



Analysen epigenetischer Marker aus Liquid Biopsies: Informationen von jenseits des Genoms

Aus einer Liquid Biopsy lassen sich neben der genomischen Information aus der DNA-Sequenz, wie sie in den beiliegenden Artikeln von Ulz et al. und Speicher et al. beschrieben werden, auch Daten zu epigenetischen Modifikationen und Alterationen erheben [9]. Im Gegensatz zu den genetischen Informationen, die in der Basenabfolge in der DNA kodiert werden, erfolgt die Speicherung epigenetischer Informationen zum Beispiel im DNA-Methylierungs- und Histonmodifikationsmuster, in der Expression von nicht kodierender RNA (ncRNA), in der Chromatinstruktur sowie in der Lokalisation von Genen im Nukleus (nuclear positioning) [19, 53]. Da epigenetische Modifikationen z. B. durch Enzyme von einer Zelle modifiziert werden können, erlauben sie es ihr, flexibel auf sich verändernde Umweltbedingungen zu reagieren. Darüber hinaus werden auch Änderungen der Genexpression im Rahmen von Differenzierungsprozessen durch epigenetische Mechanismen bewirkt. Daher ist es wenig überraschend, dass die verschiedenen Gewebe sich sicher anhand ihres Epigenoms unterscheiden lassen. Zudem lassen sich aus dem DNA-Methylierungsmuster zahlreiche weitere Informationen ableiten, die aus genetischen Analysen nicht zu entnehmen sind (■ Tab. 1).

Insbesondere bei Tumorerkrankungen treten umfangreiche, mit dem pathologischen Prozess assoziierte epigeneti-

sche Veränderungen auf, die mit dem Tumorphänotyp, der Entität oder dem Ansprechen auf Therapien korrelieren [25, 30]. Doch auch bei nicht malignen Erkrankungen wie beispielsweise bei Infektionen [51] und Autoimmunerkrankungen finden sich wiederkehrende Veränderungen epigenetischer Merkmale innerhalb des betroffenen Gewebes. Auch diese können sowohl von diagnostischem als auch prognostischem Wert sein [16, 25].

Da die DNA-Methylierungsmuster sowie die Expressionsmuster von RNA inklusive der ncRNA pathologisch veränderter Gewebe auch anhand von Liquid Biopsies analysierbar sind, eröffnen sich mit der epigenetischen Analyse dieser Nukleinsäuren aus dem peripheren Blut prinzipiell völlig neue Möglichkeiten für Diagnose, Prognose oder Vorsorge zahlreicher Erkrankungen aus den verschiedensten Formenkreisen. Auch wenn bislang nur wenige dieser Marker hinsichtlich der klinischen Verwendung

robust validiert wurden, ist das Potenzial der epigenetischen Biomarker aus Liquid Biopsies immens und ihre Bedeutung für die Weiterentwicklung der humangenetischen Diagnostik hoch.

In diesem Artikel möchten wir eine Übersicht geben, welche Möglichkeiten epigenetische Analysen von Liquid Biopsies bieten und eine Auswahl darstellen, in welchen Bereichen eine konkrete Anwendung bereits jetzt vorstellbar ist. Ein mögliches Vorgehen zur Entwicklung von epigenetischen Biomarkern und eine Auswahl deren Einsatzgebiete ist in ■ Abb. 1 dargestellt.

Epigenetische Merkmale, bestimmt aus Liquid biopsies: die Analyte

Aufgrund ihrer molekularen Eigenschaften sind nicht alle epigenetischen Merkmale aus Liquid Biopsies erfassbar. Während z. B. Alterationen im DNA-Methylierungsmuster auch an zellfreier

Tab. 1 Zusammenstellung von Applikationsbeispielen genetischer und epigenetischer Untersuchungen an cfDNA

Applikation	cfDNA	cfDNA-Methylierung
Mutationsnachweis	+	(+)
Gewebeherkunft der cfDNA	-	+
Marker bei nicht malignen (klonalen) Erkrankungen	-	+
Einfluss von Umweltfaktoren bei multifaktoriellen Erkrankungen (z. B. Rauchen)	(+)	+
Einfluss auf die Genregulation	(-)	+

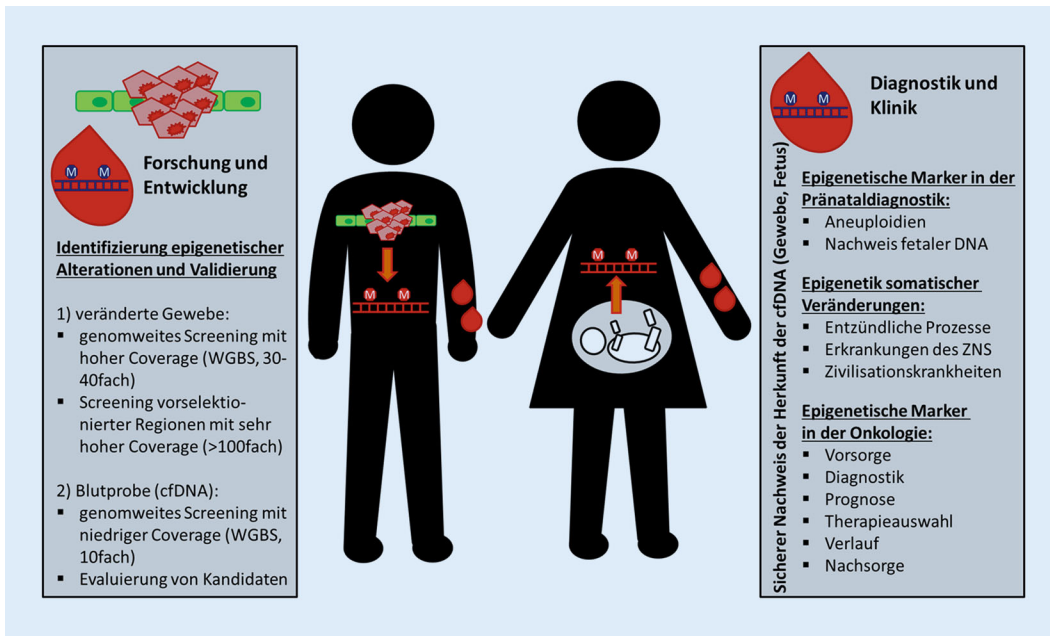


Abb. 1 ▲ Entwicklung und Einsatz epigenetischer Biomarker für die Analyse von Liquid Biopsies. Bei Gewebeveränderungen und malignen Erkrankungen werden Nukleinsäuren in den Blutstrom abgegeben. Dieses kann beispielsweise durch Exosomen oder den Zerfall von Zellen durch Apoptose oder Nekrose geschehen. Ebenso geht bei einer Schwangerschaft nach einem Zerfall fetaler Zellen DNA in den mütterlichen Kreislauf über. Nach einer Blutprobe können die zirkulierenden Nukleinsäuren isoliert und das DNA-Methylierungsmuster der cfDNA, das Splicingmuster vorhandener mRNAs sowie das Vorkommen von ncRNAs analysiert werden. Hier ist das Beispiel der DNA-Methylierung dargestellt. Es können sowohl einzelne ausgewählte Loci untersucht werden als auch komplette Methylome (dann meist mit geringer Abdeckung) durch einen whole genome bisulfite sequencing (WGBS) Ansatz erstellt werden. Um einen Biomarker zu entwickeln, bietet es sich an, diese Daten mit Analysen primärer Gewebe (z. B. aus einer Biopsie) zu ergänzen. Hier können die DNA-Methylome oder Teilmethylome auch mit einer signifikant höheren Abdeckung sequenziert werden. Alternativ bieten sich arraybasierte DNA-Methylierungsstudien an. Loci, die sowohl in den betroffenen Geweben als auch in der cfDNA der Patienten eine sicher nachweisbare aberrante DNA-Methylierung aufweisen, können als putative Biomarker in größeren Kollektiven validiert werden. Für eine Reihe von diagnostischen Zwecken sind bereits epigenetische Biomarker verfügbar, so zum Beispiel für die Pränataldiagnostik und eine Reihe benigner und maligner somatischer Veränderungen. Insbesondere in der Onkologie korrelieren definierte DNA-Methylierungsmuster mit der Prognose und dem Krankheitsverlauf

