



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

Entwicklung von Pyrosequenziermethoden zur Untersuchung des Methylierungsstatus des Promotors und des zweiten Exons von *p16*

verfasst von / submitted by

Andreas Jenik

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 190 423 445

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Lehramtsstudium UF Chemie UF Biologie und Umweltkunde

Betreut von / Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl

Danksagungen

*Allem voran möchte ich mich bei **Fr. Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markl** bedanken für die Chance, ein Teil ihrer Arbeitsgruppe zu sein und mich mit dem spannenden Umfeld der molekularbiologischen Techniken als auch analytisch-chemischen Methoden beschäftigt haben zu dürfen.*

Ein Teil ihrer Arbeitsgruppe zu sein, bedeutet nicht nur, dass man sich jederzeit an sie wenden kann und sie einem mit einem gigantischen Fundus an Erfahrung und Wissen mit Rat und Tat zur Seite steht, sondern auch ein regelmäßiger Austausch innerhalb der gesamten Arbeitsgruppe, welcher Bande knüpft die-so wie ich hoffe-auch nach der Zeit meines akademischen Werdegangs noch lange Zeit andauern werden.

*Des Weiteren gilt mein Dank an Fr. Univ.-Prof. Mag. Dr. Margit Cichna-Markls Arbeitsgruppe, insbesondere an **Fr. Katja Zappe Msc.**, die mich im Rahmen meiner Forschungen betreut und geleitet hat, und **Hr. Georg Pretsch Msc.**, welcher mich geduldig in die Techniken des Pyrosequenzierens eingeschult hat.*

*Ich bedanke mich bei **Fr. Assoc. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. MAS Petra Heffeter** sowie **Hr. Ao. Prof. Dr. Johannes Breuss** für die Proben, welche ich für meine Diplomarbeit zur Verfügung gestellt bekommen habe.*

*Außerdem bedanke ich mich bei meinen Eltern, welche mich während meines gesamten Studiums tatkräftig unterstützt haben, als auch bei meinem Bruder **Hr. Dr. Michael Jenik**, der mir die Faszination der Chemie schon früh nähergebracht hat und an meinem Entschluss des Studiums der Chemie nicht unbeteiligt war.*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
1.1	Krebserkrankungen	3
1.1.1	Charakteristika von Krebserkrankungen	3
1.1.2	Die Ursachen von Krebserkrankungen	4
1.1.3	Krebserkrankungen in Österreich	5
1.1.4	DNA/RNA	6
1.1.5	DNA-Methylierung und CpGs	6
1.1.6	DNA-Methylierung und Krebs.....	8
1.1.7	p16.....	9
1.1.8	DNA-Methylierung von <i>CDKN2A</i> und Krebserkrankungen	10
1.2	Zelluläre Seneszenz	11
1.2.1	H2O2 und zelluläre Seneszenz	11
1.2.2	Der Tumornekrosefaktor (TNF- α)	12
2	Ziele der Arbeit	15
3	Theoretische Grundlagen	17
3.1	Analyse von DNA-Methylierungsmustern.....	17
3.1.1	Bisulfitkonvertierung	17
3.1.2	PCR.....	18
3.1.3	Pyrosequenzierung (PSQ)	22
3.1.4	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
3.2	Analyse der Genexpression.....	30
3.2.1	cDNA-Herstellung mittels reverser Transkriptase	30
3.2.2	Real-Time PCR.....	30
3.2.3	Der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert.....	32
4	Ergebnisse und Diskussion.....	33
4.1	Methodenentwicklung.....	33
4.1.1	Primer für die Promotorregion	33
4.1.2	PCR-Amplifikation	35
4.1.3	Gelelektrophorese	35
4.1.4	Pyrosequenzierung	37
4.1.5	Primer für Exon 2	40
4.1.6	PCR-Amplifikation	41
4.1.7	Gelelektrophorese	41
4.2	Methylierungsstatus von <i>CDKN2A</i> in kommerziellen Brustkrebszelllinien	44
4.2.1	Proben	44
4.2.2	Ergebnisse.....	45
4.2.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	57
4.2.4	Diskussion	62

4.3	HUVEC	64
4.3.1	Ergebnisse	64
4.3.2	Diskussion	69
5	Experimentelles	71
5.1	Proben	71
5.1.1	Kommerzielle Brustkrebszelllinien	71
5.1.2	HUVECs	71
5.1.3	DNA-/RNA-Extraktion	71
5.2	DNA-Methylierung	72
5.2.1	Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop	72
5.2.2	Bisulfitkonvertierung	72
5.2.3	Aufreinigung der DNA	73
5.2.4	Amplifikation mittels PCR	74
5.2.5	Strangtrennung	76
5.3	Genexpression	77
5.3.1	Reverse Transkriptase Reaktion	77
5.3.2	Zur Analyse der Genexpression verwendete Primer	77
5.3.3	Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR	79
5.4	Methodenentwicklung	81
5.4.1	Primerdesign	81
5.4.2	Optimierung der Methoden	82
5.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	84
5.5	Auswertung	85
5.6	Verwendete Materialien und Software	86
5.6.1	Verwendete Software	86
5.6.2	Verwendete Apparaturen	86
5.6.3	Verwendete Kits	86
6	Anhang	I
6.1	Zusammenfassung	I
6.2	Abkürzungsverzeichnis	II
6.3	Rohdaten	IV
6.3.1	Pyrosequenzierung	IV
6.3.2	Erhaltene Daten der Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR	VIII
6.3.3	Statistische Auswertungen	IX
6.4	Abbildungsverzeichnis	XIII
6.5	Tabellenverzeichnis	XV
7	Quellenverzeichnis	XVI

1 Einleitung

Die Genetik als auch die Epigenetik sind schnell wachsende Wissenschaften, welche sich mit dem Aufbau und der Veränderung bzw. mit der Modifikation des Erbguts von Organismen beschäftigen. Der heutige Wissensstand über den Stammbaum von Arten, evolutionäre Prozesse, Vererbung von Merkmalen, aber auch die molekularbiologischen Ursachen von Erkrankungen wäre ohne genetische Analysen nicht denkbar. Die Epigenetik beschäftigt sich mit DNA-Modifikationen und deren Auswirkung auf die Aktivität von Genen. Forschung im Bereich der Epigenetik ist für Fragestellungen wie die Ursachen der Entstehung von Krebserkrankungen unerlässlich. Änderungen in der DNA-Methylierung haben häufig Einfluss auf die Aktivität von Genen. p16, ein Protein, welches von dem Gen *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) codiert wird, hat Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus und wird in der Literatur häufig im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebserkrankungen erwähnt. Um die epigenetischen Modifikationen von *CDKN2A* und deren Auswirkung auf die Genexpression analysieren zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit Methoden zur Pyrosequenzierung von Bereichen des Gens *CDKN2A* entwickelt, optimiert und an verschiedenen Proben getestet. Auch die relative Genexpression der Proben wurde mittels real-time PCR (RT-PCR) bestimmt.

1.1 Krebserkrankungen

1.1.1 Charakteristika von Krebserkrankungen

Unter dem Begriff „Krebs“ wird eine Gruppe verschiedener Erkrankungen zusammengefasst, für welche unreguliertes Zellwachstum als auch die Invasion und Ausbreitung solcher veränderten Zellen auf andere Körperregionen charakteristisch sind. Bis zum Jahr 2016 wurden über 100 verschiedene Krebserkrankungen klassifiziert, deren Eigenschaften meist von jenem Gewebe, in welchem die ersten anormalen Zellen gebildet wurden, abhängen. So werden Krebsarten je nach Bildungsgewebe in Karzinome (Epithelgewebe), Sarkome (mesodermales Gewebe) und Adenokarzinome (Drüsengewebe) eingeteilt. [1] Die Hauptursachen für die Entstehung von Krebs sind je nach Gewebe unterschiedlich, aber auch die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, welche für die Kanzerogenese verantwortlich sind, differieren je nach Zelltyp und Streumuster der vom Ursprungsgewebe ausgehenden Krebszellen. In **Abbildung 1** sind die wichtigsten Charakteristika einer Krebserkrankung dargestellt. So gehören unter anderem die Fähigkeit, autonome Zellwachstumssignale zu senden, die Umgehung von inhibitorisch wirkenden

Zellwachstums- sowie Apoptosesignalen, gesteigertes Replikationspotential, Angiogenese, als auch Invasion und Metastasierung zu den eindeutigen Kennzeichen von Krebszellen. Während benigne Tumore nur an ihrem Ort der Bildung verbleiben, bilden maligne Tumore Metastasen (Tochtergeschwulste) in anderen Geweben. Man spricht hier auch von einem „Streuen“ des Tumors. Benigne Tumore gehören nicht zu den Krebserkrankungen. [2]

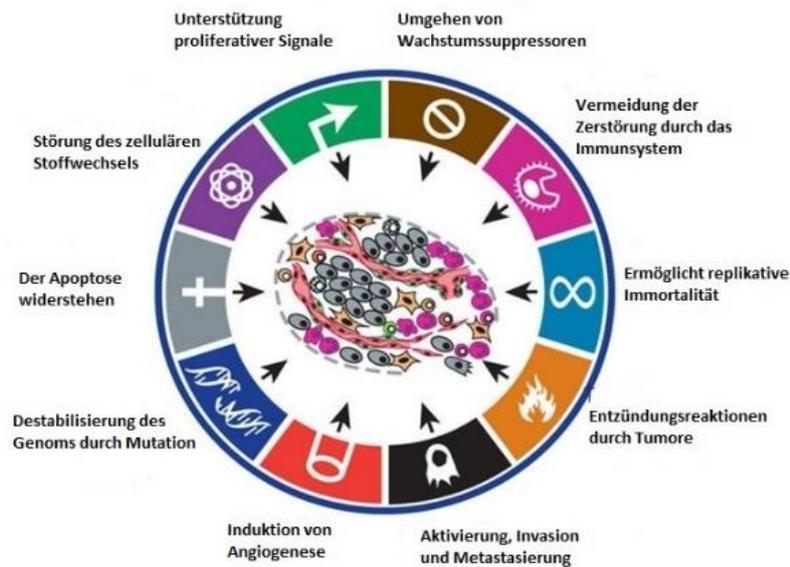


Abbildung 1 Gezeigt sind die verschiedenen Kennzeichen einer Krebserkrankung (verändert nach [2])

1.1.2 Die Ursachen von Krebserkrankungen

Krebs ist das Resultat von Änderungen der DNA. Diese Änderungen können von Punktmutationen (Änderung einer einzelnen DNA-Base durch Insertion, Deletion oder Substitution) bis hin zu großen Chromosomenaberrationen reichen. In den seltensten Fällen führt eine einzelne Mutation schon zur Entstehung einer Krebserkrankung. Meist sind mehrere Mutationen als Auslöser für die Krebsentstehung notwendig. Durch die Akkumulation von Mutationen einer Zelle im Laufe der Zeit ist auch die steigende Krebsrate in einer ständig älter werdenden Population nicht überraschend. Beinahe alle Mutationen, welche in Tumorzellen gefunden wurden, waren Mutationen somatischer Zellen und können somit nicht an die nächste Generation vererbt werden. Es sind zwar Mutationen in der Keimbahn bekannt, welche ein höheres Risiko mit sich bringen, im Laufe des Lebens an Krebs zu erkranken, diese lösen jedoch nicht direkt eine Krebserkrankung aus.

Vererbte Modifikationen des Genoms als auch der Chromatinstruktur spielen jedoch sehr wohl eine Rolle bei der Karzinogenese. Es gibt drei Hauptfaktoren, welche die Zellzahl eines Organismus

bestimmen. Diese sind Zellwachstum, Apoptose (programmierter Zelltod) und Zelldifferenzierung. Vor allem das Zellwachstum ist Krebserkrankungen betreffend von besonderem Interesse. Das Zellwachstum kann von verschiedenen molekularen Faktoren positiv oder negativ beeinflusst werden. Bei mutierten Zellen sind es zwei verschiedene Typen von Genen, welche auf das Zellwachstum und somit auch auf die Karzinogenese Einfluss haben.

Onkogene sind mutierte Gene, deren Proteinprodukte entweder in größerer Menge oder mit höherer Aktivität entstehen und dadurch die Bildung eines Tumors initiieren. Tumorsuppressorgene codieren für Proteine, welche eine Rolle bei der Inhibierung von Zellwachstum und der Tumorentstehung spielen. Während sich Onkogene dominant durchsetzen und somit auch schon bei nur einem der beiden Allele eines diploiden Organismus eine Veränderung in der Zelle auslösen, arbeiten Tumorsuppressorgene rezessiv, müssen also in beiden Allelen eine Mutation tragen, welche ihre Expression inhibiert, um Krebsentstehung zuzulassen. Neuere Studien weisen jedoch daraufhin, dass bei Tumorsuppressorgenen möglicherweise auch schon bei der Mutation eines der beiden Allele Haploinsuffizienz auftritt, dass also 50% des regulären Genproduktes nicht ausreichen, um Karzinogenese zu verhindern. Um die Expression von Tumorsuppressorgenen zu beeinflussen und Karzinogenese zu fördern, reichen neben Mutationen oft auch schon Modifikationen der DNA aus. [2]

1.1.3 Krebserkrankungen in Österreich

Inzidenz als auch Mortalität von verschiedenen Krebserkrankungen in Österreich sind in

Abbildung 2 zu sehen. Krebserkrankungen sind in Österreich nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Brustkrebserkrankungen machen 16% der bösartigen Neubildungen bei Frauen aus und sind somit die häufigste Krebserkrankung beim weiblichen Geschlecht. Durch die immer höher werdende Lebenserwartung der Bevölkerung wird auch in Zukunft die Inzidenz von Krebserkrankungen steigen, selbst wenn die Mortalitätsrate aufgrund besserer Behandlungsmöglichkeiten bzw. ausgereifterer Früherkennungsmethoden sinkt. [3]

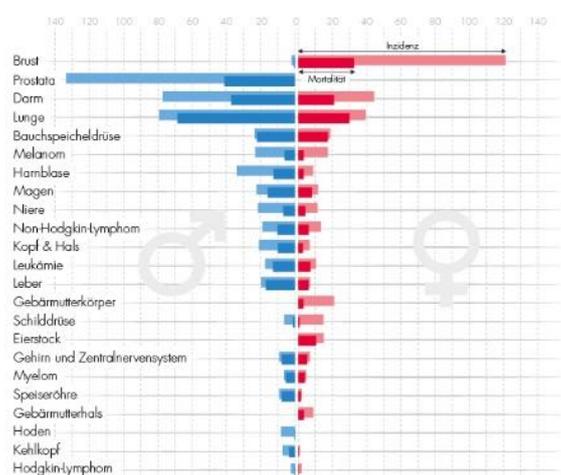


Abbildung 2 Krebsinzidenz und -mortalität in Österreich. Zu sehen sind die verschiedenen, nach befallenen Gewebe geordneten Erkrankungen, welche im Zeitraum von 2010-2014 in Österreich diagnostiziert wurden. Die Darstellung ist nach Geschlecht aufgetrennt, männlich (blau), weiblich (rot). Krebserkrankungen des Brustgewebes sind bei Frauen die häufigste Krebserkrankung. [3]

1.1.4 DNA/RNA

Die Desoxyribonukleinsäure (Abkürzung „DNA“ oder veraltet „DNS“) ist ein Polymer aus vier verschiedenen Desoxyribonukleotiden, welche über ein Rückgrat aus β -D-2-Desoxyribose, einer Pentose und Phosphatgruppen miteinander verknüpft sind. [4] Der Aufbau der DNA ist in **Abbildung 3** dargestellt. Die stickstoffhaltigen Basen sind entweder Derivate des Purins (Adenin, Guanin) oder Derivate des Pyrimidins (Cytosin, Thymin). Die Abfolge dieser Nukleotide repräsentiert den genetischen Code. Um die mittels genetischen Codes festgelegten Proteine aufzubauen wird die DNA über Transkription in Ribonukleinsäure (RNA) transkribiert und anschließend exprimiert. [4,5]

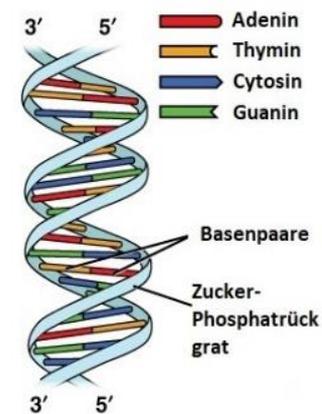


Abbildung 3 Aufbau der DNA. Zu sehen ist die doppelhelikale Struktur der DNA, 5'-und 3'-Enden der jeweiligen Einzelstränge sind eingezeichnet. Das Rückgrat der DNA besteht alternierend aus einer 5'-Desoxyribose und einem Phosphatrest. Die komplementären Basenpaare, welche sich jeweils gegenüberstehen, sind eingezeichnet. Adenin (rot), Thymin (orange), Cytosin (blau) und Guanin (grün) (verändert nach [5])

1.1.5 DNA-Methylierung und CpGs

Im Gegensatz zur Untersuchung von Veränderungen der DNA-Sequenz, wie es zum Beispiel bei Mutationen oder Rekombination der Fall ist, werden in der Epigenetik Modifikationen des Genoms oder Chromatinkomponenten, welche die Genexpression beeinflussen, betrachtet. [6] Mittlerweile sind diverse epigenetische Phänomene bekannt, so zum Beispiel Modifikationen an den endständigen Armen der Histone wie Acetylierungen, Phosphorylierungen oder Methylierungen, aber auch die DNA-Methylierung. [7,8] Unter DNA-Methylierung wird das kovalente Anknüpfen einer Methylgruppe an das C5 eines Cytosins verstanden. Dieser Vorgang ist in **Abbildung 4** dargestellt. Die Methylierung des Cytosins zum 5-Methylcytosin wird von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert und erfolgt nur, wenn die darauffolgende Nukleinbase in 3'-Richtung des DNA-Stranges ein Guanin ist. Darum wird dieses (Desoxy)cytidin- Phosphorsäure- (Desoxy)guanosin-Paar auch als CpG-Dinukleotid, oder einfach als CpG, bezeichnet. Regionen der DNA, in denen viele CpGs vorkommen, werden CpG-Inseln genannt. Diese CpG-Inseln sind im Laufe der Evolution entstanden. Es wird davon ausgegangen, dass CpGs in den Vorfahren der Vertebraten noch gleichmäßig verteilt waren. Durch DNA-Reparaturenzyme wurden jedoch viele methylierte Cytosin-Reste eliminiert. Durch zufällige Desaminierung eines unmethylierten Cytosins entsteht ein Uracil, welches jedoch normalerweise in der DNA nicht vorkommt. Ein Uracil wird von der Uracil-DNA-Glycosylase, einem

Reparaturenzym der DNA, ausgeschnitten und durch ein Cytosin ersetzt. Wird jedoch ein 5-Methylcytosin zufällig desaminiert, kann dieser Reparaturprozess nicht stattfinden, da hier ein Thymin entsteht, welches eine reguläre Base der DNA ist und somit nicht als falsch erkannt wird. Somit ergab es sich im Laufe der Zeit, dass immer mehr 5-Methylcytosin gegen Thymin ausgetauscht wurde. Dies ist Teil eines evolutionären Prozesses, welcher in **Abbildung 5** dargestellt ist. Konserviert blieben CpG-Dinukleotide in regulatorischen Sequenzen der DNA, welche bereits in der Keimbahn aktiv sind, da diese unmethyliert verbleiben. Dadurch ergibt sich die ungleichmäßige Verteilung der CpG-Dinukleotide im Genom und CpG-Inseln treten vor allem in Promotorregionen auf. Auch in somatischem Gewebe können CpGs unmethyliert bleiben, wenn sie sich in regulatorisch aktiven Regionen befinden, da sie von DNA bindenden Proteinen vor Methylierung geschützt werden. [8]

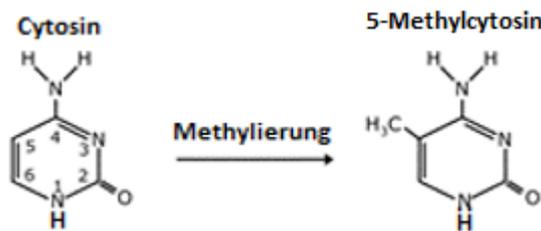


Abbildung 4 Gezeigt ist die Methylierung von Cytosin zum 5-Methylcytosin durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) (verändert nach [8])

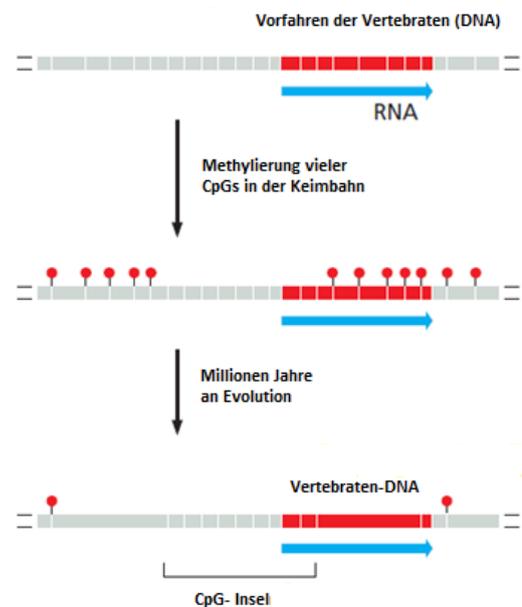


Abbildung 5 Vermuteter evolutionärer Prozess, der in Vertebraten zur Entstehung von CpG-Inseln geführt hat. Die DNA ist rot eingezeichnet. (rechts 5', links 3') Die transkribierte RNA ist als blauer Pfeil eingezeichnet. Methylierungen der CpGs sind mit roten Punkten markiert. (verändert nach [8])

1.1.6 DNA-Methylierung und Krebs

Krebsspezifische Veränderungen von DNA-Methylierungsmustern wurden schon häufig festgestellt. Besonders häufig wurde eine Hypermethylierung von normalerweise unmethylierten CpG-Inseln in Promotoren von Genen beobachtet. Die Unterdrückung der Expression eines Gens (gene silencing) durch Methylierung, gerade bei Tumorsuppressorgenen, ist ein wichtiger Mechanismus der Karzinogenese und wurde schon in Krebszelllinien als auch menschlichen Tumoren festgestellt. So gibt es einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Stilllegung des Östrogenrezeptors (ER) und der Methylierung der zugehörigen Promotorregion in Brustkrebszellen. In einer Studie [9] wurde bei 30% der untersuchten Brustkrebspatientinnen ein Fehlen des Östrogenrezeptor- α festgestellt, bei 41% davon konnte die fehlende Genexpression auf DNA-Hypermethylierung zurückgeführt werden. Auch *BRCA1*, ein Tumorsuppressorgen ist bei erblich bedingtem Brustkrebs häufig durch Mutation inaktiviert, bei nicht erblich bedingtem Brustkrebs aber häufig auch durch Hypermethylierung inaktiv. [10] Weitere Kausalitäten zwischen DNA-Methylierung und Krebserkrankungen wurden beim Retinoblastom-Gen (*Rb*) [11], Adenomatösen Polyposis Coli Gen (*APC*) [12], der pro-apoptotic death-associated protein kinase (*DAPK*) [13] aber auch beim Inhibitor des Zellzyklus *p16/INK4a* [14], gefunden. Beobachtungen weisen außerdem darauf hin, dass eine anormale Methylierung schon in prämaligen Zellen auftritt und diese zu Änderungen ihrer Signalwege anregt und das Auftreten weiterer Mutationen erleichtert. Methylierte DNA-Bereiche interagieren mit weiteren epigenetisch wirksamen regulatorischen Proteinen, wie zum Beispiel den in Abschnitt 1.1.5 erwähnten DNMTs, und haben einen Einfluss auf die Chromatinstruktur. DNMTs könnten somit abgesehen von der Vermittlung der Methylierung auch noch als Sammelplattform für Chromatin-modifizierende Faktoren dienen. Durch die Erkenntnis, dass Änderungen der DNA-Methylierung eine Rolle in der Krebsentstehung spielen können, stehen auch nicht genotoxische Karzinogene, also Karzinogene, welche keine Mutationen der DNA verursachen, unter Verdacht, Einfluss auf das Methylierungsmuster einer Sequenz zu haben. Dies wurde bei der Verursachung von Leberkrebs bei Mäusen durch Behandlung mit Phenobarbital bereits nachgewiesen. [15] Jedoch wurden auch schon Krebszellen gefunden, welche eine 20-60% geringere Methylierung aufwiesen als gesunde Zellen. Diese hypomethylierten Bereiche betreffen oft codierende Regionen von Genen, aber auch Transposons und repetitive Sequenzen. So können hypermethylierte Promotoren und hypomethylierte codierende Regionen in derselben Zelle zeitgleich vorkommen. [2]

1.1.7 p16

p16, oft auch als p16INK4a bezeichnet, ist ein Tumorsuppressorprotein der INK4-Familie, welches den Eintritt einer Zelle von der G_1 -Phase in die S-Phase im Rahmen des Zellzyklus reguliert. Das Gen, das p16 codiert, heißt *CDKN2A* und liegt auf Chromosom 9. p16 wirkt als Cyclin-abhängiger Kinase Inhibitor, indem es an den Komplex von Cyclin D und an eine der Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK4 oder CDK6) bindet. Durch die Bindung an den Komplex verhindert p16, dass das Retinoblastomprotein (Rb) von den Kinasen phosphoryliert wird. Rb bleibt im dephosphorylierten Zustand aktiv und bindet an den Transkriptionsfaktor E2F. [14] Der Transkriptionsfaktor E2F ist für die Bildung von für die DNA-Synthese essenziellen Proteinen verantwortlich. So reguliert E2F unter anderem die DNA-Polymerase α [16], die M-Phasen-Induktor-Phosphatase 1 (*CDC25A*) [17] oder die Dihydrofolatreduktase [18]. Ist der Transkriptionsfaktor E2F an Rb gebunden, so werden diese Proteine nicht hergestellt. Die Zelle kann nicht in die S-Phase eintreten und verharrt in der G_1 -Phase des Zellzyklus. Dieser Zustand des Verharrens wird als zelluläre Seneszenz bezeichnet. [19] Der beschriebene Vorgang ist in **Abbildung 6** gezeigt.

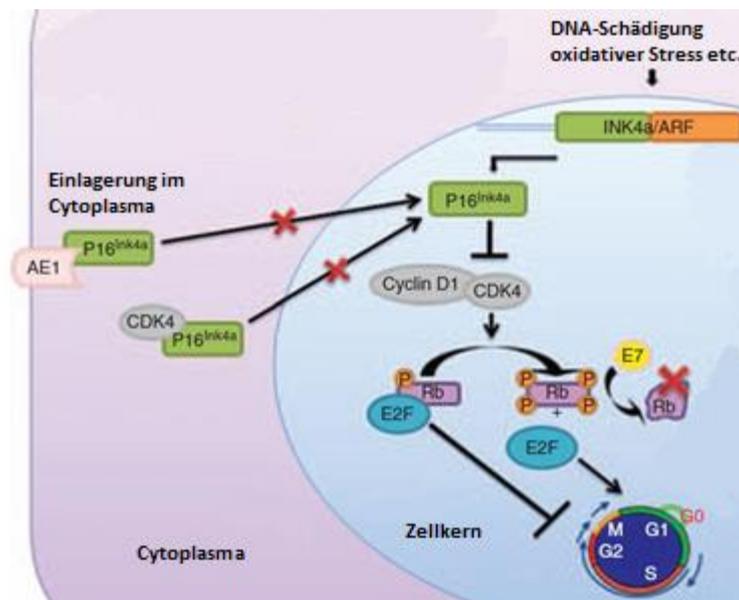


Abbildung 6 Arbeitsweise des Tumorsuppressorproteins p16. p16 bindet an Cyclin D1 und CDK4. Eine Phosphorylierung von Rb (Retinoblastomprotein) wird dadurch verhindert. Das dephosphorylierte Rb bindet den Transkriptionsfaktor E2F, der dadurch keine für die DNA-Synthese benötigten Proteine bildet. Die Zelle kann aus der G_1 -Phase nicht zur S-Phase des Zellzyklus übergehen. Es kommt zu zellulärer Seneszenz. (verändert nach [14])

1.1.8 DNA-Methylierung von *CDKN2A* und Krebserkrankungen

Tumorsuppressorgene können ihre Funktion nicht nur durch Verlust eines Allels oder eine Mutation verlieren, sondern auch durch epigenetische Modifikationen wie DNA-Methylierung. [20] Dies trifft auch auf *CDKN2A* zu. In einer Vielzahl an Studien wurde die durch DNA-Methylierung induzierte Inaktivierung von *CDKN2A* in Verbindung mit verschiedenen Krebserkrankungen [21], unter anderem auch Brustkrebs [22], festgestellt. So wurden in einer Studie bei mehr als 30% der untersuchten Mammakarzinome durch DNA-Methylierung inaktivierte Kopien von *CDKN2A* entdeckt. [23] In einer weiteren Studie wurde die Promotorregion von *CDKN2A* mittels einer Kombination aus Bisulfitkonvertierung und Genomsequenzierung bei Brustgewebeproben untersucht. Auch hier zeigte sich, dass fünf von neun Proben von Mammakarzinomen eine erhöhte DNA-Methylierung in *CDKN2A* aufwiesen. Die restlichen vier als auch vier gesunde Gewebeproben waren unmethyliert. [22] Eine Hypermethylierung der DNA in der Promotorregion von *CDKN2A* wurde in Tumorgewebe bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen, beispielsweise bei Lymphomen [24,25], Hautkrebs [26], Plattenepithelkarzinomen in der Mundregion [27], Darmkrebs [28] und vielen weiteren [21]. Dies könnte einen Angriffspunkt für zukünftige Diagnosemethoden als auch Therapien von Krebserkrankungen bieten. [21,22] Auch in Exon 2 von *CDKN2A* wurden Veränderungen der Methylierung in Zusammenhang mit Krebserkrankungen entdeckt. So wurde eine erhöhte DNA-Methylierung im Gewebe von Speiseröhrentumoren sowohl in der Promotorregion als auch in Exon 2 von *CDKN2A* nachgewiesen. [29] Während laut dieser Studie die Methylierung der Promotorregion die Menge an Expressionsprodukt von *CDKN2A* beeinflusst, trat eine erhöhte Methylierung von Exon 2 besonders in fortgeschrittenen Phasen der Kanzerogenese auf. So könnte die Methylierung von Exon 2 unabhängig von der Expression von *CDKN2A* für die weitere Entwicklung des Tumors relevant sein. Eine intern durchgeführte Studie untersuchte das Auftreten von Hyper- bzw. Hypomethylierung in der Promotorregion als auch in Exon 2 von *CDKN2A* bei Brustkrebspatientinnen. [30] Hierfür wurde Tumorgewebe, tumornahes Gewebe als auch tumorfernes Gewebe von Brustkrebspatientinnen auf Veränderungen des durchschnittlichen Methylierungsstatus der in den genannten Regionen von *CDKN2A* vorkommenden CpGs mittels MS-HRM (methylation sensitive high resolution melt analysis) untersucht. Insgesamt wurde im Rahmen der Studie das Brustgewebe von 22 Patientinnen analysiert, wovon 18 ein Mammakarzinom aufwiesen. Das Brustgewebe vier gesunder Patientinnen diente als Kontrolle. Während im Tumorgewebe die CpGs in der Promotorregion lediglich bei 5 von 18 Patientinnen (28%) methyliert waren, war dies bei den CpGs in Exon 2 in allen Proben der Fall. Des Weiteren wiesen die CpGs in Exon 2 einen signifikant höheren durchschnittlichen Methylierungsstatus im

Tumorgewebe auf als in den tumornahen und tumorfernen Geweben derselben Patientin und dem gesunden Brustgewebe der Kontrollgruppe. Auch war deren durchschnittlicher Methylierungsstatus in tumornahen und tumorfernen Geweben höher als jener im gesunden Brustgewebe der Kontrollgruppe. Lediglich zwischen tumornahem und tumorfernem Gewebe konnte kein signifikanter Unterschied im Methylierungsstatus festgestellt werden. Außerdem zeigte der Methylierungsstatus in Exon 2 eine schwache, aber signifikante negative Korrelation mit der Proliferationsaktivität des jeweiligen Tumors. Dass die Hypermethylierung von Exon 2 in Zusammenhang mit dem jeweiligen molekularen Subtyp (Rezeptorstatus) des Tumors steht, wird aufgrund der erhaltenen Ergebnisse vermutet, konnte aufgrund der Zusammensetzung der zur Verfügung stehenden Proben jedoch nicht eindeutig nachgewiesen werden.

1.2 Zelluläre Seneszenz

Als zelluläre Seneszenz wird ein irreversibler Wachstumsstopp von Zellen bezeichnet. Es findet keine weitere Zellteilung mehr statt. Auslöser von Seneszenz sind Faktoren wie DNA-Schädigungen, Verkürzungen der Telomere, aber auch die Derepression des Genlocus von *INK4a*. Die genannten Auslöser werden auch als Hayflick-Faktoren („Hayflick Factors“) bezeichnet. Die Hauptrolle von zellulärer Seneszenz in Organismen ist die Eindämmung potenzieller Schädigungen von Geweben und somit die Vorbeugung vor Krebserkrankungen. Zellen, welche sich in Seneszenz befinden, können durch reguläre Erneuerungsprozesse repariert werden. [31]

1.2.1 H_2O_2 und zelluläre Seneszenz

Wasserstoffperoxid ist eine meist farblose Flüssigkeit, welche zu gleichen Teilen aus Wasserstoff und Sauerstoff zusammengesetzt ist. Die Flüssigkeit weist eine etwas höhere Viskosität als Wasser auf und fungiert als starkes Oxidationsmittel sowie als schwache Säure. [32] Wasserstoffperoxid entsteht jedoch auch als Stoffwechselprodukt bei zellulären Prozessen. In hoher Konzentration kann Wasserstoffperoxid einerseits Zellen durch Oxidation schädigen, es dient jedoch in manchen Fällen auch als Signalüberträger innerhalb der Zelle und ist somit in der Lage, Zellfunktionen zu steuern. [33]

Die Behandlung menschlicher Fibroblasten mit H_2O_2 führte zu einem Wachstumsstopp und einem Seneszenz-ähnlichen Zustand der Zellen. Hierfür verantwortlich ist der durch H_2O_2 ausgeübte oxidative Stress auf die Zellen. Oxidativer Stress führt zur DNA-Spaltung. Durch die Schädigung der DNA werden Tumorsuppressoren aktiviert, welche den Zellzyklus kontrollieren und somit Seneszenz auslösen können. Bei den mit H_2O_2 behandelten Zellen wurde außerdem eine

Verminderung der NAD⁺-Konzentration (Nikotinamidadenindinukleotid) und eine Steigerung der Expression der Tumorsuppressorproteine p21 und p53 festgestellt. Auch eine Steigerung der Expression von SIRT1, einer NAD⁺-abhängigen Deacetylase, konnte festgestellt werden. SIRT1 reguliert die Aktivität von p53 über dessen Acetylierungsgrad und könnte somit ausschlaggebend für den Eintritt zellulärer Seneszenz sein. [34]

Werden Zellen H₂O₂ ausgesetzt, so bewirkt dies auch eine höhere Expression von p16 und induziert so zelluläre Seneszenz. Die zugrundeliegenden Mechanismen hierfür sind nach wie vor ungeklärt. [35] Da die Expression von p21 und p53 direkt nach erfolgter DNA-Schädigung ansteigt, während die Expression von p16 erst nach einigen Tagen zunimmt, und dies erst nach wieder abnehmender p21- und p53-Expression, könnten p21 und p53 für die Initiierung von Seneszenz verantwortlich sein und p16 für die Aufrechterhaltung dieses Zustands. Andererseits kann p16 über die Aktivierung von Rb, wie in **Abbildung 6** gezeigt, auch direkt Seneszenz induzieren und dies parallel zum Mechanismus über p53. [36]

1.2.2 Der Tumornekrosefaktor (TNF- α)

Der Tumornekrosefaktor (TNF- α) ist einer der wichtigsten Zytokine des Immunsystems. Das Gen, welches TNF- α codiert, ist auf Chromosom 6 in der Region vom Haupthistokompatibilitätskomplex 3 (MHC-III) lokalisiert. Die Produktion von TNF- α wird durch diverse Faktoren stimuliert. Darunter zählen UV-Strahlung, osmotischer Stress, Chemikalien wie zum Beispiel Phorbolster, Bakterien und Viren. Dabei hängt die Produktion von TNF- α mit vielen verschiedenen Rezeptoren zusammen, wie zum Beispiel Toll-like-Rezeptoren (TLR), die dem angeborenen Immunsystem zugeordnet werden, oder T-Zell-Rezeptoren, die auf der Oberfläche von T-Zellen lokalisiert sind und für die Erkennung von Antigenen zuständig sind. Die zytotoxische Wirkung von TNF- α auf Tumorzellen und die damit einhergehende Nekrose wurde bereits mehrmals im Tierversuch festgestellt. [37] Meist ist TNF- α als Typ-2-Transmembranprotein aus drei identischen Untereinheiten (Homotrimer) aufgebaut. Von diesem Transmembranprotein wird, ausgeübt durch eine Metalloprotease (TACE-TNF- α converting enzyme) ein löslicher Teil des Moleküls (sTNF-soluble TNF) proteolytisch abgespalten. sTNF, aber auch die membrangebundene Form von TNF, binden an spezifische Rezeptoren, die in der Zellmembran lokalisiert sind. Von diesen Rezeptoren sind zwei Typen bekannt, TNF-R1 und TNF-R2. Beide Rezeptoren sind Typ-1-Transmembranproteine und besitzen vier Cystein-reiche Wiederholungen (repeats) in ihrer extrazellulären Domäne, welche mit dem Liganden wechselwirken. Während TNF-R1 in den Zellmembranen der meisten Gewebearten zu finden ist, wird TNF-R2 großteils nur in Zellen des

