

InfiniumTM MethylationEPIC v2.0 BeadChip

Genomweites
Methylierungsscreening
mit aktuellen Inhalten

- Über 935.000 CpGs mit von Experten zusammengestellten neuen Inhalten
- Hochgenaue und präzise DNA-Methylierungsdaten
- Hochdurchsatzanalyse mit minimalen Kosten je Probe
- Geeignet für aus FFPE-Gewebeproben extrahierte DNA

illumina[®]

Einleitung

Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genexpression. Veränderungen der zellulären DNA-Methylierung werden bereits seit längerer Zeit mit Alterung, Entwicklung und pathologischen Veränderungen in Verbindung gebracht.^{1,2} Seit mehr als einem Jahrzehnt bietet Illumina Forschern zuverlässige Mikroarray-Werkzeuge auf Basis der BeadArray™-Technologie zur genomweiten quantitativen Messung der DNA-Methylierung. Die BeadChips Infinium HumanMethylation450 und MethylationEPIC v1.0 kommen derzeit in der Forschung zur Erfassung von Daten in epigenomweiten Assoziationsstudien (EWAS) zur Anwendung. Diese Infinium-BeadChips haben sowohl die Ermittlung als auch den Einsatz von methylierungsbasierten Biomarkern in der Krebsforschung^{3,4} sowie in den Bereichen genetische Erkrankungen,⁵ Alterung,⁶ und molekulare Epidemiologie⁷ ermöglicht. Der aktualisierte Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip ([Abbildung 1](#), [Tabelle 1](#)) basiert auf derselben zuverlässigen Infinium-Chemie und bietet erweiterte, von Experten zusammengestellte Inhalte für die biologische Epigenetikforschung.

Genomweite, aktuelle Inhalte

Der Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip beruht auf der genomweiten Basis des Infinium MethylationEPIC v1.0 BeadChip, zeichnet sich durch hohe Abwärtskompatibilität aus ([Abbildung 2](#)) und bietet anhand von Expertenfeedback und epigenetischer Evaluierungen von bei Menschen auftretenden Karzinomen und entsprechenden Zellproben entwickelte neue Inhalte ([Tabelle 2](#), [Tabelle 3](#)). Nicht funktionale Sonden, die in DNA-Methylierungsstudien aufgrund von zugrunde liegenden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs, Single Nucleotide Polymorphisms), Kreuzhybridisierung und Multimapping-Verhalten⁸ routinemäßig herausgefiltert werden, wurden in der neuen Version des BeadChips entfernt, wodurch mehr Platz für funktionale, in der Epigenetikforschung ermittelte Inhalte zur Verfügung steht.

Es wurden mehr als 186.000 neue Sonden entwickelt, die auf bekannte Enhancer, Super-Enhancer, Domänen, die CTCF-Bindungen bilden, und offene Chromatinregionen ansprechen, die mit Primärtumoren assoziiert sind und durch ATAC-Seq

(Assay for Transposable-Accessible Chromatin using sequencing, Assay für Transposase-zugängliches Chromatin mit Sequenzierung) und ChIP-Seq (Chromatin Immunoprecipitation Sequencing, Chromatin-Immunpräzipitationssequenzierung) ermittelt wurden. Diese neuen Inhalte wurden auf Empfehlung von führenden Epigenetikforschern sowie anhand von aktuellen wissenschaftlichen Publikationen zusammengestellt.⁹⁻¹⁴

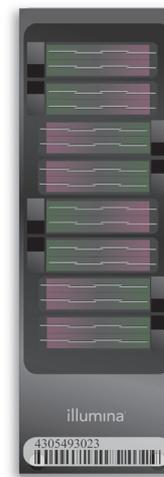


Abbildung 1: Der Infinium MethylationEPIC BeadChip v2.0: Der Infinium MethylationEPIC BeadChip v2.0 enthält über 935.000 CpG-Stellen in Enhancer-Regionen, Genkörpern, Promoter-Regionen und CpG-Inseln.