zirkulierender DNA (cfDNA) nachweisbar sind, können Veränderungen im Histonmodifikationsmuster oder der Lokalisation von Genen im Nukleus bestenfalls in intakten, im Blut zirkulierenden (Tumor-) Zellen untersucht werden [9]. Deshalb scheiden die letztgenannten epigenetischen Modifikationen derzeit für diagnostische Zwecke weitgehend aus. Prinzipiell lassen sich aber bereits jetzt die folgenden Merkmale für epigenetische Analysen nutzen:

Expressionsmuster von ncRNA

Insbesondere maligne Neoplasien gehen mit charakteristischen Veränderungen im Expressionsniveau von ncRNA einher. Die ncRNAs, aber auch mRNAs, werden in Exosomen aus den Tumorzellen ausgeschleust [18]. Dabei ist die Exocytose der ncRNAs keinesfalls zufällig, es

werden bevorzugt tumorigene ncRNAs exocytiert, während andere ncRNAs z. T. gar nicht betroffen sind [43, 45]. Die Gruppe der ncRNAs umfasst dabei ein sehr breites Spektrum verschiedener RNAs, u. a. miRNAs, snoRNA, piRNA oder lncRNAs [17, 23, 32, 45, 60].

Differentielles mRNA-Splicing

Alternatives oder aberrantes Splicing ist ein Charakteristikum insbesondere für maligne Erkrankungen, kann aber auch spezifisch für ein bestimmtes Gewebe sein. Wird eine davon betroffene RNA in die Blutbahn abgegeben, kann das aberrante Splicing z. B. durch eine Sequenzierung freier mRNA oder zirkulierender Tumorzellen detektiert werden. So ist aberrantes Splicing z. B. bei Patienten mit urogenitalen Tumoren oder mit Brustkrebs in Liquid Biopsies nachgewie-

sen worden. Im ersteren Falle wurde das Splicing der CAIX (carbonic anhydrase IX) mRNA als Biomarker im Urin vorgeschlagen [40], im zweiten Survivin im Serum [27].

Nachteile von RNA als Analyt sind deren geringere Stabilität sowie die gegenüber der Untersuchung von DNA etwas anspruchsvolleren Analyseverfahren. Demgegenüber steht der Vorteil, dass die mit RNA beladenen Exosomen die Blut-Hirn-Schranke passieren können [6, 9, 12] und somit auch Informationen aus Geweben des zentralen Nervensystems (ZNS) liefern können, was bei neurologischen Erkrankungen (z. B. M. Alzheimer) oder malignen Erkrankungen des ZNS (z. B. Glioblastom) bedeutsam ist. Dabei korrelierte das Auftreten spezifischer ncRNAs im Blut in verschiedenen Studien sowohl mit dem Stadium als auch dem Therapieanspre-

chen der Tumoren und der Prognose [18, 42].

DNA-Methylierung

Der epigenetische Marker, auf den wir uns im Folgenden in diesem Übersichtsartikel fokussieren werden, ist die DNA-Methylierung. Bei der DNA-Methylierung des Menschen handelt es sich um eine postreplikative Modifikation von Cytosinresten in der DNA am C5-Atom, die durch DNA-Methyltransferasen katalysiert wird [7, 28, 55]. Die Methylierung ist überwiegend auf Cytosine in CG-Dinukleotiden beschränkt (CpG-Methylierung). Es ist jedoch auch die Methylierung von Cytosinen in anderen Zusammenhängen beschrieben worden (non-CpG-Methylierung) [47, 50]. Die Untersuchung der DNA-Methylierung von cfDNA kann prinzipiell mit den gleichen Methoden durchgeführt werden, die bereits zur DNA-Methylierungsanalyse von genomischer DNA aus Geweben etabliert und auch für die klinische Anwendung zur Detektion von Biomarkern validiert sind [9, 15]. Die Methylierungsanalyse von cfDNA ist nicht ausschließlich auf Blut als Ausgangsmaterial beschränkt, auch im Urin wurden derartige Analysen durchgeführt [21]. Da cfDNA jedoch auch erfolgreich aus Stuhl, zerebrospinaler Flüssigkeit, Lavage, Amnion- oder Samenflüssigkeit isoliert wurde [10, 24, 34, 62, 63], ist zu erwarten, dass auch diese Materialien als Ausgangspunkt für entsprechende Methylierungsanalysen von freier DNA geeignet sind. Wie eingangs bereits erwähnt, ist das DNA-Methylierungsmuster hochgradig gewebespezifisch. Auch Differenzierungsgrade von Zellpopulationen lassen sich durch das DNA-Methylierungsmuster charakterisieren, wie wir neulich am Beispiel der B-Zell-Differenzierung im Rahmen des Internationalen Humanen Epigenom-Consortiums (IHEC; www.ihec.org) umfassend zeigen konnten [31]. Was sich auf den ersten Blick wegen der größeren Variationsbreite als Nachteil bei der Analyse und Dateninterpretation darstellt, kann auch ein großer Vorteil epigenetischer Biomarker im Vergleich zu rein genetischen Markern

medgen 2016 · 28:251–258 DOI 10.1007/s11825-016-0093-3
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

O. Ammerpohl · S. Scheufele · R. Siebert

Analysen epigenetischer Marker aus Liquid Biopsies: Informationen von jenseits des Genoms

Zusammenfassung

Die Analyse epigenetischer Marker aus Liquid Biopsies erlaubt Einblicke in physiologische und pathologische Prozesse im Körper einer Person, die über die reine Sequenzinformation hinausgehen. Insbesondere das DNA-Methylierungsmuster sowie die Expressionsmuster von mRNA und ncRNA sind aus Liquid Biopsies erfassbar. Damit werden ganze Gruppen neuer potenzieller Biomarker einer nicht invasiven und ökonomischen Diagnostik zugänglich. Darüber hinaus und im Gegensatz zur reinen DNA-Sequenzanalyse von Liquid Biopsies erlaubt die hohe Gewebespezifität epigenetischer Marker auch die Bestimmung der Herkunft

der analysierten Nucleinsäuren z. B. in Bezug auf ein betroffenes Organ. Angesichts der fallenden Kosten für Sequenzierungen und des technologischen Fortschritts, der die Nachweisgrenzen immer weiter zu immer sensitiveren Anwendungen verschiebt, könnten epigenetische Untersuchungen aus Liquid Biopsies den Trend zu einer Individualisierung in der Medizin weiter forcieren.