Lymphsystems exprimiert. Außerdem kann TNF-R2 nur durch die membrangebundene Form von TNF (memTNF) vollständig aktiviert werden und nicht durch seine lösliche Form (sTNF). [38] Die TNF-R Superfamilie besteht im Allgemeinen aus drei verschiedenen Gruppen, den Death-Rezeptoren (death domain-(DD-) containing receptors), den Köder-Rezeptoren (Decoy Receptor) und den TNF-receptor-associated factor (TRAF) bindenden Rezeptoren. Death-Rezeptoren führen über Aktivierung einer Caspase-Kaskade zur Apoptose. Rezeptoren vom Typ TNF-R1 als auch TNF-R2, die keine „death domain“ besitzen, aktivieren NF-κB (nuclear factor-κB), einen Transkriptionsfaktor, welcher schon im Zusammenhang mit zellulärer Aktivierung, Zelldifferenzierung, Zytokinproduktion und Übermittlung von Überlebenssignalen (survival signaling) untersucht wurde. Je nach zellulärem Kontext kann die Bindung von TNF-α an TNF-Rezeptoren in einem durch NF-κB vermittelten Signal zum Überleben der Zelle führen, oder über die Aktivierung der Caspase-Kaskade in Apoptose resultieren. [39] Die zwei Möglichkeiten sind in **Abbildung 7** dargestellt. Als dritte Möglichkeit kann die durch TNF-α ausgelöste Aktivierung von NF-κB auch zur Seneszenz von Zellen führen. Bei einer Langzeitbehandlung mit TNF-α wurden sowohl eine Erhöhung der Aktivität von NF-κB als auch eine vermehrte Produktion von Sauerstoffradikalen in HUVECs (human umbilical vein endothelial cells, Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene) festgestellt. Es wurde bei mit TNF-α behandelten Zellen auch eine erhöhte Expression von p16, also des im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gens, im Vergleich zu unbehandelten HUVECs festgestellt. Die Proliferation der Zellen wurde durch Zellzählung durchgeführt, die Expression von p16 wurde mittels Immunfärbung ermittelt. Eine Analyse des Methylierungsstatus von *CDKN2A* mittels Pyrosequenzierung und die Ermittlung der relativen Genexpression mittels RT-PCR wurden jedoch noch nicht durchgeführt. [40]

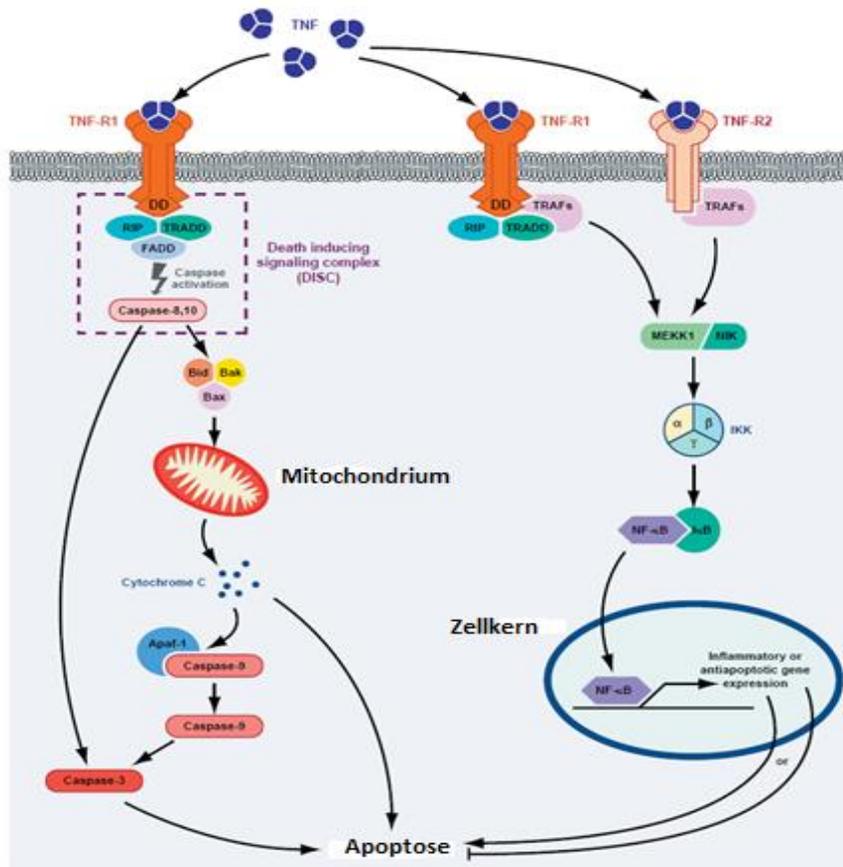


Abbildung 7 Möglichkeiten der Bindung von TNF- α an TNF-R1 bzw. TNF-R2. Je nach zellulärem Kontext wird entweder eine Caspase-Kaskade aktiviert, welche zur Apoptose führt, oder es erfolgt eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welche ein Überleben der Zelle sichert, aber auch Entzündungsreaktionen hervorrufen kann. (verändert nach [39])

2 Ziele der Arbeit

Krebsspezifische Veränderungen des DNA-Methylierungsstatus wurden schon häufig festgestellt. Besonders häufig wurde eine Hypermethylierung von normalerweise unmethylierten CpG-Inseln in Promotoren von Genen untersucht. Die Unterdrückung der Expression eines Gens (gene silencing) durch Methylierung, gerade bei Tumorsuppressorgenen, ist ein wichtiger Mechanismus der Karzinogenese und wurde schon in Krebszelllinien als auch menschlichen Tumoren festgestellt. p16, oft auch als p16INK4a bezeichnet, ist ein Tumorsuppressorprotein der INK4-Familie, welches den Eintritt einer Zelle von der G₁-Phase in die S-Phase im Rahmen des Zellzyklus reguliert. Das Gen, das p16 codiert, heißt *CDKN2A* und liegt auf Chromosom 9. Analysen des Methylierungsstatus der Promotorregion als auch in Exon 2 von *CDKN2A* wurden bereits durchgeführt. So existieren zahlreiche Studien, welche einen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus der Promotorregion von *CDKN2A* und der Inaktivierung von p16 in Krebszellen bestätigen. [21] Der durchschnittliche Methylierungsstatus der CpGs in Exon 2 von *CDKN2A* wurde bei einer intern durchgeführten Studie mittels MS-HRM bei Brustkrebspatientinnen untersucht. [30] Hierbei wurden Zellproben vom Mammakarzinom, aber auch von tumornahem und tumorfernem Brustgewebe entnommen und analysiert. Es stellte sich heraus, dass die CpGs in Exon 2 im Gegensatz zu jenen in der Promotorregion durchwegs in allen Tumorproben methyliert waren. Auch unterschied sich der durchschnittliche Methylierungsstatus der CpGs in Exon 2 der Tumorzellen von jenen in tumornahem und tumorfernem Gewebe signifikant. Der Methylierungsstatus der CpGs in Exon 2 in tumornahen und tumorfernen Proben war wiederum signifikant höher als jener im gesunden Brustgewebe der Kontrollgruppe. Somit brachte die intern durchgeführte Studie viele neue Erkenntnisse. Die bisher eingesetzten Methoden waren jedoch in ihrem entnehmbaren Informationsgehalt limitiert, da lediglich der durchschnittliche Methylierungsstatus der sich in den untersuchten Regionen befindenden CpGs bestimmt werden konnte. Die Form der im Rahmen der Studie erhaltenen Schmelzkurven mittels MS-HRM deutete bei einigen Proben auf eine heterogene Verteilung des Methylierungsstatus in Exon 2 hin.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Methylierungsstatus einzelner, sich in der Promotorregion und in Exon 2 von *CDKN2A* befindenden CpGs zu untersuchen. Dazu sollten auf der Pyrosequenzierung basierende Methoden entwickelt werden. Nach der Entwicklung und der Optimierung der Methoden sollten diese an verschiedenen Proben getestet werden. Hierfür wurden kommerziell erhältliche Brustkrebszelllinien und Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVECs) verwendet.

Bei den kommerziell erhältlichen Brustkrebszelllinien sollte abgeklärt werden, ob sich der Methylierungsstatus der Promotorregion von jener in Exon 2 unterscheidet. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob die Regionen homogen methyliert sind oder ob sich benachbarte CpGs stark in ihrem Methylierungsstatus unterscheiden. Weiters sollte geprüft werden, ob der Methylierungsstatus der zwei Regionen mit der relativen Genexpression von p16 assoziiert ist. Die Derepression des Genlocus von *INK4a*, in dem auch p16 exprimiert wird, ist ein möglicher Faktor für den Eintritt zellulärer Seneszenz. Auch bei einer Behandlung von HUVECs mit TNF- α oder H₂O₂ konnte zelluläre Seneszenz festgestellt werden. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die Behandlung der Zellen mit TNF- α bzw. H₂O₂ einen Einfluss auf den Methylierungsstatus der mit den entwickelten Methoden untersuchten CpGs der Promotorregion und Exon 2 von *CDKN2A* hat, ob die Dauer der Behandlung den Methylierungsstatus beeinflusst und ob die relative Genexpression von *CDKN2A* mit der Inkubationszeit von TNF- α bzw. H₂O₂ assoziiert ist.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Analyse von DNA-Methylierungsmustern

3.1.1 Bisulfitkonvertierung

Um die DNA-Methylierungsmuster von Cytosinen untersuchen zu können, muss zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen unterschieden werden können. Dies wird durch die Bisulfitkonvertierung bewerkstelligt. Die Reaktion von Natriumbisulfit mit Cytosin ist in **Abbildung 8** dargestellt. Die Desaminierung von Cytosin zum Uracil ist ein dreistufiger Prozess. Vor Beginn der Desaminierung muss die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgetrennt werden, hierfür ist zuerst ein Denaturierungsschritt bei hoher Temperatur notwendig. Erst wird das Bisulfition an die 5,6-Doppelbindung des Cytosins addiert. Im Anschluss erfolgt eine hydrolytische Desaminierung, welche zu einem Uracil-Bisulfitintermediat führt und letztendlich erfolgt eine Basen-katalysierte Elimination des Sulfonats, ein Uracil entsteht. [41] 5-Methylcytosin weist eine 100fach langsamere Reaktionsrate mit Natriumbisulfit auf, als es Cytosin besitzt. Verantwortlich hierfür ist die Wirkung als Elektronendonator der an der fünften Position des Pyrimidinringes hängenden Methylgruppe. Diese verhindert eine Addition des Bisulfits an die 5,6-Doppelbindung aufgrund sterischer Hinderung. [42] 5-Methylcytosin ist somit vor der Desaminierungsreaktion zum Uracil geschützt und verbleibt nach erfolgter PCR als Cytosin in der DNA-Sequenz. Zusammenfassend werden, wie in **Abbildung 9** ersichtlich, unmethylierte Cytosin-Nukleotide zu Uracil desaminiert und in der anschließend durchgeführten PCR als Thymin amplifiziert, während 5-Methylcytosin als Cytosin in der DNA-Sequenz erhalten bleibt. Somit wird die Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen durch die Übersetzung in divergente Primärsequenzen möglich. Der dadurch entstehende C/T-Polymorphismus kann mittels anschließender Pyrosequenzierung nachgewiesen werden und durch das Verhältnis des sich in einer Probe befindlichen Cytosins zum Thymin auch quantitative Rückschlüsse auf den ursprünglich vorhandenen Methylierungsstatus geben. [43,44]

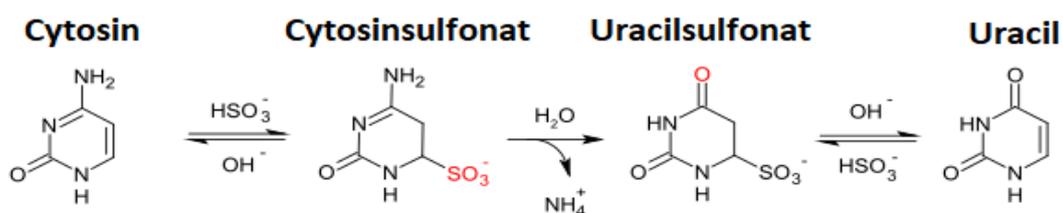


Abbildung 8 Gezeigt ist der Mechanismus der Bisulfitkonvertierung von Cytosin zu Uracil. Die Desaminierung von Cytosin zu Uracil ist ein dreistufiger Prozess. Erst wird das Bisulfition an die 5,6-Doppelbindung des Cytosins addiert. Im Anschluss erfolgt eine hydrolytische Desaminierung, welche zu einem Uracil-Bisulfitintermediat (Uracilsulfonat) führt. Schließlich erfolgt eine Basen-katalysierte Elimination des Uracilsulfonats zum Uracil. (verändert nach [41])

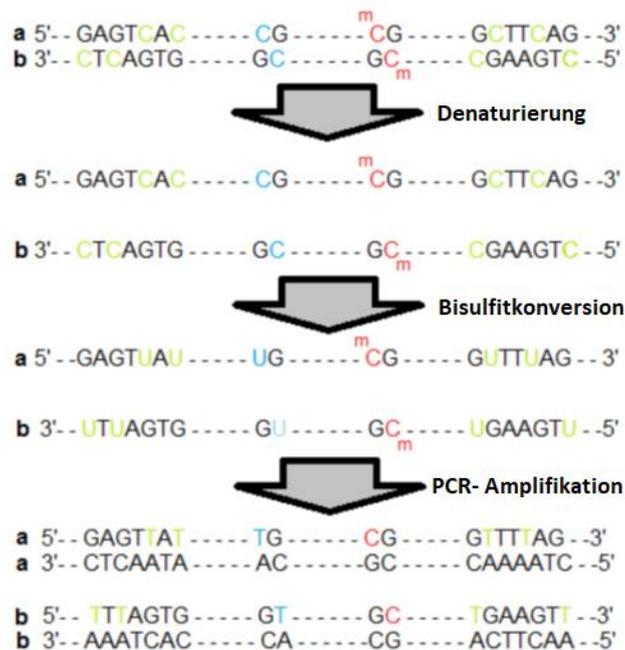


Abbildung 9 Schema der Bisulfitkonvertierung mit anschließender PCR. Zuerst findet Denaturierung (Auftrennung der doppelsträngigen DNA) statt, dann die Bisulfitkonvertierung und im Anschluss die PCR zur Amplifikation. 5-Methylcytosin (rot), Cytosin (blau) (verändert nach [41])

3.1.2 PCR

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Technik zur Amplifikation von DNA *in vitro*. Für eine erfolgreiche PCR werden die folgenden Reagenzien benötigt. Eine Ausgangs-DNA (Template-DNA), eine thermostabile DNA-Polymerase, zwei Oligodesoxynukleotide als Primer, ein Puffer mit $MgCl_2$ und Desoxynukleotide (dNTPs).

Template-DNA

Die Template-DNA ist die Proben-DNA, die amplifiziert werden soll. In der Theorie würde ein DNA-Strang ausreichen, um eine erfolgreiche Amplifikation der Probe durchzuführen. In der Praxis wird jedoch von mindestens zehn Molekülen ausgegangen, die für eine Amplifikation notwendig sind.

DNA-Polymerase

Für eine einwandfreie Amplifikation ist eine thermostabile DNA-Polymerase unbedingt erforderlich. Die erste thermostabile DNA-Polymerase wurde in einem thermophilen Bakterium (*Thermus aquaticus*) im Yellowstone-Nationalpark gefunden und isoliert. Deswegen wird diese hitzestabile Polymerase als Taq-Polymerase bezeichnet. Die Taq-Polymerase besitzt eine

molekulare Masse von 94kDa und besitzt zwei katalytische Aktivitäten. Sie fungiert sowohl als Polymerase als auch als Exonuklease, beides in 5' nach 3'-Richtung. Die Taq-Polymerase besitzt ein Temperaturoptimum bei 72-75°C. Sie kann auch bei niedrigeren Temperaturen eingesetzt werden, dies könnte jedoch zu unerwünschten PCR-Produkten führen. Um dies zu vermeiden wurden weitere Polymerasen entwickelt, wie zum Beispiel die Hot-Start DNA-Polymerasen. Hot-Start-DNA-Polymerasen sind inaktiv, bis sie durch Temperaturen von 94-95°C aktiviert werden. Die Inaktivierung bis zum Erreichen einer höheren Temperatur kann durch Bindung eines Antikörpers an die Polymerase gewährleistet werden, welcher bei höheren Temperaturen denaturiert und somit erst dann die Polymerase freigibt. Auch können dem Reaktionsgemisch Wachskügelchen beigemischt werden, welche erst, nachdem diese geschmolzen sind, die für die Reaktion wichtigen Mg^{2+} -Ionen freisetzen. [45]

Desoxynukleotide (dNTPs)

Als „Baumaterial“ für die Synthese des komplementären Strangs der Template-DNA werden Desoxynukleotide in ausreichender Menge im Reaktionsgemisch benötigt.

Puffer

$MgCl_2$ ist ein wichtiger Bestandteil des Puffers und einer der kritischsten Komponenten im Reaktionsgemisch für eine erfolgreiche PCR. Die Konzentration an Magnesiumionen kann sowohl die Spezifität als auch die Effizienz der Reaktion maßgeblich beeinflussen. Standard-Puffer enthalten meist eine Konzentration von 1,5mM an $MgCl_2$. Mg^{2+} -Ionen und dNTPs sollten in äquimolaren Verhältnissen im Reaktionsgemisch vorliegen. Weitere Komponenten des Puffers sind meist Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid), KCl (Kaliumchlorid) und Gelatine. [46]

Oligodesoxynukleotide (Primer)

Zur Durchführung einer erfolgreichen PCR sind ein Forward- und ein Reverse-Primer notwendig. Diese binden an die komplementären Stränge der Template-DNA. Bei Kenntnis der DNA-Sequenz, welche amplifiziert werden soll, ist es möglich, passende Primer zu entwerfen. Hier gibt es zahlreiche Softwarelösungen zur Unterstützung beim Primerdesign. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Primerdesign mit PyroMark Assay Design 2.0.1.15 von Qiagen durchgeführt. Genauere

Informationen zum Design der Primer und der dafür verwendeten Software sind in Abschnitt **4.1** und Abschnitt **5.3.2** angeführt.

Ein guter Primer sollte die folgenden Eigenschaften besitzen:

- Er sollte eine Länge von 16-30 Nukleotiden besitzen, um eine ausreichende Spezifität für die Bindung an genau eine bestimmte Zielregion der Template-DNA zu haben.
- Er sollte eine möglichst gleichmäßige Verteilung der vier verschiedenen Desoxynukleotide besitzen, aus denen er sich zusammensetzt. Repetitive Sequenzen sollten vermieden werden.
- Am 3'-Ende des Primers sollten nicht mehr als maximal drei Cs bzw. Gs vorkommen, um eine Fehlpaarung in CG-reichen Regionen zu verhindern. Das 3'-Ende sollte auch keine Sequenz besitzen, die eine Bindung mit sich selbst oder anderen Primern in dem Reaktionsgemisch erlauben (Primerdimere).
- Ein Primer sollte auch nicht Sekundärstrukturen, wie zum Beispiel Haarnadelschleifen ausbilden können, auch Homo-und Heterodimere sollen vermieden werden.

Die Möglichkeit einer Fehlpaarung der verwendeten Primer kann auch über die Annealingtemperatur beeinflusst werden. So sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Fehlpaarung mit steigender Annealingtemperatur, jedoch sinkt im gleichen Maße auch die Ausbeute an PCR-Produkt. Die Auswahl einer geeigneten Annealingtemperatur orientiert sich meistens an der Schmelztemperatur (T_m). T_m ist jene Temperatur, bei der 50% des Primers nicht mehr an die Template-DNA binden. Die geeignete Annealingtemperatur liegt meist etwa 5°C unter T_m . [45]

Der Ablauf

Eine PCR besteht aus drei verschiedenen Schritten, welche sich durch unterschiedliche Temperaturen voneinander abgrenzen. Die verschiedenen Phasen sind in **Abbildung 10** veranschaulicht.

1. Denaturierungsschritt

Während des Denaturierungsschrittes wird die Probe auf 94-96°C erhitzt. Hierbei trennt sich der Doppelstrang einer Template-DNA in seine zwei durch Wasserstoffbrücken verbundenen Einzelstränge auf.

2. Annealingschritt

Im Anschluss an den Denaturierungsschritt wird die Temperatur rasch auf die Annealingtemperatur von 55-65°C gesenkt, um eine Hybridisierung der DNA-Einzelstränge mit den im Überschuss vorhandenen Primern zu ermöglichen. Hierbei binden die Primer an deren komplementäre Sequenzen der Template-DNA. Da dieser Schritt sehr schnell passiert, ist es den langen Einzelsträngen der Template-DNA nicht möglich, sich in der kurzen Zeitspanne wieder zu einem Doppelstrang zu verbinden. Während des Annealingschrittes beginnt bereits die Taq-Polymerase aktiv zu werden und die gerade an die Template-DNA gebundenen Primer zu verlängern. Sollte die Annealingtemperatur zu niedrig gewählt werden, kann dieser Prozess zu Spezifitätsproblemen führen.

3. Elongationsschritt

Im Anschluss wird die Temperatur auf 72°C angehoben. 72°C ist die optimale Temperatur für die hitzestabile Taq-Polymerase, welche, von den gebundenen Primern ausgehend, den jeweils komplementären Strang synthetisiert. Das Produkt sind Doppelstränge, welche der Ausgangs-DNA gleichen. [45]

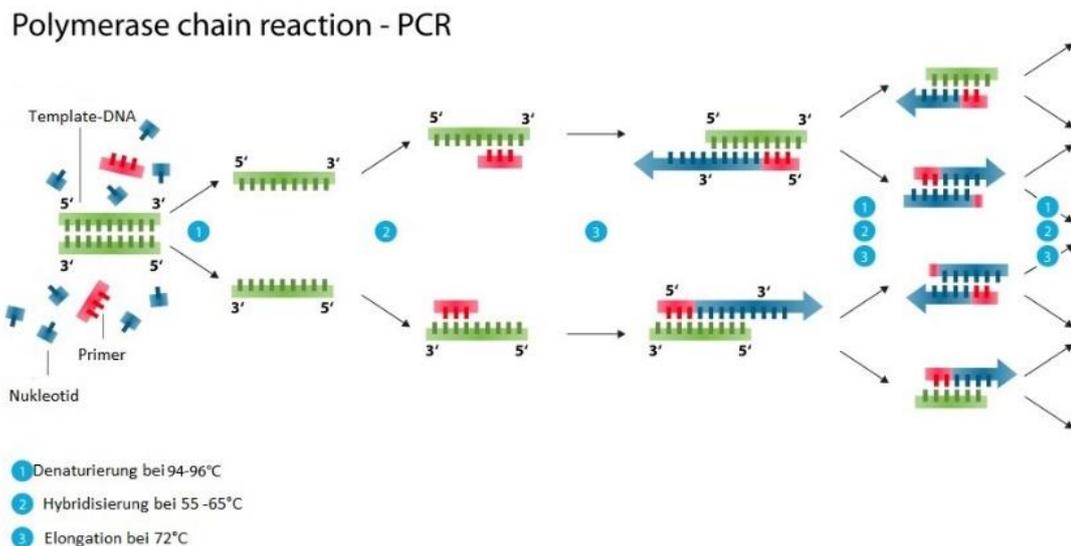


Abbildung 10 Gezeigt ist der chronologische Ablauf einer PCR. **1. Denaturierung** Das Reaktionsgemisch wird auf 94-96°C erhitzt. Es kommt zur Auftrennung des Doppelstranges der Template-DNA. **2. Hybridisierung (Annealing)** Bei einer Temperatur von 55-65°C binden die Primer an die Template-DNA. **3. Elongation** Die Taq-Polymerase synthetisiert die komplementären Stränge der Template-DNA. Schritt 1-3 werden zyklisch wiederholt. (verändert nach [47])

Laut der Theorie verdoppelt sich die Anzahl an Template-DNA mit jedem durchgeführten Zyklus. Dies ergibt bei n durchgeführten Zyklen eine Anzahl von 2^n DNA-Molekülen und entspräche 100% Effizienz, welche in der Praxis jedoch nicht erreicht wird. Der Verlauf einer PCR ist gekennzeichnet durch den Beginn mit einer exponentiellen Zunahme an DNA-Molekülen, gefolgt von linearem Wachstum der DNA-Menge bis hin zu einem Plateau, ab welchem keine weitere Zunahme mehr erfolgt. Gründe für die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit sind unter anderem die nur begrenzt zur Verfügung stehenden Bausteine, welche für die Reaktion benötigt werden und der Verlust an Aktivität der Polymerase durch im Verlauf der Reaktion entstehendes Pyrophosphat. Die verschiedenen Phasen sind in **Abbildung 16** ersichtlich.

Zur Detektion der PCR-Produkte gibt es viele verschiedene Möglichkeiten. Im Rahmen dieser Arbeit sind die Agarose-Gelelektrophorese (**3.1.4**) und die Messung der Fluoreszenz bei der RT-PCR (**3.2.2**) verwendet worden. [46]

3.1.3 Pyrosequenzierung (PSQ)

Die Pyrosequenzierung gehört zu den sogenannten „Sequencing by Synthesis“ (SBS)-Methoden, bei denen die Sequenz einer Proben-DNA während der Synthese des komplementären Stranges in Echtzeit verfolgt werden kann. Ermöglicht wird dies durch Enzymgekoppelte Reaktionen, welche in Verbindung mit Chemilumineszenzmessungen verfolgt werden können. [48] Damit eine Pyrosequenzierung durchgeführt werden kann, muss die gewünschte DNA-Sequenz zuerst mittels PCR amplifiziert werden. Für eine erfolgreiche Pyrosequenzierung ist es unbedingt erforderlich, lediglich einen Einzelstrang der zu untersuchenden DNA vorliegen zu haben. Hierfür wird einer der beiden in der PCR verwendeten Primer biotinyliert. Ist ein Primer (entweder Forward-Primer oder Reverse-Primer) biotinyliert, so kann man im Anschluss die Anziehungskräfte zwischen Biotin und Streptavidin nutzen, um die biotinylierten Einzelstränge aufzureinigen und somit vom Rest der sich in der Probe befindlichen DNA-Stränge zu trennen. Hierfür wird die DNA mit Hilfe des kovalent gebundenen Biotins an Streptavidin Beads immobilisiert und durch mehrere Reinigungsschritte vom Rest abgetrennt. Die einzelsträngige DNA kann im Anschluss genutzt werden, um die eigentliche Sequenzierung durchzuführen.

Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, welches zu den B-Vitaminen gezählt wird. [49] Biotin wird sehr spezifisch von Streptavidin beziehungsweise Avidin gebunden. Diese Eigenschaft macht man sich zu Nutze, indem man zuerst das gewünschte Molekül kovalent an Biotin binden lässt. Dieser Vorgang wird Biotinylierung genannt. Das so biotinylierte Molekül kann dann durch die nicht-

kovalente Kopplung an Streptavidin Beads aufgereinigt werden. Streptavidin kommt in *Streptomyces avidinii*, einem Bakterium der Streptomyceten, vor und besitzt 4 Bindungsstellen für Biotin. [50]

Für die Pyrosequenzierung werden eine einzelsträngige DNA, deren Sequenz untersucht werden soll, ein passender Sequencing-Primer, der an der gewünschten Stelle der Template-DNA bindet, sowie einige Enzyme (DNA-Polymerase, Luciferase, ATP-Sulfurylase, Apyrase) und Substrate (Luciferin, Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS)) benötigt.

Die Reaktion

Die Reaktion beginnt mit einem Annealingschritt, in welchem der Sequencing-Primer an die einzelsträngige Template-DNA bindet. Im Anschluss wird eines von vier möglichen Desoxynukleotiden (dNTPs) hinzugefügt. Ist dieses Desoxynukleotid komplementär zur Vorlage der Template-DNA, so wird es von der DNA-Polymerase eingebaut. Beim Einbau wird ein Diphosphat (Pyrophosphat, PP_i) abgespalten. Das abgespaltene Diphosphat reagiert, durch die Sulfurylase katalysiert, mit dem APS zum ATP. Das so entstandene ATP wird von der Luciferase verwendet, um Luciferin mittels oxidativer Decarboxylierung zum Oxyluciferin umzuwandeln. Hierbei kommt es zu einer Lichtreaktion, ausgelöst durch Chemilumineszenz, welche detektiert werden kann. [43] Der Prozess ist in **Abbildung 11** dargestellt. Die Intensität des gemessenen Lichts ist hierbei direkt proportional zur Anzahl der eingebauten dNTPs und somit durch die Höhe der entsprechenden Peaks ablesbar. Bevor das nächste dNTP eingebaut werden kann, müssen die übriggebliebenen dNTPs zu dNDPs (Desoxynukleosid-Diphosphate) abgebaut werden. Dies bewerkstelligt die Apyrase durch Hydrolyse. Da die Lichtreaktion des neu gebildeten ATPs wesentlich rascher verläuft als die durch die Apyrase induzierte Abbaureaktion, beeinträchtigt dies nicht das Ergebnis. [45] Da dATP für die Lichtreaktion der Luciferase verwendet wird, würde der Einsatz von dATP als dNTP die erhaltenen Signale verfälschen. Deswegen wird stattdessen Desoxyadenosin- α -Thiotriphosphat (dATP- α -S) verwendet. Der Einbau von dATP- α -S in den neu synthetisierten Strang führt zu einer Lichtreaktion höherer Intensität als bei den anderen dNTPs. Dies sollte bei der Auswertung eines Pyrogrammes berücksichtigt werden. [48,51]

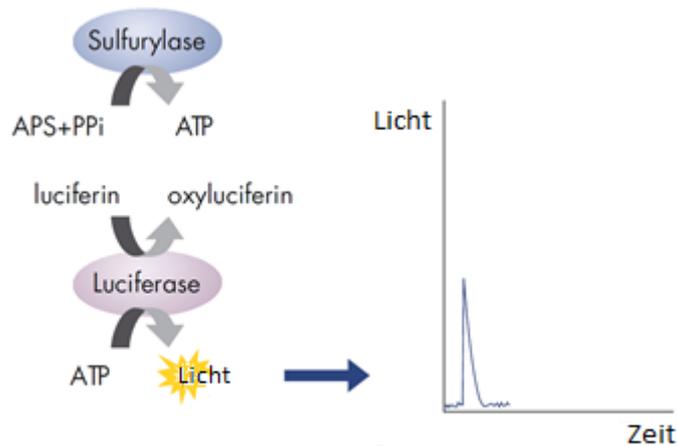


Abbildung 11 Gezeigt sind die während einer Pyrosequenzierung ablaufenden Reaktionen. Beim Einbau eines zur Template-DNA komplementären Desoxynukleotids wird ein Diphosphat (Pyrophosphat, PP_i) abgespalten. Das abgespaltene Diphosphat reagiert, durch die Sulfurylase katalysiert, mit dem APS (Adenosin-5'-Phosphosulfat) zum ATP. Das so entstandene ATP wird von der Luciferase verwendet, um Luciferin mittels oxidativer Decarboxylierung zum Oxyluciferin umzuwandeln. Hierbei kommt es zu einer Lichtreaktion, ausgelöst durch Chemilumineszenz, welche detektiert werden kann. (verändert nach [43])

In Kombination mit der Bisulfitkonvertierung, welche in Abschnitt 3.1.1 erläutert wurde, kann die Pyrosequenzierung genutzt werden, um den Methylierungsstatus einzelner CpGs in kurzen DNA-Sequenzen zu bestimmen, da zwischen Cytosin und 5-Methylcytosin unterschieden werden kann. Mit Ausnahme der variablen Positionen, an denen entweder ein Cytosin für ein methyliertes oder ein Thymin für ein unmethyliertes Cytosin eingebaut wurde, ist die Sequenz der Template-DNA bekannt. In einem Forward-Assay ist der Reverse-Primer biotinyliert und somit wird der Reverse-Strang der Template-DNA immobilisiert und vom Rest des Reaktionsgemisches abgetrennt. Der zugehörige Sequencing-Primer bindet an den Reverse-Strang und im Rahmen der Sequenzierung wird der Forward-Strang synthetisiert. An den variablen Positionen werden somit entweder ein Cytosin oder ein Thymin eingebaut. Bei einem Reverse-Assay trägt der Forward-Primer der PCR das Biotin. Somit wird der Forward-Strang der Template-DNA an die Streptavidin Beads gebunden und aufgereinigt. Der Sequencing-Primer dient somit als Startpunkt für die Synthese des Reverse-Stranges. In diesem Fall wird an den variablen Positionen entweder ein Guanin oder ein Adenin eingebaut. Der Methylierungsstatus eines CpGs ergibt sich aus dem Verhältnis eingebauter C/T in einem Forward-Assay bzw. aus dem Verhältnis G/A in einem Reverse-Assay. Die beiden Möglichkeiten sind in **Abbildung 12** und **Abbildung 13** gegenübergestellt.

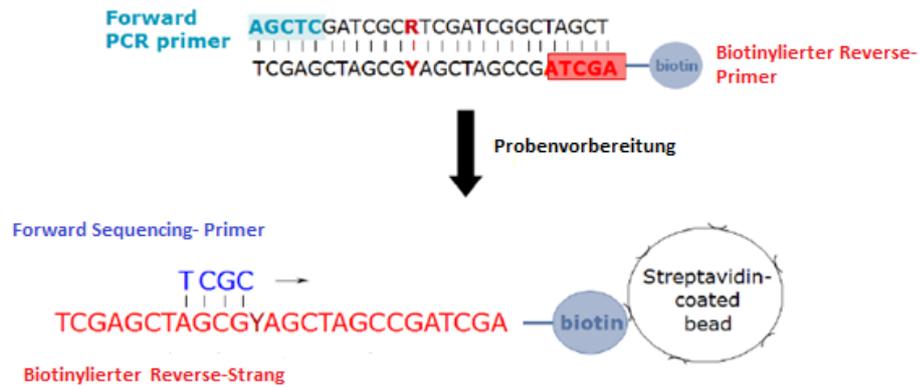


Abbildung 12 Gezeigt ist ein Forward-Assay. Bei einem Forward-Assay ist der Reverse-Primer biotinyliert (rot). Damit bleibt der Reverse-Strang der Template-DNA für die Pyrosequenzierung erhalten (rot). Der Sequencing-Primer ist der Startpunkt für die Synthese des Forward-Stranges (blau), welche in Echtzeit verfolgt wird.

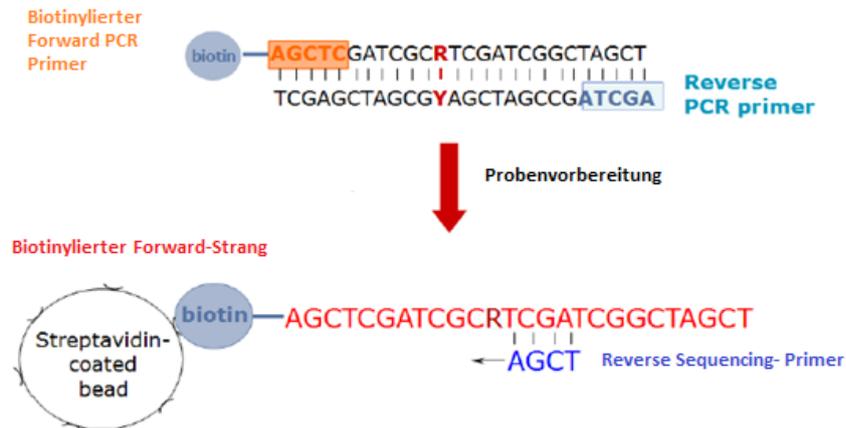


Abbildung 13 Gezeigt ist ein Reverse-Assay. Bei einem Reverse-Assay ist der Forward-Primer biotinyliert (orange). Damit bleibt der Forward-Strang der Template-DNA für die Pyrosequenzierung erhalten (rot). Der Sequencing-Primer ist der Startpunkt für die Synthese des Reverse-Stranges (blau), welche in Echtzeit verfolgt wird.

Grenzen der Methode

Die Bestimmungsgrenze (limit of quantification, LOQ) des in dieser Arbeit verwendeten Pyrosequenzier-Geräts liegt bei einem Methylierungsstatus von 5%, die obere Bestimmungsgrenze (upper limit of quantification, ULOQ) bei einem Methylierungsstatus von 95%. [52]

Die DNA-Sequenz, welche untersucht wird, sollte eine maximale Länge von 140bp besitzen. Die Limitierung der Länge ist vor allem durch die, während jedes Zyklus entstehenden Nebenprodukte bedingt, welche die Auflösung der Ergebnisse verschlechtern. [53] Die Pyrosequenzierung längerer Amplikons kann jedoch mit Hilfe von Tandem-Assays realisiert werden. Hier werden mehrere, unterschiedliche Sequencing-Primer in aufeinanderfolgenden Pyrosequenzierungen an derselben Template-DNA eingesetzt. [54] Der erhaltene Methylierungsstatus einzelner CpGs ist jeweils der Mittelwert aller der Pyrosequenzierung zugänglichen DNA-Stränge. Eine weitere Limitierung ist die Abnahme der Sensitivität bei Homopolymeren. In der untersuchten Sequenz sollte nach Möglichkeit ein Nukleotid nicht häufiger als fünf bis acht Mal hintereinander vorkommen. [48]

Stärken der Methode

Eine Stärke der Pyrosequenzierung ist die Möglichkeit der Bestimmung heterogener Methylierungsmuster einer DNA-Sequenz, aufgelöst nach einzelnen CpGs. Dies ist weder bei einer Sequenzierung bisulfitkonvertierter DNA nach Sanger noch bei einem MS-HRM (Methylation-Sensitive High Resolution Melting) Assay möglich. [55] Während bei einer Pyrosequenzierung der durchschnittliche Methylierungsstatus einzelner CpGs ermittelt werden kann, kann bei einer MS-HRM lediglich der durchschnittliche Methylierungsstatus eines Amplikons mit Standards, deren durchschnittlicher Methylierungsstatus bekannt ist, verglichen werden. [56]

Das Primerdesign

Für eine Pyrosequenzierung sind, wie schon besprochen, drei verschiedene Primer von Nöten, ein Forward- und ein Reverse-Primer für die Amplifikation mittels PCR, wobei einer der beiden Primer biotinyliert sein muss, und ein Sequencing-Primer, der innerhalb der zuvor amplifizierten DNA bindet und den Startpunkt der anschließenden Pyrosequenzierung darstellt. Bei der Auswahl von für die Reaktion geeigneten Primern gibt es mehrere Aspekte zu beachten. [51]

- Die Länge des Amplikons sollte 350bp nicht übersteigen. Die Länge der Sequenz, die pyrosequenziert wird, sollte nicht länger als 140bp sein.
- Innerhalb der Primerbindungsstellen sollten nach Möglichkeit keine CpGs vorkommen, da dies eine ungleichmäßige Amplifikation methylierter und unmethylierter Proben-DNA zur Folge haben könnte, was in einem fehlerhaften Methylierungsstatus resultieren würde.

