij laat begint, rond cyclus 40. Terwijl de amplificatie van hetzelfde staal met de mastermix voor ongemethyleerde primers veel vroeger is waar te nemen. Op figuur 41D is een gemethyleerd staal zichtbaar, nl MBT10-116. Dit staal is duidelijk gemethyleerd aangezien zowel de ongemethyleerde primers als de gemethyleerde primers aan het DNA van het staal hebben kunnen binden. Dit wijst erop dat het staal zowel ongemethyleerd als gemethyleerd DNA bevat. Aangezien het staal gemethyleerd DNA bevat wordt dit staal als gemethyleerd beschouwd.

Tabel 25 Ct-waarden van beperkte reeks patiëntenstalen voor de MLH1-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix van de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de Δ Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Als laatste wordt ook het resultaat van de *nested* PCR met de oude bisulfietbehandeling weergegeven. De discrepanties die tussen de twee methodes (*nested* PCR en qPCR) voorkomen worden in het grijs gearceerd.

Staal	MBT10-111	MBT10-116	MBT10-123	MBT10-210	MBT10-299	MBT10-311	MBT10-312	MBT10-314	MBT10-315
Ct-waarde U	24,97	26,46	28,10	28,23	27,39	25,56	37,58	28,66	26,88
Ct-waarde M	40,31	27,60	45	30,63	27,78	33,91	45	28,19	27,35
Δ Ct-waarde	-15,34	-1,14	-16,90	-2,4	-0,39	-8,35	-7,42	0,47	-0,47
Resultaat qPCR	U	M	U	M	M	U	U	M	M
Oorspronkelijk resultaat	U	M	U	M	M	U	M	M	M
Staal	MBT10-416	MBT10-574	MBT10-642	MBT10-694	MBT10-744	MBT10-808	MBT10-959	MBT10-1022	MBT10-1024
Ct-waarde U	26,96	28,57	24,60	25,52	28,47	25,22	29,39	30,99	26,81
Ct-waarde M	28,43	30,85	38,37	41,46	28,25	25,40	28,45	32,79	42,86
ΔCt-waarde	-1,47	-2,28	-13,77	-15,94	0,22	-0,18	0,94	-1,80	-16,05
Resultaat qPCR	M	M	U	U	M	M	M	M	U
Oorspronkelijk resultaat	M	M	U	U	M	M	M	U	U

Aan de hand van de amplificatiecurve kan de Ct-waarde berekend worden. De Ct-waarde is de cyclus waarbij het product voldoende geamplificeerd is en er een detecteerbaar fluorescent signaal verkregen wordt.

Zo is bij een ongemethyleerd staal, bv MBT10-111, de amplificatie van het staal met de ongemethyleerde primers is vroeger waar te nemen dan de amplificatie van het staal met de gemethyleerde primers. Dit wordt bevestigd door de Ct-waarden. Zo is de Ct-waarde van het staal met de ongemethyleerde primers veel lager dan het staal met de gemethyleerde primers.

Bij een gemethyleerd staal, bv MBT10-116, daarentegen is de amplificatie van het staal met de gemethyleerde primers vroeger waar te nemen aangezien hier de gemethyleerde primers gemakkelijk kunnen binden aan het DNA. Hiernaast kunnen meestal ook de ongemethyleerde primers gaan binden aangezien het zelden voor komt dat al het DNA gemethyleerd is. Vandaar dat ook amplificatie waar te nemen is voor het staal met ongemethyleerde primers. Meestal liggen voor een gemethyleerd staal de Ct-waarden van ongemethyleerde primers en gemethyleerde primers bij elkaar in de buurt.

Uit de tabel (tabel 25) blijkt dat er tussen de oude methode, *nested* PCR, en de nieuwe methode, qPCR, twee discrepanties zijn vast te stellen, nl MBT10-312 en MBT10-1022. Dit kan te wijten zijn aan de gevoeligheid van de techniek. Zo is bij qPCR de amplificatie van het DNA beter te volgen. Bij *nested* PCR daarentegen is enkel de eindpuntsmeting waar te nemen.

Het staal MBT10-312 is gemethyleerd volgens de MSP met de oude bisulfietbehandeling (*nested* PCR) en ongemethyleerd volgens de MSP (qPCR) met de nieuwe bisulfietbehandeling. Echter bij de analyse met de qPCR blijkt dat dit staal ongemethyleerd is. Uit de amplificatiecurve kan er worden afgeleid dat dit staal geen amplificatie vertoont bij de mastermix met de gemethyleerde primers. Hoogstwaarschijnlijk is hier iets misgegaan tijdens het voorbereiden van de qPCR. Hierbij kan het zijn dat hier DNA is vergeten toe te voegen. Verder kan deze discrepantie te wijten zijn aan de techniek. Zo kan met behulp van qPCR de amplificatie beter gevolgd worden.

Het staal MBT10-1022 is ongemethyleerd volgens de MSP met de oude bisulfietbehandeling (*nested* PCR) en gemethyleerd volgens de MSP met de nieuwe bisulfietbehandeling (qPCR). Bij de analyse met behulp van de qPCR blijkt dat dit staal gemethyleerd is.

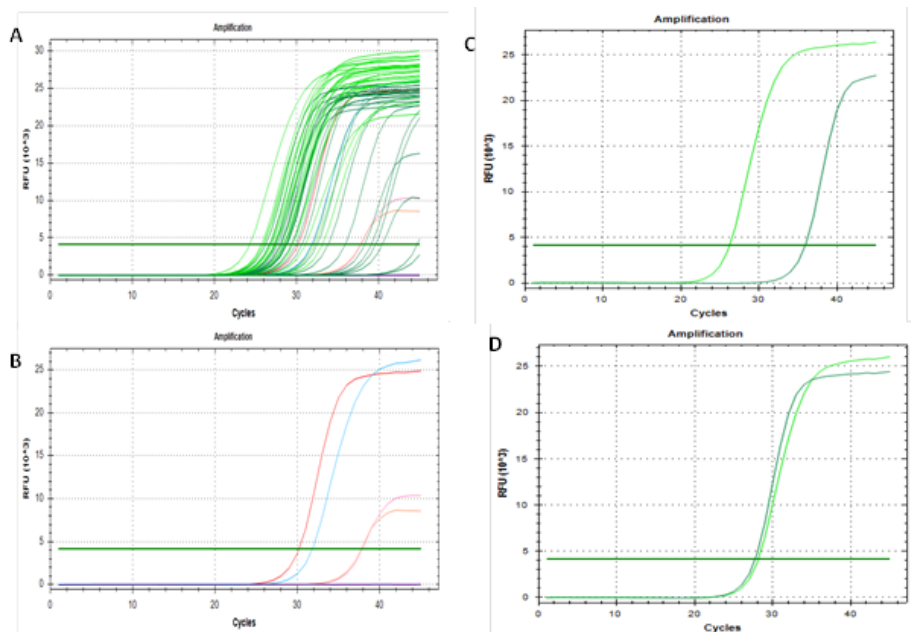
Op basis van de resultaten van de oude analyse, MSP, kan bepaald worden wanneer een staal na analyse met qPCR gemethyleerd of ongemethyleerd is. Als deze resultaten vergeleken worden met de Δ Ct-waarde van de qPCR is een staal met Δ Ct-waarde boven -2,4 gemethyleerd en onder -8,35 ongemethyleerd.

Aan de hand van qPCR kan een goed onderscheid gemaakt worden tussen gemethyleerd en ongemethyleerd DNA. Deze resultaten kunnen bevestigd worden door de Ct-waarden.

VALIDATIE VAN QPCR OP GROTER AANTAL PATIËNSTALEN

Nadat de resultaten van de beperkte reeks goed waren, kon overgegaan worden naar de validatie van deze analyse. Hierbij werd de methode gecontroleerd op juistheid. Voor deze analyse werden de stalen in bijlage 14 gebruikt. Deze stalen ondergingen een bisulfietbehandeling om het onderscheid tussen gemethyleerd DNA en ongemethyleerd DNA zichtbaar te maken. Verder werd de SensiFast™ HRM gebruikt en het geoptimaliseerde PCR-programma met als *annealing*temperatuur 60°C. Voor deze analyse werden 47 stalen getest. Deze reeks werd in twee delen opgesplitst.

De opsplitsing moest gebeuren aangezien per analyse 44 stalen kunnen worden getest. Dit komt omdat de stalen zowel voor de ongemethyleerde als gemethyleerde primers getest worden. Verder worden normaal vier controles meegenomen, nl. gemethyleerde controle, ongemethyleerde controle, blanco van de bisulfietbehandeling en blanco voor de PCR-reactie.



Figuur 42 Resultaat van qPCR op deel 1 van uitgebreid aantal patiëntstalen voor MLH1-analyse.

A. Overzicht van de amplificatiecurves van de stalen en controlestalen zowel voor gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven.

B. Amplificatiecurves van de blanco, gemethyleerde en ongemethyleerde controle. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurve van de blanco is in het lichtroze weergegeven voor de ongemethyleerde primers. Voor de blanco met gemethyleerde primers is de amplificatiecurve in het donkerroze weergegeven. De amplificatiecurve van positieve controle is in het lichtoranje weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkeroranje voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve voor de negatieve controle is in het lichtblauw weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerblauw voor de gemethyleerde primers.

C. Amplificatiecurves van een ongemethyleerd staal, MBT08-140. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij is de amplificatiecurve van het staal met de mastermix met ongemethyleerde primers weergegeven in het lichtgroen. Het staal met de mastermix met gemethyleerde primers is weergegeven met een donkergroene grafiek.

D. Amplificatiecurves van een gemethyleerd staal, MBT08-150. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij is opnieuw de curve van het staal met de mastermix met ongemethyleerde primers weergegeven in het lichtgroen. Het staal met de mastermix met gemethyleerde primers is weergegeven in het donkergroen.

Op figuur 42A wordt een overzicht gegeven van de amplificatiecurves van de geanalyseerde stalen. Figuur 42B geeft de amplificatiecurves weer van de blanco, gemethyleerde controle en ongemethyleerde controle weer. De gemethyleerde controle (lichtoranje) en blanco (lichtroze) geven een lage amplificatie bij de ongemethyleerde primers. Dit is te wijten aan vorming van primerdimeren. De ongemethyleerde controle (donkerblauw) en de blanco (donkerroze) blijven mooi negatief bij de gemethyleerde primers. De qPCR is gelukt. De meeste stalen zijn goed te analyseren aan de hand van de amplificatiecurve. Zo is op figuur 42C het staal MBT08-140 zichtbaar. Dit staal is duidelijk ongemethyleerd aangezien de amplificatie van het staal met de mastermix met gemethyleerde primers vrij laat wordt gedetecteerd, rond cyclus 35. Dit is ook af te leiden uit de Ct-waarde (tabel 26). Hierbij is de Ct-waarde van het staal met de gemethyleerde primers nl 35,94. Op figuur 42D is daarentegen het staal MBT08-150 waar te nemen. Dit staal is duidelijk gemethyleerd aangezien zowel ongemethyleerde als gemethyleerde primers hebben kunnen binden. Dit wijst erop dat het staal zowel ongemethyleerd als gemethyleerd DNA bevat. Aangezien het staal gemethyleerd DNA bevat wordt dit staal als gemethyleerd beschouwd.

Tabel 26 Ct-waarden van uitgebreide reeks patiëntenstalen voor de MLH1-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de stalen met de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de Δ Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde M van de Ct-waarde U af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat van de stalen van de qPCR weergegeven. Als laatste wordt ook het resultaat van de *nested* PCR met de nieuwe bisulfietbehandeling weergegeven. De discrepanties die voorkomen tussen de oude analyse (*nested* PCR) en de nieuwe analyse (qPCR) worden in de tabel grijs gearceerd.

Staal	MBT08-140	MBT08-150	MBT08-197	MBT08-235	MBT08-328	MBT08-343	MBT08-510	MBT08-565	MBT08-571
Ct-waarde U	26,23	28,14	25,91	28,68	27,38	28,42	27,02	32,21	33,15
Ct-waarde M	35,94	27,72	26,74	28,87	28,02	28,76	27,29	32,49	33,86
Δ Ct-waarde	-9,71	0,42	-0,83	-0,19	-0,64	-0,34	-0,27	-0,28	-0,71
Resultaat qPCR	U	M	M	M	M	M	M	M	M
Oorspronkelijk resultaat	U	M	M	M	M	M	M	M	U
Staal	MBT08-600	MBT08-750	MBT08-771	MBT09-09	MBT09-10	MBT09-30	MBT09-62	MBT09-149	MBT09-166
Ct-waarde U	31,10	27,25	26,67	28,59	27,40	28,38	29,39	28,14	26,04
Ct-waarde M	31,97	44,69	39,61	45	28,71	28,11	29,36	29,94	38,29
Δ Ct-waarde	-0,87	-17,44	-12,94	-16,41	-1,31	0,27	0,03	-1,8	-12,25
Resultaat qPCR	M	U	U	U	M	M	M	M	U
Oorspronkelijk resultaat	M	U	U	U	M	M	M	M	U
Staal	MBT09-169	MBT09-199	MBT09-298	MBT09-327	MBT09-369	MBT09-384			
Ct-waarde U	26,77	25,69	24,28	29,55	26,98	27,34			
Ct-waarde M	26,25	40,44	39,13	30,65	27,54	28,43			
Δ Ct-waarde	0,52	-14,75	-14,85	-1,1	-0,56	-1,09			
Resultaat qPCR	M	U	U	M	M	M			
Oorspronkelijk resultaat	M	U	U	M	M	M			

Aan de hand van de Ct-waarden kunnen de resultaten van de amplificatiecurve bevestigd worden. Zo geeft de Ct-waarde de cyclus weer waarbij het product voldoende geamplificeerd is en een detecteerbaar fluorescent signaal verkregen wordt.

Zo is de Ct-waarde van het staal MBT08-140 met ongemethyleerde primers veel lager dan de Ct-waarde van het staal met gemethyleerde primers. Dit wijst erop dat de ongemethyleerde primers veel beter hebben kunnen binden waardoor het staal meer ongemethyleerd DNA bevat. Hieruit kan worden besloten dat dit staal ongemethyleerd is.

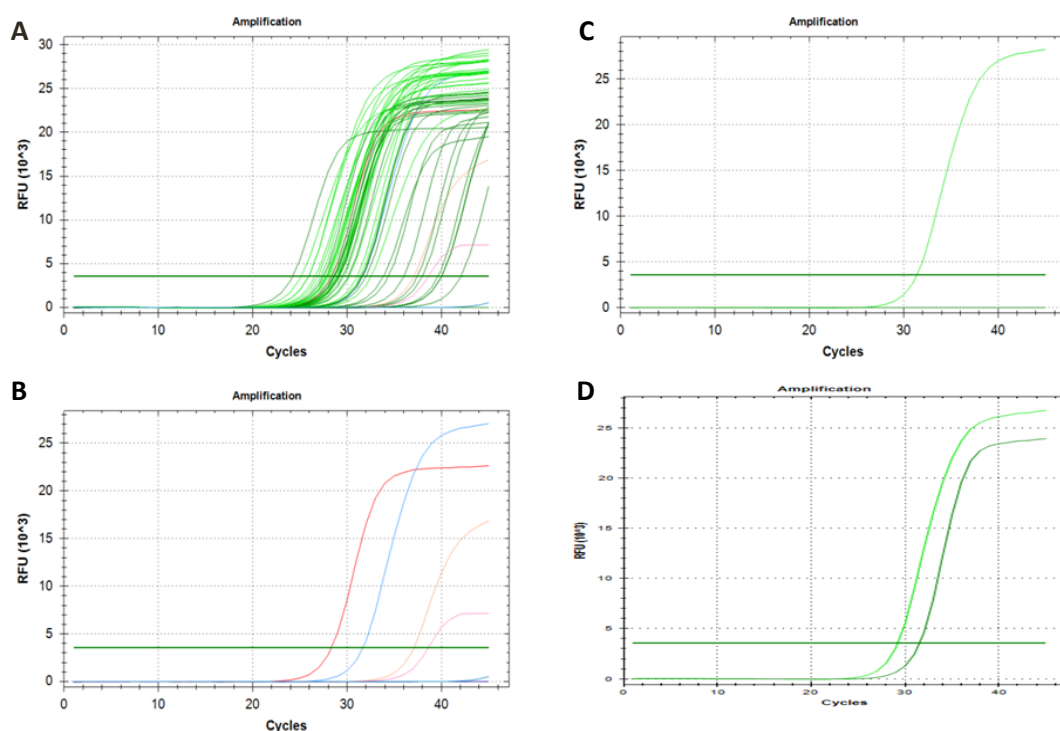
Als naar de Ct-waarden van het staal, MBT08-150, wordt gekeken, kan ook hieruit worden afgeleid dat het staal gemethyleerd is. Zo liggen de Ct-waarden van zowel het staal met de gemethyleerde primers als het staal met de ongemethyleerde primers rond dezelfde waarde.

Ook bij deze reeks stalen wordt op basis van de resultaten van de oude analyse, *nested* PCR nagegaan wanneer een staal na analyse met qPCR al dan niet gemethyleerd is. Als deze resultaten vergeleken worden met de Δ Ct-waarde van de qPCR kunnen de resultaten van de beperkte reeks

bevestigd worden. Zo wordt bij deze analyse een staal met Ct-waarde boven -1,8 gemethyleerd en onder -9,71 ongemethyleerd.

Bij deze bevindingen kan uit tabel 26 één discrepantie worden vastgesteld tussen de *nested* PCR en de qPCR, met name het staal MBT08-571. De Δ Ct-waarde van dit staal is -0,71. Naast dit staal zijn nog vier andere stalen (MBT08-197, MBT08-600, MBT09-149 en MBT09-127) die een lagere Ct-waarde hebben dan -0,71 waarbij het resultaat gemethyleerd is bij de MSP. Deze discrepantie kan te wijten zijn aan de techniek. Zo wordt bij *nested* PCR de amplificatie op het einde waargenomen. Hierbij wordt enkel waargenomen of het staal gemethyleerd of ongemethyleerd is. Terwijl bij qPCR de amplificatie kan worden opgevolgd.

Ook de tweede reeks van de uitgebreide reeks patiëntenstalen geeft goede resultaten weer voor de qPCR.



Figuur 43 Resultaat van qPCR op deel 2 van uitgebreid aantal patiëntenstalen voor MLH1-analyse.

A. Overzicht van amplificatiecurves van de patiëntenstalen en controlestalen voor zowel gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven (zelfde kleurcode als B, C en D).

B. Amplificatiecurves van de blanco, gemethyleerde en ongemethyleerde controle gemethyleerde en ongemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurve van de blanco is in het lichtroze weergegeven voor de ongemethyleerde primers. Voor de blanco met gemethyleerde primers is de amplificatiecurve in het donkerroze weergegeven. De amplificatiecurve van gemethyleerde controle is in het lichtoranje weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkeroranje voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve voor de ongemethyleerde controle is in het lichtblauw weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerblauw voor de gemethyleerde primers.

C. Amplificatiecurves van een ongemethyleerd staal met gemethyleerde en ongemethyleerde primers, MBT09-622. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij is de amplificatiecurve van het staal met de mastermix met ongemethyleerde primers weergegeven in het lichtgroen. Het staal met de mastermix met gemethyleerde primers is weergegeven met een donkergroene grafiek.

D. Amplificatiecurves van een gemethyleerd staal, MBT09-507, gemethyleerde en ongemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij is opnieuw de curve van het staal met de mastermix met ongemethyleerde primers weergegeven in het lichtgroen. Het staal met de mastermix met gemethyleerde primers is weergegeven in het donkergroen.

Op figuur 43A wordt een overzicht gegeven van de amplificatiecurve van de geanalyseerde stalen. Figuur 43B geeft de amplificatiecurves weer van de blanco, gemethyleerde controle en ongemethyleerde controle weer. De gemethyleerde controle (lichtoranje) en blanco (lichtroze) geven een lage amplificatie bij de ongemethyleerde primers. Dit is te wijten aan vorming van primerdimeren. De ongemethyleerde controle (donkerblauw) en de blanco (donkerroze) blijven mooi negatief bij de gemethyleerde primers. De qPCR is gelukt.

De meeste stalen zijn goed te analyseren aan de hand van de amplificatiecurve. Zo is op figuur 43C het staal MBT09-622 zichtbaar. Dit staal is duidelijk ongemethyleerd aangezien geen amplificatie van het staal met de mastermix met gemethyleerde primers wordt gedetecteerd. Dit wil zeggen dat de primers niet hebben kunnen binden op het DNA en dat bijgevolg geen gemethyleerd DNA aanwezig is. Op figuur 43D is daarentegen het staal MBT09-507 waar te nemen. Dit staal is duidelijk gemethyleerd aangezien zowel ongemethyleerde als gemethyleerde primers hebben kunnen binden. Dit wijst erop dat het staal zowel ongemethyleerd als gemethyleerd DNA bevat. Aangezien het staal gemethyleerd DNA bevat wordt dit staal als gemethyleerd beschouwd.

Tabel 27 Ct-waarden van deel 2 van de uitgebreide reeks patiëntenstalen voor de MLH1-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de stalen met de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de Δ Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde M van de Ct-waarde U af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat van de stalen van de qPCR weergegeven. Als laatste wordt ook het resultaat van de *nested* PCR met de nieuwe bisulfitbehandeling weergegeven. Discrepancies tussen de oude MSP (*nested* PCR) en nieuwe MSP (qPCR) worden in het grijs gearceerd.

Staal	MBT09-507	MBT09-608	MBT09-622	MBT09-633	MBT09-688	MBT09-755	MBT09-764	MBT09-804	MBT10-123
Ct-waarde U	29,21	27,56	31,37	25,93	27,77	32,51	28,72	27,87	28,53
Ct-waarde M	31,53	28,34	45	37,42	37,98	40,02	28,62	29,16	42,07
ΔCt-waarde	-2,32	-0,78	-13,63	-11,49	-10,21	-7,51	0,1	-1,29	-13,54
Resultaat qPCR	M	M	U	U	U	U	M	M	U
Oorspronkelijk resultaat	M	M	U	U	U	U	M	M	U
Staal	MBT10-311	MBT10-315	MBT10-642	MBT10-808	MBT10-1024	MBT11-134	MBT11-306	MBT11-481	MBT12-53
Ct-waarde U	26,58	31,08	25,90	27,19	26,89	28,72	29,01	27,96	28,97
Ct-waarde M	34,35	31,60	39,61	27,42	40,05	29,48	32,03	29,08	33,84
ΔCt-waarde	-7,77	-0,52	-13,71	-0,23	-13,16	-0,76	-3,02	-1,12	-4,87
Resultaat qPCR	U	M	U	M	U	M	M of U	M	U
Oorspronkelijk resultaat	U	M	U	M	U	M	M	M	U
Staal	MBT12-352	MBT12-432	MBT12-1140	MBT12-1249	MBT12-1313				
Ct-waarde U	27,78	29,64	28,12	25,12	30,22				
Ct-waarde M	28,55	30,11	36,02	24,21	28,96				
ΔCt-waarde	-0,77	-0,47	-7,9	0,91	1,26				
Resultaat qPCR	M	M	U	M	M				
Oorspronkelijk resultaat	M	M	M	M	M				

Ook hier kunnen aan de hand van de Ct-waarden de resultaten van de amplificatiecurve bevestigd worden (tabel 27).

Zo liggen de Ct-waarde van het staal MBT09-622 ver uit elkaar. Aangezien geen amplificatie wordt waargenomen bij het staal met de gemethyleerde primers wordt hier het maximale aantal cycli genomen voor deze analyse, nl. 45. Dit staal is bijgevolg ongemethyleerd.

Als naar de Ct-waarden van het staal, MBT09-507 wordt gekeken, kan worden opgemerkt dat de Ct-waarden van zowel het staal met de ongemethyleerde primers als het staal met de gemethyleerde primers vrij dicht bij elkaar liggen. Dit betekent dat het staal zowel ongemethyleerd als gemethyleerd DNA bevat. Vermits dit staal gemethyleerd DNA bevat, wordt dit beschouwd als een gemethyleerd staal.

Op basis van bovenstaande Ct-waarden en de resultaten van de oude analyse, *nested* PCR, kan bepaald worden wanneer een staal na analyse met qPCR al dan niet gemethyleerd is. Als deze resultaten vergeleken worden met de Δ Ct-waarde van de qPCR blijkt dat een staal met Ct-waarde boven -2,32 gemethyleerd is en onder -4,87 ongemethyleerd. Hierbij is de verspreiding van de waarde voor het stellen van de cut-off zeer klein geworden.

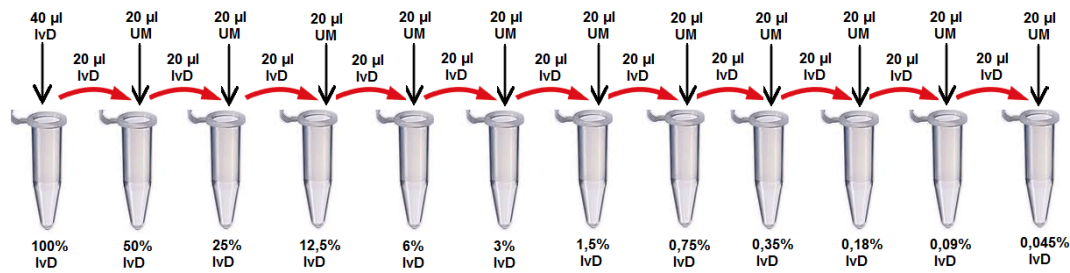
Enkel het staal MBT11-306 heeft een Δ Ct-waarde van -3,02. Bij de oude methode werd dit staal als gemethyleerd beschouwd. Bij deze analyse valt dit staal in een twijfelgebied waarbij niet met zekerheid kan gesteld worden of dit staal gemethyleerd of ongemethyleerd is. Bij dit staal wordt duidelijk dat het stellen van een cut-off belangrijk en noodzakelijk is.

Het staal MBT12-1140 werd beschouwd als gemethyleerd in de vorige analyse. Echter bij deze resultaten blijkt het staal ongemethyleerd te zijn. Dit kan verklaard worden door de verschillende methodes. Zo kan bij de qPCR de amplificatie tijdens de PCR gevolgd worden. Terwijl bij de MSP enkel op het einde kan worden waargenomen of amplificatie heeft plaatsgevonden.

Aan de hand van bovenstaande resultaten kan worden besloten dat door middel van qPCR de methylatiestatus van de promotor van het MLH1-gen kan worden bepaald. Uit bovenstaande resultaten van de qPCR, zowel van de beperkte reeks patiëntenstalen als de uitgebreide reeks patiëntenstalen, kan worden besloten dat een staal met een Δ Ct-waarde groter dan -2,32 als gemethyleerd beschouwd mag worden. Een staal met een Δ Ct-waarde lager dan -4,87 kan beschouwd worden als ongemethyleerd. Voor een definitieve cut-off te stellen, wordt de qPCR uitgevoerd op een verdunningsreeks.

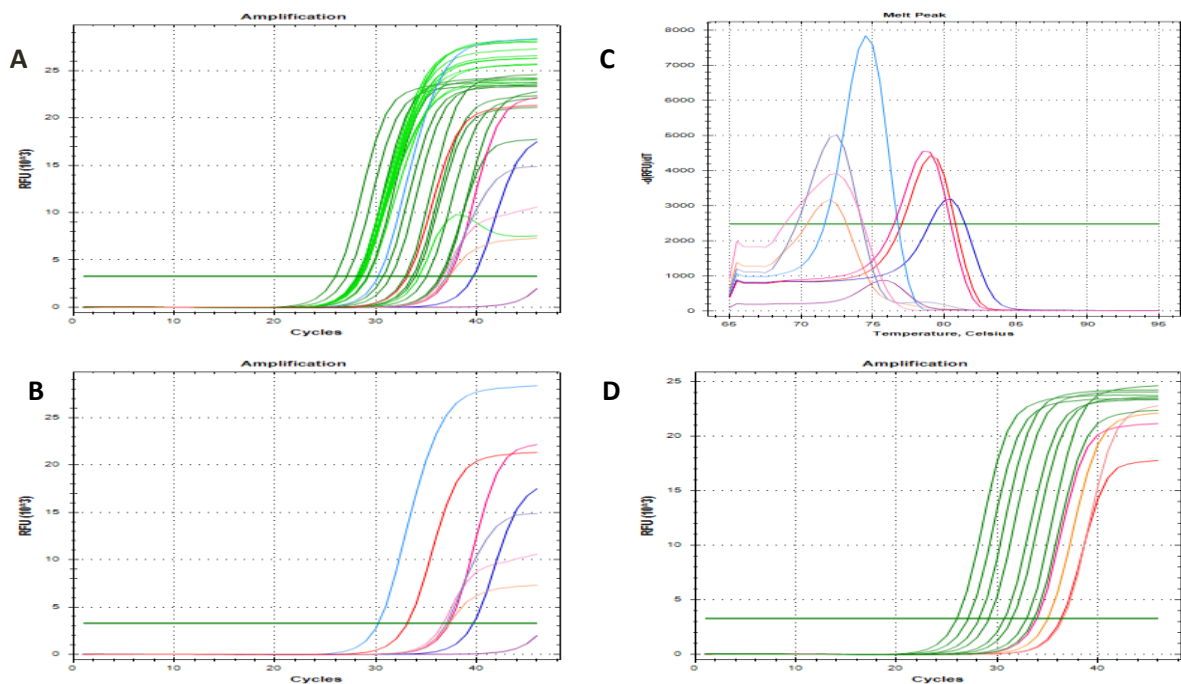
4.1.2.3. CUT-OFF BEPALING

De cut-off of drempelwaarde werd naast de resultaten van de patiëntenstalen bepaald door middel van een verdunningsreeks. Voor de verdunningsreeks werden de controlestalen IvD en UM gebruikt. IvD is een gemethyleerde controle afkomstig van een cellijn. Het DNA van deze cellijn is door middel van een enzym omgezet naar gemethyleerd DNA (zie 3. Materiaal en methoden; 3.1 Materiaal; 3.1.2 Controlestalen: IvD). UM is een ongemethyleerde controle die commercieel werd aangekocht (Qiagen PCR *control* DNA Cat.no. 59695). Van deze stalen werd eerst de concentratie bepaald met behulp van de Quantus (zie 3. Materiaal en methoden; 3.1 Materiaal; 3.2.1 Aantonen van promotor hypermethylering op MLH1- en MGMT-gen; 3.2.1.3 DNA-concentratiebepaling met behulp van Quantus). IvD had een concentratie van 174 ng/ μ l en UM had een concentratie van 50 ng/ μ l. Deze concentraties werden aan elkaar gelijkgesteld, zo werd IvD 3,5x verdund. Hierna werd een seriële verdunningsreeks bereid zoals op figuur 44 is voorgesteld.



Figuur 44 Schematische voorstelling van seriële verdunningsreeks

Deze verdunningsreeks onderging een bisulfietbehandeling om het onderscheid tussen gemethyleerd en ongemethyleerd DNA te maken. Na de bisulfietbehandeling werd op de verdunningsreeks de geoptimaliseerde qPCR uitgevoerd. Het resultaat is een amplificatiecurve (zie figuur 45). De bijhorende Ct-waarden worden in tabel 28 weergegeven.



Figuur 45 Het resultaat van de qPCR van de verdunningsreeks voor de MLH1-analyse.

A. Overzicht van de amplificatiecurves van de stalen van de verdunningsreeks en controlestalen met gemethyleerde en ongemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurve van de blanco van de bisulfietbehandeling is in het lichtpaars weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve van de blanco is in het lichtroze weergegeven voor de ongemethyleerde primers. Voor de blanco met gemethyleerde primers is de amplificatiecurve in het donkerroze weergegeven. De amplificatiecurve van gemethyleerde controle is in het lichtoranje weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkeroranje voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve voor de ongemethyleerde controle is in het lichtblauw weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerblauw voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve in het lichtgroen weergegeven is deze van de verdunningen bij ongemethyleerde primers. In het donkergroen wordt de amplificatiecurve weergegeven van de verdunningen met gemethyleerde primers.

B. Amplificatiecurves van de blanco van de bisulfietbehandeling, blanco van de PCR-reactie, gemethyleerde en ongemethyleerde controle. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De kleurcode is hetzelfde als bij A voor de controlestalen.

C. Smeltcurve van de blanco van de bisulfietbehandeling (paars), blanco van PCR-reactie (roze), gemethyleerde controle (oranje) en ongemethyleerde controle (blauw). Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven.

D. Verdunningsreeks weer met de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve in het rood weergegeven is van de verdunning 0,35%, de amplificatiecurve in het oranje weergegeven is deze van verdunning 0,18%, de lichtroze amplificatiecurve is deze van 0,09% en de amplificatiecurve in het donkerroze weergegeven is deze van 0,045%. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven.

Op figuur 45A wordt een overzicht gegeven van de amplificatiecurves van de verdunningsreeks en controlestalen.

Figuur 45B geeft amplificatiecurves weer van de controlestalen, nl. de blanco van de bisulfietbehandeling, blanco van de PCR-reactie, gemethyleerde controle en ongemethyleerde controle. De ongemethyleerde controle (lichtblauw) geeft een mooie amplificatiecurve weer bij de mastermix met de ongemethyleerde primers. De blanco van de bisulfietbehandeling (lichtpaars), blanco van de PCR-reactie (lichtroze) en gemethyleerde controle (lichtoranje) vertonen een lichte amplificatie bij de mastermix met ongemethyleerde primers. Verder is bij de gemethyleerde controle (donkeroranje) met gemethyleerde primers een mooie amplificatiecurve waar te nemen. Echter bij de blanco van de PCR-reactie (donkerroze) en de ongemethyleerde controle (donkerblauw) is amplificatie waar te nemen bij de gemethyleerde primers. De blanco van de bisulfietbehandeling (donkerpaars) is negatief.

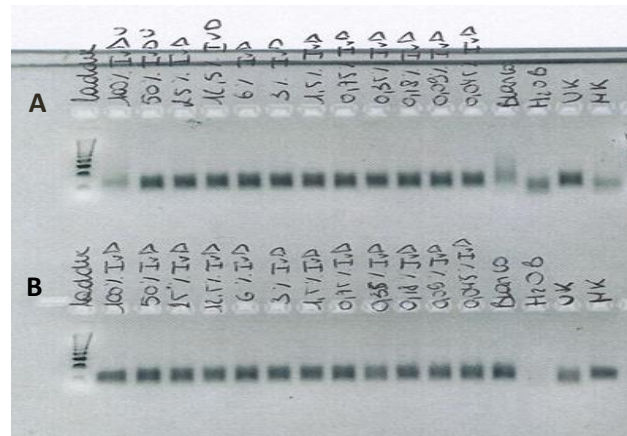
De lichte amplificatie van de blanco's en de gemethyleerde controle bij de ongemethyleerde primers is waarschijnlijk te wijten aan primerdimeren. Uit de smeltcurve (figuur 45C) kan dit bevestigd worden aangezien deze controles dezelfde smeltemperatuur hebben. De PCR-reactie is voor ongemethyleerde primers gelukt. De amplificatie van de ongemethyleerde controle en blanco van PCR-reactie bij gemethyleerde primers kunnen te wijten zijn aan contaminatie. Uit de smeltcurve (figuur 45C) blijkt dat deze controles een verschillende smeltemperatuur hebben. Dit wijst ook in de richting van contaminatie. Voor de gemethyleerde primers kan deze PCR-reactie niet met zekerheid geslaagd worden genoemd.

Verder is uit de amplificatiecurves van de verdunningsreeks (figuur 45D) met de gemethyleerde primers af te leiden dat vanaf verdunning 3% IvD de resultaten onbetrouwbaar worden. De amplificatiecurves voor 3% IvD volgen mooi met ongeveer één cyclus verschil op elkaar. Dit is ook af te leiden uit de Ct-waarden (tabel 28). Hierbij wordt naar de Ct-waarde M gekeken aangezien de verdunningsreeks werd gemaakt van IvD, de gemethyleerde controle. Uit deze waarden is af te leiden dat de amplificatiecurves van verdunningen ongeveer met één cyclus verschil op elkaar volgen. Echter bij verdunning 0,35% IvD is een verschil van 3 cyclussen op te merken met verdunning 0,75% IvD. Dit zou in de richting kunnen wijzen dat de detectielimiet van deze techniek bij 0,35% gemethyleerd DNA ligt.

Tabel 28 Ct-waarden van verdunningsreeks van MLH1-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix van de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de Δ Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Als laatste wordt ook het resultaat van de *nested* PCR met de oude bisulfietbehandeling weergegeven. De discrepanties die tussen de twee methodes (*nested* PCR en qPCR) voorkomen worden in het grijs gearceerd.

Verdunning	100% IvD	50% IvD	25% IvD	12,5% IvD	6% IvD	3% IvD	1,5% IvD	0,75% IvD	0,35% IvD	0,18% IvD	0,09% IvD	0,045% IvD
Ct-waarde U	34,27	29,23	28,59	28,44	28,47	28,54	28,12	28,40	28,33	28,33	28,11	28,41
Ct-waarde M	26,01	27,10	28,18	29,15	30,71	31,45	32,93	33,62	36,34	35,04	36,50	33,93
Δ Ct-waarde	8,26	2,10	0,41	-0,71	-2,24	-2,91	-4,81	-5,22	-8,01	-6,71	-8,39	-5,52

Deze resultaten kunnen echter niet als betrouwbaar worden beschouwd aangezien de ongemethyleerde controle en blanco van de bisulfietbehandeling waarschijnlijk gecontamineerd zijn. Om te kijken welke PCR-producten gevormd werden, werd een gelelektroforese uitgevoerd op de stalen van de qPCR van verdunningsreeks 1.



Figuur 46 Resultaat na gelelektroforese van verdunningsreeks voor MLH1-analyse. In de eerste baan werd telkens een 100 basenparenladder toegevoegd. Hiermee kan de lengte van het PCR-product worden afgeleid. Bovenaan de gel worden de stalen weergegeven. Figuur A geeft het resultaat weer van de stalen die behandeld zijn met een mastermix met ongemethyleerde primers. Figuur B geeft het resultaat weer van de stalen die behandeld zijn met een mastermix met gemethyleerde primers. Voor deze PCR-reacties werden vier controlestalen meegenomen. Een blanco van de bisulfietbehandeling, H₂O B. Een blanco voor de PCR-reactie, blanco. Verder werd ook nog een gemethyleerde (MK) en ongemethyleerde controle (UK).

Op de figuur 46 is bij de blanco bij zowel de mastermix met ongemethyleerde als gemethyleerde primers een band zichtbaar. Verder is ook bij de controle van de bisulfietbehandeling bij de mastermix met ongemethyleerde primers een band zichtbaar.

De grootte van banden van de stalen ligt rond 100 basenparen. Dit komt overeen met de verwachte waarden voor deze analyse nl. voor de ongemethyleerde primers 98 basenparen en voor de gemethyleerde primers 87 basenparen. De band van 100% IvD is lichter bij de ongemethyleerde primers dan bij de gemethyleerde primers.

De ongemethyleerde controle, UK, heeft een dikkere band bij de ongemethyleerde primers. Deze band ligt ook hoger dan bij de gemethyleerde primers. De gemethyleerde controle, MK, heeft een lichtere band bij de ongemethyleerde primer. Deze band ligt lager dan bij de gemethyleerde primer, maar op dezelfde hoogte als de band van de controle van de bisulfietbehandeling.

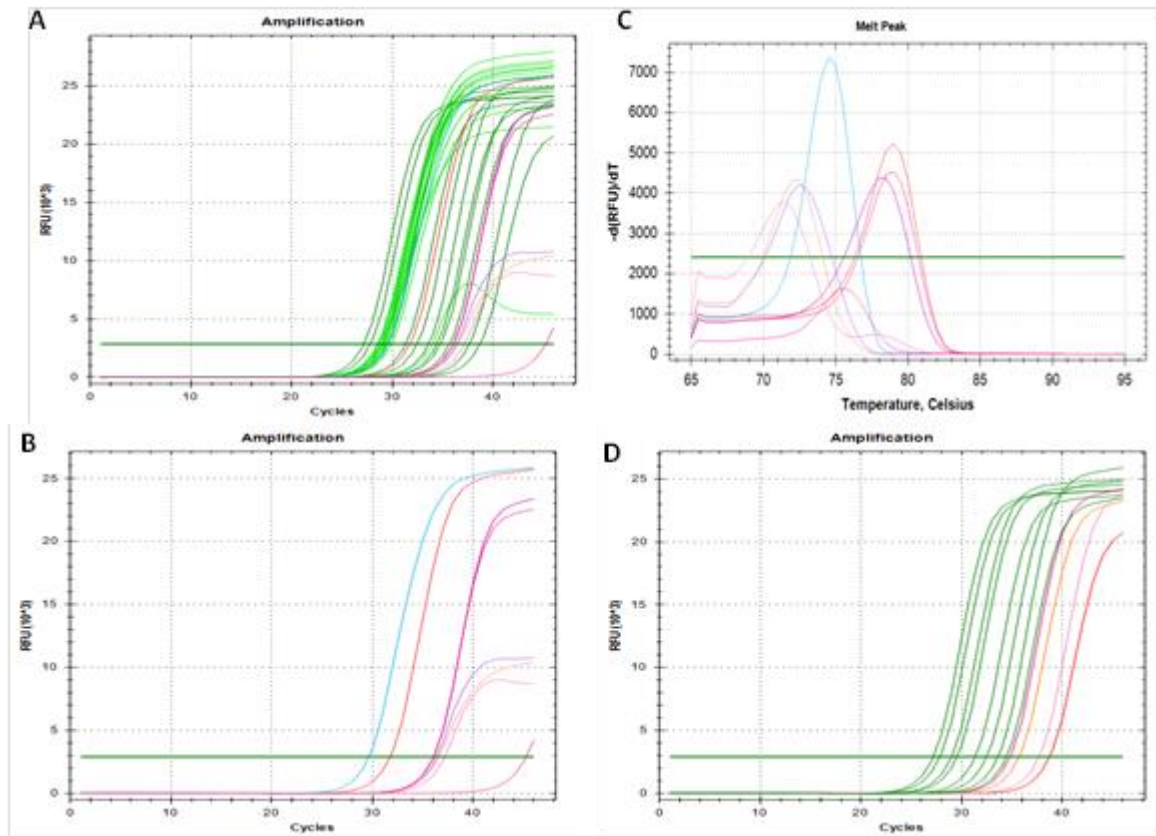
De band die zichtbaar is bij de blanco wijst op contaminatie aangezien deze enkel mastermix bevat. Deze contaminatie kan bij de bereiding van de mastermix gebeurd zijn, maar aangezien de controle van de bisulfietbehandeling, de gemethyleerde controle en ongemethyleerde controle geen band van dezelfde hoogte zichtbaar is, is dit onwaarschijnlijk. Verder kan de besmetting in het PCR-water voorkomen die aan de mastermix wordt toegevoegd. Een andere verklaring kan zijn dat de besmetting wordt veroorzaakt door de omgeving waar in gewerkt wordt. Dit is namelijk een UV-kast waar voor andere analyses met PCR-producten gewerkt wordt.

De band die aanwezig is bij de gemethyleerde controle en de controle van de bisulfietbehandeling wijst op primerdimeren. Aangezien deze lager liggen dan de banden van de verdunningsreeks.

De band van 100% IvD is lichter bij de ongemethyleerde primers dan bij de gemethyleerde primers. Normaal bevat de positieve controle geen ongemethyleerd product. Hierdoor zou ook geen product gevormd mogen worden bij het ongemethyleerde primerpaar. Bijgevolg mag geen band

aanwezig zijn bij de ongemethyleerde primers. Deze band kan wijzen op contaminatie. Verder kan deze band ook wijzen op het feit dat de positieve controle niet enkel gemethyleerd product bevat. De analyse wordt een tweede maal uitgevoerd, aangezien de resultaten onbetrouwbaar zijn doordat de blanco besmet is.

Op de verdunningsreeks werd een tweede maal de geoptimaliseerde qPCR uitgevoerd. Het resultaat is een amplificatiecurve (figuur 47) met bijhorende Ct-waarden in tabel 29 weergegeven.



Figuur 47 Het resultaat van de qPCR van de verdunningsreeks 2 voor de MLH1-analyse.

A. Overzicht van de amplificatiecurves van de stalen van de verdunningsreeks en controlestalen met gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurve van de blanco van de bisulfietbehandeling is in het lichtpaars weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve van de blanco is in het lichtroze weergegeven voor de ongemethyleerde primers. Voor de blanco met gemethyleerde primers is de amplificatiecurve in het donkerroze weergegeven. De amplificatiecurve van gemethyleerde controle is in het lichtoranje weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkeroranje voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve voor de ongemethyleerde controle is in het lichtblauw weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerblauw voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve in het lichtgroen weergegeven is deze van de verdunningen bij ongemethyleerde primers. In het donkergroen wordt de amplificatiecurve weergegeven van de verdunningen met gemethyleerde primers.

B. Amplificatiecurves van de blanco van de bisulfietbehandeling, blanco van de PCR-reactie, gemethyleerde controle en gemethyleerde controle. De amplificatiecurve van de blanco van de bisulfietbehandeling is in het licht paars weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve van de blanco is in het lichtroze weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerroze voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve van de gemethyleerde controle is in het lichtoranje weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkeroranje voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve voor de ongemethyleerde controle is in het lichtblauw weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerblauw voor de gemethyleerde primers.

C. Smeltcurve van controlestalen, nl de blanco van de bisulfietbehandeling (paars), blanco van de PCR-reactie (roze), gemethyleerde controle (oranje) en gemethyleerde controle (blauw).

D Amplificatiecurve van de verdunningsreeks weer met de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve in het rood weergegeven is van de verdunning 0,35%, de amplificatiecurve in het oranje weergegeven is deze van de verdunning 0,18%, de lichtroze amplificatiecurve is deze van 0,09% en de amplificatiecurve in het donkerroze weergegeven is deze van 0,045%.

Op figuur 47A wordt een overzicht gegeven van de amplificatiecurves van de herhaling van de qPCR van de verdunningsreeks op controlestalen.

Figuur 47B geeft de amplificatiecurves weer van de controlestalen, nl. de blanco van de bisulfietbehandeling, de blanco van de PCR-reactie, gemethyleerde controle en ongemethyleerde controle. Bij de blanco van de bisulfietbehandeling (lichtpaars), blanco van de PCR-reactie (lichtroze) en gemethyleerde controle (lichtoranje) kan een lichte amplificatie waargenomen worden. De ongemethyleerde controle (lichtblauw) vertoont amplificatie.

Bij de controlestalen met gemethyleerde primers is echter amplificatie waar te nemen bij de blanco van de bisulfietbehandeling (donkerpaars). Aangezien niet voldoende ongemethyleerde controle beschikbaar was, werd een tweede blanco (donkerroze) toegevoegd. Bij deze tweede blanco werd ook amplificatie waargenomen. De gemethyleerde controle (donkerblauw) vertoont een mooie amplificatiecurve bij de gemethyleerde primers. De eerste blanco (donkerroze) daarentegen vertoonde geen amplificatie.

De lichte amplificatie van de gemethyleerde controle en de blanco's bij de ongemethyleerde primers is te wijten aan primerdimeren. Dit blijkt ook uit de smeltcurve (figuur 47C) aangezien de smelttemperatuur van deze controles lager ligt dan de ongemethyleerde controle bij de ongemethyleerde primers. Hieruit kan worden besloten dat de PCR-reactie voor de ongemethyleerde primers is gelukt.