Schlüsselwörter

Liquid Biopsy · DNA-Methylierung · ncRNA · cfDNA · epigenetische Marker

Analyses of epigenetic markers in liquid biopsies: information from beyond the genome

Abstract

Analysis of epigenetic markers from liquid biopsies provides insights into physiological and pathological processes in the body of a person far beyond the pure sequence information. In particular, the DNA methylation pattern and the expression patterns of mRNA and ncRNA are accessible from liquid biopsies. Therefore, a whole group of new potential biomarkers will come into reach for non-invasive and economic diagnostics. Furthermore, and in contrast to the pure DNA sequence analysis from liquid biopsies, the high tissue specificity of several epigenetic

markers allows the origin of the nucleic acids analyzed, e.g. with regard to the affected organ, to be determined. In view of the falling costs of sequencing and the technological progress that continues to push the detection limits to even more sensitive application, epigenetic analyses from liquid biopsies could further enforce the trend toward precision medicine.

Keywords

Liquid biopsy · DNA methylation · ncRNA · cfDNA · epigenetic marker

sein. Damit ist es nämlich auch möglich, das Herkunftsgewebe von cfDNA zu bestimmen. Insbesondere, wenn das Ursprungsgewebe für die Interpretation der cfDNA-Analyseergebnisse von Bedeutung ist, sind cfDNA-Methylierungsanalysen im Vorteil. Basierend auf bekannten gewebespezifischen DNA-Methylierungsmustern ist es beispielsweise gelungen, bei Patienten mit einem kurz zuvor diagnostizierten Typ-1-Diabetes cfDNA nachzuweisen, die aus Beta-Zellen stammt. Diese cfDNA wurde wahrscheinlich im Rahmen der autoimmunologischen Destruktion dieser Zellen freigesetzt. Ebenso gelang, basierend auf der Gewebespezifität der

DNA-Methylierung, bei Patienten mit multipler Sklerose der Nachweis von cfDNA aus Oligodendrozyten, bei Traumatopatienten der Nachweis von cfDNA neuronalen bzw. glialen Ursprungs und bei Patienten mit einem malignen Pankreastumor oder einer Pankreatitis der Nachweis von cfDNA aus Zellen des exokrinen Pankreas [33].

Ein Kritikpunkt bei der Methylierungsanalyse von cfDNA ist die Möglichkeit, dass die Methylierung entweder die Stabilität der cfDNA im Blut beeinflusst und damit das relative Vorkommen methylierter DNA verändert oder das DNA-Methylierungsmuster von cfDNA im Blut modifiziert und somit das Ana-

lyseergebnis verfälscht wird. Angesichts der Tatsache, dass Proteine bekannt sind, die methylierte DNA relativ sequenzspezifisch binden, wäre so ein Szenario nicht auszuschließen. Diesen Kritikpunkten widersprechen jedoch Untersuchungen der cfDNA-Methylierung des *GNAS1*-Locus. Dieser Locus ist elterlich geprägt: Während das mütterliche Allel methyliert ist, ist das väterliche Allel unmethyliert. Puszyk et al. haben die Allele in der cfDNA nicht nur epigenetisch aufgrund des DNA-Methylierungsmusters, sondern auch genetisch mithilfe eines häufigen SNPs (rs1800905), für den einige der untersuchten Probanden heterozygot waren, differenziert. So konnten die Autoren zeigen, dass zwar verschiedene DNA-Sequenzen im Plasma nicht unbedingt gleich repräsentiert sind, dieses jedoch vom Methylierungsstatus der DNA unabhängig ist [52].

Neben der „klassischen“ 5-Methyl Cytosin-Methylierung existieren weitere DNA-Modifikationen (beispielsweise die 5-Hydroxymethyl Cytosin-Methylierung, [44]), denen in Zukunft eventuell ebenfalls eine Bedeutung in der Diagnostik zukommen könnte.

Epigenetische Untersuchungen aus Liquid Biopsies in der Pränataldiagnostik

In der Pränataldiagnostik hat die Untersuchung fetaler cfDNA im Rahmen der nicht invasiven pränatalen Testung (NIPT) bereits jetzt einen hohen klinischen Stellenwert [1]. Für die DNA-Methylierung von fetaler cfDNA im maternalen Blut existieren im Wesentlichen zwei unterschiedliche Anwendungen: Zum einen kann diese als Marker für die Herkunft der cfDNA dienen (z. B. maternal vs fetal oder spezifisch für das fetale Gewebe) [57, 46], zum anderen wurden DNA-Methylierungsmarker identifiziert, welche spezifisch für bestimmte fetale Chromosomenstörungen wie die Trisomie 21 sind. So wurde kürzlich im Rahmen einer Studie [20] das DNA-Methylierungsmuster von über 450.000 CpG-Loci in zehn mütterlichen Blutproben mit dem Muster von zwölf Ersttrimester-Chorionproben

verglichen. Nach ergänzenden Analysen mit anderen Verfahren wurde im Rahmen dieser Studie eine Liste von DNA-Methylierungsmarkern auf den Chromosomen 13, 18 und 21 für ein potenzielles Aneuploidie-Screening sowie für die Identifizierung von submikroskopischen Deletionen oder Duplikationen im fetalen Genom publiziert [20]. Mit den erhobenen Informationen kann die fetale cfDNA folglich anhand ihrer Methylierung sicher identifiziert werden.

Epigenetische Untersuchungen aus Liquid Biopsies bei nicht malignen Erkrankungen

Der Einsatz von Liquid Biopsies bei nicht malignen Erkrankungen ist insbesondere immer dann von Interesse, wenn der Zugang zu adäquatem Untersuchungsmaterial limitiert ist. Dieses gilt auch für Erkrankungen des zentralen Nervensystems, wie beispielsweise die multiple Sklerose. Hier hat die Gruppe um Liggett und Kollegen das DNA-Methylierungsmuster von 56 Promotoren an der cfDNA von Patienten mit multipler Sklerose im aktiven und remittierenden Stadium sowie gesunden Probanden verglichen und die drei Probandengruppen anhand der DNA-Methylierung mit verhältnismäßig hoher Sensitivität und Spezifität differenzieren können [36], ohne dass eine Gewebeprobe des zentralen Nervensystems zur Verfügung stand. Eine andere Studie untersuchte den Zusammenhang des DNA-Methylierungsniveaus von Genen des Immunsystems und dem Auftreten bzw. dem Ausmaß einer Anämie bei Diabetes-Patienten nach einer Hämodialyse. Dabei zeigte sich, dass bei Patienten mit hohem Methylierungsniveau der Gene *IL13RA1*, *IL15*, *EDG3* und *INHA* keine oder lediglich eine milde Therapie einer Anämie notwendig war [29]. Sowohl in der Studie von Liggett et al. als auch der Studie von Korabneca et al. [29] diente die DNA-Methylierung von cfDNA als Biomarker zur kurzzeitigen Verlaufsvorhersage bzw. Diagnose bei nicht malignen Erkrankungen.

Shamay et al. hingegen nutzten die DNA-Methylierung zur Charakterisierung zellfreier Kaposi-Sarkom Herpesvirus-DNA. Dabei verglichen die Autoren

den Gehalt viraler cfDNA in AIDS-Patienten mit einem Kaposi-Sarkom mit dem eines primären Effusions-Lymphoms (PEL). Während bei den Kaposi-Sarkom Patienten nur virale DNA nachweisbar war, konnte in einem Fall mit PEL auch DNA zellulären Ursprungs nachgewiesen werden [54]. In dieser Studie diente die DNA-Methylierung im Wesentlichen der Trennung von DNA zellulären (methyliert) und viralen (unmethyliert) Ursprungs durch Präzipitation mittels MBD (methylation domain binding domain) gekoppelter Beads.