- Lange homopolymere bzw. repetitive Sequenzen sollten nicht als Primerbindungsstellen verwendet werden.
- Potenzielle Primer sollten auf die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Homo- und Heterodimeren, aber auch Sekundärstrukturen geprüft werden. Hierzu gibt es geeignete Software. Die Software, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist in Abschnitt **5.6.1** angegeben.
- Die optimale Länge der Primer für die PCR liegt bei 20-35bp. Der Sequencing-Primer sollte 16-24bp lang sein. Die Schmelztemperaturen der PCR-Primer sollten nicht mehr als 2°C Differenz aufweisen.
- Als Kontrolle für eine erfolgreich durchgeführte Bisulfitkonvertierung ist es von Vorteil, wenn die Sequenz der PCR-Primer Thymin enthält, welches aus einem Austausch von C zu T, bedingt durch die Bisulfitkonvertierung, entsteht und nicht Teil eines CpGs ist.
- Der Sequencing-Primer sollte innerhalb des Amplikons nur einmal binden können und die Bindungsstelle sollte keine CpGs beinhalten.

Auswertung eines Pyrogramms

Die mit dem PyroMark Q24 (Qiagen®) erhaltenen Pyrogramme setzen sich aus dem Pyrogramm selbst und einem auf Basis der eingegebenen Sequenz erwarteten Histogramm zusammen. Auf der X-Achse des Pyrogramms als auch des Histogramms ist die Nukleotidabfolge (dispensation order) der eingegebenen Sequenz aufgetragen. Auf der Y-Achse ist im Histogramm die erwartete Anzahl der Nukleotide aufgetragen, während es im Pyrogramm die Signalthöhe in Form von Peaks ist. Ein Beispiel für solch ein Pyrogramm mit zugehörigem Histogramm ist in **Abbildung 14** ersichtlich. Über den variablen Positionen ist der Methylierungsstatus in Prozent aufgetragen. Die variablen Positionen sind in dem Pyrogramm blau hinterlegt. Für die Zuverlässigkeit des Methylierungsstatus wird ein Farbcode verwendet. Blau weist auf ein sehr zuverlässiges Ergebnis hin („passed“), gelb auf ein zuverlässiges („check“) und rot auf ein unzuverlässiges Ergebnis („failed“). [52]

Der orangefarbene Balken bei Position 34 ist die Kontrolle für eine funktionierende Bisulfitkonvertierung. Bei einem Forward-Assay ist, wie schon erörtert, der Reverse-Primer biotinyliert. Ein Cytosin, auf das kein Guanin folgt, ist üblicherweise nicht methyliert und sollte somit durch die Bisulfitbehandlung mit anschließender PCR vollständig zu einem Thymin konvertiert sein. Somit sollte an dieser Position nach einer erfolgreichen Bisulfitkonvertierung nur noch ein Thymin und kein Cytosin mehr vorhanden sein. Bei einem Reverse-Assay gilt dies für Adenin, welches sich bei vollständiger Bisulfitkonvertierung an Stelle von Guanin an dieser

Position befinden muss. Bei der Bisulfitkontrolle wird an dieser Position je nach Assay die zu Cytosin oder zu Guanin komplementäre Base hinzugefügt. Wäre die Bisulfitkonvertierung nicht vollständig verlaufen, so würde ein Peak sichtbar sein. [51]

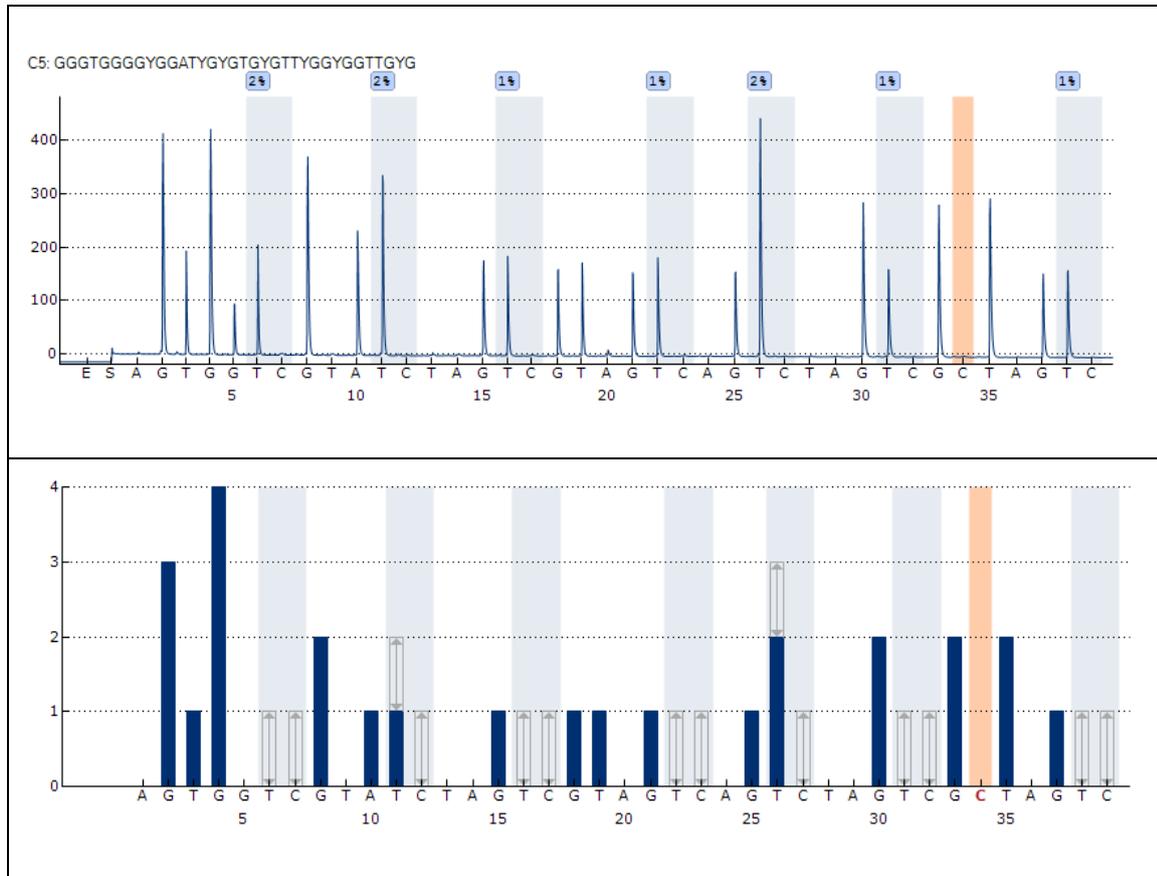


Abbildung 14 Exemplarisches Pyrogramm mit zugehörigem Histogramm. Auf der X-Achse ist die Nucleotidabfolge (dispensation order) aufgetragen, auf der Y-Achse des Histogramms die erwartete Nucleotidanzahl, auf jener des Pyrogramms die Intensität der Lichtreaktion. Bei unvollständiger Bisulfitkonvertierung würde im orangefarbenen Feld bei Zugabe eines dCTPs ein Peak auftreten. Die Zuverlässigkeit der erhaltenen Daten ist in einem Farbcode angegeben. (Blau= sehr zuverlässig, gelb= zuverlässig, rot= unzuverlässig)

3.1.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und effektive Methode, um DNA-Fragmente einer Länge von 0,5 bis 25kb aufzutrennen und zu identifizieren.

Prinzip

Agarose wird in Elektrophoresepuffer aufgekocht und mit Hilfe eines Kammes und eines Gelschlittens wird ein Gel mit Taschen gegossen, welches man im Anschluss aushärten lässt. Das ausgehärtete Gel wird in eine Elektrophoresekammer gegeben und mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Nun können die Taschen mit Hilfe einer Pipette mit DNA beladen werden und im Anschluss wird eine Spannung zwischen 50 und 150 Volt angelegt. Wird das Gel mit einem Farbstoff gefärbt, so kann es im Anschluss unter UV-Licht betrachtet und ausgewertet werden.

Als Elektrophoresepuffer wird meist ein TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer), oder ein TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) verwendet. Während sich ein TAE-Puffer gut für eine anschließende Aufreinigung der DNA eignet, ist er mit einer geringen Spannung (0,5-5V/cm Elektrodenabstand) zu betreiben, was eine lange Laufzeit der Elektrophorese bedeutet. Der TBE-Puffer hingegen kann mit über 10V/cm betrieben werden, es ist jedoch problematisch, die DNA aus dem Gel zu präparieren.

Standardagarosen werden in Konzentrationen von 0,5-2% verwendet. Hiermit lassen sich Fragmentgrößen von 0,2 bis 20kb voneinander trennen. Um kleinere Fragmente aufzutrennen, können Spezialagarosen, die eine höhere Konzentration (2-4%) zulassen, verwendet werden. [45] Durch die Siebstruktur der Agarose werden kleinere DNA-Fragmente weniger stark retardiert als große und laufen somit schneller durch das Gel. Dabei ist die Laufstrecke der DNA umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Fragmentlänge. Dieser mathematische Zusammenhang ist jedoch begrenzt, da sich die DNA ab einer Länge über 20kb, bedingt durch die lange Laufzeit, im elektrischen Feld der Länge nach ausrichtet und somit ungehindert durch das Gel wandert. [45] Dieser Effekt ist in **Abbildung 15** dargestellt.

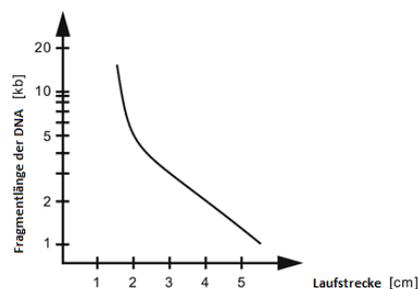


Abbildung 15 Logarithmischer Zusammenhang der Fragmentlänge einer DNA in kb und deren Laufstrecke in einem Agarosegel in cm. Zu sehen ist das Ende dieser mathematischen Beziehung mit steigender Fragmentlänge, was eine Auftrennung ab einer Fragmentlänge von 20kb unmöglich macht. Je nach Elektrophoresepuffer, Agarosekonzentration und angelegter Spannung tritt die Einbuchtung des Graphen zwischen 3-8kb auf. (verändert nach [45])

Um die aufgetrennten DNA-Fragmente im Gel sichtbar zu machen, muss dieses gefärbt werden. Die häufigste Methode ist die Färbung mit Ethidiumbromid (EtBr). EtBr wird mit Licht einer Wellenlänge von 302 bzw. 366nm angeregt und emittiert nach Interkalation in die doppelsträngige Proben-DNA Licht einer Wellenlänge von 590nm. [57] Dafür kann das Gel entweder nach erfolgter Elektrophorese in einen mit EtBr ($[\text{EtBr}] = 0,5 \mu\text{g/mL}$) versetzten Elektrophoresepuffer für 30 Minuten eingelegt werden, oder EtBr wird bereits bei der Zubereitung des Gels zugegeben. Mittlerweile werden jedoch viele weitere Farbstoffe wie SYBR Green® oder RedSafe® von diversen Herstellern angeboten. Um die Beladung der Geltaschen mit DNA zu erleichtern, wird meist noch ein Probenpuffer (loading buffer) beigegeben. Dieser erhöht die Dichte der DNA-Lösung im Vergleich zum Elektrophoresepuffer und sorgt somit für einen Verbleib der DNA-Lösung in den Geltaschen bis zum Beginn der Elektrophorese. [45]

3.2 Analyse der Genexpression

3.2.1 cDNA-Herstellung mittels reverser Transkriptase

Unter einer cDNA (complementary DNA, komplementäre DNA) versteht man eine mittels reverser Transkriptase aus einer RNA synthetisierte DNA. Die Herstellung der cDNA erfolgt durch dieselbe Strategie, welche auch schon bei der PCR Anwendung findet. Hier wird jedoch anstatt einer hitzestabilen DNA abhängigen Polymerase (Taq-Polymerase) eine reverse Transkriptase verwendet. Wird die cDNA aus einer mRNA hergestellt, so besitzt die daraus resultierende cDNA keine Introns.

[58,59]

3.2.2 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR (RT-PCR) ist eine Erweiterung der herkömmlichen PCR, welche es ermöglicht, die im Laufe der Reaktion amplifizierte DNA in Echtzeit zu detektieren und zu quantifizieren. Somit ist es heute nicht mehr notwendig, die PCR nach jeweils 5 Zyklen zu unterbrechen, ein Aliquot zu entnehmen und anschließend eine Agarose-Gelelektrophorese durchzuführen, um die verschiedenen Stadien der Amplifikation verfolgen zu können. Ermöglicht wird die Verfolgung der Amplifikation in Echtzeit durch Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffes. Als Farbstoffe werden EtBr, YO-PRO-1 und SYBR Green® verwendet. Wird SYBR Green® mit Licht einer Wellenlänge von 494nm angeregt, emittiert es Licht im Bereich von 521nm. Dabei ist die Menge des emittierten Lichts

proportional zur Menge der vorhandenen DNA. Die Messung der Fluoreszenz wird üblicherweise, während jenem Schritt der PCR vorgenommen, welcher die niedrigste Temperatur aufweist. Meist ist dies der Annealingschritt. [60]

Zur Quantifizierung der DNA-Menge wird die Kinetik der PCR ausgenutzt. Wie schon in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, findet während der ersten Zyklen eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt. In weiterer Folge findet durch stetig steigende störende Einflüsse wie die Entstehung von Pyrophosphat, welches die Reaktion hemmt, oder eine Verknappung von Primern und Nukleotiden eine Verlangsamung zu einem linearen Wachstum statt, welches letztendlich in einem Plateau endet. [45] Eine solche Amplifikationskurve ist in **Abbildung 16** dargestellt. Während der exponentiellen Phase ist es möglich, den Threshold-Cycle (C_t -Wert) zu bestimmen. Der Threshold-Cycle wird in einem Bereich der Kurve ermittelt, in dem das erhaltene Fluoreszenzsignal bereits deutlich erkennbar ist, sich also vom Hintergrundrauschen abhebt, aber die exponentielle Phase noch stattfindet. Nach Abschluss der exponentiellen Phase gäbe es Faktoren, welche eine exakte Messung der Quantität erschweren würden. So steigt beispielsweise die Möglichkeit einer Hybridisierung von Produktfragmenten. [45,61]

Die Ermittlung von C_t -Wert wird verwendet, um die Expressionsraten von Genen miteinander vergleichen zu können. Um die Expressionsrate eines Gens quantifizieren zu können, wird diese mit einem sogenannten Housekeeping-Gen verglichen. Housekeeping-Gene zeichnen sich dadurch aus, dass sie ständig, und dies unabhängig von äußeren Einflüssen, transkribiert werden. Meist codieren sie für Gene, oder RNA-Moleküle, die für die reguläre Aktivität von Zellen essenziell sind. Sie werden auch als konstitutiv exprimierte Gene bezeichnet und codieren häufig für Enzyme des Intermediärstoffwechsels von Zellen, wie beispielsweise dem Glukose-Stoffwechsel. [62,63]

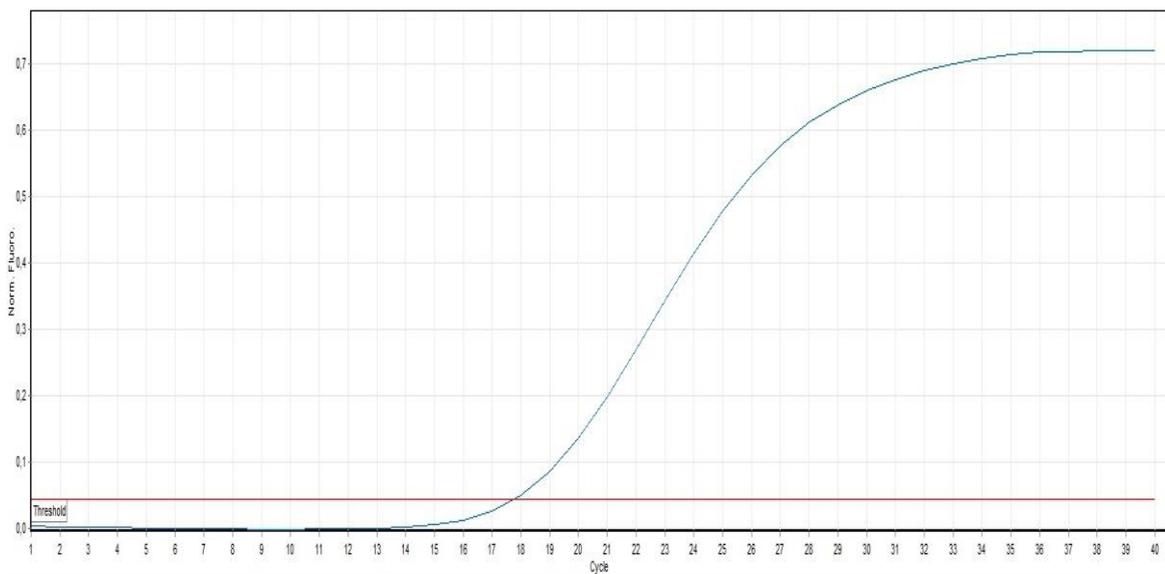


Abbildung 16 Exemplarische Amplifikationskurve mit dazugehöriger Threshold-Linie. Auf der Y-Achse ist die im Laufe der Reaktion detektierte normalisierte Fluoreszenz aufgetragen. Auf der X-Achse ist die Zyklenzahl der PCR zu sehen. Die Threshold-Linie (rot) wird in der exponentiellen Phase der Reaktion gesetzt, in der sich das Fluoreszenzsignal eindeutig vom Hintergrundrauschen unterscheidet. Die exponentielle Phase geht durch mit der Zeit immer ausgeprägter werdende Störfaktoren in ein lineares Wachstum über, welches schließlich zum Stillstand kommt (Plateauphase)

3.2.3 Der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert

Der $\Delta\Delta C_t$ -Wert ist eine Möglichkeit, die Quantität von Genexpressionsprodukten mehrerer Proben relativ zu vergleichen. Hierzu wird ein Housekeeping-Gen benötigt. Zunächst wird der vom Housekeeping-Gen erhaltene C_t -Wert von jenem der Probe abgezogen. Dadurch erhält man den ΔC_t -Wert. Der gleiche Vorgang wird mit einer Probe, welche als Referenz für die Messreihe dient, durchgeführt. Im Anschluss wird nun die Differenz der zwei erhaltenen ΔC_t -Wert ermittelt ($\Delta\Delta C_t$ -Wert). Die so erhaltene Differenz wird in die folgende Formel eingesetzt. Wird mit weiteren Proben genauso verfahren, können die erhaltenen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte miteinander verglichen werden. [64,65]

$$\Delta C_t (\text{Probe}) \text{ zu } \Delta C_t (\text{Referenzprobe}) = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Methodenentwicklung

Alle folgenden Primer für die Amplifikation mittels PCR als auch für die anschließende Pyrosequenzierung zur Untersuchung der Methylierungsstatus der sich in der Promotorregion und Exon 2 befindenden CpGs von *CDKN2A* wurden mit der Software PyroMark Assay Design 2.0 von Qiagen entworfen. Die grobe Abschätzung der Schmelztemperatur der Primer wurde mit dem Oligonucleotide Properties Calculator 3.26 der Northwestern University vorgenommen. Außerdem wurden die entworfenen Primer mittels RNAfold der Universität Wien auf die Bildung möglicher störender Sekundärstrukturen untersucht. Die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren wurde mittels OligoAnalyzer 3.1 der Firma IDT® (Integrated DNA Technologies) getestet.

4.1.1 Primer für die Promotorregion

Die von dem Forward-Primer und Reverse-Primer umschlossene Sequenz beinhaltet 75 Basenpaare und sieben CpGs. Die Primer bzw. ihre Bindungsstellen sind in **Abbildung 17** dargestellt. Die Promotorregion von *CDKN2A* ist in der Abbildung nach erfolgter Bisulfitkonvertierung dargestellt.

Abbildung 18 zeigt die Darstellung der entworfenen Primer in jenem Programm (PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen), in welchem sie entworfen wurden. Länge als auch Position der Primer wurden so gewählt, dass möglichst keinerlei Fehlpaarungen auftreten können.

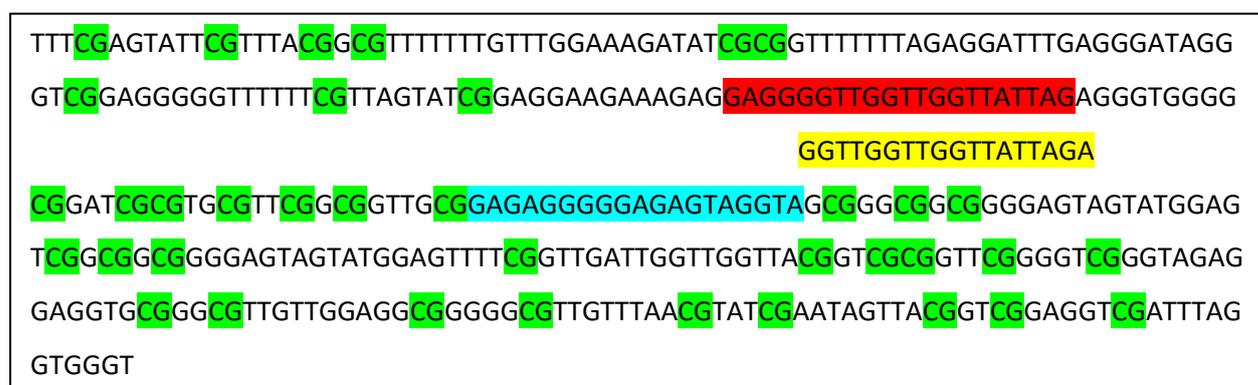


Abbildung 17 Gezeigt sind Bindungsstellen der entworfenen Primer für die Pyrosequenzierung eines Teils der Promotorregion von *CDKN2A* [Forward-Primer (rot), Sequencing-Primer (gelb), Bindungsstelle des Reverse-Primers (blau), CpGs (grün)]. Da sich Forward- und Sequencing-Primer überlappen, ist diese Sequenz zweifach dargestellt.

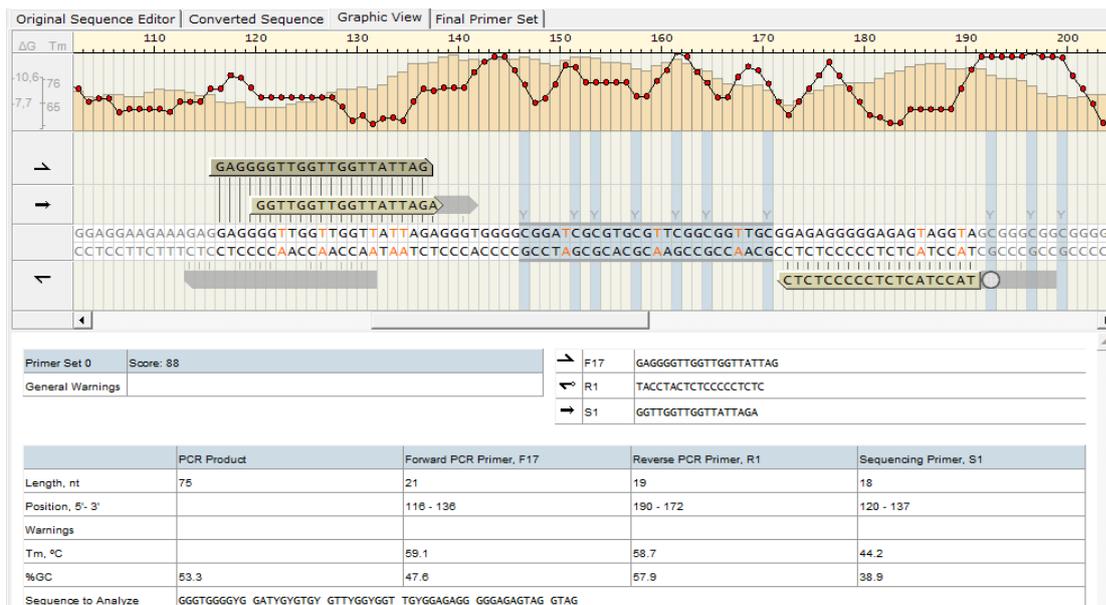


Abbildung 18 Darstellung der entworfenen Primer für die Promotorregion von *CDKN2A* mittels PyroMark® Assay Design 2.0 (Qiagen®)

In **Abbildung 19** sind die wichtigsten Informationen zu den entworfenen Primern für die Promotorregion zusammengefasst. Angegeben sind deren Sequenz, Länge, Schmelztemperatur, aber auch die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von möglicherweise störenden Sekundärstrukturen. Die Primer wurden so entworfen, dass eine Ausbildung von Sekundärstrukturen möglichst vermieden wird.

Primer	Sequenz	Länge [nt]	T _m [°C]	Sekundärstruktur (RNAfold) (Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung)
Forward-Primer	GAGGGGTTGGTTGGTTATTAG	21	59,5	
Reverse-Primer (biotinyliert)	TACCTACTCTCCCCCTCTC	19	59,5	
Sequencing-Primer	GGTTGGTTGGTTATTAGA	18	49,3	

Abbildung 19 Übersicht der Sequenz, Länge, Schmelztemperatur und Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Sekundärstrukturen der entworfenen Primer für die Pyrosequenzierung der Promotorregion von *CDKN2A*

4.1.2 PCR-Amplifikation

Zur Optimierung wurden verschiedene Parameter der PCR variiert. So wurden vier verschiedene Temperaturen beim Annealingschritt der PCR getestet, als auch zwei verschiedene Konzentrationen des eingesetzten Primerpaares.

Variation der Temperatur des Annealingschrittes

Eine Regel besagt, dass die optimale Annealingtemperatur in etwa 5°C unter der Schmelztemperatur der verwendeten Primer liegt. Somit wurde die Methode mit Annealingtemperaturen von 53,3°C, 55,1°C, 57,6°C und 59,5°C getestet, wobei 59,5°C der zuvor mittels Software (Oligonucleotide Properties Calculator 3.26, Northwestern University) eruierten Schmelztemperatur der Primer entspricht.

Außerdem wurden zwei Master Mixes mit variierenden Primerkonzentrationen hergestellt. Die experimentellen Informationen sind in Abschnitt **5.4.2.1** angeführt.

4.1.3 Gelelektrophorese

Wichtige Faktoren, um anschließend valide Messergebnisse zu erhalten, sind die Menge und Reinheit an erhaltenem PCR-Produkt. Um die ideale Annealingtemperatur für eine möglichst hohe Ausbeute an Produkt zu eruieren, wurde nach erfolgter PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden gemäß dem in **Tabelle 1** ersichtlichen Beladungsschema auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde 62 Minuten bei U=120V laufen gelassen. Das entstandene Elektropherogramm ist in **Abbildung 20** gezeigt.

Tabelle 1 Beladungsschema des Agarosegels zur Ermittlung der optimalen Bedingungen der Amplifikation mittels PCR für die Promotorregion von *CDKN2A*

Aufgabeposition	Annealingtemperatur[°C]	[Primer]	Standard
M			25bp-DNA-Ladder
2	T ₁ =59,5	200nM	0%-Standard
3			100%-Standard
N			NTC
5	T ₂ = 57,6		0%-Standard
6			100%-Standard
N			NTC
8	T ₃ = 55,1		0%-Standard
9			100%-Standard
N			NTC
11	T ₄ = 53,3		0%-Standard
12			100%-Standard
N			NTC
M			25bp-DNA-Ladder (verdünnt)
15	T ₁ =59,5	400nM	0%-Standard
16			100%-Standard
N			NTC
18	T ₂ = 57,6		0%-Standard
19			100%-Standard
N			NTC
21	T ₃ = 55,1		0%-Standard
22			100%-Standard
N			NTC
24	T ₄ = 53,3		0%-Standard
25			100%-Standard
N			NTC
M			25bp-DNA-Ladder

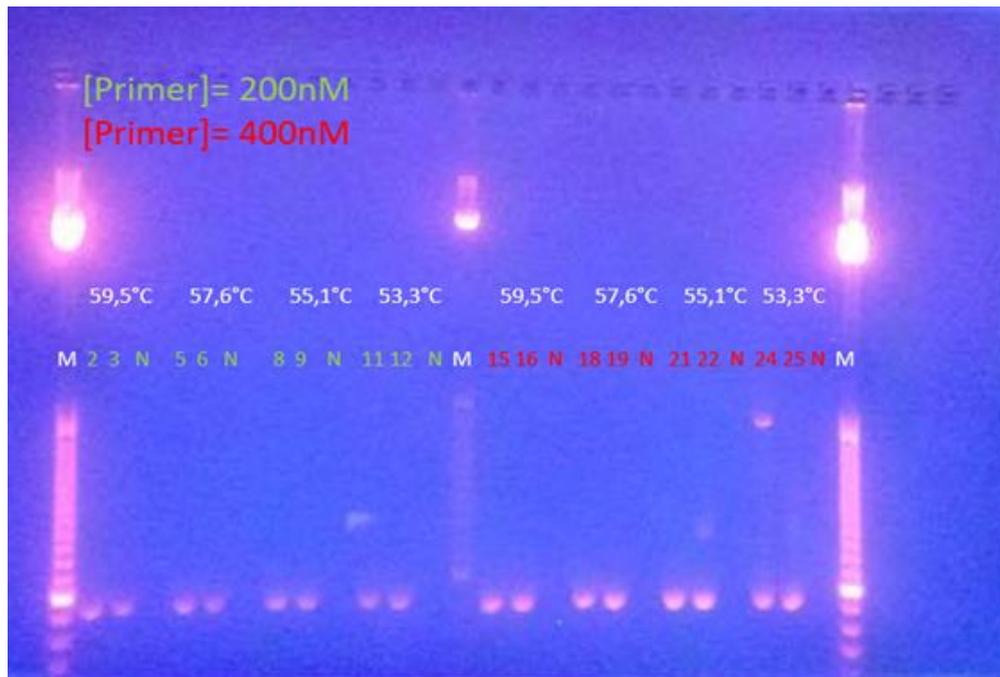


Abbildung 20 Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese zur Ermittlung der optimalen PCR Bedingungen. Primerkonzentration: 200nM oder 400nM; Annealingtemperatur: 59,5°C, 57,6°C, 55,1°C oder 53,3°C. Das Beladungsschema ist in **Tabelle 1** angegeben.

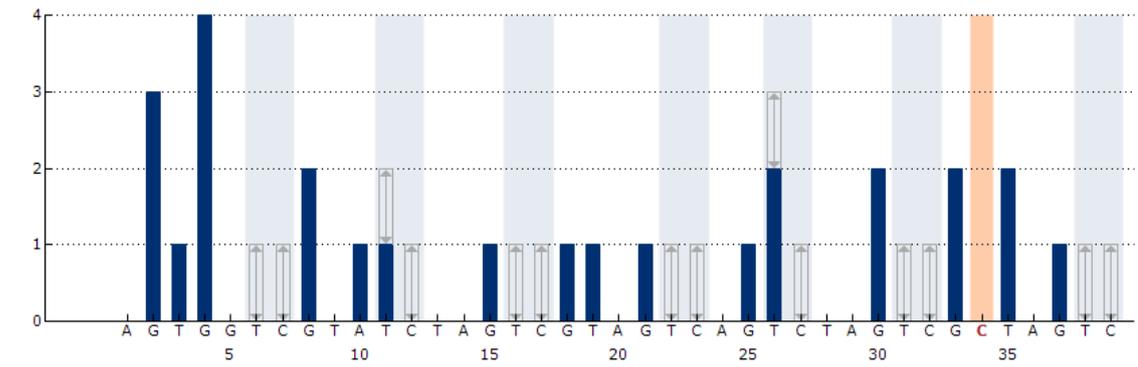
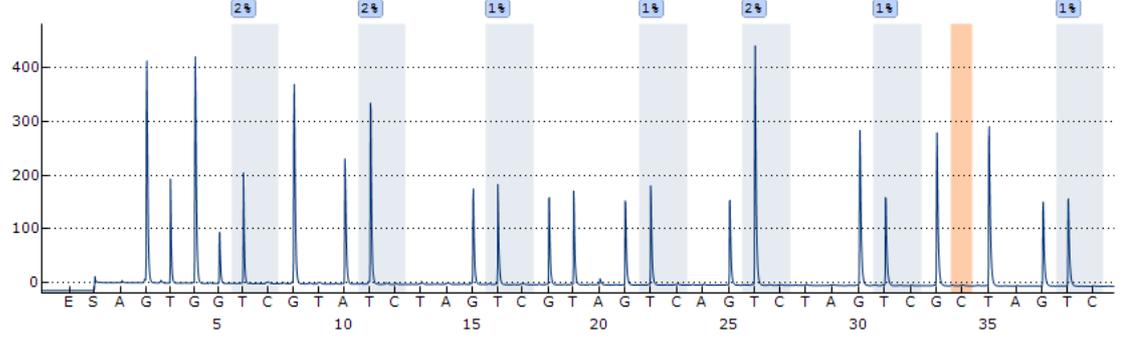
Da für PCR-Produkte, die bei einer Primerkonzentration von 400nM gebildet wurden, stärkere Banden erhalten wurden, was auf eine höhere Ausbeute hinweist, wurden alle folgenden Experimente bei einer Primerkonzentration von 400nM durchgeführt. Da bei einer Annealingtemperatur von 59,9°C und 57,6°C keine Nebenprodukte entstanden sind, wurde die Spezifität des Bindungsprozesses der Primer hier als am höchsten betrachtet. Die mit einer Primerkonzentration von 400nM und einer Annealingtemperatur von 59,5°C bzw. 57,6°C erhaltenen Produkte wurden im Anschluss sequenziert.

4.1.4 Pyrosequenzierung

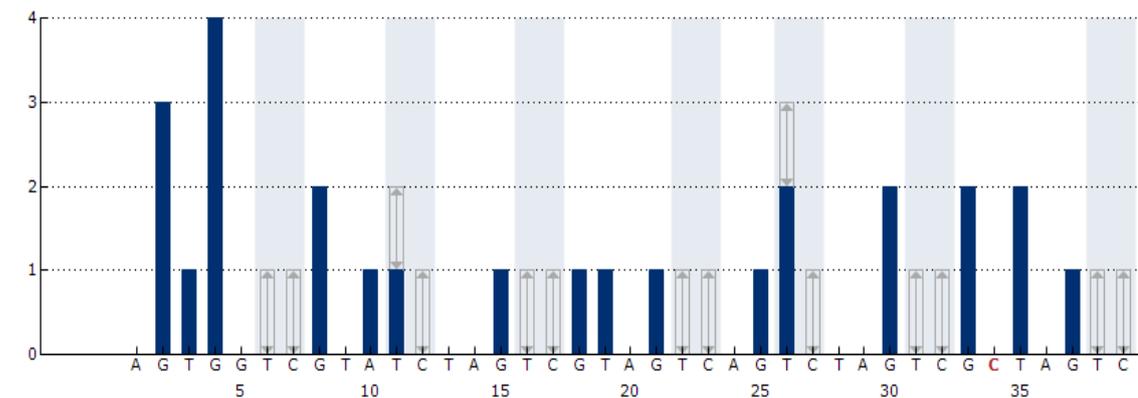
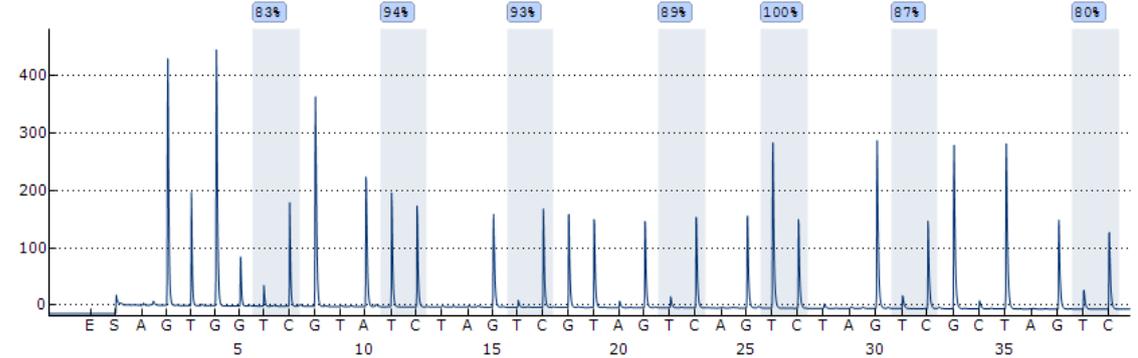
Wie in **Abbildung 21** gezeigt, führten beide Annealingtemperaturen zu validen Ergebnissen. Das Peakmuster entsprach in sämtlichen Pyrogrammen den jeweiligen Histogrammen. Die Vertrauenswürdigkeit des erhaltenen Methylierungsstatus war bei sämtlichen CpGs gegeben. Da die Annealingtemperatur von 59,5°C zu höheren Peaks führte, wurden die weiteren Analysen bei dieser Annealingtemperatur durchgeführt.

A

C5: GGGTGGGGYGGATYGYGTGYGTTYGGYGGTTGYG

**B**

C6: GGGTGGGGYGGATYGYGTGYGTTYGGYGGTTGYG



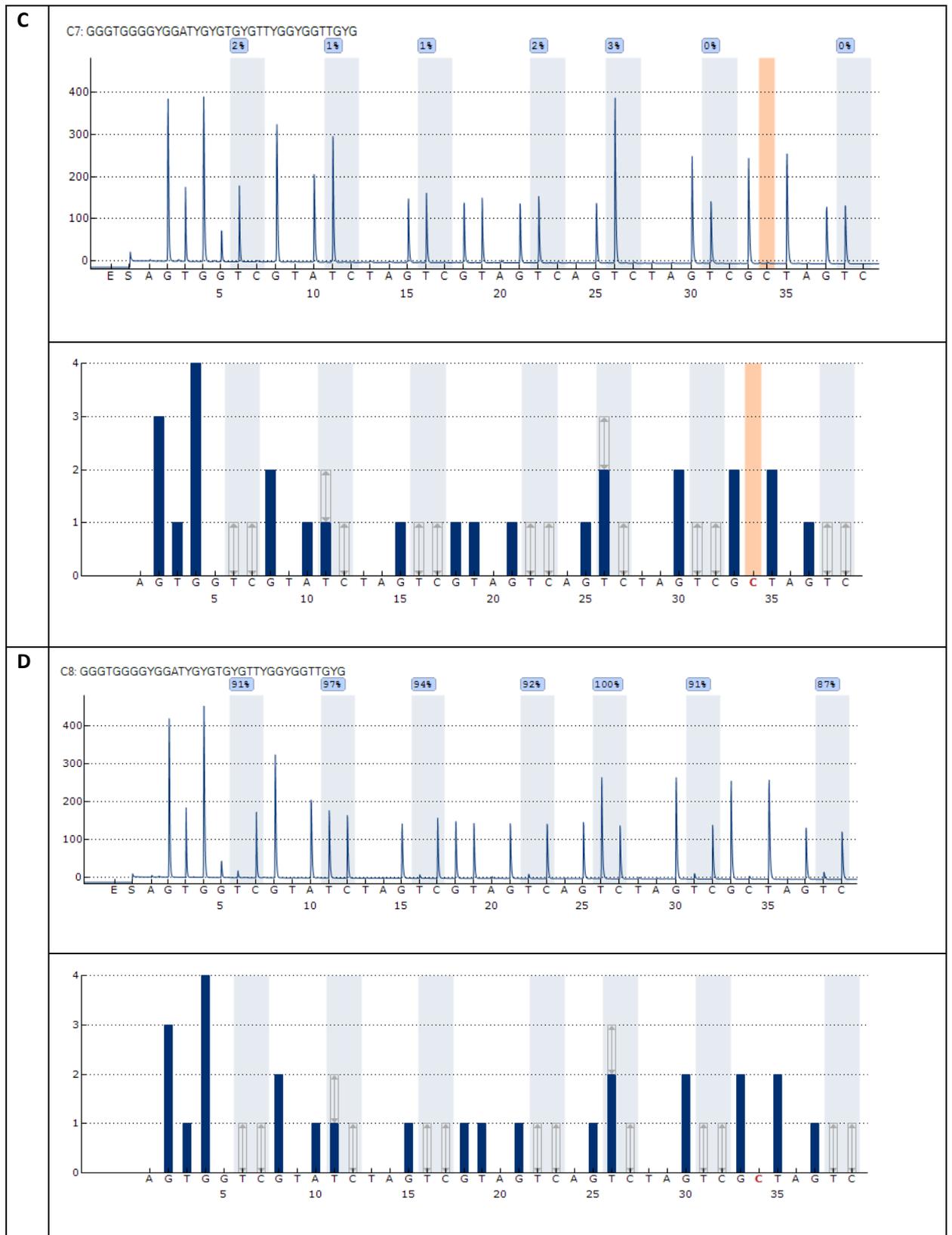


Abbildung 21 Pyrogramme des unmethylierten und methylierten Standards, amplifiziert mit den entworfenen Primern für die Promotorregion von *CDKN2A*.