Tabelle 1: Produktinformationen

Merkmal	Beschreibung
Spezies	Mensch
Anzahl der Marker insgesamt ^a	> 935.000
Anzahl der Proben je BeadChip	8
Erforderliche DNA-Zugabe	250 ng
Spezialisierte Probenotypen	FFPE-Gewebe
Assay-Chemie	Infinium HD
Unterstützte Geräte	iScan-, NextSeq 550-Systeme

a. Untersuchte Methylierungsstellen

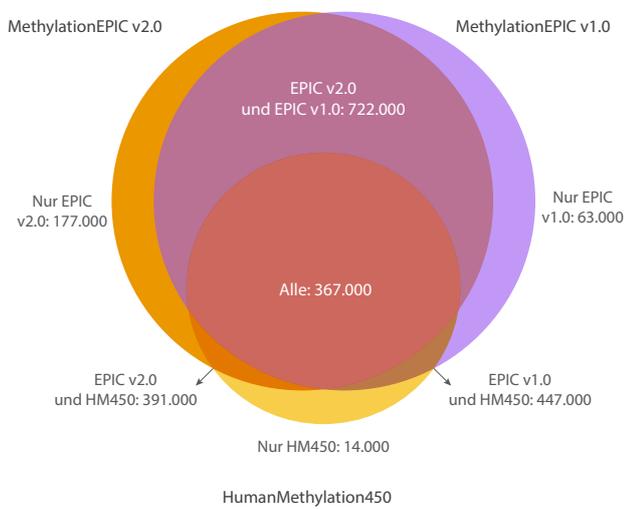


Abbildung 2: Hohe Abwärtskompatibilität mit älteren BeadChips: Der Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip beruht auf der Basis der BeadChips Infinium MethylationEPIC v1.0 und HumanMethylation450.

Eine weitere Verbesserung besteht darin, dass neue Sonden für CpG-Inseln und Exons, die beim Infinium MethylationEPIC v1.0 BeadChip nur unzureichend abgedeckt waren, hinzugefügt wurden und somit eine umfassende Coverage gewährleisten. Darüber hinaus werden mit der neuen Version mehr als 450 Krebstreiber Mutationen untersucht, was den Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip zu einem Multiomik-Tool für Krebsstudien macht.¹⁵ Jedoch profitieren von den Vorteilen des neuen, hochmodernen Inhalts Forscher aller Fachrichtungen, die mit Epigenetik befasst sind.

Tabelle 2: Dichte Coverage von CpG-Inseln

Merkmal	Anz. mit Coverage	% mit Coverage	Durchschn. Anz der Loci/ Merkmale
Insel	25.381	91 %	5,4
Nördl. Ufer	25.115	90 %	3,5
Südl. Ufer	24.870	89 %	3,6
Nördl. Riff	21.719	78 %	2,1
Südl. Riff	21.677	78 %	2,1

Legacy-Inhalt der BeadChips Infinium MethylationEPIC v1.0 und v2.0:

- CpG-Inseln
- Nicht-CpG (CHH)-methylierte Stellen, die in menschlichen Stammzellen identifiziert wurden
- ENCODE-Euchromatin und -Enhancer
- FANTOM5-Enhancer
- DNase-hypersensitive Stellen
- miRNA-Promotor-Regionen
- > 85 % der Inhalte des HumanMethylation450 BeadChip

Neuer Inhalt des Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip:

- Unterschiedlich methylierte Stellen, die durch den Vergleich von Tumor- und Normalproben für unterschiedliche Krebsarten ermittelt wurden
- Durch ChIP-Seq in Krebs- und Zelllinienproben ermittelte Enhancer und Super-Enhancer
- Regionen mit unterschiedlicher Chromatin-Zugänglichkeit, die durch ATAC-Seq in primären Tumoren beim Menschen ermittelt wurden
- Erweiterte Coverage von CpG-Inseln
- Verbesserte Exon-Coverage zur genaueren Bestimmung von Kopienzahlvarianten (CNV, Copy Number Variation)
- Häufige Krebstreiber Mutationen

