



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Bestimmung des Methylierungsgrades
Brustkrebs-relevanter Tumorsuppressorgene *in vitro* und
in vivo mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse“

verfasst von

Anna Raab

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 190 423 445
Studienrichtung lt. Studienblatt: Lehramtsstudium UF Chemie UF Biologie und Umweltkunde
Betreut von: Ao. Univ. Prof. Dr. Margit Cichna-Markl

DANKSAGUNG

Zunächst danke ich Ao. Univ. Prof. Dr. Margit Cichna-Markl ganz herzlich für die interessante Themenstellung und die hervorragende und umfassende Betreuung während der praktischen Arbeiten im Labor und der Erstellung der vorliegenden Diplomarbeit.

Ein Dankeschön gilt der gesamten Arbeitsgruppe für die Unterstützung und Hilfe, vor allem aber auch für die netten gemeinsamen Stunden.

Bei Ass. Prof. Dr. Georg Pfeiler von der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie der Medizinischen Universität Wien bedanke ich mich für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen. Ferner danke ich der Arbeitsgruppe des Instituts für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien für die Zurverfügungstellung der Räumlichkeiten und Geräte zur Durchführung der Zellexperimente.

Der größte Dank gilt abschließend meinen Eltern, die mich während der gesamten Studienzeit unterstützt und mir alle Möglichkeiten eröffnet haben, mich in meiner Ausbildung zu entfalten. Auch bei meinem Freund Dominik möchte ich mich bedanken, er ist mir zu jeder Zeit zur Seite gestanden und hat mich ermutigt.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 ENTWICKLUNG VON KREBS	1
1.1.1 Brustkrebs.....	2
1.1.2 Kanzerogenese und Eigenschaften von Krebszellen	2
1.2 EPIGENETIK	4
1.2.1 Epigenetische Modifikationen.....	4
1.2.2 DNA-Methylierung.....	5
1.3 DNA-METHYLIERUNG UND KREBS	7
1.3.1 Globale Hypomethylierung	8
1.3.2 Regionale Hypermethylierung.....	8
1.3.3 DNA-Methylierung als Biomarker	9
1.3.4 Heterogene Methylierung bei Krebs.....	10
1.4 TUMORSUPPRESSORGENE	11
1.4.1 RASSF1A.....	11
1.4.2 CDKN2A	12
1.4.3 DAPK1	13
1.4.4 APC	13
1.5 EINFLUSS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN AUF DIE METHYLIERUNG	14
1.5.1 5-Aza-2'-Desoxycytidin.....	14
1.5.2 Bisphenol A.....	15
1.5.3 Genistein und Daidzein.....	17
1.5.4 Curcumin	18
1.5.5 Parthenolid	19
1.6 PROBENMATERIAL.....	20
1.6.1 MCF-7 Zellen.....	20
1.6.2 Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen	20
2. ZIELSETZUNG	21
3. THEORETISCHER HINTERGRUND.....	22
3.1 DIE POLYMERASE KETTENREAKTION	22
3.1.1 Ablauf einer PCR.....	22

3.1.2	Reagenzien	25
3.1.3	Real-Time PCR	27
3.2	BISULFIT KONVERTIERUNG.....	28
3.2.1	Prinzip.....	28
3.2.2	Durchführung	29
3.3	METHYLIERUNGS-SENSITIVE HOCHAUFLÖSENDE SCHMELZKURVENANALYSE	30
3.3.1	Prinzip.....	30
3.3.2	Detektion.....	31
3.3.3	Analyse der Schmelzkurven.....	32
3.4	ENTWERFEN VON PRIMERN	36
3.4.1	Allgemeine Regeln.....	36
3.4.2	Entwerfen von Primern für eine MS-HRM Analyse.....	37
3.4.3	Optimierungsparameter.....	38
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
4.1	VERSUCHE ZUR ENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG VON MS-HRM METHODEN FÜR AUSGWÄHLTE GENE	40
4.1.1	RASSF1A.....	40
4.1.2	GATA3.....	51
4.1.3	GSTP1.....	56
4.1.4	TWIST.....	59
4.1.5	RAR β	60
4.2	ANWENDUNG VON MS-HRM METHODEN	61
4.3	BESTIMMUNG DES DNA-METHYLIERUNGSGRADES BRUSTKREBS-RELEVANTER TUMORSUPPRESSORGENE IN MCF-7 ZELLEN.....	61
4.3.1	5-Aza-2'-Desoxycytidin.....	62
4.3.2	Bisphenol A.....	67
4.3.3	Genistein und Daidzein.....	69
4.3.4	Curcumin	73
4.3.5	Parthenolid.....	77
4.4	BESTIMMUNG DER DNA-METHYLIERUNG VON TUMORSUPPRESSORGENEN IN BIOPSIEPROBEN.....	81
4.4.1	RASSF1A.....	82
4.4.2	CDKN2A	83
4.4.3	DAPK1.....	83
4.4.4	APC	84

4.4.5	Diskussion.....	85
4.4.6	Biologische Varianz.....	85
5.	EXPERIMENTELLER TEIL.....	86
5.1	ENTWERFEN UND ÜBERPRÜFUNG VON PRIMERN.....	86
5.1.1	Entwerfen von Primern mit der Methyl Primer Express Software.....	86
5.1.2	Überprüfung der entworfenen Primer.....	88
5.2	ZELLKULTUR UND INKUBATIONSEXPERIMENTE MIT MCF-7 ZELLEN	88
5.2.1	Arbeiten unter der sterilen Werkbank	88
5.2.2	MCF-7 Zellkultur	89
5.2.3	Subkultur	89
5.2.4	Vitalitätstest und Bestimmung der Zellzahl	91
5.2.5	Inkubationsversuche	93
5.3	ISOLIERUNG DER DNA.....	95
5.3.1	Durchführung bei MCF-7 Zellen	95
5.3.2	Durchführung bei Gewebeproben	96
5.3.3	Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der DNA.....	98
5.4	BISULFIT-KONVERTIERUNG	98
5.4.1	Durchführung	99
5.4.2	Aufreinigung der bisulfit-konvertierten DNA	100
5.5	DURCHFÜHRUNG DER PCR.....	101
5.5.1	DNA-Standards	101
5.5.2	PCR und hochauflösende-Schmelzkurvenanalyse.....	101
5.6	DATENAUSWERTUNG	107
5.6.1	Ausreißertest nach Nalimov	108
5.6.2	Signifikanztests: Student t-Test und Mann-Whitney Rangsummentest	109
5.7	CHEMIKALIEN	110
5.8	VERWENDETE KITS.....	110
5.9	ZELLKULTURBEDARF	110
5.10	GERÄTE	111
6.	ZUSAMMENFASSUNG	I
	Abstract (deutsch)	I
	Abstract (english)	II
7.	ANHANG	IV
	Abkürzungsverzeichnis.....	IV

Rohdaten	VI
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XVII
Formelverzeichnis.....	XVIII
Curriculum Vitae.....	XIX
Literaturverzeichnis	XX

1. EINLEITUNG

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit, allein in Österreich sind jährlich etwa 38000 Menschen von einer Neuerkrankung und den damit verbundenen Folgen betroffen [1, 2]. Die Ursachen für eine Krebserkrankung können sehr vielfältig sein. Neben äußeren Einflüssen, wie UV-Strahlung, Luftverschmutzung und chemischen Schadstoffen, spielen auch innere Faktoren eine wesentliche Rolle. Hierzu zählen vor allem die genetische Veranlagung, das Geschlecht und das Alter eines Menschen, aber auch Defekte des Immunsystems und mögliche Vorerkrankungen [3]. Die Lebensführung darf als Krebsrisikofaktor nicht unterschätzt werden. So erhöhen Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, ungesunde Ernährung mit wenig Obst und Gemüse, ein hoher Bodymaß-Index und geringe körperliche Aktivität die Wahrscheinlichkeit, an Krebs zu erkranken. Die individuellen Unterschiede und die Vielzahl an Umwelteinflüssen, denen Menschen ausgesetzt sind, machen es unmöglich, alle Risikofaktoren zu umgehen. Die Krebsmortalität kann nur dann reduziert werden, wenn Krebserkrankungen möglichst früh erkannt und behandelt werden [1]. Somit sind ein Verständnis über die Entstehung von Krebs und die Erforschung von genetischen und epigenetischen Ursachen von zentraler Bedeutung.

1.1 ENTWICKLUNG VON KREBS

Jährlich erkranken weltweit in etwa 12,7 Millionen Menschen an Krebs, davon sterben 7,6 Millionen an den Folgen der Erkrankung. Brustkrebs ist bei Frauen die am häufigsten auftretende Krebsart, bei Männern ist es Lungenkrebs. Beide Karzinomarten sind beim jeweiligen Geschlecht für die meisten krebsbedingten Todesfälle verantwortlich. In ökonomisch weiterentwickelten Ländern ist Prostatakrebs der häufigste Tumortyp bei Männern, gefolgt wird dieser von Dickdarm-, Magen- und Leberkrebs. Frauen weisen bei Dickdarm-, Gebärmutterhals- sowie Lungentumoren weltweit betrachtet erhöhte Erkrankungszahlen auf (Abbildung 1) [4].

Einleitung

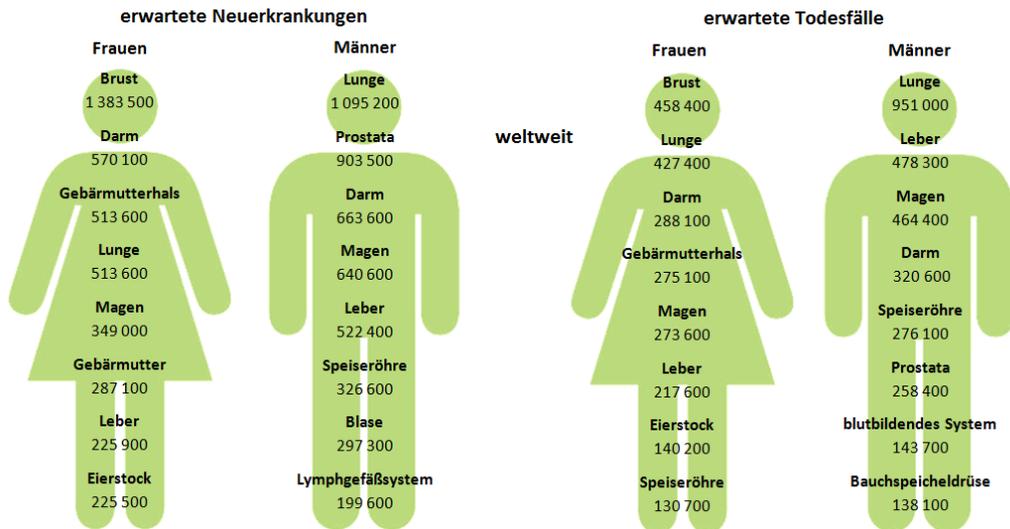


Abbildung 1: Erwartete Neuerkrankungen und Todesfälle für die häufigsten Tumorerkrankungen bei Frauen und Männern für das Jahr 2008; nach [4]

1.1.1 Brustkrebs

Brustkrebs ist die weltweit am häufigsten diagnostizierte Krebsart bei Frauen und trägt zu den meisten krebsbedingten Todesfällen bei. 2008 entfielen 23 % aller Neuerkrankungen bei weiblichen Personen auf diesen Tumortyp und führten bei 14 % der Patientinnen zum Tod. Das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, wird durch eine lange menstruale Lebensphase, postmenopausale Hormontherapien, sowie die Einnahme oraler Kontrazeptiva erhöht. Aber auch kinderlose Frauen oder jene, die erst in hohem Lebensalter Kinder gebären, erkranken mit größerer Wahrscheinlichkeit an Krebs. Zusätzlich darf der Konsum von Alkohol als Risikofaktor nicht außer Acht gelassen werden [4].

Um das Risiko einer Brustkrebserkrankung zu verringern, sind ein „gesundes“ Körpergewicht verbunden mit physischer Aktivität, sowie ein mäßiger Alkoholkonsum wichtig. Eine regelmäßige Untersuchung der Brust durch Abtasten und mittels Mammografie hilft bei einer zeitigen Bestimmung möglicher Veränderungen. Je früher Krebs diagnostiziert wird, desto vielfältiger sind die Behandlungsmethoden und die Überlebenschancen der jeweiligen Patientin steigen [4].

1.1.2 Kanzerogenese und Eigenschaften von Krebszellen

Krebs ist eine komplexe Erkrankung - einerseits treten einzelne Tumortypen zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten des Menschen auf und unterscheiden sich in der Wachstumsgeschwindigkeit, andererseits variieren die zelluläre Differenzierung und Invasivität, sowie die Fähigkeit zur Bildung von Metastasen zwischen den verschiedenen Krebsarten. Nach

Einleitung

diesen Eigenschaften richten sich sowohl die Art der Behandlung als auch die Prognose für eine mögliche Heilung [5].

Unter Kanzerogenese wird jener Vorgang verstanden, bei dem sich aus einer gesunden Körperzelle in einer Abfolge mehrerer komplexer Ereignisse eine Krebszelle entwickelt. Grundsätzlich kann der Prozess der Kanzerogenese in drei Phasen eingeteilt werden [3, 5]:

- **Initiation:** durch Änderungen in der Genexpression (z.B. durch Mutationen oder DNA-Methylierung) einzelner Gene entwickelt sich aus einer gesunden Körperzelle eine Krebszelle
- **Tumorpromotion:** die Proliferation der initiierten Zelle und die Bildung gutartiger (benigner) Tumore wird gefördert
- **Tumorprogression:** eine Anhäufung weiterer genetischer Schäden bewirkt eine Weiterentwicklung der initiierten Zellen oder der gutartigen Tumore zu bösartigen (malignen) Karzinomen.

Bei Krebs handelt es sich um ein abnormales Wachstum von Zellen, welches auf mehrere Veränderungen in der Genexpression zurückzuführen ist. Betroffen sind dabei vor allem Onkogene und Tumorsuppressorgene, die für Proteine des regulatorischen Kreislaufs der Zelle kodieren. Die Schädigung oder Inaktivierung dieser Gene kann zur Bildung veränderter Proteinstrukturen oder zu einem abweichenden Proteingehalt in der Zelle führen und somit eine Dysregulation des Zellwachstums und der Differenzierung bewirken. Damit wird ein gestörtes Gleichgewicht zwischen dem Wachstum und dem Tod von Zellen hervorgerufen. Weiters wird die Bildung einer Zellpopulation gefördert, die in umliegendes Gewebe eindringen und in entfernten Stellen metastasieren kann [3, 5].

Mutationen sind nicht die einzige vererbare Möglichkeit zur Inaktivierung oder Aktivierung von Schlüsselgenen. Epigenetische Modifikationen der DNA bewirken ebenfalls eine abnormale Genexpression, ohne dabei jedoch eine Veränderung der DNA-Sequenz hervorzurufen [6].

Mutationen und epigenetische Modifikationen tragen letztlich zu einer Änderung der Zellphysiologie bei, die sich durch sechs wesentliche Merkmale auszeichnet [6, 7]:

- Unsterblichkeit der Zelle: kontinuierliche Zellteilung und nicht endende Replikation
- Resistenz gegenüber der Apoptose
- Produktion von Wachstumsfaktoren durch Onkogene
- Immunität gegenüber Wachstumsinhibitoren von Tumorsuppressorgenen
- Fähigkeit zur Angiogenese (Anregung zur Bildung von Blutgefäßen)
- Fähigkeit zur Bildung von Metastasen

1.2 EPIGENETIK

Der Ausdruck Epigenetik wurde erstmals von Conrad Hal Waddington im Jahr 1942 geprägt. Er beschreibt die Epigenetik als Mischung der beiden Begriffe Genetik und Epigenese und fasst damit alle entwicklungsgemäßen Vorgänge zusammen, die von einer befruchteten Zygote bis zum erwachsenen Organismus durchlaufen werden [8]. Das richtige Verständnis des Begriffs Epigenetik und dessen Verwendung hat sich im Laufe der Zeit entwickelt. Tost beschrieb 2009 die Epigenetik als das Studium von erblichen Veränderungen des Phänotyps, welche nicht auf eine Änderung der Nukleotidsequenz im genetischen Code zurückzuführen sind. Die epigenetische Vererbung ermöglicht eine mitotische, in manchen Fällen auch meiotische Übertragung der nicht im genetischen Code verankerten Information von der Mutter- auf die Tochterzelle, also von Generation zu Generation [8, 9].

Alle Zellen eines multizellulären Organismus tragen das gleiche genetische Material, zeigen aber ein breites Spektrum morphologischer und funktioneller Diversität. Diese Heterogenität wird unter anderem durch unterschiedliche Expression einer Vielzahl von Genen erreicht [9].

1.2.1 Epigenetische Modifikationen

Das menschliche Genom enthält zwei Formen von Information, die genetische und die epigenetische. Die genetische Information liefert die Baupläne für die Produktion von Proteinen, die für eine lebende Zelle in bestimmten Stadien notwendig sind. Die epigenetische Information hingegen gibt vor, wo und wann die genetische Information genutzt werden soll. Durch epigenetische Veränderungen können Gene „ein-“ bzw. „ausgeschaltet“ werden. Damit sind die Transkription und Bildung von Genprodukten möglich oder werden durch „Stilllegung“ des Gens verhindert [10].

Unter dem Begriff epigenetische Modifikationen wird eine Vielzahl von molekularen Mechanismen verstanden. Die am häufigsten auftretenden sind [9]:

- DNA-Methylierung
- post-transkriptionale Histonmodifikationen
- Histonvarianten
- ATP-abhängiger Chromatinumbau
- kleine und andere nicht-kodierende RNAs

Diese unterschiedlichen molekularen Mechanismen sind eng miteinander verflochten und sichern die Weitergabe der epigenetischen Information während der Zellteilung. Auch wenn epigenetische Modifikationen bei vielen zellbiologischen Prozessen eine Rolle spielen, sind sie nicht endgültig und

können sich mit dem Alter des Menschen, wie auch durch Umwelteinflüsse verändern. Die Forschungsergebnisse des letzten Jahrzehnts zeigen deutlich, dass die Epigenetik einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung von Krebs und anderen Erkrankungen hat [9, 11].

1.2.2 DNA-Methylierung

Die wichtigste epigenetische Modifikation im Säugetiergenom ist die DNA-Methylierung. Eine „Stilllegung“ von Genen dient der Erhaltung gewebes- und entwicklungsspezifischer Genexpressionsmuster, die sich im Verlauf des Lebens eines Individuums ausbilden und trägt so zur Dosiskompensation von Genprodukten bei [9-11].

Die DNA-Methylierung spielt eine bedeutende Rolle bei der Unterdrückung der Transkription, der X-Chromosom-Inaktivierung, der genomischen Prägung und bei der Suppression schädlicher Effekte durch sich wiederholende DNA-Sequenzen und parasitische DNA. Zusätzlich ist sie an der DNA-Reparatur beteiligt und sorgt für die Stabilität des Genoms und die Ausbildung der Chromatinstruktur [10].

Bei der DNA-Methylierung im Säugetiergenom wird eine Methylgruppe an die 5'-Position des Pyrimidinrings eines Cytosins (C) gebunden. C kann nur dann methyliert werden, wenn direkt darauf ein Guanin (G) folgt, man spricht von einem Cytosin-Phosphat-Guanin-Dinukleotid (CpG-Dinukleotid) [10]. In menschlichen Körperzellen macht 5-Methylcytosin 1 % der Basen des Genoms aus und liegt somit bei etwa 70-80 % der enthaltenen CpG-Dinukleotide vor [12]. CpG-Dinukleotide kommen im Genom vergleichsweise selten vor, ein möglicher Grund für diese Unterrepräsentation ist eine spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin unter Bildung von Thymin (T) [9]. Entgegen diesem Trend finden sich in den Promotorregionen und ersten Exons von 60-70 % aller menschlichen Gene GC-reiche Cluster. Diese so genannten CpG-Inseln weisen eine ungefähre Länge von 1000-4000 Basen und einen GC-Gehalt von mehr als 50 % auf. Insgesamt sind im menschlichen Genom etwa 30000 solcher Cluster verteilt. Dreiviertel aller Transkriptionsstartstellen und 88 % der aktiven Promotoren weisen CpG-Inseln auf und werden durch DNA-Methylierung reguliert [9, 13].

Es ist anzumerken, dass eine unmethylierte CpG-Insel nicht zwangsläufig zu einer Transkriptionsaktivität des Gens führt. Eine Methylierung muss ebenso keine Stilllegung naheliegender Gene bewirken, vielmehr ist eine Hypermethylierung einer spezifischen Kernregion des Promotors, welche die Startstelle für die Transkription beinhaltet, mit einer Modulation der Genexpression verknüpft. Der Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide dieser Promotorregion hängt stärker mit der Expression eines Gens zusammen, als die Methylierung der gesamten CpG-Insel [9].

1.2.2.1 DNA-Methyltransferasen

Das Methylierungsmuster der DNA ist von funktioneller Bedeutung, Abweichungen können zu Entwicklungsstörungen und Krankheiten führen. Säugetierzellen weisen Enzyme auf, die die DNA-Methylierung während der Replikation erhalten oder zur Entwicklung eines neuen Musters beitragen können. Diese so genannten DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und die zugehörigen Proteine binden an die Cytosinbasen in CpG-Dinukleotiden und methylieren diese [14].

Generell kann aufgrund der Funktion der Methyltransferasen zwischen zwei Typen unterschieden werden [14]:

- erhaltende DNA-Methyltransferasen (DNMT1)
- *de novo* DNA-Methyltransferasen (DNMT3a und DNMT3b)

Zusätzlich gibt es noch eine vierte DNA-Methyltransferase (DNMT2), die *in vitro* eine sehr schwache Aktivität aufweist. Bei Verlust durch Deletion zeigt sich kein nachweisbarer Effekt auf die *de novo* Methylierung der DNA in embryonalen Stammzellen [15].

DNMT3L ist ein Protein der Familie der DNMT3. Es ist mit den *de novo* Methyltransferasen DNMT3a und 3b assoziiert und steigert deren katalytische Aktivität, moduliert jedoch nicht die erhaltende DNA-Methyltransferase DNMT1 [16].

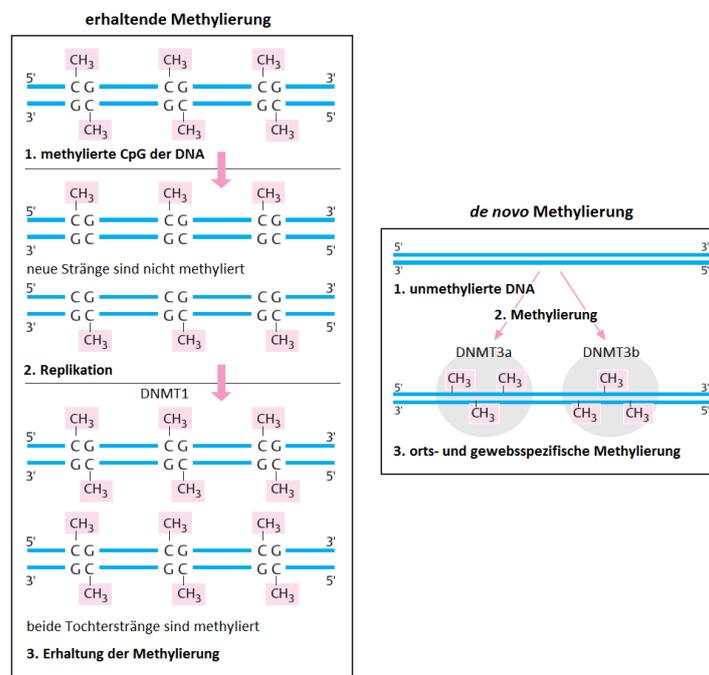


Abbildung 2: Mechanismen der erhaltenden und der *de novo* Methylierung; aus [14], modifiziert

Die erhaltende Methyltransferase DNMT1 hat eine 10-40 fach erhöhte Präferenz gegenüber hemimethylierter DNA. Sie ist an der Replikationsgabel während der S-Phase des Zellzyklus

lokalisiert und methyliert den neu synthetisierten DNA-Strang. Als Templat wird hierfür der elterliche Strang verwendet, womit die epigenetische Information an die nächste Zellgeneration weitergegeben und somit erhalten wird, wie in Abbildung 2 dargestellt ist [9, 10].

Eine *de novo* Methylierung der DNA wird von den Methyltransferasen DNMT3a und 3b bewerkstelligt. Die Enzyme bevorzugen zwar jeweils bestimmte Template (DNMT3a methyliert gemeinsam mit dem Protein DNMT3L mütterlich geprägte Gene, während DNMT3b mit kurzen sich wiederholenden Sequenzabschnitten assoziiert ist), führen aber auch gemeinsam zu einer Methylierung des Genoms (Abbildung 2) [9].

1.2.2.2 Mechanismus der DNA-Methylierung

Bei der Methylierung der DNA kommt es zu einer Übertragung einer Methylgruppe vom Donor S-Adenosyl-L-methionin (SAM) an die 5'-Position eines Cytosins der DNA, wobei S-Adenosylhomocystein (SAH) frei wird.

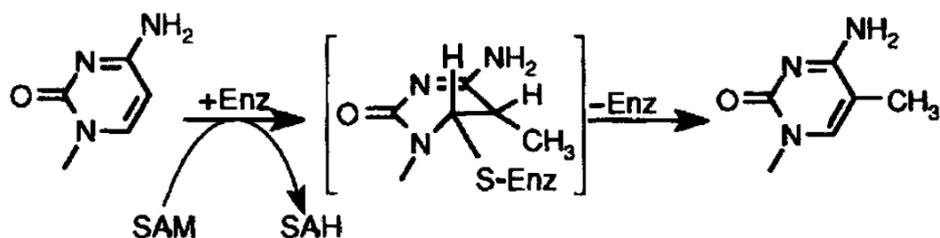


Abbildung 3: Mechanismus der enzymatischen Methylierung von Cytosin; aus [17], modifiziert

Der katalytische Mechanismus der DNA-Methylierung verläuft über die Bildung einer kovalenten Bindung zwischen der Methyltransferase und einem Cytosin der DNA. Dabei bindet ein Cysteinrest des aktiven Zentrums des Enzyms an das C₆-Atom des Cytosins. Dies führt zu einem Elektronenfluss zum C₅, welches dann die Methylgruppe des Donors SAM angreift. Eine Deprotonierung gefolgt von einer β -Eliminierung führt zur Ausbildung einer Doppelbindung und zur Entfernung des Enzyms. Am Ende der Reaktion liegen ein methyliertes Cytosin und SAH vor [9, 17].

1.3 DNA-METHYLIERUNG UND KREBS

Die Entstehung verschiedenster Erkrankungen ist auf den Einfluss einer Veränderung des natürlichen Methylierungsmusters der DNA zurückzuführen. Bisher konnte ein Zusammenhang zu Schizophrenie, Autismus, Morbus Alzheimer und Chorea Huntington aufgezeigt werden, aber auch bei Autoimmunerkrankungen, wie Lupus erythematodes, rheumatoider Arthritis und Asthma bronchiale spielt eine aberrante DNA-Methylierung eine Rolle [9]. Der epigenetische Einfluss auf die Entwicklung

von Krankheiten ist bei Krebs jedoch am besten untersucht. Veränderungen in der DNA-Methylierung können sowohl in frühen, als auch in sehr fortgeschrittenen Stadien der Kanzerogenese nachgewiesen werden. Diese Tatsache unterstützt die Annahme, dass Änderungen in der Methylierung ein frühzeitiges Ereignis der Tumorentwicklung darstellen [9, 10].

In Tumorzellen liegt das genomische Methylierungsmuster oft verändert vor. Das gemeinsame Vorkommen einer genspezifischen Hypermethylierung von Promotorregionen und eine globale Hypomethylierung der genomischen DNA ist ein epigenetisches Charakteristikum von Krebszellen [18, 19].

1.3.1 Globale Hypomethylierung

In Tumoren kann ein umfassender Verlust der Methylierung des Genoms beobachtet werden. Vielfach tritt eine Hypomethylierung in repetitiven und parasitischen DNA-Elementen auf, die in gesundem Gewebe stark methyliert vorliegen. Dies bewirkt eine weitreichende Instabilität des Genoms und führt zu einer Reaktivierung von übertragbaren Elementen und dem Verlust der genomischen Prägung [10, 20]. Eine zusätzliche Aktivierung von Onkogenen und prometastatischen Genen initiiert die Bildung von Krebs und fördert die Entwicklung bösartiger Tumore [9]. Studien zeigen, dass hypomethylierte CpG-Inseln in Karzinomzellen ungleichmäßig über das Genom verteilt sind. Die globale Hypomethylierung stellt dabei eine Art Mosaikmuster dar, welches eine deutliche Spezifität aufzeigt und zwischen individuellen Tumortypen variieren kann [21].

Eine umfassende Hypomethylierung lässt sich bei einer Reihe von Krebsformen, wie etwa bei Brust-, Gebärmutter- und Gehirntumoren nachweisen und zeigt eine progressive Zunahme mit der Schwere der Erkrankung. Auch in soliden Karzinomen der Leber und Prostata, sowie bei bösartigen hämatologischen Erscheinungen (z.B. Leukämie) konnte eine Abnahme der DNA-Methylierung beobachtet werden [22].

1.3.2 Regionale Hypermethylierung

Eine Hypermethylierung von CpG-Inseln in der Promotorregion eines Tumorsuppressorgens oder eines anderen Krebs-assoziierten Gens führt häufig zu einer transkriptionellen Stilllegung dieser DNA-Abschnitte und fördert die Entwicklung von Tumoren [9, 21]. Die Anzahl der bekannten Gen-assoziierten Promotorregionen, die während der Kanzerogenese hypermethyliert werden, nimmt zu. Betroffen sind hauptsächlich Gene, die in die Signaltransduktion, die DNA-Reparatur, die Regulation des Zellzyklus sowie in die Entgiftung eingreifen. Zusätzlich findet sich eine Inaktivierung

durch übermäßige DNA-Methylierung bei Genen, die bei der Differenzierung, Angiogenese oder Apoptose eine Rolle spielen [9].

In einer Studie von Costello *et al.* (2000) konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede im Methylierungsgrad bei verschiedenen Tumortypen gibt. Brust-, Kopf- und Nacken-, sowie Hodenkrebs weisen relativ selten abnormale Methylierungsmuster auf, wohingegen bei Darmkrebs und akuter myeloischer Leukämie signifikant häufiger CpG-Inseln methyliert vorliegen. Die Ausprägung der Methylierung kann bei individuellen Tumoren einer Karzinomart stark variieren [23].

1.3.3 DNA-Methylierung als Biomarker

Für eine erfolgreiche Behandlung von Krebs ist eine frühe Diagnose bedeutend. Neben den traditionellen histopathologischen, cytologischen, immunhistochemischen und serologischen Methoden zur Klassifizierung von Tumoren nehmen molekulare Anwendungen einen immer größeren Stellenwert ein [22]. Eine veränderte Methylierung stellt ein frühes Ereignis in der Kanzerogenese dar und eignet sich demnach gut als Indikator für das Auftreten einer Erkrankung [24]. Die DNA-Methylierung kann vor allem dann für die Diagnose von Krebs oder zur Risikobewertung für die Wahrscheinlichkeit einer Krebserkrankung herangezogen werden, wenn das auftretende Methylierungsmuster für einen bestimmten Tumortyp spezifisch ist [9].

Die Sensitivität und Spezifität von DNA-Methylierungsmarkern hängen von dem untersuchten Material ab [24]. Der Nachweis einer krebsspezifischen DNA-Methylierung kann anhand von Biopsieproben erfolgen. Eine weitere Quelle stellt freie DNA dar, die aus abgestorbenen Krebszellen in Körperflüssigkeiten abgegeben wurde. Aus diesem Grund basieren viele Studien auf der Entwicklung nicht-invasiver Untersuchungsmethoden zur Analyse von Blut (Serum oder Plasma) [24]. Molekulare DNA-Biomarker bieten aufgrund der chemischen und biologischen Stabilität der DNA und des Methylierungsmusters die Möglichkeit einer routinemäßigen Diagnostik [9].

Klinisch interessant ist ebenso die Beobachtung der Entwicklung einer bestimmten Tumorart bei Patienten, weshalb Biomarker für das Erstellen von Diagnosen relevant sind. Marker, die spezifisch für einen bestimmten Tumortyp sind, eignen sich als potentielle Screeningmarker im Zuge der Risikobewertung für das Entstehen von Krebs bei bestimmten Personen. Sind die Marker jedoch selektiv für eine Vielzahl von Karzinomen, können diese als voraussagende Indikatoren und als Biomarker für das Ansprechen einer therapeutischen Behandlung dienen. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Hypermethylierung bestimmter Gene den Erfolg einer Therapie stark beeinflussen kann. So ist bei einer Methylierung des MGMT Promotors eine hohe Wahrscheinlichkeit auf das Ansprechen auf alkylierende Substanzen gegeben [19].

1.3.4 Heterogene Methylierung bei Krebs

Veränderungen der DNA-Methylierung während der Kanzerogenese spielen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Lokus-spezifischen Biomarkern und können zur Früherkennung und Überwachung von Krebs dienen. Im Zusammenhang mit Krebs stößt man jedoch oft auf heterogen methylierte DNA. Dies führt meist zu Schwierigkeiten bei der Bestimmung des Methylierungsmaßes [25].

Heterogen methyliert bedeutet, dass eine bestimmte Region der DNA unterschiedliche Muster von methylierten und unmethylierten CpG-Dinukleotiden aufweist und dass diese so genannten Epiallele gemeinsam vorkommen können [25]. Die Biologie der heterogenen DNA-Methylierung ist nicht vollständig aufgeklärt. Sie kann auf eine graduelle Akkumulation von Veränderungen während der semikonservativen Replikation im Zuge der Zellteilung zurückzuführen sein oder es existiert möglicherweise ein kontinuierlicher Fluss von DNA-Methylierungsmustern innerhalb mitotisch entstandener Tochterzellen [26].

Eine Heterogenität der DNA-Methylierung kann auf unterschiedlichen Ebenen betrachtet werden. Der einfachste Fall liegt vor, wenn man sich auf eine Mischung vollständig methylierter und unmethylierter Epiallele bezieht. Eine homogene Zellmischung kann möglicherweise beide Formen aufweisen, wie in Abbildung 4 (A) dargestellt ist. Liegt jedoch ein heterogenes Gemisch von Zellen vor, dann beinhaltet dieses methylierte und unmethylierte Epiallele zu unterschiedlichen Anteilen (B). Jedes vorkommende DNA-Methylierungsmuster einer bestimmten genomischen Sequenz, inklusive vollständig methylierter und vollständig unmethylierter DNA, bezeichnet eines der möglichen Epiallele, die in einer Probe vorkommen können [26].

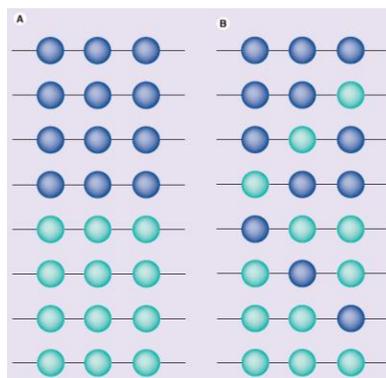


Abbildung 4: Darstellung möglicher Epiallele von zwei Typen heterogener Methylierung (grün: unmethylierte CpG, blau: methylierte CpG); aus [26]

Die Analyse der heterogenen DNA-Methylierung stellt eine Schwierigkeit dar, da viele Assays nicht zwischen homogener und heterogener Ausprägung der Methylierung unterscheiden können [26].

1.4 TUMORSUPPRESSORGENE

Wie bereits erwähnt, sind vor allem die Promotorregionen bestimmter Tumorsuppressorgene von einer Hypermethylierung betroffen [9]. In der vorliegenden Arbeit wurden analytische Methoden basierend auf der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) entwickelt, um das Ausmaß der Methylierung der Promotorregion und der ersten Exons ausgewählter Brustkrebs-relevanter Gene zu bestimmen. Diese Gene sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.4.1 RASSF1A

Die Ras-association domain family (*RASSF*) besteht aus acht Genen, *RASSF1-8*. Sie alle interagieren direkt oder indirekt mit aktiviertem Ras (engl.: *Rat sarcoma*), einem Proto-Onkogen, und modulieren so durch Ras vermittelte wachstumsinhibierende Prozesse. Die Gene der *RASSF* Familie sind somit wichtige Tumorsuppressorgene [27]. Das *RASSF1* Gen ist auf Chromosom 3p21.3 lokalisiert und weist bei einer Länge von ~11 kb acht Exons auf. Durch Aktivierung verschiedener Promotoren und alternatives Schneiden werden sieben unterschiedliche Transkripte gebildet (*RASSF1A-G*), wobei *RASSF1A* und *RASSF1C* die Hauptisoformen sind [28]. Das *RASSF1A* Gen unterliegt in Tumorzellen häufig einer transkriptionellen Inaktivierung durch eine abweichende Promotormethylierung und es hat deshalb eine besondere Funktion als Tumorsuppressor [27].

Eine Hypermethylierung der CpG-Insel des *RASSF1A* Promotors ist einer der Hauptgründe für den Verlust der Proteinexpression und findet sich bei einer Vielzahl von Tumoren [28, 29]. Das Protein *RASSF1A* weist keine enzymatische Aktivität auf, moduliert jedoch die Signalwege des programmierten Zelltods und des Zellzyklus, welche bei Krebs dereguliert sind [29]. Eine direkte Interaktion zwischen *RASSF1A* und Mikrotubuli-bindenden Proteinen bewirkt eine Stabilisierung der Mikrotubuli, wodurch unter anderem die Mitose reguliert wird [28].

Ein Verlust der Expression von *RASSF1A* ist ein frühzeitiges Ereignis in der Tumorgenese und konnte bei zumindest 37 Tumortypen nachgewiesen werden. Eine *RASSF1A* Promotormethylierung wurde bei epithelialer Hyperplasie und bei „Intraductal Papilloma“ der Brust aufgezeigt [27]. Bei primären Mammakarzinomen steht eine nachweisliche Methylierung von *RASSF1A* im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose [30].

Da gesundes Gewebe kaum eine Methylierung des *RASSF1A* Gens zeigt, sich jedoch eine abweichend hohe in Krebszellen findet, ist *RASSF1A* ein möglicher Tumormarker [29].

1.4.2 CDKN2A

Das menschliche Zyklin-abhängige Kinase Inhibitor 2A Gen (*CDKN2A*, engl.: cyclin dependent kinase inhibitor 2A) ist auf Chromosom 9p21 lokalisiert. Es codiert für ein Protein (p16), das spezifisch an die Zyklin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (CDK4 und CDK6) während der G1-Phase des Zellzyklus bindet [31, 32]. Durch eine Bildung von Komplexen der Kinasen CDK4 und CDK6 mit D Zyklinen während der späten G1-Phase wird eine Phosphorylierung des Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein (Rb) initiiert, womit der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus gesteuert wird. In normalen Zellen kann p16 die Kinasen CDK4 und CDK6 in einer Rückkopplungsschleife herunterregulieren, wenn Rb bereits phosphoryliert vorliegt. Es wirkt hemmend auf die Ausbildung der Zyklin D-CDK4 und Zyklin D-CDK6 Komplexe und verhindert so ein unkontrolliertes Fortschreiten des Zellzyklus am G1/S-Kontrollpunkt (Abbildung 5). In Zellen mit inaktivem Rb ist die Expression von p16 erhöht, um die Kinasen konsequent zu inhibieren. Die biochemischen Eigenschaften von p16 legen nahe, dass es als negativer Regulator bei der Proliferation normaler Zellen wirkt [31-34].

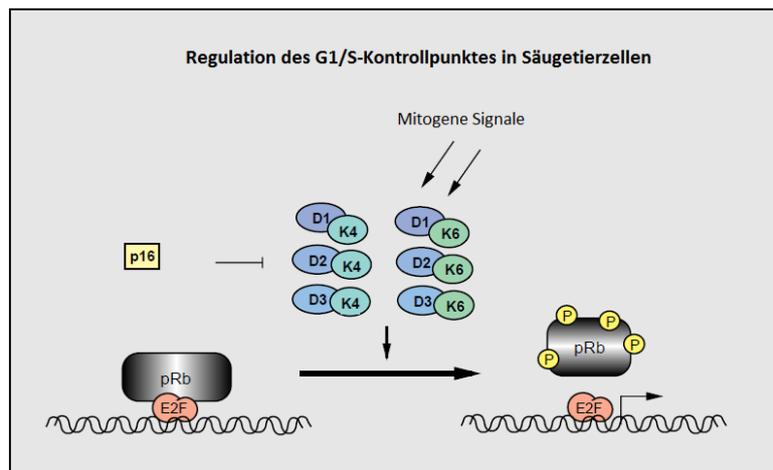


Abbildung 5: Phosphorylierung des Rb Genprodukts durch die Kombination der D Zykline (D1, D2 und D3) und deren assoziierte Kinasen CDK4 und CDK6 (K4 und K6); aus [32], modifiziert

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von p16 durch Transkription des *CDKN2A* Gens das Eintreten von Tumorzellen in die S-Phase des Zellzyklus verhindert und so die Tumorphiliferation sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmt [33].

Der Verlust von p16 kann aus einer homozygoten Deletion, Punktmutation oder Methylierung des Promotors resultieren und ist ein gemeinsames Merkmal vieler Krebstypen. Das erste Exon des Gens weist eine CpG-Insel auf, die bei normalem Gewebe unmethyliert und bei manchen Tumorarten hypermethyliert vorliegt. Eine abnorme Methylierung findet sich bei Darmkrebs mit einer Häufigkeit von 40 %. Eine Methylierung der ersten Promotorregion und des ersten Exons wird bei menschlichen Brustkrebszelllinien und bei 20-30 % der Fälle von primärem Brustkrebs beobachtet [34, 35].

1.4.3 DAPK1

Das *DAPK1* Gen kodiert für die „Death-associated protein kinase 1“, eine 160 kD schwere Ca^{2+} /Camodulin-abhängige Serin/Threonin Kinase, welche den programmierten Zelltod vermittelt [36, 37]. DAPK1 gehört zu einer Familie eng verwandter „Death“-Kinasen, die eine ausgeprägte Sequenzähnlichkeit und funktionelle Homologie aufweisen [36]. Die Aminosäuresequenz der katalytischen Domäne von DAPK3 und DAPK1 sind zu 83 % ident. Das Substrat von DAPK3 ist das Protein p21. Es bindet an die Zyklin D-CDK4/6 Komplexe und verhindert das Durchlaufen des G1/S-Kontrollpunktes des Zellzyklus. DAPK3 beeinflusst demnach die Differenzierung von Zellen. Auch für DAPK1 wird eine Beteiligung am Arrest während der G1-Phase diskutiert. DAPK1 interagiert mit den extrazellulären Signal-regulierenden Kinasen (ERK), welche Einfluss auf die Aktivierung der DNA-Synthese und das Fortschreiten des Zellzyklus haben [38]. Zellen werden durch DAPK1 während der Tumorgenese gegenüber apoptotischen Signalen sensibilisiert. Das *DAPK1* Gen kann demnach als Tumorsuppressor bezeichnet werden [36].

Eine abweichende und erhöhte Methylierung der Promotorregion des *DAPK1* Gens konnte bei vielen Krebsarten nachgewiesen werden. Sie spielt eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese von Brustkrebs [18]. Außerdem ist die Promotorregion des Gens bei Darm- und Blasenkrebs sowie bei akuter myeloischer Leukämie und dem Myelodysplastischen Syndrom hypermethyliert [39-41].

1.4.4 APC

Das adenomatöse Polyposis coli Gen (*APC* Gen) ist ein Tumorsuppressorgen des WNT/ β -Catenin Signalwegs. Mutierte APC Proteine binden nicht an β -Catenin und dies führt zu einer Transkription verschiedener wachstumsregulierender Gene, wie dem Myelocytomatose-Onkogen. Mutationen des *APC* Gens in Keimzellen sind die Hauptursache für Familiäre Adenomatöse Polyposis des Darms (FAP). Bei dieser autosomal dominanten Erbkrankheit kommt es in der späten Kindheit und dem jungen Erwachsenenalter zur Bildung von tausenden Polypen in der Dickdarmschleimhaut, die sich zu Karzinomen entwickeln können [14].

Das *APC* Gen ist auf dem fünften Chromosom lokalisiert und besteht aus 8538 bp. Es kodiert ein 2843 Aminosäure großes Protein, von dem mehrere alternative Splicevarianten existieren [14]. Das *APC* Transkript weist verschiedene Domänen auf, die eine Interaktion mit einer Vielzahl von Proteinen erlauben. Es ist Bestandteil des WNT-Signalwegs, welchem eine bedeutende Rolle bei der Zelldifferenzierung und Proliferation sowie der Zellbewegung und Polarität zugesprochen wird. Das *APC* Protein beeinflusst die Regulation des Zellzyklus und möglicherweise auch die Apoptose. Defekte

dieses Signalweges treten bei der Pathogenese verschiedener Tumortypen auf, einschließlich Brustkrebs [42, 43].

Sowohl bei kolorektalen Adenomen als auch Karzinomen ist eine Hypermethylierung des *APC* Promotors nachweisbar, jedoch nicht in der normalen Darmschleimhaut. Eine hohe Methylierung findet sich zusätzlich bei anderen menschlichen Tumoren des Gastrointestinaltraktes, wie Speiseröhren-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen- und Leberkrebs, aber auch in der Magenschleimhaut [42]. Eine abweichende Methylierung des *APC* Gens ist bei invasiven duktalem und lobulären Mammakarzinomen aller pathologischer Grade und Stadien nachweisbar. Sie deutet auf ein frühes Ereignis der Tumorgenese von Brustkrebs hin und ist mit einer schlechten Prognose verbunden [18, 30].

1.5 EINFLUSS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN AUF DIE METHYLIERUNG

Die Entwicklung von Medikamenten und Substanzen, die eine Reaktivierung epigenetisch stillgelegter Gene bewirken, stellen ein interessantes Gebiet in der Krebsforschung dar. Epigenetische Modifikationen der DNA sind veränderlich, wohingegen genetische Abweichungen irreversibel sind. Es gibt einige pharmakologisch bedeutende Substanzen, zu denen 5-Aza-2'-Desoxycytidin zählt, die nachweislich eine Demethylierung der DNA bewirken und so zu Erfolgen bei der Behandlung von Leukämie und Lymphomen führen [44]. Auch sekundäre Pflanzenstoffe, wie Daidzein und Genistein, und biologisch aktive Pflanzeninhaltsstoffe, wie Curcumin und Parthenolid, hemmen die Entstehung und Progression von Tumoren [45-47]. In den folgenden Kapiteln werden jene Substanzen beschrieben, die für die Inkubationsexperimente mit Brustkrebszellen herangezogen wurden.

1.5.1 5-Aza-2'-Desoxycytidin

Bei 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-2'-dC) handelt es sich um Cytidin-Analoga. Es sind zwei der am häufigsten verwendeten DNA-Methyltransferase-Inhibitoren. Um die DNA-Methylierung beeinflussen zu können, müssen beide Verbindungen in die DNA eingebaut werden, dies erfordert jedoch eine aufwendige Modifikation der Substanzen über den Stoffwechsel [48].

Einleitung

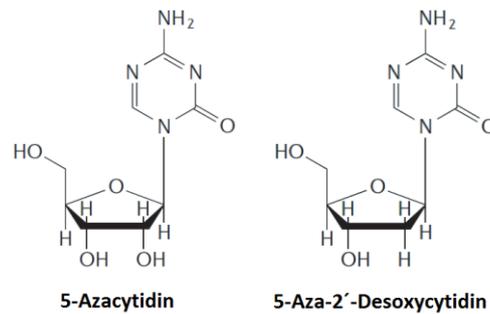


Abbildung 6: Chemische Strukturen von 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Desoxycytidin; aus [11], modifiziert

5-Azacytidin und 5-Aza-2'-dC zeichnen sich durch einen modifizierten Cytosinring aus, der jeweils an eine Ribose bzw. Desoxyribose gebunden ist. Die Metabolisierung erfolgt über Kinasen, welche die Nucleoside in Nucleotide umwandeln [11]. DNA-Methyltransferasen erkennen die Verbindungen 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-dC als natürliche Substrate und initiieren eine Methylierung der vorliegenden Cytosine unter Verwendung der Verbindungen [48]. Die Modifikation am C₅-Atom des Cytosinrings verhindert das Freiwerden der Methyltransferase im Verlauf der Methylierung und führt zur Bildung eines kovalent gebundenen Komplexes. Eine weitere Methylierung des Genoms wird damit unterbunden und die Cytosinbasen der DNA neu gebildeter Tochterzellen sind demnach unmethyliert [11].

5-Azacytidin ist zwar effektiv, wirkt aber stark zytotoxisch und ist kein spezifischer DNA-Methyltransferase-Inhibitor. Aufgrund der Ribonucleosidstruktur wird ein Großteil der Verbindung in RNA eingebaut und wirkt sich eher bei der Translation von Proteinen aus. Das Desoxyribonucleosid 5-Aza-2'-dC wird aufgrund der Desoxyribose am Cytosin vermehrt in DNA eingebaut und ist effizienter in der Inhibierung der DNA-Methyltransferasen [48]. Experimente haben gezeigt, dass dieses in niedrigen Dosen eine geringe Toxizität aufweist und so eine Methylierung der DNA verhindert. Dieser Effekt ist jedoch nicht von Dauer, denn mit Absetzen der Medikation kommt es zu einer Wiederherstellung des abweichenden Methylierungsmusters [11].

Bei Versuchen mit nicht-Nucleosidanaloga, wie (-)-Epigallocatechin-3-Gallat, Hydralazin und Procainamid konnte nachgewiesen werden, dass 5-Aza-2'-dC stärker auf die Inhibierung der Methylierung wirkt und einen größeren Einfluss auf die Reaktivierung stillgelegter Genen hat [49].