A Pyrogramm des unmethylierten Standards nach erfolgter PCR bei einer Annealingtemperatur = 59,5°C, **B** Pyrogramm des methylierten Standards nach erfolgter PCR bei einer Annealingtemperatur = 59,5°C, **C** Pyrogramm des unmethylierten Standards nach erfolgter PCR bei einer Annealingtemperatur = 57,6°C, **D** Pyrogramm des methylierten Standards nach erfolgter PCR bei einer Annealingtemperatur = 57,6°C

4.1.5 Primer für Exon 2

Die vom Forward- und Reverse-Primer umschlossene Sequenz beinhaltet 230 Basenpaare. Zwischen Sequencing-Primer und Reverse-Primer liegen 21 CpGs.

Abbildung 22 zeigt einen Teil von Exon 2 des Gens *CDKN2A* mit den entworfenen Primern bzw. deren Bindungsstellen. Die Darstellung zeigt die DNA-Sequenz nach bereits erfolgter Bisulfitkonvertierung.

```

ATTATTTT GTTTTTTTGGTAGGTTATGATGATGGGTAGCGTTCGAGTGGGGAGTTGTTGTTGTTTACGGCCCGGAGTTTAA
TTGCGCGATTCGTTATTTTATTCGATTCGGTACCGCGTTGTTCGGGAGGGTTTTTTGGATACCGTTGGTGGTGTGTATCGG
GTCGGGGCGCGGTTGGACCGTGCGCGATGTTTGGGGTCGTTTGTCGTGGATTGTTGAGGAGTTGGGTTATCGCGATGT
    
```

Abbildung 22 Bindungsstellen der entworfenen Primer für die Pyrosequenzierung eines Teils von Exon 2 in *CDKN2A* [Forward-Primer (rot), Sequencing-Primer (gelb), Bindungsstelle des Reverse-Primers (blau), CpGs (grün)]

In **Abbildung 23** sind die wichtigsten Informationen zu den entworfenen Primern für die untersuchte Region in Exon 2 zusammengefasst. Angegeben sind deren Sequenz, Länge, Schmelztemperatur, aber auch die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von möglicherweise störenden Sekundärstrukturen. Die Primer wurden so entworfen, dass eine Ausbildung von Sekundärstrukturen möglichst vermieden wird.

Primer	Sequenz	Länge [nt]	T _m [°C]	Sekundärstruktur (RNAfold)  (Wahrscheinlichkeit der Basenpaarung)
Forward-Primer	GTTTTTTTGGTAGGTTATGATGATGG	27	62,1	
Reverse-Primer (biotinyliert)	ACCCAATCCTCAACCAAATCC	22	62,1	
Sequencing-Primer	GGAGTTGTTGTTGTTTA	18	46,9	

Abbildung 23 Übersicht der Sequenz, Länge, Schmelztemperatur und Wahrscheinlichkeit der Ausbildung von Sekundärstrukturen der entworfenen Primer für die Pyrosequenzierung der untersuchten Region in Exon 2 von *CDKN2A*

4.1.6 PCR-Amplifikation

Variation der Temperatur des Annealingschrittes

Die Methode wurde bei Annealingtemperaturen von 58,4°C, 59,5°C, 61,0°C und 62,1°C getestet, wobei 62,1°C der zuvor mittels Software abgeschätzten Schmelztemperatur der Primer entspricht. Die experimentellen Informationen sind in Abschnitt **5.4.2.1** angeführt.

4.1.7 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden gemäß dem Beladungsschema (**Tabelle 2**) auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde 62 Minuten bei U=120V laufen gelassen. Das entstandene Elektropherogramm ist **Abbildung 24** ersichtlich.

Tabelle 2 Beladungsschema des in **Abbildung 24** gezeigten Agarosegels mit einem unmethylierten und einem vollständig methylierten Standard zur Ermittlung der optimalen Bedingungen der Amplifikation mittels PCR für die Region in Exon 2 von *CDKN2A*

Aufgabeposition	Annealingtemperatur[°C]	[Primer]	Standard
M			25bp-DNA-Ladder
2	T ₁ =62,1	200nM	0%-Standard
3			100%-Standard
N			NTC
5	T ₂ = 61		0%-Standard
6			100%-Standard
N			NTC
8	T ₃ = 59,5		0%-Standard
9			100%-Standard
N			NTC
11	T ₄ = 58,4		0%-Standard
12			100%-Standard
N			NTC
N			NTC
15	T ₁ =62,1	400nM	0%-Standard
16			100%-Standard
N			NTC
18	T ₂ = 61		0%-Standard
19			100%-Standard
N			NTC
21	T ₃ = 59,5		0%-Standard
22			100%-Standard
N			NTC
24	T ₄ = 58,4		0%-Standard
25			100%-Standard
N			NTC
M			25bp-DNA-Ladder

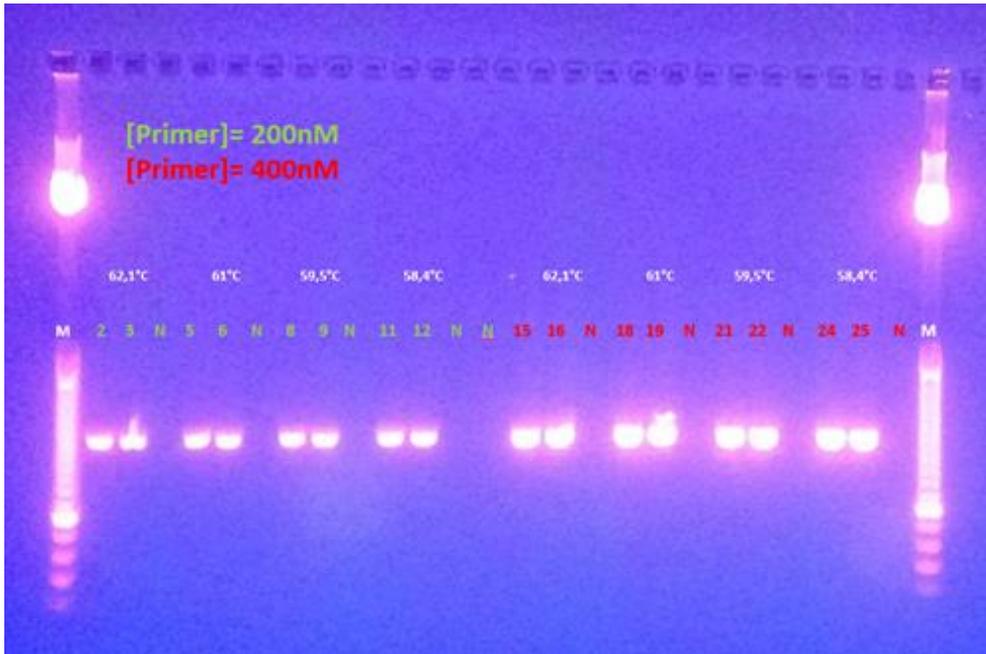


Abbildung 24 Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese zur Ermittlung der optimalen PCR Bedingungen. Primerkonzentration: 200nM oder 400nM; Annealingtemperatur: 62,1°C, 61°C, 59,5°C oder 58,4°C. Das Beladungsschema ist in **Tabelle 2** angegeben.

Da für PCR-Produkte, die mit einer Primerkonzentration von 400nM gebildet wurden, stärkere Banden erhalten wurden, wurden alle folgenden Experimente mit einer Primerkonzentration von 400nM durchgeführt. Da es bei der Annealingtemperatur von 62,1°C nicht zur Bildung von Nebenprodukten kam, scheinen die Primer spezifisch an die Template-DNA gebunden zu haben. PCR-Produkte, die mit einer Primerkonzentration von 400nM bei einer Annealingtemperatur von 62,1°C erhalten wurden, wurden im Anschluss sequenziert. Die dazugehörigen Pyrogramme sind in **Abbildung 26** ersichtlich.

Abbildung 25 zeigt ein Pyrogramm der vollständigen Sequenz, welche mit den entworfenen Primern amplifiziert wurde. Da diese jedoch mit 145bp sehr lang ist und die Sensitivität als auch die Zuverlässigkeit des ermittelten Methylierungsstatus mit zunehmender Länge abnehmen, wurden für die Auswertung der Ergebnisse nur die ersten elf CpGs herangezogen.

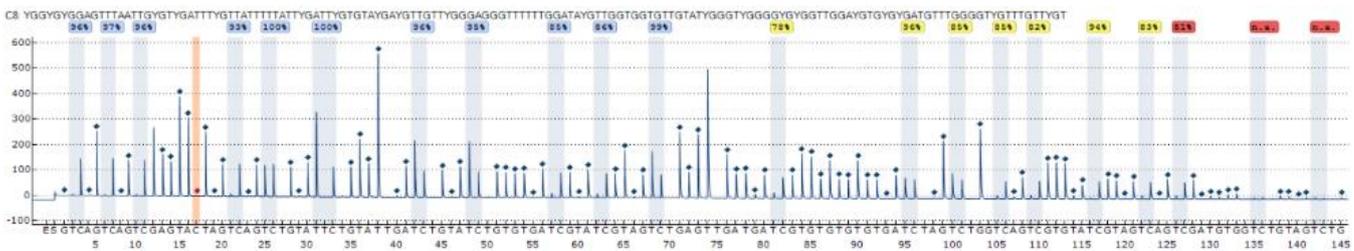


Abbildung 25 Vollständiges Pyrogramm des methylierten Standards, amplifiziert mit dem entworfenen Primerpaar für die Region in Exon 2 von *CDKN2A*. Die untersuchte Region von Exon 2 umfasst 145bp und 21 CpGs. Da mit steigender Länge die Sensitivität und Zuverlässigkeit der erhaltenen Ergebnisse abnehmen, wurden lediglich die ersten elf CpGs für die Auswertung berücksichtigt.

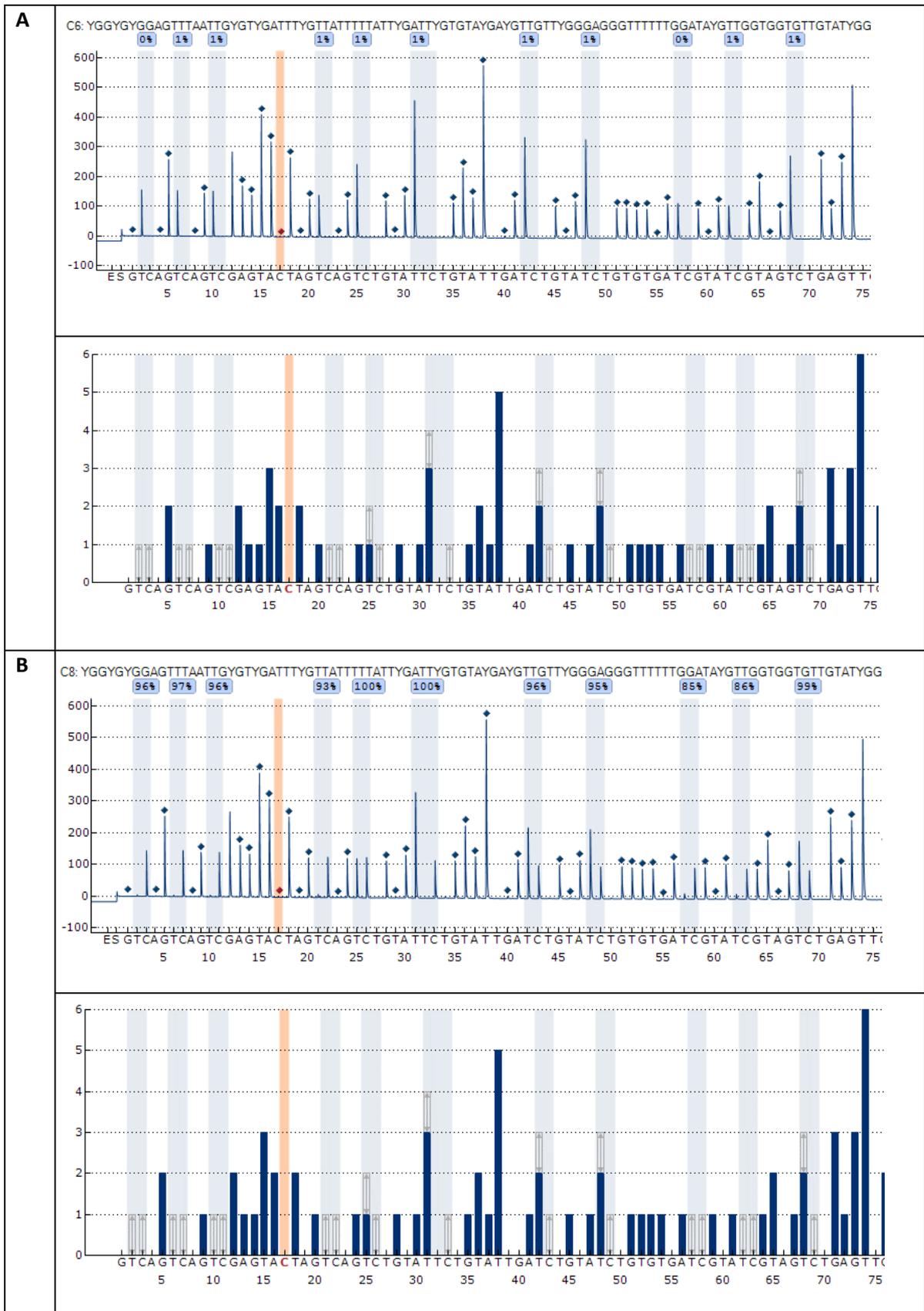


Abbildung 26 Pyrogramme des unmethylierten und vollständig methylierten Standards, amplifiziert mit den entworfenen Primern für die Region in Exon 2 von *CDKN2A*, welche zur Optimierung der Methode genutzt wurden. **A** Pyrogramm des unmethylierten Standards nach erfolgter PCR bei einer Annealingtemperatur = 62,1°C, **B** Pyrogramm des methylierten Standards nach erfolgter PCR bei einer Annealingtemperatur = 62,1°C

4.2 Methylierungsstatus von *CDKN2A* in kommerziellen Brustkrebszelllinien

4.2.1 Proben

Informationen zu den Brustkrebszelllinien, die mit den entwickelten Methoden zur Bestimmung der Methylierungsstatus der ausgewählten CpGs in der Promotorregion und Exon 2 von *CDKN2A* untersucht wurden, sind in **Tabelle 3** zusammengefasst.

Tabelle 3 Übersicht der verwendeten kommerziell erhältlichen Brustkrebszelllinien. Angeführt sind Gewebe, Morphologie, Erkrankung, Alter der Patientinnen, Geschlecht, Ethnie, als auch der Subtyp/Hormonrezeptorstatus. Triple-negative Zelllinien besitzen keine therapierelevante Expression des Östrogenrezeptors (ER), des Progesteronrezeptors (PR) und des human epidermal growth factor receptors 2 (HER2)

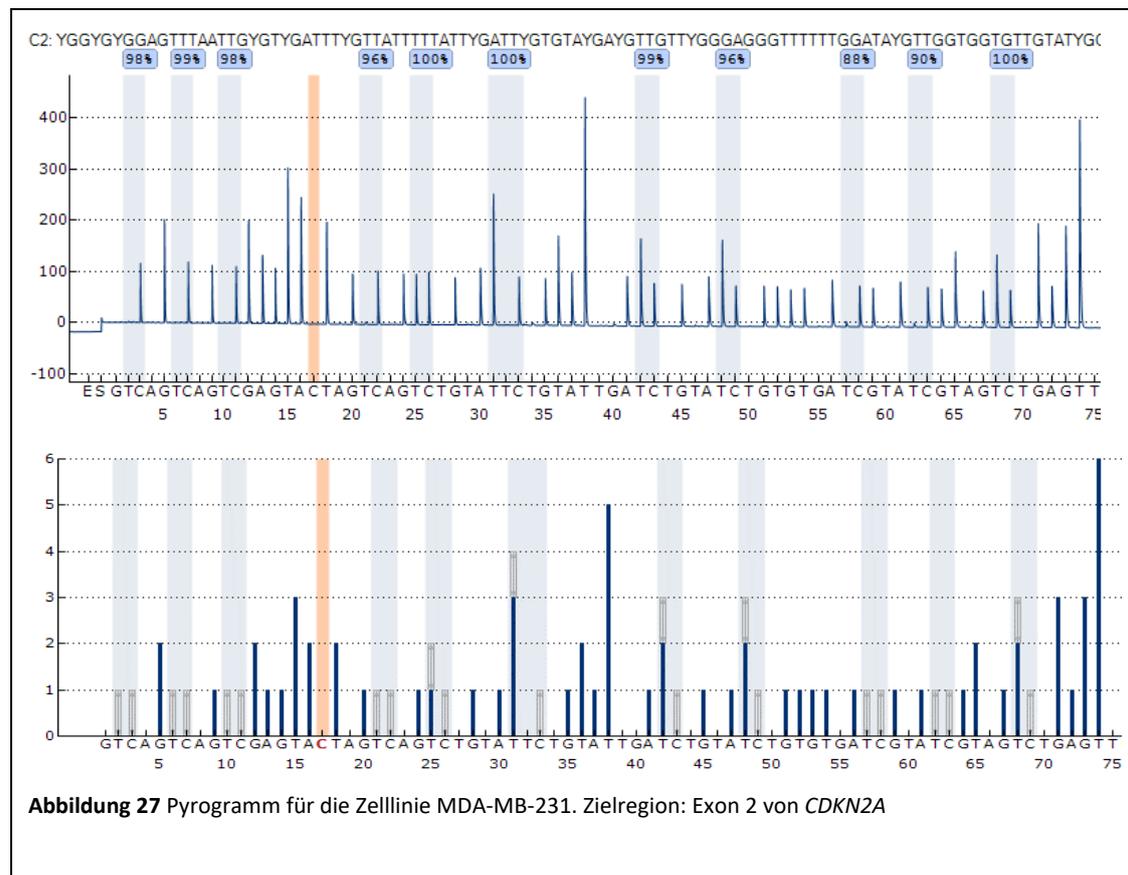
Epithelzellen des Brustgewebes	Gewebe	Morphologie	Erkrankung	Alter [Jahre]	Geschlecht	Ethnie	Subtyp/ Hormonrezeptorstatus
MDA-MB-231 [70,71]	Brustdrüse, Pleuraerguss aus Metastase	epithelial	Adenokarzinom	51	weiblich	kaukasisch	basal, triple-negativ
MDA-MB-468 [67]	Brustdrüse, Pleuraerguss aus Metastase	epithelial	Adenokarzinom	51	weiblich	schwarz	basal, triple-negativ
MCF-7 [68–70]	Brustdrüse	epithelial	Karzinom	69	weiblich	kaukasisch	Luminal A (ER positiv, und/oder PR positiv, HER2 negativ)
T47D [68,70]	Brustdrüse, Pleuraerguss aus Metastase	epithelial	Duktales Karzinom	54	weiblich	kaukasisch	Luminal A (ER positiv, und/oder PR positiv, HER2 negativ)
ZR-75-1 [69]	Brustdrüse, Flüssigkeitsansammlung aus Metastase (Asziten)	epithelial	Duktales Karzinom	63	weiblich	kaukasisch	Luminal A (ER positiv, und/oder PR positiv, HER2 negativ)
SKBR 3/38 [70]	Brustdrüse	epithelial	Adenokarzinom	43	weiblich	kaukasisch	HER2 Überexpression, ER negativ, PR negativ
BT20/ HTB19 [66]	Brustdrüse	epithelial	Karzinom	74	weiblich	kaukasisch	basal, triple-negativ

4.2.2 Ergebnisse

MDA-MB-231

Der Methylierungsstatus der sich in der Promotorregion von *CDKN2A* befindenden CpGs von MDA-MB-231 konnte nicht bestimmt werden, da kein PCR-Produkt erhalten wurde.

Die Pyrosequenzierung der für die Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* erhaltenen PCR-Produkte hat gut funktioniert. Ein repräsentatives Pyrogramm ist in **Abbildung 27** zu sehen. Das erhaltene Pyrogramm weist durchgehend hohe Peaks auf und das erhaltene Peakmuster stimmt mit dem Histogramm überein. Zwei der drei durchgeführten technischen Replikate ließen auf einen hohen Methylierungsstatus, das dritte technische Replikat hingegen auf einen niedrigen Methylierungsstatus der CpGs schließen. Da bei dem dritten technischen Replikat die Zuverlässigkeit der erhaltenen Ergebnisse als sehr unsicher eingestuft wurden, wurden diese Ergebnisse nicht in weiterführende Betrachtungen miteinbezogen. Der Methylierungsstatus von CpG 1-8 und CpG 11 lag über dem ULOQ (95%). Auch CpG 9 und CpG 10 waren mit einem Methylierungsstatus von 88% bzw. 90% hoch methyliert.



Die relative Genexpression konnte für MDA-MB-231 nicht bestimmt werden, da mit den entsprechenden Primern kein Produkt erhalten wurde. Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse wurde nach der PCR eine Gelelektrophorese durchgeführt. Das Elektropherogramm ist in **Abbildung 28** dargestellt, das dazugehörige Beladungsschema ist in **Tabelle 4** angegeben. Das Elektropherogramm bestätigte, dass mit dem verwendeten Primerpaar (INK4a) kein PCR-Produkt der erwarteten Länge (122bp) gebildet wurde. In der Literatur wurden Hinweise darauf gefunden, dass dies auf homozygote Deletion zurückzuführen sein könnte. [72]



Abbildung 28 Elektropherogramm von Proben, für welche das Ausmaß der Genexpression nicht bestimmt werden konnte. Proben, die auf den Positionen 1-9 (weiß) aufgegeben wurden, wurden mit dem Primerpaar p16INK4a amplifiziert. Die Positionen 10-25 (gelb) wurden mit Proben beladen, welche mit dem Primerpaar GAPDH zur Bestimmung des Housekeeping-Gens *GAPDH* amplifiziert wurden. M (Marker). Das Beladungsschema ist in **Tabelle 4** angeführt

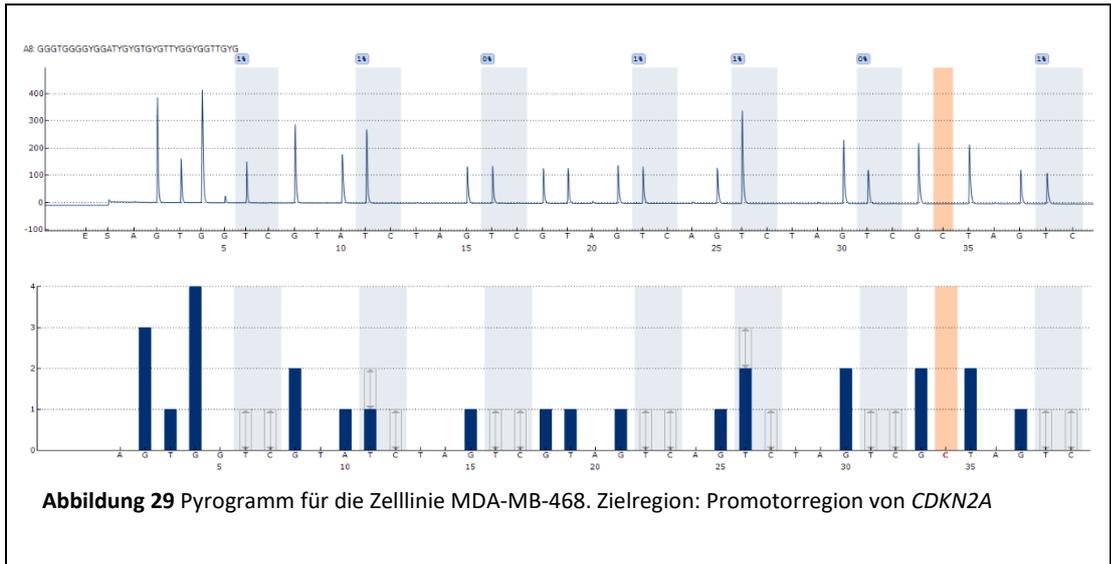
Tabelle 4 Beladungsschema des in **Abbildung 28** gezeigten Elektropherogramms zur Überprüfung der Bildung von PCR-Produkten bei der Genexpressionsanalyse

Aufgabeposition	Probe	Verwendete Primer
M	Marker (25bp DNA Ladder)	-----
1	MCF-7	p16INK4a
2	MCF-7	
3	MCF-7	
4	MCF-7	
5	MDA-MB-231	
6	MDA-MB-231	
7	BT20/HTB19	
8	BT20/HTB19	
9	BT20/HTB19	
10	BT20/HTB19	
11	BT20/HTB19	
12	BT20/HTB19	
13	BT20/HTB19	
14	MDA-MB-231	
15	MDA-MB-231	
16	MDA-MB-231	
17	MDA-MB-231	
18	MCF-7	
19	MCF-7	
20	MCF-7	
21	MCF-7	
22	MCF-7	
23	MCF-7	
24	MCF-7	
25	MCF-7	
M	Marker (25bp DNA Ladder)	-----

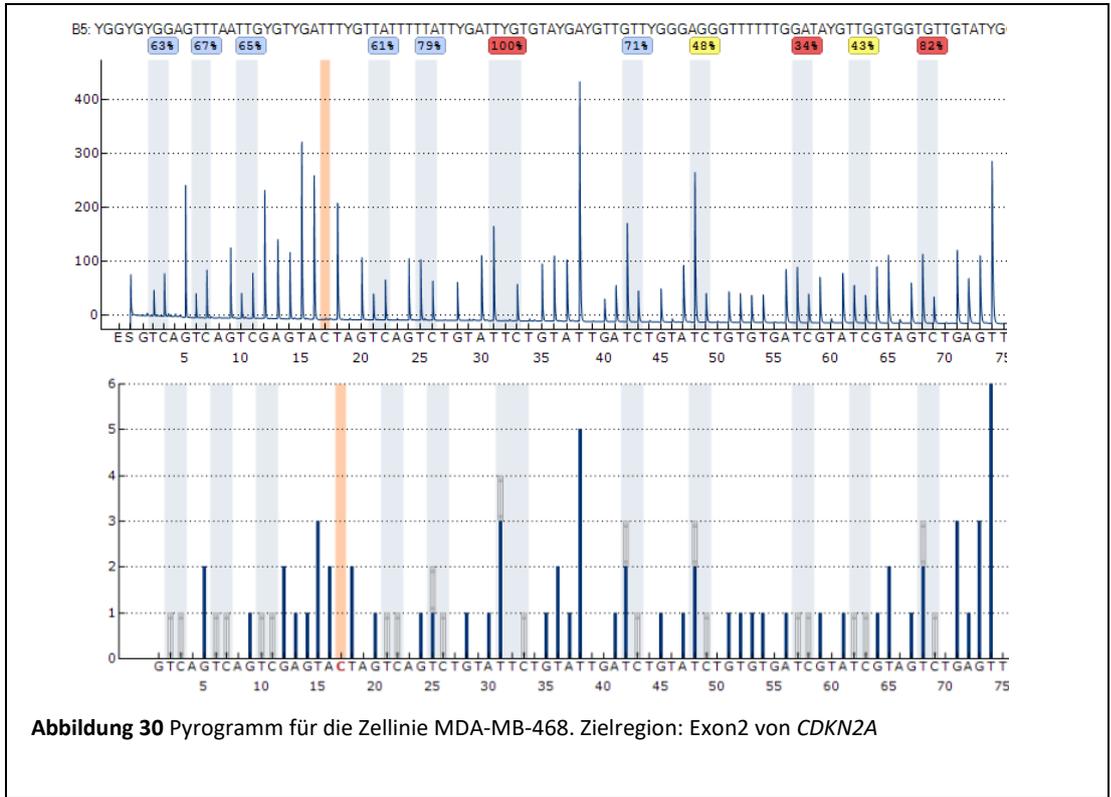
MDA-MB-468

Für die Zelllinie MDA-MB-468 konnte der Methylierungsstatus beider Zielregionen, in der Promotorregion und in Exon 2, ermittelt werden.

Wie in **Abbildung 29** ersichtlich, war die Promotorregion unmethyliert, der Methylierungsstatus jedes der sieben CpGs lag unter dem LOQ. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Literatur. [72] Da das Peakmuster dem Histogramm entsprach und keine Warnhinweise auftraten, können die Ergebnisse als zuverlässig angesehen werden.



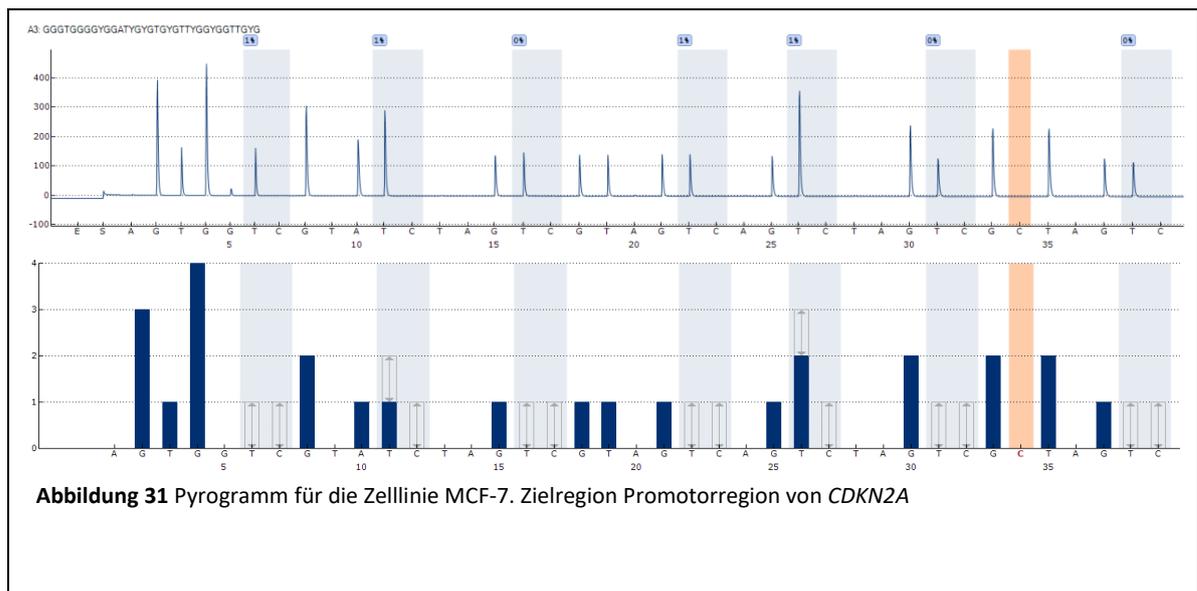
Ein repräsentatives Pyrogramm für die Zielregion in Exon 2 ist in **Abbildung 30** gezeigt. CpG 1-5 und CpG 7 wiesen einen Methylierungsstatus von 61-79% auf. Die Ergebnisse für CpG 6, CpG 9 und CpG 11 waren mit dem Warnhinweis „geringe Zuverlässigkeit (rot)“, die für CpG 8 und CpG 10 mit dem Warnhinweis „mäßige Zuverlässigkeit (gelb)“ versehen. Ergebnisse, die eine geringe Zuverlässigkeit aufwiesen, wurden nicht in statistischen Analysen berücksichtigt.



Der bei der Genexpressionsanalyse ermittelte $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert, bezogen auf die Zelllinie SW480, lag mit 10,9 sehr hoch (**Abbildung 45**).

MCF-7

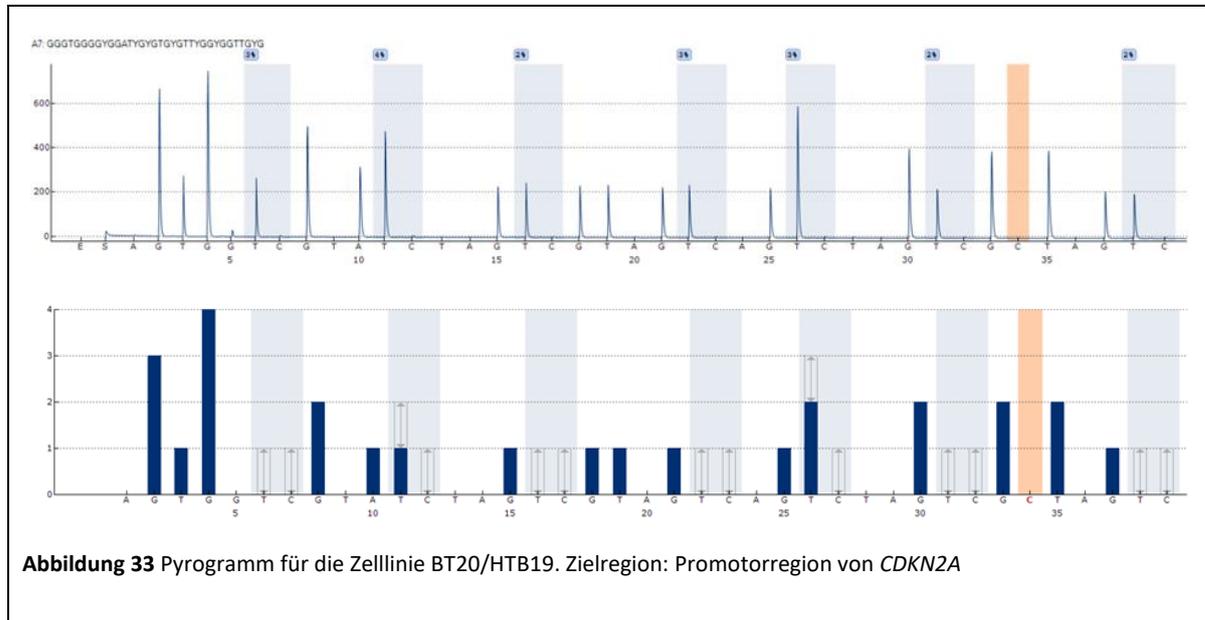
Der Methylierungsstatus der CpGs im *CDKN2A*-Promotor war für die Zelllinie MCF-7 gut bestimmbar. Ein repräsentatives Pyrogramm ist in **Abbildung 31** dargestellt. Für alle CpGs wurde ein Methylierungsstatus < LOQ ermittelt, die Promotorregion von MCF-7 war somit unmethyliert. Das erhaltene Peakmuster entspricht dem Histogramm und der Methylierungsstatus konnte zuverlässig bestimmt werden.