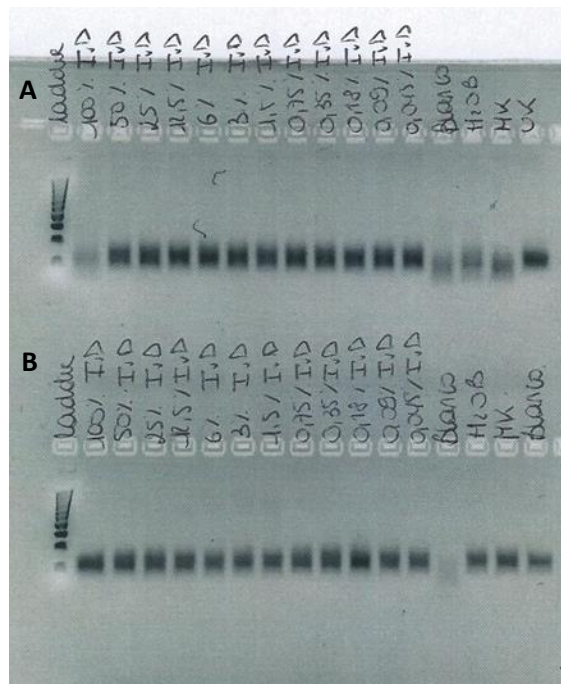
De amplificatie die waar te nemen is bij de blanco van de bisulfietbehandeling en de ongemethyleerde controle zijn waarschijnlijk te wijten aan contaminatie. Verder is contaminatie van de mastermix uitgesloten aangezien de blanco van de bisulfietbehandeling en de tweede blanco geen amplificatie vertonen. Op basis van deze blanco kan gesteld worden dat de PCR-reactie gelukt is. Echter op basis van de blanco van de bisulfietbehandeling en de tweede blanco kan gesteld worden dat de amplificatie te wijten is aan contaminaties. Hier kan opnieuw niet met zekerheid gezegd worden of de PCR-reactie geslaagd is.

Verder is uit de amplificatiecurves van de verdunningsreeks (figuur 47D) met gemethyleerde primers af te leiden dat vanaf verdunning 3% IvD de resultaten onbetrouwbaar worden. De amplificatiecurves voor verdunning 3% IvD volgen mooi met ongeveer één cyclus verschil op elkaar. Dit is ook af te leiden uit de Ct-waarden van de stalen met de gemethyleerde primers (Ct-waarde M) in tabel 29.

Tabel 29 Ct-waarden na de herhaling van qPCR op verdunningsreeks van MLH1-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix van de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de Δ Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Als laatste wordt ook het resultaat van de *nested* PCR met de oude bisulfietbehandeling weergegeven. De discrepanties die tussen de twee methodes (*nested* PCR en qPCR) voorkomen worden in het grijs gearceerd.

Verdunning	100% IvD	50% IvD	25% IvD	12,5% IvD	6% IvD	3% IvD	1,5% IvD	0,75% IvD	0,35% IvD	0,18% IvD	0,09% IvD	0,045% IvD
Ct-waarde U	33,97	29,90	29,26	28,94	29,05	29,23	29,21	29,49	28,56	29,02	28,49	28,71
Ct-waarde M	27,14	27,78	28,98	29,46	31,28	32,40	33,54	34,37	38,67	35,64	37,61	34,73
Δ Ct-waarde	6,83	2,12	0,28	-0,52	-2,23	-3,17	-4,33	-4,88	-10,11	-6,62	-9,12	-6,02

Om te controleren welke PCR-producten gevormd werden, werd een gelelektroforese uitgevoerd op de stalen van de qPCR.



Figuur 48 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten van de herhaling van qPCR op verdunningsreeks voor MLH1-analyse. In de eerste baan werd telkens een 100 basenparenladder toegevoegd. Hiermee kan de grootte van de PCR-producten geschat worden. Bovenaan de gel worden de stalen weergegeven. Figuur A geeft het resultaat weer van de stalen die behandeld zijn met een mastermix met ongemethyleerde primers. Figuur B geeft het resultaat weer van de stalen die behandeld zijn met een mastermix met gemethyleerde primers. Voor deze PCR-reacties werden vier controles meegenomen, nl een blanco voor de PCR-reactie (Blanco), een blanco van de bisulfietbehandeling (H₂O B), een gemethyleerde controle (MK) en een ongemethyleerde controle (UK).

Op figuur 48 is een band zichtbaar bij de blanco van de ongemethyleerde reactie. Deze band is lichter dan de banden van de stalen en ligt iets lager. Bij de controle van de bisulfietreactie is een band zichtbaar bij zowel de ongemethyleerde als de gemethyleerde primers. De band bij de ongemethyleerde primers ligt iets lager en is lichter van kleur dan de banden van de stalen bij de ongemethyleerde primers.

De banden van de stalen liggen op dezelfde hoogte, nl. rond 100 basenparen. Dit komt overeen met de verwachte waarden, nl. 98 en 87 basenparen respectievelijk voor het ongemethyleerde primerpaar en het gemethyleerde primerpaar. De band van 100% IvD is bij de ongemethyleerde primers iets lichter dan die bij de gemethyleerde primer.

De ongemethyleerde controle geeft bij de ongemethyleerde primers een band en de gemethyleerde controle bij het gemethyleerde primerpaar. Verder geeft de positieve controle ook een band weer bij de ongemethyleerde primers. Deze band ligt wel lager en is lichter van kleur. De ongemethyleerde controle werd niet toegevoegd bij de gemethyleerde primers aangezien hier te weinig product voor was. In plaats daarvan werd PCR-water toegevoegd. Dit staal kan dus gezien worden als een tweede blanco. Ook bij deze blanco is een band zichtbaar.

De band die zichtbaar is bij de blanco, controle van de bisulfietbehandeling en ongemethyleerde controle van de ongemethyleerde primer kan wijzen op contaminatie of primerdimeren. Aangezien de banden lichter zijn en lager liggen dan de banden van de stalen van de verdunningsreeks kan

hier van primerdimeren uitgegaan worden. Dit kan ook bevestigd worden door de smeltcurve (figuur 47C).

De band die zichtbaar is bij zowel de controle van de bisulfietbehandeling en de tweede blanco wijst op contaminatie. Deze contaminatie is waarschijnlijk te wijten aan de UV-kast waarin het staal bij de mastermix toegevoegd wordt. In deze UV-kast worden voor andere analyses de PCR-producten aan de mastermix toegevoegd. Terwijl voor deze analyse zuiver DNA-materiaal aan de mastermix wordt toegevoegd. Een contaminatie van de mastermix is onwaarschijnlijker aangezien bij de blanco van de gemethyleerde mastermix geen band zichtbaar is. Enkel een zeer lichte smeer die kan wijzen op primerdimeren.

Samengevat

Uit bovenstaande resultaten van de qPCR en gelelektroforese van verdunningsreeks 1 en 2 voor de MLH1-analyse kan worden besloten dat bij enkele controlestalen van de PCR-reactie contaminatie heeft plaatsgevonden. Hierdoor zijn de resultaten van de stalen niet betrouwbaar aangezien hier ook contaminatie heeft plaatsgevonden. Hierbij kan wel worden opgemerkt dat bij de twee handelingen andere stalen werden gecontamineerd. Als een vergelijking gemaakt wordt tussen de Ct-waarden van de stalen van de verdunningsreeks (tabel 30) blijkt dat deze goed met elkaar overeenkomen.

Tabel 30 Samenvattende tabel met Ct-waarden van zowel verdunningsreeks 1 als 2 voor de MLH1-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix van de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de Δ Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Als laatste wordt ook het resultaat van de *nested* PCR met de oude bisulfietbehandeling weergegeven. De discrepanties die tussen de twee methodes (*nested* PCR en qPCR) voorkomen worden in het grijs gearceerd.

Verdunning	100% IvD	50% IvD	25% IvD	12,5% IvD	6% IvD	3% IvD	1,5% IvD	0,75% IvD	0,35% IvD	0,18% IvD	0,09% IvD	0,045 % IvD
Δ Ct-waarde van verdunningsreeks 1	8,26	2,10	0,41	-0,71	-2,24	-2,91	-4,81	-5,22	-8,01	-6,71	-8,39	-5,52
Δ Ct-waarde van verdunningsreeks 2	6,83	2,12	0,28	-0,52	-2,23	-3,17	-4,33	-4,88	-10,11	-6,62	-9,12	-6,02

Cut-off bepaling

De cut-off bepaling gebeurt aan de hand van de resultaten van de verdunningsreeks, maar ook van de patiëntenstalen.

Zo worden de resultaten van de qPCR van de twee verdunningsreeksen met elkaar vergeleken. Hieruit kan worden afgeleid dat de detectie van de qPCR onbetrouwbaar wordt op DNA waarvan 3% of minder gemethyleerd is. Aangezien na deze verdunning de Ct-waardes ongeloofwaardig worden. De Δ Ct-waarde bij 3% IvD is respectievelijk voor analyse 1 en voor analyse 2, -2,91 en -3,17. Het gemiddelde van deze Δ Ct-waardes is -3,04. De qPCR van deze analyses was echter in beide gevallen gecontamineerd waardoor dit als een onbetrouwbaar resultaat moet worden gezien.

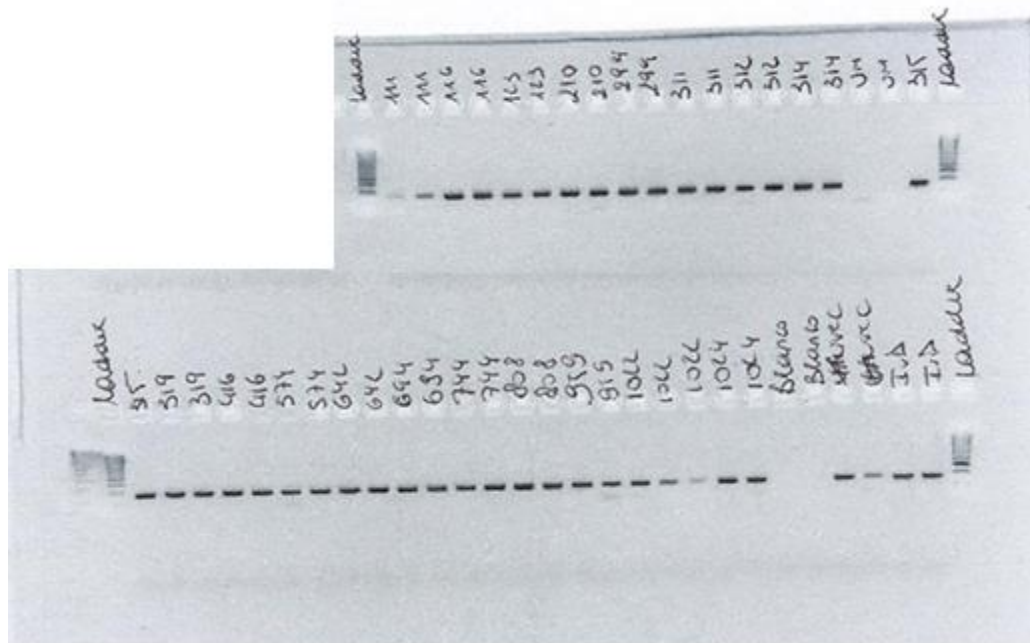
Verder worden de resultaten van de qPCR van de patiëntenstalen vergeleken met de resultaten van de oude analyse, *nested* PCR. Op basis van deze bevindingen kan worden opgemerkt dat een staal geanalyseerd met de qPCR als gemethyleerd kan worden beschouwd bij een Δ Ct-waarde van -2,4 of hoger. Verder wordt een staal bij deze analyse als ongemethyleerd beschouwd bij een Δ Ct-waarde van -4,87 of lager.

4.1.3. PYROSEQUENCING ALS METHODE OM PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN HET MLH1-GEN TE ANALYSEREN

Naast *methylation specific* PCR wordt getracht om de methylatiestatus van de promotor van het MLH1-gen te bepalen met behulp van *pyrosequencing*. Vooraf aan de *pyrosequencing* wordt een PCR uitgevoerd om het gewenste stuk DNA te amplificeren. Deze PCR-reactie dient geoptimaliseerd te worden. Met behulp van de PCR kan bepaald worden of al dan niet amplificatie heeft plaatsgevonden. Hiernaast kan afhankelijk van de intensiteit van de banden op het gel, het volume DNA voor de *pyrosequencing* aangepast worden. Als de PCR geoptimaliseerd is, wordt een programma aangemaakt voor de *pyrosequencing*. Verder wordt dit programma uitgetest op controlestalen. Wanneer zowel de PCR als de *pyrosequencing* geoptimaliseerd zijn, kan overgegaan worden op het testen van een beperkte reeks patiëntenstalen (bijlage 13). Als deze resultaten goed zijn, kan de *pyrosequencing* gevalideerd worden voor het bepalen van de methylatiestatus van het MLH1-gen. Dit gebeurt op een grotere reeks patiëntenstalen (bijlage 14). Verder dient ook voor deze analyse een cut-off gesteld te worden. Deze cut-off wordt gesteld op basis van de resultaten van patiëntenstalen en verdunningsreeks. De resultaten van de patiëntenstalen worden vergeleken met de resultaten van de reeds uitgevoerde *nested* PCR.

4.1.3.1. PYROPCR OP CONTROLESTALEN EN BEPERKT AANTAL STALEN

Voor de pyroPCR van de MLH1-analyse werd een algemene kit van Qiagen gebruikt, nl. PyroMark PCR kit (Cat.no.978703). Van deze kit werd de PyroMark PCR Master Mix en *concentrate corralload* gebruikt. Verder werden aangekochte primers en PCR-water toegevoegd. De PyroMark PCR Master Mix bevat een HotStarTaq DNA-polymerase, dNTP's en bufferoplossing. Als programma werd het standaardprogramma van de pyroPCR toegepast.



Figuur 49 Het resultaat na gelelektroforese op de PCR-producten na pyroPCR (MLH1-analyse). Hierbij is in de eerste en laatste baan een 100 basenparenladder geladen. Verder staan bovenaan de gel de stalen zonder MBT14 weergegeven. Hierbij wordt MBT14, de code van de afdeling en het jaartal van isolatie '14 weggelaten om de figuur overzichtelijk te houden. Naast de stalen werd een blanco

voor de PCR-reactie meegenomen. Daarnaast werden ook gemethyleerde (IvD) en ongemethyleerde (HUVEC en UM) controles meegenomen.

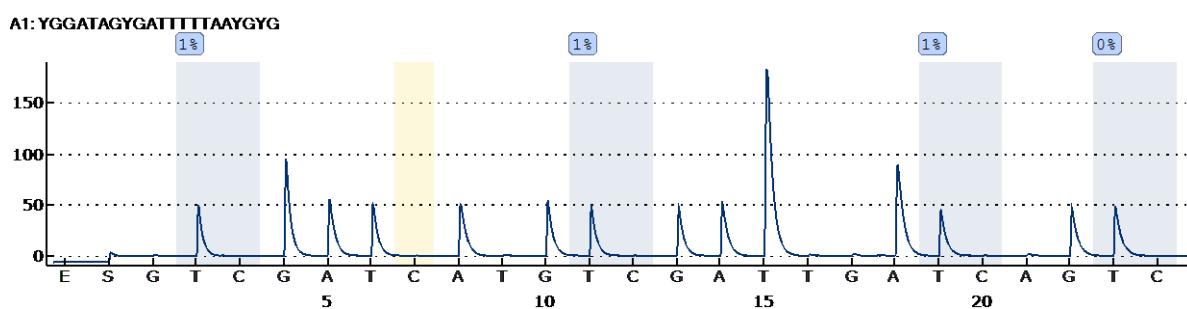
Op figuur 49 is het resultaat na gelelektroforese zichtbaar. Bij de blanco zijn geen banden zichtbaar. Dit wijst op het feit dat geen contaminatie heeft plaatsgevonden. Bij de gemethyleerde controle (IvD) en ongemethyleerde controle (HUVEC) is een band zichtbaar. Ook bij de stalen zijn overall banden terug te vinden. Enkel bij MBT10-111.1 en MBT 10-1022.1 zijn banden met een lichtere intensiteit waar te nemen. Bij UM is geen band zichtbaar, toch wordt deze controle meegenomen als negatieve controle voor de *pyrosequencing*.

Verder zijn de stalen bruikbaar voor de *pyrosequencing*. De intensiteit van de meeste banden is goed. Dit wil zeggen dat voldoende PCR-product gevormd is. Bij staal MBT10-111.1 en MBT10-1022.2 zou het beginvolume voor de *pyrosequencing* verhoogd mogen worden naar 15 µl. Voor de pyroPCR van de MLH1-analyse kan het standaard PCR-programma worden gebruikt.

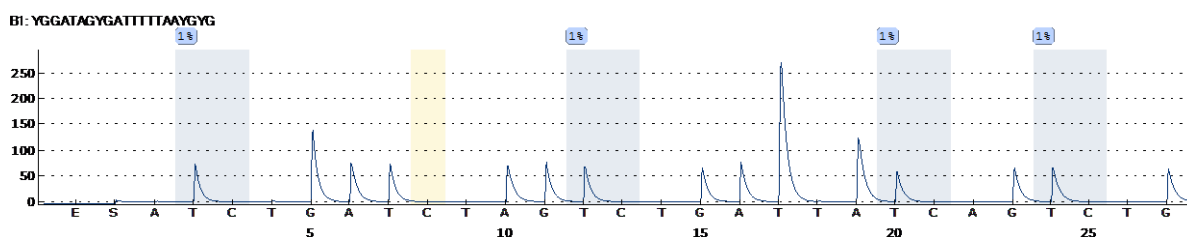
4.1.3.2. OPTIMALISATIE PYROSEQUENCING OP CONTROLESTALEN

Voor de *pyrosequencing* werden twee programma's uitgetest. Zo werd het programma uit het artikel, Newton et al. waarin deze primers reeds werden gebruikt, uitgetest [74]. Dit programma werd MLH1 CpG MANC genoemd. Daarnaast werd zelf een programma voor de *pyrosequencing* aangemaakt. Dit werd MLH1 CpG MUMC genoemd. Deze programma's werden uitgetest op de PCR-producten van de controlestalen: IVD, HUVEC en UM. Voor deze analyses werden de controlestalen in duplo meegenomen. Dit om discrepanties uit te sluiten.

Het resultaat van de *pyrosequencing* is een piekendiagram. Dit diagram wordt ook wel pyrogram genoemd. De pyrogrammen van de duplo's worden met elkaar vergeleken, nl. de twee pyrogrammen van de ongemethyleerde controle met het programma MLH1 CpG MUMC met de twee pyrogrammen van de ongemethyleerde controle met het programma MLH1 CpG MANC (figuur 50 en 51). Dit wordt ook voor de gemethyleerde controle (figuur 52 en 53) en UM (figuur 54) gedaan.

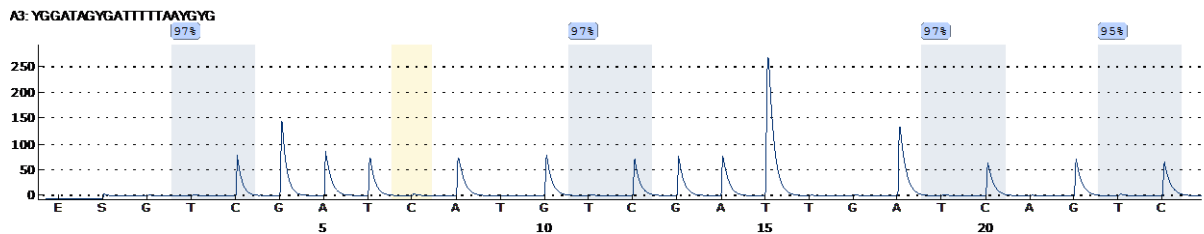


Figuur 50 Het pyrogram van de negatieve controle met programma MLH1 CpG MUMC

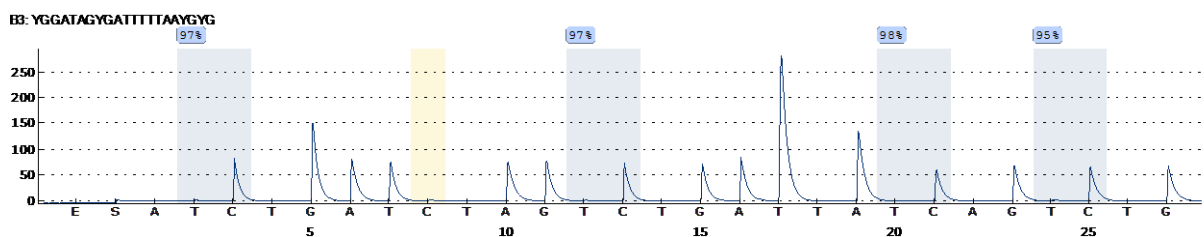


Figuur 51 Het pyrogram van de negatieve controle met het programma MLH1 CpG MANC

In figuur 50 wordt het pyrogram van de ongemethyleerde controle met het zelfgemaakte pyroprogramma weergegeven. In figuur 51 wordt het pyrogram van de ongemethyleerde controle met het programma uit Newton et al. [74] weergegeven. Met beide programma's is een goed resultaat waarneembaar.

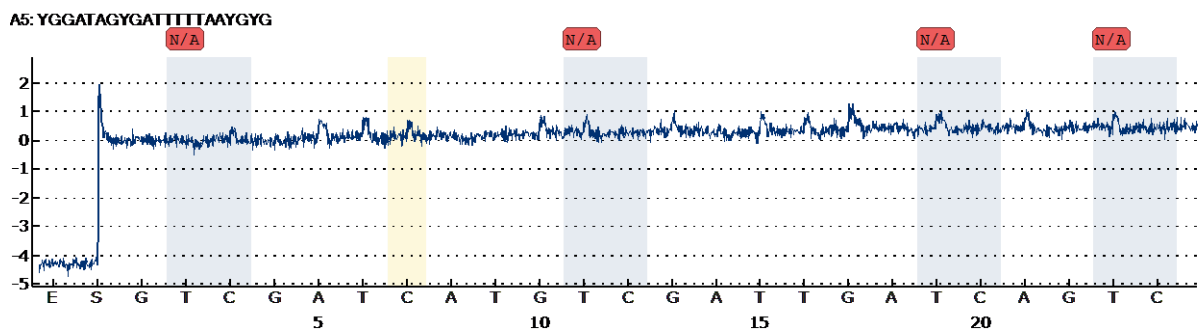


Figuur 52 Het pyrogram van de positieve controle met het programma MLH1 CpG MUMC.



Figuur 53 Het pyrogram van de positieve controle met het programma MLH1 CpG MANC.

In figuur 52 wordt het pyrogram van de gemethyleerde controle met het zelfgemaakte pyroprogramma weergegeven. In figuur 53 wordt het pyrogram van de gemethyleerde controle met het programma uit Newton et al. weergegeven. Met beide programma's is een goed resultaat zichtbaar.



Figuur 54 Het pyrogram van het UM staal. Op dit pyrogram is enkel ruis waar te nemen.

Op het pyrogram (figuur 54) van UM is enkel ruis waar te nemen. Dit voor beide programma's.

De ruis bij UM is te wijten aan het feit dat geen PCR-product was waar te nemen op de pyroPCR. Dit komt doordat deze controle geen bisulfitbehandeling heeft ondergaan. Waardoor de primers niet hebben kunnen binden.

Aangezien voor beide programma's een goed resultaat is waar te nemen voor zowel de gemethyleerde als ongemethyleerde controle, wordt geopteerd om met het zelfgemaakte programma verder te gaan. Hierbij zijn minder nucleotiden, enzymmix en substraatmix nodig. Nu de pyroPCR en het programma van de *pyrosequencing* geoptimaliseerd zijn, kan verder gegaan worden op het testen van een beperkt aantal stalen.

4.1.3.3. VALIDATIE VAN PYROSEQUENCING

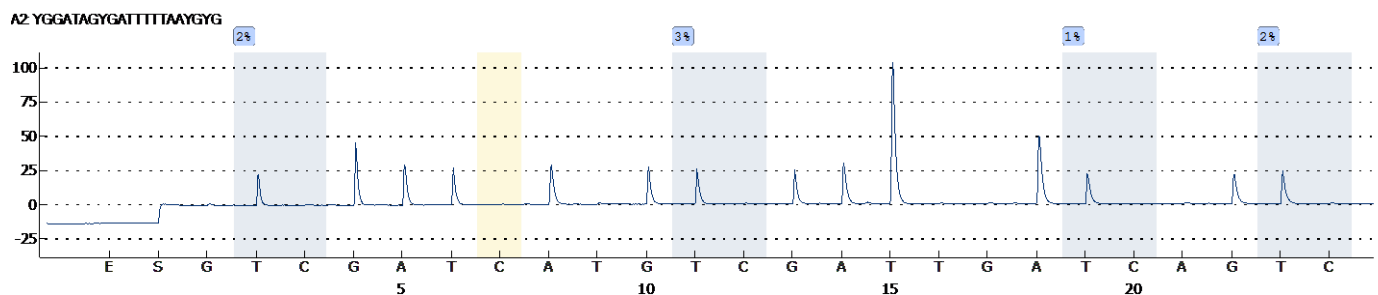
Vermits de pyroPCR gunstige resultaten opleverde voor zowel de controlestalen als de beperkte reeks patiëntenstalen. En daarbij het programma voor de *pyrosequencing* werd geoptimaliseerd op de controlestalen is deze analyse geoptimaliseerd. Verder kan het programma van de *pyrosequencing* worden uitgetest op de beperkte reeks patiëntenstalen (bijlage 13). Wanneer deze reeks goede resultaten geeft, kan overgegaan worden naar de validatie van de analyse op een grotere reeks patiëntenstalen (bijlage 14).

PYROSEQUENCING OP BEPERKT AANTAL PATIËNTENSTALEN

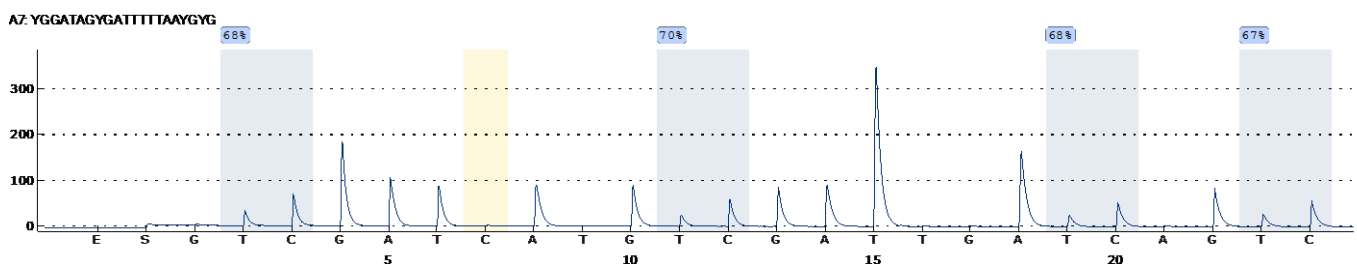
De pyroPCR is reeds uitgevoerd voor deze stalen met het standaard PCR-programma. Hierbij werd opgemerkt dat het DNA van alle stalen van voldoende kwaliteit was. Bijgevolg werd op alle stalen de *pyrosequencing* gerund. Verder werd geopteerd voor het programma MLH1 CpG MUMC. Dit programma staat vermeld in het protocol van de *pyrosequencing* (3. Materiaal en methoden; 3.2 Methodes; 3.2.1 Aantonen van promotor hypermethylering op MLH1- en MGMT-gen; 3.2.1.8 *Pyrosequencing*).

Voor deze analyse worden de stalen in duplo meegenomen om discrepanties uit te sluiten. In figuur 55 wordt het pyrogram van een ongemethyleerd staal weergegeven, nl. MBT10-111. Voor de analyse van een pyrogram wordt gekeken naar de CpG-eilanden of de blauwe rechthoeken op figuur 55. Bovenaan deze rechthoeken staat een percentage. Dit percentage geeft aan voor hoeveel deze DNA-sequentie gemethyleerd is. Voor deze analyse kan een gemiddeld percentage berekend worden. Zo is voor dit staal 3,5% van het DNA gemethyleerd. Dit is zeer weinig, vandaar dat dit staal als ongemethyleerd wordt beschouwd.

In figuur 56 wordt het pyrogram van een gemethyleerd staal weergegeven, nl MBT10-808. Als het gemiddeld percentage van deze analyse wordt berekend, is dit 68%. Dit percentage betekent dus dat 68% van het geanalyseerde DNA gemethyleerd is. Dit staal wordt beschouwd als gemethyleerd.



Figuur 55 Het pyrogram van een ongemethyleerd staal, MBT10-111.



Figuur 56 Het pyrogram van een gemethyleerd staal, MBT10-808.

In onderstaande tabel (tabel 31) wordt een overzicht gegeven van de resultaten van de *pyrosequencing* van de methylatiestatus van het MLH1-gen voor de beperkte reeks patiëntenstalen.

Tabel 31 Overzicht van resultaten van *pyrosequencing* van beperkte reeks patiëntenstalen (MLH1-analyse). Hierbij wordt voor elke duplo van het staal een gemiddeld percentage berekend. Verder wordt het resultaat van de oude methode (*nested* PCR) weergegeven. De discrepanties tussen beide methodes worden in het grijs gemarkeerd.

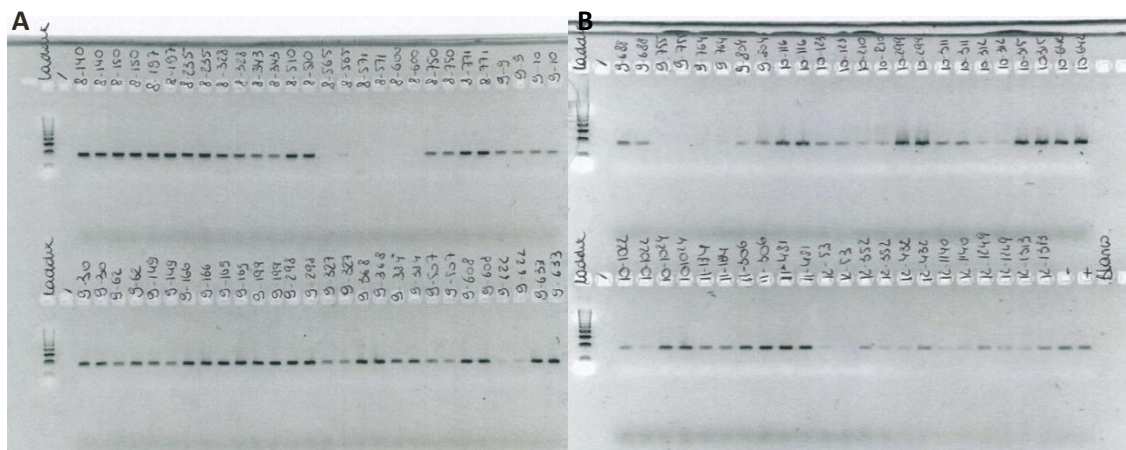
Staal	MBT10-111	MBT10-116	MBT10-123	MBT10-210	MBT10-299	MBT10-311	MBT10-312	MBT10-314	MBT10-315
Gemiddeld percentage methylatie eerste duplo	3,5%	46,75%	3%	29,5%	53%	8,75%	N/A	63,75%	61,75%
Gemiddeld percentage methylatie tweede duplo	2%	41,75%	1,75%	30%	54,75%	4,5%	41,25%	65,75%	52,5%
Resultaat <i>pyrosequencing</i>	U	M	U	M	M	U	M	M	M
Oorspronkelijk resultaat	U	M	U	M	M	U	M	M	M
Staal	MBT10-416	MBT10-574	MBT10-642	MBT10-694	MBT10-744	MBT10-808	MBT10-959	MBT10-1022	MBT10-1024
Gemiddeld percentage methylatie eerste duplo	3%	4,5%	2,25%	1,5%	60,25%	68,25%	69,25%	/	3%
Gemiddeld percentage methylatie tweede duplo	3%	3%	3,5%	2,5%	57%	64%	64%	/	2,5%
Resultaat <i>pyrosequencing</i>	U	U	U	U	M	M	M		U
Oorspronkelijk resultaat	M	M	U	U	M	M	M	U	U

Op basis van de resultaten van de oude analyse, *nested* PCR, kan bepaald worden wanneer een staal na analyse met de *pyrosequencing* gemethyleerd of ongemethyleerd is. Hieruit blijkt dat bij een gemiddeld percentage onder 8,75% een staal beschouwd wordt als ongemethyleerd. Verder blijkt bij een percentage van boven 29,5% een staal beschouwd wordt als gemethyleerd.

Het staal MBT10-574 blijkt echter voor de analyse van de *pyrosequencing* ongemethyleerd te zijn, terwijl dit staal bij de analyse door de qPCR als MSP gemethyleerd blijkt te zijn. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat de *pyrosequencing* een ander CpG-gebied van de promotor van het MLH1-gen detecteert.

PYRO-PCR OP UITGEBREID AANTAL PATIËNTENSTALEN

Nadat de resultaten van de beperkte reeks goed waren, kon overgegaan worden naar de validatie van deze analyse. Hierbij werd de methode gecontroleerd op juistheid. Voor deze analyse werden de stalen in bijlage 14 gebruikt. Voor deze pyroPCR werd opnieuw de algemene kit van Qiagen gebruikt, nl. PyroMark PCR kit (Cat.no.978703). Verder werd het standaardprogramma van de pyroPCR toegepast.



Figuur 57 Het resultaat van de pyroPCR van uitgebreid aantal patiëntenstalen na gelelektroforese. Hierbij is zowel op figuur A als B in de eerste baan een 100 basenparenladder geladen waarmee de lengte van de PCR-producten geschat kan worden. Verder staan boven de gel het nummer van de stalen weergegeven. Hierbij wordt MBT14, de code van de afdeling en het jaartal van isolatie '14 weggelaten om de figuur overzichtelijk te houden. Naast de stalen werd een blanco voor de PCR-reactie meegenomen. Daarnaast werden ook een gemethyleerde (ivD) en ongemethyleerde (UM) controle meegenomen.

Op figuur 57 wordt het resultaat van de pyroPCR weergegeven. Bij de blanco zijn geen banden zichtbaar. Dit wijst op het feit dat geen contaminatie heeft plaatsgevonden. Bij de gemethyleerde (ivD) en ongemethyleerde (UM) controle is een band zichtbaar. Dit wijst op het feit dat de primers hebben kunnen binden. De PCR-reactie is gelukt.

Bij de stalen MBT08-565, MBT08-571, MBT08-600, MBT09-755, MBT-09-764, MBT012-53 zijn geen banden waar te nemen. Dit wijst op het feit dat geen amplificatie heeft plaatsgevonden. Dit kan te wijten zijn aan de kwaliteit van het DNA. In bijlage 14 kan worden opgemerkt dat het resultaat van de SCS-ladder van deze stalen onder 200 basenparen. Dit betekent dat dit DNA gefragmenteerd is en dus van mindere kwaliteit is. Deze stalen worden dan ook niet meegenomen met de *pyrosequencing*.

Bij de stalen MBT09-62, MBT09-149, MBT09-327, MBT09-507, MBT09-622, MBT09-688, MBT09-804, MBT09-123, MBT09-210, MBT10-311, MBT10-312, MBT10-1022, MBT11-134, MBT12-352, MBT12-432, MBT14-1140, MBT12-1249, MBT12-1313 zijn banden met een lichte intensiteit waar te nemen. Dit betekent dat een kleine hoeveelheid PCR-product gevormd is. Vandaar wordt het volume DNA van deze stalen voor de *pyrosequencing* verhoogd naar 15 µl.

PYROSEQUENCING OP UITGEBREID AANTAL PATIËNTENSTALEN

De pyroPCR is reeds uitgevoerd voor het uitgebreid aantal patiëntenstalen (zie figuur 57). Hierbij werd opgemerkt dat niet alle stalen kunnen worden meegenomen met de *pyrosequencing* aangezien bij sommige stalen (MBT08-565, MBT08-571, MBT08-600, MBT09-755, MBT09-764, MBT012-53) geen amplificatie plaatsvond. Verder werd bij bepaalde stalen het volume DNA voor de *pyrosequencing* verhoogd naar 15 µl. Voor deze analyse werden de stalen in duplo meegenomen om discrepanties uit te sluiten.

In tabel 32 wordt een overzicht gegeven van de resultaten van het uitgebreid aantal patiëntenstalen (bijlage 14). Hierbij werd een gemiddeld percentage berekend van elke duplo.

Tabel 32 Overzicht van resultaten van *pyrosequencing* van uitgebreid aantal patiëntenstalen (MLH1-analyse). Hierbij wordt voor elke duplo van het staal een gemiddeld percentage berekend. Verder wordt het resultaat van de oude methode (*nested PCR*) weergegeven. De discrepanties tussen beide methodes worden in het grijs gemarkeerd.

Staal	MBT08-140	MBT08-150	MBT08-197	MBT08-235	MBT08-328	MBT08-343	MBT08-510	MBT08-750	MBT08-771
Gemiddeld percentage methylatie eerste duplo	3%	65,25%	49,75%	56,25%	60,5%	41,75%	46,75%	5,25%	3,25%
Gemiddeld percentage methylatie tweede duplo	3,25%	62,75%	49%	64,75%	54,75%	44,75%	44,25%	7,5%	3,25%
Resultaat <i>pyrosequencing</i>	U	M	M	M	M	M	M	U	U
Oorspronkelijk resultaat	U	M	M	M	M	M	M	U	U
Staal	MBT09-09	MBT09-10	MBT09-30	MBT09-62	MBT09-149	MBT09-166	MBT09-169	MBT09-199	MBT09-298
Gemiddeld percentage methylatie eerste duplo	2%	20,75%	2,5%	45,25%	33%	3%	66,25%	6,25%	3,25%
Gemiddeld percentage methylatie tweede duplo	4%	16,25%	3%	48%	29,75%	3,5%	66,75%	3,5%	2,75%
Resultaat <i>pyrosequencing</i>	U	M	U	M	M	U	M	U	U
Oorspronkelijk resultaat	U	M	M	M	M	U	M	U	U
Staal	MBT09-327	MBT09-369	MBT09-384	MBT09-507	MBT09-608	MBT09-622	MBT09-633	MBT09-688	MBT09-804
Gemiddeld percentage methylatie eerste duplo	27,25%	49,5%	39,75%	29,5%	40,75%	2,75%	4,5%	3,5%	12,5%
Gemiddeld percentage methylatie tweede duplo	30,25%	55,25%	43%	20,25%	39,5%	6,5%	3%	4,5%	31,25%
Resultaat <i>pyrosequencing</i>	M	M	M	M	M	U	U	U	M
Oorspronkelijk resultaat	M	M	M	M	M	U	U	U	M
Staal	MBT10-123	MBT10-311	MBT10-315	MBT10-642	MBT10-808	MBT10-1024	MBT11-134	MBT11-306	MBT11-481
Gemiddeld percentage methylatie eerste duplo	3%	8,75%	55,25%	3,25%	68,25%	2%	47%	8,25%	48%
Gemiddeld percentage methylatie tweede duplo	1,75%	4,5%	51,25%	1,75%	64%	4,25%	46,25%	20,5%	44,75%
Resultaat <i>pyrosequencing</i>	U	U	M	U	M	U	M	/	M
Oorspronkelijk resultaat	U	U	M	U	M	U	M	M	M

Staal	MBT12-352	MBT12-432	MBT12-1140	MBT12-1249	MBT12-1313
Gemiddeld percentage methylatie eerste duplo	24,75%	16%	6,75%	63,75%	70%
Gemiddeld percentage methylatie tweede duplo	21,75%	23,25%	4%	66,5%	74,75%
Resultaat <i>pyrosequencing</i>	M	M	U	M	M
Oorspronkelijk resultaat	M	M	M	M	M

Op basis van de resultaten (tabel van de oude analyse, *nested* PCR, kan bepaald worden wanneer een staal na analyse met de *pyrosequencing* gemethyleerd of ongemethyleerd is. Hieruit blijkt dat bij een gemiddeld percentage van 8,75% of lager het staal ongemethyleerd is. Daarnaast wordt een staal beschouwd als gemethyleerd bij 12,5% of hoger.

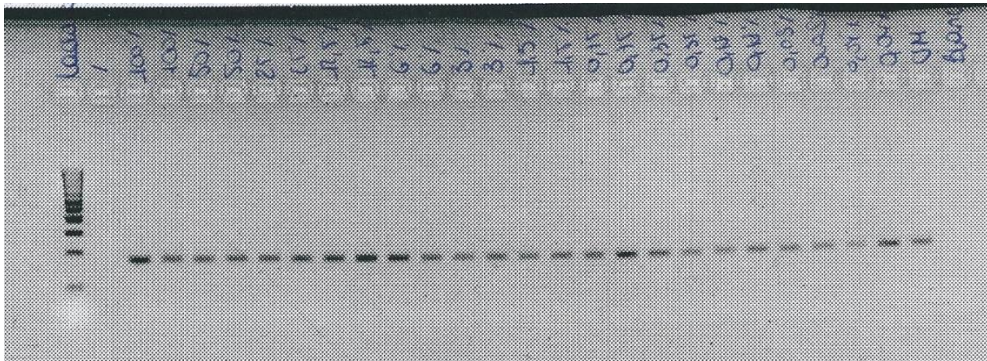
Echter in tabel 23 worden twee discrepanties weergegeven, MBT9-30 en MBT12-1140. Allebei de stalen blijken echter voor de analyse van de *pyrosequencing* ongemethyleerd te zijn, terwijl bij de analyse door de qPCR als MSP deze stalen gemethyleerd blijkt te zijn. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat de *pyrosequencing* een ander CpG-gebied van de promotor van het MLH1-gen detecteert.

Aan de hand van bovenstaande resultaten kan worden besloten dat door middel van *pyrosequencing* de methylatiestatus van de promotor van het MLH1-gen bepaald kan worden. Uit bovenstaande resultaten van de *pyrosequencing*, zowel op de beperkte als uitgebreide reeks patiëntenstalen, kan worden besloten dat een staal met 8,75% of lager ongemethyleerd is. Verder wordt een staal met 12,5% of hoger beschouwd als gemethyleerd. Voor een definitieve cut-off te stellen wordt de *pyrosequencing* uitgevoerd op een verdunningsreeks.

4.1.3.4. CUT-OFF BEPALING

De cut-off of drempelwaarde wordt naast de vergelijking van de resultaten van de patiëntenstalen bepaald aan de hand van een verdunningsreeks. Voor het opstellen van deze verdunningsreeks werd dezelfde procedure gevolgd als de verdunningsreeks voor de cut-off bepaling van de qPCR (zie 4. Resultaten; 4.1 MLH1-analyse; 4.1.2 qPCR; 4.1.2.3 cut-off bepaling).

De verdunningsreeks onderging een bisulfietbehandeling om onderscheid tussen gemethyleerd en ongemethyleerd DNA te maken. Na de bisulfietbehandeling werd de geoptimaliseerde pyroPCR uitgevoerd op deze stalen (zie figuur 58).



Figuur 58 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten van pyroPCR verdunningsreeks van MLH1-analyse. In de eerste laan werd een 100 basenparenladder geladen. Hiermee kan de grootte van de PCR-producten geschat worden. Verder werd bovenaan de gel de stalen weergegeven. In de tweede laan werd geen staal geladen. Naast de stalen van de verdunningsreeks werden ook controlestalen meegenomen, nl. een ongemethyleerd staal en een blanco.

Op figuur 58 wordt het resultaat van de pyroPCR op de verdunningsreeks van de MLH1-analyse weergegeven. Bij de blanco zijn geen banden waar te nemen. Dit wijst op het feit dat geen contaminatie heeft plaatsgevonden. Bij de ongemethyleerde controle (UM) is een band zichtbaar. Dit wijst op het feit dat de primers hebben kunnen binden. De PCR-reactie is gelukt.

Bij alle stalen van de verdunningsreeks is een band waar te nemen. Sommige banden hebben een lichtere intensiteit. Doch wordt geadviseerd om het volume van 10 µl aan te houden voor de *pyrosequencing*.

Alle stalen van de verdunningsreeks kunnen worden meegenomen met de *pyrosequencing*. Een overzicht van de resultaten van de *pyrosequencing* van de verdunningsreeks wordt in tabel 33 weergegeven.

Tabel 33 Overzicht van resultaat van de *pyrosequencing*. Hierbij is het gemiddeld percentage berekend van elke duplo.

Staal	100% lvD	50% lvD	25% lvD	12,5% lvD	6% lvD	3% lvD	1,5% lvD	0,75% lvD	0,35% lvD	0,18% lvD	0,09% lvD	0,045% lvD	UM
Gemiddeld percentage methylatie eerste duplo	81%	25,5%	10,5%	11,25%	5,75%	4,5%	4,25%	3,5%	2,25%	0%	3,5%	6,75%	3,5%
Gemiddeld percentage methylatie tweede duplo	84%	27,5%	13,5%	11,5%	4,75%	3,75%	4,25%	3,75%	3,75%	2,75%	3%	4%	4%

Uit de resultaten van de verdunningsreeks van de *pyrosequencing* is af te leiden dat vanaf verdunning 6% lvD de resultaten onbetrouwbaar worden. De methylatiepercentages van 6% en 3% lvD liggen bij elkaar in de buurt terwijl het methylatiepercentage van de stalen gehalveerd is. Dit wijst op het feit dat bij een staal met een methylatiepercentage van minder dan 6% de resultaten onbetrouwbaar zijn. De detectielimiet van de *pyrosequencing* ligt rond 6%.

4.2. MGMT-ANALYSE

Met de MGMT-analyse wordt getracht om promotor hypermethylering van het MGMT-gen aan te tonen. Hypermethylatie van de promotor van het MGMT-gen speelt een belangrijke rol bij hersentumoren. Deze tumoren zijn moeilijk te behandelen aangezien ze een vrij resistent karakter vertonen. Als de promotor van het MGMT-gen gemethyleerd is, heeft dit een positieve invloed op de behandeling van hersentumoren. Zo verhoogt de gevoeligheid van de tumor voor chemotherapie. Met de MGMT-analyse kan dus een betere prognose voor de patiënt gesteld worden.

Voor het aantonen van hypermethylering van de promotor van het MGMT-gen wordt de MLH1-analyse als basis gebruikt. Bij deze analyse werden zowel de technieken MSP als *pyrosequencing* geoptimaliseerd voor het detecteren van de methylatiestatus. Ook voor de MGMT-analyse wordt getracht om deze twee testen te optimaliseren.

4.2.1. QPCR ALS METHODE OM PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN HET MGMT-GEN TE ANALYSEREN

Voor de MGMT-analyse wordt getracht om promotor hypermethylering aan te tonen met behulp van MSP. In Esteller et al. [64] staat de standaardmethode voor deze techniek beschreven. Als PCR-methode wordt hier geopteerd voor de qPCR. Om de qPCR te gebruiken als analysemethode voor het detecteren van de methylatiestatus van het MGMT-gen dient deze techniek geoptimaliseerd te worden. De optimalisatie gebeurt eerst op controlestalen. Daarna wordt de geoptimaliseerde qPCR uitgetest op een beperkt aantal patiëntenstalen (bijlage 16). Verder wordt deze analyse uitgetest op een tweede reeks patiëntenstalen (bijlage 17). Als laatste dient een cut-off bepaald te worden. Deze cut-off wordt bepaald aan de hand van twee zaken. Zo worden de resultaten van de patiëntenstalen vergeleken met de oude resultaten. Daarnaast wordt een verdunningsreeks opgesteld met IvD en UM.