1.5.2 Bisphenol A

Die erstmalige Synthese von Bisphenol A (BPA) erfolgte 1891. Die östrogene Wirkung konnte 1930 nachgewiesen werden. Kurz darauf wurden auch die quervernetzenden Eigenschaften bei der Herstellung von Epoxidharzen erkannt. Seit 1950 wird BPA als synthetisches Monomer bei der Herstellung von Polycarbonaten und Polystyrolharzen verwendet. Zusätzlich findet man BPA in einer

Einleitung

breiten Palette von Produkten, wie Spielsachen, Wasserhähnen, Trinkflaschen, Tuben und Lebensmittelverpackungen. Studien haben gezeigt, dass nicht vollständig polymerisiertes BPA bei Erwärmung freigesetzt und auch bei bestimmungsgemäßem Gebrauch ausgewaschen werden kann [50, 51].

Aufgrund der weitverbreiteten Anwendung von BPA ist ein Großteil der Bevölkerung dieser Substanz ausgesetzt. Calafat *et al.* (2005) konnten in einer Studie zeigen, dass sich bei 95 % der untersuchten Probanden BPA-Konzentrationen $\geq 0,1 \mu\text{g/l}$ im Urin nachweisen lassen [52]. Ferner weisen Versuche an Nagetieren einen Zusammenhang zwischen einer pre- und perinatalen BPA-Exposition und erhöhtem Körpergewicht auf. Es wurden zusätzlich vermehrt Brust- und Prostatakreberkrankungen, eine veränderte Reproduktionsfunktion und andere chronische Erkrankungen festgestellt [53].

BPA zeigt bei Säugetieren Wirkungen einer endokrin aktiven Komponente. Diese Verbindungen haben eine ähnliche Struktur wie natürliche Steroidhormone und wirken nach demselben Mechanismus. Sie können an die zellulären Steroidhormonrezeptoren binden und die normale hormonelle Regulation und die ordnungsgemäße Funktion des endokrinen und neuroendokrinen Systems beeinflussen [51].

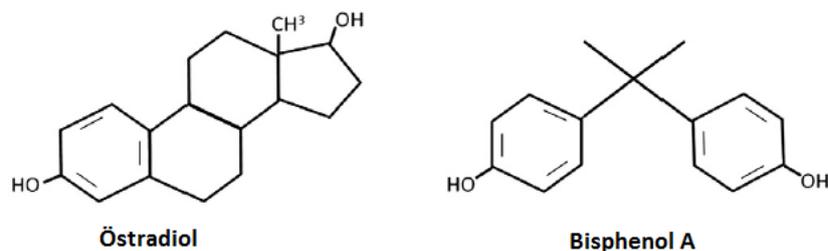


Abbildung 7: Chemische Strukturen von Östradiol und Bisphenol A; aus [51], modifiziert

BPA agiert aufgrund der ähnlichen chemischen Struktur zu Östradiol als Östrogenagonist und bindet an die nuklearen Östrogenrezeptoren α (ER α) und β (ER β). Da die Bindungsaffinität im Vergleich zu den natürlichen Steroidhormonen sehr gering ist, kann die Wirkung von niedrigen BPA-Dosen auf die Reproduktionsfähigkeit nicht vollständig erklärt werden [51].

Zusätzlich kann BPA Veränderungen der DNA-Methylierung hervorrufen. Bei Versuchen mit Mäusen stellten Dolinoy *et al.* (2007) fest, dass eine ernährungsbedingte Exposition des Muttertiers gegenüber BPA eine Lokus-unabhängige Hypomethylierung des Genoms der Nachkommenschaft hervorruft, wobei das Methylierungsmuster bei sich gerade entwickelnden Stammzellen besonders empfindlich reagiert. Der epigenetische Mechanismus dieser Wirkung konnte jedoch noch nicht aufgeklärt werden [51, 54].

Beim Menschen wurde in Folge einer chronischen Exposition gegenüber niedrigen BPA-Dosen ein Effekt auf Brustepithelzellen nachgewiesen. Durch eine Aktivierung der ER α -vermittelten

Signaltransduktion wurde eine nachträglich vermehrte Genexpression in differenzierten Epithelzellen der Tochtergeneration beobachtet. In ähnlicher Weise konnte der erbliche Einfluss auf die DNA-Methylierung in ER α -positiven Tumoren der Brust aufgezeigt werden [50].

1.5.3 Genistein und Daidzein

Genistein und Daidzein gehören der Gruppe der Isoflavone an. Diese zählen neben den Lignanen und Coumestanen zu den Phytoöstrogenen und kommen in einem Konzentrationsbereich von 0,5-2 mg/g in Soja vor. Es handelt sich um in der Sojabohne und anderen Hülsenfrüchten natürlich vorkommende phenolische, sekundäre Metaboliten [47, 55, 56]. Eine Aufnahme von Soja-Isoflavonen vermindert bei Frauen das Risiko an Brust- und Gebärmutterkrebs zu erkranken. Die Schutzeffekte ergeben sich vermutlich vor allem durch eine sojareiche Ernährung im Kindes- und Jugendalter [57, 58].

Soja und daraus hergestellte Lebensmittel enthalten signifikante Mengen der Isoflavone Genistein und Daidzein, die entweder in unkonjugierter Form (Aglykone) oder als verschiedene Glykosidkonjugate vorliegen können. Genistein und Daidzein sind Hydrolyseprodukte der Isoflavonglykoside, deren biologische Aktivität stark von der Zufuhrmenge und von der Stoffwechsellistung der Darmbakterien abhängt [56, 57].

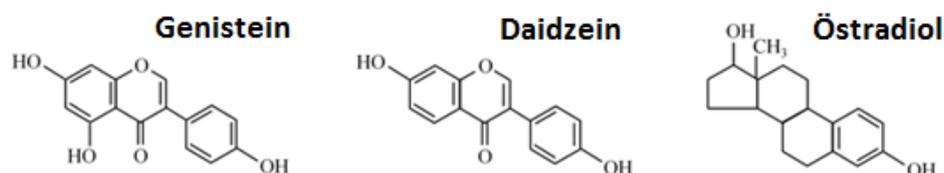


Abbildung 8: Chemische Strukturen der Isoflavone Genistein und Daidzein im Vergleich zu Östradiol; aus [59], modifiziert

Daidzein und Genistein weisen in ihrer Struktur einen Phenolring auf, welcher Voraussetzung für eine Bindung an Östrogenrezeptoren (ER α und ER β) ist (Abbildung 8). Im Vergleich zu Steroidhormonen, wie Östradiol und Östron, zeigen diese hormonähnlichen Komponenten jedoch nur eine schwache östrogene Wirkung, sie sind aber in der Lage, steroidale Östrogene von den Rezeptoren zu verdrängen. Durch den Einfluss dieser Phytoöstrogene wird außerdem die Synthese des Sexualhormon-bindenden-Globulins (SHBG) gesteigert, welches einen Abfall des freien, biologisch aktiven Östrogenspiegels bewirkt. Zusätzlich können sie die Bildung inaktiver Östrogenmetabolite erhöhen [56, 57].

Vor allem die biologischen Effekte des Isoflavons Genistein sind weitreichend. Durch die hemmende Wirkung auf die Angiogenese beeinflusst es das Wachstum und die Ausdehnung von bösartigen

Tumoren. Genistein hat außerdem einen Effekt auf die Vermittlung von Zellsignalen, die Zellteilung und das Zellwachstum sowie auf die Genexpression [47].

1.5.4 Curcumin

Curcumin ist ein gelbes Pigment, das aus der Wurzel der Kurkumapflanze (*Curcuma longa*), auch Gelbwurz, gelber Safran oder gelber Ingwer genannt, extrahiert wird. Diese nicht toxische Substanz wird als Farb- und Geschmackszusatz in Lebensmitteln und einigen Getränken verwendet und verarbeitet [45].

Kurkumawurzeln enthalten Curcuminoiden in sehr hohen Konzentrationen (4-8 % des Trockengewichts). Kommerziell erhältliches Curcumin ist eine Mischung verschiedener Curcuminoiden, die Hauptkomponente ist Diferuloylmethan (77 %), zusätzlich kommen noch Demethoxycurcumin (18 %) und Bisdemethoxycurcumin (5 %) zu geringeren Anteilen vor (Abbildung 9). Die beiden Letzteren zeigen synergistische Effekte auf die entzündungshemmende Wirkung der Hauptkomponente Curcumin [60-62].

Basierend auf der strukturellen Aktivität der Curcuminoiden wird angenommen, dass sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit α,β -ungesättigten Carbonylgruppen das katalytische Zentrum des Cysteins der DNMT1 kovalent blockieren und so die katalytische Funktion bei der Methylierung der DNA inhibieren. Eine Hemmung der DNMT1 Synthese könnte einen alternativen oder zusätzlichen Mechanismus für die Wirkung von Curcumin auf die DNA-Methylierung darstellen [45, 62].

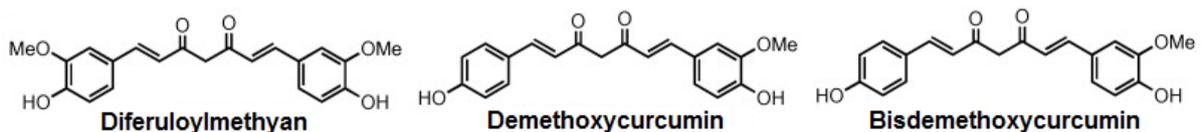


Abbildung 9: Chemische Struktur natürlicher Curcuminoiden; aus [62], modifiziert

Aufgrund der pharmakologischen Eigenschaften von Curcumin wurde die Substanz zur Behandlung von Entzündungen, Hautwunden und gegen Tumore eingesetzt. Curcumin wirkt zytotoxisch und ist ein natürliches Antioxidans. Letzteres ist für die antimutagenen und antikanzerogenen Eigenschaften der Substanz verantwortlich [45, 60].

Curcumin kann allein oder in Kombination mit anderen antikanzerogenen Medikamenten zur Chemoprävention eingesetzt werden. In Zellexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass eine Konzentration von 30 μM Curcumin Einfluss auf die DNA-Methylierung hat und so eine Aktivierung stillgelegter Gene bewirken kann [62]. *In vitro* und *in vivo* Versuche lassen erkennen, dass Curcumin sich negativ auf das Wachstum und die Proliferation von Brustkrebszellen auswirken kann und zu einer Reduktion der Tumorgroße führt [45].

1.5.5 Parthenolid

Parthenolid ist ein natürliches, bioaktives Sesquiterpenlakton und eine der Hauptkomponenten im Mutterkraut (*Tanacetum parthenium*). Es wird aufgrund seiner antirheumatischen Wirkung zur Behandlung von Fieber, Migräne und Arthritis verwendet [63, 64]. Die Substanz weist eine geringe Toxizität auf und kann somit als potentielles chemopräventives Mittel angewendet werden [64].

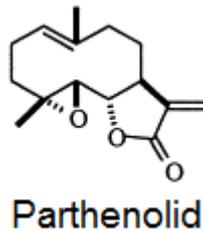


Abbildung 10: Chemische Struktur von Parthenolid; aus [63], modifiziert

Es wird angenommen, dass die Inhibierung der Enzymaktivität auf eine Interaktion des γ -Methylenlaktonrings von Parthenolid mit der Thiolgruppe der aktiven Stelle der DNMT1 zurückzuführen ist. Eine Beeinflussung des DNMT1-Niveaus ist von der Parthenolid-Dosis und dem vorliegenden Zelltyp abhängig, wobei die Herabregulierung relativ hohe Konzentrationen der Substanz erfordert [64].

Aufgrund der inhibierenden Wirkung auf die Aktivität des nuklearen Transkriptionsfaktors NF- κ B wurde die Substanz auf ihre antikanzerogene Wirkung getestet und zeigte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* positive Ergebnisse [64]. NF- κ B ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, der die Expression vieler Gene aktiviert und somit in entzündlichen Prozessen involviert ist [63]. Dieser Effekt spielt möglicherweise eine zentrale Rolle bei der Apoptose. Durch die Wechselwirkung mit DNMT1 kann Parthenolid die Methylierung der DNA inhibieren und zu einer Hypomethylierung von Genen beitragen [64]. Zusätzlich zeigt die Substanz einen Einfluss auf die DNA-Synthese und Zellproliferation in verschiedenen Krebszelllinien [46]. Guzman *et al.* (2005) beobachteten, dass Parthenolid und ähnliche Sesquiterpenlaktone selektiv myeloische Leukämienstammzellen ablösen können, ohne dabei gesunde Stammzellen und deren Vorläuferzellen zu beeinträchtigen [46].

1.6 PROBENMATERIAL

Die Bestimmung des Methylierungsgrades Brustkrebs-relevanter Tumorsuppressorgene erfolgte zum einen an MCF-7 Zellen und zum anderen an Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen.

1.6.1 MCF-7 Zellen

Bei den MCF-7 Zellen (Michigan Cancer Foundation-7) handelt es sich um eine Zelllinie eines humanen Adenokarzinoms der Brust, welche erstmals 1970 aus einem metastasierenden Brusttumor einer 69-jährigen Kaukasierin gewonnen wurde. Im Zytoplasma dieser Zellen kommen Östrogenrezeptoren vor, welche sensitiv auf Östrogene reagieren. Außerdem weisen sie Charakteristika eines differenzierten Brustepithels auf und können hügelartig wachsen. Grundsätzlich zeigen MCF-7 Zellen eine Verdoppelungsrate von etwa 50 Stunden (Bereich 30-72 h), adhärentes Wachstum (Abbildung 11) und bilden in Kultur Monolayer aus [65, 66].

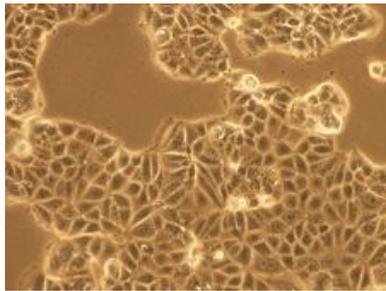


Abbildung 11: Wachstum von MCF-7 Zellen; aus [66]

1.6.2 Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen

In Zusammenarbeit mit Ass. Prof. Dr. Georg Pfeiler von der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie der Medizinischen Universität Wien, wurden Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen erhalten. Das Alter der Patientinnen lag zwischen 30 und 63 Jahren. Bei der Gewebeentnahme für weitere Untersuchungen der Erkrankten wurde von Dr. Pfeiler jeweils ein Teil des Tumorgewebes entnommen, zusätzlich wurde Zellmaterial in etwa einem cm Abstand zum Tumor und weiter entfernt liegendes, gesundes Gewebe biopsiert. Diese Gewebeproben wurden dem Institut für Analytische Chemie der Universität Wien für weitere Analysen zur Verfügung gestellt.

2. ZIELSETZUNG

Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression und ist die am häufigsten untersuchte epigenetische Veränderung im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs. Vor allem eine Hypermethylierung der Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen und die damit verbundene Stilllegung des Gens ist ein frühes Ereignis der Kanzerogenese. Da es sich bei der Methylierung der DNA um einen reversiblen Mechanismus handelt, ist sie ein interessantes Forschungsgebiet für die Detektion, Prävention und Behandlung von Krebs. In der Umwelt vorkommende Kontaminanten, aber auch Inhaltsstoffe von Lebensmitteln können das Ausmaß der DNA-Methylierung beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit war es, analytische Methoden basierend auf der methylierungs-sensitiven hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) zu entwickeln, um Veränderungen der DNA-Methylierung in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen, die als mögliche Biomarker für Brustkrebs relevant sind, zu untersuchen.

MS-HRM Methoden basieren auf einer Bisulfit-Konvertierung der zu untersuchenden DNA. Unmethyliertes Cytosin wird dabei in Thymin umgewandelt, wohingegen methyliertes Cytosin in Form von Cytosin bestehen bleibt. Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ermöglicht eine Amplifikation der interessanten, zuvor konvertierten, DNA-Abschnitte. Durch anschließende hochauflösende Schmelzkurvenanalyse kann der Methylierungsgrad aufgrund unterschiedlicher Schmelzprofile von unmethylierter und methylierter DNA ermittelt werden. Im Vordergrund dieser Arbeit stand das Entwerfen und Optimieren neuer Methoden für die Gene *RASSF1A*, *GATA3*, *GSTP1*, *TWIST* und *RARβ*. Des Weiteren sollen auch bereits entwickelte Methoden für *CDKN2A*, *DAPK1* und *APC* angewendet werden, um den Methylierungsgrad in MCF-7 Zellen und Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen zu bestimmen.

MCF-7 Zellen sollen mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5-Aza-2'-Desoxycytidin und Bisphenol A, sowie lebensmittelrelevanten Inhaltsstoffen, wie Genistein und Daidzein, Curcumin bzw. Parthenolid behandelt werden, um einen möglichen demethylierenden Einfluss der Substanzen auf die DNA feststellen zu können. Zusätzlich sollte das Ausmaß der DNA-Methylierung in Gewebeproben von Brustkrebspatientinnen unter Verwendung der entwickelten MS-HRM Methoden analysiert werden. Durch einen Vergleich der Methylierung der Promotorregion bzw. der ersten Exons der untersuchten Gene in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe sollten eventuelle Unterschiede in Abhängigkeit von der Art und Lage des Gewebes nachgewiesen werden.

3. THEORETISCHER HINTERGRUND

Die methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) ist ein neuer Ansatz zur genauen Bestimmung der DNA-Methylierung und zählt zu den sensitivsten und spezifischsten Techniken der Analyse der DNA-Methylierung einzelner Genregionen. Unter Verwendung spezifischer Primer wird bisulfit-behandelte DNA im Zuge einer Polymerase Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Durch anschließende hochauflösende Schmelzkurven-Analyse kann das Methylierungsausmaß einer unbekannt Probe ermittelt werden [67].

3.1 DIE POLYMERASE KETTENREAKTION

Für die Bestimmung der DNA-Methylierung eines bestimmten Gens mittels MS-HRM wird die gewünschte DNA-Sequenz im ersten Schritt mittels PCR amplifiziert. Dabei lagern sich spezifische Primer an die jeweils komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge an. Durch die DNA-Polymerase erfolgt anschließend die Synthese von Doppelsträngen, womit die zu untersuchende DNA-Region im Verlauf mehrerer Amplifikationszyklen annähernd exponentiell vervielfältigt wird.

3.1.1 Ablauf einer PCR

Die PCR ist eine sehr effiziente Methode zur selektiven Amplifikation eines beliebigen Abschnitts eines DNA-Moleküls. Primer legen den Beginn und das Ende der zu vervielfältigenden Sequenz fest. Für die Ausführung einer PCR werden DNA, Primer, Polymerase, dNTPs, $MgCl_2$ und Puffer in einem Reaktionsgefäß miteinander vermischt (vgl. Kapitel 5.5.2.1), wobei die gewünschte DNA-Sequenz in einem sich zyklisch wiederholenden Temperaturprogramm amplifiziert wird.

3.1.1.1 PCR-Zyklus

Jede PCR beginnt mit einer anfänglichen Denaturierung und Initiierung der Hot-Start-DNA-Polymerase. Dabei wird der Reaktionsansatz für mindestens 5 Minuten auf 95 °C erhitzt. Anschließend folgt ein sich zyklisch wiederholendes Temperaturprogramm (vgl. Abbildung 12). Jeder Zyklus besteht dabei aus drei Phasen [68, 69]:

- **Denaturierung**

Im ersten Schritt wird der Reaktionsansatz auf 95 °C erhitzt, dabei kommt es zu einem Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen den Basen, wobei aus einem DNA-Doppelstrang zwei Einzelstränge gebildet werden. Diese dienen der DNA-Polymerase als Matrizen [68, 70].

- **Annealing**

In der Annealingphase wird die Temperatur auf eine für die Primer spezifische Anlagerungstemperatur (50-60 °C) abgesenkt, womit diese an die DNA-Einzelstränge binden. Aufgrund der Länge und Komplexität der einzelsträngigen DNA (ss-DNA, engl.: single-stranded DNA) kommt es während der raschen Abkühlung zu keiner Rehybridisierung. Zusätzlich lagert sich im Annealingschritt die DNA-Polymerase an. Eine zu niedrige Temperatur während der Anlagerung kann zu einer verminderten Primerspezifität führen [68, 69].

- **Elongation**

Der Reaktionsansatz wird auf 72 °C erhitzt, um eine effiziente DNA-Synthese durch die Polymerase zu gewährleisten. Durch den Einbau von Nukleotiden wird der Einzelstrang in 3'- Richtung des Primers verlängert [69].

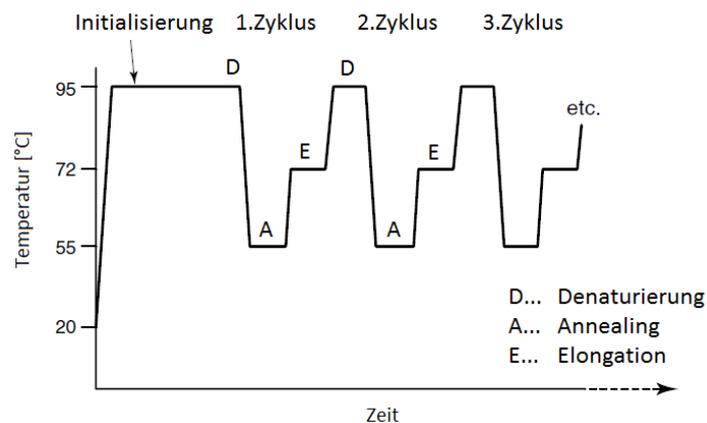


Abbildung 12: Schema des Temperaturzyklus einer PCR; aus [69], modifiziert

Bei einer PCR wird DNA eingesetzt, die länger als die zu amplifizierende Region ist [69]. Im ersten Zyklus wird durch das Anlagern der Primer das 5'-Ende des neu synthetisierten Stranges festgelegt, am 3'-Ende bleibt ein Überhang. Die im zweiten Zyklus gebildeten DNA-Stränge entsprechen dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt, da die im ersten Schritt gebildeten Template bereits ein definiertes 5'-Ende aufweisen. Damit stehen erstmals unmittelbar Produkte der gewünschten Länge zur Verfügung (Abbildung 13) [68, 69].

Theoretischer Hintergrund

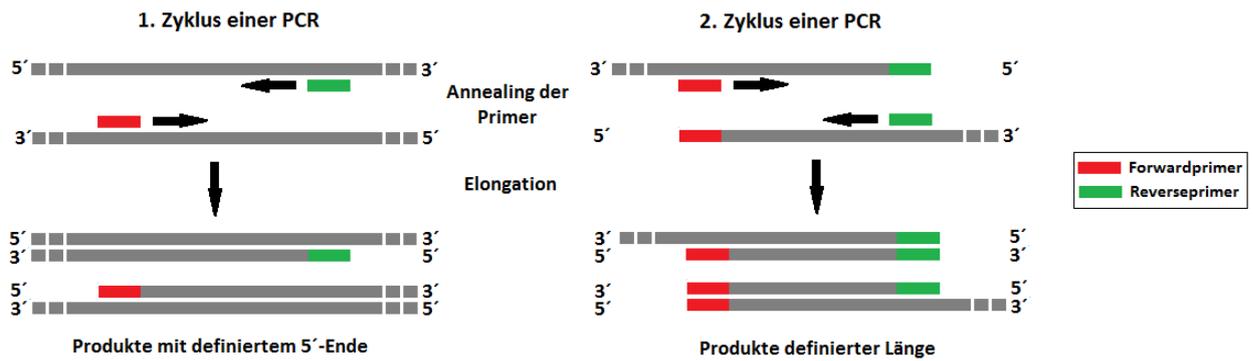


Abbildung 13: Edukte und Produkte des ersten und zweiten Zyklus einer PCR; nach [69]

3.1.1.2 Zyklenzahl und Effizienz der PCR

Bei einer PCR-Reaktion kommt es theoretisch zu einer Verdopplung der Amplikons bei jedem Zyklus. Könnte eine Effizienz von 100 % erreicht werden, würde eine Abfolge von 20 solcher Zyklen zur Bildung von $2^{20}=10^6$ Amplikons führen. In der Praxis wird diese hohe Umsatzrate jedoch nicht erreicht. Durch eine Wiederholung von 25-40 Zyklen kann eine ausreichende Amplifikation der zuvor eingesetzten DNA erzielt werden, um weitere Analysen durchführen zu können [69].

Die bei der PCR erhaltene Amplifikationskurve kann in drei Phasen gegliedert werden, ein Schema dazu findet sich in Abbildung 14 [69]:

- **Eingangsphase:** Primer lagern an den richtigen Abschnitt der Templat DNA an, es werden nur wenige Produkte gebildet
- **exponentielle Phase:** annähernd exponentielle Vervielfachung der DNA-Template
- **Plateauphase:** Reaktion flacht ab

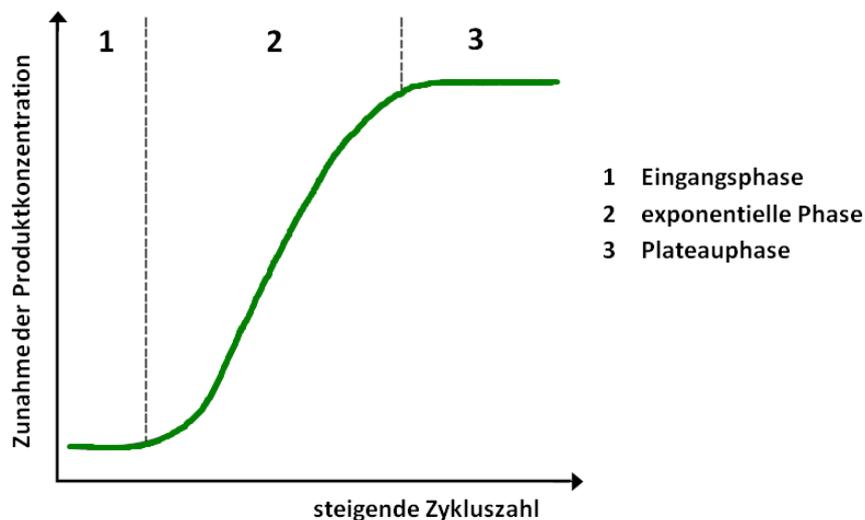


Abbildung 14: Darstellung der Kinetik der Zunahme der Produktkonzentration im Verlauf einer PCR; aus [69], modifiziert

Das Ende einer PCR ist erreicht, wenn es zu einer reduzierten Produktbildung kommt und ein Plateau-effekt eintritt. Die Ursachen dieses Phänomens liegen zum einen in der Akkumulation von Endprodukten (PCR-Amplifikons, Pyrophosphat), welche die Synthese verlangsamen, zum anderen vermindert die Wahrscheinlichkeit eines Re-Annealings zweier synthetisierter DNA-Stränge die Rate der Neubildung. Zusätzlich nehmen die Substratkonzentrationen (Primer, Nukleotide und intakte Polymerase) ab, die Bildung unspezifischer Produkte, wie Primer-Dimere wird begünstigt und es kommt zu einer verstärkten Fehlhybridisierung [71].

3.1.2 Reagenzien

Wie eingangs erwähnt, werden für eine PCR-Reaktion neben der Templat-DNA und den Primern auch eine Polymerase und Nukleotide benötigt. $MgCl_2$ und Puffer sorgen für die optimalen Bedingungen im Verlauf der Reaktion. Im Folgenden werden die wichtigsten Eigenschaften der einzelnen Komponenten kurz ausgeführt.

- **Templat-DNA**

Als Templat kann für die PCR aus jedem Organismus isolierte DNA herangezogen werden. Die verwendete DNA sollte jedoch integer und möglichst rein sein, um die Bildung von Nebenprodukten zu vermeiden. In der Theorie ist ein einziges Templatmolekül für eine Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz mittels PCR ausreichend. Allerdings wäre hier die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Vervielfältigung sehr gering. Es empfiehlt sich deshalb ein Einsatz von 10 ng Templat für einen PCR-Ansatz mit 20 μ l Volumen [69, 71, 72].

- **Primer**

Für einen PCR-Ansatz benötigt man zwei spezifische Primer unterschiedlicher Sequenzen (Forward- und Reverseprimer), die jeweils mit einem komplementären Strang hybridisieren können. Bei bekannter DNA-Sequenz können Primer für die Amplifikation eines gewünschten DNA-Fragments entworfen werden (siehe Abschnitt 3.4). Passende Primer haben in der Regel eine Länge von 18-30 Basen (bp). Die Schmelztemperatur der Primer sollte in etwa 65 °C betragen, um eine optimale Annealingtemperatur von 60 °C zu gewährleisten [69, 73].

- **Polymerase**

Für die Amplifikation der DNA wird eine Polymerase benötigt, die für die Synthese des DNA-Doppelstranges sorgt. Am häufigsten wird die *Taq*-DNA-Polymerase herangezogen, welche aus *Thermus aquaticus*, einem hitzestabilen Bakterienstamm, isoliert wird. Sie weist neben einer

5'→3'-Polymeraseaktivität eine 5'→3'-Exonukleaseaktivität auf und verfügt über eine geringe Reverse-Transkriptaseaktivität. Ihr Aktivitätsmaximum liegt bei 72-75 °C und einem pH-Wert größer als 8. Im Vergleich zu anderen DNA-Polymerasen weist die *Taq*-DNA-Polymerase eine sehr hohe Umsatzrate auf. Aufgrund ihrer Stabilität bei langanhaltenden hohen Temperaturen reicht eine einmalige Zugabe der Polymerase am Beginn der Reaktion für eine große Anzahl von Amplifikationszyklen aus. Die Verwendung einer Hot-Start-Polymerase erleichtert die Vorbereitung der PCR-Ansätze. An das Enzym sind blockierende Komponenten (kleine, hitzelabile Moleküle oder Antikörper) gebunden, welche einen Reaktionsstart bei Raumtemperatur verhindern. Eine Aktivierung der Polymerase wird erst durch hohe Temperaturen (95 °C) für 1-15 Minuten erzielt [69-71].

- **Nukleotide**

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) sind die Vorstufen-Bausteine der Nukleinsäuren. Sie kommen als dATP, dTTP, dCTP und dGTP vor und sind kommerziell als dNTP-Mix erhältlich. Protokolle schlagen die Verwendung einer Konzentration von 200 µM für die Amplifikation von 13 µg DNA vor. Für eine erfolgreiche PCR ist es notwendig, dass die vier dNTPs in äquimolaren Konzentrationen vorhanden sind. Sie werden von der DNA-Polymerase zur Synthese eines neuen Stranges in Richtung 3'-Ende des Einzelstranges herangezogen [71].

- **Magnesiumchlorid**

Magnesium ist eine der kritischsten Komponenten der PCR, da dessen Konzentration die Effizienz und Spezifität der Reaktion stark beeinflusst. Die *Taq*-DNA-Polymerase arbeitet nur in Anwesenheit von freiem Mg²⁺. Magnesium zeigt einen Einfluss auf die Anlagerung der Primer, die Trennung der DNA-Doppelstränge während der Denaturierung und die Produktspezifität. Zusätzlich wirkt es sich auf die Bildung von Primer-Dimeren und die Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden durch die Polymerase aus. Für jede PCR muss die optimale MgCl₂-Konzentration ermittelt werden. In der Regel liegt sie zwischen 0,5 und 2,5 mM [69, 71].

- **Puffer**

Um die Funktion der thermostabilen *Taq*-DNA-Polymerase zu gewährleisten, ist der Einsatz von Puffern notwendig. In der Regel wird ein Tris-HCl Puffer mit pH 8,55 oder pH 9 verwendet [69, 71].

3.1.3 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR erlaubt eine kontinuierliche Überprüfung der Produktakkumulation im Verlauf der Reaktion und stellt damit eine Erweiterung der normalen PCR dar. Durch die direkte Beobachtung des Amplifikationsfortschritts können zu jedem Zeitpunkt des Experiments Daten entnommen werden. Für die Detektion der Amplifikation können unter anderem in ds-DNA einlagernde Fluoreszenzfarbstoffe oder fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt werden [74, 75]. Bei den im Zuge dieser Diplomarbeit durchgeführten PCR-Reaktionen wurde der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff EVAGreen eingesetzt.

- **Interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe**

Bei der Verwendung von interkalierenden Farbstoffen lagert sich ein Fluoreszenzmarker in ds-DNA ein, die während der PCR synthetisiert wird. Ein Schema dazu ist in Abbildung 15 dargestellt. Der so gebildete DNA-Farbstoff-Komplex führt zu einer deutlichen Zunahme des Fluoreszenzsignals, wohingegen freier oder an ss-DNA gebundener Farbstoff nur eine geringe Hintergrundstrahlung emittiert. Nachteilig an dieser Methode ist, dass neben den gewünschten doppelsträngigen DNA-Amplikons auch Primer-Dimere und falsche PCR-Produkte zu einer Signalerhöhung beitragen [75].

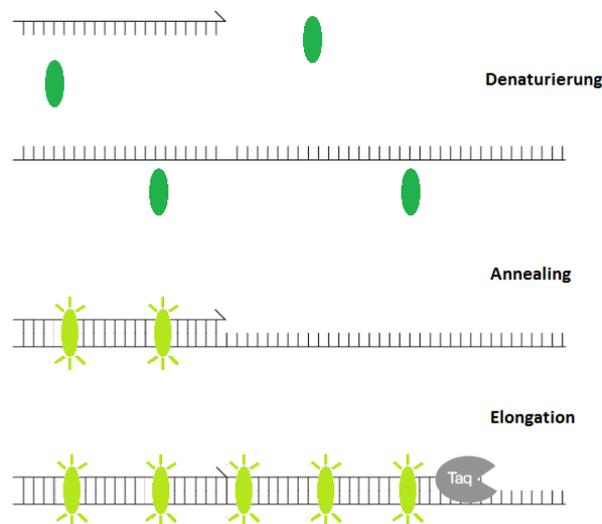


Abbildung 15: Darstellung der Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes in ds-DNA mit Zunahme des Fluoreszenzsignals; aus [75], modifiziert

- **Fluoreszenzmarkierte Sonden**

Bei dieser Methode wird neben zwei Primern ein drittes, fluoreszenzmarkiertes Oligonukleotid eingesetzt, welches komplementär an eine Region des zu amplifizierenden Abschnittes der DNA bindet. Am häufigsten werden dazu TaqMan Sonden und Molecular Beacons verwendet. Durch die

Theoretischer Hintergrund

räumliche Nähe zweier Fluoreszenzmarker (Reporter und Quencher) wird das Fluoreszenzsignal gequencht. Im Zuge der Synthese des Doppelstranges kommt es durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase zur Hydrolyse der Sonde, die räumliche Nähe der Marker wird aufgehoben und ein Signal ist messbar (Abbildung 16) [75].

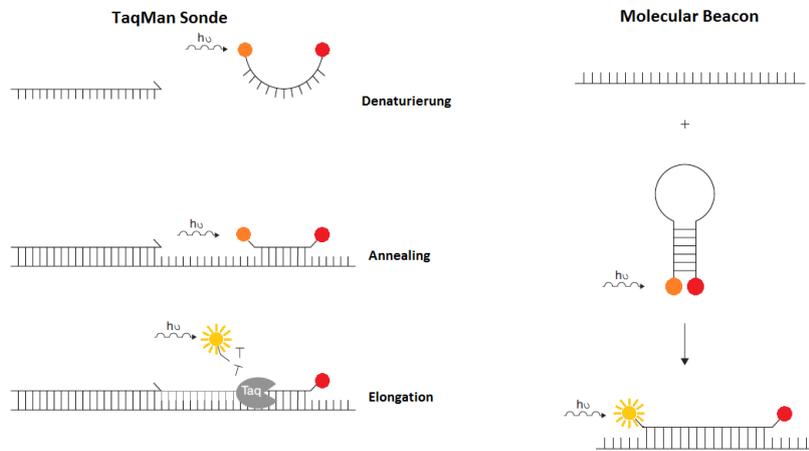


Abbildung 16: Entstehung des Fluoreszenzsignals bei einer TaqMan Sonde und einem Molecular Beacon; aus [75], modifiziert

3.2 BISULFIT KONVERTIERUNG

Die Umwandlung der DNA durch eine Behandlung mit Bisulfit wurde 1992 von Frommer *et al.* publiziert und hat die epigenetische Analyse revolutioniert. Während der Durchführung einer PCR geht epigenetische Information in Form der DNA-Methylierung verloren, weil die DNA-Polymerase nicht zwischen methyliertem und unmethyliertem Cytosin unterscheiden kann. Eine Behandlung der genomischen DNA (gDNA) mit Natriumhydrogensulfit (Natriumbisulfit) vor der PCR erlaubt durch eine Veränderung der Basensequenz der DNA die Erhaltung der chemischen Modifikation an Cytosinen [67, 76, 77].

3.2.1 Prinzip

Bei der Behandlung mit Natriumhydrogensulfit (NaHSO_3) werden unmethylierte C der gDNA in Uracilbasen (U) umgewandelt, wohingegen methyliertes C als Cytosin bestehen bleibt. Bei einer nachfolgenden PCR wird jedes Uracil durch die Aktivität der Polymerase als Thymin (T) amplifiziert. Durch die Modifikation der DNA mit Bisulfit wird die Information der Methylierung in die Basensequenz überführt, wie in Tabelle 1 dargestellt ist [67].

Die Umwandlung von Cytosin in Uracil beruht auf einer dreistufigen chemischen Reaktion einzelsträngiger DNA mit NaHSO_3 bei einem niedrigen pH-Wert und hohen Temperaturen. Die

Reaktivität von 5-Methylcytosin gegenüber NaHSO_3 ist signifikant geringer als jene von unmethyliertem Cytosin, weshalb nur letzteres bei der Reaktion in Uracil umgewandelt wird [76].

Tabelle 1: Vergleich von unmethylierten und methylierten DNA-Sequenzen nach der Behandlung mit Natriumhydrogensulfit und anschließender PCR; modifiziert nach [68]

	Originalsequenz	Sequenz nach der Behandlung mit Bisulfit	Sequenz nach der PCR
unmethylierte DNA	A-T-C-G-G T-C-A-T-C-G-C-A-T	A-T-U-G-G-T-U-A-T-U-G-U-A-T	A-T-T-G-G-T-T-A-T-T-G-T-A-T
methylierte DNA	A-T-C ^m -G-G-T-C-A-T-C ^m -G-C-A-T	A-T-C-G-G-T-U-A-T-C-G-U-A-T	A-T-C-G-G-T-T-A-T-C-G-T-A-T

3.2.2 Durchführung

Im ersten Schritt wird die DNA durch eine alkalische Behandlung denaturiert. Um eine sofortige oder im weiteren Verlauf der Reaktion auftretende Rehybridisierung der DNA-Einzelstränge zu vermeiden, wird ein stündlicher Denaturierungsschritt (95 °C für 5 min) während der Konvertierung empfohlen. Eine anschließende Inkubation mit NaHSO_3 bei hohen Temperaturen (60-95 °C) über mehrere Stunden führt zu einer Sulfonierung des C_6 -Atoms des Cytosin. Bei dieser Sulfonierung wird aus jeder unmethylierten Cytosinbase ein Cytosinsulfat gebildet [67, 76]. Der Reaktionsverlauf ist in Abbildung 17 dargestellt.

Im zweiten Schritt wird das Cytosinsulfat durch eine irreversible hydrolytische Desaminierung in Uracilsulfonat umgewandelt [67, 76].

Der letzte Reaktionsschritt wird unter alkalischen Bedingungen durchgeführt und bewirkt eine Desulfonierung des Uracilsulfonats, wobei dieses in eine Uracilbase konvertiert wird [67, 76].

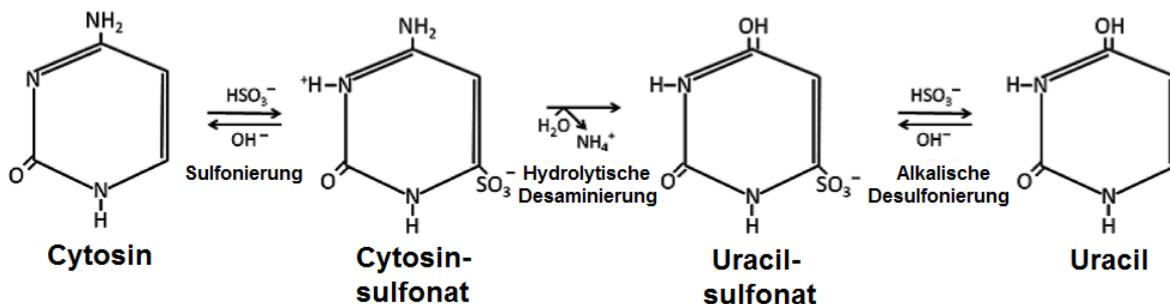


Abbildung 17: Reaktionsschritte der Bisulfit-Konvertierung; aus [67], modifiziert

Ein großer Vorteil der Methode ist die Erhaltung der Integrität der eingesetzten DNA, welche so ohne Probleme für weitere Analysen herangezogen werden kann. Die Amplifikation bisulfit-konvertierter DNA im Zuge einer PCR erlaubt den Einsatz von sehr geringen DNA-Konzentrationen. Wenn die Behandlung mit Natriumhydrogensulfit unter geeigneten Bedingungen durchgeführt wird, kann eine Umwandlungsrate von 99 % erzielt werden. Problematisch ist die Konvertierung von CpG-reicher gDNA, da diese häufig nicht zur Gänze denaturiert wird. Eine unvollständige Bisulfit-Konvertierung

spiegelt sich in zu hohen Werten für die Methylierung wider und kann so zu falschen Ergebnissen führen [76].

3.3 METHYLIERUNGS-SENSITIVE HOCHAUFLÖSENDE SCHMELZKURVENANALYSE

Mittels methylierungs-sensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM) kann der Methylierungsgrad der DNA bestimmt werden. Dabei werden im Anschluss an eine PCR-Reaktion die gebildeten Amplikons eines Genabschnitts im selben Reaktionsgefäß einem steigenden Temperaturgradienten ausgesetzt. Durch die Bildung von ss-DNA während der Denaturierung der PCR-Produkte kann der verwendete interkalierende Fluoreszenzfarbstoff EVAGreen nicht mehr einlagern. Es werden Schmelzkurven aufgezeichnet, die der Signalabnahme entsprechen. Durch einen Vergleich des Schmelzprofils einer Probe mit denen von unmethylierten und methylierten Kontroll-DNA-Standards kann der Methylierungsgrad ermittelt werden [72, 78, 79].

3.3.1 Prinzip

Die Schmelztemperatur (T_m) der DNA ist jene Temperatur, bei der die Hälfte der doppelsträngigen DNA (ds-DNA, engl.: double-stranded DNA) in zwei Einzelstränge dissoziiert ist. Dabei brechen die Wasserstoffbrücken zwischen den komplementären Basen der beiden Stränge auf. Die dafür notwendige Energie hängt von der Anzahl der bestehenden Bindungen ab. Guanin bildet mit Cytosin drei Wasserstoffbrücken aus, Adenin (A) mit Thymin nur zwei, wie in Abbildung 18 dargestellt ist. Die T_m einer DNA-Sequenz hängt demnach direkt von ihrer Basenzusammensetzung ab. GC-reiche Sequenzen weisen im Vergleich zu AT-reichen höhere Schmelztemperaturen auf [78, 79].

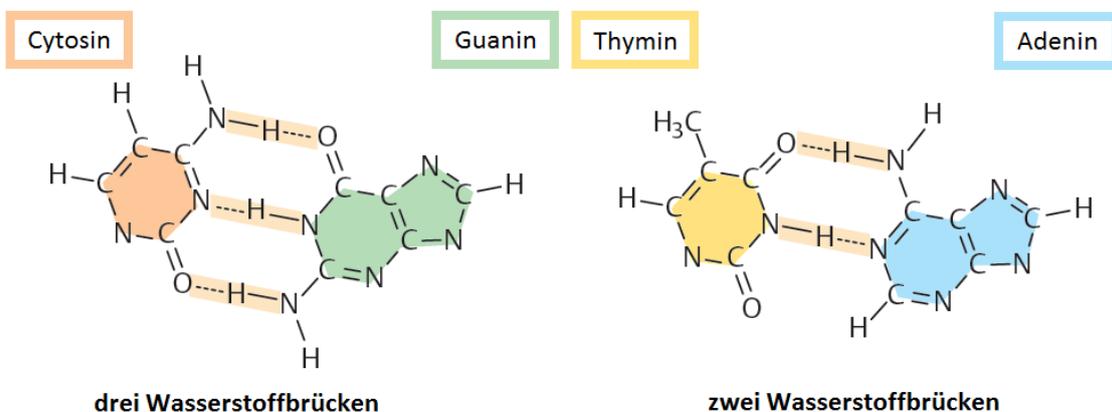


Abbildung 18: Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren GC und AT; aus [14], modifiziert

Das Schmelzen eines DNA-Amplikons besteht meist aus einer Serie von Dissoziationsereignissen kürzerer Domänen innerhalb der Sequenz, die sich in ihrem GC-Gehalt unterscheiden. Dieses Sequenz-abhängige Schmelzen des Amplikons während eines steigenden Temperaturgradienten wird als „Schmelzprofil“ verstanden [78].

3.3.2 Detektion

PCR-Produkte bisulfit-konvertierter DNA, die entweder reich an GC oder AT sind, können aufgrund ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens anhand eines steigenden Temperaturgradienten identifiziert werden. Die Detektion erfolgt dabei durch Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes (EVAGreen), der nur in ds-DNA eingelagert wird und somit zu einem starken Signal führt [78].

Am Beginn der Analyse liegt die Temperatur unterhalb der Schmelztemperatur der PCR-Amplikons. Der eingelagerte Farbstoff emittiert nach Anregung mit Licht geeigneter Wellenlänge Strahlung und führt so zu einem hohen Fluoreszenzsignal. Bei einer Zunahme der Temperatur ist das Signal bis zu jenem Punkt stabil, an dem das Schmelzen der Amplikons beginnt. Die Dissoziation zu ss-DNA führt zu einer kontinuierlichen Abnahme der Fluoreszenzintensität und einer damit verbundenen Signalverringerng. Durch die Aufzeichnung der Fluoreszenzintensität während des steigenden Temperaturgradienten kann das Schmelzprofil eines PCR-Amplikons dargestellt werden (Abbildung 19) [78].

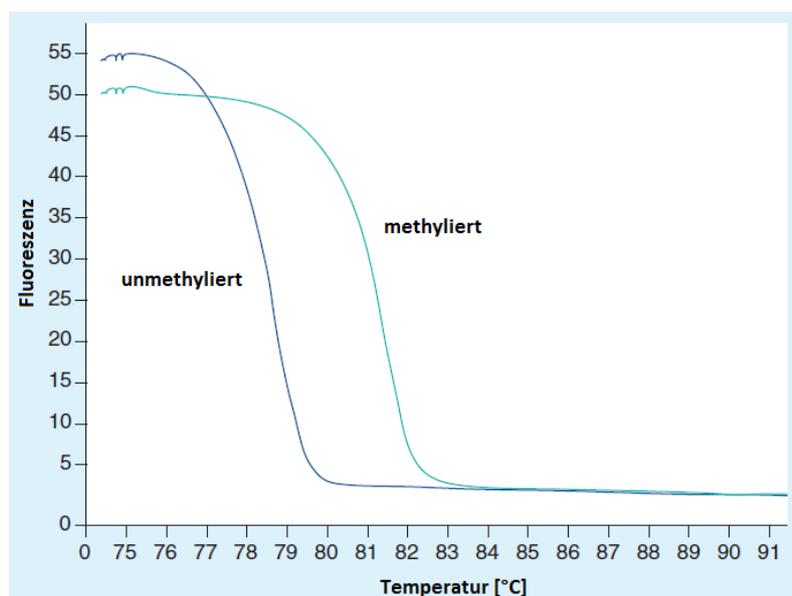


Abbildung 19: Schmelzprofile von unmethylierter und methylierter DNA; aus [78], modifiziert

Der erste interkalierende Farbstoff, der im Zuge einer Schmelzkurvenanalyse herangezogen wurde, war SYBR Green I. Nachteilig ist, dass die für eine Sättigung der ds-DNA erforderlichen

Konzentrationen toxisch auf die DNA-Polymerase wirken. Die Amplifikation der DNA in Anwesenheit von SYBR Green I ist nicht robust und erreicht nur geringe Produktkonzentrationen. Mit der Entwicklung neuer Fluoreszenzfarbstoffe, zB. EVAGreen und Syto[®]9, wird eine vollständige Sättigung der PCR-Produkte ohne Einfluss auf die Amplifikationseffizienz erreicht [79].

Die Anforderungen an die hochauflösende Schmelzkurvenanalyse sind eine genaue und präzise Messung des Fluoreszenzsignals und eine geringe Temperaturübergangsrate während des angelegten Gradienten. Eine Kombination eines Thermocyclers, der einen Temperaturanstieg von 0,05 °C/s über den gesamten Schmelzbereich erlaubt, mit einem Fluoreszenzdetektor eignet sich somit zur Durchführung einer hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an eine PCR [79].

3.3.3 Analyse der Schmelzkurven

Die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte von methylierter und unmethylierter bisulfit-konvertierter DNA sind aufgrund des verschiedenen GC-Gehalts verschieden [78]. Es werden Standards definierter Methylierung (0 % methyliert und 100 % methyliert) in unterschiedlichen Verhältnissen zusammengefügt und als Vergleich herangezogen. Durch eine 1:1 Mischung von 0 % und 100 % methylierter bisulfit-konvertierter DNA wird beispielsweise ein Standard erhalten, welcher eine Methylierung von 50 % aufweist.