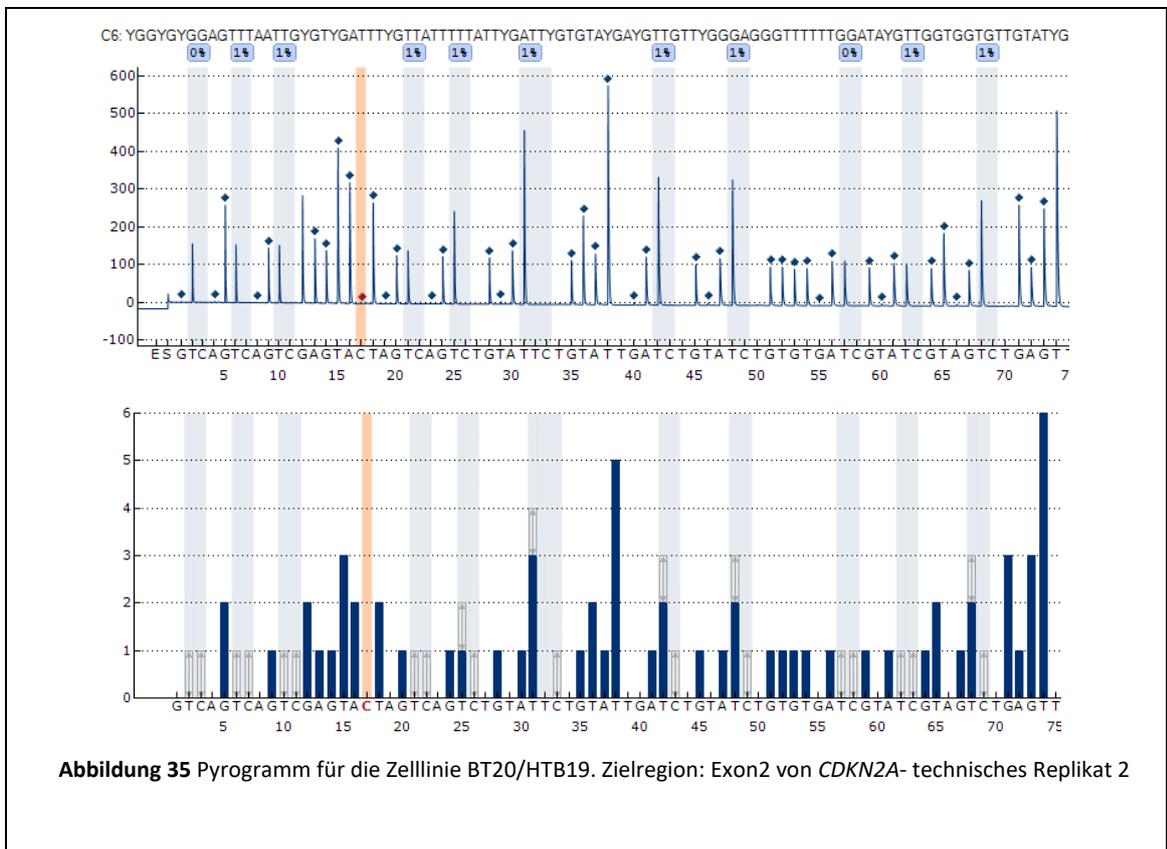
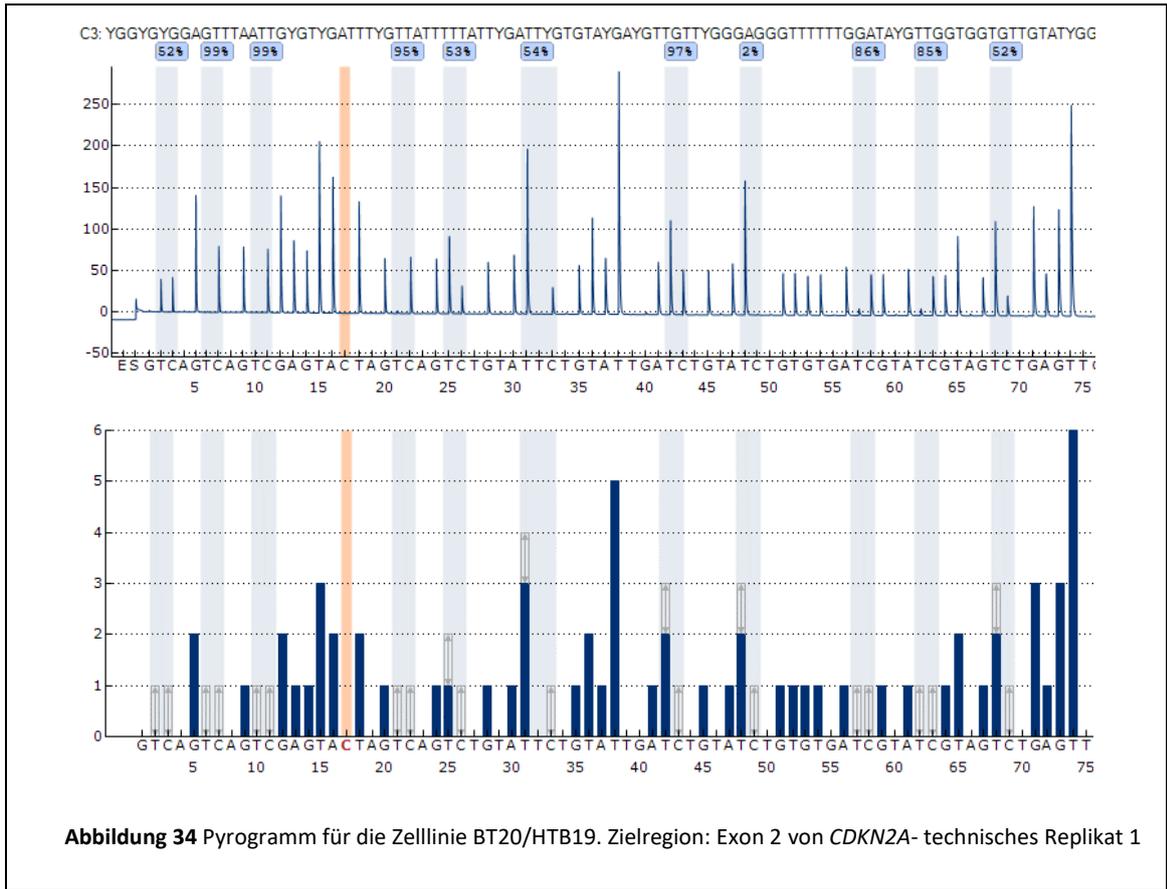
Die Pyrosequenzierung der ausgewählten Region in Exon 2 von *CDKN2A* ergab für jedes der elf CpGs einen hohen Methylierungsstatus. Das dazugehörige Pyrogramm ist in **Abbildung 32** dargestellt. Der Methylierungsstatus der CpGs 1-7 lag über ULOQ (95%). CpG 8-10 waren mit einem Methylierungsstatus von 86%-94% hoch methyliert, nur CpG 11 wies mit 55% einen deutlich niedrigeren Methylierungsstatus auf.

BT20/HTB19

Der Methylierungsstatus der sieben CpGs in der Promotorregion von *CDKN2A* war in der Zelllinie BT20/HTB19 unter dem LOQ (**Abbildung 33**). Für eines von drei technischen Replikaten wurde kein Sequenzierergebnis erhalten, das Pyrogramm wies keine Peaks auf.



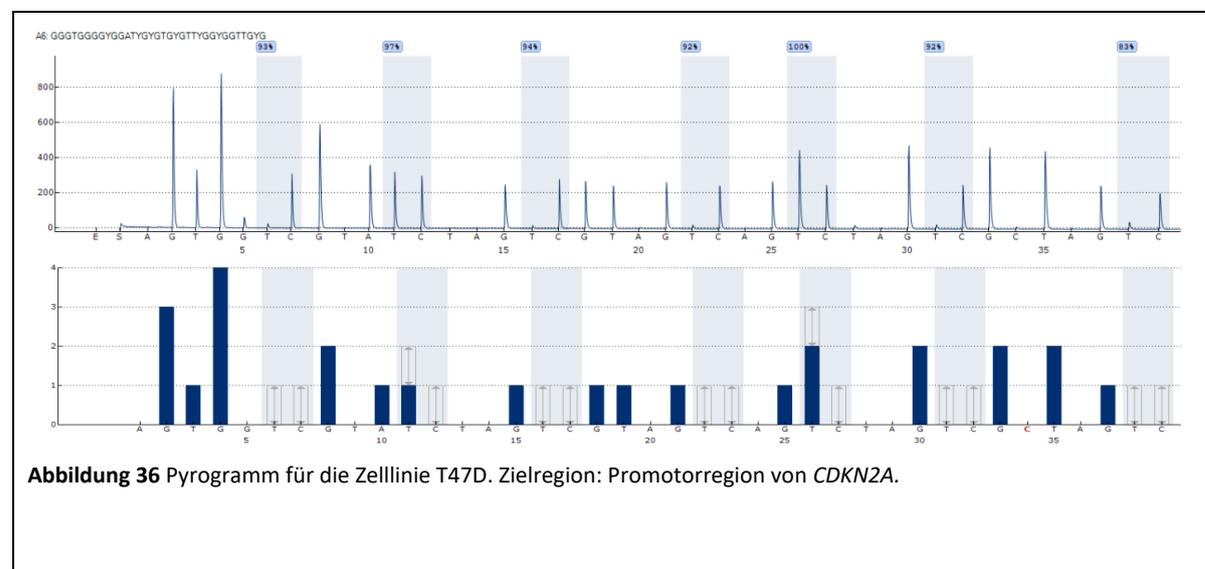
Auch bei der Bestimmung des Methylierungsstatus der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* kam es zu stark streuenden Ergebnissen (**Abbildung 34**, technisches Replikat-1 und **Abbildung 35**, technisches Replikat-2). Für das technische Replikat-1 wurde eine heterogene Methylierung erhalten. CpG 1, CpG 5-6 und CpG 11 waren in etwa zu 50% methyliert, während CpG 2-4, CpG 7, CpG 9 und CpG 10 einen hohen Methylierungsstatus von über 80% aufwiesen. Der Methylierungsstatus des CpG 8 lag hingegen unter dem LOQ. Im Fall des technischen Replikats-2 lag der Methylierungsstatus von allen CpGs unter dem LOQ. Da für keines der beiden Replikate Warnmeldungen erhalten wurden, liegt der Verdacht nahe, dass sich die einzelnen DNA-Stränge im Extrakt der Zelllinie BT20/HTB19 sehr stark im Methylierungsstatus unterschieden und für verschiedene Aliquote (technische Replikate) unterschiedliche Ergebnisse erhalten wurden.



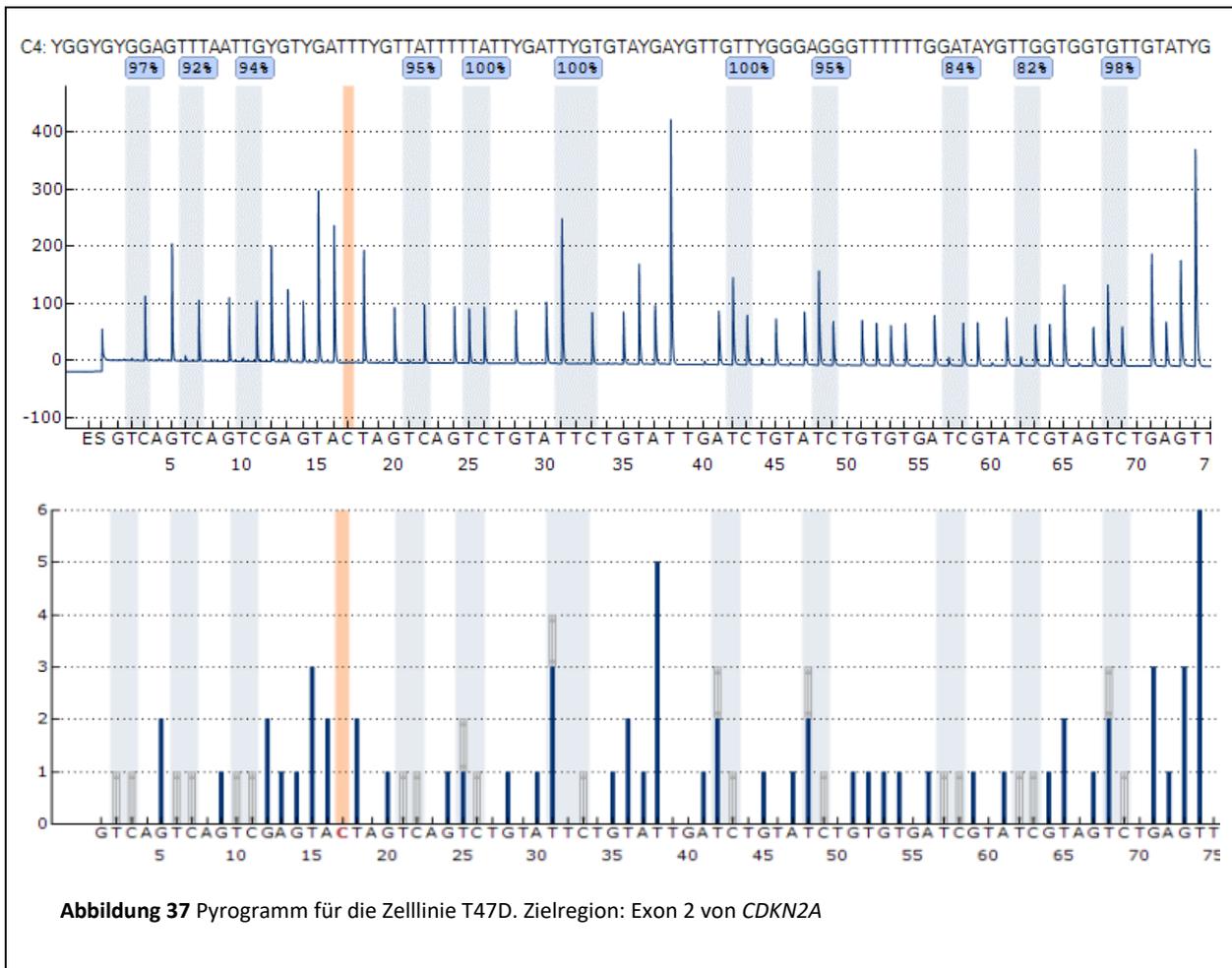
Die relative Genexpression in der Zelllinie BT20/HTB19 konnte nicht bestimmt werden, da mit dem verwendeten Primerpaar (INK4a) keine PCR-Produkte der erwarteten Länge erhalten wurden. (**Abbildung 28**). Laut Literatur liegt die Ursache an einer homozygoten Deletion des Gens in dieser Zelllinie. [72]

T47D

In der Zelllinie T47D waren die sieben untersuchten CpGs der Promotorregion von *CDKN2A* durchwegs hoch methyliert, wie in **Abbildung 36** ersichtlich. Das erhaltene Peakmuster stimmt mit dem Histogramm überein. Der hohe Methylierungsstatus der sieben CpGs in der Promotorregion von *CDKN2A* deckt sich mit Ergebnissen in der Literatur. [72]



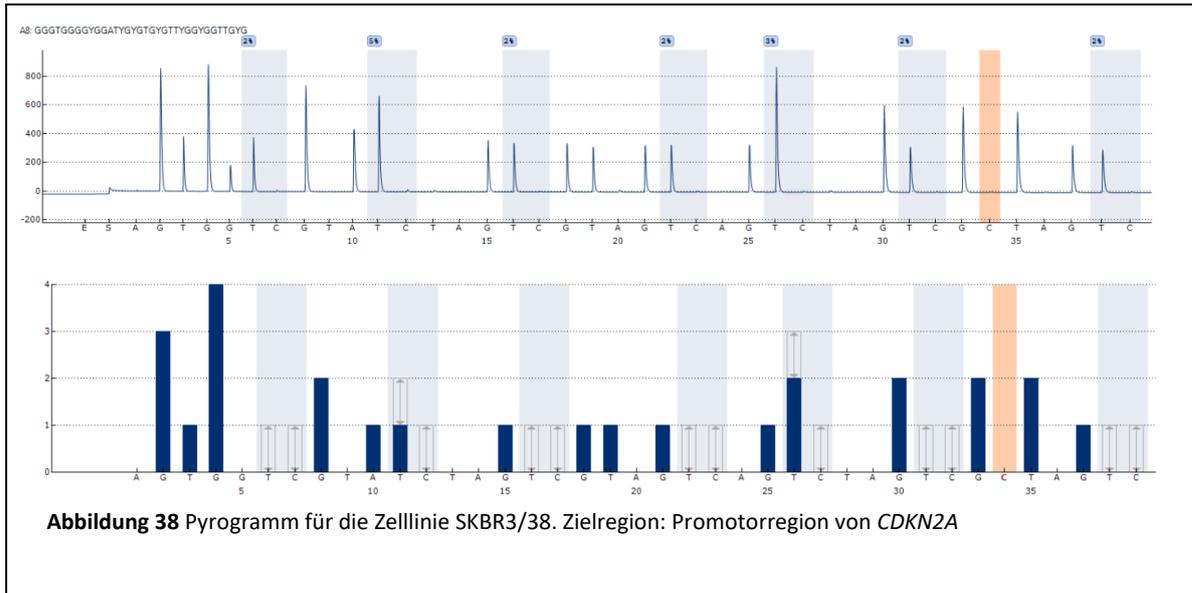
Ein repräsentatives Pyrogramm für die Zielregion in Exon 2 ist in **Abbildung 37** dargestellt. Jedes der elf CpGs war hoch methyliert.



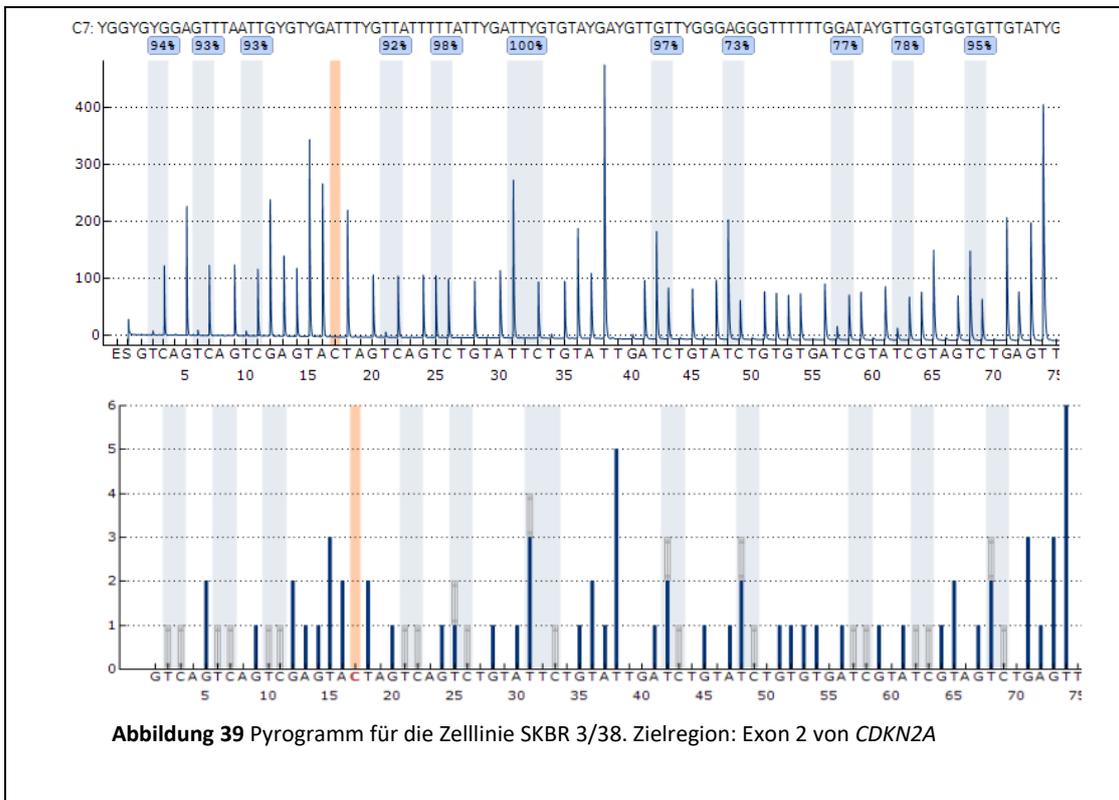
Das Ausmaß der Genexpression konnte ermittelt werden, mit einem $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert von 7,8 war die relative Genexpression im Vergleich zu jener in anderen Proben hoch (**Abbildung 45**).

SKBR 3/38

Ein repräsentatives Pyrogramm der Promotorregion von *CDKN2A* für die Zelllinie SKBR 3/38 ist in **Abbildung 38** dargestellt. Der Methylierungsstatus aller sieben CpGs lag unter dem LOQ, was mit Ergebnissen in der Literatur übereinstimmt. [72]



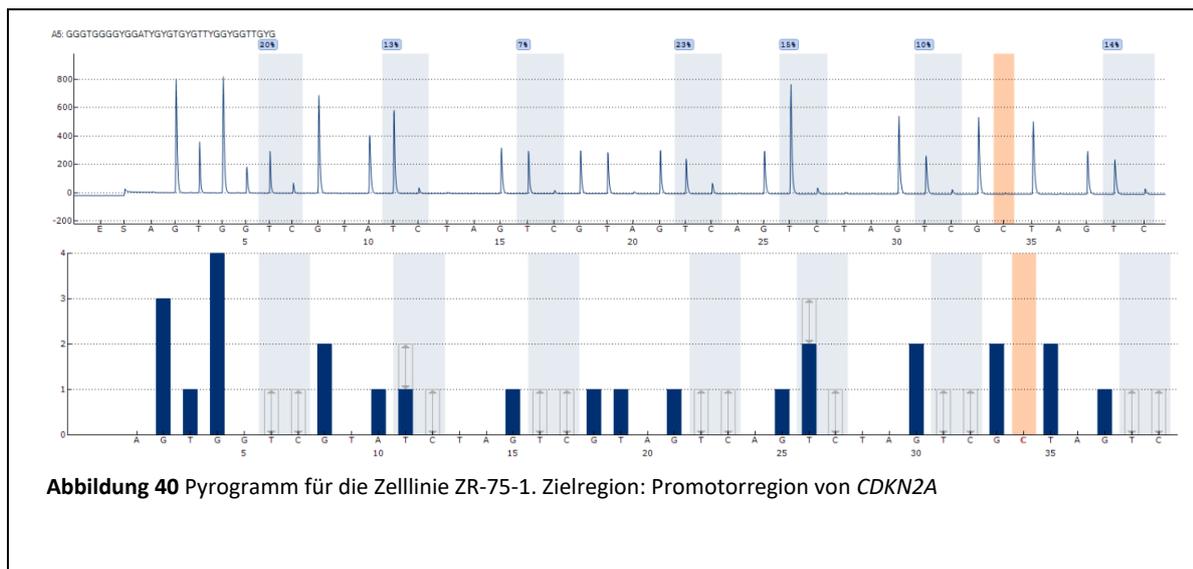
Das in **Abbildung 39** dargestellte Pyrogramm zeigt, dass der Methylierungsstatus von CpG 5-7 und CpG 11 über dem ULOQ lagen. Aber auch CpG 1-4 und CpG 8-10 wiesen mit 73%-94% einen hohen Methylierungsstatus auf.



Das Ausmaß der Genexpression war mit einem $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert von 7 ähnlich wie in der Zelllinie T47D.

ZR-75-1

Ein repräsentatives Pyrogramm der Promotorregion von *CDKN2A* für die Zelllinie ZR-75-1 ist in **Abbildung 40** gezeigt. Die sieben CpGs der Promotorregion wiesen eine moderate Methylierung zwischen 7% und 20% auf. Die erhaltenen Ergebnisse stimmen mit jenen aus der Literatur überein. [72] Die mit der neu entwickelten Methode erhaltenen Ergebnisse lassen auf eine einigermaßen heterogene Methylierung schließen. CpG 1 und CpG 4 hatten einen Methylierungsstatus von 20% bzw. 23%, während CpG 3 und CpG 6 deutlich niedriger methyliert waren.



In Exon 2 von *CDKN2A* wiesen die elf untersuchten CpGs einen hohen Methylierungsstatus von über 73% auf (**Abbildung 41**).

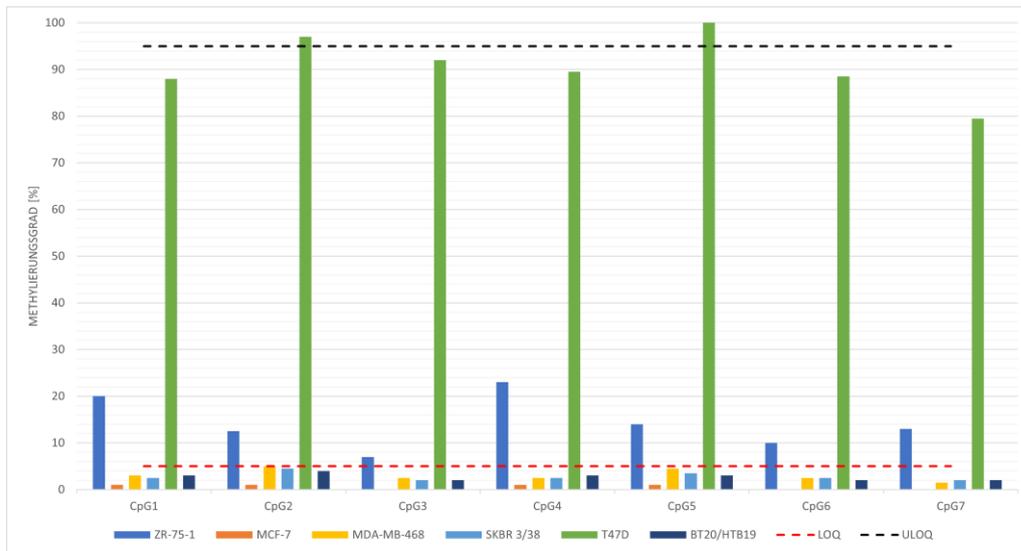


Abbildung 42 Methylierungsgrad der sieben CpGs in der Zielregion des *CDKN2A* Promotors in kommerziellen Brustkrebszelllinien. Gezeigt sind die Mittelwerte aus den technischen Replikaten. (Die rote Linie zeigt LOQ=5%, die schwarze Linie ULOQ=95%)

Generell war die Zielregion in Exon 2 höher methyliert als jene in der Promotorregion. Von der Zelllinie BT20/HTB19 sind die Ergebnisse zweier technischer Replikate einzeln aufgetragen, da sich der erhaltene Methylierungsstatus stark voneinander unterschied (siehe Abschnitt 4.2.2). Während ein technisches Replikat bei allen CpGs zu einem Methylierungsstatus < LOQ führte, führte das andere technische Replikat zu einem deutlich höheren Methylierungsstatus und die Ergebnisse ließen auf eine heterogene Methylierung schließen. Eine heterogene Methylierung wurde auch bei der Zelllinie MDA-MB-468 beobachtet.

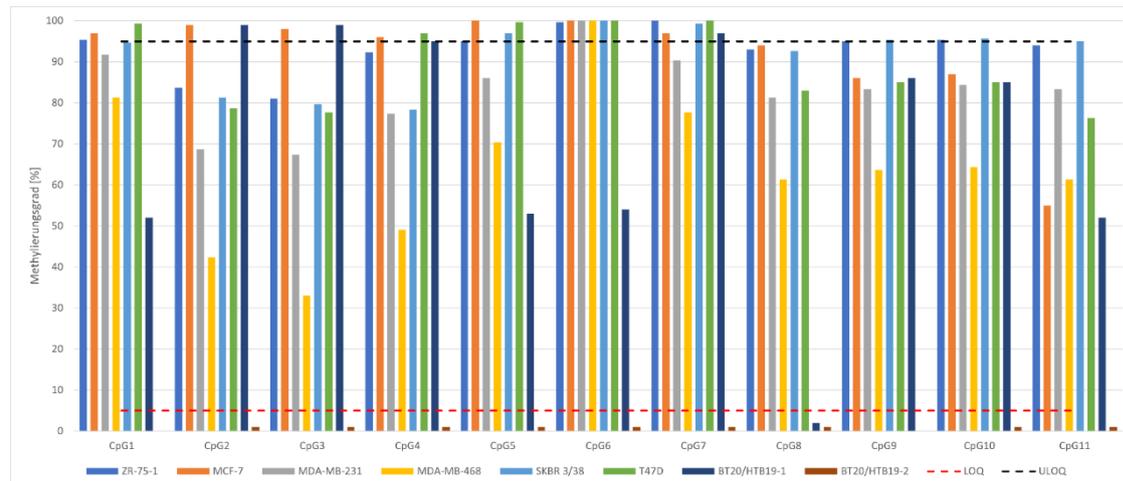
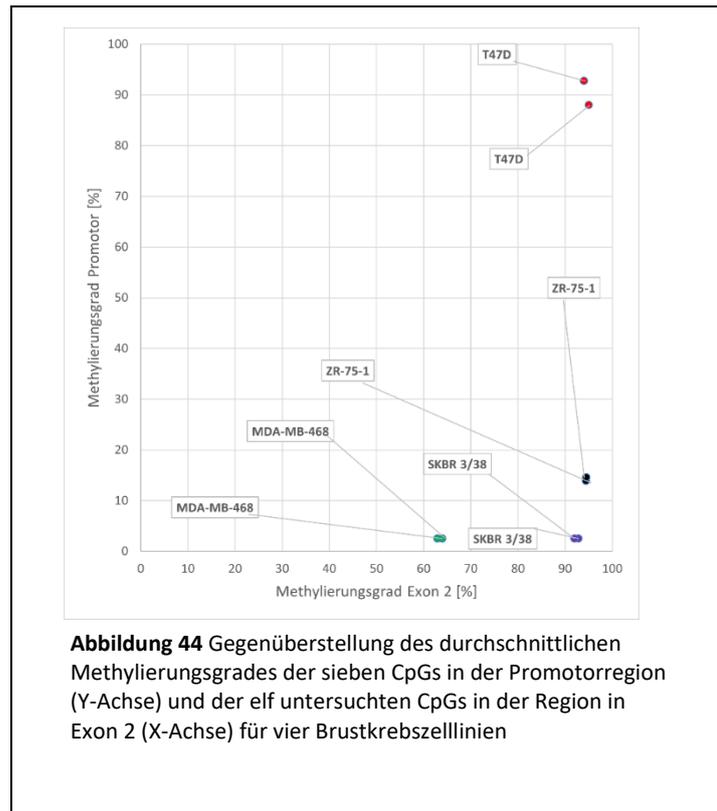
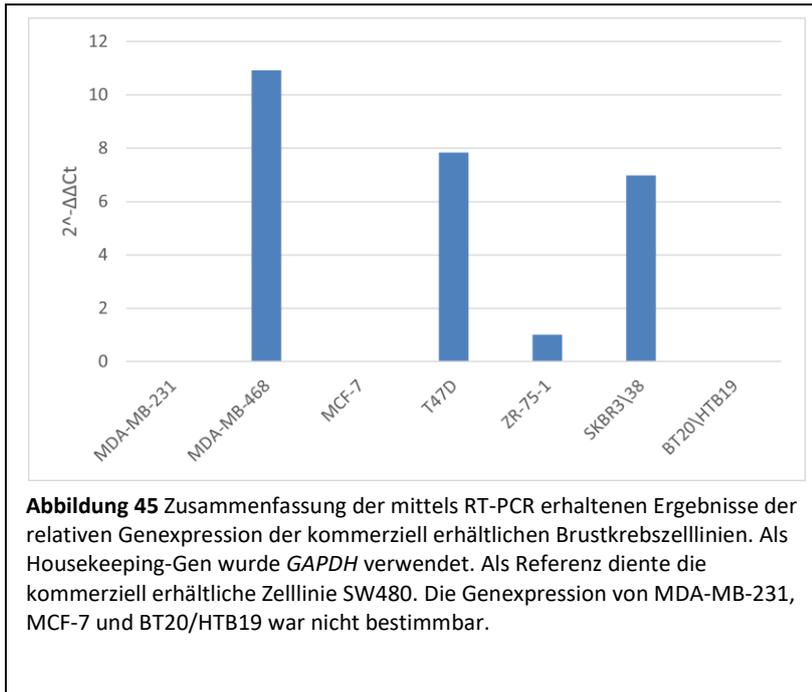


Abbildung 43 Methylierungsgrad der elf CpGs in der Zielregion Exon 2 von *CDKN2A* in kommerziellen Brustepithelzelllinien. Gezeigt sind die Mittelwerte. (Die rote Linie zeigt LOQ=5%, die schwarze Linie zeigt ULOQ=95%)

In **Abbildung 44** ist für vier Brustkrebszelllinien der durchschnittliche Methylierungsstatus der sieben CpGs in der Zielregion des *CDKN2A* Promotors gegen den durchschnittlichen Methylierungsstatus der elf CpGs in der Zielregion von Exon 2 aufgetragen. Es konnte keine Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus im Promotor und dem in Exon 2 festgestellt werden. Die Ergebnisse der statistischen Analysen sind in Abschnitt **6.3.3.1** angeführt.



Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse sind in **Abbildung 45** zusammengefasst. Als Referenz wurde die Zelllinie SW480 verwendet. Das Ausmaß der Genexpression der Brustkrebszelllinien MDA-MB-231, MCF-7 und BT20/HTB19 war nicht bestimmbar. Die höchste Genexpression wies die Zelllinie MDA-MB-468 auf, gefolgt von den Zelllinien T47D, SKBR 3/38 und ZR-75-1.



In **Abbildung 46** und **Abbildung 47** sind die bei der Genexpressionsanalyse erhaltenen $\Delta\Delta C_t$ -Werte gegen den durchschnittlichen Methylierungsstatus der sieben CpGs in der Promotorregion bzw. der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* aufgetragen. Weder der durchschnittliche Methylierungsstatus der sieben CpGs im Promotor noch der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 korrelierte mit der relativen Genexpression. Die Ergebnisse der statistischen Analysen sind in Abschnitt 6.3.3.2 angeführt.

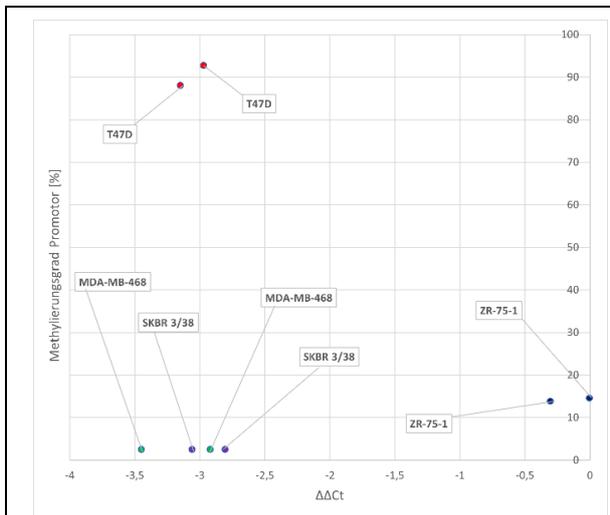


Abbildung 46 Gegenüberstellung des durchschnittlichen Methylierungsgrades der sieben CpGs im *CDKN2A*-Promotor (Y-Achse) und den erhaltenen $\Delta\Delta C_t$ -Werten (X-Achse) für vier Brustkrebszelllinien. Als Housekeeping-Gen wurde *GAPDH* verwendet, als Referenz diente die Zelllinie SW480.

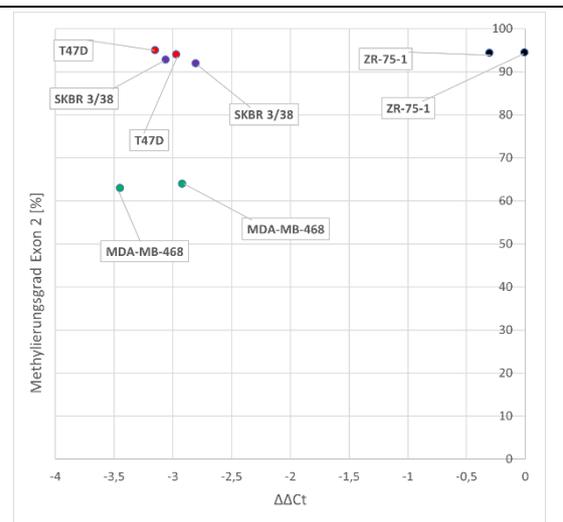


Abbildung 47 Gegenüberstellung des durchschnittlichen Methylierungsgrades der elf CpGs in der Region in Exon 2 von *CDKN2A* (Y-Achse) und den erhaltenen $\Delta\Delta C_t$ -Werten (X-Achse) für vier Brustkrebszelllinien. Als Housekeeping-Gen wurde *GAPDH* verwendet, als Referenz diente die Zelllinie SW480.

Tabelle 5 enthält zusätzlich zum durchschnittlichen Methylierungsstatus der zwei untersuchten Regionen und der relativen Genexpression auch den Hormonrezeptorstatus bzw. den molekularen Subtyp der einzelnen Brustkrebszelllinien. Zwischen dem durchschnittlichen Methylierungsstatus der CpGs in der Promotorregion von *CDKN2A* bzw. dem durchschnittlichen Methylierungsstatus der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 und dem jeweiligen Hormonrezeptorstatus der Zelllinien konnte keine Assoziation festgestellt werden.

Tabelle 5 Übersicht der Ergebnisse für die kommerziell erhältlichen Brustkrebszelllinien. Angegeben ist der durchschnittliche Methylierungsstatus der Promotorregion und der untersuchten Region in Exon 2 von *CDKN2A*. ([-]= Methylierungsstatus <LOQ), [-]= Methylierungsstatus 5-40%), [+]= Methylierungsstatus 41-70%, [++]= Methylierungsstatus >70%). Bei BT20/HTB19 sind für die Region in Exon 2 die Ergebnisse der einzelnen technischen Replikate angeführt. Spalte 4 gibt die relative Genexpression an ([-] $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert <1,5; [+] $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert 5-10; [++] $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Wert >10), Spalte 5 den molekularen Subtyp bzw. den Hormonrezeptorstatus der Brustkrebszelllinien

Brustkrebszelllinie	Methylierungsstatus Promotorregion	Methylierungsstatus Region in Exon 2	Relative Genexpression	Subtyp/ Hormonrezeptorstatus
MDA-MB-231	nicht bestimmbar	[++]	nicht bestimmbar	basal, triple-negativ
MDA-MB-468	[-]	[+]	[++]	basal, triple-negativ
MCF-7	[-]	[++]	nicht bestimmbar	Luminal A
T47D	[++]	[++]	[+]	Luminal A
ZR-75-1	[-]	[++]	[-]	Luminal A
SKBR-3/38	[-]	[++]	[+]	HER2 Überexpression, ER negativ, PR negativ
BT20/HTB19	[-]	[-]/[++]	nicht bestimmbar	basal, triple-negativ

4.2.4 Diskussion

Mit der entwickelten Pyrosequenziermethode konnte der Methylierungsstatus der sieben CpGs im *CDKN2A*-Promotor in allen Brustkrebszelllinien mit Ausnahme der Zelllinie MDA-MB-231 bestimmt werden. Es wurden hohe Peaks erhalten, und das Peakmuster entsprach dem Histogramm. Der ermittelte durchschnittliche Methylierungsstatus des *CDKN2A*-Promotors stimmte mit Ergebnissen in der Literatur überein. Die entdeckte Heterogenität der Methylierung in der Zelllinie ZR-75-1 zeigt den Vorteil der entwickelten Methode, da hier, mittels Pyrosequenzierung, im Vergleich zu einer Bestimmung mittels MS-HRM, ein größerer Informationsgehalt gewonnen wird.

Dies gilt im Besonderen auch für die entwickelte Methode zur Bestimmung der Methylierungsstatus der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A*, da hier bei mehreren der untersuchten kommerziellen Brustkrebszelllinien eine heterogene Methylierung festgestellt wurde. Wie auch schon in der zuvor durchgeführten internen Studie an Tumorgewebe von Brustkrebspatientinnen [30] wurde auch bei allen kommerziellen Brustkrebszelllinien ein hoher Methylierungsstatus der elf untersuchten CpGs in Exon 2 von *CDKN2A* festgestellt. Ob die CpGs in Exon 2 von *CDKN2A* auch in Tumorzellen von Brustkrebspatientinnen heterogen methyliert sind, wäre ein spannendes Thema zukünftiger Forschungen.

Die Vermutung der an Brustkrebspatientinnen durchgeführten internen Studie [30], dass die Hypermethylierung von Exon 2 in Zusammenhang mit dem jeweiligen molekularen Subtyp (Rezeptorstatus) des Tumors steht, konnte an den elf in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* untersuchten CpGs in den kommerziellen Brustkrebszellen mit der entwickelten Methode nicht bestätigt werden. Hier war jedoch auch die geringe Anzahl an Proben und die Zusammenstellung (3x Luminal A, 3x triple-negativ, 1x HER2 positiv) die Aussagekraft betreffend, limitierend.

Der Erhalt eines stark divergierenden Methylierungsstatus für die untersuchten CpGs in der Zielregion von Exon 2 bei der Analyse mehrerer technischer Replikate der Zelllinie BT20/HTB19 bedarf weiterer Untersuchungen. Hierfür wurde in der Literatur keine Erklärung gefunden.