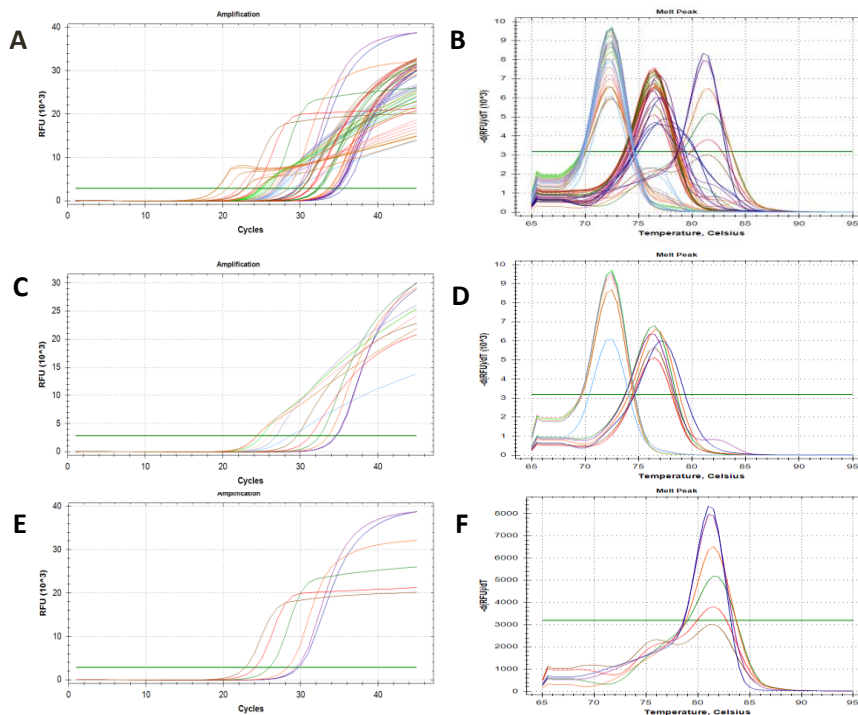
4.2.1.1. OPTIMALISATIE VAN QPCR OP CONTROLESTALEN

De optimalisatie van de qPCR gebeurde op twee soorten controlestalen. Zo werden, net zoals bij de MLH1-analyse, ook bij deze analyse IvD en HUVEC gebruikt. Deze controlestalen werden zelf bereid in het labo (zie 3. Materiaal en methoden; 3.1 stalen; 3.1.1 controlestalen: IvD en HUVEC). IvD is de controle voor gemethyleerd DNA. Dit is een DNA cellijn die in vitro gemethyleerd werd. HUVEC is de controle voor ongemethyleerd DNA. Dit DNA is afkomstig van endotheelcellen uit bloedvaten van de navelstreng. Daarnaast werd ook een kit met controlestalen aangekocht bij Qiagen (Nederland), nl. Qiagen PCR *control* DNA (Cat.no. 59695).

De PCR werd geoptimaliseerd aan de hand van met SensiFast™ HRM mix (Cat.no.BIO-32002). Dit is een *ready-to-use* mix waarbij enkel primers en steriel H₂O moet worden toegevoegd. Ook het PCR-programma werd op punt gesteld. Dit gebeurde met behulp van een temperatuursgradiënt.

QPCR SENSIFAST™ HRM MIX

De qPCR werd op controlestalen ingezet met de SensiFast™ HRM mix. Als primers werden de *inside* primers gebruikt. Bij de eerste qPCR werd als *annealing*temperatuur een gradiënt ingevoerd met als temperaturen 54°C, 56°C, 59°C, 62°C, 64°C en 66°C aangezien de smeltemperatuur van de primers rond 66°C ligt.



Figuur 59 Resultaat qPCR van controlestalen (MGMT-analyse).

A. Overzicht van de amplificatiecurves van de controlestalen bij verschillende *annealing*temperaturen. De controlestalen werden ingezet met een mastermix voor de gemethyleerde primers en mastermix voor de ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurves van de controlestalen hebben voor elke *annealing*temperatuur een andere kleur gekregen. Zo zijn de amplificatiecurves bij 66°C blauw, de amplificatiecurves bij 64°C paars, de amplificatiecurves bij 62°C oranje, de amplificatiecurves bij 59°C groen, de amplificatiecurves bij 56°C rood en de amplificatiecurves bij 54°C bruin.

B. Overzicht van de smeltcurves van de controlestalen bij verschillende *annealing*temperaturen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hier geldt dezelfde kleurcode als bij de amplificatiecurves in figuur A.

C. Amplificatiecurves van de blanco's bij de verschillende temperaturen. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hier geldt dezelfde kleurcode als in figuur A.

D. De smeltcurves van de blanco's bij de verschillende temperaturen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Ook bij deze curves geldt dezelfde kleurcode.

E. De amplificatiecurves van de gemethyleerde controle, IvD, met de gemethyleerde primers weer. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hier geldt dezelfde kleurcode als bij de amplificatiecurves in figuur A.

F. De smeltcurves van de gemethyleerde controle bij de verschillende temperaturen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hier geldt dezelfde kleurcode als bij de amplificatiecurves in figuur A.

Op figuur 59A worden de amplificatiecurves van de controlestalen bij de verschillende *annealing*temperaturen weergegeven. Voor elk staal zijn twee amplificatiecurves waarneembaar. Zo wordt één staal zowel bij een mastermix met gemethyleerde primers gepipetteerd als bij een mastermix met ongemethyleerde primers. Hieruit kan worden afgeleid of het staal al dan niet gemethyleerd DNA bevat. Zo zullen de gemethyleerde primers enkel op gemethyleerd DNA kunnen binden en ongemethyleerde primers enkel op ongemethyleerd DNA. Hieruit kan worden afgeleid dat enkel de ongemethyleerde controles amplificatie vertonen bij de ongemethyleerde primers en de gemethyleerde controles enkel amplificatie vertonen bij de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves op figuur 58A zien er niet goed uit. Op deze figuur vertonen zowel de ongemethyleerde als gemethyleerde controles amplificatie bij zowel de ongemethyleerde als gemethyleerde primers en dit voor alle *annealing*temperaturen.

Dit kan te wijten zijn aan het vormen van primerdimeren. Verder kan contaminatie hebben opgetreden in de mastermixen. Een andere optie is de vorming van aspecifieke producten.

Op figuur 59B worden de smeltcurves van de controlestalen weergegeven. Hierop zijn duidelijk drie pieken waar te nemen. De eerste, linkse piek zijn de smeltcurves van de controlestalen met ongemethyleerde primers. De middelste piek zijn de smeltcurves van de controlestalen met de gemethyleerde primers. De uiterst rechtse piek zijn de smeltcurves van de gemethyleerde controles van het labo, IvD.

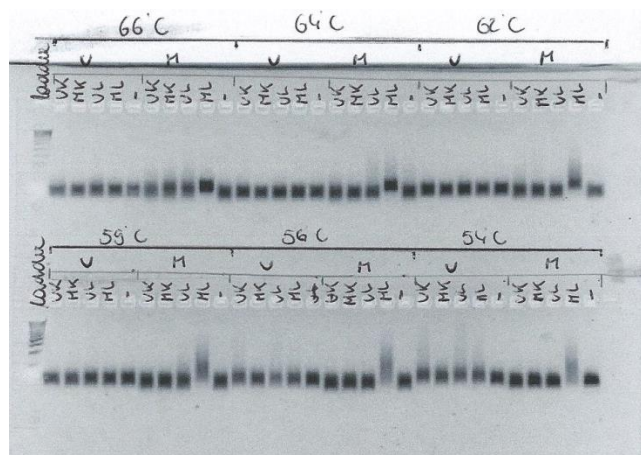
Op figuur 59C worden de amplificatiecurves van de blanco weergegeven. Deze curves mogen normaal geen amplificatie vertonen. Doch is op deze figuur amplificatie waarneembaar.

Dit kan te wijten zijn aan contaminatie. Daarnaast kan dit te wijten zijn aan primerdimeren. Verder kunnen aspecifieke producten gevormd zijn. Op de smeltcurves van figuur 59D kunnen twee patronen waargenomen worden. Zo is de linkse, hoge curve de smeltcurve van de blanco's met ongemethyleerde primers. De rechtste, lagere curve is de smeltcurve van de blanco's met gemethyleerde primers. Uit deze curve kan worden afgeleid dat de primers hebben kunnen binden.

Op figuur 59E zijn de amplificatiecurves van de gemethyleerde controle van het labo, IvD, weergegeven met de gemethyleerde primers. Deze curves vertonen wel een goed beeld.

Op de smeltcurve (figuur 59F) is af te leiden dat de gemethyleerde controles van het labo (IvD) dezelfde smelttemperatuur hebben. Hierbij kan uit figuur 59B worden opgemerkt dat deze een andere, hogere smelttemperatuur hebben dan de andere controlestalen. Dit komt waarschijnlijk doordat hier wel binding van de primers heeft plaatsgevonden aan de sequentie.

Om te kijken welke PCR-producten gevormd werden, werd een gelelektroforese uitgevoerd.



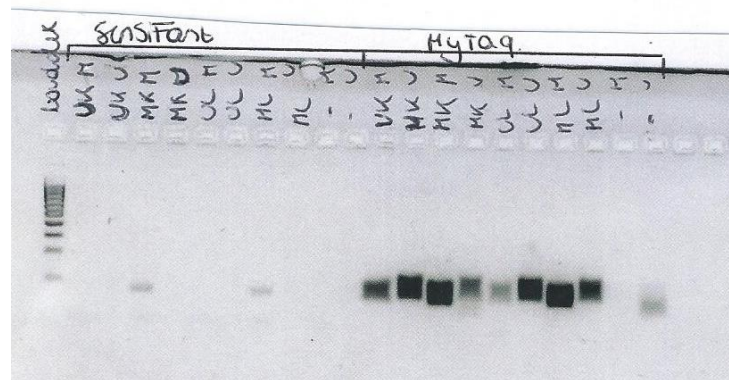
Figuur 60 Resultaat qPCR van controlestalen voor MGMT-analyse met een temperatuursgradiënt voor *annealing*temperatuur. In de eerste baan is een 100 basenparenladder geladen. Hiermee kan de grootte van de PCR-producten geschat worden. Verder staat bovenaan de gel de controlestalen die in de baan zijn geladen met het soort primer waarmee de PCR is ingezet. U staat voor ongemethyleerde primers en M staat voor gemethyleerde primers. Daarnaast staat bovenaan de gel ook bij welke *annealing*temperatuur de PCR-producten gevormd zijn.

Op figuur 60 is het resultaat na gelelektroforese van de PCR-producten van de qPCR op controlestalen voor MGMT-analyse zichtbaar. Bij zowel de blanco als de stalen bij ongemethyleerde primers en gemethyleerde primers zijn banden zichtbaar. De meeste banden liggen onder 100 basenparen. Enkel bij IvD met gemethyleerde primers zijn banden zichtbaar rond 100 basenparen. Dit komt overeen met de verwachte waarden, nl. 81 basenparen.

De banden die onder 100 basenparen liggen, wijzen op aspecifieke binding van de primers of primerdimeren. Aangezien ook bij de blanco banden zichtbaar zijn, kan er vanuit gegaan worden dat deze PCR-reactie mislukt is. Als naar de intensiteit van de banden van IvD bij gemethyleerde primers wordt gekeken, kan worden opgemerkt dat deze vervaagt naarmate de *annealing*temperatuur lager wordt. Zo is bij *annealing*temperatuur 54°C en 56°C enkel een smeer waar te nemen. Hieruit kan worden bemerkt dat bij de IvD wel een goede binding met de gemethyleerde primers heeft plaatsgevonden.

Aangezien deze PCR-reactie niet gelukt is, werd overgegaan naar de huidige methode van de MLH1-analyse, nl. een *nested* PCR. De *nested* PCR bestaat uit een *outside* PCR en een *inside* PCR. Na de *outside* PCR werd het PCR-product 1000x verdund. Voor de *outside* en *inside* PCR werden andere primerparen gebruikt (zie bijlage 7).

Bij deze *nested* PCR werd een mastermix met MyTaq™ HS en een mastermix met SensiFast™ HRM uitgetest. Het resultaat van de *nested* PCR wordt zichtbaar gemaakt aan de hand van gelelektroforese (figuur 61).



Figuur 61 Resultaat gelelektroforese van PCR-producten afkomstig van de *nested* PCR voor MGMT-analyse. In de eerste laan werd een 100 basenparenladder geladen. Hiermee kan de grootte van de PCR-producten geschat worden. De eerste tien controlestalen zijn bereid met de SensiFast™ HRM mix. De laatste 10 controlestalen zijn bereid met de mastermix MyTaq™ HS mix. Bovenaan de gel wordt het staal vermeld met hierbij een U of een M. Dit wijst op de primers die werden toegevoegd. Zo staat U voor ongemethyleerde primers en M staat voor gemethyleerde primers. Voor deze analyse worden vier controlestalen gebruikt, nl ongemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (UK), gemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (MK), ongemethyleerd staal in het labo bereid (UL) en gemethyleerd staal in het labo bereid (ML).

Op figuur 61 is het resultaat van de *nested* PCR zichtbaar. Zowel de blanco van de mastermix met SensiFast™ HRM mix als de blanco van mastermix met MyTaq™ HS mix bevatten geen band voor zowel de ongemethyleerde primers als de gemethyleerde primers. Enkel bij de blanco van de ongemethyleerde primers bij de MyTaq™ HS mix is een zeer lichte band waarneembaar. Deze band bevindt zich onder 100 basenparen.

De zeer lichte band kan wijzen op primerdimeren. Op basis van bovenstaande waarneming kan worden besloten dat de PCR-reactie gelukt is.

Voor de controlestalen met de SensiFast™ HRM mix zijn geen banden waar te nemen. Enkel bij de gemethyleerde controlestalen met gemethyleerde primer zijn zeer lichte banden waar te nemen. Deze banden bevinden zich rond 100 basenparen. Dit komt overeen met de verwachte waarden, nl. 83 basenparen. Aangezien geen band is waar te nemen bij de ongemethyleerde controlestalen met de gemethyleerde primers is de SensiFast™ HRM mix niet bruikbaar voor deze analyse.

Voor de controletalen met de MyTaq™ HS mix zijn wel banden waar te nemen. Zo is voor het ongemethyleerde controlestaal van de Qiagen kit (UK) een band waar te nemen bij zowel de gemethyleerde als ongemethyleerde primer. Hierbij ligt de band van het staal met de ongemethyleerde primer iets hoger. Ook bij het gemethyleerde staal van de kit met gemethyleerde primers zijn banden waar te nemen. Hierbij is een dikke band waar te nemen bij het gemethyleerde staal met de gemethyleerde primers. Bij het gemethyleerde staal met de ongemethyleerde primers is een iets lichtere band waar te nemen.

Uit deze resultaten blijkt dat de MyTaq™ HS mix werkzaam is. Vandaar dat werd besloten om een qPCR uit te voeren met de MyTaq™ HS mix op de controlestalen. Als primers werd geopteerd voor de *outside* primers aangezien deze makkelijker zouden binden.

Tijdens het voorbereiden van de qPCR met de MyTaq™ HS mix werd opgemerkt dat bij voorgaande proeven primers werden gebruikt met een concentratie van 100 µM in plaats van 20 µM. Dit verklaart waarom geen goede amplificatiecurves werden waargenomen. Verder verklaart dit ook waarom de *nested* PCR geen goede resultaten vertoonde. Voor deze analyse met de MyTaq™ HS mix worden de *inside* primers verdund naar een concentratie van 20 µM. Verder wordt voor de *annealing*temperaturen in het PCR-programma een gradiënt geplaatst met als temperaturen: 54°C, 56°C, 59°C, 62°C, 64°C en 66°C. Voor deze test werden naast de controlestalen ook twee *outside* producten van de *nested* PCR meegenomen, nl. een gemethyleerd en ongemethyleerd *outside* product. Verder werd de blanco enkel op *annealing*temperatuur 64°C meegenomen.

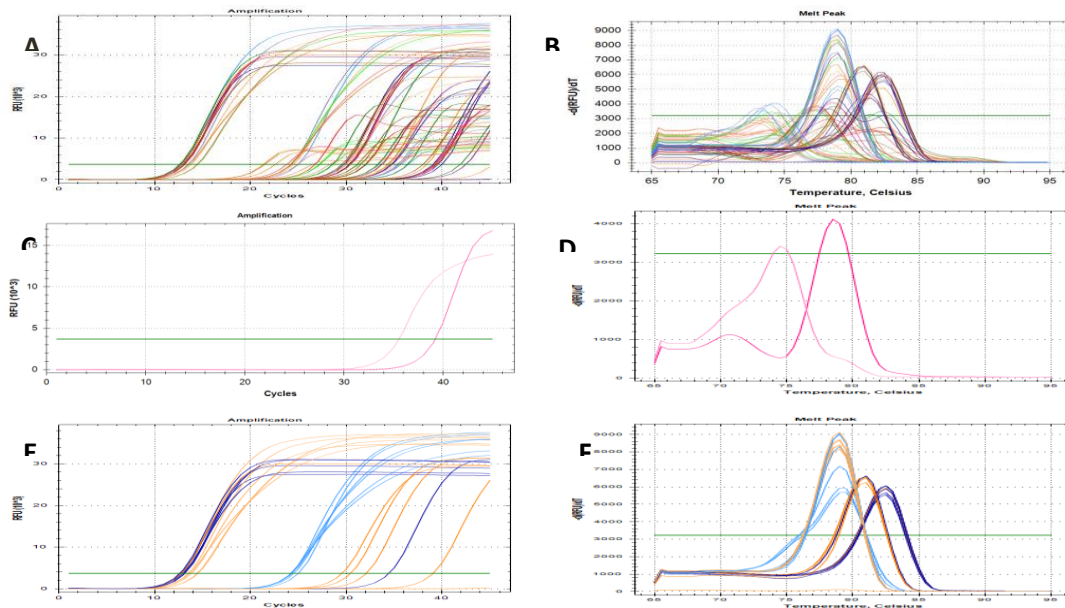
Op onderstaande figuur (figuur 62) worden de resultaten weergegeven. Op figuur 62A wordt een overzicht weergegeven van de amplificatiecurves van de controlestalen met mastermix MyTaq™ HS mix bij verschillende *annealing*temperaturen. Op figuur 62B wordt een overzicht gegeven van de smeltcurves van de controlestalen met mastermix MyTaq™ HS mix bij de verschillende *annealing*temperaturen.

Op figuur 62C wordt een overzicht gegeven van de amplificatiecurve van de blanco bij *annealing*temperatuur 64°C. Hierbij mag normaal geen amplificatie vertoond worden. Aangezien in dit staal enkel de mastermix zit. Deze amplificatie kan te wijten zijn aan contaminatie of aan vorming van primerdimeren.

Op figuur 62D wordt de smeltcurve van deze blanco getoond, zowel voor de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Deze smeltcurve komt voor de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers overeen met de smeltcurve van de gemethyleerde stalen met ongemethyleerde primers (figuur 62B). De smeltcurve van de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers komt overeen met de smeltcurve van de ongemethyleerde stalen met gemethyleerde primers (figuur 62B). Dit wijst in de richting van primerdimeren.

Op figuur 62E wordt een overzicht gegeven van de amplificatiecurves van de *outside* PCR-producten. Deze PCR-producten zijn afkomstig van *nested* PCR, meer bepaald de *outside* PCR die eerder werd uitgevoerd. Op de figuur zijn in het lichtbruin de amplificatiecurves van de ongemethyleerde stalen met de ongemethyleerde primers weergegeven. Deze vertonen een mooie amplificatie. De donkerbruine amplificatiecurves zijn van de ongemethyleerde stalen met gemethyleerde primers. Deze amplificatie wordt veel later gedetecteerd. Verder zijn in het donkerblauw de curves weergegeven van de gemethyleerde stalen met de gemethyleerde primers. De amplificatie van deze stalen is goed. De amplificatiecurves in het lichtblauw weergegeven zijn deze van de gemethyleerde stalen met de ongemethyleerde primers. Ook bij deze curves kan worden opgemerkt dat de amplificatie pas laat gedetecteerd wordt.

Normaal zou voor de ongemethyleerde stalen met gemethyleerde primers en gemethyleerde stalen met ongemethyleerde primers geen amplificatie waargenomen mogen worden. Aangezien de amplificatie vrij laat waargenomen wordt, ongeveer 20 cycli verder, kan dit te wijten zijn aan binding van de primers. Wanneer de smeltcurves van deze stalen (figuur 62F) erbij worden gehaald, kunnen hier drie smeltcurves worden waargenomen. De eerste, linkse smeltcurves bevat de *outside* producten van de ongemethyleerde primers. De middelste smeltcurves zijn deze van de ongemethyleerde stalen met gemethyleerde primers. En de rechtse smeltcurves zijn deze van de gemethyleerde stalen met gemethyleerde primers.



Figuur 62 Resultaat qPCR op controlestalen met MyTaq™ HS mix voor MGMT-analyse.

A. Overzicht van de amplificatiecurves van de controlestalen bij verschillende *annealing*temperaturen. De controlestalen werden ingezet met een mastermix voor de gemethyleerde primers en mastermix voor de ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Deze curves hebben per *annealing*temperatuur een kleur gekregen. Zo zijn de amplificatiecurves bij 66°C blauw, de amplificatiecurves bij 64°C paars, de amplificatiecurves bij 62°C oranje, de amplificatiecurves bij 59°C groen, de amplificatiecurves bij 56°C rood en de amplificatiecurves bij 54°C bruin. Verder is de blanco in het roze aangeduid, meer bepaald lichtroze voor de ongemethyleerde primers en donkerroze voor de gemethyleerde primers.

B. Overzicht van de smeltcurves van de controlestalen bij verschillende *annealing*temperaturen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Deze curves hebben per *annealing*temperatuur dezelfde kleurcode als de amplificatiecurves gekregen.

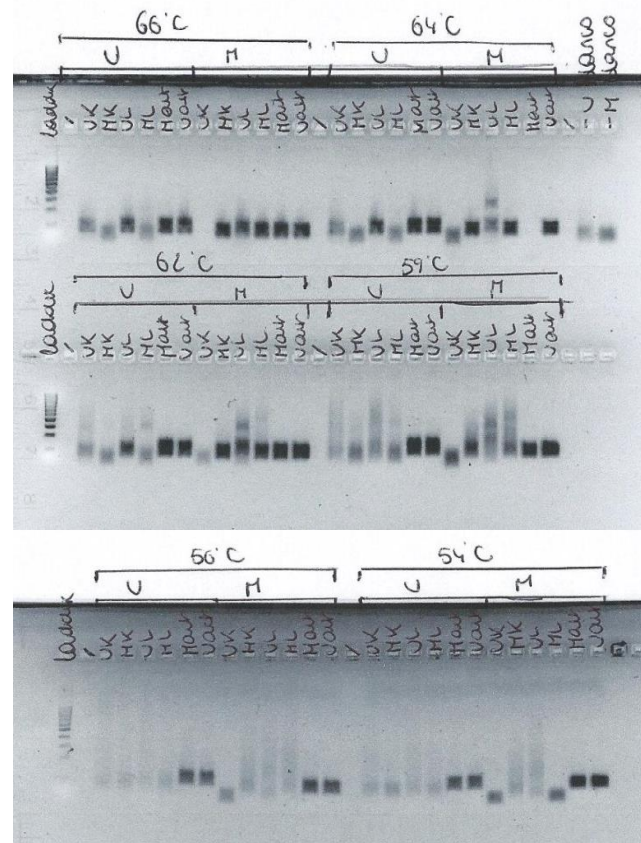
C. Amplificatiecurves van de blanco's. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij is de lichtroze grafiek de amplificatiecurve van de blanco met ongemethyleerde primers. De blanco van de gemethyleerde primers is donkerroze.

D. Smeltcurves van de blanco's. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. De lichtroze smeltcurve is deze van de blanco met de ongemethyleerde primers en de donkerroze smeltcurve is deze van de blanco met gemethyleerde primers.

E. Amplificatiecurves van de *outside* PCR-producten. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij zijn de donkerblauwe amplificatiecurves deze van de gemethyleerde *outside* producten bij gemethyleerde primers. De lichtblauwe amplificatiecurves zijn deze van de gemethyleerde *outside* producten bij ongemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de ongemethyleerde stalen met ongemethyleerde primers zijn weergegeven in het lichtbruin. De amplificatiecurves van de ongemethyleerde stalen met de gemethyleerde primers zijn weergegeven in het donkerbruin.

F. De smeltcurves van *outside* PCR-producten. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hierbij zijn de donkerblauwe amplificatiecurves deze van de gemethyleerde *outside* producten bij gemethyleerde primers. De lichtblauwe amplificatiecurves zijn deze van de gemethyleerde *outside* producten bij ongemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de ongemethyleerde stalen met ongemethyleerde primers zijn weergegeven in het lichtbruin. De amplificatiecurves van de ongemethyleerde stalen met de gemethyleerde primers zijn weergegeven in het donkerbruin.

Om te kijken welke PCR-producten werden gevormd, werd een gelelektroforese uitgevoerd op de controlestalen na qPCR.



Figuur 63 Resultaat qPCR op controlestalen met MyTaq™ HS mix voor MGMT-analyse na gelelektroforese. In de eerste baan is telkens een 100 basenparenladder geladen. Met behulp van deze ladder kan de grootte van de PCR-producten geschat worden. Verder wordt bovenaan de gel het staal weergegeven. UK staat voor ongemethyleerd staal van de Qiagen PCR control DNA kit. MK staat voor gemethyleerd staal van de Qiagen PCR control DNA kit. UL staat voor ongemethyleerd staal van het labo. ML staat voor gemethyleerd staal van het labo. Verder staat bovenaan de gel nog welke primers bij het staal zijn gevoegd. Zo staat U voor de ongemethyleerde primers en M voor gemethyleerde primers. Als laatste wordt bovenaan de gel de *annealing*temperatuur weergegeven waarbij de PCR-producten gevormd zijn.

Op figuur 63 is het resultaat zichtbaar van de gelelektroforese op de PCR-producten na qPCR. Deze qPCR werd uitgevoerd op de controlestalen met een mastermix op basis van MyTaq™ HS mix voor de MGMT-analyse. De blanco bevat zowel voor de mastermix met gemethyleerde als ongemethyleerde primers lichte banden ruim onder 100 basenparen.

De zeer lichte band kan wijzen op primerdimeren. Op basis van bovenstaande waarneming kan gesteld worden dat de PCR-reactie gelukt is.

Voor de meeste controlestalen zijn zowel banden waar te nemen bij de gemethyleerde primers als de ongemethyleerde primers. Hierbij kan worden opgemerkt dat naarmate de *annealing*temperatuur lager wordt er meer een smeer te zien is. Zo is bij *annealing*temperatuur 54°C en 56°C een echte smeer waarneembaar. Verder zijn bij *annealing*temperatuur 66°C en 64°C duidelijke banden waar te nemen. Dit wijst op het feit dat de *annealing*temperatuur rond 64°C gaat liggen.

Bij de ongemethyleerde controles met de gemethyleerde primers zijn ook banden waar te nemen. Dit heeft hoogstwaarschijnlijk te maken met contaminatie. Aangezien niet bij elke ongemethyleerd staal een band is waar te nemen. Deze contaminatie is daarom waarschijnlijk niet te wijten aan een

gecontamineerde mastermix. Wel kan de contaminatie veroorzaakt worden door de omgeving waarin het staal bij de mastermix wordt gepipetteerd. Dit is namelijk een UV-kast waarin voor andere analyses met PCR-producten wordt gewerkt. Voor de gemethyleerde controles met ongemethyleerde primers liggen de banden ruim onder 100 basenparen en zijn ze lichter van kleur. Dit wijst op de vorming van primerdimeren.

Aangezien de eerste qPCR met SensiFast™ HRM mix ook werd ingezet met een te hoge primerconcentratie (100 µM), werd de qPCR nogmaals ingezet op controlestalen met SensiFast™ HRM mix. Dit enkel voor de *annealing*temperaturen 64°C en 66°C. Bij deze temperaturen waren op de gel (figuur 63) mooie banden waar te nemen. In figuur 64 wordt het resultaat van deze qPCR weergegeven.

Op onderstaande figuur (figuur 64A) wordt het overzicht van de amplificatiecurves weergegeven. De bijhorende smeltcurves worden weergegeven in figuur 64B.

Op figuur 64C worden de amplificatiecurves van de blanco weergegeven. Hierbij wordt amplificatie waargenomen bij de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers. Dit voor zowel de *annealing*temperaturen 64°C en 66°C. Verder wordt ook amplificatie waargenomen voor blanco van de mastermix met gemethyleerde primers. Dit enkel voor *annealing*temperatuur 64°C.

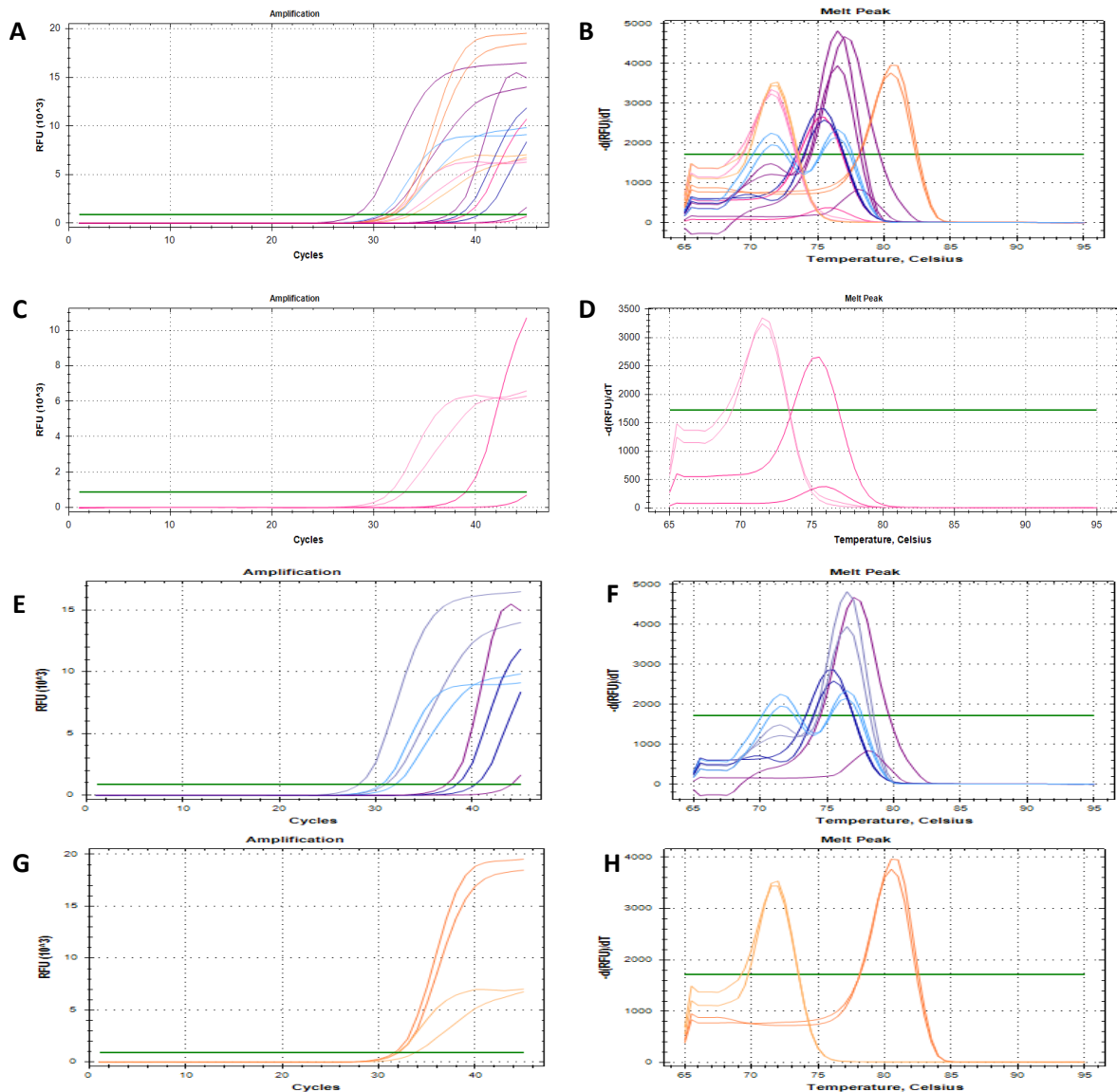
De amplificatie van de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers kan te wijten zijn aan primerdimeren. Vermits het amplificatiesignaal vrij laag is. De amplificatie van de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers kan te wijten zijn aan contaminatie omdat hier maar één blanco amplificatie vertoont. Op figuur 64D worden de smeltcurves van de blanco's getoond. Hieruit is af te leiden dat de blanco's van de mastermix met ongemethyleerde primers dezelfde smelttemperatuur hebben. Verder liggen ook de blanco's van de mastermix met gemethyleerde primers rond dezelfde smelttemperatuur. Dit kan ook in de richting van primerdimeren wijzen.

De amplificatiecurves van de ongemethyleerde controles worden weergegeven op figuur 64E. Hierbij vertonen de ongemethyleerde controles amplificatie. Deze amplificatie wordt wel pas laat gedetecteerd. Verder wordt ook amplificatie waargenomen bij de ongemethyleerde controles met gemethyleerde primers. Deze amplificatie wordt zeer laat gedetecteerd.

Aangezien de amplificatie van de ongemethyleerde controles met gemethyleerde primers vrij laat gedetecteerd wordt, kan dit te wijten zijn aan primerdimeren. In figuur 64F worden de bijhorende smeltcurves weergegeven. Uit deze curve is af te leiden dat er specifieke producten gevormd worden. Dit is zichtbaar aan de curve vermits deze twee smelttemperaturen geeft voor één staal.

In figuur 64G worden de amplificatiecurves weergegeven van de gemethyleerde controle. Ook voor deze stalen is zowel amplificatie waar te nemen voor de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. De gemethyleerde stalen met ongemethyleerde primers hebben echter een lager amplificatieniveau dan deze met gemethyleerde primers.

Het lager amplificatieniveau is waarschijnlijk te wijten aan vorming van primerdimeren.



Figuur 64 Resultaat van qPCR op controlestalen met SensiFast™ HRM mix voor MGMT-analyse.

A. Overzicht van de amplificatiecurves van de controlestalen bij verschillende *annealing*stemperatuur 64°C en 66°C. De controlestalen werden ingezet met een mastermix voor de gemethyleerde primers en mastermix voor de ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurves van de controlestalen hebben voor elke *annealing*stemperatuur een andere kleur gekregen. Zo zijn de amplificatiecurves bij 66°C blauw, de amplificatiecurves bij 64°C paars, de amplificatiecurves bij 62°C oranje.

B. Overzicht van de smeltcurves van de controlestalen bij verschillende *annealing*stemperaturen 64°C en 66°C. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hier geldt dezelfde kleurcode als bij de amplificatiecurves in figuur A.

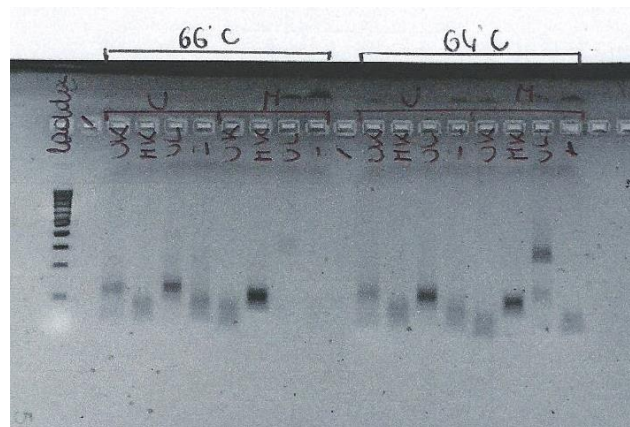
C. Amplificatiecurves van de blanco's bij *annealing*stemperatuur 64°C en 66°C. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hier geldt dezelfde kleurcode als in figuur A. De curve in het lichtroze is voor de mastermix met ongemethyleerde primers en in het donkerroze voor de mastermix met gemethyleerde primers.

D. Smeltcurves van de blanco's bij *annealing*stemperatuur 64°C en 66°C. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. De curve in het lichtroze is voor de mastermix met ongemethyleerde primers en in het donkerroze voor de mastermix met gemethyleerde primers.

E. De amplificatiecurves van de gemethyleerde controle, IvD, met de gemethyleerde primers weer. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij is de curve in het lichtoranje van de controle met ongemethyleerde primers en de curve in het donkeroranje van de controle met gemethyleerde primers.

F. De smeltcurves van de gemethyleerde controle bij de verschillende temperaturen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hierbij is de curve in het lichtoranje van de controle met ongemethyleerde primers en de curve in het donkeroranje van de controle met gemethyleerde primers.

Om te kijken welke PCR-producten gevormd werden, werd een gelelektroforese uitgevoerd op de PCR-producten na de qPCR.



Figuur 65 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten na qPCR op controlestalen met SensiFast™ HRM (MGMT-analyse). In de eerste laan werd een 100 basenparenladder toegevoegd. Hiermee kan de lengte van het PCR-product worden afgeleid. Bovenaan de gel worden de stalen vermeld. Hiernaast wordt een M of een U vermeld. Dit wijst erop of bij het staal primers voor gemethyleerde of ongemethyleerde sequenties zijn toegevoegd. Voor deze analyse werden vier controlestalen gebruikt, nl. ongemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (UK), gemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (MK), ongemethyleerd staal in het labo bereid (UL) en een blanco (-).

Op figuur 65 is het resultaat van de gelelektroforese op de PCR-producten na qPCR zichtbaar. Deze qPCR werd uitgevoerd op de controlestalen met als mastermix SensiFast™ HRM mix. Hierbij werd als *annealing*temperatuur 64°C en 66°C weergegeven.

De blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers vertoont een band bij beide *annealing*temperaturen. De blanco van mastermix met gemethyleerde primers vertoont enkel een band bij *annealing*temperatuur 64°C.

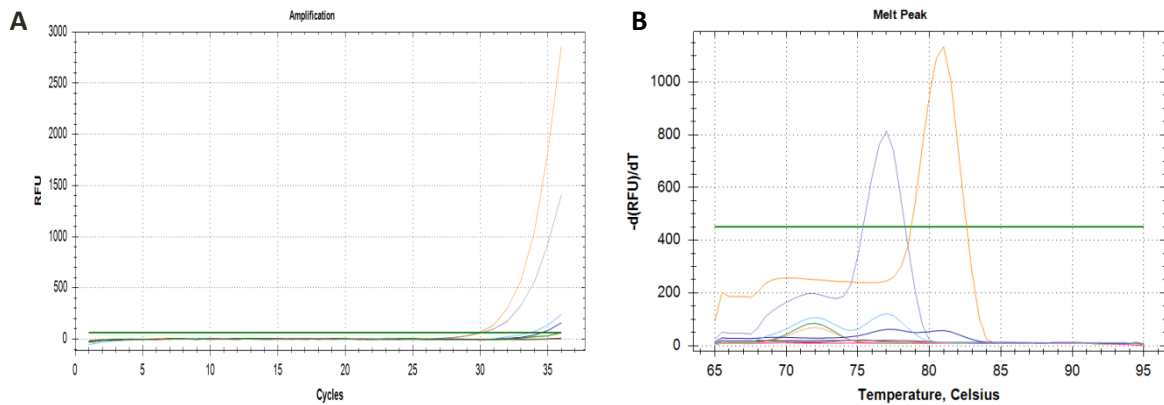
Deze banden zijn licht en liggen ruim onder 100 basenparen. Dit wijst op primerdimeren. De PCR-reactie is dus gelukt.

Voor de controlestalen zijn zowel banden waar te nemen bij de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Deze banden zijn niet strak.

De ongemethyleerde controles met ongemethyleerde primers geven een band weer bij 100 basenparen. Dit geldt ook voor de gemethyleerde controles met gemethyleerde primers. Dit komt overeen met de verwachte waarde, nl. 81 basenparen voor PCR-producten gevormd met de gemethyleerde primers en 93 basenparen voor PCR-producten gevormd met ongemethyleerde primers. De ongemethyleerde controles met gemethyleerde primers geven ook een band weer. Net zoals de gemethyleerde controles met de ongemethyleerde primers. Deze band ligt echter ruim onder 100 basenparen. Dit wijst op vorming van primerdimeren.

Bij 64°C zijn bij de ongemethyleerde controles met gemethyleerde primers twee banden waar te nemen. Hierbij zijn waarschijnlijk specifieke PCR-producten gevormd met een grootte van 300 basenparen. Dit kan wijzen op contaminatie van het staal.

De qPCR werd nogmaals herhaald op de controlestalen bij *annealing*temperatuur 64°C. Hierbij werd het aantal cycli verlaagd naar 35. Dit om de amplificatie van primerdimeren te vermijden. Verder werd ook de hoeveelheid primer voor de mastermix gehalveerd. Ook dit werd gedaan om de vorming van primerdimeren te voorkomen.



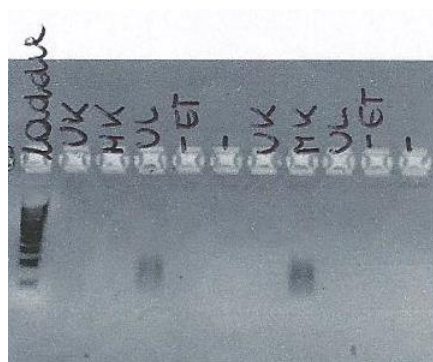
Figuur 66 Resultaat van qPCR op controlestalen met SensiFast™ HRM mix voor MGMT-analyse bij *annealing*temperatuur 64°C. Hierbij werd het aantal cycli verminderd tot 35, verder werd de hoeveelheid primer gehalveerd.

A. Amplificatiecurves van de controlestalen. De controlestalen werden ingezet met een mastermix voor de gemethyleerde primers en mastermix voor de ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij is de amplificatiecurve van de ongemethyleerde controle met de ongemethyleerde primers lichtblauw weergegeven. De amplificatiecurve van de gemethyleerde controle met gemethyleerde primers is in het donkeroranje weergegeven. Verder is de amplificatiecurve van de ongemethyleerde controle met de gemethyleerde primers donkerblauw. De amplificatiecurve voor de gemethyleerde controle met de ongemethyleerde primers is in het lichtoranje weergegeven. De amplificatiecurves van de blanco zijn in het lichtroze weergegeven voor de gemethyleerde primers en in het donkerroze voor de ongemethyleerde primers.

B. Smeltcurves van de controlestalen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hier geldt dezelfde kleurcode als bij de amplificatiecurves in figuur A.

Op figuur 66A wordt een overzicht gegeven van de amplificatiecurves van de controlestalen met mastermix SensiFast™ HRM mix. Op deze figuur is geen amplificatie waar te nemen voor zowel de blanco van de mastermix met ongemethyleerde als gemethyleerde primers. De gemethyleerde controle geeft enkel amplificatie weer bij de gemethyleerde primer. De ongemethyleerde controle geeft enkel amplificatie weer bij de ongemethyleerde primer. Deze resultaten worden bevestigd door de smeltcurves (figuur 66B). Op basis van voorgaande bespreking kan worden gesteld dat de qPCR gelukt is.

Om te kijken welke PCR-producten gevormd werden, werd een gelelektroforese uitgevoerd op de PCR-producten van de qPCR.



Figuur 67 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten na qPCR op controlestalen met SensiFast™ HRM mix voor MGMT-analyse bij een *annealing*temperatuur van 64°C. Hierbij werd het aantal cycli verminderd naar 35. Verder werd de hoeveelheid primer gehalveerd. In de eerste laan werd een 100 basenparenladder geladen. Hiermee kan de grootte van de PCR-producten geschat worden. Bovenaan de gel wordt het staal vermeld met hierbij een U of een M. Dit wijst op de primers die werden toegevoegd. Zo staat U voor ongemethyleerde primers en M staat voor gemethyleerde primers. Op deze gel worden drie controlestalen geladen, nl. ongemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (UK), gemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (MK), ongemethyleerd staal in het labo bereid (UL). Verder wordt nog twee blanco's meegenomen.

Op figuur 67 is het resultaat van de gelelektroforese van de PCR-producten na qPCR zichtbaar. Voor zowel de blanco van de mastermix met gemethyleerde als ongemethyleerde primers is geen band zichtbaar. Dit wijst erop dat geen contaminatie heeft plaatsgevonden. Naast deze blanco werd bij de mastermix in plaats steriel H₂O , ethanol toegevoegd. Ook bij deze blanco is geen band zichtbaar.

Verder is enkel een band waar te nemen bij de negatieve controle met ongemethyleerde primers en bij de positieve controle met gemethyleerde primers. Dit wijst op het feit dat de PCR-reactie gelukt is. Bij deze PCR-reactie zijn geen primerdimeren waar te nemen.

De qPCR is geoptimaliseerd voor de SensiFast™ HRM mastermix. Verder werd als *annealing*temperatuur 64°C aangenomen.

4.2.1.2. GEOPTIMALISEERDE QPCR OP PATIËNTENSTALEN VOOR MGMT-GEN

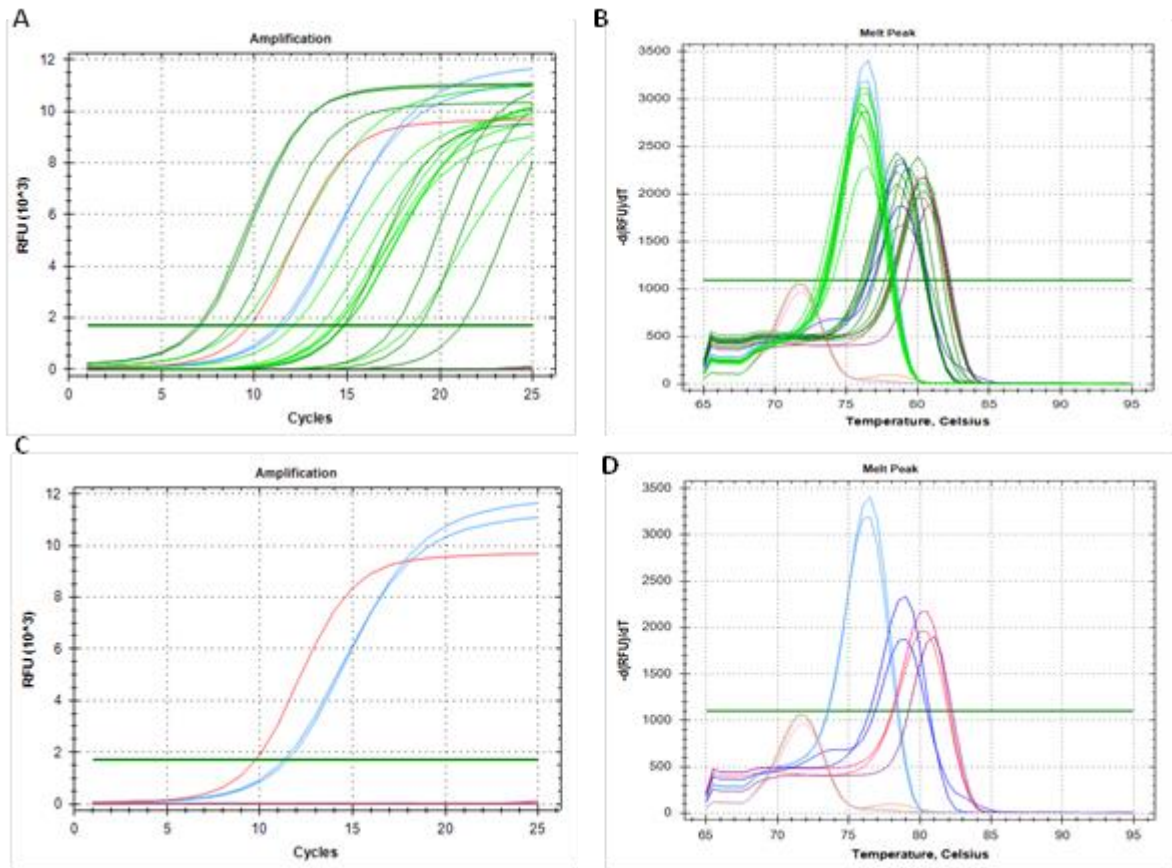
Na de optimalisatie van de qPCR op controlestalen kan deze worden uitgetest op patiëntestalen. De patiëntestalen die voor deze analyse worden gebruikt zijn terug te vinden in bijlage 16 en 17.