Epigenetische Untersuchungen aus Liquid Biopsies bei malignen Tumorerkrankungen

Die meisten publizierten Studien zur DNA-Methylierungsanalyse aus Liquid Biopsies fokussieren auf den Nachweis, die Diagnose oder die Nachverfolgung malignen Tumoren. Hier stellen wir einige Studien dazu kurz vor.

Chan et al. haben die Eignung von cfDNA-Hypomethylierung als Tumormarker mittels hochparalleler shotgun Bisulfidsequenzierung untersucht [11]. Eine globale Hypomethylierung ist für viele Tumorentitäten beschrieben worden. Sie betrifft u. a. repetitive Elemente in der DNA, die im Normalfall vermehrt methyliert vorliegen [35, 58, 64]. Neben Kopienzahlveränderungen fanden die Autoren auch eine genomweite Hypomethylierung von cfDNA im Plasma von Patienten mit Leber-, Brust-, Lungen- und Nasopharynx- und endokrinen Tumoren sowie Sarkomen. Mit 93 Mio. reads pro Fall konnten die Tumoren anhand der DNA-Hypomethylierung mit einer Sensitivität von 74 % und einer Spezifität von 94 % nachgewiesen werden. Bei lediglich 10 Mio. reads pro Fall, was für ein diagnostisches Testverfahren ökonomischer ist, ergab sich eine Sensitivität von 68 % und einer Spezifität von unverändert 94 % [11]. Zudem zeigten die Autoren die Eignung der cfDNA-Hypomethylierung zur Detektierung einer MRD (minimal residual disease) nach Resektion eines hepatozellulären Karzinoms.

Tumoren des Verdauungstraktes

Um den prognostischen Wert der Methylierung des *SOX17* in cfDNA beim Magenkarzinom im operablen Stadium zu evaluieren, haben Balgkouranidou und Kollegen die cfDNA-Methylierung bei Tumorpatienten und gesunden Kontrollen an diesem Locus mittels MSP (methylation specific PCR) untersucht [3]. In einer weiteren Studie untersuchten die Autoren mit der gleichen Methode die Methylierung von cfDNA am *APC*-Promotor 1 A sowie am *RASSF1A*-Promotor [5]. Bei etwa 59 % der Tumorpatienten zeigte sich eine Methylierung des *SOX17*-Gens [3], bei etwa 84 % eine Methylierung des *APC*- und bei etwa 69 % die Methylierung des *RASSF1A*-Promotors. Dabei korrelierte der Nachweis von methylierter *SOX17*-cfDNA mit dem Differenzierungsstatus des Tumors sowie dem Gesamtüberleben der Patienten [3], wohingegen die DNA-Methylierung des *RASSF1A*-Promotors mit dem Nachweis von Tumorzellen in den Lymphknoten und die DNA-Methylierung des *APC*-Promotors mit erhöhten CEA- und CA-19-9-Werten sowie ebenfalls der Prognose [5] korrelierten.

In einer weiteren Studie, ebenfalls mittels MSP, analysierte das Autorenteam den cfDNA-Methylierungsstatus der *APC*- und *RASSF1A*-Gene bei Patienten mit einem operablen oder einem metastasierten kolorektalen Karzinom [41]. Bei ersteren Patienten konnte in 33 % eine Methylierung des *APC*- und in 25 % des *RASSF1A*-Gens nachgewiesen werden, beides korrelierte mit einem weiter fortgeschrittenen Stadium. Bei metastasierten Karzinomen waren diese Werte weiter erhöht. Eine fehlende DNA-Methylierung der benannten Gene korrelierte mit einer besseren Prognose.

In einer Studie von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom (HCC) konnte mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung von cfDNA gezeigt werden, dass die DNA-Methylierung am *INK4A*-Gen signifikant erhöht ist im Vergleich zu Patienten mit benignen Lebererkrankungen [22]. In einem breiteren Ansatz haben Zhao et al. MethylCap-Seq [8] genutzt, um das genomweite cfDNA-Methylierungsprofil von Patienten mit HCC, HBV-induzierter Leberzirrhose (LC), chronischer HBV (Hepatitis B, CBB) und gesunden Kontrollen zu untersuchen. In dieser Studie war die DNA-Methylierungsanalyse von drei Genen ausreichend, um CBB-Patienten von Patienten mit LC bzw. Patienten mit LC von HCC-Patienten zu unterscheiden [67]. Die Unterscheidung von entzündlichen Prozessen und Tumorstadien ist in der Klinik vielfach ein Problem, da entzündliche Veränderungen eine Vorstufe zur Tumorentstehung darstellen und beide Prozesse parallel vorliegen können. Daher sind eindeutige Differenzierungen von potenziellen Vorstufen und malignen Tumoren klinisch von großem Wert. Eine ähnliche Situation stellt die chronische Pankreatitis dar, die von einem Pankreaskarzinom abgegrenzt werden muss [49], was aufgrund ähnlicher Symptomatik klinisch schwierig sein kann. Liggett et al. ist es in einer Studie mit cfDNA von Patienten mit einem Pankreaskarzinom, einer Pankreatitis sowie gesunden Kontrollprobanden gelungen, acht Promotoren zu identifizieren, deren cfDNA-Methylierungsstatus zwischen Normalkontrollen und Patienten mit chronischer Pankreatitis bzw. zwischen chronischer Pankreatitis und Pankreaskarzinom differenziert [37]. Ähnlich konnten in einer arraybasierten Studie mit DNA aus Gewebe sowie cfDNA aus dem Serum von Patienten mit einem Adenokarzinom des Ösophagus, einem Barrett-Ösophagus sowie gesunden Kontrollen nicht nur Parallelen zwischen den Methylierungsmustern von Gewebe- und Serumproben aufgezeigt werden, es wurden auch 911 Loci identifiziert, deren Methylierung zwischen Ösophagus-Adenokarzinom und Kontrollen differenziert, 554 Loci, deren Methylierung Ösophagus-Adenokarzinom vom Barrett-Ösophagus differenziert und 56 Loci, deren Methylierung Barrett-Ösophagus und Kontrollen unterscheidet [65].

Diese Studien zeigen, dass DNA-Methylierungsanalysen von cfDNA nicht nur den Nachweis eines gastrointestinalen Tumors erlauben, sie ermöglichen auch Rückschlüsse auf das Stadium, die Metastasierung oder die Prognose.

Gynäkologische Tumoren

Das epitheliale Ovarialkarzinom ist nicht nur durch eine sehr hohe Letalität charakterisiert, es wird auch selten frühzeitig diagnostiziert [38, 66]. Entsprechend dringlich ist die Entwicklung neuer und sensitiver Diagnoseoptionen. In einer Studie von Zhang et al. wählten die Autoren sieben Kandidatengene aus, deren Methylierung in der cfDNA sie bei Ovarialkarzinom-Patientinnen mit unterschiedlichen Tumorstadien, Patientinnen mit benignen Ovarialtumoren und gesunden Kontrollen mittels multiplex MSP bestimmten. Selbst Ovarialtumoren im Stadium I konnten mit einer Sensitivität von 85 % und einer Spezifität von etwa 91 % identifiziert werden [66]. In einer weiteren Studie zum Ovarialkarzinom reichte die Bestimmung des DNA-Methylierungsstatus von drei Genen in der cfDNA der Patientinnen aus, um gutartige Veränderungen mit hoher Sensitivität zu detektieren. Dagegen reichte für die Differenzierung von Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom und einer benignen Veränderung bereits die Untersuchung zweier Gene in der cfDNA aus [38].