3.3.3.1 Normalisierte Schmelzkurven und Bestimmung des Methylierungsgrades

Nach der PCR-Amplifikation zeigen nicht alle DNA-Proben und DNA-Standards gleich hohe Fluoreszenzsignale in der Plateauphase. Dies ist auf eine Differenz in der Menge der gebildeten PCR-Produkte zurückzuführen. Aufgrund dieser Tatsache ist kein direkter Vergleich der erhaltenen Schmelzkurven möglich. Durch eine Normalisierung der Fluoreszenzsignale der Schmelzkurven werden die unterschiedlichen Eingangswerte der einzelnen Proben und Standards ausgeglichen und ähnlich geformte Kurven zusammengefasst. Der Verlauf der Kurven spiegelt das Verhältnis von methylierten und unmethylierten PCR-Produkten wider und erlaubt einen Vergleich von zwei Proben auf Basis ähnlicher HRM-Profile [73, 79].

Für die Normalisierung der Daten werden zwei lineare Regionen ausgewählt, jeweils eine vor und eine nach dem Schmelzvorgang der DNA (Abbildung 20). Diese Abschnitte definieren für jede aufgezeichnete Schmelzkurve eine Linie, die obere 100 % Fluoreszenzlinie und die untere 0 % Basislinie. Der Prozentsatz an Fluoreszenz innerhalb des Übergangs (zwischen den beiden gewählten Regionen) wird bei jeder Temperatur berechnet und stellt dabei einen Vergleich zwischen dem

Theoretischer Hintergrund

Unterschied der experimentell ermittelten Daten und dem Abstand zwischen der extrapolierten oberen und unteren Linien her [80].

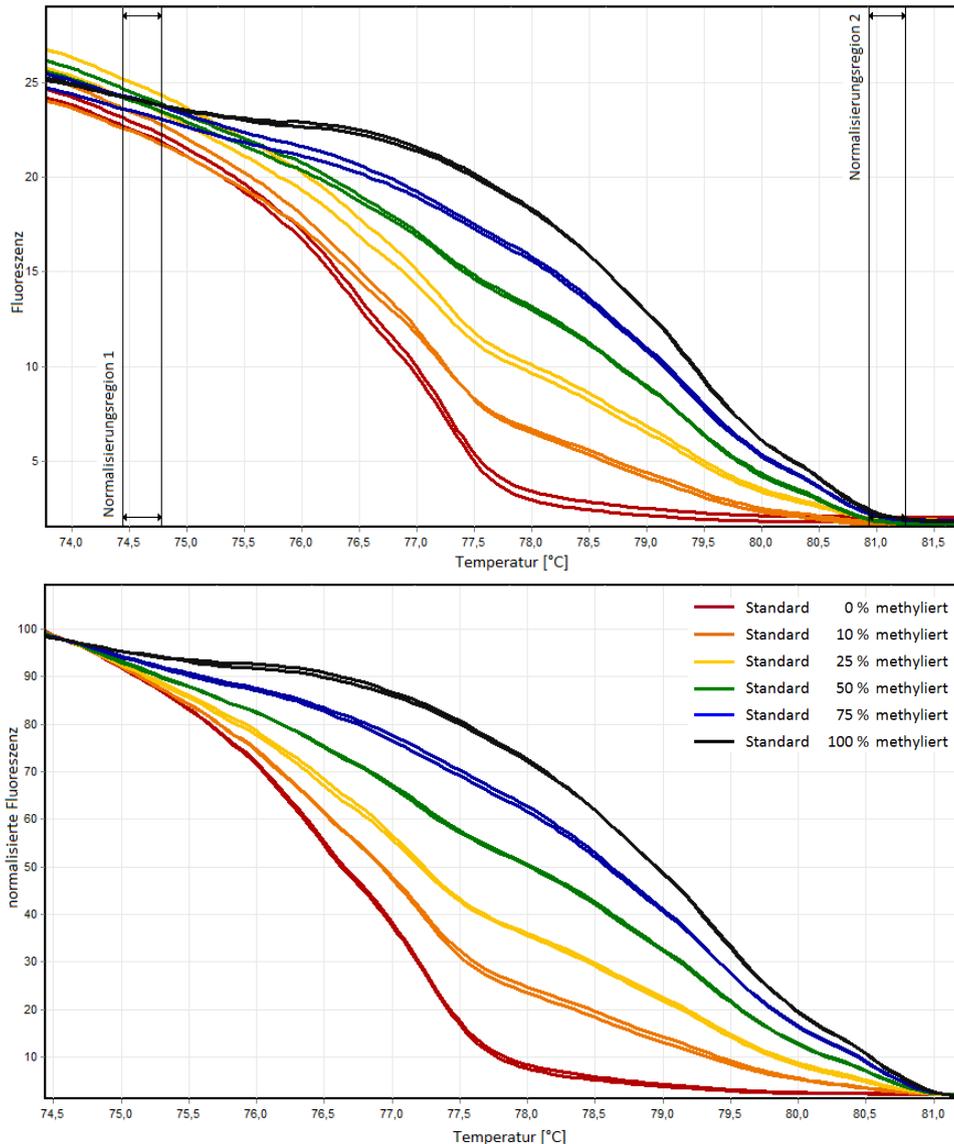


Abbildung 20: Schmelzkurven unterschiedlich stark methylierter Standards vor und nach der Normalisierung

Bei der Analyse heterogen methylierter DNA-Proben ergeben sich im Zuge der Bisulfit-Konvertierung Unterschiede in der Sequenz. Durch eine nicht homogene Methylierung der C der gDNA entstehen Stränge, die sich in einer oder mehreren Basen voneinander unterscheiden und am Ende der PCR aufgrund von Fehlpaarungen neben Homoduplexen auch als Heteroduplexe vorliegen können. Bei der Schmelzkurvenanalyse zeigen heterogen methylierte DNA-Proben Schmelzprofile, deren Form sich von der der Standards unterscheidet [25]. Aufgrund fehlender Basenpaarung bei Heteroduplexen zeigen diese in der Regel im Vergleich zu den Standards niedrigere Schmelztemperaturen und damit verbunden abweichend geformte Schmelzkurven (Abbildung 21) [80].

Theoretischer Hintergrund

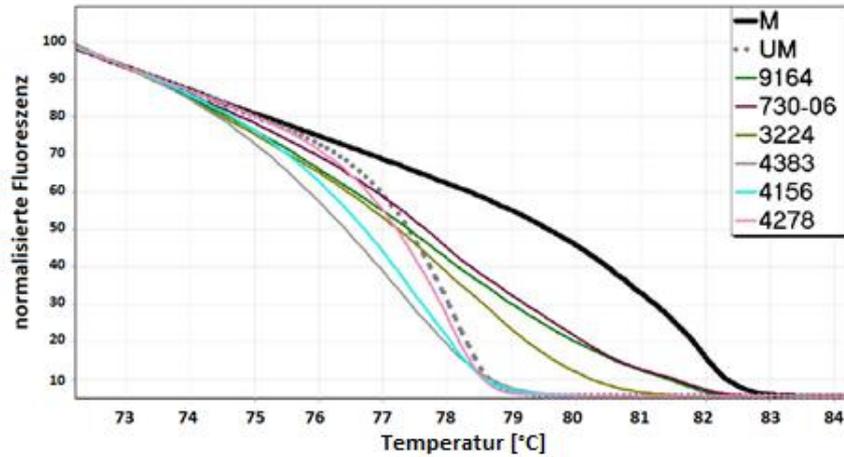


Abbildung 21: Schmelzprofile heterogen methylierter Proben im Vergleich zu einem 100 % methylierten (M) und 0 % methylierten Standard (UM); aus [81], modifiziert

3.3.3.2 Abgeleitete Peaks

Durch das Auftragen der negativen Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur ($-dF/dT$) werden die Schmelzkurven in Peaks transformiert. Die Spitze eines jeden Peaks repräsentiert dabei den stärksten Abfall der Fluoreszenz im Verlauf des Schmelzens und kann als Schmelztemperatur des jeweiligen Amplikons interpretiert werden. Über die Darstellung der abgeleiteten Peaks und der damit aufgezeigten Schmelztemperaturen der Amplikons kann ein PCR-Bias identifiziert werden. Sind die beiden Peaks des 50 % methylierten Standards gleich hoch, liegt kein Bias vor, denn beide Standards wurden im gleichen Ausmaß amplifiziert, wie in Abbildung 22 dargestellt ist. Zeigt sich jedoch ein höheres Signal auf der methylierten oder unmethylierten Seite, spricht man von einem PCR-Bias, bei dem es zu einer bevorzugten Amplifikation eines der beiden Template kommt. Liegt eine heterogen methylierte Probe vor, zeigt sich ein sehr breiter und komplexer Peak, der auf die Bildung von Heteroduplexen zurückzuführen ist [73, 78].

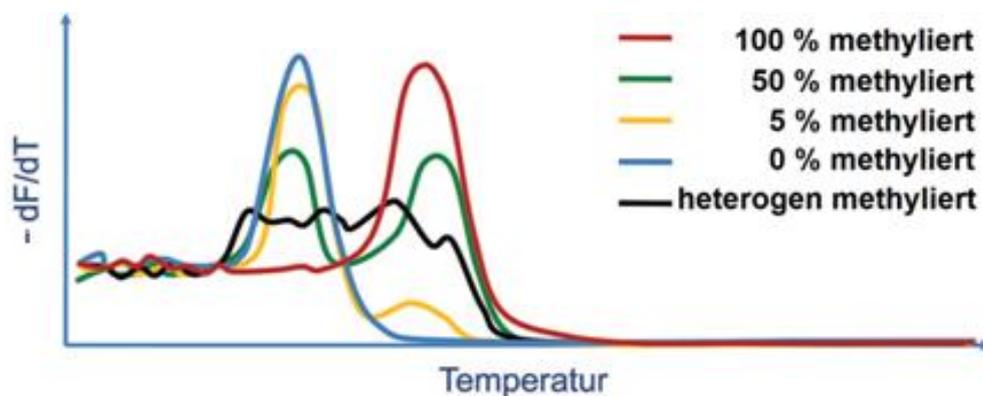


Abbildung 22: Beispiel für die Schmelztemperaturen unterschiedlich methylierter DNA; aus [67], modifiziert

3.3.3.3 Differentialgraf

Für eine genaue Quantifizierung der Methylierung einer unbekannt Probe werden die normalisierten Schmelzkurven in Differentialkurven transformiert. Dabei werden durch das Auftragen der Fluoreszenzsignaldifferenzen zwischen den normalisierten Schmelzkurven der Standards (zB. 10 % - 100 %) gegen eine Referenz (0 % Standard) Peaks unterschiedlicher Höhe gebildet. Die maximale Höhe eines jeden Peaks stellt dabei die Schmelztemperatur des PCR-Produkts dar. Der höchste Peak entspricht dem 100 % methylierten Standard, die Höhe der anderen Peaks nimmt proportional mit dem Anteil an methylierter DNA ab (Abbildung 23) [80, 82].

Durch das Auftragen des Logarithmus der relativen Peakhöhen gegen den Logarithmus des Ausmaßes an Methylierung (0 % - 100 %) wird durch eine lineare Regression eine Kalibriergerade erhalten (Abbildung 23), welche zur Bestimmung der Methylierung einer unbekannt Probe herangezogen werden kann [82].

Liegt eine heterogen methylierte DNA-Probe vor, kann keine quantitative Auswertung der DNA-Methylierung erfolgen. Aufgrund der enormen Variation der Muster und Kopienanzahl von heterogen methylierten Templaten verbunden mit der niedrigeren Schmelztemperatur von gebildeten Heteroduplexen kann das resultierende Schmelzprofil nur qualitativ ausgewertet werden [25].

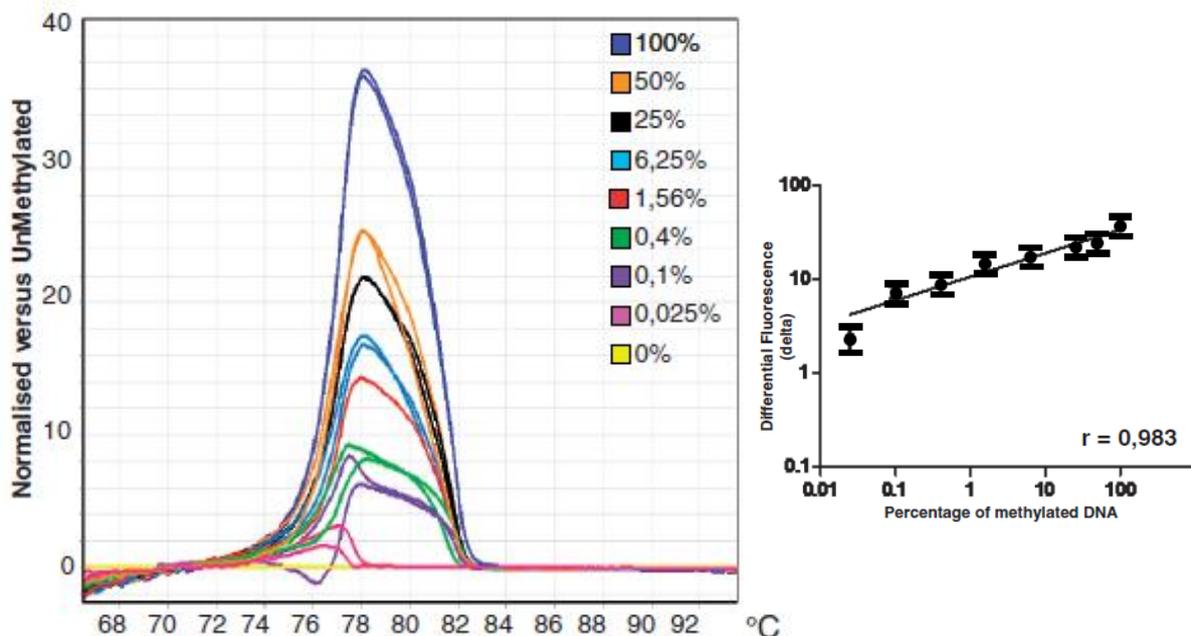


Abbildung 23: Darstellung der Differentialkurven (% methyliert) und der zugehörigen Kalibriergerade; aus [82]

3.4 ENTWERFEN VON PRIMERN

Für die PCR werden zwei Primer unterschiedlicher Basenzusammensetzung benötigt, die an je einen der beiden komplementären DNA-Stränge anlagern können. Ist die Sequenz des Templats bekannt, können passende Primer für die Amplifikation einer bestimmten Region der DNA entwickelt werden. Das Entwerfen passender Primeroligonukleotide für die PCR stellt sich dabei oft als anspruchsvoll heraus. Es stehen mittlerweile Softwareprogramme zur Verfügung, welche das Entwickeln passender Primer erleichtern [69, 74].

3.4.1 Allgemeine Regeln

Auch wenn das Entwerfen von Primern für die PCR durch Computerprogramme unterstützt wird, ist es sinnvoll, die Grundlagen zu kennen. Im Folgenden werden allgemeine Regeln zum Entwerfen von Primern nach McPherson und Møller (2006) angeführt [69, 70].

- **Primerspezifität**

Die entworfenen Primer sollen spezifisch an das gewünschte Templat binden, um dieses im Zuge einer PCR zu amplifizieren. Der Primer muss dabei nicht vollständig komplementär zur DNA-Sequenz sein, jedoch sollte vorzugsweise das 3'-Ende des Primers gut an das Templat binden, da dieses bei der Elongation durch die Polymerase verlängert wird. Die ersten drei Nukleotide des 3'-Endes sollten komplementär sein, während das 5'-Ende für die Spezifität weniger bedeutend ist und eine Manipulation der Basenzusammensetzung erlaubt.

- **Primerlänge**

Geeignete Primer weisen in etwa eine Länge von 16-28 Nukleotiden auf, wobei die Anzahl von Nukleotiden beider Primer ungefähr gleich sein sollte. Ist die Sequenz zu kurz, zeigen die Primer eine geringere Spezifität gegenüber dem Templat. Je länger Primer sind, desto eher bilden sie Sekundärstrukturen oder Primer-Dimere aus, die zu einer Reduktion der PCR-Effizienz führen.

- **GC-Gehalt und Basenzusammensetzung**

Der GC-Gehalt soll zwischen 35 % und 65 % liegen. Sich wiederholende Sequenzen oder die Abfolge mehrerer gleicher Basen sollte vermieden werden. Drei oder mehr G oder C am 3'-Ende können zu einer Fehlbindung in GC-reichen Regionen führen. Die Basenabfolge der Primersequenz sollte aus diesem Grund möglichst komplex sein.

- **Stabilität des 3'-Ende der Primer**

Ein instabiles 3'-Ende der Primer kann eine unspezifische Primerverlängerung durch die DNA-Polymerase bedingen. Zusätzlich sollten bevorzugt am 3'-Ende die enthaltenen Basen zu keiner Bildung von Primer-Dimeren oder Sekundärstrukturen führen.

- **Schmelztemperatur (T_m)**

Die T_m der beiden Primer ist der wichtigste Faktor für die Bestimmung der optimalen Annealingtemperatur. Die T_m ist jene Temperatur, bei der sich die Hälfte der Primer an das Templat angelagert hat. Idealerweise sollte diese für beide Primer möglichst ähnlich sein. Eine einfache Methode zur Abschätzung der T_m von Primern mit einer Länge von bis zu 20 Nukleotiden ist das Addieren der Basenzahl unter Verwendung folgender Formel:

$$T_m = (\text{Anzahl von G + C}) * 4^\circ\text{C} + (\text{Anzahl von A + T}) * 2^\circ\text{C}$$

Formel 1: Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur von Primern; aus [69], modifiziert

Die Formel spiegelt die Tatsache wider, dass die GC-Bindung mit drei Wasserstoffbrücken stabiler ist als die AT-Basenpaarung (zwei Wasserstoffbrücken), wie in Abbildung 18 dargestellt ist.

- **Größe des Amplikons**

Das Amplikon sollten aus 100 bis maximal 250 Basenpaaren zusammengesetzt sein, da eine zu große Länge zu einer verminderten Effizienz führt.

3.4.2 Entwerfen von Primern für eine MS-HRM Analyse

Für die Bestimmung des Methylierungsgrades der zu untersuchenden Gene wurden Primer entworfen, die eine Amplifikation der Templat-DNA unabhängig ihres Methylierungsmaßes mittels PCR erlauben und so eine Bestimmung der DNA-Methylierung durch hochauflösendes Schmelzen der PCR-Produkte, wie in Abschnitt 3.3 ausgeführt wurde, ermöglichen.

Wenn die zu amplifizierenden DNA-Regionen sehr variable Methylierungsgrade zeigen, weisen diese nach der Bisulfit-Konvertierung starke Unterschiede in ihrem Cytosingehalt auf. Hochmethylierte DNA ist reich an Cytosin, wohingegen unmethylierte DNA viele Thyminbasen beinhaltet (vgl. Kapitel 3.2). Eine ausgeglichene Amplifikation beider Template unter Verwendung methylierungs-unabhängiger Primer ist kritisch. In diesem Sinne kann eine bevorzugte Vervielfachung des methylierten oder unmethylierten Templates (PCR-Bias) zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse führen [83, 84].

Um die Bevorzugung einer der beiden Stränge durch die Primer zu vermeiden, wird empfohlen, eine Primersequenz ohne CpG-Dinukleotide zu wählen. Ist dies nicht möglich, können die C der CpG-Dinukleotide durch ein T ersetzt werden, um ein präferiertes Binden der Primer an methylierte Template zu vermeiden [73]. In den meisten Fällen wird dadurch jedoch das unmethylierte Templat besser amplifiziert als das methylierte Templat, was einen starken Bias während der Amplifikation zur Folge hat. Eine limitierte Anzahl an aktiven CpG ermöglicht eine verbesserte Anlagerung der Primer an das methylierte Templat. Dieses sollte bevorzugt am 5'-Ende der Primersequenz positioniert sein. Eine Optimierung der Annealingtemperatur während der PCR kann zusätzlich zu einem Ausgleich des Bias während der Amplifikation beitragen. Bei einer höheren Anlagerungstemperatur wird das methylierte Templat durch die Primer bevorzugt vervielfältigt [73, 85].

Wojdacz *et al.* (2008) haben Regeln für das Entwerfen von Primern für MS-HRM Analysen aufgestellt, welche bei der vorliegenden Diplomarbeit befolgt wurden [73, 84]:

- Jeder Primer soll ein oder zwei CpG-Dinukleotide enthalten.
- Die CpG sollen möglichst nahe am 5'-Ende der Primer liegen, da diese sonst bevorzugt an das methylierte Templat binden.
- Die Schmelztemperatur der Primer soll in etwa 65 °C betragen und sich maximal um 1 °C unterscheiden, sodass die PCR bei etwa 60 °C durchgeführt werden kann. Diese Temperatur ist wichtig, um die Spezifität der Primer gegenüber den Templaten zu sichern.
- Das Inkludieren eines oder mehrerer T am oder in der Nähe des 3'-Endes des Primers sichert die Amplifikation von bisulfit-modifizierter DNA. Die T der bisulfit-konvertierten DNA müssen dabei von einem C der gDNA stammen, welches nicht aus einem CpG-Dinukleotid stammt.
- Die so ausgewählten Primer müssen auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen und die Bildung von Primer-Dimeren überprüft werden, um die Effizienz der PCR zu gewährleisten.

3.4.3 Optimierungsparameter

Für jedes entwickelte Primerpaar müssen die Bedingungen für eine PCR optimiert werden. Sowohl die Annealingtemperatur und die MgCl₂-Konzentration, als auch die Menge der Primer stellen wichtige Parameter für eine erfolgreiche PCR dar [69, 73, 84].

- **Annealingtemperatur**

Die Annealingtemperatur hängt von der Primersequenz ab und sollte in etwa 60 °C betragen. Über die Wahl der geeigneten Anlagerungstemperatur kann ein möglicher PCR-Bias ausgeglichen werden.

Bei relativ niedrigen Temperaturen werden sowohl methylierte als auch unmethylierte Template mit vergleichbarer Effizienz amplifiziert. Eine Erhöhung der Annealingtemperatur führt hingegen zu einer bevorzugten Amplifikation des methylierten Templates. Zusammengefasst kann über eine Optimierung der Temperatur während der Anlagerung der Primer die Sensitivität gegenüber den Templates im Zuge der PCR beeinflusst werden [84, 85].

- **MgCl₂-Konzentration**

In den gängigen HRM-Mixes ist Mg²⁺ enthalten, da dieses essentiell für die Aktivität der DNA-Polymerase ist [69]. Die dabei verwendeten Konzentrationen sind für eine erfolgreiche Amplifikation bisulfit-konvertierter DNA meist nicht ausreichend. Ein Zusatz von 2-3 mM Mg²⁺ führt dabei zu einer signifikant verbesserten Vervielfältigung dieser Template, kann jedoch bei einem zu hohen Zusatz eine unspezifische Amplifikation begünstigen. Aus diesem Grund ist eine Optimierung der MgCl₂-Konzentration für jedes Primerpaar notwendig [73].

- **Primerkonzentration**

Die Konzentration der verwendeten Primer hängt stark vom PCR-Experiment ab, wobei das Primer- zu Template-Verhältnis der bestimmende Faktor ist. Beide Primer sollten in gleicher Konzentration eingesetzt werden, die im Bereich von 0,1 µM bis 1 µM variieren kann. Zu hohe Primermengen begünstigen die Bildung von Primer-Dimeren und mögliche Fehlbindungen an Sequenzen, die nicht dem Template entsprechen [69].

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 VERSUCHE ZUR ENTWICKLUNG UND OPTIMIERUNG VON MS-HRM METHODEN FÜR AUSGWÄHLTE GENE

Im Zuge der vorliegenden Diplomarbeit wurden für Brustkrebs-relevante Tumorsuppressorgene MS-HRM Methoden entwickelt, um den Methylierungsgrad des zu untersuchenden Genabschnittes zu bestimmen.

Die Sequenzen der Tumorsuppressorgene wurden aus der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* [86] entnommen. Es wurde versucht, für die Promotorregionen bzw. Exons folgender Gene Primer zu entwerfen:

- *RASSF1A*
- *GATA3*
- *GSTP1*
- *TWIST*
- *RARβ*

Die Primer wurden nach den Richtlinien von Wojdacz *et al.* (2008) entwickelt, welche in Abschnitt 3.4.2 zusammengefasst sind. Dazu wurde die Software *Methyl Primer Express (v 1.0)* verwendet, wobei die Vorgehensweise in Kapitel 5.1.1 beschrieben ist. Die Überprüfung der wichtigsten Eigenschaften, wie die Bildung von Heterodimeren und Sekundärstrukturen der Primer, sowie die Schmelztemperatur und das Schmelzverhalten des Amplikons erfolgte im Anschluss unter zu Hilfenahme verschiedener Freeware (vgl. Kapitel 5.1.2).

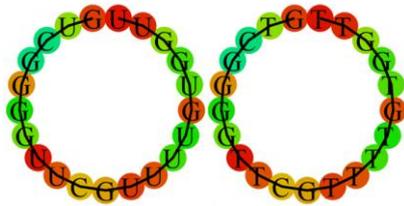
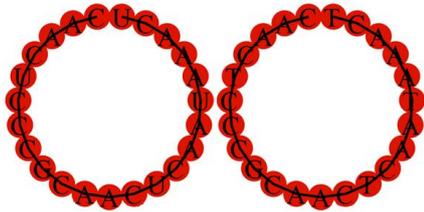
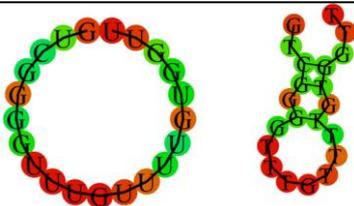
4.1.1 RASSF1A

4.1.1.1 Entwerfen der Primer

Für das *RASSF1A* Gen wurde die Referenzsequenz DQ444319.1 ausgewählt. In Tabelle 2 sind die Charakteristika der Forward- und Reverseprimer angegeben.

Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 2: Charakteristika der Primer für die RASSF1A Promotorregion

RASSF1A	Forwardprimer 5'-GTYGGGGTTYGTTTTGTG-3'	Reverseprimer 5'-CAACTCCCRCAACTCAATAAAC-3'
Anzahl der CpG	2	1
endgültige Sequenz	RASSF1A_f1 5'-GTCGGGGTTCGTTTTGTGGTT-3'	RASSF1A_r1 5'-CAACTCCCGCAACTCAATAAACT-3'
Basen [bp]	21	23
Anzahl der CpG	2	1
T _m Software [°C]	64,3	64,2
T _m berechnet	64	66
T _m OligoCalc [°C]	61,2	60,9
Sekundärstruktur		
endgültige Sequenz	RASSF1A_f2 5'-GTCGGGGTTTGTGTTTTGTGGTT-3'	RASSF1A_r3 5'-CAACTCCCACTCAATAAACT-3'
Basen [bp]	21	23
Anzahl der CpG	1	0
T _m Software [°C]	64,3	64,2
T _m berechnet	62	64
T _m OligoCalc [°C]	59,5	59,2
Sekundärstruktur		
Länge des Amplikons [bp]	118	
Sequenz des Amplikons	5'-GTYGGGGTTYGTTTTGTGGTTYGTYGGTTYGYGTTTGTAGYGTAAAGTTAGYGAA GTA YGGGTTTAATYGGGTTATGT YGGGGGAGTTTGAGTTATTGAGTTGYGGGAGTTG-3'	

Die mittels der Software erhaltenen Primer sind in der Basenabfolge sehr unterschiedlich, der Forwardprimer weist sehr viele G und T auf und der Reverseprimer sehr viele C und A. Sie sind zum Teil komplementär, dennoch wurde das Primerpaar für Optimierungsversuche herangezogen. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse diskutiert:

- **Anzahl und Lage der CpG**

CpG-Dinukleotide konnten durch Austausch des Y im Forwardprimer (R im Reverseprimer) durch ein C oder T (G oder A) aktiviert bzw. inaktiviert werden. Die Sequenz des Forwardprimers inkludiert zwei CpG-Dinukleotide, wobei eines sehr nahe am 5'-Ende liegt und das andere eher in der Mitte zu finden ist. Für den **Primer RASSF1A_f1** wurden beide durch den Austausch des Y durch ein C aktiv belassen. Der Reverseprimer enthält ein CpG-Dinukleotid, das in der Mitte der Sequenz lokalisiert ist. Durch Aktivierung dieses CpG wurde der **Primer RASSF1A_r1** erhalten. Die Ergebnisse der MS-HRM Analyse zeigten einen sehr ausgeprägten Bias gegenüber dem methylierten Templat (siehe Abbildungen 25 und 26).

Um das Primerpaar selektiver für das unmethylierte Templat zu gestalten, wurde zunächst der **Primer RASSF1A_f2** entworfen. Dazu wurde das mittlere CpG inaktiviert, wie in Tabelle 2 dargestellt ist. Durch Kombination mit dem **Primer RASSF1A_r1** und einer Variation der Annealingtemperatur konnte jedoch weiterhin keine Reduktion des Bias festgestellt werden (Abbildungen 27 und 28).

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde der **Primer RASSF1A_r3** entworfen, der durch Austausch des R gegen ein A kein aktives CpG enthält (vgl. Tabelle 2). Durch Verwendung des zweiten Primerpaares für *RASSF1A* (**RASSF1A_f2** und **RASSF1A_r3**) wurden unmethylierte und methylierte Template in gleichem Ausmaß amplifiziert und der Bias konnte ausgeglichen werden (Abbildung 29).

- **Länge der Primer**

Mit einer Länge von 21 bzw. 23 Basen entsprechen die Primer den Regeln von Wojdacz, wie sie in Abschnitt 3.4.2 angeführt sind.

- **Schmelztemperatur**

Von der *Methyl Primer Express Software* wird für jeden Primer die Schmelztemperatur angegeben. Diese wurde zusätzlich mit Formel 1 (siehe Kapitel 3.4.1) berechnet und mit der Freeware *OligoCalc* überprüft (vgl. Kapitel 5.1.2). Wie aus Tabelle 2 zu entnehmen ist, wurden für jeden Primer drei unterschiedliche T_m ermittelt, wobei die T_m nach *OligoCalc* als Referenz herangezogen wurde. Die T_m der Forwardprimer betragen demnach 61,2 °C bzw. 59,5 °C und die der Reverseprimer 60,9 °C bzw. 59,2 °C. Gemäß den Richtlinien nach Wojdacz *et al.* (2008) sollte die Differenz der T_m nicht mehr als 1 °C betragen. Ferner sollten die Primer eine T_m von etwa 65 °C aufweisen, um bei der PCR eine Annealingtemperatur von 60 °C zu ermöglichen. Damit wird die Bindungsspezifität an das Templat erhöht. Durch Hinzufügen von Basen am 3'- oder 5'-Ende kann die T_m variiert werden [84].

- **T am 3'-Ende, die nicht von einem C stammen**

Da sich am 3'-Ende sowohl beim Forward- als auch beim Reverseprimer keine T befanden, die von einem nicht-CpG C der gDNA stammen, wurden die Primersequenzen um drei Basen (Forwardprimer) bzw. eine Base (Reverseprimer) verlängert.

- **Sekundärstrukturen**

Mit dem *RNAfold web server* wurden die Primer auf die Bildung möglicher Sekundärstrukturen überprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass die Primer durch mögliche Basenpaarungen Ringe ausbilden können, bei Primer RASSF1A_f2 taucht zusätzlich als Sekundärstruktur eine Haarnadelform auf. Die rote Färbung zeigt an, dass das Auftreten der Zusammenlagerung sehr wahrscheinlich ist, gelb und grün deuten an, dass eine Bildung unwahrscheinlich ist.

- **Amplikons**

Sowohl die Länge des Amplikons als auch die Anzahl der vorkommenden CpG-Dinukleotide beeinflussen das Schmelzverhalten. Je mehr CpG inkludiert sind, desto größer ist der Unterschied zwischen der T_m des unmethylierten und methylierten Templates. Um das Schmelzverhalten und die Schmelztemperatur des methylierten bzw. unmethylierten Templates zu ermitteln, wurde die Freeware *POLAND* herangezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

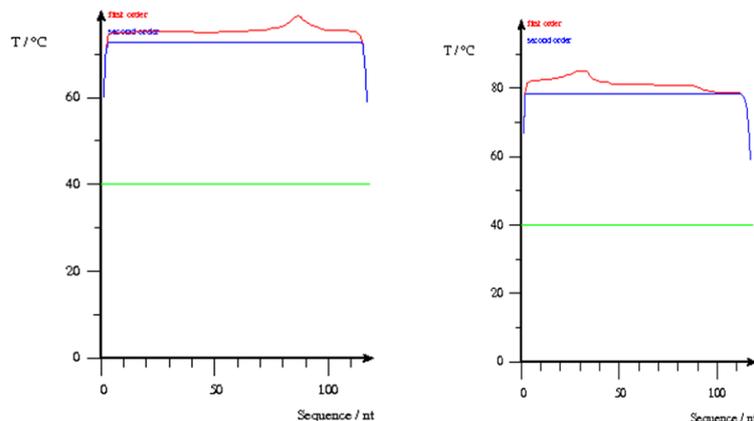


Abbildung 24: Schmelzprofile und Schmelztemperatur des methylierten und unmethylierten Templates, simuliert mit POLAND

Handelt es sich um einen homogen schmelzenden DNA-Abschnitt, der nur eine Schmelzdomäne enthält, wird eine Gerade erhalten und die Schmelztemperatur kann abgeschätzt werden. Für das aus dem unmethylierten Template resultierende Amplikon wurde eine T_m von 72 °C ermittelt und für das methylierte Template resultiert eine T_m von 78 °C. Beide Amplikons weisen nur eine

Schmelzdomäne auf und die Differenz der Schmelztemperaturen (≥ 6 °C) reicht für die Durchführung einer HRM Analyse aus [84].

4.1.1.2 Versuche zur Optimierung der Methode

Das Primerpaar RASSF1A_f1 und RASSF1A_r1 wurde mit methylierter und unmethylierter bisulfit-konvertierter Standard-DNA (Konzentration 10 ng/ μ l) getestet. Um Kontrollstandards unterschiedlicher Methylierung (10 %, 25 %, 50 % bzw. 75 %) zu erhalten, wurden die 0 % methylierte und 100 % methylierte Standard-DNA in entsprechenden Verhältnissen gemischt (siehe dazu Kapitel 5.5.1). Beim ersten Versuch wurden eine Annealingtemperatur von 52 °C und ein MgCl₂-Zusatz von 2 mM gewählt. Es zeigte sich eine bevorzugte Amplifikation der höher methylierten Kontrollstandards (Abbildung 25). Dieses Verhalten spiegelte sich in einem sehr starken Bias wider. Die normalisierte Schmelzkurve des 50 % methylierten Kontrollstandards lag sehr nahe bei der des 100 % methylierten Standards, es war keine ausreichende Unterscheidung dieser möglich, wie in Abbildung 26 erkennbar ist.

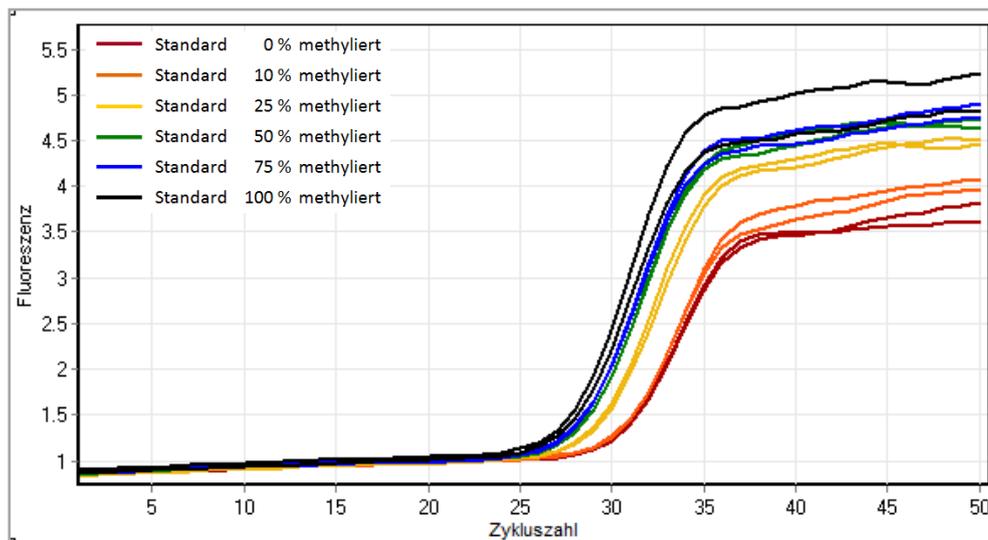


Abbildung 25: Amplifikationskurven der Kontrollstandards mit den Primern RASSF1A_f1 und RASSF1A_r1 bei einer Annealingtemperatur von 52 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂

Ergebnisse und Diskussion

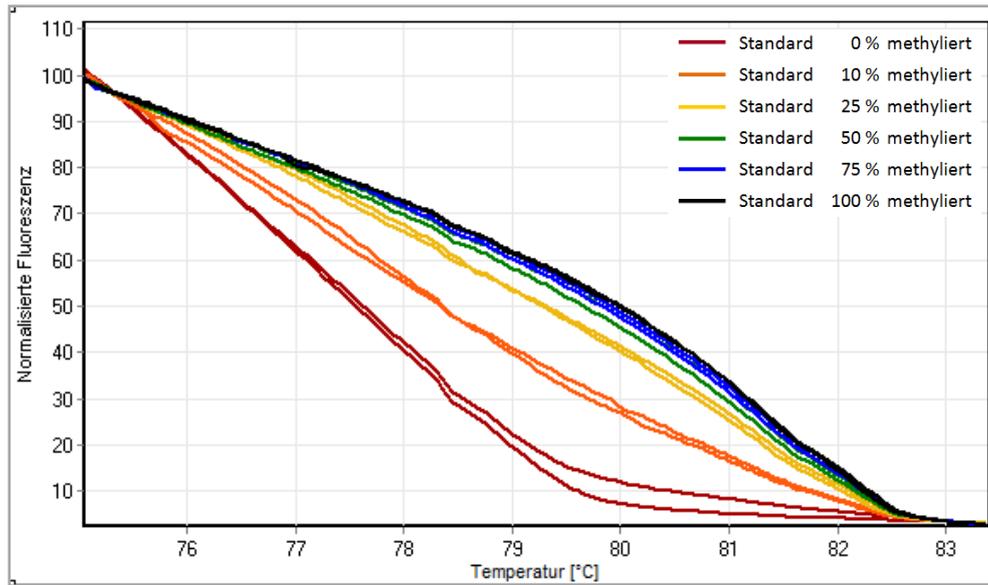


Abbildung 26: Normalisierte Schmelzkurven nach Amplifikation mit den Primern RASSF1A_f1 und RASSF1A_r1 bei einer Annealingtemperatur von 52 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Forwardprimer RASSF1A_f1 modifiziert. Das so erhaltene neue Primerpaar, bestehend aus dem Forwardprimer RASSF1A_f2 und dem Reverseprimer RASSF1A_r1, wurde wiederum bei einer Annealingtemperatur von 52 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂ getestet. Es zeigte sich keine Verbesserung der Amplifikation des unmethylierten Templates bei der gewählten Temperatur. Der Bias konnte ebenfalls nicht korrigiert werden und eine Unterscheidung der normalisierten Schmelzkurven des 50 %, 75 % und 100 % Standards war nicht möglich. Da bei einer höheren Annealingtemperatur bevorzugt das methylierte Template amplifiziert wird [84], wurde diese in einem weiteren Versuch um 2 °C erniedrigt. Wie in Abbildungen 27 und 28 erkennbar ist, zeigten sich jedoch wiederum ein Bias und keine Verbesserung bei der Trennung der normalisierten Schmelzkurven der höher methylierten Standards.

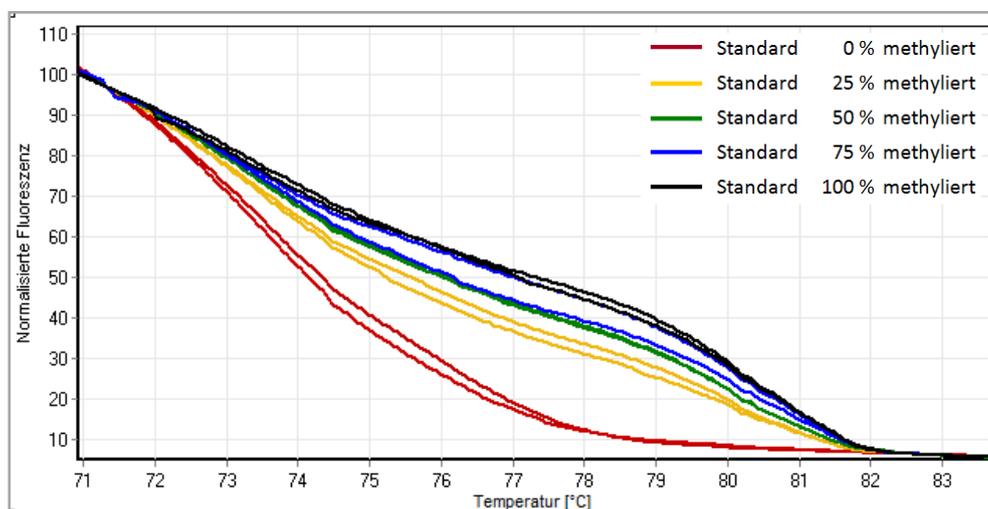


Abbildung 27: Normalisierte Schmelzkurven für das Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r1 bei einer Annealingtemperatur von 54 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂

Ergebnisse und Diskussion

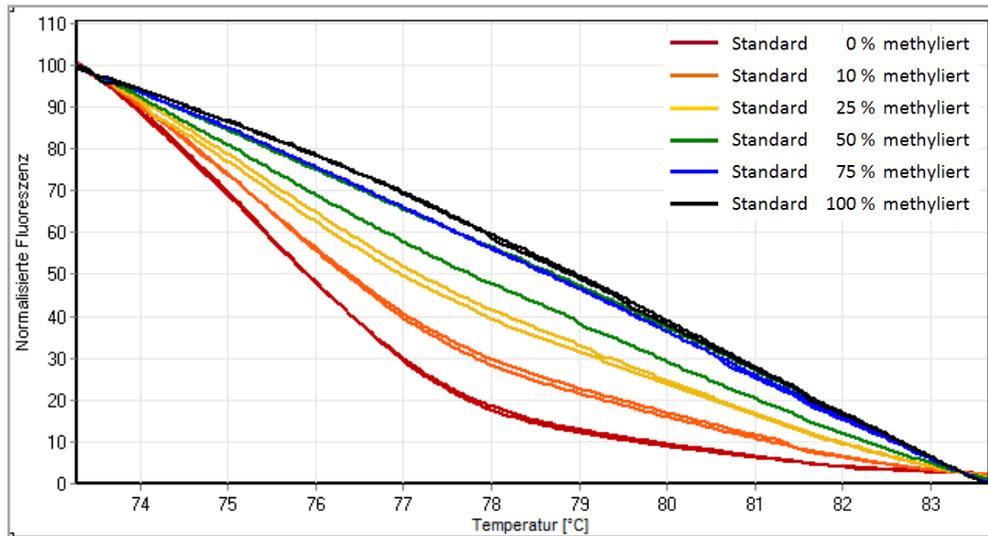


Abbildung 28: Normalisierte Schmelzkurven für das Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r1 bei einer Annealingtemperatur von 52 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂

Um den Effekt von aktiven CpG-Dinukleotiden in einem Primerpaar zu testen, wurde in weiterer Folge auch der Reverseprimer angepasst. Das zuvor aktive CpG wurde durch den Ersatz des G durch ein A inaktiviert (siehe Tabelle 2).

Obwohl in den Versuchen mit den zuvor entworfenen Primerpaaren immer wieder ein Bias ins Methylierte zu beobachten war, wurde dennoch zu Beginn eine höhere Annealingtemperatur von 56 °C gewählt. Damit sollte ein spezifischeres Anlagern der Primer zu gewährleistet werden [85]. Die erste MS-HRM Analyse mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 wurde bei einem Zusatz von 1,5 mM MgCl₂ durchgeführt. Durch die Optimierung der Primersequenz konnte eine gute Amplifikation der unmethylierten als auch der methylierten DNA bei einer Annealingtemperatur von 56 °C in annähernd gleichem Ausmaß erreicht werden (Abbildung 29).

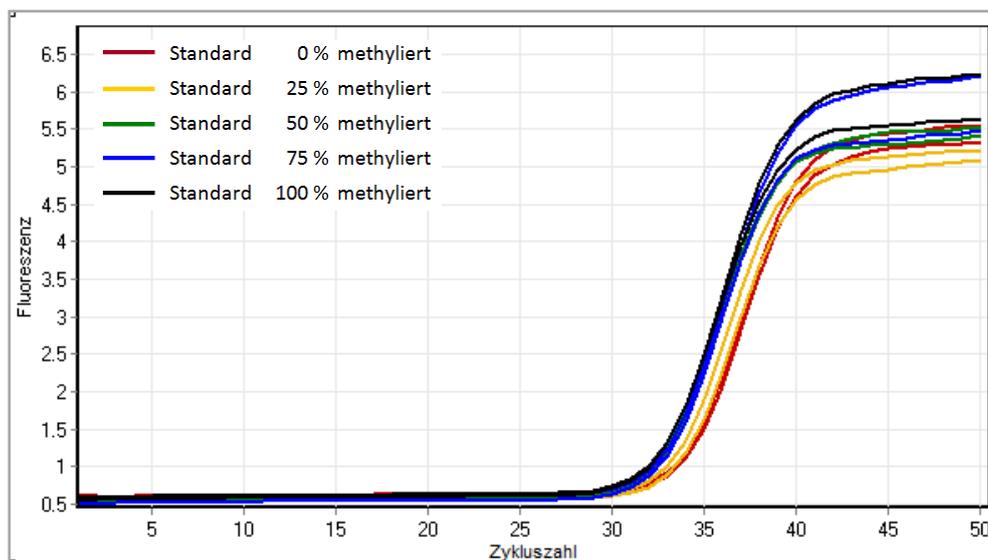


Abbildung 29: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C und einem Zusatz von 1,5 mM MgCl₂

Ergebnisse und Diskussion

Der Zusatz von MgCl_2 ist für eine Verbesserung der PCR-Amplifikation bei bisulfit-konvertierter DNA essentiell [79]. Um den Einfluss der MgCl_2 -Konzentration auf die Amplifikation zu ermitteln, wurde die Analyse bei gleicher Annealingtemperatur, aber mit einem Zusatz von jeweils 2 mM, 3 mM bzw. 4 mM MgCl_2 wiederholt. Es wurde eine Verschlechterung der Amplifikation der Kontrollstandards bei zunehmender MgCl_2 -Konzentration festgestellt (Abbildungen 30-32). Abbildung 33 zeigt eine vergleichende Darstellung der Ergebnisse. Es lässt sich sehr gut erkennen, dass die beste Amplifikation bei einem Zusatz von 2 mM MgCl_2 erreicht wurde.