QPCR OP PATIËNTENSTALEN EN CELLIJNEN

De qPCR werd geoptimaliseerd op controlestalen. Hierbij werd de mastermix met buffer SensiFast™ HRM (Cat.no. BIO-32002) gebruikt. Verder werd het PCR-programma geoptimaliseerd met als *annealing*temperatuur 64°C. Voor deze analyse werd geopteerd voor een *nested* PCR vermits de banden van de PCR-producten op gel vrij vaag waren en de amplificatie vrij laat gedetecteerd werd. Een *nested* PCR verhoogt de specificiteit van de reactie. Voor deze analyse werd vooraf aan de qPCR een gewone PCR uitgevoerd met *outside* primers. Daarna werden de PCR-producten 1000x verdund. De verdunde PCR-producten werden geanalyseerd via qPCR. Het aantal cycli van de qPCR werd verlaagd naar 25 aangezien vooraf een PCR-reactie wordt uitgevoerd om de specificiteit te verhogen.

De qPCR werd uitgetest op een aantal cellijnen en patiëntestalen (Bijlage 16). Deze stalen en cellijnen hebben vooraf aan deze qPCR een bisulfietbehandeling ondergaan.

Op de stalen werd in een ander labo in het azM (*research*) een MSP uitgevoerd. De bekomen resultaten van de qPCR kunnen worden vergeleken met de resultaten van de reeds uitgevoerde MSP. De resultaten van de cellijnen zijn terug te vinden in artikels (zie 3. Materiaal en methoden; 3.1. materiaal; 3.1.1 Aantonen van promotor hypermethylering op het MLH1-gen en het MGMT-gen: cellijnen).



Figuur 68 Resultaat van qPCR op patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse.

A. Overzicht van de amplificatiecurves van de patiëntenstalen en controlestalen met gemethyleerde en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij zijn in het lichtgroen de amplificatiecurves van de stalen aangeduid met ongemethyleerde primers en in het donkergroen de amplificatiecurves van de stalen met gemethyleerde primers. Verder is de amplificatiecurve van de blanco voor de ongemethyleerde primers lichtroze gekleurd en voor de gemethyleerde primer donkerroze gekleurd. De amplificatiecurve van de controle van de bisulfietbehandeling is lichtpaars gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve van de ongemethyleerde controle is lichtblauw gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkerblauw voor de gemethyleerde primers. Verder is de amplificatiecurve voor de gemethyleerde controle lichtoranje gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkeroranje voor de gemethyleerde primers.

B. Overzicht van de smeltcurves van de patiëntenstalen en controlestalen met gemethyleerde en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hierbij geldt dezelfde kleurcode als bij figuur 67A.

C. Amplificatiecurves van de controlestalen voor zowel gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Zo is de amplificatiecurve van de blanco voor de ongemethyleerde primers lichtroze gekleurd en voor de gemethyleerde primer donkerroze gekleurd. De amplificatiecurve van de controle van de bisulfietbehandeling is lichtpaars gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve van de ongemethyleerde controle is lichtblauw gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkerblauw voor de gemethyleerde primers. Verder is de amplificatiecurve voor de gemethyleerde controle lichtoranje gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkeroranje voor de gemethyleerde primers.

D. Smeltcurves van de controlestalen voor zowel gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hierbij geldt dezelfde kleurcode als figuur C.

Het resultaat van de qPCR is een amplificatiecurve. Een overzicht van de amplificatiecurves van de stalen wordt weergegeven in figuur 68A. Verder worden ook de smeltcurves van de stalen weergegeven in figuur 68B.

Op figuur 68C zijn de amplificatiecurves van de controlestalen weergegeven. Hierbij kan worden waargenomen dat de ongemethyleerde controles bij ongemethyleerde primers amplificatie

vertonen. De gemethyleerde controle vertoont amplificatie bij gemethyleerde primers. Verder kan worden opgemerkt dat de blanco's, zowel van de bisulfietbehandeling als de PCR-reactie, mooi negatief blijven, dus geen amplificatie vertonen. Dit geldt ook voor de ongemethyleerde controle met gemethyleerde primers en de gemethyleerde controle met de ongemethyleerde primers.

De smeltcurves van de controlestalen (figuur 68C) weergeven verschillende pieken. Hierbij worden enkel de pieken van de ongemethyleerde controles met ongemethyleerde primers en de gemethyleerde controle met de gemethyleerde primers verwacht. Op deze figuur zijn ook smeltcurves waar te nemen voor de controlestalen van de ongemethyleerde primers. Deze blijven echter onder de detectielimiet.

De smeltcurves van de blanco's bij de gemethyleerde primers kunnen wijzen op contaminatie. De smeltcurves van de blanco's bij de ongemethyleerde primers kunnen wijzen op vorming van primerdimeren.

Tabel 34 Ct-waarden van de patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix van de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de delta Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Ook het resultaat van reeds uitgevoerde MSP op de patiëntenstalen wordt weergegeven. De discrepanties die waar te nemen zijn tussen de twee technieken worden in het grijs gearceerd.

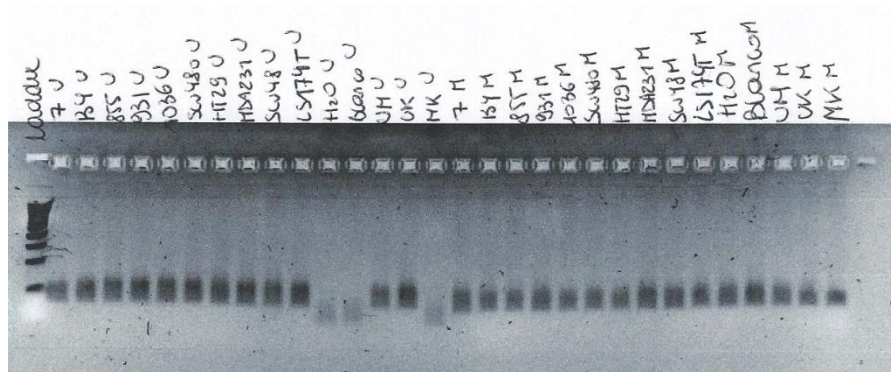
Staal	SW480	HT29	MDA231	SW48	LS174T	MBT14-007	MBT14-134	MBT14-855	MBT14-931	MBT14-1036
Ct-waarde U	12,12	9,18	14,34	25	14,40	14,83	18,43	14,92	14,19	13,53
Ct-waarde M	7,11	25	14,75	8,69	6,97	21,13	25	18,90	17,55	25
Δ Ct-waarde	5,01	-15,82	-0,41	16,31	7,43	-6,3	-6,57	-3,98	-3,36	-11,47
Resultaat qPCR	M	U	M	M	M	U	U	M	M	U
Oorspronkelijk resultaat	M	U	M	M	/	U	U	M	U	U

De resultaten van de qPCR voor de cellijnen en patiëntenstalen worden aan de hand van de Ct-waarden besproken. De Ct-waarde is de cyclus waarbij het product voldoende geamplificeerd is en er een detecteerbaar fluorescent signaal verkregen wordt.

Op basis van de gekende methylatiestatus van de cellijnen en de resultaten van de MLH1-analyse kan bepaald worden wanneer een staal na analyse met qPCR gemethyleerd of ongemethyleerd is. Als naar de resultaten van de cellijnen wordt gekeken, is een staal met Δ Ct-waarde -0,41 gemethyleerd. Bij de MLH1-analyse lag de cut-off rond een Δ Ct-waarde van -3 voor qPCR. Als naar de Ct-waarde van de qPCR van de stalen voor MGMT-analyse wordt gekeken, kan afgeleid worden dat het staal (MBT14-855) met Ct-waarde van -3,98 gemethyleerd is. Dit wijst erop dat de cut-off van deze analyse lager ligt.

De smeltcurves van de blanco's van de gemethyleerde primers wijzen echter in de richting van contaminatie.

Om te kijken welke PCR-producten gevormd werden, werd een gelelektroforese uitgevoerd op de PCR-producten van de qPCR.



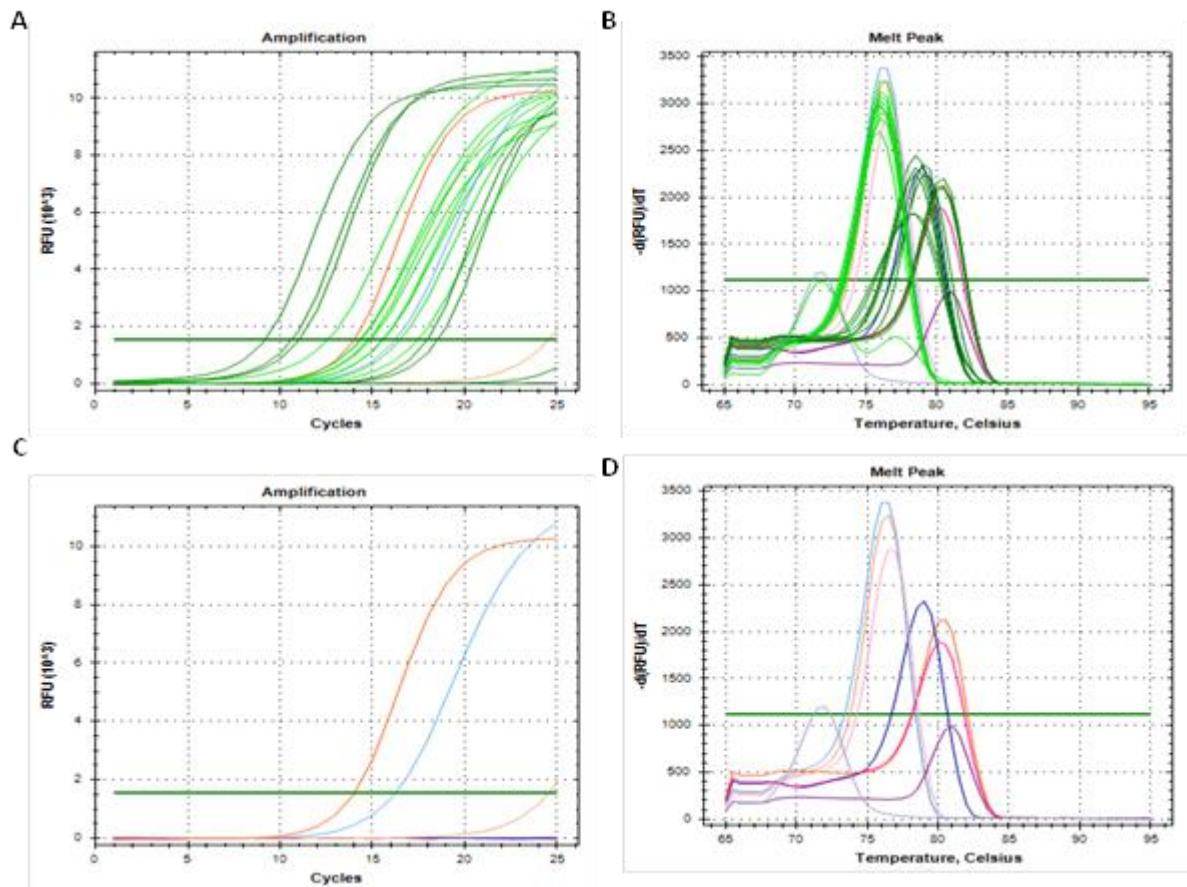
Figuur 69 Resultaat gelelektroforese van PCR-producten na qPCR voor MGMT-analyse. In de eerste laan is een 100 basenparenladder geladen. Hiermee kan de lengte van de PCR-producten geschat worden. Bovenaan de gel worden het nummer van de stalen weergegeven of de naam van de cellijnen. Verder staat bij de nummer of de naam ook het soort primer waarmee de PCR is ingezet. U staat voor ongemethyleerde primers en M staat voor gemethyleerde primers.

Op figuur 69 is het resultaat na gelelektroforese van de PCR-producten van de qPCR op de eerste reeks patiëntenstalen zichtbaar. Bij de blanco van de bisulfietbehandeling, de blanco van de PCR-reactie en de gemethyleerde controle van de mastermix met ongemethyleerde primers is een lichte band waar te nemen ruim onder 100 basenparen. Bij de ongemethyleerde controles zijn banden waar te nemen rond 100 basenparen. Dit komt overeen met de verwachte waarde; nl. voor de PCR-producten van ongemethyleerde primers 93 basenparen en voor de PCR-producten van de gemethyleerde primers 81 basenparen. De PCR-reactie is gelukt voor de mastermix met de ongemethyleerde primers. Verder is bij alle stalen van de mastermix met de ongemethyleerde primers een band waar te nemen. Deze liggen rond 100 basenparen. Ook dit komt overeen met de verwachte waarde.

Bij alle stalen van de mastermix met de gemethyleerde primers (figuur 69) zijn banden waar te nemen rond 100 basenparen. Zo ook de controlestalen en blanco's.

Aangezien bij alle stalen, zowel patiëntenstalen, cellijnen als controlestalen een band zichtbaar is, wijst dit op contaminatie. De resultaten van de stalen zijn hierdoor onbetrouwbaar. De qPCR dient herhaald te worden voor deze stalen.

Op de patiëntenstalen en cellijnen werd een tweede maal de geoptimaliseerde qPCR uitgevoerd. Het resultaat is een amplificatiecurve (figuur 70) met bijhorende Ct-waarden in tabel 35 weergegeven.



Figuur 70 Resultaat herhaling van de qPCR op patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse.

A. Overzicht van de amplificatiecurves van de patiëntenstalen en controlestalen met gemethyleerde en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij zijn in het lichtgroen de amplificatiecurves van de stalen aangeduid met ongemethyleerde primers en in het donkergroen de amplificatiecurves van de stalen met gemethyleerde primers. Verder is de amplificatiecurve van de blanco voor de ongemethyleerde primers lichtroze gekleurd en voor de gemethyleerde primer donkerroze gekleurd. De amplificatiecurve van de controle van de bisulfietbehandeling is lichtpaars gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve van de ongemethyleerde controle is lichtblauw gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkerblauw voor de gemethyleerde primers. Verder is de amplificatiecurve voor de gemethyleerde controle lichtoranje gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkeroranje voor de gemethyleerde primers.

B. Overzicht van de smeltcurves van de patiëntenstalen en controlestalen met gemethyleerde en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hierbij geldt dezelfde kleurcode als bij figuur 67A.

C. Amplificatiecurves van de controlestalen voor zowel gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Zo is de amplificatiecurve van de blanco voor de ongemethyleerde primers lichtroze gekleurd en voor de gemethyleerde primer donkerroze gekleurd. De amplificatiecurve van de controle van de bisulfietbehandeling is lichtpaars gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurve van de ongemethyleerde controle is lichtblauw gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkerblauw voor de gemethyleerde primers. Verder is de amplificatiecurve voor de gemethyleerde controle lichtoranje gekleurd voor de ongemethyleerde primers en donkeroranje voor de gemethyleerde primers.

D. Smeltcurves van de controlestalen voor zowel gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hierbij geldt dezelfde kleurcode als figuur C.

Op figuur 70A wordt een overzicht weergegeven van de amplificatiecurves van de geanalyseerde stalen via qPCR. De smeltcurves van de stalen worden weergegeven in figuur 70B.

Op figuur 70C zijn de amplificatiecurves van de controlestalen weergegeven. Hierbij kan worden waargenomen dat de ongemethyleerde controle bij de ongemethyleerde primers amplificatie vertoont. De gemethyleerde controle vertoont amplificatie bij de gemethyleerde primers. Verder

kan worden opgemerkt dat de blanco's, zowel van de bisulfietbehandeling als de PCR-reactie, mooi negatief blijven, dus geen amplificatie vertonen. Dit geldt ook voor de ongemethyleerde controle met gemethyleerde primers en de gemethyleerde controle met de ongemethyleerde primers. De smeltcurves van de controlestalen (figuur 70C) weergeven verschillende pieken. Hierbij worden enkel de pieken van de ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers en de gemethyleerde controle met de gemethyleerde primers verwacht. Op deze figuur zijn ook smeltcurves waar te nemen voor de controlestalen van de ongemethyleerde primers en gemethyleerde primers.

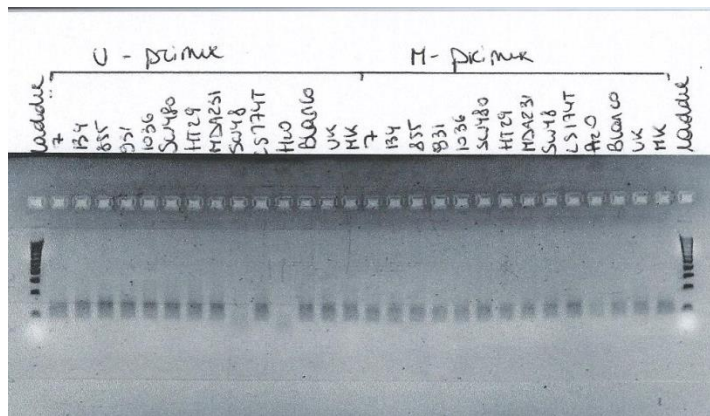
De smeltcurves van de blanco van de PCR-reactie bij zowel de ongemethyleerde als gemethyleerde primers kunnen wijzen op contaminatie.

Tabel 35 Ct-waarden van de patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix van de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de delta Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Als laatste wordt ook het resultaat van de reeds uitgevoerde MSP weergegeven.

Staal	SW480	HT29	MDA231	SW48	LS174T	MBT14-007	MBT14-134	MBT14-855	MBT14-931	MBT14-1036
Ct-waarde U	14,32	12,57	14,92	25	14,37	14,78	15,58	16,48	15,54	17,45
Ct-waarde M	11,04	25	18,00	9,17	10,62	25	25	18,52	25	25
Δ Ct-waarde	3,08	-12,43	-3,08	15,83	3,75	-10,22	-9,42	-2,04	-9,46	-7,55
Resultaat qPCR	M	U	M	M	M	U	U	M	U	U
Oorspronkelijk resultaat	M	U	M	M	/	U	U	M	U	U

De resultaten van de qPCR voor de patiëntenstalen worden aan de hand van de Ct-waarden besproken. Als naar de resultaten van de cellijnen wordt gekeken, is een staal (MDA231) met Δ Ct-waarde -3,08 gemethyleerd. Als naar de Δ Ct-waarde van de patiëntenstalen voor MGMT-analyse wordt gekeken, kan afgeleid worden dat deze resultaten overeenkomen met een cut-off rond -3,08.

Aangezien de smeltcurves van de controlestalen wijzen op contaminatie, wordt een gelelektroforese uitgevoerd op de PCR-producten. Zo kan worden waargenomen welke PCR-producten gevormd werden.



Figuur 71 Resultaat gelelektroforese van PCR-producten na qPCR van herhaling patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse. In de eerste en laatste baan is een 100 basenparenladder geladen. Hiermee kan de lengte van de PCR-producten geschat worden. Bovenaan de gel worden het nummer van de stalen weergegeven of de naam van de cellijn. Verder staat bij het staal ook het soort primer waarmee de PCR is ingezet. U staat voor ongemethyleerde primers en M staat voor gemethyleerde primers.

Op figuur 71 is het resultaat na gelelektroforese van de PCR-producten van de qPCR van de herhaling van de patiëntenstalen reeks 1 zichtbaar. Bij de blanco van de bisulfitbehandeling is geen band waar te nemen bij de ongemethyleerde primers. Bij de andere controlestalen met ongemethyleerde primers is een band waar te nemen. Bij het staal SW48 is een zeer lichte band waar te nemen.

Bij alle stalen van de mastermix met de gemethyleerde primers zijn banden waar te nemen rond 100 basenparen. Zo ook de controlestalen en blanco's.

Aangezien bij de controlestalen van de gemethyleerde en ongemethyleerde primers een band waar te nemen is, wijst dit op contaminatie. Deze contaminatie kan bij de bereiding van de mastermix gebeurd zijn. Dit is onwaarschijnlijk voor de mastermix met ongemethyleerde primers aangezien hier bij de blanco van de bisulfitbehandeling geen band waar te nemen is. Voor de mastermix met ongemethyleerde primers kan dit wel gebeurd zijn. Verder kan de besmetting voorkomen in het PCR-water dat wordt toegevoegd aan de controlestalen om een volume van 25 μ l te bekomen. Daarnaast kan de besmetting veroorzaakt worden door de omgeving waarin gewerkt wordt. Dit is namelijk een UV-kast waar voor andere analyses met PCR-producten gewerkt wordt.

Samenvatting

Uit bovenstaande resultaten van de qPCR en gelelektroforese van patiëntenreeks 1 voor de MGMT-analyse kan worden besloten dat bij enkele controlestalen contaminatie heeft plaatsgevonden. Hierdoor zijn de resultaten van de stalen niet betrouwbaar aangezien hier ook contaminatie kan hebben plaatsgevonden. Hierbij kan wel worden opgemerkt dat bij de twee handelingen andere stalen werden gecontamineerd. Als een vergelijking gemaakt wordt tussen de Ct-waarden van patiëntenstalen van beide analyses (tabel 36) blijkt dat deze Δ Ct-waarde verschillen.

Tabel 36 Ct-waarden van de patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix van de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de delta Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Als laatste wordt ook het resultaat van de reeds uitgevoerde MSP weergegeven.

Staal	SW480	HT29	MDA231	SW48	LS174T	MBT14-007	MBT14-134	MBT14-855	MBT14-931	MBT14-1036
Δ Ct-waarde analyse 1	5,01	-15,82	-0,41	16,31	7,43	-6,3	-6,57	-3,98	-3,36	-11,47
Δ Ct-waarde analyse 2	3,08	-12,43	-3,08	15,83	3,75	-10,22	-9,42	-2,04	-9,46	-7,55
Oorspronkelijk resultaat	M	U	M	M	/	U	U	M	U	U

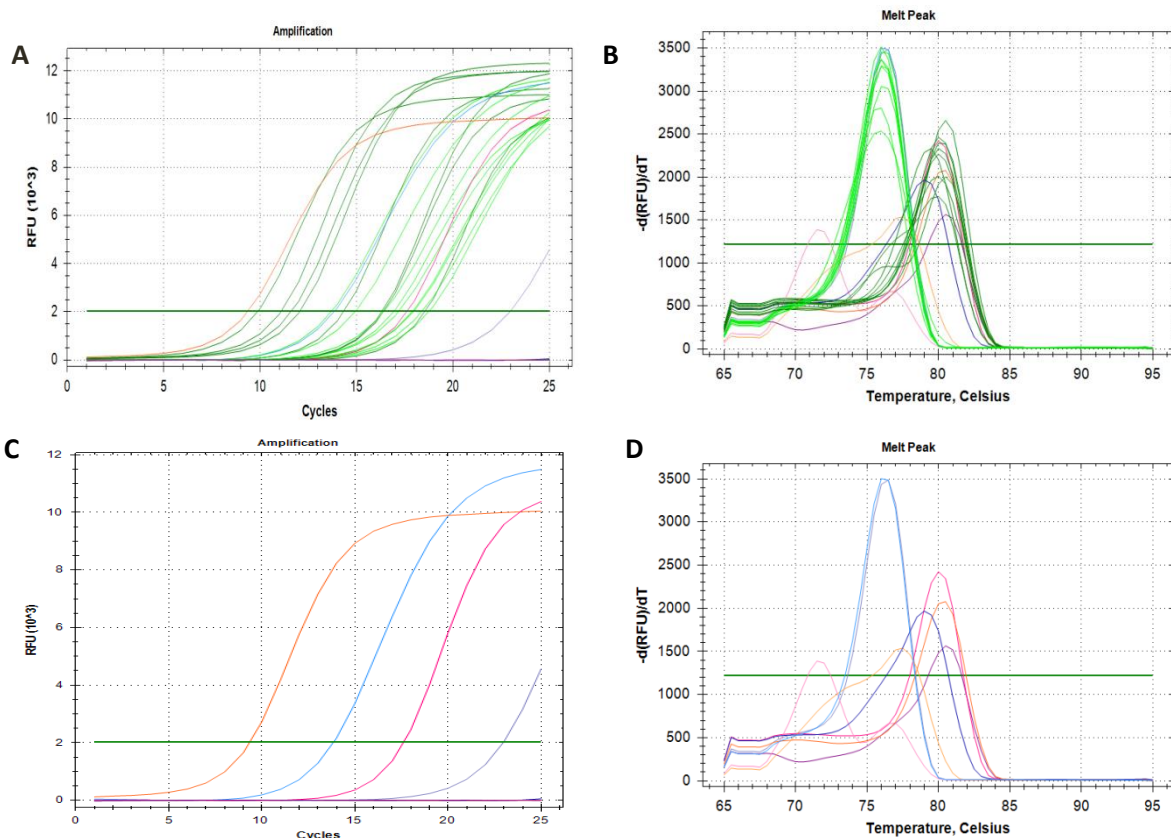
Als naar de Δ Ct-waarde wordt gekeken, kan worden waargenomen dat deze resultaten in dezelfde orde van grootte liggen. Hierbij zijn verschillen tussen de Δ Ct-waardes waar te nemen. Zo is tussen de Δ Ct-waarde van analyse 1 en 2 bij staal MBT14-931 een groot verschil waar te nemen.

QPCR OP PATIËNTENSTALEN REEKS 2

Verder wordt een andere reeks patiëntenstalen (bijlage 17) geanalyseerd via de geoptimaliseerde qPCR. Het DNA van deze stalen moeten nog geïsoleerd worden. Het DNA wordt uit de coupes geïsoleerd met behulp van de Maxwell 16MDx. Na de DNA-isolatie worden de concentratie en de zuiverheid van het DNA gemeten met behulp van de NanoDrop. Deze resultaten zijn terug te vinden in bijlage 15. Verder wordt op de DNA-stalen een SCS-ladder uitgevoerd om de fragmentatie van het DNA te bepalen. De resultaten van deze analyses zijn terug te vinden in bijlage 15. Vooraf aan de qPCR werd een bisulfietbehandeling uitgevoerd op de stalen.

Deze stalen zijn reeds in een labo van het ziekenhuis Radboudumc te Nijmegen geanalyseerd via MSP. De resultaten van deze stalen bekomen via qPCR worden vergeleken met de resultaten van de reeds uitgevoerde MSP.

In deze *run* werden naast de patiëntenstalen van reeks 2 ook de verdunningsstalen meegenomen.



Figuur 72 Resultaat van qPCR op patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse.

A. Amplificatiecurves van de patiëntenstalen en de controlestalen voor zowel gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij zijn de amplificatiecurves van de patiëntenstalen met ongemethyleerde primers en de gemethyleerde primers respectievelijk in het lichtgroen en donkergroen weergegeven. De amplificatiecurve van blanco van de PCR-reactie is in het lichtroze weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerroze weergegeven voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de blanco van de PCR-reactie is in het lichtpaars weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de gemethyleerde controle zijn in het lichtoranje weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkeroranje voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de ongemethyleerde controle zijn in het lichtblauw weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerblauw voor de gemethyleerde primers.

B. Smeltcurves van de patiëntenstalen en de controlestalen voor gemethyleerde en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hier is de kleurcode hetzelfde als A.

C. Amplificatiecurves van de controlestalen met gemethyleerde primers en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurve van blanco van de PCR-reactie is in het lichtroze weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerroze weergegeven voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de blanco van de PCR-reactie is in het lichtpaars weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de gemethyleerde controle zijn in het lichtoranje weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkeroranje voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de ongemethyleerde controle zijn in het lichtblauw weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerblauw voor de gemethyleerde primers.

D. Smeltcurves van de controlestalen met gemethyleerde primers en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. (Zelfde kleurcode als in figuur 72A.)

Het resultaat van de qPCR is een amplificatiecurve. De amplificatiecurves van de geanalyseerde stalen (patiëntenstalen en controlestalen) worden weergegeven in figuur 72A. De bijhorende smeltcurves worden weergegeven in figuur 72B.

Op figuur 72C worden de amplificatiecurves van de controlstalen weergegeven. Hierbij kan worden waargenomen dat de blanco van de PCR-reactie van de mastermix met gemethyleerde primers (donkerroze) amplificatie vertoont. De blanco van de PCR-reactie van de mastermix met

ongemethyleerde primers (lichtroze) en de blanco van de bisulfietbehandeling van de mastermix met gemethyleerde primers (donkerpaars) vertonen geen amplificatie. De blanco van de bisulfietbehandeling met ongemethyleerde primers (lichtpaars) vertoont amplificatie. Deze wordt wel pas laat gedetecteerd. De ongemethyleerde controle vertoont enkel bij de mastermix met ongemethyleerde primers (lichtblauw) amplificatie. De gemethyleerde controle vertoont enkel bij de mastermix met gemethyleerde primers (donkeroranje) amplificatie.

De blanco van de PCR-reactie van de mastermix met gemethyleerde primers vertoont amplificatie. Dit wijst op contaminatie. Deze contaminatie kan veroorzaakt zijn door de mastermix. Dit lijkt onwaarschijnlijk aangezien de blanco van de bisulfietbehandeling bij deze mastermix geen amplificatie vertoont. Verder kan deze contaminatie veroorzaakt worden door de omgeving waarin DNA bij de mastermix wordt gepipetteerd. Dit is een UV-kast waarin voor andere analyses met PCR-producten gewerkt wordt.

De blanco van de bisulfietbehandeling vertoont echter zeer laat amplificatie. Dit kan te wijten zijn aan primerdimeren of aan een lichte contaminatie. Als naar de smeltcurves van de controlestalen (figuur 72D) wordt gekeken, kan worden bevestigd dat contaminaties hebben plaatsgevonden. Zo heeft de blanco van de bisulfietbehandeling met de ongemethyleerde primers (lichtpaars) dezelfde smeltemperatuur als de ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers (lichtblauw). Dit wijst op het feit deze blanco gecontamineerd is en geen primerdimeren gevormd zijn. Verder heeft de blanco van de PCR-reactie met gemethyleerde primers (donkerroze) ongeveer dezelfde smeltemperatuur als de gemethyleerde controle met gemethyleerde primers (donkeroranje). Dit wijst opnieuw in de richting van contaminatie.

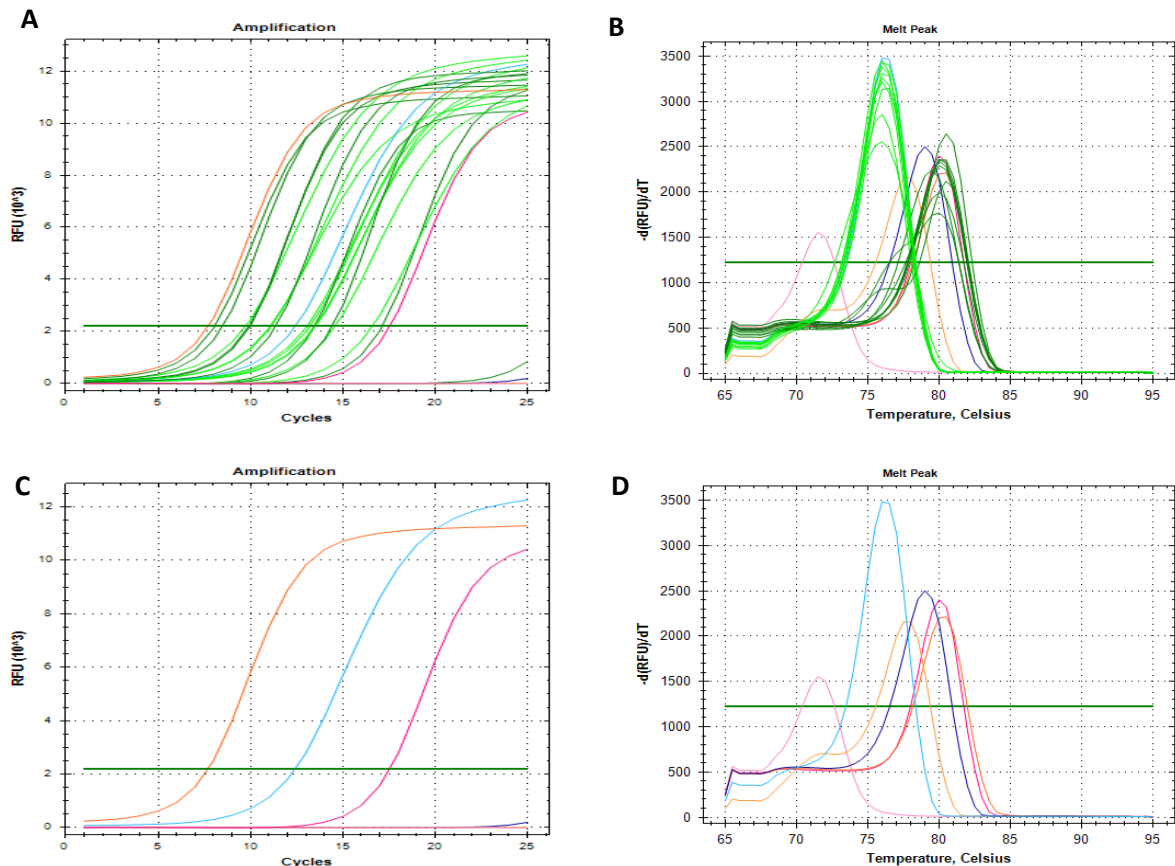
Tabel 37 Ct-waarden van de patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix van de ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de delta Ct-waarde weergegeven. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Verder wordt ook het resultaat van de reeds uitgevoerde MSP weergegeven. De discrepanties tussen de twee technieken worden in het grijs gemarkeerd.

Staal	T13/08423	T13/12990	T13/15617	T13/20564	T14/14986	T14/15908	T14/17044	T14/17068	T14/17146
Ct-waarde U	17,19	16,95	14,95	18,39	18,76	16,42	13,70	17,98	17,91
Ct-waarde M	14,33	18,54	25	16,39	11,09	11,61	16,31	12,06	9,89
Δ Ct-waarde	2,86	-1,59	-10,05	2	7,67	4,81	-2,61	5,92	8,02
Resultaat qPCR	M	M	U	M	M	M	M	M	M
Oorspronkelijk resultaat	M	U	U	U	M	M	U	M	M

De resultaten van de qPCR op de patiëntenstalen reeks 2 worden aan de hand van Ct-waarden besproken (tabel 37). Uit de grafiek zijn drie discrepanties waar te nemen. Dit is vrij veel voor de beperkte reeks stalen die hier getest werd. Deze discrepanties kunnen te wijten zijn aan de contaminatie die heeft plaatsgevonden. Verder kunnen deze discrepanties ook te wijten zijn aan het feit dat bij de MSP in Nijmegen een groter gebied van de sequentie geanalyseerd werd (bijlage 11).

Vermits de resultaten onbetrouwbaar zijn door de contaminaties in de blanco's, wordt geopteerd op deze analyse te herhalen.

De qPCR werd opnieuw herhaald voor de patiëntenstalen van reeks 2. Hierbij werden de *outside* PCR-producten van de vorige analyse 1000x verdund.



Figuur 73 Resultaat van herhaling van qPCR op *outside* PCR-producten (MGMT-analyse).

A. Amplificatiecurves van de verschillende patiëntenstalen en controlestalen. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurves van de patiëntenstalen met ongemethyleerde primers worden weergegeven in het lichtgroen. De amplificatiecurves van de patiëntenstalen met gemethyleerde primers worden weergegeven in het donkergroen. In het donkerroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers. In het lichtroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers. De ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtblauw. De ongemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkerblauw. De gemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkeroranje. De gemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtoranje.

B. Bijhorende smeltcurves van de verschillende patiëntenstalen en controlestalen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hierbij geldt dezelfde kleurcode als op figuur 73A werd weergegeven.

C. Amplificatiecurves van de controlestalen met zowel de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. In het donkerroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers. In het lichtroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers. De ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtblauw. De ongemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkerblauw. De gemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkeroranje. De gemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtoranje.

D. Bijhorende smeltcurves van de controlestalen met zowel de gemethyleerde als ongemethyleerde primers (zelfde kleurcode als op figuur 73C). Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven.

Op figuur 73A wordt een overzicht weergegeven van de amplificatiecurves van de geanalyseerde stalen via qPCR. Dit zowel voor de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. De bijhorende smeltcurves worden weergegeven in figuur 73B.

Op figuur 73C zijn de amplificatiecurves zichtbaar van de controlestalen. Dit zowel voor de mastermixen met de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Hierbij kan worden waargenomen dat blanco van de PCR-reactie van de mastermix met ongemethyleerde primers (lichtroze) geen amplificatie vertoont. De blanco van de PCR-reactie van de mastermix met gemethyleerde primers (donkerroze) vertoont echter wel amplificatie. De ongemethyleerde controle vertoont enkel amplificatie bij de ongemethyleerde primers (lichtblauw). Verder vertoont de gemethyleerde controle enkel amplificatie bij de gemethyleerde primers (donkeroranje).

Vermits de blanco van de PCR-reactie van de mastermix met gemethyleerde primers amplificatie vertoont, kan gesteld worden dat deze PCR-reactie niet gelukt is. De amplificatie van deze blanco wijst op contaminatie. Deze besmetting zit waarschijnlijk niet in de mastermix met gemethyleerde primers. Dit kan gesteld worden aangezien de ongemethyleerde controle geen amplificatie vertoont bij de gemethyleerde primers. Verder kan deze besmetting gebeurd tijdens het overbrengen van het DNA bij de mastermix. Hierbij wordt gewerkt in een UV-kast waar voor andere analyses met PCR-producten gewerkt wordt. Een andere optie is dat de besmetting tijdens de bereiding van de *outside* PCR, vooraf aan de qPCR, veroorzaakt werd.

De bijhorende smeltcurves van de controlestalen (figuur 73C) weergeven verschillende pieken. Hierbij worden enkel de curves van de ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers en gemethyleerde controle met gemethyleerde primers verwacht. De andere pieken wijzen in de richting van contaminatie.

Tabel 38 Ct-waarden van herhaling van de qPCR op de patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden voor stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de Δ Ct-waarde berekend. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Verder wordt het resultaat van de reeds uitgevoerde MSP op de patiëntenstalen weergegeven. De discrepanties worden weergegeven in het grijs.

Staal	T13/08423	T13/12990	T13/15617	T13/20564	T14/14986	T14/15908	T14/17044	T14/17068	T14/17146
Ct-waarde U	13,06	11,07	9,71	13,44	13,50	14,56	11,12	16,58	13,21
Ct-waarde M	9,90	13,44	25	17,12	8,46	9,98	14,39	11,33	8,05
Δ Ct-waarde	3,16	-2,37	-15,29	-3,68	5,04	4,58	-3,27	5,25	5,16
Resultaat qPCR	M	M	U	M/U	M	M	M	M	M
Oorspronkelijk resultaat	M	U	U	U	M	M	U	M	M

De resultaten van tweede poging van de qPCR op de patiëntenstalen reeks 2 voor de MGMT-analyse worden aan de hand van de Ct-waarden besproken (tabel 38). Uit de tabel zijn drie discrepanties waar te nemen. Deze discrepanties kunnen te wijten zijn aan de contaminatie die heeft plaatsgevonden. Verder kunnen deze discrepantie te wijten zijn aan het feit dat bij MSP in Nijmegen een groter gebied werd gedetecteerd dan met deze qPCR (zie bijlage 11).

Samenvatting

Uit bovenstaande resultaten van de qPCR op patiëntenstalen reeks 2 voor de MGMT-analyse kan worden besloten dat bij enkele controlestalen van de PCR-reactie contaminatie heeft plaatsgevonden. Hierdoor zijn de resultaten van de stalen niet betrouwbaar aangezien hier ook contaminatie kan hebben plaatsgevonden. Hierbij kan wel worden opgemerkt dat bij de twee handelingen andere stalen werden gecontamineerd. Als een vergelijking gemaakt wordt tussen de Δ Ct-waarden van de patiëntenstalen van de qPCR (tabel 39), kan worden opgemerkt dat de Ct-waarde van de stalen bij de verschillende analyses bij elkaar in de buurt liggen. Doch zijn er bij sommige stalen grote verschillen waar te nemen, zoals bij staal T13/20564. Dit staal zou bij de eerste analyse worden behandeld als gemethyleerd. Terwijl bij de tweede analyse hierover twijfel kan optreden omdat de Δ Ct-waarde geen duidelijk resultaat biedt. Verder kan worden opgemerkt dat in beide analyses dezelfde discrepanties terugkomen. Dit bij staal T13/12990, T13/20564 en T14/17044. Dit heeft waarschijnlijk te maken met het gebied dat door de twee analyses, MSP en qPCR, wordt geanalyseerd. Hierbij wordt in de MSP (uitgevoerd in Radboudumc te Nijmegen) een groter gebied geanalyseerd dan met de qPCR.

Tabel 39 Overzicht van de Ct-waarde van de patiëntenstalen reeks 1 en 2 voor MGMT-analyse.

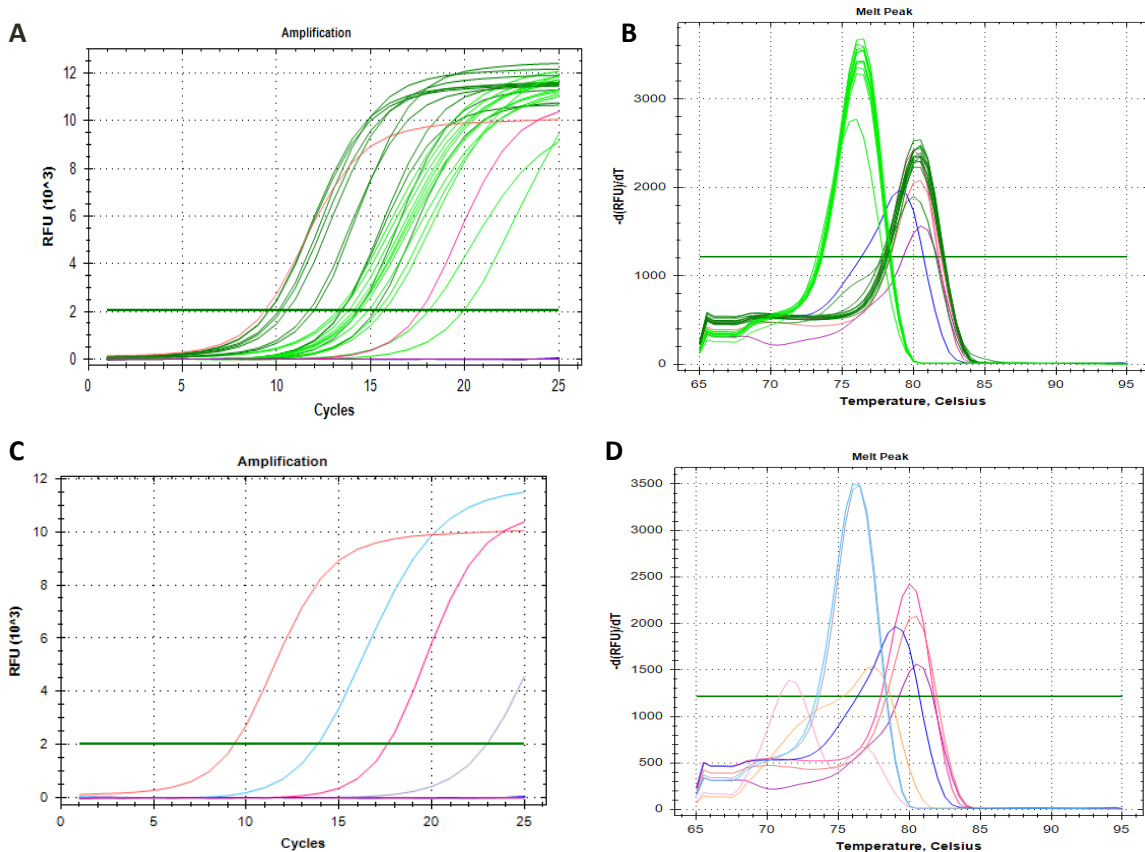
Staal	T13/08423	T13/12990	T13/15617	T13/20564	T14/14986	T14/15908	T14/17044	T14/17068	T14/17146
Δ Ct-waarde analyse 1	2,86	-1,59	-10,05	2	7,67	4,81	-2,61	5,92	8,02
Δ Ct-waarde analyse 2	3,16	-2,37	-15,29	-3,68	5,04	4,58	-3,27	5,25	5,16
Oorspronkelijk resultaat	M	U	U	U	M	M	U	M	M

4.2.1.3. CUT-OFF BEPALING

De cut-off bepaling gebeurt aan de hand van de resultaten van de patiëntenstalen en de resultaten van de verdunningsreeks. Door middel van de qPCR uit te voeren op een verdunningsreeks kan de detectiegrens van de qPCR worden bepaald.

Voor de cut-off bepaling van de qPCR voor de MGMT-analyse wordt dezelfde verdunningsreeks als voor de *pyrosequencing* van de MLH1-analyse gebruikt. Op deze stalen is reeds een bisulfietbehandeling uitgevoerd.

Op de stalen van de verdunningsreeks werd een *nested* PCR uitgevoerd. Zo werd eerst een gewone PCR-reactie met *outside* primers uitgevoerd. Hierna werden de PCR-producten van deze reactie 1000x verdund. Verder werd op de verdunde PCR-producten de geoptimaliseerde qPCR uitgevoerd. Het resultaat van deze qPCR is een amplificatiecurve en is zichtbaar in figuur 74. Naast de verdunningsstalen werden in deze *run* van de qPCR ook de patiëntstalen van reeks 2 meegenomen.



Figuur 74 Resultaat na qPCR van verdunningsreeks MGMT-analyse.

A. Overzicht van amplificatiecurves van de stalen van de verdunningsreeks en de controlestalen voor zowel gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. Hierbij zijn de amplificatiecurves van de stalen van de verdunningsreeks met ongemethyleerde primers en de gemethyleerde primers respectievelijk in het lichtgroen en donkergroen weergegeven. De amplificatiecurve van blanco van de PCR-reactie is in het lichtroze weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerroze weergegeven voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de blanco van de PCR-reactie is in het lichtpaars weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de gemethyleerde controle zijn in het lichtoranje weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkeroranje voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de ongemethyleerde controle zijn in het lichtblauw weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerblauw voor de gemethyleerde primers

B. Bijhorende smeltcurves van de stalen van de verdunningsreeks en de controlestalen voor zowel gemethyleerde en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hier is de kleurcode hetzelfde als A.

C. Amplificatiecurves van controlestalen met gemethyleerde primers en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurve van blanco van de PCR-reactie is in het lichtroze weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerroze weergegeven voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de blanco van de PCR-reactie is in het lichtpaars weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerpaars voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de gemethyleerde controle zijn in het lichtoranje weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkeroranje voor de gemethyleerde primers. De amplificatiecurves van de ongemethyleerde controle zijn in het lichtblauw weergegeven voor de ongemethyleerde primers en in het donkerblauw voor de gemethyleerde primers.

D. Smeltcurves van de controlestalen met gemethyleerde primers en ongemethyleerde primers. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. (Zelfde kleurcode als in figuur D.)

Op figuur 74A wordt een overzicht weergegeven van de amplificatiecurves van de geanalyseerde stalen via qPCR. Dit zowel voor de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. De bijhorende smeltcurves worden weergegeven in figuur 74B.

Op figuur 74C worden de amplificatiecurves weergegeven van de controlestalen. Dit zowel voor de mastermixen met de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Hierbij kan worden waargenomen dat de blanco van de PCR-reactie van de mastermix met de ongemethyleerde

primers (lichtroze) en de blanco van de bisulfietbehandeling van de mastermix met gemethyleerde primers (donkerpaars) geen amplificatie plaatsvindt. De blanco van de mastermix met de gemethyleerde primers (donkerroze) en de blanco van de bisulfietbehandeling met ongemethyleerde primers (lichtpaars) vertonen wel amplificatie. De amplificatie van de bisulfietbehandeling met de ongemethyleerde primers wordt wel pas laat gedetecteerd. De ongemethyleerde controle vertoont enkel bij de mastermix met ongemethyleerd primers (lichtblauw) amplificatie. De gemethyleerde controle vertoont enkel bij de mastermix met gemethyleerde primers (donkeroranje) amplificatie.