Tabelle 3: Infinium MethylationEPIC v2.0: Coverage genomischer Regionen

Merkmaltyp	Anz. der zugeordneten Merkmale	Abgedeckte Merkmale in %	Durchschn. Anz der Loci/ Merkmale
RefSeq			
NM_TSS200 ^a	51.688	82 %	2,8
NM_TSS1500	59.981	96 %	5,6
NM_5' UTR	42.051	67 %	1,7
NM_1stExon	44.471	71 %	1,8
NM_3' UTR	39.407	63 %	1,3
NM_Exonic	207.398	28 %	0,5
NR_TSS200	12.706	68 %	2,0
NR_TSS1500	15.961	86 %	3,9
NR_1stExon	9.810	53 %	1,4
NR_Exonic	30.211	25 %	0,5
GenCode Basic v41			
TSS200	160.572	79 %	1,7
TSS1500	197.603	80 %	3,9
5' UTR	61.823	59 %	1,4
Erstes Exon	118.516	47 %	1,1
3' UTR	41.659	53 %	1,2
Exonisch	417.055	26 %	0,5
Enhancer			
DNase-hypersensitive Stellen ^b	432.393	16 %	0,2
FANTOM5-Enhancer ^c	23.852	84 %	1,0
CisReg Site Evid 40–50 ^d	19.159	70 %	1,3
CisReg Site Evid 50–60	21.609	67 %	1,2
CisReg Site Evid 60–70	30.152	61 %	1,1
CisReg Site Evid 70–80	66.446	47 %	0,8
CisReg Site Evid > 80	153.712	19 %	0,3
Krebsrebermutationen			
Krebsrebermutationen ^e	473	81 %	0,8

- a. Entfernung in Basenpaaren vom Transkriptionsstartpunkt (TSS, Transcriptional Start Site).
- b. Aus ENCODE v5: 2.745.580 DNase-hypersensitive Stellen genomweit.
- c. Genomische Regionen, die im FANTOM5-Projekt als Enhancer identifiziert wurden.
- d. Aus ENCODE v5: 87 Studien mit vollständiger Datenannotation
- e. Aus: Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. Cell. 2018;173(2):371-385.e18.

Optimierter Workflow

Das Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit zeichnet sich durch einen unkomplizierten, anwenderfreundlichen Workflow aus, der weder Probenpooling noch Indizierung erfordert. Der BeadChip für acht Proben wird im Anschluss an den Infinium HD Methylation Assay verarbeitet und auf den Systemen iScan™ oder NextSeq™ 550 gescannt.

Der Infinium-Methylierungsassay wurde durch die Ergänzung neuer Methoden für die schnelle Bisulfit-Umwandlung optimiert, wodurch sich die Gesamtzeit für den Assay (von der DNA-Extraktion bis zur Generierung der Intensitätsdateien) von vier auf drei Tage reduziert. Die Bisulfit-Umwandlung vor dem Infinium-Methylierungsassay kann jetzt mithilfe der empfohlenen Kits von Drittanbietern zur schnellen Bisulfit-Umwandlung in drei Stunden abgeschlossen werden. Diese Kits eignen sich auch für die Automatisierung, was die Variabilität verringert und den Durchsatz bei der Probenverarbeitung erhöht.

Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip-Kits enthalten alle zur Durchführung von Methylierungsscreenings erforderlichen Reagenzien (mit Ausnahme der separat zu erwerbenden Kits für die Bisulfit-Umwandlung).



Weitere Informationen finden Sie im technischen Hinweis [Automated bisulfite conversion for Infinium Methylation BeadChips](#) (Automatisierte Bisulfit-Umwandlung für Infinium-Methylierungs-BeadChips).

Hochgenaue und präzise Methylierungsdaten

Die Infinium-Arraychemie verwendet für jede einzelne untersuchte CpG-Stelle zahlreiche Bead-Replikate mit jeweils Tausenden von Sonden. Damit liefert der Infinium-Methylierungsassay hochpräzise Methylierungswerte. Dies wird durch interne Versuche mit Krebszelllinien belegt, die eine Reproduzierbarkeit von > 99 % zwischen technischen Replikaten zeigen ([Abbildung 3A](#)). Darüber hinaus wird eine hohe analytische Sensitivität erreicht, da sich mit dem Infinium-Methylierungsassay Abweichungen bei den Beta-Werten von 0,2 mit einer Falsch-Positiv-Rate von weniger als 1 % bestimmen lassen.