Eine Korrelation zwischen dem Methylierungsstatus in der Promotorregion bzw. der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* und der relativen Genexpression der kommerziellen Brustkrebszelllinien konnte in dieser Arbeit nicht gefunden werden.

Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass ein höherer durchschnittlicher Methylierungsstatus in der Promotorregion eines Gens eine verringerte Genexpression bewirkt. [74] Dies konnte für die sieben untersuchten CpGs des *CDKN2A*-Promotors nicht festgestellt werden. Für T47D, die Zelllinie mit dem höchsten durchschnittlichen Methylierungsstatus, wurden

vergleichbare $\Delta\Delta C_t$ -Werte erhalten wie für MDA-MB-468 und SKBR 3/38, in denen der Promotor unmethyliert war. Die Zelllinie ZR-75-1, in der der Promotor einen geringen Methylierungsstatus aufwies, zeigte eine deutlich niedrigere Expressionsrate als die vorher genannten Zelllinien.

Ein höherer Methylierungsstatus in einem der ersten Exons resultiert bei vielen Genen in einer Erhöhung der Genexpression. [74] Dies war jedoch beispielsweise bei ZR-75-1 nicht der Fall und konnte somit für die elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* nicht bestätigt werden.

Für die Zelllinien BT20/HTB19, MCF-7 und MDA-MB-231 konnte keine Bestimmung der relativen Genexpression durchgeführt werden, in der Literatur konnten Hinweise auf homozygote Deletion als mögliche Ursache hierfür gefunden werden. [72]

Zusätzlich erschwerte wurde die Auswertung der bei der Genexpressionsanalyse erhaltenen Ergebnisse dadurch, dass die mittels RT-PCR erhaltenen C_t -Werte für das Housekeeping-Gen *GAPDH* starke Schwankungen aufwiesen. Auch sei hier angeführt, dass die geringe Anzahl der Bestimmungen für die Aussagekraft statistischer Erhebungen limitierend wirkt. Des Weiteren sei hier erwähnt, dass *GAPDH* als Housekeeping-Gen genutzt wurde. *GAPDH* (Glyzerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) ist ein Enzym, welches wichtige Funktionen in der Glykolyse, aber auch bei der Apoptose von Zellen spielt. [75] Es wird bei vielen Fragestellungen als Housekeeping-Gen verwendet. [64] Es finden sich jedoch in der Literatur Anhaltspunkte, welche den Einsatz von *GAPDH* gerade bei Tumorproben nicht empfehlen. [76] Ein Housekeeping-Gen soll, unabhängig von äußeren Faktoren, dem jeweiligen Zellstadium und Zelltyp, eine konstante Expressionsrate besitzen. Dies scheint jedoch bei *GAPDH* in Krebszellen nicht immer gegeben zu sein. Verantwortlich hierfür könnte Hypoxie sein, eine Sauerstoffminderversorgung von Geweben, welche in Krebszellen häufig auftritt und die Menge des Genexpressionsproduktes beeinflusst. [77] Es sei jedoch erwähnt, dass auch noch andere komplexe Faktoren die Genexpression und damit die gebildete Menge an Expressionsprodukten beeinflussen können, wie zum Beispiel Degradierungsprozesse von RNA, oder aber auch Spleißen.[78] Allerdings wurde auch bei sorgfältiger Literaturrecherche kein besser geeignetes Housekeeping-Gen für Proben von Krebspatientinnen gefunden. [79]

4.3 HUVEC

Zelluläre Seneszenz ist durch ein Verharren der Zellen an einem bestimmten Punkt im Laufe des Zellzyklus charakterisiert. Als Ursachen für zelluläre Seneszenz wurden bereits oxidativer Stress, Entzündungsreaktionen, ionisierende Strahlung und weitere Faktoren wie zum Beispiel der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [40] oder H_2O_2 [34] untersucht. Auch ein möglicher Zusammenhang von *CDKN2A* und zellulärer Seneszenz wurde schon an Fibroblasten untersucht. [80]

Die entwickelten Pyrosequenziermethoden wurden angewandt, um den Methylierungsstatus der ausgewählten CpGs im *CDKN2A*-Promotor und der Zielregion in Exon 2 mit TNF- α bzw. H_2O_2 behandelten HUVECs (Human Umbilical Endothelial Cells, Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene) zu bestimmen. Außerdem wurde die relative Genexpression der Proben mittels RT-PCR ermittelt.

4.3.1 Ergebnisse

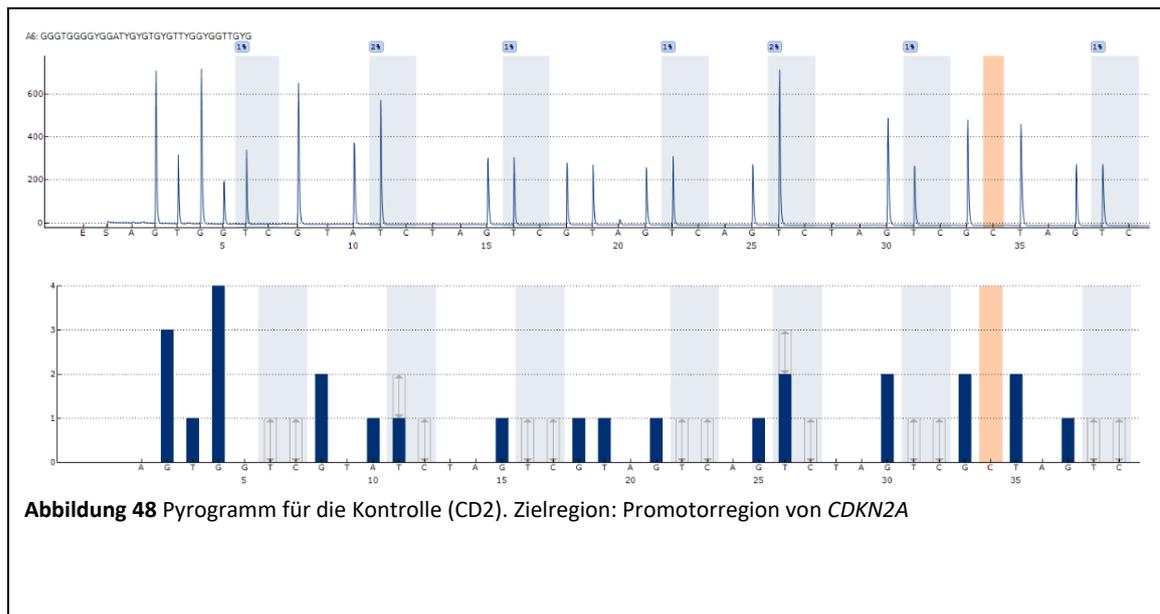
4.3.1.1 Proben

Bei den Proben, die mit den entwickelten Methoden untersucht wurden, handelte es sich um HUVECs. HD2, HD4, HD6 und HD12 wurden jeweils unterschiedliche lange mit H_2O_2 ($[H_2O_2]=30\mu M$) behandelt. TD2, TD4, TD6 und TD11 wurden jeweils unterschiedlich lange mit TNF- α ($[TNF-\alpha]=10ng/mL$) (Tumornekrosefaktor) behandelt. Eine Übersicht über die Probebezeichnungen und die jeweilige Behandlungsdauer der Zellen ist in **Tabelle 6** gegeben.

Tabelle 6 Übersicht über die erhaltenen HUVECs und deren jeweilige Behandlungsart und-dauer

HUVECs			
Zelllinie/ Probe	Behandlungsdauer mit H_2O_2 [Tage]	Zelllinie/ Probe	Behandlungsdauer mit TNF- α [Tage]
HD2	2	TD2	2
HD4	4	TD4	4
HD6	6	TD6	6
HD12	12	TD11	11
CD2	Kontrollzellen, keine Behandlung durchgeführt		

Die entwickelten Methoden zur Untersuchung des Methylierungsstatus in der Promotorregion als auch in der ausgewählten Region in Exon 2 von *CDKN2A* haben sehr gut funktioniert. Es wurden mit den für die Promotorregion von *CDKN2A* entworfenen Primern alle Proben mittels PCR amplifiziert und anschließend eine Pyrosequenzierung der Zielregion durchgeführt. Ein Pyrogramm, welches die sieben untersuchten CpGs im *CDKN2A*-Promotor der unbehandelten Probe (CD2) zeigt, ist in **Abbildung 48** zu sehen. Im *CDKN2A*-Promotor lag der Methylierungsstatus aller sieben CpGs unter dem LOQ von 5%.



Der Methylierungsstatus der Promotorregion ist für mit TNF- α behandelte HUVECs in **Abbildung 49** dargestellt, für HUVECs, die mit H₂O₂ behandelt wurden, in **Abbildung 50**. Der Methylierungsstatus der sieben CpGs im *CDKN2A*-Promotor blieb sowohl bei jenen Zellen, welche mit TNF- α , als auch bei jenen, die mit H₂O₂ behandelt wurden, unabhängig von der Behandlungsdauer, immer unter dem LOQ. Somit konnte hier keinerlei Assoziation zwischen Art und Dauer der Behandlung und dem Methylierungsstatus der sieben CpGs im *CDKN2A*-Promotor festgestellt werden.

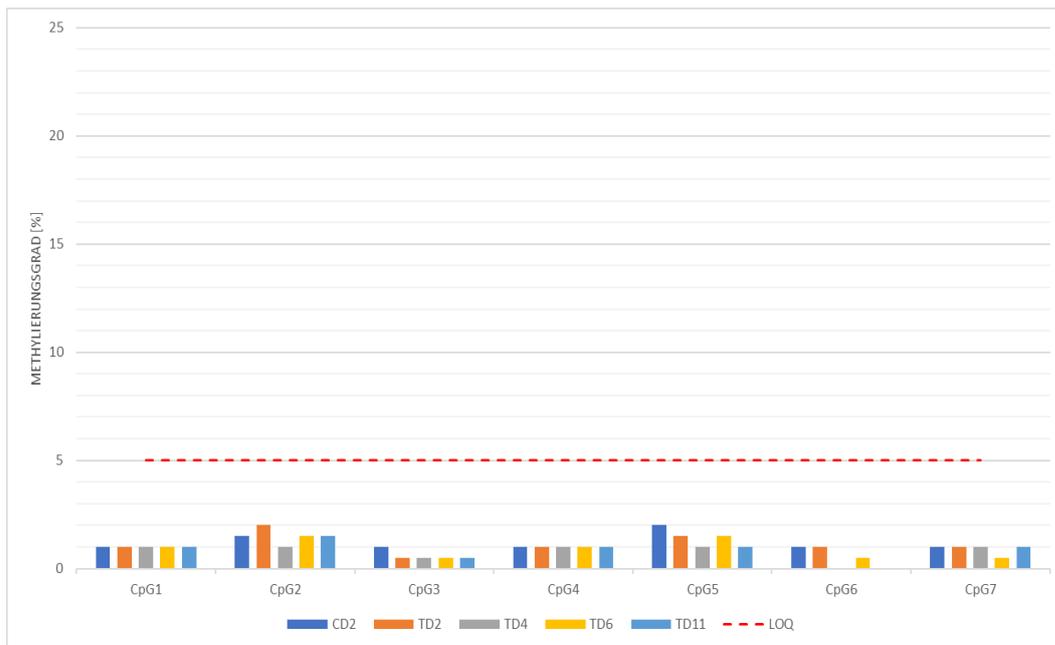


Abbildung 49 Methylierungsstatus der sieben CpGs in der Zielregion des *CDKN2A*-Promotors in den HUVECs, welche mit TNF- α behandelt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte aus den technischen Replikaten. (Die rote Linie zeigt LOQ= 5%)

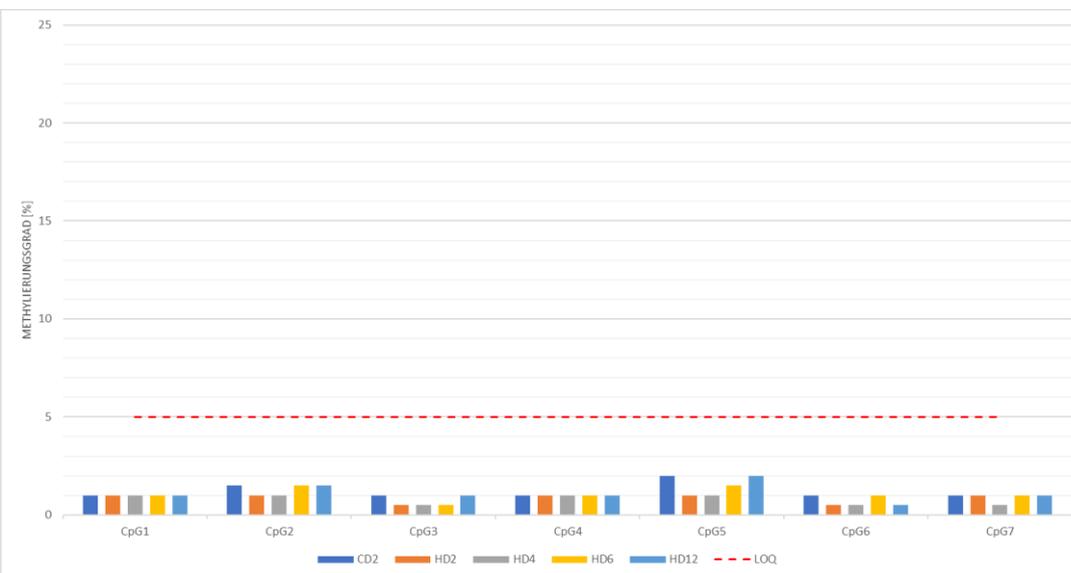
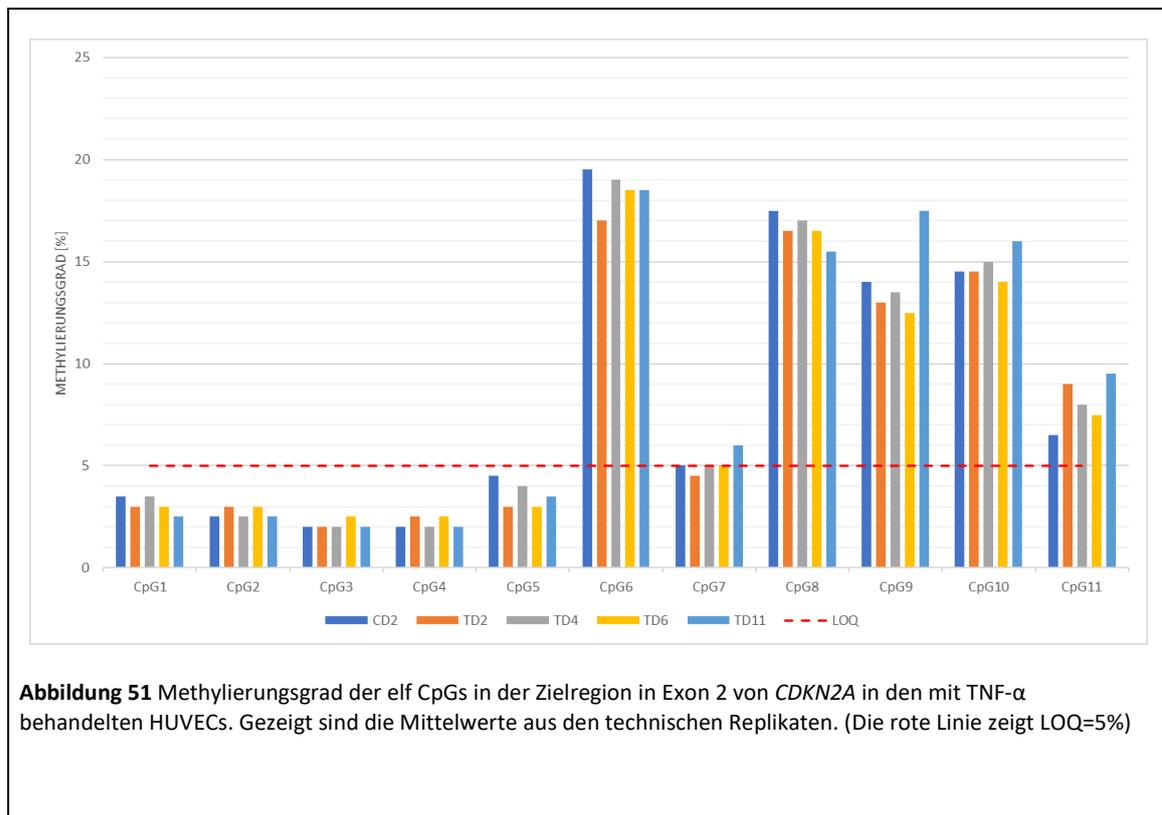


Abbildung 50 Methylierungsstatus der sieben CpGs in der Zielregion des *CDKN2A*-Promotors in den HUVECs, welche mit H₂O₂ behandelt wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte. (Die rote Linie zeigt LOQ= 5%)

Die elf untersuchten CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* wiesen bereits bei der unbehandelten Probe (CD2) eine niedrige Methylierung (<LOQ-17%) auf. Der Methylierungsstatus der elf untersuchten CpGs sind für HUVECS, die mit TNF- α behandelt wurden, in **Abbildung 51**, für jene, welche mit H₂O₂ behandelt wurden, in **Abbildung 52** dargestellt. Die CpGs waren sowohl in den mit H₂O₂ als auch in den mit TNF- α behandelten HUVECs heterogen methyliert. Trotz der unterschiedlichen Behandlung wiesen CpGs 1-5 und CpG 7 einen Methylierungsstatus \leq 6% auf. CpG 6 und CpG 8-10 hatten einen Methylierungsstatus von 15-20%, während der Methylierungsstatus von CpG 11 bei 6-10% lag. Es konnte keine Korrelation zwischen Art und Dauer der Behandlung und dem Methylierungsstatus der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* festgestellt werden.



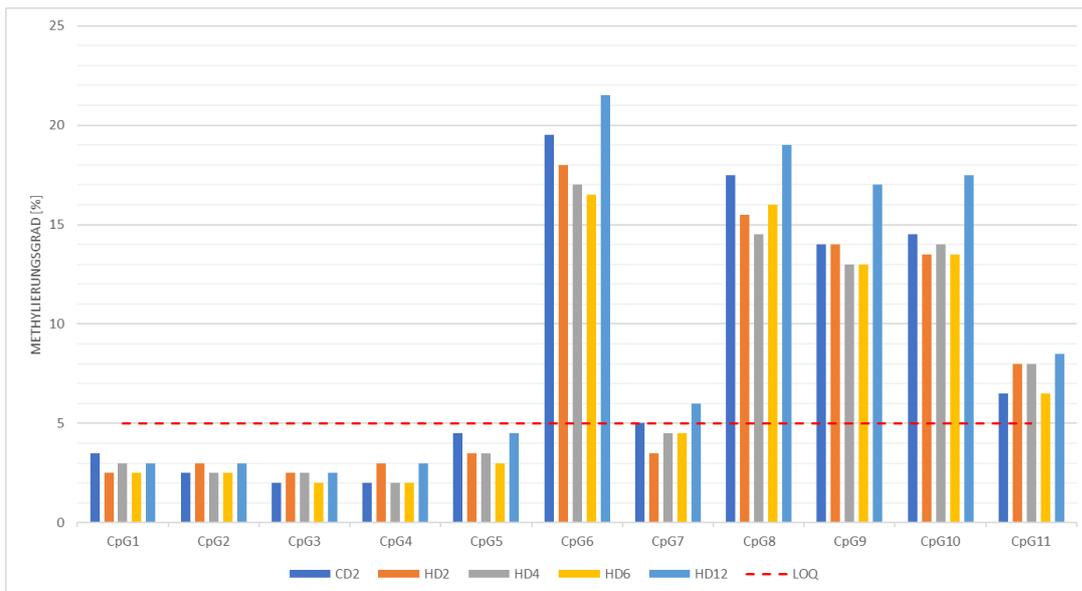
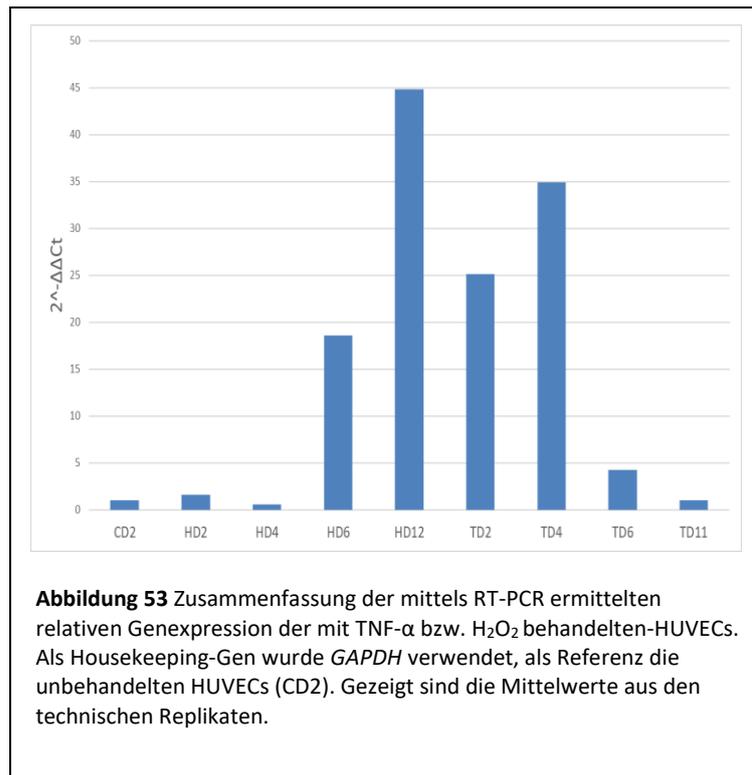


Abbildung 52 Methylierungsgrad der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* in den mit H_2O_2 behandelten HUVECs. Gezeigt sind die Mittelwerte aus den technischen Replikaten. (Die rote Linie zeigt LOQ=5%)

Zusätzlich wurde der Einfluss der Behandlung mit $TNF-\alpha$ bzw. H_2O_2 auf die relative Genexpression mittels RT-PCR untersucht. Als Housekeeping-Gen wurde *GAPDH* verwendet, als Referenz wurde die unbehandelte Probe (CD2). Die erhaltenen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ – Werte sind in **Abbildung 53** aufgetragen. Gezeigt sind die Mittelwerte aus den technischen Replikaten. Die erhaltenen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ – Werte für HUVECs, welche mit H_2O_2 behandelt wurden, betragen für HD2 =1,6, HD4=0,6, HD6=18,6 und HD12=44,8. Bei den mit $TNF-\alpha$ behandelten HUVECs betragen die erhaltenen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ – Werte für TD2=25,1, TD4=34,9, TD6=4,3 und TD11=1,0. Es konnte keine statistisch signifikante Korrelation zwischen der Art der Behandlung bzw. der Behandlungsdauer und der relativen Genexpression festgestellt werden. Die Rohdaten sind in Abschnitt **6.3.2.2** angeführt.



4.3.2 Diskussion

Die entwickelten Methoden zur Pyrosequenzierung der Zielregion im *CDKN2A*-Promotor als auch in Exon 2 zur Bestimmung der Methylierungsstatus der CpGs haben gut funktioniert. Alle an den HUVECs durchgeführten Pyrosequenzierungen lieferten aussagekräftige Pyrogramme hoher Zuverlässigkeit. Die heterogene Methylierung der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* der HUVECs zeigt den Vorteil der entwickelten Methode durch den Erhalt zusätzlicher Information im Vergleich zu Methoden wie beispielsweise der MS-HRM, welche lediglich den durchschnittlichen Methylierungsstatus aller CpGs in einer Zielregion bestimmen kann.

Der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf die Genexpression in Zellen wurde in der Literatur häufig beschrieben. [33-35] Als Grund für eine erhöhte relative Genexpression werden die Bildung von Disulfidbrücken durch oxidative Prozesse an Cysteinresten genannt [33], oder p16 betreffend, die Phosphorylierung von Serin, welche jedoch vorwiegend Apoptose begünstigt. [35]

Die Zugabe von H₂O₂ kann auch Seneszenz hervorrufen. Verstärkt wird dieser Prozess in Kombination mit einer Überexpression von p16. [81] Dies wurde schon in einer Studie an humanen Lungenzellen mittels Seneszenz-assoziiertem Galactosidase-Aktivitäts-Assay

nachgewiesen. [34] Hier wurden die humanen Lungenzellen jedoch lediglich für 30 Minuten mit 1mM Wasserstoffperoxidlösung behandelt und nicht, wie die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten HUVECs, für mehrere Tage ($[H_2O_2]= 30\mu M$). Allerdings wurde die 30-minütige Behandlung nach drei Tagen wiederholt. Es wurde auch bereits festgestellt, dass H_2O_2 durch Acetylierung von p53 wachstumshemmende Gene aktiviert, was wiederum zu Seneszenz führt. [34]

Die Auswirkung von TNF- α auf die zelluläre Seneszenz von HUVECs wurde in einer Studie bereits beschrieben. [40] Hier wurden die Zellen für maximal neun Tage mit TNF- α ($[TNF-\alpha] = 10ng/mL$) behandelt, was zu einer verminderten Zellproliferation führte. Dies wurde durch Zellzählung und Immunfärbung überprüft. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellen wurden maximal elf Tage ebenfalls mit $[TNF-\alpha] = 10ng/mL$ behandelt.

Anders als es die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse vermuten lassen, konnte im Rahmen dieser Arbeit keine statistisch signifikante Änderung der Genexpression, weder durch die Behandlung mit H_2O_2 , noch durch jene mit TNF- α , festgestellt werden. Der Grund liegt in den stark schwankenden C_t -Werten, die für das Housekeeping-Gen *GAPDH* erhaltenen wurden. Wie schon in Abschnitt 4.2.4 beschrieben, gibt es auch in der Literatur Hinweise, dass *GAPDH* nicht immer eine konstante Expressionsrate aufweist und somit in manchen Fällen nicht als Housekeeping-Gen geeignet ist. [76]

5 Experimentelles

Um etwaige Kontaminationen zu vermeiden, wurde zur Reinigung des Arbeitsplatzes stets DNA Exitus verwendet. Zusätzlich wurden die Laminar Flow Kammern vor jedem Arbeitsschritt für 30 Minuten mittels UV-Strahlung dekontaminiert. Sämtliche verwendete Materialien wurden nach Vorgaben des Herstellers verwendet. RNA-Extrakte wurden bei -80°C gelagert, DNA-Extrakte sowie Primer bei -20°C.

5.1 Proben

5.1.1 Kommerzielle Brustkrebszelllinien

Bei den von der Arbeitsgruppe von Assoc. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. MAS Petra Heffeter (Institut für Krebsforschung, Medizinische Universität Wien) erhaltenen Zellen handelte es sich um kommerzielle Brustkrebszelllinien diverser Patientinnen. Sämtliche Proben wurden als gewaschene Zellpellets bei einer Temperatur von -80°C erhalten.

5.1.2 HUVECs

Bei den von der Arbeitsgruppe von Ao. Prof. Dr. Johannes Breuss (Zentrum für Physiologie und Pharmakologie, Medizinische Universität Wien) erhaltenen Zellen handelte es sich um Endothelzellen der humanen Nabelschnurvene (HUVEC). Sämtliche Proben wurden als gewaschene Zellpellets bei einer Temperatur von -80°C erhalten.

5.1.3 DNA-/RNA-Extraktion

Die DNA-/RNA-Extraktion und -Aufreinigung wurde mit dem AllPrep DNA/RNA Mini Kit von Qiagen® durchgeführt. Die Durchführung selbst wurde akribisch nach den Angaben des Herstellers vollzogen. [82] Die als Zellsuspension erhaltenen Proben wurden zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Im Anschluss wurden 600µL RLT-Puffer zugegeben, um die Zellen zu lysieren und die entstandene Suspension wurde durch mehrmaliges Vortexen homogenisiert. Nach ausreichender Homogenisierung wurde die Suspension in eine AllPrep® DNA spin column überführt und 30s bei 10000rpm zentrifugiert. Falls die gesamte Flüssigkeit die Membran nach 30s nicht passiert hatte, wurde ein weiteres Mal 30s bei 10000rpm zentrifugiert. Nach erfolgter Zentrifugation befand sich die DNA im Filter der Säule und die RNA im Durchfluss. Im Anschluss wurde die erhaltene DNA im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt, während die RNA weiter aufgereinigt wurde. Hierzu wurde

dasselbe Volumen, welches an RLT-Puffer zugegeben wurde, an 70% Ethanol hinzugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in einer Pipettenspitze gemischt. Die erhaltene Lösung wurde nun in eine RNeasy® spin column transferiert und 15s bei 10000rpm zentrifugiert, der Durchfluss anschließend verworfen. Nun folgten weitere Reinigungsschritte, erst durch Zugabe von 700µL von RW1-Puffer mit anschließender Zentrifugation für 30s bei 10000rpm, nach abermaligem Verwerfen des Durchflusses durch Hinzufügen von 500µL RPE-Puffer und 2minütigem Zentrifugieren bei 14000rpm. Nach Sicherstellung der Trocknung der Membran wurde die darin enthaltene RNA mittels 30-50µL RNase-freiem Wasser eluiert und im Anschluss bei -80°C gelagert. Zu der sich in der AllPrep® DNA spin column befindenden DNA wurden nun 500µL AW1-Puffer zugegeben und 30s bei 10000rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Durchflusses wurden 500µL AW2-Puffer zugegeben und 2min bei 14000rpm zentrifugiert. Um Ethanolrückstände restlos zu entfernen, wurde nach Verwerfen des Durchflusses abermals 1min bei 14000rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden 100µL EB-Puffer hinzugegeben und nach einer Inkubationszeit von 1min bei Raumtemperatur (25°C) 1min bei 10000rpm zentrifugiert, um so die an der Membran der Säule gebundene DNA zu eluieren. Die extrahierte DNA wurde im Anschluss mit Bisulfit konvertiert, wie in Abschnitt 5.2.2 beschrieben. Die extrahierte RNA wurde im Anschluss mittels Reverser Transkriptase Reaktion für die Genexpressionsanalyse in eine cDNA umgeschrieben. Der Vorgang ist in Abschnitt 5.3.1 beschrieben.

5.2 DNA-Methylierung

5.2.1 Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop

Die Konzentrationsbestimmungen an RNA bzw. DNA wurden an einem Nanodrop 2000 von Thermo Fisher Scientific® durchgeführt. Es wurde jeweils 1µL Probelösung eingesetzt. Gemessen wurde jeweils gegen RNase freies Wasser oder EB-Puffer als Blank.

5.2.2 Bisulfitkonvertierung

Die Bisulfitkonvertierung wurde mit dem Epi Tect®-Fast DNA Bisulfite-Kit von Qiagen® durchgeführt. Sämtliche Arbeitsschritte entsprachen der dazugehörigen Anleitung des Herstellers. [83] Die Menge der verwendeten Reagenzien wurde an die zuvor mittels Nanodrop bestimmte DNA-Konzentration im DNA-Extrakt angepasst. Das Epi Tect®-Fast DNA Bisulfite-Kit ist für Konzentrationen bis maximal 2µg an DNA pro Ansatz geeignet. Hierfür werden höchstens 20µL an Probelösung eingesetzt. Sollte die DNA-Konzentration unter 12,5ng/µL sein, so kann auf insgesamt 40µL erhöht werden. Dies war bei den verwendeten Proben jedoch nicht notwendig.

Es wurden jeweils 85µL Bisulfite Solution und 35µL DNA Protect Puffer zu den 20µL DNA-Extrakt zugegeben. Anschließend wurde mit RNA-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 140µL aufgefüllt. Durch die Durchmischung der Komponenten mit der Pipettenspitze entstand, bedingt durch den DNA Protect Puffer, eine charakteristische Blaufärbung der Lösung.

Im Anschluss wurden die Eppendorfgläser in den Thermocycler transferiert und ein vom Hersteller vorgegebenes Programm gestartet. Das Programm ist in **Tabelle 7** angeführt.

Tabelle 7 Zeit- und Temperaturangaben der einzelnen Schritte für die Bisulfitkonvertierung der Proben mit dem Thermocycler

Schritt	Zeit [min]	Temperatur [°C]
Denaturierung	5	95
Inkubation	20	60
Denaturierung	5	95
Inkubation	20	60
Hold	unlimitiert	20

Nach Beendigung des Programms wurde mit der Aufreinigung der DNA begonnen.

5.2.3 Aufreinigung der DNA

Die Proben wurden aus dem Thermocycler entnommen, vorsichtig gevortext und abgespinn. Die entstandenen Pellets wurden in ein 1,5mL Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurden 310µL BL-Puffer, sowie 250µL konzentrierte Ethanol-Lösung zugegeben und mittels vortexen (15s) gemischt. Im Anschluss wurde die Probe auf Spin-Columns übertragen und 1 Minute bei 14000rpm abzentrifugiert. Nach Entleeren der Auffanggefäße wurden 500µL BW-Puffer zugegeben und abermals bei 14000rpm für 1 Minute zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 500µL BD-Puffer zugegeben und die Probe 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abermaligem Zentrifugieren bei 14000rpm für 1 Minute wurde der Durchfluss verworfen und 500µL BW-Puffer zugegeben. Die Probe wurde bei 14000rpm zentrifugiert und der Durchfluss abermals verworfen. Der Waschschrift mittels BW-Puffer wurde noch ein zweites Mal wiederholt, bevor 250µL konzentrierte Ethanol-Lösung zugegeben und erneut bei 14000rpm für 1 Minute zentrifugiert wurde. Die sich in den Säulen befindlichen Filter wurden in ein neues Auffanggefäß transferiert und mit offenem Deckel für 5 Minuten auf 60°C erhitzt, um etwaige Ethanolreste

abzudampfen. Die nun trockenen Filter wurden in neue Auffanggefäße transferiert und 15µL EB-Puffer wurde auf die Filtermembran aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit bei Raumtemperatur von 1 Minute wurde bei 12000rpm für 1 Minute abzentrifugiert. Die DNA befand sich nun im Durchfluss. Der Filter wurde in ein neues Auffanggefäß gesteckt und der Elutionsschritt wurde wiederholt.

5.2.4 Amplifikation mittels PCR

Zur Amplifikation der Bisulfitkonvertierten DNA wurde das PyroMark® PCR Kit von Qiagen® verwendet. Sämtliche Arbeitsschritte wurden streng nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. [52] Es wurde durchgehend in Laminar Flow Kammern gearbeitet. Zuerst wurde der Master Mix laut Herstellerangaben hergestellt. Dieser bestand aus PyroMark® PCR Master Mix (bestehend aus Polymerase, Magnesium²⁺ Ionen, Triphosphatnukleosiden und Puffer), CoralLoad Concentrate, Forward-Primer, Reverse-Primer und RNase freiem Wasser. Die jeweils verwendeten Volumina der einzelnen Komponenten pro Ansatz sind in **Tabelle 8** ersichtlich.

Tabelle 8 Übersicht der eingesetzten Volumina für die Amplifikation der Proben-DNA pro Ansatz

MasterMix für PyroMark® PCR		
Primerkonzentration [nM]	200	400
PyroMark® PCR Master Mix [µl]	12,5	12,5
CoralLoad Concentrate [µl]	2,5	2,5
Forward-Primer [µl]	0,5	1
Reverse-Primer [µl]	0,5	1
RNase freies Wasser [µl]	7	6
Gesamtvolumen [µl]	23	23
Mastermix pro well [µl]	23	23
DNA-Extrakt [µl]	2	2

Während der Herstellung des Master Mix wurden alle Lösungen auf Kühlblöcken gekühlt. Die Bisulfitkonvertierten Proben wurden aufgetaut, durch kurzes Vortexen homogenisiert und anschließend, wie in **Tabelle 8** angeführt, je 2µL der Probe ([DNA]=5ng/µL) dem Master Mix hinzugefügt. Somit wurden insgesamt je 10ng der DNA pro Ansatz für die anschließende Pyrosequenzierung verwendet. Das verwendete PCR-Setup für die Amplifikation der Proben ist in **Tabelle 9** angeführt.

Tabelle 9 PCR-Setup für die Amplifikation der Bisulfitkonvertierten Proben für die anschließende Pyrosequenzierung. [*] = Annealingtemperatur der Primer für die Promotorregion von *CDKN2A*, [**] = Annealingtemperatur der Primer für Exon 2 von *CDKN2A*

Schritt	Benötigte Zeit	Temperatur [°C]
Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	15 min	95
Denaturierung	30s	94
Annealing	30s	59,5* 62,1**
Elongation	30s	72
50 Zyklen		
Finale Elongation	10min	72

5.2.5 Strangtrennung

Die nach Beendigung der Amplifikation des Templates durchzuführende Strangtrennung der Proben-DNA erfolgte mit der PyroMark® Q24 Vacuum Workstation. Sämtliche Arbeitsschritte wurden exakt nach Vorgabe des Herstellers vollzogen. [84] Die Befüllung der PyroMark® Q24 Vacuum Workstation erfolgte wie in **Abbildung 54** gezeigt. Im Anschluss erfolgten die in **Tabelle 10** angeführten Arbeitsschritte.

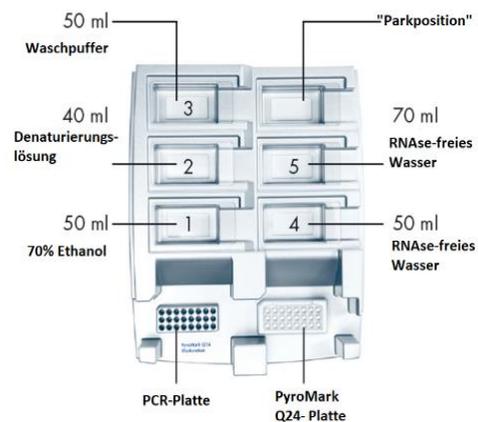


Abbildung 54 Befüllungsschema der PyroMark Q24 Vakuum Workstation zur Trennung der DNA-Stränge vor der Pyrosequenzierung (verändert nach [84])

Tabelle 10 Auflistung der einzelnen Arbeitsschritte und deren Dauer zur Strangtrennung mittels PyroMark Q24 Vakuum Workstation

	Arbeitsschritt	Zeit [s]
1	Vakuum einschalten	
2	Probenaufnahme mit Vakuum Tool aus PCR Platte	15
3	Vakuum Tool in 70% EtOH-Lösung tauchen	5
4	Vakuum Tool in Denaturierungslösung tauchen	5
5	Vakuum Tool in Waschpuffer tauchen	10
6	Vakuum Tool in 90° Position halten und trocknen lassen	5
7	Vakuum ausschalten, Vakuum Tool in PyroMark® Q24 Platte tauchen	
8	Vakuum Tool in Wanne 4 waschen	10
9	Vakuum einschalten, Vakuum Tool in Wanne 5 durchspülen	10
10	Vakuum Tool in 90° Position halten und trocknen lassen	5
11	Vakuum ausschalten, Vakuum Tool in Parkposition verstauen	

5.3 Genexpression

5.3.1 Reverse Transkriptase Reaktion

Die Reverse Transkription wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Qiagen® durchgeführt. [85] Die laut Hersteller maximal zu verwendende Masse an RNA beträgt bei diesem Kit 1µg, das maximal einzusetzende Volumen an Probelösung 12µL. Proben, welche eine höhere Konzentration aufwiesen, mussten demnach mit RNase-freiem Wasser auf insgesamt 1µg ($c=83,3\mu\text{g}/\mu\text{L}$) verdünnt werden.