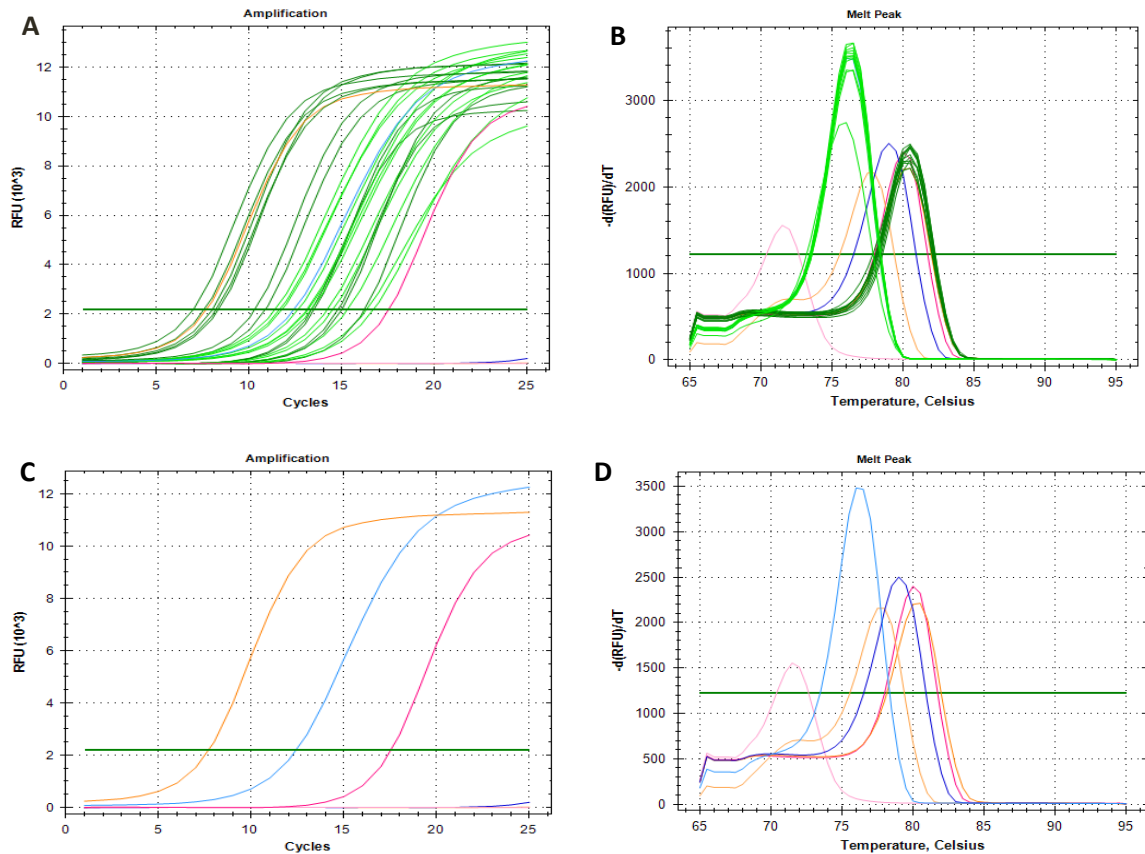
Vermist de blanco van de mastermix met de gemethyleerde primers amplificatie vertoont, wijst dit in de richting van contaminatie. Deze kan veroorzaakt zijn bij de bereiding van de mastermix. Dit lijkt onwaarschijnlijk aangezien de blanco van de bisulfietbehandeling bij deze mastermix geen amplificatie vertoont. Verder kan deze contaminatie veroorzaakt worden door de omgeving waarin het DNA bij de mastermix wordt gepipetteerd. Dit is een UV-kast waarin voor andere analyses met PCR-producten gewerkt wordt.

De blanco van de bisulfietbehandeling vertoont echter zeer laat amplificatie. Dit kan ofwel te wijten zijn aan primerdimeren ofwel aan contaminatie. Als op figuur 74D naar de smeltcurves van de controlestalen wordt gekeken, kan worden bevestigd dat contaminaties hebben plaatsgevonden. Zo liggen de blanco van de bisulfietbehandeling met ongemethyleerde primers (lichtpaars) en de ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers (lichtblauw) rond dezelfde smelttemperatuur. Dit wijst op contaminatie. Verder ligt de blanco van de mastermix met de gemethyleerde primers (donkerroos) rond dezelfde smelttemperatuur als de gemethyleerde controle met de gemethyleerde primers (donkeroranje). Dit wijst opnieuw in de richting van contaminatie.

Tabel 40 Ct-waarden van verdunningsreeks voor MGMT-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden voor stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de Δ Ct-waarde berekend. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Verder wordt het resultaat van de reeds uitgevoerde MSP op de patiëntenstalen weergegeven.

Verdunning	100% IvD	50% IvD	25% IvD	12,5% IvD	6% IvD	3% IvD	1,5% IvD	0,75% IvD	0,35% IvD	0,18% IvD	0,09% IvD	0,045% IvD
Ct-waarde U	18,08	19,94	15,38	15,68	14,85	14,09	14,27	14,25	13,80	13,21	13,37	14,41
Ct-waarde M	9,59	10,10	9,60	10,22	10,54	11,99	11,70	14,32	13,46	13,43	15,21	25
Δ Ct- waarde	8,49	9,84	5,78	5,46	4,31	2,1	2,57	-0,07	0,34	-0,22	-1,84	-10,59

De resultaten van de verdunningsreeks worden aan de hand van de Ct-waarde (tabel 40) besproken. Uit deze tabel is op te merken dat de Δ Ct-waarde bij 50% IvD al onbetrouwbaar worden. Vermits normaal deze Δ Ct-waarde lager zou moeten liggen dan de Δ Ct-waarde van 100% IvD. Dit heeft waarschijnlijk te maken met de contaminatie die heeft plaatsgevonden. Hierdoor kunnen deze resultaten niet worden meegenomen voor de bepaling van de cut-off.



Figuur 75 Resultaat na qPCR van herhaling van verdunningsreeks op *outside* PCR-producten (MGMT-analyse).

A. Amplificatiecurves van de stalen van de verdunningsreeks en controlestalen. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. De amplificatiecurves van de stalen van de verdunningsreeks met ongemethyleerde primers worden weergegeven in het lichtgroen. De amplificatiecurves van de stalen van de verdunningsreeks met gemethyleerde primers worden weergegeven in het donkergroen. In het donkerroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers. In het lichtroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers. De ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtblauw. De ongemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkerblauw. De gemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkeroranje. De gemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtoranje.

B. Bijhorende smeltcurves van de verschillende stalen van de verdunningsreeks en de controlestalen. Op de X-as wordt de temperatuur weergegeven in graden Celsius. Op de Y-as wordt de afgeleide van de fluorescentie weergegeven. Hierbij geldt dezelfde kleurcode als op figuur A werd weergegeven.

C. Amplificatiecurves van de controlestalen met zowel de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. Op de X-as is het aantal cycli weergegeven. Op de Y-as wordt het amplificatiesignaal weergegeven. In het donkerroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers. In het lichtroze wordt de amplificatiecurve weergegeven van de blanco van de mastermix met ongemethyleerde primers. De ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtblauw. De ongemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkerblauw. De gemethyleerde controle met gemethyleerde primers wordt weergegeven in het donkeroranje. De gemethyleerde controle met ongemethyleerde primers wordt weergegeven in het lichtoranje.

Op figuur 75A wordt een overzicht gegeven van de amplificatiecurves van herhaling van de qPCR op de verdunningsreeks. Dit zowel voor de gemethyleerde als ongemethyleerde primers. De bijhorende smeltcurves worden weergegeven in figuur 75B.

Op figuur 75C worden de amplificatiecurves van de controlestalen weergegeven. Dit zowel voor de mastermix met gemethyleerde primers als ongemethyleerde primers. Hierbij kan worden waargenomen dat de blanco van de PCR-reactie van de mastermix met ongemethyleerde primers (lichtroze) geen amplificatie vertoont. Bij de blanco van de mastermix met gemethyleerde primers

(donkerroze) is echter wel amplificatie waar te nemen. Hiernaast vertoont de ongemethyleerde controle met ongemethyleerde primers (lichtblauw) en de gemethyleerde controle met gemethyleerde primers (donkeroranje) amplificatie.

Vermits de blanco van de PCR-reactie met de mastermix met gemethyleerde primers amplificatie vertoont, kan gesteld worden dat deze PCR-reactie niet gelukt is. Deze amplificatie wijst op contaminatie. Deze besmetting kan tijdens de bereiding van de mastermix hebben plaatsgevonden. Dit is waarschijnlijk niet gebeurd aangezien de ongemethyleerde controle met de gemethyleerde primers geen amplificatie vertoont. Verder kan de besmetting ook gebeurd zijn bij het toevoegen van DNA aan de mastermix. Dit gebeurde in een UV-kast waar voor andere analyses met PCR-producten wordt gewerkt. Hiernaast kan de besmetting ook al hebben plaatsgevonden tijdens de bereiding van de *outside* PCR, vooraf aan de qPCR.

Op de bijhorende smeltcurves van de controlestalen (figuur 75C) zijn verschillende pieken waar te nemen. Hierbij worden enkel de smeltcurves van de ongemethyleerde controlestalen met ongemethyleerde primers en gemethyleerde controlestalen met gemethyleerde primers verwacht. De andere pieken zijn waarschijnlijk te wijten aan contaminatie. Enkel de smeltcurve van de blanco van de ongemethyleerde primers (lichtroze) kan te wijten zijn aan primerdimeren. Aangezien de smeltemperatuur van deze curve vrij laag is.

Tabel 41 Ct-waarden van herhaling van de qPCR op de verdunningsreeks voor MGMT-analyse. In de tabel worden zowel de Ct-waarden voor stalen met de mastermix met gemethyleerde primers (Ct-waarde M) als de Ct-waarden van de stalen met de mastermix met ongemethyleerde primers (Ct-waarde U) weergegeven. Verder wordt de Δ Ct-waarde berekend. Deze wordt berekend door de Ct-waarde U van de Ct-waarde M af te trekken. Daarnaast wordt het resultaat afgeleid uit de amplificatiecurve weergegeven. Verder wordt het resultaat van de reeds uitgevoerde MSP op de patiëntenstalen weergegeven

Verdunning	100% IvD	50% IvD	25% IvD	12,5% IvD	6% IvD	3% IvD	1,5% IvD	0,75% IvD	0,35% IvD	0,18% IvD	0,09% IvD	0,045% IvD
Ct-waarde U	16,33	14,21	14,51	11,38	13,34	15,29	16,70	13,18	11,63	11,76	13,11	12,63
Ct-waarde M	7,55	8,33	7,00	8,03	10,29	15,01	8,20	10,87	13,36	13,49	14,79	16,21
Δ Ct-waarde	8,78	5,88	7,51	3,35	3,05	0,28	8,5	2,31	-1,73	-1,73	-1,67	-3,58

De resultaten van de verdunningsreeks worden aan de hand van de Ct-waarden besproken (tabel 41). Ook hierbij kan worden opgemerkt de resultaten onbetrouwbaar zijn aangezien bij 25% IvD een hogere Δ Ct-waarde heeft dan 50% IvD. Deze analyse dient opnieuw uitgevoerd te worden.

4.2.2. PYROSEQUENCING ALS METHODE OM PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN HET MGMT-GEN TE ANALYSEREN

Naast de *methylation specific* PCR wordt getracht om de methylatiestatus van de promotor van het MGMT-gen te bepalen met behulp van *pyrosequencing*. In Quillien et al. [75] staat de standaardmethode voor deze techniek beschreven. Naast deze standaardmethode is ook een kit van Qiagen beschikbaar voor het detecteren van de methylatiestatus van het MGMT-gen, nl. de *Therascreen* MGMT pyro kit (Cat.no. 971061). Vermits uit Quillien et al. [65] afgeleid kan worden dat CpG74-78, CpG 84, CpG89, CpG 84-88 belangrijke gebieden zijn en met de *therascreen* MGMT pyro kit, een ander gebied geanalyseerd wordt (CpG76-79), worden beide methoden uitgetest.

Vooraf aan de *pyrosequencing* wordt een PCR uitgevoerd om het gewenste stuk DNA te amplificeren. Deze PCR-reactie dient ook voor de MGMT-analyse geoptimaliseerd te worden. Na de optimalisatie worden via controlestalen de programma's van de *pyrosequencing* uitgetest. Na goede resultaten wordt overgegaan op de analyse van patiëntenstalen (bijlage 16 en 17). Verder wordt getracht om een cut-off te bepalen. Deze cut-off wordt aan de hand van twee zaken gesteld. Langs de ene kant worden de resultaten van de patiëntenstalen vergeleken met de oude resultaten. Daarnaast wordt een verdunningsreeks opgesteld met IvD en UM.

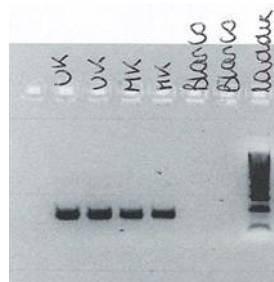
4.2.2.1. OPTIMALISATIE PYROSEQUENCING OP CONTROLESTALEN

Voor de MGMT-analyse worden twee soorten pyroPCR's ingezet. De pyroPCR van de *therascreen* MGMT pyro kit is al geoptimaliseerd. Toch wordt deze ter controle uitgetest op de controlestalen. De tweede pyroPCR dient echter geoptimaliseerd te worden. Hiervoor werd een algemene pyro kit van Qiagen gebruikt, nl. PyroMark PCR kit (978703). Van deze kit werd de PyroMark PCR Master Mix en *concentrate corralload* gebruikt. Verder werden aangekochte primers en PCR-water toegevoegd. De PyroMark PCR Master Mix bevat een HotStarTaq DNA-polymerase, dNTP's en bufferoplossing. Als programma werd het standaardprogramma van de pyroPCR toegepast (zie 3. Materiaal en methoden; 3.2. Methoden; 3.2.1. Aantonen van promotor hypermethylering op het MLH1- en MGMT-gen; 3.2.1.8 *Pyrosequencing*: amplificatie (pyroPCR)).

De optimalisatie gebeurt op controlestalen. Voor deze optimalisatie werden de controlestalen van de Qiagen PCR control DNA kit (Cat.no.59695) gebruikt.

PYROPCR VOOR CPG74-83 EN CPG84-89

Het resultaat van een pyroPCR wordt door middel van gelelektroforese bekomen. Op figuur 76 is het resultaat zichtbaar van de pyroPCR. Hierbij werd het standaard PCR-programma toegepast. De stalen worden in duplo meegenomen om discrepanties uit te sluiten.



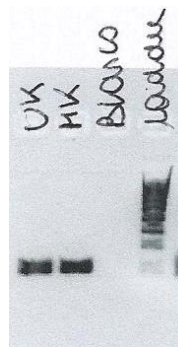
Figuur 76 Het resultaat na gelelektroforese van de pyroPCR voor MGMT-analyse. Hierbij is in de laatste baan een 100 basenparenladder geladen. Verder staan bovenaan de gel de controlestalen weergegeven, nl ongemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (UK), gemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (MK). Naast de stalen werd een blanco voor de PCR-reactie meegenomen.

Op de gel (figuur 76) zijn bij de blanco geen banden waar te nemen. Dit wijst op het feit dat geen contaminatie heeft plaatsgevonden. Zowel bij de ongemethyleerde controle (UK) als de gemethyleerde controle (MK) zijn banden waar te nemen. Deze banden liggen tussen 100 en 200 basenparen. Dit voldoet aan de verwachte waarde, nl. 166 basenparen. Hieruit kan worden besloten dat de PCR-reactie gelukt is.

De pyroPCR voor de *pyrosequencing* met het zelfgemaakt programma kan worden uitgevoerd met het standaard PCR-programma. Aangezien twee zelfgemaakte programma's voor de *pyrosequencing* worden gedraaid, moet de pyroPCR twee keer worden uitgevoerd op één staal. Op deze manier is er voldoende PCR-product voor beide *runs*

PYROPCR QIAGEN

De pyroPCR voor de *Therascreen* MGMT pyro kit is reeds geoptimaliseerd door Qiagen. Doch wordt deze PCR uitgetest op controlestalen. De controlestalen worden niet in duplo meegenomen. Het resultaat van de pyroPCR is zichtbaar op figuur 77.



Figuur 77 Het resultaat na gelelektroforese van de pyroPCR Qiagen voor MGMT-analyse. Hierbij is in de laatste baan een 100 basenparenladder geladen. Verder zijn bovenaan de gel de controlestalen weergegeven, nl ongemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (UK), gemethyleerd staal afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (MK). Naast de stalen werd een blanco voor de PCR-reactie meegenomen.

Het resultaat na gelelektroforese is een gel (figuur 77). Bij de blanco zijn geen banden waar te nemen. Dit wijst op het feit dat geen contaminatie heeft plaatsgevonden. Zowel bij de ongemethyleerde controle (UK) als gemethyleerde controle (MK) zijn banden waar te nemen. Deze banden liggen rond 100 basenparen. Hieruit kan besloten worden dat de PCR-reactie gelukt is.

De pyroPCR voor de *pyrosequencing* van de *therascreen* MGMT pyro kit geeft goede resultaten voor de controlestalen. Op deze controlestalen kan het programma van de *pyrosequencing* getest worden.

4.2.2.2. OPTIMALISATIE PYROSEQUENCING OP CONTROLESTALEN

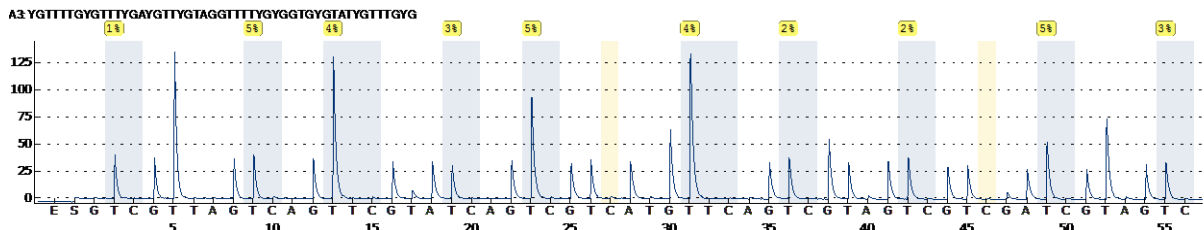
Voor de *pyrosequencing* werden drie programma's uitgetest. Zo werden twee programma's zelf opgesteld op basis van de sequentie van het MGMT-gen en de *sequence* primers voor de *pyrosequencing* (bijlage 9). Deze programma's werden uitgetest op de PCR-producten van de controlestalen: ongemethyleerd controlestaal (UK) en gemethyleerd controlestaal (MK). Deze zijn beide afkomstig van de Qiagen PCR control DNA kit (Cat.no.59695).

Voor deze analyses werden de controlestalen in duplo meegeegenomen. Dit om discrepanties uit te sluiten. Het derde programma staat in de handleiding van de *therascreen* MGMT pyro kit uitgewerkt. Deze drie programma's zijn terug te vinden onder 3. Materiaal en methoden; 3.1 Methoden; 3.1.2. Aantonen van promotor hypermethylering op MLH1- en MGMT-gen; 3.1.2.8 *Pyrosequencing*).

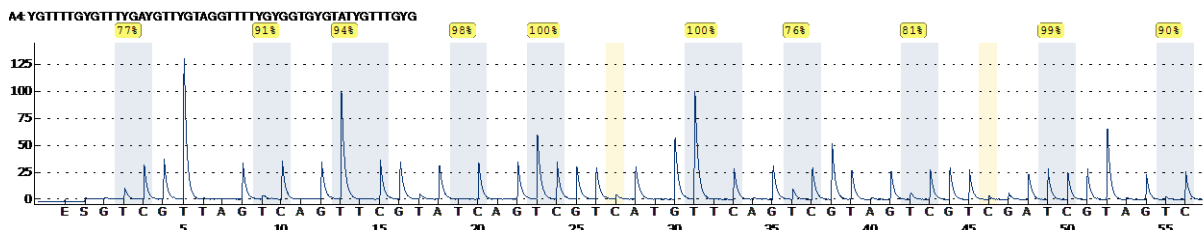
Hieronder worden de resultaten van de drie programma's weergegeven per gebied.

PYROSEQUENCING VOOR CPG74-83

Op onderstaande figuren (figuur 78 en 79) is het resultaat te zien van de *pyrosequencing* waarop het eerste gebied, CpG74-83, geanalyseerd werd. Op figuur 78 is het pyrogram van de ongemethyleerde controle zichtbaar. Het pyrogram van de gemethyleerde controle is zichtbaar op figuur 79. De pyrogrammen zijn mooi strak en kunnen goed afgelezen worden. Doch is het methylatiepercentage boven de pyrogram in het geel weergegeven. Dit wijst op het feit dat het programma nog niet volledig geoptimaliseerd is. Waarschijnlijk heeft dit te maken met de twee bisulfietcontroles die werden ingevoerd (in het geel gemarkeerd op de figuur). Hierbij dient het programma aangepast te worden.

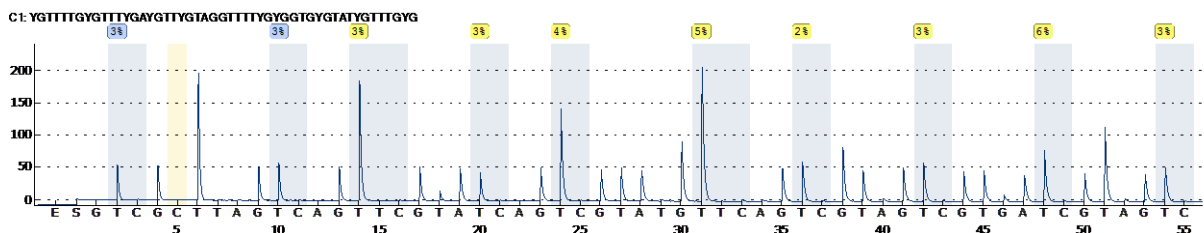


Figuur 78 Pyrogram van ongemethyleerd controlestaal voor CpG 74-83 (MGMT-analyse).

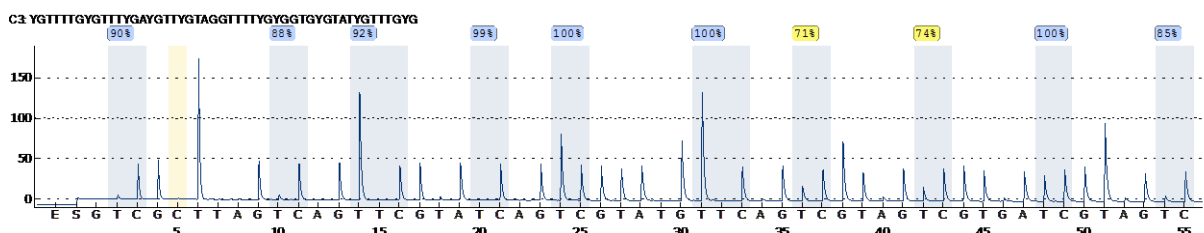


Figuur 79 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal voor CpG74-83 (MGMT-analyse).

Na enkele aanpassingen werd het programma opnieuw uitgetest op de controlestalen. Hierbij is waar te nemen dat de pyrogrammen strakker zijn dan bij de vorige analyse (figuur 80 en 81). Verder worden niet alle methylatiepercentages in het blauw weergegeven. Toch komen deze percentages overeen met de status van de controlestalen. Het resultaat van deze controlestalen is goed. De *pyrosequencing* is geoptimaliseerd voor dit CpG (74-83) gebied. Bij de analyse van de stalen moet wel rekening gehouden worden met het feit dat dit programma op controlestalen al een gele aanduiding krijgt.



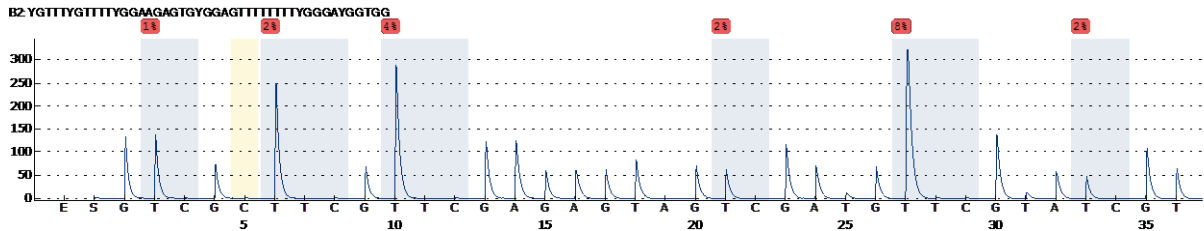
Figuur 80 Pyrogram van ongemethyleerd controlestaal voor CpG 74-83 met aangepast programma (MGMT-analyse).



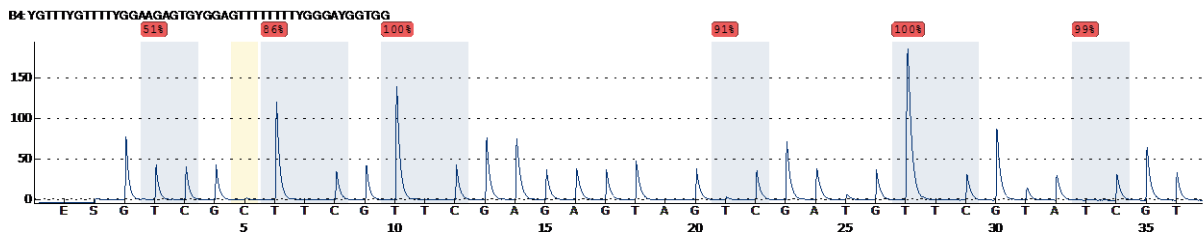
Figuur 81 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal voor CpG 74-83 met aangepast programma (MGMT-analyse).

PYROSEQUENCING VOOR CPG84-89

Op onderstaande figuren (figuur 82 en 83) wordt het resultaat weergegeven van de *pyrosequencing* waarop het gebied CpG84-89 wordt geanalyseerd. Hierbij werd waargenomen dat een verkeerd programma werd opgesteld aangezien. Zo werden op de *sequence to analyse* enkele nucleotiden vergeten toe te voegen.

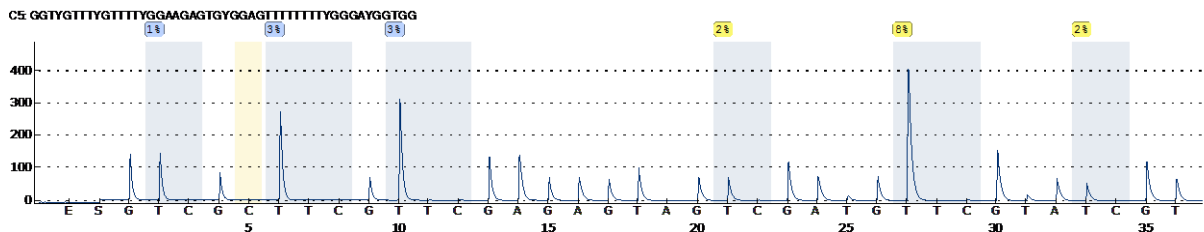


Figuur 82 Pyrogram van ongemethyleerd controlestaal voor gebied CpG84-89 (MGMT-analyse).

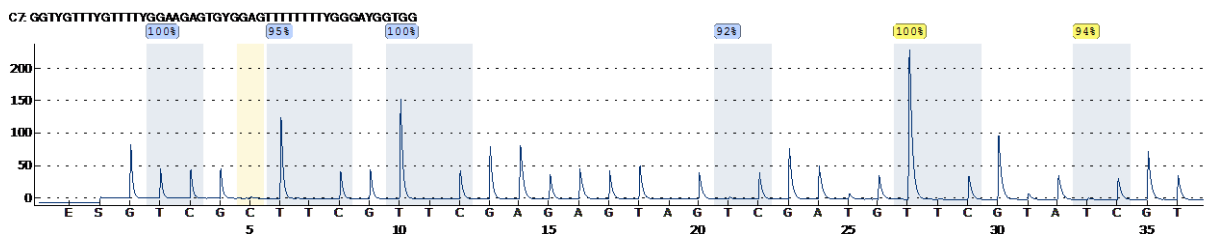


Figuur 83 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal voor gebied CpG 84-89 (MGMT-analyse).

Dit programma werd aangepast en nogmaals gerund op de controlestalen. Het resultaat van deze analyse op de controlestalen is goed (figuur 84 en 85). De *pyrosequencing* is geoptimaliseerd voor dit CpG (84-89) gebied.



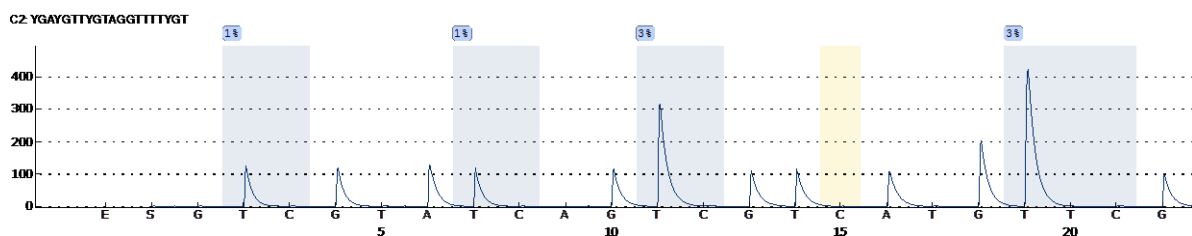
Figuur 84 Pyrogram van ongemethyleerd staal voor gebied CpG 84-89 met aangepast programma (MGMT-analyse).



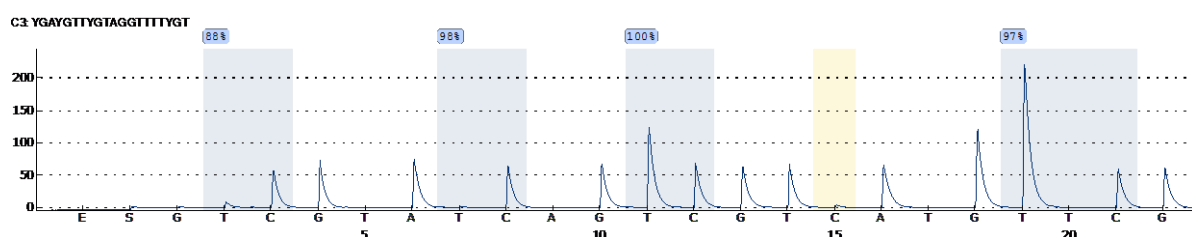
Figuur 85 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal voor gebied CpG 84-89 met aangepast programma (MGMT-analyse).

PYROSEQUENCING VOOR CpG76-79 (QIAGEN)

Naast de twee zelfgemaakte programma's voor gebied CpG74-83 en CpG84-89, werd ook het pyroprogramma van de *therascreen* MGMT kit van Qiagen getest. Deze detecteert de CpG-gebieden van 76-79. Op onderstaande resultaten (figuur 86 en 87) kan worden opgemerkt dat dit programma geoptimaliseerd is.



Figuur 86 Pyrogram van ongemethyleerd controlestaal CpG 76-79 (Qiagen) (MGMT-analyse)



Figuur 87 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal CpG76-79 (Qiagen) (MGMT-analyse)

4.2.2.3. VALIDATIE VAN PYROSEQUENCING OP PATIËNTENSTALEN

Vermits de pyroPCR gunstige resultaten opleverde voor de controlestalen en de programma's voor de *pyrosequencing* werden geoptimaliseerd, is deze analyse geoptimaliseerd. Verder kan het programma van de *pyrosequencing* worden uitgetest op patiëntestalen reeks 1 van de MGMT-analyse (bijlage 16). Wanneer deze reeks goede resultaten geeft, kan overgegaan worden naar de validatie van de analyse op een tweede reeks patiëntestalen, nl patiëntestalen reeks 2 van de MGMT-analyse (bijlage 17).

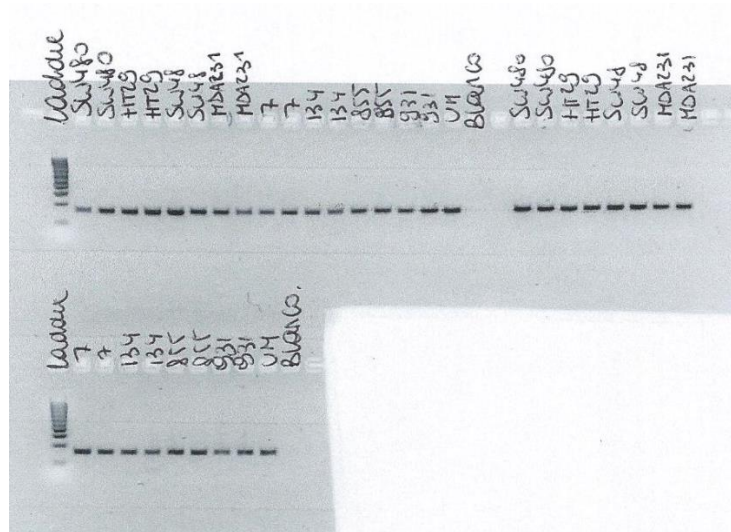
PYROSEQUENCING OP PATIËNTENSTALEN REEKS 1

Op de patiëntestalen reeks 1 (bijlage 16) wordt de geoptimaliseerde pyroPCR uitgevoerd met het standaard PCR-programma (zie 3. Materiaal en methoden; 3.2 Methoden; 3.2.1 Aantonen van promotor hypermethylering op het MLH1- en MGMT-gen; 3.2.1.8 *pyrosequencing*). Aan de hand van de gelelektroforese van deze pyroPCR kan worden waargenomen bij welke stalen geen amplificatie heeft waargenomen. Deze stalen worden niet meegenomen met de *pyrosequencing*. Indien de intensiteit van de banden laag is, wordt het volume input DNA verhoogd voor de *pyrosequencing*.

De *pyrosequencing* wordt uitgevoerd met drie soorten programma's op één staal. Hierbij worden drie verschillende gebieden van de promotor van het MGMT-gen geanalyseerd op methylering. Hier gaat het over CpG74-76, CpG74-83 en CpG84-89. De programma's staan vermeld in het protocol van de *pyrosequencing* (3. Materiaal en methoden; 3.2 Methoden; 3.2.1 Aantonen van promotor hypermethylering op MLH1- en MGMT-gen; 3.2.1.8 *Pyrosequencing*).

PYROPCR

De pyroPCR wordt uitgevoerd op de patiëntenstalen reeks 1 van de MGMT-analyse (bijlage 16). Op deze stalen worden twee PCR's uitgevoerd om voldoende PCR-product te verkrijgen. Hiervoor wordt twee keer de geoptimaliseerde pyroPCR uitgevoerd met de algemene kit van Qiagen, nl. PyroMark PCR kit. Voor deze pyroPCR's werd het standaardprogramma van de pyroPCR toegepast.



Figuur 88 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten van pyroPCR op patiëntenstalen reeks 1 van de MGMT-analyse. Hierbij werd in elke eerste baan een 100 basenparenladder geladen. Bovenaan de gel wordt de naam van de cellijn of het nummer van de patiëntenstalen weergegeven. Verder is naast de patiëntenstalen en de cellijnen ook een negatieve controle (ongemethyleerd staal (UM)) en een blanco meegenomen.

Op figuur 88 wordt het resultaat na gelelektroforese voor beide pyroPCR's weergegeven. Bij beide blanco's is geen band waar te nemen. Bij de ongemethyleerde controle is een band zichtbaar tussen 100 en 200 basenparen. Dit komt overeen met verwachte waarde, nl. 166 basenparen. De PCR-reactie is gelukt.

Ook bij de cellijnen en patiëntenstalen zijn banden waar te nemen tussen 100 en 200 basenparen. Dit komt overeen met de verwachte waarde, nl. 166 basenparen. Verder is de intensiteit van de banden goed. Zowel de cellijnen als de patiëntenstalen reeks 1 kunnen worden meegenomen voor de *pyrosequencing*.

PYROSEQUENCING

De pyroPCR is reeds uitgevoerd voor de patiëntenstalen reeks 1 van de MGMT-analyse (figuur 88). Hierbij werd opgemerkt dat alle stalen kunnen worden meegenomen met de *pyrosequencing*.

In tabel 40 wordt een overzicht gegeven van de resultaten van de patiëntenstalen reeks 1 van de MGMT-analyse. Uit Quillien et al. [65] werd opgemerkt dat bepaalde CpG gebieden invloed hebben op de methylatiestatus van de promotor. Deze gebieden werden uit Quillien et al. [65] afgeleid, nl. CpG 74-78, CpG84, CpG84-88, CpG89.

Tabel 42 Overzicht van de resultaten van de *pyrosequencing* van patiëntenstalen reeks 1 van de MGMT-analyse. Hierbij wordt de methylatiestatus van de verschillende belangrijke CpG-gebieden, bepaald in Quillien et al. [65], voor elk staal weergegeven. Verder wordt deze berekening ook uitgevoerd voor een negatieve controle.

Staal		SW480	HT29	SW48	MDA231	MBT14-007	MBT14-134	MBT14-855	MBT14-931	UM
Resultaat eerste duplo	CpG74-78	39,8	7	93,2	23	14,4	12,6	24,6	14	2,8
	CpG84	44	5	95	21	5	6	44	18	1
	CpG84-88	48,6	11,4	97,8	38,6	16	16	43	18,8	3,4
	CpG89	50	6	95	26	7	12	18	11	2
Resultaat tweede duplo	CpG74-78	50	6,8	94	19,2	10,4	16,6	26,8	9,8	2,8
	CpG84	50	5	92	19	8	2	44	13	1
	CpG84-88	52	11,6	96	35,8	15	15	47,2	17	3,4
	CpG89	52	6	96	27	22	14	31	13	2

In Quillien et al. [65] zijn voor deze CpG gebieden bepaalde cut-offs opgesteld. Zo is dit 8% voor CpG74-78, voor CpG 84 een cut-off van 9%, voor CpG 84-88 een cut-off van 32% en voor CpG 89 een cut-off van 12%. Op basis van deze cut-off werd getracht de methylatiestatus van de promotor van het MGMT-gen te bepalen. Hierbij werd het resultaat van elk CpG gebied voor elk staal vergeleken met het resultaat van de ongemethyleerde controle met daarbij rekening houdend met de cut-off. Deze resultaten zijn terug te vinden in tabel 42. Verder werd voor elk staal bepaald of het staal al dan niet gemethyleerd is (zie tabel 43). Hierbij werd getracht om een algemene conclusie over de stalen te geven. Deze is gebaseerd op welk resultaat het meeste voorkomt, gemethyleerd of ongemethyleerd.

Tabel 43 Overzicht resultaten van patiëntenstalen reeks 1 voor de MGMT-analyse. Hierbij wordt voor elk CpG-gebied aan de hand van de gestelde cut-off uit Quillien et al. [65] bepaald of het staal al dan niet gemethyleerd is. Verder wordt getracht een algemene conclusie over de stalen te geven. Deze is gebaseerd op het resultaat dat bij de verschillende CpG-gebieden voorkomt, gemethyleerd of niet gemethyleerd.

Staal		SW480	HT29	SW48	MDA231	MBT14-007	MBT14-134	MBT14-855	MBT14-931
Resultaat eerste duplo	CpG74-78	M	U	M	M	M	M	M	M
	CpG84	M	U	M	M	U	U	M	M
	CpG84-88	M	U	M	M	U	U	M	U
	CpG89	M	U	M	M	U	U	M	U
Resultaat tweede duplo	CpG74-78	M	U	M	M	U	M	M	U
	CpG84	M	U	M	M	U	U	M	M
	CpG84-88	M	U	M	M	U	U	M	U
	CpG89	M	U	M	M	M	M	M	U
Resultaat <i>pyrosequencing</i>		M	U	M	M	U	U	M	M
Oorspronkelijk resultaat MSP		M	U	M	M	U	M	U	U

Uit bovenstaande tabel (tabel 43) kan worden afgeleid dat de resultaten van de cellijnen uit de literatuur overeenkomen met de resultaten van de *pyrosequencing*. Dit zowel voor aparte CpG-gebieden als het globale overzicht. Verder worden bij de stalen vrij veel discrepanties

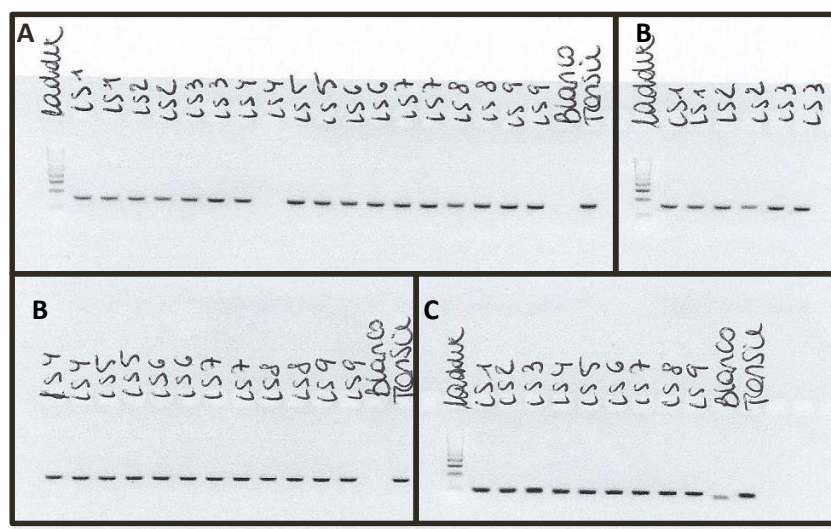
waargenomen. Niet alleen tussen de resultaten van de twee technieken, maar ook tussen de duplo's. Wanneer naar de discrepanties van de duplo's wordt gekeken, kan worden opgemerkt dat deze enkel bij CpG74-78 en CpG89 voorkomen. Bij CpG74-78 liggen deze percentages echter vrij dicht bij de cut-off. Hierbij kan het zijn dat de cut-off voor deze analyse opnieuw gesteld moet worden. Verder kan worden opgemerkt dat tussen de resultaten van de twee technieken enkel het staal MBT14-007 bij beide technieken hetzelfde is. Deze discrepanties kunnen veroorzaakt worden door de verschillende regio's die worden geanalyseerd bij de technieken.

PYROSEQUENCING OP PATIËNTENSTALEN REEKS 2

De *pyrosequencing* wordt naast de patiëntenstalen reeks 1 ook uitgevoerd op patiëntenstalen reeks 2 (Bijlage 17). Op deze patiëntenstalen werd naast de standaardmethode van *pyrosequencing* uit Quillien et al. [65] ook een *pyrosequencing* uitgevoerd met de *therascreen* MGMT kit van Qiagen.

PYROPCR

Op deze stalen werden drie pyroPCR's uitgevoerd. Twee PCR's met algemene kit van Qiagen, nl. PyroMark PCR kit. Voor deze analyse worden de stalen in duplo meegenomen om discrepanties uit te sluiten. Voor deze PCR wordt het standaardprogramma van de pyroPCR toegepast. De andere PCR wordt uitgevoerd met behulp van de *therascreen* MGMT kit. Hierbij worden de stalen in enkelvoud meegenomen, aangezien maar een beperkte reeks stalen met deze kit gerund kan worden. Voor deze PCR wordt het PCR-programma beschreven in de *therascreen* MGMT handleiding toegepast.



Figuur 89 Resultaat van gelelektroforese na pyroPCR op patiëntenstalen reeks 2 van de MGMT-analyse.

A Resultaat van gelelektroforese na pyroPCR met PyroMark PCR kit van Qiagen. In de eerste laan werd een 100 basenparenladder geladen. De stalen staan bovenaan de gel weergegeven. Deze werden in duplo meegenomen. Naast de stalen wordt een blanco en een positieve controle voor de pyroPCR meegenomen.

B. Resultaat van gelelektroforese na pyroPCR met PyroMark PCR kit van Qiagen. In de eerste laan werd een 100 basenparenladder geladen. Hiermee kan de grootte van de PCR-producten geschat worden. De stalen staan bovenaan de gel weergegeven. Deze werden in duplo meegenomen. Naast de stalen wordt een blanco en een positieve controle voor de pyroPCR meegenomen.

C. Resultaat van gelelektroforese na pyroPCR met *therascreen* MGMT kit. In de eerste laan werd een 100 basenparenladder geladen. Hiermee kan de grootte van de PCR-producten geschat worden. De stalen staan bovenaan de gel weergegeven. Deze worden in duplo meegenomen. Naast de stalen wordt een blanco en een positieve controle voor de pyroPCR meegenomen.

Op figuur 89 wordt het resultaat na gelelektroforese van de drie pyroPCR's op patiëntenstalen reeks 2 van de MGMT-analyse weergegeven. Op figuur A is bij de blanco geen band waar te nemen. Verder is bij de positieve controle voor de PCR-reactie een band waar te nemen. Dit wijst op het feit dat de primers hebben kunnen binden. De PCR-reactie is gelukt. Voor alle stalen, behalve de duplo van staal LS4, is een band waar te nemen tussen 100 en 200 basenparen. Dit voldoet aan de verwachte grootte, nl. 166 basenparen. Enkel bij de duplo van staal LS4 is geen band waar te nemen. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het niet toevoegen van DNA. Vermits bij de eerste duplo van LS4 wel een band waar te nemen is.

Alle stalen kunnen meegenomen worden voor de *pyrosequencing* behalve de duplo van LS4. Voor dit staal wordt echter twee maal DNA genomen uit de eerste duplo.

Bij figuur B is opnieuw geen band zichtbaar bij de blanco. Verder is bij de positieve controle voor de PCR-reactie een band waar te nemen. Dit wijst op het feit dat de primers hebben kunnen binden. De PCR-reactie is gelukt. Voor alle stalen is een band waar te nemen tussen 100 en 200 basenparen. Dit voldoet aan de verwachte grootte, nl. 166 basenparen.

Op figuur C is wel een band waar te nemen bij de blanco. Dit is wel een zeer lichte band. Deze band kan wijzen op contaminatie. Verder is bij de positieve controle voor de PCR-reactie een band waar te nemen. Dit wijst op het feit dat de primers hebben kunnen binden. De PCR-reactie is gelukt. Voor alle stalen is een band waar te nemen rond 100 basenparen.

Op alle stalen wordt het desbetreffende programma van de *pyrosequencing* gerund.

PYROSEQUENCING

De pyroPCR is reeds uitgevoerd voor de patiëntenstalen reeks 2 van de MGMT-analyse (figuur 77). Hierbij werd opgemerkt dat niet alle stalen kunnen worden meegenomen met de *pyrosequencing*. Zo is bij de duplo van staal LS4 voor een pyroPCR geen amplificatie waar te nemen. Om toch dit staal in duplo mee te nemen wordt het volume van de eerste duplo LS4 in twee gedeeld.

In tabel 33 wordt een overzicht gegeven van de resultaten van de patiëntenstalen reeks 1 van de MGMT-analyse. Uit Quillien et al. [65] werd opgemerkt dat bepaalde CpG gebieden invloed hebben op de methylatiestatus van de promotor. Deze gebieden werden uit dit artikel afgeleid, nl. CpG 74-78, CpG84, CpG84-88, CpG89.

Tabel 44 Overzicht van resultaat *pyrosequencing* op patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse. Hierbij wordt de methylatiestatus van de verschillende belangrijke CpG-gebieden, bepaald in Quillien et al. [65], voor elk staal weergegeven. Verder wordt deze berekening ook uitgevoerd voor een negatieve controle.