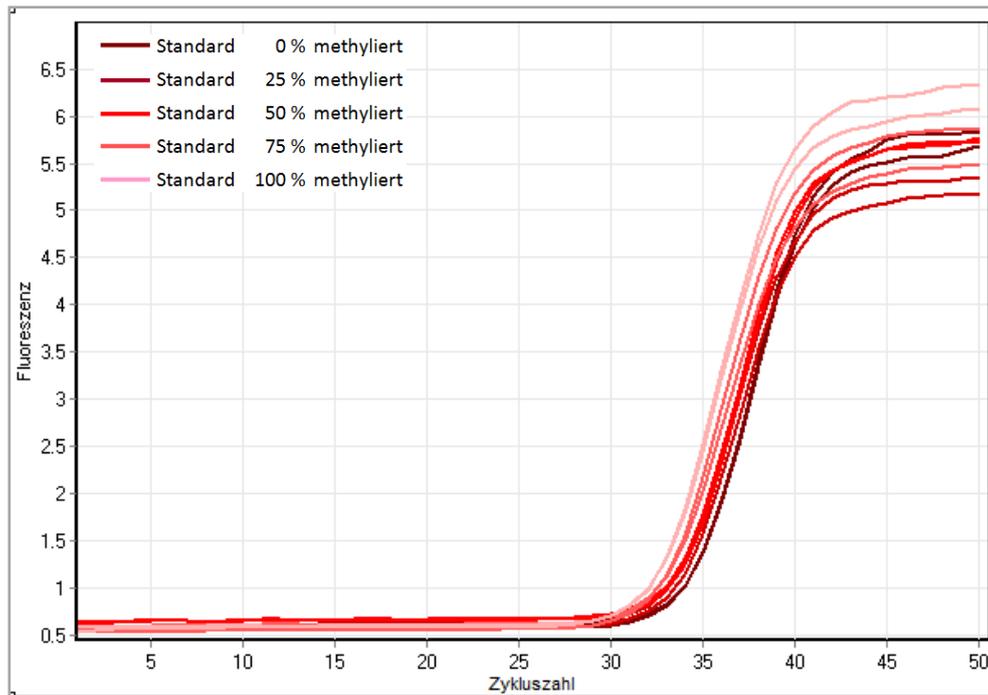


Abbildung 30: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl_2

Ergebnisse und Diskussion

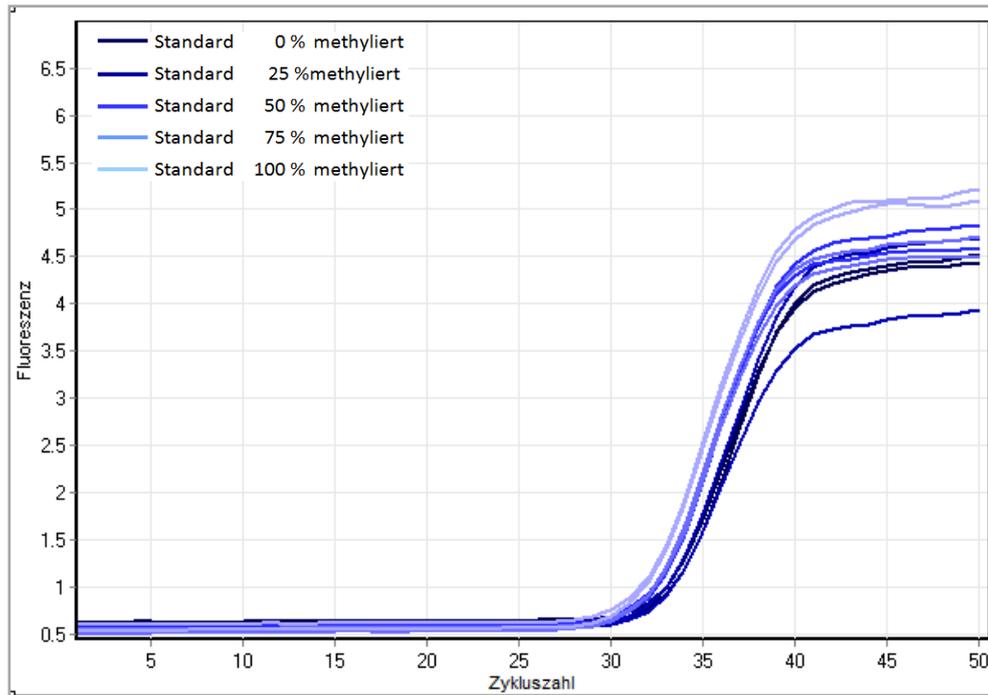


Abbildung 31: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C und einem Zusatz von 3 mM MgCl₂

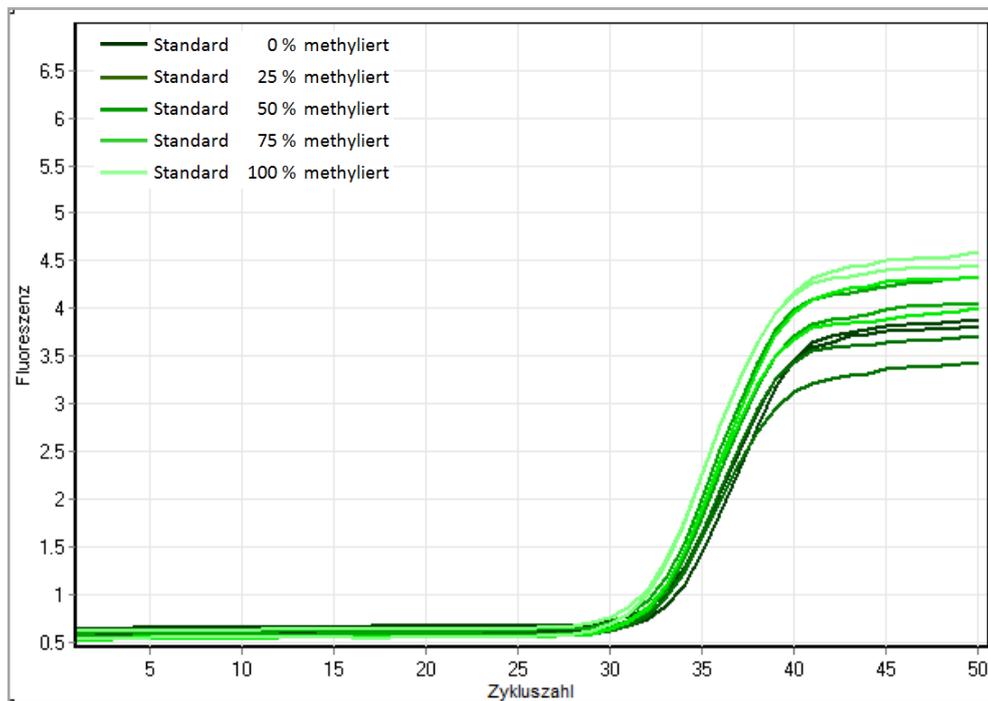


Abbildung 32: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C und einem Zusatz von 4 mM MgCl₂

Ergebnisse und Diskussion

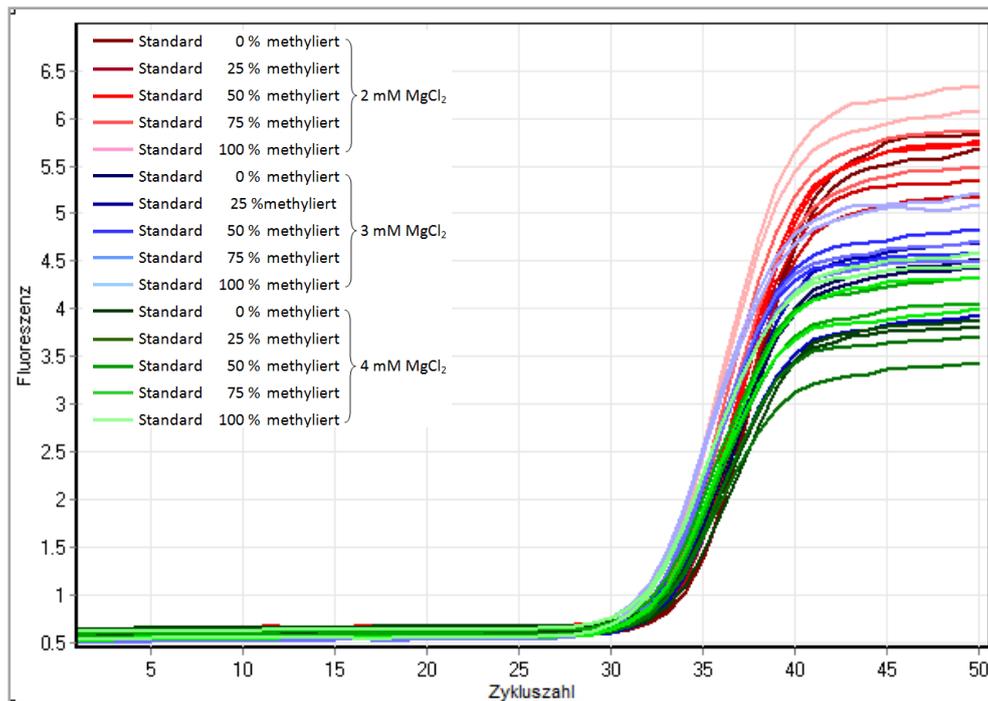


Abbildung 33: Einfluss des MgCl₂-Zusatzes auf die Amplifikationseffizienz. Primer RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C

4.1.1.3 Optimierte Bedingungen

Durch die Optimierung der Primersequenzen des Forward- und Reverseprimers konnte die bevorzugte Amplifikation des methylierten Templates ausgeglichen werden. Bei einer Annealingtemperatur von 56 °C und einem MgCl₂-Zusatz von 2 mM wurde die beste Amplifikation erreicht. Es zeigte sich kein Bias, wie aus der Darstellung der ersten negativen Ableitung der Schmelzkurven ($-dF/dT$ gegen T) und der normalisierten Schmelzkurven (Abbildung 34) ersichtlich ist.

Ergebnisse und Diskussion

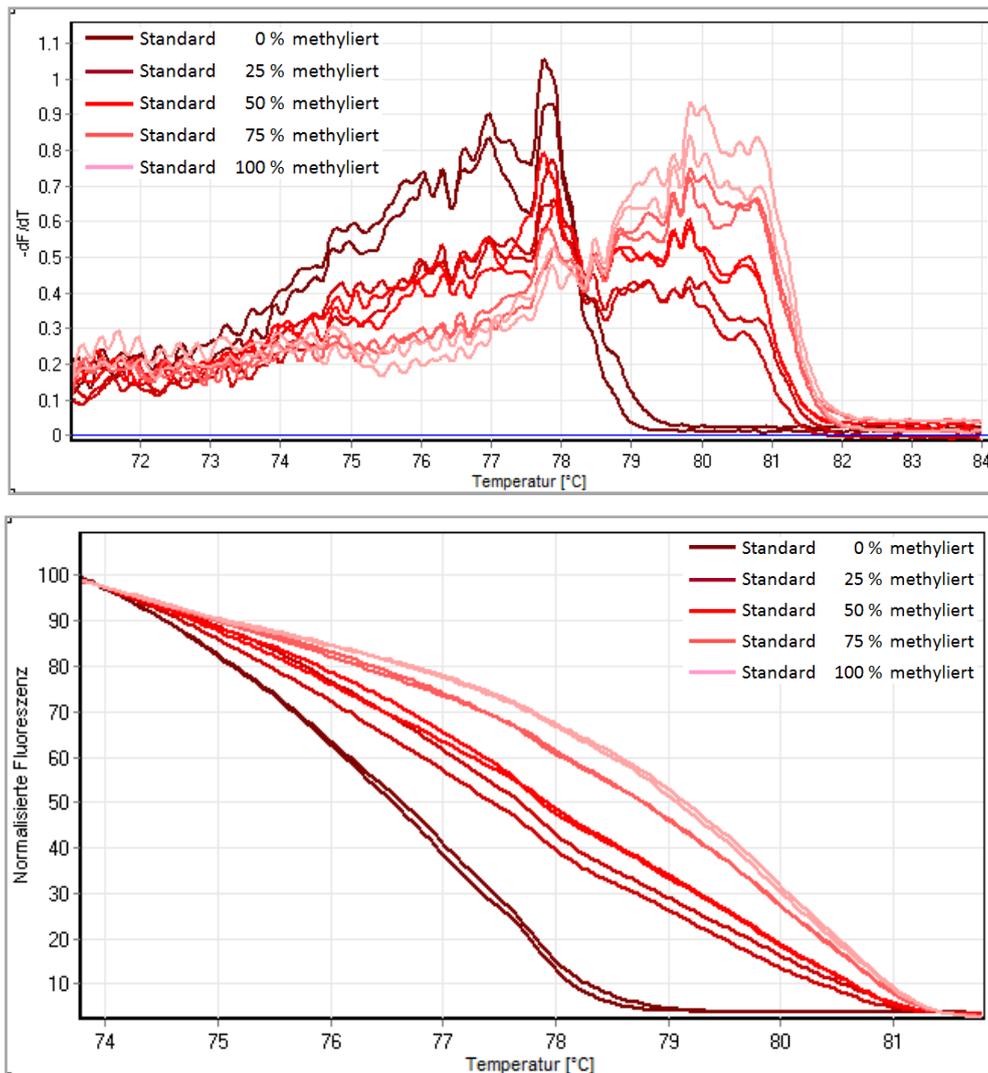


Abbildung 34: Erste negative Ableitung der Schmelzkurven ($-dF/dT$ gegen T) und normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3. PCR-Bedingungen: Annealingtemperatur 56 °C, $MgCl_2$ -Zusatz 2 mM

4.1.1.4 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit von MS-HRM Analysen hängt sowohl von der verwendeten Methode als auch von der Genauigkeit in der Vorbereitung der Messung ab. Es lassen sich teilweise große Abweichungen in der Amplifikationseffizienz der verwendeten Methoden feststellen. Grundsätzlich können geringe Unterschiede in der eingesetzten DNA-Menge und damit verbundene Variationen in der Amplifikationseffizienz durch anschließende Normalisierung der Schmelzkurven ausgeglichen werden, wobei durchwegs gute Ergebnisse erzielt werden können. Die für RASSF1A entwickelte und optimierte MS-HRM Methode wies eine hohe Reproduzierbarkeit auf. In Abbildung 35 sind die Kalibriergeraden von drei unabhängigen Messungen dargestellt, die an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden.

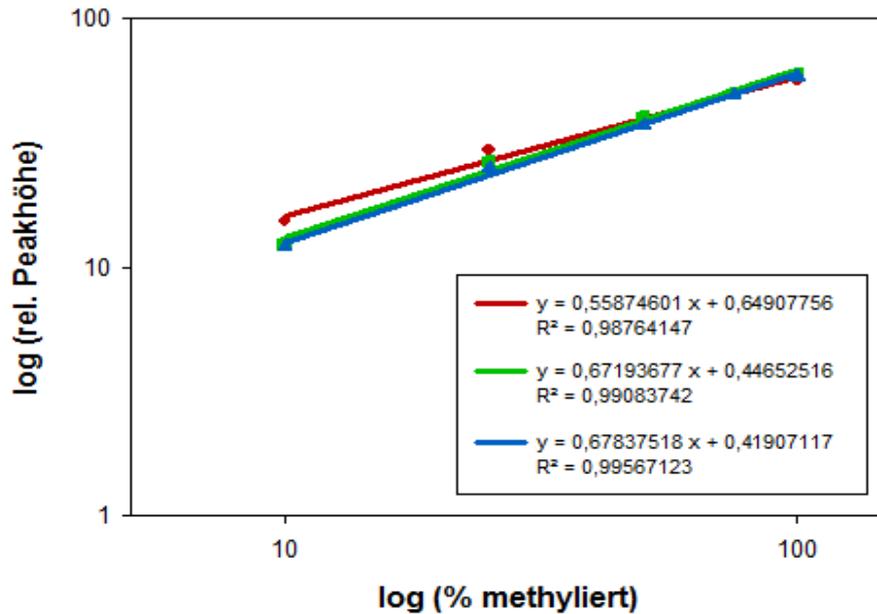


Abbildung 35: Darstellung von drei Kalibriergeraden von drei unabhängigen Messungen an unterschiedlichen Tagen

4.1.2 GATA3

4.1.2.1 Entwerfen der Primer

Bei der Suche nach geeigneten Primerpaaren für die Promotorregion des *GATA3* Gens wurde die Referenzsequenz NM_001002295.1 herangezogen. Es wurden zwei mögliche Primerpaare entworfen, die jeweiligen Eigenschaften sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Primerpaare für *GATA3*

GATA3_1 (1. Primerpaar)		
Sequenz	GATA3_f1	GATA3_r1
	5'-AGCGAGATAGAGCGAGTAATGTAATTTG-3'	5'-CAAACCTCTCTACACCGAAATCCTC-3'
Anzahl der CpG	2	1
Basen [bp]	28	25
T _m OligoCalc [°C]	65,6	65,8
GATA3_2 (2. Primerpaar)		
Sequenz	GATA3_f2	GATA3_r2
	5'-CGAGTATAGTCGAGGTTATGG-3'	5'-CTCCTCCAACAACGAATACTAC-3'
Anzahl der CpG	2	1
Basen [bp]	21	22
T _m OligoCalc [°C]	59,5	60,1

4.1.2.2 Versuche zur Optimierung der Methode

- **Primerpaar GATA3_1**

Die mit *OligoCalc* ermittelten T_m der Primer betragen 65,6 °C bzw. 65,8 °C (Tabelle 3). Die erste Analyse wurde bei einer Annealingtemperatur von 53 °C und einem Zusatz von 2 mM $MgCl_2$ durchgeführt. Es kam zu keiner einheitlichen Amplifikation der Kontrollstandards (Abbildung 36). Eine Variation in der Annealingtemperatur brachte keine Verbesserung der Ergebnisse, woraufhin auf die Durchführung weiterer Versuche mit diesem Primerpaar verzichtet wurde.

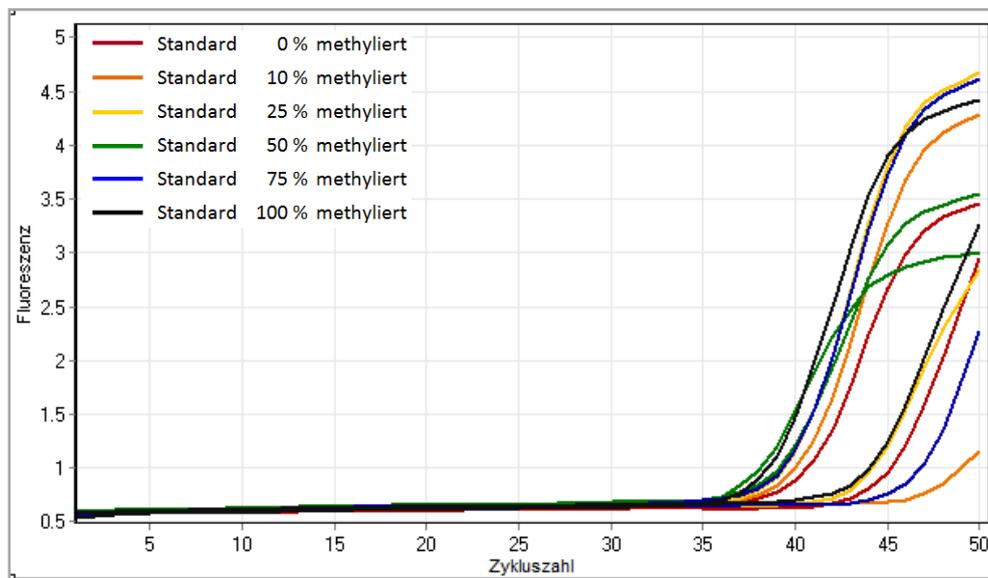


Abbildung 36: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar GATA3_1 bei einer Annealingtemperatur von 53 °C und einem Zusatz von 2 mM $MgCl_2$

- **Primerpaar GATA3_2**

Die Primer GATA3_2 wiesen nach *OligoCalc* eine T_m von 59,5 °C bzw. 60,1 °C auf (Tabelle 3). Beim ersten Versuch wurden eine Annealingtemperatur von 50 °C und ein $MgCl_2$ -Zusatz von 2 mM gewählt. Es zeigte sich eine sehr gute Amplifikation der Kontrollstandards in annähernd gleichem Ausmaß (Abbildung 37). Bei der Begutachtung der normalisierten Schmelzkurven und der ersten negativen Ableitung der Schmelzkurven ($-dF/dT$ gegen die Temperatur) wurde kein Bias festgestellt (Abbildungen 38 und 39).

Ergebnisse und Diskussion

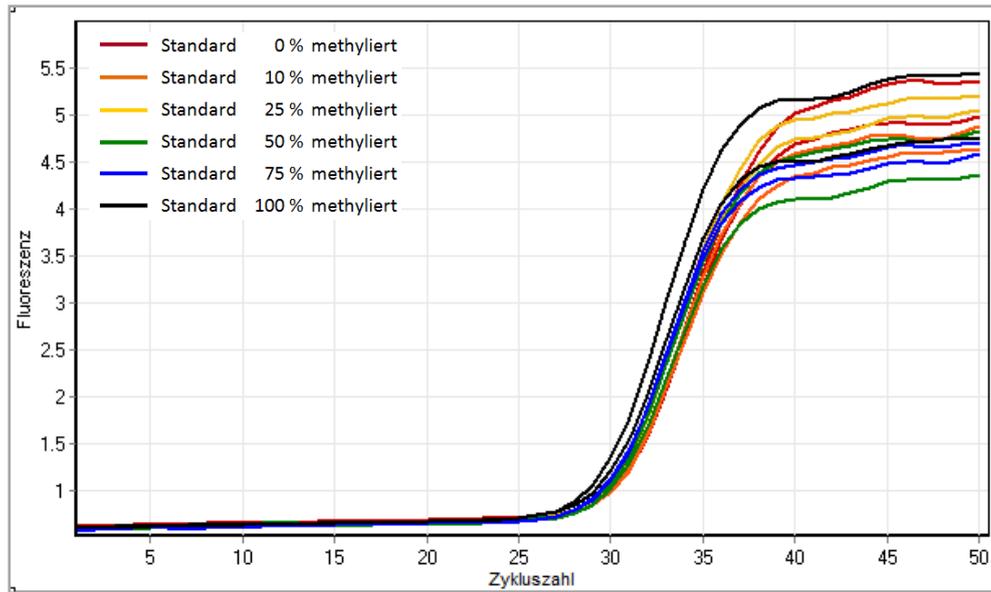


Abbildung 37: Amplifikationskurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar GATA3_2 bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂

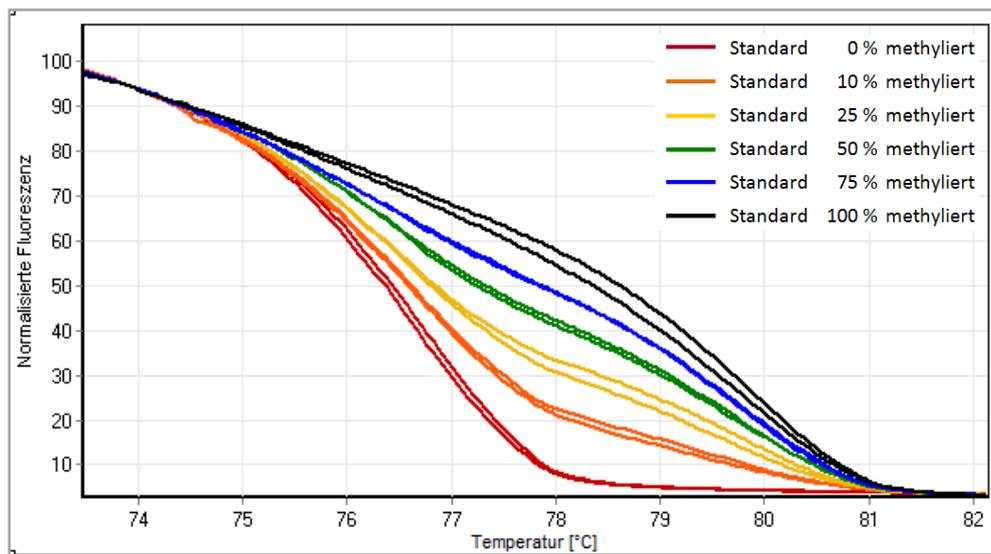


Abbildung 38: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar GATA3_2 bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂

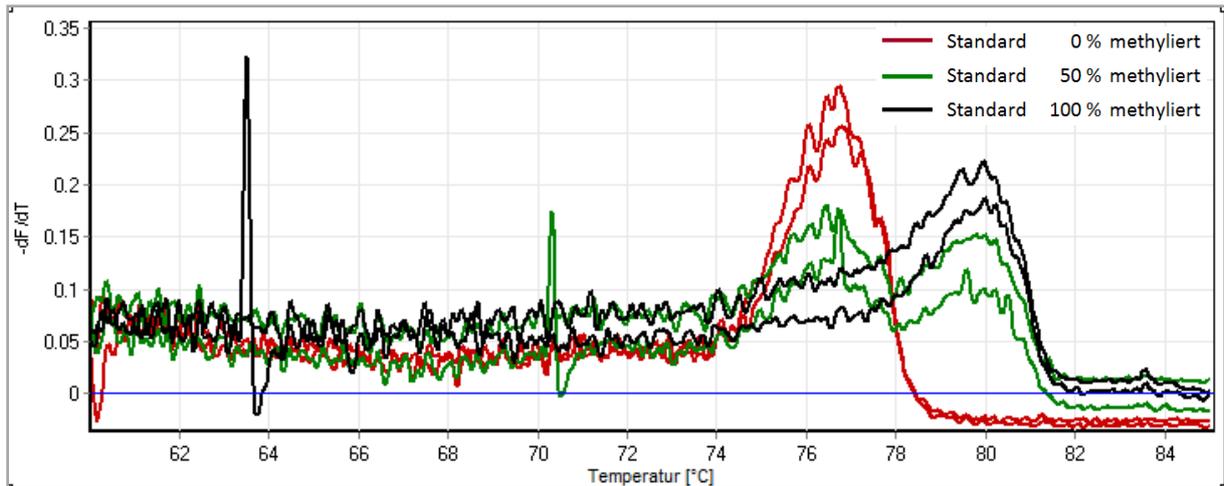


Abbildung 39: Darstellung der ersten negativen Ableitung der Schmelzkurven ($-dF/dT$ gegen T) der Kontrollstandards mit dem Primerpaar *GATA3_2* bei einer Annealingtemperatur von $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einem Zusatz von 2 mM MgCl_2

Es wurde versucht, die Amplifikation durch Variation der MgCl_2 -Konzentration zu verbessern. Dazu wurde die PCR bei einem Zusatz von 3 mM MgCl_2 wiederholt. Es zeigte sich jedoch keine Verbesserung in der Amplifikation der Kontrollstandards, weshalb die zuvor gewählten Bedingungen beibehalten wurden.

4.1.2.3 Optimierte Bedingungen

Bei den ersten Versuchen mit selbst-extrahierter DNA aus MCF-7 Zellen, die mit Bisphenol A bzw. DMSO inkubiert wurden, und DNA aus Biopsieproben zeigte sich jedoch ein abweichendes Schmelzverhalten der Proben von dem der Standards, sodass eine Auswertung nicht möglich war (Abbildungen 40 und 41). Es wurden einige Wiederholungen mit anderen DNA-Proben aus MCF-7 Zellen durchgeführt, es konnten aber keine Veränderungen im Schmelzverhalten festgestellt werden. Wahrscheinlich handelt es sich um eine vorliegende partielle Methylierung der DNA-Proben, welche über die relative Peakhöhe nicht auswertbar ist. Trotz optimierter Methode wurden mit jenem Primerpaar keine weiteren Versuche durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

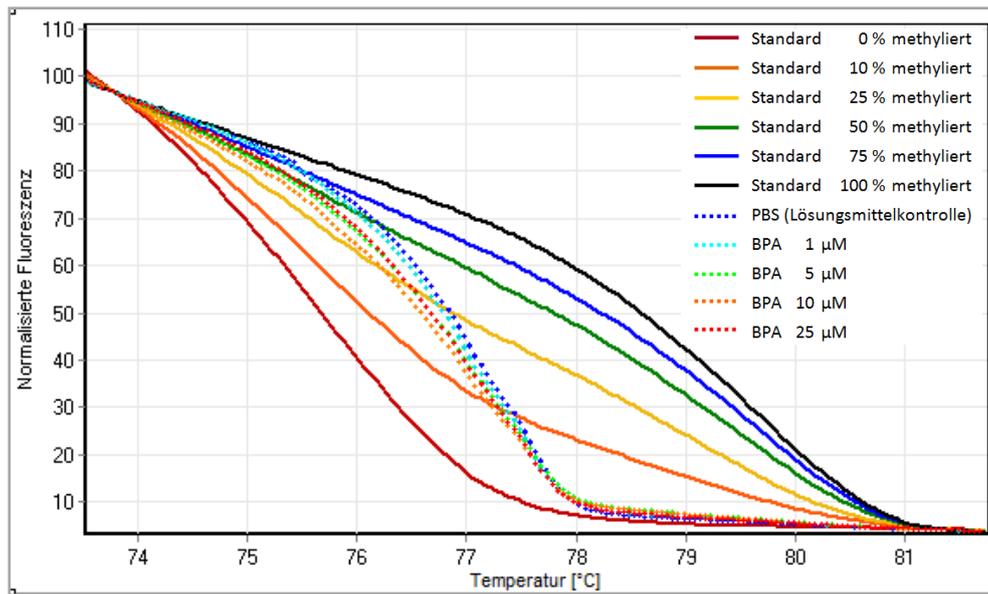


Abbildung 40: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards und der DNA aus MCF-7 Zellen, die mit Bisphenol A bzw. DMSO inkubiert wurden. PCR-Bedingungen: Primer GATA3_2, Annealingtemperatur: 50 °C, Zusatz von MgCl₂: 2 mM

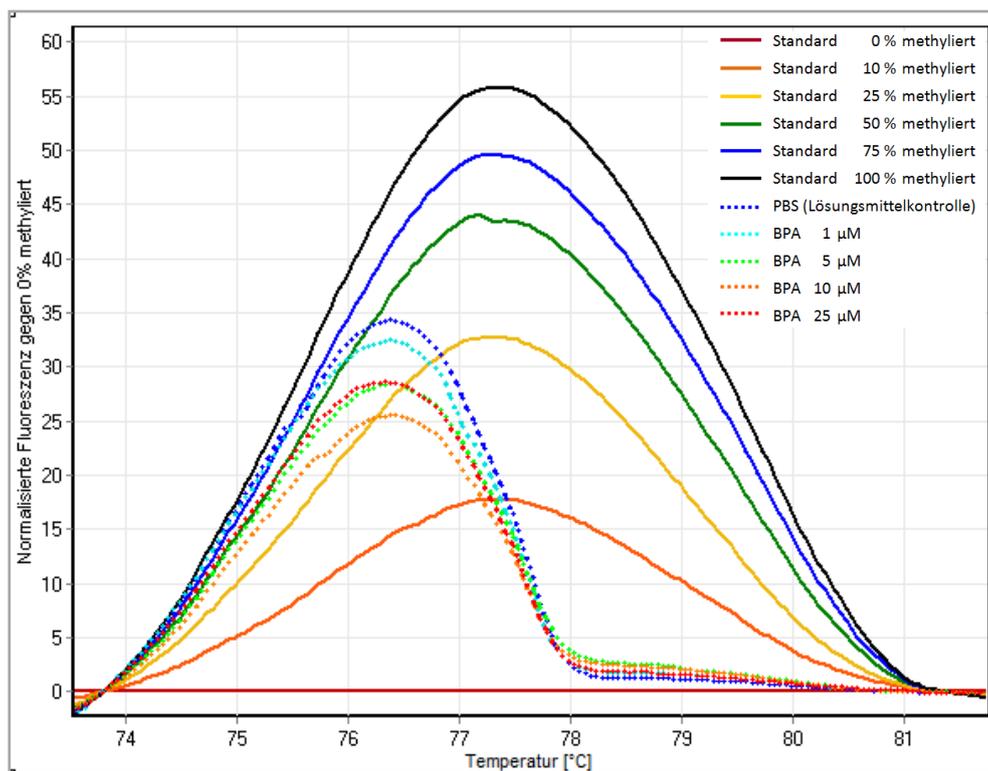


Abbildung 41: Differentialgraf der normalisierten Schmelzkurven der Kontrollstandards und der DNA aus MCF-7 Zellen, die mit Bisphenol A bzw. DMSO inkubiert wurden. PCR-Bedingungen: Primer GATA3_2, Annealingtemperatur: 50 °C, Zusatz von MgCl₂: 2 mM

4.1.3 GSTP1

4.1.3.1 Entwerfen der Primer

Das Glutathion S-Transferase P1 Gen (*GSTP1*) codiert für ein Enzym, das an einer Vielzahl von detoxifizierenden Reaktionen beteiligt ist, die die Zellen vor reaktiven kanzerogenen Metaboliten schützen [87]. NM_000852.3 wurde als Referenzsequenz für das Entwerfen passender Primer herangezogen, zusätzlich wurde ein in der Literatur [18] gefundenes Primerpaar getestet. In Tabelle 4 sind die Charakteristika der entworfenen Primerpaare angeführt.

Tabelle 4: Primerpaare für GSTP1

GSTP1_1		
Sequenz	GSTP1_f1 5'-GGCGATTTCGGGGATTTAG-3'	GSTP1_r1 5'-CCGCCCAATACTAAATCAC-3'
Anzahl der CpG	2	1
Basen [bp]	20	20
T _m OligoCalc [°C]	58,4	58,4
GSTP1_2 [18]		
Sequenz	GSTP1_f2 5'-GTGAAGCGGGTGTGTAAGTTT-3'	GSTP1_r2 5'-TAAACAACAACAAAAAAAACC-3'
Anzahl der CpG	1	0
Basen [bp]	21	24
T _m OligoCalc [°C]	59,5	53,3
GSTP1_3		
Sequenz	GSTP1_f3 5'-ATTCGGGAGGTTGAAGTAGAATT-3'	GSTP1_r3 5'-ACGTAATCTCACACTATAACCCA-3'
Anzahl der CpG	1	1
Basen [bp]	23	23
T _m OligoCalc [°C]	59,2	59,2

4.1.3.2 Versuche zur Optimierung der Methode

- **Primerpaar GSTP1_1**

Der erste Versuch wurde bei einer Annealingtemperatur von 53 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂ durchgeführt. Es wurde eine bevorzugte Amplifikation höher methylierter DNA beobachtet (Abbildung 42). Die für Standards mit einem Methylierungsgrad von 20 % - 50 % erhaltenen normalisierten Schmelzkurven konnten nicht voneinander unterschieden werden. Um die

Amplifikationseffizienz des unmethylierten Standards zu steigern, wurde in einem nächsten Versuch die Annealingtemperatur auf 50 °C gesenkt. Da auch dies zu keiner Verbesserung des Ergebnisses führte, wurde auf weitere Versuche mit diesem Primerpaar verzichtet.

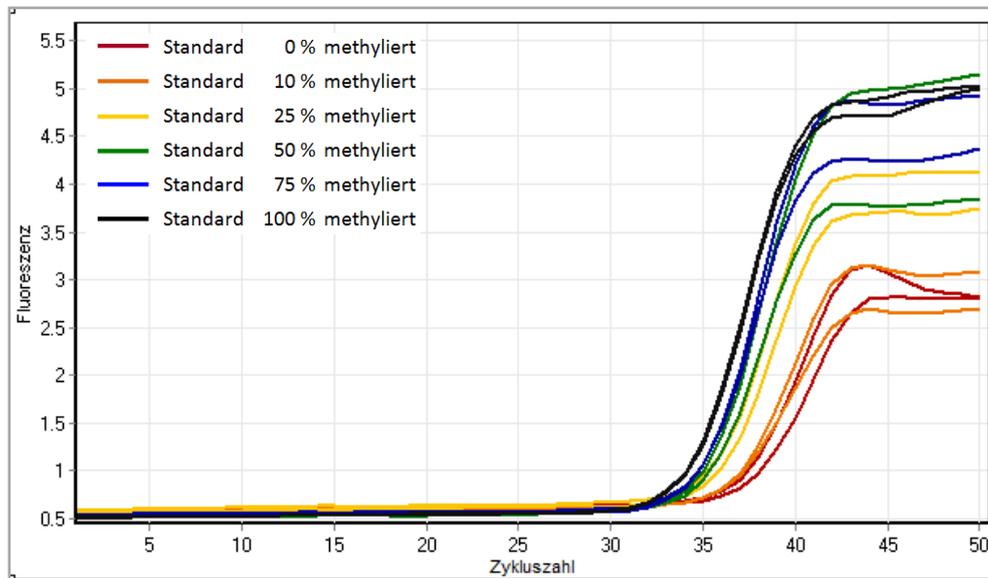


Abbildung 42: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar GSTP1_1 bei einer Annealingtemperatur von 53 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂

- **Primerpaar GSTP1_2**

Das zweite Primerpaar für dieses Gen wurde aus einer Publikation von Tserga *et al.* (2012) entnommen. Als optimierte Bedingungen wurden ein MgCl₂-Zusatz von 3,5 mM und eine Primerkonzentration von 200 nM angeführt [18]. Aufgrund der fehlenden Angabe einer Annealingtemperatur wurde im ersten Versuch mit 53 °C gearbeitet. Es waren jedoch eine schlechte Amplifikation und ein starker Bias ins Methylierte zu beobachten, weshalb die Annealingtemperatur auf 50 °C gesenkt wurde. Der Bias konnte dadurch nicht ausgeglichen werden, es war keine deutliche Unterscheidung der 50 %- 100 % methylierten Standards bei der Darstellung der normalisierten Schmelzkurven möglich (vgl. Abbildungen 43 und 44). Eine Senkung des MgCl₂-Zusatzes auf 2 mM brachte keine Verbesserungen mit sich, weshalb auf weitere Versuche mit diesem Primerpaar verzichtet wurde.

Ergebnisse und Diskussion

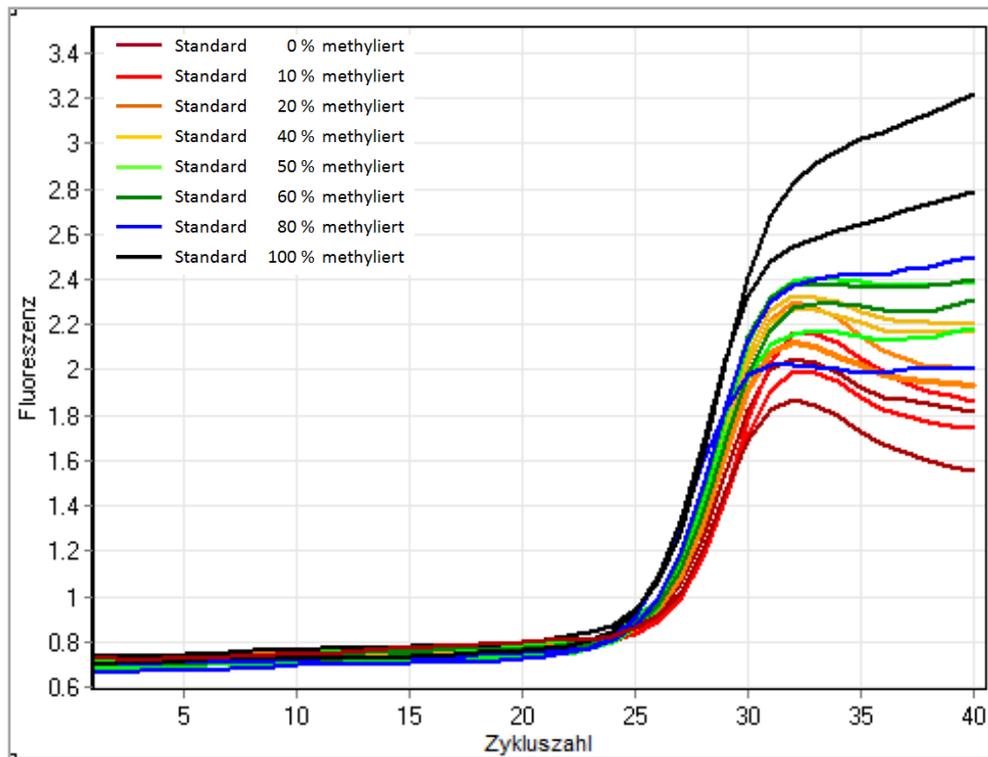


Abbildung 43: Amplifikationskurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar GSTP1_2 bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einem Zusatz von 3,5 mM MgCl₂

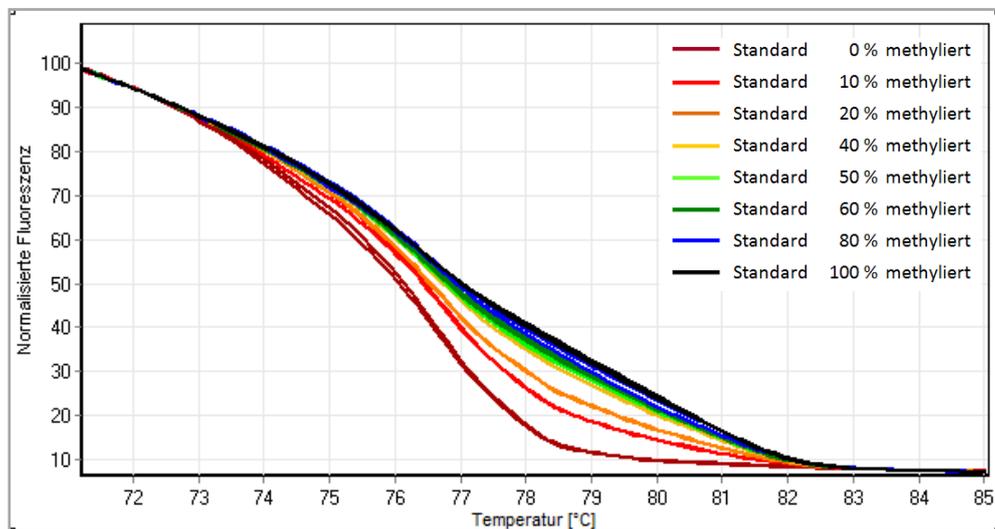


Abbildung 44: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar GSTP1_2 bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂

- **Primerpaar GSTP1_3**

Bei der Verwendung dieses Primerpaares konnte wiederum keine ausreichende Amplifikation der DNA-Standards bei einer Annealingtemperatur von 50 °C erreicht werden. Eine Erhöhung der Temperatur um 4 °C während der Anlagerungsphase brachte im Zuge der Optimierung keine

Verbesserungen mit sich. Aufgrund der schlechten Amplifikation mit dem Primerpaar GSTP1_3 wurde von weiteren Versuchen abgesehen.

4.1.4 TWIST

4.1.4.1 Entwerfen der Primer

Der Transkriptionsfaktor TWIST stellt einen Masterregulator während der embryonalen Morphogenese dar. Er spielt eine bedeutende Rolle bei der Metastasierung von Tumoren und ist unter anderem an der Entwicklung von Brustkrebs beteiligt [88]. Aus der Datenbank des *NCBI* wurde mit Hilfe der Referenzsequenz X91662.1 ein Primerpaar entworfen. Eine Zusammenfassung ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Primerpaar für TWIST

TWIST (X91662.1)		
Sequenz	TWIST_f 5'-GGCGGGTTGAGGCGTTTT-3'	TWIST_r 5'-CTTCCTCGCTATTAACAAC-3'
Anzahl der CpG	2	1
Basen [bp]	18	22
T _m OligoCalc [°C]	58,4	58,4

4.1.4.2 Versuche zur Optimierung der Methode

Die erste MS-HRM Analyse wurde bei einer Annealingtemperatur von 48 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂ durchgeführt. Bei der Amplifikation waren deutliche Unterschiede in der Effizienz zu erkennen, wobei der unmethylierte Standard stärker vervielfältigt wurde. Auch die Betrachtung der Schmelzkurven ließ keine Differenzierung zwischen der 10 % - 100 % methylierten Kontroll-DNA zu. Aufgrund dieses ersten Ergebnisses wurde die Annealingtemperatur um 3 °C erhöht. Es konnten jedoch keine Verbesserungen erzielt werden (Abbildung 45), weshalb von weiteren Optimierungsversuchen mit den Primern für das *TWIST* Gen abgesehen wurde.

Ergebnisse und Diskussion

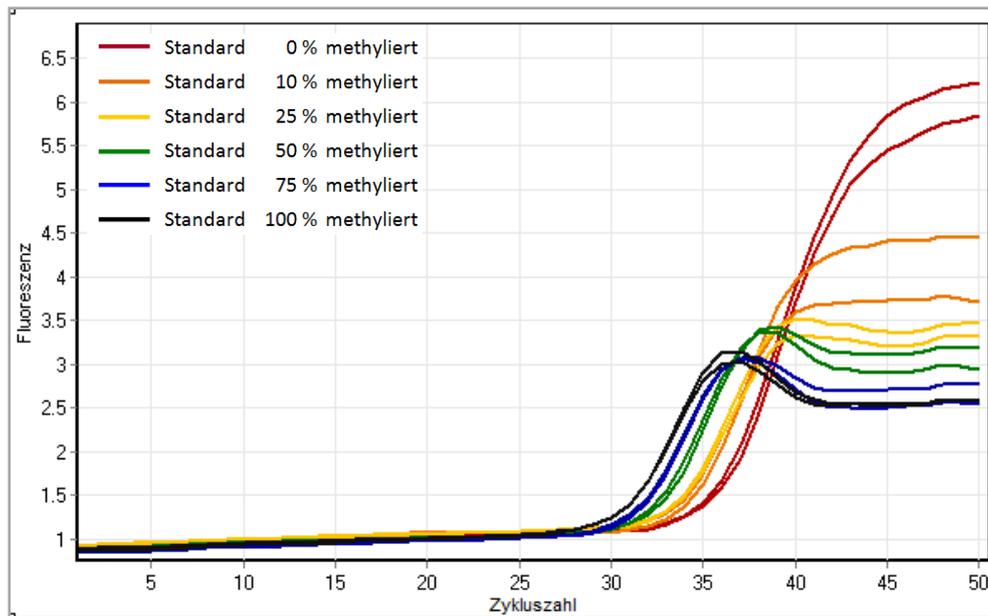


Abbildung 45: Amplifikationskurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar TWIST bei einer Annealingtemperatur von 51 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂

4.1.5 RAR β

Der vom Gen *RAR β* (engl. *retinoic acid receptor β*) codierte nukleare Rezeptor bindet Retinolsäure, einen aktiven Metaboliten von Vitamin A. Er ist an der Wachstumskontrolle und Differenzierung von Zellen beteiligt und ein essentielles Signalmolekül in der frühen Entwicklung. Diese Eigenschaften fördern die anti-Tumor Aktivität der Retinolsäure und machen *RAR β* zu einem interessanten Tumorsuppressorgen [89]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, für das *RAR β* Gen Primer zu entwerfen. Dazu wurde die Referenzsequenz NM_016152.3 gewählt.

Tabelle 6: Primerpaar für RAR β

RAR β (NM_016152.3)		
Sequenz	RAR β _f	RAR β _r
	5'-GCGATT C GAGTAGGGTTTGT-3'	5'-CAA C TTACTCGACCAATCCAAC-3'
Anzahl der CpG	2	1
Basen [bp]	22	23
T _m OligoCalc [°C]	60,1	60,9

Bei der Überprüfung des Primerpaares auf Sekundärstrukturen mit dem *RNAfold* zeigte sich eine wahrscheinliche Bildung von Haarnadelstrukturen beim Forwardprimer. Zusätzlich lagen die Schmelztemperaturen der Amplikons sehr nahe beieinander, was eine keine erfolgreiche MS-HRM Analyse zulässt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Primerpaar nicht für Versuche herangezogen.

4.2 ANWENDUNG VON MS-HRM METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Methylierungsgrad in MCF-7 Zellen und Biopsieproben von Brustkrebspatientinnen bestimmt werden. Es wurde für das Tumorsuppressorgen *RASSF1A* eine geeignete MS-HRM Methode entwickelt (siehe Kapitel 4.1.1). Zusätzlich wurde die von B. Werner beschriebene Methode für *CDKN2A* zur Ermittlung des Methylierungsgrades des Exon 3 herangezogen [90]. Die MS-HRM Methoden für die Gene *APC* und *DAPK1* wurden von E. Habla entwickelt und für Untersuchungen der DNA-Methylierung in der jeweiligen Promotorregion herangezogen [91]. In Tabelle 7 sind die optimierten Bedingungen der angewandten Methoden zusammengefasst.

Tabelle 7: Zusammenfassung der optimierten Bedingungen der verwendeten MS-HRM Methoden

Gen	Primerkonzentration [nM]	MgCl ₂ -Zusatz [mM]	Annealingtemperatur [°C]	HRM Bereich [°C]
<i>RASSF1A</i>	250	2	56	73 - 85
<i>CDKN2A</i>	250	1,5	52	67 - 85
<i>DAPK1</i>	250	3	55	70 - 88
<i>APC</i>	500	2	53	74 - 86

4.3 BESTIMMUNG DES DNA-METHYLIERUNGSGRADES BRUSTKREBS-RELEVANTER TUMORSUPPRESSORGENE IN MCF-7 ZELLEN

Für die Bestimmung möglicher Effekte von verschiedenen Substanzen auf die Methylierung des Promoters bzw. des dritten Exons Brustkrebs-relevanter Tumorsuppressorgene in MCF-7 Zellen wurden optimierte MS-HRM Methoden herangezogen (vgl. Tabelle 8). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Substanzen 5-Aza-2'-Desoxycytidin, Bisphenol A, eine Kombination von Genistein und Daidzein, sowie Curcumin und Parthenolid untersucht, da diese einen Einfluss auf die DNA-Methylierung ausüben können (siehe Kapitel 5.2.5). Dazu wurden MCF-7 Zellen mit der jeweiligen Verbindung inkubiert. Die dabei eingesetzten Konzentrationen der verwendeten Substanzen und die Durchführung der Inkubationsversuche sind in den Tabellen 9 und 10 in Abschnitt 5.2.5 aufgelistet. Nach der Isolierung der DNA (vgl. Abschnitt 5.3.1) und der Bestimmung der Konzentration und Reinheit des DNA-Extrakts mit dem NanoDrop 2000 Spektralphotometer (vgl. Abschnitt 5.3.3) erfolgte eine Bisulfit-Konvertierung (Kapitel 5.4). Durch die Erstellung einer Kalibrierfunktion mit Kontrollstandards konnte der Methylierungsgrad einer unbekanntem bisulfit-konvertierten DNA-Probe ermittelt werden (nähere Details in Abschnitt 3.3.3). Der

Methylierungsgrad des jeweiligen Genabschnitts in unbehandelten MCF-7 Zellen kann aus Tabelle 8 entnommen werden.

Tabelle 8: Untersucher Genabschnitt und dessen DNA-Methylierungsgrad in unbehandelten MCF-7 Zellen [%] mit Standardabweichung [%]

Gen	Genabschnitt	DNA-Methylierungsgrad unbehandelter MCF-7 Zellen [%]	Standardabweichung [%]
<i>RASSF1A</i>	Promotor	66	15
<i>CDKN2A</i>	Exon 3	86	12
<i>DAPK1</i>	Promotor	92	15

Für jeden Standard und jede Probe wurde im Zuge eines MS-HRM Experiments eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Messung wurde an einem anderen Tag wiederholt. Um Ergebnisse vergleichen zu können, wurde der Methylierungsgrad der jeweiligen Negativkontrolle auf 100 % gesetzt. Alle weiteren Messwerte der zugehörigen Inkubation wurden in Folge darauf normiert. Es wurde der Student t-Test angewandt, um auf signifikante Unterschiede der DNA-Methylierung bei den verwendeten Substanzkonzentrationen zu prüfen. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der Inkubationsexperimente mit MCF-7 Zellen dargestellt.

4.3.1 5-Aza-2'-Desoxycytidin

Der größte demethylierende Effekt konnte bei einer Inkubation der MCF-7 Zellen mit 5-Aza-2'-dC festgestellt werden. Die stärkste Abnahme der Promotormethylierung wurde dabei bei niedrigeren Konzentrationen (1 μ M und 5 μ M) erzielt, wohingegen höhere Konzentrationen einen geringeren Einfluss zeigten. Dieser beobachtete Effekt kann auf die Zytotoxizität von 5-Aza-2'-dC zurückgeführt werden, welche vor allem bei höheren Konzentrationen zum Tragen kommt [48]. Zusätzlich wurden ein vermindertes Zellwachstum und ein vermehrtes Absterben der Zellen nach einer Inkubationsdauer von 168 h festgestellt. Die Experimente wurden dennoch über den festgelegten Zeitraum von 216 h durchgeführt. Die Ergebnisse für die Promotormethylierung bzw. Methylierung des Exons der untersuchten Gene sind in den Abbildungen 49, 53 und 54 dargestellt.