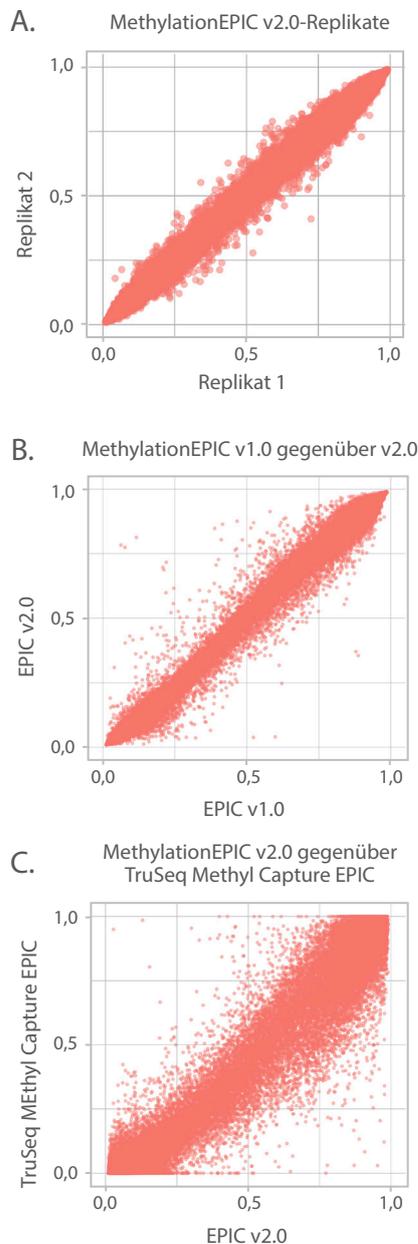


Abbildung 3: Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChips zeichnen sich durch hohe Reproduzierbarkeit, Abwärtskompatibilität und Korrelation mit Sequenzierungsdaten aus: (A) Der Vergleich der Beta-Werte von technischen Replikaten für HeLa-Proben auf dem MethylationEPIC v2.0 zeigt einen R^2 -Wert von $> 99\%$. (B) Der Vergleich der Beta-Werte für HeLa-Proben bei zwischen MethylationEPIC v1.0 und v2.0 übereinstimmenden Inhalten zeigt einen R^2 -Wert von $> 99\%$. (C) MethylationEPIC v2.0-Daten zeigen bei 100-facher Sequenzierungstiefe eine hohe Korrelation bei Methylierungs-Calls ($R^2 > 96\%$) im Vergleich zu mit der gezielten Bisulfit-Sequenzierung gewonnenen Daten. Die Übereinstimmungsdiagramme wurden anhand der mit dem SeSAmE-Datenanalysepaket generierten Beta-Werte erstellt.

Versuche zeigen zudem eine hohe Korrelation zwischen übereinstimmenden Assays der BeadChips Infinium MethylationEPIC v2.0 und v1.0 (Abbildung 3B) und Methylierungssequenzierungsdaten (Abbildung 3C). Studien haben gezeigt, dass sich das mit Infinium-BeadChips erzielte Niveau an Genauigkeit und Präzision nur mit einer hohen (mindestens 100-fachen) Sequenzierungstiefe erreichen lässt.¹⁶

Unkomplizierte, integrierte Qualitätskontrolle

Infinium-Methylierungsassays enthalten proben-spezifische und unabhängige Kontrollen, die für eine einfache und intuitive Qualitätskontrolle sorgen. Diese Kontrollen geben die Qualität der Daten in Abhängigkeit von den Infinium-Workflowschritten sowie probenspezifischen Kontrollen wie die Kontrolle der Effizienz der Bisulfit-Umwandlung und Negativkontrollen an. Die Kontrollen lassen sich in Tabellenform mit dem BeadArray Controls Reporter oder probenübergreifend grafisch mit der GenomeStudio™ Methylation Module Software auswerten. Darüber hinaus haben Anwender zusätzliche Methoden zur Bewertung der Datenqualität mit Drittanbieter-Softwarelösungen wie SeSAmE¹⁷ und minfi¹⁸ entwickelt.