Staal		T13/08423	T13/12990	T13/15617	T13/20564	T14/14986	T14/15908	T14/17044	T14/17068	T14/17146	UM
Resultaat eerste duplo	CpG74-78	31	10,8	4,8	31,8	34,8	56	4,8	12,4	61,4	2,8
	CpG84	60	10	4	8	37	13	3	13	64	1
	CpG84-88	47,8	20,8	6,6	18,4	34,2	31,6	7,8	19,2	67,2	3,4
	CpG89	45	39	6	9	30	62	9	19	78	2
Resultaat tweede duplo	CpG74-78	35,8	7	4,8	30,4	33,2	59	6,2	8,2	53	2,8
	CpG84	46	8	4	17	33	17	5	15	66	1
	CpG84-88	41,2	26,2	6,2	18,4	32	26,6	9	21,8	68	3,4
	CpG89	30	49	4	10	32	65	8	24	71	2

In Quillien et al. [65] zijn voor deze CpG gebieden bepaalde cut-offs opgesteld. Zo is dit 8% voor CpG74-78, voor CpG 84 een cut-off van 9%, voor CpG 84-88 een cut-off van 32% en voor CpG 89 een cut-off van 12%. Op basis van deze cut-off werd getracht de methylatiestatus van de promotor van het MGMT-gen te bepalen. Hierbij werd het resultaat van elk CpG gebied voor elk staal vergeleken met het resultaat van de ongemethyleerde controle met daarbij rekening houdend met de cut-off. Deze resultaten zijn terug te vinden in tabel 44. In deze analyse werd echter geen ongemethyleerde controle meegenomen. Om toch een schatting van de methylatiestatus te maken werd de ongemethyleerde controle uit de voorgaande analyse op patiëntenreeks 1 gebruikt. Voor elk staal werd bepaald of het staal al dan niet gemethyleerd is (zie tabel 45). Hierbij werd getracht om een algemene conclusie over de stalen te geven. Deze is gebaseerd op welk resultaat het meeste voorkomt, gemethyleerd of ongemethyleerd.

Tabel 45 Overzicht van de patiëntenstalen reeks 2 voor de MGMT-analyse. Hierbij wordt voor elk CpG-gebied aan de hand van de gestelde cut-off uit Quillien et al. [65] bepaald of het staal al dan niet gemethyleerd is. Verder wordt getracht een algemene conclusie over de stalen te geven. Deze is gebaseerd op het resultaat dat bij de verschillende CpG-gebieden voorkomt, gemethyleerd of niet gemethyleerd. De discrepanties tussen de duplo's worden weergegeven in het grijs.

Staal		T13/08423	T13/12990	T13/15617	T13/20564	T14/14986	T14/15908	T14/17044	T14/17068	T14/17146
Resultaat eerste duplo	CpG74-78	M	M	U	M	M	M	U	M	M
	CpG84	M	M	U	U	M	M	U	M	M
	CpG84-88	M	U	U	U	U	U	U	U	M
	CpG89	M	M	U	U	M	M	U	M	M
Resultaat tweede duplo	CpG74-78	M	U	U	M	M	M	U	U	M
	CpG84	M	U	U	M	M	M	U	M	M
	CpG84-88	M	U	U	U	U	U	U	U	M
	CpG89	M	M	U	U	M	M	U	M	M
Resultaat <i>pyrosequencing</i>		M	U	U	U	M	M	U	M	M
Oorspronkelijk resultaat MSP		M	U	U	U	M	M	U	M	M

Uit bovenstaande resultaten (tabel 45) kan worden opgemerkt dat de resultaten van vier stalen volledig overeenkomt, nl. T13/08423, T13/15617, T14/17044 en T14/17146. Dit zowel voor de aparte CpG-gebieden als bij het globale overzicht. Voor het staal T13/12990 zijn twee discrepanties tussen de duplo's waar te nemen bij CpG74-78 en CpG84. Het methylatiepercentage van deze gebieden ligt vrij kort bij de cut-off. Deze discrepantie kan te wijten zijn aan de m

en T13/20564 een discrepantie waar te nemen bij CpG-gebied 84. Ook bij het staal T14/17068 is een discrepantie waar te nemen. Dit bij CpG-gebied 74-78. Deze discrepanties kunnen te wijten zijn aan het feit dat de procedure van *pyrosequencing* niet optimaal werd uitgevoerd. Verder kan worden opgemerkt dat bij het globale overzicht van de methylatiestatus geen discrepanties kunnen worden waargenomen tussen de twee technieken.

Tabel 46 Overzicht van de stalen geanalyseerd door de *therascreen* MGMT pyro kit. Hierbij wordt voor elke duplo van het staal een gemiddeld percentage berekend. Verder wordt het resultaat van de oude methode (*nested* PCR) weergegeven. De discrepanties tussen beide methodes worden in het grijs gemarkeerd

Staal	T13/08 423	T13/12 990	T13/15 617	T13/20 564	T14/14 986	T14/15 908	T14/17 044	T14/17 068	T14/17 146
Gemiddeld percentage methylatie	30,25%	10,25%	5,25%	23,5%	31,75%	53%	5,25%	16,75%	54,5%
Resultaat <i>pyrosequencing</i>	M	M	M	M	M	M	M	M	M
Oorspronkelijk resultaat	M	U	U	U	M	M	U	M	M

Op de patiëntenstalen reeks 2 werd ook de *therascreen* MGMT pyro kit uitgevoerd (tabel 46). Hierbij werd in de handleiding van de *therascreen* MGMT pyro kit 5% als cut-off gesteld. Voor deze analyse werd echter geen negatieve controle meegenomen. Hierdoor kan de achtergrondruis van de analyse niet in rekening worden gebracht. Normaal wordt deze achtergrondruis bij cut-off geteld. Dit percentage wordt dan vergeleken met het gemiddelde percentage over de vier CpG-eilanden.

Als het gemiddelde methylatiepercentage van de stalen, zonder rekening te houden met de achtergrondruis, vergeleken wordt met de cut-off kan hieruit worden afgeleid dat al de stalen gemethyleerd zijn. Hieruit blijkt dat voor sommige resultaten, T13/15617 en T14/17044, de cut-off vrij dicht bij het methylatiepercentage ligt. Zo zouden deze stalen waarschijnlijk een ander resultaat bekomen wanneer de achtergrondruis wel in rekening wordt gebracht.

5. ALGEMENE DISCUSSIE

Hieronder volgt een algemene discussie over de resultaten van de analyses.

5.1. MLH1-ANALYSE

Om een beter onderscheid tussen sporadische en erfelijke colontumoren te maken, kan promotor hypermethylering van het MLH1-gen worden aangetoond. Verder kan bij tumoren met een verhoogde microsatelliet instabiliteit en de afwezigheid van hypermethylering van het MLH1-gen een betere prognose gemaakt worden voor het Lynch syndroom.

Deze analyse wordt reeds in het azM uitgevoerd. Voor de bisulfietbehandeling werd geopteerd voor een nieuwe methode, nl. Epitect *bisulfite* kit. Hierdoor werd de MSP opnieuw geoptimaliseerd. Dit gebeurde aan de hand van qPCR. Verder werd getracht om de methylatiestatus van de promotor te bepalen via *pyrosequencing*.

5.1.1. VALIDATIE VAN DE NIEUWE BISULFIETBEHANDELING, EPITECT *BISULFITE* KIT

Voor de bisulfietbehandeling werd geopteerd voor een nieuwe methode, nl. Epitect *bisulfite* kit. Deze methode moest echter nog gevalideerd worden. De validatie gebeurde op een reeks patiëntenstalen (bijlage 13).

Bij drie stalen werd echter een discrepantie tussen de oude bisulfietbehandeling en de nieuwe bisulfietbehandeling opgemerkt, nl. MBT14-311, MBT14-642 en MBT14-1022. Deze stalen werden met de oude bisulfietbehandeling geanalyseerd als ongemethyleerd. Terwijl deze met de nieuwe bisulfietbehandeling werden geanalyseerd als gemethyleerd. Hieruit werd afgeleid dat de nieuwe bisulfietbehandeling efficiënter is als de oude bisulfietbehandeling. Vermits bij deze bisulfietbehandeling meer *input* DNA kon worden toegevoegd. Verder werd bij de nieuwe bisulfietbehandeling gebruik gemaakt van een DNA *protect* buffer. Deze buffer beschermde het DNA tijdens de conversie. Hierbij bleef de kwaliteit van het DNA beter bewaard [76].

5.1.2. QPCR ALS METHODE OM PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN HET MLH1-GEN TE ANALYSEREN

De qPCR werd geoptimaliseerd met behulp van twee soorten buffers, SensiFast™ HRM mix en MyTaq™ HS mix. De voorkeur ging uit naar de buffer SensiFast™ HRM mix aangezien dit een *ready to use mix* is. Het voordeel hierbij was dat minder pipetteerhandelingen moesten uitgevoerd worden en de kans op contaminatie werd verlaagd.

De geoptimaliseerde qPCR werd uitgetest op een reeks patiëntenstalen (bijlage 13 en 14). In totaal werden 65 stalen getest. Hierbij werden vier discrepanties opgemerkt, nl. bij de stalen MBT08-571, MBT10-312, MBT10-1022, MBT12-1140.

De stalen MBT10-312 en MBT12-1140 werden bij de oude analyse beschouwd als gemethyleerd. Bij de nieuwe analyse werden deze stalen echter beschouwd als gemethyleerd. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat geen DNA werd toegevoegd. Verder kon dit ook te maken hebben met de detectiemethode van de techniek. Zo werd bij de qPCR de amplificatie beter opgevolgd dan bij de *nested* PCR. Bij de *nested* PCR gaf enkel het eindresultaat weer op het einde van de reactie.

De stalen MBT08-571 en MBT10-1022 werden bij de oude analyse beschouwd als ongemethyleerd. Bij de nieuwe analyse daarentegen werden deze stalen als gemethyleerd beschouwd. Dit had waarschijnlijk te maken met de verhoogde efficiëntie van de nieuwe bisulfietbehandeling. Ook kon deze discrepantie te wijten zijn aan de detectiemethode van de techniek.

Over het staal MBT11-306 was moeilijk een besluit te trekken uit de analyse van de qPCR. Uit de analyse van de *nested* PCR werd dit staal als gemethyleerd beschouwd. Na de analyse met de qPCR werd bij dit staal een ΔC_t -waarde van -3,02 bepaald. Op basis van de cut-off van de patiëntenstalen kon worden afgeleid dat een ΔC_t -waarde van -2,4 of hoger beschouwd werd als gemethyleerd. Een staal met een ΔC_t -waarde van -4,87 of lager werd beschouwd als ongemethyleerd. Echter de ΔC_t -waarde van -3,02 lag tussen deze twee waarden in. Om een conclusie over dit staal te geven, moest een cut-off gesteld worden voor deze analyse.

Verder werd de qPCR uitgevoerd op een verdunningsreeks met IvD en HUVEC. IvD is een DNA cellijn die in vitro gemethyleerd werd. Deze controle werd gebruikt als gemethyleerde controle. HUVEC daarentegen zijn endotheelcellen die geïsoleerd werden uit bloedvaten van de navelstreng. Dit werd bijgevolg een ongemethyleerde controle.

Met behulp van deze analyse kon de detectielimiet van de techniek bepaald worden. Deze analyse werd tweemaal uitgevoerd. In beide gevallen was contaminatie op te merken bij de gemethyleerde mastermix. Doch was het onwaarschijnlijk dat deze contaminatie te wijten was aan de mastermix. Vermits niet alle stalen bij deze mastermix gecontamineerd waren. Zo was bij de controle van de bisulfietbehandeling, de gemethyleerde controle en de ongemethyleerde controle na gelelektroforese geen band zichtbaar. Verder kon deze contaminatie te wijten zijn aan het PCR-water dat werd toegevoegd bij de blanco's. Ook dit leek onwaarschijnlijk aangezien dit water ook voor andere analyses gebruikt werd. Een andere optie was dat de contaminatie werd veroorzaakt door de omgeving waarin de analyse werd voorbereid. Dit was namelijk een UV-kast waarin voor andere analyses met PCR-producten werd gewerkt .

Uit de resultaten werd waargenomen dat de detectielimiet waarschijnlijk op 3% IvD lag. Hieruit kon worden afgeleid dat de detectie van de qPCR onbetrouwbaar werd bij DNA waarvan 3% of minder gemethyleerd is. Om 10% methylatie aan te kunnen tonen was voor deze analyse echter een tumorpercentage van minimum 30% nodig. De qPCR moest echter opnieuw uitgevoerd worden op een verdunningsreeks aangezien contaminaties hebben plaatsgevonden.

Verder moest voor deze analyse een cut-off bepaald worden. Deze waarde gaf aan wanneer een DNA-staal beschouwd werd als gemethyleerd of ongemethyleerd. Voor de qPCR werd de cut-off bepaald aan de hand van de ΔC_t -waarde. Deze waarde werd bepaald door de resultaten van de reeds uitgevoerde MSP op de patiëntenstalen te vergelijken met de resultaten van de qPCR. Zo werd een staal gemethyleerd beschouwd bij een ΔC_t -waarde van -2,4 of hoger. Vanaf een ΔC_t -waarde van -4,87 of lager werd een staal als ongemethyleerd beschouwd. De stalen met een C_t -waarde tussen -2,4 en -4,87 bevonden zich in een grijze zone. Hierover kon op basis van bovenstaande gegevens niet met zekerheid een conclusie worden gesteld. Deze resultaten werden bevestigd door de verdunningsreeks. Hierbij was de gemiddelde C_t -waarde van de twee uitgevoerde analyses nl. 3,04. Om een correcte cut-off te bepalen dient de qPCR op de verdunningsreeks herhaald te worden.

5.1.3. PYROSEQUENCING ALS METHODE OM PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN HET MLH1-GEN TE ANALYSEREN

Voor de *pyrosequencing* moesten zowel de pyroPCR als het programma van de *pyrosequencing* geoptimaliseerd worden. De pyroPCR kan uitgevoerd worden met het standaard PCR-programma. Voor deze PCR werd een algemene kit van Qiagen gebruikt, nl. de PyroMark PCR kit (Cat.no.59695).

De *pyrosequencing* werd uitgevoerd op een dezelfde reeks patiëntenstalen als de qPCR (bijlage 13 en 14). Deze stalen werden in duplo getest. Zo werden in totaal 116 stalen getest met *pyrosequencing* voor de MLH1-analyse. Uit deze testen waren drie discrepanties op te merken. Dit bij de stalen MBT10-574, MBT9-30 en MBT12-1140. Deze stalen werden bij de *pyrosequencing* geanalyseerd als ongemethyleerd, terwijl deze stalen bij de *nested* PCR beschouwd werden als gemethyleerd. Dit had waarschijnlijk te maken met het gebied dat wordt gedetecteerd door deze twee technieken. In bijlage 6 kan worden opgemerkt dat dit een heel ander detectiegebied is.

Verder werd ook een verdunningsreeks met IvD en HUVEC *gerund* met de *pyrosequencing*. Met behulp van deze analyse kon de detectielimiet van de techniek worden bepaald. Uit de resultaten van deze analyse kon worden opgemerkt dat bij DNA waarvan 6% of minder gemethyleerd is de detectie onbetrouwbaar werd. Om 10% methylatie aan te kunnen tonen, was voor deze analyse echter een tumorpercentage van minimum 60% nodig.

Bij het vergelijken van de resultaten met de *nested* PCR met de resultaten van de *pyrosequencing* kon worden opgemerkt dat een staal gemethyleerd werd beschouwd bij een methylatiepercentage van 12,5 % of hoger. Verder werd een staal beschouwd als ongemethyleerd bij een methylatiepercentage van 8% of lager. De stalen met een methylatiepercentage tussen 8% en 12,5% bevonden zich in een grijze zone. Hierover kon niet met zekerheid gesteld worden of deze stalen al dan niet gemethyleerd waren.

5.2. AANTONEN VAN PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN MGMT-GEN

Met de MGMT-analyse werd getracht om promotor hypermethylering van het MGMT-gen aan te tonen. Hypermethylatie van de promotor van het MGMT-gen speelt een belangrijke rol bij hersentumoren. Deze tumoren zijn moeilijk te behandelen aangezien ze een vrij resistent karakter vertonen. Als de promotor van het MGMT-gen gemethyleerd is, heeft dit een positieve invloed op de behandeling van hersentumoren. Zo verhoogt de gevoeligheid van de tumor voor chemotherapie. Met de MGMT-analyse kan dus een betere prognose voor de patiënt gesteld worden

Voor het aantonen van hypermethylering van de promotor van het MGMT-gen wordt de MLH1-analyse als basis gebruikt. Bij deze analyse werden zowel de technieken MSP als *pyrosequencing* geoptimaliseerd voor het detecteren van de methylatiestatus. Ook voor de MGMT-analyse wordt getracht om deze twee testen te optimaliseren.

5.2.1. QPCR ALS METHODE OM PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN HET MGMT-GEN TE ANALYSEREN

Voor de MGMT-analyse kon de qPCR worden geoptimaliseerd. Dit gebeurde op controlestalen en met behulp van de SensiFast™ HRM mix. Deze analyse werd gebaseerd op de standaardmethode die beschreven staat in Esteller et al. [64].

Verder werd de geoptimaliseerde qPCR uitgetest op twee reeksen stalen (bijlage 16 en bijlage 17). Hierbij bestond de eerste reeks stalen (bijlage 16) naast patiëntenstalen ook uit cellijnen. Van deze cellijnen is de methylatiestatus algemeen bekend en in de literatuur terug te vinden [67] [69] [72]. Op basis van de resultaten van deze stalen, meer bepaald ΔC_t -waardes, kon een interpretatie gegeven worden aan de resultaten van de patiëntenstalen. De resultaten van de cellijnen kwamen van qPCR kwamen overeen met de resultaten uit de literatuur.

De resultaten van de qPCR op de patiëntenstalen reeks 1 werden op basis van de ΔC_t -waarde, van de cellijnen en de resultaten van de MLH1-analyse, vergeleken. Hieruit kon één discrepantie worden opgemerkt, nl. MBT14-931. Deze discrepantie lag waarschijnlijk aan het feit dat contaminatie had plaatsgevonden aangezien bij de tweede analyse, waar tevens ook contaminatie werd waargenomen, wel overeenkomst van de resultaten was. Doch werd deze analyse als onbetrouwbaar beschouwd. Voor een betrouwbare resultaten moet deze herhaald worden.

Hiernaast werd de qPCR ook op reeks 2 van de patiëntenstalen (bijlage 17) uitgevoerd. De analyse werd tweemaal uitgevoerd. Bij vergelijking van beide analyses bleek dat drie discrepanties waar te nemen waren, nl. bij de stalen T13/12990, T13/20564 en T14/17044. Deze stalen werden beschouwd als ongemethyleerd in de reeds uitgevoerde analyse, MSP, te Nijmegen. Terwijl deze stalen beschouwd werden als gemethyleerd in de qPCR. Deze discrepanties konden te wijten zijn aan het feit dat ook bij deze analyses contaminatie had plaatsgevonden. Uit een vergelijking van de ΔC_t -waarden bleek dat de contaminaties niet alleen in de controlestalen hadden plaatsgevonden, maar ook in de patiëntenstalen. Ook konden deze discrepanties te wijten zijn aan het detectiegebied van de analyse. Dit is verschillend voor de MSP, die in Nijmegen werd uitgevoerd en de qPCR die hier werd uitgevoerd (zie bijlage 10 en 11).

Naast de patiëntenstalen werd ook een verdunningsreeks van IvD en HUVEC met de qPCR geanalyseerd. IvD is een DNA cellijn die in vitro gemethyleerd werd en als gemethyleerde controle werd gebruikt. HUVEC daarentegen waren endotheelcellen die geïsoleerd werden uit bloedvaten van de navelstreng. Dit was bijgevolg een ongemethyleerde controle. Met behulp van deze resultaten kon de detectielimiet bepaald worden. Met behulp van deze resultaten en de resultaten van de patiëntenstalen kon een cut-off gesteld worden.

Deze analyse werd tweemaal uitgevoerd. Ook hier had bij beide analyses contaminatie plaatsgevonden. Hierdoor is de detectielimiet moeilijk te bepalen aangezien de ΔC_t -waardes van analyse 1 en 2 al rond een hoog percentage beginnen te schommelen, nl. 50%IvD en 25%IvD. Bijgevolg werd de bepaling van de cut-off moeilijk. Hiernaast werd de cut-off bepaling ook beter uitgevoerd op een grotere reeks patiëntenstalen.

De contaminaties die bij deze analyses hebben plaatsgevonden konden bij de bereiding van de mastermix ontstaan zijn. Aangezien bij enkele controlestalen geen band van dezelfde grootte als die van de stalen zichtbaar was, was dit onwaarschijnlijk. Verder kon de besmetting in het PCR-water voorkomen die aan de mastermix werd toegevoegd. Een andere verklaring kon zijn dat de besmetting werd veroorzaakt door de omgeving waar in gewerkt werd. Dit is namelijk een UV-kast waar voor andere analyses met PCR-producten werd gewerkt.

5.2.2. PYROSEQUENCING ALS METHODE OM PROMOTOR HYPERMETHYLERING VAN HET MGMT-GEN TE ANALYSEREN

Naast de MSP werd getracht om de methylatiestatus van de promotor van het MGMT-gen te bepalen met behulp van *pyrosequencing*. In Quillien et al. [75] werd de standaardmethode voor deze techniek beschreven. Uit dit artikel kon worden afgeleid dat CpG74-78, CpG84, CpG89, CpG84-88 belangrijke gebieden zijn.

In dit project werden drie gebieden van de promotor van het MGMT-gen geanalyseerd, nl. CpG74-76, CpG74-83 en CpG84-89. Er werden drie pyroprogramma's gerund voor deze gebieden. Voor het eerste gebied CpG74-76 werd gebruik gemaakt van de *therascreen* MGMT pyro kit (Cat.no. 971061). Voor de andere twee gebieden, CpG74-83 en CpG84-89, werden de pyroprogramma's zelf opgesteld.

De *pyrosequencing* werd uitgetest op twee reeksen patiëntenstalen (bijlage 16 en bijlage 17). Hierbij bestond de eerste reeks (bijlage 17) naast patiëntenstalen ook uit cellijnen. Van deze cellijnen was de methylatiestatus algemeen bekend en in de literatuur terug te vinden [67] [69] [72]. Uit de resultaten van de cellijnen werd afgeleid dat de methylatiestatus van de vier belangrijke CpG-gebieden, zowel apart als het globale overzicht, overeenkwam met de resultaten uit de literatuur. Hierdoor kon worden aangenomen dat deze vier CpG-gebieden representatief zijn voor de methylatiestatus van het gen. Met dit in het achterhoofd konden de resultaten van de patiëntenstalen worden bekeken. Uit de patiëntenstalen van reeks 1 werd afgeleid dat tussen de duplo's vrij veel discrepanties werden waargenomen.

Zo werd bij het staal MBT14-007 twee discrepanties in de duplo's waargenomen. Dit voor CpG74-78 en voor CpG89. Deze discrepanties waren waarschijnlijk te wijten aan de uitvoering van de procedure. Aangezien de methylatiepercentage van de duplo's overeenstemmend moesten zijn. Bij deze analyse werd een kleine spreiding waargenomen. Doch blijft het eindresultaat van de *pyrosequencing* ongemethyleerd, hetgeen ook bij de MSP werd geconstateerd.

Bij de duplo van MBT12-134 werd een discrepantie opgemerkt bij CpG89. Ook deze discrepantie kon te wijten zijn aan de uitvoering van de techniek. Verder was de eindconclusie van de *pyrosequencing* in tegenstrijd met deze van de MSP. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat met beide analyses andere CpG-gebieden in rekening gebracht werden om de methylatiestatus van de promotor te vertegenwoordigen.

Hiernaast kon worden opgemerkt dat het staal MBT14-855 volledig was gemethyleerd terwijl bij de analyse met de MSP dit staal als ongemethyleerd werd beschouwd. Dit kan te wijten zijn aan het feit dat bij MSP een ander CpG-gebied en andere CpG-verhoudingen in rekening werden gebracht dan bij de *pyrosequencing*.

Als laatste is bij staal MBT14-931 een discrepantie tussen de duplo's waar te nemen bij CpG74-78. Ook dit kan aan de uitvoering van de techniek liggen.

Naast de stalen uit reeks 1 werden ook de patiëntenstalen van reeks 2 gerund op de *pyrosequencing*. Deze resultaten werden met alle drie de programma's gerund. Uit deze resultaten van CpG74-89 werd afgeleid dat zowel voor de *pyrosequencing* als de MSP de eindconclusie hetzelfde is voor alle stalen. Verder werden bij staal T13/12990, T13/20564 en T14/17068 tussen de duplo's discrepanties waargenomen. Dit kon te wijten zijn aan de uitvoering van de techniek. Hiernaast kon dit ook te wijten zijn aan het feit dat deze stalen net niet of niet wel gemethyleerd waren. Wanneer naar de resultaten van de qPCR werd gekeken, werd opgemerkt dat bij deze stalen een discrepantie werd vastgesteld.

De stalen werden ook gerund met de *therascreen* MGMT kit. Hierbij werd geen negatief controlestaal meegenomen. Bijgevolg werd de achtergrondruis meegerekend bij de methylatiestatus van de promotor hetgeen een vertekend beeld van de resultaten weergeeft. Wanneer de cut-off (5%) wordt vergeleken met het methylatiepercentage kan worden vastgesteld dat voor bepaalde stalen, T13/15617 en T14/17068, dit percentage zeer dicht bij de cut-off ligt. Met andere woorden wanneer hier de achtergrondruis in rekening werd gebracht. Zo kunnen deze resultaten van een gemethyleerde status naar een ongemethyleerde status veranderen.

Uit bovenstaande resultaten kon³ worden afgeleid dat het dus van belang is welke CpG-gebieden worden geanalyseerd vermits dit bepalend is voor de methylatiestatus van de promotor.

6. BESLUIT

In dit project werden glioblastomen onder de loep genomen, meer bepaald de glioblastoma multiforme. Dit is de meest voorkomende agressieve vorm binnen de hersentumoren. Deze tumoren zijn over het algemeen zeer moeilijk te behandelen. Ze zijn vrij resistent waardoor de patiënten meestal binnen het jaar overlijden. Om de overlevingskans te vergroten, dient een juiste prognose voor de behandeling gesteld te worden. Dit kan door aantonen van MGMT-promotor hypermethylering. Promotor hypermethylering speelt een belangrijke rol bij de tumorgenese en tumorprogressie van glioblastomen.

Vooreerst werd de bisulfietbehandeling gevalideerd omwille van een nieuwe kit. Met deze behandeling werd een onderscheid gemaakt tussen gemethyleerd en ongemethyleerd DNA. Zo kon de methylatiestatus van het DNA bepaald worden. De validatie van de bisulfietbehandeling werd succesvol uitgevoerd. Hierbij werd opgemerkt dat de nieuwe bisulfietbehandeling efficiënter is dan de oude. Dit komt doordat de kwaliteit van het DNA beter behouden bleef.

Door de nieuwe bisulfietbehandeling moest de MLH1-analyse opnieuw geoptimaliseerd worden. Met deze analyse kon een beter onderscheid tussen sporadische en erfelijke colontumoren gemaakt worden. Hierbij werd de methylatiestatus van het MLH1-gen onderzocht. Een verhoogde methylatiestatus van de promotor van het MLH1-gen kon het gen inactiveren. Hierdoor werden microsatellieten instabiel. Bij tumoren met een verhoogde microsatelliet instabiliteit en de afwezigheid van hypermethylering van het MLH1-gen kon een betere prognose gemaakt worden voor het Lynch syndroom.

De detectie van de methylatiestatus werd reeds in het labo uitgevoerd met behulp van MSP, meer bepaald een *nested* PCR. Hierbij werd het resultaat op het einde zichtbaar gemaakt via gelelektroforese. Deze methode diende omgezet te worden in een rechtstreekse PCR. Deze PCR-methode had een lagere gevoeligheid aangezien hier maar één PCR-reactie werd uitgevoerd in tegenstelling tot de *nested* PCR. Hierbij verlaagde ook de kans op contaminatie. Als rechtstreekse methode werd geopteerd voor de qPCR. Verder werd niet alleen de methylatiestatus door qPCR bepaald maar ook door *pyrosequencing*. Voor beide analyses werd getracht een cut-off te stellen.

De optimalisatie van de MLH1-analyse werd succesvol uitgevoerd. De *nested* PCR werd omgezet naar een rechtstreekse PCR, nl. de qPCR. Bij de qPCR was de amplificatie van het DNA beter op te volgen. Deze werd niet enkel op het einde van de reactie weergegeven, maar doorheen de hele PCR-reactie. De detectielimiet kon echter niet gesteld worden omdat de resultaten van de verdunningsreeks gecontamineerd werden. Hierdoor kon geen betrouwbare cut-off gesteld worden.

Hiernaast werd de methylatiestatus van het MLH1-gen geanalyseerd met behulp van *pyrosequencing*. Hieruit kon worden opgemerkt dat enkele discrepanties zijn waar te nemen tussen de qPCR en *pyrosequencing*. Dit kwam omdat bij deze analyses een ander CpG-gebied gedetecteerd wordt. Hieruit werd afgeleid dat de *pyrosequencing* gebruikt kon worden als een bevestigende methode op de qPCR.

Uit bovenstaande waarnemingen kon geconcludeerd worden dat de methylatiestatus van het MLH1-gen zowel met de qPCR als *pyrosequencing* bepaald was.

De optimalisatie van de MLH1-analyse diende als basis voor aantonen van MGMT-promotor hypermethylering. Het MGMT-gen codeert voor een enzym dat betrokken is bij DNA-herstel. Wanneer de promotor van het MGMT-gen gemethyleerd was, werd geen eiwit gevormd. Hierdoor zal ook geen DNA-herstel optreden. Dit was positief voor de behandeling van hersentumoren met behulp van temozolomide. Vermits de werking hiervan teniet werd gedaan door het MGMT-eiwit. Voor het aantonen van MGMT-promotor hypermethylering werden verschillende CpG-gebieden en regio's van de promotor van het gen geanalyseerd. Zo werden de CpG-gebieden omschreven in Esteller et. al [64], meer bepaald CpG81-83, gedetecteerd met behulp van qPCR. Hiernaast werden de CpG-gebieden omschreven in Quillien et al. [65], meer bepaald CpG74-89 gedetecteerd met behulp van *pyrosequencing*. Verder werden de resultaten van deze analyses vergeleken met de resultaten van de reeds uitgevoerde analyses op de stalen. Hieruit bleek dat het van belang is om de juiste CpG-eilanden te analyseren. Aangezien deze een heel andere invloed op het resultaat van patiëntenstalen konden teweegbrengen. Hierdoor kon de verkeerde behandeling worden opgestart. De MGMT-analyse dient hierbij nog verder geoptimaliseerd te worden.

Uit de MLH1-analyse en MGMT-analyse bleek dat het noodzakelijk is om een ongemethyleerde controle mee te nemen bij de *pyrosequencing*. Zo kon de achtergrondruis in rekening gebracht worden met de methylatiepercentages.

Voor de optimalisatie van de MLH1-analyse moet de qPCR op de verdunningsreeks herhaald worden. Deze analyse werd in beide gevallen gecontamineerd waardoor het stellen van de cut-off niet met zekerheid kon worden uitgevoerd.

Daarnaast dient de MGMT-analyse nog verder geoptimaliseerd te worden. Hierbij moeten verdere testen worden uitgevoerd. De technieken, zowel qPCR als *pyrosequencing*, moeten voor de MGMT-analyse op een groter aantal patiëntenstalen worden uitgevoerd. Verder dient de qPCR op de verdunningsreeks herhaald te worden zodat een cut-off gesteld kan worden.

Om de kans op contaminatie te verminderen bij het aantonen van MGMT-promotor hypermethylering, kan geopteerd worden voor een nieuwe UV-kast in het post-PCR labo. In deze UV-kast kan de opzuivering van de bisulfietbehandeling worden uitgevoerd. Verder kan hier de voorbereiding van de PCR-reacties voor de MLH1- en MGMT-analyses plaatsvinden. Een tweede optie om de kans op contaminatie te verlagen, is om een thermocycler in het DNA-labo kunnen te plaatsen. In dit labo wordt de DNA-isolatie uitgevoerd en worden PCR-reacties voorbereid. Hier wordt dus niet met PCR-producten gewerkt waardoor de kans op contaminatie verkleint.

Om een beter prognose te stellen over de behandeling van hersentumoren kan naast MGMT-promotor hypermethylering ook de mutatieanalyse op IDH1- en IDH2-genen worden uitgevoerd. De mutatieanalyse van het IDH1-gen wordt momenteel in het labo uitgevoerd door immunohistochemisch onderzoek. Aangezien de resultaten van deze testen vrij moeilijk te beoordelen zijn, kan geopteerd worden om de mutatieanalyse uit te voeren met behulp van *pyrosequencing*. Hierbij kan naast de analyse van het IDH1-gen ook een mutatieanalyse uitgevoerd worden op het IDH2-gen.

LITERATUURLIJST

- [1] „All cancers estimated incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012,” Globocan, 2012. [Online]. Available: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx. [Geopend 20 september 2014].
- [2] H. Vries, „Glioblastoom en chemotherapie: nieuwe inzichten bieden nieuwe mogelijkheden,” Springer, februari 2005. [Online]. Available: Beschikbaar: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF03058671>. [Geopend 18 september 2014].
- [3] E. Capel, J.-F. Réjou en R. Hamelin, „Assessment of MLH1 promotor methylation in relation to gene expression requires specific analysis,” readcube, 4 juni 2007. [Online]. Available: <http://www.readcube.com/articles/10.1038/sj.onc.1210581>. [Geopend 29 september 2014].
- [4] „O6-methylguanin-DNA methyltransferase,” Genecards, 7 mei 2014. [Online]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MGMT>. [Geopend 29 september 2014].
- [5] K. Suijkerbuijk, E. van der Wall, T. van Laar, M. Vooijs en P. van Diest, „Nederlands tijdschrift voor geneeskunde,” 22 april 2007. [Online]. Available: <http://www.ntvg.nl/artikelen/epigenetische-processen-de-maligne-ontaarding-de-rol-van-dna-methylering-het-ontstaan-van>. [Geopend 20 september 2014].
- [6] „Wat is genetica?,” Universitair ziekenhuis Brussel, 26 11 2012. [Online]. Available: http://www.brusselgenetics.be/wat_introductie. [Geopend 27 oktober 2014].
- [7] S. J., „Methylering DNA beklijft minstens 3 jaar,” 9 september 2013. [Online]. Available: <http://www.bionieuws.nl/artikel.php?id=7775&print=1>. [Geopend 29 oktober 2014].
- [8] G. Van Steenberghe, „Epigenetische veranderingen in kanker: nieuwe targets voor therapie,” Universiteit Gent, 2010. [Online]. Available: http://buck.ugent.be/fulltxt/RUG01/001/458/985/RUG01-001458985_2011_0001_AC.pdf. [Geopend 2 november 2014].
- [9] J. G. Herman, M.D en S. B. Baylin, M.D., „Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation,” 20 November 2003. [Online]. Available: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra023075>. [Geopend 25 november 2014].
- [10] „wat is kanker?,” kanker.nl, 3 december 2013. [Online]. Available: <https://www.kanker.nl/bibliotheek/kanker/wat-is/792-wat-is-kanker>. [Geopend 2014 november 1].
- [11] J. Govaerts, S. De Coster en N. van Larebeke, „Milieu en gezondheid,” 2006. [Online]. Available: http://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCMQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.milieu-en-gezondheid.be%2Frapporten%2FEpigenetische%2520mechanismen%2520in%2520de%2520carcinogenese.pdf&ei=amVyVMLFO43tapvrgJgL&usq=AFQjCNF3vX7RmSX8-ga_vGu20L. [Geopend 1 november 2014].

- [12] „cell biology and cancer,” Rediscovering biology , [Online]. Available: http://www.learner.org/courses/biology/textbook/cancer/cancer_3.html. [Geopend 5 november 2014].
- [13] „Celdeling van kankercellen,” [Online]. Available: <http://mens-en-gesondheid.infonu.nl/ziekten/26837-celdeling-van-kankercellen.html> . [Geopend 2014].
- [14] I. Breusegem, „Optimalisatie methylatie-onderzoek MLH1 promotor in colontumoren,” Howest, 3 juli 2009. [Online]. Available: <http://dspace.howest.be/bitstream/10046/545/4/Eindwerk%2BIIse%2BDefinitieve%2Bversie.pdf>. [Geopend 26 oktober 2014].
- [15] E. Steine, „De novo DNA methyltransferases in tumorigenesis,” [Online]. Available: http://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=7&ved=0CEcQFjAG&url=http%3A%2F%2Frepub.eur.nl%2Fpub%2F37374%2F120627_Steine%2C%2520Eveline%2520Josephine.pdf&ei=Wx1V1VImCGOat7gai0IDIBQ&usg=AFQjCNHqrZk_1ouqX3TT94HA60Tye7aPvg&bvm=bv.80185997,d.ZGU. [Geopend 2014 november 23].
- [16] C. Boland en A. Goel, „Microsatellite instability in colorectal cancer,” juni 2010. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3037515/>. [Geopend 15 oktober 2014].
- [17] A. Moran , P. Ortega, C. de Juan , T. Fernandez-Marcelo en C. Frias, „Differential colorectal carcinogenesis: molecular basis and clinical relevance,” 15 maart 2010. [Online]. Available: <http://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=8&ved=0CEsQFjAH&url=http%3A%2F%2Fwww.wjgnet.com%2F1948-5204%2Fpdf%2Fv2%2Fi3%2F151.pdf&ei=fIN7VO6dEcHnaqXbgPgB&usg=AFQjCNHsKHKt-bUVNqbWpltLWBvFqprasQ&bvm=bv.80642063,d.d2s>. [Geopend 25 november 2014].
- [18] „Colorectale tumoren,” Koning albert II instituut , [Online]. Available: <http://www.centreducancer.be/nl/groups/4/Colorectale+Tumoren>. [Geopend 13 november 2014].
- [19] P. Hermens, M. Nagengast , I. Overbeek , H. van Krieken , J. Ligtenberg en N. Hoogerbrugge, „Erfelijke darmkanker opsporen door tumoronderzoek,” 2012. [Online]. Available: http://www.google.be/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCIQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.palga.nl%2Fpalga%2Fpalgacms.nsf%2Fuploads%2F8B3AF5B419AE3501C1257AA0003EAEA1%2F%24FILE%2FHoogerbrugge_NTVG_2012_MIPA_LZV564.pdf&ei=vSF1VOqNM8uz7gb0hIDIB A&usg=. [Geopend 2014 28 oktober 2014].
- [20] R. Senf, „Het lynch syndroom,” Erfelijkheid, 8 augustus 2013. [Online]. Available: <http://www.erfelijkheid.nl/content/lynch-syndroom>. [Geopend 2014 november 12].
- [21] A. de Rooter, „Autosomaal dominante overerving,” Erfelijkheid, 2 december 2013. [Online]. Available: <http://erfelijkheid.nl/content/autosomaal-dominante-overerving>. [Geopend 13 november 2014].
- [22] „MLH1 gene,” Genetics home reference , mei 2013. [Online]. Available: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1>. [Geopend 28 september 2014].

- [23] P. M. V. B. Park B.H., „DNA repair pathway genes,” 2013. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12469/#A1595>. [Geopend 20 november 2014].
- [24] „MLH1-gene,” Gene cards , 7 mei 2014. [Online]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MLH1>. [Geopend 3 oktober 2014].
- [25] A. Jones en B. Baylin, „The fundamental role of epigenetic events in cancer,” juni 2002. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042769>. [Geopend 25 november 2014].
- [26] R. Geurts-Giele, H. Leenen, J. Dubbink, C. Meijssen en E. Post, „Somatic abberations of mismatch repair genes as a cause of microsatellite-unstable cancers,” 19 juni 2014. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111426>. [Geopend 15 oktober 2014].
- [27] „Darm aandoening: Lynch syndroom diagnose,” 31 december 2013. [Online]. Available: <http://www.darmaandoening.nl/lynch-syndroom-diagnose-en-behandeling/>. [Geopend 15 december 2014].
- [28] A. Vilkin , Y. Niv, R. Boland, T. Nagasaka, S. Morgenstern, Z. Levi, Z. Fireman, F. Fuerst en A. Goel, „Microsatellite Instability, MLH1 Promoter Methylation, and BRAF Mutation Analysis in Sporadic Colorectal Cancers of Different Ethnic Groups in Israel,” 15 februari 2009. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2855188/>. [Geopend 28 oktober 2014].
- [29] K. g. Nederland, „Diagnostische tests,” Oncoline, 9 januari 2008. [Online]. Available: http://www.oncoline.nl/index.php?pagina=/richtlijn/item/pagina.php&id=25927&richtlijn_id=545. [Geopend 20 november 2014].
- [30] „Hersentumor,” Hersenstichting , [Online]. Available: <https://www.hersenstichting.nl/alles-over-hersenen/hersenaandoeningen/hersentumor>. [Geopend 15 november 2014].
- [31] „Hersentumor: symptomen, verschijnselen, levensverwachting,” mens en gezondheid , 2 oktober 2011. [Online]. Available: <http://mens-en-gezondheid.infonu.nl/aandoeningen/83680-hersentumor-symptomen-verschijnselen-levensverwachting.html>. [Geopend 28 oktober 2014].
- [32] „Gliomen,” Hersentumor, [Online]. Available: <http://hersentumor.nl/over-hersentumoren-2/soorten-tumoren/gliomen/laaggradig-astrocytoom-grad-2/#a>. [Geopend 15 november 2014].
- [33] K. kankerbestrijding, „Hersentumoren,” kanker , 7 november 2013. [Online]. Available: <https://www.kanker.nl/bibliotheek/hersentumoren/wat-is/307-hersentumoren>. [Geopend 15 november 2014].
- [34] „Recidief,” hersentumor , [Online]. Available: <http://hersentumor.nl/traject/recidief/>. [Geopend 20 november 2014].
- [35] H. E., „Glioblastoma multiforme: the terminator,” 6 juni 2000. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC33993/>. [Geopend 20 oktober 2014].
- [36] N. Thon , S. Kreth en F. Kreth, „Personalized treatment strategies in glioblastoma: MGMT promoter methylation status,” Pubmed, 2013. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3792931/>. [Geopend 25 oktober 2014].

- [37] N. Shah, „Comprehensive analysis of MGMT promoter methylation: correlation with MGMT expression and clinical response in GBM,” 7 januari 2011. [Online]. [Geopend 30 september 2014].
- [38] C.-H. Fan , W.-L. Liu, H. Cao, C. Wen, L. Chen en G. Jiang, „O6-methylguanine DNA methyltransferase as a promising target for the treatment of temozolomide-resistant gliomas,” 24 oktober 2013. [Online]. Available: <http://www.nature.com/cddis/journal/v4/n10/full/cddis2013388a.html>. [Geopend 20 december 2014].
- [39] H. Vries , „Glioblastoom en chemotherapie: nieuwe inzichten bieden nieuwe mogelijkheden,” februari 2005. [Online]. Available: <http://link.springer.com/article/10.1007/BF03058671>. [Geopend 20 september 2014].
- [40] M. Baur, „Frequent MGMT (O6-methylguanine-DNA methyltransferase) hypermethylation in long-term survivors of glioblastoma: a single institution experience,” 6 april 2010. [Online]. [Geopend 25 september 2014].
- [41] Y. H., D. Ye, K. Guan en Y. Xiong, „IDH1 and IDH2 mutations in tumorigenesis: mechanistic insights and clinical perspectives,” 15 oktober 2012. [Online]. Available: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/18/20/5562.full>. [Geopend 26 november 2014].
- [42] J. Losman, G. Wiliam en J. Kaelin, „What difference a hydroxyl makes: mutant IDH, (R)-2-hydroxyglutarate, and cancer,” 2013. [Online]. Available: <http://genesdev.cshlp.org/content/27/8/836.full>. [Geopend 26 november 2014].
- [43] „IDH1,” januari 2014. [Online]. Available: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IDH1>. [Geopend 20 september 2014].
- [44] „IDH2-gen,” januari 2014. [Online]. Available: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/IDH2>. [Geopend 20 september 2014].
- [45] „DNA-extractie,” [Online]. Available: <http://www.allesoverdna.nl/woordenboek/dna-extractie.html>. [Geopend 2 december 2014].
- [46] v. D. J., T. Langerak, M. Bruggeman , P. Evans, M. Hummel, F. Lavender en E. Delabesse, „Desing and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations,” 1 december 2003. [Online]. Available: <http://repub.eur.nl/pub/64754/>. [Geopend 26 november 2014].
- [47] „gelelektroforese,” [Online]. Available: <http://levien.zonnetjes.net/biochemie/tmp/proevenlos/6-electroforese.pdf>. [Geopend 14 oktober 2014].
- [48] K. Patterson , L. Molloy en S. Clark, „DNA methylation: bisulphite modification and analysis,” Pubmed, 21 oktober 2011. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3227193/?report=reader>. [Geopend 15 oktober 2014].
- [49] K. Patterson , L. Molloy, Q. Wenjia en S. Clark, „DNA methylation: bisulphite modification and analysis,” 21 oktober 2011. [Online]. Available:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3227193/pdf/jove-56-3170.pdf>. [Geopend 15 oktober 2014].

[50] H. H., „Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis - a personal account,” oktober 2008. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3722019/pdf/321.pdf> . [Geopend 15 oktober 2014].

[51] P. Russel , „Bisulfite sequencing of DNA,” 12 november 2011. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3214597/>. [Geopend 20 oktober 2014].

[52] H. J.G., J. Graff, S. Myhohanen , B. Nelkin en S. Baylin , „Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands,” 3 september 1996. [Online]. Available: <http://www.pnas.org/content/93/18/9821.abstract>. [Geopend 10 oktober 2014].

[53] „Polymerase chain reaction (PCR),” NCBI, 26 september 2014. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techpcr/>. [Geopend 30 oktober 2014].

[54] E. Arnoldus, N. Jiwa, A. Peters en A. Raap, „De polymerase-kettingreactie,” ntvg, 16 september 1989. [Online]. Available: <http://www.ntvg.nl/artikelen/de-polymerase-kettingreactie/volledig>. [Geopend 10 oktober 2014].

[55] „Nested PCR,” [Online]. Available: http://www.clcsupport.com/clcgenomicsworkbench/650/Nested_PCR.html. [Geopend 27 oktober 2014].

[56] „Nested primers for PCR,” [Online]. Available: <http://www.bio.davidson.edu/genomics/method/NestedPCR.html>. [Geopend 24 oktober 2014].

[57] „Gelelektroforese,” [Online]. Available: <http://levien.zonnetjes.net/biochemie/tmp/proevenlos/6-electroforese.pdf>. [Geopend 26 oktober 2014].

[58] „Clinical Trial substantiates the predictive value of O-6-Methylguanine-DNA methyltransferase promoter methylation in glioblastoma patients treated with temozolomide,” 15 maart 2004. [Online]. Available: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/10/6/1871/F1.expansion> . [Geopend 30 oktober 2014].

[59] „Real-time PCR applications Guide,” Bio-Rad laboratories , 2006. [Online]. Available: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf. [Geopend 25 oktober 2014].

[60] „Real-time PCR vs traditional PCR,” [Online]. Available: http://www6.appliedbiosystems.com/support/tutorials/pdf/rtpcr_vs_tradpcr.pdf. [Geopend 16 oktober 2014].

[61] „pyrosequencing technology and platform overview,” [Online]. Available: <http://www.qiagen.com/nl/resources/technologies/pyrosequencing-resource-center/technology-overview/>. [Geopend 20 oktober 2014].