4.3.1.1 RASSF1A

Es konnte ein deutlich demethylierender Effekt auf die Promotorregion von *RASSF1A* festgestellt werden, wie aus den Darstellungen der normalisierten Schmelzkurven und des Differentialgrafens zu entnehmen ist (siehe Abbildungen 46 und 47). Die Ermittlung des Methylierungsgrades erfolgte dabei mit der in Abbildung 48 dargestellten Kalibriergeraden. Signifikante Änderungen wurden über

Ergebnisse und Diskussion

den gesamten Konzentrationsbereich (1 μM - 100 μM) festgestellt, wobei eine Exposition von 1 μM den stärksten Einfluss ausübte. In Abbildung 49 ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse aller Messungen angeführt.

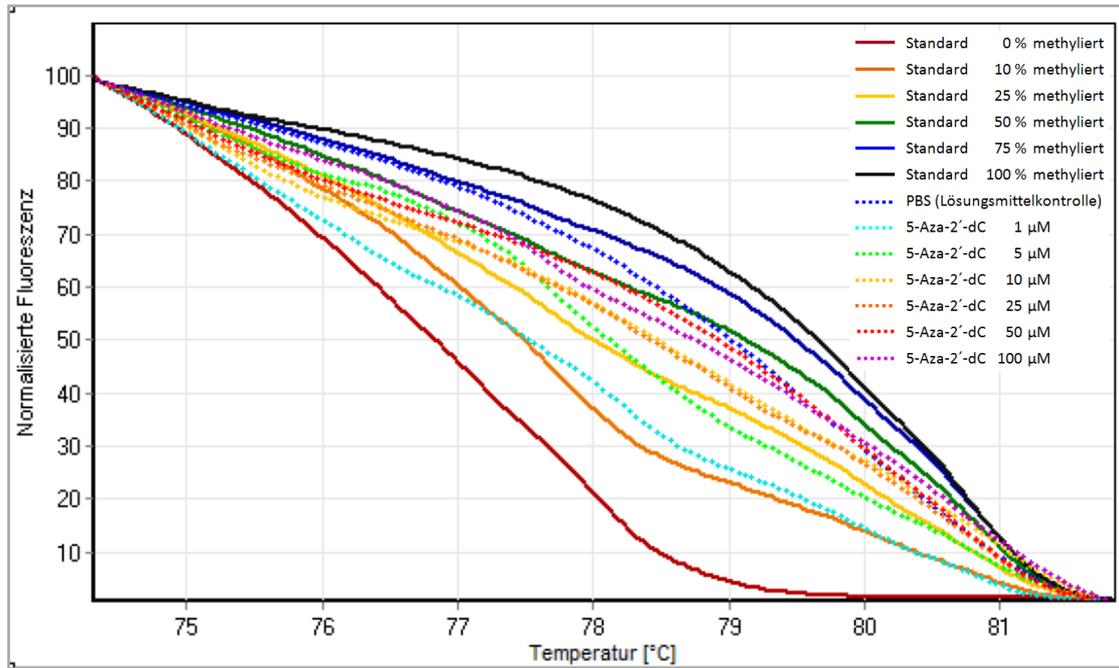


Abbildung 46: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit 5-Aza-2'-dC inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A

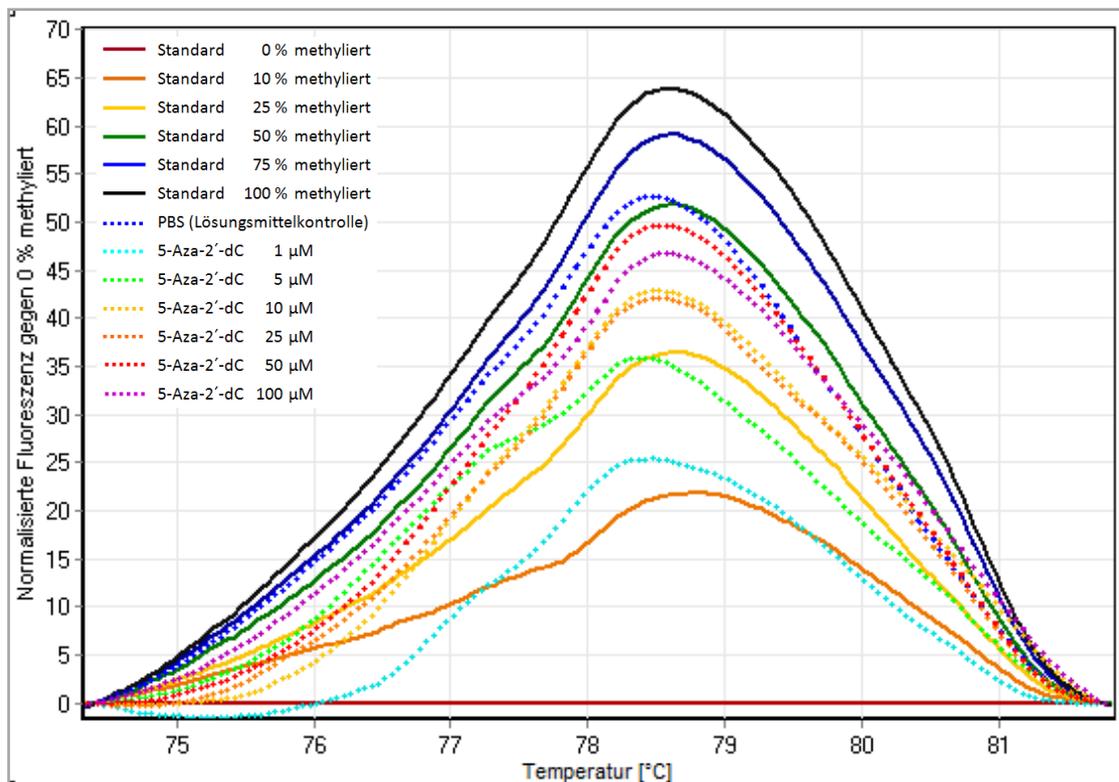


Abbildung 47: Differentialgraf der DNA aus mit 5-Aza-2'-dC inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A

Ergebnisse und Diskussion

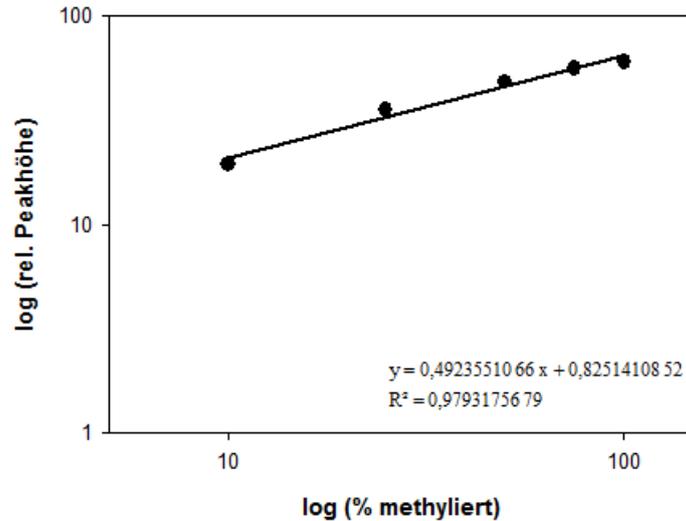


Abbildung 48: Kalibriergerade für RASSF1A für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit 5-Aza-2'-dC

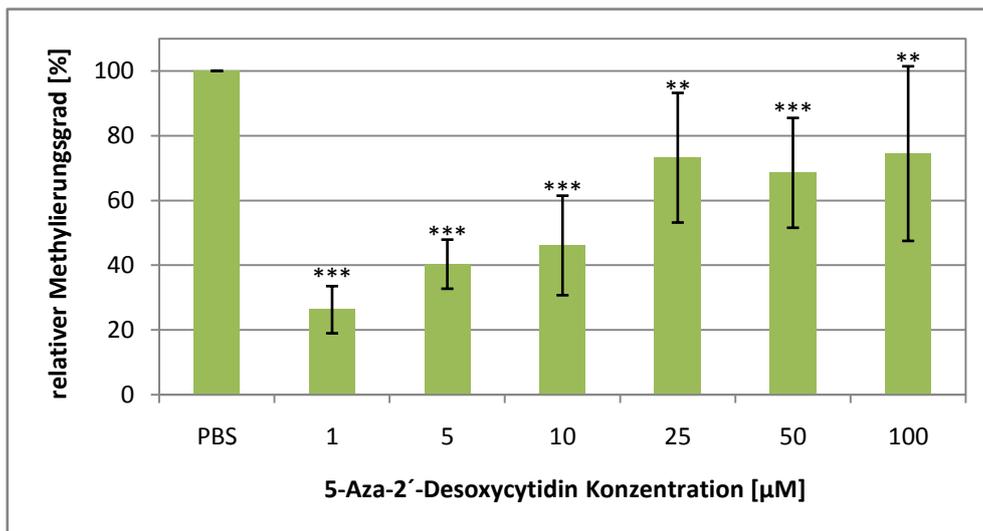


Abbildung 49: Relativer Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-dC. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt ($n = 8$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle PBS, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

4.3.1.2 CDKN2A

Durch Inkubation mit 5-Aza-2'-dC konnte bei *CDKN2A* eine signifikante Abnahme der Methylierung über fast den gesamten Konzentrationsbereich festgestellt werden, wobei der stärkste Effekt bei 5 µM beobachtet wurde. In Abbildungen 50 und 51 sind die Ergebnisse einer MS-HRM Analyse dargestellt. Die Berechnung der DNA-Methylierung erfolgte mit der in Abbildung 52 dargestellten Kalibriergeraden.

Ergebnisse und Diskussion

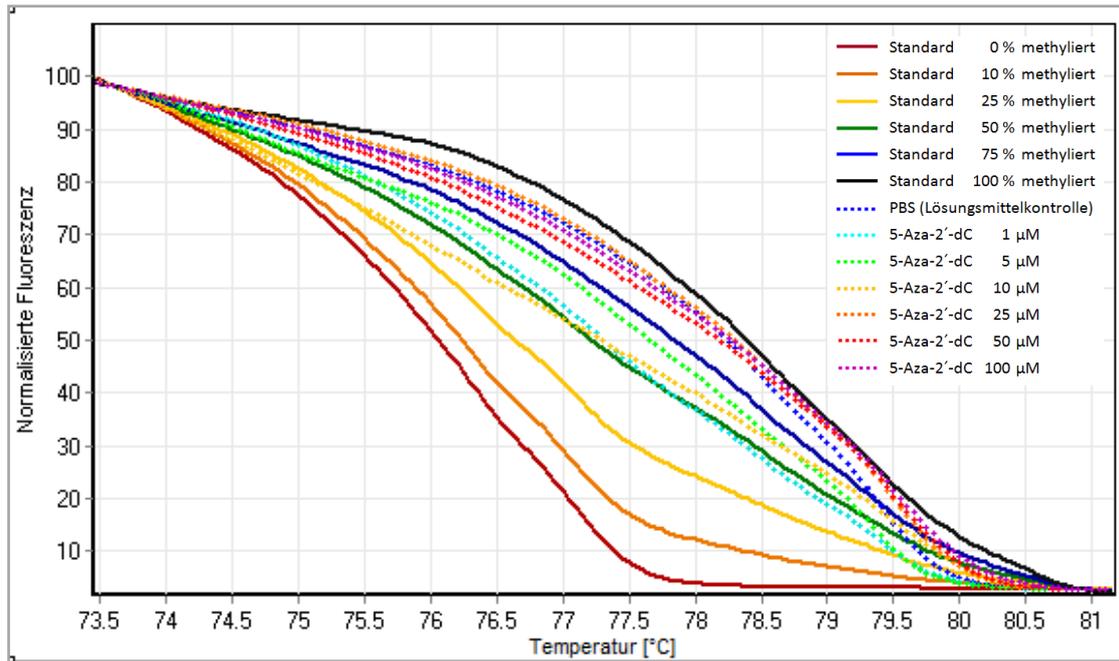


Abbildung 50: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit 5-Aza-2'-dC inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A

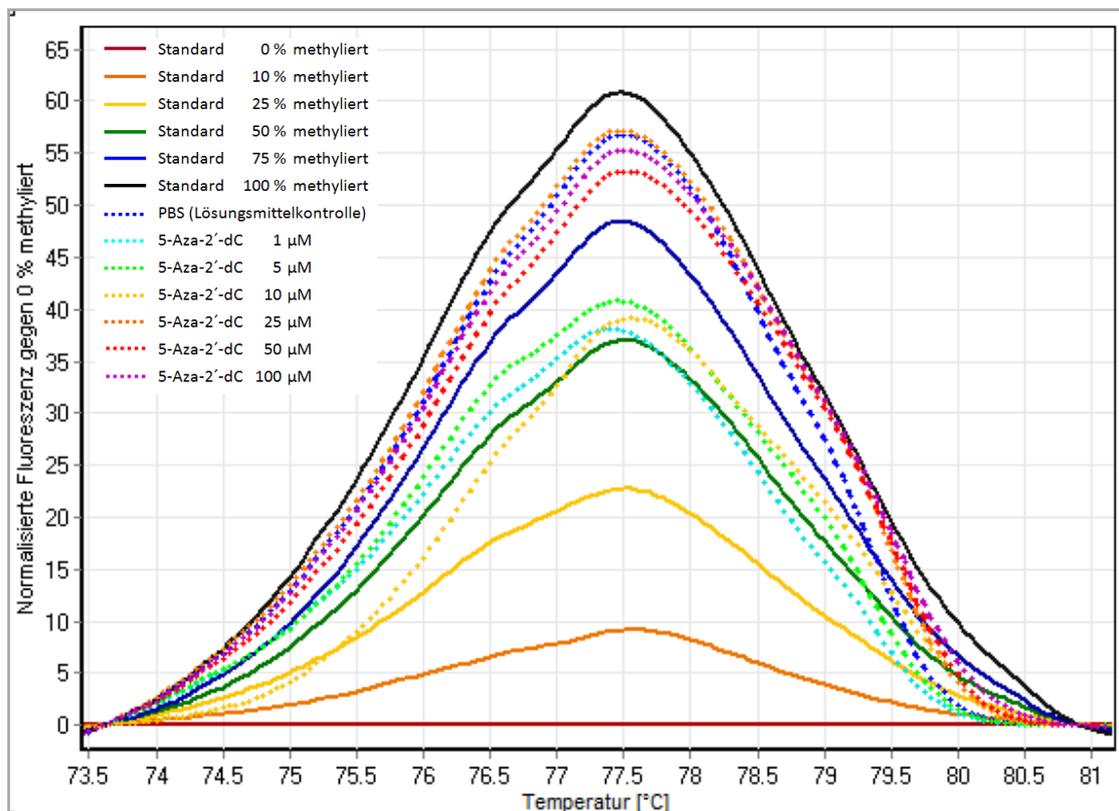


Abbildung 51: Differentialgraf der DNA aus mit 5-Aza-2'-dC inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A

Ergebnisse und Diskussion

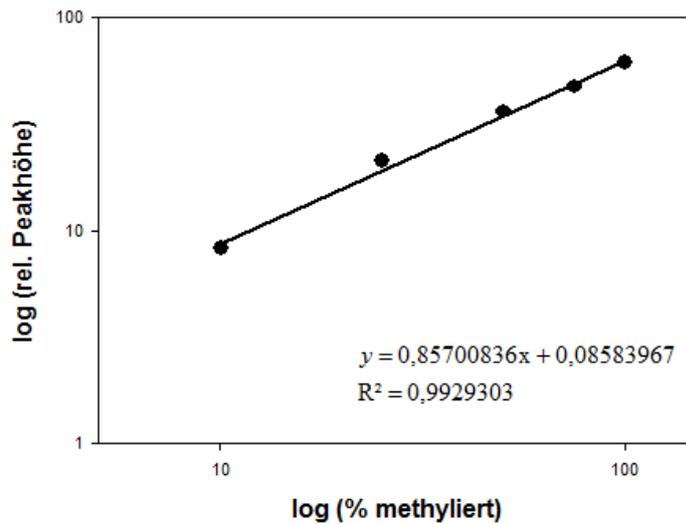


Abbildung 52: Kalibriergerade für CDKN2A für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit 5-Aza-2'-dC

Abbildung 53 zeigt die Ergebnisse der MS-HRM Analysen für *CDKN2A* der DNA von MCF-7 Zellen, die mit einer Konzentration von 1 μM - 100 μM 5-Aza-2'-dC bzw. PBS als Lösungsmittelkontrolle inkubiert wurden.

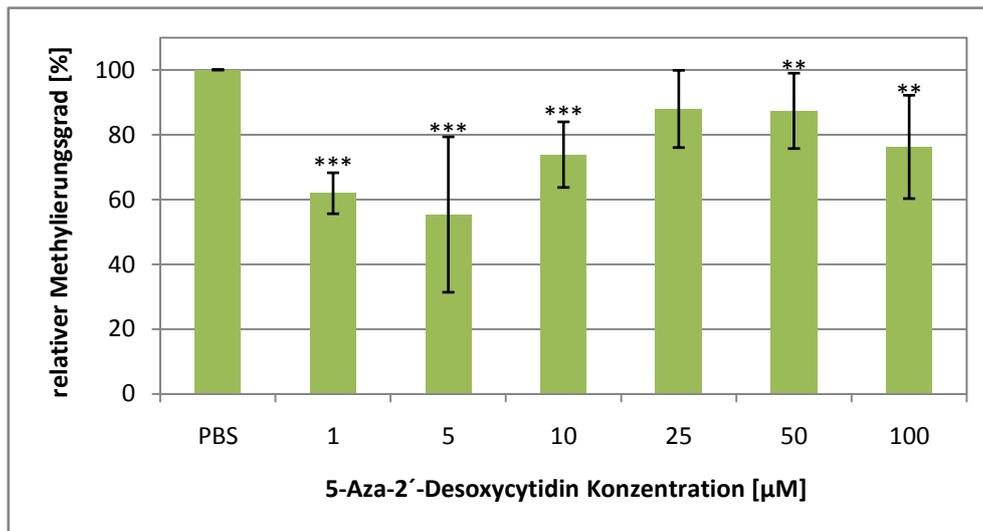


Abbildung 53: Relativer Methylierungsgrad von *CDKN2A* in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-dC. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt ($n = 8$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle PBS, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.3.1.3 DAPK1

Die Promotorregion von *DAPK1* wurde durch 5-Aza-2'-dC demethyliert. Die größte Wirkung wurde wiederum bei einer Konzentration von 5 μM festgestellt. Im Unterschied zu *RASSF1A* und *CDKN2A*

(Abbildungen 49 und 53) zeigte sich jedoch eine sehr starke Streuung der Werte, da die Methode für *DAPK1* nicht die Robustheit aufweist, wie sie bei anderen Methoden zu finden ist.

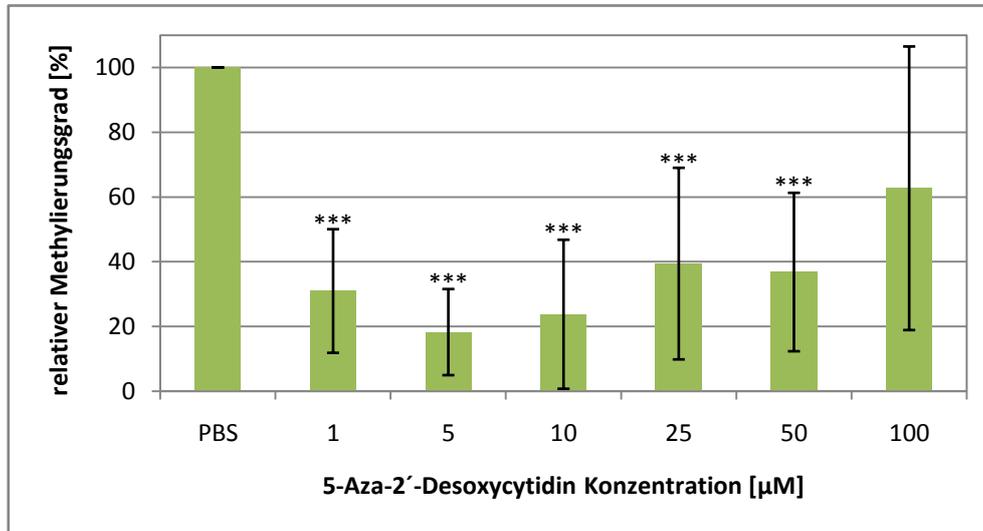


Abbildung 54: Relativer Methylierungsgrad von *DAPK1* in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-dC. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt ($n = 8$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle PBS, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

4.3.2 Bisphenol A

Bereits nach 24 h führte BPA in Konzentrationen von 50 µM und 100 µM zu einer Hemmung des Wachstums der Brustkrebszellen, wobei teilweise auch Deformationen der Zellen zu beobachten waren. Nach einer Inkubationsdauer von 96 h betrug die Zelldichte bei diesen BPA-Konzentrationen in etwa 50 %, nach 216 h waren nur mehr in etwa 20 % der Bodenoberfläche mit Zellen bewachsen. Bei niedrigeren Konzentrationen von BPA (1 µM-25 µM) konnte hingegen keine Wachstumsverminderung beobachtet werden.

4.3.2.1 RASSF1A

Es konnte kein signifikanter Effekt durch eine Inkubation mit BPA auf die Promotormethylierung von *RASSF1A* festgestellt werden.

Ergebnisse und Diskussion

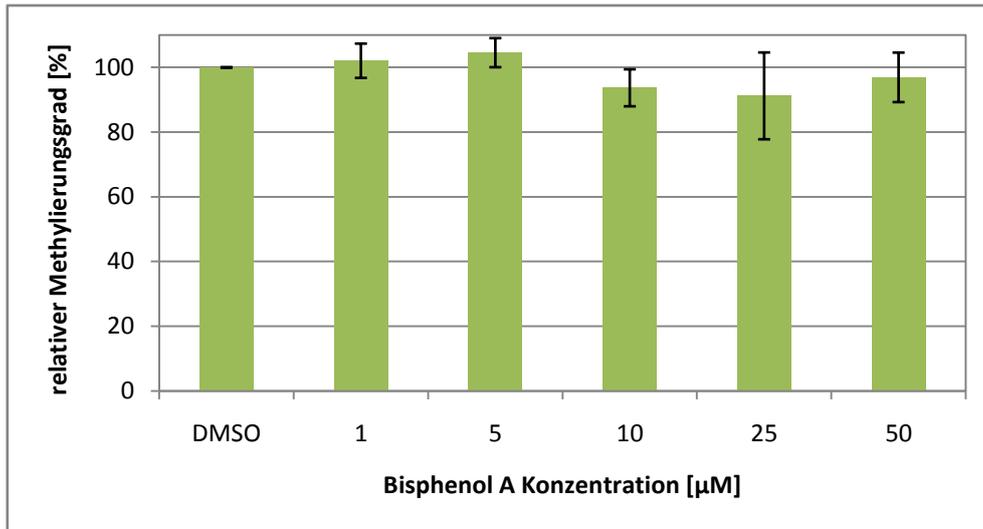


Abbildung 55: Relativer Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Bisphenol A. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt ($n = 8$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

4.3.2.2 CDKN2A

Auch auf das Exon 3 von *CDKN2A* übte die Inkubation mit BPA keine signifikante Änderung des Methylierungsgrades aus.

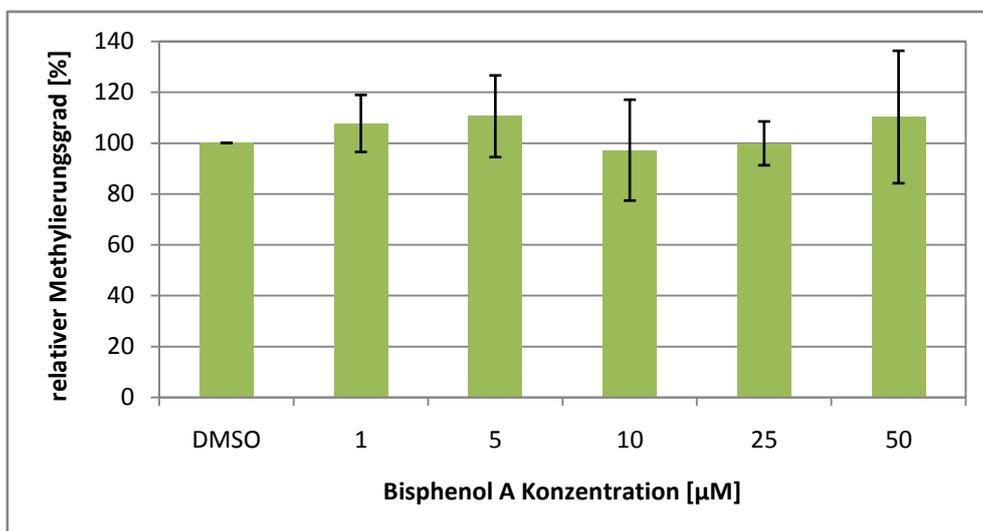


Abbildung 56: Relativer Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Bisphenol A. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt ($n = 8$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

4.3.2.3 DAPK1

Eine Behandlung von MCF-7 Zellen mit BPA führte zu keiner signifikanten Änderung der Promotormethylierung von *DAPK1*. Im Vergleich zur Negativkontrolle wurden teilweise höhere Werte für die Methylierung erhalten. Diese Ergebnisse wurden auf natürliche Schwankungen innerhalb der Zellpopulation zurückgeführt.

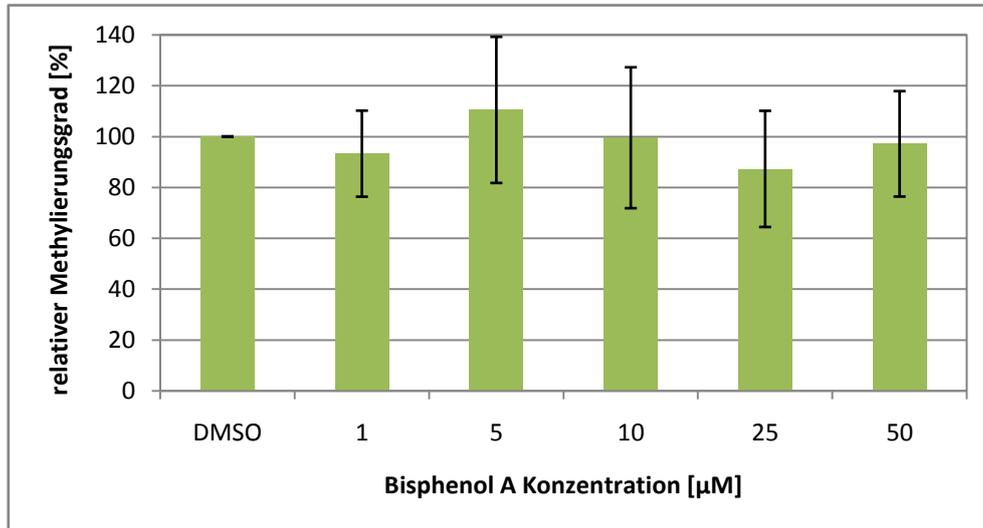


Abbildung 57: Relativer Methylierungsgrad von *DAPK1* in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Bisphenol A. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt ($n = 8$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.3.3 Genistein und Daidzein

Die MCF-7 Zellen wurden gleichzeitig mit unterschiedlichen Konzentrationen der Isoflavone Genistein (Gen) und Daidzein (Dai) behandelt (Abschnitt 5.2.5). Bei der Behandlung mit 12,5/12,5 µM bis 50/50 µM Genistein/Daidzein wurde bereits nach 24 h ein vermindertes Zellwachstum beobachtet und nach 48 h zeigte sich eine deutlich veränderte Morphologie der Zellen. Am Ende der Inkubationszeit waren Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. mit einer Gesamtisoflavonkonzentration von 10 µM inkubiert wurden, ausreichend angewachsen. Bei Zellen hingegen, die mit einer Gesamtisoflavonkonzentration von 20 µM behandelt wurden, betrug die Zelldichte nur in etwa 40 %. Eine Inkubation mit höheren Konzentrationen der Substanzen über einen Zeitraum von 216 h führte zum Absterben der Zellen, weshalb diese nicht für eine DNA-Extraktion herangezogen werden konnten. Das Inkubationsexperiment wurde kein zweites Mal durchgeführt, könnte aber Gegenstand weiterer Untersuchungen sein, um den beobachteten demethylierenden Effekt bei *CDKN2A* zu bestätigen (Abbildung 62).

4.3.3.1 RASSF1A

Eine gleichzeitige Inkubation von Genistein und Daidzein zeigte keinen nachweisbaren Effekt auf die Promotormethylierung von *RASSF1A*.

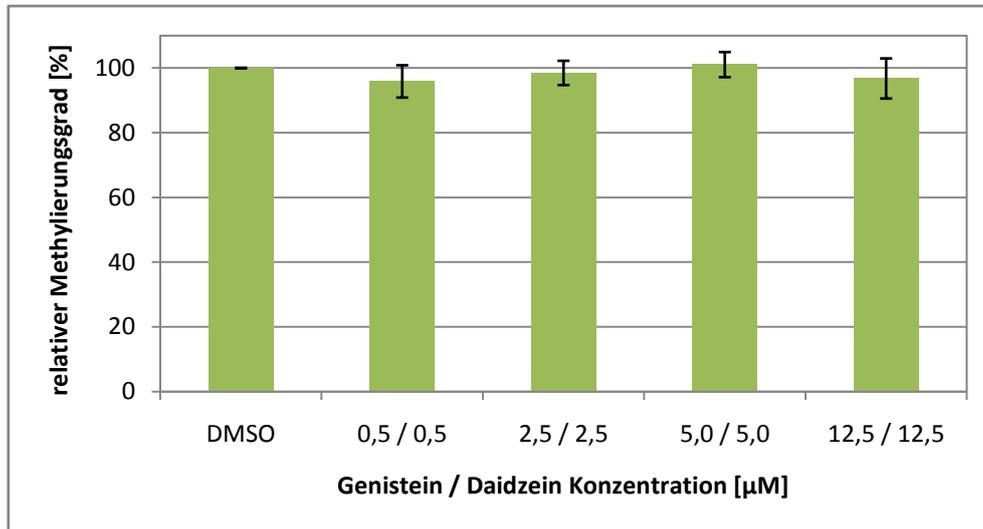


Abbildung 58: Relativer Methylierungsgrad von *RASSF1A* in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Genistein und Daidzein. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.3.3.2 CDKN2A

Genistein und Daidzein zeigten bei einer Konzentration von jeweils 0,5 µM einen demethylierenden Effekt auf das Exon 3 von *CDKN2A*. In den Abbildungen 59 und 60 sind die Ergebnisse einer MS-HRM Analyse dargestellt.

Ergebnisse und Diskussion

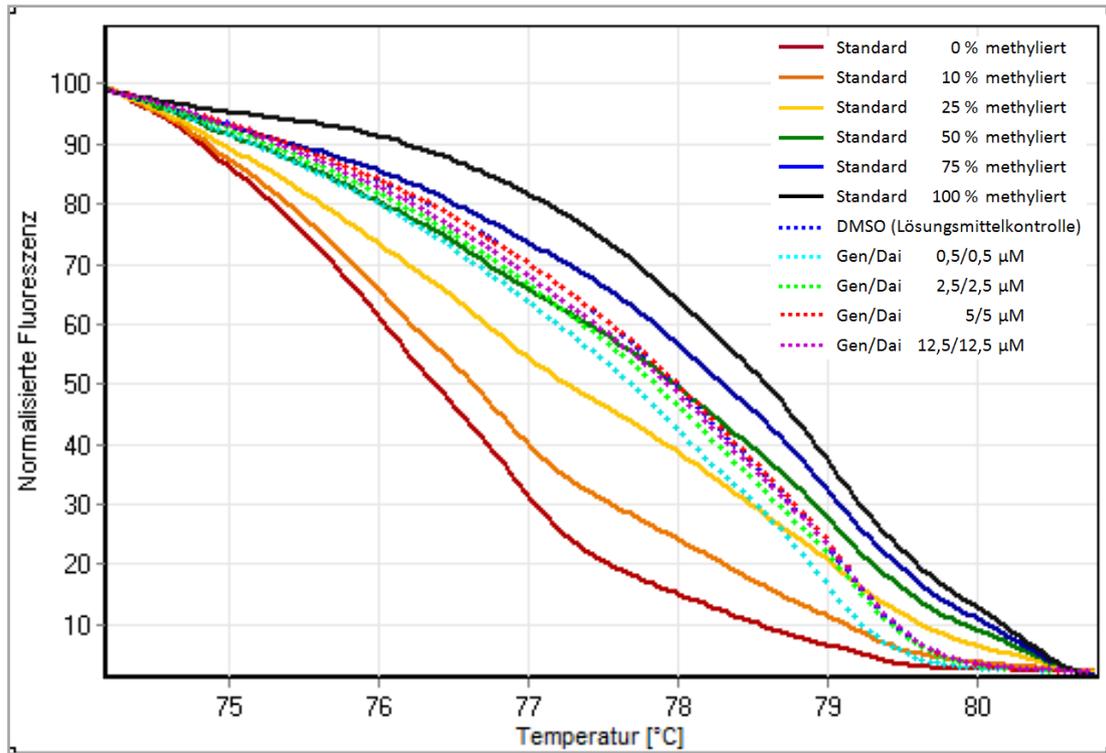


Abbildung 59: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Genistein (Gen) und Daidzein (Dai) inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A

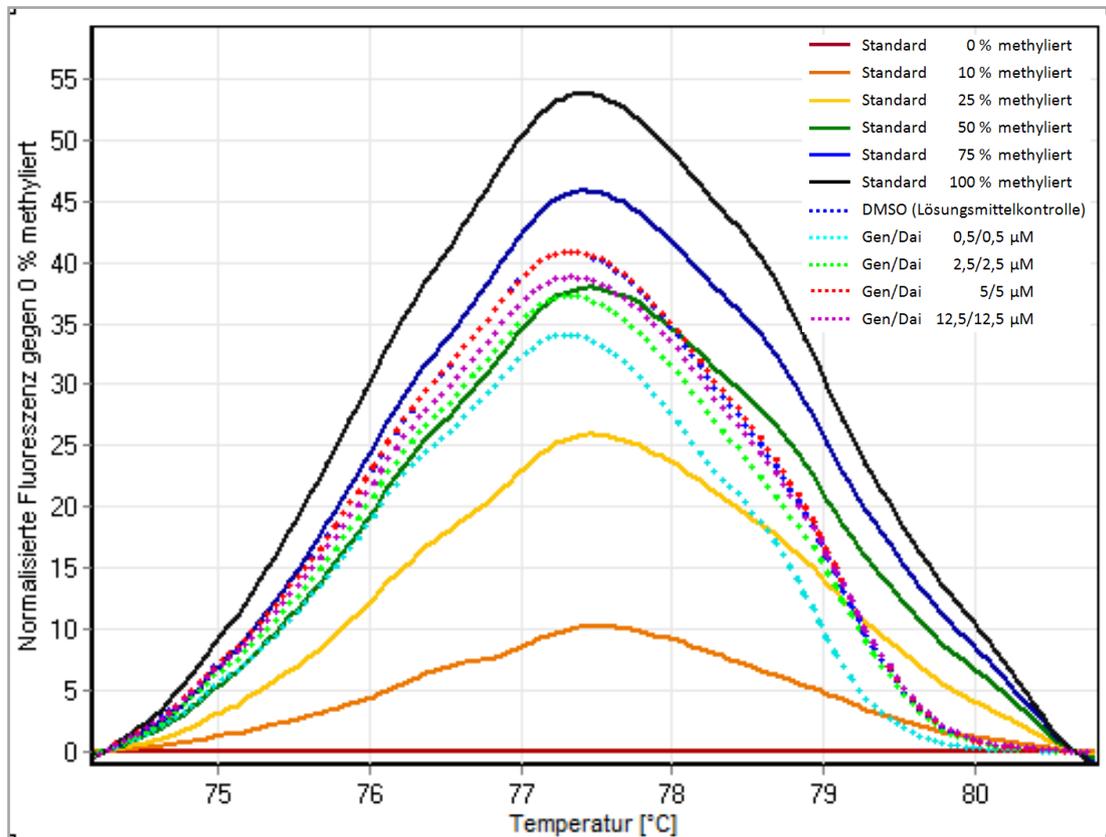


Abbildung 60: Differentialgraf der DNA aus mit Genistein und Daidzein inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A

Ergebnisse und Diskussion

Die in Abbildung 61 dargestellte Kalibriergerade zeigt eine hohe Korrelation zwischen dem Logarithmus der relativen Peakhöhe und dem Logarithmus der DNA-Methylierung (%). Eine grafische Darstellung der demethylierenden Wirkung von Genistein und Daidzein auf *CDKN2A* in MCF-7 Zellen ist in Abbildung 62 angeführt.

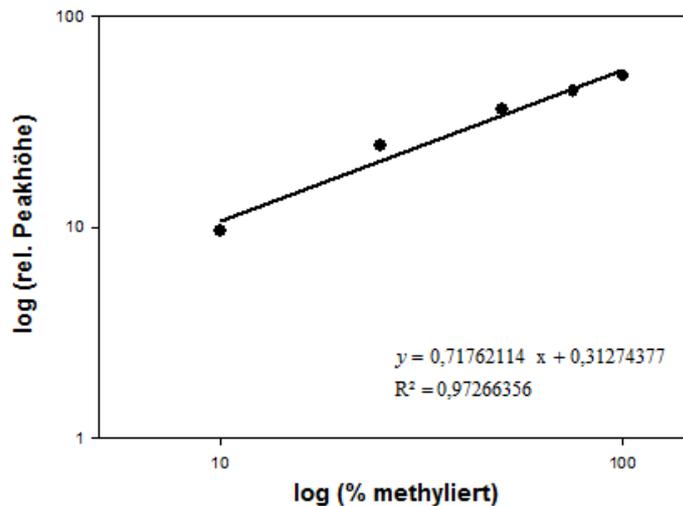


Abbildung 61: Kalibriergerade für *CDKN2A* für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Genistein und Daidzein

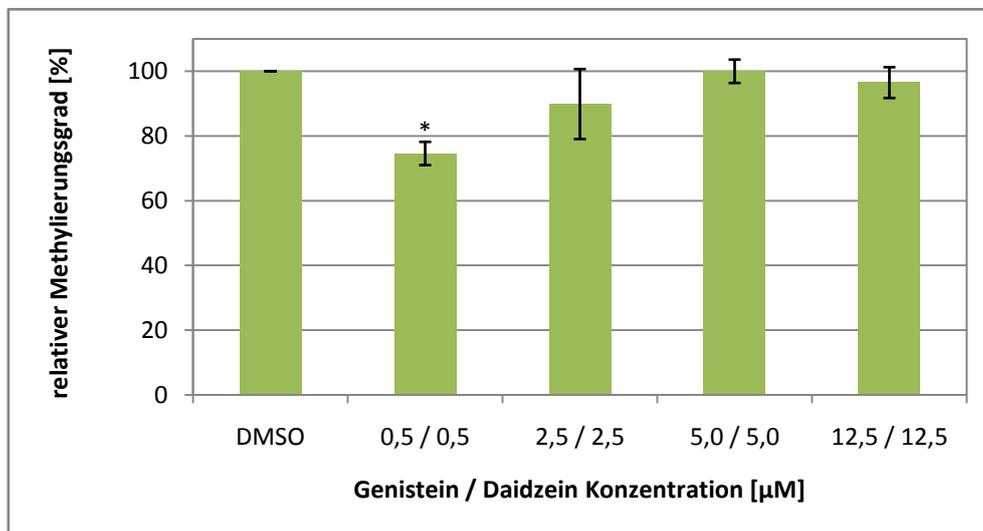


Abbildung 62: Relativer Methylierungsgrad von *CDKN2A* in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Genistein und Daidzein. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

4.3.3.3 DAPK1

Es konnte kein signifikanter Einfluss von Genistein und Daidzein auf die Promotorregion von *DAPK1* nachgewiesen werden (Abbildung 63).

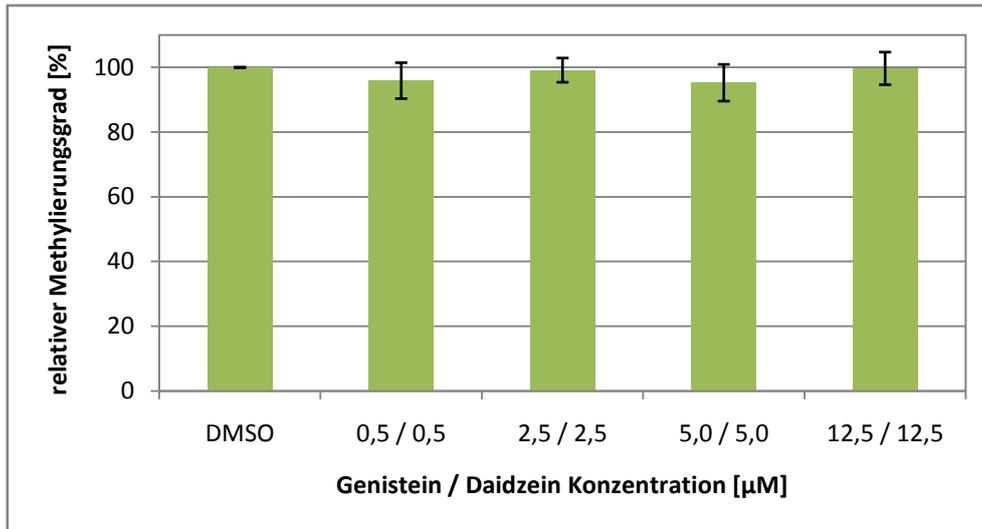


Abbildung 63: Relativer Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Genistein und Daidzein. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.3.4 Curcumin

Bei Zellen, die mit Curcumin einer Konzentration von 50 µM bzw. 100 µM behandelt wurden, war nach 24 h eine verminderte Zellteilung und ein damit verbundenes gehemmtes Wachstum zu erkennen. Nach einer Inkubationsdauer von 72 h wurden bei beiden Ansätzen nur mehr vereinzelt lebende Zellen identifiziert, weshalb die Kultivierungen mit 50 µM bzw. 100 µM Curcumin abgebrochen wurden. Bei einer Inkubation mit 25 µM Curcumin wurde nach einer Inkubationsdauer von 96 h ebenfalls ein vermindertes Wachstum festgestellt. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei niedrigeren Konzentrationen (1 µM - 10 µM) eine normale Zellentwicklung. Für die Extraktion der DNA konnten aufgrund der zu niedrigen Zelldichte die Ansätze mit einer Konzentration > 10 µM nicht verwendet werden. Es wurde mit Curcumin nur ein Inkubationsversuch ausgeführt. Inkubationsversuche über einen kürzeren Zeitraum könnten Gegenstand weiterer Experimente sein.

4.3.4.1 RASSF1A

Im Zuge der Analyse konnte eine signifikante Verminderung der Promotormethylierung von *RASSF1A* durch Curcumin festgestellt werden, wobei die Konzentrationen von 5 µM und 10 µM die stärksten Effekte zeigten (Abbildung 67). Die Abbildungen 64 und 65 zeigen die normalisierten Schmelzkurven und den Differentialgraf, welche mit der DNA von mit Curcumin behandelten MCF-7 Zellen erhalten wurden. Es wurden deutlich unterschiedliche Kurvenverläufe im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet.

Ergebnisse und Diskussion

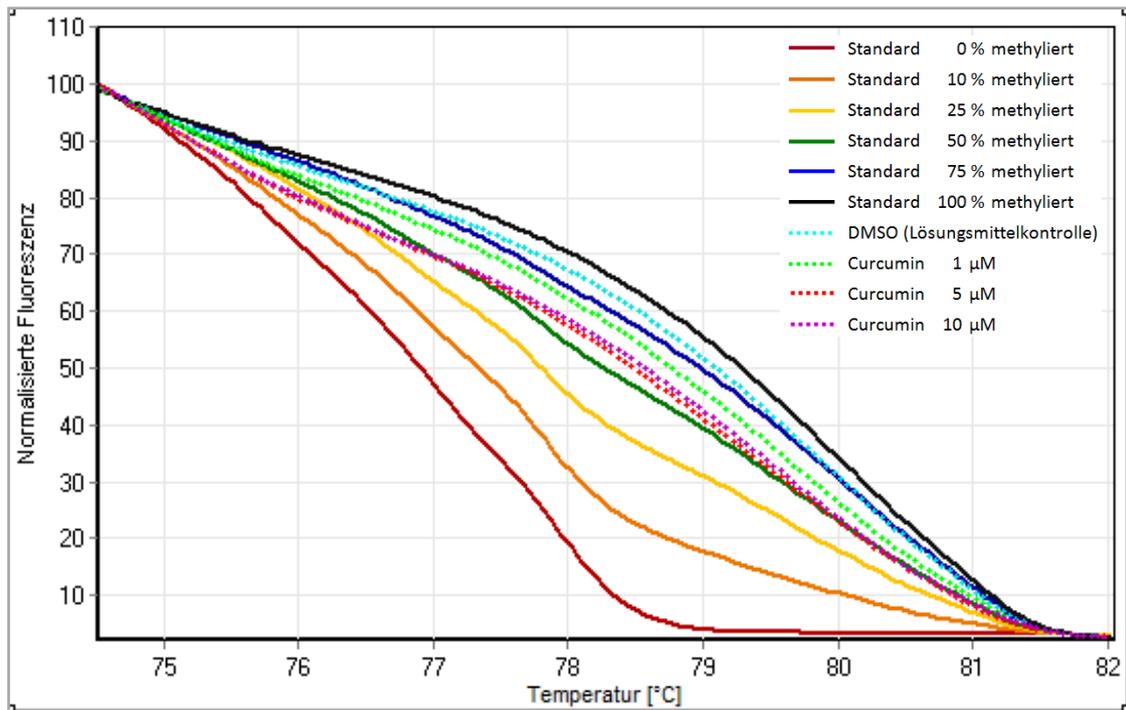


Abbildung 64: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Curcumin inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A

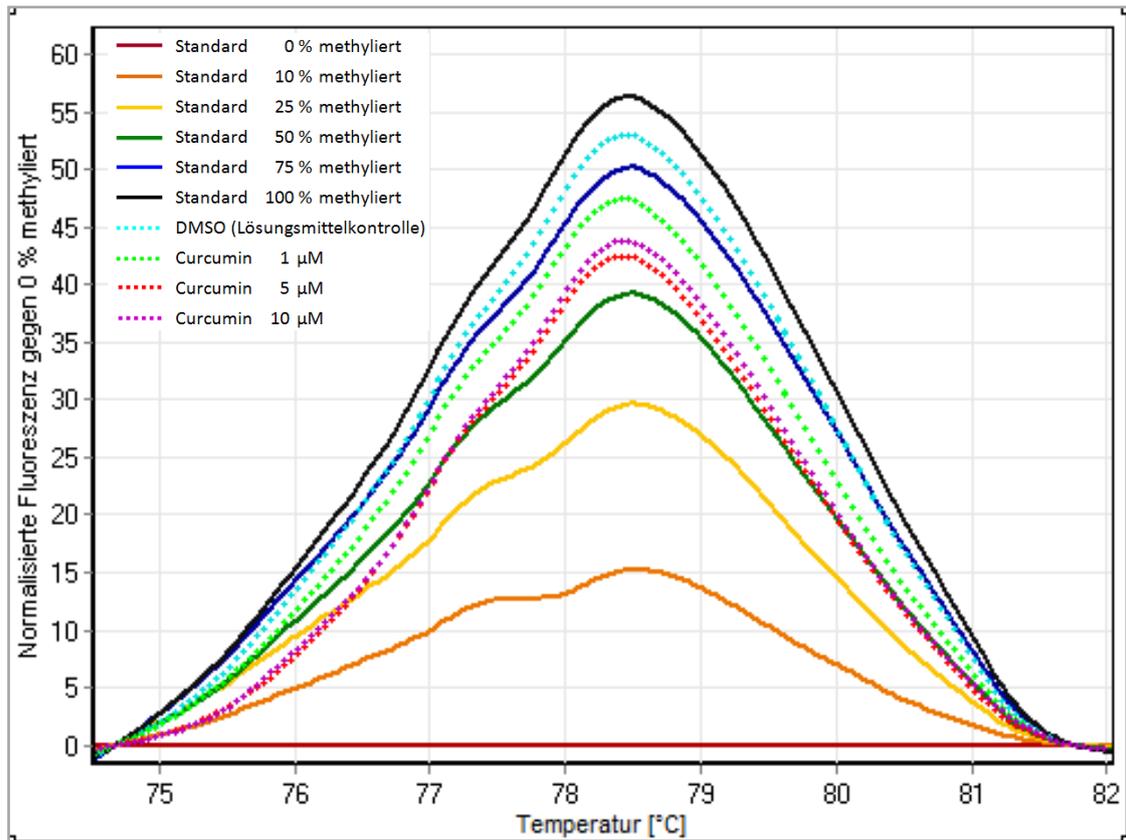


Abbildung 65: Differentialgraf der DNA aus mit Curcumin inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A

Ergebnisse und Diskussion

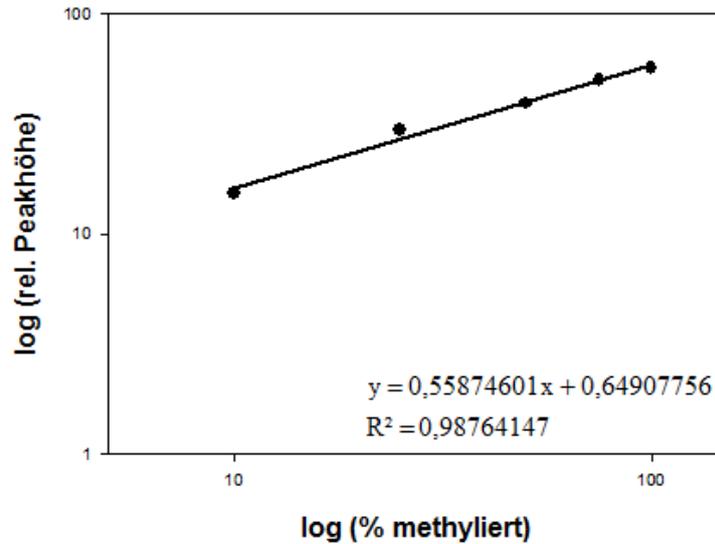


Abbildung 66: Kalibriergerade für RASSF1A für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Curcumin

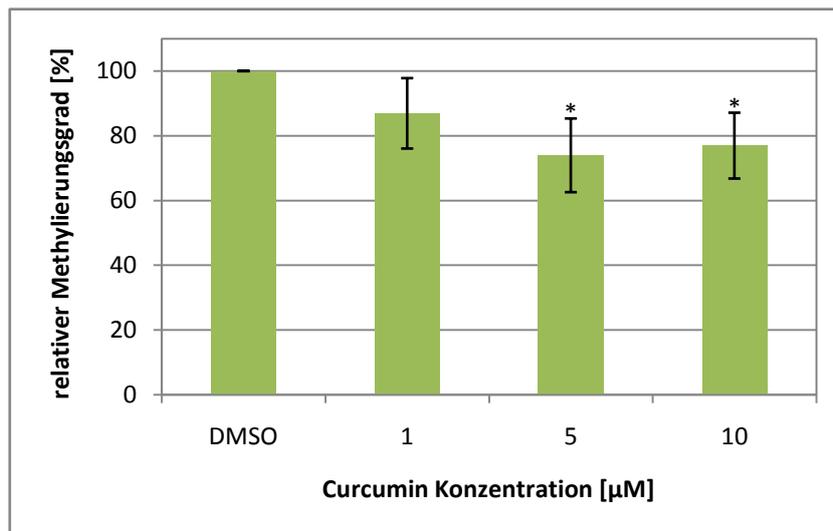


Abbildung 67: Relativer Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Curcumin. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

4.3.4.2 CDKN2A

Die Methylierung des Exon 3 von *CDKN2A* wurde durch eine Inkubation mit Curcumin im Konzentrationsbereich von 5 µM vermindert.