Auch zum Mammakarzinom sind bereits initiale Studien über Liquid Biopsies publiziert worden [13, 14, 39, 56]. So konnte gezeigt werden, dass die Methylierung des *CST6* Gens (cystatin E/M) im Plasma von Patientinnen mit einem Mammakarzinom signifikant erhöht ist gegenüber einer gesunden Kontrollkohorte [14].

Am Beispiel des Mammakarzinoms gingen Liggett et al. der Frage nach, ob sich das Methylierungsprofil der cfDNA nach der Entfernung des Primärtumors oder unter einer Therapie (in diesem Falle Tamoxifen) verändert. Dieses ist eine essenzielle Fragestellung, um die Nützlichkeit von Methylierungsanalysen von cfDNA im Rahmen von Nachkontrollen zu beurteilen. In der Studie wurden cfDNA-Proben von Patientinnen vor und nach einer operativen Entfernung des Tumors sowie unter einer anschließenden Tamoxifentherapie gesammelt. Insgesamt sieben der untersuchten Promotoren zeigten eine aberrante Methylierung in der cfDNA der Patientinnen vor

der OP, die sich nach Entfernung des Tumors jedoch dem Normalwert annäherte. Unter der anschließenden Tamoxifen-Therapie normalisierte sich das Methylierungsmuster weiter, lediglich die Methylierung eines der sieben Promotoren blieb aberrant [39]. Diese Studie zeigt somit, dass sich das Methylierungsmuster der cfDNA von Tumorpatienten unter Therapie verändert und auch mit der applizierten Therapie korrelieren kann.

Andere Tumoren

Klinisch sind Vorhersagen zur individuellen Prognose eines Tumorpatienten u. a. unter einer spezifischen Therapie interessant. Auch zu dieser Fragestellung existieren bereits Studien unter Verwendung von cfDNA. So konnte eine Studie von Peters et al. zur cfDNA-Methylierung bei Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom mittels quantitativer MSP zeigen, dass sowohl das progressionsfreie als auch das Gesamtüberleben der Patienten unter einer anti-VEGF-Therapie mit dem Methylierungsstatus des *CST6*- und des *LADI*-Gens (Ladinin 1) signifikant korreliert. Hier ist die Hypermethylierung mit einer schlechten Prognose assoziiert [48].

Balgkouranidou et al. konnten zeigen, dass das *BRMS1*-Gen (Breast-cancer metastasis suppressor gene 1) bei Patienten mit einem nicht kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) sowohl im Tumorgewebe als auch in der cfDNA signifikant hypermethyliert ist. In operablen NSCLC korrelierte eine geringe *BRMS1*-Methylierung im Plasma sowohl mit dem Gesamt- als auch dem progressionsfreien Überleben. Im fortgeschrittenen Stadium korrelierte eine geringe Methylierung jedoch auch mit einem längeren Gesamtüberleben [4].

In einer weiteren interessanten Studie zur Methylierung von cfDNA in Patienten mit COPD (chronisch obstruktive Lungenerkrankung), ILD (interstitielle Lungenerkrankungen) oder Bronchiolalkarzinom sowie normalen Kontrollen wurden 96 Marker durch eine hochparallele qPCR analysiert. Den Autoren gelang nicht nur die Differenzierung von Patienten mit und ohne Karzinom, sondern auch die anderen Erkrankungen konn-

ten untereinander und von den Kontrollen differenziert werden [61]. In eigenen, bislang unpublizierten Untersuchungen zum Lungenkarzinom konnten die Autoren in einem arraybasierten Ansatz etwa 900 in Tumoren hochsignifikant aberrant methylierte Loci identifizieren. Eine Ganzgenom-Bisulfit-Sequenzierung (WGBS) von cfDNA-Proben von Lungenkarzinompatienten identifizierte bei einer 15-fachen Abdeckung insgesamt 681 aberrant methylierte Gene. Ausgewählte Kandidaten beider Datensätze erlauben eine sichere Identifizierung von Tumorpatienten (Scheufele et al., in Vorbereitung). Diese Studien zeigen das Potenzial der Methylierungsanalyse von cfDNA am Beispiel des Bronchiolalkarzinoms.

Fazit für die Praxis

Betrachtet man die vorgestellten Arbeiten im Überblick, so fällt auf, dass diese sich sowohl im Umfang der analysierten Gene und Probenzahlen als auch den genutzten Technologien unterscheiden. Es kamen sowohl quantitative als auch qualitative Ansätze zum Tragen, wobei die Aussagekraft einiger Methoden zumindest mit Zurückhaltung zu beurteilen ist, da sie keine Quantifizierung erlauben [2]. Viele Arbeiten haben den Charakter einer Pilotstudie und die Ergebnisse bedürfen vor einem regelmäßigen klinischen Einsatz zumeist noch einer umfangreichen Validierung mit größeren Fallzahlen.

Eine weitere Schwierigkeit stellt die eingeschränkte Spezifität vieler beschriebener Veränderungen für definierte Erkrankungen oder Tumorentitäten dar. So ist beispielsweise eine veränderte Methylierung von *RASSF1A* in der cfDNA sowohl beim Magen-, beim kolorektalen als auch beim Ovarialkarzinom gefunden worden [5, 38, 41]. Aber auch im Blut von Schwangeren war die Methylierung von *RASSF1A* verändert [46], wengleich im letzten Fall eine Hypomethylierung beschrieben wurde. Eine aberrante Methylierung von *CST6* wurde sowohl beim Nieren- als auch beim Mammakarzinom gefunden [14, 48]. Hier ist die Entwicklung spezifischer klinischer Assays noch am Anfang und

entsprechende klinische Handlungsanweisungen müssen noch entwickelt werden. Dennoch zeigen die Studien einige für die Zukunft interessante Optionen auf, um den Patienten belastende und kostenintensive Untersuchungen zu ersparen, auch im Bereich der Vorsorge.

Auch wenn sicher noch viel Entwicklungsarbeit investiert werden muss, um das volle Potenzial epigenetischer Biomarker im Rahmen von Liquid Biopsies auszuschöpfen, so sind doch bereits jetzt für einige Analysen im Rahmen von (Krebs-) Vorsorgeuntersuchungen erste Tests auf epigenetischer Basis kommerziell verfügbar und in verschiedenen Ländern zugelassen. Hierzu gehören z. B. der Epi proColon-Assay, der eine aberrante Methylierung des *Septin9*-Gens (*SEPT9*) in der cfDNA als Marker für das kolorektale Karzinom analysiert, und der Epi proLung-Assay, der die aberrante Methylierung des *SHOX2*-Gens in der cfDNA als Marker für ein Bronchiolalkarzinom erfasst [26, 59].

Korrespondenzadresse

Prof. Dr. O. Ammerpohl

Institut für Humangenetik,
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Schwanenweg 24, 24105 Kiel, Deutschland
oammerpohl@medgen.uni-kiel.de

Funding. Eigene Untersuchungen der Autoren zu epigenetischen Biomarkern für Erkrankungen werden gefördert aus Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung, Fördernummern 82DZL001A5 und 82DZL00105 (Airway Research Center North (ARCN), German Center for Lung Research, DZL), 01KU1502A (RESET-AID) und 01KU1505G (ICGC-DE-Mining) sowie der Deutschen Forschungsgemeinschaft (AM343/2-3).