- [62] „Therascreen MGMT pyro kit,” [Online]. Available: <http://www.qiagen.com/be/products/catalog/assay-technologies/complete-assay-kits/personalized-healthcare/therascreen-mgmt-pyro-kit/>. [Geopend 20 december 2014].
- [63] „Therascreen EGRF pyro kit handbook,” [Online]. Available: <http://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=94c89f69-54f1-43d7-ba5a-2393df515b1e&lang=en>. [Geopend 20 december 2014].
- [64] M. Esteller, „Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents,” 9 november 2000. [Online]. Available: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200011093431901#t=articleMethods>. [Geopend 4 november 2014].
- [65] Q. V., A. Lavenu, M. Sanson, M. Legrain , P. Dubus, L. Karyan-Tapon , J. Mosser en K. Ichimura, „Outcome-based determination of optimal pyrosequencing assay for MGMT methylation detection in glioblastoma patients,” 14 januari 2014. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24420923>. [Geopend 2 november 2014].
- [66] „MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™),” ATCC, s.d.. [Online]. Available: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/HTB-26.aspx?geo_country=be. [Geopend 12 november 2014].
- [67] M. Brock, M. Gou , Y. Akiyama, A. Muller , T. Wu, E. Montgomery, M. Deasel , P. Germonpré , L. Rubinson, R. Heitmiller , S. Yang , A. Forastiere , S. Baylin en Herman JG, „Prognostic importance of promoter hypermethylation of multiple genes in esophageal adenocarcinoma.,” 1 augustus 2003. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12912936>. [Geopend 12 november 2014].
- [68] „SW480 [SW-480] (ATCC® CCL-228™),” ATCC, s.d.. [Online]. Available: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-228.aspx>. [Geopend 12 november 2014].
- [69] L. Shen, Y. Kondo, G. Rosner, L. Xiao, N. Hernandez, J. Vilaythong, P. Houlihan, R. Krouse, A. Prasad, J. Einspahr, J. Buckmeier, D. Alberts, S. Hamilton en J. Issa, „MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer.,” september 2005. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16174854>. [Geopend 12 november 2014].
- [70] „SW48 [SW-48] (ATCC® CCL-231™),” ATCC, s.d.. [Online]. Available: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-231.aspx>. [Geopend 12 november 2014].
- [71] „HT-29 (ATCC® HTB-38™),” ATCC, s.d.. [Online]. Available: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-38.aspx>. [Geopend 12 november 2014].
- [72] M. Esteller , S. Hamilton, P. Burger, S. Baylin en J. Herman, „Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia.,” Februari 1999. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029064>. [Geopend 12 november 2014].
- [73] „LS 174T (ATCC® CL-188™),” atcc, s.d.. [Online]. Available: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CL-188.aspx?geo_country=be. [Geopend 12 november 2014].

- [74] N. K., „Colorectal cancer in those with a genetic susceptibility,” 2013. [Online]. Available: <https://www.escholar.manchester.ac.uk/uk-ac-man-scw:199254>. [Geopend 22 September 2014].
- [75] Q. V., „Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, methyl light, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting and immunohistochemistry) to analyse O6-methylguanine-DNA-methyltransferase,” 2012. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22294349>. [Geopend 2 november 2014].
- [76] R. Peist, G. Traeger, G. Schock, D. Holton en D. Loeffert, „(EN) - Improved DNA methylation analysis through prevention of DNA fragmentation during bisulfite treatment,” 2007. [Online]. Available: <http://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=3cb81cd1-a250-46ba-b6a9-69fe37f2c955&lang=en>. [Geopend 16 november 2014].
- [77] „TSS viewer MLH1 gene,” database of transcriptional start sites, 15 September 2014. [Online]. Available: <http://dbtss.hgc.jp/>. [Geopend 10 oktober 2014].
- [78] D. P. e. al., „Homo sapiens chromosome 10,” NCBI, 3 februari 2014. [Online]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000010.11?report=genbank&from=129467190&to=129767519. [Geopend 10 oktober 2014].
- [79] S. Mulholland, D. Pearson, R. Hamoudi, D. Malley, M. Smith, J. Weaver, D. Jones, S. Kocalkowski, L. Bäcklund, P. Collins en K. Ichimura, „MGMT CpG island is invariably methylated in adult astrocytic and oligodendroglial tumors with IDH1 and IDH2 mutations,” 2012. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020830>. [Geopend 5 oktober 2014].
- [81] „Epigenetica,” Alles over DNA, [Online]. Available: <http://www.allesoverdna.nl/woordenboek/epigenetica.html>. [Geopend 27 oktober 2014].
- [82] „Beschrijving van het lynch syndroom,” Maag, lever en darm stichting, [Online]. Available: <http://www.mlds.nl/ziekten/31/lynch-syndroom/>. [Geopend 2014 november 13].
- [83] „Hersentumoren,” Vlaamse liga tegen kanker, 2013 februari 2013. [Online]. Available: <http://www.tegenkanker.be/hersentumoren>. [Geopend 15 november 2014].
- [84] M. D. Lynch J.P., „Mouse models of colon cancer,” 12 12 2008. [Online]. Available: <http://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085%2808%2902307-X/fulltext>. [Geopend 21 november 2014].
- [85] „Repair of O6-MeG by MGMT,” Qiagen, [Online]. Available: <http://www.qiagen.com/be/products/genes%20and%20pathways/pathway%20details.aspx?pwid=390>. [Geopend 1 november 2014].
- [86] „O-6-methylguanine-DNA methyltransferase,” genecards, 7 mei 2014. [Online]. Available: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MGMT>. [Geopend 29 september 2014].
- [87] „Institute for viral pathogenesis,” [Online]. Available: http://www.ivpresearch.org/nested_pcr.htm. [Geopend 14 oktober 2014].

- [88] „B/PCR ou technique d'amplification de l'ADN,” L'homme et la nature , [Online]. Available: <http://lhommeetlanatures3yglck.e-monsite.com/pages/2-les-methodes-d-analyses/b-pcr-ou-technique-d-amplification-de-l-adn.html>. [Geopend 24 november 2014].
- [89] [Online]. Available: <http://bbs.pranovo.com/resources/fig-2-melting-curve-profi-le-of-pcr-products-amplified-wit/thumb/1046>. [Geopend 4 november 2014].
- [90] A. Reints en H. Wilkens, Wat bepaalt de kwaliteit van digitaal leermateriaal, nummer 1 red., Weten Wat Werkt en Waarom, 2012.
- [91] A. Reints, A framework for assesing the quality of learning materials. In: Selander, S., Tholey, M. & Lorentzen, S (eds.), Stockholm: New Educational Press, 2002.
- [92] L. Pennings, J. Esmeijer en M. Leendertse, TNO Rapport Leermiddelen voor de 21e eeuw – Eindrapport, 2008.
- [93] J. Elen, Beoordelen van opleidingsmateriaal. Enkele theoretische bedenkingen. In Opleiding en Ontwikkeling, 9, 13-17., 1993.
- [94] M. Clement en L. (. Laga, Steekkaarten doceerpraktijk – steekkaart studiemateriaal, Antwerpen-Apeldoorn: Garant, 2005.
- [95] P. Bunnik-Tibbe, Kenmerken van leerfuncties binnen onderwijsleermiddelen - ontwikkeling en toetsing van een instrument voor de beoordeling van leermiddelen, 2008.
- [96] M. Banens en A. Wilkens, De Verleiding Weerstaan, Bohn Stafleu van Loghum, 2012.
- [97] S. de Valk, Wijs met Wikiwijs - reactie van de Groep Educatie Uitgeverijen op de brief van de minister van 7 april 2009 betreffende Stimulering open leermiddelen., 2009.
- [98] J. van den Akker, Curriculum perspectives: An introduction. In J. van den Akker, W. Kuiper & U. Hameyer (Eds.), Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2003.
- [99] G. Ubachs, K. Williams, K. Kear en J. Rosewell, Quality Assessment for E-learning: a Benchmarking Approach, Heerlen: EADTU, 2012.
- [100] „Engineering-online,” [Online]. Available: http://www.engineering-online.nl/?com=content&action=frequency_converter.
- [101] „Rootechniek,” [Online]. Available: <http://www.rootechniek.nl/cms/files/frequentieregelaar.pdf>.

FIGURENLIJST

Figuur 1 Methylering van CpG-eilanden in normale cellen. e [9].	13
Figuur 2 'Two-hit'-hypothese van Knudson. [9].	15
Figuur 3 Vergelijking van DNA-methylering bij normale cel en kanker cel. [9].	15
Figuur 4 Fearon-Vogelstein model. Dit model beschrijft de ontwikkeling van sporadische colonkanker [17].	17
Figuur 5 Schematische weergave van de pathway van MutS-MutL. [84]	18
Figuur 6 De plaats van het MLH1-gen aangeduid op chromosoom 3 [24].	19
Figuur 7 Hypermethylering van de promotor van het MLH1-gen kan leiden tot inactivatie van het gen [25].	19
Figuur 8 Overzicht van verschillende analyses voor het Lynch syndroom. [26].	20
Figuur 9 Pathway van het MGMT-gen [85] . Het MGMT-eiwit gaat methylgroepen (CH ₃) verwijderen van de O ⁶ -positie van het guanine.	24
Figuur 10 De plaats van het MGMT-gen aangeduid op chromosoom 10 [4].	24
Figuur 11 Hypermethylering van de promotor van het MGMT-gen kan leiden tot inactivatie van het gen [25].	25
Figuur 12 Pathway van IDH-genen [41].	26
Figuur 13 Schematische weergave van chromosoom 2, met aanduiding van locatie van IDH1-gen [43].	26
Figuur 14 Schematische weergave van chromosoom 15. De roze balk geeft de plaats van het IDH2-gen weer, nl. 15q26.1 [44].	27
Figuur 15 Eenvoudige weergave van de reactie van wildtype en gemuteerd IDH1- en IDH2-gen [42]	27
Figuur 16 Reactievergelijking van de omzetting van een cytosine naar een uracil met behulp van bisulfiet [48]	29
Figuur 17 Schematische weergave van principe van PCR [88].	31
Figuur 18 Schematische weergave van principe van <i>nested</i> PCR [87].	31
Figuur 19 Resultaat na MSP. [58].	32
Figuur 20 De amplificatiecurve [59].	33
Figuur 21 Resultaat na qPCR, de smeltcurve [89].	33
Figuur 22 Principe van pyroPCR [61]	34

Figuur 23 Principe van <i>pyrosequencing</i> [61].	35
Figuur 24 Resultaat van <i>pyrosequencing</i> , een pyrogram [61].	35
Figuur 25 Voorbeeld van pyrogram waarbij methylatiestatus bepaald wordt van een ongemethyleerd staal.	36
Figuur 26 Voorbeeld van een pyrogram waarbij methylatiestatus bepaald wordt van een gemethyleerd staal. [62].	37
Figuur 27 Pyrogram van wildtype sequentie [63].	37
Figuur 28 Pyrogram van een sequentie met een mutatie nl. ACG is gemuteerd naar ATG [63].	37
Figuur 29 Voorbeeld van invullen van plaat setup voor <i>pyrosequencing</i> .	65
Figuur 30 Weergave van opstelling van het vacuümstation.	66
Figuur 31 Weergave van de cartridge voor het pipetteren van de nucleotiden (A,C,G en T), enzymmix (E) en substraatsmix (S).	67
Figuur 32 Resultaat na gelelektroforese van MLH1-analyse met de nieuwe bisulfietbehandeling.	69
Figuur 33 Resultaat na gelelektroforese van MLH1-analyse met de nieuwe bisulfietbehandeling.	70
Figuur 34 Resultaat na gelelektroforese van MLH1-analyse met de nieuwe bisulfietbehandeling op de stalen die een discrepantie vertonen. I.	71
Figuur 35 Resultaat van qPCR met MyTaq™ HS mix op controlestalen (MLH1-analyse).	74
Figuur 36 Resultaat van qPCR met MyTaq™ HS mix op controlestalen met 2 µl DNA (MLH1-analyse)	74
Figuur 37 Resultaat van qPCR vergelijking tussen MyTaq™ HS mix en SensiFast™ HRM HM mix bij lage temperaturen voor <i>annealing</i> temperatuur (52°C, 54°C en 56°C) (MLH1-analyse).	75
Figuur 38 Resultaat van qPCR vergelijking tussen MyTaq™ HS mix en SensiFast™ HRM mix bij 58°C en 60°C (MLH1-analyse).	76
Figuur 39 Resultaat van qPCR met SensiFast™ HRM mix op controlestalen (MLH1-analyse).	77
Figuur 40 Resultaat geoptimaliseerde qPCR op controlestalen (MLH1-analyse).	78
Figuur 41 Resultaat van qPCR op beperkt aantal stalen voor MLH1-analyse.	79
Figuur 42 Resultaat van qPCR op deel 1 van uitgebreid aantal patiëntenstalen voor MLH1-analyse.	82
Figuur 43 Resultaat van qPCR op deel 2 van uitgebreid aantal patiëntenstalen voor MLH1-analyse.	84
Figuur 44 Schematische voorstelling van seriële verdunningsreeks.	87
Figuur 45 Het resultaat van de qPCR van de verdunningsreeks voor de MLH1-analyse.	87

Figuur 46 Resultaat na gelelektroforese van verdunningsreeks voor MLH1-analyse.....	89
Figuur 47 Het resultaat van de qPCR van de verdunningsreeks 2 voor de MLH1-analyse.	90
Figuur 48 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten van de herhaling van qPCR op verdunningsreeks voor MLH1-analyse. 92	
Figuur 49 Het resultaat na gelelektroforese op de PCR-producten na pyroPCR (MLH1-analyse).....	94
Figuur 50 Het pyrogram van de negatieve controle met programma MLH1 CpG MUMC.....	95
Figuur 51 Het pyrogram van de negatieve controle met het programma MLH1 CpG MANC	95
Figuur 52 Het pyrogram van de positieve controle met het programma MLH1 CpG MUMC.	96
Figuur 53 Het pyrogram van de positieve controle met het programma MLH1 CpG MANC.....	96
Figuur 54 Het pyrogram van het UM staal. Op dit pyrogram is enkel ruis waar te nemen.	96
Figuur 55 Het pyrogram van een ongemethyleerd staal, MBT10-111.....	97
Figuur 56 Het pyrogram van een gemethyleerd staal, MBT10-808.....	97
Figuur 57 Het resultaat van de pyroPCR van uitgebreid aantal patiëntenstalen na gelelektroforese. -	99
Figuur 58 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten van pyroPCR verdunningsreeks van MLH1-analyse. -.....	102
Figuur 59 Resultaat qPCR van controlestalen (MGMT-analyse).	104
Figuur 60 Resultaat qPCR van controlestalen voor MGMT-analyse met een temperatuursgradiënt voor <i>annealing</i> temperatuur.	105
Figuur 61 Resultaat gelelektroforese van PCR-producten afkomstig van de <i>nested</i> PCR voor MGMT-analyse.....	106
Figuur 62 Resultaat qPCR op controlestalen met MyTaq™ HS mix voor MGMT-analyse.	108
Figuur 63 Resultaat qPCR op controlestalen met MyTaq™ HS mix voor MGMT-analyse na gelelektroforese.	109
Figuur 64 Resultaat van qPCR op controlestalen met SensiFast™ HRM mix voor MGMT-analyse. ...	111
Figuur 65 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten na qPCR op controlestalen met SensiFast™ HRM (MGMT-analyse).....	112
Figuur 66 Resultaat van qPCR op controlestalen met SensiFast™ HRM mix voor MGMT-analyse bij <i>annealing</i> temperatuur 64°C.	113
Figuur 67 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten na qPCR op controlestalen met SensiFast™ HRM mix voor MGMT-analyse bij een <i>annealing</i> temperatuur van 64°C.	113

Figuur 68 Resultaat van qPCR op patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse.....	115
Figuur 69 Resultaat gelelektroforese van PCR-producten na qPCR voor MGMT-analyse.	117
Figuur 70 Resultaat herhaling van de qPCR op patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse.....	118
Figuur 71 Resultaat gelelektroforese van PCR-producten na qPCR van herhaling patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse.	120
Figuur 72 Resultaat van qPCR op patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse.....	122
Figuur 73 Resultaat van herhaling van qPCR op <i>outside</i> PCR-producten (MGMT-analyse).....	124
Figuur 74 Resultaat na qPCR van verdunningsreeks MGMT-analyse.	127
Figuur 75 Resultaat na qPCR van herhaling van verdunningsreeks op <i>outside</i> PCR-producten (MGMT-analyse).	129
Figuur 76 Het resultaat na gelelektroforese van de pyroPCR voor MGMT-analyse.	131
Figuur 77 Het resultaat na gelelektroforese van de pyroPCR Qiagen voor MGMT-analyse.....	132
Figuur 78 Pyrogram van ongemethyleerd controlestaal voor CpG 74-83 (MGMT-analyse).	133
Figuur 79 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal voor CpG74-83 (MGMT-analyse).....	133
Figuur 80 Pyrogram van ongemethyleerd controlestaal voor CpG 74-83 met aangepast programma (MGMT-analyse).....	133
Figuur 81 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal voor CpG 74-83 met aangepast programma (MGMT-analyse).....	133
Figuur 82 Pyrogram van ongemethyleerd controlestaal voor gebied CpG84-89 (MGMT-analyse). ..	134
Figuur 83 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal voor gebied CpG 84-89 (MGMT-analyse).....	134
Figuur 84 Pyrogram van ongemethyleerd staal voor gebied CpG 84-89 met aangepast programma (MGMT-analyse).....	134
Figuur 85 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal voor gebied CpG 84-89 met aangepast programma (MGMT-analyse).....	134
Figuur 86 Pyrogram van ongemethyleerd controlestaal CpG 76-79 (Qiagen) (MGMT-analyse).....	135
Figuur 87 Pyrogram van gemethyleerd controlestaal CpG76-79 (Qiagen) (MGMT-analyse)	135
Figuur 88 Resultaat van gelelektroforese op PCR-producten van pyroPCR op patiëntenstalen reeks 1 van de MGMT-analyse.....	136
Figuur 89 Resultaat van gelelektroforese na pyroPCR op patiëntenstalen reeks 2 van de MGMT-analyse.....	138

TABELLENLIJST

Tabel 1	Overzicht van indeling van hersentumoren in WHO-graden [32].	22
Tabel 2	Overzicht van methylatiestatus van het MGMT-gen voor de verschillende cellijnen.	41
Tabel 3	In deze tabel worden de ratio's weergegeven die van belang zijn voor de kwaliteit van DNA of RNA. De ratio A260/A280 geeft informatie over de verontreiniging door eiwitten. De ratio A260/A230 geeft informatie over de organische verontreiniging	48
Tabel 4	Pipetteerschema voor de mastermix van SCS-ladder.	51
Tabel 5	PCR-programma van SCS-ladder.	52
Tabel 6	Schema met hoeveelheden agarose en TBE buffer voor het aanmaken van een gel.	53
Tabel 7	Schema met toe te voegen hoeveelheden <i>sybersafe</i> voor 70 ml gel en voor 120 ml gel.	53
Tabel 8	Schema voor het maken van de mastermix van de bisulfietbehandeling.	55
Tabel 9	PCR-programma voor de bisulfietbehandeling.	56
Tabel 10	Pipetteerschema voor het maken van de mastermix voor de <i>outside</i> PCR van <i>nested</i> PCR.	58
Tabel 11	PCR-programma dat gebruikt wordt voor de <i>outside</i> PCR van de <i>nested</i> PCR.	59
Tabel 12	Schema voor het maken van de mastermix voor de <i>inside</i> PCR van de <i>nested</i> PCR.	59
Tabel 13	PCR-programma van de <i>inside</i> PCR voor de <i>nested</i> PCR.	60
Tabel 14	Pipetteerschema voor het bereiden van een mastermix met MyTaq™ HS mix voor qPCR.	61
Tabel 15	Schema voor het bereiden van een mastermix met SensiFast™ HRM mix voor qPCR.	61
Tabel 16	PCR-programma voor qPCR voor MLH1-analyse.	62
Tabel 17	PCR-programma voor qPCR voor MGMT-analyse.	62
Tabel 18	Pipetteerschema voor bereiding van de mastermix van de PyroMark PCR kit voor de pyroPCR.	63
Tabel 19	Pipetteerschema voor bereiding van de mastermix van de <i>therascreen</i> MGMT Pyro kit voor de pyroPCR.	64
Tabel 20	PCR-programma voor de pyroPCR van PyroMark PCR kit voor de MLH1-analyse als MGMT-analyse.	64
Tabel 21	PCR-programma voor de pyroPCR van de <i>therascreen</i> MGMT Pyro kit.	64
Tabel 22	Pipetteerschema voor bereiding van mastermix voor de immobilisatie van de PCR-producten aan <i>ss-beads</i> zowel voor de PyroMark PCR kit als de <i>therascreen</i> MGMT kit.	66

Tabel 23 Pipetteerschema voor het verdunnen van de <i>sequencing</i> primer voor de stalen behandeld met de <i>therascreen</i> MGMT kit.	66
Tabel 24 Overzichtstabel van resultaten na MSP met nieuwe en oude bisulfietbehandeling op beperkte reeks patiëntenstalen (bijlage 12).	72
Tabel 25 Ct-waarden van beperkte reeks patiëntenstalen voor de MLH1-analyse.	80
Tabel 26 Ct-waarden van uitgebreide reeks patiëntenstalen voor de MLH1-analyse.	83
Tabel 27 Ct-waarden van deel 2 van de uitgebreide reeks patiëntenstalen voor de MLH1-analyse. ..	85
Tabel 28 Ct-waarden van verdunningsreeks van MLH1-analyse.	88
Tabel 29 Ct-waarden na de herhaling van qPCR op verdunningsreeks van MLH1-analyse.	91
Tabel 30 Samenvattende tabel met Ct-waarden van zowel verdunningsreeks 1 als 2 voor de MLH1-analyse.	93
Tabel 31 Overzicht van resultaten van <i>pyrosequencing</i> van beperkte reeks patiëntenstalen (MLH1-analyse).	98
Tabel 32 Overzicht van resultaten van <i>pyrosequencing</i> van uitgebreid aantal patiëntenstalen (MLH1-analyse).	100
Tabel 33 Overzicht van resultaat van de <i>pyrosequencing</i>	102
Tabel 34 Ct-waarden van de patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse.	116
Tabel 35 Ct-waarden van de patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse.	119
Tabel 36 Ct-waarden van de patiëntenstalen reeks 1 voor MGMT-analyse.	121
Tabel 37 Ct-waarden van de patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse.	123
Tabel 38 Ct-waarden van herhaling van de qPCR op de patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse.	125
Tabel 39 Overzicht van de Ct-waarde van de patiëntenstalen reeks 1 en 2 voor MGMT-analyse.	126
Tabel 40 Ct-waarden van verdunningsreeks voor MGMT-analyse.	128
Tabel 41 Ct-waarden van herhaling van de qPCR op de verdunningsreeks voor MGMT-analyse.	130
Tabel 42 Overzicht van de resultaten van de <i>pyrosequencing</i> van patiëntenstalen reeks 1 van de MGMT-analyse.	137
Tabel 43 Overzicht resultaten van patiëntenstalen reeks 1 voor de MGMT-analyse.	137
Tabel 44 Overzicht van resultaat <i>pyrosequencing</i> op patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse.	139
Tabel 45 Overzicht van de patiëntenstalen reeks 2 voor de MGMT-analyse.	140

Tabel 46	Overzicht van de stalen geanalyseerd door de <i>therascreen</i> MGMT pyro kit.....	141
----------	--	-----

BIJLAGE 1: SEQUENTIE MLH1-GEN

Hieronder wordt de sequentie van het MLH1-gen gegeven. Hierbij worden de voornaamste transcriptieplaatsen aangeduid in het paars. Transcriptieplaatsen kunnen veranderen doordat er meer onderzoek naar de genen wordt uitgevoerd. De transcriptieplaatsen die in onderstaande sequentie zijn aangeduid zijn belangrijk bij het controleren van de primers. Voor de MLH1-analyse worden primers uit artikels gebruikt, hierbij is het belangrijk dat er wordt gekeken vanuit welke transcriptieplaats deze primers ontworpen zijn. De promotorregio van het gen wordt in het groen aangeduid en onderstreept [77].

```

-819                                     cc gcggataaag accaggaggt
-841 agtttctcata ggccacaaaa gcctggtcgt ccaaggcaag agaataggct ttaaagtccc
-781 tggctcgggtt aaaaagctgg ttgcgtagat tctgtcaat gtcaggatc ctctgccttg
-721 tgatatctgg agataagtca acgccttgca ggacgcttac atgctcgggc agtacctctc
-661 tcagcaacac ctccatgcac tggatataca agtccccctc accccagccg cgacccttca
-601 aggccaagag gcgacagagc ccgaggcctg cacgagcagc tctctcttca ggagtgaagg
-541 aggccacggg caagtcgccc tgacgcagac gctccaccag ggccgcgcgc tcgccgtccg
-481 ccacataaccg ctcgtagtat tcgtgctcag cctcgtagtg gcgctgacg tcgcttccgc
-421 gggtagctac gatgaggcgg cgacagacca ggcacagggc cccatcgccc tccggagggt
-361 ccaccaccaa ataacgctgg gtccactcgg gccggaaaac tagagcctcg tcgacttcca
-301 tcttgttct tttgggcgtc atccacattc tgcgggaggc cacaagagca gggccaacgt
-241 tagaaaaggcc gcaaggggag aggaggagcc tgagaagcgc caagcacctc ctccgctctg
-181 gcgcagatca cctcagcaga ggcacacaag cccggttccg gcatctctgc tcctattggc
-121 tggtatatttc gtattccccg agctcctaaa aacgaaccaa taggaagagc ggacagcgat
-61 ctctaacgcg caagcgcata tccttctagg tagcgggagc tagccgcttc agggagggac
1 gaagagaccc agcaaccac agagttgaga aatttgactg gcattcaagc tgtccaatca
61 atagctgccc ctgaagggg gggctggatg gcgtaagcta cagctgaagg aagaacgtga
121 gcacagggca ctgaggtgat tggctgaagg cacttccggt gagcatctag acgtttcctt
181 ggctcttctg gcaacaaaat gtcgctcgtg gcaggggta ttcggcggct ggacgagaca
241 gtggtgaacc gcatcgcggc gggggaagtt atccagcggc cagctaattgc tataaagag
301 atgattgaga actgtttaga tgcaaaatcc acaagtattc aagtgattgt taaagagggg
361 ggctgaagt tgattcagat ccaagacaat ggcaccggga tcaggaaaga agatctggat
421 attgtatgtg aaaggttac tactagtaaa ctgcagtcct ttgaggattt agccagtatt
481 tctacctatg gctttcgagg tgaggctttg gccagcataa gccatgtggc tcatgttact
541 attacaacga aaacagctga tggaaagtgt gcatacagag caagtactc agatggaaaa
601 ctgaaagccc ctctaaacc atgtgctggc aatcaagggg cccagatcac ggtggaggac
661 cttttttaca acatagccac gaggagaaaa gctttaaaaa atccaagtga agaatatggg
721 aaaattttg aagtgttg caggtattca gtacacaatg caggcattag tttctcagtt
781 aaaaaacaag gagagacagt agctgatgtt aggacactac ccaatgcctc aaccgtggac
841 aatattcgct ccatctttgg aatgctgtt agtcgagaac tgatagaaa tggatgtgag
901 gaataaacc tagccttcaa aatgaatggt tacatatcca atgcaacta ctcagtgaag
961 aagtgcactc tcttactctt catcaacctc cgtctggtag aatcaacttc cttgagaaaa
1021 gccatagaaa cagtgtatgc agcctatttg ccaaaaaaca cacaccatt cctgtacctc
1081 agtttagaaa tcagtcccc aatgtggat gttaatgtgc accccacaaa gcatgaagtt
1141 cacttctgc acgaggagag catcctggag cgggtgcagc agcacatcga gagcaagctc
1201 ctgggctcca attcctccag gatgtacttc acccagactt tgctaccagg acttgctggc
1261 ccctctgggg agatgggtaa atccacaaca agtctgacct cgtcttctac tcttggaggt
1321 agtgataagg tctatgccc ccagatggtt cgtacagatt cccgggaaca gaagcttgat
1381 gcatttctgc agcctctgag caaaccctg tccagtcagc cccaggccat tgtcacagag
1441 gataagacag atatttctag tggcagggct aggcagcaag atgaggagat gcttgaactc
1501 ccagcccctg ctgaagtggc tgccaaaaat cagagcttgg agggggatc aacaagggg
1561 acttcagaaa tgtcagagaa gagaggacct acttcagca accccagaaa gagacatcgg
1621 gaagattctg atgtggaat ggtggaagat gattcccga aggaaatgac tgcagcttgt
1681 acccccggg gaagatcat taacctcact agtgttttga gtctccagga agaaattaat
1741 gagcagggac atgaggttct cgggagatg ttgcataacc actcctctgt ggcgtgtgtg
1801 aatcctcagt ggccttggc acagcatcaa accaagttat accttctcaa caccaccaag
1861 cttagtgaag aactgttcta ccagatactc atttatgatt ttgccaattt tgggtgttctc
1921 aggttatcgg agccagcacc gctctttgac cttgcatgc ttgccttaga tagtccagag
1981 agtggctgga cagaggaaga tggccccaaa gaaggacttg ctgaatacat tgttgagttt
2041 ctgaagaaga aggtcgagat gcttgcagac tatttctctt tggaaattga tgaggaggg

```

```

2101 aacctgattg gattaccocct tctgattgac aactatgtgc cccttttggga gggactgcct
2161 atcttcattc ttcgactagc cactgagggtg aattgggacg aagaaaagga atgttttgaa
2221 agcctcagta aagaatgccc tatgttctat tccatccgga agcagtacat atctgaggag
2281 tgcaccctct caggccagca gagtgaagtg cctggctcca ttccaactc ctggaagtgg
2341 actgtgggaac acattgtcta taaagccttg cgctcacaca ttctgcctcc taaacatttc
2401 acagaagatg gaaatatacct gcagcttgct aacctgcctg atctatacaa agtctttgag
2461 aggtgttaaa tatggttatt tatgactgtt gggatgtgtt cttctttctc tgtattccga
2521 tacaagtgtg tgtatcaaag tgtgatatac aaagtgtacc aacataagtg ttgtagcac
2581 ttaagactta tacttgccct ctgatagtat tcctttatac acagtggatt gattataaat
2641 aaatagatgt gtcttaacat aa

```

//

Bij de analyses die op het MLH1-gen worden uitgevoerd, wordt meestal uitgegaan van een ongemethyleerde en een gemethyleerde sequentie. Om de gemethyleerde sequentie te verkrijgen worden eerst de CpG-eilanden aangeduid. Deze zijn in onderstaande sequenties in het groen gemarkeerd. De cytosine basen in deze CpG-eilanden blijven ongewijzigd. Hiernaast worden de resterende cytosine basen omgezet in uracil basen doordat een bisulfietbehandeling wordt uitgevoerd. Deze cytosines worden in de sequentie omgezet naar thymine basen. De gemethyleerde cytosines die omgezet worden naar thymines. Deze zijn in een groene hoofdletter T aangeduid.

```

-819 TC GCGgataaag aTTaggaggt
-841 agttTtTata ggTTaTaaaa gTTTggtCGt TTAaggTaag agaataggTt ttaaagtTTT
-781 tggTtCGgtt aaaaagTtgg ttgCGtagat tTTtgtTaat gTtTaggatT TtTtgTTttg
-721 tgatatTtgg agataagtTa aCGTtttTgTa ggaCGTttaT atgTtCGggT agtaTTtTtT
-661 tTagTaaTat TtTTatgTat tggataTaa agtTTTTTTT aTTTTTagTCG CGaTTttTaa
-601 aggTTAagag gCGgTagagT TCGaggTTtg TaCGagTagT tTtTtTttTa ggagtgaagg
-541 aggTTaCGgg TaaGTtCGTTT tgaCGTagaC GTtTTaTTAg ggTCGCGCGT tCGTCGTTCG
-481 TTAataTataTCG TtCGtagtat tCGTgtTtTag TTTtCGtagtg gCGTTtgaCG tCGCGttCGC
-421 GggtagTtaC GatgaggCGG CGaTagaTTa ggTaTagggT TTTtCGTTT tTCGaggTt
-361 TTAaTTaTTaa ataaCGTtgg gtTTaTtCGG gTCGaaaaT tagagTTtCG tCGaTttTTa
-301 tTtTtTtTt tttgggCGtT atTTaTattT tgCGggaggT TaTaagagTa gggTTaaCGT
-241 tTaaaggTC GTAaggggag aggaggagTT tgagaagCGT TaaGTaTTTT TtTCGTTttg
-181 CGTTtagatTa TTTtTagTaga ggTaTaTaag TTCGgttTCG gTatTtTtGT tTTtattggT
-121 tggatatttC GtattTTTTCG agTtTTtaaa aaCGaaTTaa taggaagagC GgaTagCGat
-61 TtTtaaCGCG TaaGTaTata tTTtTttagg tagCGggTag tagTCGTTtT agggaggggC
1 GaagagaTTT agTaaTTTTAT agagtTgaga aatttgaTtg gTattTaaGT tgtTTaatTa
61 atagTtgTCG TtgaagggTg gggTtggatg gCGtaagTta TagTtgaagg aagaaCGtga
121 gTaCGaggTa Ttgaaggtgat tggTtgaagg TaTttTCGtT gagTatTtag aCGtTtTTt
181 ggTtTtTtg CGTTaaaat gtCGtTCGtg gTaggggtta tTCGgCGgTt ggaCGagaTa
241 gtggTgaaTC GTatCGCGgC Gggggaagtt atTTagCGgT TagTtaatgT tatTaaagag
301 atgattgaga aTtgtttaga tgTaaaatTT aTaaagtattT aagtgattgt taaagagggg
361 ggTTtgaagt tgattTagat TTAagaTaat ggTaTTCGgga tTaggaaaga agatTtggat
421 attgtatgtg aaaggttTaT taTtagtaaa TtgTagtTTt ttgaggattt agTTagtatt
481 tTtaTTtatg gTtttCGagg tgaggTtttT gTTagTataa gTTatgtggT tTatgttaTt
541 attaTaaCGa aaaTagTtga tggaaagtgt gTataTagag TaaGTaTTt agatggaaaa
601 TtgaagTTT TtTTtaaaTT atgtTtggT aatTaaagga TTTtagatTaC GgtggaggTa
661 TtttttTaTa aTatagTTaC Gaggagaaaa gTtttaaaaa atTTaagtga agaatatggg
721 aaaatTTtgg aagtTgttgg TaggtattTa gtaTaTaatg TaggTattag tttTtTagtt
781 aaaaaTaaG gagagaTagt agTttagtgtt aggaTaTtat TTAatgTTTT aaTCGtggaT
841 aatattCGTt TtTtTtttgg aatgTtgtt agtCGaGaaT tgatagaaat tggatgtgag
901 gataaaaTTT tagTtTtTaa aatgaatggt taTatatTTa atgTaaaTTa TtTagtgaag
961 aagtGTatTt tTtaTtTtT TatTaaTTat CGtTtggtag aatTaaTTTT Tttgagaaaa
1021 gTTatagaaa TagtgtatgT agTTtatttTg TTTaaaaaTa TaTaTTTTatt TTTgtatTTtT
1081 agtttagaaa tTagtTTTTa gaatgtggat gTaatgtgT aTTTTaTaaa gTatgaagtt
1141 TaTttTtTgT aCGaggagag TatTtTggag CGggtgTagT agTatTatCGa gagTaaGTtT
1201 TtgggTtTTa attTtTtTtag gatgtaTttT aTTTagaTtt tgTtaTTagg aTttTtggT
1261 TTTtTtgggg agatggTtaa atTTaTaaTa agtTtgaTTT CGtTttTtaT tTtTggaagt
1321 agtgataagg tTtatgTTTa TTagatggtt TTagatggtt TtCGggaaTa gaagTttagat
1381 gTatttTtG agTTtTtGag TaaaTTTTtTg tTTagtTagT TTTaggTTat tgtTaTAgag
1441 gataagaTag atatttTtag tggTagggTt aggTagTaaG atgaggagat gTttgaaTtT
1501 TTagTTTTtG TtgaagtggT tgTTaaaaat TagagTtTgg agggggataT aaTaaagggg
1561 aTttTagaaa tgtTagagaa gagaggaTTT aTttTTagTa aTTTTagaaa gagaTatCGg
1621 gaagattTtg atgtggaat ggtggaagt gattTTCGaa aggaaatgaT tgTagTttgt
1681 aTTTTTCGga gaaggatTat taaTtTatTt agtgttttga gtTtTTagga agaaattaat

```


1741 gag**T**aggg**aT** atgaggtt**Tt** **TCG**ggagatg ttg**T**ataa**TT** a**TtTTt****CGt** ggg**T**tgtgtg
1801 aat**TTt****Tagt** ggg**TT**ttgg**T** a**TagT**at**Taa** a**TT**aagttat a**TTttTtTaa** **TaTTaTT**aag
1861 **T**ttag**tgaag** aa**T**tg**ttTta** **TT**agata**TTT** atttatgatt ttg**TT**aattt tgg**tgttTTT**
1921 aggttat**CGg** ag**TT**ag**TaTC** **G**tt**T**tttga**T** **T**ttg**TT**atg**T** ttg**TT**ttaga tagt**TT**agag
1981 agtgg**T**tgga **T**agaggaaga tgg**tTTT**aaa gaagga**T**ttg **T**tgaata**T**at tgttgagttt
2041 **T**tgaagaaga ag**gT**tgagat g**T**ttg**T**aga**T** t**at**tt**TtT**tt tgg**aa**attga tgaggaaggg
2101 aa**TT**tgattg gatta**TTTT** t**T**tgattga**T** aa**T**tatg**tGT** **TTTT**ttt**gga** gggactg**TTT**
2161 at**TTtT**att**T** tt**CGa****T**tag**T** **Ta**Ttgaggtg aattgg**gaCG** aagaaaagga atg**tt**tgaa
2221 ag**TTt****Tagt**a aagaatg**CGT** tatg**ttT**at t**TT**at**TCG**ga ag**T**agta**T**at at**T**tgaggag
2281 t**CGa****TTTT****Tt** **T**ag**gTT**ag**Ta** gagtgaagtg **TT**tg**gTtTTa** tt**TT**aaa**TTT** **T**tggaagtg**g**
2341 a**T**tg**tg**gaa**T** a**T**attg**T**ta taaag**TT**ttg **CG****TtTaTaTa** tt**T**g**TTTT** taaa**T**att**T**
2401 a**T**agaagatg gaaat**atTTT** g**T**ag**T**ttg**Tt** aa**TT**tg**TT**tg at**T**tata**Taa** agt**T**tttgag
2461 aggtgt**taaa** tatggttatt tatg**Ta****T**tg**t** gggatg**gtt** **T**tt**T**ttt**TTT** tgtatt**TCG**a
2521 ta**T**aaag**tgt** tgtat**Taa**ag tgtgatata**T** aaag**tg**ta**TT** aa**T**ataagtg ttg**g**tag**TaT**
2581 ttaaga**T**tta ta**T**ttg**TT**tt **T**tgatagtat t**TT**tttata**T** a**T**ag**tg**gatt gattataaat
2641 tagatgt gt**T**tt**aaT**at aa //

BIJLAGE 2: SEQUENTIE MGMT-GEN

Hieronder wordt de sequentie van het MGMT-gen gegeven. Hierbij worden de voornaamste transcriptieplaatsen aangeduid in het paars. Daarnaast is de promotorregio van het gen in het groen aangeduid en onderstreept. De grijs gemarkeerde zone stellen de introns voor [78] .

```

-574          gagcggcacc aggaggggag agactcgcgc tccgggctca gcgtagccgc
-481 cccgagcagg accgggatte tcaactaagcg ggcgccgtcc tacgaccccc gcgcgctttc
-421 aggaccactc gggcacgtgg caggtcgctt gcacgcccgc ggactatccc tgtgacagga
-361 aaaggtacgg gccatttggc aaactaaggc acagagcctc aggcggaagc tgggaaggcg
-301 ccgcccggct tgtaccggcc gaagggccat ccgggtcagg cgcacagggc agcggcgctg
-241 ccggaggacc agggccggcg tgccggcgtc cagcgaggat gcgcagactg cctcaggccc
-181 ggcgccgccc cacagggcat gcgccgaccc ggtcgggccc gaacaccccc cccctcccgg
-121 gctccgcccg acctccgccc ccgcgcgccc cggccccgcc cccgcgcgct ctcttgcttt
-61 tctcaggtcc tcggctccgc ccgctctag accccgcccc acgccgcat cccgtgccc
1 ctcggccccc cccccgcgc ccggatatgc tgggacagcc cgcgcccta gaacgctttg
61 cgtcccgaag cccgcaggtc ctccgggtgc gcaccgtttg cgacttggtg agtgtctggg
121 tcgcctcgct cccggaagag tgccgagctc tccctcggga cggtggcagc ctccagtggt
181 cctgcaggcg cctcaacttc gccgtcgggt gtggggccc cctgaccccc acccatcccc
241 ggcgagctcc aggtgcgccc caagtgcctc ccaggtggtg ccagccttt cccgggctc
301 ggggttcctg gactaggctg cgctgcagtg actgtggact ggcgtgtggc gggggtcgtg
361 gcagcccctg ccttacctct aggtgccagc cccaggcccg ggccccgggt tcttcctacc
421 cttccatgct gccagctttc cctccgcccag ctgctccagg aagcttccag aagcccctgc
481 gcgggccttg gcttgagca accctttagc atacttaggc agagtcccat atttccttcc
541 tgctggaggc caagttctag gggccttctg gttactatgg ctggtgtttg tgtacatcat
601 accctaactg tattcatcaa cacttagagt aagcaaggct cgctggagag ccacacacac
661 tgggcaccgt aatgtcgggt ataacaccgc agaggagtgc tgaactatgt atttcgact
721 cctgggttca tcatctcctg aaatctcagg gtgggtgtttg ctctcagttg cttcagctga
781 gtagctggct ttctgtcctg gaaagcagac tttgtacatg tgtgtgcaac ctatgcctgc
841 tgagatcatc atcagacagg gaagcggctt ggtccagaga gctgttctca gtagaatgtt

```

Bij de analyses die op het MGMT-gen worden uitgevoerd, wordt meestal uitgegaan van een ongemethyleerde en een gemethyleerde sequentie. Om de gemethyleerde sequentie te verkrijgen worden eerst de CpG-eilanden aangeduid. Deze zijn in onderstaande sequenties in het groen gemarkeerd. De cytosine basen in deze CpG-eilanden blijven ongewijzigd. Hiernaast worden de resterende cytosine basen omgezet in uracil basen doordat een bisulfietbehandeling wordt uitgevoerd. Deze cytosines worden in de sequentie omgezet naar thymine basen. De gemethyleerde cytosines die omgezet worden naar thymines. Deze zijn in een groene hoofdletter T aangeduid.

```

-574          gagCGgTaTT  aggaggggag  agaTtCGCGT  tTCGggTtTa  gCGtagTCGT
-481  TTCGagTagg  aTCGggattT  tTaTtaagCG  ggCGTCGtTT  taCGaTTTTC  GCGCGTtttT
-421  aggaTTaTtC  GggTaCGtgG  TaggtCGTtt  gTaCGTTCGC  GgaTtatTTT  tgtgaTagga
-361  aaaggtaCGg  gTTatTTggT  aaaTtaaggT  aTagagTTtT  aggCGgaagT  tgggaaggCG
-301  TCGTTCGgTt  tgtaTCGgTC  GaagggTtat  TCGggtTagg  CGTaTagggT  agCGgCGTtg
-241  TCGgaggaTT  agggTCGgCG  tgTCGgCGtT  TagCGaggat  gCGTagaTtg  TTTTaggTTC
-181  GgCGTCGTCG  TaTagggTat  gCGTCGaTTC  GgtCGggCGg  gaaTaTTTTCG  TTTTtTTCGg
-121  gTtTCGTTTCG  aTTtTCGTTT  TCGCGCGTTT  CGgTTTCGTT  TTCGCGCGTt  TtTttgTttt
-61   tTtTaggtTT  tCGgTtTCGT  TTCGtTttag  aTTTCGTTTT  aCGTCGTTat  TTTTCGtgTTT
1     TtCGgTTTTCG  TTTTCGCGTT  TCGgatatgT  tgggaTagTT  CGCGTTTTta  gaaCGTtttg
61   CGTTTTCaCG  TTCGTaggtT  TtCGCGgtgC  GTaTCGtttg  CGaTttggtg  agtgtTtggg
121  tCGTtTCGtT  TTCGgaagag  tgCGgagTtT  tTTTTCGgga  CGgtggTagT  TtCGagtggT
181  TTTgTaggCG  TTTTtTaTtC  GTCGtCGggt  gtggggTCGT  TTTgaTTTTT  aTTTatTTCG
241  ggCGagTtTT  aggtgCGTTT  TaagtgTtTt  TTaggtgTtg  TTTagTtttt  TTTTCGggTtT
301  ggggttTTtg  gaTtaggTtg  CGTtgTagtg  aTtgtggaTt  ggCGtgTggC  GggggTCGtg
361  gTagTTTTTg  TTTtaTtTt  aggtgTtagT  TTTaggTTCG  ggTTTCGggt  tTttTTtaTT
421  TttTTatgTt  gTTagTtttT  TTTTCGTTag  TtgTtTtagg  aagTttTtag  aagTTTTtgC
481  GCGggTTTTg  gTttgTagTa  aTTTTtttagT  ataTttaggT  agagtTTTat  atttTtttTT
541  tgTtggaggT  TaagttTtag  gggTTTTtTg  gtaTtatgg  TtggTgTttg  tgtaTatTat
601  aTTTTaaTtg  tattTatTaa  TaTttagagt  aagTaaggTt  CGTtggagag  TTaTaTaTaT
661  tgggTaTCGt  aatgtCGgtt  ataaTaTCGT  agaggagttT  tgaatTatgt  atttCGTaTt
721  TTTgggttTa  tTatTTTTtg  aaatTtTagg  gtggTgTttg  TtTtTagttg  TttTagTtga
781  gtagTtggTt  ttTtgtTTtg  gaaagTagaT  tttgtaTatg  tgtgtgTaaT  TtatgTTtgT
841  tgagatTatT  atTagaTagg  gaagCGgTtt  ggtTtagaga  gTtggtTtTa  gtagaatgTt

```

BIJLAGE 3: PRIMERS NESTED-PCR AANGEDUID OP MLH1-SEQUENTIE

Hieronder worden de sequenties van de gebruikte primers voor de *methylation specific* PCR weergegeven. Verder worden deze aangeduid op de sequentie. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de gemethyleerde en de ongemethyleerde sequentie. De *forward* primers kunnen rechtstreeks teruggevonden worden op de DNA-sequentie. Voor de *reverse* primer wordt de sequentie *reverse* en complementair gemaakt aan de huidige sequentie van de primer.

Voor de *nested* PCR worden twee paar primers gebruikt, nl. de *outside* en *inside* primers. Bij de *inside* primers is onderscheid gemaakt op basis van de gemethyleerde sequentie en de ongemethyleerde sequentie. Hieronder wordt een overzicht gegeven van de primers. Daarnaast worden de primers op de gemethyleerde en ongemethyleerde sequentie van het MLH1-gen aangeduid. Om de *reverse* primer in de sequentie terug te vinden, wordt deze primer complementair en *reverse* gemaakt aan de huidige sequentie. Het PCR-product dat met behulp van de *outside* primers wordt geamplificeerd is 154 bp. lang. Dit product is zowel voor de ongemethyleerde en gemethyleerde sequentie hetzelfde. Het PCR-product dat met behulp van de *inside* primers geamplificeerd is voor de gemethyleerde sequentie 89 bp. lang en voor de ongemethyleerde sequentie 95 bp. lang.