Ergebnisse und Diskussion

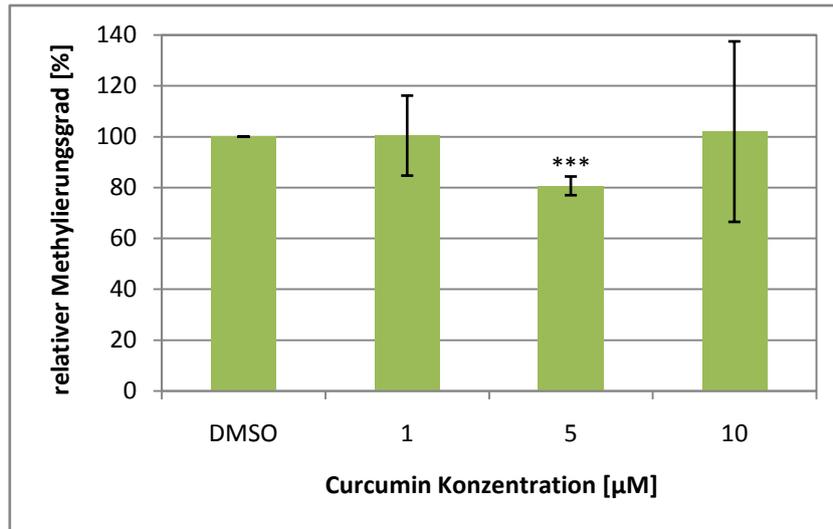


Abbildung 68: Relativer Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Curcumin. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

4.3.4.3 DAPK1

Bei DAPK1 konnte ein demethylierender Effekt durch eine Konzentration von 10 µM Curcumin nachgewiesen werden.

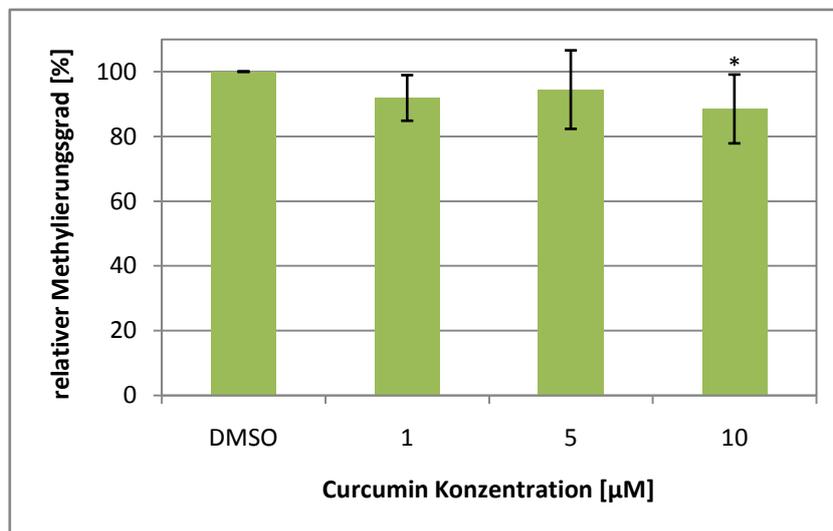


Abbildung 69: Relativer Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Curcumin. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)

4.3.5 Parthenolid

In einem Vorversuch wurden MCF-7 Zellen mit Parthenolid der Konzentrationen von 0 bis 100 μM über einen Zeitraum von 216 h inkubiert. Bereits nach 24 h zeigten die Zellen bei höheren Konzentrationen (10 μM , 25 μM , 50 μM bzw. 100 μM Parthenolid) ein vermindertes Wachstum und eine veränderte Morphologie und wurden aufgrund der verminderten Zellzahl nach 96 h verworfen. Nach 168 h zeigten auch vereinzelt Zellen der Inkubation mit 5 μM Parthenolid Deformationen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in einem zweiten Versuch sowohl die Konzentrationen von Parthenolid als auch die Dauer der Inkubation variiert. MCF-7 Zellen wurden für 96 Stunden mit 1 μM , 2,5 μM bzw. 5 μM Parthenolid behandelt. Im Vergleich zur DMSO-Kontrollprobe zeigten die Zellen bei allen Konzentrationen ein vermindertes Wachstum und wiesen nur eine Zelldichte von 30-40 % auf.

4.3.5.1 RASSF1A

Es konnte über den gesamten Konzentrationsbereich von Parthenolid ein demethylierender Effekt auf *RASSF1A* bei MCF-7 Zellen nachgewiesen werden.

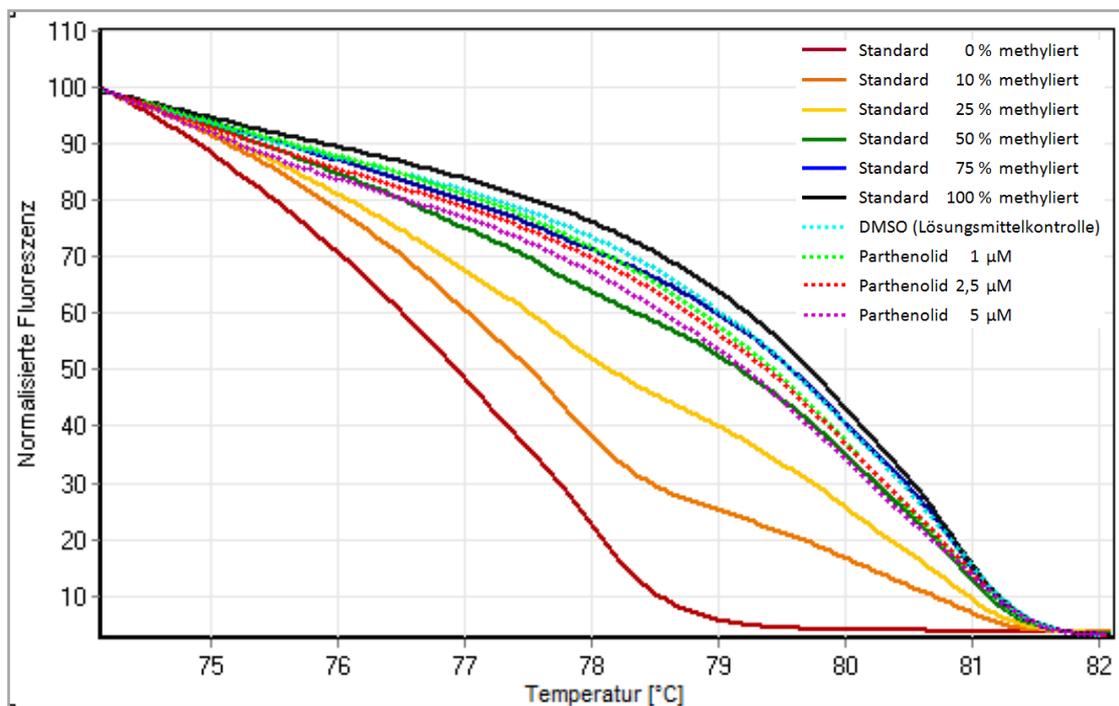


Abbildung 70: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Parthenolid inkubierten MCF-7 Zellen für *RASSF1A*

Ergebnisse und Diskussion

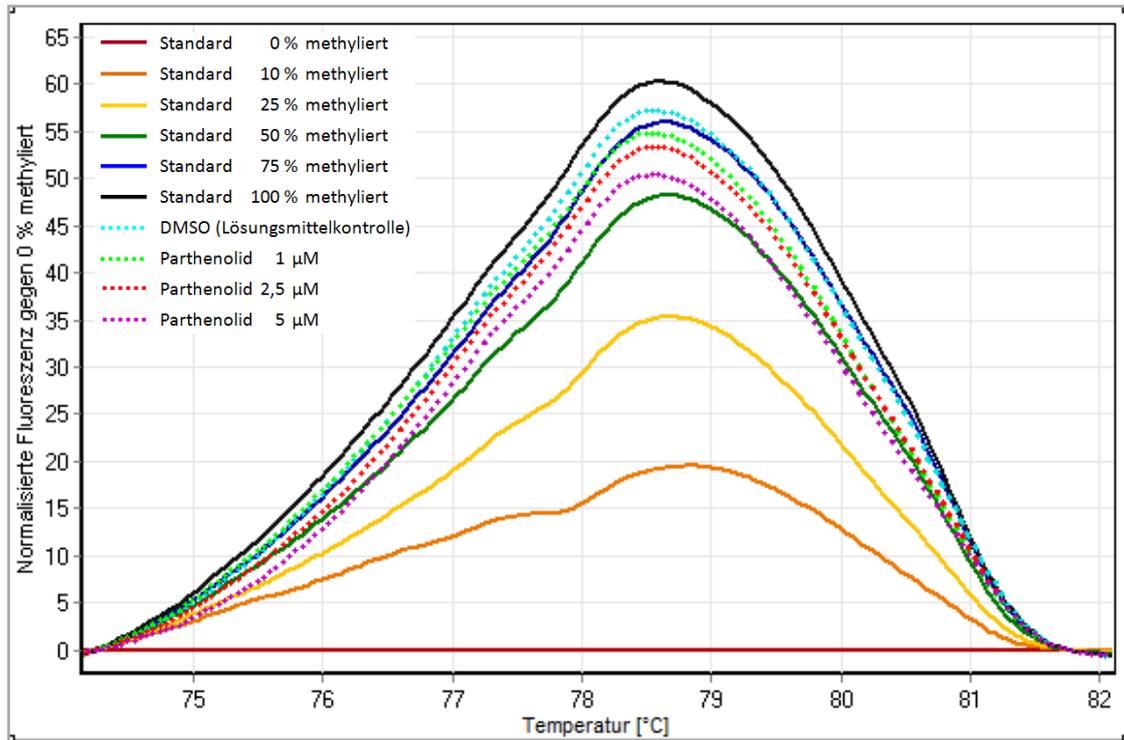


Abbildung 71: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Parthenolid inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A

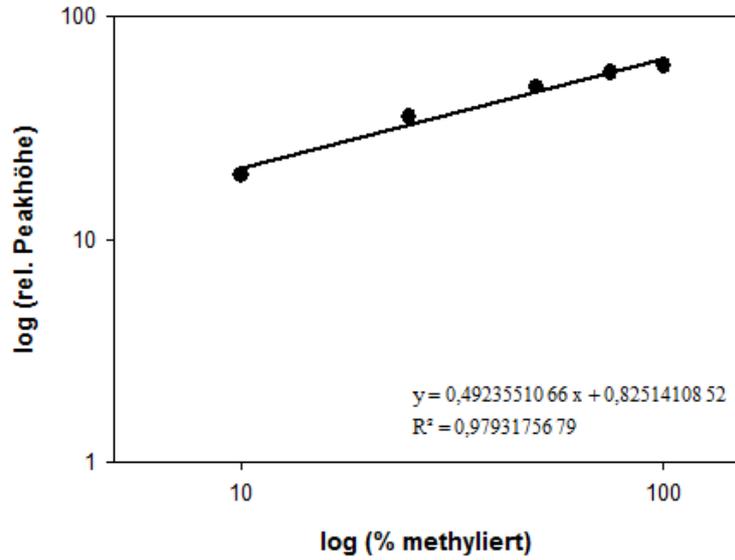


Abbildung 72: Kalibriergerade für RASSF1A für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Parthenolid

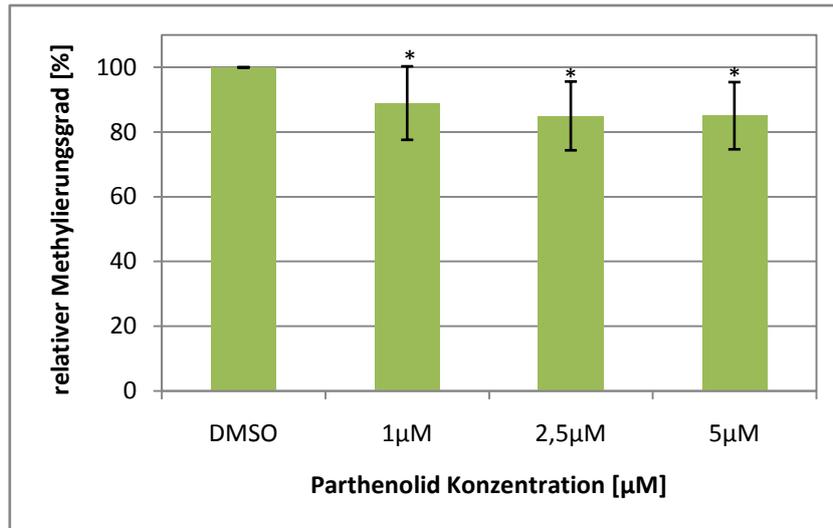


Abbildung 73: Relativer Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Parthenolid. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.3.5.2 CDKN2A

Trotz der starken Streuung der Werte bei der Bestimmung des Methylierungsgrades von *CDKN2A* wurde eine statistisch signifikante Abnahme bei einer Konzentration von 5 µM Parthenolid festgestellt.

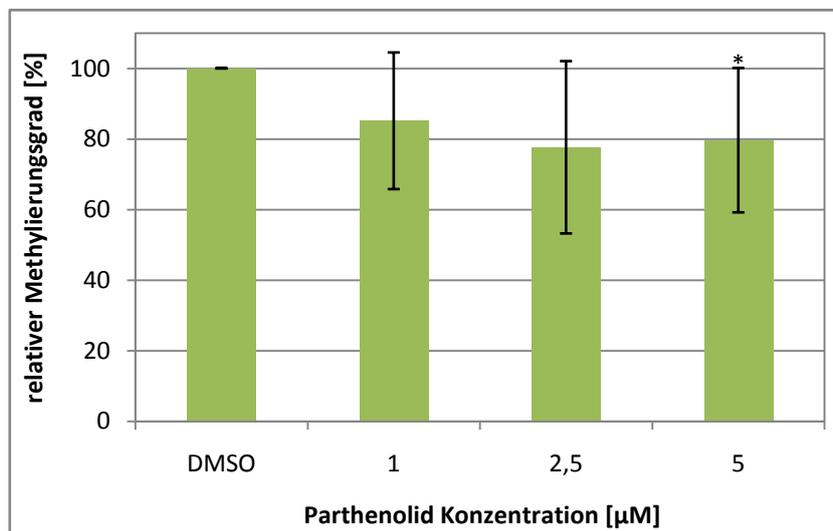


Abbildung 74: Relativer Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Parthenolid. Es sind der Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.3.5.3 DAPK1

Bei der Inkubation mit 1 μM , 2,5 μM bzw. 5 μM Parthenolid wurde eine Reduktion der Promotormethylierung von *DAPK1* festgestellt. Die normalisierten Schmelzkurven (Abbildung 75) und der Differentialgraf (Abbildung 76) zeigen die Abnahme des Methylierungsgrades. Für die Berechnung wurde die in Abbildung 77 dargestellte Kalibrierfunktion verwendet.

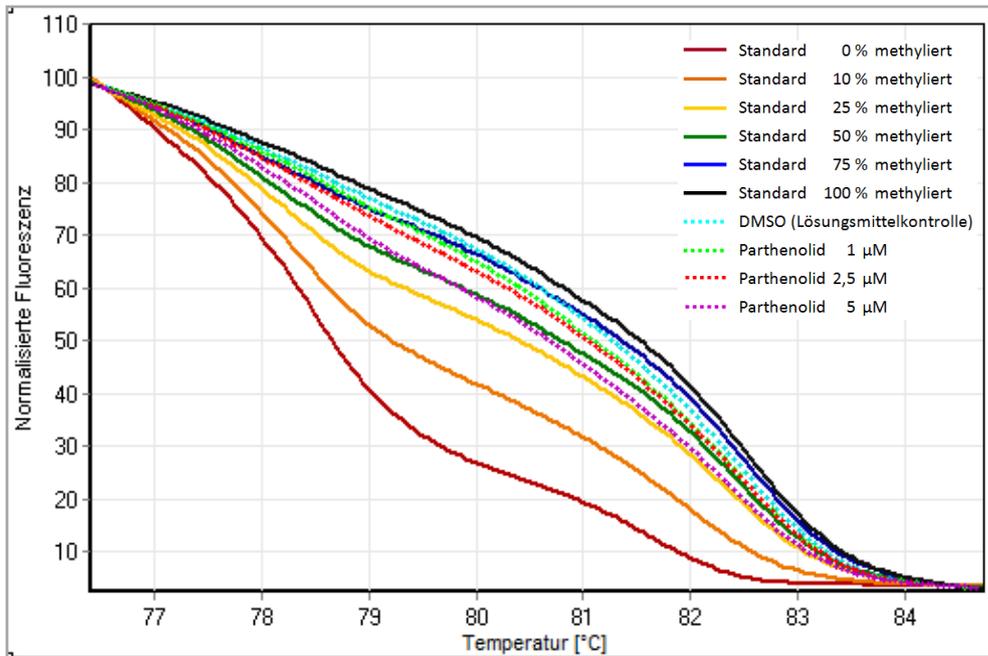


Abbildung 75: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Parthenolid inkubierten MCF-7 Zellen für *DAPK1*

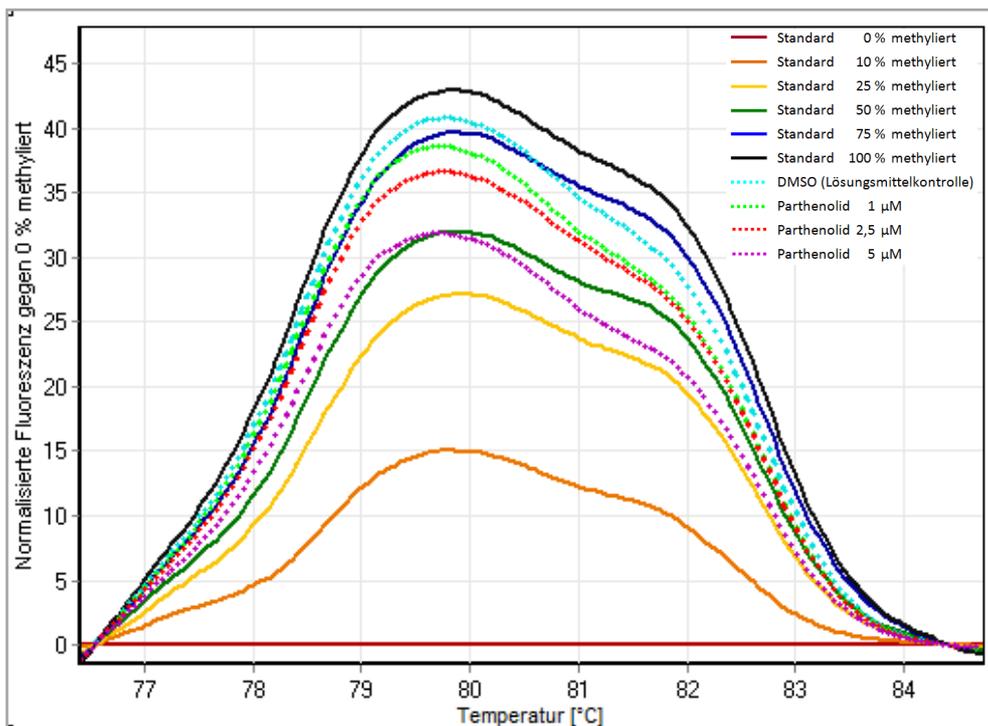


Abbildung 76: Differentialgraf der DNA aus mit Parthenolid inkubierten MCF-7 Zellen für *DAPK1*

Ergebnisse und Diskussion

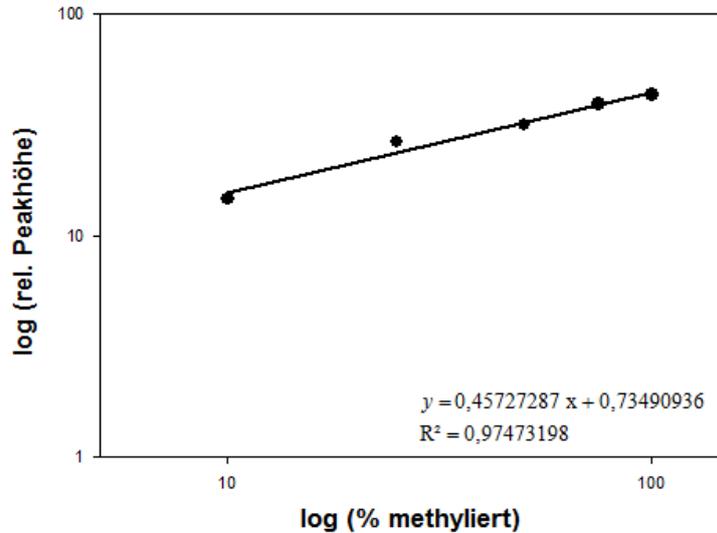


Abbildung 77: Kalibriergerade für DAPK1 für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Parthenolid

In Abbildung 78 sind die Ergebnisse der MS-HRM Analysen für die Promotorregion von *DAPK1* dargestellt.

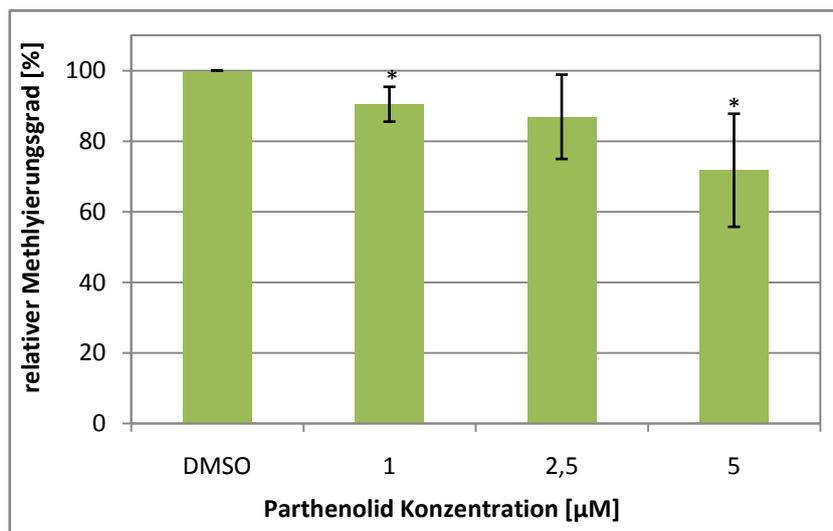


Abbildung 78: Relativer Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Parthenolid. Es sind der Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$).**

4.4 BESTIMMUNG DER DNA-METHYLIERUNG VON TUMORSUPPRESSORGENEN IN BIOPSIEPROBEN

In Zusammenarbeit mit Ass. Prof. Dr. Georg Pfeiler von der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie der Medizinischen Universität Wien wurden fünf Biopsieproben von

Brustkrebspatientinnen untersucht, wobei jeweils Tumorgewebe, Zellmaterial in etwa einem cm Abstand zum Karzinom und weiter entfernt liegendes, gesundes Gewebe biopsiert wurden.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde der Methylierungsgrad der Promotorregion bzw. des Exons Brustkrebs-relevanter Tumorsuppressorgene in Tumorgewebe, tumornahem und -fernem Gewebe mit MS-HRM Methoden für *RASSF1A*, *CDKN2A*, *DAPK1* und *APC* untersucht (vgl. Abschnitt 4.2). Bei der Auswertung der Daten wurde auf signifikante Unterschiede zwischen dem Methylierungsgrad unterschiedlicher Gewebe von einer Brustkrebspatientin geachtet. Im Verlauf der Analysen konnte die zuvor getroffene Annahme, dass Tumorgewebe eine höhere Methylierung als umliegendes, gesundes Gewebe aufweist, bei einem Großteil der untersuchten Gene bestätigt werden.

4.4.1 RASSF1A

Bei der Analyse der Promotorregion von *RASSF1A* konnte in Tumorgewebe der Proben 2, 3 und 5 trotz der starken Streuung der Werte eine deutlich höhere Methylierung im Gegensatz zum umliegenden Gewebe festgestellt werden. Individuelle Unterschiede in der Promotormethylierung zwischen den Karzinomen der einzelnen Patientinnen sind deutlich zu erkennen. Bei Probe 1 und 4 weist die DNA des Tumors eine sehr geringe Methylierung des *RASSF1A* Promotors auf. Bei Probe 1 sind keine Unterschiede zu den umliegenden Geweben erkennbar. Tumornahes Gewebe der Probe 4 weist im Vergleich zu Karzinommaterial und fernem Gewebe die höchste Methylierung auf.

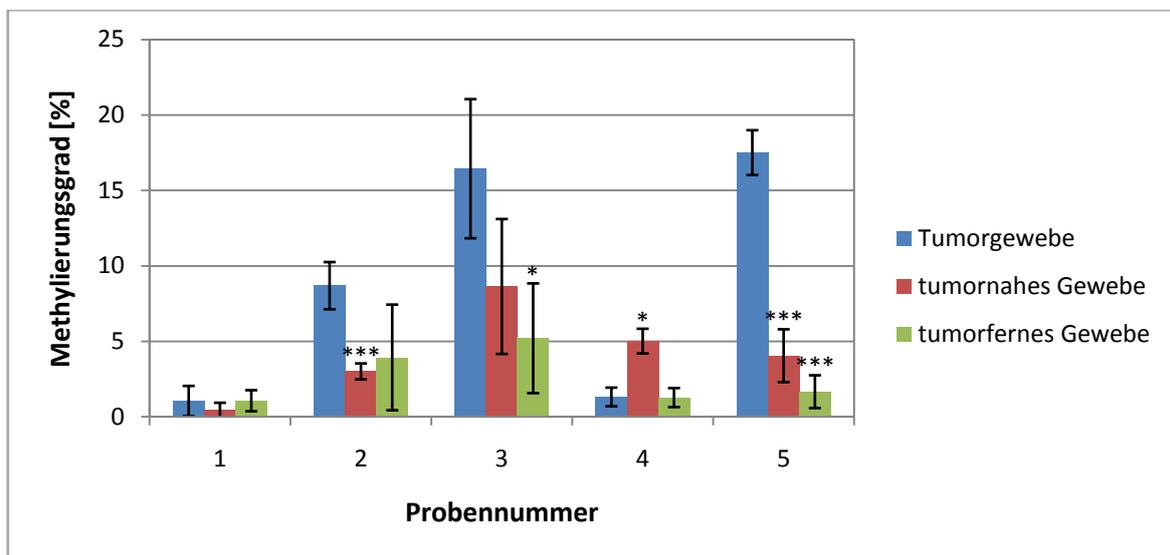


Abbildung 79: Methylierungsgrad der Promotorregion von *RASSF1A* in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe fünf unterschiedlicher Biopsieproben. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf das jeweilige Tumorgewebe, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.4.2 CDKN2A

Bei allen fünf Proben konnte jeweils bei Tumorgewebe der höchste Grad an DNA-Methylierung aufgezeigt werden (Abbildung 80). Tumorfernes Gewebe wies bei Probe 1 und 2 eine stärkere Methylierung als das Tumornahe. Die deutlichsten Unterschiede in der Methylierung von *CDKN2A* konnten bei einem Vergleich der drei Gewebe bei den Proben 3 und 5 festgestellt werden.

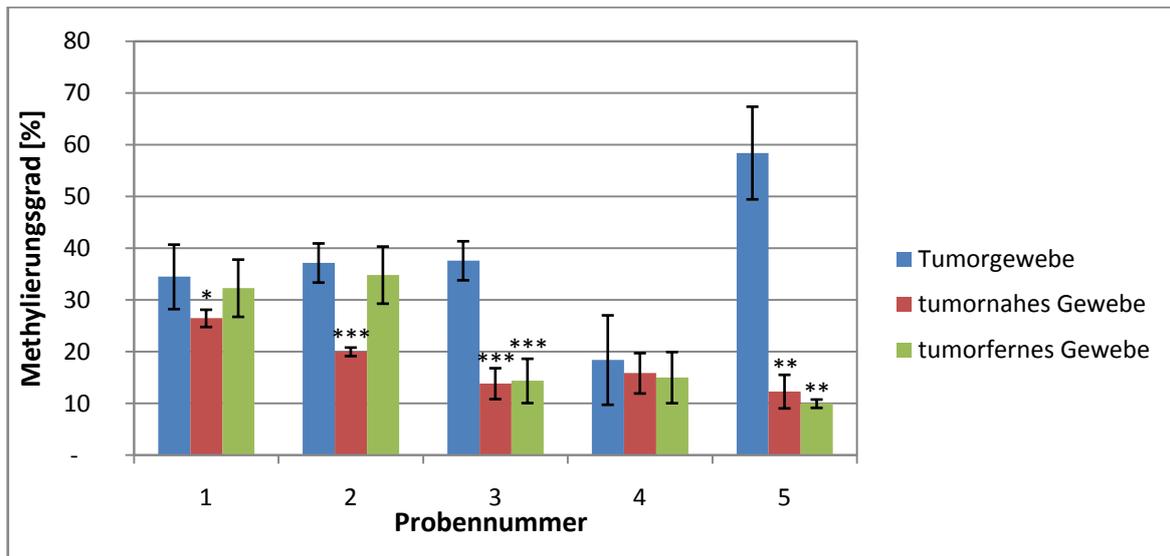


Abbildung 80: Methylierungsgrad der Methylierung des Exon 3 von *CDKN2A* in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe fünf unterschiedlicher Biopsieproben. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf das jeweilige Tumorgewebe, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.4.3 DAPK1

Im Unterschied zu den anderen untersuchten Genen weisen die Ergebnisse für *DAPK1* eine sehr starke Streuung auf. Die Werte der einzelnen Messungen variieren deutlich, sodass genaue Aussagen über den tatsächlichen Methylierungsgrad der einzelnen Proben nur bedingt möglich sind. Grundsätzlich weisen die Tumorgewebe fast aller Proben (2-5), eine höhere Methylierung als umliegendes, gesundes Gewebe auf. Bei Probe 3 zeigt sich ein signifikant höherer Wert für das Ausmaß der Methylierung im Karzinomgewebe im Vergleich zu tumornahem und -fernem Biopsiematerial derselben Patientin (vgl. Abbildung 81).

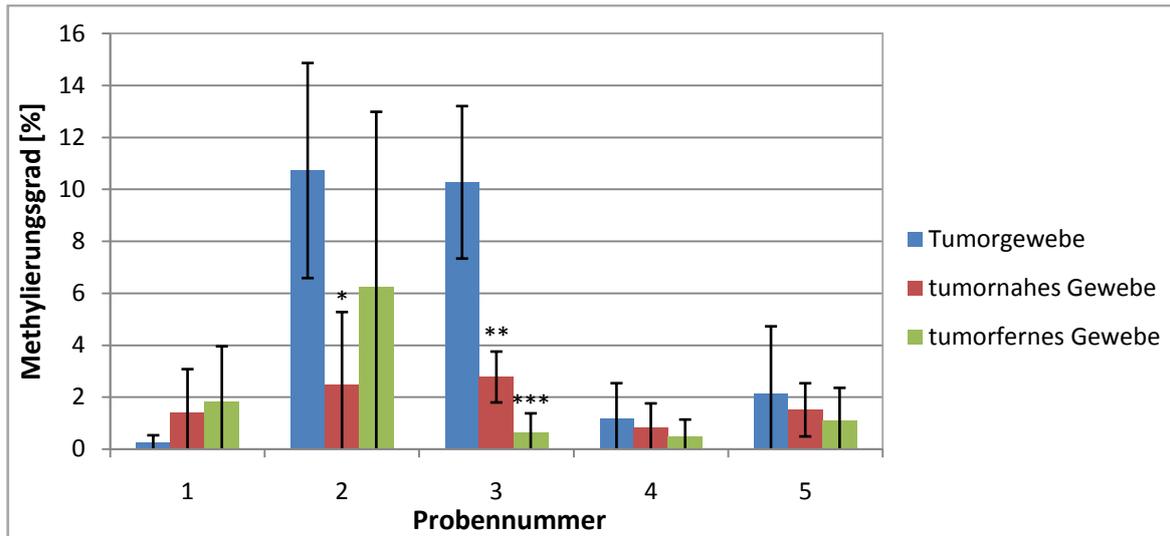


Abbildung 81: Methylierungsgrad der Promotorregion von DAPK1 in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe fünf unterschiedlicher Biopsieproben. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf das jeweilige Tumorgewebe, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.4.4 APC

Bei der Untersuchung der DNA-Methylierung des APC Promotors konnten sehr starke individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Brustkrebspatientinnen festgestellt werden. Eine deutliche Methylierung lässt sich bei Probe 3 erkennen, wohingegen die Proben 4 und 5 kaum methyliert sind. Die Proben 1 und 2 zeigen ein Muster, das entgegen der These die höchste Methylierung bei tumorfernem Gewebe aufweist (Abbildung 82).

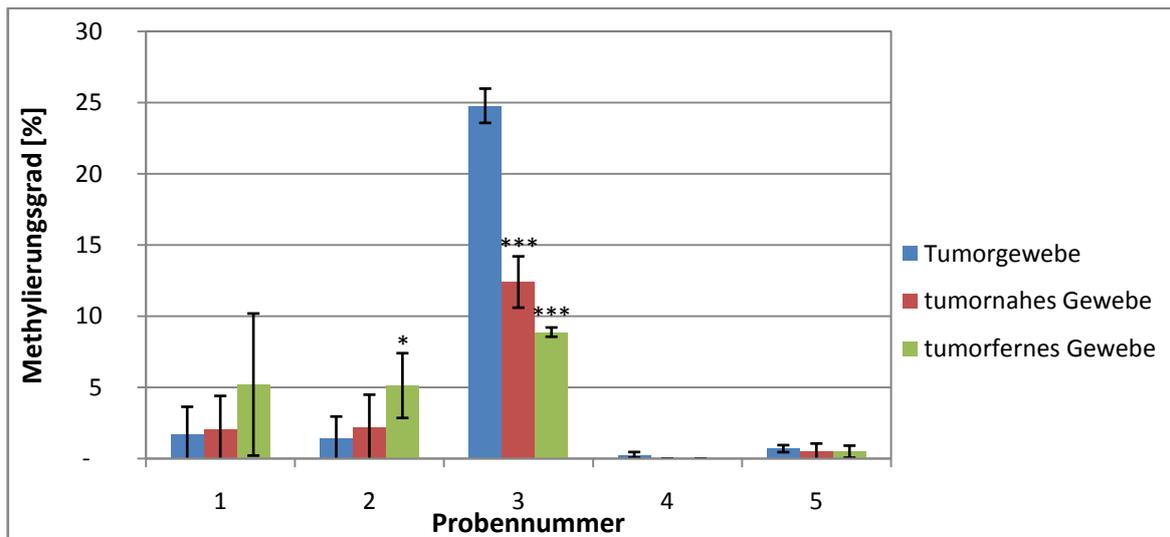


Abbildung 82: Methylierungsgrad der Promotorregion von APC in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe fünf unterschiedlicher Biopsieproben. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf das jeweilige Tumorgewebe, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; *: $p < 0,001$)**

4.4.5 Diskussion

Bei der Analyse der Biopsieproben konnten bei allen untersuchten Genen Unterschiede im Methylierungsgrad zwischen Tumorgewebe, Tumornahem und -fernem Gewebe festgestellt werden. Zusätzlich wurden bei den einzelnen Genen vor allem beim Tumorgewebe deutlich verschiedene hohe Werte für die DNA-Methylierung ermittelt, so sind der Promotor von *RASSF1A* und das Exon 3 von *CDKN2A* wesentlich stärker methyliert als die Promoter von *DAPK1* und *APC*. Ferner wurde festgestellt, dass das Methylierungsausmaß zwischen den einzelnen Patientinnen stark variiert. Die Probe 4 ist beispielsweise bei allen untersuchten Genen relativ niedrig methyliert, es lässt sich jedoch kein eindeutiges Muster feststellen.

4.4.6 Biologische Varianz

Bei den Messungen der Biopsieproben mittels MS-HRM Methoden wurden starke Schwankungen der Ergebnisse festgestellt. Bei Zellen aus Gewebeproben handelt es sich um zuvor lebende Systeme, die aufgrund variierender Voraussetzungen nicht ident sind. Neben den individuellen Unterschieden aufgrund der biologischen Varianz zwischen den Brustkrebspatientinnen, führten auch zwei unabhängige Messungen der gleichen Probe zu stark unterschiedlichen Werten. Es traten teilweise Probleme bei der Bestimmung der DNA-Methylierung auf und die Interpretation der Ergebnisse war aufgrund der starken Streuung der Werte schwierig. Weitere Analysen der Biopsieproben wären nötig, um die gemessenen Werte statistisch abzusichern.

5. EXPERIMENTELLER TEIL

5.1 ENTWERFEN UND ÜBERPRÜFUNG VON PRIMERN

Für das Entwerfen von Primern wurde die Software *Methyl Primer Express (v 1.0)* verwendet. Ebenso wurden diverse Freewares herangezogen, die bei der Überprüfung der Schmelztemperatur, der Bildung von Sekundärstrukturen und Primer-Dimeren helfen. Im Folgenden wird die Vorgehensweise ausgeführt.

5.1.1 Entwerfen von Primern mit der Methyl Primer Express Software

Für die Entwicklung von MS-HRM Methoden wurde die Sequenz des jeweiligen Zielgens aus der Datenbank des *NCBI* [86] entnommen und anschließend in die *Methyl Primer Express Software (Version 1.0)* eingefügt, welche daraus CpG-reiche Regionen ermittelt. Liegen mehrere solcher CpG-Inseln vor, wurde jene näher des 5'-Endes der Sequenz gewählt. Im nächsten Schritt wurde die Funktion „Design BSP Primer“ ausgewählt, um nach bisulfit-konvertierungs-spezifischen Primer zu suchen, die für die Amplifikation der zuvor gewählten DNA-Sequenz eingesetzt werden können. Durch die Wahl geeigneter Parameter wurden mögliche Primerpaare ausgewählt (vergleiche dazu Kapitel 3.4.1 und 3.4.2).

Es wurden folgende Einstellungen beim Entwerfen von Primern berücksichtigt:

allgemeine Einstellungen:

- Länge des Amplikons: 90-150 Basen
- Länge der Primer: 18-27 Basen
- Annealingtemperatur: 60-68 °C

methylierungs-spezifische Einstellungen:

- Anzahl der CpG im Primerpaar: 3
- Anzahl der C nicht von einem CpG stammend: 1-10
- Minimale Anzahl der C nicht aus einem CpG/Primer: 3

Zu jedem Primerpaar wurden die Basensequenz und deren Länge angegeben, außerdem wurden die T_m und die Anzahl der vorkommenden CpG aufgelistet. Es fand sich zusätzlich die Region, in der die Primersequenz eingebettet ist, um eine Modifikation dieser durchführen zu können. Des Weiteren war das PCR-Produkt, dessen Länge sowie die Anzahl und Lage der CpG angegeben.

Wichtige Parameter, wie die Lage der CpG-Dinukleotide, die Komplexität der Basenabfolge, die Anzahl der T am Ende der Sequenz, die nicht von einem CpG stammen etc. wurden nicht berücksichtigt, weshalb ein manuelles Aussortieren der vorgeschlagenen Primerpaare notwendig war. Im ersten Schritt wurde die Basenzusammensetzung der Primer kontrolliert, dabei wurden jene ausgeschlossen, die eine vier- bis fünffache Wiederholung der gleichen Base zeigten. Primer, die kein ausgewogenes Verhältnis der Basen aufwiesen, wurden ebenfalls ausgeschlossen.

Weitere wichtige Ausschlusskriterien waren die Länge des Amplikons und dessen Anzahl an CpG-Dinukleotiden. Die Länge sollte dabei 100-130 Basenpaare nicht überschreiten, da sonst das Auftreten komplexer Schmelzprofile wahrscheinlich ist [73]. Auf zehn Basenpaare sollte zumindest ein CpG-Dinukleotid entfallen, wodurch meist ein ausreichend großer Unterschied in der Schmelztemperatur des bisulfit-konvertierten unmethylierten und methylierten PCR-Produkts für die MS-HRM Analyse erzielt werden konnte.

Als nächstes wurden die Primerpaare auf die Anzahl und Lage der CpG überprüft. Das Vorkommen von drei CpG-Dinukleotiden pro Primerpaar hat sich als günstig herausgestellt. Weist ein Primer mehr als zwei CpG-Dinukleotide auf, könnte es zu keiner oder nur sehr verminderten Amplifikation des unmethylierten Templates kommen. Die CpG sollten so nahe wie möglich am 5'-Ende des jeweiligen Primers liegen [85].

Um ein CpG-Dinukleotid in einem Primer zu aktivieren, wurde das Y bzw. R durch ein C im Forwardprimer und durch ein G im Reverseprimer ersetzt. Zur Inaktivierung wurden diese durch ein T bzw. A ersetzt. Auf diese Weise wurden die Primer den zuvor angeführten Anforderungen (siehe dazu Kapitel 3.4.1 und 3.4.2) entsprechend entworfen. Liegt ein CpG in der Nähe des 5'-Endes, hat es sich als günstig erwiesen, ein zweites CpG am Ende der Primersequenz zu aktivieren. Liegt es hingegen in der Mitte, wurde meist dieses als einziges aktiviert. Die Problemstellung ist jedoch von Primer zu Primer verschieden und wurde in jedem Fall einzeln überdacht.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Primer am oder in der Nähe des 3'-Endes T aufwiesen, die vor der Bisulfit-Konvertierung ein C und nicht Teil eines CpG der gDNA waren. Dadurch wurde die spezifische Amplifikation von bisulfit-konvertierter DNA gesichert [84]. Falls sich keines dieser T in der vorgeschlagenen Primersequenz befand, wurde diese falls möglich entweder verlängert oder verkürzt.

Die Manipulation der Länge der Primersequenz führte zu einer Änderung der T_m . Da sich diese bei den Primern nicht mehr als 1°C unterscheiden soll, wurden zum Ausgleich Basen am 5'- oder 3'-Ende entfernt oder hinzugefügt [84]. Diese Möglichkeit konnte je nach Primer ebenso zur besseren Positionierung der CpG-Dinukleotide angewendet werden.

5.1.2 Überprüfung der entworfenen Primer

- **Bestimmung der genauen Schmelztemperatur der Primer**

Die Bestimmung der Schmelztemperatur wurde über Formel 1, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, ermittelt. Zur genaueren Berechnung der T_m wurde der *Oligonucleotide Properties Calculator* verwendet [92]. Dabei wurde die salzangepasste T_m als Referenztemperatur angesehen [84].

- **Überprüfung auf Bildung von Self-Dimeren oder Heterodimeren**

Primerpaare sollten keine komplementären Sequenzen aufweisen. Bei der Bildung von Self-Dimeren kommt es zur Basenpaarung innerhalb der Primersequenz und bei der Formation von Hetero-Dimeren lagern sich der Forward- und Reverseprimer zusammen. Liegen Dimere vor, kann die Amplifikationseffizienz der DNA stark vermindert sein. Entworfenen Primer und Primerpaare wurden mit Hilfe des *Oligo Analyzers 3.1* auf mögliche Dimere überprüft [93].

- **Überprüfung auf Sekundärstrukturen**

Mit Hilfe des *RNAfold* wurden mögliche Basenpaarungen innerhalb der Primersequenz simuliert, womit die Bildung von Haarnadelstrukturen ausgeschlossen werden konnte [94].

- **Schmelzprofile der Amplikons**

Die Schmelztemperatur und das Schmelzprofil eines vollständig methylierten und unmethylierten Templates wurden mit Hilfe der Freeware *POLAND* simuliert [95].

5.2 ZELLKULTUR UND INKUBATIONSEXPERIMENTE MIT MCF-7 ZELLEN

Die Kultivierung der MCF-7 Zellen wurde in den Räumlichkeiten für Zellkultur des Instituts für Lebensmittelchemie und –toxikologie durchgeführt.

5.2.1 Arbeiten unter der sterilen Werkbank

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Im Arbeitsraum des Gerätes herrscht eine von oben nach unten geführte turbulenzarme Verdrängungsströmung, wobei Luft von außen angesaugt, vorne in der Arbeitsfläche durch ein Gitter geführt und schlussendlich gefiltert wieder in den Raum entlassen wird. Diese Zirkulation verhindert, dass Partikel aus der Raumluft in den Arbeitsbereich gelangen können. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Materialien vor jeder Berührung mit dem Arbeitsbereich mit 70 %-igem Ethanol

abgesprüht. Ziel dieser Desinfektionsmaßnahme ist das Abtöten möglicher Keime auf der Oberfläche. Alle Flaschen und Pipetten wurden vor dem Öffnen bzw. der Verwendung mit dem Bunsenbrenner abgeflammt. Anfallende Abfälle und nicht mehr benötigte Glas- und Kunststoffwaren wurden in einem Behälter gesammelt und mussten vor einer möglichen Wiederverwendung oder schlussendlichen Entsorgung autoklaviert werden. Abgesaugtes Medium und andere Flüssigkeiten wurden in einem dichten Behälter gesammelt und ebenfalls fachgerecht entsorgt [96].

5.2.2 MCF-7 Zellkultur

Für die Kultivierung von MCF-7 Zellen wurde das Medium *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) verwendet. Das Medium besteht aus Glukose, Salzen, Aminosäuren und Vitaminen und basiert auf einem Kohlenstoffdioxid/Natriumhydrogencarbonat Puffersystem, welches einen optimalen und konstanten pH-Wert gewährleistet. Für die Feststellung des richtigen pH-Wertes ist RPMI 1640 der Indikator Phenolrot zugesetzt [96]. Zusätzlich wurden dem Medium 10 % fetales Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) zugefügt. FKS liefert Wachstumsfaktoren und Hormone, Bindungs- und Transportproteine, Anheftungs- und Ausbreitungsfaktoren, zusätzliche Aminosäuren, Vitamine, Spurenelemente, Fettsäuren und Lipide. Die Kombination der Antibiotika Pen/Strep verhindert das Wachstum gramnegativer und grampositiver Bakterien [96].

Die MCF-7 Zellen wurden in Kulturflaschen mit einer Bodenfläche von 75 cm² in 20 ml Medium in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO₂ bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Die Flaschen sind mit einer kontaminationssicheren Belüftungskappe ausgestattet, welche durch einen integrierten Filter einen optimalen CO₂-Gehalt gewährleisten [65, 96].

5.2.3 Subkultur

Bei Zellkulturen müssen regelmäßig Subkulturen angelegt werden, um ein stetiges Zellwachstum und die Erhaltung der Vitalität zu gewährleisten. Dabei wird sowohl das Nährmedium erneuert als auch die Zellzahl verringert. Der Wechsel des Mediums ist besonders wichtig, da sich im Laufe der Entwicklung der Zellkultur die Umgebungsbedingungen stetig verändern: die Konzentration der Nährstoffe nimmt ab, die der Stoffwechselprodukte hingegen zu. Diese natürlichen Vorgänge bewirken ein Absinken des pH-Wertes des Mediums. Der zugesetzte Indikator Phenolrot zeigt dabei eine Farbänderung von rot zu orange. Ein weiterer wichtiger Aspekt, der eine Subkultivierung erforderlich macht, ist die stetig zunehmende Zellzahl, die bis zur Konfluenz (Zustand, bei dem die gesamte Bodenfläche der Kulturflasche mit Zellen bedeckt ist) reichen kann. Ist dieses Dichtestadium

erreicht, stellen viele Zelltypen ihre Teilung ein. Tumorzellen, also auch MCF-7 Zellen, sind in der Lage Polylayer und Dome (flüssigkeitsgefüllte Blasen innerhalb der Zellschicht) zu bilden [65]. Um diese Zustände und die Konfluenz zu vermeiden, ist es notwendig, die Zellkultur nach erreichter Maximaldichte zu verdünnen. Dieser Vorgang ist auch unter dem Begriff Passagieren bekannt. Die Zellen werden dabei durch einen enzymatischen Verdau mit Trypsin, einer Pankreasprotease, aus dem Monolayer herausgelöst und liegen sodann frei in der Flüssigkeit vor. Nach entsprechender Verdünnung der erhaltenen Suspension mit Medium wird ein Teil dieses Ansatzes in ein neues Kulturgefäß überführt und im Brutschrank inkubiert [96].