Zur Probe wurden 2µL gDNA Wipeout Puffer 7x zugegeben und je nach zuvor gemessener RNA Konzentration mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14µL aufgefüllt. Nach Durchmischung durch Vortexen wurde die Lösung 2min bei 42°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Anschließend wurde in der Laminar Flow Kammer der Master Mix hergestellt. 1µL Quantiscript Reverse Transkriptase, 4µL Quantiscript RT Puffer 5x und 1µL RT Primer Mix wurden hierfür vermengt. Danach wurde die RNA hinzugegeben (auf ein Gesamtvolumen von 20µL) und die Proben wurden für 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde 3 Minuten bei 95°C inkubiert, um die reverse Transkriptase zu inaktivieren. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Probe bei -20°C gelagert.

5.3.2 Zur Analyse der Genexpression verwendete Primer

5.3.2.1 Primer p16INK4a

Zur Genexpressionsanalyse wurde ein Primerpaar verwendet, welches bereits in der Literatur [86] Anwendung fand. Die von Forward- und Reverse-Primer umschlossene Sequenz erstreckt sich über Exon 2 und Exon 3. Die Sequenzlänge beträgt 122 Basenpaare. In **Abbildung 55** sind der verwendete Forward-Primer (P16^{INK4a}F) als auch die Bindungsstelle des Reverse-Primers (P16^{INK4a}R) gezeigt. Die Sequenz der Primer sowie deren Schmelztemperatur und Tendenz zur Ausbildung von Sekundärstrukturen sind in **Abbildung 56** angeführt.

5.3.2.2 Primer für das Housekeeping-Gen (GAPDH)

Für das zur Bestimmung der relativen Genexpression benötigte Housekeeping-Gen wurden Literaturprimer [87] verwendet. Als Housekeeping-Gen wurde *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase) ausgewählt. Die Sequenz der Primer, deren Länge und deren Schmelztemperatur sind in **Tabelle 11** ersichtlich.

Tabelle 11 Übersicht der Sequenz, Länge und Schmelztemperatur der verwendeten Primer für das Housekeeping-Gen *GAPDH* zur Bestimmung der relativen Genexpression mittels RT-PCR

Primer	Sequenz	Länge [nt]	T _m [°C]
Forward-Primer	TCCCATCACCATCTTCCAG	19	60
Reverse-Primer	ATGAGTCCTTCCACGATACC	20	60

5.3.3 Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR

Sämtliche Arbeitsschritte wurden streng nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde durchgehend in Laminar Flow Kammern gearbeitet. Zuerst wurde der Master Mix laut Herstellerangaben [60] hergestellt. Dieser besteht aus Rotor Gene® PCR SYBR Green® Master Mix, Forward-Primer, Reverse-Primer, und RNase freiem Wasser. Die eingesetzten Volumina pro Ansatz sind in **Tabelle 12** angeführt.

Tabelle 12 Eingesetzte Volumina pro Ansatz für die Messung der Genexpression mittels SYBR Green®

Primerkonzentration [nM]	300
SYBR-Green®-Mastermix [µL]	12,5
Forward-Primer [µL]	0,75
Reverse-Primer [µL]	0,75
RNase freies Wasser [µL]	8,5
DNA [µL]	2,5
Gesamtvolumen [µL]	25

Während der Herstellung des Master Mix wurden alle Lösungen auf Kühlblöcken gekühlt. Im Anschluss an die Herstellung des Master Mix wurden die Proben aufgetaut, durch kurzes Vortexen homogenisiert und anschließend je 2,5µL der Proben dem Master Mix hinzugefügt.

Das verwendete PCR-Setup ist in **Tabelle 13** angegeben. Die RT-PCR wurde mit dem Rotor-Gene Q von Qiagen® durchgeführt. Die verwendeten Einstellungsparameter zur Ermittlung der C_t-Werte für die Auswertung der relativen Genexpression sind in **Abbildung 57** angeführt.

Tabelle 13 Verwendetes Setup für die Durchführung einer RT-PCR mit SYBR Green®

Schritt	Benötigte Zeit	Temperatur [°C]
Reverse Transkription	10 min	55
PCR Aktivierungsschritt	5min	95
Two-step cycling		
Denaturierung	5s	95
Annealing-Extension	10s	60
Zyklen	40	

Quantitation Information	
Threshold	0,01559
Left Threshold	1,000
Standard Curve Imported	No
Standard Curve (1)	N/A
Standard Curve (2)	N/A
Start normalising from cycle	1
Noise Slope Correction	Yes
No Template Control Threshold	% 0
Reaction Efficiency Threshold	Disabled
Normalisation Method	Dynamic Tube Normalisation
Digital Filter	Light
Sample Page	Page 1
Imported Analysis Settings	

Abbildung 57 Verwendete Einstellungen des Setups der RT-PCR mit SYBR Green® zur Ermittlung der C_t-Werte für die Auswertung der relativen Genexpression der Proben

5.4 Methodenentwicklung

Alle folgenden Primer für die Amplifikation mittels PCR als auch für die anschließende Pyrosequenzierung zur Untersuchung des Methylierungsstatus der sich in der Promotorregion und Exon 2 befindenden CpGs von *CDKN2A* wurden mit der Software PyroMark Assay Design 2.0 von Qiagen® entworfen. Die grobe Abschätzung der Schmelztemperatur wurde mit dem Oligonucleotide Properties Calculator 3.26 der Northwestern University vorgenommen. Außerdem wurden die entworfenen Primer mittels RNAfold der Universität Wien auf die Bildung möglicher störender Sekundärstrukturen untersucht. Die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren wurde mittels OligoAnalyzer 3.1 der Firma IDT® (Integrated DNA Technologies) getestet. Die verwendete Software ist in Abschnitt 5.6.1 angeführt. Die entworfenen Primer wurden von Sigma Aldrich geliefert und nach den Herstellerangaben auf [100µM] mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Anschließend wurden die Primer zu je V=10µL aliquotiert und bei -20°C gelagert.

5.4.1 Primerdesign

Das Design der für die Bestimmung des Methylierungsstatus der CpGs im *CDKN2A*-Promotor entworfenen Primer ist im Abschnitt 4.1.1 angeführt, das Design für die Primer der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* in Abschnitt 4.1.5.

Die für das Design verwendeten Parameter sind in **Abbildung 58** angegeben. Die Parameter für das Design der Sequencing-Primer sind in **Abbildung 59** ersichtlich.

<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">PCR Primer</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Min Primer Length [nt]</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>Max Primer Length [nt]</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>Optimal Amplicon Length From [nt]</td> <td>50</td> </tr> <tr> <td>Optimal Amplicon Length To [nt]</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>Max Amplicon Length [nt]</td> <td>400</td> </tr> <tr> <td>Allow Primer Over Variable Position</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Melting Temperature Algorithm</td> <td>NN Mismatch</td> </tr> <tr> <td>Primer Concentration [µM]</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>Min Melting Temperature [°C]</td> <td>50.0</td> </tr> <tr> <td>Max Melting Temperature [°C]</td> <td>72.0</td> </tr> <tr> <td>Max Allowed Tm Difference [°C]</td> <td>10.0</td> </tr> <tr> <td>Max GC Difference [%]</td> <td>50</td> </tr> </tbody> </table> <p>Abbildung 58 Parameter zum Design der Forward- und Reverse-Primer für die Promotorregion und die Zielregion in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> mittels PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen)</p>		PCR Primer		Min Primer Length [nt]	18	Max Primer Length [nt]	30	Optimal Amplicon Length From [nt]	50	Optimal Amplicon Length To [nt]	100	Max Amplicon Length [nt]	400	Allow Primer Over Variable Position	<input type="checkbox"/>	Melting Temperature Algorithm	NN Mismatch	Primer Concentration [µM]	0.2	Min Melting Temperature [°C]	50.0	Max Melting Temperature [°C]	72.0	Max Allowed Tm Difference [°C]	10.0	Max GC Difference [%]	50	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Sequencing Primer</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Min Primer Length [nt]</td> <td>15</td> </tr> <tr> <td>Max Primer Length [nt]</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>Min Distance From Target [nt]</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>Max Distance From Target [nt]</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Allow Primer Over Variable Position</td> <td><input type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Generate Forward Primers</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Generate Reverse Primers</td> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> </tr> <tr> <td>Melting Temperature Algorithm</td> <td>NN Mismatch</td> </tr> <tr> <td>Min Melting Temperature [°C]</td> <td>29.0</td> </tr> <tr> <td>Max Melting Temperature [°C]</td> <td>59.0</td> </tr> </tbody> </table> <p>Abbildung 59 Parameter zum Design der Sequencing-Primer für die Promotorregion und die Zielregion in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> mittels PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen)</p>		Sequencing Primer		Min Primer Length [nt]	15	Max Primer Length [nt]	25	Min Distance From Target [nt]	0	Max Distance From Target [nt]	10	Allow Primer Over Variable Position	<input type="checkbox"/>	Generate Forward Primers	<input checked="" type="checkbox"/>	Generate Reverse Primers	<input checked="" type="checkbox"/>	Melting Temperature Algorithm	NN Mismatch	Min Melting Temperature [°C]	29.0	Max Melting Temperature [°C]	59.0
PCR Primer																																																			
Min Primer Length [nt]	18																																																		
Max Primer Length [nt]	30																																																		
Optimal Amplicon Length From [nt]	50																																																		
Optimal Amplicon Length To [nt]	100																																																		
Max Amplicon Length [nt]	400																																																		
Allow Primer Over Variable Position	<input type="checkbox"/>																																																		
Melting Temperature Algorithm	NN Mismatch																																																		
Primer Concentration [µM]	0.2																																																		
Min Melting Temperature [°C]	50.0																																																		
Max Melting Temperature [°C]	72.0																																																		
Max Allowed Tm Difference [°C]	10.0																																																		
Max GC Difference [%]	50																																																		
Sequencing Primer																																																			
Min Primer Length [nt]	15																																																		
Max Primer Length [nt]	25																																																		
Min Distance From Target [nt]	0																																																		
Max Distance From Target [nt]	10																																																		
Allow Primer Over Variable Position	<input type="checkbox"/>																																																		
Generate Forward Primers	<input checked="" type="checkbox"/>																																																		
Generate Reverse Primers	<input checked="" type="checkbox"/>																																																		
Melting Temperature Algorithm	NN Mismatch																																																		
Min Melting Temperature [°C]	29.0																																																		
Max Melting Temperature [°C]	59.0																																																		

5.4.2 Optimierung der Methoden

5.4.2.1 PCR-Amplifikation

Für die Optimierung der entwickelten Methoden wurde das PyroMark® PCR Kit von Qiagen® verwendet. Sämtliche Arbeitsschritte wurden streng nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. [52] Es wurde durchgehend in Laminar Flow Kammern gearbeitet.

Zuerst wurde der Master Mix laut Herstellerangaben hergestellt. Dieser bestand aus PyroMark® PCR Master Mix (bestehend aus Polymerase, Magnesium²⁺ Ionen, Triphosphatnukleosiden und Puffer), CoralLoad Concentrate, Forward-Primer, Reverse-Primer und RNase freiem Wasser.

Es wurden zwei Master Mixes mit verschiedenen Primerkonzentrationen hergestellt. Die genaue Auflistung der jeweils eingesetzten Volumina zur Herstellung der Master Mixes findet sich in **Tabelle 14**.

Tabelle 14 Eingesetzte Volumina zur Herstellung der Master Mixes mit zwei verschiedenen Primerkonzentrationen

	[Primer]= 200nM	[Primer]=400nM
PyroMark PCR Mastermix 2x	175µL	175µL
CoralLoad concentrate 10x	35µL	35µL
Forward-Primer [10µM]	7µL	14µL
Reverse-Primer [10µM]	7µL	14µL
RNase freies Wasser	98µL	84µL
Gesamtvolumen	322µL	322µL

Nach der Herstellung der Master Mixes wurden diese gevortext und anschließend jeweils 23µL der zubereiteten Lösung in ein Eppendorfgefäß transferiert. Anschließend wurden je 2µL an Probe hinzugefügt. Die Volumina der jeweiligen Reagenzien pro Eppendorfgefäß sind in **Tabelle 15** angeführt.

Tabelle 15 Eingesetzte Volumina des Master Mix und Probe je Ansatz

	[Primer]= 200nM	NTC	[Primer]= 400nM	NTC
PyroMark PCR Mastermix 2x	12,5µL	12,5	12,5µL	12,5µL
CoralLoad concentrate 10x	2,5µL	2,5µL	2,5µL	2,5µL
Forward-Primer [10µM]	0,5µL	0,5µL	1µL	1µL
Reverse-Primer [10µM]	0,5µL	0,5µL	1µL	1µL
RNase freies Wasser	7µL	9µL	6µL	8µL
Volumen Mastermix	23µL	25µL	23µL	25µL
Probe	2µL	0µL	2µL	0µL
Gesamtvolumen	25µL	25µL	25µL	25µL

Die anschließende PCR wurde jeweils mit einem zuvor Bisulfitkonvertierten unmethylierten (0%) Standard [DNA]=5ng/µL und einem vollständig methylierten (100%) Standard [DNA]=5ng/µL durchgeführt. Außerdem wurde bei sämtlichen Messungen immer eine NTC (No Template Control) mitgetestet, um eine Kontamination der Master Mixes auszuschließen. Das verwendete Setup zur Optimierung der Annealingtemperatur der entworfenen Primer für den Promotor von *CDKN2A* ist in **Tabelle 16** angegeben. Das verwendete Setup zur Optimierung der Annealingtemperatur der entworfenen Primer für die Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* ist in **Tabelle 17** angeführt.

Tabelle 16 PCR-Setup für die Optimierung der Annealingtemperatur für die entworfenen Primer der Promotorregion von *CDKN2A*

Schritt	Benötigte Zeit	Temperatur [°C]
Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	15 min	95
Denaturierung	30s	94
Annealing	30s	59,5/57,6/55,1/53,3
Elongation	30s	72°C
50 Zyklen		
Finale Elongation	10min	72°C

Tabelle 17 PCR-Setup für die Optimierung der Annealingtemperatur des entworfenen Primerpaares für die Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A*

Schritt	Benötigte Zeit	Temperatur [°C]
Denaturierung und Aktivierung der Polymerase	15 min	95
Denaturierung	30s	94
Annealing	30s	62,1/61,0 /59,5 /58,4
Elongation	30s	72
50 Zyklen		
Finale Elongation	10min	72

Zur Überprüfung der Menge und Reinheit der entstandenen PCR-Produkte wurde im Anschluss eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

5.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde mit der Mini Sub Cell GT und mit dem Power Supply PowerPac HV von Biorad® durchgeführt. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde ein 2%-iges Agarosegel hergestellt.

5.4.3.1 Herstellung des Agarosegels

Um den Tris-Acetat-Ethylendiamintetraacetatpuffer (TAE-Puffer) herzustellen, wurden zunächst 242g Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 57,1mL Essigsäure und 18,6g Ethylendiamintetraacetat in 1000mL destilliertem Wasser gelöst. Der so zunächst in 50-facher Konzentration vorliegende TAE-Puffer musste im Anschluss auf die einfache Konzentration verdünnt werden. Hierzu wurden 20mL des konzentrierten Puffers mit destilliertem Wasser auf 1000mL aufgefüllt. Im Anschluss wurden 100mL des Puffers 2g Agarose zugegeben. Die Mischung wurde aufgekocht, bis keine Trübung der Lösung mehr sichtbar war. Der Lösung wurden 10µL GelRed hinzugefügt. Der Kamm zur Formung der Auftrageschalen wurde in den Gelcasser gesteckt und das Gel langsam in den Gelcasser gegossen, um einen übermäßigen Einschluss von Luftbläschen zu vermeiden. Nach 30 Minuten war das Gel ausgehärtet und der Kamm konnte vorsichtig aus dem Gel gezogen werden. Im Anschluss wurde das ausgehärtete Gel in die Laufkammer überführt und die Laufkammer bis zu der Markierung mit einfach konzentriertem TAE-Puffer aufgefüllt.

5.4.3.2 Durchführung und Auswertung der Gelelektrophorese

Danach wurden die Geltaschen mit der Probe beladen. Hierzu wurden Aliquote von 5µL der PCR-Produkte auf das Gel aufgetragen, der Deckel geschlossen und die Elektroden ordnungsgemäß angebracht. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 120V für 1 Stunde laufen gelassen. Als Molekulargewichtsmarker wurde die 25bp DNA Ladder von Invitrogen® verwendet. Es wurden 3,6 µL der 25bp-DNA-Ladder mit 0,9µL 5x Loading Dye gemischt. Von dem Gesamtvolumen von 4,5µL wurden je 1,88µL pro Tasche auf das Gel aufgetragen.

Das Elektropherogramm wurde unter einem Transilluminator mit UV-Licht einer Wellenlänge von 312nm ausgewertet.

5.5 Auswertung

Die Rohdaten der durchgeführten Pyrosequenzierungen wurden mit Q24 Advanced Software 3.0.0 erhoben und untersucht. Die verwendete Software kennzeichnet unzuverlässige Messdaten mit roter Farbe, wie bereits in Abschnitt **3.1.3** erwähnt. Unzuverlässige Messdaten wurden nicht für die Auswertung verwendet. Laut Hersteller liegt der LOQ bei der Bestimmung des Methylierungsstatus bei 5%, der ULOQ bei 95%. Für die statistischen Auswertungen der Messdaten wurden Werte unterhalb des LOQ mit LOQ/2 (2,5%) und jene oberhalb des ULOQ mit 97,5% angenommen. [88] Für die Datensammlung und Erstellung der Diagramme wurde Microsoft Excel Version 2101 benutzt. Die statistischen Analysen wurden mittels R durchgeführt. Als statistischer Test wurde der Kruskal-Wallis-Test verwendet. Als Post-hoc-Test wurde der Dunn-Test verwendet. Die Nullhypothese war, dass kein Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ festgelegt. Für die statistische Auswertung der relativen Genexpression wurden die $\Delta\Delta C_t$ -Werte herangezogen, da aufgrund nicht-linearer Transformation die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte weniger geeignet sind.

5.6 Verwendete Materialien und Software

5.6.1 Verwendete Software

Tabelle 18 Verwendete Software für die im Rahmen dieser Arbeit entworfenen Primer

Methode	Programm/Version	Hersteller
Primerdesign	PyroMark Assay Design 2.0.1.15	Qiagen®
Schmelztemperaturbestimmung	Oligonucleotide Properties Calculator 3.26	Northwestern University
Sekundärstrukturbestimmung	RNAfold	Universität Wien
Homo-/Heterodimere	OligoAnalyzer 3.1	IDT® (Integrated DNA Technologies)

5.6.2 Verwendete Apparaturen

Tabelle 19 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Apparaturen

Methode	Apparatur	Hersteller
Amplifikation	Rotor-Gene Q thermocycler/Bio-Rad IQ5	Qiagen®/ Bio-Rad®
Konzentrationsbestimmung	Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific®
Strangaufftrennung/Waschung	PyroMark Q24 Vacuum Workstation	Qiagen®
Pyrosequenzierung	PyroMark Q24	Qiagen®
Gelelektrophorese	Mini Sub Cell GT mit Power Supply PowerPac HV	BioRad®

5.6.3 Verwendete Kits

Tabelle 20 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits

Methode	Kit	Hersteller
DNA-Extraktion	AllPrep DNA/RNA Mini Kit	Qiagen®
Bisulfitkonvertierung	EpiTect® Fast DNA Bisulfite Kit	Qiagen®
Reverse Transkription	QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen®
Amplifikation Bisulfitkonvertierter DNA	PyroMark® PCR Kit	Qiagen®
HRM	Rotor-Gene SYBR Green® PCR Kit	Qiagen®

6 Anhang

6.1 Zusammenfassung

Veränderungen des Methylierungsstatus definierter Regionen der DNA wurden mit zellulärer Seneszenz, Apoptose und verschiedenen Krankheiten assoziiert. Abweichungen im DNA-Methylierungsstatus im Promotor des Gens *CDKN2A*, welches das Tumorsuppressorprotein p16 codiert, treten früh in der Kanzerogenese auf. Während eine Hypermethylierung des Promotors häufig zu einer Stilllegung des Gens führt, weiß man über den Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad in Exons und dem Ausmaß der Genexpression noch wenig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Pyrosequenziermethoden zur Bestimmung des Methylierungsstatus von sieben CpGs im *CDKN2A*-Promotor und elf CpGs in Exon 2 von *CDKN2A* entwickelt. Mittels Pyrosequenzierung kann der Methylierungsstatus einzelner CpGs in der Zielregion bestimmt werden.

Zur Testung der Leistungsfähigkeit wurden die Methoden auf sieben kommerzielle Brustkrebszelllinien (MCF-7, BT20/HTB19, T47D, ZR-75-1, SKBR 3/38, MDA-MB-231, MDA-MB-468) angewandt. MCF-7, MDA-MB-468, SKBR 3/38 und BT20/HTB19 wiesen einen unmethylierten Promotor auf. In ZR-75-1 war der Promotor niedrig und heterogen, in T47D hoch methyliert. Bei MDA-MB-231 konnte der Methylierungsstatus nicht bestimmt werden. Generell war Exon 2 von *CDKN2A* deutlich höher methyliert als der Promotor. In MDA-MB-468 war Exon 2 heterogen methyliert. Eine Korrelation mit der Genexpression von *CDKN2A* wurde für die Methylierungsstatus beider Regionen nicht beobachtet. Für MDA-MB-231, MCF-7 und BT20/HTB19 konnte das Ausmaß der Genexpression nicht bestimmt werden, wahrscheinlich aufgrund homozygoter Deletion von p16.

Die Pyrosequenziermethoden wurden auch auf HUVECs (Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen) angewandt, welche mit H₂O₂ bzw. Tumornekrosefaktor- α bis zu 12 Tage lang behandelt wurden. Unabhängig von Behandlungsart und -dauer war der *CDKN2A*-Promotor unmethyliert während Exon 2 heterogen methyliert war. Auf die relative Genexpression von p16 hatte die Behandlung mit H₂O₂ bzw. Tumornekrosefaktor- α keinen Einfluss.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

μL	Mikroliter
μM	Mikromolar
A	Adenin
APC	Adenomatöses Polyposis Coli Gen
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C _t	Schwellenzyklus (threshold cycle)
cDNA	komplementäre DNS
CpG	Cytosin-Guanin-Dinukleotid
DAPK	pro-apoptotic death-associated protein kinase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
fw	vorwärts (forward)
G	Guanin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
°C	Grad Celsius
HUVECs	Endothelzellen der Nabelschnurvene (human umbilical vein endothelial cells)
HRM	High resolution melting
L	Liter
LOQ	Bestimmungsgrenze (limit of quantification)
M	Molar
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mM	Millimolar
μL	Mikroliter
μg	Mikrogramm
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
nt	Nukleotid
NTC	No template control
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
rev	rückwärts (reverse)

rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions per minute)
rRNA	Ribosomale RNA
s	Sekunden
ssDNA	Einzelsträngige DNA
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAE-Puffer	Tris-acetat-ethylendiamintetraacetat-Puffer
TLR	Toll-like Rezeptor
T _m	Schmelztemperatur
UV	Ultraviolett

6.3 Rohdaten

6.3.1 Pyrosequenzierung

6.3.1.1 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs im *CDKN2A*-Promotor in methylierten und unmethylierten Standards

Tabelle 21 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs im *CDKN2A*-Promotor in verwendeten Standards. Es wurden zwei technische Replikate durchgeführt (LOQ=5%, ULOQ=95%)

Probe	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7
Standard unmethyliert	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Standard methyliert	86%	94%	88%	85%	>ULOQ	83%	75%
	88%	>ULOQ	93%	88%	>ULOQ	86%	80%

6.3.1.2 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* in methylierten und unmethylierten Standards

Tabelle 22 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* in verwendeten Standards. Es wurden zwei technische Replikate durchgeführt (LOQ=5%, ULOQ=95%)

Probe	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	CpG10	CpG11
Standard unmethyliert	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Standard methyliert	>ULOQ	86%	85%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	93%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ
	>ULOQ	86%	86%	>ULOQ							

6.3.1.3 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs im *CDKN2A*-Promotor in kommerziellen Brustkrebszelllinien

Tabelle 23 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs im *CDKN2A*- Promotor in kommerziellen Brustkrebszelllinien. Von jeder Probe wurden zwei bzw. drei technische Replikate durchgeführt. (LOQ=5%, ULOQ=95%, n.a: es wurden keine Peaks erhalten)

Probe	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7
ZR-75-1	20%	12%	7%	23%	13%	10%	12%
	20%	13%	7%	23%	15%	10%	14%
MCF-7	<LOQ						

	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
MDA-MB-231	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
MDA-MB-468	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
SKBR 3/38	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
T47D	83%	>ULOQ	90%	87%	>ULOQ	85%	76%
	93%	>ULOQ	94%	92%	>ULOQ	92%	83%
BT20/HTB19	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

6.3.1.4 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* in kommerziellen Brustkrebszelllinien

Tabelle 24 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* in den kommerziellen Brustkrebszelllinien. Von jeder Probe wurden drei technische Replikate durchgeführt. (LOQ=5%, ULOQ=95% n.a: es wurden keine Peaks erhalten) Bei mit [*] gekennzeichneten Ergebnissen handelt es sich um technische Replikate desselben PCR-Laufes

Probe	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	CpG10	CpG11
ZR-75-1	>ULOQ	93%	85%	87%	91%						
	93%	>ULOQ	>ULOQ	94%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	84%	86%	>ULOQ
	92%	93%	92%	90%	>ULOQ	>ULOQ	92%	89%	74%	78%	>ULOQ
MCF-7	>ULOQ	94%	86%	87%	55%						
	28%	28%	28%	27%	28%	42%	22%	15%	13%	17%	29%
	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	<LOQ	n.a	<LOQ	<LOQ	33%	48%	7%
MDA-MB-231	>ULOQ	88%	90%	>ULOQ							
	>ULOQ	87%	91%	>ULOQ							
	54%	55%	54%	52%	71%	>ULOQ	60%	40%	27%	25%	75%
MDA-MB-468	61%	63%	65%	61%	78%	>ULOQ	71%	50%	33%	43%	81%
	61%	63%	61%	62%	76%	>ULOQ	69%	49%	32%	41%	81%
	63%	67%	65%	61%	79%	>ULOQ	71%	48%	34%	43%	82%

SKBR 3/38	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	93%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	81%	83%	85%	94%
	93%	>ULOQ	>ULOQ	93%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	81%	79%	81%	>ULOQ
	94%	93%	93%	92%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	73%	77%	78%	>ULOQ
T47D	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	93%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	86%	86%	>ULOQ
	35%	64%	63%	61%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	63%	68%	>ULOQ
	>ULOQ	92%	94%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	84%	82%	>ULOQ
BT20/HT B19 [*]	>ULOQ	87%	89%	>ULOQ							
[*]	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ							
	52%	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ	53%	54%	>ULOQ	2%	86%	85%	52%

6.3.1.5 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs im *CDKN2A*-Promotor in HUVECs

Tabelle 25 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs im *CDKN2A*-Promotor in HUVECs. Von jeder Probe wurden zwei technische Replikate durchgeführt (LOQ=5%, ULOQ=95%)

Probe	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7
HD2	<LOQ						
	<LOQ						
CD2	<LOQ						
	<LOQ						
TD4	<LOQ						
	<LOQ						
TD6	<LOQ						
	<LOQ						
TD2	<LOQ						
	<LOQ						
HD6	<LOQ						
	<LOQ						
HD4	<LOQ						
	<LOQ						
HD12	<LOQ						

	<LOQ						
TD11	<LOQ						
	<LOQ						

6.3.1.6 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* in HUVECs

Tabelle 26 Ermittelter Methylierungsstatus der untersuchten CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* in HUVECs. Von jeder Probe wurden zwei technische Replikate durchgeführt (LOQ=5%, ULOQ=95%)

Probe	CpG1	CpG2	CpG3	CpG4	CpG5	CpG6	CpG7	CpG8	CpG9	CpG10	CpG11
HD2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	18%	<LOQ	16%	15%	13%	9%
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	18%	<LOQ	15%	13%	14%	7%
CD2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	19%	<LOQ	18%	14%	15%	6%
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	20%	<LOQ	17%	14%	14%	7%
TD4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	19%	<LOQ	17%	13%	16%	9%
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	19%	<LOQ	17%	14%	14%	7%
TD6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	20%	<LOQ	16%	12%	17%	8%
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	17%	<LOQ	17%	13%	11%	7%
TD2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	17%	<LOQ	17%	13%	15%	9%
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	17%	<LOQ	16%	13%	14%	9%
HD6	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	16%	<LOQ	17%	13%	13%	7%
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	17%	<LOQ	15%	13%	14%	6%
HD4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	16%	<LOQ	15%	13%	14%	8%
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	18%	<LOQ	14%	13%	14%	8%
HD12	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	21%	6%	18%	19%	18%	8%
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	5%	22%	6%	20%	15%	17%	9%
TD11	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	16%	6%	13%	17%	15%	<LOQ
	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	21%	6%	18%	18%	17%	14%

6.3.2 Erhaltene Daten der Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR

6.3.2.1 Erhaltene Daten der Genexpressionsanalyse für kommerzielle Brustkrebszelllinien

Tabelle 27 Bei der Genexpressionsanalyse erhaltene Daten für kommerzielle Brustkrebszelllinien. Als Housekeeping-Gen wurde *GAPDH* verwendet. Von jeder Probe wurden zwei technische Replikate durchgeführt.

Probe	C_t (<i>CDKN2A</i>)	C_t (<i>GAPDH</i>)	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	Mittelwert
SW480 (Referenz)	17,57	13,05	4,52	-0,005	1,0	1,0
	17,56	13,03	4,53	0,005	1,0	
MDA-MB-231	30,59	15,72	14,87	10,345	0,0	0,0
	31,54	15,75	15,79	11,265	0,0	
MDA-MB-468	17,12	16,03	1,09	-3,435	10,8	10,9
	17,27	16,21	1,06	-3,465	11,0	
MCF-7	30,83	16,05	14,78	10,255	0,0	0,0
	30,55	16,08	14,47	9,945	0,0	
T47D	18,41	16,83	1,58	-2,945	7,7	7,8
	18,49	16,96	1,53	-2,995	8,0	
ZR-75-1	19,5	15	4,5	-0,025	1,0	1,0
	19,7	15,16	4,54	0,015	1,0	
SKBR 3/38	19,43	17,69	1,74	-2,785	6,9	7,0
	19,56	17,86	1,7	-2,825	7,1	
BT20/HTB19	31,58	15,78	15,8	11,275	0,0	0,0
	31,31	15,81	15,5	10,975	0,0	

6.3.2.2 Erhaltene Daten der Genexpressionsanalyse für mit H_2O_2 bzw. TNF- α behandelte HUVECs

Tabelle 28 Bei der Genexpressionsanalyse erhaltene Daten für mit H_2O_2 bzw. TNF- α behandelte HUVECs. Als Housekeeping-Gen wurde *GAPDH* verwendet. Von jeder Probe wurden zwei technische Replikate durchgeführt.

Probe	C_t (<i>CDKN2A</i>)	C_t (<i>GAPDH</i>)	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	Mittelwert
CD2	19,65	14,75	4,9	-0,05	1,0	1,0
	19,85	14,85	5	0,05	1,0	
HD2	20,19	15,88	4,31	-0,64	1,6	1,6
	20,23	15,94	4,29	-0,66	1,6	
HD4	19,26	13,35	5,91	0,96	0,5	0,6
	19,21	13,7	5,51	0,56	0,7	
HD6	20,6	19,9	0,7	-4,25	19,0	18,6
	20,69	19,92	0,77	-4,18	18,1	
HD12	21,35	21,83	-0,48	-5,43	43,1	44,8

	21,37	21,96	-0,59	-5,54	46,5	
TD2	19,06	18,76	0,3	-4,65	25,1	25,1
	19,08	18,78	0,3	-4,65	25,1	
TD4	21,2	21,33	-0,13	-5,08	33,8	34,9
	21,11	21,33	-0,22	-5,17	36,0	
TD6	22,75	19,93	2,82	-2,13	4,4	4,3
	22,78	19,89	2,89	-2,06	4,2	
TD11	18,13	13,14	4,99	0,04	1,0	1,0
	18,16	13,24	4,92	-0,03	1,0	
HP29	21,11	21,19	-0,08	-5,03	32,7	34,3
	21,1	21,32	-0,22	-5,17	36,0	
HT	21,05	18,27	2,78	-2,17	4,5	4,8
	21,08	18,47	2,6	-2,34	5,1	

6.3.3 Statistische Auswertungen

6.3.3.1 Statistische Auswertung der Methylierungsstatus der kommerziellen Brustkrebszellen im *CDKN2A*-Promotor mittels Kruskal-Wallis-Test

Tabelle 29 p-Werte der statistischen Auswertung des Methylierungsstatus der sieben CpGs im *CDKN2A*-Promotor in kommerziellen Brustkrebszelllinien mittels Kruskal-Wallis-Test. (n.s: nicht signifikant). MDA-MB-231 ist ausgenommen, da der Methylierungsstatus im *CDKN2A*-Promotor nicht bestimmbar war. Es ergaben sich keine signifikanten Korrelationen des Methylierungsstatus. $p \leq \alpha = 0,05$. [p(Probe)] = p-Werte des Vergleichs der Methylierungsgrade untereinander. [p-(Subtyp)] = p-Werte des Vergleichs der Proben in Hinsicht auf deren jeweiligen Hormonrezeptorstatus. (3x Luminal A, 2x triple-negativ, 1x HER2 positiv)

	Freiheitsgrade	p (Probe)	p (Subtyp)	Signifikanz
CpG1	5	0,0525	0,0723	n.s
CpG2	5	0,0525	0,0723	n.s
CpG3	5	0,0525	0,0723	n.s
CpG4	5	0,0525	0,0723	n.s
CpG5	5	0,0525	0,0723	n.s
CpG6	5	0,0525	0,0723	n.s
CpG7	5	0,0536	0,0733	n.s
p gesamt		0,0536	0,0733	

6.3.3.2 Statistische Auswertung des Methylierungsstatus in den kommerziellen Brustkrebszelllinien in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* mittels Kruskal-Wallis-Test

Tabelle 30 p-Werte der statistischen Auswertung des Methylierungsstatus der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* in kommerziellen Brustkrebszelllinien mittels Kruskal-Wallis-Test. (ns: nicht signifikant) Es ergaben sich keine signifikanten Korrelationen des Methylierungsstatus. $p \leq 0,05$. [p(Probe)] = p-Werte des Vergleichs der Methylierungsgrade untereinander. [p-(Subtyp)] = p-Werte des Vergleichs der Proben in Hinsicht auf deren jeweiligen Hormonrezeptorstatus (3x Luminal A, 2x triple-negativ, 1x HER2 positiv)

	Freiheitsgrade	p (Probe)	p (Subtyp)	Signifikanz
CpG1	5	0,128	0,301	ns
CpG2	5	0,214	0,499	ns
CpG3	5	0,230	0,507	ns
CpG4	5	0,186	0,666	ns
CpG5	5	0,0531	0,0384*	*Post-hoc ns (siehe Tabelle 31)
CpG6	5	0,0997	0,344	ns
CpG7	5	0,110	0,185	ns
CpG8	5	0,0800	0,141	ns
CpG9	5	0,109	0,770	ns
CpG10	5	0,109	0,710	ns
CpG11	5	0,119	0,142	ns

Tabelle 31 Post-hoc-Test auf signifikante Korrelationen des Methylierungsstatus in kommerziellen Brustkrebszelllinien für CpG5 der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* mittels Dunn-Test. Adjustment nach Holm. ($p \geq \alpha = 0,05$)

	BT20/HTB19	MDA-MB-231	MDA-MB-468	SKBR 3/38	T47D
MDA-MB-231	-1.7717				
	0.6879				
MDA-MB-468	0.2085	1,9582			
	1,0000	0.5522			
SKBR 3/38	-1.9808	0.0000	-2.1894		
	0.6189	1,0000	0.4285		
T47D	-1,7717	0.0000	-1,9582	0.0000	
	0.6115	1,0000	0.5020	1,0000	
ZR-75-1	-1,9808	0,0000	-2,1894	0,0000	0,0000
	0,5712	1,0000	0,3999	1,0000	1,0000

Tabelle 32 Post-hoc-Test auf signifikante Korrelationen des Methylierungsstatus der Brustkrebszelllinien in Bezug auf den Hormonrezeptorstatus für CpG 5 in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* mittels Dunn-Test. Adjustment nach Holm. ($p \geq \alpha = 0,04$) (3x Luminal A, 2x triple-negativ, 1x HER2 positiv)

Hormonrezeptorstatus	HER 2+	Luminal A
Luminal A	0,0000	
	1,0000	
triple-negativ	1,8860	2,2398
	0,1186	0,0753

6.3.3.3 Statistische Auswertung des Methylierungsstatus der HUVECs in der Zielregion von Exon 2 von *CDKN2A* mittels Kruskal-Wallis-Test

Tabelle 33 p-Werte der statistischen Auswertung des Methylierungsstatus der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* mittels Kruskal-Wallis-Test. (n.s.: nicht signifikant) Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Methylierungsstatus. ($p \geq \alpha = 0,05$)

	p	p.adj	Signifikanz
CpG6	0,231	0,23	n.s
CpG7	0,0301*	0,03*	*Post-hoc ns (siehe Tabelle 34)
CpG8	0,239	0,24	n.s
CpG9	0,0805	0,08	n.s
CpG10	0,282	0,28	n.s
CpG11	0,49	0,49	n.s

Tabelle 34 Post-hoc-Test für CpG7 in der Zielregion von Exon 2 in HUVECs, Dunn-Test. Adjustment nach Holm. ($p \geq \alpha = 0,05$)