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. O. Ammerpohl, S. Scheufele und R. Siebert geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Dieser Beitrag beinhaltet keine von den Autoren durchgeführten Studien an Menschen oder Tieren.

Literatur

- Akolekar R, Beta J, Picciarelli G, Ogilvie C, D'Antonio F (2015) Procedure-related risk of miscarriage following amniocentesis and chorionic villus sampling: a systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 45(1):16–26. doi:10.1002/uog.14636
- Ammerpohl O, Martin-Subero JI, Richter J, Vater I, Siebert R (2009) Hunting for the 5th base: Techniques for analyzing DNA methylation. *Biochim Biophys Acta* 1790(9):847–862. doi:10.1016/j.bbagen.2009.02.001
- Balgkouranidou I, Karayiannakis A, Matthaïos D, Bolanaki H, Tripsianis G, Tentas AA, Lianidou E, Chatzaki E, Fiska A, Lambropoulou M, Kolios G, Kakolyris S (2013) Assessment of SOX17 DNA methylation in cell free DNA from patients with operable gastric cancer. Association with prognostic variables and survival. *Clin Chem Lab Med* 51(7):1505–1510. doi:10.1515/cclm-2012-0320
- Balgkouranidou I, Chimonidou M, Milaki G, Tsarouxa EG, Kakolyris S, Welch DR, Georgoulis V, Lianidou ES (2014) Breast cancer metastasis suppressor-1 promoter methylation in cell-free DNA provides prognostic information in non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 110(8):2054–2062. doi:10.1038/bjc.2014.104
- Balgkouranidou I, Matthaïos D, Karayiannakis A, Bolanaki H, Michailidis P, Xenidis N, Amaranthidis K, Chelis L, Trypsianis G, Chatzaki E, Lianidou ES, Kakolyris S (2015) Prognostic role of APC and RASSF1A promoter methylation status in cell free circulating DNA of operable gastric cancer patients. *Mutat Res* 778:46–51. doi:10.1016/j.mrfmmm.2015.05.002
- Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, Bartlett BR, Wang H, Lubner B, Alani RM, Antonarakis ES, Azad NS, Bardelli A, Brem H, Cameron JL, Lee CC, Fecher LA, Gallia GL, Gibbs P, Le D, Giuntoli RL, Goggins M, Hogarty MD, Holdhoff M, Hong SM, Jiao Y, Juhl HH, Kim JJ, Siravegna G, Laheru DA, Lauricella C, Lim M, Lipson EJ, Marie SK, Netto GJ, Oliner KS, Olivi A, Olsson L, Riggins GJ, Sartore-Bianchi A, Schmidt K, Shih I M, Oba-Shinjo SM, Siena S, Theodorou D, Tie J, Harkins TT, Veronese S, Wang TL, Weingart JD, Wolfgang CL, Wood LD, Xing D, Hruban RH, Wu J, Allen PJ, Schmidt CM, Choti MA, Velculescu VE, Kinzler KW, Vogelstein B, Papadopoulos N, Diaz LA Jr (2014) Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med* 6(224):224ra24. doi:10.1126/scitranslmed.3007094
- Brenner C, Fuks F (2006) DNA methyltransferases: facts, clues, mysteries. *Curr Top Microbiol Immunol* 301:45–66
- Brinkman AB, Simmer F, Ma K, Kaan A, Zhu J, Stunnenberg HG (2010) Whole-genome DNA methylation profiling using MethylCap-seq. *Methods* 52(3):232–236. doi:10.1016/j.ymeth.2010.06.012
- Cai X, Janku F, Zhan Q, Fan JB (2015) Accessing Genetic Information with Liquid Biopsies. *Trends Genet* 31(10):564–575. doi:10.1016/j.tig.2015.06.001
- Carstensen T, Schmidt B, Engel E, Jandrig B, Witt C, Fleischhacker M (2004) Detection of cell-free DNA in bronchial lavage fluid supernatants of patients with lung cancer. *Ann NY Acad Sci* 1022:202–210. doi:10.1196/annals.1318.031
- Chan KC, Jiang P, Chan CW, Sun K, Wong J, Hui EP, Chan SL, Chan WC, Hui DS, Ng SS, Chan HL, Wong CS, Ma BB, Chan AT, Lai PB, Sun H, Chiu RW, Lo YM (2013) Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(47):18761–18768. doi:10.1073/pnas.1313995110
- Cheng L, Doecke JD, Sharples RA, Villemagne VL, Fowler CJ, Rembach A, Martins RN, Rowe CC, Macaulay SL, Masters CL, Hill AF, Australian Imaging B, Lifestyle Research G (2015) Prognostic serum miRNA biomarkers associated with Alzheimer's disease shows concordance with neuropsychological and neuroimaging assessment. *Mol Psychiatry* 20(10):1188–1196. doi:10.1038/mp.2014.127
- Chimonidou M, Strati A, Malamos N, Georgoulis V, Lianidou ES (2013) SOX17 promoter methylation in circulating tumor cells and matched cell-free DNA isolated from plasma of patients with breast cancer. *Clin Chem* 59(1):270–279. doi:10.1373/clinchem.2012.191551
- Chimonidou M, Tzitzira A, Strati A, Sotiropoulou G, Sfikas C, Malamos N, Georgoulis V, Lianidou E (2013) CST6 promoter methylation in circulating cell-free DNA of breast cancer patients. *Clin Biochem* 46(3):235–240. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.09.015
- consortium B (2016) Quantitative comparison of DNA methylation assays for biomarker development and clinical applications. *Nat Biotechnol* 34(7):726–737. doi:10.1038/nbt.3605
- Dietrich D, Jung M, Puetzer S, Leisse A, Holmes EE, Meller S, Uhl B, Schatz P, Ivascu C, Kristiansen G (2013) Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant and malignant pleural effusions. *PLoS ONE* 8(12):e84225. doi:10.1371/journal.pone.0084225