Durchführung der Subkultivierung

Aufgrund der Verdoppelungsrate (etwa 50 h) [65] der MCF-7 Zellen wurde eine Verdünnung der Zellkultur im Intervall von 72-96 h durchgeführt. Die Zelldichte wurde täglich mit Hilfe des Transmissionsmikroskops kontrolliert, um ein Erreichen der Konfluenz zu vermeiden. Für die Subkultivierung wurden folgende Lösungen herangezogen:

- Medium RPMI 1640 mit 10% FKS und 1% Pen/Strep
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)
- Trypsin (500 mg/l mit 250 mg/l EDTA)

Diese für das Passagieren der Zellkultur benötigten Lösungen wurden im Kühlschrank (Nährmedium, PBS) bzw. bei -20 °C (Trypsin) aufbewahrt und vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

Das nährstoffarme, verbrauchte Medium in den Kulturflaschen wurde vorsichtig mit einer an eine Vakuumpumpe angeschlossenen Pasteurpipette abgesaugt, ohne den Zellrasen dabei zu berühren. Anschließend wurde mit 5 ml PBS gespült, um verbliebenes Medium zu entfernen. Das Einbringen dieser Lösung musste dabei ebenfalls vorsichtig erfolgen, da es durch die geringe Haftung der MCF-7 Zellen an der Bodenoberfläche zu einem Ablösen des Zellverbandes kommen konnte. Es ist wichtig, Reste des Mediums vollständig zu entfernen. Da das enthaltene Serum eine Inaktivierung des Trypsins bewirkt, würde das gewünschte Lösen der interzellulären Adhäsionen verhindert werden. Nachdem das PBS abgesaugt wurde, wurden 2 ml Trypsin zupipettiert und durch leichtes Schwenken der geschlossenen Kulturflasche gleichmäßig auf der Bodenfläche verteilt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Minuten bei 37 °C im Brutschrank, welche das Temperaturoptimum für die Aktivität des Enzyms Trypsin darstellt, wurde der Zellrasen durch leichtes Klopfen am Flaschenrand gelöst. Die Einwirkzeit der Protease auf die Zellen sollte dabei nicht überschritten werden, da es zu einer irreversiblen Zellschädigung kommen kann [96]. Es wurden 5 ml Medium zugefügt, wobei das darin enthaltene FKS die Wirkung des Trypsins inhibiert. Mit einer Glaspipette wurden die noch anhaftenden Zellen vom Flaschenboden gespült und durch Aufziehen und Ablassen der Lösung

vereinzelt. 1-2 ml der so erhaltenen Zellsuspension wurden in der Kulturflasche belassen und mit 20 ml Medium aufgefüllt. Ein leichtes Schwenken des Gefäßes gewährleistete eine gute Verteilung der Zellen auf der Bodenoberfläche. Die so passagierten Zellen wurden wieder zurück in den Brutschrank gestellt und dort bis zur nächsten Subkultivierung belassen. Die restliche Zellsuspension wurde entweder für Inkubationsexperimente herangezogen oder verworfen.

Mit jeder Subkultivierung erhöht sich die Nummer der Passage der Zellkultur, welche neben dem Datum auf der Zellkulturflasche vermerkt wurde. Nach maximal drei Passagen wurde die Subkultur in einer neuen Kulturflasche angelegt, um sicherzustellen, dass sich nicht durch anhaftende Zellen lokale Polylyer ausbilden.

5.2.4 Vitalitätstest und Bestimmung der Zellzahl

Vor dem Anlegen von Subkulturen für die Inkubationsversuche musste die Vitalität der Zellkultur überprüft und die Zellzahl bestimmt werden, um möglichst vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Die Zellzahl wurde mittels eines Hämocytometers, der so genannten Neubauer Zählkammer, bestimmt. Die bei einer Subkultur eingesetzte Zellzahl beeinflusst bei den meisten adhären wachsenden Zellen die Wachstumsgeschwindigkeit. Werden Zellen zu dünn ausgesät, heften sie sich nur langsam am Gefäßboden an. Wenn sie jedoch zu dicht ausgestreut werden, können sie sehr rasch den Zustand der Konfluenz erreichen und müssen erneut subkultiviert werden. In der Routine wird deshalb die Bestimmung der Zellzahl vor jeder Aussaat empfohlen [96].

Die Neubauer Zählkammer besteht aus einer Grundplatte aus optischem Spezialglas in der Größe eines Objektträgers und einem passenden Deckglas. Die Zählkammer weist eine Netzeinteilung von neun, je 1 mm² großen Quadrate auf, wobei zusätzlich noch feinere Unterteilungen erkennbar sind (Abbildung 83). Durch die Abmessungen der einzelnen Flächen und den Abstand des Deckglases zur Grundplatte kann jedes Quadrat ein Volumen von 0,1 mm³ bzw. 0,1 µl fassen. Durch das Abzählen der Zellen in jedem der vier Eckquadrate und anschließender Berechnung des Mittelwertes kann die Zellzahl in einer Lösung bestimmt werden [96].

Experimenteller Teil

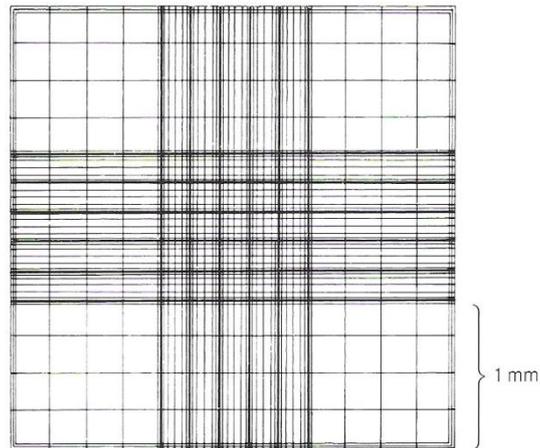


Abbildung 83: Netzeinteilung einer Neubauer-Zählkammer; aus [96]

Beim Auszählen der Zellen ist darauf zu achten, diese nicht doppelt zu erfassen. Aus diesem Grund werden nur jene gezählt, die auf der oberen und linken Seitenlinie eines jeden Quadrats liegen [96]. Ein Schema dazu ist in Abbildung 84 dargestellt.

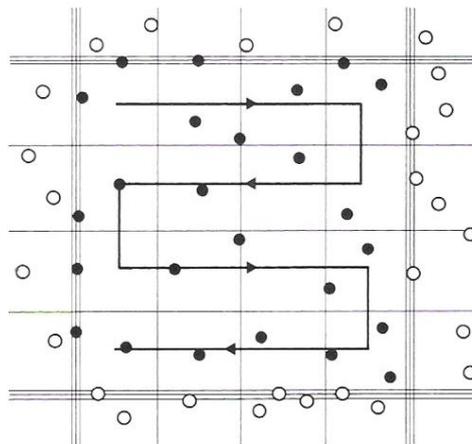


Abbildung 84: Auszählen der Zellen, wobei die obere und linke Linie erfasst werden; aus [96]

Um zwischen toten und lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde vor der Bestimmung der Zellzahl ein Vitalitätstest mit Trypanblau durchgeführt. Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass die Membran lebender Zellen für diesen Farbstoff nicht durchlässig ist und die Zellen bei der Betrachtung unter dem Mikroskop deshalb ungefärbt erscheinen. Tote Zellen hingegen lassen sich mit Trypanblau anfärben und stellen sich während der Zählung als blaue Kreise dar [96]. Es werden bei der Bestimmung der Zellzahl nur die lebenden, durchsichtigen Zellen erfasst.

Durchführung der Zellzählung

Die Neubauer Zählkammer wurde vor der Verwendung mit 70 %-igem Ethanol gereinigt. Nach leichtem Anfeuchten des Deckglases wurde dieses über die Stege der Zählkammer gelegt und durch

festes Anpressen und leichtes Verschieben fixiert. Das Auftreten von „Newtonschen Ringen“ zeigt an, dass die Tiefe zum Mittelsteg (0,1 mm) richtig eingestellt ist. Nachdem die Zellen mittels Trypsin resuspendiert wurden (vgl. Kapitel 5.2.3), wurden 20 µl der so erhaltenen Suspension mit 180 µl 0,5 %-iger Trypanblaulösung versetzt und durch leichtes Klopfen gemischt. Mit Hilfe einer Pipette wurden 10 µl der so gefärbten Zelllösung in die Zählkammer eingebracht, wobei die bestehenden Kapillarkräfte die Flüssigkeit in den Zwischenraum saugten. Anschließend wurde die Anzahl der lebenden Zellen in jedem der vier Eckquadrate bestimmt. Durch die Berechnung des Mittelwerts wurde die durchschnittliche Zellzahl in 0,1 µl Volumen der Lösung erhalten. Die Ermittlung der Zellzahl je Milliliter der vorliegenden Zellsuspension erfolgte mit der angegebenen Formel.

$$\text{Zellzahl}/_{ml} = D \times f \times 10\,000$$

D.....durchschnittliche Zellzahl der Eckquadrate (Volumen von 0,1 µl)

f..... Verdünnungsfaktor 10

Formel 2: Bestimmung der Zellzahl in einem Milliliter Suspension

5.2.5 Inkubationsversuche

Bei den durchgeführten Inkubationsversuchen wurden MCF-7 Zellen über einen Zeitraum von 216 bzw. 96 h unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener gelöster Substanzen ausgesetzt, um durch nachfolgende Untersuchungen mögliche Einflüsse auf die DNA-Methylierung festzustellen. Für jeden Versuchsansatz wurde zunächst jeweils die gleiche Anzahl von Zellen in Petrischalen ausgestreut und anschließend mit der jeweiligen Substanz über den vorgesehen Zeitraum inkubiert. Es wurde zusätzlich jeweils eine Negativkontrolle mitgeführt, um Lösungsmittelleffekte zu kompensieren.

Durchführung der Inkubationen

Für jeden Inkubationsansatz wurden nach Ermittlung der Zellzahl (Kapitel 5.2.4) jeweils 50000 Zellen in 5 ml Medium pipettiert. Die so erhaltene Zellsuspension wurde zunächst gemischt und dann in Petrischalen überführt. Nach guter Verteilung der Zellen auf der Bodenoberfläche der Schale durch eine leicht kreisende Bewegung wurde diese im Brutschrank bei 37 °C für 72 h belassen, um ein Anwachsen der Zellen zu ermöglichen. Erst dann wurde mit dem jeweiligen Inkubationsexperiment begonnen.

Die im Inkubationsversuch eingesetzten Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder PBS gelöst und vor jedem Versuchsbeginn in unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt. Die Lagerung der so erhaltenen Stammlösungen erfolgte bei -20 °C, wobei sie vor der Verwendung auf

Experimenteller Teil

Raumtemperatur erwärmt wurden. Für die Inkubationsversuche wurden sie dem Medium zu einem Gehalt von 1 % (v/v) beigelegt (50 µl Stammlösung und 5 ml Medium) und vor dem Einbringen in die Petrischalen gut gemischt. Dies sollte verhindern, dass zu hohe Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz die Zellen schädigen können. Die anschließende Inkubation der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 216 bzw. 96 h. Ein Wechsel des verbrauchten Mediums sowie die Zugabe der Lösungen für die Inkubationen fanden dabei im Abstand von 48 h statt. Nach Ablauf der 216 h (bei Parthenolid 96 h) wurde die Aufarbeitung der Zellen durchgeführt, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird.

Die Details zu den Inkubationsversuchen sind in Tabelle 9 aufgelistet, die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen finden sich in Tabelle 10.

Tabelle 9: Übersicht über die einzelnen Inkubationsversuche bei MCF-7 Zellen

Substanz	Inkubationsversuch	Nummer der Passage	Lösungsmittel	Inkubationsdauer [h]
5-Aza-2'-dC	1	24	PBS	216
	2	15	PBS	216
Bisphenol A	1	21	DMSO	216
	2	3	DMSO	216
Genistein und Daidzein	1	12	DMSO	216
Curcumin	1	14	DMSO	216
Parthenolid	1	14	DMSO	216
	2	16	DMSO	96

Tabelle 10: Verwendete Konzentrationen der Substanzen und die jeweilige Negativkontrolle der Inkubationsexperimente

5-Aza-2'-dC [µM]	Bisphenol A [µM]	Genistein / Daidzein [µM]	Curcumin [µM]	Parthenolid [µM]
100	100	50 / 50	100	100
50	50	25 / 25	50	50
25	25	12,5 / 12,5	25	25
10	10	5 / 5	10	10
5	5	2,5 / 2,5	5	5
1	1	0,5 / 0,5	1	2,5
PBS	DMSO	DMSO	DMSO	1
				DMSO

5.3 ISOLIERUNG DER DNA

Bei der Gewinnung von DNA aus Zellen werden bevorzugt schonende Aufarbeitungsmethoden zur Zerstörung ebendieser herangezogen, um eine Fragmentierung der DNA weitgehend zu vermeiden. Ein enzymatischer Aufschluss ist deshalb besonders geeignet. Enzyme verdauen die Zellwände und zugesetzte Detergenzien lösen die Zellmembranen auf, wodurch sowohl DNA als auch RNA frei in Lösung vorliegen. Die RNA kann anschließend durch Behandlung mit Ribonuklease (RNase) entfernt werden. Des Weiteren wird in Gegenwart von Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gearbeitet, welche Mg^{2+} komplexiert und das Enzym Desoxyribonuklease (DNase) inaktiviert, womit ein Abbau der DNA verhindert wird. Durch Ausschütteln der Lösung in einer Wasser-Phenol oder einer Phenol-Chloroform Mischung können durch selektive Denaturierung Proteine entfernt werden. Ein Zentrifugationsschritt lässt das Abtrennen der organischen Phase als auch der Interphase von vorliegendem denaturiertem Protein zu. Durch Zugabe von absolutem Ethanol zur wässrigen Phase wird die darin enthaltene DNA denaturiert, was einen weiteren Reinigungsschritt darstellt und zusätzlich der Anreicherung der DNA dient. Sie kann anschließend wieder in Wasser aufgenommen werden [97].

Für die Gewinnung reiner und integrier DNA ist es notwendig, vorhandene DNasen zu entfernen und neuerliche Kontaminationen zu verhindern. Aus diesem Grund wurden bei der Isolation nur sterile Gefäße und Materialien verwendet. Bei allen Schritten wurde RNase-freies Wasser herangezogen. Die Extraktion der DNA wurde mit Hilfe des *QIAamp DNA Mini Kits (50)* von Qiagen durchgeführt. Die Lyse der aufgearbeiteten Zellen erfolgte mit Proteinase K und die Aufreinigung des so erhaltenen Extrakts über *QIAamp Mini Spin Säulen*, wobei DNA an die Silika-Membran der Säulen bindet. Salz und pH-Bedingungen gewährleisten, dass keine Proteine und andere Kontaminanten an der Membran adsorbiert werden. Waschschrte unter Verwendung unterschiedlicher Puffer sorgen für die Entfernung von Zellresten und Verunreinigungen und gewährleisten so die Reinheit der DNA. Die anschließende Elution der DNA von der Membran erfolgte mit Wasser. Die reine DNA-Lösung wurde bei $-20^{\circ}C$ gelagert [98].

5.3.1 Durchführung bei MCF-7 Zellen

Die Extraktion der DNA aus den Zellen der Kulturversuche erfolgte mit dem *QIAamp DNA Mini kit (50)* von Qiagen nach dem Handbuch des Herstellers [98]. Im ersten Schritt mussten die inkubierten Zellen gewonnen werden. Das Medium in der Petrischale wurde entfernt, anschließend mit 2 ml PBS gespült und erneut abgesaugt. Nach einem 2-3 minütigen Verdau mit 500 μ l einer Lösung des Enzyms Trypsin (500 mg/l mit 250 mg/l EDTA) wurde dessen Wirkung durch Zugabe von 2,5 ml Medium

gestoppt. Der nun gelöste Zellrasen konnte mit einer Pipette von der Oberfläche abgespült werden, wobei die Suspension mehrmals aufgesaugt und rasch entlassen wurde, um eine Vereinzelnung der Zellen zu erreichen. Die so erhaltene trübe Lösung wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge 4K10, Sigma). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert, kurz gevortext und erneut bei 1300 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Nach dem Entfernen der überstehenden Lösung wurde das Zellpellet in 200 µl PBS resuspendiert. Durch die mehrmalige Wiederaufnahme und Zentrifugation konnten tote Zellen und Stoffwechselprodukte von lebenden Zellen abgetrennt werden. Die reine Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 20 µl *Proteinase K-Lösung* zugegeben und wiederum kurz gevortext, bevor 200 µl *Puffer AL* hinzugefügt wurden. Die Zellen wurden nun für 10 Minuten bei 56 °C belassen, um die Zellwände aufzuschließen. Nach der Inkubation wurde das Reaktionsgefäß kurz zentrifugiert, anschließend wurden 200 µl absoluter Ethanol zugegeben, gut gemischt und erneut kurz zentrifugiert (Zentrifuge 5424, Eppendorf). Die erhaltene Lösung wurde in *Spin Säulen* transferiert und bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule in einem neuem Auffanggefäß platziert. 500 µl *Waschpuffer AW1* wurden zupipettiert und anschließend bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die Säule wurde nach dem Verwerfen des Filtrats in ein frisches Auffanggefäß gestellt. Es wurden 500 µl *Waschpuffer AW2* auf die Säule aufgebracht und bei 14000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt und erneut bei 14000 rpm für eine Minute zentrifugiert, um eventuelle Restflüssigkeit aus dieser zu entfernen. Für die Elution der DNA von der Membran der Säule wurden zweimal je 200 µl RNase-freies Wasser zupipettiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bevor bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert wurde. Damit wurden eine A- und eine B-Probe (je 200 µl DNA-Lösung) erhalten. Bei den gewonnenen DNA-Extrakten wurde letztendlich die Konzentration mit dem NanoDrop Spektralphotometer bestimmt und anschließend bei -20°C gelagert.

5.3.2 Durchführung bei Gewebeproben

Die Extraktion der DNA aus Gewebe wurde ebenfalls mit Hilfe des *QIAamp DNA Mini kit (50)* von Qiagen durchgeführt [98]. Für die Extraktion wurden maximal 25 mg Gewebeprobe eingesetzt. Die Bestimmung der Masse erfolgte mit einer Mikrowaage (TE2144S, Sartorius).



Abbildung 85: Beispiel für eine Biopsieprobe (T= Tumorgewebe, N= tumornahes Gewebe, F= tumorfernes Gewebe)

Um die Dauer der Lyse zu verkürzen, wurde das Gewebe in kleine Stücke geschnitten und anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 200 μ l *Puffer ATL* und 20 μ l *Proteinase K-Lösung* zupipettiert, gut gemischt und bei 56 °C inkubiert. Die Lyse betrug dabei je nach Größe und Art des Gewebes zwischen ein und drei Stunden. Es wurde während dieses Zeitraums alle 15 Minuten gevortext, um eine Verteilung der Lösungsbestandteile zu gewährleisten.

Es wurde auch versucht, mit Hilfe einer Kugelmühle das Gewebe in 80 μ l PBS zu homogenisieren und nach Zugabe von 180 μ l *Puffer ATL* bei 56 °C vollständig aufzulösen. Die Lyse des Gewebes mit dieser Methode dauerte jedoch bedeutend länger, was auf die Verdünnung des *Puffers ATL* mit PBS zurückzuführen ist. Deshalb wurde auf das erste Protokoll, wie zuvor beschrieben, zurückgegriffen.

Das 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde nach vollständigem Auflösen des Gewebes kurz zentrifugiert. Anschließend wurden 14 μ l Ribonuklease A-Lösung (30 mg/ml) zupipettiert und nach kurzem Vortexen für zwei Minuten bei Raumtemperatur belassen. Es wurden 200 μ l *Puffer AL* zugegeben und für 10 Minuten bei 70 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l absolutem Ethanol wurde die Lösung nach kurzer Zentrifugation in die *Spin Säulen* überführt. In weiterer Folge wurde wie bei der Isolierung von DNA aus Zellen vorgegangen (siehe Abschnitt 5.3.1). Ein abweichendes Protokoll findet sich erst wieder bei der Elution der DNA von der Säulenmembran.

Für die Elution der DNA wurde RNase-freies Wasser verwendet. Im ersten Schritt wurde je zweimal mit 100 μ l Wasser eluiert und nach jeweils 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur für je eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Damit wurden eine Probe A1 und A2 gewonnen. Dieser Vorgang wurde für den Erhalt der B-Probe mit 200 μ l Wasser durchgeführt. Von DNA-Lösungen wurde die Konzentration mit Hilfe des NanoDrop Spektralphotometers bestimmt. Diese wurden anschließend bei -20 °C gelagert [98].

5.3.3 Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der DNA

Die Bestimmung der Konzentration der erhaltenen DNA-Lösungen wurde mit dem NanoDrop 2000 Spektralphotometer durchgeführt.

Da Nukleinsäuren Licht einer Wellenlänge von 260 nm stark absorbieren, können diese photometrisch vermessen werden. Eine Absorptionseinheit entspricht dabei 50 ng/μl DNA, wodurch sich die Konzentration in ng/μl durch Zuhilfenahme folgender Formel berechnen lässt [97]:

$$c = A_{260} \times V \times f$$

c.....Konzentration der DNA [ng/μl]

A₂₆₀.....Extinktion bei 260 nm

V.....Verdünnungsfaktor

f..... DNA-Konstante (f=50)

Formel 3: Bestimmung der Konzentration der DNA

Für die Ermittlung der Konzentration wurden je 1,5 μl der zu messenden Lösungen auf die Linse des Spektralphotometers aufgebracht. Die Berechnung wurde dabei vom Gerät durchgeführt. Für die Überprüfung der Reinheit wird das Verhältnis der Extinktion bei 260 und 280 nm bestimmt.

$$\text{Reinheit} = A_{260}/A_{280}$$

Formel 4: Bestimmung der Reinheit der DNA

Wird für das Extinktionsverhältnis ein Wert zwischen 1,8 und 2 erhalten, liegt eine proteinfreie Lösung vor, da Proteine Licht einer Wellenlänge von 280 nm stark absorbieren [97].

5.4 BISULFIT-KONVERTIERUNG

Bei der Bisulfit-Konvertierung wird unmethyliertes Cytosin der DNA durch die Behandlung mit Natriumhydrogensulfit in Uracil konvertiert, wobei methylierte Cytosinbasen unverändert bleiben. Für die Umwandlungsreaktion werden maximal 2 μg der aus Zellen oder Geweben gewonnenen DNA eingesetzt, zusätzlich wurden kommerziell erhältliche unmethylierte (50 ng/μl, Qiagen) und methylierte (100 ng/μl, Millipore) Kontroll-DNA konvertiert. Um eine vollständige Umwandlung aller unmethylierten Cytosine zu gewährleisten, wird die DNA in Gegenwart einer hohen Hydrogensulfitkonzentration, hoher Temperatur und bei einem niedrigen pH-Wert durchgeführt. Diese Bedingungen werden durch die Zugabe des *Bisulfit-Mixes*, einer fertigen Lösung, eingestellt.

Um die DNA vor einer Fragmentierung zu schützen, wird ein *DNA-Schutzpuffer* zugegeben, der durch eine Farbänderung von grün zu blau die Einstellung des optimalen pH-Wert anzeigt. Die Konvertierung von Cytosin in Uracil findet während des Verlaufs eines Temperaturprogramms im Thermocycler statt. In aufeinanderfolgenden Inkubationsschritten wird die DNA thermisch denaturiert, anschließend sulfoniert und desaminiert. Die Desulfonierung und Aufreinigung der konvertierten DNA findet über eine Festphasenextraktion in Säulen unter Verwendung verschiedener Waschpuffer statt. Die Bindung der DNA an die Membran der Säule wird durch Zugabe von *carrier-RNA (c-RNA)* begünstigt [99].

5.4.1 Durchführung

Die Bisulfit-Konvertierung wurde nach den Vorgaben des Herstellers mit dem *EpiTect Bisulfite Kit* durchgeführt. Die Tabellen 11 und 12 veranschaulichen die Zusammenstellung des Reaktionsansatzes für die Bisulfit-Konvertierung. Das Volumen des zugesetzten Wassers wurde je nach eingesetzter DNA-Menge variiert. Da die Konzentration der DNA aus den Gewebeproben im Gegensatz zu der aus Zellexperimenten sehr gering war, wurde hierfür meist das zweite Konvertierungsprotokoll (Tabelle 12) herangezogen.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die Bisulfit-Konvertierung von 1-2000 ng DNA

Komponente	Volumen pro Reaktionsansatz
DNA-Lösung	x µl (maximal 20 µl)
Wasser (RNase-frei)	20- x µl
Bisulfit-Mix (gelöst)	85 µl
DNA-Schutzpuffer	35 µl
Endvolumen	140 µl

Tabelle 12: Reaktionsansatz für die Bisulfit-Konvertierung von 1-500 ng DNA

Komponente	Volumen pro Reaktionsansatz
DNA-Lösung	x µl (maximal 40 µl)
Wasser (RNase-frei)	40- x µl
Bisulfit-Mix (gelöst)	85 µl
DNA-Schutzpuffer	15 µl
Endvolumen	140 µl

Die Konvertierung der DNA erfolgte anschließend im Thermocycler (Rotor-Gene Q, Qiagen) bei dem vom Hersteller vorgegebenen Temperaturprogramm, welches in der folgenden Tabelle ersichtlich ist [99].

Tabelle 13: Temperaturprotokoll für die Bisulfit-Konvertierung

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Denaturierung	5	95
Inkubation	25	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	85	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	175	60
Abkühlen	1	25

5.4.2 Aufreinigung der bisulfit-konvertierten DNA

Nach dem Durchlaufen des Temperaturprogramms wurde die konvertierte DNA-Lösung in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Jedem Reaktionsansatz wurden 560 µl eines *c-RNA* (10 ng/µl) enthaltenden *Puffer BL* zugefügt und kurz homogenisiert. Die Lösung wurde anschließend auf eine Festphasenextraktions-Säule aufgetragen und bei 12000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und die Säule wurde wieder in dem gleichen Auffanggefäß platziert. Nach Zugabe von 500 µl *Puffer BW* wurde eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernung der Lösung wurde die Säule wieder in das Auffanggefäß zurückgestellt. Durch diesen Waschschrift wurden Rückstände von Natriumhydrogensulfit, welches bei der Konvertierung zum Einsatz kommt, entfernt. Anschließend wurden 500 µl *Puffer BD* zugegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 14000 rpm für eine Minute und anschließendem Verwerfen der Pufferlösung aus dem Auffanggefäß wurde erneut mit 500 µl *Puffer BW* gewaschen. Dieser Reinigungsschritt wurde nach Abtrennen des Filtrats durch eine einminütige Zentrifugation bei 14000 rpm wiederholt. Dadurch wurde eine ausreichende Entsalzung der Säule erzielt. Um Restflüssigkeiten aus der Membran zu entfernen, wurde die Säule in einem neuen Auffanggefäß platziert und nochmals für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Durch eine 15 minütige Inkubation bei 56 °C der Säule mit offenem Deckel konnten Ethanolrückstände entfernt werden. Dann wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gestellt. Für die Elution der DNA wurden 20 µl *Puffer EB* in die Mitte der Membran der Säule pipettiert und für drei Minuten bei 12000

rpm zentrifugiert. Es wurden ein weiteres Mal 20 µl *Puffer EB* aufgetragen und für drei Minuten bei 14000 rpm in der Zentrifuge belassen.

Die so erhaltene bisulfit-konvertierte DNA der Proben und der unmethylierten und methylierten Kontrollstandards wurde mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 5 ng/µl verdünnt und aliquotiert. Die anschließende Lagerung erfolgte bei -80°C.

5.5 DURCHFÜHRUNG DER PCR

5.5.1 DNA-Standards

Für die Optimierungsversuche der MS-HRM Methoden sowie für die Erstellung einer Kalibrierfunktion für die HRM-Analyse wurde unmethylierte (Qiagen) und methylierte (Millipore) Kontroll-DNA verwendet. Diese wurden im unkonvertierten Zustand erhalten und anschließend analog zu den Proben einer Bisulfit-Konvertierung unterzogen (siehe Abschnitt 5.4).

Durch das Mischen von unmethylierter und methylierter bisulfit-konvertierter Kontroll-DNA wurden DNA-Standards unterschiedlicher Methylierungsgrade hergestellt. In der Regel wurden zur Erstellung der Kalibrierfunktion Standards mit einem Anteil von 0 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 % und 100 % an methylierter DNA analysiert. Zur Optimierung der MS-HRM Methoden wurden meistens nur Standards mit einem Gehalt von 0 %, 10 %, 50 % und 100 % an methylierter DNA verwendet. Das Pipettierschema zur Erstellung der Standards ist in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Pipettierschema zur Herstellung von je 5 µl eines DNA-Standards bestimmter Methylierung

Standard-DNA [% methyliert]	unmethylierte DNA [µl]	methylierte DNA [µl]
0	5	0
10	4,5	0,5
25	3,75	1,25
50	2,5	2,5
75	1,25	3,75
100	0	5

5.5.2 PCR und hochauflösende-Schmelzkurvenanalyse

Die verwendeten Methoden für die hochauflösende-Schmelzkurvenanalyse wurden entweder selbst entwickelt (*RASSF1A*) oder waren bereits zuvor in der Arbeitsgruppe entwickelt und optimiert

worden (*CDKN2A*, *DAPK1*, *APC*). Die Primer wurden nach den in Abschnitt 5.1 beschriebenen Kriterien entworfen und von Sigma-Aldrich bezogen. Die lyophilisierten Primer wurden nach den Angaben des Herstellers in Wasser gelöst, um eine Konzentration von 100 µM zu erhalten und anschließend aliquotiert. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Für die PCR wurde ein Aliquot der konzentrierten Primerlösungen mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 10 µM verdünnt. Im Folgenden werden die einzelnen Komponenten des Reaktionsansatzes für eine PCR und MS-HRM Analyse beschrieben.

5.5.2.1 Reaktionsansatz für die PCR

Für die Durchführung einer PCR wurden ein *HRM-Mix* von Qiagen, ein frisch bereiteter Mastermix, welcher die Primer und MgCl₂ enthielt, und die DNA-Lösungen mit einer Konzentration von 5 ng/µl verwendet. In Tabelle 16 ist die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die PCR mit Mengenangaben dargestellt.

- **Mastermix**

Der Mastermix für die PCR wurde vor jeder Durchführung frisch bereitete und beinhaltete neben Wasser die Primer und MgCl₂ in bestimmten Konzentrationen. Es wurde eine 40 mM MgCl₂-Stamm-Lösung hergestellt und bei 4 °C gelagert. Die optimale MgCl₂-Konzentration musste für jedes Primerpaar optimiert werden (siehe dazu Kapitel 3.4.3). Die verdünnten Primer (10 µM) wurden im Zuge der Herstellung des Reaktionsansatzes auf eine Endkonzentration von 250 nM verdünnt. Bei einem Endvolumen von 20 µl pro PCR-Gefäß entspricht das einem eingesetzten Volumen von 0,5 µl der Primerlösung. Insgesamt wurden pro PCR-Ansatz 8 µl Mastermix verwendet. Die Zugabe von Wasser diente dabei dem Erreichen des gewünschten Volumens und hing von dem Volumen an eingesetzter MgCl₂-Lösung ab. Die genauen Volumenangaben bei der Bereitung des Mastermix für eine PCR waren vom eingesetzten Primerpaar abhängig. Tabelle 15 veranschaulicht exemplarisch die Zusammenstellung des Mastermix für *RASSF1A*.

Tabelle 15: Pipettierschema für die Zusammenstellung des Mastermix für *RASSF1A*

	Konzentration	Volumen pro Ansatz [µl]
Forwardprimer	250 nM	0,5
Reverseprimer	250 nM	0,5
MgCl ₂	2 mM	1
RNase-freies H ₂ O		6
Endvolumen		8

- **HRM-Mix**

Es wurde der *EpiTect HRM PCR Kit (100)* von Qiagen verwendet. Dieser Kit beinhaltet den Fluoreszenzfarbstoff EVAGreen, welcher in ds-DNA einlagert wird. Durch den Zusatz optimierter Puffer wird die Amplifikation unspezifischer und nicht bisulfit-konvertierter DNA vermieden. Die Aktivierung der verwendeten *HotStarTaq Plus DNA Polymerase* erfolgt erst nach einer fünfminütigen Inkubation bei 95 °C. Dadurch kann ein verfrühter Reaktionsstart während des Pipettierens des Reaktionsansatzes verhindert werden. Des Weiteren finden sich in diesem Mix die dNTPs, die während der Elongation durch die Polymerase zur Synthese des Doppelstranges benötigt werden [72].

- **Herstellung des Reaktionsansatzes für die PCR**

Die Reaktionsansätze wurden in PCR Strip Tubes mit 0,1 µl Volumen (4 Tubes/Strip) (Qiagen) pipettiert und anschließend mit einem passenden Deckel verschlossen. In jedes Reaktionsgefäß wurden zuerst 10 µl *HRM-Mix* vorgelegt, wozu dann jeweils 8 µl des Mastermix gegeben wurde. Zuletzt wurden 2 µl der DNA-Lösung hinzugefügt. Die eingesetzte DNA wurde bereits nach der Bisulfit-Konvertierung (siehe Abschnitt 5.4) auf die gewünschte Konzentration von 5 ng/µl verdünnt. Ein Schema für einen PCR-Reaktionsansatz ist in Tabelle 16 dargestellt. Bei einem Einsatz von 2 µl DNA-Lösung pro Ansatz entspricht das einer Menge von 10 ng DNA/Tube. Von allen Standards und Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Tabelle 16: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes

Komponente	Volumen [µl]
HRM-Mix	10
Mastermix	8
DNA	2
Gesamtvolumen	20

5.5.2.2 Temperaturprotokoll

Alle MS-HRM Experimente wurden im Thermocycler Rotor-Gene Q von Qiagen durchgeführt. Tabelle 17 zeigt eine Übersicht über die Zyklusbedingungen während der PCR und der MS-HRM Analyse.

Tabelle 17: Temperaturprogramm für eine MS-HRM Analyse

Zyklusschritt	Dauer	Temperatur [°C]
Initialisierung	10 min	95
<u>3-stufiger Zyklus</u> Denaturierung	10 s	95
Annealing (Touchdown 1°C über 7 Zyklen)	10 s	Primer-spezifisch
Elongation	20 s	72
Denaturierung	1 min	95
HRM	2 s	60-90 (in 0,05°C Schritten)

Am Beginn der PCR wurde die *HotStarTaq Plus DNA Polymerase* durch das Einwirken einer Temperatur von 95 °C für 10 Minuten aktiviert und die DNA gleichzeitig denaturiert. Im nächsten Schritt wurde mit den Temperaturzyklen zur Vervielfältigung der DNA begonnen, wobei je nach Gen insgesamt 45-50 solcher Zyklen durchlaufen wurden, um ein ausreichendes Amplifikationslevel zu erreichen. Zunächst erfolgte eine Denaturierung bei 95 °C für 10 Sekunden, anschließend wurde die Temperatur auf die Primer-spezifische Annealingtemperatur gesenkt, wobei diese aber zunächst durch das Einstellen eines Touchdowns für 7 Zyklen um 6 °C höher lag, als die eigentliche Annealingtemperatur der Primer während der verbleibenden Zyklen. Durch die Touchdown-Funktion wurde die Temperatur bei den ersten sieben Zyklen um je 1 °C gesenkt, bis schlussendlich die eigentliche Temperatur für die Anlagerung der Primer erreicht wurde. Mit dieser Anwendung konnte die Spezifität der Primer verbessert werden, sie binden eher an die korrekte komplementäre Position des DNA-Einzelstranges. Damit findet mit höherer Wahrscheinlichkeit zu Beginn der Reaktion eine Bildung von Amplikons richtiger Länge statt und die Anlagerungsrate der Primer an falsche Sequenzen wird herabgesetzt [85]. Während der Elongationsphase für 20 Sekunden bei 72 °C, welches das Temperaturoptimum der *HotStarTaq Plus DNA Polymerase* darstellt, wurde durch Einbau von Nukleotiden aus jedem DNA-Einzelstrang ein Doppelstrang synthetisiert. Nach jedem Elongationsschritt wurde nach einer Anregung bei 470 nm die Fluoreszenz bei 510 nm gemessen, um die Zunahme an PCR-Produkten im Verlauf der Amplifikation sicherstellen zu können.

Zwischen der PCR-Amplifikation und der HRM-Analyse wurde nochmals ein Denaturierungsschritt bei 95 °C mit einer Dauer von einer Minute durchgeführt. Für die Schmelzkurvenanalyse wurde ein Temperaturgradient von 60-90 °C eingestellt, bei dem im Abstand von 2 Sekunden die Temperatur um jeweils 0,05 °C erhöht wurde. Im Verlauf der Optimierung konnte der eigentliche Schmelzbereich der jeweiligen DNA-Sequenz ermittelt und für weitere Messungen eingegrenzt werden. Der Temperaturgradient muss den Schmelzbereich der DNA-Amplikons der Proben und der

unmethylierten und methylierten Standards abdecken, um eine Normalisierung der Kurven im Zuge der Auswertung durchführen zu können [79]. Während der gesamten HRM-Analyse wird die Fluoreszenz gemessen, um die Schmelzprofile der PCR-Produkte darstellen und auswerten zu können. Ein Beispiel für den Temperaturverlauf im Zuge einer PCR und anschließender hochauflösender Schmelzkurvenanalyse ist in Abbildung 86 dargestellt. Die rote Linie zeigt dabei die Temperaturveränderung während der Zyklen an und blau markiert sind jene Abschnitte, bei denen die Fluoreszenz gemessen wird.

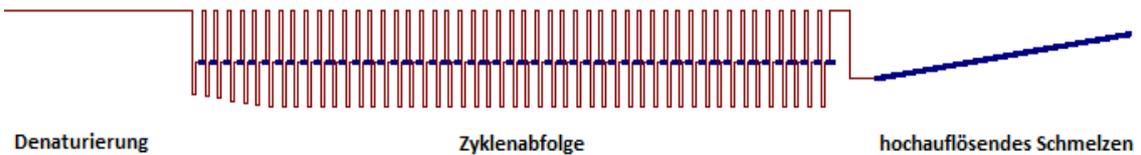


Abbildung 86: Temperaturverlauf während einer PCR und der anschließenden hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse

5.5.2.3 MS-HRM Analyse der einzelnen Gene

Im Zuge der Diplomarbeit wurde der DNA-Methylierungsgrad der Gene *RASSF1A*, *CDKN2A*, *DAPK1* und *APC* untersucht. Die MS-HRM Methode für das *RASSF1A* Gen wurde selbst entwickelt, jene für *CDKN2A* wurde von B. Werner, MSc übernommen [90]. Mag. E. Habla entwickelte und optimierte die Methoden für die Gene *DAPK1* und *APC* [91]. Teilweise wurden einzelne Parameter verändert, so stellte sich eine Erhöhung der Annealingtemperatur bei der Methode für *DAPK1* durch B. Werner als sinnvoll heraus und wurde deshalb ebenso durchgeführt. In den nachfolgenden Tabellen sind die Zusammensetzungen der jeweiligen Mastermixe für die verwendeten Methoden und die dazu optimierten Temperaturprotokolle für die PCR und MS-HRM Analyse dargestellt.

- **RASSF1A**

Tabelle 18: Zusammensetzung des Mastermix für RASSF1A

Komponente	Volumen [μ l]	Konzentration
Forwardprimer	0,5	250 nM
Reverseprimer	0,5	250 nM
MgCl ₂	1	2 mM
H ₂ O	6	
Gesamtvolumen	8	

Experimenteller Teil

Tabelle 19: Temperaturprogramm für RASSF1A

	Schritt	Zeit	Temperatur [°C]
	Denaturierung	10 min	95
PCR 50 Zyklen	Denaturierung	10 s	95
	Annealing	10 s	56
	Elongation	20 s	72
	Denaturierung	1 min	95
HRM	Schmelzen	2 s	73 - 85 (0,05°C pro Intervall)

• **CDKN2A**

Tabelle 20: Zusammensetzung des Mastermix für CDKN2A

Komponente	Volumen [µl]	Konzentration
Forwardprimer	0,5	250 nM
Reverseprimer	0,5	250 nM
MgCl ₂	0,75	1,5 mM
H ₂ O	6,25	
Gesamtvolumen	8	

Tabelle 21: Temperaturprogramm für CDKN2A

	Schritt	Zeit	Temperatur [°C]
	Denaturierung	10 min	95
PCR 45 Zyklen	Denaturierung	10 s	95
	Annealing	10 s	52
	Elongation	20 s	72
	Denaturierung	1 min	95
HRM	Schmelzen	2 s	67 - 85 (0,05°C pro Intervall)

• **DAPK1**

Tabelle 22: Zusammensetzung des Mastermix für DAPK1

Komponente	Volumen [µl]	Konzentration
Forwardprimer	0,5	250 nM
Reverseprimer	0,5	250 nM
MgCl ₂	1,5	3 mM
H ₂ O	5,5	
Gesamtvolumen	8	

Tabelle 23: Temperaturprogramm für DAPK1

	Schritt	Zeit	Temperatur [°C]
	Denaturierung	10 min	95
PCR 50 Zyklen	Denaturierung	10 s	95
	Annealing	10 s	55
	Elongation	20 s	72
	Denaturierung	1 min	95
HRM	Schmelzen	2 s	70 - 88 (0,05°C pro Intervall)

- APC

Tabelle 24: Zusammensetzung des Mastermix für APC

Komponente	Volumen [µl]	Konzentration
Forwardprimer	1	500 nM
Reverseprimer	1	500 nM
MgCl ₂	1	2 mM
H ₂ O	5	
Gesamtvolumen	8	

Tabelle 25: Temperaturprogramm für APC

	Schritt	Zeit	Temperatur [°C]
	Denaturierung	10 min	95
PCR 45 Zyklen	Denaturierung	10 s	95
	Annealing	10 s	53
	Elongation	20 s	72
	Denaturierung	1 min	92
HRM	Schmelzen	2 s	74 - 86 (0,05°C pro Intervall)

5.6 DATENAUSWERTUNG

Die Analyse der HRM Kurven erfolgte mit der *Rotor-Gene Q Series Software 2.1.0* von Qiagen. Im ersten Schritt wurde geprüft, ob die Standards und Proben mit annähernd gleicher Effizienz amplifiziert wurden. Die Auswertung (vgl. Kapitel 3.3.3) erfolgte anschließend über eine Normalisierung der Schmelzkurven.

Für die weitere Analyse wurden die Schmelzkurven durch das Auftragen der negativen Ableitung der Fluoreszenz nach der Temperatur (-dF/dT) gegen die Temperatur in Peaks konvertiert. Die Peakspitzen stellen dabei die größte Abnahme des Fluoreszenzsignals dar und können als Schmelztemperatur des PCR-Produkts interpretiert werden. Durch den Vergleich der Peaks von unmethylierten und methylierten Standards kann der Methylierungsgrad einer unbekannt Probe ermittelt werden [79].

Um den Methylierungsgrad von unbekannt Proben zu bestimmen, wurden Differentialkurven erstellt. Dazu wurden die normalisierten Schmelzkurven als Differentialsignal gegen den 0 % Standard aufgetragen. Die dabei ermittelbaren relativen Peakhöhen der Standards (0 % - 100 % methyliert) wurden zur Erstellung einer Kalibriergeraden herangezogen. Für die Darstellung wurde das Programm *SigmaPlot 11.0* verwendet, wobei der Logarithmus der relativen Peakhöhen gegen den Logarithmus der Methylierung in % aufgetragen wurde. Bei jeder Probe und jedem Standard wurde pro PCR-Lauf eine Doppelbestimmung vorgenommen. Durch die Wiederholung dieser ergab sich eine Serie von Messwerten, die anschließend dem Ausreißertest nach Nalimov unterzogen wurden.

5.6.1 Ausreißertest nach Nalimov

Für diesen Test müssen mindestens drei Datenwerte vorliegen, die anschließend der Größe nach sortiert und auf den kleinsten und größten Wert kontrolliert werden. Nach der Berechnung der Prüfgröße PG nach Nalimov und einem Vergleich mit einem Tabellenwert (mit P=95 %) wurden ausreißerverdächtige Werte ermittelt. Die nachstehende Formel dient dem Erkennen von Ausreißern, welche nur dann vorliegen, wenn der erhaltene Prüfwert größer als der abgelesene Tabellenwert ist. Solche Werte wurden aus der Datenreihe entfernt und mit dem erhaltenen neuen Datensatz wurde der Test wiederholt, um auf weitere ausreißerverdächtige Werte zu kontrollieren. Liegt nach dem Berechnen der Prüfwert jedoch unter dem angegebenen Tabellenwert, kann nach Nalimov nicht von einem Ausreißer gesprochen werden [100].

$$PG = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s_x} \cdot \sqrt{\frac{N}{N-1}}$$

x^* ausreißerverdächtiger Wert (größter oder kleinster Wert)

\bar{x} Mittelwert

s_x Standardabweichung

N Anzahl der Stichproben

Formel 5: Berechnung der Prüfgröße nach Nalimov; aus [100]

5.6.2 Signifikanztests: Student t-Test und Mann-Whitney Rangsummentest

Die ermittelten Abweichungen im DNA-Methylierungsgrad, welche als Folge der Inkubation von MCF-7 Zellen auftraten, wurden auf Signifikanz getestet. Ebenso wurden die Ergebnisse der MS-HRM Analysen für die Methylierung von Tumorgewebe, tumornahem- und fernem Gewebe auf bedeutsame Unterschiede kontrolliert. Die Signifikanzniveaus wurden dabei unter Verwendung des Student t-Tests im Programm *SigmaPlot 11.0* berechnet. Lag keine Normalverteilung der Datenmenge vor, die zusätzlich unterschiedliche Varianzen aufwies, wurde der Mann-Whitney Rangsummentest zur Überprüfung der Signifikanz herangezogen.

5.7 CHEMIKALIEN

5-Aza-2'-Desoxycytidin	Sigma-Aldrich
Bisphenol A	Sigma-Aldrich
CpGenome TM Universal Methylated DNA 100%, methyliert	Millipore
Curcumin	Sigma-Aldrich
Daidzein	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich
DNA-Exitus Plus IF	GenX®press
EpiTect Control DNA, unmethyliert	Qiagen
EpiTect HRM PCR Kit	Qiagen
Ethanol	VWR
Genistein	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Parthenolid	Sigma-Aldrich
PBS	Sigma-Aldrich
Primer	Sigma-Aldrich
Quercetin	Sigma-Aldrich
Ribonuklease A	Sigma-Aldrich
Wasser, ultrafiltriert und autoklaviert	Sigma-Aldrich

5.8 VERWENDETE KITS

EpiTect Bisulfite Kit (48)	Qiagen
QIAamp DNA Mini Kit (50)	Qiagen
EpiTect HRM PCR Kit (100)	Qiagen

5.9 ZELLKULTURBEDARF

RPMI 1640	Gibco-Invitrogen
Fetales Kälberserum	Gibco-Invitrogen
Penicillin/ Streptomycin	Gibco-Invitrogen

Experimenteller Teil

Trypanblau-Lösung
Trypsin

Sigma-Aldrich
Serva

5.10 GERÄTE

Absaugpumpe	Vacunsafe comfort	IBS Integra Biosciences
Analysenwaage	TE2144S	Sartorius
Brutschrank	Heracell 240i	Thermo Scientific
Mikroskop	Axiovert 40C	Zeiss
Neubauer-Zählkammer	Neubauer improved	Optik Labor
Pipetten	2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl 0,5-10 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Biorad
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschman Laborgeräte
Real-Time PCR Gerät	Rotor Gene Q	Qiagen
Spektralphotometer	Nano Drop 2000C	PeqLab
Sterilbank	Herasafe KS	Thermo Scientific
Trockenschrank	Memmert Modell 500	Memmert
Vortex	VV3 VF2	VWR Janke & Kunkel
Wasserbad	GD 100	Grant
Zentrifugen	Centrifuge 5424 4K10 Rotina 420R	Eppendorf Sigma Hettich Laborapparate

6. ZUSAMMENFASSUNG

Abstract (deutsch)

Die DNA-Methylierung spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression und ist eine der am häufigsten untersuchten epigenetischen Veränderungen im Zusammenhang mit der Kanzerogenese. Das gemeinsame Auftreten einer globalen Hypomethylierung und einer genspezifischen Hypermethylierung der genomischen DNA ist ein epigenetisches Charakteristikum von Tumorzellen. Vor allem die mit der Methylierung der Promotorregionen bzw. der ersten Exons von Tumorsuppressorgenen verbundene Stilllegung von Genen ist ein frühes Ereignis der Kanzerogenese. Neben Umwelteinflüssen sind auch der Lebensstil und das Alter entscheidend für die Entstehung von Brustkrebs. Studien haben gezeigt, dass verschiedene Substanzen, wie 5-Aza-2'-Desoxycytidin und Bisphenol A, sowie einige Pflanzeninhaltsstoffe, z.B. Isoflavone (Genistein und Daidzein), Curcumin und Parthenolid das DNA-Methylierungsmuster beeinflussen können. In der vorliegenden Diplomarbeit wurde der Einfluss von lebensmittelrelevanten Substanzen auf den Methylierungsgrad von Tumorsuppressorgenen in MCF-7 Zellen untersucht. Dafür wurden Gene ausgewählt, die bereits als mögliche Biomarker für die Entstehung von Brustkrebs genannt wurden.