	CD2	HD12	HD2	HD4	HD6	TD11	TD2	TD4
HD12	-2,3376							
	0,6987							
HD2	0,0000	2,3376						
	1,0000	0,6793						
HD4	0,0000	2,3376	0,0000					
	1,0000	0,6599	1,0000					
HD6	0,0000	2,3376	0,0000	0,0000				
	1,0000	0,6405	1,0000	1,0000				
TD11	-2,3376	0,0000	-2,3376	-2,3376	-2,3376			
	0,6211	1,0000	0,6017	0,5823	0,5629			

TD2	0,00000	2,3376	0,0000	0,0000	0,0000	2,3376		
	1,0000	0,5435	1,0000	1,0000	1,0000	0,5240		
TD4	0,0000	2,3376	0,0000	0,0000	0,0000	2,3376	0,0000	
	1,0000	0,5046	1,0000	1,0000	1,0000	0,4852	1,0000	
TD6	0,0000	2,3376	0,0000	0,0000	0,0000	2,3376	0,0000	0,0000
	1,0000	0,4658	1,0000	1,0000	1,0000	0,4464	1,0000	1,0000

6.3.3.4 Statistische Auswertung der relativen Genexpression der HUVECs in der Zielregion in Exon 2 von *CDKN2A* mittels Kruskal-Wallis-Test

Tabelle 35 Statistische Auswertung der Ergebnisse der relativen Genexpression der HUVECs. Für weitere Betrachtungen wurden lediglich Werte mit einer Standardabweichung (SD) ≤ 2 verwendet. [SD* (C_t Probe zu C_t Referenz) = Standardabweichung der erhaltenen C_t-Werte von den mit dem Primerpaar P16INK4a amplifizierten Proben zur unbehandelten Zelllinie (CD2)] [SD** (C_t Probe zu C_t Referenz) Standardabweichung der erhaltenen C_t-Werte von den mit dem Primerpaar für das Housekeeping-Gen *GAPDH* amplifizierten Proben im Vergleich zu jenen der unbehandelten Zelllinie (CD2)]

	C _t (<i>CDKN2A</i>)	SD* (C _t Probe zu C _t Referenz)	C _t (<i>GAPDH</i>)	SD** (C _t Probe zu C _t Referenz)	Δ C _t	ΔΔ C _t	Mittelwert
CD2 (Referenz)	19,65	0,14	14,75	0,07	4,9	-0,05	1,04
	19,85	0,14	14,85	0,07	5	0,05	0,97
HD2	20,19	0,28	15,88	0,64	4,31	-0,64	1,56
	20,23	0,28	15,94	0,64	4,29	-0,66	1,58
HD4	19,26	0,31	13,35	0,75	5,91	0,96	0,51
	19,21	0,31	13,7	0,75	5,51	0,56	0,68
HD6	20,6	0,52	19,9	2,95	0,7	-4,25	19,03
	20,69	0,52	19,92	2,95	0,77	-4,18	18,13
HD12	21,35	0,93	21,83	4,1	-0,48	-5,43	43,11
	21,37	0,93	21,96	4,1	-0,59	-5,54	46,53
TD2	19,06	0,4	18,76	2,29	0,3	-4,65	25,11
	19,08	0,4	18,78	2,29	0,3	-4,65	25,11
TD4	21,2	0,82	21,33	3,77	-0,13	-5,08	33,82
	21,11	0,82	21,33	3,77	-0,22	-5,17	36
TD6	22,75	1,74	19,93	2,95	2,82	-2,13	4,38
	22,78	1,74	19,89	2,95	2,89	-2,06	4,17
TD11	18,13	0,93	13,14	0,93	4,99	0,04	0,97
	18,16	0,93	13,24	0,93	4,92	-0,03	1,02

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Kennzeichen einer Krebserkrankung.....	4
Abbildung 2 Krebsinzidenz und -mortalität in Österreich.	5
Abbildung 3 Aufbau der DNA.	6
Abbildung 4 Methylierung von Cytosin zum 5-Methylcytosin durch DNA-Methyltransferasen (DNMT).....	7
Abbildung 5 Vermuteter evolutionärer Prozess der in Vertebraten zur Entstehung von CpG-Inseln geführt hat.	7
Abbildung 6 Arbeitsweise des Tumorsuppressorproteins p16.....	9
Abbildung 7 Möglichkeiten der Bindung von TNF- α an TNF-R1 bzw. TNF-R2.	14
Abbildung 8 Mechanismus der Bisulfidkonvertierung von Cytosin zu Uracil.	17
Abbildung 9 Schema der Bisulfidkonvertierung mit anschließender PCR.	18
Abbildung 10 Ablauf einer PCR.....	21
Abbildung 11 Während einer Pyrosequenzierung ablaufende Reaktionen.....	24
Abbildung 12 Forward-Assay.....	25
Abbildung 13 Reverse-Assay.	25
Abbildung 14 Exemplarisches Pyrogramm mit zugehörigem Histogramm.	28
Abbildung 15 Fragmentlänge einer DNA und deren Laufstrecke in einem Agarosegel.....	29
Abbildung 16 Exemplarische Amplifikationskurve mit dazugehöriger Threshold-Linie.....	32
Abbildung 17 Bindungsstellen der entworfenen Primer der Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	33
Abbildung 18 Darstellung der entwickelten Primer für die Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	34
Abbildung 19 Primer für die Pyrosequenzierung der Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	34
Abbildung 20 Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese zur Ermittlung der optimalen PCR Bedingungen.	37
Abbildung 21 Pyrogramme der Standards, amplifiziert mit den entworfenen Primern für den <i>CDKN2A</i> -Promotor.	39
Abbildung 22 Bindungsstellen der Primer für die Pyrosequenzierung von Exon 2 in <i>CDKN2A</i>	40
Abbildung 23 Primer für die Pyrosequenzierung der untersuchten Region in Exon 2 von <i>CDKN2A</i>	40
Abbildung 24 Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese zur Ermittlung der optimalen PCR Bedingungen.	42
Abbildung 25 Vollständiges Pyrogramm amplifiziert mit dem entwickelten Primerpaar für Exon 2 von <i>CDKN2A</i>	42
Abbildung 26 Pyrogramme des unmethylierten und vollständig methylierten Standards.....	43
Abbildung 27 Pyrogramm für die Zelllinie MDA-MB-231. Zielregion: Exon 2 von <i>CDKN2A</i>	45
Abbildung 28 Elektropherogramm der Proben für die das Ausmaß der Genexpression nicht bestimmt werden konnte.	46
Abbildung 29 Pyrogramm für die Zelllinie MDA-MB-468. Zielregion: Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	48
Abbildung 30 Pyrogramm für die Zelllinie MDA-MB-468. Zielregion: Exon2 von <i>CDKN2A</i>	48
Abbildung 31 Pyrogramm für die Zelllinie MCF-7. Zielregion Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	49
Abbildung 32 Pyrogramm für die Zelllinie MCF-7. Zielregion: Exon 2 von <i>CDKN2A</i>	50
Abbildung 33 Pyrogramm für die Zelllinie BT20/HTB19. Zielregion: Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	51
Abbildung 34 Pyrogramm für die Zelllinie BT20/HTB19. Zielregion: Exon 2 von <i>CDKN2A</i> - technisches Replikat 1.....	52
Abbildung 35 Pyrogramm für die Zelllinie BT20/HTB19. Zielregion: Exon2 von <i>CDKN2A</i> - technisches Replikat 2.....	52
Abbildung 36 Pyrogramm für die Zelllinie T47D. Zielregion: Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	53
Abbildung 37 Pyrogramm für die Zelllinie T47D. Zielregion: Exon 2 von <i>CDKN2A</i>	54
Abbildung 38 Pyrogramm für die Zelllinie SKBR3/38. Zielregion: Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	55
Abbildung 39 Pyrogramm für die Zelllinie SKBR 3/38. Zielregion: Exon 2 von <i>CDKN2A</i>	55
Abbildung 40 Pyrogramm für die Zelllinie ZR-75-1. Zielregion: Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	56
Abbildung 41 Pyrogramm für die Zelllinie ZR-75-1. Zielregion: Exon 2 von <i>CDKN2A</i>	57
Abbildung 42 Methylierungsgrad des <i>CDKN2A</i> Promotors in kommerziellen Brustepithelzelllinien.	58
Abbildung 43 Methylierungsgrad der Zielregion in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> in kommerziellen Brustepithelzelllinien.	58
Abbildung 44 Gegenüberstellung der erhaltenen Methylierungsgrade der CpGs in der Promotorregion und den Mittelwerten der erhaltenen Methylierungsgrade in Exon 2 der untersuchten Brustzellen.....	59
Abbildung 45 Zusammenfassung der mittels RT-PCR erhaltenen Ergebnisse der relativen Genexpression der kommerziell erhältlichen Brustzelllinien.....	60
Abbildung 46 Gegenüberstellung der Mittelwerte der erhaltenen Methylierungsgrade der sieben CpGs in der Promotorregion der Brustzelllinien (Y-Achse) und den $\Delta\Delta C_t$ -Werten der Proben.....	60
Abbildung 47 Gegenüberstellung der Mittelwerte der erhaltenen Methylierungsgrade der elf CpGs in Exon 2 der Brustzelllinien (Y-Achse) und den $\Delta\Delta C_t$ -Werten der Proben.	60

Abbildung 48 Pyrogramm der Kontrolle (CD2) amplifiziert mittels Primerpaar für die Promotorregion von <i>CDKN2A</i> .	65
Abbildung 49 Methylierungsstatus der sieben CpGs <i>CDKN2A</i> Promotors in den Huvecs, welche mit TNF- α behandelt wurden.....	66
Abbildung 50 Methylierungsstatus der sieben CpGs in der Zielregion des <i>CDKN2A</i> Promotors in den Huvecs, welche mit H2O2 behandelt wurden.	66
Abbildung 51 Methylierungsgrad der elf CpGs in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> in den mit TNF- α behandelten HUVECs.	67
Abbildung 52 Methylierungsgrad der elf CpGs in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> in den mit H2O2 behandelten HUVECs.	68
Abbildung 53 Zusammenfassung der mittels RT-PCR erhaltenen Ergebnisse der relativen Genexpression der HUVECs.	69
Abbildung 54 Befüllungsschema für die Trennung der DNA-Stränge vor der Pyrosequenzierung.....	76
Abbildung 55 Bindungsstellen der Primer zur Bestimmung der relativen Genexpression in Exon 2 und Exon 3.....	78
Abbildung 56 Primer zur Bestimmung der relativen Genexpression von <i>CDKN2A</i>	78
Abbildung 57 Verwendete Einstellungen des Setups der RT-PCR mit SYBR Green	80
Abbildung 58 Beim Design verwendete Parameter der entworfenen Forward- und Reverse-Primer	81
Abbildung 59 Beim Design verwendete Parameter der entworfenen Sequencing-Primer	81

6.5 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Beladungsschema des Agarosegels zur Optimierung der Amplifikation mittels PCR für die Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	36
Tabelle 2 Beladungsschema des gezeigten Agarosegels mit unmethylierten und methylierten Standards zur Ermittlung der optimalen Bedingungen der Amplifikation mittels PCR für die Region in Exon 2 von <i>CDKN2A</i>	41
Tabelle 3 Übersicht der verwendeten kommerziell erhältlichen Brustkrebszelllinien	44
Tabelle 4 Beladungsschema der Gelelektrophorese zur Überprüfung der Bildung von PCR-Produkten bei der Genexpressionsanalyse.....	47
Tabelle 5 Übersicht der Ergebnisse der entwickelten Methoden von den kommerziell erhältlichen Brustzelllinien.....	61
Tabelle 6 Übersicht über die erhaltenen HUVECs und deren jeweilige Behandlungsart und-dauer	64
Tabelle 7 Zeit- und Temperaturangaben der einzelnen Schritte für die Bisulfitkonvertierung der Proben	73
Tabelle 8 Übersicht der eingesetzten Volumina für die Amplifikation der Proben-DNA pro Ansatz	74
Tabelle 9 PCR-Setup für die Amplifikation der Bisulfitkonvertierten Proben zur Pyrosequenzierung	75
Tabelle 10 Einzelne Arbeitsschritte und deren Dauer zur Strangtrennung mittels PyroMark Q24 Vakuum Workstation	76
Tabelle 11 Übersicht über Primer für das Housekeeping-Gen <i>GAPDH</i>	79
Tabelle 12 Eingesetzte Volumina pro Ansatz für die Messung der Genexpression mittels SYBR Green®	79
Tabelle 13 Verwendetes Setup für die Durchführung einer RT-PCR mit SYBR Green®	80
Tabelle 14 Eingesetzte Volumina zur Herstellung der Master Mixes mit zwei verschiedenen Primerkonzentrationen .	82
Tabelle 15 Eingesetzte Volumina des Master Mix und Probe je Ansatz	83
Tabelle 16 PCR-Setup für den Optimierungsprozess der entworfenen Primer der Promotorregion von <i>CDKN2A</i>	83
Tabelle 17 PCR-Setup für die Optimierung der Annealingtemperatur des entworfenen Primerpaares für Exon 2	84
Tabelle 18 Verwendete Software für die im Rahmen dieser Arbeit entworfenen Primer.....	86
Tabelle 19 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Apparaturen.....	86
Tabelle 20 Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits	86
Tabelle 21 Methylierungsstatus der untersuchten CpGs im <i>CDKN2A</i> -Promotor der verwendeten Standards	IV
Tabelle 22 Methylierungsstatus der untersuchten CpGs in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> der verwendeten Standards.	IV
Tabelle 23 Methylierungsstatus der untersuchten CpGs im <i>CDKN2A</i> - Promotor in kommerziellen Brustkrebszellen.....	IV
Tabelle 24 Methylierungsstatus der untersuchten CpGs in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> in den kommerziellen Brustkrebszelllinien	V
Tabelle 25 Methylierungsstatus der untersuchten CpGs im <i>CDKN2A</i> -Promotor in HUVECs	VI
Tabelle 26 Methylierungsstatus der untersuchten CpGs in der Zielregion in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> in HUVECs	VII
Tabelle 27 Bei der Genexpressionsanalyse erhaltene Daten für kommerzielle Brustkrebszelllinien	VIII
Tabelle 28 Bei der Genexpressionsanalyse erhaltene Daten für mit H ₂ O ₂ bzw. TNF-α behandelte HUVECs.....	VIII
Tabelle 29 p-Werte der statistischen Auswertung des Methylierungsstatus der sieben CpGs im <i>CDKN2A</i> -Promotor in kommerziellen Brustkrebszelllinien mittels Kruskal-Wallis-Test.....	IX
Tabelle 30 p-Werte der statistischen Auswertung des Methylierungsstatus der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> in kommerziellen Brustkrebszelllinien mittels Kruskal-Wallis-Test.	X
Tabelle 31 Post-hoc-Test des Methylierungsstatus in kommerziellen Brustkrebszelllinien für CpG5 in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> mittels Dunn-Test	X
Tabelle 32 Post-hoc-Test des Methylierungsstatus der Brustkrebszelllinien in Bezug auf den Hormonrezeptorstatus für CpG 5 in der Zielregion in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> mittels Dunn-Test	XI
Tabelle 33 p-Werte der statistischen Auswertung des Methylierungsstatus der elf CpGs in der Zielregion in Exon 2 von <i>CDKN2A</i> mittels Kruskal-Wallis-Test.	XI
Tabelle 34 Post-hoc-Test für CpG7 in der Zielregion von Exon 2 in HUVECs, Dunn-Test.....	XI
Tabelle 35 Statistische Auswertung der Ergebnisse der relativen Genexpression der HUVECs.	XII

7 Quellenverzeichnis

1. Petrides, P.E., *Tumorgewebe*. In *Biochemie und Pathobiochemie*; Heinrich, P.C., Löffler, G., Petrides, P.E., (Eds.); Springer-Lehrbuch; 9., vollständig überarbeitete Auflage.; Springer: Berlin Heidelberg, 2014; 1142-1150, ISBN 978-3-642-17971-6.
2. Pecorino, L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics*; Fourth edition.; Oxford University Press: Oxford, United Kingdom, 2016; 1-78, ISBN 978-0-19-871734-8.
3. Hackl, M. *Trends der Entwicklung von Krebserkrankungen in Österreich 2015*. Bundesministerium für Gesundheit (BMG), ISBN 978-3-902611-86-4
4. Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Gatto, G.J.; Stryer, L. *Stryer Biochemie*; Lehrbuch; 8. Auflage.; Springer Spektrum: Berlin, 2018; 4-6, ISBN 978-3-662-54619-2.
5. <https://www.Lecturio.de/Magazin/Dna/>. Strukt. DNA 2018. (02.02.2021)
6. Lewin, B. *Genes IX*; 9th ed.; Jones and Bartlett Publishers: Sudbury, Mass, 2008; S.851 ISBN 978-0-7637-4063-4.
7. Allis, C.D., Jenuwein, T., Reinberg, D., Overview and concepts. In *Epigenetics*. Allis, C.D., Caparros, M.-L., Jenuwein, T., Reinberg (Eds.); Second edition.; CSH Press, Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York, 2015; 23-61, ISBN 978-1-936113-59-0.
8. Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Morgan, D.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. *Molekularbiologie der Zelle*; Schäfer, U., Ed.; 6. Auflage.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2017; 173-202; 406-408, ISBN 978-3-527-34072-9.
9. Hervouet, E.; Cartron, P.-F.; Jouvenot, M.; Delage-Mourroux, R. *Epigenetic Regulation of Estrogen Signaling in Breast Cancer*. *Epigenetics* **2013**, *8*, 237–245, doi:10.4161/epi.23790.
10. Bosviel, R.; Garcia, S.; Lavediaux, G.; Michard, E.; Dravers, M.; Kwiatkowski, F.; Bignon, Y.-J.; Bernard-Gallon, D.J. *BRCA1 Promoter Methylation in Peripheral Blood DNA Was Identified in Sporadic Breast Cancer and Controls*. *Cancer Epidemiol.* 2012, *36*, e177–e182, doi:10.1016/j.canep.2012.02.001.
11. Singh, U.; Malik, M.A.; Goswami, S.; Shukla, S.; Kaur, J. *Epigenetic Regulation of Human Retinoblastoma*. *Tumor Biol.* 2016, *37*, 14427–14441, doi:10.1007/s13277-016-5308-3.
12. Liang, T.-J.; Wang, H.-X.; Zheng, Y.-Y.; Cao, Y.-Q.; Wu, X.; Zhou, X.; Dong, S.-X. *APC Hypermethylation for Early Diagnosis of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis and Literature Review*. *Oncotarget* 2017, *8*, 46468–46479, doi:10.18632/oncotarget.17576.
13. Bodoor, K.; Haddad, Y.; Alkhateeb, A.; Al-Abbadi, A.; Dowairi, M.; Magableh, A.; Bsoul, N.; Ghabkari, A. *DNA Hypermethylation of Cell Cycle (P15 and P16) and Apoptotic (P14, P53, DAPK and TMS1) Genes in Peripheral Blood of Leukemia Patients*. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 75–84, doi:10.7314/APJCP.2014.15.1.75.
14. Romagosa, C.; Simonetti, S.; López-Vicente, L.; Mazo, A.; Leonart, M.E.; Castellvi, J.; Ramon y Cajal, S. *P16Ink4a Overexpression in Cancer: A Tumor Suppressor Gene Associated with Senescence and High-Grade Tumors*. *Oncogene* **2011**, *30*, 2087–2097, doi:10.1038/onc.2010.614.
15. Phillips, J.M.; Yamamoto, Y.; Negishi, M.; Maronpot, R.R.; Goodman, J.I. *Orphan Nuclear Receptor Constitutive Active/Androstane Receptor–Mediated Alterations in DNA Methylation during Phenobarbital Promotion of Liver Tumorigenesis*. *Toxicol. Sci.* **2007**, *96*, 72–82, doi:10.1093/toxsci/kfl188.
16. Pearson, B.E.; Nasheuer, H.P.; Wang, T.S. *Human DNA Polymerase Alpha Gene: Sequences Controlling Expression in Cycling and Serum-Stimulated Cells*. *Mol. Cell. Biol.* **1991**, *11*, 2081–2095, doi:10.1128/mcb.11.4.2081.
17. Vigo, E.; Müller, H.; Prosperini, E.; Hateboer, G.; Cartwright, P.; Moroni, M.C.; Helin, K. *CDC25A Phosphatase Is a Target of E2F and Is Required for Efficient E2F-Induced S Phase*. *Mol. Cell. Biol.* **1999**, *19*, 6379–6395, doi:10.1128/mcb.19.9.6379.

18. Blake, M.C.; Azizkhan, J.C. *Transcription Factor E2F Is Required for Efficient Expression of the Hamster Dihydrofolate Reductase Gene in Vitro and in Vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **1989**, *9*, 4994–5002, doi:10.1128/mcb.9.11.4994.
19. Serrano, M. *The Tumor Suppressor Protein P16INK4a*. *Exp. Cell Res.* **1997**, *237*, 7–13, doi:10.1006/excr.1997.3824.
20. Baylin, S.B. *Abnormal Regional Hypermethylation in Cancer Cells*. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* **1992**, *8*, 811–820.
21. Zhao, R.; Choi, B.Y.; Lee, M.-H.; Bode, A.M.; Dong, Z. *Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (P16(INK4a)) in Cancer*. *EBioMedicine* **2016**, *8*, 30–39, doi:10.1016/j.ebiom.2016.04.017.
22. Woodcock, D.M.; Linsenmeyer, M.E.; Doherty, J.P.; Warren, W.D. *DNA Methylation in the Promoter Region of the P16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) Gene in Human Breast Tumours*. *Br. J. Cancer* **1999**, *79*, 251–256, doi:10.1038/sj.bjc.6690041.
23. Merlo, A.; Herman, J.G.; Mao, L.; Lee, D.J.; Gabrielson, E.; Burger, P.C.; Baylin, S.B.; Sidransky, D. *5' CpG Island Methylation Is Associated with Transcriptional Silencing of the Tumour Suppressor P16/CDKN2/MTS1 in Human Cancers*. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 686–692, doi:10.1038/nm0795-686
24. Huang, Q.; Su, X.; Ai, L.; Li, M.; Fan, C.-Y.; Weiss, L.M. *Promoter Hypermethylation of Multiple Genes in Gastric Lymphoma*. *Leuk. Lymphoma* **2007**, *48*, 1988–1996, doi:10.1080/10428190701573224.
25. Robaina, M.C.S.; Faccion, R.S.; Arruda, V.O.; de Rezende, L.M.M.; Vasconcelos, G.M.; Apa, A.G.; Bacchi, C.E.; Klumb, C.E. *Quantitative Analysis of CDKN2A Methylation, mRNA, and P16(INK4a) Protein Expression in Children and Adolescents with Burkitt Lymphoma: Biological and Clinical Implications*. *Leuk. Res.* **2015**, *39*, 248–256, doi:10.1016/j.leukres.2014.11.023.
26. Kostaki, M.; Manona, A.D.; Stavra, I.; Korkolopoulou, P.; Levidou, G.; Trigka, E.-A.; Christofidou, E.; Champsas, G.; Stratigos, A.J.; Katsambas, A.; et al. *High-Frequency P16(INK) (4A) Promoter Methylation Is Associated with Histone Methyltransferase SETDB1 Expression in Sporadic Cutaneous Melanoma*. *Exp. Dermatol.* **2014**, *23*, 332–338, doi:10.1111/exd.12398.
27. Asokan, G.S.; Jeelani, S.; Gnanasundaram, N. *Promoter Hypermethylation Profile of Tumour Suppressor Genes in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma*. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **2014**, *8*, ZC09-12, doi:10.7860/JCDR/2014/9251.4949.
28. Kim, J.C.; Choi, J.S.; Roh, S.A.; Cho, D.H.; Kim, T.W.; Kim, Y.S. *Promoter Methylation of Specific Genes Is Associated with the Phenotype and Progression of Colorectal Adenocarcinomas*. *Ann. Surg. Oncol.* **2010**, *17*, 1767–1776, doi:10.1245/s10434-009-0901-y.
29. Kempster, S.; Phillips, W.A.; Baidur-Hudson, S.; Thomas, R.J.; Dow, C.; Rockman, S.P. *Methylation of Exon 2 of P16 Is Associated with Late Stage Oesophageal Cancer*. *Cancer Lett.* **2000**, *150*, 57–62, doi:10.1016/s0304-3835(99)00372-9.
30. Spitzwieser, M.; Entfellner, E.; Werner, B.; Pulverer, W.; Pfeiler, G.; Hacker, S.; Cichna-Markl, M. *Hypermethylation of CDKN2A Exon 2 in Tumor, Tumor-Adjacent and Tumor-Distant Tissues from Breast Cancer Patients*. *BMC Cancer* **2017**, *17*, 260, doi:10.1186/s12885-017-3244-2.
31. Collado, M.; Blasco, M.A.; Serrano, M. *Cellular Senescence in Cancer and Aging*. *Cell* **2007**, *130*, 223–233, doi:10.1016/j.cell.2007.07.003.
32. Mortimer, C.E.; Müller, U.; Beck, J. *Chemie: das Basiswissen der Chemie; 12., korrigierte und aktualisierte Auflage.*; Georg Thieme Verlag: Stuttgart New York, 2015; 394-403, ISBN 978-3-13-484312-5.
33. Sobotta, M.C.; Liou, W.; Stöcker, S.; Talwar, D.; Oehler, M.; Ruppert, T.; Scharf, A.N.D.; Dick, T.P. *Peroxiredoxin-2 and STAT3 Form a Redox Relay for H2O2 Signaling*. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*, 64–70, doi:10.1038/nchembio.1695.

34. Furukawa, A.; Tada-Oikawa, S.; Kawanishi, S.; Oikawa, S. *H2O2 Accelerates Cellular Senescence by Accumulation of Acetylated P53 via Decrease in the Function of SIRT1 by NAD+ Depletion*. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **2007**, *20*, 45–54, doi:10.1159/000104152.
35. Guo, G.E.; Ma, L.W.; Jiang, B.; Yi, J.; Tong, T.J.; Wang, W.G. *Hydrogen Peroxide Induces P16(INK4a) through an AUF1-Dependent Manner*. *J. Cell. Biochem.* **2010**, *109*, 1000–1005, doi:10.1002/jcb.22474.
36. Ben-Porath, I.; Weinberg, R.A. *The Signals and Pathways Activating Cellular Senescence*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 961–976, doi:10.1016/j.biocel.2004.10.013.
37. Mahdavi Sharif, P.; Jabbari, P.; Razi, S.; Keshavarz-Fathi, M.; Rezaei, N. *Importance of TNF-Alpha and Its Alterations in the Development of Cancers*. *Cytokine* **2020**, *130*, 155066, doi:10.1016/j.cyto.2020.155066.
38. Wajant, H.; Pfizenmaier, K.; Scheurich, P. *Tumor Necrosis Factor Signaling*. *Cell Death Differ.* **2003**, *10*, 45–65, doi:10.1038/sj.cdd.4401189.
39. Rahman, M.M.; McFadden, G. *Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens*. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, e4, doi:10.1371/journal.ppat.0020004.
40. Khan, S.Y.; Awad, E.M.; Oszwald, A.; Mayr, M.; Yin, X.; Waltenberger, B.; Stuppner, H.; Lipovac, M.; Uhrin, P.; Breuss, J.M. *Premature Senescence of Endothelial Cells upon Chronic Exposure to TNF α Can Be Prevented by N-Acetyl Cysteine and Plumericin*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 39501, doi:10.1038/srep39501.
41. Susan, J.Ci.; Harrison, J.; Paul, C.L.; Frommer, M. *High Sensitivity Mapping of Methylated Cytosines*. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 2990–2997, doi:10.1093/nar/22.15.2990.
42. Hayatsu, H. *The Bisulfite Genomic Sequencing Used in the Analysis of Epigenetic States, a Technique in the Emerging Environmental Genotoxicology Research*. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2008**, *659*, 77–82, doi:10.1016/j.mrrev.2008.04.003.
43. Lehmann, U. *Pyrosequencing* 2ed.; Springer: New York, 2015; 1-206, ISBN 978-1-4939-4909-0.
44. Adusumalli, S.; Mohd Omar, M.F.; Soong, R.; Benoukraf, T. *Methodological Aspects of Whole-Genome Bisulfite Sequencing Analysis*. *Brief. Bioinform.* **2015**, *16*, 369–379, doi:10.1093/bib/bbu016.
45. Mülhardt, C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 2013; 58-112, ISBN 978-3-642-34635-4.
46. McPherson, M.J.; Moller, S.G. *PCR, Second Edition*.; Taylor & Francis Group: UK, 2007; 1-82, ISBN 978-0-203-00267-4.
47. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Polymerase_chain_reaction.svg [08.12.2020] 2020. (02.02.2021)
48. Harrington, C.T.; Lin, E.I.; Olson, M.T.; Eshleman, J.R. *Fundamentals of Pyrosequencing*. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **2013**, *137*, 1296–1303, doi:10.5858/arpa.2012-0463-RA.
49. Mock, D.M., Biotin in *Handbook of Vitamins*; 4th ed Zemleni, J., Rucker, R.B., Mc Cormick, D.B., Suttie, J.W., (Eds); Taylor & Francis: Boca Raton, 2007;185, 362, ISBN 978-0-8493-4022-2.
50. Chaiet, L.; Wolf, F.J. *The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding Protein Produced by Streptomyces*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1964**, *106*, 1–5, doi:10.1016/0003-9861(64)90150-X.
51. Mikeska, T.; Felsberg, J.; Hewitt, C.A.; Dobrovic, A. *Analysing DNA Methylation Using Bisulphite Pyrosequencing*. In *Epigenetics Protocols*; Tollefsbol, T.O., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; Vol. 791, 33–53; ISBN 978-1-61779-315-8.
52. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=98af0247-ee11-4937-87d2-31a551e562fa&lang=en>. *PyroMarkQ24 Adv.* 2021. (01.02.2021)
53. Brakensiek, K.; Wingen, L.U.; Länger, F.; Kreipe, H.; Lehmann, U. *Quantitative High-Resolution CpG Island Mapping with PyrosequencingTM Reveals Disease-Specific Methylation Patterns of the CDKN2B Gene in Myelodysplastic Syndrome and Myeloid Leukemia*. *Clin. Chem.* **2007**, *53*, 17–23, doi:10.1373/clinchem.2007.072629.

54. Tost, J.; El abdalaoui, H.; Glynne Gut, I. *Serial Pyrosequencing for Quantitative DNA Methylation Analysis*. *BioTechniques* **2006**, *40*, 721–726, doi:10.2144/000112190.
55. Mikeska, T.; Candiloro, I.L.M.; Dobrovic, A. *The Implications of Heterogeneous DNA Methylation for the Accurate Quantification of Methylation*. *Epigenomics* **2010**, *2*, 561–573, doi:10.2217/epi.10.32.
56. Wojdacz, T.K.; Dobrovic, A. *Methylation-Sensitive High Resolution Melting (MS-HRM): A New Approach for Sensitive and High-Throughput Assessment of Methylation*. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, e41–e41, doi:10.1093/nar/gkm013.
57. Holtzhauer, M. *Biochemische Labormethoden*; Springer-Labor-Manual; Dritte, korrigierte Auflage.; Springer: Berlin, 1997; 50-52, ISBN 978-3-540-62435-6.
58. Cann, A. *Principles of Molecular Virology*; 5th ed.; Elsevier; Academic Press: Amsterdam: Waltham, MA, 2012; 88-92 ISBN 978-0-12-384939-7.
59. Wagner, E.M. *Monitoring Gene Expression: Quantitative Real-Time Rt-PCR*. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **2013**, *1027*, 19–45, doi:10.1007/978-1-60327-369-5_2.
60. <https://www.qiagen.com/at/Resources/Resourcedetail?Id=a1f55944-D044-4319-Bd9b-98d193ab76ae&lang=en>. *Sybr Green* 2020. (02.02.2021)
61. Dorak, M.T., Ed.; *Real-Time PCR*; BIOS advanced methods; Taylor & Francis: New York, 2006; 1-37, ISBN 978-0-415-37734-8.
62. Koolman, J., Röhm, K.-H., Eds.; *Taschenatlas Biochemie des Menschen*; 5th ed.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2019; 254-255; ISBN 978-3-13-241740-3.
63. Moran, L.A., Horton, R.H., Scrimgeour, K.G., Perry, M.D.; *Principles of Biochemistry*; 5th ed.; Pearson: Boston, 2012; 633-634; ISBN 978-0-321-70733-8.
64. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ Method*. *Methods* **2001**, *25*, 402–408, doi:10.1006/meth.2001.1262.
65. Nowrousian, M. *Die Real-Time-PCR in Praktikum der Molekulargenetik: mit 40 Tabellen*; Kück, U., Eds.; Springer: Berlin, 2005; 226-228, ISBN 978-3-540-21166-2.
66. Chavez, K.J.; Garimella, S.V.; Lipkowitz, S. *Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer*. *Breast Dis.* **2011**, *32*, 35–48, doi:10.3233/BD-2010-0307.
67. Lee, A.V.; Oesterreich, S.; Davidson, N.E. *MCF-7 Cells--Changing the Course of Breast Cancer Research and Care for 45 Years*. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*, djv073–djv073, doi:10.1093/jnci/djv073.
68. Yu, S.; Kim, T.; Yoo, K.H.; Kang, K. *The T47D Cell Line Is an Ideal Experimental Model to Elucidate the Progesterone-Specific Effects of a Luminal A Subtype of Breast Cancer*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *486*, 752–758, doi:10.1016/j.bbrc.2017.03.114.
69. Darbre, P.D.; Daly, R.J. *Transition of Human Breast Cancer Cells from an Oestrogen Responsive to Unresponsive State*. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **1990**, *37*, 753–763, doi:10.1016/0960-0760(90)90416-l.
70. Lacroix, M.; Leclercq, G. *Relevance of Breast Cancer Cell Lines as Models for Breast Tumours: An Update*. *Breast Cancer Res. Treat.* **2004**, *83*, 249–289, doi:10.1023/B:BREA.0000014042.54925.cc.
71. Cailleau, R.; Olivé, M.; Cruciger, Q.V. *Long-Term Human Breast Carcinoma Cell Lines of Metastatic Origin: Preliminary Characterization*. *In Vitro* **1978**, *14*, 911–915, doi:10.1007/bf02616120.
72. Hui, R.; Macmillan, R.D.; Kenny, F.S.; Musgrove, E.A.; Blamey, R.W.; Nicholson, R.I.; Robertson, J.F.; Sutherland, R.L. *INK4a Gene Expression and Methylation in Primary Breast Cancer: Overexpression of P16INK4a Messenger RNA Is a Marker of Poor Prognosis*. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2777–2787.

73. Todd, M.C.; Langan, T.A.; Sclafani, R.A. *Doxycycline-Regulated P16MTS1 Expression Suppresses the Anchorage-Independence and Tumorigenicity of Breast Cancer Cell Lines That Lack Endogenous P16*. *J. Cancer* **2017**, *8*, 190–198, doi:10.7150/jca.15481.
74. Deaton, A.M.; Bird, A. *CpG Islands and the Regulation of Transcription*. *Genes Dev.* **2011**, *25*, 1010–1022, doi:10.1101/gad.2037511.
75. Tarze, A.; Deniaud, A.; Le Bras, M.; Maillier, E.; Molle, D.; Larochette, N.; Zamzami, N.; Jan, G.; Kroemer, G.; Brenner, C. *GAPDH, a Novel Regulator of the pro-Apoptotic Mitochondrial Membrane Permeabilization*. *Oncogene* **2007**, *26*, 2606–2620, doi:10.1038/sj.onc.1210074.
76. Purohit, G.K.; Mahanty, A.; Mohanty, B.P.; Mohanty, S. *Evaluation of Housekeeping Genes as References for Quantitative Real-Time PCR Analysis of Gene Expression in the Murrel Channa Striatus under High-Temperature Stress*. *Fish Physiol. Biochem.* **2016**, *42*, 125–135, doi:10.1007/s10695-015-0123-0.
77. Xu, R.-H.; Pelicano, H.; Zhou, Y.; Carew, J.S.; Feng, L.; Bhalla, K.N.; Keating, M.J.; Huang, P. *Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia*. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 613–621.
78. Maier, T.; Güell, M.; Serrano, L. *Correlation of mRNA and Protein in Complex Biological Samples*. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 3966–3973, doi:10.1016/j.febslet.2009.10.036.
79. Aithal, M.G.S.; Rajeswari, N. *Validation of Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Glioblastoma Using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*. *Brain Tumor Res. Treat.* **2015**, *3*, 24, doi:10.14791/btrt.2015.3.1.24.
80. Hara, E.; Smith, R.; Parry, D.; Tahara, H.; Stone, S.; Peters, G. *Regulation of P16CDKN2 Expression and Its Implications for Cell Immortalization and Senescence*. *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 859–867, doi:10.1128/mcb.16.3.859.
81. Kondo, Y.; Shen, L.; Issa, J.-P.J. *Critical Role of Histone Methylation in Tumor Suppressor Gene Silencing in Colorectal Cancer*. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 206–215, doi:10.1128/MCB.23.1.206-215.2003.
82. <https://www.qiagen.com/Us/Products/Discovery-and-Translational-Research/Dna-Rna-Purification/Multianalyte-and-Virus/Allprep-Dnarna-Mini-Kit/#orderinginformation>. *Qiagen AllPrep DNARNA Mini Kit*. (01.02.2021)
83. <https://www.qiagen.com/at/Resources/Resourcedetail?Id=ab2427dc-3da9-412c-8c37-7e78d397b6ac&lang=en> Epitect Fast Bisulfite Conversion Handbook (03.02.2021).
84. <https://www.qiagen.com/Us/Resources/Resourcedetail?Id=41eed6af-3e3d-4085-Ae1b-3607e80539ea&lang=en>. *Q24 Vak. Workstn.* (19.07.2020)
85. <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=f0de5533-3dd1-4835-8820-1f5c088dd800&lang=en> (19.07.2020)
86. Mas-Bargues, C.; Viña-Almunia, J.; Inglés, M.; Sanz-Ros, J.; Gambini, J.; Ibáñez-Cabellos, J.S.; García-Giménez, J.L.; Viña, J.; Borrás, C. *Role of P16INK4a and BMI-1 in Oxidative Stress-Induced Premature Senescence in Human Dental Pulp Stem Cells*. *Redox Biol.* **2017**, *12*, 690–698, doi:10.1016/j.redox.2017.04.002.
87. Zhou, M.; Jin, W.-Y.; Fan, Z.-W.; Han, R.-C. *Analysis of the Expression of the Notch3 Receptor Protein in Adult Lung Cancer*. *Oncol. Lett.* **2013**, *5*, 499–504, doi:10.3892/ol.2012.1033.
88. Programs, U.S.E.P.A.O. of P. *Assigning Values to Non-Detected /Non-Quantified Pesticide Residues in Human Health Food Exposure Assessments*; Office of Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency, 2000;