Einfache Sekundäranalyse der Daten

In den mittlerweile über zehn Jahren breiter Anwendung der Infinium-Methylierungs-BeadChips haben Anwender benutzerfreundliche R-Pakete für die Datenanalyse entwickelt. Diese Pakete, z. B. SeSAmE und minfi, stellen aktuelle bioinformatische Methoden für die Normalisierung, die Sondenfilterung und die Bestimmung differentieller Methylierung bereit. Anwendungs-videos und umfassende Benutzerhandbücher erläutern den Einsatz dieser Datenanalysepakete. Da die BeadArray-Technologie zielgerichtet ist, lassen sich die Ausgabedaten zudem mit minimalem Rechenaufwand einfach verarbeiten und zu geringen Kosten oder sogar ohne Kosten speichern.

Eignung für FFPE-Proben

Bei Verwendung von formalin-fixierten, in Paraffin eingebetteten (FFPE) Gewebeproben mit einer modifizierten Version des Infinium Methylation HD Assay zeigt sich eine solide Leistung (Tabelle 4). Für wertvolle Proben und optimale Probenintegrität werden das [Infinium FFPE QC Kit](#) und das [DNA Restoration Kit](#) empfohlen.

Tabelle 4: Solide Daten anhand von FFPE-Proben

Infinium MethylationEPIC BeadChips	Standard	FFPE
Reproduzierbarkeit (technische Replikate)	$r^2 \geq 98 \%$	$r^2 \geq 98 \%$
Anzahl der ermittelten Stellen ^a	$\geq 96 \%$	$\geq 90 \%$

a. Basierend auf Nichttumor-Proben empfohlene Probenzugabemengen hochwertiger DNA, wie von PicoGreen bestätigt und gemäß allen anderen Illumina-Empfehlungen in den jeweiligen Benutzerhandbüchern.

Zusammenfassung

Mit dem Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip steht ein Werkzeug für die genomweite Methylierungsanalyse mit aktuellen Inhalten und hohem Durchsatz zur Verfügung. Damit handelt es sich um die ideale Lösung für Epigenetikstudien jeder Größe.

Weitere Informationen

Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip: illumina.com/products/by-type/microarray-kits/infinium-methylation-epic.html

Support zum Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip: support.illumina.com/array/array_kits/infinium-methylationepic-beadchip-kit.html

Methylierungsarrayanalyse: illumina.com/techniques/microarrays/methylation-arrays.html

Tipps zur Analyse von Methylierungsarray-Daten: illumina.com/techniques/microarrays/methylation-arrays/methylation-array-data-analysis-tips.html

Schnelle, automatisierte Umwandlung von Bisulfite: illumina.com/content/dam/illumina/gcs/assembled-assets/marketing-literature/automated-bisulfite-infinium-methylation-tech-note-m-gl-00144/automated-bisulfite-Infinium-methylation-tech-note-m-gl-00144.pdf

Krebs-Epigenetik: illumina.com/areas-of-interest/cancer/research/cancer-epigenetics.html

Bestellinformationen

Produkt	Katalog-Nr.
Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit (8 samples)	20087706
Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit (16 samples)	20087707
Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit (32 samples)	20087708
Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip Kit (96 samples)	20087709

Jeder Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip kann acht Proben gleichzeitig verarbeiten und über 935.000 Methylierungsstellen je Probe analysieren.