Die Bestimmung des Methylierungsgrades erfolgte mittels methylierungs-sensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse (MS-HRM), wobei im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit eine MS-HRM Methode für *RASSF1A* entwickelt und optimiert wurde. Zusätzlich wurden weitere spezifische MS-HRM Methoden für die Gene *CDKN2A* und *DAPK1* angewendet. MCF-7 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (1-100 µM) von 5-Aza-2'-Desoxycytidin, Bisphenol A, Genistein und Daidzein, sowie Curcumin und Parthenolid für 216 bzw. 96 Stunden inkubiert. Die isolierte, bisulfit-modifizierte DNA wurde anschließend analysiert. 5-Aza-2'-Desoxycytidin diente als Kontrollsubstanz, da sie über den gesamten Konzentrationsbereich zu einer Demethylierung der DNA führt. Sowohl eine Konzentration von 5 µM bzw. 10 µM Curcumin als auch Parthenolid der Konzentration 1µM, 2,5µM bzw. 5 µM führten zu einer Abnahme der DNA-Methylierung bei den untersuchten Genen. Ebenso konnte ein demethylierender Effekt einer Gesamtkonzentration von 1 µM Genistein und Daidzein auf *CDKN2A* festgestellt werden. Im Unterschied dazu zeigten die Inkubationen mit Bisphenol A keine signifikanten Änderungen im Grad der Methylierung bei den untersuchten Genen in MCF-7 Zellen.

Zusätzlich wurden im Rahmen der Zusammenarbeit mit Ass. Prof. Dr. Georg Pfeiler von der Abteilung für Geburtshilfe und Gynäkologie der Medizinischen Universität Wien Biopsieproben von fünf Brustkrebspatientinnen untersucht. Bei Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe wurde jeweils die DNA-Methylierung mittels MS-HRM Methoden für die Gene *RASSF1A*, *CDKN2A*, *DAPK1* und *APC* bestimmt. Generell wiesen die Promotorregionen bzw. Exons der untersuchten Gene

in Tumorgewebe eine höhere Methylierung auf als in den umliegenden Geweben. Ferner wurden starke individuelle Schwankungen des Methylierungsmaßes zwischen einzelnen Patientinnen festgestellt. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, müssen jedoch noch weitere Proben untersucht werden.

Abstract (english)

DNA methylation plays an important role in the regulation of gene expression and is one of the most frequently studied epigenetic changes in respect of carcinogenesis. The co-occurrence of a global hypomethylation and a gene-specific hypermethylation of genomic DNA is an epigenetic characteristic of tumor cells. Especially "gene silencing" which is associated with the methylation of promoter regions and the first exons of tumor suppressor genes can be defined as an early event of carcinogenesis. In addition to the age, environmental influences and a person's lifestyle affect the development of breast cancer. Studies have shown that various substances, such as 5-aza-2'-deoxycytidine and bisphenol A, as well as some vegetable ingredients, eg. isoflavones (genistein and daidzein), curcumin and parthenolide may influence the DNA methylation patterns and therefore the development of tumors.

In this diploma thesis, the influence of food-relevant substances on the methylation-status of tumor suppressor genes in MCF-7 cells was investigated. Genes were selected that have already been regarded as potential biomarkers for the development of breast cancer.

The methylation status was determined by methylation-sensitive high-resolution melting curve analysis (MS-HRM). The MS-HRM method for *RASSF1A* was developed during the diploma thesis whereas the methods for the genes *CDKN2A* and *DAPK1* had been developed by former diploma/master students. MCF-7 cells were incubated with various concentrations (1-100 µM) of 5-aza-2'-deoxycytidine, bisphenol A, genistein/daidzein, as well as curcumin and parthenolide for either 216 or 96 hours. After isolation and bisulfite modification, the DNA methylation-status was determined by MS-HRM analysis. 5-Aza-2'-deoxycytidine, which is known to demethylate the DNA, served as a control. A demethylation effect was observed for curcumin (5 µM and 10 µM) and parthenolide (1 µM, 2.5 µM and 5 µM). Furthermore, the combined incubation with the isoflavones genistein and daidzein (total concentration of 1 µM) led to a demethylation of *CDKN2A*. In contrast, the incubation with bisphenol A didn't result in significant changes of the methylation-status.

In addition, in cooperation with Ass. Prof. Dr. Georg Pfeiler, Department of Obstetrics and Gynecology, Medical University of Vienna, biopsy samples from five breast cancer patients were analyzed. The DNA methylation status of the genes *RASSF1A*, *CDKN2A*, *DAPK1* and *APC* were determined in tumor, in tumor-adjacent and tumor-surrounding normal tissue. In general, the promoter regions or exons of the investigated genes showed a higher degree of methylation in tumor

Anhang

tissues than in the surrounding tissues. Furthermore, significant differences were found between tissue samples from different individuals. However, more samples have to be analyzed in order to obtain statistically relevant data.

7. ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

5-Aza-2'-dC	5-Aza-2'-Desoxycytidin
A	Adenin
APC	Adenomatous polyposis coli
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BPA	Bisphenol A
C	Cytosin
CDK	Zyclin-abhängige Kinase
<i>CDKN2A</i>	Zyclin-abhängiger Kinase Inhibitor 2A
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
cRNA	carrier RNA
CT	Cycle Treshold, Schwellenwertzyklus
Dai	Daidzein
<i>DAPK1</i>	Death-associated protein kinase 1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds-DNA	doppelsträngige DNA (engl.: double-stranded DNA)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EAK	endokrin aktive Komponente
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Östrogenrezeptor
ERK	extrazelluläre Signal-regulierende Kinase
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FKS	fetales Kälberserum
G	Guanin
<i>GATA3</i>	Gata binding protein 3
Gen	Genistein

Anhang

gDNA	genomische DNA
<i>GSTP1</i>	Gluthathion S-Transferase pi 1
HRM	hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
kD	Kilodalton
MS-HRM	methylierungs-sensitive hochauflösende Schmelzkurvenanalyse
MW	Mittelwert
MYC	Myelocytomatose-Onkogen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
Pen	Penicillin
<i>RARβ</i>	Retinolsäurerezeptor β
<i>RASSF1A</i>	Ras-association domain family 1A
Rb	Retinoblastoma Tumorsuppressorprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
s	Standardabweichung
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosyl-L-methionin
SHBG	Sexualhormon-bindendes-Globulin
ss-DNA	einzelsträngige DNA (engl.: single-stranded DNA)
Strep	Streptomycin
T	Thymin
T_m	Schmelztemperatur
U	Uracil

Rohdaten

Inkubationsversuche mit MCF-7 Zellen

Angegeben sind die Einzelwerte zu den Inkubationsversuchen mit MCF-7 Zellen sowie der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (s). Bei den mit einem * gekennzeichneten Werten handelt es sich um Ausreißer (bestimmt mit dem Ausreißertest nach Nalimov).

- Inkubation mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin

RASSF1A	Methylierungsgrad [%]									
Konz. [μM]	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
PBS	102	101	87	74	71	82	59	58	79	17
1	28	24	28	19	28	12	15	12	21	7,0
5	29	37	11*	36	27	38	48*	26	32	15,5
10	30	24	55	29	43	40	37	24	35	10,8
25	61	71	63	73	56	35	61	35	57	14,4
50	77	65	74	64	35	40	31	50	54	17,9
100	65	95	78	73	34	21	45	59	59	24,3

CDKN2A	Methylierungsgrad [%]									
Konz. [μM]	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
PBS	88	90	89	87	74	71	49	51	75	16,8
1	51	45	53	55	52	47	32	32	46	9,2
5	9	28	51	66	60	51	28	30	40	19,6
10	69	18*	66	46	55	52	39	43	53	11,2
25	75	68	90	88	52	72	40	45	66	18,8
50	60	67	80	83	68	74	44	44	65	15
100	71	78	90	81	47	40	32	33	59	23,3

DAPK1	Methylierungsgrad [%]									
Konz. [μM]	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
PBS	74	85	112*	84	90	81	78	74	81	5,8
1	42	50	35	30	24	15	8	6	26	15,8
5	14	10	5	2	33	30	11	15	15	11,3
10	6	5	1	3	54	40	30	17	20	19,8
25	23	24	9	9	69	73	30	23	33	25,0
50	25	25	11	1	65	52	28	35	30	20,7
100	103	100	31	35	55	52	21	16	52	33,5

Anhang

- Inkubation mit Bisphenol A

RASSF1A	Methylierungsgrad [%]									
Konz. [μM]	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
DMSO	90	96	92	95	98	93	93	85*	94	2,6
1	93	101	101	97	95	91	88	91	95	4,7
5	102	99	99	97	98	96	93	92	97	3,3
10	92	87	66*	102*	83	90	89	79	87	4,8
25	95	99	97	89	76	67	75	78	85	12,2
50	96	102	94	90	83	88	85	81	90	7,1

CDKN2A	Methylierungsgrad [%]									
Konz. [μM]	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
DMSO	71	53	67	63	83	82	58	65	68	10,5
1	63	66	73	74	82	84	66	69	72	7,6
5	74	78	68	66	82	82	69	70	74	6,4
10	69	74	56	55	86	81	55	47	65	14,1
25	66	62	62	64	77	82	59	45*	67	8,5
50	90	86	64	78	77	74	61	55	73	12,2

DAPK1	Methylierungsgrad [%]									
Konz. [μM]	1. Inkubation				2. Inkubation				MW	s
DMSO	79	74	112	117	133	67	105	109	100	23,4
1	87	60	111	110	81	76	105	95	91	18
5	79	92	129	85	118	109	115	158*	104	18,7
10	78	68	83	94	81	89	138	137	96	26,7
25	74	81	83	70	93	78	110*	129*	80	8
50	85	80	107	105	69	64	127	117	94	23,0

- Inkubation mit Genistein und Daidzein

RASSF1A	Methylierungsgrad [%]					
Konz. [μM]					MW	s
DMSO	96	94	99	91	95	3,5
0,5 / 0,5	99	87	92	87	91	5,8
2,5 / 2,5	93	94	94	94	94	0,4
5 / 5	96	99	97	88*	97	1,5
12,5 / 12,5	95	98	90	85	92	5,6

Anhang

CDKN2A	Methylierungsgrad [%]					
Konz. [μM]					MW	s
DMSO	57	59	62	60	59	2,3
0,5 / 0,5	41	42	49	45	44	3,8
2,5 / 2,5	59	47	53	53	53	5,2
5 / 5	57	58	60	63	59	2,8
12,5 + 12,5	57	57	56	58	57	1,0

DAPK1	Methylierungsgrad [%]					
Konz. [μM]					MW	s
DMSO	97	99	89*	97	98	0,8
0,5 + 0,5	100	94	86	87	92	6,3
2,5 + 2,5	101	97	89	92	95	5,1
5 + 5	100	95	82	87	91	7,9
12,5 + 12,5	102	101	87	91	95	7,5

- Inkubation mit Curcumin**

RASSF1A	Methylierungsgrad [%]					
Konz. [μM]					MW	s
DMSO	90	78	67	71	77	10,0
1	68	70	54*	68	69	1,3
5	55	58	49	63	56	5,9
10	56	64	54	60	58	4,4

CDKN2A	Methylierungsgrad [%]					
Konz. [μM]					MW	s
DMSO	51	53	58*	52	52	0,6
1	60	59	48	48	53	6,4
5	42	53*	44	43	43	1,0
10	76	60	43	38	54	17,1

DAPK1	Methylierungsgrad [%]					
Konz. [μM]					MW	s
DMSO	87	96	91	83	89	5,6
1	87	91	80	70	82	9,1
5	97	90	82	69	84	11,8
10	86	92	71	67	79	12,1

Anhang

- Inkubation mit Parthenolid

RASSF1A	Methylierungsgrad [%]					
	Konz. [μM]				MW	s
DMSO	89	84	81	76	83	5,7
1	89	61	75	69	74	11,6
5	64	79	65	71	70	6,9
10	80	81	67	55	71	12,5

CDKN2A	Methylierungsgrad [%]					
	Konz. [μM]				MW	s
DMSO	78	87	41	37	61	25,5
1	76	74	24	36	53	26,6
5	48	47	36	39	42	5,6
10	52	51	38	37	44	7,9

DAPK1	Methylierungsgrad [%]					
	Konz. [μM]				MW	s
DMSO	98	97	81	82	90	9,2
1	92	88	77	69	81	10,3
5	99	85	71	59	79	17,3
10	80	87	49	47	65	20,8

Biopsieproben

Angegeben sind die Einzelwerte zu den Messungen des Methylierungsgrads der Biopsieproben sowie der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (s).

RASSF1A	Methylierungsgrad [%]																	
	Tumorgewebe				tumornahes Gewebe				tumorfernes Gewebe									
	1.Messung	2.Messung	MW	s	1.Messung	2.Messung	MW	s	1.Messung	2.Messung	MW	s						
Probe 1	1	0	2	1	1	1,0	0	1	0	0	0	0,5	1	1	2	0	1	0,7
Probe 2	8	7	10	10	9	1,6	3	3	3	2	3	0,5	0	7	9	0	4	3,5
Probe 3	20	21	13	12	16	4,6	12	13	5	5	9	4,5	9	7	3	1	5	3,6
Probe 4	2	2	1	1	1	0,6	6	5	5	4	5	0,8	2	2	1	1	1	0,6
Probe 5	19	18	17	16	17	1,5	5	6	4	2	4	1,8	3	0	2	2	2	1,1

Anhang

CDKN2A	Methylierungsgrad [%]																	
	Tumorgewebe						tumornahes Gewebe						tumorfernes Gewebe					
	1.Messung		2.Messung		MW	s	1.Messung		2.Messung		MW	s	1.Messung		2.Messung		MW	s
Probe 1	35	43	31	29	34	6,2	24	28	26	28	26	1,7	29	28	32	40	32	5,5
Probe 2	42	37	36	33	37	3,8	21	19	19	21	20	0,8	33	42	35	30	35	5,5
Probe 3	41	41	35	33	38	3,8	18	14	12	11	14	3	17	19	10	12	14	4,3
Probe 4	21	30	13	11	18	8,6	20	18	14	11	16	3,9	17	21	10	12	15	4,9
Probe 5	72	53	54	54	58	9	15	15	10	9	12	3,2	11	10	9	10	10	0,8

DAPK1	Methylierungsgrad [%]																	
	Tumorgewebe						tumornahes Gewebe						tumorfernes Gewebe					
	1.Messung		2.Messung		MW	s	1.Messung		2.Messung		MW	s	1.Messung		2.Messung		MW	s
Probe 1	0	1	0	0	0	0,3	3	2	0	0	1	1,7	3	4	0	0	2	2,2
Probe 2	7	7	16	13	11	4,1	5	5	0	0	2	2,8	12	12	0	1	6	6,8
Probe 3	10	6	13	12	10	2,9	2	2	4	2	3	1	1	1	0	0	1	0,8
Probe 4	2	3	0	0	1	1,4	2	2	0	0	1	0,9	1	0	0	0	0	0,7
Probe 5	5	3	0	0	2	2,6	2	2	2	0	2	1,0	2	2	0	0	1	1,3

APC	Methylierungsgrad [%]																	
	Tumorgewebe						tumornahes Gewebe						tumorfernes Gewebe					
	1.Messung		2.Messung		MW	s	1.Messung		2.Messung		MW	s	1.Messung		2.Messung		MW	s
Probe 1	4	3	0	0	2	2	5	3	0	0,3	2	2,3	4	4	12	1	5	5
Probe 2	3	3	0,1	0,1	1	1,5	4	4	0,1	0,2	2	2,3	4	7	3	7	5	2,3
Probe 3	25	26	25	23	25	1,2	10	14	13	13	12	1,8	9	9	8	9	9	0,3
Probe 4	0,3	0,5	0,3	0	0	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Probe 5	0,6	0,5	1,0	0,7	1	0,3	0	0	0,9	1,1	0	0,6	0,3	0	1	1	0	0,4

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Erwartete Neuerkrankungen und Todesfälle für die häufigsten Tumorerkrankungen bei Frauen und Männern für das Jahr 2008; nach [4]</i>	<i>2</i>
<i>Abbildung 2: Mechanismen der erhaltenden und der de novo Methylierung; aus [14], modifiziert</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 3: Mechanismus der enzymatischen Methylierung von Cytosin; aus [17], modifiziert.....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 4: Darstellung möglicher Epiallele von zwei Typen heterogener Methylierung (grün: unmethylierte CpG, blau: methylierte CpG); aus [26]</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 5: Phosphorylierung des Rb Genprodukts durch die Kombination der D Zykline (D1, D2 und D3) und deren assoziierte Kinasen CDK4 und CDK6 (K4 und K6); aus [32], modifiziert.....</i>	<i>12</i>
<i>Abbildung 6: Chemische Strukturen von 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Desoxycytidin; aus [11], modifiziert</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 7: Chemische Strukturen von Östradiol und Bisphenol A; aus [51], modifiziert.....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 8: Chemische Strukturen der Isoflavone Genistein und Daidzein im Vergleich zu Östradiol; aus [59], modifiziert.....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 9: Chemische Struktur natürlicher Curcuminoide; aus [62], modifiziert</i>	<i>18</i>
<i>Abbildung 10: Chemische Struktur von Parthenolid; aus [63], modifiziert.....</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 11: Wachstum von MCF-7 Zellen; aus [66]</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 12: Schema des Temperaturzyklus einer PCR; aus [69], modifiziert</i>	<i>23</i>
<i>Abbildung 13: Edukte und Produkte des ersten und zweiten Zyklus einer PCR; nach [69].....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 14: Darstellung der Kinetik der Zunahme der Produktkonzentration im Verlauf einer PCR; aus [69], modifiziert.....</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 15: Darstellung der Einlagerung eines Fluoreszenzfarbstoffes in ds-DNA mit Zunahme des Fluoreszenzsignals; aus [75], modifiziert.....</i>	<i>27</i>
<i>Abbildung 16: Entstehung des Fluoreszenzsignals bei einer TaqMan Sonde und einem Molecular Beacon; aus [75], modifiziert.....</i>	<i>28</i>
<i>Abbildung 17: Reaktionsschritte der Bisulfit-Konvertierung; aus [67], modifiziert</i>	<i>29</i>
<i>Abbildung 18: Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren GC und AT; aus [14], modifiziert</i>	<i>30</i>
<i>Abbildung 19: Schmelzprofile von unmethylierter und methylierter DNA; aus [78], modifiziert.....</i>	<i>31</i>
<i>Abbildung 20: Schmelzkurven unterschiedlich stark methylierter Standards vor und nach der Normalisierung</i>	<i>33</i>
<i>Abbildung 21: Schmelzprofile heterogen methylierter Proben im Vergleich zu einem 100 % methylierten (M) und 0 % methylierten Standard (UM); aus [81], modifiziert</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 22: Beispiel für die Schmelztemperaturen unterschiedlich methylierter DNA; aus [67], modifiziert</i>	<i>34</i>
<i>Abbildung 23: Darstellung der Differentialkurven (% methyliert) und der zugehörigen Kalibriergerade; aus [82].....</i>	<i>35</i>

Anhang

<i>Abbildung 24: Schmelzprofile und Schmelztemperatur des methylierten und unmethylierten Templats, simuliert mit POLAND</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 25: Amplifikationskurven der Kontrollstandards mit den Primern RASSF1A_f1 und RASSF1A_r1 bei einer Annealingtemperatur von 52 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 26: Normalisierte Schmelzkurven nach Amplifikation mit den Primern RASSF1A_f1 und RASSF1A_r1 bei einer Annealingtemperatur von 52 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 27: Normalisierte Schmelzkurven für das Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r1 bei einer Annealingtemperatur von 54 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 28: Normalisierte Schmelzkurven für das Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r1 bei einer Annealingtemperatur von 52 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 29: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C und einem Zusatz von 1,5 mM MgCl₂.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 30: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 31: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C und einem Zusatz von 3 mM MgCl₂.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 32: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C und einem Zusatz von 4 mM MgCl₂.....</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 33: Einfluss des MgCl₂-Zusatzes auf die Amplifikationseffizienz. Primer RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3 bei einer Annealingtemperatur von 56 °C.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 34: Erste negative Ableitung der Schmelzkurven (-dF/dT gegen T) und normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar RASSF1A_f2 und RASSF1A_r3. PCR-Bedingungen: Annealingtemperatur 56 °C, MgCl₂-Zusatz 2 mM</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 35: Darstellung von drei Kalibriergeraden von drei unabhängigen Messungen.....</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 36: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar GATA3_1 bei einer Annealingtemperatur von 53 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 37: Amplifikationskurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar GATA3_2 bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 38: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar GATA3_2 bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 39: Darstellung der ersten negativen Ableitung der Schmelzkurven (-dF/dT gegen T) der Kontrollstandards mit dem Primerpaar GATA3_2 bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 40: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards und der DNA aus MCF-7 Zellen, die mit Bisphenol A bzw. DMSO inkubiert wurden. PCR-Bedingungen: Primer GATA3_2, Annealingtemperatur: 50 °C, Zusatz von MgCl₂: 2 mM.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 41: Differentialgraf der normalisierten Schmelzkurven der Kontrollstandards und der DNA aus MCF-7 Zellen, die mit Bisphenol A bzw. DMSO inkubiert wurden. PCR-Bedingungen: Primer GATA3_2, Annealingtemperatur: 50 °C, Zusatz von MgCl₂: 2 mM.....</i>	<i>55</i>

Anhang

<i>Abbildung 42: Amplifikationskurven von Kontrollstandards mit dem Primerpaar GSTP1_1 bei einer Annealingtemperatur von 53 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 43: Amplifikationskurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar GSTP1_2 bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einem Zusatz von 3,5 mM MgCl₂.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 44: Normalisierte Schmelzkurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar GSTP1_2 bei einer Annealingtemperatur von 50 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂.....</i>	<i>58</i>
<i>Abbildung 45: Amplifikationskurven der Kontrollstandards mit dem Primerpaar TWIST bei einer Annealingtemperatur von 51 °C und einem Zusatz von 2 mM MgCl₂</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 46: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit 5-Aza-2'-dC inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A.....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 47: Differentialgraf der DNA aus mit 5-Aza-2'-dC inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A..</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 48: Kalibriergerade für RASSF1A für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit 5-Aza-2'-dC.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 49: Relativer Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-dC. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt (n = 8). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle PBS, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001)</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 50: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit 5-Aza-2'-dC inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 51: Differentialgraf der DNA aus mit 5-Aza-2'-dC inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A ..</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 52: Kalibriergerade für CDKN2A für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit 5-Aza-2'-dC</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 53: Relativer Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-dC. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt (n = 8). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle PBS, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001)</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 54: Relativer Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-dC. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt (n = 8). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle PBS, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001)</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 55: Relativer Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Bisphenol A. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt (n = 8). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 56: Relativer Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Bisphenol A. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen (von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt (n = 8). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 57: Relativer Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Bisphenol A. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von vier MS-HRM Bestimmungen</i>	

(von zwei unabhängigen Inkubationsversuchen) dargestellt ($n = 8$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).....	69
Abbildung 58: Relativer Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Genistein und Daidzein. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)	70
Abbildung 59: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Genistein (Gen) und Daidzein (Dai) inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A.....	71
Abbildung 60: Differentialgraf der DNA aus mit Genistein und Daidzein inkubierten MCF-7 Zellen für CDKN2A	71
Abbildung 61: Kalibriergerade für CDKN2A für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Genistein und Daidzein	72
Abbildung 62: Relativer Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Genistein und Daidzein. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).	72
Abbildung 63: Relativer Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Genistein und Daidzein. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)	73
Abbildung 64: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Curcumin inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A.....	74
Abbildung 65: Differentialgraf der DNA aus mit Curcumin inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A	74
Abbildung 66: Kalibriergerade für RASSF1A für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Curcumin	75
Abbildung 67: Relativer Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Curcumin. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)	75
Abbildung 68: Relativer Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Curcumin. Es sind der Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)	76
Abbildung 69: Relativer Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Curcumin. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$)	76
Abbildung 70: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Parthenolid inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A.....	77

Abbildung 71: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Parthenolid inkubierten MCF-7 Zellen für RASSF1A..... 78

Abbildung 72: Kalibriergerade für RASSF1A für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Parthenolid..... 78

Abbildung 73: Relativer Methylierungsgrad von RASSF1A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Parthenolid. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) 79

Abbildung 74: Relativer Methylierungsgrad von CDKN2A in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Parthenolid. Es sind der Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) 79

Abbildung 75: Normalisierte Schmelzkurven der DNA aus mit Parthenolid inkubierten MCF-7 Zellen für DAPK1 80

Abbildung 76: Differentialgraf der DNA aus mit Parthenolid inkubierten MCF-7 Zellen für DAPK1 80

Abbildung 77: Kalibriergerade für DAPK1 für die Inkubation von MCF-7 Zellen mit Parthenolid 81

Abbildung 78: Relativer Methylierungsgrad von DAPK1 in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Parthenolid. Es sind der Mittelwerte und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen ($n = 4$) dargestellt. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Kontrolle DMSO, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). 81

Abbildung 79: Methylierungsgrad der Promotorregion von RASSF1A in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe fünf unterschiedlicher Biopsieproben. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf das jeweilige Tumorgewebe, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) 82

Abbildung 80: Methylierungsgrad der Methylierung des Exon 3 von CDKN2A in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe fünf unterschiedlicher Biopsieproben. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf das jeweilige Tumorgewebe, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) 83

Abbildung 81: Methylierungsgrad der Promotorregion von DAPK1 in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe fünf unterschiedlicher Biopsieproben. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf das jeweilige Tumorgewebe, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) 84

Abbildung 82: Methylierungsgrad der Promotorregion von APC in Tumorgewebe, tumornahem und tumorfernem Gewebe fünf unterschiedlicher Biopsieproben. Es sind der Mittelwert und die Standardabweichung von zwei unabhängigen MS-HRM Bestimmungen dargestellt ($n = 4$). Die Signifikanzniveaus, bezogen auf das jeweilige Tumorgewebe, wurden mit dem Student t-Test berechnet (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) 84

Abbildung 83: Netzeinteilung einer Neubauer-Zählkammer; aus [96]..... 92

Abbildung 84: Auszählen der Zellen, wobei die obere und linke Linie erfasst werden; aus [96] 92

Anhang

<i>Abbildung 85: Beispiel für eine Biopsieprobe (T= Tumorgewebe, N= tumornahes Gewebe, F= tumorfernes Gewebe).....</i>	<i>97</i>
<i>Abbildung 86: Temperaturverlauf während einer PCR und der anschließenden hochauflösenden Schmelzkurvenanalyse.....</i>	<i>105</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Vergleich von unmethylierten und methylierten DNA-Sequenzen nach der Behandlung mit Natriumhydrogensulfit und anschließender PCR; modifiziert nach [68]</i>	29
<i>Tabelle 2: Charakteristika der Primer für die RASSF1A Promotorregion</i>	41
<i>Tabelle 3: Primerpaare für GATA3</i>	51
<i>Tabelle 4: Primerpaare für GSTP1</i>	56
<i>Tabelle 5: Primerpaar für TWIST</i>	59
<i>Tabelle 6: Primerpaar für RARβ</i>	60
<i>Tabelle 7: Zusammenfassung der optimierten Bedingungen der verwendeten MS-HRM Methoden</i> ...	61
<i>Tabelle 8: Untersucher Genabschnitt und dessen DNA-Methylierungsgrad in unbehandelten MCF-7 Zellen [%] mit Standardabweichung [%]</i>	62
<i>Tabelle 9: Übersicht über die einzelnen Inkubationsversuche bei MCF-7 Zellen</i>	94
<i>Tabelle 10: Verwendete Konzentrationen der Substanzen und die jeweilige Negativkontrolle der Inkubationsexperimente</i>	94
<i>Tabelle 11: Reaktionsansatz für die Bisulfit-Konvertierung von 1-2000 ng DNA</i>	99
<i>Tabelle 12: Reaktionsansatz für die Bisulfit-Konvertierung von 1-500 ng DNA</i>	99
<i>Tabelle 13: Temperaturprotokoll für die Bisulfit-Konvertierung</i>	100
<i>Tabelle 14: Pipettierschema zur Herstellung von je 5 μl eines DNA-Standards bestimmter Methylierung</i>	101
<i>Tabelle 15: Pipettierschema für die Zusammenstellung des Mastermix für RASSF1A</i>	102
<i>Tabelle 16: Zusammensetzung eines PCR-Reaktionsansatzes</i>	103
<i>Tabelle 17: Temperaturprogramm für eine MS-HRM Analyse</i>	104
<i>Tabelle 18: Zusammensetzung des Mastermix für RASSF1A</i>	105
<i>Tabelle 19: Temperaturprogramm für RASSF1A</i>	106
<i>Tabelle 20: Zusammensetzung des Mastermix für CDKN2A</i>	106
<i>Tabelle 21: Temperaturprogramm für CDKN2A</i>	106
<i>Tabelle 22: Zusammensetzung des Mastermix für DAPK1</i>	106
<i>Tabelle 23: Temperaturprogramm für DAPK1</i>	107
<i>Tabelle 24: Zusammensetzung des Mastermix für APC</i>	107
<i>Tabelle 25: Temperaturprogramm für APC</i>	107

Formelverzeichnis

<i>Formel 1: Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur von Primern; aus [69], modifiziert</i>	<i>37</i>
<i>Formel 2: Bestimmung der Zellzahl in einem Milliliter Suspension</i>	<i>93</i>
<i>Formel 3: Bestimmung der Konzentration der DNA</i>	<i>98</i>
<i>Formel 4: Bestimmung der Reinheit der DNA.....</i>	<i>98</i>
<i>Formel 5: Berechnung der Prüfgröße nach Nalimov; aus [100]</i>	<i>108</i>

Curriculum Vitae

persönliche Daten:

Name: Anna Raab
Geburtsdatum: 21.01.1988
Geburtsort: 3270 Scheibbs
Familienstand: ledig
Eltern: Johann Raab
Anneliese Raab

Ausbildung:

1994-1998 Volksschule in Gresten
1998-2002 Landeshauptschule in Gresten
2002-2006 BORG Scheibbs
2007-2013 Lehramtsstudium UF Chemie und UF Biologie und Umweltkunde an der Universität Wien
seit März 2012 Diplomarbeit am Institut für Analytische Chemie

Berufserfahrung:

Sommer 2008-2013 Mitarbeit und Kinderbetreuung bei „Feriencamps“ Strebersdorf in Wien
WS 2012 und SS 2013 Tutorin am Institut für Analytische Chemie im Lebensmittelanalytischen Praktikum für Ernährungswissenschaftler, Universität Wien
SS 2013 Tutorin am Institut für Materialchemie bei den anorganischen Schulversuchen für Lehramtstudenten, Universität Wien

Literaturverzeichnis

- [1] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. WHO; WHO Cancer. 05.02.2013.
- [2] http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/krebserkrankungen/. Statistik Austria; Österreichisches Krebsregister. 2009. 18.03.2013.
- [3] F. P. Perera, *Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention*. Journal of the National Cancer Institut, 1996. 88(8): p. 496–509.
- [4] A. Jemal, F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman, *Global cancer statistics*. A Cancer Journal for Clinicians, 2011. 61(2): p. 69–90.
- [5] R. W. Ruddon, *Cancer biology*, 4.Aufl., Oxford University Press: USA, 2007. p. 4-5.
- [6] S. Pelengaris and M. Khan, *Introduction*, in *The molecular biology of cancer*. S. Pelengaris and M. Khan (Editors), Wiley-Blackwell, 2006. p. 14.
- [7] M. Hejmadi, *Introduction to Cancer Biology*. Bookboon, 2010. p. 11-12.
- [8] S. Choudhuri, Y. Cui and C. D. Klaassen, *Molecular targets of epigenetic regulation and effectors of environmental influences*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010. 245(3): p. 378–393.
- [9] J. Tost, *DNA methylation: an introduction to the biology and the disease-associated changes of a promising biomarker*. Methods in Molecular Biology, 2009. 507: p. 3–20.
- [10] K. D. Robertson, *DNA methylation, methyltransferases, and cancer*. Oncogene, 2001. 20(4): p. 3139–3155.
- [11] C. B. Yoo and P. A. Jones, *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. Nature Reviews Drug Discovery, 2006. 5(1): p. 37–50.
- [12] A. Bird, *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes & Development, 2002. 16(1): p. 6–21.
- [13] R. S. Illingworth and A. P. Bird, *CpG islands – ‘a rough guide’*. FEBS Letters, 2009. 583(11): p. 1713–1720.
- [14] E. Passarge, *Color atlas of genetics*, 3. Aufl., 2006, erw. und rev. A. Thieme: Stuttgart. p. 44, 330.
- [15] M. Okano, S. Xie and E. Li, *Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells*. Nucleic Acids Research, 1998. 26(11): p. 2536–2540.
- [16] I. Suetake, F. Shinozaki, J. Miyagawa, H. Takeshima and S. Tajima, *DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of DNMT3a and DNMT3b through a direct interaction*. The Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(26): p. 27816–27823.

- [17] J. Christman, *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy*. *Oncogene*, 2002. 21(35): p. 5483–5495.
- [18] A. Tserga, N. V. Michalopoulos, G. Levidou, P. Korkolopoulou, G. Zografos, E. Patsouris and A. A. Saetta, *Association of aberrant DNA methylation with clinicopathological features in breast cancer*. *Oncology Reports*, 2012. 27(5): p. 1630–1638.
- [19] S. Mulero-Navarro and M. Esteller, *Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now*. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 2008. 68(1): p. 1–11.
- [20] M. Esteller and J. G. Herman, *Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*. *The Journal of Pathology*, 2002. 196(1): p. 1–7.
- [21] C. De Smet and A. Loriot, *DNA hypomethylation in cancer: epigenetic scars of a neoplastic journey*. *Epigenetics*, 2010. 5(3): p. 206–213.
- [22] P. M. Das and R. Singal, *DNA methylation and cancer*. *Journal of Clinical Oncology*, 2004. 22(22): p. 4632–4642.
- [23] J. F. Costello, M. C. Frühwald, D. J. Smiraglia, L. J. Rush, G. P. Robertson, X. Gao, F. A. Wright, J. D. Feramisco, P. Peltomäki, J. C. Lang, D. E. Schuller, L. Yu, C. D. Bloomfield, M. A. Caligiuri, A. Yates, R. Nishikawa, H.-J. S. Huang, N. J. Petrelli, X. Zhang, M. S. O, W. A. Held, W. K. Cavenee and C. Plass, *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. *Nature Genetics*, 2000. 24(2): p. 132–138.
- [24] P. W. Laird, *The power and the promise of DNA methylation markers*. *Nature Reviews Cancer*, 2003. 3(4): p. 253–266.
- [25] I. L. M. Candiloro, T. Mikeska and A. Dobrovic, *Assessing combined methylation-sensitive high resolution melting and pyrosequencing for the analysis of heterogeneous DNA methylation*. *Epigenetics*, 2011. 6(4): p. 500–507.
- [26] T. Mikeska, I. L. M. Candiloro and A. Dobrovic, *The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation*. *Epigenomics*, 2010. 2(4): p. 561–573.
- [27] L. van der Weyden and D. J. Adams, *The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumourigenesis*. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 2007. 1776(1): p. 58–85.
- [28] H. Donniger, M. D. Vos and G. J. Clark, *The RASSF1A tumor suppressor*. *Journal of Cell Science*, 2007. 120(18): p. 3163–72.
- [29] A. Agathangelou, W. N. Cooper and F. Latif, *Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers*. *Cancer Research*, 2005. 65(9): p. 3497–3508.

- [30] H. M. Müller, A. Widschwendter, H. Fiegl, L. Ivarsson, G. Goebel, E. Perkmann, C. Marth and M. Widschwendter, *DNA methylation in serum of breast cancer patients: an independent prognostic marker*. *Cancer Research*, 2003. 63(22): p. 7641–7645.
- [31] M. Serrano, G. J. Hannon and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. *Letters to Nature*, 1993. 366(6456): p. 704–707.
- [32] M. Ruas and G. Peters, *The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives*. *Biochimica et Biophysica Acta- Reviews on Cancer*, 1998. 1378(2): p. F115–F177.
- [33] X. Jin, D. Nguyen, W.-W. Zhang, A. P. Kyritsis and J. A. Roth, *Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector*. *Cancer Research*, 1995. 55(15): p. 3250–3253.
- [34] H. Mitomi, N. Fukui, N. Tanaka, H. Kanazawa, T. Saito, T. Matsuoka and T. Yao, *Aberrant p16INK4a methylation is a frequent event in colorectal cancers: prognostic value and relation to mRNA expression and immunoreactivity*. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2010. 136(2): p. 323–331.
- [35] X. Yang, L. Yan, and N. E. Davidson, *DNA methylation in breast cancer*. *Endocrine-Related Cancer*, 2001. 8(2): p. 115–127.
- [36] S. Bialik and A. Kimchi, *The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond*. *Annual Review of Biochemistry*, 2006. 75(1): p. 189–210.
- [37] J. Qian, D.-M. Yao, J. Lin, Y.-L. Wang, L.-X. Han, W.-R. Xu and C.-Y. Wu, *Methylation of DAPK1 promoter: frequent but not an adverse prognostic factor in myelodysplastic syndrome*. *International Journal of Laboratory Hematology*, 2010. 32(1): p. 74–81.
- [38] X. Luo, W. Li, L. Yang, X. Yu, L. Xiao, M. Tang, X. Dong, Q. Deng, A. M. Bode, J. Liu and Y. Cao, *DAPK1 mediates the G1 phase arrest in human nasopharyngeal carcinoma cells induced by grifolin, a potential antitumor natural product*. *European Journal of Pharmacology*, 2011. 670(2-3): p. 427–434.
- [39] S. Pehlivan, M. Artac, T. Sever, H. Bozcuk, C. Kilincarslan and M. Pehlivan, *Gene methylation of SFRP2, P16, DAPK1, HIC1, and MGMT and KRAS mutations in sporadic colorectal cancer*. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 2010. 201(2): p. 128–132.
- [40] R. Claus, B. Hackanson, A. R. Poetsch, M. Zucknick, M. Sonnet, N. Blagitko-Dorfs, J. Hiller, S. Wilop, T. H. Brümmendorf, O. Galm, U. Platzbecker, J. C. Byrd, K. Döhner, H. Döhner, M. Lübbert and C. Plass, *Quantitative analyses of DAPK1 methylation in AML and MDS*. *International Journal of Cancer*, 2012. 131(2): p. E138–E142.
- [41] S. Vinci, G. Giannarini, C. Selli, J. Kuncova, D. Villari, F. Valent and C. Orlando, *Quantitative methylation analysis of BCL2, hTERT, and DAPK promoters in urine sediment for the detection of non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder: A prospective, two-center validation study*. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 2011. 29(2): p. 150–156.

- [42] N. S. Fearnhead, M. P. Britton and W. F. Bodmer, *The ABC of APC*. Human Molecular Genetics, 2001. 10(7): p. 721–733.
- [43] G. J. Klarmann, A. Decker and W. L. Farrar, *Epigenetic gene silencing in the Wnt pathway in breast cancer*. Epigenetics, 2008. 3(2): p. 59–63.
- [44] M. Esteller, *Epigenetic changes in cancer*. F1000 Biology Reports, 2011. 3: p. 1–6.
- [45] L. Du, Z. Xie, L. Wu, M. Chiu, J. Lin, K. K. Chan, S. Liu and Z. Liu, *Reactivation of RASSF1A in breast cancer cells by curcumin*. Nutrition and Cancer, 2012. 64(8): p. 1228–1235.
- [46] M. L. Guzman, R. M. Rossi, L. Karnischky, X. Li, D. R. Peterson, D. S. Howard and C. T. Jordan, *The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells*. Blood, 2005. 105(11): p. 4163–4169.
- [47] S. I. Mishra, V. Dickerson, and W. Najm, *Phytoestrogens and breast cancer prevention: What is the evidence?*. American Journal of Obstetrics and Gynecology, 2003. 188(5): Supplement, p. S66–S70.
- [48] C. Stresemann, B. Brueckner, T. Musch, H. Stopper and F. Lyko, *Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines*. Cancer Research, 2006. 66(5): p. 2794–2800.
- [49] J. C. Chuang, C. B. Yoo, J. M. Kwan, T. W. H. Li, G. Liang, A. S. Yang and P. A. Jones, *Comparison of biological effects of non-nucleoside DNA methylation inhibitors versus 5-aza-2'-deoxycytidine*. Molecular Cancer Therapeutics, 2005. 4(10): p. 1515–1520.
- [50] Y.-I. Weng, P.-Y. Hsu, S. Liyanarachchi, J. Liu, D. E. Deatherage, Y.-W. Huang, T. Zuo, B. Rodriguez, C.-H. Lin, A.-L. Cheng and T. H.-M. Huang, *Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010. 248(2): p. 111–121.
- [51] J. T. Wolstenholme, E. F. Rissman and J. J. Connelly, *The role of bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior*. Hormones and Behavior, 2011. 59(3): p. 296–305.
- [52] A. M. Calafat, Z. Kuklennyik, J. A. Reidy, S. P. Caudill, J. Ekong and L. L. Needham, *Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population*. Environmental Health Perspectives, 2005. 113(4): p. 391–395.
- [53] M. V. Maffini, B. S. Rubin, C. Sonnenschein and A. M. Soto, *Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A*. Molecular and Cellular Endocrinology, 2006. 254–255: p. 179–186.
- [54] D. C. Dolinoy, D. Huang and R. L. Jirtle, *Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. 104(32): p. 13056–13061.
- [55] J. Gilbert and H. Z. Senyuva, *Bioactive compounds in foods*. Blackwell Publishing: Oxford, 2008. p. 174–178.

- [56] K. D. Setchell, *Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones*. The American Journal of Clinical Nutrition, 1998. 68(6): p. 1333S–1346S.
- [57] A. Hahn, A. Ströhle and M. Wolters, *Ernährung: Physiologische Grundlagen, Prävention, Therapie*, 2. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2006. p. 174-175.
- [58] J. M. Cline and C. E. Wood, *Estrogen/isoflavone interactions in cynomolgus macaques (Macaca fascicularis)*. American Journal of Primatology, 2009. 71(9): p. 722–731.
- [59] C. E. Wood, S. E. Appt, T. B. Clarkson, A. A. Franke, C. J. Lees, D. R. Doerge and J. M. Cline, *Effects of high-dose soy isoflavones and equol on reproductive tissues in female cynomolgus monkeys*. Biology of Reproduction, 2006. 75(3): p. 477–486.
- [60] A. J. Ruby, G. Kuttan, K. Dinesh Babu, K. N. Rajasekharan and R. Kuttan, *Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids*. Cancer Letters, 1995. 94(1): p. 79–83.
- [61] P. Anand, C. Sundaram, S. Jhurani, A. B. Kunnumakkara and B. B. Aggarwal, *Curcumin and cancer: an 'old-age' disease with an 'age-old' solution*. Cancer Letters, 2008. 267(1): p. 133–164.
- [62] Z. Liu, Z. Xie, W. Jones, R. E. Pavlovicz, S. Liu, J. Yu, P. Li, J. Lin, J. R. Fuchs, G. Marcucci, C. Li and K. K. Chan, *Curcumin is a potent DNA hypomethylation agent*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2009. 19(3): p. 706–709.
- [63] B. H. B. Kwok, B. Koh, M. I. Ndubuisi, M. Eloffsson and C. M. Crews, *The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb feverfew directly binds to and inhibits I κ B kinase*. Chemistry & Biology, 2001. 8(8): p. 759–766.
- [64] Z. Liu, S. Liu, Z. Xie, R. E. Pavlovicz, J. Wu, P. Chen, J. Aimiuwu, J. Pang, D. Bhasin, P. Neviani, J. R. Fuchs, C. Plass, P.-K. Li, C. Li, T. H.-M. Huang, L.-C. Wu, L. Rush, H. Wang, D. Perrotti, G. Marcucci and K. K. Chan, *Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009. 329(2): p. 505–514.
- [65] http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-115.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192. *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Braunschweig, DSMZ; MCF7*. 04.03.2014.
- [66] <http://www.tgrbio.com/cancer-cell-lines-primary-cell-cultures/cell-models-mcf7-cells.html>. *TGR BioScience; cell models MCF7 cells*. 04.03.2013.
- [67] L. S. Kristensen and L. L. Hansen, *PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment*. Clinical Chemistry, 2009. 55(8): p. 1471–1483.
- [68] T. A. Brown, *Gentechnologie für Einsteiger*, 6.Aufl., Spektrum Akad. Verl.: Heidelberg, 2011. p. 199-214.

- [69] M. J. McPherson and S. G. Møller, *PCR (THE BASICS)*, 2. Aufl., Taylor & Francis, 2006. p. 9-19, 23-43.
- [70] X. Wang and B. Seed, *High-throughput primer and probe design*, in *Real-time PCR*. M. Tevfik Dorak (Editor), New York: Taylor & Francis, 2006. p. 93–106.
- [71] C. Mülhardt, *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*, 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, 2006. p. 84-96.
- [72] Qiagen, *EpiTect HRM PCR Handbook*. 2009.
- [73] T. K. Wojdacz, A. Dobrovic and L. L. Hansen, *Methylation-sensitive high-resolution melting*. *Nature Protocols*, 2008. 3(12): p. 1903–1908.
- [74] S. Metzenberg, *Working with DNA*, New York: Taylor & Francis Group, 2007. p. 291-315.
- [75] G. L. Shipley, *An introduction to real-time PCR*, in *Real-time PCR*. M. Tevfik Dorak (Editor), New York: Taylor & Francis, 2006. p. 1–32.
- [76] O. Ammerpohl, J. I. Martín-Subero, J. Richter, I. Vater and R. Siebert, *Hunting for the 5th base: techniques for analyzing DNA methylation*. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, 2009. 1790(9): p. 847–862.
- [77] M. Frommer, L. E. McDonald, D. S. Millar, C. M. Collis, F. Watt, G. W. Grigg, P. L. Molloy and C. L. Paul, *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992. 89(5): p. 1827–1831.
- [78] T. K. Wojdacz, *Methylation-sensitive high-resolution melting in the context of legislative requirements for validation of analytical procedures for diagnostic applications*. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2012. 12(1): p. 39–47.
- [79] T. K. Wojdacz and A. Dobrovic, *Melting curve assays for DNA methylation analysis*, in *DNA methylation methods and protocols*, 2.Aufl., J. Tost (Editor), Humana Press, 2009. p. 229–240.
- [80] V. Dujols, N. Kusukawa, J. T. McKinney, S. F. Dobrowolsky and C. T. Wittwer, *High-resolution melting analysis for scanning and genotyping*, in *Real-time PCR*. M. Tevfik Dorak (Editor), New York: Taylor & Francis, 2007. p. 160–161.
- [81] I. L. Candiloro, T. Mikeska, P. Hokland and A. Dobrovic, *Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the CDKN2B (p15) gene*. *Epigenetics Chromatin*, 2008. 1: p. 7.
- [82] F. Malentacchi, G. Forni, S. Vinci, and C. Orlando, *Quantitative evaluation of DNA methylation by optimization of a differential-high resolution melt analysis protocol*. *Nucleic Acids Research*, 2009. 37(12) p. e86.

- [83] P. M. Warnecke, C. Stirzaker, J. R. Melki, D. S. Millar, C. L. Paul and S. J. Clark, *Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA*. *Nucleic Acids Research*, 1997. 25(21): p. 4422–4426.
- [84] T. K. Wojdacz, L. L. Hansen and A. Dobrovic, *A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies*. *BMC Research Notes*, 2008. 1: p. 54.
- [85] T. K. Wojdacz and L. L. Hansen, *Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay*. *BioTechniques*, 2006. 41(3): p. 274–278.
- [86] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. *National center for biotechnology information, NCBI-Nucleotide*. 09.03.2013.
- [87] T. Pongtheerat, S. Pakdeethai, W. Purisa, S. Chariyalertsak and S. Petmitr, *Promoter methylation and genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 gene (GSTP1) in thai breast- cancer patients*. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2011. 12(10): p. 2731–2734.
- [88] J. Yang, S. A. Mani, J. L. Donaher, S. Ramaswamy, R. A. Itzykson, C. Come, P. Savagner, I. Gitelman, A. Richardson and R. A. Weinberg, *Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis*. *Cell*, 2004. 117(7): p. 927–939.
- [89] C. Moison, C. Senamaud-Beaufort, L. Fourrière, C. Champion, A. Ceccaldi, S. Lacomme, A. Daunay, J. Tost, P. B. Arimondo and A.-L. Guieysse-Peugeot, *DNA methylation associated with polycomb repression in retinoic acid receptor β silencing*. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2013. 27(4): p. 1468-1478.
- [90] B. K. Werner, *Analyse der Auswirkung lebensmittelrelevanter Substanzen auf die DNA-Methylierung mittels hochauflösender Schmelzkurvenanalyse*. Diplomarbeit, Universität Wien, 2012.
- [91] E. Habla, *Bestimmung des Grades der Genpromotormethylierung mittels methylierungs-sensitiver hochauflösender Schmelzkurvenanalyse*. Diplomarbeit, Universität Wien, 2011.
- [92] <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoCalc.html>. *OligoCalc: Oligonucleotide properties calculator*. 09.03.2013.
- [93] <http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>. *Oligo analyzer 3.1*. 09.03.2012.
- [94] <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>. *RNAfold web server*. 09.03.2012.
- [95] <http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/html/local/POLAND/poland.html>. *Poland service request form*. 09.03.2012.
- [96] T. Lindl and G. Gstraunthaler, *Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank*, 6. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, 2008. p. 1-50, 84-120, 127-144.

- [97] R. Rapley, *Basic molecular biology techniques*, in *Molecular biology and biotechnology*, 5.Aufl., J. M. Walker and R. Rapley (Editors), Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2009. p. 3–5.
- [98] Qiagen, *QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*, 3. Aufl., 2010.
- [99] Qiagen, *EpiTect® Bisulfite Handbook*. 2009.
- [100] W. Gottwald, *Statistik für Anwender*, 1.Aufl., Wiley-VCH: Weinheim, 1999. p. 70-71, 209.