- Ekstrom K, Valadi H, Sjostrand M, Malmhall C, Bossios A, Eldh M, Lotvall J (2012) Characterization of mRNA and microRNA in human mast cell-derived exosomes and their transfer to other mast cells and blood CD34 progenitor cells. *J Extracell Vesicles*. doi:10.3402/jev.v1i0.18389
- Endzelins E, Melne V, Kalnina Z, Lietuviets V, Riekstina U, Llorente A, Line A (2016) Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: a systematic review. *Mol Cancer* 15(1):41. doi:10.1186/s12943-016-0523-5
- Guasconi V, Souidi M, Ait-Si-Ali S (2005) Nuclear positioning, gene activity and cancer. *Cancer Biol Ther* 4(2):134–138
- Hatt L, Aagaard MM, Graakjaer J, Bach C, Sommer S, Agerholm IE, Kolvraa S, Bojesen A (2015) Microarray-based analysis of methylation status of CpGs in placental DNA and maternal blood DNA – potential new epigenetic biomarkers for cell free fetal DNA-based diagnosis. *PLoS ONE* 10(7):e0128918. doi:10.1371/journal.pone.0128918
- How Kit A, Nielsen HM, Tost J (2012) DNA methylation based biomarkers: practical considerations and applications. *Biochimie* 94(11):2314–2337. doi:10.1016/j.biochi.2012.07.014
- Huang G, Krockler JD, Kirk JL, Merwat SN, Ju H, Soloway RD, Wieck LR, Li A, Okorodudu AO, Petersen JR, Abdulla NE, Duchini A, Cicalese L, Rastellini C, Hu PC, Dong J (2014) Evaluation of INK4A promoter methylation using pyrosequencing and circulating cell-free DNA from patients with hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med* 52(6):899–909. doi:10.1515/cclm-2013-0885
- Huang X, Yuan T, Tschannen M, Sun Z, Jacob H, Du M, Liang M, Dittmar RL, Liu Y, Liang M, Kohli M, Thibodeau SN, Boardman L, Wang L (2013) Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics* 14:319. doi:10.1186/1471-2164-14-319
- Hui L, Bianchi DW (2011) Cell-free fetal nucleic acids in amniotic fluid. *Hum Reprod Update* 17(3):362–371. doi:10.1093/humupd/dmq049
- Jiang D, Hong Q, Shen Y, Xu Y, Zhu H, Li Y, Xu C, Ouyang G, Duan S (2014) The diagnostic value of DNA methylation in leukemia: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* 9(5):e96822. doi:10.1371/journal.pone.0096822
- Jung M, Putzer S, Gevensleben H, Meller S, Kristiansen G, Dietrich D (2016) Diagnostic and prognostic value of SHOX2 and SEPT9 DNA methylation and cytology in benign, paramalignant, and malignant ascites. *Clin Epigenetics* 8:24. doi:10.1186/s13148-016-0192-7
- Khan S, Bennis HF, Turay D, Perez M, Mirshahidi S, Yuan Y, Wall NR (2014) Early diagnostic value of survivin and its alternative splice variants in breast cancer. *BMC Cancer* 14:176. doi:10.1186/1471-2407-14-176
- Kirsanova OV, Cherepanova NA, Gromova ES (2009) Inhibition of C5-cytosine-DNA-methyltransferases. *Biochemistry (Mosc)* 74(11):1175–1186
- Korabecna M, Pazourkova E, Horinek A, Mokrejsova M, Tesar V (2013) Methylation status of immune response genes promoters in cell-free DNA differs in hemodialyzed patients with diabetic nephropathy according to the intensity of anemia therapy. *Blood Purif* 36(3–4):280–286. doi:10.1159/000356094
- Kretzmer H, Bernhart SH, Wang W, Haake A, Weniger MA, Bergmann AK, Betts MJ, Carrillo-de-Santa-Pau E, Dooze G, Gutwein J, Richter J, Hovestadt V, Huang B, Rico D, Juhlring F, Kolarova J, Lu Q, Otto C, Wagener R, Arnolds J, Burkhardt B, Claviez A, Drexler HG, Eberth S, Eils R, Flicek P, Haas S, Hummel M, Karsch D, Kerstens HH, Klapper W, Kreuz M, Lawrenz C, Lenze D, Loeffler M, Lopez C, MacLeod RA, Martens JH, Kulis M, Martin-Subero JI, Moller P, Nagel I, Picelli S, Vater I, Rohde M, Rosenstiel P, Rosolowski M, Russell RB, Schilhabel M, Schlessner M, Stadler PF, Szczepanowski M, Trummer L, Stunnenberg HG, project IM-S, project B, Kuppers R, Ammerpohl O, Lichter P, Siebert R, Hoffmann S, Radlwimmer B (2015) DNA methylation analysis in Burkitt and follicular lymphomas identifies differentially methylated regions linked to somatic mutation and transcriptional control. *Nat Genet* 47(11):1316–1325. doi:10.1038/ng.3413
- Kulis M, Merkel A, Heath S, Queiros AC, Schuyler RP, Castellano G, Beekman R, Raineri E, Esteve A, Clot G, Verdaguer-Dot N, Duran-Ferrer M, Russinon N, Vilarrasa-Blasi R, Ecker S, Pancaldi V, Rico D, Agueda L, Blanc J, Richardson D, Clarke L, Datta A, Pascual M, Agirre X, Prosper F, Alignani D, Paiva B, Caron G, Fest T, Muench MO, Fomin ME, Lee ST, Wiemels JL, Valencia A, Gut M, Flicek P, Stunnenberg HG, Siebert R, Kuppers R, Gut IG, Campo E, Martin-Subero JI (2015) Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat Genet* 47(7):746–756. doi:10.1038/ng.3291
- Lasser C, Alikhani VS, Ekstrom K, Eldh M, Paredes PT, Bossios A, Sjostrand M, Gabriellsson S, Lotvall J, Valadi H (2011) Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* 9:9. doi:10.1186/1479-5876-9-9
- Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheim J, Vaknin-Dembinsky A, Rubertsson S, Nellgard B, Blennow K, Zetterberg H, Spalding K,