Quellen

1. Bibikova M, Lin Z, Zhou L, et al. **High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays.** *Genome Res.* 2006;16(3):383-393.
2. Fan JB, Oliphant A, Shen R, et al. **Highly parallel SNP genotyping.** *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* 2003;68:69-78.
3. Capper D, Jones DTW, Sill M, et al. **DNA methylation-based classification of central nervous system tumours.** *Nature.* 2018;555(7697):469-474. doi: 10.1038/nature26000.
4. Sengos AP, Aldape K. **DNA Methylation Profiling: An Emerging Paradigm for Cancer Diagnosis.** *Annu Rev Pathol.* 2022;17:295-321. doi: 10.1146/annurev-pathol-042220-022304.
5. Sadikovic B, Levy MA, Kerkhof J, et al. **Clinical epigenomics: genome-wide DNA methylation analysis for the diagnosis of Mendelian disorders.** *Genet Med.* 2021;23(6):1065-1074. doi: 10.1038/s41436-020-01096-4.
6. Horvath S, Raj K. **DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing.** *Nat Rev Genet.* 2018;19(6):371-384. doi: 10.1038/s41576-018-0004-3.
7. Nwanaji-Enwerem JC, Colicino E. **DNA Methylation-Based Biomarkers of Environmental Exposures for Human Population Studies.** *Curr Environ Health Rep.* 2020;7(2):121-128. doi: 10.1007/s40572-020-00269-2.
8. Zhou W, Laird PW, Shen H. **Comprehensive characterization, annotation and innovative use of Infinium DNA methylation BeadChip probes.** *Nucleic Acids Res.* 2017; 45(4):e22. doi: 10.1093/nar/gkw967.
9. Corces MR, Granja JM, Shams S, et al. **The chromatin accessibility landscape of primary human cancers.** *Science.* 2018;362(6413):eaav1898. doi:10.1126/science.aav1898.
10. Chen H, Li C, Peng X, et al. **A Pan-Cancer Analysis of Enhancer Expression in Nearly 9000 Patient Samples.** *Cell.* 2018;173(2):386-399. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.027.
11. Lovén J, Hoke HA, Lin CY, et al. **Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers.** *Cell.* 2013;153(2):320-334. doi:10.1016/j.cell.2013.03.036.
12. Hnisz D, Abraham BJ, Lee TI, et al. **Super-enhancers in the control of cell identity and disease.** *Cell.* 2013;155(4):934-47. doi: 10.1016/j.cell.2013.09.053.
13. Jiang Y, Qian F, Bai X, et al. **SEdb: a comprehensive human super-enhancer database.** *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D235-D243. doi: 10.1093/nar/gky1025.
14. Chapuy B, McKeown MR, Lin CY, et al. **Discovery and characterization of super-enhancer-associated dependencies in diffuse large B cell lymphoma.** *Cancer Cell.* 2013;24(6):777-790. doi:10.1016/j.ccr.2013.11.003.
15. Bailey MH, Tokheim C, Porta-pardo E, et al. **Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations.** *Cell.* 2018;173(2):371-385. doi: 10.1016/j.cell.2018.02.060.
16. Zhou L, Ng HK, Drautz-Moses DI, et al. **Systematic evaluation of library preparation methods and sequencing platforms for high-throughput whole genome bisulfite sequencing.** *Sci Rep.* 2019;;9(1):10383. doi: 10.1038/s41598-019-46875-5.
17. Zhou W, Triche Jr TJ, Laird PW, Shen H. **SeSAMe: reducing artifactual detection of DNA methylation by Infinium BeadChips in genomic deletions.** *Nucleic Acids Res.* 2018;46(20): e123. doi: 10.1093/nar/gky691.
18. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrado-Bravo H, et al. **Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays.** *Bioinformatics.* 2014;30(10): 1363-1369. doi: 10.1093/bioinformatics/btu049.



+1.800.809.4566 (USA, gebührenfrei) |
 +1.858.202.4566 (Tel. außerhalb der USA)
 techsupport@illumina.com | www.illumina.com

© 2022 Illumina, Inc. Alle Rechte vorbehalten. Alle Marken sind Eigentum von Illumina, Inc. bzw. der jeweiligen Eigentümer. Spezifische Informationen zu Marken finden Sie unter www.illumina.com/company/legal.html.
 M-GL-01156 DEU v1.0