- ♦ **MLH1 forward primer (flank up):** 5'-TTT TGA YGT AGA YGT TTT ATT AGG GT-3'
- ♦ **MLH1 reverse primer (flank down):** 5'-AAA ACR ATA AAA CCC TAT ACC TAA TCT ATC-3'
MLH1 reverse primer (flank down): 5' GAT AGA TTA GGT ATA GGG TTT TAT YGT TTT 3'
- ♦ **MLH1 U forward (MLH1 U sense (US)):** 5'-TGT GTG TTT GTT GTT TGT TAT ATA TTG TTT-3'
- ♦ **MLH1 U reverse (MLH1 U antisense (UAS)):** 5'-ACC ACC TCA TCA TAA CTA CCC ACA-3'
MLH1 U reverse (MLH1 U antisense (UAS)): 5'-TGT GGG TAG TTA TGA TGA GGT GGT-3'
- ♦ **MLH1 M forward (MLH1 M sense (MS)):** 5'-GTT CGT CGT TCG TTA TAT ATC GTT C-3'
- ♦ **MLH1 M reverse (MLH1 M antisense (MAS)):** 5'-CCT CAT CGT AAC TAC CCG CG-3'
MLH1 M reverse (MLH1 M antisense (MAS)): 5'- CGC GGG TAG GTT ACG ATG AGG-3'

Gemethyleerde MLH1-sequentie met primers van *nested* PCR

```
-661 tTagTaaTaT TtTTatgTaT tggataTaa agtTTTTTtT aTTTTagTCG CGaTTTttTa
-601 aggTTaagag gCGgTagagT TCGaggTTtg TaCGagTagT tTtTtTtTa ggagtgaagg
-541 aggTTaCGgg TaagtCGTTT tgaCGTagaC GTtTTaTTAg ggTCGCGCGT tCGTCGtTCG
-481 TTaTataTCG TtCGtagtat tCGtgTtTag TTTtCGtagtg gCGTTtgaCG tCGCGttCGC
-421 GggtagTtaC GatgaggCGg CGaTagaTTa ggTaTagggT TTTatCGTTT tTCGgaggTt
-361 TTaTTaTTaa ataaCGTtgg gtTTaTtCGg gTCGgaaaaT tagagTTtCG tCGaTttTTa
-301 tTttgTttTt tttgggCGtT atTTaTattT tgCGggaggT TaTaagagTa gggTTaaCGt
```

Ongemethyleerde MLH1-sequentie met primers *nested* PCR

```
-661 tTagTaaTaT TtTTatgTaT tggataTaa agtTTTTTtT aTTTTagTCG CGaTTTttTa
-601 aggTTaagag gTggTagagT TTgaggTTtg TaTgagTagT tTtTtTtTa ggagtgaagg
-541 aggTTaTggg TaagtTgTTT tgaTgTagaT gTtTTaTTAg ggTgTgTgT tTgTgTgTgT
-481 TTaTataTTg TtTgtagtat tTgtgTtTag TTTtTgtagtg gTgTtTgaTg tTgTgTtTgT
-421 gggtagTtaT gatgaggTgg TgaTagaTTa ggTaTagggT TTTatTgTTT tTTggaggTt
-361 TTaTTaTTaa ataaTgTtgg gtTTaTtTgg gTTggaaaaT tagagTTtTg tTgaTttTTa
-301 tTttgTttTt tttgggTgtT atTTaTattT tgTggaggT TaTaagagTa gggTTaaTgt
```

BIJLAGE 4: PRIMERS QPCR AANGEDUID OP MLH1-SEQUENTIE

Hieronder worden de sequenties van de gebruikte primers voor de *methylation specific* PCR weergegeven. Verder worden deze aangeduid op de sequentie. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de gemethyleerde en de ongemethyleerde sequentie. De *forward* primers kunnen rechtstreeks teruggevonden worden op de DNA-sequentie. Voor de *reverse* primer wordt de sequentie *reverse* en complementair gemaakt aan de huidige sequentie van de primer.

Voor de qPCR wordt maar één primerpaar gebruikt, nl. de *inside* primers van de *nested* PCR. Hierbij is onderscheid gemaakt tussen de gemethyleerde sequentie en de ongemethyleerde sequentie. Het PCR-product dat geamplificeerd wordt is voor ongemethyleerde sequentie 98 bp. lang en voor de gemethyleerde sequentie 87 bp. lang.

- ◆ **MLH1 U forward (MLH1 U sense (US))**: 5'-TGT GTG TTT GTT GTT TGT TAT ATA TTG TTT-3'
- ◆ **MLH1 U reverse (MLH1 U antisense (UAS))**: 5'-ACC ACC TCA TCA TAA CTA CCC ACA-3'
MLH1 U reverse (MLH1 U antisense (UAS)): 5'-TGT GGG TAG TTA TGA TGA GGT GGT-3'
- ◆ **MLH1 M forward (MLH1 M sense (MS))**: 5'-GTT CGT CGT TCG TTA TAT ATC GTT C-3'
- ◆ **MLH1 M reverse (MLH1 M antisense (MAS))**: 5'-CCT CAT CGT AAC TAC CCG CG-3'
MLH1 M reverse (MLH1 M antisense (MAS)): 5'- CGC GGG TAG GTT ACG ATG AGG-3'

Gemethyleerde sequentie van het MLH1-gen met primers van qPCR

```
-661 tTagTaaTaT TTTTatgTaT tggTataTaa agtTTTTTTtT aTTTTagTCG CGaTTTTtTa
-601 aggTTaagag gCGgTagagT TCGaggTTtg TaCGagTagT tTtTtTtTa ggagtgaagg
-541 aggTTaCGgg TaagtCGTTT tgaCGTagaC GTtTTaTTag ggTCGCGCGT tCGTCGtTCG
-481 TTaTataTCG TtCGtagtat tCGtgTtTag TtTCGtagtg gCGTTtgaCG tCGCGttCGC
-421 GggtagTtaC GatgaggCGg CGaTagaTTa ggTaTagggT TTTatCGTTT tTCGgaggTt
-361 TTaTTaTTaa ataaCGTtgg gtTTaTtCGg gTCGgaaaaT tagagTtTCG tCGaTttTTa
-301 tTttgTttTt tttgggCGtT atTTaTattT tgCGggaggT TaTaagagTa gggTTaaCGt
```

Ongemethyleerde sequentie van het MLH1-sequentie met primers van qPCR

```
-661 tTagTaaTaT TTTTatgTaT tggTataTaa agtTTTTTTtT aTTTTagTCG CGaTTTTtTa
-601 aggTTaagag gTggTagagT TTgaggTTtg TaTgagTagT tTtTtTtTa ggagtgaagg
-541 aggTTaTggg TaagtTgTTT tgaTgTagaT gTtTTaTTag ggTTgTgTgT tTgTTgtTTg
-481 TTaTataTTg TtTgtagtat tTgtgTtTag TtTtTgtagtg gTgTTtgaTg tTgTgttTgT
-421 gggtagTtaT gatgaggTgg TgaTagaTTa ggTaTagggT TTTatTgTTT tTTggaggTt
-361 TTaTTaTTaa ataaTgTtgg gtTTaTtTgg gTTggaaaaT tagagTtTg tTgaTttTTa
-301 tTttgTttTt tttgggTgtT atTTaTattT tgTggaggT TaTaagagTa gggTTaaTgt
```

BIJLAGE 5: PRIMERS PYROSEQUENCING AANGEDUID OP MLH1-SEQUENTIE

Hieronder worden de sequenties van de gebruikte primers voor de *methylation specific* PCR weergegeven. Verder worden deze aangeduid op de sequentie. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de gemethyleerde en de ongemethyleerde sequentie. De *forward* primers kunnen rechtstreeks teruggevonden worden op de DNA-sequentie. Voor de *reverse* primer wordt de sequentie *reverse* en complementair gemaakt aan de huidige sequentie van de primer.

Bij *pyrosequencing* worden andere primers gebruikt dan bij de MSP. Hieronder worden de sequenties van de gebruikte primers weergegeven. Daarnaast worden de verschillende primers aangeduid op de gemethyleerde en de ongemethyleerde sequentie van het MLH1-gen. Voor de pyroPCR wordt één primerpaar gebruikt, de *reverse primer* draagt hierbij een biotinelabel. Het PCR-product van de pyroPCR is 181 bp. groot. Na de pyroPCR wordt de *pyrosequencing* uitgevoerd. Hierbij wordt een *sequencing* primer gebruikt [74].

- ◆ **MLH1 inside reverse primer pyroPCR met biotinelabel:** [Btn]CCA ATC AAA TTT CTC AAC TCT ATA
MLH1 inside reverse primer pyroPCR met biotinelabel : TAT AGA GTT GAG AAA TTT GAT TGG
- ◆ **MLH1 inside forward primer pyroPCR:** GTA TTT TTG TTT TTA TTG GTT GG
- ◆ **MLH1 sequence primer forward:** GAATTAATAGGAAGAG

Primers van *pyrosequencing* aangeduid op gemethyleerde sequentie van het MLH1-gen

```

-241 tagaaaggTC GTaaggggag aggaggagTT tgagaagCGT TaagTaTTTT TtTCGTtTtg
-181 CGTTTagatTa TTTTtagTaga ggTaTaTaag TTCGgttTCG gTatTTTtgT tTTtattggT
-121 tggatattttC GtattTTTTCG agTtTTTTaaa aaCGaaTTaa taggaagagC GgaTagCGat
-61 TtTtaaCGCG TaagCGTata tTTTTTtagg tagCGggTag tagTCGTttT agggaggggaC
1 GaagagaTTT agTaaTTTaT agagttgaga aatttgaTtg gTattTaagT tgtTTaatTa
61 atagTtgTCG Ttgaaggggtg gggTtggatg gCGtaagTta TagTtgaagg aagaaCGtga
121 gTaCGaggTa Ttgaggtgat tggTtgaagg TaTttTCGtt gagTatTtag aCGtttTTtt
181 ggTtTTTTTtg gCGTTaaaat gtCGttCGtg gTaggggtta ttCGgCGgTt ggaCGagaTa

```

Primers voor *pyrosequencing* aangeduid op ongemethyleerde sequentie MLH1-gen

```

-241 tagaaaggTT gTaaggggag aggaggagTT tgagaagTgT TaagTaTTTT TtTTgTtTtg
-181 TgTTTagatTa TTTTtagTaga ggTaTaTaag TTTGgttTTg gTatTTTtgT tTTtattggT
-121 tggatattttT gtattTTTTTg agTtTTTTaaa aaTgaaTTaa taggaagagT ggaTagTgat
-61 TtTtaaTgTg TaagTgTata tTTTTTtagg tagTgggTag tagTTgTttT agggaggggaT
1 GaagagaTTT agTaaTTTaT agagttgaga aatttgaTtg gTattTaagT tgtTTaatTa
61 atagTtgTTg Ttgaaggggtg gggTtggatg gTgtaagTta TagTtgaagg aagaaTgtga
121 gTaTgaggTa Ttgaggtgat tggTtgaagg TaTttTTgtt gagTatTtag aTgtttTTtt
181 ggTtTTTTTtg gTgTTaaaat gtTgttTgtg gTaggggtta ttTggTggTt ggaTgagaTa

```

BIJLAGE 6: VERGELIJKING VAN GEDETECTEERDE CPG-GEBIEDEN DOOR MSP EN
PYROSEQUENCING OP MLH1-SEQUENTIE

Op onderstaande gemethyleerde sequentie van MLH1-gen worden de sequenties aangeduid van de PCR-producten geanalyseerd door MSP (*nested* PCR en qPCR) en *pyrosequencing*. Het PCR-product van de *methylation specific* PCR is in het groen gemarkeerd. Deze regio is zowel voor de *nested* PCR als qPCR hetzelfde. Het PCR-product dat bij *pyrosequencing* wordt geanalyseerd, is in het geel aangeduid. Hierbij kan worden opgemerkt dat deze twee methodes, qPCR en *pyrosequencing*, een ander gebied analyseren in de sequentie.

```

-819                                     TC GCGgataaaag aTTaggaggt
-841 agttTTTata ggTTaTaaaa gTTTgggtCGt TTAaggTaag agaataggTt ttaaagtTTT
-781 tggTtCGgtt aaaaagTtgg ttgCGtagat tTTtgtTaat gTtTaggatT TtTtgTTttg
-721 tgatatTtgg agataagtTa aCGTTttgTa ggaCGTttaT atgTtCGggT agtaTTtTtT
-661 tTagTaaTaT TtTTatgTaT tggTataTaa agtTTTTTtT aTTTTagTCG CGaTTTttTa
-601 aggTTaagag gCGgTagagT TCGaggTTtg TaCGagTagT tTtTtTtTa ggagtgaagg
-541 aggTTaCGgg TaagtCGTTT tgaCGTagaC GTtTTaTTag ggTCGCGCGT tCGTCGTTCG
-481 TTAatataTCG TtCGtagtat tCGtgTtTag TTTCGtagtg gCGTTtgaCG tCGCGtTCG
-421 GggtagTtaC GatgaggCGg CGaTagaTTa ggTaTagggT TTTatCGTTT tTCGgaggTt
-361 TTAATTTTaa ataaCGTtgg gtTTAAtTCGg gTCGgaaaaT tagagTtTCG tCGaTttTTa
-301 tTttgTttTt tttgggCGtT atTTAAtattT tgCGggaggT TaTaagagTa gggTTaaCGt
-241 tagaaaggTC GTaaggggag aggaggagTT tgagaagCGT TaagTaTTtT TtTCGTtTtg
-181 CGTTtagatTa TTTTagTaga ggTaTaTaag TTCGgttTCG gTatTtTtgT tTTtattggT
-121 tggatatttC GtattTTTTCG agTTTTtaaa aaCGaaTTaa taggaagagC GgaTagCGat
-61 TtttaaCGCG TaagCGTata tTTTTTtagg tagCGggTag tagTCGTttT agggagggaC
  1 GaagagaTTT agTaaTTTat agagttgaga aatttgaTtg gTattTaagT tgtTTaatTa
  61 atagTtgTCG Ttgaaggggtg gggTtggatg gCGtaagTta TagTtgaagg aagaaCGtga
 121 gTaCGaggTa Ttgaggtgat tggTtgaagg TaTttTCGtt gagTatTtag aCGtttTTtt
 181 ggTTTTttg gCGTTaaaat gtCGttCGtg gTaggggtta ttCGgCGgTt ggaCGagaTa
 241 gtggtgaaTC GTatCGCGgC Ggggggaagtt atTTagCGgT TagTtaatgT tatTaaagag

```


BIJLAGE 7: PRIMERS NESTED PCR AANGEDUID OP MGMT-SEQUENTIE

Hieronder worden de sequenties van de gebruikte primers voor de *methylation specific* PCR weergegeven. Verder worden deze aangeduid op de sequentie. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de gemethyleerde en de ongemethyleerde sequentie. De *forward* primers kunnen rechtstreeks teruggevonden worden op de DNA-sequentie. Voor de *reverse* primer wordt de sequentie *reverse* en complementair gemaakt aan de huidige sequentie van de primer.

Voor de *nested* PCR worden twee primerparen gebruikt, nl. de *outside* en *inside* primers. Bij de *inside* primers is onderscheid gemaakt op basis van de gemethyleerde sequentie en de ongemethyleerde sequentie. Hieronder wordt een overzicht gegeven van de primers. Daarnaast worden de primers op de gemethyleerde en de ongemethyleerde sequentie van het MLH1-gen aangeduid. Om de *reverse* primer in de sequentie terug te vinden, wordt deze primer complementair en *reverse* gemaakt aan de huidige sequentie. Het PCR-product dat geamplificeerd wordt met behulp van de *outside* primers is 135 bp. groot. Het PCR-product dat met behulp van de *inside* primers wordt geamplificeerd is voor de gemethyleerde sequentie 81 bp. groot en voor de ongemethyleerde sequentie 93 bp. groot [64] [75].

- ♦ **MGMT forward primer (MGMT flank up):** 5' GYG TTT YGG ATA TGT TGG GAT AGT 3'
- ♦ **MGMT reverse primer (MGMT flank down):** 5' AAA CTC CRC ACT CTT CCR AAA AC 3'
- ♦ **MGMT reverse primer (MGMT flank down):** 3' GTT TTY GGA AGA TGY GGA GTT T 5'
- ♦ **MGMT U forward primer (MGMT U sense (US)):** 5' TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT 3'
- ♦ **MGMT U reverse primer (MGMT U antisense (UAS)):** 5' AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A 3'
- ♦ **MGMT U reverse primer (MGMT U antisense (UAS)):** 3' TGT TTT GTT TTT GGA AGA GTG TGG AGT T 5'
- ♦ **MGMT M forward primer (MGMT M sense (MS)):** 5' TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC 3'
- ♦ **MGMT M reverse primer (MGMT M antisense (MAS)):** 5' GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G 3'
- ♦ **MGMT M reverse primer (MGMT M antisense (MAS)):** 3' C GTT TCG TTT TCG GAA GAG TGC 5'

Gemethyleerde sequentie van het MGMT-gen met primers van *nested* PCR

```

-121 gTtTCGTTTCG aTTtTCGTTT TCGCGCGTTT CGgTTTCGTT TTCGCGCGTt TtTttgTttt
-61 tTtTaggtTT tCGgTtTCGT TTCGtTtag aTTTCGTTTT aCGTCGTTat TTTTCGtgTTT
1 TtCGgTTTCG TTTTCGCGTT TCGgatatgT tgggaTagTT CGCGTTTTta gaaCGTtttg
61 CGtTTTCGaCG TTCGTaggtT TtCGCGgtgC GTaTCGtttg CGaTttgggtg agtgtTtggg
121 tCGTTtCGTt TTCGgaagag tgCGgagTtT tTTTTCGgga CGgtggTagT TtCGagtggT
181 TTTgTaggCG TTTtTaTttC GTCGtCGggt gtggggTCGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTCG
241 ggCGagTtTT aggtgCGTTT TaagtgTtTt TTaggtggtg TTTagTtttt TTTTCGggTTt

```

Ongemethyleerde sequentie van het MGMT-gen met primers van *nested* PCR

```

-121 gTtTTGTTTG aTTtTTGTTT TTGTGTGTTT TGgTTTTGTT TTTGTGTGtT TtTttgTttt
-61 tTtTaggtTT tTGgTtTTGT TTTGTtTtag aTTTTGTTTT aTGTGTtat TTTTGtgTTT
1 TtTGgTTTTG TTTTGTGTT TtGatatgT tgggaTagTT TGTGTTTTta gaaTGttttg
61 TGtTTTGaTG TTTGTaggT TtTGTGgtG GTaTTGtttg TGaTttgggtg agtgtTtggg
121 tTGTTtTGtT TTTGgaagag tgTGgagTtT tTTTTTGgga TGgtggTagT TtTGagtggT
181 TTTgTaggTG TTTtTaTttT GTTGtTGggt gtggggTTGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTG
241 ggTGagTtTT aggtgTGTTT TaagtgTtTt TTaggtggtg TTTagTtttt TTTTGggTTt

```

BIJLAGE 8: PRIMERS QPCR AANGEDUID OP MGMT-SEQUENTIE

Hieronder worden de sequenties van de gebruikte primers voor de *methylation specific* PCR weergegeven. Verder worden deze aangeduid op de sequentie. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de gemethyleerde en de ongemethyleerde sequentie. De *forward* primers kunnen rechtstreeks teruggevonden worden op de DNA-sequentie. Voor de *reverse* primer wordt de sequentie *reverse* en complementair gemaakt aan de huidige sequentie van de primer.

Voor de qPCR wordt maar één primerpaar gebruikt, nl. de *inside* primers van de *nested* PCR. Hierbij is onderscheid gemaakt tussen de gemethyleerde sequentie en de ongemethyleerde sequentie. Het PCR-product dat geamplificeerd wordt is voor de gemethyleerde sequentie 81 bp. groot en voor de ongemethyleerde sequentie 93 bp. groot [64].

- ♦ **MGMT U forward primer (MGMT U sense (US))**: 5' TTT GTG TTT TGA TGT TTG TAG GTT TTT GT 3'
- ♦ **MGMT U reverse primer (MGMT U antisense (UAS))**: 5' AAC TCC ACA CTC TTC CAA AAA CAA AAC A 3'
- ♦ **MGMT U reverse primer (MGMT U antisense (UAS))**: 3' TGT TTT GTT TTT GGA AGA GTG TGG AGT T 5'
- ♦ **MGMT M forward primer (MGMT M sense (MS))**: 5' TTT CGA CGT TCG TAG GTT TTC GC 3'
- ♦ **MGMT M reverse primer (MGMT M antisense (MAS))**: 5' GCA CTC TTC CGA AAA CGA AAC G 3'
- ♦ **MGMT M reverse primer (MGMT M antisense (MAS))**: 3' C GTT TCG TTT TCG GAA GAG TGC 5'

Gemethyleerde sequentie van het MGMT-gen met primers van *nested* PCR

```

-121 gTtTCGTTTCG aTTtTCGTTT TCGCGCGTTT CGgTTTCGTT TTCGCGCGTt TtTttgTttt
-61 tTtTaggtTT tCGgTtTCGT TTCGtTttag aTTTCGTTTT aCGTCGTTat TTTTCGtgTTT
 1 TtCGgTTTTCG TTTTCGCGTT TCGgatatgT tgggaTagTT CGCGTTTTta gaaCGTtttg
 61 CGtTTTCGaCG TTCGTaggtT TtCGCGgtgC GTaTCGtttg CGaTttgggtg agtgtTtggg
121 tCGTTtCGTt TTCGgaagag tgCGgagTtT tTTTTCGgga CGgtggTagT TtTCGagtggT
181 TTTgTaggCG TTTtTaTttC GTCGtCGggt gtggggTCGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTCG
241 ggCGagTtTT aggtgCGTTT TaagtgTTtT TTaggtgTtg TTTagTttt TTTTCGggTTt
301 ggggttTTTg gaTtaggTtg CGTtgTagtg aTtgtggaTt ggCGtgtggC GgggtCGtg
361 gTagTTTTTg TTTtaTTtTt aggtgTtagT TTTaggTTTCG ggTTTCGggt tTtTTtaTT
421 TttTTatgTt gTTtagTtttT TTTTCGTTag TtgTtTtagg aagTttTtag aagTTTTtgC

```

Ongemethyleerde sequentie van het MGMT-gen met primers van *nested* PCR

```

-121 gTtTTGTTTG aTTtTTGTTT TTGTGTGTTT TGgTTTTGTT TTTGTGTGtT TtTttgTttt
-61 tTtTaggtTT tTGgTtTTGT TTTGTtTtag aTTTGTTTTT aTGTGTtTat TTTTGtgTTT
 1 TtTGgTTTTG TTTTGTGTT TTGgatatgT tgggaTagTT TGTGTTTTta gaaTGTTTTg
 61 TGtTTTGaTG TTTGTaggtT TtTGTGgtgT GTaTTGtttg TGaTttgggtg agtgtTtggg
121 tTGTTtTGtT TTTGgaagag tgTGgagTtT tTTTTTGgga TGgtggTagT TtTGagtggT
181 TTTgTaggTG TTTtTaTttT GTTGTGggt gtggggTTGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTG
241 ggTGagTtTT aggtgTGTTT TaagtgTTtT TTaggtgTtg TTTagTttt TTTTGggTTt
301 ggggttTTTg gaTtaggTtg TGtTgTagtg aTtgtggaTt ggTGtgtggT GgggtTGtg
361 gTagTTTTTg TTTtaTTtTt aggtgTtagT TTTaggTTTG ggTTTTGggt tTtTTtaTT
421 TttTTatgTt gTTtagTtttT TTTTTGTTag TtgTtTtagg aagTttTtag aagTTTTtgT

```

BIJLAGE 9: PRIMERS PYROSEQUENCING AANGEDUID OP MGMT-SEQUENTIE

Bij *pyrosequencing* worden andere primers gebruikt dan bij de MSP. Hieronder worden de sequenties van de gebruikte primers weergegeven. Daarnaast worden de verschillende primers aangeduid op zowel de gemethyleerde en de ongemethyleerde sequentie van het MGMT-gen. Voor de pyroPCR wordt één primerpaar gebruikt, de *reverse primer* draagt hierbij een biotinelabel. Na de pyroPCR wordt de *pyrosequencing* uitgevoerd. Hierbij wordt een *sequencing primer* gebruikt. Het PCR-product van de pyroPCR is 166 bp. lang [75] [79].

- ♦ **MGMT *inside reverse primer* pyroPCR met biotinelabel:** 5' AAA ACC ACT CRA AAC TAC CAC 3'
- MGMT *inside reverse primer* pyroPCR met biotinelabel:** 3' GTG GTA GTT TYG AGT GGT TTT 5'
- ♦ **MGMT *inside forward primer* pyroPCR:** 5' GTT TYG GAT ATG TTG GGA TAG 3'
- ♦ **MGMT *sequence primer forward* :** 5' GYG ATT TGG TGA GTG TTT G 3'
Afkomstig van Quillin et al. (CpG 84-89)
- ♦ **MGMT *sequence primer forward:*** 5' GAT AGT TYG YGT TTT TAG AA 3'
Afkomstig van artikel Quillin et al. (CpG 74-83)

Gemethyleerde sequentie van het MGMT-gen met primers van *nested PCR*

```

-121 gTtTCGTTTCG aTTtTCGTTT TCGCGCGTTT CGgTTTCGTT TTCGCGCGTt TtTttgTttt
-61 tTtTaggtTT tCGgTtTCGT TTCGTtTtag aTTTCGTTTT aCGTCGTTat TTTCGtgTTT
 1 TtCGgTTTTG TTTTTCGCGTT TCGgatatgT tggaTagTT CGCGTTTTta gaaCGTttt
 61 CGTTTTGaCG TTTCGTaggtT TtCGCGgtgC GTaTCGttt CGaTttggtg agtggtTtggg
121 tCGTTTCGTT TTCGgaagag tgCGgagTtT tTTTTTCGgga CGgtggTagT TtCGagtggT
181 TtTgTaggCG TTTtTaTttC GTCGtCGggt gtggggTCGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTCG
241 ggCGagTtTT aggtgCGTTT TaagtgTtTt TTaggtggtg TTTagTttt TTTTCGggTTt
301 ggggttTTtg gaTtaggTtg CGTtgTagtg aTtgtggaTt ggCGtggtgC GgggtTCGtg

```

Ongemethyleerde sequentie van het MGMT-gen met primers van *nested PCR*

```

-121 gTtTTGTTTG aTTtTTGTTT TTGTGTGTTT TGgTTTTGTT TTTGTGTGTTt TtTttgTttt
-61 tTtTaggtTT tTGgTtTTGT TTTGTtTtag aTTTGTTTTT aTGTGTtat TTTTGTgTTT
 1 TtTGgTTTTG TTTTTTGTGTT TTGgatatgT tggaTagTT TGTGTTTTta gaaTGTTTTt
 61 TGTTTTGaTG TTTGTAggtT TtTGTGgtgT GTaTTGttt TGaTttggtg agtggtTtggg
121 tTGTTTGTtT TTTGgaagag tgTGgagTtT tTTTTTGgga TGgtggTagT TtTGagtggT
181 TtTgTaggTG TTTtTaTttT GTTGTGggt gtggggTTGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTG
241 ggTGagTtTT aggtgTGTTT TaagtgTtTt TTaggtggtg TTTagTttt TTTTGggTTt
301 ggggttTTtg gaTtaggTtg TGTtgTagtg aTtgtggaTt ggTGtggtgT GgggtTGtg

```

BIJLAGE 10: PRIMERS METHYLATION SPECIFIC PCR AANGEDUID OP MGMT-SEQUENTIE VAN ANALYSE IN RADBOUDUMC TE NIJMEGEN

De patiëntenstalen reeks 2 voor MGMT-analyse uit bijlage 17 zijn afkomstig van het ziekenhuis Radboudumc te Nijmegen. Op deze stalen in is in dit ziekenhuis een *methylation specific* PCR uitgevoerd. Op de uitslagformulieren werd de regio van de primers op het MGMT-gen weergegeven: chr10 (GRCh37): (G131265501-131265525) en (G131265595-13126518).

Hieronder worden de sequenties van de gebruikte primers voor de *methylation specific* PCR weergegeven. Verder worden deze aangeduid op de sequentie. Hierbij wordt onderscheid gemaakt tussen de gemethyleerde en de ongemethyleerde sequentie.

Gemethyleerde sequentie van het MGMT-gen met primers van MSP (Nijmegen)

```

-121 gTtTCGTTTCG aTtTTCGTTT TCGCGCGTTT CGgTTTCGTT TTCGCGCGTt TtTttgTttt
-61 tTtTaggtTT tCGgTtTCGT TTCGtTttag aTTTCGTTTT aCGTCGTTat TTTCGtgTTT
 1 TtCGgTTTCG TTTTCGCGTT TCGgatatgT tgggaTagTT CGCGTTTTta gaaCGTtttg
 61 CGtTTCGaCG TTCGTaggtT TtCGCGgtgC GTaTCGtttg CGaTttggtg agtgtTtggg
121 tCGTTtCGTt TTCGgaagag tgCGgagTtT tTTTTCGgga CGgtggTagT TtCGagtggT
181 TTTgTaggCG TTTtTaTttC GTCGtCGggt gtggggTCGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTCG
241 ggCGagTtTT aggtgCGTTT TaagtgTtTt TTaggtgTtg TTTagTTttt TTTTCGggTTt

```

Ongemethyleerde sequentie van het MGMT-gen met primers van MSP (Nijmegen)

```

-121 gTtTTGTTTTG aTtTTGTTTT TtGTGTGTTT TGgTTTTGTT TTTGTGTGt TtTttgTttt
-61 tTtTaggtTT tTGgTtTTGT TTTGtTttag aTTTTGTTTT aTGTGTtat TTTTgtgTTT
 1 TtTGgTTTTG TTTTGTGTT TtGgatatgT tgggaTagTT TGTGTTTTta gaaTGttttg
 61 TGtTTTGaTG TTTGTaggtT TtGTGTgtgT GTaTTGtttg TGaTttggtg agtgtTtggg
121 tTGTTtTGtT TTTGgaagag tgTGgagTtT tTTTTTGgga TGgtggTagT TtTGagtggT
181 TTTgTaggTG TTTtTaTttT GTTGTtGggt gtggggTTGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTTG
241 ggTGagTtTT aggtgTGTTT TaagtgTtTt TTaggtgTtg TTTagTTttt TTTTGggTTt

```

**BIJLAGE 11: VERGELIJKING VAN GEDETECTEERDE CPG-GEBIEDEN DOOR MSP EN
PYROSEQUENCING OP MGMT-SEQUENTIE**

Op onderstaande gemethyleerde sequentie van MGMT-gen worden zowel de primersequenties van de MSP als van *pyrosequencing* aangeduid. Voor de *pyrosequencing* worden in dit project drie regio's onderzocht. Verder wordt ook de regio aangeduid die in Radboudumc te Nijmegen geanalyseerd wordt.

MSP Maastricht (CpG 81-83)

```
-61 tTtTaggtTT tCGgTtTCGT TTCGtTttag aTTTCGTTTT aCGTCGTTat TTTCGtgTTT
  1 TtCGgTTTCG TTTTCGCGTT TCGgatatgT tgggaTagTT CGCGTTTTta gaaCGTtttg
  61 CGtTTCGaCG TTCGTaggtT TtCGCGgtgC GTaTCGtttg CGaTttggtg agtgtTtggg
 121 tCGTtTCGtT TTCGgaagag tgCGgagTtT tTTTtCGgga CGgtggTagT TtCGagtggT
 181 TTTgTaggCG TTTtTaTttC GTCGtCGggt gtggggTCGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTCG
 241 ggCGagTtTT aggtgCGTTT TaagtgTtTt TTaggtgTtg TTTAgTTttt TTTCGggTtT
```

MSP Nijmegen (CpG 78-86)

```
-61 tTtTaggtTT tCGgTtTCGT TTCGtTttag aTTTCGTTTT aCGTCGTTat TTTCGtgTTT
  1 TtCGgTTTCG TTTTCGCGTT TCGgatatgT tgggaTagTT CGCGTTTTta gaaCGTtttg
  61 CGtTTCGaCG TTCGTaggtT TtCGCGgtgC GTaTCGtttg CGaTttggtg agtgtTtggg
 121 tCGTtTCGtT TTCGgaagag tgCGgagTtT tTTTtCGgga CGgtggTagT TtCGagtggT
 181 TTTgTaggCG TTTtTaTttC GTCGtCGggt gtggggTCGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTCG
 241 ggCGagTtTT aggtgCGTTT TaagtgTtTt TTaggtgTtg TTTAgTTttt TTTCGggTtT
```

Pyro Quillien (CpG74-83)

```
-61 tTtTaggtTT tCGgTtTCGT TTCGtTttag aTTTCGTTTT aCGTCGTTat TTTCGtgTTT
  1 TtCGgTTTCG TTTTCGCGTT TCGgatatgT tgggaTagTT CGCGTTTTta gaaCGTtttg
  61 CGtTTCGaCG TTCGTaggtT TtCGCGgtgC GTaTCGtttg CGaTttggtg agtgtTtggg
 121 tCGTtTCGtT TTCGgaagag tgCGgagTtT tTTTtCGgga CGgtggTagT TtCGagtggT
 181 TTTgTaggCG TTTtTaTttC GTCGtCGggt gtggggTCGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTCG
 241 ggCGagTtTT aggtgCGTTT TaagtgTtTt TTaggtgTtg TTTAgTTttt TTTCGggTtT
```

Pyro Quillien (CpG84-89)

```
-61 tTtTaggtTT tCGgTtTCGT TTCGtTttag aTTTCGTTTT aCGTCGTTat TTTCGtgTTT
  1 TtCGgTTTCG TTTTCGCGTT TCGgatatgT tgggaTagTT CGCGTTTTta gaaCGTtttg
  61 CGtTTCGaCG TTCGTaggtT TtCGCGgtgC GTaTCGtttg CGaTttggtg agtgtTtggg
 121 tCGTtTCGtT TTCGgaagag tgCGgagTtT tTTTtCGgga CGgtggTagT TtCGagtggT
 181 TTTgTaggCG TTTtTaTttC GTCGtCGggt gtggggTCGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTCG
 241 ggCGagTtTT aggtgCGTTT TaagtgTtTt TTaggtgTtg TTTAgTTttt TTTCGggTtT
```

Pyro Qiagen (CpG76-79)

```
-61 tTtTaggtTT tCGgTtTCGT TTCGtTttag aTTTCGTTTT aCGTCGTTat TTTCGtgTTT
  1 TtCGgTTTCG TTTTCGCGTT TCGgatatgT tgggaTagTT CGCGTTTTta gaaCGTtttg
  61 CGtTTCGaCG TTCGTaggtT TtCGCGgtgC GTaTCGtttg CGaTttggtg agtgtTtggg
 121 tCGTtTCGtT TTCGgaagag tgCGgagTtT tTTTtCGgga CGgtggTagT TtCGagtggT
 181 TTTgTaggCG TTTtTaTttC GTCGtCGggt gtggggTCGT TTTgaTTTTT aTTTatTTTCG
 241 ggCGagTtTT aggtgCGTTT TaagtgTtTt TTaggtgTtg TTTAgTTttt TTTCGggTtT
```

BIJLAGE 12: PATIËNTENSTALEN MLH1-ANALYSE VOOR BISULFIETBEHANDELING

Voor de analyses van het MLH1-gen worden patiëntenstalen uit voorgaande jaren gebruikt. De MSP-analyse met de *nested* PCR is al uitgevoerd op de patiëntenstalen van het MLH1-gen. Hierbij werd een andere bisulfietmethode toegepast. De bisulfietmethode die nu gebruikt wordt, Epiect *bisulfite* kit, zou een hogere gevoeligheid vertonen. Dit kan aangetoond worden met deze analyse. Alle stalen die voor de MLH1-analyse gebruikt worden ondergaan de nieuwe bisulfietmethode. De gebruikte stalen zijn terug te vinden in tabel

In de tabel wordt de naam van het staal vermeld. Deze naam begint altijd met moleculair biologische technieken (MBT) en verwijst naar de moleculaire diagnostiek. Achter MBT wordt het jaartal vermeld. Daarnaast wordt een nummer aan het staal gegeven.

Naast de staalnaam zijn ook de concentratie en de zuiverheid van het DNA terug te vinden. Verder staat de gebruikte methode van de DNA-isolatie vermeld. De DNA-isolatie kan door drie methodes uitgevoerd zijn: TE buffer, DHS methode en Maxwell. Aan de hand van deze methode is de concentratie van het DNA naar een andere hoeveelheid verdund. Zo is voor de stalen behandeld met de TE buffer en de DHS methode de concentratie naar 200 ng/ μ l herleid. Voor de stalen behandeld met de maxwell daarentegen is de concentratie naar 20 ng/ μ l herleid. Als laatste is het resultaat van de ladder weergegeven, aan de hand van deze analyse wordt de kwaliteit van het DNA bepaald.

Staal	Concentratie (ng/ μ l)	Verdund? (ng/ μ l)	Ladder (bp)	DNA-isolatie	A260/A280
MBT08-140	/	200	400		1,9
MBT08-150	/	200	600		2,1
MBT08-197	616,09	200	600		2,01
MBT08-235	366,35	200	Zwak 600		2,08
MBT08-328	718,70	200	400		2,02
MBT08-343	262,17	262	400		1,32
MBT08-510	525,11	200	400		2
MBT08-565	1190,63	200	200		1,29
MBT08-571	1481,19	200	100		1,43
MBT08-600	522,61	200	100		2,01
MBT08-750	/	200	400		1,9
MBT08-771	2980,51	200	600		1,90
MBT09-09	584,45	200	300		1,250
MBT09-10	495,34	200	300		1,87
MBT09-30	/	200	400		2,0
MBT09-62	454,69	200	300		1,30
MBT09-149	/	200	300		1,8
MBT09-166	/	200	600		2,0
MBT09-169	/	200	Zwak 400		1,7
MBT09-199	514,80	200	400		1,97
MBT09-298	796,11	200	400		2,02
MBT09-327	185,28	185	400		2,01
MBT09-369	1124,70	200	Zwak 400		2,03
MBT09-384	586,66	200	Geen resultaat		1,75
MBT09-507	316	200	300		1,05

MBT09-622	3638,13	200	300		1,58
MBT09-608	1761,76	200	400		1,96
MBT09-633	804,80	200	Zwak 600		1,91
MBT09-688	231,11	231	300		1,97
MBT09-755	90,38	90	100		1,02
MBT09-764	1147,31	200	200		1,81
MBT09-804	/	200	Licht 300		2,0
MBT10-111	619,11	Zwak 600	DHS	200	1,87
MBT10-116	1808,73	Zwak 600	TE	200	2,08
MBT10-123	590,14	300	DHS	200	2,02
MBT10-210	391,81	Zwak 300	DHS	200	1,94
MBT10-299	2416,81	600	TE	200	1,84
MBT10-311	291,63	Zwak 400	TE	200	1,96
MBT10-312	120,02	400	TE	/	2,36
MBT10-314	544,21	400	TE	200	1,35
MBT10-315	4732,60	600	TE	400	1,85
MBT10-319	230,97	300	TE	230	1,10
MBT10-416	1048,70	400	TE	200	2,04
MBT10-574	1005,40	400	TE	200	1,29
MBT10-642	1418,86	300	DHS	200	1,89
MBT10-694	1002,13	Zwak 400	DHS	200	1,90
MBT10-744	1052,83	Zwak 400	DHS	200	1,93
MBT10-808	886,22	Zwak 400	DHS	200	1,94
MBT10-959	2004,50	Zwak 400	DHS	200	1,93
MBT10-1022	378,15	100	DHS	200	1,98
MBT10-1024	230,53	300	DHS	200	2,01
MBT11-134	399,64	200	Zwak 300		1,75
MBT11-306	915,06	200	Zwak 300		1,98
MBT11-481	474,26	200	400		2,01
MBT12-53	203,19	200	100		1,32
MBT12-352	291,612	20	Zwak 200	Maxwell	1,72
MBT12-432	231,18	231	100		1,29
MBT12-1140	77,8	20	Zwak 300	Maxwell	1,73
MBT12-1249	870	20	Zwak 400	Maxwell	1,86
MBT12-1313	426,68	20	Zwak 400	Maxwell	1,82

BIJLAGE 13: BEPERKTE REEKS PATIËNTENSTALEN VOOR MLH1-ANALYSE

Na de optimalisatie van de qPCR wordt deze analyse uitgevoerd op een beperkt aantal patiëntenstalen. In onderstaande tabel (tabel ...) wordt een overzicht gegeven van deze stalen. De stalen zijn allemaal afkomstig uit het jaar 2010. Op deze stalen is in 2010 de bisulfitbehandeling met de oude kit uitgevoerd. Tijdens dit project worden de stalen behandeld met de nieuwe bisulfitbehandeling. Na de bisulfitbehandeling wordt de qPCR uitgevoerd.

Staal	Concentratie (ng/μl)	Verdund? (ng/μl)	Ladder (bp)	DNA- isolatie	A260/A280
MBT10-111	619,11	200	Zwak 600	DHS	1,87
MBT10-116	1808,73	200	Zwak 600	TE	2,08
MBT10-123	590,14	200	300	DHS	2,02
MBT10-210	391,81	200	Zwak 300	DHS	1,94
MBT10-299	2416,81	200	600	TE	1,84
MBT10-311	291,63	200	Zwak 400	TE	1,96
MBT10-312	120,02	120	400	TE	2,36
MBT10-314	544,21	200	400	TE	1,35
MBT10-315	4732,60	400	600	TE	1,85
MBT10-319	230,97	230	300	TE	1,10
MBT10-416	1048,70	200	400	TE	2,04
MBT10-574	1005,40	200	400	TE	1,29
MBT10-642	1418,86	200	300	DHS	1,89
MBT10-694	1002,13	200	Zwak 400	DHS	1,90
MBT10-744	1052,83	200	Zwak 400	DHS	1,93
MBT10-808	886,22	200	Zwak 400	DHS	1,94
MBT10-959	2004,50	200	Zwak 400	DHS	1,93
MBT10-1022	378,15	200	100	DHS	1,98
MBT10-1024	230,53	200	300	DHS	2,01

BIJLAGE 14: PATIËNTENSTALEN VOOR VALIDATIE VAN MLH1-ANALYSE

Het controlelabo van de qPCR op het MLH1-gen wordt uitgevoerd op een groot aantal stalen. Het DNA van deze stalen is in 2008, 2009, 2010, 2011 of 2012 geïsoleerd. In volgende tabel (tabel ...) worden de gegevens van deze stalen weergegeven.

Staal	Concentratie (ng/μl)	Verdund? (ng/μl)	Ladder (bp)	DNA-isolatie	A260/A280
MBT08-140	/	200	400		1,9
MBT08-150	/	200	600		2,1
MBT08-197	616,09	200	600		2,01
MBT08-235	366,35	200	Zwak 600		2,08
MBT08-328	718,70	200	400		2,02
MBT08-343	262,17	262	400		1,32
MBT08-510	525,11	200	400		2
MBT08-565	1190,63	200	200		1,29
MBT08-571	1481,19	200	100		1,43
MBT08-600	522,61	200	100		2,01
MBT08-750	/	200	400		1,9
MBT08-771	2980,51	200	600		1,90
MBT09-09	584,45	200	300		1,250
MBT09-10	495,34	200	300		1,87
MBT09-30	/	200	400		2,0
MBT09-62	454,69	200	300		1,30
MBT09-149	/	200	300		1,8
MBT09-166	/	200	600		2,0
MBT09-169	/	200	Zwak 400		1,7
MBT09-199	514,80	200	400		1,97
MBT09-298	796,11	200	400		2,02
MBT09-327	185,28	185	400		2,01
MBT09-369	1124,70	200	Zwak 400		2,03
MBT09-384	586,66	200	Geen resultaat		1,75
MBT09-507	316	200	300		1,05
MBT09-622	3638,13	200	300		1,58
MBT09-608	1761,76	200	400		1,96
MBT09-633	804,80	200	Zwak 600		1,91
MBT09-688	231,11	231	300		1,97
MBT09-755	90,38	90	100		1,02
MBT09-764	1147,31	200	200		1,81
MBT09-804	/	200	Licht 300		2,0
MBT10-123	590,1	200	300		2,02
MBT10-311	291,6	200	Zwak 400		1,96
MBT10-315	4732,6	400	600		1,85
MBT10-642	1418,86	200	300		1,98
MBT10-808	886,2	200	400		1,94
MBT10-1024	230,5	200	300		2,01
MBT11-134	399,64	200	Zwak 300		1,75
MBT11-306	915,06	200	Zwak 300		1,98
MBT11-481	474,26	200	400		2,01

MBT12-53	203,19	200	100		1,32
MBT12-352	291,612	20	Zwak 200	Maxwell	1,72
MBT12-432	231,18	231	100		1,29
MBT12-1140	77,8	20	Zwak 300	Maxwell	1,73
MBT12-1249	870	20	Zwak 400	Maxwell	1,86
MBT12-1313	426,68	20	Zwak 400	Maxwell	1,82

BIJLAGE 15: PATIËNTENSTALEN MGMT-ANALYSE VOOR BISULFIETBEHANDELING

De stalen die gebruikt worden voor het MGMT-gen moeten vooraf aan de MSP of *pyrosequencing* een bisulfiëtbehandeling ondergaan. In tabel ... worden de stalen voor de MGMT-analyse weergegeven die een bisulfiëtbehandeling ondergaan.

MBT-nummer	Concentratie (ng/μl)	Ladder (bp)	DNA-isolatie	Verdunning (ng/μl)	260/280
MBT14-0007	307,39		MAX	20	1,73
MBT14-134	70,78		MAX	20	1,83
MBT14-240	14,98		MAX	/	1,83
MBT14-276	229,49		MAX	20	1,77
MBT14-456	112,93		MAX	20	1,73
MBT14-505	15,7		MAX	/	1,7
MBT14-512	8,41		MAX	/	1,93
MBT14-581	137,01		MAX	20	1,77
MBT14-591	163,27		MAX	20	1,77
MBT14-564	395,82		MAX	20	1,79
MBT14-821	94,95		MAX	20	1,83
MBT14-855	53,1		MAX	20	1,74
MBT14-931	55,76		MAX	20	1,81
MBT14-1036	8,9		MAX	/	1,33

BIJLAGE 16: PATIËNTENSTALEN REEKS 1 VOOR MGMT-ANALYSE

De optimalisatie gebeurt net zoals bij het MLH1-gen op controlestalen. Hierna wordt deze analyse uitgevoerd op een beperkt aantal stalen. Hieronder wordt het beperkt aantal stalen voor de MGMT-analyse weergegeven (tabel ..).

MBT-nummer	Concentratie (ng/μl)	Ladder (bp)	DNA- isolatie	Verdunning (ng/μl)	260/280
MBT14-0007	307,39	400	MAX	20	1,73
MBT14-134	70,78	300	MAX	20	1,83
MBT14-855	53,1	300	MAX	20	1,74
MBT14-931	55,76	200	MAX	20	1,81
MBT14-1036	8,9	100	MAX	/	1,33
SW480	7,3	/	/	20	/
HT29	84	/	/	20	/
MDA231	6,3	/	/	/	/
SW48	62	/	/	20	/
LS741	9,7	/	/	/	/

BIJLAGE 17: PATIËNTENSTALEN REEKS 2 VOOR MGMT-ANALYSE

	Staal	Concentratie (ng/μl)	Ladder (bp)	Isolatie	Verdund? (ng/μl)	A260/280
LS1	T13-08423	225,28	300	MAX	20	1,72
LS2	T13-12990	301,82	300	MAX	20	1,61
LS3	T13-15617	557,69	300	MAX	20	1,78
LS4	T13-20564	161,42	300	MAX	20	1,73
LS5	T14-14986	40,97	400	MAX	20	1,7
LS6	T14-15908	18,82	400	MAX	/	1,58
LS7	T14-17044	70,64	400	MAX	20	1,79
LS8	T14-17068	8,05	400	MAX	/	1,93
LS9	T14-17146	36,83	400	MAX	20	1,72