- Haller MJ, Wasserfall CH, Schatz DA, Greenbaum CJ, Dorrell C, Grompe M, Zick A, Hubert A, Maoz M, Fendrich V, Bartsch DK, Golan T, Sasson BSA, Zamir G, Razin A, Cedar H, Shapiro AM, Glaser B, Shemer R, Dor Y (2016) Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 113(13):E1826–1834. doi:10.1073/pnas.1519286113
34. Li HG, Huang SY, Zhou H, Liao AH, Xiong CL (2009) Quick recovery and characterization of cell-free DNA in seminal plasma of normozoospermia and azoospermia: implications for non-invasive genetic utilities. *Asian J Androl* 11(6):703–709. doi:10.1038/aja.2009.65
35. Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, Zhu W, Zhang B (2014) The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. *PLoS ONE* 9(9):e106290. doi:10.1371/journal.pone.0106290
36. Liggett T, Melnikov A, Tilwalli S, Yi Q, Chen H, Replogle C, Feng X, Reder A, Stefowski D, Balabanov R, Levenson V (2010) Methylation patterns of cell-free plasma DNA in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 290(1–2):16–21. doi:10.1016/j.jns.2009.12.018
37. Liggett T, Melnikov A, Yi QL, Replogle C, Brand R, Kaul K, Talamonti M, Abrams RA, Levenson V (2010) Differential methylation of cell-free circulating DNA among patients with pancreatic cancer versus chronic pancreatitis. *Cancer* 116(7):1674–1680. doi:10.1002/cncr.24893
38. Liggett TE, Melnikov A, Yi Q, Replogle C, Hu W, Rotmensch J, Kamat A, Sood AK, Levenson V (2011) Distinctive DNA methylation patterns of cell-free plasma DNA in women with malignant ovarian tumors. *Gynecol Oncol* 120(1):113–120. doi:10.1016/j.ygyno.2010.09.019
39. Liggett TE, Melnikov AA, Marks JR, Levenson VV (2011) Methylation patterns in cell-free plasma DNA reflect removal of the primary tumor and drug treatment of breast cancer patients. *Int J Cancer* 128(2):492–499. doi:10.1002/ijc.25363
40. Malentacchi F, Vinci S, Melina AD, Kuncova J, Villari D, Nesi G, Selli C, Orlando C, Pazzagli M, Pinzani P (2016) Urinary carbonic anhydrase IX splicing messenger RNA variants in urogenital cancers. *Urol Oncol* 34(7):292 e299–292 e216. doi:10.1016/j.urolonc.2016.02.017
41. Matthaïos D, Balgkouranidou I, Karayiannakis A, Bolanaki H, Xenidis N, Amarantidis K, Chelis L, Romanidis K, Chatzaki A, Lianidou E, Trypsianis G, Kakolyris S (2016) Methylation status of the APC and RASSF1A promoter in cell-free circulating DNA and its prognostic role in patients with colorectal cancer. *Oncol Lett* 12(1):748–756. doi:10.3892/ol.2016.4649
42. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanian EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(30):10513–10518. doi:10.1073/pnas.0804549105
43. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, Bernad A, Sanchez-Madrid F (2011) Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2:282. doi:10.1038/ncomms1285
44. Nestor CE, Reddington JP, Benson M, Meehan RR (2014) Investigating 5-hydroxymethylcytosine (5hmC): the state of the art. *Methods Mol Biol* 1094:243–258. doi:10.1007/978-1-62703-706-8_19
45. Nolte-t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, t Hoen PA (2012) Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res* 40(18):9272–9285. doi:10.1093/nar/gks658
46. Oever JM van den, Balkassmi S, Segboer T, Verweij EJ, van der Velden PA, Oepkes D, Bakker E, Boon EM (2013) Mrassf1a-pap, a novel methylation-based assay for the detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma. *PLoS ONE* 8(12):e84051. doi:10.1371/journal.pone.0084051
47. Patil V, Ward RL, Hesson LB (2014) The evidence for functional non-CpG methylation in mammalian cells. *Epigenetics* 9(6):823–828. doi:10.4161/epi.28741
48. Peters I, Dubrowskaja N, Abbas M, Seidel C, Kogosov M, Scherer R, Gebauer K, Merseburger AS, Kuczyk MA, Grunwald V, Serth J (2014) DNA methylation biomarkers predict progression-free and overall survival of metastatic renal cell cancer (mRCC) treated with antiangiogenic therapies. *PLoS ONE* 9(3):e91440. doi:10.1371/journal.pone.0091440
49. Pilarsky C, Ammerpohl O, Sipos B, Dahl E, Hartmann A, Wellmann A, Braunschweig T, Lohr M, Jesenofsky R, Friess H, Wente MN, Kristiansen G, Jahnke B, Denz A, Ruckert F, Schackert HK, Kloppel G, Kalthoff H, Saeger HD, Grutzmann R (2008) Activation of Wnt signalling in stroma from pancreatic cancer identified by gene expression profiling. *J Cell Mol Med* 12(6B):2823–2835. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00289.x
50. Pinney SE (2014) Mammalian non-CpG methylation: stem cells and beyond. *Biology (Basel)* 3(4):739–751. doi:10.3390/biology3040739
51. Pion M, Jaramillo-Ruiz D, Martinez A, Munoz-Fernandez MA, Correa-Rocha R (2013) HIV infection of human regulatory T cells downregulates Foxp3 expression by increasing DNMT3b levels and DNA methylation in the FOXP3 gene. *AIDS* 27(13):2019–2029. doi:10.1097/QAD.0b013e32836253fd
52. Puzzyk WM, Chatha K, Elsenheimer S, Crea F, Old RW (2009) Methylation of the imprinted GNAS1 gene in cell-free plasma DNA: equal steady-state quantities of methylated and unmethylated DNA in plasma. *Clin Chim Acta* 400(1–2):107–110. doi:10.1016/j.cca.unhbox(voidb@x.penalty)@M.2008.10.018
53. Romani M, Pistillo MP, Banelli B (2015) Environmental Epigenetics: Crossroad between Public Health, Lifestyle, and Cancer Prevention. *Biomed Res Int* 2015:587983. doi:10.1155/2015/587983
54. Shamay M, Hand N, Lemas MV, Koon HB, Krown SE, Wrangle J, Desai P, Ramos JC, Ambinder RF (2012) CpG methylation as a tool to characterize cell-free Kaposi sarcoma herpesvirus DNA. *J Infect Dis* 205(7):1095–1099. doi:10.1093/infdis/jis032
55. Siedlecki P, Zielenkiewicz P (2006) Mammalian DNA methyltransferases. *Acta Biochim Pol* 53(2):245–256
56. Skvortsova TE, Rykova EY, Tamkovich SN, Bryzgunova OE, Starikov AV, Kuznetsova NP, Vlassov VV, Laktionov PP (2006) Cell-free and cell-bound circulating DNA in breast tumours: DNA quantification and analysis of tumour-related gene methylation. *Br J Cancer* 94(10):1492–1495. doi:10.1038/sj.bjc.6603117
57. Sun K, Jiang P, Chan KC, Wong J, Cheng YK, Liang RH, Chan WK, Ma ES, Chan SL, Cheng SH, Chan RW, Tong YK, Ng SS, Wong RS, Hui DS, Leung TN, Leung TY, Lai PB, Chiu RW, Lo YM (2015) Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(40):E5503–5512. doi:10.1073/pnas.1508736112
58. Torano EG, Petrus S, Fernandez AF, Fraga MF (2012) Global DNA hypomethylation in cancer: review of validated methods and clinical significance. *Clin Chem Lab Med* 50(10):1733–1742. doi:10.1515/ccim-2011-0902
59. Tost J (2015) DNA methylation signatures in circulating cell-free DNA for the monitoring of at-risk populations progressing to lung cancer. *EBioMedicine* 2(8):798–799. doi:10.1016/j.ebiom.2015.08.015
60. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9(6):654–659. doi:10.1038/ncb1596
61. Wielscher M, Vierlinger K, Kegler U, Ziesche R, Gsur A, Weinhausel A (2015) Diagnostic performance of plasma DNA methylation profiles in lung cancer, pulmonary fibrosis and COPD. *EBioMedicine* 2(8):929–936. doi:10.1016/j.ebiom.2015.06.025
62. Yao K, Honarmand S, Espinosa A, Akhyani N, Glaser C, Jacobson S (2009) Detection of human herpesvirus-6 in cerebrospinal fluid of patients with encephalitis. *Ann Neurol* 65(3):257–267. doi:10.1002/ana.21611
63. Zancan M, Galdi F, Di Tonno F, Mazzariol C, Orlando C, Malentacchi F, Agostini M, Maran M, Del Bianco P, Fabricio AS, Murer B, Pianon C, Gion M (2009) Evaluation of cell-free DNA in urine as a marker for bladder cancer diagnosis. *Int J Biol Markers* 24(3):147–155
64. Zelic R, Fiano V, Grasso C, Zugna D, Pettersson A, Gillio-Tos A, Merletti F, Richiardi L (2015) Global DNA hypomethylation in prostate cancer development and progression: a systematic review. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 18(1):1–12. doi:10.1038/pcan.2014.45
65. Zhai R, Zhao Y, Su L, Cassidy L, Liu G, Christiani DC (2012) Genome-wide DNA methylation profiling of cell-free serum DNA in esophageal adenocarcinoma and Barrett esophagus. *Neoplasia* 14(1):29–33
66. Zhang Q, Hu G, Yang Q, Dong R, Xie X, Ma D, Shen K, Kong B (2013) A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA. *Gynecol Oncol* 130(1):132–139. doi:10.1016/j.ygyno.2013.04.048
67. Zhao Y, Xue F, Sun J, Guo S, Zhang H, Qiu B, Geng J, Gu J, Zhou X, Wang W, Zhang Z, Tang N, He Y, Yu J, Xia Q (2014) Genome-wide methylation profiling of the different stages of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma development in plasma cell-free DNA reveals potential biomarkers for early detection and high-risk monitoring of hepatocellular carcinoma. *Clin Epigenetics* 6(1):30. doi:10.1186/1868-7083-6-30